



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **94022** (13) **C2**  
(51) **МПК**  
**A61K 39/395 (2011.01)**  
**A61K 38/21 (2011.01)**  
**A61P 1/16 (2006.01)**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) ЗАСТОСУВАННЯ ІНГІБІТОРУ IL-18 ДЛЯ ЛІКУВАННЯ І/АБО ПОПЕРЕДЖЕННЯ АЛКОГОЛЬНОГО ГЕПАТИТУ**

1

(21) а200604789  
(22) 20.02.2001  
(24) 11.04.2011  
(31) 00103590.6  
(32) 21.02.2000  
(33) EP  
(31) 00103597.1  
(32) 21.02.2000  
(33) EP  
(31) 00121651.4  
(32) 04.10.2000  
(33) EP  
(31) 00125633.8  
(32) 23.11.2000  
(33) EP  
(62) 2002097585, 20.02.2001  
(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.  
(72) ШВАТШКО ЙОЛАНД, СН, ДІНАРЕЛЛО ЧАРЛЬЗ А, US, ПЛАТЕР-ЗІБЕРК КРІСТІН, СН, ВАН ДЕВЕНТЕР САНТЕР, NL, РУБІНШТЕЙН МЕНАХЕМ, IL, НОВІК ДАНІЕЛА, IL, КІМ СОО ХІУН, US  
(73) АППЛАЙД РЕЗЕЧ СІСТЕМЗ АРС ХОЛДІНГ Н.В., NL, ЙЕДА РІСЕРЧ ЕНД ДІВЕЛОПМЕНТ КОМПАНІ, IL  
(56) WO A 9909063, 25.02.1999  
EP 0864585 A, 16.09.1998  
EP 0974600 A, 26.01.2000  
H. TSUTSUI ET AL.: "IL-18 accounts for both TNF-alpha- and Fas ligand-mediated hepatotoxic pathways in endotoxin-induced liver injury in mice", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 159, no. 8, 15 October 1997, pages 3961-3867  
(57) 1. Застосування інгібітору IL-18, що вибраний з антитіла проти IL-18 і IL-18-зв'язуючого білка, або ізоформ, мутеїнів, злитих білків, функціональних похідних, активних фракцій або похідних із циклічною перестановкою, що мають по суті таку ж активність, як і IL-18-зв'язуючий білок, для виготовлення лікарського засобу для лікування і/або попередження алкогольного гепатиту.  
2. Застосування за п. 1, де антитіло до IL-18 являє собою гуманізоване антитіло до IL-18.  
3. Застосування за п. 1, де антитіло до IL-18 являє собою антитіло до IL-18 людини.

2

4. Застосування за п. 1, де IL-18-зв'язуючий білок оброблений поліетиленгліколем.  
5. Застосування за п. 1, де інгібітор IL-18 являє собою злитий білок, що містить весь IL-18-зв'язуючий білок або його частину, злитий з усім імуноглобуліном або його частиною, і де злитий білок зв'язується з IL-18.  
6. Застосування за п. 5, де злитий білок містить всю константну ділянку імуноглобуліну або її частину.  
7. Застосування за п. 6, де імуноглобулін є ізотипом IgG1 або IgG2.  
8. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де лікарський засіб містить також інтерферон.  
9. Застосування за п. 8, де інтерферон являє собою інтерферон-β.  
10. Застосування за п. 8 або 9, де інгібітор IL-18 застосовується одночасно, послідовно або окремо від інтерферону.  
11. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де лікарський засіб містить також антагоніст фактора некрозу пухлини (TNF).  
12. Застосування за п. 11, де антагоніст TNF являє собою TBPI і/або TBPII.  
13. Застосування за п. 11 або 12, де інгібітор IL-18 і/або інтерферон застосовується одночасно, послідовно або окремо від антагоніста TNF.  
14. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де лікарський засіб містить також інгібітор COX.  
15. Застосування за п. 14, де інгібітор COX являє собою інгібітор COX-2.  
16. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де інгібітор IL-18 застосовується в кількості приблизно 0,4-4 мг на кг маси тіла.  
17. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де інгібітор IL-18 застосовується в кількості приблизно 1 мкг на кг маси тіла.  
18. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де інгібітор IL-18 вводять підшкірно.  
19. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де інгібітор IL-18 вводять внутрішньом'язово.  
20. Застосування за п. 1, де інгібітор IL-18 вводять щодня.

(13) **C2**  
(11) **94022**  
(19) **UA**

21. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де інгібітор IL-18 вводять через день.  
 22. Застосування експресуючого вектора, що містить кодуючу послідовність IL-18-зв'язуючого білка, для виготовлення лікарського засобу для лікування і/або попередження алкогольного гепатиту.

23. Застосування за п. 22 для генної терапії.  
 24. Застосування клітини, генетично модифікованої для продукування IL-18-зв'язуючого білка, при виготовленні лікарського засобу для лікування і/або попередження алкогольного гепатиту.

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Даний винахід відноситься до лікувального застосування інгібіторів IL-18 при деяких патологічних станах. Конкретніше, винахід відноситься до лікування і/або попередження артрити, до лікування і/або попередження хвороб печінки і до лікування і/або попередження запальних захворювань кишечника (IBD).

Передумови створення винаходу

В 1989 описана ендотоксиніндукована сироваткова активність, яка індукує інтерферон- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), одержаний з клітин селезінки миші (Micallef et al., 1996). Така сироваткова активність діє не як прямий індуктор IFN- $\gamma$ , а як спів стимулятор разом з IL-2 або мітогенами. При спробі виділити активність в чистому вигляді з постендотоксинної мишачої сироватки виявили явно гомогенний білок в 50-55 кДа. Оскільки інші цитокіни можуть діяти як співстимулятори для продукування IFN- $\gamma$ , неефективність нейтралізуючих антитіл до IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 або TNF для нейтралізації сироваткової активності дозволила передбачити, що вона є особливим фактором. У 1995 ті ж вчені показали, що ендотоксиніндукований співстимулятор для продукування IFN- $\gamma$  присутній в екстрактах печінки мишей, заздалегідь кондиціонованих *P. acnes* (Novick et al., 1992). На даній моделі росте популяція печінкових макрофагів (клітини Купфера), і у таких мишей низька доза бактерійного ліпополісахариду (LPS), не летальна для мишей, заздалегідь некондиціонованих, стає летальною. Фактор, названий IFN- $\gamma$ -індукуючим фактором (IGIF), а пізніше названий інтерлейкіном-18 (IL-18), виділений в чистому вигляді з 1200 г печінки мишей, оброблених *P. acnes*. Вироджені олігонуклеотиди, одержані з амінокислотних послідовностей очищеного IL-18, використали для клонування кДНК мишачого IL-18 (Novick et al., 1992). IL-18 являє собою білок в 18-19 кДа з 157 амінокислот, що не володіє явною подібністю з яким-небудь пептидом в базі даних. Матричні РНК IL-18 і інтерлейкіну-12 (IL-12) добре виявляються в клітинах Купфера і активованих макрофагах. Рекombінантний IL-18 індукує IFN-гамма сильніше, ніж IL-12, очевидно, через окремий каскад (Novick et al., 1992). Подібно ендотоксиніндукованій сироватковій активності, IL-18 сам не індукує IFN- $\gamma$ , а діє насамперед як співстимулятор з мітогенами або IL-2. IL-18 посилює клітинну проліферацію, очевидно, через IL-2-залежний каскад, і посилює продукування цитокінів Th1 *in vitro* і виявляє синергізм при поєднанні з IL-2 у значенні посиленого продукування IFN- $\gamma$  (Malizewski et al., 1990).

Показано, що нейтралізуючі антитіла до мишачого IL-18 запобігають летальності низької дози

LPS для мишей, заздалегідь кондиціонованих *P. acnes*. Є інші повідомлення про важливість IFN- $\gamma$  як медіатора летальності LPS у заздалегідь кондиціонованих мишей. Наприклад, нейтралізуючі анти-IFN- $\gamma$ -антитіла захищають мишей від шоку, подібного шоку Шварцмана (Fantuzzi et al., 1998), і оброблені галактозаміном миші з недоліком в IFN- $\gamma$ -рецепторах були стійкі до LPS загибелі, що викликається (Вут, 1990). Тому не стало несподіванкою, що нейтралізуючі антитіла до мишачого IL-18 захищають мишей, заздалегідь кондиціонованих *P. acnes*, від летального LPS (Novick et al., 1992). Обробка антимишачим IL-18 також захищала мишей, що вижили від важкої печінкової цитотоксичності.

Після того, як була клонована мишача форма, в 1996 з'явилося повідомлення про послідовність кДНК для IL-18 людини (Okamura et al., 1995). Рекombінантний IL-18 людини виявляє природну IL-18-активність (Okamura et al., 1995). Рекombінантний IL-18 людини не виявляє прямої IFN- $\gamma$ -індукуючої активності у відношенні Т-клітин людини, але діє як співстимулятор продукування IFN- $\gamma$  і інших цитокінів Т-хелперних клітин-1 (Th1) (Okamura et al., 1995). На сьогоднішній день IL-18 розглядають насамперед як співстимулятор продукування цитокінів Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2 і колонієстимулюючого фактора гранулоцитів-макрофагів) (Izaki, 1978), а також як співстимулятор FAS-лігандопосередкованої цитотоксичності мишачих клонів клітин природних кілерів (Novick et al., 1989).

Шляхом клонування IL-18 із уражених тканин і дослідження експресії гена IL-18 виявлений тісний зв'язок цього цитокіну з аутоімунною хворобою. У миші з діабетом, не пов'язаним з ожирінням (NOD), спонтанно розвивається аутоімунний інсуліт і діабет, які можна прискорити і синхронізувати однією ін'єкцією циклофосфаміду. На ранніх стадіях інсуліту у підшлунковій залозі NOD-миші методом ПЛР із зворотною транскрипцією показана наявність мРНК IL-18. Рівні мРНК IL-18 швидко підвищуються після обробки циклофосфамідом і передують зростанню рівня мРНК IFN- $\gamma$  і потім розвитку діабету. Представляє інтерес те, що така кінетика нагадує кінетику мРНК IL-12-p40, причому одержують тісну кореляцію рівнів окремих мРНК. Клонування кДНК IL-18 з РНК підшлункової залози з подальшим секвенуванням показує ідентичність з послідовністю IL-18, клонованою з клітин Купфера і заздалегідь активованих *in vivo* макрофагів. Також макрофаги NOD-миші відповідали на циклофосфамід експресією гена IL-18, в той час як макрофаги паралельно оброблених мишей Balb/c не реагували. Отже, експресія IL-18 у аутоімунної

NOD-миші регулюється аномально і тісно пов'язана з розвитком діабету (Novick et al., 1992).

IL-18 грає можливу роль в імунорегуляції або в запаленні шляхом збільшення функціональної активності Fas-ліганду на клітинах Th1 (Conti et al., 1997). IL-18 також експресується в корковій речовині надниркової залози і, отже, може являти собою секретований нейромодулятор, граючи важливу роль в організації імунної системи після сильного стресу (Chater, 1986).

In vivo IL-18 утворюється шляхом розщеплення про-IL-18, і виявляється, що його ендогенна активність відповідає за продукування IFN- $\gamma$  при летальності, опосередкованої P. acnes і LPS. Зрілий IL-18 продукується зі свого попередника за допомогою IL-1 $\beta$ -конвертуючого ферменту (IL-1 бета-конвертуючий фермент, ICE, каспаза-1).

Рецептор IL-18 складається щонайменше з двох компонентів, спільно діючих при скріпленні ліганду. Високо- і низькоафінні сайти скріплення IL-18 виявлені в Т-клітинах, стимульованих мишачим IL-12 (Yoshimoto et al., 1998), що наводить на думку про багатоланцюговий рецепторний комплекс. Поки ідентифіковані дві рецепторні субодиниці, причому обидві належать сімейству рецепторів IL-1 (Parnet et al., 1996). Сигнальна трансдукція IL-18 бере участь в активації NF- $\kappa$ B (DiDonato et al., 1997).

Деякі відомі цитокінзв'язуючі білки є розчинними цитокіновими рецепторами і відповідають позаклітинним лігандзв'язуючим доменам їх відповідних цитокінових рецепторів клітинної поверхні. Вони утворюються або шляхом альтернативного сплайсингу пре-мРНК, звичайного для рецептора клітинної поверхні, або шляхом протеолітичного розщеплення рецептора клітинної поверхні. Такі розчинні рецептори описані, в тому числі, серед інших, розчинні рецептори IL-6 і IFN- $\gamma$  (Nakamura et al., 1989), TNF (Dao et al., 1996; Englemann et al., 1989), IL-1 і IL-4 (John, 1986), IFN- $\alpha/\beta$  (Mizushima and Nagata, 1990) і інші. Виявляється, що один цитокінзв'язуючий білок, названий остеопротегерином (OPG, також відомий як фактор, який інгібує остеокласти - OCIF), член сімейства TNFR/Fas, є першим прикладом розчинного рецептора, який існує тільки у вигляді секретованого білка (Anderson, 1997; Bollon, 1980).

Нещодавно розчинний білок з високою афінністю до IL-18 виділений з людської сечі, і описані кДНК людини і миші (Novick et al., 1999; WO 99/09063). Білок названий IL-18-зв'язуючим білком (IL-18BP).

IL-18BP є не позаклітинним доменом одного з відомих рецепторів IL-18, а секретованим природно циркулюючим білком. Він належить новому сімейству секретованих білків. Сімейство також включає в себе деякі кодовані поксвірусами білки з високою гомологією з IL-18BP (Novick et al., 1999). IL-18BP конститутивно експресується в селезінці, належить суперсімейству імунोगлобулінів і має обмежену гомологію з рецептором IL-1 типу II. Його ген локалізується на хромосомі людини 11q13, і екзон, що кодує трансмембранний домен, в геномній послідовності 8,3 т.п.н. не виявлений (Novick et al., 1999).

Чотири ізоформи IL-18BP людини і дві ізоформи миші, що є результатом сплайсингу мРНК, виявлені в різних бібліотеках кДНК і експресовані, очищені і перевірені на скріплення і нейтралізацію біологічної активності IL-18 (Kim et al., 2000). Ізоформа IL-18BP людини (IL-18BP $\alpha$ ) виявила найвищу афінність до IL-18 з швидким "включенням" (rapid on-rate) і повільним "вимкненням" (slow off-rate) і константою дисоціації ( $K(d)$ ) 399 нМ. IL-18BP $\alpha$  розділяє загальний Ig-домен з IL-18BP $\alpha$ , за винятком 29 С-кінцевих амінокислот;  $K(d)$  IL-18BP $\alpha$  в 10 разів менше (2,94 нМ). Проте, IL-18BP $\alpha$  і IL-18BP $\alpha$  нейтралізують IL-18 >95% при молярному надлишку того і іншого. Ізоформи IL-18BP $\beta$  і IL-18BP $\delta$  втрачають повний Ig-домен і втрачають здатність зв'язувати або нейтралізувати IL-18. Мишачі ізоформи IL-18BP $\alpha$  і IL-18BP $\delta$ , що володіють ідентичністю з Ig-доменом, також нейтралізують >95% мишачого IL-18 при молярному надлишку того і іншого. Однак мишачий IL-18BP $\delta$ , що розділяє загальний звичайний С-кінцевий мотив з IL-18BP $\alpha$  людини, також нейтралізує IL-18 людини. За допомогою молекулярного моделювання ідентифікований великий надлишок електростатичного і гідрофобного зв'язуючого сайту в Ig-домені IL-18BP, який може відповідати за його високоафінне скріплення з лігандом (Kim et al., 2000).

Нещодавно зроблене припущення, що інтерлейкін IL-18 бере участь у розвитку патогенності при хронічних запальних захворюваннях, в тому числі ендотоксинного шоку, гепатиту і аутоімунного діабету (Kahiwamura and Okamura, 1998). Інша вказівка на позитивну роль IL-18 в розвитку пошкодження печінки виходить з експериментів, результати яких опубліковані Tsui et al. (Tsui et al., 1999), де на мишачій моделі показаний підвищений рівень IL-18 при викликаному ліпополісахаридом гострому пошкодженні печінки. Однак механізм дії багатфункціонального фактора IL-18 при розвитку пошкодження печінки поки не з'ясований.

Пошкодження печінки може мати різні причини. Це може відбуватися, наприклад, через вірусні або бактерійні інфекції, зловживання алкоголем, імунні розлади або рак.

Вірусні гепатити, викликані, наприклад, вірусом гепатиту В або вірусом гепатиту С, є погано керованими хворобами, що вражають велике число людей у всьому світі. Число відомих вірусів гепатиту постійно росте. Крім вірусів гепатиту В і С поки виявлені щонайменше чотири інших віруси, що викликають пов'язаний з вірусом гепатит, названі вірусами гепатиту А, D, E і G.

Алкогольна хвороба печінки є іншим широко розповсюдженим захворюванням, пов'язаним з хронічним вживанням алкоголю. Імунний гепатит є рідким аутоімунним захворюванням, яке погано лікується. Пошкодження печінки також включає в себе пошкодження жовчних протоків. Первинний біліарний цироз (ПБЦ) є аутоімунним захворюванням печінки, що характеризується зайнуванням внутрішньопечінкових жовчних протоків.

У деяких дослідженнях показано, що пошкодження печінки при хворобах, таких як алкогольний гепатит, цироз печінки, вірусний гепатит і первинний біліарний цироз, пов'язане з реакціями Т-

хелперних клітин-1 (Th1). У одній з робіт створена нова модель пошкодження печінки у мишей шляхом направленої доставки в печінку овалбумінвміщуючих ліпосом з подальшим адаптивним перенесенням овалбумінспецифічних клітин Th1. Комбінована обробка мишей овалбумінвміщуючими ліпосомами і переносником клітин Th1 спричиняла підвищення сироваткової трансаміназної активності паралельно з підвищенням рівнів IFN- $\gamma$  в сироватці. Як різкий контраст, перенесення овалбумінспецифічних клітин Th2 приводило до підвищення рівнів IL-4 в сироватці, але не викликало пошкодження печінки. Пошкодження печінки блокувалося антитілами проти IFN- $\gamma$  і антитілами проти фактора некрозу пухлини TNF- $\alpha$ . Такі результати показують, що клітини Th1 є головними ефекторними клітинами при гострому пошкодженні печінки (Nishimura and Ohta, 1999). У ряді інших робіт показано, що у мишей з понадекспресією виявляється спонтанний гепатит без якого-небудь патогену або якого-небудь іншого стимулятора (Okamoto et al., 1998).

Інше дослідження пов'язане з реакціями Th1 при первинному біліарному цирозі (ПБЦ). ПБЦ є аутоімунною хворобою печінки, що характеризується руйнуванням внутрішньопечінкових жовчних протоків. Як правило, вважають, що до такого пошкодження жовчних протоків приводять клітинні імунні механізми, зокрема, з участю Т-клітин. Останнім часом зроблене припущення, що відносна сила реакцій Th1 і Th2 є важливим фактором в патології різних аутоімунних хвороб. У даному дослідженні баланс підмножин при ПБЦ оцінювали шляхом виявлення цитокінів, специфічних для двох підмножин Т-клітин, тобто, IFN- $\gamma$  для клітин Th1 і IL-4 для клітин Th2. Клітини, позитивні у відношенні IFN- $\gamma$ -матричної РНК (мРНК) і IL-4-мРНК, підраховували у відділах печінки 18 пацієнтів з ПБЦ і 35 контрольних хворих, що мали хронічний активний гепатит С, позапечінкову біліарну обструкцію і здорову печінку, з використанням неізотопної гібридизації *in situ* і імуногістохімії. Мононуклеарні клітини, які експресують мРНК IFN- $\gamma$  і IL-4, при ПБЦ збиралися в запалених вхідних шляхах в печінці, але рідко були присутніми у відділах печінки при позапечінковій біліарній обструкції, алкогольному фіброзі або при здоровій печінці. Клітини, позитивні у відношенні мРНК IFN- $\gamma$  і IL-4, при ПБЦ печінки виявлялися в значно більшому числі, ніж в печінці в контролі ( $P < 0,01$ ). Крім того, при ПБЦ печінки експресія мРНК IFN- $\gamma$  виявлялася частіше, ніж експресія IL-4, і рівні експресії мРНК IFN- $\gamma$  більше корелюють з мірою запальної активності на входах. Клітини, позитивні у відношенні мРНК IFN- $\gamma$ , виявлялися, головним чином, поблизу пошкоджених жовчних протоків, які оточувалися лімфоїдними агрегатами. Результати показують, що клітини Th1 є більш помітною субпопуляцією Т-клітин в лімфоїдних інфільтратах при ПБЦ (Harada et al., 1997).

Картина цитокінів при пізнанні вірусних антигенів також, як вважають, впливає глибоким чином на розчинення вірусних інфекцій і вірусний кліренс. У одній з робіт досліджувалося, чи грає

яку-небудь роль цитокіновий дисбаланс, орієнтований на реакцію клітин типу Th2, при хронічному гепатиті В. Профілі цитокінів моноклерних клітин периферичної крові, пов'язаних з хронічним гепатитом В, аналізували методом ОТ-ПЛР. Після стимуляції поверхневого антигену гепатиту В (HbsAg) виявляли експресію IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 і IL-10 у 41%, 8%, 41% і 50% пацієнтів, відповідно. Серед вказаних цитокінів експресію цитокіну Th1 IFN- $\gamma$  зв'язували з високими рівнями в сироватці AST/ALT

(аспартатамінотрансферази/аланінамінотрансферази), що являють собою типові маркери пошкодження печінки. Не показано, що цитокіни типу Th2 надають захисну дію на гепатоцити. Як висновок, продукування цитокіну Th1 IFN- $\gamma$ , HbsAg-реактивними клітинами пов'язано з пошкодженням гепатоцитів при хронічному гепатиті В (Lee et al., 1999). Є повідомлення про високі рівні FAS-ліганду і його рецептора (CD95) в печінці пацієнтів з гепатитом В (Luo et al., 1997). Вважається, що FAS-ліганд є одним з головних цитотоксичних факторів, що приводять до апоптозу гепатоцитів.

У іншій роботі ідентифіковані фактори, пов'язані з розвитком пошкодження печінки у 30 пацієнтів, що не зазнавали лікування з хронічним гепатитом, позитивних відносно вірусу гепатиту С/РНК (HCV/RNA). Некрозапальні і архітектурні пошкодження оцінювали з використанням шкали Ishak. Активовані зірчасті клітини печінки (HSC) візуалізували методом імуногістохімії для  $\alpha$ -актину гладких м'язів ( $\alpha$ SMA) і визначали кількісно методом морфометрії. HCV/RNA в плазмі оцінювали з використанням методу ОТ-ПЛР. Для того, щоб дослідити тип імунної відповіді, що бере участь в розвитку пошкодження печінки, IFN- $\gamma$ -позитивні клітини (як вираження Th1-подібної реакції) оцінювали методом імуногістохімії і визначали кількісно методом морфометрії. Виявлено, що більше всього HSC визначали поблизу областей часточкового некрозапалення або фіброзних перегородок підстилки. Паренхіма,  $\alpha$ SMA- і сиріус червоної-позитивна, істотно корелює з оцінками некрозапалення і архітектури. IFN- $\gamma$ -позитивні клітини виявлені навколо вхідних областей, пов'язаних із запальними інфільтратами, що добре корелює з архітектурними пошкодженнями. Тому зроблений висновок, що активація HSC і розвиток пошкодження печінки пов'язані з Th1-подібною реакцією (Baroni et al., 1999). Подібним чином, у разі гепатиту С в печінці і сироватці пацієнтів з гепатитом С виявлені FAS-ліганд і його рецептор (Hiramatsu et al., 1994; Okazaki et al., 1996; Lio et al., 1998).

Виявлено, що цитокіни Th1 і інші маркери Th1 пов'язані з алкогольним гепатитом і цирозом печінки. Запальні стимули і перекисне окиснення ліпідів активують нуклеарний фактор  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) і активують прозапальні цитокіни і хемокини. У одній з робіт оцінювали співвідношення між паталогічним пошкодженням печінки, ендотоксикозом, перекисним окисненням ліпідів і активацією NF- $\kappa$ B і дисбалансом між про- і протизапальними цитокінами. Паціюкам (5 осіб в групі) шляхом внутрішньошлункової інфузії давали етанол і корм, що містить насичений жир, пальмове масло, кукурудзяне ма-

сло або риб'ячий жир. Контрольним паціюкам етанол замінювали ізокалорійною кількістю декстрози. Здійснювали аналіз патології і визначали рівні ендотоксину, перекисного окислення ліпідів, NF-κB і матричної РНК (мРНК) прозапальних цитокінів (TNFα, IL-1-бета, IFNγ і IL-12), С-хемокінів (регульовані при активації експресовані і секретовані нормальними Т-клітинами [RANTES], хемотаксичний білок моноцитів [MCP]-1, макрофагальний запальний білок [MIP]-1a), С-Х-С-хемокінів (цитокініндукований нейтрофільний хемоатрактант [CINC], MIP-2, IP-10 і епітеліальний нейтрофілактивуючий білок [ENA]-78) і протизапальних цитокінів (IL-10, IL-4 і IL-13). У паціюків, що виявляють некрозапальне пошкодження (риб'ячий жир і етанол і кукурудзяне масло і етанол) видна активація NF-κB і підвищена експресія прозапальних цитокінів С-С і хемокінів С-Х-С. У вказаних групах також були самі високі рівні ендотоксину і перекисного окислення ліпідів. Рівні мРНК IL-10 і IL-4 були нижче в групі, що виявляє запальне пошкодження печінки. Таким чином, активація NF-κB відбувається в присутності прозапальних стимулів і приводить до підвищеної експресії прозапальних цитокінів Th1 і хемокінів (Naji et al., 1999). При алкогольних хворобах печінки також підвищувалися кількості FAS-ліганду і його рецептора, що ще раз наводить на думку про те, що цитокіни Th1 залучаються до аутоімунних процесів, індукованих при алкогольному гепатиті (Galle et al., 1995; Taieb et al., 1998; Fiore et al., 1999).

