

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) **BG**

(11) **108128 A**  
7(51) A 61 K 39/395,  
38/17, 48/00  
A 61 P 9/10

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ  
ЗА  
ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 108128  
(22) Заявено на 25.08.2003  
(24) Начало на действие  
на патента от:

Приоритетни данни

(31) 01101959 (32) 29.01.2001 (33) EP

(41) Публикувана заявка в  
бюлетин № 11 на 30.11.2004  
(45) Отпечатано на  
(46) Публикувано в бюлетин №  
на  
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):  
APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOL-  
DING N.V., CURACAO (AN)

(72) Изобретател(и):  
Charles Dinarello, Boulder, CO  
Benjamin Pomerantz  
Leonid Reznikov, Denver, CO  
Alden Harken, Littleton, CO (US)  
Yolande Chvatchko, Confignon (CH)

(74) Представител по индустриална  
собственост:  
Георги Цветанов Перев, 1124 София,  
ул. "Леонардо да Винчи" 3

(86) № и дата на PCT заявка:  
PCT/EP2002/000844, 28.01.2002

(87) № и дата на PCT публикация:  
WO2002/060479, 08.08.2002

**(54) ИЗПОЛЗВАНЕ НА ИНХИБИТОРИ НА ИНТЕРЛЕВКИН-18 ЗА ЛЕЧЕНИЕ И/ИЛИ ПРОФИЛАКТИКА НА СЪРДЕЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ**

(57) Изобретението се отнася до използването на инхибитор на IL-18 за получаването на лекарствено средство за лечение и/или профилактика на сърдечно заболяване, по-специално на исхемична болест на сърцето. Изобретението се отнася и до комбинации от IL-18-инхибитор и TNF-антагонист, използвани за лечение и/или профилактика на сърдечни заболявания.

25 претенции, 8 фигури

**BG 108128 A**

2591/03-ГП

## ИЗПОЛЗВАНЕ НА ИНХИБИТОРИ НА ИНТЕРЛЕВКИН-18 ЗА ЛЕЧЕНИЕ И/ИЛИ ПРОФИЛАКТИКА НА СЪРДЕЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

### Област на техниката

Настоящото изобретение се отнася до областта на сърдечно-съдовите заболявания. По-точно, то се отнася до използването на инхибитор на интерлекин-18 (IL-18) за лечение и/или профилактика на сърдечни заболявания, в частност – на исхемична болест на сърцето.

### Предшестващо състояние на техниката

Цитокинът интерлекин-18 (IL-18) първоначално е описан като индуциращ фактор на интерферон- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Nakamura et al., 1989). Той е ранен сигнал в развитието на Т-лимфоцитните отговори от хелперно-клетъчен тип 1 (ТН1-отговори). IL-18 действа заедно с IL-12, IL-2, антигени, митогени и вероятно други фактори за индуцирането на производството на IFN- $\gamma$ . IL-18 засилва също производството на GM-CSF (гранулоцитно-макрофагеален колонио-стимулиращ фактор) и IL-2, потенцира анти-CD3 индуцираната Т-клетъчна пролиферация и увеличава Fas-медираното убиване от естествените клетки-убийци ("natural killer cells").

Зрелият IL-18 се произвежда от неговия прекурсор посредством IL-1 $\beta$  конвертиращия ензим (ICE, каспаза-1).

IL-18 рецепторът се състои от поне два компонента, коопериращи в свързването на лиганда. Установени са високо- и нискоафинитетни места на свързване за IL-18 в миши IL-12-стимулирани Т-клетки (Yoshimoto et al.,

1998), предполагащи множествен верижен рецепторен комплекс. Досега са установени две рецептори субединици, като и двете спадат към IL-1 рецепторното семейство (Parnet et al., 1996; Kim et al., 2001). Провеждането на сигнала от IL-18 включва активация на NF- $\kappa$ B (некротичен фактор  $\kappa$ B) (DiDonato et al. 1997). IL-18-рецепторният комплекс включва две рецепторни вериги: лиганд-свързваща верига, наречена IL-18R $\alpha$  верига, и сигнал-предаваща верига, наречена IL-18R $\beta$  верига. IL-18R веригата първоначално е била изолирана като клетъчно-повърхностен протеин, свързващ се към радио-маркиран IL-18; протеинът е бил пречистен и неговата аминокиселинна последователност е показала идентичност с по-рано установен орфан-тип рецептор, наречен IL-1R-свързан протеин (IL-1Rrp) (Torigoe et al., 1997).

Наскоро от човешка урина бе изолиран протеин с висок афинитет за IL-18 и бяха клонирани човешката и миша cДНК, както и човешкият ген (Novick et al., 1999; WO 99/09063). Протеинът бе обозначен като IL-18 свързващ протеин (IL-18BP).

IL-18BP не е извънклетъчната област на някой от познатите IL-18 рецептори, а секретирани, естествено циркулиращ протеин. Той спада към ново семейство секретирани протеини, включващо и няколко покс-вирусно кодирани протеини (Novick et al., 1999). Уринарният, както и рекомбинантният IL-18BP, свързват специфично IL-18 с висок афинитет и модулират биологичния афинитет на IL-18.

IL-18BP генът е локализиран в човешката хромозома 11q13 и в 8.3 kВ геномна последователност не е установено ексонно кодиране за трансмембранната област. Досега при хора са установени четири варианта на свързване на изоформите на IL-18BP, генерирани от алтернативно мРНК-свързване. Те са обозначени като IL-18BP a, b, c и d, като всичките имат един и същ N-край и се различават според C-края (Novick et al., 1999).

Тези изоформи се различават по своята способност да свързват IL-18. Известно е, че от четирите hIL-18BP изоформите а и с имат неутрализираща способност за IL-18. Човешката IL-18BP-изоформа реагира кръстосано с мишия IL-18.

Сърдечните заболявания се дефинират като нарушения, които засягат сърдечния мускул или кръвоносните съдове на сърцето (The Merck Manual Home Edition, [www.merck.com](http://www.merck.com)). Съдовото разстройство е проблем на кръвоносните съдове като например лоша циркулация поради блок. Сърдечните заболявания се наричат също сърдечно-съдови нарушения.

Исхемичната болест на сърцето е честа причина за сърдечна слабост и е най-честата причина за смърт в Западните общества. Тя обикновено се предизвиква от атером на коронарна артерия. Миокардните увреждания включват исхемична фиброза и остър инфаркт. При нормални условия кръвният ток в коронарните артерии е строго приспособен към метаболитните изисквания на сърдечния мускул. Исхемична болест на сърцето настъпва, когато кръвоснабдяването става недостатъчно или поради това, че е увредено кръвоснабдяването само по себе си, или поради това, че миокардът става хипертрофичен и има по-голяма нужда от кръвоснабдяване. Коронарният кръвен ток нормално не зависи от аортното налягане. Съществува ефикасен авторегулаторен механизъм за контрол на кръвния ток през коронарното съдово легло.

Когато се развие обструкция в голяма коронарна артерия, обикновено поради атеросклероза или артериосклероза, коронарният кръвен ток в началото е съхранен поради намаляването на периферното съпротивление дистално от обструкцията. Когато луменът на съда е запушен над 75%, настъпва исхемия, особено ако колатералната коронарна циркулация е лошо развита.

Сърдечният мускул е изключително активен метаболитно и митохондриите съставляват над 30% от обема на отделните влакна. Аеробният метаболизъм е съществен, тъй като има много малки резерви от високоенергийни фосфати. Смърт на сърдечния мускул настъпва, когато тъканните нива на аденозин трифосфат (АТФ) са много ниски и когато анаеробната гликолиза е преустановена в действителност. Както и при други тъкани, точната причина за смъртта е неясна, но леталните увреждания на сърдечния мускул са свързани с мембранна увреда и внезапното навлизане на калций в клетъчната цитоплазма. След кратки периоди на исхемия сърдечният кръвен ток може да бъде възстановен (реперфузия). Въпреки това, след критичен интервал реперфузията е невъзможна, вероятно като резултат от набъбване на капилярните ендотелни клетки.

Атеросклерозата е отговорна за повечето от заболяванията на коронарните артерии. Исхемичната болест на сърцето може да бъде също резултат от слаба коронарна артериална перфузия. Кръвонапълването, особено в резултат на хеморагия, е честа причина за това.

Както бе посочено по-горе, исхемичната болест на сърцето се причинява от дисбаланс между миокардния кръвен ток и метаболитните изисквания на миокарда. Кръвният ток може да бъде намален допълнително и от насложени се събития като вазоспазъм, тромбоза или циркулаторни промени, водещ до хипоперфузия.

Перфузията в коронарните артерии зависи от разликата в налягането между изходните отвори (аортно диастолно налягане) и коронарния синус (дясно предсърдно налягане). Коронарният кръвен ток е намален по време на диастола поради ефекта на Вентури върху коронарните отвори и компресията на интрамускулните артерии по време на камерното съкращение. Факторите, намаляващи коронарния кръвен ток, включват

намалено аортно диастолно налягане, увеличено вътрекамерно налягане и миокардно съкращение, стеноза на коронарна артерия, стеноза на аортната клапа и регургитация (=връщане на кръвта) и увеличено дясно предсърдно налягане.

Тромболитичната терапия със средства като стрептокиназа или тъканен плазминогенен активатор (ТРА) често се използва за разграждане на наскоро образуван тромб. Такова лечение с разграждане на тромба може да възстанови кръвния ток в повечето случаи. Това помага за предотвратяване на значимо миокардно увреждане, ако стане рано (по-малко от около час) в хода на събитията и може поне да помогне за намаляването на по-нататъшни увреждания.

Ангина пекторис ("гръдна жаба", стенокардия) е комплекс от симптоми на исхемичната болест на сърцето, характеризиращ се с внезапни пристъпи от гръдна болка, обикновено под гръдната кост или пред сърцето. Той се причинява от миокардна исхемия, която е кратка, за да предизвика инфаркт. Може да настъпи внезапна сърдечна смърт, което е неочаквана смърт от сърдечни причини, обикновено в рамките на един час след сърдечен пристъп или без изява на симптоми. Тя засяга 300 000 – 400 000 души годишно.

Други форми на сърдечни заболявания включват алкохолната кардиомиопатия, пролапс на аортната клапа, стеноза на аортната клапа, аритмии, кардиогенен шок, вродено сърдечно заболяване, дилатативна кардиомиопатия, сърдечен пристъп, сърдечна слабост, сърдечен тумор, стеноза на белодробната сърдечна клапа, хипертрофична кардиомиопатия, исхемична болест на сърцето, исхемична кардиомиопатия, митрална регургитация, пролапс на митралната клапа, родилна кардиомиопатия, стабилна стенокардия.

Миокардният инфаркт е друга форма на исхемичната болест на сърцето. Патогенезата може да включва оклузивен интракоронарен тромб, т.е. тромб, разположен върху разязвена или нацепена стенотична плака. Оклузивният интракоронарен тромб причинява 90% от трансмуралните остри миокардни инфаркти. Вазоспазмът може да бъде със или без коронарна атеросклероза и възможна връзка с агрегацията на тромбоцитите. Емболите могат също да бъдат налице при исхемичния инфаркт.

Общият морфологичен вид на миокардния инфаркт може да е различен. Трансмуралният инфаркт ангажира цялата дебелина на лявата камерна стена от ендокарда до епикарда. Субендокардният инфаркт ангажира многоогнищни области на некроза, ограничени до вътрешната 1/3-1/2 от лявата камерна стена. Усложненията на миокардния инфаркт могат да включват аритмии и проводни дефекти с възможна "внезапна смърт", разширяване на инфаркта или повторно инфарциране, застойна сърдечна слабост (белодробен оток), кардиогенен шок, перикардит, пристенна тромбоза с възможна емболизация, руптура на миокардната стена с възможна тампонада, руптура на папиларен мускул с възможна клапна недостатъчност, образуване на камерна аневризма.

Миокардният инфаркт (MI) се дефинира като исхемична миокардна некроза, обикновено резултат от внезапно намаляване на коронарния кръвен ток към сегмент от миокарда.

При над 90% от пациентите с остър MI остро образуван тромб, често свързан с руптура на плака, запушва артерията (предварително частично запушена от атеросклеротична плака), която кръвоснабдява увредената област. Нарушената функция на тромбоцитите, предизвикана от ендотелната промяна в атеросклеротичната плака, вероятно допринася за тромбогенезата. Спонтанна тромболиза настъпва при около 2/3 от

пациентите, така че 24 часа по-късно тромботично запушване се установява само при около 30%.

Миокардният инфаркт понякога се причинява от артериална емболизация (например при митрална или аортна стеноза, инфекциозен ендокардит или марантичесен ендокардит). Миокарден инфаркт може да се наблюдава при пациенти с коронарен спазъм и нормални коронарни артерии. Кокаинът предизвиква интензивен коронарен артериален спазъм и употребяващите го могат да се представят с кокаин-предизвикана стенокардия или миокарден инфаркт. Аутопсионни проучвания и коронарна ангиография са показали, че кокаин-предизвиканата коронарна тромбоза може да настъпи в нормални коронарни артерии или да се насложи върху предварително съществуващ атером.

Миокардният инфаркт е предимно заболяване на лявата камера, но увредата може да се разпространи и в дясната камера (ДК) или предсърдията. Инфарктът на дясната камера обикновено е следствие от запушване на дясната коронарна или доминиращата лява циркумфлексна артерия и се характеризира с високо налягане на пълнене в дясната камера, често с тежка трикуспидална регургитация и намалено изтласкване от сърцето. Известна дисфункция на дясната камера може да настъпи в около половината от пациентите с долно-заднен инфаркт, предизвикващ хемодинамично нарушение в 10 до 15%.

Способността на сърцето да продължава функционирането си като помпа е директно свързана с размера на миокардната увреда.

