



УКРАЇНА

(19) UA (11) 76695 (13) C2  
(51) МПК (2006)  
A61K 38/20  
A61P 25/16 (2006.01)  
A61P 25/28 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ХИМЕРА IL6RIL6 ДЛЯ ЛІКУВАННЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

1

2

(21) 2002010458  
(22) 21.06.2000  
(24) 15.09.2006  
(86) PCT/IL00/00363, 21.06.2000  
(31) 130586  
(32) 21.06.1999  
(33) IL  
(46) 05.09.2006, Бюл. №9, 2006р.  
(72) Ревел Мічел, ІЛ, Чебат Юдіт, ІЛ, Піцці Маріна,  
ІТ, Спано П'єрфранко, ІТ, Бошерт Урсула, СН  
(73) ЙЄДА РІСЕРЧ ЕНД ДІВЕЛОПМЕНТ КО. ЛТД.,  
ІЛ, АППЛАЙД РЕЗЕЧ СІСТЕМЗ АРС ХОЛДІНГ Н.В.,  
NL

(56) WO 99/02552 21.01.1999  
(57) 1. Застосування химери IL6RIL6 для виробництва лікарського засобу для лікування травматичної дегенерації нервів, демієлінізуючих захворювань ЦНС або ПНС і/або нейродегенеративних захворювань.  
2. Застосування за п.1, де демієлінізуючим захворюванням є розсіяний склероз (РС).  
3. Застосування за п.1, де нейродегенеративне захворювання вибрано з хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона і аміотрофічного бічного склерозу (БАС).

Даний винахід загалом відноситься до області неврологічних хвороб і розладів. Зокрема винахід відноситься до нейродегенеративних захворювань, нейропротекції, мієлінізації нервів і утворенню клітин, які продукують мієлінову оболонку. Більш конкретно, даний винахід передбачає застосування химер IL6RIL6 для виробництва лікарською препаратом для лікування неврологічних хвороб і розладів, особливо для нейропротекції і для лікування демієлінізуючих хвороб і посилення регенерації нервів.

Мієлінізація нервів є найважливішим процесом в формуванні і функціонуванні відділів центральної нервової системи (ЦНС) і периферичної нервової системи (ПНС). Мієлінова оболонка, що оточує аксон, необхідна для правильного проведення електричних імпульсів по нервах. Втрата мієліну походить при ряді захворювань, серед яких неуважний склероз (НС), що впливає на ЦНС синдром Гійєна-Барре, хронічна запальна демієлінізуюча полінейропатія (ХЗДН) і інші захворювання [дивись Abramsky and Ovadia, 1997; Trojaborg, 1998, Hartung et al., 1998]. Незважаючи на різні етіологічні причини, такі як інфекційні патогени або аутоімунні атаки, всі демієлінізуючі захворювання викликають втрату неврологічних функцій і можуть привести до паралічу і смерті. Хоч терапевтичні засоби, що є в цей час знижують запальні атаки

при НС і сповільнюють розвиток хвороби, існує необхідність в розробці терапії, яка може приводити до ремієлінізації і відновленню неврологічних функцій [Abramsky and Ovadia, 1997, Pohlau et al., 1998].

Синтез мієліну є функцією спеціалізованих гліальних клітин: олігодендроцитів в ЦНС і мієлінізуючих шванновських клітин в ПНС. Вказані два типи клітин в їх повністю диференційованому стані можна назвати мієлінізуючими клітинами. Мієлін являє собою ліпідну мембранну структуру, що містить ряд різних білків. Основні білки мієліну (МБР) представляють головні компоненти (30%) білків мієліну ЦНС, а також ПНС. Експресія генів МБР і інших генів, що кодують різні білки мієліну – (наприклад, PO, PMP-22, MAG в ПНС, PLP, MOG в ЦНС), включається під час термінального диференціювання олігодендроцитів і мієлінізуючих шванновських клітин. Джерелом походження цих клітин є ембріональний нервовий гребінець (Fraser, 1991), з якого вони мігрують і зазнають диференціювання, яке протікає в декілька стадій. У розвиток шванновських клітин (SC), мабуть, залучено три основних стадії: 1) утворення попередників (pSC) з мігруючих клітин; 2) проліферація і перетворення в ембріональні SC (eSC), експресуючі білок S100; 3) постнатальне термінальне диференціювання частини популяції eSC в мієлінізуючі