TNFα також виявляється як звичайний шлях метаболізму при патогенезі некрозапалення печінки, пов'язаного з алкоголем. Підвищені рівні TNF в печінці і сироватці підтверджені на тваринних моделях алкогольної хвороби печінки і при алкогольній хворобі печінки у людей. Постульовано, що такий розрегульований метаболізм TNF грає роль при багатьох метаболічних ускладненнях і пошкодженні печінки при алкогольній хворобі печінки (Grove et al., 1997; McClan and Cohen, 1989). Наприклад, при дослідженні виявлено, що у пацієнтів з алкогольним гепатитом більш високі рівні TNFα (в середньому 26,3 нг/л; 95% CI - 21,7-30,9), ніж у здорових людей (6,4 нг/л; CI - 5,4-7,4). У хворих, вмерлих згодом, рівень TNFα більш високий (34,7 нг/л; CI - 27,8-41,6), ніж у тих, що залишилися в живих (16,6 нг/л; CI - 14,0-19,2). У пацієнтів з алкогольним гепатитом рівні TNF-α позитивно корелюють з білірубіном сироватки ( $r=0,74$ ;  $P=0,0009$ ) і креатиніном сироватки ( $r=0,81$ ;  $P=0,0003$ ). У пацієнтів з алкогольним гепатитом рівні TNF-α вище, ніж у пацієнтів з неактивним алкогольним цирозом (11/1 нг/л; CI - 8,9-13,3) і важких алкоголіків без хвороби печінки (6,4 нг/л; CI - 5,0-7,8). У пацієнтів з аномальною функцією нирок рівні TNF-α нижче (за 14,1 нг/л; CI - 5,4-22,8), ніж у пацієнтів з алкогольним гепатитом. Тому зроблений висновок, що підвищення рівня TNF-α при алкогольному гепатиті найбільш помітно у важких випадках, що наводить на думку про те, що TNF-α грає деяку роль при патогенезі (Bird et al., 1990).

TNF опосередковує багато які біологічні дії ендотоксину. Нещодавно проведені дослідження

показали, що введення TNF може викликати пошкодження печінки і що TNF може опосередкувати летальність гепатотоксину галактозаміну. Одним з найбільш сильних індукторів TNF є ендотоксин. Оскільки у пацієнтів з алкогольною хворобою печінки часто є ендотоксемія і оскільки багато які клінічні вияви алкогольного гепатиту є відомими біологічними ефектами TNF, оцінювали його активність у пацієнтів з алкогольним гепатитом. Базальне і стимульоване ліпополісахаридами вивільнення TNF з моноцитів периферичної крові - головного джерела продукування TNF - визначали у 16 пацієнтів з алкогольним гепатитом і 16 здорових добровольців. У восьми з 16 пацієнтів з алкогольним гепатитом і тільки у двох із 16 здорових добровольців була спонтанна TNF-активність, що виявляється ( $p$  менше 0,05). Після стимуляції ліпополісахаридами середній рівень вивільнення TNF з моноцитів у пацієнтів з алкогольним гепатитом істотно - більш, ніж в два рази - перевищував рівень вивільнення TNF у здорових людей (25,313,7 проти  $10,9 \pm 2,4$  одиниць на мл,  $p$  менше 0,005). Тому зроблений висновок, що моноцити пацієнтів з алкогольним гепатитом мають істотно підвищене спонтанне і стимульоване ліпополісахаридами вивільнення TNF в порівнянні зі здоровими добровольцями (McClain and Cohen, 1989).

Ліпополісахарид(LPS)-зв'язуючий білок (LBP) і CD 14 грають ключові посередницькі ролі в активації клітин ендотоксинам. Постульовано, що LPS, що утворився в кишечнику, бере участь в промотуванні патологічного пошкодження печінки при алкогольній хворобі печінки. Показано, що у паціюків, яким давали внутрішньовенно етанол в маслі протягом 4 тижнів, підвищувалися рівні CD 14 і LBP в Купферовських клітинах і гепатоцитах, відповідно. Експресія мРНК CD 14 також може підвищитися в немієлоїдних клітинах. Посилена експресія LBP і CD 14 сприяє швидкому підвищенню LPS-індукованої експресії різних прозапальних цитокінів і корелює з наявністю патологічного пошкодження печінки при алкогольному пошкодженні печінки (Su et al., 1998; Lukkari et al., 1999).

Артрит є захворюванням, що полягає в запаленні суглобів. Суглоби опухають, втрачають рухливість, стають хворобливими, червоніють або горять. Симптоми можуть супроводжуватись втратою ваги, лихоманкою або слабкістю. Коли вказані симптоми продовжуються більше двох тижнів, це може означати запальний артрит, наприклад, ревматоїдний артрит. Самим звичайним типом артриту є дегенеративна хвороба суглобів (остеоартрит).

Лікарські засоби, що звичайно призначаються у разі артриту, відносяться до нестероїдних протизапальних засобів (NSAID). До NSAID відносяться аспірин і подібні аспірину лікарські засоби. Вони зменшують запалення, що є причиною болю в суглобах, нерухомості і опухання суглобів. Однак NSAID є неспецифічними лікарськими засобами з рядом побічних дій, включаючи шлункову кровотечу (Homepage of the Department of Orthopaedics of the University of Washington on Arthritis, Frederick Matsen (Chairman), [www.orthop.washington.edu](http://www.orthop.washington.edu)). Крім NSAID, для ослаблення ознак і симптомів

остеоартриту і ревматоїдного артриту у дорослих застосовують целебрекс™ - інгібітор циклооксигенази (COX-2). Він також показаний для лікування хворих з сімейним аденомним поліпозом.

У WO 01/00229 описується комбінація антагоністів фактора некрозу пухлин (TNF) і інгібіторів COX-2 для лікування запалення.

Антагоністи TNF також застосовуються для лікування артриту. Антагоністи TNF описуються, наприклад, у WO 9103553.

Недавні дослідження показали, що інтерлейкін IL-18 грає роль прозапального фактора при метаболізмі в суглобах. Olee et al. (1999) показали, що IL-18 продукується суглобовими хондроцитами і індукує прозапалення і катаболічні реакції. У хондроцитах мРНК IL-18 індукується 11-1 β. Хондроцити продукують попередник IL-18 і у відповідь на стимуляцію IL-1 секретиють зрілу форму IL-18. Дослідження дії IL-1 на хондроцити також показало, що він інгібує TGF-β-індуковану проліферацію і посилює продукування окислу азоту. IL-18 стимулює експресію деяких генів в суглобових хондроцитах здорових людей, включаючи синтазу окислу азоту, що індукується, циклооксигеназу, що індукується, IL-6 і стромелізин. Експресія гена пов'язана з синтезом відповідних білків. Обробка суглобового хряща здорової людини IL-18 підвищувала вивільнення глікозаміногліканів. Вказані результати ідентифікують IL-18 як цитокін, який регулює реакції хондроцитів і вносить вклад в деградацію хрящів.

Локалізація інтерлейкін-1β-конвертуючого ферменту (ICE)/каспази-1 в остеоартритних тканинах людини і його роль в дозріванні інтерлейкіну-1-бета і інтерлейкіну-18 показані Sana et al. (1999). Saha et al. досліджували експресію і продукування каспази-1 в хрящі і синовії здорової людини і у випадку остеоартриту (ОА), кількісно визначали рівень ICE в ОА-хондроцитах і перевіряли співвідношення між топографічним розподілом ICE, інтерлейкіну-1β (IL-1β) і IL-18, а також апоптоз хондроцитів. Експерименти, проведені при даному дослідженні, показали, що ICE експресувався і синтезувався як в синовіальній мембрані, так і в хрящі людини, причому значно більше число клітин фарбувалось в ОА-позитивній тканині, ніж в здоровій тканині. Продукування ICE локалізоване переважно у зовнішніх і верхніх проміжних шарах суглобового хряща. Продукування зрілого IL-1-бета в ОА-хрящових експлантатах і хондроцитах повністю блокувалося шляхом обробки специфічним інгібітором ICE, який також помітно зменшує число IL-18-позитивних клітин. Співвідношення між активним IL-1-бета і ICE наводить на думку, що ICE може промотувати розвиток ОА шляхом активації даного прозапального цитокіну і що IL-18 може грати деяку роль в патології хряща.

Gracie et al. (1999) передбачили для IL-18 роль прозапального фактора при ревматоїдному артриті. Gracie et al. виявили мРНК IL-18 і білок в синовіальних тканинах при ревматоїдному артриті в істотно більшій кількості, ніж при остеоартриті (контроль). Також показано, що поєднання IL-12 або IL-15 з IL-18 викликає продукцію IFN-γ синовіальними тканинами in vitro. Крім того, введення IL-18

мишам, імунізованим колагеном/неповним ад'ювантом Фрейнда, полегшує розвиток ерозивного запального артриту, що наводить на думку, що IL-18 може бути прозапальним фактором in vivo.

Однак на сьогоднішній день показано, що, крім хімічних сполук, тільки блокада TNFα і IL-1β шляхом використання рецепторів або мононуклеарних антитіл ослабляє колагеніндукований артрит у мишей (CIA, є мишачою моделлю ревматоїдного артриту) (Williams et al., 1994), і тому пропонується як лікування ревматоїдного артриту.

Термін "хронічні або ідіопатичні запальні захворювання кишечника" охоплює щонайменше два стани: хвороба Крона і неспецифічний виразковий коліт. Обидва захворювання є хворобами кишкового тракту, причому хвороба Крона звичайно вражає тонку кишку. Коли в патологічний процес залучається також і ободова кишка, диференціальна діагностика, що відрізняє це захворювання від неспецифічного виразкового коліту, може бути проблематичною.

Хронічне запалення і покриття виразками при хворобі Крона звичайно починається або з обструкції тонкої кишки, або з болю в черевній порожнині, що нагадує гострий апендицит; інші описи можуть відноситися до її ускладнень. Хід хвороби хронічний, і можуть бути загострення і ремісії, незважаючи на лікування. Початок, як правило, має місце в ранній молодості, причому приблизно половина всіх випадків відноситься до віку 20-30 років і 90% - до 10-40 років. Уражується трохи більше чоловіків, ніж жінок.

Мікроскопія відображає масивні явища. Запалення є переривчастим: воно осередкове або плямоподібне. Скупчення лімфоцитів і клітин плазми виявляються, головним чином, в слизовій оболонці і шарі тканини під слизовою оболонкою, але, як правило, уражуються всі шари (трансмуральне запалення). Класичною мікроскопічною особливістю хвороби Крона є наявність огрядних клітин, оточених скупченням лімфоцитів. Виникнення ідіопатичних запальних захворювань кишечника має істотні географічні відмінності. Вказані хвороби частіше трапляються в Північній Європі і Сполучених Штатах, ніж в країнах Південної Європи, Африки, Південної Америки і Азії, хоча підвищення урбанізації і економічного процвітання веде до більш частих випадків в областях Південної Європи і Японії (General and Systematic Pathology, Churchill Livingstone, 3<sup>rd</sup> edition 2000, JCE Underwood, Ed.).

При хворобі Крона клінічно є дві основні групи, причому перша включає пацієнтів, хвороба яких входить в тривалу ремісію протягом трьох років з початку захворювання, а друга включає пацієнтів, що хворіють довше трьох років.

Як б не була етіологія, є доказ персистентності і невідповідності активації Т-клітин і макрофагів при хворобі Крона з підвищеним продукуванням прозапальних цитокінів, зокрема, інтерлейкінів (IL) 1, 2, 6 і 8, інтерферону (IFN)-γ і фактора некрозу пухлини (TNF)-α. Хвороба Крона характеризується тривалим (хронічним) запаленням, що супроводжується фіброзом. Процес проліферації фібробластів і осадження колагену може бути опосеред-

кований перенесенням фактора зростання  $\beta$ , що володіє деякою протизапальною дією, а саме, рекрутментом фібробластів, синтезом матриці і дезактивацією клітин зони запалення, але також ймовірно, що можуть залучатися багато інших медіаторів.

Неспецифічний виразковий коліт є неспецифічним запальним розладом в товстій кишці, який починається в прямій кишці і негайно розповсюджується в різній мірі. На відміну від хвороби Крона, неспецифічний виразковий коліт обмежується товстою кишкою.

Все більше стає свідомість, які вказують на те, що неспецифічний виразковий коліт є наслідком зміни аутоімунної реактивності, але пошкодження слизової оболонки також може бути результатом невідповідної Т-клітинної активації і непрямого пошкодження, викликаного цитокінами, протеазами і метаболітами і реактивним киснем макрофагів і нейтрофілів. Останній механізм пошкодження епітелію ободової кишки названий пошкодженням з "нешкідливим свідком". Доказом підтримки аутоімунітету є наявність аутореактивних Т-лімфоцитів і аутоантитіл проти епітеліальних клітин ободової кишки і ендотеліальних клітин, і цитоплазматичних аутоантитіл проти нейтрофілів (ANCA). Однак неспецифічний виразковий коліт не повинен розглядатися як аутоімунне захворювання, при якому пошкодження слизової оболонки є прямим наслідком імунної реакції на аутоантигени (General and Systematic Pathology, цит. вище).

Що стосується лікування хвороби Крона, то більшість людей лікують спочатку лікарськими засобами, що містять мезаламін - речовину, яка сприяє боротьбі із запаленням. Хворі, яким він не допомагає або які його не переносять, можуть одержувати інші мезаламінвміщуючі лікарські засоби, як правило, відомі як 5-ASA. До можливих побічних дій препаратів мезаламіну відносяться нудота, блювота, печія, діарея і головний біль.

Деякі пацієнти для боротьби із запаленням приймають кортикостероїдні препарати. Такі лікарські засоби найбільш ефективні у разі активної хвороби Крона, але вони можуть викликати сильну побічну дію, включаючи підвищену сприйнятливість до інфекції.

Лікарські засоби, які приглушують імунну систему, також застосовують для лікування хвороби Крона. Частіше за все виписують 6-меркаптопурин і споріднений лікарський засіб азатіоприн. Імунодепресивні засоби діють шляхом блокування імунної реакції, що вносить вклад в запалення. Такі лікарські засоби можуть викликати побічну дію, подібну нудоті, блювоті і діареї, і можуть знизити опір людини інфекції. Коли пацієнтів лікують поєднанням кортикостероїдних і імунодепресивних лікарських засобів, доза кортикостероїдів, зрештою, може бути знижена. Деякі дослідники вважають, що імунодепресивні лікарські засоби можуть посилити ефективність кортикостероїдів.

Управління США за харчовими продуктами і лікарськими засобами схвалило лікарський засіб інфліксимаб для лікування помірно і важкої форм хвороби Крона, не реагуючої на стандартну терапію (мезаламіни, кортикостероїди, імунодепресив-

ні засоби), і для лікування відкритих дренуючих свищів. Інфліксимаб - перший лікарський засіб, схвалений спеціально для хвороби Крона, являє собою моноклональні антитіла проти фактора некрозу пухлини (TNF). Анти-TNF видаляють TNF з кровотоку до того, як він досягне кишечника, за допомогою чого попереджається запалення.

Антибіотики застосовують для лікування надмірного розвитку мікрофлори в тонкій кишці, викликаного стенозом, свищами або проведеною раніше операцією. У разі такої звичайної проблеми лікар може призначити один або декілька з наступних антибіотиків: ампіцилін, сульфонамід, цефалоспори́н, тетрациклін або метронідазол.

Діарея і судорожний біль в черевній порожнині часто полегшуються, коли втихає запалення, але також може бути потрібна додаткова лікарська терапія. Можна використати деякі протидіарейні засоби, включаючи дифеноксилат, лоперамід і кодеїн. Пацієнтів, збездовнених через діарею, звичайно лікують рідинами і електролітами.

Залишається потреба в ефективній терапії для лікування і/або попередження запальних захворювань кишечника, зокрема, хвороби Крона і неспецифічного виразкового коліту, із зниженою побічною дією або, в ідеалі, навіть без побічної дії.

Як гістологічні, так і імунологічні спостереження показують, що клітинно-опосередкований імунітет і Т-клітинна активація є ключовими особливостями CD. Дослідження на людині і на експериментальних моделях наводять на думку, що при CD локальна імунна реакція має тенденцію розвиватися переважно за типом Th1 (Desreumaux et al., 1997), і що цитокіни, що локально вивільняються, такі як IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  і TNF- $\alpha$ , вносять вклад в промотування і поширення запальної реакції (Rehmd et al., 1996).

Цитокін IL-18 грає важливу роль в Th1-опосередкованій імунній реакції спільно з цитокіном IL-12 шляхом стимуляції секретування IFN- $\gamma$ , посилення цитотоксичності природних кілерних клітин і стимуляції диференціювання клітин TH1 (Uchito et al., 1996).

IL-18 діє разом з IL-12, IL-2, антигенами, мітогенами і також, можливо, іншими факторами, для індукції продукування IFN- $\gamma$ . IL-18 також посилює продукування GM-CSF і IL-2, посилює проліферацію Т-клітин, що індукується анти-CD-3, і посилює Fas-опосередкований клінінг природних кілерних клітин. Зрілий IL-18 продукується з свого попередника IL-1 $\beta$ -конвертуючим ферментом (ICE, каспаза-1). Рецептор IL-18 складається щонайменше з двох компонентів, спільно діючих при скріпленні ліганду. Високо- і низькоафінні сайти скріплення IL-18 виявлені в Т-клітинах, стимульованих мишами IL-12 (Okamoto et al., 1998), що наводить на думку про багатоланцюговий рецепторний комплекс. Поки ідентифіковані дві рецепторні субодиниці, причому обидві належать сімейству рецепторів IL-1 (Okamoto et al., 1999). Сигнальна трансдукція IL-18 бере участь у активації NF- $\kappa$ B (Matsumoto et al., 1997).

Нещодавно зроблене припущення, що IL-18 бере деяку участь у запальних захворюваннях

кишечнику (Pizarro et al., 1999; Monteleone et al., 1999).

Pizarro et al. (1999) охарактеризували експресію і локалізацію IL-18 в зразках ободової кишки і виділили популяції слизових клітин у пацієнтів з хворобою Крона. З використанням схеми напівкількісної ОТ-ПЛР виявлено, що кількість транскриптів мРНК IL-18 у свіжовиділених інтестинальних епітеліальних клітинах і мононуклеарних клітин власної пластинки пацієнтів при CD зростає у порівнянні з пацієнтами з неспецифічним виразковим колітом і контролем без запалення. Транскриптів мРНК IL-18 було більше в інтестинальних епітеліальних клітинах в порівнянні з мононуклеарними клітинами власної пластинки. Імуногістохімічний аналіз посічених тканин ободової кишки виявив локалізацію IL-18 як в мононуклеарних клітинах власної пластинки (зокрема, макрофагах і дендритних клітинах), так і в інтестинальних епітеліальних клітинах. Вестерн-блотинг показав, що смуга 18,3 кДа, відповідна як рекомбінатному, так і зрілому білку IL-18, при біопсії слизової оболонки кишечника виявляється переважно при CD, в порівнянні з UC; інша смуга 24 кДа, відповідна неактивному попереднику IL-18, визначається при біопсії незапалених областей як при CD, так і при UC, і є єдиною формою, виявленою в контролі без запалення.

Monteleone et al. (1999) підтвердили вказані результати. Суцільну тканину слизової оболонки кишечника і мононуклеарні клітини власної пластинки 12 пацієнтів з хворобою Крона, 9 з неспецифічним виразковим колітом і 15 чоловік (контроль) без запального захворювання кишечника випробували на IL-18 методом напівкількісної ОТ-ПЛР і вестерн-блотингу. У перевірених зразках виявлені транскрипти IL-18. Однак підвищене накопичення мРНК IL-18 виявлене в зразках як слизової оболонки, так і мононуклеарних клітин власної пластинки при хворобі Крона, при порівнянні з неспецифічним виразковим колітом і контролем. При хворобі Крона більше транскриптів IL-18 накопичується в зразках слизової оболонки, взятих з уражених ділянок. Смуга 18 кДа відповідна зрілому IL-18, переважно виявлялася в зразках слизової оболонки при хворобі Крона. У зразках слизової оболонки контролю без IBD IL-18 був присутнім як поліпептид в 24 кДа. Відповідно, активна субодиниця (p20) IL-1-бета-конвертуючого ферменту (ICE) експресувалась у зразках або при CD або при UC, в той час як в слизовій оболонці ободової кишки контролю без IBD ICE синтезувався тільки у вигляді попередника (p45).

Daye (1999) розглядав різні і частково суперечливі функції IL-18. У результаті, IL-18 являє собою плейотропний інтерлейкін, що має функції як посилення, так і ослаблення запалення. З одного боку, він посилює продукування прозапальних цитокінів, подібних TNF- $\alpha$ , отже, промотує запалення. З іншого боку, він індукує продукування NO - інгібітору каспази-1, таким чином блокуючи дозрівання IL-1 $\beta$  і IL-18 і, можливо, ослабляючи запалення. Така невизначена роль IL-18 ставить під сумнів ефективність інгібіторів IL-18 при запальних захворюваннях. Крім того, через взаємодію вели-

кої множини різних цитокінів і хемокінів при регуляції запалення сприятлива дія при лікуванні або попередженні запальних захворювань шляхом блокування тільки одного з учасників непередбачувана.

Короткий виклад суті винаходу

Даний винахід заснований на висновку, що інгібітори IL-18 ефективні для лікування і/або попередження різних захворювань і розладів.

Першою метою даного винаходу є новий засіб для лікування і/або попередження пошкодження печінки. Тому винахід відноситься до застосування інгібітору IL-18 для виробництва лікарського засобу для лікування і/або попередження пошкодження печінки в гострій або хронічній стадії. Конкретніше, винахід відноситься до лікування і/або попередження алкогольного гепатиту, імунного гепатиту, блискавичного гепатиту, цирозу печінки і первинного біліарного цирозу.

Другою метою даного винаходу є новий засіб для лікування і/або попередження артриту. Тому винахід також відноситься до застосування інгібіторів IL-18 для одержання лікарського засобу для лікування і/або попередження артриту. Сприятлива дія інгібіторів IL-18 включає в себе зниження важкості хвороби, а також попередження поширення хвороби. Ці результати є несподіваними, оскільки зі стану техніки, описаного вище, не можна зробити висновок, що блокада одного специфічного фактора, що бере участь в артриті, а саме, інтерлейкіну IL-18, може привести до полегшення при артриті або навіть до лікування ураженого артритом суглоба.

На мишачій моделі також виявлено, що введення інгібітору IL-18 істотно зменшує ерозію хряща. Таким чином, даний винахід також відноситься до застосування інгібітору IL-18 при виготовленні лікарського засобу для лікування і/або попередження руйнування хряща.

Третьою метою даного винаходу є новий засіб для лікування і/або попередження запального захворювання кишечника (IBD), зокрема, хвороби Крона і неспецифічного виразкового коліту. Тому винахід також відноситься до застосування інгібітору IL-18 для виготовлення лікарського засобу для лікування і/або попередження IBD. Згідно з даним винаходом, тепер виявлено, що в біоптатах пацієнтів з хворобою Крона в зонах запалення слизової оболонки підвищуються концентрації мРНК IL-18BP і білка. Крім того, на мишачій моделі запального захворювання кишечника показано, що два різних інгібітору IL-18 захищають тварин від захворювання.

Застосування поєднань інгібітору IL-18 і/або інтерферону і/або антагоніста TNF і/або інгібітору COX-2 також розглядаються згідно з винаходом. Для того, щоб застосувати генно-терапевтичні підходи до доставки інгібітору IL-18 в хворі тканини або клітини, інші аспекти винаходу відносяться до застосування експресуючих векторів, що містять кодуючу послідовність інгібітору IL-18, для лікування і/або попередження хворобливих станів. Винахід також відноситься до застосування активації ендогенного гена інгібіторів IL-18 і до застосування створених методами генної інженерії клі-



тин для експресії інгібіторів IL-18 для попередження і/або лікування пошкодження печінки, артриту і IBD.

Короткий опис креслень

На Фіг. 1 представлена гістограма, що відображає рівень IFN- $\gamma$  у сироватці (пг/мл) після ін'єкції різних кількостей рекомбінантного IL18BP (0; 3,04; 0,4; 4 мг/кг) мишам за 1 годину до ін'єкції LPS. Зразки крові беруть через 5 год. після ін'єкції LPS і методом ELISA аналізують наявність в них циркулюючого IFN- $\gamma$ .

На Фіг. 2 представлена гістограма, що відображає рівень аланінамінотрансферази (ALT) в сироватці. Мишам роблять ін'єкції зростаючих доз рекомбінантного IL18BP людини (0; 0,04; 0,4; 4 мг/кг) перед ін'єкцією LPS мишам, сенсibilізованим Р. аспес. Зразки крові беруть через 5 год. після ін'єкції LPS, і вимірюють вміст ALT в сироватці. SF=сигма Френкеля: 1 одиниця SF AST/ALT буде утворювати  $4,82 \times 10^{-4}$  мкмоль глутаміну на хвилину при pH 7,5 при 25°C.

На Фіг. 3 показаний час виживання мишей після ін'єкції LPS. Мишам роблять ін'єкції різних доз рекомбінантного IL18BP людини (0; 0,04; 0,4; 4 мг/кг) за 20 хв. до ін'єкції LPS мишам, сенсibilізованим Р. аспес. Трикутники - 4 мг/кг; маленькі ромби - 0,4; великі ромби - 0,04; кружки - IL18BF відсутній (тільки LPS).

На Фіг. 4 представлена гістограма, що відображає рівень IFN- $\gamma$  в сироватці, виміряний через 5 год. після ін'єкції різних кількостей IL18BP (0; 0,4; 4 мг/кг), який вводять за 20 хв. до ін'єкції LPS мишам, сенсibilізованим Р. аспес.