Трансмуралните инфаркти засягат цялата дебелина на миокарда от епикарда до ендокарда и обикновено се характеризират с абнормни Q-вълни в ЕКГ. Не-трансмуралните или субендокардни инфаркти не преминават през камерната стена и предизвикват само отклонения в ST-сегмента или T-вълната. Субендокардните инфаркти обикновено ангажират

вътрешната 1/3 от миокарда, където напрежението на стената е по-високо и миокардният кръвен ток е най-раним при циркулаторни промени. Те могат също да последват продължително състояние на понижено налягане. Тъй като трансмуралната дълбочина на некрозата не може да бъде прецизно определена клинично, инфарктите се класифицират по-добре чрез ЕКГ като Q-вълнови и не-Q-вълнови. Обемът на увредения миокард може да бъде определен чрез степента и продължителността на повишаването на СК (креатинкиназата).

Исхемичната кардиомиопатия е друго заболяване в рамките на исхемичната болест на сърцето. При това състояние може да е налице предхождащ миокарден инфаркт, но заболяването е резултат от тежка коронарна атеросклероза, засягаща всички основни клонове. Резултатът е неадекватно кръвоснабдяване, което води до загуба на миоцити. Загубата на миоцити, свързана с фиброза под формата на интерстициално колагеново отлагане, води до намален комплайънс, който, заедно с придружаващата сърдечна дилатация, води до свръхнатоварване на останалите миоцити. Това поддържа процеса с компенсация от продължаващата хипертрофия на миоцитите. Може дори да има компенсация чрез хиперплазия и хипертрофия, което може да обясни огромната големина (2 до 3 пъти над нормата) на такова сърце. Евентуално, сърцето не може да компенсира повече и се явява сърдечна слабост с аритмии и/или исхемични инциденти. Следователно, клинично е налице бавна, прогресивна сърдечна слабост със или без данни за предшестващ миокарден инфаркт или стенокардна болка. Исхемичната кардиомиопатия е отговорна за поне 40% от смъртността от исхемична болест на сърцето.

По време на исхемията, както и на реперфузията на сърцето, се произвеждат многобройни ендогенни медиатори като например

малкомолекулни вторични месенджери, които повлияват миокардната функция. В рамките на минути от началото на един исхемичен епизод миокардната съкратителна сила намалява и общото възстановяване на съкратителната сила зависи много от продължителността на исхемичния период (Daemen et al., 1999). Например, по време на исхемичен инцидент,  $\text{Ca}^{2+}$ -хомеостазата е нарушена, генерират се производни на кислорода свободни радикали и започва синтеза и освобождаване на азотен оксид (NO). В допълнение, налице е и локално производство на цитокини, особено  $\text{TNF}\alpha$  и  $\text{IL-1}\beta$  (Bolli, 1990). В интактното сърце тези цитокини допринасят за исхемично предизвиканата миокардна дисфункция чрез предизвикване на генната експресия за индуцируема NO-синтаза (iNOS) (Daemen et al., 1999), циклооксигеназа-2 (COX-2) и фосфолипаза A2, както и на съдови адхезионни молекули и различни хемокини. Като резултат е налице незабавно потискане на миокардната съкратителна сила, медирано от малкомолекулните медиатори, последвано от цитокин-медираното неутрофилно инфилтриране, което уврежда допълнително сърдечния мускул. Проучвания върху животински сърца в отсъствието на кръв или кръвни продукти дават данни за участие на  $\text{TNF}\alpha$  (Herskowitz et al., 1995) и  $\text{IL-1}\beta$  по време на исхемичното събитие (Meldrum et al., 1998).

Повечето от експерименталните данни за  $\text{TNF}\alpha$ - и  $\text{IL-1}\beta$ -медираната миокардна дисфункция са от животински проучвания. Въпреки това, човешките миокардни тъкани от пациенти, прекарвали процедури на елективен сърдечно-белодробен байпас, са проучени в контролирани, *ек vivo* условия (Gurevitch et al., 1996; Cleveland et al., 1997). В този експериментален модел човешки атриални трабекули (=мускулни снопчета под формата на колонки=трабекули) са суспендирани в свободна от кръв, физиологично оксигенирана буферна вана и след това са подложени на епизод от симулирана исхемия. През това време съкратителната сила

намалява драматично; когато тъканта е отново експонирана на кислород, съкратителната сила се възобновява, но е намалена (60-70% намаление) и се наблюдават данни за миокардна увреда посредством освобождаването на креатинкиназа (СК) (Gurevitch et al., 1996; Cleveland et al., 1997). Когато биоактивността на TNF е специфично неутрализирана по време на исхемия/реперфузия (I/R), се наблюдава по-голямо възстановяване на съкратителната сила, което предполага, че ендогенната миокардна TNF-активност допринася за съкратителната дисфункция, предизвикана от исхемичното събитие (Cain et al., 1999).

Daemen и сътр. (1999) са проучвали тъканната увреда като последствие от исхемия, последвана от реперфузия, използвайки миши модел на бъбречна исхемия. Те са показали, че бъбречната свръхрегулацията на IL-18-mPHK съвпада с активацията на каспаза-1 на първия ден след исхемията. IFN- $\gamma$  и IL-12 mPHK са свръхрегулирани на ден 6 след исхемията. Съчетано, а не поотделно, *in vivo* неутрализиране на IFN- $\gamma$ -индуциращите цитокини IL-12 и IL-18 намаляват IFN- $\gamma$ -зависимата МНС клас I и II свръхрегулация в сходна степен, както и IFN- $\gamma$ -неутрализацията.

Въпреки това, досега не е установено IL-18 да играе роля при сърдечните заболявания.

#### Техническа същност на изобретението

Изобретението се основава на откритието, че инхибитор на IL-18 съществено подобрява съкратителната функция на сърцето в модел на исхемия/реперфузия на супрафузиран (=изцяло потопен в течност) човешки предсърден миокард. Инхибицията на каспаза-1 (ICE) също намалява потискането на съкратителната сила след исхемия и реперфузия.

Освен това, приложението на IL-18-инхибитор в миши модел на миокарден инфаркт води до увеличено преживяване и значително подобрене на камерната функция.

Тези проучвания демонстрират, че инхибиторите на IL-18 са подходящи за лечение или профилактика на миокардна дисфункция.

Поради това, настоящото изобретение се отнася до използването на инхибитор на IL-18 в производството на лекарствено средство за лечение и/или профилактика на сърдечни заболявания, в частност на исхемична болест на сърцето и /или сърдечна слабост.

С цел да се приложи генен терапевтичен подход при доставянето на IL-18-инхибитора в болестната тъкан или клетка, изобретението се отнася и до използването на експресионен вектор, включващ кодиращата последователност на един IL-18-инхибитор, за лечение и/или профилактика на сърдечно заболяване.

#### Кратко описание на рисунките

Фигура 1: показва ефекта на IL-18BP при предизвикана от исхемия миокардна съкратителна дисфункция.

(A) Кинетичен отговор при исхемична травма. След еквилибриране (изравняване, =екв.), контролните трабекули са супрафузирани при нормоксични условия по време на експеримента. Трабекулите са подложени на исхемия/реперфузия в отсъствието или присъствието на IL-18BP (5 мкгг/мл). Вертикалната ос показва процента развита сила, в сравнение с началото на експеримента (нулево време). Данните са получени от трабекули на един пациент и са представителни за методите, използвани за изчисляване на средната промяна в развитата сила на 90-тата минута.

- (B) пост-исхемично развита сила след неутрализиране на IL-18 с 1 или 5 мкггг/мл IL-18BP. Резултатите са представени като средни процентни промени в развитата сила спрямо контролите след завършване на реперфузията (90-та минута). Числата в скобите показват IL-18BP в мкггг/мл. N=6. \*  $p < 0.01$  в сравнение с I/R.

Фигура 2: показва миокардното съдържание на IL-18 протеин. Трабекулите са хомогенизирани след 90-минути от супрафузията при нормоксични условия (контроли) или 45 минути след 30-минутна исхемия (I/R). Трабекулите са взети от същите субекти. Нивата на IL-18 са показани на вертикалната ос в пкггг/мл. N=4. \*  $p < 0.01$ .

Фигура 3: показва нивата на IL-18 и IL-18BP mRNA при стабилното състояние в контролна и исхемичната предсърдна тъкан. Нивата на IL-18 и IL-18BP mRNA са определени чрез RT-PCR. Данните са от един от два изследвани субекта. А показва агарозен гел, оцветен с етидиумбромид, в който са разделени PCR-продуктите, а В показва резултатите от количественото определяне на количеството РСТ-продукт като кратна промяна спрямо контролата (GAPDH).

Фигура 4: показва ефектите на ICE-инхибицията върху пост-исхемично развитата сила. Резултатите са изразени като средна процентна промяна в развитата сила спрямо контролната след исхемия/реперфузия (I/R). Числата в скобите означават

концентрацията на ICEi в мкгр/мл. N=7. \*  $p < 0.01$  в сравнение с I/R.

Фигура 5: показва увеличаването на тъканната активност на креатинкиназата (СК) след I/R. СК е изразена в единици активност на милиграм мокро тегло от тъканта. Експерименталните условия са под хоризонталната ос. Контроли и I/R, N=6; IL-18BP (5 мкгр/мл), N=5; ICEi (10 и 20 мкгр/мл), N=5 всяка; \*  $p < 0.05$  в сравнение с I/R.

Фигура 6: показва средната промяна в развитата сила спрямо развитата сила след периода на еквилибриране, нагласена на 100% (n=5), за трабекулите, инкубирани с 10 мкгр/мл за 15 минути, преди добавянето на  $TNF\alpha$  (1 нгр/мл).  $TNF\alpha$  и IL-18BP са добавяни при всяка промяна в ваната.

Фигура 7: показва времевия отговор на човешки предсърдни трабекули към IL-18 при нормоксични условия. Добавян е зрял IL-18 (100 нгр/мл) към предсърдни трабекули през целия експериментален период. Вертикалната ос показва средната процентна промяна от изходната развита сила. Изходното ниво е определено на края на периода на еквилибриране (не е показан). (n=6).  
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$  в сравнение с контролите за същия времеви интервал и за остатъка от експерименталния период.

Фигура 8: показва съхранението на мускулно-клетъчната тъканна активност на креатинкиназата след излагане на I/R,  $TNF\alpha$  (10

нгр/мл) + IL-18BP. СК-активността е изразена в единици СК-активност на милиграм от теглото на мокра тъкан. (n=6).

Подробно описание на изобретението

Настоящото изобретение се основава на откритието, че IL-18 инхибиторите имат благоприятен ефект при сърдечни заболявания, в частност при исхемична болест на сърцето. Както е показано в примерите по-долу, няколко различни IL-18 инхибитори имат значителен благоприятен ефект върху постисхемично развиваната сила на сърдечния мускул.

В допълнение към това, един IL-18 инхибитор е тестван в *in vivo* модел на миокарден инфаркт и е довел до увеличена преживяемост и значително подобрена камерна функция.

Поради това, изобретението се отнася до използването на един IL-18-инхибитор за производство на лекарствено средство за лечение и/или профилактика на сърдечни заболявания.

Съгласно настоящото изобретение, терминът "сърдечно заболяване" включва заболявания със сърдечна дисфункция. Те най-общо се наричат сърдечно-съдови нарушения.

В предпочитано изпълнение на изобретението сърдечното заболяване е исхемичната болест на сърцето.

Терминът "исхемична болест на сърцето" според употребата му тук, включва различни видове исхемична сърдечна болест, включително, но не ограничено до тези, разяснени подробно в "Предшестващото състояние на техниката", както и сърдечно-съдови заболявания или нарушения, свързани с исхемичната болест на сърцето.

Приложението съгласно изобретението е много подходящо за дългосрочно лечение и поради това е от полза във връзка с хронични

сърдечни заболявания. Поради това, в предпочитано изпълнение на изобретението, исхемичната болест на сърцето е хронична. Стенокардията или ангина пекторис е една от най-честите клинични прояви при пациентите с дълга история на исхемична болест на сърцето. Увредената левокамерна функция след един или повече епизоди на миокарден инфаркт може да доведе до левокамерна, и накрая до застойна сърдечна слабост. Поради това, изобретението се отнася и до използването на IL-18 инхибитор за лечение и/или профилактика на стенокардия.

В друго предпочитано изпълнение исхемичната болест на сърцето е остра и по-предпочитано тя е миокарден инфаркт.

Острото миокардно сърдечно заболяване или миокардният инфаркт обикновено включва некроза на сърдечния мускул, най-често на лявата камера. Той често е в резултат на атером на коронарна артерия с насложен тромб или кървяща плака. Некрозата се последва от възпалително инфилтриране и освобождаване на ензими за фиброзно възстановяване от некротичния мускул в кръвта, както и от левкоцитоза, които са от диагностична полза. Усложненията на острия миокарден инфаркт включват аритмии, сърдечна слабост, миокардна руптура, водеща до хемоперикард, мурален (пристенен) тромб, водещ до емболизъм, и сърдечна аневризма. Другите усложнения включват внезапна смърт, аритмии, постоянна болка, стенокардия, сърдечна слабост, митрална недостатъчност, перикардит, руптура на сърцето (камерна, на преградата или на папиларен мускул), мурална тромбоза, камерна аневризма, синдром на Dressler (гръдна болка, фебрилитет, ефузии), белодробни емболи. Лекарственото средство съгласно изобретението може също да бъде от полза в лечението и/или профилактиката на тези усложнения на миокардният инфаркт.