(19) UA (11) 76695 (13) C2

SC, які експресують МБР і інші білки мієліну [Kioussi and Gruss, 1996]. Клітини, мігруючи з нервового гребінця, дають початок не тільки pSC, але також сенсорним і симпатичним нейронам, клітинам гладкої мускулатури і клітинам, які досягають шкіри і волоссяних фолікулів і стають пігментованими меланоцитами. На долю клітин нервового гребінця впливають різні індукуючі фактори: диференціювання в гліальні клітини, в нейрони і м'язи активується неурегулінами, такими як гліальний фактор росту (GGF), BMP2/4 і TGF- $\beta$ , відповідно [Andersen, 1997]. Диференціювання в меланоцити може активуватися факторами росту, такими як bFGF або PDGF або SDF [Stocker et al., 1991; Anderson, 1997].

Завершальне диференціювання попередників шванновських клітин і олігодендроцитів в активно мієлінізуючі клітини і сама мієлінізація, мабуть, залежать від сигналів, що генеруються при взаємодії між аксонами нейронів і гліальними клітинами [Lemke and Chao, 1988; Trapp et al., 1988]. Коли уривається контакт між аксоном і шванновськими клітинами, як, наприклад, після пошкодження нерва, клітини повертаються в немієлінізуючий стан, і експресія генів білків мієліну втрачається [Jessen and Mirsky, 1991]. Щоб зуміти стимулювати мієлінізацію або ремієлінізацію після нервового захворювання або травми, надзвичайно важливо ідентифікувати фактори, які здатні індукувати синтез мієліну.

Пошкодження ЦНС, індуковане гострими інсультами, включаючи травму, гіпоксію і ішемію, може впливати як на нейрони, так і на білу речовину. Хоч найбільша увага приділялася процесам, що приводять до загибелі нейронів, зростаючи кількість даних свідчить про те, що пошкодження олігодендроцитів, які мієлінізують аксони, також є характерною складовою пошкодження ЦНС. Так, патологія олігодендроцитів була продемонстрована в дуже ранній фазі після ішемії головного мозку (3 години) у пацюків, свідчаючи про те, що ці клітини навіть більш вразливі до екситотоксичних подій, чим нейронні клітини [Pantoni et al. 1996]. Одним з потенційних кандидатів, що опосередковують загибель клітин, є помітне підвищення концентрації глутамату, яке супроводжує багато які гострі пошкодження ЦНС [Lipton et al. 1994]. Дійсно, виявили, що навіть крім нейронів олігодендроцити експресують функціональні рецептори глутамату, що відносяться до підтипу AMPA/каїнату. Крім того, олігодендроцити виявляють високу вразливість до застосування глутамату [McDonald et al. 1998].

Неурегуліни, такі як GGF, які діють на ембріональні попередники шванновських клітин, також є факторами виживання, росту і дозрівання постнатальних олігодендроцитів і шванновських клітин в пошкоджених нервах, і GGF є одним з мітогенних факторів, що надаються контактом аксона [Torlisco et al., 1996]. Рекombінантний hGGF2 може посилювати ремієлінізацію при тривалому введенні в моделі неухважного склерозу у мишей [Cannella et al., 1998] або в роздробленому периферичному нерві [Chen et al. 1998]. Іншим цитокином, який індукується в шванновських клітинах контактом аксона, є циліарний нейротрофічний фактор CNTF [Lee et al., 1995]. Було показано, що CNTF, а також фак-

тор, що інгібує лейкемію (LIF), стимулюють виживаність олігодендроцитів оптичного нерва, що культивуються *in vitro* з bFGF або PDGF, і збільшують кількість олігодендроцитів, які експресують МБР, в цих культурах [Mayer et al., 1994]. Однак при додаванні до гліальних клітин-попередників CNTF і LIF, мабуть, переважно сприяють диференціюванню астроцитів і індукують експресію маркера GFAP астроцитів, тоді як на олігодендроцити вони надають в основному дію, пов'язану з виживаністю, надаючи при цьому невеликий вплив на рівень експресії гена МБР [Kahn and De Vellis, 1994; Bonni et al., 1997]. Проте, комбінації CNTF з нейротрофічним фактором, отриманим з головного мозку, BDNF, поліпшують відновлення пошкодженого периферичного сидничного нерва [Ho et al., 1998].