На Фіг. 5 показана виживаність мишей, ін'єкованих або поліклональною антисироваткою проти IL-18 або звичайною кролячою сироваткою (NDS=контроль) за 30 хв. до ін'єкції 40 мг/мл (летальна доза) LPS, одержаного з *E. coli* (Фіг. 5A) або *S. typhimurium* (Фіг. 5B). Трикутники: мишей ін'єкують антисироваткою проти IL-18; кружки: мишей ін'єкують NDS. По осі X відмічені дні після зараження LPS. \* $p < 0,05$ .

На Фіг. 6 представлена гістограма, що відображає середнє+SEM (середньоквадратична помилка) для групи з п'яти мишей, оброблених наступним способом. Мишам ін'єкують інтраперітонеально (i.p.) антисироватку проти IL-16, розчинні рецептори TNF- $\alpha$  (TNFRp55) або носій (фізіологічний розчин) відразу ж після внутрішньовенного (i.v.) введення конканаваліну А (Con A; Фіг. 6A) або PEA (*Pseudomonas aeruginosa*, Фіг. 6B). \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  проти одного тільки ConA або PEA; #  $p < 0,01$  проти або TNFRp55 або анти-L-18, факторіальний ANOVA.

На Фіг. 7 показана дія IL-18BP на клінічні показники на мишачій моделі артриту. Фіг. 7A являє собою діаграму, яка відображає клінічні показники, виміряні після щоденного i.p. (інтраперітонеального) введення мишам різних кількостей або IL-18BP, або IFN- $\beta$ , або носія (NaCl). Позначення: заштриховані трикутники - 10000 МЕ IFN- $\alpha$ ; незаштриховані трикутники - 10 мг/кг IL-18BP; обернені трикутники - 3 мг/кг IL-18BP; ромби - 1 мг/кг IL-18BP; кружки - 0,5 мг/кг IL-18BP; незаштриховані квадрати - 0,25 мг/кг IL-18BP; і заштриховані квадрати -

NaCl. Дні обробки відкладають по осі X, клінічні показники (середні значення) відкладають по осі Y. Статистичні показники обчислюють за допомогою критерію Манна-Уїтні. На Фіг. 7 представлена гістограма, що відображає AUC (площа під кривою), одержану з графіка на Фіг. 7A.  $n$ =число тварин.

На Фіг. 8 показана дія IL-18BP на опухання лап. На Фіг. 8A представлена діаграма, що відображає результати, одержані при вимірюванні товщини хворих задніх лап (опухання) у окремих тварин, оброблених різними кількостями IL-18BP. По осі X відкладають зміну товщини лап в мм від початку обробки. Позначення ті ж, що на Фіг. 7. Фіг. 8B являє собою гістограму, що відображає AUC, одержані з Фіг. 8A.  $n$ =число тварин.

На Фіг. 9 показаний аналіз числа хворих задніх лап згодом при гострому артриті, тобто, поширення захворювання в інші суглоби. Позначення: заштриховані квадрати - NaCl (контроль); трикутники - 10 мг/кг IL-18BP; обернені трикутники - 3 мг/кг IL-18BP; ромби - 1 мг/кг IL-18BP; кружки - 0,5 мг/кг IL-18BP; і незаштриховані квадрати - 0,25 мг/кг IL-18BP.

На Фіг. 10 представлена гістограма, що відображає показники ерозії хряща хворих суглобів.

На Фіг. 11 показана гістопатологія мишачих суглобів. По закінченні експерименту лапу, де артрит розвивався насамперед, відсікають, фіксують і обробляють, як описано нижче в прикладі 10. Фіг. 11A: здоровий суглоб миші; Фіг. 11B: суглоб миші, хворий артритом; Фіг. 11C: суглоб миші, обробленої rhIL-18BP.

На Фіг. 12 представлена гістограма, що відображає рівні антитіл проти колагену типу II ізотипу IgG1 (незаштриховані стовпці) або IgG2a (заштриховані стовпці) у мишей, оброблених 3 мг/кг IL-18BP або фізіологічним розчином (носієм), відповідно. Вимірювання проводили на 4 день (D4) або на 8 день (D8) захворювання.

На Фіг. 13 представлена гістограма, що відображає рівні IL-6, в пг/мл, у тварин, оброблених 1, 3 або 10 мг/кг IL-18BP, 10000 МЕ інтерферону  $\beta$  (IFN- $\beta$ ), нормальною мишачою сироваткою (NMS) або фізіологічним розчином (NaCl), відповідно.

На Фіг. 14 показана експресія hIL-18BP і транскриптів мРНК IL-18 в інтестинальних біоптатах пацієнтів, страждаючих активною хворобою Крона, неспецифічним виразковим колітом або здорових індивідуумів. Видні характерні продукти ОТ-ПЛР IL-18BP, IL-18 і обов'язкового гена ( $\beta$ -актину) (Фіг. 14A). Відносну кількісну оцінку забарвлених етидйбромідом смуг здійснюють з використанням програмного забезпечення для аналізу зображень Kodak Digital і приводять як відношення гена-мишені до  $\beta$ -актину. Геном-мішенню є IL-18 на Фіг. 14B і IL-18BP на Фіг. 14C.

На Фіг. 15 показана експресія транскриптів мРНК hIL-18BP і білка HUVES (ендотеліальні клітини пупкової вени людини) і експресія білка THP1 (клітинна лінія моноцитів людини). РНК виділяють з необроблених ендотеліальних клітин (середовище) і ендотеліальних клітин, стимульованих IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ . Позитивний контроль: ободова кишка пацієнта з хворобою Крона; негативний контроль: без кДНК. Експресію IL-18BP і IL-18 аналі-

зують методом напівкількісної ОТ-ПЛР (Фіг. 15A). Культуральний супернатант необроблених (середовище) клітин і клітин після 24-годинної активації IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  або HUVEC (Фіг. 15B) або THP1 (Фіг. 15C) аналізують на продукування білка IL-18BP і IL-18 методом ELISA.

На Фіг. 16 показана зміна маси тіла між 1 і 10 днями на мишачій моделі IBD після інтраперитонеального (ip) введення або фізіологічного розчину (NaCl), або IL-18BP (8 мг/кг). Зміну маси виражають в процентах зміни маси тіла в порівнянні з днем 1. Наводяться середні значення і SEM для двох груп по 8 мишей в групі.

На Фіг. 17 показані результати аналізів ободових кишок, каудальних лімфовузлів і селезінок, одержаних у мишей з IBD, оброблених IL-18BP, і необроблених. На Фіг. 17A відображена маса, в мг останніх 6 см ободової кишки. На Фіг. 17B показане загальне число клітин, присутніх в каудальному лімфовузлі. Фіг. 17C відображає процентний вміст клітин в селезінці, що забарвлюються позитивно на CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>. Дані являють собою середні значення величин і SEM. Знак \* показує значущу відмінність.

На Фіг. 18 показана кількість IFN $\gamma$  (Фіг. 18, A і B) і TNF $\alpha$  (Фіг. 18, C і D), продукованих через 48 годин клітинами каудального лімфовузла (Фіг. 18, A і C), і клітинами селезінки (Фіг. 18, B і D) після стимуляції CD3/CD28, присутніх в супернатанті. Приводяться середні значення і SEM.

На Фіг. 19 показано зміст TNF $\alpha$  (Фіг. 19A) і IFN $\gamma$  (Фіг. 19B) в гомогенатах з ободової кишки. Дані виправлені на масу ободової кишки. Приводяться середні значення і SEM. Знак \* показує значущу відмінність.

#### Опис винаходу

Даний винахід заснований на виявленні сприятливої дії інгібітору IL-18 при різних захворюваннях і розладах.

Термін "інгібітор" в контексті даного винаходу відноситься до будь-якої молекули, що модулює продукування і/або дію IL-18 таким чином, що продукування і/або дія IL-18 слабшає, зменшується або частково, істотно або повністю запобігається або блокується. Термін "інгібітор" призначений для позначення інгібіторів продукування IL-18, а також інгібіторів дії IL-18.

Інгібітор продукування може являти собою будь-яку молекулу, що негативно впливає на синтез, процесинг або дозрівання IL-18. Інгібітори, що розглядаються згідно з винаходом, можуть являти собою, наприклад, супресори експресії гена інтерлейкіну IL-18, антисмислові мРНК, що знижують або що попереджають транскрипцію мРНК IL-18 або що приводять до деградації мРНК, білки, що порушують правильну просторову упаковку, або частково, або істотно запобігають секреції IL-18, протеази, що руйнують IL-18 відразу ж після синтезу, інгібітори протеаз, що розщеплюють про-IL-18 для генерації зрілого IL-18, такі як інгібітори каспази-1, і т.п.

Інгібітор дії IL-18 може являти собою, наприклад, антагоніст IL-18. Антагоністи можуть або зв'язуватися з молекулою IL-18, або ізолювати саму молекулу, з достатньою афінністю і специфі-

чністю для часткової або повної нейтралізації IL-18 або сайта(ів) скріплення IL-18, відповідальної за скріплення IL-18 зі своїм лігандом (наприклад, подібно його рецепторам). Антагоніст також може інгібувати каскад передачі сигналів IL-18, який активується в клітинах після скріплення IL-18 і рецептора.

Інгібітор дії IL-18 також може являти собою розчинні рецептори IL-18 або молекули, що нагадують рецептори, або агенти, що блокують рецептори IL-18, або антитіла до IL-18, такі як поліклональні або моноклональні антитіла, або будь-який інший агент або молекулу, що попереджають скріплення IL-18 зі своїми мішенями, причому таким чином зменшується або запобігається включення механізмів внутрішньо- або позаклітинних реакцій, опосередкованих IL-18.

Згідно з першим аспектом даного винаходу, інгібітори IL-18 застосовують для виготовлення лікарського засобу для лікування і/або попередження пошкодження печінки. Переважно, винахід відноситься до застосування інгібітору IL-18 для виготовлення лікарського засобу для лікування і/або попередження гострих і хронічних хвороб печінки, і переважніше, алкогольного гепатиту, вірусного гепатиту, імунного гепатиту, блискавичного гепатиту, цирозу печінки і первинного біліарного цирозу.

Термін "пошкодження печінки", або "хвороба печінки", що використовується в даному описі, включає в себе різні патологічні стани. Деякі їх таких станів, що розглядаються в даному винаході, детально пояснюються вище в розділі "Передумови створення винаходу". До інших хвороб печінки, які можна лікувати і/або попереджати згідно з винаходом, відноситься, наприклад, пірогенний абсцес печінки. Він також називається бактерійною печінкою і являє собою порожнину в печінці, яка продукує гній. Причин абсцесу печінки багато. Він може розвинути з абдомінальної інфекції, такої як апендицит, дивертикуліт або перфорована кишка; інфекції в кровотоці; інфекції з біліарного (печінкового секрет) тракту або травми, коли забита печінка стає інфікованою. Найбільш звичайними мікроорганізмами, що викликають абсцес печінки, є *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* і *Enterobacter aerogenes*. Частота захворювання становить 1 випадок на 10000 чоловік.

Алкогольні хвороби печінки можна лікувати і/або попереджувати з використанням інгібіторів IL-18 згідно з винаходом. До них відносяться гостре і хронічне запалення печінки, викликане зловживанням алкоголем. Алкогольний гепатит, як правило, має місце після декількох років посиленого вживання алкоголю. Чим більше тривалість застосування алкоголю і більше споживання алкоголю, тим більше імовірність розвитку хвороби печінки. Недостатність живлення розвивається як результат малої калорійності алкоголю, зниженого апетиту і малабсорбції (неадекватне поглинання поживних речовин з кишкового тракту). Недостатність живлення вносить вклад в хворобу печінки. Токсичність етанолу для печінки, індивідуальна чутливість до хвороби печінки, що викликається алкого-

лем, і генетичні фактори також вносять вклад в розвиток алкогольної хвороби печінки.

Згідно з даним винаходом, з використанням інгібіторів IL-18 можна лікувати і/або попереджати цироз печінки. Цироз є хронічною хворобою печінки, яка викликає пошкодження тканини печінки, рубцювання печінки (фіброз; нодулярна регенерація), прогресивне зниження функції печінки, утворення надмірної рідини в черевній порожнині (асцит), кровотечі (коагулопатія), підвищений тиск в кровоносних судинах (портальна гіпертензія) і розлади функцій головного мозку (печінкова енцефалопатія). Пошкоджена і печінка, що зарубцювалася, стає нездатною адекватно видаляти продукти життєдіяльності (токсини) з крові, а утворення рубцевої тканини веде до підвищеного тиску (портальна гіпертензія) у венах між кишечником і селезінкою і печінкою. Надмірне вживання алкоголю є провідною причиною цирозу. До інших причин відносяться інфекційні хвороби (такі як гепатит), хвороби і дефекти жовчної дренажної системи (такі як біліарні стеноз або обструкція), кістозний фіброз і підвищене поглинання заліза і міді.

Тип цирозу залежить від причини захворювання. При цирозі можуть бути важкі ускладнення. У США цироз є 9-ою причиною смертності. Можуть з'явитися неврологічні проблеми (такі як печінкова енцефалопатія). Підвищене скупчення рідини в черевній порожнині (асцит) викликається зниженим вмістом білка в організмі, підвищеним вмістом натрію і підвищеним тиском в кровоносних судинах печінки (портальна гіпертензія). Портальна гіпертензія може спричинити підвищений тиск, збільшення і потовщення кровоносних судин в стравоході (стравохідне розширення вен). Можуть з'явитися проблеми кровотечі і коагуляції крові. Підвищений тиск в кровоносних судинах і проблеми коагуляції крові можуть підвищити можливість важкого і небезпечного для життя крововиливу.

Іншим розладом, що охоплюється терміном "пошкодження печінки" згідно з даним винаходом, є аутоімунний гепатит. Він являє собою запалення печінки, викликане взаємодією з імунною системою. Аутоімунний гепатит є типом хронічного активного гепатиту. У крові пацієнтів з хронічним активним гепатитом можна виявити різні циркулюючі антитіла. Інші аутоімунні хвороби можуть бути пов'язані з хронічним активним гепатитом або можуть мати місце у родичів хворих з хронічним активним гепатитом. Такими хворобами є тиреоїдит, цукровий діабет, неспецифічний виразковий коліт, Coombs-позитивна гемолітична анемія, проліферативний гломерулонефрит і синдром Шегрена. Фактори ризику можуть включати в себе вказані хвороби, або фактори ризику пов'язані з хронічним активним гепатитом. Частота захворювання - 4 випадки на 10000 чоловік.

Біліарна атрезія є іншим розладом в сфері терміну "пошкодження печінки". Вона являє собою обструкцію жовчних протоків, викликану недостатністю їх розвитку, як правило, до народження (в утробі). Біліарна атрезія викликається аномальним і неадекватним розвитком жовчних протоків всередині і поза печінкою. Призначення біліарної системи - видалення продуктів життєдіяльності з печі-

нки і винесення жовчних солей, необхідних для перетравлювання жирів в тонкій кишці. При такому стані блокується виділення жовчі з печінки в жовчний міхур. Це може привести до пошкодження печінки і цирозу печінки, який, якщо його не лікувати, зрештою смертельний.

Згідно з винаходом, інгібітори IL-18 також застосовують для виготовлення лікарського засобу для лікування і/або попередження хронічного активного гепатиту, також названого хронічним агресивним гепатитом. Він являє собою тривале запалення печінки, що ушкоджує клітини печінки. До причин хронічного активного гепатиту відносяться вірусна інфекція, реакція/поглинання лікарського засобу, метаболічні порушення або аутоімунні хвороби. Причина також може бути неясною. Хвороба характеризується некрозом або загибеллю клітин печінки, активним запаленням і фіброзом, які можуть привести до печінкової недостатності, цирозу і смерті. Частота захворювання - 1 випадок на 10000 чоловік, факторами ризику є аутоімунні хвороби, попереднє - понад 6 місяців - зараження гепатитом С або позитивна реакція на антиген гепатиту А або гепатиту В.

Хронічний персистуючий гепатит є помірно непрогресуючою формою запалення печінки, і також являє собою хворобу, що згідно з даним винаходом охоплюється терміном "пошкодження печінки".

Згідно з винаходом, інгібітори IL-18 також застосовують для виготовлення лікарського засобу для лікування і/або попередження первинного біліарного цирозу (ПБЦ). ПБЦ є запальним станом, що є результатом обструкції виділення жовчі в печінці, що викликає пошкодження клітин печінки. Жовчні протоки в печінці запалюються з невідомої причини. Хвороба вражає найчастіше жінок середнього віку. Симптоми з'являються поступово, і першим симптомом є свербіж шкіри. Відбувається запалення жовчних протоків в печінці. Зрештою, розвивається цироз печінки. Захворювання може асоціюватися з аутоімунними розладами. Частота захворювання 8 випадків на 100000 чоловік. Інгібітори IL-18, що розглядаються в даному описі, також можна застосовувати для лікування гострого отруєння печінки, наприклад, викликаного великою кількістю парацетамолу. Таке гостре отруєння печінки може статися через передозування парацетамолу, випадкове або навмисне.

Як показано нижче в прикладах, автори даного винаходу несподівано виявили, що інгібітори IL-18 особливо ефективні при попередженні і лікуванні блискавичного гепатиту (гострий гепатит). Тому винахід переважно відноситься до попередження і/або лікування блискавичного гепатиту.

Згідно з другим аспектом даного винаходу, інгібітори IL-18 застосовують для виготовлення лікувального засобу для лікування і/або попередження артриту.

Термін "артрит", що використовується в даному описі, включає в себе всі різні типи артриту і артритних станів, як гострий, так і хронічний артрит, як вказано, наприклад, в Homepage of the Department of Orthopaedics of the University of Washington on Arthritis

(www.orthop.washington.edu). Прикладами артритних станів є анкілозуючий спондиліт, біль в спині, синдром зап'ястних відкладень, синдром Елерса-Данлоса, подагра, ювенільний артрит, червоний вовчак, міозит, незавершений остеогенез, остеопороз, поліартрит, поліміозит, псоріатичний артрит, синдром Рейтера, склеродерма, артрит з хворобою кишечника, хвороба Бехчета, дитячий артрит, дегенеративна хвороба суглобів, фіброміалгія, інфекційний артрит, хвороба Лайма, синдром Марфана, остеоартрит, остеонекроз, хвороба Педжета, ревматоїдна поліміалгія, псевдоподагра, рефлекторна симпатична дистрофія, ревматоїдний артрит, ревматизм, синдром Шегрена, сімейний аденомний поліпоз і т.п.

Переважно, згідно з винаходом, інгібітори IL-18 пропонуються для лікування і/або попередження запального артрит. Запальний артрит класифікується як хронічний артрит, відповідно до упорної, тривалої або поворотної течії хвороби.

У переважному варіанті втілення винаходу запальний артрит являє собою ревматоїдний артрит (RA). RA спричиняє запалення у підстилці суглобів (синовіальна мембрана, епітелій з одним шаром клітин) і/або внутрішніх органів. Хвороба має тенденцію утримуватися багато років, як правило, вражає багато різних суглобів тіла і, зрештою, може викликати пошкодження хряща, кістки, сухожилів і зв'язок. Суглоби, які можуть уражатись RA, є суглобами, розташованими, наприклад, в шиї, плечах, ліктях, стегнах, зап'ястках, кистях рук, колінах і стопах. У багатьох випадках суглоби запалюються при RA симетрично.

RA поширений приблизно серед 1% населення в Сполучених Штатах, причому розподіляється в межах всіх етнічних груп і віку. Він зустрічається у всьому світі, і число жінок і чоловіків з RA співвідноситься як 3 до 1.

Як показано нижче в прикладах, доведено, що інгібітор IL-18 виявляє вельми ефективну сприятливу дію на ерозію хряща. Тому винахід також відноситься до застосування інгібітору IL-18 при виготовленні лікарського засобу для лікування і/або попередження руйнування хряща, тобто до застосування інгібітору IL-18 як хондрозахисного засобу. Інгібітор IL-18 можна застосовувати при будь-якому стані, при якому відбувається руйнування або ерозія хряща. Руйнування хряща є прогресуючим погіршенням структурної цілісності суглобового хряща. Воно відбувається, наприклад, при станах, що уражають суглобовий хрящ, таких як ревматоїдний артрит, ювенільний артрит або остеоартрит, але також, наприклад, при інфекційному синовіті.

Третій аспект даного винаходу відноситься до застосування інгібітору IL-18 для виготовлення лікарського засобу для лікування і/або попередження запального захворювання кишечника. Таке застосування засноване на висновку, що інгібітор IL-18 активується в запаленні слизовій оболонці у пацієнтів з CD. Воно також засновується на висновку, що введення різних інгібіторів IL-18 має захисну дію на мишачій моделі коліту.

Активация IL-18 в хворій слизовій оболонці у пацієнтів з CD вже описана в техніці (Monteleone et al., 1999; Pizzaro et al., 1999).

Після того, як показана присутність великих кількостей IL-18BP в запалених ділянках слизової оболонки кишечника, згідно з винаходом, стало навіть більш несподіваним виявлення явної сприятливої дії IL-18BP, введеної системно, на розвиток і симптоми коліту на тваринній моделі. Хоча IL-18BP вже активується ендогенно в кишці пацієнтів з CD, як показано нижче в прикладах, кількість IL-18BP в організмі, здатного до продукування, як виявляється, недостатня для боротьби із захворюванням.

Згідно з винаходом, запальним захворюванням кишечника переважно є хвороба Крона або неспецифічний виразковий коліт.

У переважному варіанті втілення даного винаходу інгібітор IL-18 вибирають серед інгібіторів каспази-1 (ICE), антитіл, направлених проти IL-18, антитіл, направлених проти будь-якої з субодиниць рецептора IL-18, інгібіторів сигнального каскаду IL-18, антагоністів IL-18, конкуруючих з IL-18 і що блокують рецептор IL-18, і IL-18-зв'язуючих білків, ізоформ, мутеїнів, злитих білків, функціональних похідних, активних фракцій або їх похідних з циклічною перестановкою, що володіють такою ж активністю.

Термін "IL-18-зв'язуючі білки" використовується в даному описі як синонім "IL-18BP". Він охоплює IL-18-зв'язуючі білки за визначенням, даним у WO 99/09063 або в Novick et al., 1999, включаючи сплайс-варіанти і/або ізоформи IL-18-зв'язуючих білків за визначенням, даним в Kirn et al., 2000. Зокрема, згідно з даним винаходом, корисні ізоформи а і с IL-18BP людини. Білки, корисні згідно з даним винаходом, можуть бути глікозильованими або неглікозильованими, вони можуть походити з природних джерел, таких як сеча, або, переважно, можуть бути одержані рекомбінантними методами. Експресію рекомбінантів можна здійснити в прокаріотичних експресуючих системах, подібних E. coli, або в еукаріотичних, і переважно - в експресуючих системах ссавців.

Термін "мутеїни", що використовується в даному описі, відноситься до аналогів IL-18BP або аналогів вірусного IL-18BP, в яких один або декілька амінокислотних залишків природного IL-18BP або вірусна IL-18BP замінені різними амінокислотними залишками або делетовані, або один або декілька амінокислотних залишків додані до природної послідовності IL-18BP або вірусного IL-18BP, без істотної зміни активності одержаних продуктів в порівнянні з IL-18BP дикого типу або вірусним IL-18BP. Такі мутеїни одержують відомими методами синтезу і/або методами сайтнаправленого мутагенезу або будь-яким відповідним для такої мети відомим способом.

Будь-який такий мутеїн має послідовність амінокислот, по суті, дублюючу послідовність IL-18BP або по суті дублюючу послідовність вірусного IL-18BP, так що активність по суті подібна активності IL-18BP. Однією з активностей IL-18BP є його здатність до скріплення IL-18. Доти, поки мутеїн володіє істотною зв'язуючою активністю у відношенні

IL-18, він може використовуватися при очищенні IL-18 таким способом як афінна хроматографія, і, таким чином, може розглядатися як такий, що володіє активністю в основному подібною активності IL-18BP. Таким чином, можна визначити, чи володіє будь-якою даний мутеїн активністю в основному подібною активності IL-18BP, за допомогою звичайних експериментів, що включають в себе визначення того, чи зв'язується такий мутеїн або не зв'язується з відповідним чином поміченим IL-18, наприклад, шляхом простого конкурентного сендвіч-аналізу наприклад, радіоімунаналізу або аналізу методом ELISA.

Мутеїни поліпептидів IL-18BP або мутеїни вірусного IL-18BP, які можна використати згідно з даним винаходом, або кодуюча їх нуклеїнова кислота, включають в себе обмежений ряд по суті відповідних послідовностей у вигляді заміщених пептидів або поліпептидів, які може одержати звичайними методами рядовий фахівець в даній області техніки без зайвого експериментування, засновуючись на вказівках і керівництві, представлених в даному описі.

Переважаючими змінами для мутеїнів, згідно з даним винаходом, є зміни, відомі як "консервативні" заміни. Консервативні заміни амінокислот поліпептидів IL-18BP або білків вірусного IL-18BP можуть включати в себе тотожні амінокислоти в межах групи, яка має по суті подібні фізико-хімічні властивості, і при замінах між членами групи буде зберігатися біологічна функція молекули (Grantham, 1974). Ясно, що у вищезгаданих послідовностях також можна здійснити вставки або делеції без зміни їх функції, зокрема, якщо вставки або делеції включають в себе тільки декілька амінокислот, наприклад, до тридцяти, а переважно до десяти, і не віддаляються або не замінюються амінокислоти, критичні для функціональної конформації, наприклад, цистеїнові залишки. Білки і мутеїни, одержані за допомогою таких делецій і/або інсерцій, входять в сферу дії даного винаходу.

Переважаючими, коли тотожними амінокислотами є амінокислоти, вказані в табл. I. Переважніше, якщо тотожними амінокислотами є амінокислоти, вказані в табл. II; і найбільш переважно, коли тотожними амінокислотами є амінокислоти, вказані в табл. III.