В друго предпочитано изобретение сърдечното заболяване и кардиална или сърдечна слабост. Сърдечната слабост е болестно

състояние, при което сърцето е неспособно да изпомпва кръв в желаната за нормалния метаболизъм степен. При почти всички форми на сърдечна слабост изтласкването от сърцето е намалено, като това причинява степен на намалена перфузия, която се нарича недостатъчно артериално пълнене. Тялото компенсира чрез запазване на течностите и увеличен кръвен обем. Сърдечната слабост може да бъде остра или хронична. В ранните стадии клиничните белези на сърдечната слабост могат да изглеждат едностранни, но поради това, че междукамерната преграда между дясната и лявата камера е обща, става неизбежно сърдечната слабост на една камера да се последва от слабост на другата. Сърдечната слабост може да бъде следствие от исхемична болест на сърцето. Тя може да бъде и поради други причини като системна хипертония, клапна болест на сърцето или белодробно заболяване, водещо до застойна сърдечна слабост.

Сърдечната слабост може да бъде застойна сърдечна слабост, която е симптоматична миокардна дисфункция, водеща до характерен модел на хемодинамични, бъбречни и неврохормонални отговори. Клиничните изяви на сърдечната слабост могат да бъдат левокамерна слабост или деснокамерна слабост. Сърдечната слабост се изразява в систолна или диастолна дисфункция, или и двете. Съчетаните систолни и диастолни абнормности са чести.

В още едно предпочитано изпълнение сърдечното заболяване е кардиомиопатия. Кардиомиопатията е всяка структурна или функционална абнормност на камерния миокард.

Терминът “профилактика” в контекста на изобретението се отнася не само до пълно предотвратяване на определен ефект, но и до всяко частично или основно предотвратяване, потискане, редуциране, понижаване или намаляване на ефекта преди или в началото на болестта.

Терминът “лечение” в контекста на това изобретение се отнася до всяко молекулно-модулиращо IL-18-производство и/или действие по такъв начин, че IL-18-производството и/или действието е потиснато, намалено, или частично, основно или напълно предотвратено или блокирано.

Инхибитор на производството може да бъде всяка молекула, повлияваща отрицателно синтеза, развитието или узряването на IL-18. Инхибиторите, обсъждани съгласно изобретението, могат да бъдат, например, супресори на генната експресия на IL-18 mRNA или водещи до разграждане на mRNA; протеини, нарушаващи правилното оформяне, или частично или основно предотвратяващи секрецията на IL-18; протеази, разграждащи IL-18 след неговото синтезиране; инхибитори на протеазите, разцепващи pro-IL-18 с цел генериране на зрял IL-18 като например инхибитори на каспаза-1 и други такива.

Инхибитор на IL-18-действието може да бъде, например, IL-18-антагонист. Антагонистите могат да свързват или да секвестрират (отделят) IL-18-молекулата с достатъчно афинитет и специфичност за частично или основно неутрализиране на IL-18 или на свързващите места на IL-18, отговорни за IL-18-свързването към неговите лиганди (например към неговите рецептори). Антагонистът може също да инхибира сигналния път на IL-18, който се активира в клетките след свързването IL-18/рецептор.

Инхибиторите на IL-18-действието могат също да бъдат разтворими IL-18-рецептори или молекули, наподобяващи рецепторите, или средства, блокиращи IL-18-рецепторите, или IL-18-антитела като поликлонални или моноклонални антитела, или всяко друго средство или молекула, предотвратяващо свързването на IL-18 към неговите мишени, намаляващи или предотвратяващи по този начин задействането на интра- или екстрацелуларните клетъчни реакции, медиранни от IL-18.

В предпочитано изпълнение на настоящото изобретение инхибиторът на IL-18 е избран от инхибитори на каспаза-1 (ICE), антитела срещу IL-18, антитела срещу всяка от IL-18-рецепторните субединици, инхибитори на IL-18-сигналния път, антагонисти на IL-18, които се конкурират с IL-18 и блокират IL-18-рецептора, и IL-18-свързващи протеини, изоформи, мутеини, сляти протеини, функционални производни, активни фракции или кръгово променени негови производни, инхибиращи биологичната активност на IL-18.

Терминът "IL-18-свързващи протеини" се използва тук синонимно на "IL-18-свързващ протеин" или "IL-18BP". Той включва IL-18-свързващите протеини съгласно определението в WO 99/09063 или от Novick et al., 1999, включително слети варианти и/или изоформи на IL-18-свързващи протеини, съгласно определението от Kim et al., 2000, които свързват IL-18. В частност, човешките изоформи а и с на IL-18BP са приложими в съгласие с настоящото изобретение. Протеините, които са от полза, съгласно настоящото изобретение, могат да бъдат гликозилирани или негликозилирани; те могат да бъдат производни на естествени източници като урина или да са предпочитано получени по рекомбинантен път. Рекомбинантната експресия може да бъде извършена в прокариотни експресионни системи като *E.coli* или в еукариотни, а предпочитано – в експресионни системи от бозайник.

Според употребата тук терминът "мутеини" се отнася до аналози на IL-18BP или аналози на вирусния IL-18BP, в които един или повече от аминокиселинните остатъци на естествен IL-18BP или вирусен IL-18BP са заменени с различни аминокиселинни остатъци, или са отстранени, или един или повече аминокиселинни остатъци са добавени към естествената последователност на IL-18BP, или на вирусен IL-18BP, без да се променя съществено активността на получените продукти в сравнение с дивия тип

IL-18BP или вирусния IL-18BP. Тези мутеини се получават чрез познати техники на синтеза и/или чрез насочена към определено място мутагенеза, или други известни техники, приложими за тази цел.

Мутеините в съответствие с настоящото изобретение включват протеини, кодирани от една нуклеинова киселина като ДНК или РНК, които хибридизират към ДНК или РНК, които кодират IL-18BP или кодират вирусен IL-18BP, в съгласие с настоящото изобретение и при стриктни условия. Терминът "стриктни условия" се отнася до условията на хибридизация и последващо промиване, които специалистите в областта обикновено обозначават като "стриктни". Виж Asubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, по-горе Interscience, N.Y., §§6.3 и 6.4 (1987, 1992) и Sambrook et al., по-горе. Без ограничения, примерите за стриктни условия включват условията на промиване 12-20°C под изчислената температура на топене на хибрида в проучване, например 2 x SSC и 0.5% SDS за 5 минути; 2 x SSC и 0.1% SDS за 15 минути; 0.1 x SSC и 0.5% SDS при 37°C за 30-60 минути и след това 0.1 SSC и 0.5% SDS при 68°C за 30-60 минути. Специалистите в областта ще разберат, че стриктността на условията зависи също от дължината на ДНК-последователностите, олигонуклеотидните проби (като например 10-40 основи) или смесените олигонуклеотидни проби. Ако се използват смесени проби, предпочитано е да се използва тетраметиламониев хлорид (TMAC) вместо SSC; виж Asubel, по-горе.

Всеки такъв мутеин предпочитано има последователност от аминокиселини, достатъчно дупликативна спрямо тази на IL-18BP или достатъчно дупликативна за вирусния IL-18BP, като има активност, сравнима с тази на IL-18BP. Една от активностите на IL-18BP е да свързва IL-18. Колкото по-дълго мутеинът има основната способност да свързва IL-18, толкова повече той може да бъде използван в пречистването на IL-18,

например посредством афинитетна хроматография, и следователно да се приеме, че притежава по същество сходна активност с IL-18BP. Следователно, може да бъде определено, дали всеки мутеин има по същество същата активност, както IL-18BP, което се извършва посредством рутинно експериментиране, включващо подлагане на такъв мутеин, например, към анализ при просто "sandwich" конкуриране, което определя дали той свързва или не съответно маркирания IL-18, както е например в радиоимунологичния анализ или ELISA-анализа.

В предпочитано изпълнение всеки такъв мутеин има поне 40% идентичност или хомология с последователността на IL-18BP или на вирусно-кодирания IL-18BP-хомолог, както е описано в WO 99/09063. По-предпочитано, той има поне 50%, поне 60%, поне 70%, поне 80% или най-предпочитано – поне 90% идентичност или хомология с него.

Мутеините на IL-18BP-полипептидите или мутеините на вирусни IL-18BP, които могат да бъдат използвани в съответствие с изобретението, или нуклеинови киселини, които ги кодират, включват определен набор от съответстващи последователности като заместващи пептиди или полинуклеотиди, които могат да бъдат получени рутинно от специалист в областта, без извънредно експериментиране и на основата на техниките и насоките, представени тук.

Предпочитани промени за мутеините в съответствие с настоящото изобретение са тези, познати като "консервативни" замествания. Консервативните аминокиселинни замествания на IL-18BP-полипептидите или протеините, или на вирусните IL-18BP, могат да включват синонимни аминокиселини в рамките на група, които имат достатъчно сходни физикохимични свойства, така че заместването между членове на групата да съхрани биологичната функция на молекулата (Grantham, 1974). Ясно е, че инсерции и делеции на аминокиселини могат също така да бъдат

направени в горепосочените последователности, без да променят тяхната функция, особено ако инсерциите или делециите ще включват само няколко аминокиселини, например под тридесет, и предпочитано под десет, и няма да отстраняват или заместват аминокиселини, които са критични за функционалното изграждане, например цистеинови остатъци. Протеините и мутеините, получени чрез такива делеции и/или инсерции, влизат в обсега на настоящото изобретение.

Предпочитано, синонимните аминокиселинни групи са тези, показани в Таблица 1. По-предпочитано синонимните аминокиселинни групи са тези, показани в Таблица 2; и най-предпочитано синонимните аминокиселинни групи са тези, показани в Таблица 3.

### ТАБЛИЦА 1

Предпочитани групи на синонимни аминокиселини

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

ТАБЛИЦА 2

По-предпочитани групи от синонимни аминокиселини

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

## ТАБЛИЦА 3

Най-предпочитани групи от синонимни аминокиселини

Аминокиселина	Синонимна група
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser

His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

Примерите за получаване на аминокиселинни замествания в протеини, които могат да бъдат използвани за получаване на мутеини на IL-18BP-полипептиди или протеини, или мутеини на вирусни IL-18BP за приложение в настоящото изобретение включват всички познати методи като тези, представени в Патенти на САЩ 4,959,314 и 4,737,462 от Mark et al.; 5,116,943 от Koths et al.; 4,965,195 от Namen et al.; 4,879,111 от Chong et al., и 5,017,691 от Lee et al.; и лизин-заместени протеини, представени в Патент на САЩ № 4,904,584 (Shaw et al.).

Терминът “слят протеин” се отнася до полипептид, съдържащ IL-18BP или вирусен IL-18BP, или негов мутеин или фрагмент, слят с друг протеин, който, например, има удължено време на пребиваване в телесните течности. Един IL-18BP или вирусен IL-18BP може да бъде слят с друг протеин, полипептид и подобни, например имуноглобулин или негов фрагмент.

“Функционални производни” според употребата тук означава производни на IL-18BP или вирусен IL-18BP и техните мутеини и слети протеини, които могат да бъдат получени от функционални групи, което става при страничните вериги на остатъците или на N- или C-крайните групи, посредством методи, известни в областта, като те са включени в изобретението, доколкото са фармацевтично приемливи, т.е. не нарушават активността на протеина, която е по същество сходна с активността на IL-

18BP или вирусния IL-18BP, и нямат токсични качества в съставите, които ги съдържат.

Тези производни могат, например, да включват полиетиленгликолови странични вериги, които могат да маскират антигенни места и да удължават пребиваването на един IL-18BP или вирусен IL-18BP в телесните течности. Други производни включват алифатни естери на карбоксилните групи, амиди на карбоксилните групи чрез реакция с амоняк или с първични или вторични амини, N-ацилови производни на свободни аминокиселинни остатъци, образувани с ацилови радикали, например алканоил или карбоциклени ароилови групи) или O-ацилови производни на свободни хидроксилни групи (например тези на сериловите или треонилови остатъци), образувани с ацилови радикали.

Като "активни фракции" на един IL-18BP или вирусен IL-18BP, мутени или слети протеини, настоящото изобретение покрива всеки фрагмент или прекурсор на полипептидни вериги от полипептидната верига на протеиновата молекула, самостоятелно или заедно със асоциирани молекули или остатъци, свързани към нея, например захарни или фосфатни остатъци, или агрегати от протеиновата молекула или захарния остатък сами по себе си, при условие, че тази фракция има по същество сходна активност с IL-18BP.

В друго предпочитано изпълнение на изобретението инхибиторът на IL-18 е антитяло, насочено срещу IL-18 или неговия рецептор, IL-18R. Антителата, насочени срещу всяка от IL-18R-субединиците, наречени IL-18R $\alpha$  и  $\beta$ , могат да бъдат използвани в съгласие с настоящото изобретение.

Антителата съгласно изобретението могат да бъдат поликлонални или моноклонални, химерни, хуманизирани или дори напълно човешки. Рекомбинантните антитела и фрагменти от тях се характеризират с висок свързващ афинитет за IL-18 или IL-18R *in vivo* и ниска токсичност.

Антителата, които могат да бъдат използвани в изобретението, се характеризират с тяхната способност за лечение на пациенти за период, достатъчен за постигане на добър до отличен резултат като възстановяване или намаляване на патогенното състояние или всеки симптом или група от симптоми, свързани с патогенно условие, както и ниска токсичност.

Неутрализиращите антитела лесно се повишават при бозайници като зайци, кози или мишки чрез имунизация с IL-18 или IL-18R $\alpha$  или  $\beta$ . Имунизираниите мишки са особено подходящи за осигуряване на източници на В-клетки за получаване на хибридоми, които, от своя страна, се култивират за получаване на големи количества от анти-IL-18 моноклонални антитела.