CNTF і LIF є цитокинами, діючими через загальну рецепторну систему, яка включає в себе рецептор LIF (LIFR) і ланцюг gp130, останній також є частиною рецепторного комплексу інтерлейкіну-6 (IL-6) [Ip et al., 1992]. Тому CNTF і LIF є частиною IL-6-сімейства цитокінів. У випадку CNTF і LIF сигнальна трансдукція здійснюється за допомогою димеризації LIFR з gp130, тоді як у випадку з IL-6 сигнал генерується за допомогою димеризації двох ланцюгів gp130 [Murakami et al., 1993]. Для того, щоб зв'язати gp130, IL-6 утворює комплекс з ланцюгом рецептора IL-6, який існує на певних клітинах у вигляді трансмембранного білка gp80, але розчинна форма якого також може функціонувати як агоніст IL-6 коли доставляється із зовнішньої "сторони клітини [Taga et al., 1989; Novick et al., 1992]. При злитті повних кодуючих районів кДНК, що кодують розчинний рецептор IL-6 (sIL-6R) і IL-6, рекомбінантну химеру IL6RIL6 можна продукувати в клітинах CHO [Chebath et al., 1997; WO99/02552]. Вказана химера IL6RIL6 володіє підвищеною біологічною активністю і зв'язується *in vitro* з ланцюгом gp130 з набагато більшою ефективністю, ніж суміш IL-6 з sIL-6R [Kollet et al., 1999].

Оглядовий аналіз ефектів IL-6 на клітини центральної і периферичної нервової системи свідчить про те, що цитокін може надавати захисну дію на нервові клітини, а також бере участь в запальних нейродегенеративних процесах [Gadient and Offen, 1997; Mendel et al., 1998]. CNTF і LIF були набагато більш активними при дії на гліальні клітини, ніж IL-6, при стимуляції диференціювання астроцитів, і не спостерігалось дії на клітини, іца продукують білки мієліну [Kahn and De Vellis, 1994]. Було виявлено, що IL-6 запобігає індукованій глутаматом загибелі клітин в гіпокампі [Yamada et al., 1994], а також стріарних нейронів [Toulmond et al., 1992]. Механізм нейропротекції IL-6, направленої проти токсичності, що викликається KMDA, селективним агоністом рецепторів глутамату NMDA-підтипу, ще не відомий. Дійсно було виявлене, що IL-6 посилює опосередковане NMDA підвищення внутрішньоклітинного вмісту кальцію. У трансгенних мишей, що експресують більш високі рівні як IL-6, так і розчинного IL-6R (sIL-6R), спостерігали прискорену регенерацію нервів після пошкодження під'язичного нерва, як показане ретроградним міченням ядер під'язичного нерва в головному мозку [Hirota et al., 1996]. У вказаній

роботі при доданні IL-6 і sIL-6R до культур клітин гангліїв дорсальних корінців (DRG) показане підвищення подовження нейритів нейронів, але не повідомлялося про дію на мієлінізуючі клітини.

У світлі представлених вище даних не було показано, що CNTF/LIF або суміш IL-6 і sIL-6R індукують термінальне диференціювання гліальних клітин в мієлінізуючі клітини. Однак, як підкреслено вище, стимуляція ' Диференціювання мієлінізуючих клітин мала б величезну цілющу дію для пацієнтів, страждаючих демієлінізуючими або нейродегенеративними захворюваннями.

Цитування якого-небудь документа в даній роботі не означає визнання того, що такий документ відноситься до попереднього рівня техніки або матеріалів, що обговорюються відносно патентоспроможності якого-небудь пункту формули винаходу даної заявки. Будь-яке твердження відносно змісту або дати будь-якого документа засноване на інформації, доступній заявникам під час подачі заявки на видачу патенту, і не є визнанням коректності такого твердження.