#### ТАБЛИЦЯ I

Переважаючі групи тотожних амінокислот

Амінокислота	Тотожна група
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gin, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gin, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, He
Phe	Tip, Met, Тугий, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gin, Thr, Arg, His
Gin	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gin
Asn	Gin, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gin, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gin, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Tip	Trp

## ТАБЛИЦЯ II

Більш переважні групи тотожних амінокислот

Амінокислота	Тотожна 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, Gin, Arg
Gin	Glu, Gin, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gin
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

## ТАБЛИЦЯ III

Найбільш переважні групи тотожних амінокислот

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

Приклади здійснення заміни амінокислот в білках, які можна використати для одержання мутантів поліпептидів або білків IL-18BP або мутантів вірусного IL-18BP для застосування в даному винаході, включають в себе будь-які відомі методи, наприклад, представлені в патентах США RE 33653, 4959314, 4588585 і 4737462, Mark et al.; 5116943, Kohts et al., 4965195, Namen et al.; 4879111, Chong et al.; і 5017691, Lee et al.; і білки з лізиновою заміною, представлені в патенті США № 4904584 (Shaw et al.).

Термін "злитий білок" відноситься до поліпептиду, що містить IL-18BP або вірусний IL-18BP, або його мутант або фрагмент, злитий з іншим білком, який, наприклад, має тривалий час перебування в рідинах організму. IL-18BP або вірусний IL-18BP, таким чином, можна гібридизувати з іншим білком, поліпептидом або подібним елементом, наприклад, імуноглобуліном або його фрагментом.

Термін "функціональні похідні", що використовується в даному описі, охоплює похідні IL-18BP або вірусного IL-18BP і їх мутантів і злитих білків, які можна одержати по функціональних групах, що є в бічних ланцюгах залишків N-або C-кінцевих груп, способами, відомими в техніці, і входять у винахід доти, поки вони залишаються фармацевтично прийнятними, тобто вони не руйнують активність білка, яка в основному подібна активності IL-18BP або вірусному IL-18BP, і не додають токсичних властивостей утримуючим їх композиціям.

Такі похідні можуть включати в себе, наприклад, бічні ланцюги поліетиленгліколю, які можуть маскувати антигенні сайти і продовжувати час перебування IL-18BP або вірусного IL-18BP в рідинах організму. До інших похідних відносяться аліфатичні ефіри, утворені карбоксильними групами, амід, утвореними карбоксильними групами за допомогою взаємодії з аміаком або первинними або вторинними амінами, N-ацилпохідні вільних аміно-

груп амінокислотних залишків, утворені з ацильними групами (наприклад, алканоїльними або карбоциклічними ароїльними групами), або О-ацилпохідні вільних гідроксильних груп (наприклад, групи серильних і треонільних залишків), утворені з ацильними групами.

Як "активні фракції" IL-18BP або вірусного IL-18BP, їх мутеїнів і злитих білків даний винахід охоплює будь-який фрагмент або попередник поліпептидного ланцюга білкової молекули як такий або разом з асоційованими молекулами або приєднаними до неї залишками, наприклад, залишки цукрів або фосфатів, або агрегати білкової молекули або залишки цукрів як таких по собі, за умови, що вказана фракція володіє активністю в основному подібною активності IL-18BP.

У іншому переважному варіанті втілення винаходу інгібітором IL-18 є антитіла до IL-18. Антитіла проти IL-18 можуть бути поліклональними або моноклональними, химерними, гуманізованими або навіть повністю людськими. Рекombінантні антитіла і їх фрагменти характеризувалися високоафінним скріпленням з IL-18 *in vivo* і низькою токсичністю. Антитіла, які можна використати у винаході, відрізняються своєю здатністю лікувати пацієнтів протягом періоду, достатнього для одержання чудової регресії або полегшення патогенного стану або будь-якого симптому або групи симптомів, пов'язаних з патогенним станом, і низькою токсичністю.

Нейтралізуючі антитіла легко одержати у тварин, таких як кролики, кози або миші, шляхом їх імунізації IL-18. Імунізовані миші особливо корисні для забезпечення джерел В-клітин для одержання гібридом, які, в свою чергу, культивують, і одержують моноклональні антитіла проти IL-18 у великих кількостях.

Химерні антитіла є молекулами імуноглобуліну, що характеризуються двома або великим числом сегментів або частин, одержаних у тваринних різних видів. Як правило, варіабельну область химерного антитіла одержують з антитіла ссавця, що не є людиною, такого як мишаче моноклональне антитіло, а імуноглобулінову константну область одержують з молекули імуноглобуліну людини. Переважно, обидві області і поєднання мають низьку імуногенність, що визначається звичайними способами (Elliot et al., 1994). Гуманізовані антитіла являють собою молекули імуноглобуліну, створені методами генної інженерії, в яких мишачі константні області замінюють відповідними частинами імуноглобуліну людини, зберігаючи при цьому мишачі області скріплення антигену. Одержані мишаче-людські антитіла переважно мають знижену імуногенність і поліпшену фармакокінетику в організмі людини (Knight et al., 1993).

Таким чином, в іншому переважному варіанті антитіла до IL-18 являють собою гуманізовані антитіла до IL-18. Переважні приклади гуманізованих антитіл до IL-18 описуються, наприклад, в заявці на європейський патент EP 0974600.

У ще одному переважному варіанті антитіла до IL-18 є повністю людськими. Технологія одержання людських антитіл детально описується, наприклад, у WO 00/76310, WO 99/53049, US

6162963 або AU5336100. Повністю людські антитіла є, переважно, рекombінантними антитілами, одержаними у трансгенних тварин, наприклад, ксеномишах, що містять всі функціональні локуси Ig людини або частину їх.

У вельми переважному варіанті втілення даного винаходу інгібітором IL-18 є IL-18BP або його ізоформа, мутеїн, злитий білок, функціональне похідне, активна фракція або похідне з циклічною перестановкою. Вказані його ізоформи, мутеїни, злиті білки або функціональні похідні зберігають біологічну активність IL-18BP, зокрема, скріплення з IL-18, і, переважно, мають по суті щонайменше активність, подібну активності IL-18BP. У ідеалі такі білки мають біологічну активність, яка навіть вище в порівнянні з активністю немодифікованого IL-18BP. Переважні активні фракції мають активність, кращу, ніж активність IL-18BP, або мають інші переваги, такі як підвищена стабільність або менша токсичність або імуногенність, або їх легше одержувати у великих кількостях, або легше очищати.

Послідовності IL-18BP і її сплайс-варіанти/ізоформи можна взяти з WO 99/09063 або з Novick et al., 1999, а також в Kim et al., 2000.

Функціональні похідні IL-18BP можна кон'югувати з полімерами для поліпшення властивостей білка, таких як стабільність, час півжиття, біологічна доступність, переносність організмом людини або імуногенність. Для досягнення такої мети IL-18BP можна з'єднати, наприклад, з поліетиленгліколем (ПЕГ). Обробку ПЕГ можна здійснити відомими способами, описаними, наприклад, у WO 92/13095.

Отже, в переважному варіанті здійснення даного винаходу IL-18BP обробляють ПЕГ.

У іншому переважному варіанті здійснення винаходу інгібітором IL-18 є злитий білок, що містить весь IL-18-зв'язуючий білок або його частину, злитий з усім імуноглобуліном або його частиною. Фахівцеві в даній області техніки буде зрозуміло, що одержаний злитий білок зберігає біологічну активність IL-18BP, зокрема, скріплення з IL-18. Гібридизація може бути прямою або через короткий пептидний лінкер, який може бути недовгим, наприклад, довжиною 1-3 амінокислотних залишки або довше, наприклад, довжиною 13 амінокислотних залишків. Вказаний лінкер може являти собою трипептид, наприклад, з послідовністю E-F-M (Glu-Phe-Met), або лінкерну послідовність з 13 амінокислот, що містить Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln, вбудовану між послідовністю IL-18BP і послідовністю імуноглобуліну. Одержаний злитий білок має поліпшені властивості, такі як збільшений час перебування в рідинах організму (період напіввиведення), підвищену питому активність, підвищений рівень експресії, або злитий білок легше очищається.

У переважному варіанті IL-18BP гібридизують з константною областю молекули Ig. Переважно, його гібридизують з ділянками важкого ланцюга, подібними, наприклад, доменам CH2 і CH3 IgG<sub>1</sub> людини. Одержання специфічних злитих білків, що містять IL-18BP і частину імуноглобуліну описується, наприклад, в прикладі 11 WP99/09063. Інші



ізоформи молекул Ig також підходять для одержання злитих білків згідно з даним винаходом, такі як ізоформи IgG<sub>2</sub> або IgG<sub>4</sub>, або інші класи Ig, подібні, наприклад, IgM або IgA. Злиті білки можуть бути мономерними або полімерними, гетеро або гомополімерними.

Інтерферони відомі головним чином їх інгібуючою дією на реплікацію вірусів і проліферацію клітин. Інтерферон-γ, наприклад, грає важливу роль в промоції імунних і запальних реакцій. Повідомляється, що інтерферон β (IFN-β, інтерферон типу I) грає роль протизапального фактора. Данні досліджень, опублікованих Triantaphyllopoulou et al. (1999), показують, що IFN-β оказує сприятливу дію при лікуванні ревматоїдного артриту, як показано на мишачій моделі хвороби - моделі артриту, викликаного колагеном (CIA). Така сприятлива дія IFN-β підтверджується нижче в прикладах.

Винахід також відноситься до застосування поєднання інгібітору IL-18 і інтерферону при виготовленні лікарського засобу для лікування артриту, зокрема, ревматоїдного артриту.

Інтерферони також можна кон'югувати з полімерами для збільшення стабільності білків. Кон'югат інтерферону β і поліолу поліетиленгліколю (ПЕГ) описується, наприклад, у WO 99/55377.

У іншому переважному варіанті втілення винаходу інтерферон являє собою інтерферон β (IFN-β), і переважніше - IFN-β 1a.

Інгібітор продукування і/або дії IL-18 переважно застосовують одночасно з інтерфероном або окремо від нього.

Ще в одному з варіантів втілення винаходу інгібітор IL-18 застосовують в поєднанні з антагоністом TNF. Антагоністи TNF виявляють свою активність декількома способами. По-перше, антагоністи можуть зв'язуватися з самою молекулою TNF або ізолювати її з достатньої афінністю і специфічністю і частково або істотно нейтралізувати епітоп TNF або епітопи, відповідальні за скріплення з рецептором TNF (далі називаються "секвеструючими антагоністами"). Секвеструючим антагоністом можуть бути, наприклад, антитіла, направлені проти TNF.

З іншого боку, антагоністи TNF можуть інгібувати каскад передачі сигналу TNF, що активується рецептором клітинної поверхні після скріплення TNF (далі називаються "антагоністами передачі сигналу"). Обидві групи антагоністів корисні, або окремо, або разом, в поєднанні з інгібітором IL-18 при лікуванні артриту, зокрема, ревматоїдного артриту.

Антагоністи TNF легко ідентифікувалися і оцінюються шляхом звичайного скринінгу кандидатів за їх дією на активність нативного TNF *in vitro* на сенсibilізованих клітинних лініях, наприклад, на В-клітинах людини, в яких TNF викликає проліферацію і секрецію імуноглобуліну. Аналіз включає в себе аналіз композицій TNF при різному розведенні антагоніста-кандидата, наприклад, від 0,1 до 100 кратного розведення молярної кількості TNF, що використовується при аналізі, і контроль без TNF або тільки з антагоністом (Tucci et al., 1992).

Секвеструючі антагоністи є переважними антагоністами TNF для використання згідно з даним

винаходом. Серед секвеструючих антагоністів переважними є поліпептиди, що зв'язуються з TNF з високою афінністю і володіють низькою імуногенністю. Особливо переважними є розчинні молекули рецептора TNF і нейтралізуючі антитіла до TNF. Наприклад, розчинні TNF-RI і TNF-RII корисні в даному винаході. Усічені форми вказаних рецепторів, які містять позаклітинні домени рецепторів або їх функціональні частини, є ще більш переважними антагоністами згідно з даним винаходом. Усічені розчинні рецептори TNF типу I і типу II описуються, наприклад, в EP 914431.

Усічені форми рецепторів TNF є розчинними і виявлені в сечі і сироватці як інгібуючі скріплення TNF білки в 30 кДа і 40 кДа, названі TBPI і TBPPII, відповідно (Engelmann et al., 1990). Згідно з винаходом, переважне одночасне, послідовне або роздільне застосування інгібітору IL-18 з антагоністами TNF і/або інтерфероном.

Згідно з винаходом, TBPI і TBPPII є переважними антагоністами TNF для застосування в поєднанні з інгібітором IL-18. Похідні, фрагменти, області і біологічно активні частини рецепторних молекул функціонально схожі з рецепторними молекулами і також можуть використовуватися в даному винаході. До таких біологічно активних еквівалентів або похідних рецепторної молекули відноситься частина поліпептиду або послідовності, що кодує рецепторну молекулу, яка має достатній розмір і здатна зв'язуватися з TNF з такою афінністю, що взаємодія TNF з мембранозв'язаним рецептором інгібується або блокується.

У іншому переважному варіанті антагоністом TNF для застосування згідно з винаходом є розчинний TNF-RI (TBPI) людини. Природні і рекомбінантні розчинні молекули рецепторів TNF і способи їх одержання описуються в європейських патентах EP 308378, EP 398327 і EP 433900.

Інгібітор IL-18 можна застосовувати одночасно, послідовно або роздільно з інгібітором TNF. Вигідно застосовувати поєднання антитіла або антисироватки проти IL-18 і розчинний рецептор TNF, що володіє TNF-інгібуючою активністю.

У іншому переважному варіанті втілення винаходу лікарський засіб також включає в себе інгібітор COX, переважно, інгібітор COX-2. Інгібітори COX відомі в техніці. Конкретні інгібітори COX-2 описуються, наприклад, у WO 01/00229.

Винахід також відноситься до застосування поєднання інгібіторів IL-18 і/або інтерферонів і/або антагоністів TNF і/або інгібіторів COX-2. Таке поєднання підходить для лікування і/або попередження артриту, зокрема, ревматоїдного артриту, і для лікування і/або попередження пошкодження печінки і для лікування і/або попередження запального захворювання кишечника, зокрема, хвороби Крона і неспецифічного виразкового коліту. Активні компоненти можна застосовувати одночасно, послідовно або роздільно.

У переважному варіанті втілення даного винаходу інгібітор IL-18 використовують в кількості приблизно 0,0001-10 мг на кг масу тіла, або приблизно 0,01-5 мг на кг масу тіла, або приблизно 1-2 мг на кг масу тіла. У іншому переважному варіанті інгібітор

IL-18 використовують в кількості приблизно 0,1-1000 мкг на кг масу тіла, або приблизно 1-100 мкг на кг масу тіла, або приблизно 10-50 мкг на кг масу тіла.

Винахід також відноситься до застосування експресуючого вектора, що містить кодуєчу послідовність інгібітору IL-18, при одержанні лікарського засобу для попередження і/або лікування артритних станів, зокрема, ревматоїдного артриту, для лікування пошкодження печінки і для лікування запального захворювання кишечника. Таким чином, для лікування і/або попередження хвороби застосовують генотерапевтичний підхід. Потім вигідно провести експресію інгібітору IL-18 *in situ*, причому таким чином IL-18 ефективно блокується безпосередньо в тканині(тканинах) або клітинах, уражених хворобою.

Для того, щоб лікувати і/або попереджати артрит, генотерапевтичний вектор, що містить послідовність інгібітору продукування і/або дії IL-18, можна ін'єкувати, наприклад, безпосередньо в хворий суглоб, уникнувши таким чином проблем, пов'язаних з системним введенням генотерапевтичних векторів, подібних розбавленим векторів, досягнення і націлювання на клітини- або тканини-мішені і побічної дії.

Застосування вектора для індукції і/або посилення ендогенного продукування IL-18 в клітині, що звичайно мовчить відносно експресії інгібітору IL-18 або експресує недостатні кількості інгібітору, також розглядається згідно з винаходом. Вектор може містити регуляторні послідовності, функціональні в клітинах, бажаних для експресії інгібітору IL-18. Такі регуляторні послідовності можуть являти собою, наприклад, промотори або енансери. Потім регуляторну послідовність можна вбудувати в правий локус генома методом гомологічної рекомбінації, таким чином операбельно зв'язуючи регуляторну послідовність з геном, експресію якого потрібно індукувати або посилити. Таку технологію звичайно називають "ендогенною генною активацією (EGA)", і вона описується, наприклад, у WO 91/09955.

Фахівцві в даній області техніки буде зрозуміло, що з використанням такого методу також можна припинити експресію IL-18, тобто, ввести в генний локус IL-18 елемент негативної регуляції, подібний, наприклад, елементу, що мовчить, причому таким чином дезактивується або запобігається експресія IL-18. Фахівцві в даній області техніки буде зрозуміло, що така дезактивація або "глушіння" експресії IL-18 має таку ж дію, як застосування інгібітору IL-18 для попередження і/або лікування захворювання.

Винахід також відноситься до застосування клітини, генетично модифікованої для продукування інгібітору IL-18, для виготовлення лікарського засобу для лікування і/або попередження пошкодження печінки, артриту або запального захворювання кишечника.

Винахід також відноситься до фармацевтичних композицій, зокрема, корисних для попередження і/або лікування запального артриту, пошкодження печінки або запального захворювання кишечника, що містить терапевтично ефективну

кількість інгібітору IL-18 і терапевтично ефективну кількість інтерферона. Як інгібітор IL-18 фармацевтична композиція може містити інгібітори каспази-1, антитіла проти IL-18, антитіла проти субоддиниць рецептора IL-18, інгібітори каскаду передачі сигналу IL-18, антагоністи IL-18, конкуруючі з IL-18 і що блокують рецептор IL-18, і білки, зв'язуючі IL-18, їх ізоформи, мутеїни, злиті білки, функціональні похідні, активні фракції або похідні з циклічними перестановками, що володіють такою ж активністю.

IL-18BP і його ізоформи, мутеїни, злиті білки, функціональні похідні, активні фракції або похідні з циклічними перестановками, описані вище, є переважними активними інгредієнтами фармацевтичних композицій.

Інтерферон, що міститься у фармацевтичній композиції, переважно являє собою IFN- $\beta$ .

У ще одному переважному варіанті фармацевтична композиція містить терапевтично ефективні кількості інгібітору IL-18, необов'язково інтерферону і антагоніста TNF. Антагоністи TNF можуть являти собою антитіла, нейтралізуючі активність TNF, або розчинні усічені фрагменти рецептора TNF, також названі TBPI і TBPII. Фармацевтична композиція згідно з винаходом також може містити один або декілька інгібіторів COX, переважно інгібітори COX-2.

Визначення "фармацевтично прийнятний" призначено для позначення будь-якого носія, що не впливає на ефективність біологічної активності активного інгредієнта і нетоксичного для хазяїна, якому його вводять. Наприклад, для парентерального введення активний(і) білок(білки) можна ввести до складу стандартної лікарської форми для ін'єкції в такому носії як фізіологічний розчин, розчин декстрази, сироватковий альбумін і розчин Рінгера.

Активні інгредієнти фармацевтичної композиції згідно з винаходом можна вводити індивідууму різними способами. Способи введення включають в себе інтрадермальний, трансдермальний (наприклад, в композиціях з повільним вивільненням), внутрішньом'язовий, інтраперітонеальний, внутрішньовенний, підшкірний, пероральний, епідуральний, місцевий і інтраназальний способи. Можна використати будь-який інший ефективний спосіб введення, наприклад, поглинання через епітеліальну або ендотеліальну тканини або генну терапію, коли пацієнту вводять молекулу ДНК, що кодує активний агент (наприклад, за допомогою вектора), яка викликає експресію і секрецію активного агента *in vivo*. Крім того, згідно з винаходом, білок(білки) можна вводити разом з іншими компонентами біологічно активних засобів, такими як фармацевтично прийнятні поверхнево-активні речовини, ексципієнти, носії, розріджувачі і наповнювачі.

Для парентерального (наприклад, внутрішньовенного, підшкірного, внутрішньом'язового) введення активний(і) білок(білки) можна ввести в таку композицію як розчин, суспензія, емульсія або ліофілізований порошок, в поєднанні з фармацевтично прийнятним парентеральним носієм (наприклад, водою, фізіологічним розчином, розчином декстрази) і добавками, які підтримують ізотоніч-

ність (наприклад, манітом) або хімічну стійкість (наприклад, консервантами і буферними речовинами). Композицію стерилізують методами, що використовуються звичайно.

Біологічну доступність активного(их) білка(білків) згідно з винаходом також можна поліпшити, використовуючи процедури кон'югації, що підвищують час півжиття молекули в організмі людини, наприклад, приєднуючи молекулу до поліетиленгліколю, як описується в заявці на міжнародний патент PCT WO 92/13095.

Терапевтично ефективні кількості активного(их) білка(білків) будуть функцією багатьох змінних, включаючи тип антагоніста, афінність антагоніста до IL-18, залишкову цитотоксичну активність будь-якого роду, що виявляється антагоністами, спосіб введення, клінічний стан пацієнта (в тому числі бажаність підтримки нетоксичного рівня ендогенної активності IL-18).

"Терапевтично ефективна кількість" є такою кількістю інгібітору IL-18, який будучи введеним, приводить до інгібування біологічної активності IL-18. Дозування, що вводиться індивідууму у вигляді однократної або декількох доз, буде залежати від різних факторів, в тому числі від фармакокінетичних властивостей інгібітору IL-18, способу введення, стану пацієнта і його особливостей (стать, вік, маса тіла, стан здоров'я, об'єм), важкості симптомів, супутнього лікування, частоти лікування і потрібного ефекту. Регулювання і маніпуляція у встановлених дозувальних інтервалах знаходяться в межах можливостей фахівців в цій області техніки, так само, як і способи визначення *in vitro* і *in vivo* інгібування IL-18 у індивідуума.

Згідно з винаходом, інгібітор IL-18 використовують в кількості приблизно 0,0001-10 мг на кг масу тіла, або приблизно 0,01-5 мг на кг масу тіла, або приблизно 0,1-3 мг на кг масу тіла, або приблизно 1-2 мг на кг масу тіла. Іншими переважними кількостями інгібітору IL-18 є кількості приблизно 0,1-1000 мкг на кг масу тіла, або приблизно 1-100 мкг на кг масу тіла, або приблизно 10-50 мкг на кг масу тіла.

Способом введення, переважним за винаходом, є введення підшкірним способом. Згідно з винаходом, також переважне внутрішньом'язове введення.

У інших переважних варіантах інгібітор IL-18 вводять щодня або через день.

Щоденні дози, як правило, дають у вигляді розділених доз або у формі з відстроченим вивільненням, ефективній для одержання потрібних результатів. Друге або подальше введення можна здійснювати в дозуванні, яке таке ж, як початкова або попередня доза, введена індивідууму, або менше або більше неї. Друге або подальше введення можна здійснювати у час або до початку захворювання.

Згідно з винаходом, інгібітор IL-18 можна вводити індивідууму в терапевтично ефективній кількості профілактично або терапевтично до, одночасно або після інших видів лікування або лікарських засобів (наприклад, схеми з декількома лікарськими засобами), зокрема, з інтерфероном і/або антагоністом TNF і/або інгібітором COX. Активні засо-

би, що вводяться одночасно з іншими лікувальними засобами, можна вводити в тих же або в інших композиціях.

Винахід також відноситься до способу одержання фармацевтичної композиції, що включає в себе змішування ефективної кількості інгібітору IL-18 і/або інтерферону і/або антагоніста TNF і/або інгібітору COX з фармацевтично прийнятним носієм.

Маючи опис винаходу його буде легше зрозуміти, звернувшись до наведених далі прикладів, які даються з метою ілюстрації і не призначені для обмеження даного винаходу.

#### Приклади

Частина I. Приклади 1-8, що відносяться до застосування інгібіторів IL-18 при пошкодженні печінки

Приклад 1. Одержання IL-18BP з міткою His (IL-18BP-His tag)

Очищений рекомбінантний IL-18BP людини, що містить мітку his (r-hiL-IL-18BP-His tag), одержували в клітинах CHO. Одержання рекомбінантних білків в еукаріотичних клітинах відоме фахівцям в даній області техніки. Добре відомі способи доступні для конструювання відповідних векторів, що містять ДНК, що кодує IL-18BP, і відповідних для трансфекції еукаріотичних клітин з метою одержання рекомбінантного IL-18BP. Для експресії в клітинах ДНК, що кодує IL-18BP (див., наприклад, Novick et al., 1999), вирізали і вбудовували в експресуючі вектори, відповідні для трансфекції клітин. З іншого боку, таку ДНК можна одержати методом ПЛР з відповідними смисловими і антисмисловими праймерами. Потім одержані конструкції ДНК вбудовували у відповідним чином сконструйовані еукаріотичні експресуючі вектори методами, добре відомими в техніці (Manaitis, 1982). Рекомбінантний білок очищали до чистоти понад 95% і виявляли, що він біологічно активний *in vitro* і *in vivo* і володіє високою афінністю до своїх лігандів.

Приклад 2. Захисна дія IL-18BP проти загибелі, що викликається ендотоксином на мишачій моделі

Використали мишачу модель для перевірки того, чи буде інгібітор IL-18 IL-18BP захищати мишей від високої дози ліпополісахаридів (LPS). LPS викликає гостре пошкодження печінки і услід за тим швидку загибель мишей.

Мишам C57BL/6 ін'єкували інтраперітонеально (i.p.) 4 мг/кг рекомбінантного IL-18BP людини (rhIL18BPHis), що містить мітку his (одержаного при рекомбінантному продукуванні білка). Через 1 годину ін'єкували 60 мг/кг LPS (летальні дози). Виживання мишей в даній групі порівнювали з виживанням в групі тварин, що одержували тільки LPS (без IL-18BP).

П'ять мишей з 7, ін'єкованих rhIL-18BP-his, вижили після ін'єкції LPS, на відміну від контрольної групи, де всі тварини загинули протягом 3 днів.