Химерните антитела са имуноглобулинови молекули, характеризирани се с два или повече сегмента или участъци, производни от различни животински видове. Общо, променливата област на химерното антитяло е производна от не-човешко антитяло от бозайник като мише моноклонално антитяло, а имуноглобулиновата постоянна област е производна на човешка имуноглобулинова молекула. Предпочитано, двете области и съчетанието имат ниска имуногенност при рутинно определяне (Elliott et al., 1994). Хуманизираните антитела са имуноглобулинови молекули, създадени чрез техники на генетичното инженерство, при които мишите постоянни области са заменени с човешки заменяеми участъци, като се запазват мишите области за антигенното свързване. Полученото мише-човешко химерно антитяло предпочитано има намалена имуногенност и подобрена фармакокинетика при хора (Knight et al., 1993).

Следователно, в друго предпочитано изпълнение IL-18- или IL-18R-антитялото е хуманизирано антитяло. Предпочитани примери за

хуманизирани анти-IL-18 антитела са описани, например, в Европейска Патентна Заявка EP 0 974 600.

В още едно предпочитано изпълнение антитялото е изцяло човешко. Технологиата на получаване на човешки антитела е описана подробно, например в WO 00/76310, WO 99/53049, US 6,162,963 или AU 5336100.

Един метод за получаване на изцяло човешки антитела се състои от "хуманизиране" на миша хуморална имунна система, т.е. получаване на миши клонове, способни да произвеждат човешки имуноглобулин (Ig) (Хепомісе) чрез включване на човешки имуноглобулинови локуси в мишката, в които ендогенните Ig-гени са били инактивирани. Ig-локусите са комплексни както по отношение на тяхната физична структура и генно реаранжиране, така и на експресионните процеси, необходими за окончателното произвеждане на широк имунен отговор. Разнообразието на антитела първично се генерира чрез комбинаторно реаранжиране между различните V, D и J гени, намиращи се в Ig-локусите. Тези локуси съдържат също пръснати регулаторни елементи, които контролират антитяло-експресията, алелното изключване, прехвърлянето в класовете и узряването на афинитета. Включването на не-реаранжирани човешки Ig-трансгени в мишка е демонстрирало, че устройствата за рекомбинация на мишката са съвместими с човешките гени. Нещо повече, хибридомите, секретирани антиген-специфични hu-mAbs (човешки моноклонални антитела) от различни изотипове, могат да бъдат получени от Хепомісе-имунизирани с антиген.

Изцяло човешките антитела и методите за тяхното получаване са познати в областта (Mendez et al. (1997); Buggemann et al. (1991); Tomizuka et al. (2000), Патент WO 98/24893).

В особено предпочитано изпълнение на настоящото изобретение инхибиторът на IL-18 е IL-18BP или една изоформа, мутеин, слят протеин,

функционално производно, активна фракция или кръгово променено негово производно. Тези изоформи, мутеини, слети протеини или функционални производни запазват биологичната активност на IL-18BP, в частност да свързват IL-18, и предпочитано имат по същество поне една активност, сходна с IL-18BP. В идеалния случай такива протеини имат повишена биологична активност в сравнение с немодифициран IL-18BP. Предпочитаните активни фракции имат активност, която е по-добра от активността на IL-18BP, или имат други предимства като по-добра стабилност или по-ниска токсичност, или имуногенност, или се получават по-лесно в големи количества, или се пречистват по-лесно.

Последователностите от IL-18BP и неговите слети варианти/изоформи могат да бъдат взети от WO 99/09063 от Novick et al., 1999, и от Kim et al., 2000.

Функционалните производни на IL-18BP могат да бъдат свързани към полимери с цел подобряване на качествата на протеина като стабилност, полуживот, бионаличност, поносимост от човешкото тяло или имуногенност. За постигане на тази цел IL-18BP може да бъде свързан, например, към полиетиленгликол (PEG). PEG-илирането може да бъде извършено чрез познатите методи, описани, например в WO 92/13095.

Поради това, в предпочитано изпълнение на изобретението инхибиторите на IL-18 и в частност IL-18BP са PEG-илирани.

В друго предпочитано изпълнение на изобретението инхибиторът на IL-18 съдържа имуноглобулиново сливане, т.е. IL-18-инхибиторът е слят протеин, съдържащ всичко или част от един IL-18-свързващ протеин, който е слят с целия или част от имуноглобулин. Методите за получаване на имуноглобулиново слети протеини са добре известни в областта, като например тези, описани в WO 01/03737. Специалистът в областта ще разбере, че полученият слят протеин от изобретението запазва

биологичната активност на IL-18BP, в частност – да свързва IL-18. Сливането може да бъде директно или посредством къс свързващ пептид, който може да бъде с дължина 1 до 3 аминокиселинни остатъка или по-дълъг, например, 13 до 20 аминокиселинни остатъка. Посочената свързваща част (линкер) може да бъде, например, трипептид от последователността E-F-M (Glu-Phe-Met) или 13-аминокиселинна линкерна последователност, съдържаща Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met, включена между IL-18BP-последователността и имуноглобулиновата последователност. Полученият слят протеин има подобрени свойства като удължено пребиваване в телесните течности (полуживот), повишена специфична активност, повишено ниво на експресия или улеснено пречистване на слетия протеин.

В предпочитано изпълнение IL-18BP е слят с постоянната област на една Ig-молекула. Предпочитано той е свързан към областите с тежки вериги като CH2 и CH3 на човешкия IgG1, например. Генерирането на специфични слети протеини, включващи IL-18BP и участък от имуноглобулин, са описани, например, в Пример 11 на WO 99/09063. Други изоформи на Ig-молекули също са подходящи за генерирането на слети протеини съгласно настоящото изобретение, като например изоформите IgG<sub>2</sub> или IgG<sub>4</sub>, или други Ig-класове, като например IgM или IgA. Слетите протеини могат да бъдат мултимерни, хетеро- или хомомултимерни.

В още едно изпълнение на изобретението един IL-18-инхибитор се използва в комбинация с TNF-антагонист. TNF-антагонистите упражняват активността си по няколко начина. Първо, антагонистите могат да се свързват към или да отделят (секвестират) TNF-молекулата с достатъчно афинитет и специфичност да неутрализират частично или основно TNF-епитопа или епитопите, отговорни за TNF-рецепторното свързване

(обозначавани са по-нататък като “секвестриращи антагонисти”). Секвестриращ антагонист може да бъде, например, антитяло, насочено срещу TNF.

Алтернативно, TNF-антагонистите могат да инхибират TNF-сигналния път, активиран от рецептор на клетъчната повърхност след TNF-свързването (обозначавани по-нататък като “сигнални антагонисти”). Двете групи антагонисти са полезни, самостоятелно или заедно, в комбинация с IL-18-инхибитор, в лечението или профилактиката на сърдечни заболявания.

TNF-антагонистите лесно се идентифицират и изследват чрез рутинен скрининг на кандидати за техния ефект върху активността на нативен TNF при чувствителни клетъчни линии *in vitro*, например човешки В-клетки, в които TNF причинява пролиферация и секреция на имуноглобулини. Анализът включва TNF-препарати при различни разреждания на кандидата антагонист, например от 0.1 до 100 пъти моларното количество на TNF, използван в анализа, и контроли без TNF или само с антагонист (Tucci et al., 1992).

Секвестриращите антагонисти са предпочитаните TNF-антагонисти за използване съгласно настоящото изобретение. Сред секвестриращите антагонисти са предпочитани пептидите, които свързват TNF с висок афинитет и притежават ниска имуногенност. Разтворимите TNF-рецепторни молекули и неутрализиращите антитела срещу TNF са особено предпочитани. Например, разтворимите TNF-RI и TNF-RII са приложими в настоящото изобретение. Скъсените форми на тези рецептори, съдържащи извънклетъчните области на рецепторите или техни функционални участъци, са по-предпочитани антагонисти съгласно настоящото изобретение. Скъсени разтворими тип-I и тип-II TNF-рецептори са описани, например, в EP 914431.

Скъсените форми на TNF-рецепторите са разтворими и са установени в урината и серума като 30 kDa и 40 kDa TNF-инхибиторни свързващи протеини, които се наричат, съответно TBPI и TBPII (Engelmann et al., 1990). Едновременното, последователно или поотделно приложение на IL-18-инхибитор и TNF-антагонист е предпочитано съгласно изобретението.

В друго предпочитано изпълнение човешкият разтворим TNF-RI (TBPI) е TNF-антагонистът, който следва да се използва съгласно изобретението. Естествени и рекомбинантни разтворими TNF-рецепторни молекули и методи за тяхното получаване са описани в Европейски Патенти EP 308 378, EP 398 327 и EP 433 900.

Производни, фрагменти, области и биологично активни участъци от рецепторните молекули, наподобяващи функционално рецепторните молекули, могат също да се използват в настоящото изобретение. Такъв биологично активен еквивалент или производно на рецепторната молекула представлява участък от полипептида или последователност, кодираща рецепторната молекула, която е с достатъчна големина и способност да свързва TNF с такъв афинитет, че да се инхибира или блокира взаимодействието с мембранно-свързания TNF-рецептор.

IL-18-инхибиторът може да бъде прилаган едновременно, последователно или отделно от TNF-инхибитора.

В съгласие с настоящото изобретение лекарственото средство съдържа още известни средства, използвани в лечението на сърдечни заболявания като нитрати, например нитроглицерин, диуретици, ACE-инхибитори, дигиталис, бета-блокери или калциеви блокери, в комбинация с IL-18-инхибитор. Активните съставки могат да бъдат прилагани едновременно, последователно или отделно.

В друго предпочитано изпълнение на настоящото изобретение IL-18-инхибиторът се използва в количество от около 0.001 до 100 мг/кг или около 1 до 10 мг/кг, или 2 до 5 мг/кг.

IL-18-инхибиторът съгласно изобретението предпочитано се прилага системно, предпочитано – подкожно или мускулно.

Изобретението се отнася и до използването на експресионен вектор, съдържащ кодиращата последователност на IL-18-инхибитор, за получаването на лекарствено средство за профилактика и/или лечение на сърдечно заболяване. Следователно, подходът за генна терапия влиза в съображение с цел доставяне на IL-18-инхибитора на мястото, където е необходим. С цел лечение и/или профилактика на сърдечно заболяване векторът за генна терапия, съдържащ последователността на IL-18-инхибитора, може да бъде инжектиран, например, директно в болестната тъкан, избягвайки по този начин проблемите, свързани със системното приложение на вектори за генна терапия като разреждането на векторите, достигането и насочването към прицелните клетки или тъкани, и страничните ефекти.

Използването на вектор за индуциране и/или засилване на ендогенното производство на IL-18-инхибитор в клетка, която нормално е в покой по отношение експресията на IL-18-инхибитор или която експресира количества от инхибитора, които не са достатъчни, също така се обсъжда в изобретението. Векторът може да съдържа регулаторни последователности, които са функционални в клетката, желана да експресира IL-18-инхибитора. Такива регулаторни последователности могат да бъдат, например промоторни или засилващи. Регулаторната последователност може да бъде включена в правилния локус на генома чрез хомоложна рекомбинация, като по този начин се свързва

регулаторната последователност с гена, експресията на който е необходимо да бъде индуцирана или засилена. Технологията обикновено се обозначава като "Ендогенна Генна Активация" (EGA) и е описана в WO 91/09955.

От специалиста в областта ще бъде оценено, че със същата техника е възможно също така да се изключи директно IL-18-експресията, без да се използва IL-18-инхибитор. За да се направи това, може да бъде включен негативен регулаторен елемент, като например "заглушаващ" елемент, в генния локус на IL-18, което води до понижено регулиране или предотвратяване на IL-18-експресията. Специалистът в областта ще разбере, че такова понижено регулиране или "заглушаване" на IL-18-експресията има същия ефект, както използването на IL-18-инхибитор с цел предотвратяване и/или лечение на заболяване.

Изобретението се отнася и до използването на клетка, която е генетично променена да произвежда IL-18-инхибитор, в производството на лекарствено средство за лечение и/или профилактика на сърдечно заболяване.

IL-18-инхибиторът, който се използва в съгласие с настоящото изобретение, може да бъде предпочитано прилаган във фармацевтичен състав, евентуално в комбинация с терапевтично-ефективно количество от TNF-инхибитор.

IL-18BP и неговите изоформи, мутеини, слети протеини, функционални производни, активни фракции или кръгово променени производни, както бяха описани по-горе, са предпочитаните активни съставки на фармацевтичните състави.

Определението за "фармацевтично приемлив" включва всеки вехикулум, който не взаимодейства с ефективността на биологичната

активност на активната съставка и който не е токсичен за субекта, при който се прилага. Например, за парентерално приложение активният(-ите) протеин(-и) могат да бъдат изготвени във форма за еднократно дозиране чрез инжектиране във вехикулуми като солев разтвор, глюкозен разтвор, серумен албумин и Рингеров разтвор.

Активните съставки на фармацевтичния състав съгласно изобретението могат да бъдат прилагани на индивид по различни начини. Пътищата на приложение включват вътрекожно, през кожата (например в препаратите с бавно освобождаване), мускулно, интраперитонеално, венозно, подкожно, орално, вътречерепно, епидурално, местно и интраназално приложение. Всеки друг терапевтично-ефективен път за приложение може да бъде използван, като например през епителните или ендотелните тъкани или чрез генна терапия, където ДНК-молекула, кодираща активната съставка, се прилага на пациента (например чрез вектор), което предизвиква експресия и секреция на активната съставка *in vivo*. В допълнение, протеинът(-ите) съгласно изобретението може да бъде прилаган заедно с други компоненти на биологично активни средства като фармацевтично приемливи сърфактанти, ексципиенти, разредители и вехикулуми.