Метою даного винаходу є надання способів лікування і/або запобігання неврологічним захворюванням або розладам. Зокрема, метою даного винаходу є надання способів стимулювання або посилення диференціювання попередників або диференційованих гліальних клітин в мієлінізуючі клітини. Основою винаходу є застосування рекомбінантного химерного білка IL6RIL6, який володіє помітно більш високої афінністю до gp130, чим суміш IL-6 і sIL-6R.

Наступною метою даного винаходу є надання способів стимулювання або посилення мієлінізації або ремієлінізації пошкоджених волокон, що показано за допомогою індукованої ремієлінізації аксонів після аксотомії сидничного нерва *in vivo* в доповнення до мієлінізуючої дії IL-6-химери на індукцію генів мієліну *in vitro*.

Метою даного винаходу також є застосування химери IL6RIL6 для збільшення кількості шванновських клітин, що розвиваються в культурах гангліїв дорсальних корінців (DRG). Крім того, метою даного винаходу є застосування IL6RIL6 для індукції диференціювання вказаних клітин до того моменту, коли вони накручуються навколо аксонів і продукують основний білок мієліну, як показано в спільних культурах ліній шванновських клітин і первинних DRG.

Іншою метою даного винаходу є застосування химери IL6RIL6 для індукції транскрипції генів основних білків мієліну (МБП) в системі трансдиференціювання, в якій клітини з фенотипом меланокитів перетворюються в клітини шванновського мієлінізуючого фенотипу, як показано при дії IL6RIL6 на меланому мишей.

Іншою метою даного винаходу є застосування химери IL6RIL6 як агента нейропротекції і для запобігання загибелі нервових клітин в гіпокампі, районі, залученому до кодування пам'яті, і районі, який виявляє ранню дегенерацію при хворобі Альцгеймера і ішемії.

Іншою метою даного винаходу є застосування химери IL6RIL6 як протекторного засобу проти процесу нейротоксичності, що ініціюється збуджувальними амінокислотами, як показано за допомогою

захисту від нейротоксичності, що індукується глутаматом, що забезпечується химерою IL-6 в первинних культурах нейронів мозочка новонароджених пацюків.

Запропонований молекулярний механізм, по якому IL6RIL6 індукує і репресує специфічні фактори транскрипції, які викликають індукцію диференціювання генів MBP в гени мієлінізуючого фенотипу.

Таким чином, даний винахід пов'язаний із застосуванням химери IL6RIL6 для виробництва лікарського засобу для лікування і/або запобігання неврологічним захворюванням і розладам. Зокрема, даний винахід пов'язаний із застосуванням химери IL6RIL6 для виробництва лікарського засобу для лікування травматичної дегенерації нерва, демієлінізуючих захворювань ЦНС або ПНС і/або нейродегенеративних захворювань.

Більш конкретний винахід пов'язаний із застосуванням химер IL6RIL6 при лікуванні неухвального склерозу (НС), хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона або бічного аміотрофічного склерозу (БАС, ALS).

Винахід також пов'язаний з фармацевтичними композиціями, що містять "химеру IL6RIL6, не обов'язково разом з однією або більшою кількістю фармацевтично прийнятних наповнювачів, для лікування і/або запобігання неврологічному захворюванню або розладам. Зокрема, фармацевтична композиція являє собою композицію для лікування травматичної дегенерації нервів, демієлінізуючих захворювань ЦНС або ПНС і/або нейродегенеративних захворювань.

Переважаючим застосуванням фармацевтичних композицій згідно з даним винаходом є лікування НС, хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона або БАС.

На Фіг.1 показане збільшення MBP-РНК в культурах шванновських клітин, оброблених химерою IL6RIL6 або форсколіном (FSK), або - зліва - необроблених (НО).

На Фіг.2 показана проліферація недиференційованих клітин "oli-neu", виміряна через 24, 48 і 72 години після обробки різними кількостями химери IL6R/IL6.

На Фіг.3 показано, що IL6RIL6 сильно індукує мРНК МБП (А) і знижує синтез мРНК Рах-3 (В) в клітинах F10.9 з плином часу. НО означає необроблені клітини.

На Фіг.4 показане порівняння нейропротекції під дією одного тільки IL-6 і химерою IL-6 у відношенні нейротоксичності, опосередкованої NMDA, в органотипових зрізах гіпокампу.

На Фіг.5 показано пролонгована нейропротекторна дія химери IL-6 проти дії одного тільки IL-6 в органотипових зрізах гіпокампу.