Брали зразки крові через 5 год. після ін'єкції LPS у відсутності або в присутності зростаючих доз rhIL-18BP-his і аналізували методом ELISA наявність циркулюючого IFN- $\gamma$  (Фіг. 1). Дози rhIL-18BP-his в 0,4 і 4 мг/кг спричиняли 2-кратне зни-

ження вмісту IFN- $\gamma$  в сироватці. Така інгібуюча дія втрачалася при більш низьких дозах rhIL-18BP (0,004 і 0,04 мг/кг).

Приклад 3. IL-18BP володіє захисною дією проти пошкодження печінки на мишачій моделі захворювання

Мишачу модель блискавичного гепатиту використовували для перевірки дії IL-18BP. У мишей розвивалося гостре пошкодження печінки, коли їм додатково вводили *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) і ліпополісахарид (LPS).

Мишам ін'єкували зростаючі дози rhIL-18BP-his (4; 0,4; 0,04; 0 мг/кг) в різні моменти часу (1 година, 20 хв., одночасно) перед ін'єкцією LPS мишам C57BL/6, сенсibilізованим *P. acnes*. Коли rhIL-18BP-his вводили і.р. в той же час, що і LPS, мишей, що вижили, не залишилося, і рівні циркулюючих IFN- $\gamma$  і TNF- $\alpha$  залишалися незмінними. Несподівано, rhIL-18BP (4 і 0,4 мг/кг) спричиняв у 70% мишей зниження циркулюючої аланін-амінотрансферази (маркер пошкодження печінки), як показано на Фіг. 2.

У доповнення до вказаного перевіряли виживання мишей (Фіг. 3). Коли rhIL-18BP вводили і.р. на 20 хв. раніше LPS, дві найвищі дози IL-18BP (4 і 0,4 мг/кг) сповільнювали загибель мишей на 10 год. в порівнянні з контрольною групою, де замість IL-18BP миші одержували NaCl.

Результати вимірювання вмісту IFN- $\gamma$  в сироватці приводяться на Фіг. 4. rhIL-18BP (4 мг/кг) інгібує рівні циркулюючого IFN- $\gamma$  на 90% і циркулюючої аланін-амінотрансферази на 80% (не показано).

Коли rhIL-18BP вводили і.р. на 1 годину раніше LPS, криві виживання і рівні циркулюючого IFN- $\gamma$  були схожі з показниками, що спостерігаються у випадку, коли rhIL-18BP вводили і.р. на 20 хв. раніше за LPS, але рівні циркулюючої аланін-амінотрансферази залишалися незмінними (не показано).

Крім вказаного, аналізували тканину мишачої печінки методом фарбування гематоксиліном і еозином, а також тунельної мікроскопії. Печінки мишей, у яких раніше був викликаний важкий гепатит, виявляють важкий некроз при порівнянні з тканинами здорової печінки. У протилежність цьому, тканина печінки мишей, оброблених IL-18BP, виявляє значно менше некротичних осередків, ніж у разі необроблених мишей.

Приклад 4. Антитіла проти IL-18 захищають від летальної ендотоксемії

Для того, щоб оцінити, чи буде блокада IL-18 антитілами проти IL-18 захищати мишей від дії летальних доз бактерійних ліпополісахаридів, мишам C57BL/6J ін'єкували спочатку нейтралізуючі кролячі антимишачі антитіла до IL-18 (поліклональні) або сироватку здорових кроликів (NDS) як контроль. Через 30 хв. після обробки антитілами ін'єкували летальні дози LPS, одержаних або з *E. coli* (Фіг. 5A) або з *S. typhimurium* (Фіг. 5B). Експерименти включали в себе 10-12 мишей на групу і здійснювалися двічі в двох різних випадках.

Як видно на Фіг. 5A, обробка мишей антисироваткою проти IL-18 запобігає смертності, що викликається 40 мг/кг LPS з *E. coli*. Виживає 100%

мишей проти 10% мишей, що вижили, оброблених сироваткою здорових кроликів ( $p < 0,005$ ).

На Фіг. 5B показано, що оброблені антитілами миші також захищені від летальної дії *S. typhimurium* (50% що вижили, проти 0%, що вижили;  $p < 0,05$ ).

Приклад 5. Блокада IL-18 і TNF- $\alpha$  захищає мишей від гепатотоксичності, що викликається ConA і PEA

Використали дві експериментальні моделі гепатотоксичності для оцінки ролі IL-18 і TNF- $\alpha$  при пошкодженні печінки. Обидві ін'єкції конканаваліну A (ConA) і *Pseudomonas aeruginosa* (PEA) викликали у мишей пошкодження печінки і були моделями гепатиту, опосередкованого Т-клітинами.

Мишей C57BL/6J обробляли антисироваткою проти IL-18 або розчинним рецептором TNF- $\alpha$  TNFRp55. Вимірювали сироваткові рівні аланін-амінотрансферази (ALT) як індикатори пошкодження печінки (Фіг. 6).

Як видно на Фіг. 6A, як антисироватка проти IL-18, так і розчинні рецептори TNF істотно знижували рівні ALT, що індукуються ConA, в сироватці в порівнянні з контрольною ін'єкцією одного носія (апірогенного фізіологічного розчину). Спільне введення розчинного рецептора TNF і антисироватки проти IL-18 приводить до повного інгібування пошкодження печінки, що викликається ConA.

Як видно на Фіг. 6B, у мишей, ін'єкованих PEA, нейтралізація або інгібіторами TNF- $\alpha$ , або антитілами проти IL-18 приводить до 93% і 83% інгібування рівнів ALT в сироватці, відповідно. Комбінована блокада тим і іншим приводить до 99%-ного захисту.

Приклад 6. Рівні IL-18-зв'язуючого білка в плазмі підвищені у пацієнтів з хронічною хворобою печінки

Вимірювали рівні IL-18BP в плазмі у 133 пацієнтів з хронічною хворобою печінки (CLD) різної етіології і 31 здорової людини (контроль) методом специфічного ELISA з використанням моноклональних антитіл до IL-18.

Рівні IL-18BP в плазмі були істотно вище у хворих CLD ( $12,1 \pm 0,89$  нг/мл; середнє  $\pm$  SEM), ніж у здорових людей ( $4,96 \pm 0,43$  нг/мл,  $p < 0,001$ ). Пацієнти з цирозом мали значно більш високі рівні, ніж пацієнти CLD без цирозу ( $19,23 \pm 1,28$  нг/мл,  $n=67$ , проти  $6,49 \pm 0,51$ ,  $n=66$ ,  $p < 0,001$ ). Пацієнти в стадії B за класифікацією Child-Pugh мають більш високі рівні IL-18BP, ніж пацієнти в стадії A ( $22,48 \pm 2,44$  нг/мл проти  $9,57 \pm 1,25$  нг/мл,  $p < 0,001$ ). Однак немає суттєвої відмінності між стадіями Child B і C ( $22,48 \pm 2,44$  нг/мл проти  $20,62 \pm 4,75$  нг/мл,  $p=0,7$ ). Рівні IL-18BP в плазмі позитивно корелювали з GOT, білірубіном і швидкістю осідання еритроцитів. Виявлена негативна кореляція з протромбіновим часом.

Як висновок, результати показували, що рівні IL-18BP в плазмі при CLD підвищуються і корелюють з важкістю хвороби незалежно від етіології хвороби. Незважаючи на ендогенний антагоніст прозапального IL-18, виявляється, що підвищених рівнів IL-18BP недостатньо для протидії незліченим медіаторам прозапалення при CLD.

Приклад 7. Придушення алкогольного гепатиту за допомогою IL-18BP

Чотирьом групам пацюків (5 на групу) шляхом внутрішньошлункової ін'єкції протягом 4 тижнів давали етанол і корм, що містить кукурудзяне масло. Контрольним тваринним етанол замінювали декстрозою ізокалорійно. Пацюків ін'єкували щодня мишачим IL-18BP (1 мг/кг) або фізіологічним розчином. Аналіз патології здійснювали на зрізах печінки, і проводили вимірювання вмісту в сироватці ферментів печінки, TNF- $\alpha$ , Fas-ліганду і IFN- $\gamma$ . У пацюків, яким давали етанол і ін'єкували їм фізіологічний розчин, спостерігали некро-запальне пошкодження і експресію ферментів печінки, TNF- $\alpha$ , Fas-ліганду і IFN- $\gamma$ .

Пацюки, ін'єковані IL-18BP, захищені від некрозапального пошкодження, і рівні ферментів печінки, TNF- $\alpha$ , Fas-ліганду і IFN- $\gamma$  у них істотно знижені (>90%).

Приклад 8. Придушення гепатиту, індукованого Con A, за допомогою IL-18BP

Мишам Balb/c вводили 12 мг/кг конканаваліну A (Con A) разом з ін'єкцією мишачого IL-18BP (1 мг/кг) за 2 години до введення Con A або без неї і потім щодня. Пошкодження печінки оцінювали, визначаючи рівні в сироватці ферментів печінки, TNF- $\alpha$ , Fas-ліганду і IFN- $\gamma$ . Порівнювали гістопатологію печінки таких мишей і мишей, оброблених тільки конканаваліном A.

Попередня обробка IL-18BP істотно знижує сироваткові рівні ферментів печінки і TNF- $\alpha$  з відсутністю доказів запалення при гістопатологічній перевірці в порівнянні з контрольними тваринами, не обробленими Con A.

Частина II. Приклади 9 і 10, що відносяться до застосування інгібіторів IL-18 при артриті

Приклад 9. Одержання IL-18BP з міткою His (IL-18BP-His tag)

Для експерименту, детально описаного нижче в прикладі 10, в клітинах CHO одержували рекомбінантний IL-18BP людини, що містить мітку з 6 залишків his (r-hIL-18BP-His tag), і очищали, як описується у Kirn et al., 2000. Рекомбінантний білок очищали до міри понад 95% і виявляли його біологічну активність *in vitro* і *in vivo* з високою афінністю до його лігандів.

Одержання рекомбінантних білків в інших еукаріотичних системах без міток або з мітками, що полегшують очищення рекомбінантних білків, відоме фахівцям в даній області техніки. Добре відомі способи доступні для конструювання відповідних векторів, що містять ДНК, що кодує IL-18BP, і відповідних для трансфекції еукаріотичних клітин з метою одержання рекомбінантного IL-18BP. Для експресії в клітинах ДНК, що кодує IL-18BP (див., наприклад, Novick et al., 1999), вирізали і вбудовували в експресуючі вектори, відповідні для трансфекції клітин. З іншого боку, таку ДНК можна одержати методом ПЛР з відповідними смисловими і антисмисловими праймерами. Потім одержані конструкції ДНК вбудовували у відповідним чином сконструйовані еукаріотичні експресуючі вектори методами, добре відомими в техніці (Maniatis, 1982).

Приклад 10. Блокада ендогенного IL-18 на мишачій моделі артриту

Методи

Індукція артриту, що викликається колагеном (CIA)

CIA індукували у самців мишей DBA/1 (вік 8-12 тижнів) шляхом імунізації нативним бичачим колагеном типу II (CII), як описано раніше (Plater-Zyberk et al., 1995). З 25 дня після імунізації мишей щодня перевіряли на початок захворювання.

Обробка rhIL-18BP-6his

Обробку мишей DBA/1, імунізованих CII, починали при першій появі клінічних ознак хвороби. Рекомбінантний IL-18BP людини, що містить мітку з 6 гістидинів (rhIL-18BP - 6his), використали для нейтралізації ендогенного IL18 у мишей, оброблених колагеном. rhIL-18BP-6his ін'єкували інтраперитонеально (i.p.) щодня протягом 7 (семи) днів при 5 різних концентраціях - 10, 3, 1, 0,5 і 0,25 мг/кг/ін'єкція. Контрольні миші як плацебо одержували тільки носій (0,9% розчин NaCl).

Оцінка розвитку захворювання

Клінічна оцінка (клінічні показники)

При першій появі клінічних симптомів мишей кожний день перевіряв співробітник, пов'язаний з лікуванням. Кожну кінцівку оцінювали на важкість захворювання (шкала 0-3,5, максимальне число оцінок=14/миша). На лапах, на яких ознаки хвороби з'явилися першими, вимірювали розвиток набряку (запалення) з використанням точних циркулів (Proctest 2T, Kroeplin Langenmesstechnik).

Розвиток хвороби оцінювали щодня протягом 8 днів від початку, після чого мишей умертвляли, і збирали лапи для гістопатологічної перевірки.

Гістологічна оцінка ерозій хряща і оцінка мікрозапалення

По закінченні експериментів, тобто, на 8 день після початку хвороби, мишей умертвляли, і відсікали лапи, на яких ознаки хвороби з'явилися першими. Суглоби фіксували, декальціювали і заливали парафіном. Робили стандартні зрізи і забарвлювали гематоксиліном/еозинном/сафраніном О. Кожний суглоб оцінювали 2 дослідники, не знайомі з протоколом обробки (відсутність руйнування хряща або кістки=0; локалізовані ерозії хряща=1-2; більш численні ерозії=3; загальне руйнування хряща і наявність ерозії кістки=4). Кінцеві оцінки для кожної миші були середнім з результатів для всіх оцінених суглобів. Оцінку мікрозапалення під мікроскопом або синовіт здійснювали за шкалою від 0 до 4 таким чином: відсутність запалення=0; невелике потовщення шару підстилки і/або небагато інфільтруючих клітин в шарі під підстилкою=1-2; потовщення шару підстилки і/або більш виражений приплив клітин шару під підстилкою=3; наявність клітин в синовіальному просторі і синовію, сильно пронизаному багатьма інфільтруючими клітинами=4.

Визначення антиколагенових антитіл

Антитіла проти бичачого колагену типу II перевіряли з використанням твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA). Вимірювали титри IgG1 і IgG2a. Коротко, планшети сенсibiliзували 10 мкг бичачого колагену, і потім блокували сайти неспецифічного скріплення 0,1 М розчином етано-

ламіну (Sigma). Додавали серійні розведення (1:2) сироваток і потім інкубували з ізотипспецифічною козячою антимишачою пероксидазою (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Al., USA) і субстратом (5-аміносаліцилова кислота, Sigma). Планшети зчитували при 492 нм. Титри виражали як середнє±SD розведення, яке дає значення в половину від максимального.

#### Аналізи IL-6

Рівні IL-6 визначали комерційним ELISA (системи R&D, Міннеаполіс, Міннесота, США). Біологічну активність IL-6 визначали шляхом аналізу проліферації з використанням клітин B9. Коротко, в круглодонні ямки титраційного мікропланшета вміщували  $5 \times 10^3$  клітин B9 в 200 мкл на ямку середовища RPMI 1640 з 5% FCS і інкубували протягом 3 діб з використанням як стандарту рекомбінантного IL-6 людини (системи R&D, Міннеаполіс, Міннесота, США). По закінченні інкубації додавали 0,5 мкКи  $^3\text{H}$ тимідину (NEN-Duront, Бостон, Міннесота, США) на ямку. Через три години клітини збирали, і визначали включення тимідину. Межа виявлення для біоаналізу на IL-6 становила 1 пг/мл.

#### Статистичний аналіз

Значущість відмінностей оцінювали за допомогою критерію Манна-Уїтні з використанням програми статистичного аналізу SigmaStat і програми GraphPad Prism.

#### Результати

Мишачу експериментальну модель CIA (колагеніндукований артрит) використали для оцінки ефективності IL-18BP як засобу для лікування артрити. Введення колагену і неповного ад'юванту Фрейнда мишам DBA/1 викликає розвиток ерозивного запального артрити і представляє ідеальну можливість дослідження лікувального потенціалу IL-18BP. З цією метою ендogenous IL-18 нейтралізують з використанням IL-18BP, і оцінюють дію на різні патогенні параметри.

Дослідження проводять в залежності від дози. Три групи мишей DBA/1 з колагеніндукованим артритом обробляють терапевтично (тобто, після початку захворювання) 5 дозами IL-18BP і.р. (інтраперітонеально). IL-18BP в концентраціях 10, 3, 1, 0,5 або 0,25 мг/кг вводять при перших клінічних ознаках хвороби. Ін'єкцію фізіологічного розчину (хлориду натрію, NaCl) використовують як контроль. Крім того, вводять і.р. 10000 МЕ інтерферону

$\beta$  (IFN- $\beta$ ) для оцінки впливу IFN на даній експериментальній моделі артрити. Вплив на важкість захворювання контролюють щодня, оцінюючи візуально кожну окрему лапу, як описано вище. Мишей умертвляють на 8 день від початку захворювання.

Оцінюють наступні показники:

- візуальні клінічні показники (кожну лапу, шкала 0-3,5) (Фіг. 7, А і В);
- опухання/набряк суглобів (в мм, виміряні циркулем) першої хворої лапи, за умови, що це задня лапа (Фіг. 8);
- число лап, охоплених хворобою (Фіг. 9);
- показники ерозії першої хворої лапи (руйнування хряща - 0-4, Фіг. 10);
- при гістологічному аналізі лапи, що стала першою, в якій розвинувся артрит (Фіг. 11);
- рівні антитіл проти колагену типу II (Фіг. 12);
- рівні IL-6 (Фіг. 13).

Клінічна важкість захворювання

Як видно на Фіг.7, А і В, клінічна важкість захворювання істотно знижується в групах, оброблених 1 мг/мл ( $P < 0,01$ ) і 0,5 мг/мл ( $0,01 < P < 0,05$ ) rhIL-18BP. Миші, які одержують низьку дозу rhIL-18BP (0,25 мг/мл) або високу дозу в 10 мг/мл, мають клінічну оцінку, подібну оцінці групи плацебо. Доза 1 мг/мл IL-18BP ефективна приблизно так само, як інтерферон  $\beta$  (позначений на Фіг. 7А як IFN $\beta$ ).

Запалення і опухання (набряк) суглобів

Макрозапалення (опухання) досліджували, вимірюючи набряк лап від дня 1 після початку хвороби до дня 8 закінчення експерименту. Результати приводяться на Фіг. 8, А і В. Ефективними дозами IL-18BP були 1, 3 і 10 мг/кг. Введення більш низьких доз не надає сприятливої дії на опухання лап. Як видно на Фіг. 8, А і В, інтерферон  $\beta$  (IFN $\beta$ ) при концентрації 10000 МЕ показує сприятливу дію на опухання лап.

Мікросиновіт перевіряють по закінченні експерименту на гістопатологічних зрізах і виражають як показники за шкалою ("показник синовіту"). Результати по запаленню (набряканню) і показники синовіту зведені в табл. 1. Хоча обробка rhIL-18BP при дозуванні 1 і 3 мг/кг приводить до тенденції зменшення опухання, обробка будь-якою дозою IL-18BP надає тільки обмежену дію на запальний синовіт (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив обробки IL-18BP на запалення суглобів

Обробка	Опухання (AUC, середн.+sem)	Показник синовіту (середн.±sem)
RhIL-18BP-6his		
3 мг/кг	1,55±0,64	2,17±0,5
1 мг/кг	1,53±0,60	1,98±0,4
0,5 мг/кг	3,38±0,70	1,92±0,5
0,25 мг/кг	3,06±0,90	2,08±0,5
Плацебо	3,11±0,77	2,23±0,3

На Фіг.9 показано, що число лап, уражених хворобою, зменшується після введення IL-18BP. Зокрема, терапевтичні ін'єкції IL-18BP при дозах 1 і 0,5 мг/кг знижували число лап, що залучаються до хвороби, що показує, що блокада IL-18 in vivo за-

тримує поширення артрити на інші суглоби. Обробка 1 і 0,5 мг/кг IL-18BP здатна навіть викликати нормалізацію уражених артритом суглобів.

Захист від руйнування суглобів

Обробка мишей rhIL-18BP приводить до захисту суглобів від руйнування (Фіг. 10). Система напівкількісної оцінки показує, що за ерозією кістки видна захисна дія, що залежить від дози, суттєва при 10 і 3 мг/кг ( $P < 0,05$ , Фіг. 10). У мишей, які одержують 1 мг/кг rhIL-18BP, ерозія менше, ніж у мишей, які одержують тільки носій. Захисна дія не виявлена при дозах 0,5 мг/кг і 0,25 мг/кг. Представляв інтерес той факт, що захисна дія на суглоби при дозах 3 і 10 мг/кг rhIL-18BP порівнянна і навіть більш виражена, ніж сприятлива дія 10000 МЕ інтерферону  $\beta$  (IFN- $\beta$ ).

На Фіг. 11 показана гістологія здорового (А) і хворого (В) суглоба в порівнянні з суглобом тварини, обробленої IL-18BP (С). Зрізи зроблені по закінченні експерименту з лап перших, де розвинувся артрит.

У суглобі миші, ураженої артритом, виявляється яскравий деструктивний артрит із зникненням хряща і ерозіями і численними інфільтруючими клітинами в запаленому синовії. У суглобі миші, обробленої rhIL-18BP, хрящ виглядає майже здоровим, незважаючи на наявність клітин зони запалення в синовіальному просторі. Хрящова тканина не тільки представлена в більшій кількості, але і виглядає більш гладко.

Обробка анти-IL-18 модулює рівні антитіл проти колагену типу II

У мишей СТА в кровотоці підвищені рівні антитіл IgG1 і IgG2a проти колагену типу II. Антитіла ізотипу IgG1 асоціювалися із захворюваннями, опосередкованими TH2, в той час як антитіла ізотипу IgG2a і ізотипу IgG2b асоціюються із захворюваннями, опосередкованими TH1.

Визначають ізотипи антитіл IgG1 і IgG2a проти колагену типу II (CII) в сироватці тварин, оброблених IL-18BP (Фіг. 12). Вміст ізотипів IgG1 і IgG2a анти-CII не змінюється істотно на 4 або 8 день (D4, D8) клінічної хвороби. Однак після 8 днів обробки rhIL-18BP спостерігається зменшення відношення IgG1/IgG2a в 2,6 і 3,4 рази при дозах 1 і 3 мг/кг, відповідно. На Фіг. 12 відображений експеримент, при якому використовують 3 мг/кг. По суті такі ж результати одержують з використанням 1 мг/кг rhIL-18BP. Знижене відношення IgG1/IgG2a антитіл проти CII вказує на знижену концентрацію антитіл проти колагену типу II ізотипу IgG2a і підвищену концентрацію антитіл проти колагену типу II ізотипу IgG1, що наводить на думку, що в даній моделі артриту є зміщення у бік захворювання, опосередкованого TH2.

Зниження рівнів IL-6 після нейтралізації IL-18

Для того, щоб одержати уявлення про дію блокади IL-18, вимірювали вміст IL-6 в сироватці тварин, оброблених IL-18BP. На Фіг. 13 показано, що вміст біологічно активного IL-6 істотно зменшується у тварин, які одержують IL-18BP, при всіх виміряних дозах, тобто, 1,3 і 10 мг/кг, так само, як у разі інтерферону  $\beta$  (IFN $\beta$ ). Імунноактивні рівні IL-6, виміряні в сироватці тварин, оброблених 3 мг/кг rhIL-18BP, істотно нижче ( $P < 0,0023$ ), ніж у тварин, оброблених фізіологічним розчином. Сироваткові рівні IL-6 у хворих тварин, оброблених 1, 3 або 10 мг rhIL-18BP або 10000 МЕ IFN- $\beta$ , схожі з рівнями в нормальній мишачій сироватці (NMS), одержаній

від здорових тварин, тобто, від тварин, що не мають запального захворювання.

Одержані результати показують, що IL-18 регулює рівні IL-6 на початку захворювання. Оскільки IL-6 був маркером запалення, такі результати показують, що обробка хворих мишей IL-18BP знижує запалення у тварини.

З описаних вище експериментів можна зробити наступні висновки:

- введення IL-18BP зменшує клінічну важкість артриту;
- IL-18BP інгібує подальший розвиток або поширення хвороби;
- введення IL-18BP зменшує набряк;
- введення IL-18BP зменшує руйнування хряща;
- після лікування IL-18BP знижувалися сироваткові рівні IL-6, і зменшується відношення IgG1/IgG2a.

Дані, представлені вище, показують, що нейтралізація біологічної активності IL-18 після початку захворювання являє собою протиревматичну терапію, що модифікує захворювання. Результати чітко показують, що блокада IL-18 знижує клінічний розвиток артриту і, що більш важливо, затримує розвиток руйнування хряща і кісток. Отже, блокада IL-18 за допомогою IL-18BP, антитіл проти IL-18 або будь-яким іншим блокуючим IL-18 засобом являє собою нову протиревматичну терапію, що модифікує захворювання.

Приведений вище опис конкретних варіантів втілення винаходу показує загальний характер винаходу, так що інші фахівці, застосовуючи знання, що є, легко модифікували і/або адаптували такі конкретні варіанти для різних застосувань без відходу від основної концепції, отже, така адаптація і модифікації повинні бути включені, і призначені для включення, в задум і межі еквівалентів описаних варіантів. Потрібно мати на увазі, що фразеологія або термінологія, що використовується в даному описі, мають за мету опис, а не обмеження.

Частина III. Приклади 11 і 12, що відносяться до запального захворювання кишечника

Приклад 11. Експресія IL-18BP ендотеліальними клітинами і макрофагами під час активної хвороби Крона

Збір зразків

Зразки інтестинальних слизових тканин витягують при вичерпанні зразків, взятих у пацієнтів з CD або UC. Включають чотирнадцять пацієнтів з CD (троє чоловіків і одинадцять жінок), середній вік 37,8 років (інтервал 20-78 років), тривалість захворювання 8,3 року (інтервал 1-21 рік). У восьми пацієнтів хвороба локалізована у клубовій кишці і у шести - в ободовій кишці. Дванадцять пацієнтів приймають імуносупресивні засоби. Діагноз CD поставлений за допомогою гістопатологічної перевірки і заснований на наступних критеріях: наявність виразок, підвищене число клітин запального інфільтрату і трансмуральне запалення. Ідентифікують сім пацієнтів з активною CD і сім пацієнтів з неактивною хворобою. Істотних відмінностей за віком, локалізацією хвороби, статтю, лікарською терапією і тривалістю захворювання між пацієнта-

ми з активною і неактивною CD не було. Середній вік 5 пацієнтів з UC (троє чоловіків і дві жінки) 37,6 років (інтервал 30-44 року). У всіх пацієнтів хвороба локалізована в ободовій кишці, і всіх лікували імунODEPRESИВНИМИ засобами. Середня тривалість захворювання 4 роки (інтервал 1-9 років). Контрольні зразки беруть у 5 пацієнтів, що зазнають резекції з приводу розладів, не пов'язаних з IBD (троє чоловіків і дві жінки). Середній вік цієї групи 55,2 року (інтервал 24-76 років). У всіх пацієнтів хвороба локалізована в ободовій кишці.