За парентерално (например венозно, подкожно, мускулно) приложение активният протеин(-и) може да бъде изготвен в разтвор, суспензия, емулсия или лиофилизиран прах заедно с фармацевтично-приемлив парентерален вехикулум (например вода, солев разтвор, глюкозен разтвор) и добавки, които поддържат изотоничността (например манитол) или химичната стабилност (например консерванти и буфери). Препаратът се стерилизира чрез обичайните техники.

Бионаличността на активния протеин(-и) съгласно изобретението може да бъде подобрена, използвайки процедури на свързване, които

увеличават полуживота на молекулата в човешкото тяло, например чрез свързване на молекулата с полиетиленгликол, както е описано в РСТ Патентна Заявка WO 92/13095.

Терапевтично-ефективните количества от активния протеин(-и) ще бъдат функция от различни променливи, включително вида на антагониста, афинитета на антагониста за IL-18 и остатъчната цитотоксична активност, показвана от антагонистите, начина на приложение, клиничното състояние на пациента (включително желанието за поддържане на нетоксично ниво на ендогенната IL-18-активност).

“Терапевтично-ефективно количество” е такова, което при приложение на IL-18-инхибитора води до инхибиране на биологичната активност на IL-18. Прилаганата доза при даден индивид, при единично или многократни дозирания, ще се променя в зависимост от различни фактори, включително фармакокинетичните качества на IL-18-инхибитора, пътя на приложение, състоянието на пациента и характеристиките му (пол, възраст, телесно тегло, здраве, размери), изразеността на симптомите, съпътстващото лечение, честотата на лечение и желания ефект. Уточняването и променянето на установените дозови режими са в компетентността на специалистите в областта, както и *in vitro* и *in vivo* методите за определяне на IL-18-инхибицията при даден индивид.

Съгласно изобретението IL-18-инхибиторът се използва в количество от около 0.001 до 100 мг/кг или около 0.01 до 10 мг/кг телесно тегло, или около 0.1 до 5 мг/кг телесно тегло, или около 1 до 3 мг/кг телесно тегло, или около 2 мг/кг телесно тегло.

Пътят за приложение, който е предпочитан съгласно изобретението, е подкожното приложение. Мускулното приложение е друг предпочитан начин съгласно изобретението. С цел прилагане на IL-18-инхибитора директно на мястото на действието му, се предпочита той да се прилага топично.

В друго предпочитано изпълнение IL-18-инхибиторът се прилага ежедневно или през ден.

Дневните дозировки обикновено се дават в разделени дози или като форма с удължено освобождаване, ефективна за получаване на желаните резултати. Второ или последващо приложение може да бъде извършено при дозировка, която е същата, по-малка или по-голяма от началната или предходната доза, приложена при индивида. Второ или последващо приложение може да бъде извършено по време на или преди началото на заболяването.

Съгласно изобретението IL-18-инхибиторът може да бъде прилаган профилактично или терапевтично при индивид преди, едновременно или последователно с други терапевтични режими или средства (например режим с много лекарствени средства), в терапевтично-ефективно количество, в частност с TNF-инхибитор и/или друго кардиопротективно средство. Активните средства, които се прилагат едновременно с други терапевтични средства, могат да бъдат прилагани в същия или в различни състави.

Изобретението се отнася и до метод за получаване на фармацевтичен състав, включващ смесване на ефективно количество от IL-18-инхибитор и/или TNF-антагонист с фармацевтично приемлив вехикулум.

Изобретението се отнася и до метод за лечение на сърдечно заболяване, включващ приложение на фармацевтично-ефективно количество от IL-18-инхибитор, евентуално в комбинация с фармацевтично-ефективно количество от TNF-антагонист, при пациент, нуждаещ се от такова лечение.

Описвайки дотук изцяло изобретението, ще бъде оценено от специалистите в областта, че същото може да бъде направено в широк

диапазон от еквивалентни параметри, концентрации и състояния, без да се излиза от духа и обхвата на изобретението и без неоправдано експериментиране.

Доколкото това изобретение бе описано във връзка със специфични негови изпълнения, ще бъде оценено, че могат да се направят и други модификации. Тази заявка има намерение да включва всички вариации, приложения или адаптации на изобретението, следващи, най-общо, принципите на изобретението и включващи такива отклонения от настоящото описание, които се налагат в познатата или обичайната практика в рамките на областта, към която спада изобретението, и които биха могли да се приложат към основните характеристики, посочени по-горе и по-нататък в рамките на включените претенции.

Всички цитирани тук позовавания, включително статии в списания или резюмета, публикувани или непубликувани патентни заявки на САЩ или чуждестранни такива, издадени патенти на САЩ или на други страни, или всяко друго позоваване, са включени изцяло тук, включително всички данни, фигури, таблици и текстове, представени в цитираните позовавания. В допълнение, цялото съдържание на позоваванията, цитирани тук, са също изцяло включени тук.

Позоваването на известни методи, конвенционални методи или етапи от известни и конвенционални методи не е по никакъв начин допускане, че всеки аспект, описание или изпълнение на настоящото изобретение е разкрито, допуснато или включено в съответната област на техниката.

Предходното описание на специфичните изпълнения разкрива напълно общата природа на изобретението, която може, чрез използване на познанията на специалистите в областта (включително съдържанието на цитираните позовавания) да бъде лесно променена и/или адаптирана за различно приложение на такива специфични изпълнения, без неоправдано

експериментиране и без изхождане от общата концепция на настоящото изобретение. Поради това, такива адаптации и модификации се приемат като включени в обхвата от равностойни на описаните изпълнения, базираци се на насоките и разкритията, представени тук. Следва да бъде разбрано, че фразеологията или терминологията, използвани тук, са за целите на описанието, а не за ограничаване, така че фразеологията или терминологията на настоящата спецификация следва да бъде интерпретирана от специалиста в светлината на насоките и разкритията, представени тук, в комбинация с познанията на специалиста в областта.

#### Примери за изпълнение на изобретението

**Пример 1: Инхибицията на IL-18 намалява миокардната исхемична дисфункция *in vitro***

##### **Материали и методи**

Реактиви: IL-18BP $\alpha$ -изоформата е експресирана с N-краен (His)<sub>6</sub> tag в яйчникови клетки от китайски хамстер и е пречистен до хомогенност. Способността на IL-18BP $\alpha$ -(His)<sub>6</sub> да неутрализира IL-18 е описана (Kim et al., 2000). ICE-инхибиторът (ICEi) Ac-Try-Val-Ala-Asp-хлорометилкетон (YVAD) е закупен от Alexis Biochemicals (San Diego) и е солубилизиран в DMSO при концентрация 10 мг/мл. ICEi е разреден в Tyrode-разтвор, преди да бъде използван. При мононуклеарни клетки от човешка периферна кръв ICEi намалява ендотоксин-индуцираната секреция на зрял IL-1 $\beta$  с 92%, установено съгласно измерването чрез EILISA (Cistron Biotechnology, Pine Brook, NJ).

Изолирани предсърдни трабекули: На пациенти, прекарвали елективна бай-пас операция на коронарна артерия с помпен оксигенатор, е била поставяна канюла в дясното предсърдие. По това време рутинно е

ексцизиран и отделен малък сегмент от придатъка на дясното предсърдие. Трабекулите са получени от тази отделена тъкан. Човешката предсърдна тъкан е поставена в оксигениран модифициран буферен Tyrode-разтвор при 4°C. Модифициран Tyrode-разтвор е получен с дейонизирана дестилирана вода и е съдържал D-глюкоза при концентрация 5.0 ммол/л, CaCl<sub>2</sub> 2.0 ммол/л, NaCl 118 ммол/л, KCl 4.0 ммол/л, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.2 ммол/л, NaHCO<sub>3</sub> 25.0 ммол/л и NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 ммол/л. Свободният от субстрат Tyrode-разтвор е съдържал холинхлорид 7 ммол/л за поддържане на осмоларността. Ако не е посочено другояче, химикалите и реактивите са получени от Sigma. Две до четири трабекули (4-7 мм дълги и <1.0 мм в диаметър) са били закрепени към силов трансдюсер и потопени в загрята (37°C) 30-мл-ова вана от модифициран Tyrode-разтвор; смес от 92.5%O<sub>2</sub>/7.5%CO<sub>2</sub> е вкарвана като мехурчета по време на нормоксията. Тази газова смес е осигурявала парциално O<sub>2</sub>-налягане >350 мм Hg (1 мм Hg = 133 Pa), парциално налягане на CO<sub>2</sub> от 36-40 мм Hg и pH от 7.35-7.45. Всеки параметър е проверяван рутинно с автоматичен кръвно-газов анализатор. Температурата в органната вана е била поддържана на 37°C по време на целия експеримент. По време на симулирана исхемия газовата смес е превключена към 92.5%N<sub>2</sub>/7.5%CO<sub>2</sub>. Тази смес е довела до парциално O<sub>2</sub>-налягане <50 мм Hg. Буферният разтвор е сменян на всеки 20 минути с изключение на 30-минутния период на симулирана исхемия.

Опитен дизайн: Трабекулите са еквилибрирани 90 минути за увеличаване на изходната сила на разтягане до 1,000 мг и за стабилизиране на развитата сила. Трабекулите, които не са могли да генерират повече от 250 мг развита сила, са били изключени от изследването. По време на 90-минутното еквилибриране, задаването на ритъма е извършено посредством платинени електроди (Radnoti Glass, Monrovia, CA) за стимулация на поле. Електродите са били поставени от

всяка страна на трабекулите, стимулирани са (Grass SD9 stimulator, Warwick, RI) с 6-мс импулси при волтаж 20% над прага и е подаван ритъм при 1 Hz по време на нормоксията и при 3 Hz по време на исхемията. Контракциите са мониториращи чрез силови трансдюсери (Grass FT03), записвани с компютъризиран предусилвател и дигитален преобразувател (MacLab Quad Bridge, MacLab/8e, AD Instruments, Milford, MA) и непрестанно са мониториращи с компютър Macintosh.

След еквилибрирането трабекулите от едни пациент са изследвани в три експериментални условия: контролни условия, включващи 90 минути нормоксична супрафузия; I/R, включваща 30 минути симулирана исхемия, последвана от 45 минути реперфузия; и трето условие, включващо антицитокинна интервенция. В последния случай антицитокинът е добавен към супрафузионната вана точно преди началото на исхемията и е бил наличен по време на 45-те минути реперфузия.

Съхранена трабекуларна СК-активност: Крайната (на 90-та минута) СК-активност в реперфузионната тъкан е била определена според описанието (Kaplan et al., 1993). Тъканите са хомогенизиращи в 100 обема от ледено-студен изотоничен екстракционен буфер (Cleveland et al., 1997; Kaplan et al., 1993). Анализът е извършен с СК-кит (Sigma) посредством автоматичен спектрофотометър. Резултатите са представени като единици СК-активност на милиграм (мокро тегло на тъканта).

РНК-изолиране и свързана с обратна транскриптаза PCR (полимеразно-верижна реакция): Пресните трабекули са хомогенизиращи в Tri-Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati) и общата РНК е изолирана чрез екстракция с хлороформ и преципитиране с изопропанол. РНК е солубилизираща в третирана с диетиленгликол вода, третирана е с ДНК-аза и е определена количествено чрез Gene Quant (Amersham Pharmacia Biotech). сДНК-методите са описани (Reznikov et al., 2000). За

всяка PCR е използвана следната последователност: предварително загряване до 95°C за 15 минути, след това от 94°C за 40 секунди, 55°C за 45 секунди и 72°C за 1 минута с крайна екстензионна фаза при 72°C за 10 минути. Оптималният брой цикли е определен като 35. Праймерите за глицералдехид-3-фосфат-дехидрогеназа (GAPDH) и човешки IL-18 (Reznikov et al., 2000), и за човешки IL-18BPα (Kim et al., 2000) са публикувани. PCR-продуктите са разделени върху 1.5% агарозен гел, съдържащ 0.5xTBE (50 mM Трис/45 mM борова киселина/0.5 mM EDTA, pH 8.3) с етидиум-бромид 0.5 мг/мл, визуализирани са чрез UV-осветяване и са фотографирани. Дензитометрията е извършена върху негативните образи (IMAGEQUANT software, Molecular Dynamics) и относителната абсорбция от IL-18 и IL-18BP PCR-продуктите е била коригирана спрямо абсорбцията, получена за GAPDH.

IL-18-определяне: Пресните трабекули са били хомогенизирани според горното описание за СК-измерванията. IL-18 е анализиран с течна-фазова електрохемилюминисценция (ECL, Igen, Gaithersburg, MD). Мише анти-човешко IL-18 mAb антитяло (R & D Systems) е маркирано с рутений (Igen). Допълнително, афинитетно-пречистено козе анти-човешко IL-18 mAb антитяло (R & D) е маркирано с биотин (Igen). Биотинилираното антитяло е разредено до крайна концентрация 1 µг/мл в PBS (pH 7.4), съдържащ 0.25% BSA, 0.5% Tween-20 и 0.01% азид (ECL-буфер). На една тръбичка за анализ предварително са инкубирани 25 µл от биотинилираното антитяло при стайна температура заедно с 25 µл от парамагнетични зърна, покрити със стрептавидин (DynaL, Great Neck, NY) при концентрация 1 µг/мл за 30 минути чрез силно разклащане. Пробите за тестване (25 µл) или стандартите са били добавени към тръбичките, последвано от 25 µл от рутенилирано антитяло (крайна концентрация 1 µг/мл, разреден в ECL-буфер). Тръбичките са разклащани 24 часа. Реакцията е била прекъсната

чрез добавяне на PBS 200  $\mu$ л на тръбичка и количеството хемилуминисценция е определено с Origen Analyzer (Igen). Границата за откриване на IL-18 16 пкг/мл.