Напівкількісна ОТ-ПЛР для IL-18 людини і IL-18bp

Повну РНК екстрагують із заморожених зразків інтестинальної тканини пацієнтів з CD, з UC або контролю. Екстракцію РНК здійснюють з використанням тризолу (Gibco) згідно з рекомендаціями виробника. Одержані зразки оцінюють кількісно, вимірюючи поглинання при 260 нм. Цілісність РНК аналізують методом електрофорезу на 1% агарозних гелях. Синтезують кДНК з 1 мкг повної РНК з використанням системи зворотної транскрипції Promega згідно зі схемою виробника. Реакції ПЛР проводять в загальному об'ємі 50 мкл в присутності 1 Е ДНК-полімерази AmpliTaq (Perkin Elmer, Roche, США), 2,5 mM dNTP (Amersham, США) і 50 пмоль прямих і зворотних праймерів ПЛР. Реакційні суміші інкубують в термокомірці PTC-200 Peltier Effect (MJ Research, США) в наступних умовах: денатурація - 1 хв. при 94°C, ренатурація - 1 хв. при 55°C, і розтягнення - 1 хв. при 72°C. Визначають оптимальне число циклів для IL-18BP, IL-18 і  $\beta$ -актину до насичення смуг (відповідно, 31, 28 і 25). Створюють наступні праймери ПЛР на основі опублікованих послідовностей (AF110799, D49950, X00351): IL-18, зворотний - 5'-GCGTCACTACACTCAGCTAA-3'; прямий - 5'-GCCTAGAGGTATGGCTGTAA-3'; IL-18BP, прямий - 5'-ACCTGTCTACCTGGAGTGAA-3'; зворотний - 5'-GCACGAAGATAGGAAGTCTG-3';  $\beta$ -актин, зворотний - 5'-GGAGGAGCAATGATCTTGATCTTC-3'; прямий - 5'-GCTCACCATGGATGATGATATCGC-3'. Для того, щоб виключити ампліфікацію геномної ДНК, що забруднює зразки, реакції ПЛР проводять у відсутності матриці кДНК. Продукти ПЛР (10 мкл) аналізують на 1% агарозних гелях при електрофорезі в буфері 1xTAE. Розмір продуктів ПЛР підтверджують шляхом порівняння з ланцюгом довжиною 1 т.п.н. (Gibco) після фарбування гелів. Визначають відносну кількість смуг, забарвлених етидійбромідом в УФ-світлі з використанням аналітичного програмного забезпечення Kodak Digital Sciences, і результати приводять у вигляді співвідношення гена-мішені (hIL-18BP, hIL-18) і обов'язкових генів (h $\beta$ -актин).

Одержання моноклональних антитіл, направлених проти hIL-18BP

Мишам BALB/c підшкірно в чотири кінцівки, а також в загринок, вводили 50 мкг ізоформи rhIL-18BP-6his (виділеного в чистому вигляді з клітин яєчника китайського хом'ячка, Interpharm Laboratories, Nes Ziona, Ізраїль) в PBS з ад'ювантом (емульсія MPL+TDM, RIBI Immunochem Research, Inc.) в дні 0, 7 і 28. Через 4 дні після 3-ї імунізації одержують лімфовузли і гідролізують 2,4

мкг/мл колагенази (колагеназа IV, Worthington, Biochemical Corp.) і 0,1% ДНКазу (Sigma). Потім виділені клітини зливають з мієлоїдними клітинами Sp2/0 з використанням ПЕГ-1000 (FLUKA). Клітини ресуспендують в DMEM-F12, 10% FCS (Gibco) в присутності НАТ (гіпоксантин, аміноптерин, тимидин) і розподіляють в 96-ямкові планшети в концентрації  $5 \times 10^4$  клітин/мл. Зразки супернатантів гібридомних культур скринують на присутність реакційноздатних антитіл при аналізі прямим скринінгом. Для цього планшети для ELISA сенсibilізують козячими антимишачими антитілами F(ab')<sub>2</sub> (Jackson Immuno Research, Milan analytica, Швейцарія), додають супернатанти гібридомних культур і потім біотинільований rhIL-18BP-6his (виділений в чистому вигляді з клітин COS, як описується в Novick et al., 1999), з додаванням або без rhIL-18 (виділеного в чистому вигляді з рекомбінантної E.coli, Serono Pharmaceutical Research Institute, Женева), і нарешті виявляють стрептавідином і пероксидазою хрому (HPR) (Jackson Immuno Research, Milan analytica, Швейцарія) з використанням о-фенілєндіаміну (OPD) (Sigma). Відбирають ненейтралізуючі антитіла і субклонують. При такому дослідженні використали мишачі моноклональні антитіла IgG1 95-H20.

Імуногістохімічні дослідження локалізації клітин, позитивних у відношенні IL-18bp

Зразки тканини швидко заморожують і зберігають при -80°C. Одержували серійні кріостатні зрізи (10 мкм), кладуть в середовище на покритих полі-L-лізином скляних пластинах Superfros/Plus (Polyabo, Plan-les-Ouates, Швейцарія) і фіксують в охолоджену льодом ацетоні. Локалізацію білка IL-18BP людини аналізують методом імуногістохімії з використанням Mab 95-H20. Після короткої повторної гідратації в PBS зрізи заздалегідь інкубують протягом 30 хвилин в PBS з додаванням 2% фатальної телячої сироватки (FSC) (Cansera, Онтаріо, Канада), 1% сироватки людини (сироватка AB+, Transfusion Center, Аннемасс, Франція) і 0,5% бичачого сироваткового альбуміну (BSA) (Sigma, Сент-Луїс, Міссурі, США). Активність ендогенної пероксидази блокують, вміщуючи пластини в розчин PBS з 2% FSC, 1% сироватки людини, 0,5% BSA і 1% пероксиду водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Fluka, Швейцарія) на 1 годину. Після промивки PBS зрізи інкубують протягом ночі з нерозведеним культуральним супернатантом Mab 95-H20. Після ще однієї промивки PBS зрізи інкубують протягом 1 години з біотинільованими козячими антимишачими антитілами (Jackson Immuno Research, Milan analytica, Швейцарія) (5 мкг/мл) в PBS, що містить 0,5% BSA. Чутливість до фарбування підвищували шляхом інкубації з комплексом авідинDH/біотинільованого HRP (Vectastatin Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Каліфорнія, США) протягом 30 хв. Потім пластини промивають PBS і виявляють з використанням розчину 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3,3-аміно-9-етилкарбазолу (AEC) (Sigma) і N,N-диметилформаміду (Merck) в ацетатному буфері, pH 5. Після контрфарбування гематоксиліном (Sigma) зрізи покривають гліцерином, і використовують покривні скла. Як ізотиповий контроль використовують мишачі антитіла IgG1 (система R і D).



Для того, щоб ідентифікувати клітинну локалізацію IL-18BP людини, проводять два імуногістохімічних дослідження з фарбуванням на зрізах слизової оболонки кишечника. Після повторної гідратації в PBS протягом 10 хв. зрізи заздалегідь інкубують в PBS з додаванням 2% FCS, 1% сироватки людини і 0,5% BSA. Для співлокалізації з ендотеліальними клітинами зрізи інкубують протягом ночі з біотинільованими Mab 95-H20 (20 мкг/мл), змішаними з мишачими антилюдськими CD31, кон'югованими з FITC (1:50) (Pharmingen, Каліфорнія, США), в PBS/0,5% BSA. Для співлокалізації з макрофагами зрізи інкубують протягом ночі з біотинільованими Mab 95-H20 (20 мкг/мл), змішаними з антилюдськими CD68, кон'югованими з FITC (1:25) (Dako, Данія). Після промивки в PBS протягом 1 години додають стрептавідин Texas-Red (Southern Biotechnology Associates, AL, США). Пластини знов промивають, і зрізи покривають мовіолом, і застосовують покривні скла. Як ізотиповий контроль використовують біотинільовані мишачі антитіла IgG1 (Pharmingen), а потім стрептавідин Texas-Red.

#### Клітинна культура

Культивували ендотеліальні клітини пупкової вени людини (HUVEC) (Clonetics Corp., Сан-Дієго, Каліфорнія) з використанням середовища для вирощування ендотеліальних клітин (EGM) з додаванням рекомбінантного епідермального фактора зростання людини (hEGF) (10 нг/мл), гідрокортизону (1 мкг/мл), гентаміцину і амфотеріцину В (50 мкг/мл), екстракту бичачого головного мозку (BBE) (3 мг/мл) і 2% фатальної телячої сироватки (FBS) (Clone-tics Corp., Сан-Дієго, Каліфорнія), згідно з рекомендаціями виробника. У чашки з культурами тканин заздалегідь наносили шар фібронектину людини (10 мкг/см<sup>2</sup>) (Boehringer, Маннгейм). Клітини інкубували у вологій камері з 5% CO<sub>2</sub>, і експерименти здійснювали з використанням клітин HUVEC в 3-ому пасажі. Клітини HUVEC обробляли IL-1β людини (10 нг/мл), TNFα (10 нг/мл) і IFNγ (20 нг/мл) (системи R і D, Німеччина) протягом 24 год. По закінченні періоду культивування клітини збирали, виділяли ДНК і піддавали ОТ-ПЛР для аналізу транскриптів мРНК IL-18BP і IL-18. Супернатанти збирали, і в них аналізували експресію білка IL-18BP і IL-18 методом ELISA.

Лінію моноцитів людини THP-1 підтримували в суспензійній культурі в середовищі RPMI з додаванням 10% інактивованої нагріванням FCS, L-глутаміну (2 мМ), пеніциліну-стрептоміцину (10 Е/мл) (Gibco BRL, Life Technologies) і β-меркаптоетанолу (50 мкМ) (Fluka). Клітини інкубували у вологій камері з 5% CO<sub>2</sub> і підтримували при 1:10 кожні 5 днів. За три дні до експерименту моноцити людини були диференційовані при щільності 0,4x10<sup>6</sup> клітин/мл вітаміном D3 (80 нМ) (Biomol Research Laboratories, США), і їх залишали для прикріплення. Після диференціювання до клітинної культури додавали LPS (100 нг/мл) (Calbiochem), IL-1β людини (10 нг/мл), TNFα (10 нг/мл) і IFNγ (20 нг/мл). Через 48 годин супернатанти збирали, і в них визначали експресію IL-18BP і IL-18 методом ELISA.

Вимірювання продукції IL-18BP і IL-18 людини

Наявність IL-18BP оцінювали методом ELISA в безклітинних супернатантах HUVEC, нестимульованих і стимульованих протягом 24 год. сумішшю цитокінів (IL-1β, TNFα, IFNγ), а також клітинної лінії THP-1, нестимульованої і стимульованої протягом 24 год. сумішшю цитокінів (LPS, IL-1β, TNFα, IFNγ). Для цього на планшети протягом ночі наносили іммобілізовані Mab (клон 657.27 в кількості 0,5 мкг на 100 мкл на ямку, Interpharm Laboratories, Nes Ziona, Ізраїль), направлених проти rhIL-18BP (ізоформа а). Потім визначали розчинний rhIL-18BP з використанням кролячих поліклональних антитіл (розведення 1/10000), направлених проти rhIL-18BP-6his (виділений в чистому вигляді з клітин яєчника китайського хом'ячка, Interpharm Laboratories, Nes Ziona, Ізраїль), з подальшою інкубацією з афінним очищенням козячим антикролячим IgG, кон'югованим з пероксидазою (розведеним 1/20000) (Jackson Immuno Research, Milan analytica, Швейцарія). Іммобілізовані Mab, а також кролячі поліклональні антитіла тестували методом вестерн-блотингу для підтвердження специфічності до IL-18BP. Рекомбінантний rhIL-18BP-6his використали як стандарт. Чутливість ELISA 100 пг/мл. Паралельно визначали кількість IL-18 з використанням набору для ELISA для IL-18 людини (MBL, Immunotech). Чутливість ELISA становила 12,5 пг/мл.

#### Експресія rhIL-18BPα-His6 в клітинах CHO

Рекомбінантний IL-18BP людини (rhIL-18BPα, мітка His6) виділяли в чистому вигляді з клітин яєчника китайського хом'ячка (Interpharm Laboratories, Nes Ziona, Ізраїль).

#### Результати

Експресія транскриптів мРНК IL-18BP в інтестинальних біоптатах

Аналіз експресії мРНК IL-18BP здійснювали методом ОТ-ПЛР в гомогенатах тканин одержаних при операції зразків ободової кишки пацієнтів з активною CD або неактивною CD, або з UC і без запалення тканин кишечника (Фіг. 14). Транскрипти IL-18BP і актину виявляли у всіх перевірених інтестинальних гомогенатах. Подібним чином, транскрипти IL-18 виявляли у всіх гомогенатах тканин у випадку CD, UC або контролі без IBD (Фіг. 14A). Відношення IL-18BP або IL-18 до рівнів контрольної мРНК актину показує значне зростання (як описано нижче) кількості транскриптів в біоптатах як IL-18BP, так і IL-18, одержаних у пацієнтів з активною CD в порівнянні з біоптатами пацієнтів з неактивною CD, UC або контролю без IBD (Фіг. 14, В і С). Такі дані показували, що IL-18BP активується в тканині слизової оболонки у час активної CD, і були першим доказом того, що рівень експресії IL-18BP чітко відрізняє активну CD від неактивної CD, UC і контролю без IBD.

Статистичний аналіз експресії транскриптів мРНК IL-18BP в інтестинальних біоптатах

Аналіз дисперсії здійснювали, збираючи разом всі доступні дані. Відгук ясно показує статистичний викид, що відноситься до результатів для одного з пацієнтів з групи з активною CD (дуже високе відношення OD для IL-18, а саме, 16252, і низьке відношення OD для IL-18BP, а саме, 1058). Єдина і дуже атипична пара вимірювань не дає можливості

невизнання вибірки неупередженою за моделлю ANOVA (величина  $p$  за критерієм Шапіро-Уїлкса для нормальності залишків  $<0,0001$ ). Тому вирішено ігнорувати вказану пару вимірювань при статистичному аналізі.

Модель ANOVA, що використовується, враховує фактор групи (контроль, активна CD, неактивна CD і UC), білок (IL-18 або IL-18BP) і число пацієнтів (23 пацієнти). Є значна відмінність в групі (величина  $p < 0,0001$ ). Також цікаво зазначити, що відмінність відносин OD між IL-18 і IL-18BP не суттєва (величина  $p = 0,369$ ). Крім того, виконана також кореляція між експресією IL-18 і IL-18BP. Коефіцієнт кореляції між IL-18 і IL-18BP дорівнює 0,67, що передбачає наявність суворого зв'язку між відношенням OD, виміряним для IL-18 і IL-18BP. Далі, для результатів, що стосуються ефекту групи, використали метод Scheffe для порівняння різних груп. Можна зробити висновок, що відношення OD для активної CD істотно вище, ніж для контролю (+3280), UC (+2590) і особливо неактивної CD (+4580) як для експресії IL-18, так і для експресії IL-18BP.

Імуногістохімічна локалізація IL-18BP в тканинах кишечника

Для того, щоб оцінити клітинну експресію IL-18BP *in situ*, з використанням специфічних моноклональних антитіл проти hIL-18BP виконували імуногістохімічні дослідження на криостатних зрізах, одержаних з тканин кишечника пацієнтів з активною CD і контролю без IBD. Клітини, позитивні у відношенні IL-18BP, виявлялися у власній пластинці, шарі тканини під слизовою оболонкою і в м'язовій пластинці слизової оболонки (не показано). Позитивно забарвлені клітини, присутні у власній пластинці і шарі тканини під слизовою оболонкою, володіли численною цитоплазмою, везикулярними сітковидними ядрами і морфологічно нагадували тканинні макрофаги. У м'язовій пластинці слизової оболонки позитивно забарвлені клітини мали численну цитоплазму з відкритим деякий час просвітом в середині, що передбачає позитивне фарбування капілярів, і морфологічно нагадували ендотеліальні клітини. Великі судини також специфічно забарвлювалися моноклональними антитілами проти hIL-18BP. Істотне збільшення числа позитивно забарвлених клітин, що спостерігається в зрізах, одержаних у пацієнтів з активною CD, в порівнянні із зрізками, одержаними в контролі без IBD, корелює з підвищеною експресією IL-18BP, що спостерігається при аналізі методом ОТ-ПЛР. Суміжні зрізи інкубували з відповідним мишачим ізотиповим контролем.

Ідентифікація клітин, які продукують IL-18BP, в біоптатах слизової оболонки

Клітини, позитивні у відношенні IL-18BP, присутні в запалених тканинах кишечника, ідентифікували з використанням специфічних маркерів макрофагів (анти-CD68) і ендотеліальних клітин (анти-CD31) (не показано). CD68-позитивні клітини (зелений колір), і IL-18BP - позитивні клітини (червоний колір) виявляються у власній пластинці і шарі тканини під слизовою оболонкою тканин кишечника при активній CD (не показано). CD31-позитивні клітини (зелений колір), і IL-18BP-позитивні клітини

(червоний колір) виявляються в шарі тканини під слизовою оболонкою. Для того, щоб підтвердити, що макрофаги і ендотеліальні клітини також є IL-18BP-позитивними, обидва кольори - зелений від анти-CD68 або анти-CD31 і червоний від анти-IL-18BP - аналізували разом, при цьому показали, що всі клітини, зв'язуючі антитіла проти IL-18BP, були або CD68-позитивними, або CD31-позитивними (оранжево-жовтий колір). Подвійне імунне фарбування показало, що макрофаги і ендотеліальні клітини були основним джерелом фарбування IL-18BP в запалених тканинах, одержаних у пацієнтів з CD.

Експресія мРНК IL-18bp і білка ендотеліальними клітинами

Для того, щоб дослідити здатність ендотеліальних клітин людини продукувати IL-18BP, а також підтвердити результат, одержаний при імунозабарвленні і ОТ-ПЛР на загальних біоптатах, здійснювали подальші експерименти методом ОТ-ПЛР на ендотеліальних клітинах пупкової вени людини (HUVEC) (Фіг. 15А). Ендотеліальні клітини обробляли сумішшю цитокінів (hIL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) і збирали через 24 години для екстракції РНК і ПЛР-аналізу. Відношення вмісту IL-18BP до рівнів контрольної мРНК актину свідчило про зростання через 24 год. кількості транскриптів IL-18BP в оброблених клітинах в порівнянні з нестимульованими клітинами. Крім того, виявилось, що в ендотеліальних клітинах, мабуть, істотно експресується мРНК IL-18BP. Також аналізували рівень мРНК IL-18BP, і виявили його слабе підвищення в оброблених клітинах. Однак мРНК IL-18BP не експресувався в нестимульованих ендотеліальних клітинах.

Дослідження методом ELISA культуральних супернатантів нестимульованих клітин (середовище) і HUVEC, оброблених протягом 24 год., показало, що білок IL-18BP присутній як в середовищі, так і в стимульованих клітинах, зростаючи в 30 разів після 24-годинної стимуляції (Фіг. 15В).

Експресія білка IL-18bp клітинною лінією моноцитів (THP-1)

Експресію IL-18 і IL-18BP аналізували в культуральних супернатантах нестимульованих і стимульованих диференційованих клітин THP-1 методом ELISA (Фіг. 15С). У цьому експерименті було виявлене посилення експресії IL-18BP після 48-годинної стимуляції LPS, hIL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ . Одночасно з цим після стимуляції підвищується секреція IL-18 (Фіг. 15С).

#### Резюме

У даному дослідженні охарактеризована експресія і локалізація IL-18BP в тканині слизової оболонки пацієнтів з хворобою Крона і неспецифічним виразковим колітом. З використанням схеми напівкількісної ОТ-ПЛР виявлено, що кількість транскриптів мРНК IL-18BP в біоптатах слизової оболонки пацієнтів з активною хворобою Крона вище в порівнянні з біоптатами пацієнтів з неспецифічним виразковим колітом і контролю без запалення. Імуногістохімічний аналіз біоптатів слизової оболонки показав, що білок IL-18BP локалізується в ендотеліальних клітинах і макрофагах, інфільтруючих слизову оболонку під час

хвороби Крона. Експресія IL-18BP ендотеліальними клітинами і активованими макрофагами підтверджується в первинних ендотеліальних клітинах пупкової вени людини (HUVEC) і клітинній лінії моноцитів THP1, стимульованих *in vitro*. Після стимуляції вказані клітини секретують біологічно активний IL-18BP.

Приклад 12. Обробка інгібіторами IL-18 дає поліпшення при експериментальному коліті

Матеріали і методи

Миші і індукція коліту

Всі експерименти дозволені Комітетом з етики досліджень на тваринних Амстердамського університету. Мишей BALB/c одержували в Harlan Sprague Dawley Inc. (Хорст, Нідерланди). Мишей містять в стандартних умовах і забезпечували питною водою і кормом (AM-II 10 мм, Hope Farms, Нідерланди).

Експерименти проводили на самицях мишей BALB/c у віці 8 і 10 тижнів. Коліт індукували шляхом ректального введення двох 2-мг доз (з 7-денним інтервалом) 2,4,6-тринітробензолсульфонової кислоти (TNBS) (Sigma Chemical Co., Сент-Луїс, Міссурі, США) в 40% етанолі (Merck, Дармштадт, Німеччина) з використанням вінілового катетера, який вводили в анус на 3 см (10 мишей на групу). У час інстиляції мишам давали наркоз з використанням ізофлурану (дифторметилловий ефір 1-хлор-2,2,2-трифторетилізофлурану, Abbott Laboratories Ltd., Queenborough, Кент, UK), і після інстиляції їх тримали вертикально протягом 60 секунд. Контрольних мишей піддавали ідентичній процедурі, але інстилювали фізіологічний розчин. Всіх мишей умертвляли на 9 день після першого введення TNBS (тобто через 48 годин після другого введення TNBS).

Мишей обробляли інтраперітонеально IL-18BP людини в 500 мкл 0,9% фізіологічних розчинів.

IL-18BP є 76-кратно міченим гістидином рекомбінантним білком людини, одержаним в експресуючій системі CHO. IL-18BP біологічно активний, оскільки інгібує продукування IFN $\gamma$  в клітинній лінії KG-1 і знижує продукування IFN $\gamma$  клітинами селезінки миші (Kim et al., 2000).

Оцінка запалення

Щодня реєстрували масу тіла. Після умертвіння збирали селезінки, каудальні лімфовузли і ободові кишки. Ободову кишку видаляли через поперечний розріз і розкривали в подовжньому напрямі. Після видалення фекального матеріалу реєстрували масу у вологому стані дистальної ділянки в 6 см і використали як показник пов'язаного із захворюванням потовщення інтестинальної стінки. Потім ободову кишку в подовжньому напрямі розділяли на дві частини, одну з яких використали для гістологічної оцінки.

Гістологічний аналіз

Ободові кишки, розділені в подовжньому напрямі, скочували, фіксували в 4% формаліні і заливали парафіном для звичайної гістології. Два дослідники, що проводили обробку мишей сліпим методом, проводили оцінку наступних параметрів: 1) процента ураженої площі, 2) гіперплазії фолікулярних агрегатів, 3) набряку, 4) ерозії/покриття

виразками, 5) втрати крипти і 6) інфільтрації моно- і поліморфноядерних клітин. Процент ураженої площі і втрату крипти оцінювали за шкалою в інтервалі від 0 до 4 таким чином: 0 - нормальний стан; 1 - менше 10%; 2 - 10%; 3 - 10-50%; 4 - понад 50%. Ерозію визначали як 0, якщо епітелій без змін, як 1 - у разі ураження власної пластинки, як 2 - у разі ураження шару тканини під слизовою оболонкою і як 3 - у випадку, якщо укривання виразками трансмуральні. Міру важкості інших показників оцінювали за шкалою від 0 до 3 таким чином: 0 - відсутність; 1 - слабкий вияв; 2 - помірний; і 3 - важкий. Така шкала містить в собі від 0 до 26 точок максимуму.

Гомогенати ободової кишки

З ободової кишки одержували гомогенати за допомогою гомогенізатора тканин в 9 об'ємах буфера Грінбурґера для лізису (300 mM NaCl, 15 mM трис, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM тритону (X-100), пепстатин А, лейпептин, апротинін (всіх по 20 нг/мл), pH 7,4). Тканини лізували протягом 30 хвилин на льоду з подальшим двократним центрифугуванням (10 хв., 14000 д). До використання гомогенати зберігали при -20°C.

Клітинна культура і ELISA для визначення цитокінів

Для одержання суспензії клітин селезінки і каудальних лімфовузлів використали сітчасті фільтри з фільтруючими комірками (Becton/Dickinson Labware, Н'ю-Джерсі, США). Клітини суспендували в середовищі RPMI 1640 (BioWhittaker-Boehringer, Верб'єрс, Бельгія), що містить 10% FCS і ципроксин (10 мкг/мл) (Sigma Chemical Co., Сент-Луїс, Міссурі, США). Клітини селезінки центрифугували зі стерильним фіколом (Pharmacia, Упсала, Швеція), одноядерні клітини переносили в RPMI, і проводили підрахунок клітин в клітинній суспензії. Клітини загальним числом  $1 \times 10^5$  на мишу інкубували при трикратному повторі в ямках в 200 мкл RPMI (BioWittaker Europe, A Cambrex Company, Верб'єрс, Бельгія), що містить 10% фетальної телячої сироватки. Клітини стимулювали шляхом попереднього нанесення шару антитіл проти CD3 (концентрація 1:30; клон 145.2C11) і розчинних антитіл проти CD28 (концентрація 1:1000; Pharmingen). Через 48 годин видаляли супернатанти, і методом аналізу ELISA вимірювали концентрації IFN- $\gamma$  (Pharmingen) і TNF- $\alpha$  (R&D systems, Абінгдон, Об'єднане Королівство).

Проточна цитометрія

Виділені клітини селезінки промивали буфером FACS (PBS, що містить 0,5% BSA, 0,3 ммоль/л ЕДТК і 0,01% азиду натрію) і залишали на льоду для виконання процедури, що залишилася. Клітини ( $2 \cdot 10^5$  клітин на ямку, 96-ямковий мікропланшет з V-подібною ямкою, Greiner B.V. labor technie, Alpen aan de Rijn, Нідерланди) інкубували з наступними антитілами (mAbs): щурячими антимишачими CD4, кон'югованими з Су-хромом (клон RM4-5), щурячими антимишачими CD69, кон'югованими з Fitc, і щурячими антимишачими CD25, кон'югованими з Fitc (Pharmingen, Сан-Дієго, Каліфорнія). Лімфоцити направляли за допомогою переднього і бічного розсіювача з використанням проточного цитометра FACSscan, в поєднанні з програмним

забезпеченням Facscan (Becton Dickinson, Mountain View, США), і відлічували 5000 клітин. Результати виражали в процентах пропущених клітин, позитивних у відношенні mAbs, що використовуються.

#### Статистичний аналіз

Величини приводяться як середні і SEM для обробленої групи. Відмінності між групами аналізуються з використанням непараметричного U-критерію Манна-Уїтні. Зміни маси згодом аналізуються методом одностороннього дисперсійного аналізу. Значущим вважається  $P < 0,05$ . Для всіх аналізів використовується статистичне програмне забезпечення SPSS (SPSS Inc., Чикаго, США).

#### Результати

IL-18BP захищає від втрати маси на мишачій моделі коліту

Для того, щоб дослідити роль IL-18 при експериментальному коліті, і зокрема, захисну дію IL-18-зв'язуючого білка (IL-18BP), у мишей BALB/c індукували TNBS-коліт. Дана модель включає в себе локальний вплив тринітробензолсульфонові кислоти (TNBS) в 40% етанолі. Вона викликає гіперчутливу реакцію уповільненого типу на гаптен (тринітрофеніл)-модифікований аутоантиген, і реакція є реакцією типу Th1 з посиленням продукування прозапальних цитокінів.

Мишей щодня обробляли інтраперітонеально (ip) IL-18BP людини або контролем.

Щоденні інтраперітонеальні дози в інтервалі від 12,5 мкг до 50 мкг hIL-18BP не впливали на важкість захворювання (дані не приводяться). Однак використання дози в 200 мкг hIL-18BP, що вводиться інтраперітонеально щодня, було ефективним для зменшення втрати маси в зв'язку з індукцією захворювання.

Як і очікувалося, інтраректальна інстиляція TNBS приводить до діареї і виснаження. Як видно на Фіг. 16, тварини в обох оброблених групах втрачали 15% від вихідної маси на день 3. Однак на відміну від контрольних мишей, починаючи з 4 дня після інстиляції TNBS, тварини, оброблені hIL-18BP, швидко відновлювали початкову втрату маси, повертаючись до вихідної маси тіла на день 8. У контрольних мишей друге введення TNBS в день 8 знов приводить до значної втрати маси, яка по суті запобігається введенням hIL-18BP. Введення hIL-18BP мишам, обробленим фізіологічним розчином, ефекту не має (дані не приводяться). Отже, введення hIL-18BP істотно ослабляло втрату маси, пов'язану з колітом, індукованим TNBS ( $p < 0,05$ ).

#### Дія на параметри запалення

На 10 день мишей умертвляли, і визначали масу останніх 6 см ободової кишки (Фіг. 11A). При TNBS-коліті маса ободової кишки зростала в порівнянні з масою ободової кишки у мишей, оброблених фізіологічним розчином. Таке зростання маси істотно менше у мишей, оброблених hIL-18BP ( $181,6 \text{ мг} \pm 11,4$  в порівнянні з  $268 \text{ мг} \pm 27,3$  у ми-

шей, оброблених фізіологічним розчином ( $p < 0,05$ ). Раніше повідомлялося, що TNBS-коліт асоціюється з підвищеною міграцією клітин в каудальні лімфовузли (Camoglio et al., 2000). Обробка IL-18BP знижувала число клітин, проникаючих в каудальний лімфовузол у порівнянні з числом клітин в каудальному лімфовузлі TNBS-мишей (мишей з TNBS-колітом), оброблених фізіологічним розчином (Фіг. 17B).

Зміни експресії CD69, що є раннім маркером активації Т-лімфоцитів, визначали аналізом Facscan (Фіг. 17C). Процент клітин селезінки  $\text{CD4}^+$ , експресуючих CD69, у мишей, оброблених TNBS, становив 11,4%, але у TNBS-мишей, оброблених hIL-18BP, процент  $\text{CD4}^+/\text{CD69}^+$  становив 7,3% ( $P < 0,05$ ).

Продуктування цитокінів селезінкою, каудальними лімфовузлами і гомогенатами ободової кишки

Для того, щоб дослідити дію hIL-18BP на здатність Т-лімфоцитів здійснювати синтез прозапальних цитокінів після активації Т-клітинного рецептора, виділяли клітини з каудального лімфовузла і селезінки і стимулювали їх протягом 48 годин антитілами проти CD3/CD28. У супернатантах вимірювали продуктування  $\text{IFN}\gamma$  і  $\text{TNF}\alpha$  (Фігура 18). Не спостерігали суттєвих відмінностей між продукуванням цитокінів у мишей, оброблених hIL-18BP, і контрольних мишей. Отже, нейтралізація IL-18 hIL-18BP не спричиняє загального зниження здатності Т-лімфоцитів реагувати на активацію Т-клітинного рецептора.

Аналізували гомогенати ободової кишки на вміст в них цитокінів, визначаючи локальну продукцію цитокінів (Фіг. 19). Не виявили відмінностей в рівнях  $\text{IFN}\gamma$  в гомогенатах ободової кишки TNBS-мишей і TNBS-мишей, оброблених hIL-18BP ( $134 \text{ пг/мл} \pm 7,8$  і  $139 \text{ пг/мл} \pm 23$ , відповідно). Однак рівні  $\text{TNF}\alpha$  в гомогенатах ободової кишки мишей, оброблених hIL-18BP, істотно знижувалися - від  $110 \text{ пг/мл} \pm 3$  у TNBS-мишей до  $59 \text{ пг/мл} \pm 2,1$  у TNBS-мишей, оброблених hIL-18BP.

#### Гістологічні результати

Для того, щоб дослідити, чи впливало зниження параметрів запалення, опосередковане hIL-18BP, також і на гістологічні показники, виконували гістопатологічний аналіз на парафінованих зрізах. Загальна оцінка запалення при гістології значно знижується для мишей, оброблених hIL-18BP, в порівнянні з оцінкою контрольних мишей ( $15,9 \pm 1,1$  у необроблених мишей до  $9,8 \pm 1,3$  у мишей, оброблених hIL-18BP), головним чином, внаслідок зниження числа лейкоцитів, інфільтруючих слизову оболонку ( $p < 0,05$ ). Помітним результатом є повна відсутність укривання виразками слизової оболонки у мишей, оброблених hIL-18BP ( $p < 0,05$ ). Результати зведені в табл. 2, приведену нижче. Помітне майже повне запобігання укривання виразками у мишей, оброблених hIL-18BP.

Таблиця 2

Різні показники зони коліту у TNBS-мишей, оброблених фізіологічним розчином або hIL-18BP

	TNBS-миші, оброблені фізіол. розчином	TNBS-миші, оброблені ML-18BP
Ураж. площа, %	3,4±0,4	3,2±0,5
Фолікулярні агрегати	2,0±0,4	1,5±0,4
Набряк	2,1±0,3	1,3±0,3
Фіброз	0,85±0,26	0,50±0,2
Укривання виразками	2,0±0,3	0,0±0,0*
Втрата крипти	1,7±0,3	1,0±0,3*
Поліморфноядерні клітини	2,6±0,2	1,3±0,2*
Одноядерні клітини	1,1±0,1	0,33±0,21*

Дані приводяться як середнє + SEM за шкалою 0-4,

\* представляв значущу відмінність

Поліклональні антитіла проти mIL-18 захищали від захворювання на мишачій моделі коліту, що індукується декстрансульфатом натрію

У даній моделі давали іd декстрансульфат натрію (DSS) в питній воді, починаючи з дня 0 до дня умертвіння тварин. Поліклональні антитіла проти IL-18BP вводили і.р. в дні 0, 4 і 8. Дози становили 200 і 400 мкл кролячої сироватки. Найвища доза (400 мкл) давала значне зниження втрати маси, клінічного показника, ректальної кровотечі і укорочення ободової кишки (не показано). Обробка кролячими анти-mIL-18-антитілами приводила до сповільнення ініціювання захворювання і запобігала його розвитку (не показано).

#### Резюме

Приклад 12, представлений вище, демонструє, що нейтралізація IL-18 шляхом введення або hIL-18BP або поліклональної антисироватки проти IL-18 ефективно знижує важкість викликаного експериментально коліту у мишей.

Миші, що обробляються щодня hIL-18BP, інтраперітонеально, швидко відновлювалися після первинної втрати ваги в порівнянні з контрольними мишами. Інші параметри запалення ободової кишки, виміряні за масою ободової кишки і припливом клітин в каудальний лімфовузол, у мишей, оброблених hIL-18BP, знижувалися. Гістопатологія оброблених мишей характеризувалася зменшенням важкості руйнування тканини (укривання виразками), і значно знижувалася кількість інфільтруючих клітин. Дія hIL-18BP також була системною, що демонструється зниженою експресією CD69 клітинами селезінки.

Локальне продукування  $TNF\alpha$ , виміряне в гомогенатах ободової кишки, істотно падало у TNBS-мишей, оброблених hIL-18BP. Ця обставина показує, що  $TNF\alpha$  грає важливу роль в розвитку хвороби. Рівні  $IFN\gamma$  у TNBS-мишей і TNBS-мишей, оброблених hIL-18BP, порівнюються, що можна пояснити надмірністю  $IFN\gamma$ -індукуючих стимулів.

У результаті дані, представлені вище, демонструють сприятливу дію інгібіторів IL-18 при лікуванні запальних захворювань кишечника.

#### Посилання

1. Afford, S.C., et al., Distinct patterns of chemokine expression are associated with leukocyte recruitment

in alcoholic hepatitis and alcoholic cirrhosis. *J Pathol*, 1998. 186(1): p. 82-9.

2. Anderson, D.M., et al., A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 1997. 390(6656): p. 175-179.

3. Baroni, G.S., et al., Hepatic stellate cell activation and liver fibrosis are associated with necroinflammatory injury and Th1-like response in chronic hepatitis C. *Liver*, 1999.19(3): p. 212-9.

4. Bird, G.L., et al., Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. *Ann Intern Med*, 1990.112(12): p. 917-20.

5. Bollon, D. P., et al. (1980) *J. Clin. Hematol. Oncol.* 10:39-48.

6. Botstein, D., et al. (1982) *Miami Wint. Symp.* 19:265-274.

7. Broach, J. R., in *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 445-470(1981).

8. Broach, J. R., (1982) *Cell* 28:203-204.

9. Byrn R. A. et al., 1990, *Nature (London)* 344:667-670.

10. Camoglio L, te Vekie AA, de Boer A, ten Kate FJ, Kopf M, van Deventer S.J. Hapten-induced colitis associated with maintained Th1 and inflammatory responses in iFN-gamma receptor-deficient mice. *Eur J Immunol* 2000;30:1486-95.

11. Car, B. D., V. M. Eng, B. Schnyder, L. Ozmen, S. Huang, P. Gallay, D. Heumann, M. Aguet, and B. Ryffel. 1994. Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. *J. Exp. Med.* 179:1437-44 issn: 0022-1007.

12. Chater, K. F. et al., "in Sixth International Symposium on Actinotrycetales Biology", Akademiai Kiado, Budapest. Hungary (1986), pp. 45-54.

13. Conti, B., J. W. Jahng, C Tinti, J. H. Son, and T. H. Joh. 1997. Induction of interferon-gamma inducing factor in the adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* 272:2035-2037.

14. Dao, T., K. Ohashi, T. Kayano, M. Kurimoto, and H. Okamura. 1996. Interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells. *Cell-Immunol.* 173:230-5 issn: 0008-8749.

15. Dayer, J-M (1999). *J. Clin. Inv.* 104,1337-1339.
16. Desreumaux P, Brandt E, Gambiez L, Emiie D, Geboes K, Klein O, Ectors N, Cortoi A, Capron M, Colombel JF. Distinct cytokine patterns in early and chronic iieal lesions of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997;113:118-126.
17. DiDonato, JA, Hayakawa, M, Rothwarf, DM, Zandi, E and Karin, M. (1997), *Nature* 388,16514-16517.
18. Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Chartes, P., Bijl, FL, and Woody, J.N., 1994, *Lancet* 344,1125-1127.
19. Engelmann, FL, D. Aderka, M. Rubinstein, D. Rotman, and D. Wallach. 1989. A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxidity. *J. Biol. Chem.* 264:11974-11980.
20. Engelmann, FL, D. Novick, and D. Wallach. 1990. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. *J. Biol. Chem.* 265:1531-1536.
21. Fantuzzi, G., et al., IL-18 regulation of IFN- $\gamma$  production and cell proliferation as revealed in interieukin-1b converting enzyme-deficient mice. *Blood*, 1998. 91: p. 2118-2125.
22. Fiore, G., et al., Liver tissue expression of CD80 and CD95 antigens in chronic hepatitis 3: relationship with biological and histological disease activities. *Microbios*, 1999. 97(386): p. 29-38.
23. Galle, P.R., et al., Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor andligand in liver damage. *J Exp Med*, 1995.182(5): p. 1223-30.
24. Grade, AJ, Forsey, RJ, Chan, WL, Gilmour, A, Leung, BP, Greer, AR, Kennedy, K, Carter, R, Wei, X-Q, Xu, D., Field, M, Foulis, A, Liew, FY, and McInnes, IB.(1999). *J. Clin. Inv.* 104:1393-1401.
25. Grantham (1974), *Science*, 185. 862-864.
26. Grove, J., et al., Association of a rumor necrosis factor promoter polymorphism with susceptibility to alcoholic steatohepatitis [see comments]. *Hepatology*, 1997. 26(1): p. 143-6.
27. Gryczan, T., "The Molecular Biology of the Bacilli", Academic Press, NY (1982), pp. 307-329.
28. Gutkind, J.S., et al., A novel c-fgrexon utilized in Epstein-Barr virus-infected B lymphocytes but not in normal monocytes. *Molec. Cell. Biol.*,. 1991. 11: p. 1500-1507.
29. Harada, K., et al., In situ nucleic acid hybridization of cytokines in primary biliary cirrhosis: predominance of the Th1 subset. *Hepatology*, 1997. 25(4): p. 791-6.
30. Heremans, H., J. Van Damme, C Dillen, R. Dijkmans, and A- Billiau. 1990. Interferon gamma, a mediator of lethal lipopolysaccharide-induced Shwartzman-like shock reactions in mice. *J. Exp. Med.* 171:1853-69 issn: 0022-1007.
31. Hill, D.B., et al., Increased plasma interieukin-6 concentrations in alcoholic hepatitis. *J Lab Clin Med*, 1992,119(5): p. 547-52.
32. Hill, D.B., LS. Marsano, and *Hepatology*, 1993.18: p. 576-580.
33. Hiramatsu, N., et al., Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C *Hepatology*, 1994. 19(6): p. 1354-9.
34. Huang, Y.S., et al., Serum levels of interleukin-8 in alcoholic liver disease: relationship with disease stage, biochemical parameters and survival. *J Hepatol*, 1996. 24(4): p. 377-84.
35. Iio, S., et al., Serum levels of soluble Fas antigen in chronic hepatitis 3 patients. *J Hepatol*, 1998. 29(4): p. 517-23.
36. Izaki, K. (1978) *Jpn. J. Bacteriol.* 33:729-742.
37. John, J. F., etal. (1986) *Rev. Infect. Dis.* 8:693-704.
38. Kahiwamura, S., Okamura, H. (1998), *Nippon. Rinsho.* 56, pp. 1798-1606.
39. Kendall, K. J. et. al. (1987) *J. Bacteriol.* 169:4177-4183.
40. Kirn 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 USA* 2000;97:1190-1195.
41. Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scalion 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.
42. Kohno, K., J. Kataoka, T. Ohtsuki, Y. Suemoto, I. Okamoto, M. Usui, M. Ikeda, and M. Kurimoto. 1997. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J. Immunol.* 158:1541-1550.
43. Lee, M., et al., Expression of Th1 and Th2 typecytokines responding to HBsAg and HBxAg in chronic hepatitis B patients. *J Korean Med Sci*, 1999. 14(2): p. 175-81.
44. Lukkari, TA, et al., Short-term ethanol exposure increases the expression o Kupffer cell CD14 receptor and lipopolysaccharide binding protein in rat liver. *Alcohol Alcohol*, 1999. 34(3): p. 311-9.
45. Luo, K.X., et al., In situ investigation of Fas/FasL expression in chronic hepatitis B infection and related liver diseases. *J Viral Hepat*, 1997.4(5): p. 303-7.
46. Maliszewski, C. R., T. A. Sato, T.Vanden Bos, S. Waugh, S. K. Dower, J. Stack, M. P. Beckmann, and K. H. Grabstein. 1990. Cytokine receptors and B cell functions. I. Recombinant soluble receptors specifically inhibit IL-1- and IL-4-induced B cell activities in vitro. *J. Immunol.* 144:3028-3033.
47. Maniatis, T., "in *Cell Biology: A Comprehensive Treatise*, Vol. 3: Gene Expression", Academic Press, NY, pp. 563-608 (1980).
48. Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
49. Martinez, F., et al., Ethanol and cytokine secretion. *Alcohol*, 1992. 9(6): p. 455-8.
50. McClain, C.J., et al., Tumor necrosis factor and alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*, 1998. 22(5 Suppl): p. 248S-252S.
51. McClain, C.J. and D.A. Cohen, Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatology*, 1989. 9(3): p. 349-51.
52. Micallef, M. J., T. Ohtsuki, K. Kohno, F. Tanabe, S. Ushio, M. Namba, T. Tanimoto, K. Torigoe, M. Fujii, M. Ikeda, S. Fukuda, and M. Kurimoto. 1996. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper

1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol* 26:1647-51 issn: 0014-2980.

53. Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acid Res.* 18:5322-5328.

54. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, Luzza F, Fusco A, Pallone F. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* 1999;163:143-147.

55. Muhl H, Kampfer H, Bosmann M, Frank S, Radeke H, Pfeilschifter J. Interferon-gamma mediates gene expression of IL-18 binding protein in nonleukocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:960-963.

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

57. Nanji, A.A., et al., Activation of nuclear factor  $\kappa$ B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology*, 1999. 30(4): p. 934-43.

58. Nishimura, T. and A. Ohta, A critical role for antigen-specific Th1 cells in acute liver injury in mice. *J. Immunol*, 1999.162: p. 6503-6509.

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

60. Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein. 1992. Soluble Interferon-alpha Receptor Molecules Are Present in Body Fluids. *FEBS Lett* 314:445-448.

61. Novick, D., H. Engelmann, D. Wallach, and M. Rubinstein. 1989. Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J. Exp. Med.* 170:1409-1414.

62. Novick, D, Kirn, S-H, Fantuzzi, G, Reznikov, L, Dinarello, C, and Rubinstein, M (1999). *Immunity* 10, 127-136.

63. Ohlinger, W., et al., Immunohistochemical detection of tumor necrosis factor- $\alpha$ , other cytokines and adhesion molecules in human livers with alcoholic hepatitis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1993.423(3): p. 169-76.

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

65. Okamoto, T., et al., Induction of Fas ligand and Fas antigen mRNA expressions in interferon- $\gamma$  transgenic mouse liver. *Jpn J Pharmacol*, 1998. 78(2): p. 233-5.

66. Okazaki, M., et al., Hepatic Fas antigen expression before and after interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci*, 1996.41(12): p. 2453-8.

67. Okamoto, T., K. Yamamura, and O. Hino, The mouse interferon- $\gamma$  transgene chronic hepatitis model (Review). *Int J Mol Med*, 1999. 3(5): p. 517-20.

68. Olee T, Hashimoto S, Quach J, Lotz M. (1999). *J Immunol* 162:2 1096-100.

69. Pamet, P, Garka, KE, Bonnert, TP, Dower, SK, and Sims, JE. (1996), *J. Biol. Chem.* 271,3967-3970.

70. Plater-Zyberk C, Bonnefoy JY. Marked amelioration of established collagen-induced arthritis by treatment with antibodies to CD23 *In vivo*. *Nat Med* 1995;1:781-785.

71. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadharn J, Smith MF, Jr., Foley E, Moskaluk CA, Bickston SJ, Corninelli F. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 1999; 162:6829-6835.

72. Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Baumann R, Poindron P, Dudos B. Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Clin Immunol* 1996;16:144-150.

73. Rotne, H.f N. A. Jenkins, N. G. Copeland, and H. Kolb. 1997. Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGF, which is located near Idd2. *J-Clin-Inves.t* 99:469-74 issn: 0021-9738.

74. Saha N, Moldovan F, Tardif G, Pelletier JP, Cloutier JM, Martel-Pelletier J.(1999). *Arthritis Rheum* 42:8 1577-87.

75. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and M. T., *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. ed. 1989, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

76. Simonet, W.S., et al., Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997. 89(2): p. 309-319.

77. Sheron, N., et al., Elevated plasma interleukin-6 and increased severity and mortality in alcoholic hepatitis. *Clin Exp Immunol*, 1991. 84(3): p. 449-53.

78. Sompayrac, L.H. and K.L. Danna, Efficient infection of monkey cells with DNA of simian virus 40. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 1981. 78: p. 7575-7578.

79. Sparks, C.A., et al., Assignment of the nuclear mitotic apparatus protein NuMA gene to human chromosome 11q13. *Genomics*, 1993.17: p. 222-224.

80. Su, G.L., et al., CD 14 and lipopolysaccharide binding protein expression in a rat model of alcoholic liver disease. *Am J Pathol*, 1998.152(3): p. 841-9.

81. Taieb, J., et al., Raised plasma soluble Fas and Fas-ligand in alcoholic liver disease [letter]. *Lancet*, 1998. 351(9120): p. 1930-1.

82. Triantaphylliopoulos, K A, Williams, R, Tailor, H, and Chernakovsky, Y (1999). *Arthritis and Rheumatism* 42,90-99.

83. Tsutsui, H., K. Nakanishi, K. Matsui, K. Higashino, H. Okamura, Y. Miyazawa, and K. Kaneda. 1996. IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J. Immunol.* 157:3967-73 issn: 0022-1767.

84. Tsuij, H., Mukaida, N., Harada A., Kaneko, S., Matsushita, E., Nakanuma, Y., Tsutsui, H., Okamura, H., Nakanishi, K., Tagawa, Y, Iwakura, Y., Kobayashi, K., and Matsushima, K.(1999), *J. Immunol.* 162, pp. 1049-1055.

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

86. Ushio, S., M. Namba, T. Okura, K. Hattori, Y. Nukada, K. Akita, F. Tanabe, K. Konishi, M. Micallef,

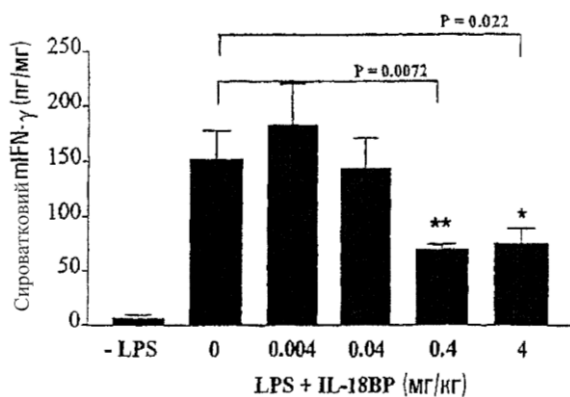
M. Fujii, K. Torigoe, T. Tanimoto, S. Fukuda, M. Ikeda, H. Okamura, and M. Kurimoto. 1996. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J. Immunol.* 156:4274-4279.34. Okayama, H. and Berg, P. (1983) A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 3:280-289.

87. Williams RO, Mason LJ, Feldmann M, Maini RN. Synergy between antiFCD4 and anti-tumor necrosis

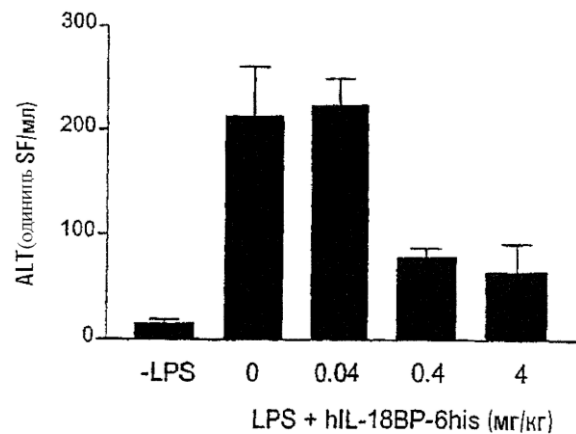
factor in the amelioration of established collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci US A* 1994 Mar 29 91:7 2762-6.

88. Yasuda, H., et al., Identity of osteodastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteodastogenesis in vitro. *Endocrinology*, 1998.139: p. 1329-1337.