Конфокална микроскопия: Човешката предсърдна тъкан, получена по време на поставянето на канюлата на помпения оксигенатор, е поставена в пластмасов носач 1 см (Meldrum et al., 1998), запечатана е и е замразена в тъканно-замразяваща среда (Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC) върху изопентан, изстуден със сух лед. Замразените отрязъци (5  $\mu$ м) са рязани на криостат Leica CM 1850 (Leica, Deerfield, IL). Предметните стъкла са фиксирани за 10 минути в 4% параформалдехид, въздушно изсушен, и са инкубирани за 20 минути в PBS с добавка 10% нормален кози серум. Отрязъците са инкубирани при разреждане 1:100 със заешко анти-човешки IL-18-антитяло (Peprotech, Rocky Hill, NJ) или неимунун заешки IgG 1  $\mu$ гр/мл като негативна контрола. Антителата са разредени в PBS, съдържащ 1% BSA. След инкубация за една нощ при 4°C, отрязъците са промити трикратно с 0.5% BSA в PBS. Отрязъците след това са инкубирани с вторично козе анти-заешко антитяло, свързано към Alexa488 (Molecular Probes) за 60 минути при стайна температура на тъмно. Ядрата са оцветени в синьо с бисбензимида (Sigma) 1  $\mu$ гр/мл. След оцветяването отрязъците са промити и изследвани с конфокална лазерно-скенираща система Leica DM RXA (Leica) и са анализирани със софтуера SLIDEBOOK за Macintosh (Intelligent Imaging Innovations, Denver).

Статистически анализ: Данните са изразени като средна стойност  $\pm$  стандартно отклонение от средната стойност (SEM). Средните промени в развитата сила са изчислени относително спрямо контролната стойност на 90-тата минута за всяка тъкан от пациент. Статистическата значимост на разликите между групите е определена чрез факторна ANOVA посредством

Bonferroni-Dunn post-hoc анализ. Статистическите анализи са извършени със софтуера STAT-VIEW4.51 (Abacus Concepts, Calabasas, CA).

### Резултати

#### Ефект на неутрализирането на ендогенния IL-18 с IL-18BP върху постисхемично развитата сила

Фигура 1А показва кинетичния отговор на трабекули спрямо I/R травма. Последните 15 минути от еквилибрирането са показани и нормализирани до 100% в началото на експерименталния период. Контролните трабекули са супрафузирани при нормоксични условия по време на целия експеримент. Както е показано, има намаление (10%) в развитата сила в контролните трабекули. Трабекулите, подложени на исхемия, показват бързо спадане в съкратителната функция; при реперфузия съкратителната сила се възстановява до около 25% от контролно развитата сила. За разлика от това, трабекулите, подложени на исхемия, но в присъствието на IL-18BP, се възстановяват до 55% от контролно развитата сила. За оценка на I/R отговора на сърдечна тъкан от няколко пациенти, нивата на развитата сила в контролните трабекули на 90-тата минута е определена на 100% за всяка проба от пациент и е изчислен относителният процент на промяната в развитата сила за експерименталните групи.

Както е показано на Фигура 1В, постисхемично развитата сила в нетретирани трабекули (I/R) е намалена до средно 35% от контролната. Въпреки това, в присъствието на IL-18BP това намаление е потиснато до средно 66.2% от контролната при 1 µг/мл и до 76% от контролната при 5 µг/мл, съответно. Тези резултати насочват на мисълта, че I/R води до освобождаване на биологично активен IL-18 след процесирание на

ендогенния прекурсор IL-18 от ICE. Поради това, IL-18 е измерен в прясно получена предсърдна тъкан. Както е показано на Фигура 2, изходният IL-18 е бил наличен в трабекули, получени преди поставянето на помпено-оксигенаторната канюла в дясното предсърдие. След 90 минути еквилибриране, 30 минути исхемия и 45 минути реоксигениране трабекулите са хомогенизирани и са определени нивата на IL-18. Налице е било 4.5-кратно увеличаване на IL-18 в тъканта след I/R (Фигура 2).

Нивата на mRNA при стабилното състояние за IL-18 и IL-18BP също са били определени в тези тъкани. Ние наблюдавахме изходна генна експресия за IL-18 и IL-18BP в прясно получени преисхемични предсърдни хомогенизати (Фигура 3А, В). Сходно на увеличението на IL-18 протеина, I/R предизвиква по-нататъшно увеличение в нивата от стабилното състояние на IL-18-mRNA (4.7-кратно увеличение). IL-18BP-генната експресия също бе наблюдавана в прясно получена предсърдна тъкан и е била увеличена само умерено (1.3-кратно) след I/R.

#### Локализиране на IL-18 в човешки миокард

Поради това, че IL-18-протеинът, според измерването чрез ECL, и IL-18-mRNA са налични в прясно получени преисхемични предсърдни хомогенизати, е използвано хистохимично оцветяване за определяне локализацията на IL-18. Предсърдните тъкани са получени точно преди поставянето на помпено-оксигенаторната канюла и са били незабавно бързо замразени (не е показано). IL-18 е наблюдаван в постоянни миокардни макрофаги и в съдовите ендотелни клетки. IL-18 в макрофагите и ендотелните клетки е наличен преди да настъпи каквато и да е оперативно-свързана исхемия и е наличен в отсъствието на контакт между каквито и да са чужди повърхности. Локализацията на IL-18 в постоянни макрофаги и ендотелни клетки е в съгласие с предишни проучвания на

съставен, предварително образуван прекурсор на IL-18 в прясно получени човешки периферни моноцити от здрави хора (Pugen et al., 1999). Поради това, може да се направи заключението, че предварително образуваният прекурсор на IL-18 съществува в миокарда на пациенти, планирани за коронарно-артериален бай-пас при исхемична болест на сърцето.

#### Ефект на ICE-инхибицията върху постисхемично развитата сила

Тъй като IL-18BP ефективно намалява индуцираната от исхемия миокардна дисфункция, ние създадохме хипотезата, че инхибицията на превръщането на предварително образувания прекурсор IL-18 в зрял IL-18 също намалява индуцираната от исхемията миокардна дисфункция. Поради това, специфичният ICE-инхибитор YVAD бе добавен към супрафузионната вана преди началото на исхемията. ICE-инхибицията от добавянето на YVAD е продължила по време на исхемичния период и реперфузията. YVAD-медираната инхибиция на ICE води до намаляване на индуцираната от исхемия миокардна дисфункция от 35% в контролите при I/R до 60% при 10  $\mu$ гр/мл и 75.8% при 20  $\mu$ гр/мл (Фигура 4). Тези резултати потвърждават, че биологично активният IL-18 в човешки миокард е резултат от разцепването на предварително образувания прекурсор IL-18 от ICE. В допълнение, тези резултати насочват към факта, че миокардната исхемия може да активира латентен ICE.

#### Съхраняване на клетъчната жизнеспособност

Вътреклетъчните нива на СК са използвани за оценка на степента на клетъчна жизнеспособност след I/R. При този анализ колкото по-висока е СК-стойността, толкова по-голям е броят на жизнеспособни клетки. Всяка от антицитокинните интервенции води до съхраняване на клетъчната жизнеспособност. Както е показано на Фигура 5, IL-18BP- и ICE-инхибицията

(10 и 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) увеличава вътреклетъчните СК-нива след I/R от 1399 до 5921, 5676, 6624 и 4662 единици СК-активност на мг (мокра тъкан), съответно. Тези наблюдения насочват, че инхибицията на I/R-индуцираната активация на IL-18 съхранява миоцелуларната жизнеспособност в този *ex vivo* модел.

#### Ефект на неутрализирането на $\text{TNF}\alpha$ -индуцираната миокардна функция

Както е показано на Фигура 6, развитата сила (DF) на трабекулите е намалена с 18% след 90 минути от излагане на екзогенен  $\text{TNF}\alpha$ . Неутрализирането на ендогенния IL-18 в човешки миокард, изложен на екзогенен  $\text{TNF}\alpha$ , чрез инкубация с IL-18BP за 10 минути преди добавянето на  $\text{TNF}\alpha$ , намалява степента на спада в развитата сила (виж Фигура 6). След 90 минути развитата сила в контролната група е намалена с 18%, докато в изложените на  $\text{TNF}\alpha$  трабекули тя е намалена с 58% в сравнение с контролите. Въпреки това, в изложените на  $\text{TNF}\alpha$  трабекули с IL-18BP, развитата сила е спаднала само с 30% в сравнение с контролите. Тези данни насочват, че директните ефекти на  $\text{TNF}\alpha$  върху миокардната съкратителна депресия са медиирани, поне отчасти, от биологично активен, ендогенен IL-18.

#### Ефект на екзогенния IL-18 върху развитата сила

След това е определен директният ефект на екзогенен IL-18 върху съкратителната миокардна функция. IL-18 е добавен към супрафузирани трабекули след 90 минути еквилибриране и при всяка промяна на ваната. Както е показано на Фигура 7, IL-18 води до бавно, но прогресивно намаляване в развитата сила по време на експерименталния период. След 90 минути постоянно излагане на IL-18 развитата сила е намалена с 42%.

Тези данни показват, че екзогенният IL-18, подобно на TNF $\alpha$ , действа като миокарден депресант.

Интересно е, че IL-18 не е толкова мощен миокарден депресант, колкото TNF $\alpha$ .

### Съхраняване на клетъчната жизнеспособност

Казазите често са свързани с апоптоза. За оценка на клетъчната жизнеспособност в трабекули, изложени на TNF $\alpha$ , е измерена тъканната вътреклетъчна креатинкиназа (СК). При този анализ високите СК-нива означават жизнеспособни клетки. Както е изобразено на Фигура 8, контролните трабекули, които са преживели 90 минути нормоксична супрафузия, са съдържали  $6801 \pm 276$  единици СТ-активност на милиграм тегло мокра тъкан. За разлика от това, трабекулите, изложени на 30/45 минути I/R-травма или 90 минути TNF $\alpha$ , са показали намалени нива СК от  $1774 \pm 181$  и  $3246 \pm 217$  единици/мг, съответно. Трабекулите, изложени на TNF $\alpha$  в присъствието на IL-18BP са съдържали  $5605 \pm 212$  единици/мг тъкан. Интересно е, че трабекулите, третирани с TNF $\alpha$  са имали по-съхранени СК-нива в сравнение с I/R-трабекулите. Това бе неочаквано откритие, тъй като степента на развитата сила на края на експерименталния период е била сходна за I/R и TNF $\alpha$ .

### Пример 3: IL-18BP защитава от миокарден инфаркт *ин vivo*

#### **Метод**

*Ин vivo* интрамускулен електротрансфер на миши IL-18BP-експресионен плазмид

C57BL/6 мишки са получили през 3-седмичен интервал 3 инжекции с експресионен плазмид, съдържащ сДНК за IL-18BP (наречен pсDNA30IL18BP, описан в WO 01/85201). Контролните мишки са били

инжектирани с празен контролен плазмид. Миша IL-18BP-изоформа  $\alpha$ сДНК, изолирана според описанието (допълнителен номер # Q9ZOM9) (Kim et al., 2000), е субклонирана в EcoR1/Not1 места на експресионен вектор за клетки от бозайници рсДНК3 при контрол на цитомегаловирусния промотор (Invitrogen). Контролният плазмид е бил сходен конструкт, лишен от терапевтична сДНК. Контролната група е съдържала 31 мишки, експерименталната група, получила IL-18BP, е съдържала 27 мишки.

IL-18BP или контролният експресионен плазмид (60  $\mu$ гр) са инжектирани в краниалната част на двата тибиялни мускула на анестезираните мишки, съгласно предходно описание (Mallat et al., 1999). За кратко през кожата са доставяни електрични импулси (8 квадратновълнови електрични импулси с 200 V/cm, 20 msec продължителност при 2 Hz) посредством PS-15 електропулсатор (Genetronics, France), използвайки два плочкови електрода от неръждаема стомана, поставени на 4.2 до 5.3 cm в страни, от всяка страна на крака.

#### Предизвикване на инфаркт в лявата камера

Двадесет и четири часа след приложението на IL-18BP-плазмида или на празния плазмид, мишките са анестезирани чрез интраперитонеална инжекция с ксилазин и кетамин, обдишвани са и са подложени на трахеотомия. Лявата главна коронарна артерия е завързана (лигирана) постоянно чрез 8-0 проленов шев, с цел да се индуцира миокарден инфаркт, след което гръдният кош е затворен и животните са оставени да се възстановят от анестезията. Смъртността около операцията е била по-малко от 20%. Следоперативната смъртност е била 48% в контролната група и 26% в експерименталната група и е настъпвала почти изключително 4-5 дни след лигирането на съда.

Седем дни след лигирането мишките са отново анестезирани и размерите на лявата камера (LV) са оценени чрез ехокардиография при затворен гръден кош, използвайки ATL HDI 5000 ехокардиограф. Скъсяването на фракцията от LV е било изчислено от измерените крайни диастолни и систолни диаметри. Накрая на ехокардиографското измерване сърцето е извадено, фиксирано и по-късно е нарязано на части (срезове). Хистологичните срезове са оцветени със сириусово червено за определяне размера на инфаркта.

### Резултати

Диастолният диаметър на лявата камера седем дни след лигиране при преживели мишки е бил, както следва:

0.53+0.01 мм (n=20) при мишките, третирани с IL-18BP, спрямо 0.59+0.01 мм на контролните мишки (n=16),  $p < 0.01$ .

Систолният диаметър на лявата камера седем дни след лигиране при преживели мишки е бил, както следва:

0.45+0.02 при мишки, третирани с IL-18BP, спрямо 0.52+0.02 на контролните мишки,  $p < 0.01$

Скъсяването на фракцията на лявата камера: 15+1% при мишки, третирани с IL-18BP, спрямо 11+1% на контролните мишки,  $p < 0.01$ .