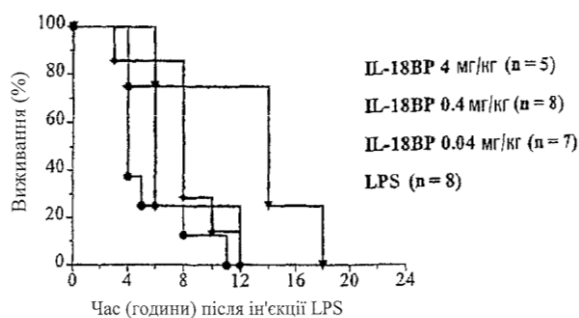
89. Yoshimoto T, Takeda, K, Tanaka, T, Ohkusu, K, Kashiwamura, S, Okamura, H, Akira, S and Nakanishi, K (1998), *J. Immunol.* 161, 3400-3407.



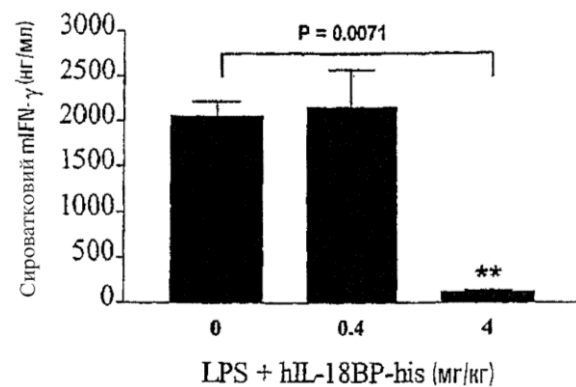
Фиг. 1



Фиг. 2

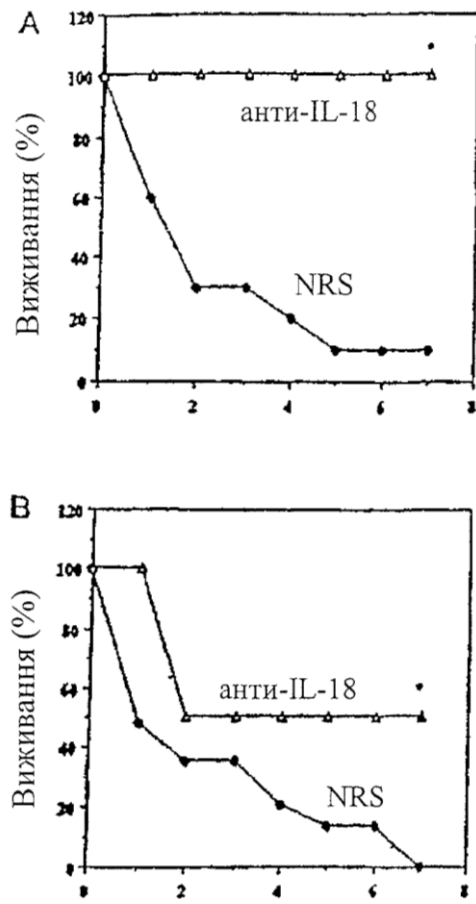


Фиг. 3

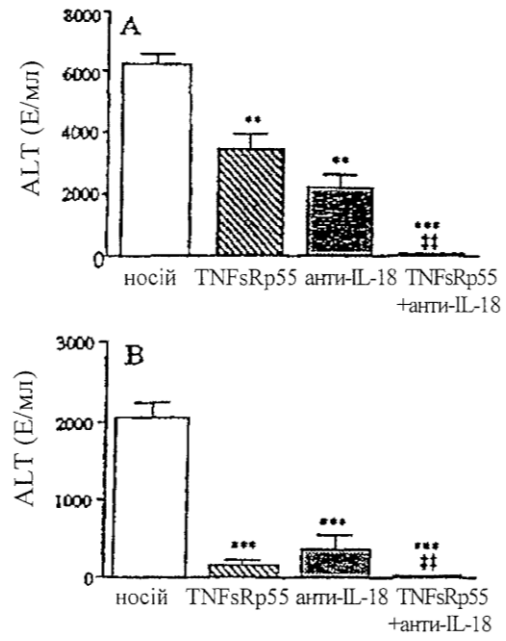


Фиг. 4



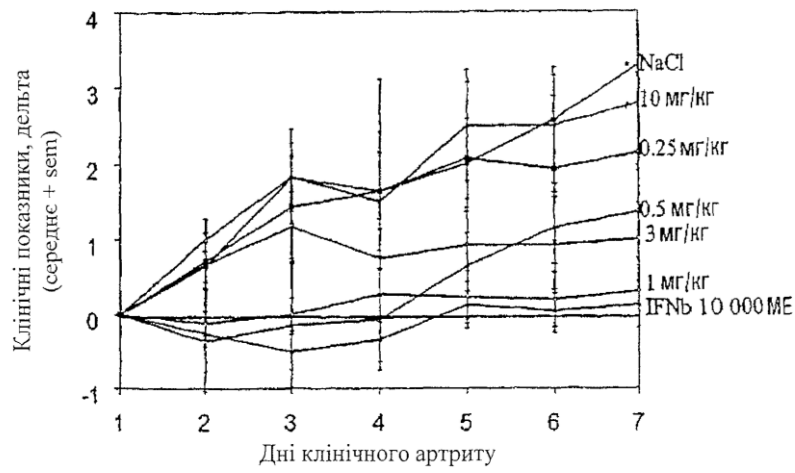


Фіг. 5

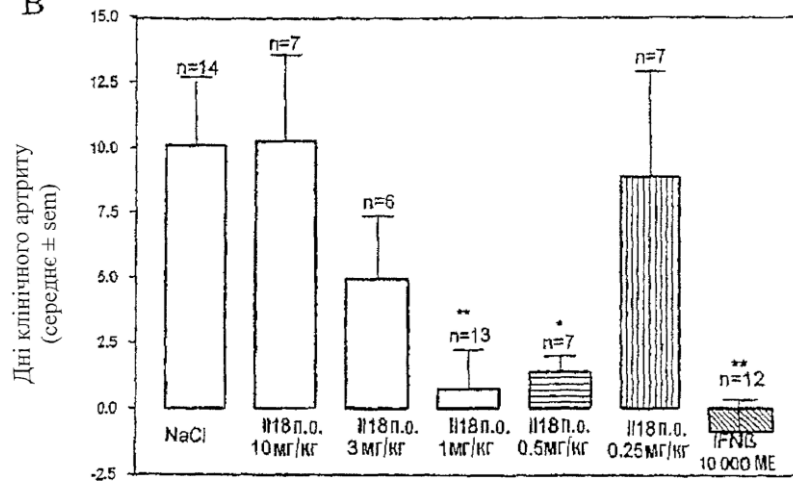


Фіг. 6

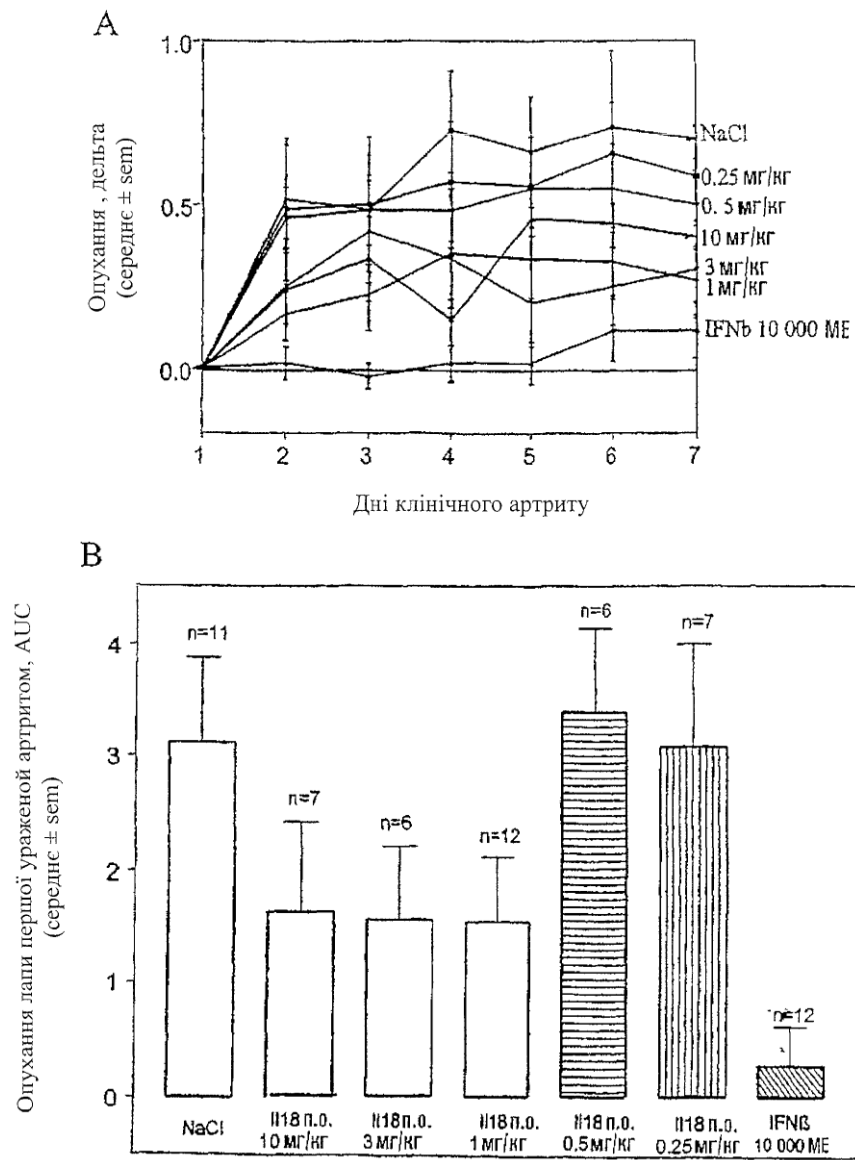
A



B

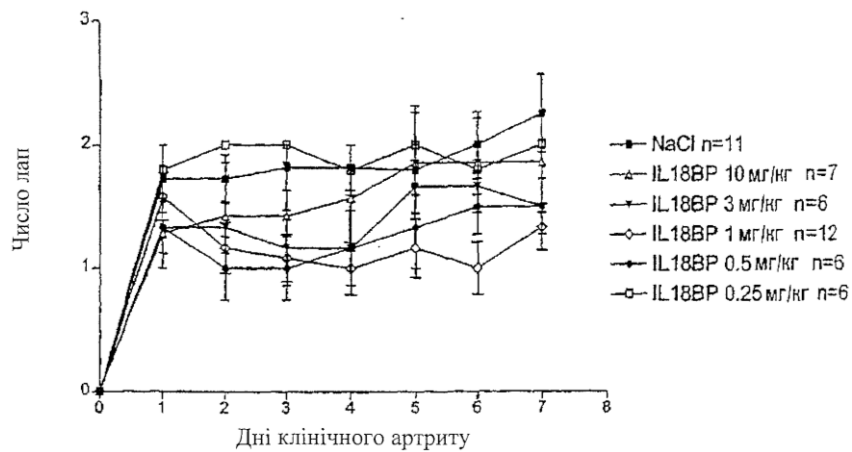


Фіг. 7



Фіг. 8

Фіг. 9



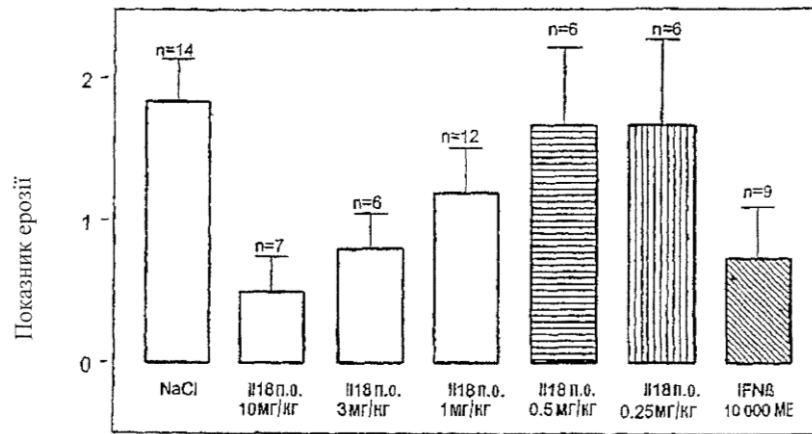


Fig. 10

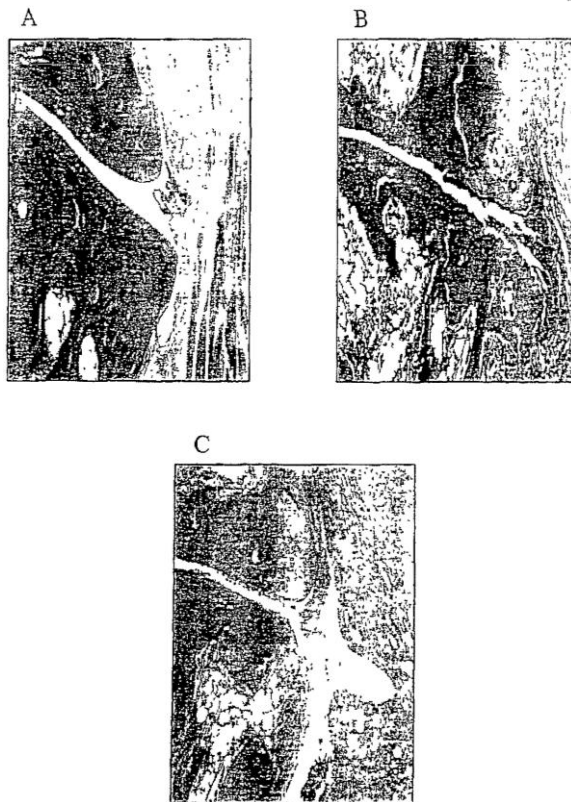


Fig. 11

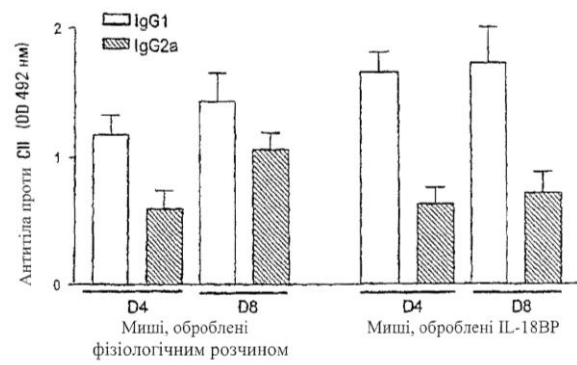
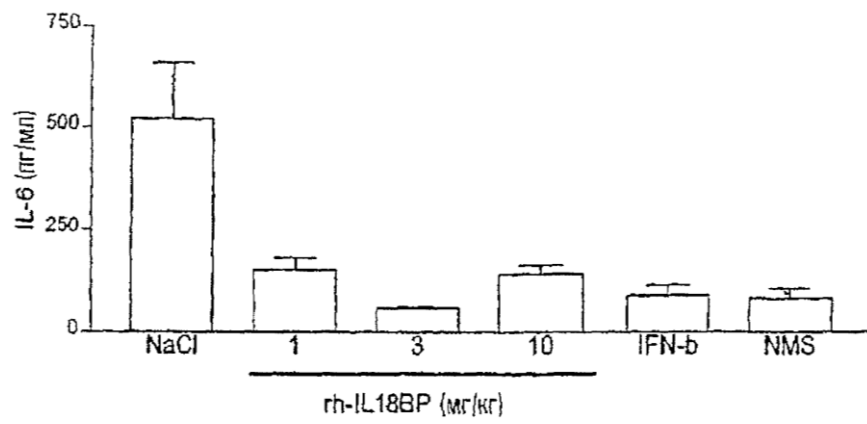
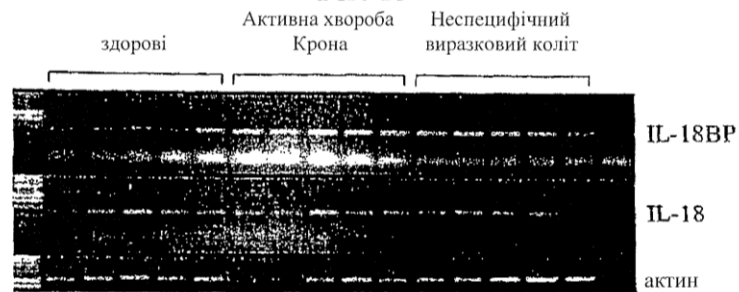


Fig. 12

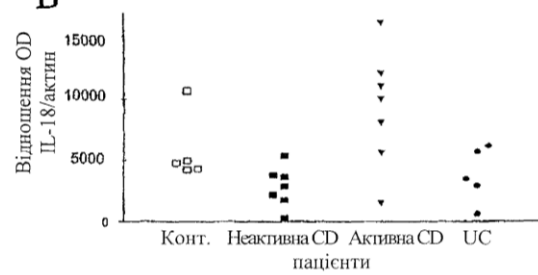


Фіг. 13

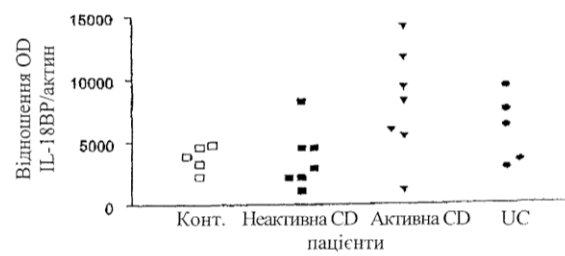
A



B

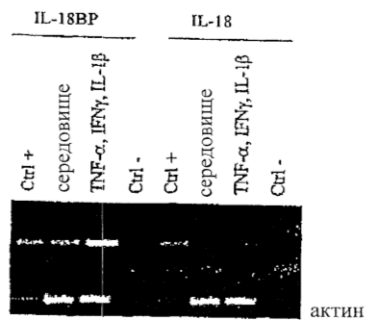


C



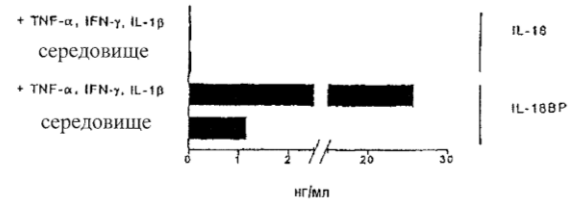
Фіг. 14

A



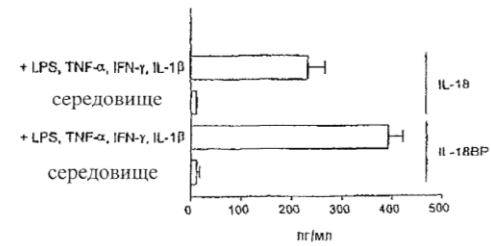
B

Ендотеліальні клітини NUVEC

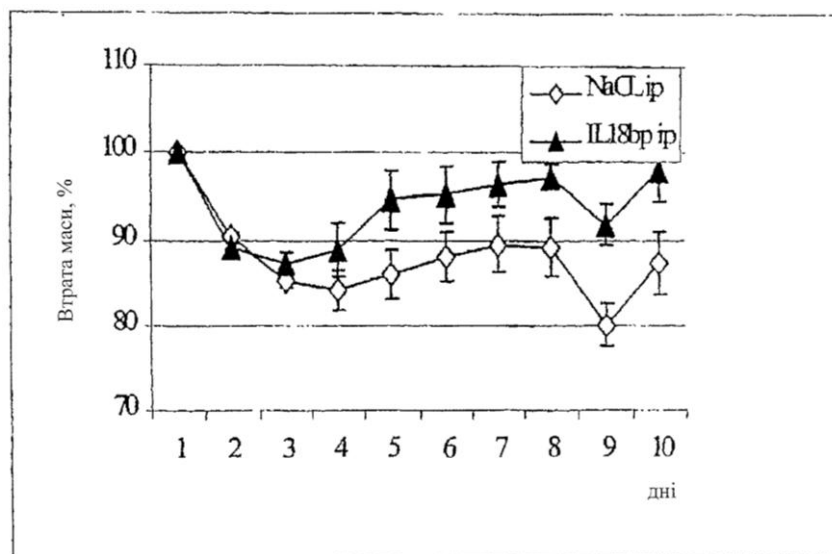


C

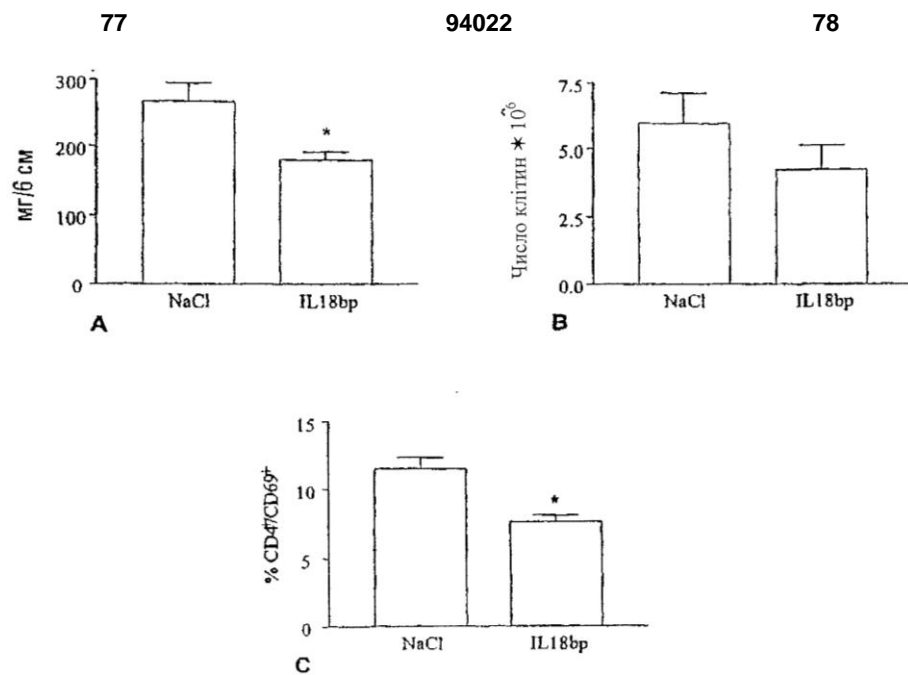
Клітинна лінія макрофагів THP1



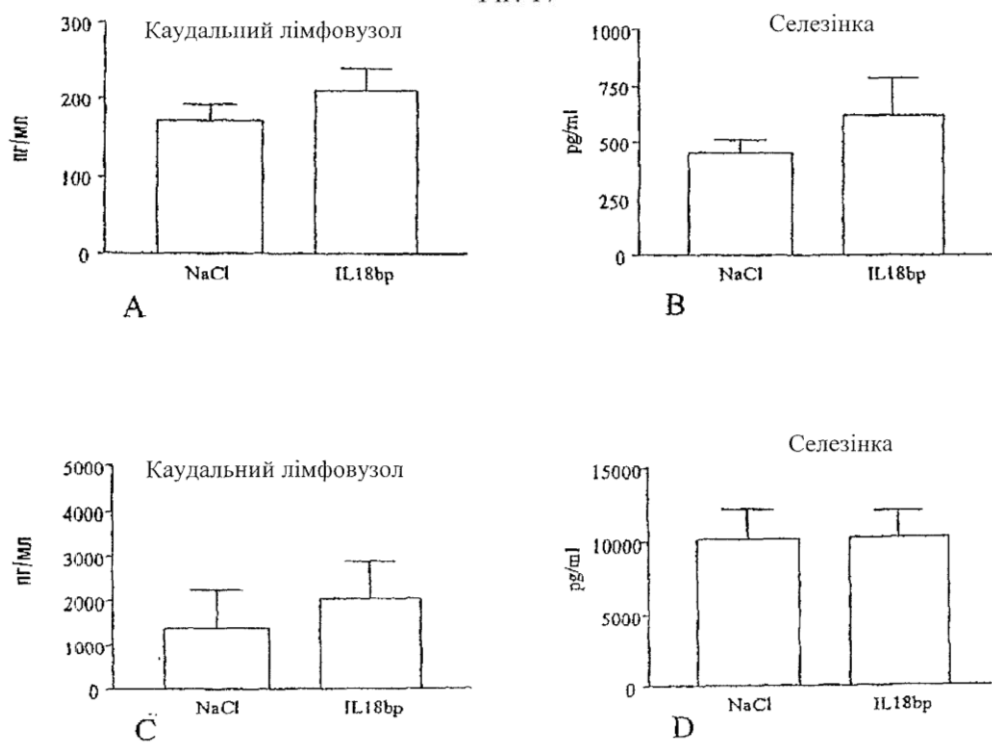
Фиг. 15



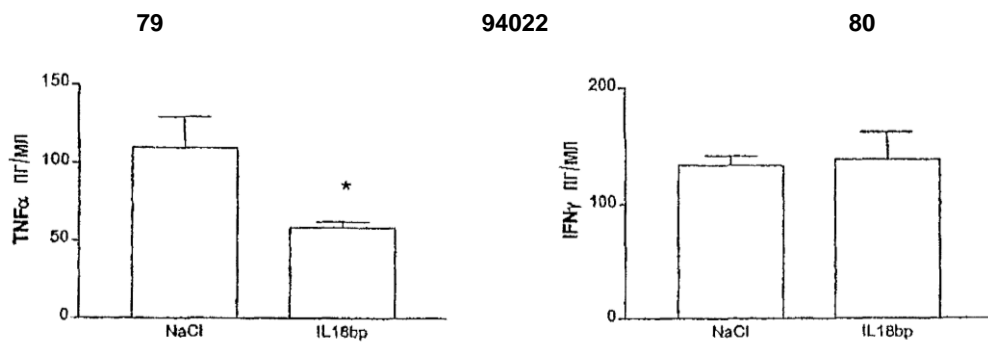
Фиг. 16



Фіг. 17



Фіг. 18



Фиг. 19

В описі до патенту на винахід графічні зображення та текст подаються в редакції заявника

Комп'ютерна верстка О. Гапоненко

Підписне

Тираж 23 прим.

Міністерство освіти і науки України

Державний департамент інтелектуальної власності, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601