Заклучение: IL-18BP намалява смъртността след миокарден инфаркт, предизвикан от пълно коронарно лигиране на лявата камера с 50%. В допълнение към това, функцията на лявата камера е значително подобрена, както е показано от намалените систолни и диастолни диаметри на лявата камера.

## REFERENCES

1. Bolli, R. (1990) *Circulation* 82, 723-38.
2. Buggemann et al., *Eur. J. Immunol.* 21:1323-1326 (1991)
3. Cain, B. S., Meldrum, D. R., Dinarello, C. A., Meng, X., Banerjee, A. & Harken, A. H. (1998) *J Surg Res* 76, 117-23.
4. Cleveland, J. C. J., Meldrum, D. R., Cain, B. S., Banerjee, A. & Harken, A. H. (1997) *Circulation* 96, 29-32.
5. Daemen MA, van't Veer C, Wolfs TG, et al: Ischemia/reperfusion-induced IFN-gamma up-regulation: involvement of IL- 12 and IL-18. *J.Immunol.* 162:5506-5510, 1999
6. DiDonato, J A, Hayakawa, M, Rothwarf, D M, Zandi, E and Karin, M. (1997). *Nature* 388, 16514-16517.
7. Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H., and Woody, J.N., 1994, *Lancet* 344, 1125-1127.
8. Engelmann, H., Novick, D., and Wallach, D., 1990, *J.Biol.Chem.* 265, 1531-1536.
9. Fantuzzi, G., A. J. Purenl M. W. Harding, D. J, Livingston, and C. A. Dinarello. *Blood* 91: 2118-25, 1998.
10. Grantham (1974), *Science*, 185. 862-864.
11. Gurevitch, J., Frolkis, I., Yuhas, Y., Paz, Y., Matsa, M., Mohr, R. & Yakirevich, V. (1996) *J Am Coll Cardiol* 28, 247-52.
12. Herskowitz, A., Choi, S., Ansari, A. A. & Wesselingh, S. (1995) *Am J Pathol* 146, 419-28.
13. Hochholzer, 9., G. B. Lipford, H. Wagner, K. Pfeffer, and K. Heeg. *Infect Immun.* 68: 3502
14. Kaplan, L. J., Blum, H., Banerjee, A. & Whitman, G. J. (1993) *J Surg Res* 54, 31-5.
15. Kim SH, Eisenstein M, Reznikov L, Fantuzzi G, Novick D, Rubinstein M, Dinarello CA. Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:1190-1195.
16. Kim SH et al., *J. Immuno.* 2001, 166, pp. 148 – 154.
17. Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallon B, Moore MA, Vilcek J, Daddona P, et al. Construction and initial characterization of a

- mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol* 1993 Nov 30:16 1443-53
18. Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- 5 19. Meldrum, D. R., Cleveland, J. C., Jr., Cain, B. S., Meng, X. & Harken, A. H. (1998) *Ann Thorac Surg* 65, 439-43.
20. Mendez, M.M., Green, L.L., Corvalan, J.R.F., Jia X-C., Maynard-Curie, E.E., Yang, X-D., Gallo, M.L., Louie, D.M., Lee, D.V., Erickson, K.L., Luna, J., Roy, C.M-N., Abderrahim, H., Kirshenbaum, F., Noguchi, M., Smith, D.M., Fukushima, A., Hales, J.F., Finer, M.H., Davis, C.G., Zsebo, K.M. and Jakobovits, A. (1997). "Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice". *Nature Genetics*, 15 , 146-56.
- 10 21. Nakamura, K, Okamura, H, Nagata, K and Tamura, T. (1989). *Infect. Immun.* 57, 590-595.
- 15 22. Novick, D, Kim, S-H, Fantuzzi, G, Reznikov, L, Dinarello, C, and Rubinstein, M (1999). *Immunity* 10, 127-136.
23. Parnet, P, Garka, K E, Bonnert, T P, Dower, S K, and Sims, J E. (1996), *J. Biol. Chem.* 271, 3967-3970.
24. Puren, A. J. , Fantuzzi, G. & Dinarello, C. A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 20 96, 2256-2261
25. Raeburn, C. D., C. M` Calkins, M. A. Zimmerman, Y. Song, L Ao, A. Banerjee, X. keng, and A. H. Harken. *Surgery* 130: 319-25., 2001.
26. Reznikov, L. L., Kim, S. H., Westcott, J. Y., Frishman, J., Fantuzzi, G., Novick, D., Rubinstein, M. & Dinarello, C. A. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2174-2179.
27. Torigoe, K., Ushio, S., Okura, T., Kobayashi, S., Taniai, M., Kunikate, T., Murakami, T., Sanou, O., Kojima, H., Fuji, M., Ohta, T., Ikeda, M., Ikegami, H. & Kurimoto, M. (1997) *J Biol Chem* 272, 25737-25742.
28. Tomizuka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727 (2000)
- 30 29. Tucci, A., James, H., Chicheportiche, R., Bonnefoy, J.Y., Dayer, J.M., and Zubler, R.H., 1992, *J.Immunol.* 148, 2778-2784.
- 30 Yoshimoto T, Takeda, K, Tanaka, T, Ohkusu, K, Kashiwamura, S, Okamura, H, Akira, S and Nakanishi, K (1998). *J. Immunol.* 161, 3400-3407.

## ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

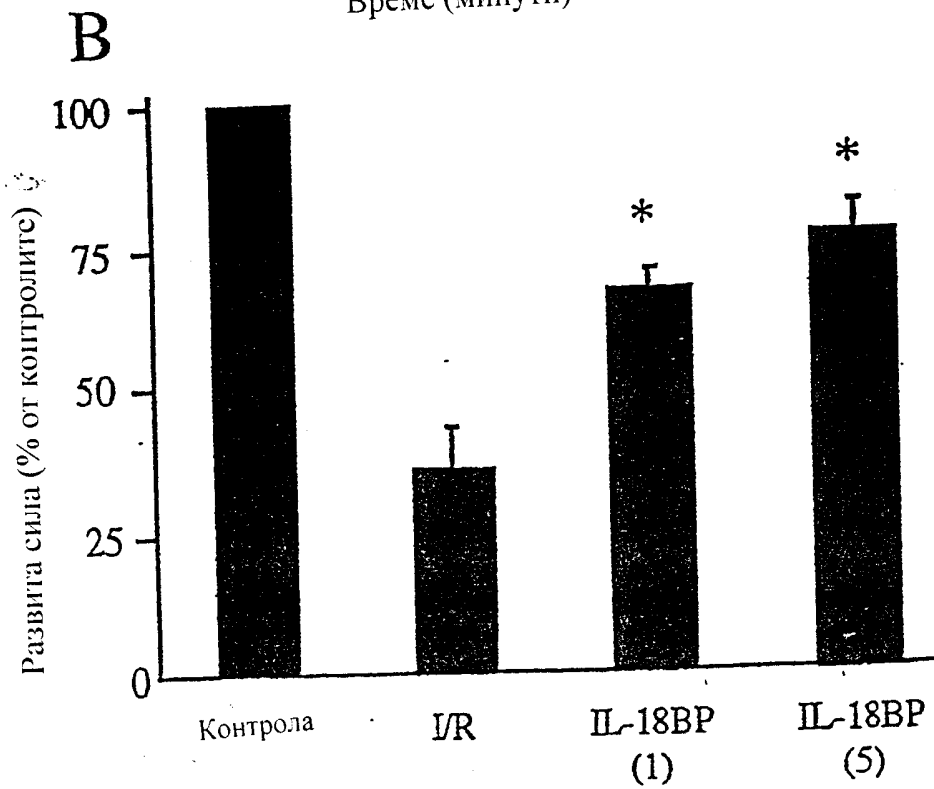
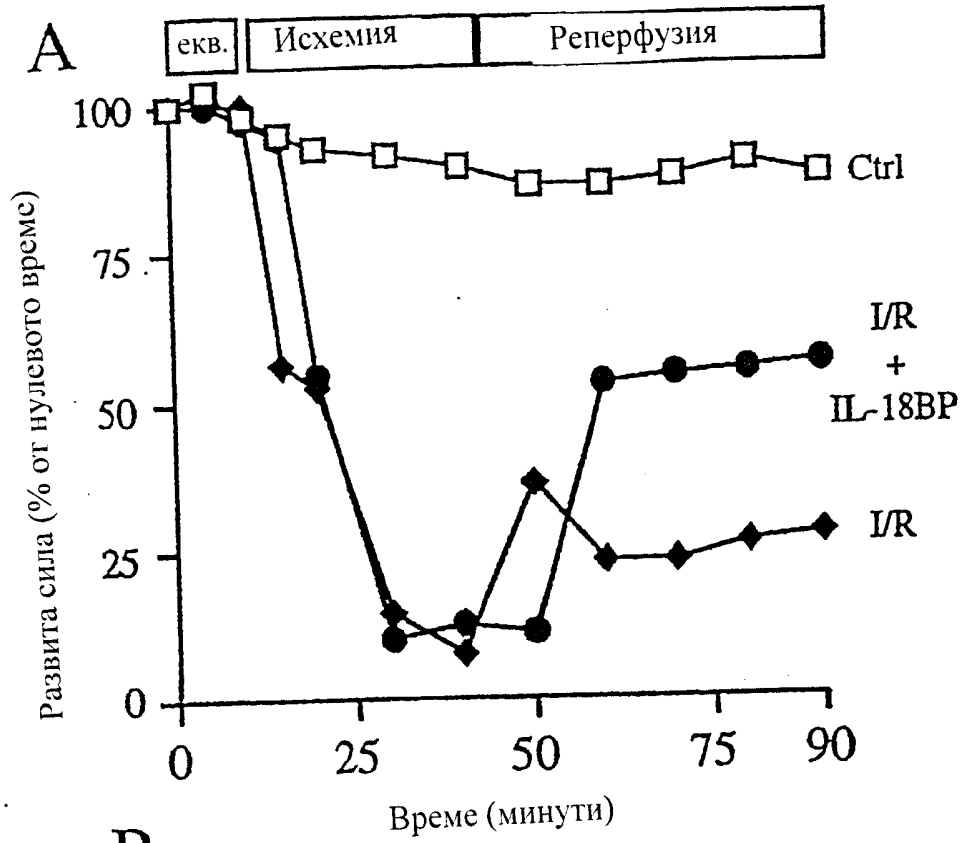
1. Използване на инхибитор на IL-18 за производство на лекарствено средство за лечение и/или профилактика на сърдечно заболяване.
2. Използване съгласно претенция 1, при което сърдечното заболяване е исхемична болест на сърцето.
3. Използване съгласно претенция 1 или 2, при което сърдечното заболяване е хронично.
4. Използване съгласно всяка от предходните претенции, при което сърдечното заболяване е стенокардия.
5. Използване съгласно претенция 1 или 2, при което сърдечното заболяване е остро.
6. Използване съгласно претенция 5, при което сърдечното заболяване е миокарден инфаркт.
7. Използване съгласно всяка от предходните претенции, при което сърдечното заболяване е сърдечна слабост.
8. Използване съгласно всяка от предходните претенции, при което сърдечното заболяване е кардиомиопатия.
9. Използване съгласно всяка от претенции 1 до 8, при което инхибиторът на IL-18 е избран между инхибитор на каспаза-1 (ICE), антитела срещу IL-

- 18, антитела срещу всяка от IL-18-рецепторните субединици, инхибитор на IL-18-сигналния път, антагонисти на IL-18, които се конкурират с IL-18 и блокират IL-18-рецептора, и IL-18-свързващи протеини, или техни изоформи, мутеини, слети протеини, функционална производни, активни фракции или кръгово променени производни, които инхибират биологичната активност на IL-18
10. Използване съгласно претенция 9, при което IL-18-инхибиторът е антитяло, насочено срещу IL-18.
11. Използване съгласно претенция 9, при което IL-18-инхибиторът е антитяло, насочено срещу IL-18-рецептора  $\alpha$ .
12. Използване съгласно претенция 9, при което IL-18-инхибиторът е антитяло, насочено срещу IL-18-рецептора  $\beta$ .
13. Използване съгласно всяка от претенции 9 до 12, при което IL-18-антитялото е хуманизирано или човешко антитяло.
14. Използване съгласно претенция 9, при което IL-18-инхибиторът е IL-18-свързващ протеин, или негова изоформа, слят протеин, функционално производно, активна фракция или кръгово променено производно, инхибиращи биологичната активност на IL-18.
15. Използване съгласно всяка от предходните претенции, при което IL-18-инхибиторът е гликозилиран на едно или повече места.

- ✓ 16. Използване съгласно претенция 14, при което слетият протеин съдържа сливане с имуноглобулин (Ig).
17. Използване съгласно претенция 9 до 14, при което функционалното производно съдържа поне един радикал, свързан към една или повече функционални групи, което става на една или повече странични вериги от аминокиселинните остатъци.
18. Използване съгласно претенция 17, при което радикалът е полиетиленов радикал.
19. Използване съгласно всяка от предходните претенции, при което лекарственото средство съдържа още антагонист на туморно-некротичния фактор (TNF).
20. Използване съгласно претенция 19, при което IL-18-инхибиторът се използва едновременно, последователно или поотделно от TNF-антагонист.
21. Използване съгласно претенция 19 или 20, при което TNF-анатонистът е ТВPI и/или ТВPII.
22. Използване съгласно всяка от предходните претенции, при което IL-18-инхибиторът се използва в концентрация в областта от около 0.001 до 100 мг/кг или около 1 до 10 мг/кг, или 2 до 5 мг/кг.

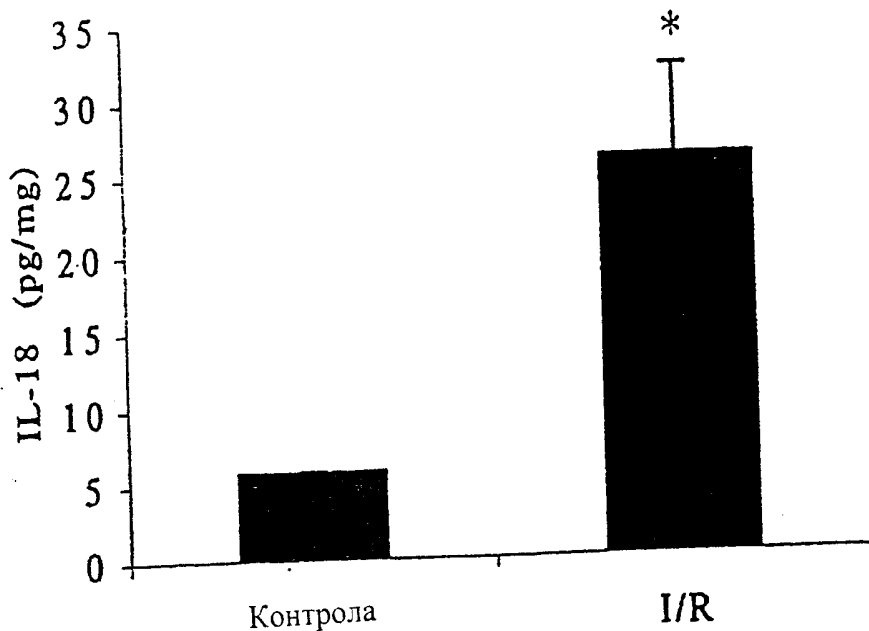
23. Използване на експресионен вектор, съдържащ кодиращата последователност на IL-18-инхибитор за изготвянето на лекарствено средство за лечение и/или профилактика на сърдечно заболяване.
24. Използване на експресионен вектор за индуциране и/или засилване на ендогенното производство на IL-18-инхибитор в дадена клетка за получаване на лекарствено средство за лечение и/или профилактика на сърдечно заболяване.
25. Използване на ефективно инхибиращо количество от IL-18-инхибитор за лечение на сърдечно заболяване, което се прилага при пациент, нуждаещ се от такова лечение.

1/5



Фигура 1

2/5

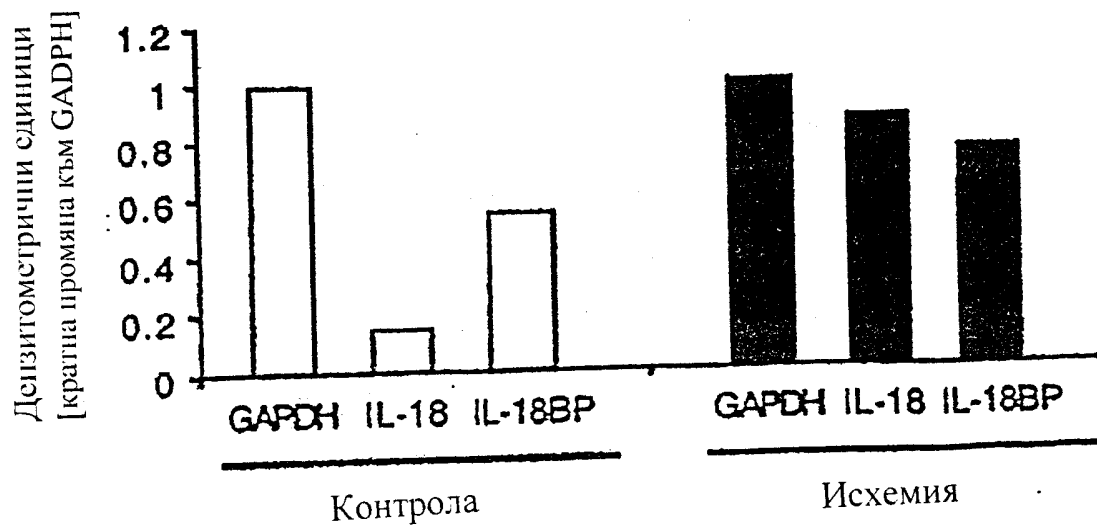


Фигура 2

A

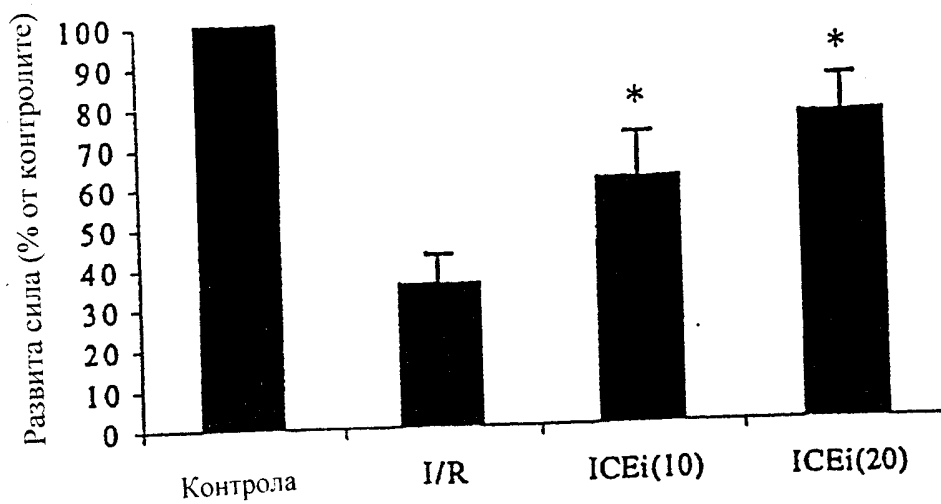


B

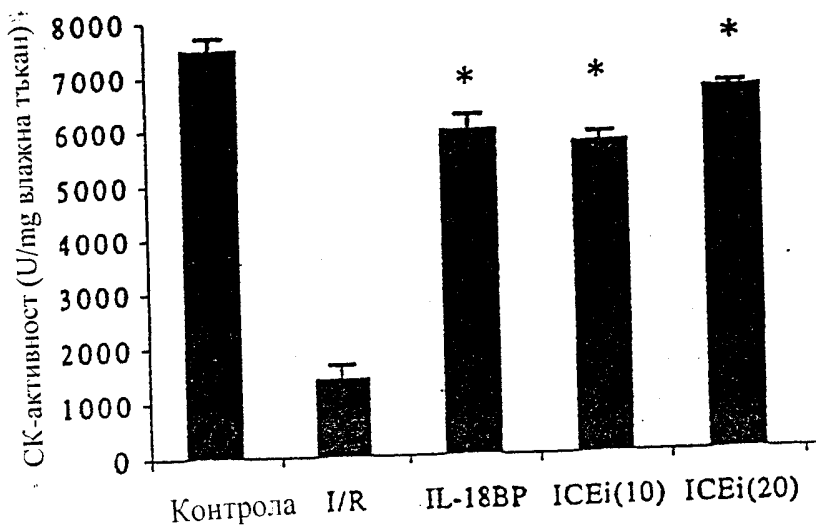


Фигура 3

3/5

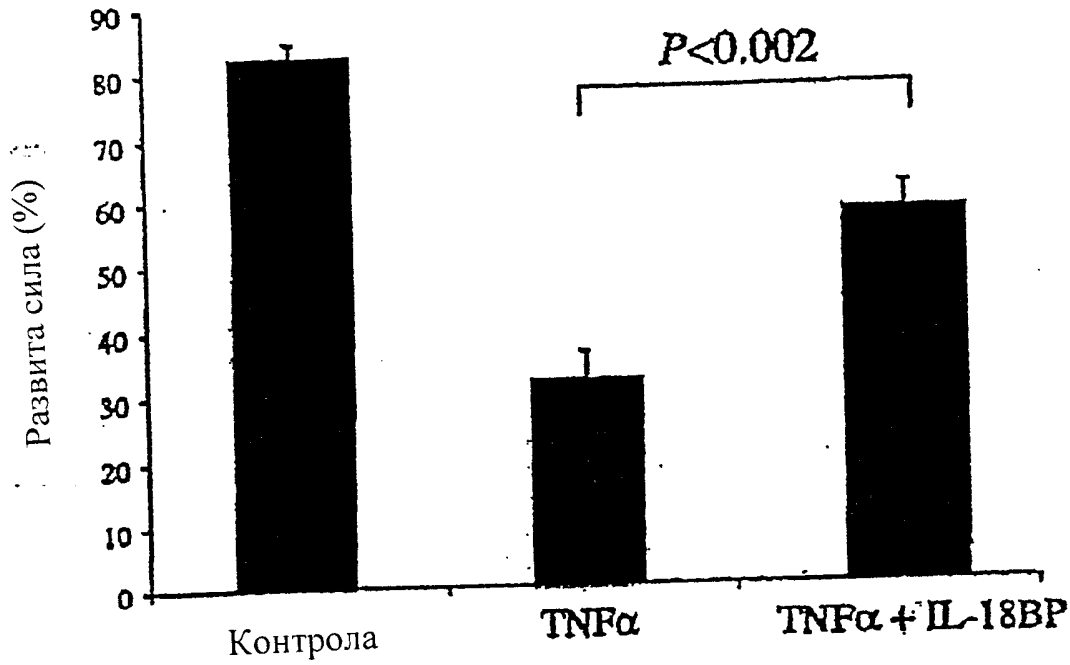


Фигура 4

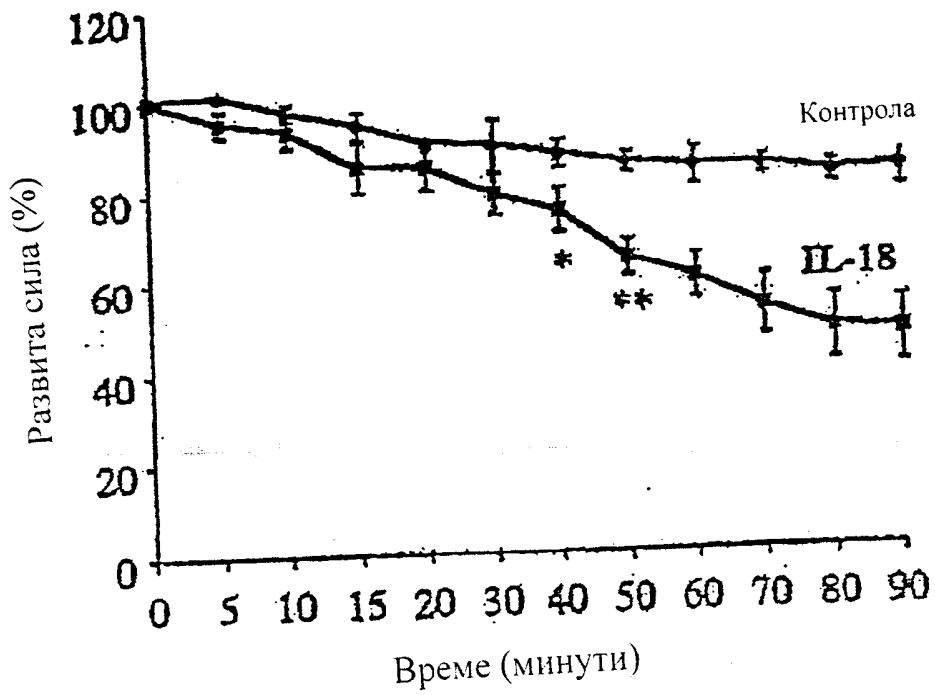


Фигура 5

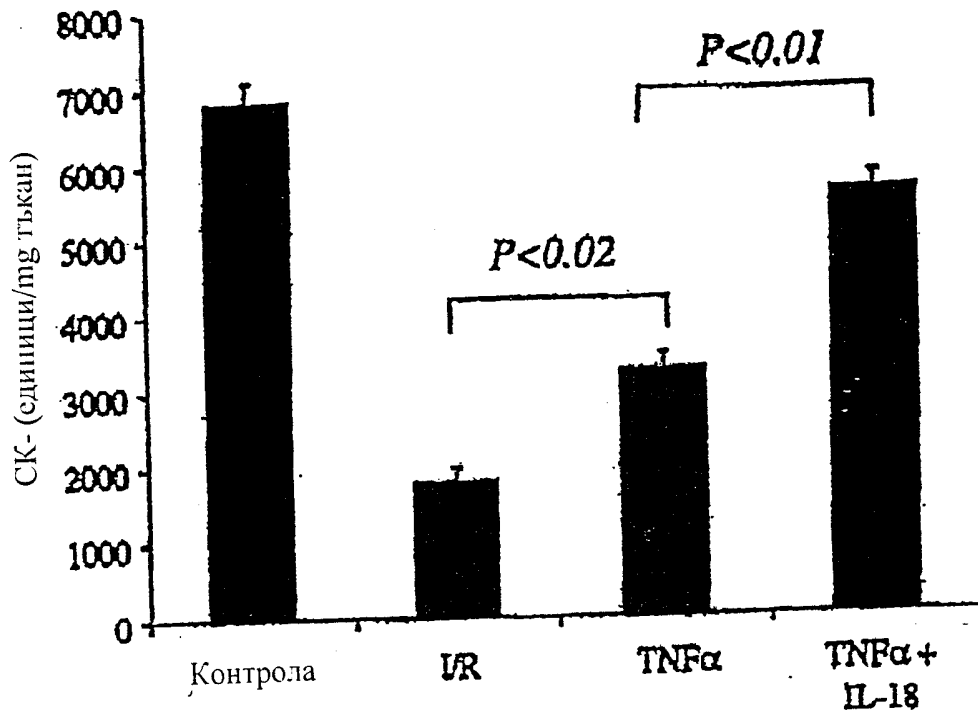
4/5



Фигура 6



Фигура 7



Фигура 8