На Фіг.6 показана дія химери IL6R/IL6 на виживаність нейронів, позбавлених NGF, після 24 годин обробки, як виміряно за допомогою МТТ-аналізу.

Згідно з винаходом, було виявлено, що додавання рекомбінантного білка IL6IL6R до культур клітин гангліїв дорсальних корінців або клітин меланоми стимулює диференціювання цих клітин в мієлінізуючі клітини. Також було виявлено, що додавання рекомбінантного білка IL6IL6R до спіль-

них культур нейронів і шванновських клітин індукує останні до утворення регулярної оболонки навколо аксонів. Тому винахід стосується застосування химери IL6RIL6 для виробництва лікарського засобу для того, щоб утворити мієлінізуючі клітини або стимулювати, посилити або прискорити утворення мієлінізуючих клітин.

Химера IL-6, крім того, індукує ремієлінізацію *in vivo* перерізаних волокон після аксотомії сідничного нерва у пацюків. Тому винахід, крім того, відноситься до застосування химери IL6RIL6 для виробництва лікарського засобу для індукції, посилення або прискорення ремієлінізації, зокрема, після пошкодження або травми нерва або пошкоджень аксонів.

Далі, було виявлено, що додавання рекомбінантного білка IL6IL6R до органотипових культур індукує пролонговану захисну дію від нейротоксических агентів. Тому винахід також відноситься до застосування химери IL6RIL6 для виробництва лікарського засобу для індукції, посилення, пролонгації або прискорення нейропротекції, зокрема, від нейротоксических агентів, і для інгібування, зниження або сповільнення загибелі нейронів, яка може бути, наприклад, наслідком апоптозу.

Даний винахід стосується застосування «химери IL6RIL6» (яку також називають «IL6RIL6» або химерою IL-6), яка являє собою рекомбінантний глікопротеїд, отриманий злиттям повної кодуючої послідовності розчинного IL-6-рецептора  $\delta$ -Val природного походження з повною кодуючою послідовністю зрілого IL-6 природного походження, при цьому, обидві вони походять з клітин людини. Химеру IL6RIL6 можна продукувати в будь-яких придатних еукаріотичних клітинах, таких як клітини дріжджів, клітини комах і ним подібні. Химеру переважно продукують в клітинах ссавців, найбільш переважно - в отриманих методами генної інженерії клітинах CHO, [як описано в WO 99/02552]. Незважаючи на те, що переважний білок, який походить з клітин людини, фахівцям в даній області буде зрозуміло, що подібний злитий білок будь-якого іншого походження можна використати згідно з винаходом, при умові, що він зберігає описану тут біологічну активність.

Більш конкретно, даний винахід стосується застосування химери IL6RJL6, для того, щоб стимулювати диференціювання попередників або диференційованих гліальних клітин в мієлінізуючі клітини. Як показано в даній роботі, процес диференціювання мієлінізуючих клітин, індукований IL6RIL6, залучає як активацію генів, необхідних для утворення мієлінової оболонки навколо аксонів нейронів, так і репресію гена, необхідного для підтримки немієлінізуючих фенотипів.

Згідно з даним винаходом, експериментально було виявлено, що додавання химери IL6RIL6 до культур клітин ембріональних гангліїв дорсальних корінців (eDRG), виділених з ембріонів мишей на 14-15 день вагітності, впливає надзвичайно сильним чином на розвиток попередників шванновських клітин, присутніх в DRG. Після 2-5 днів в культурі має місце помітне збільшення кількості ембріональних шванновських клітин, помітна зміна фенотипу цих клітин, які починають утворювати з своїх мембран оболонку навколо аксонів DRG, і

індукція МБР. Згідно з даним винаходом, крім гою, експериментально виявлене, що в спільній культурі шванновських клітин з нейронами химера IL-6 може індукувати значне збільшення скріплення шванновських клітин вздовж немієлінізованих аксонів протягом 5 годин. Шванновські клітини, які мітили Fluorogold, довшали, і через декілька днів можна було бачити, як їх цитоплазма, що флуорисцує, формувала регулярну оболонку навколо аксонів. Без химери, або в присутності NGF, шванновські клітини зв'язуються набагато менше і не утворюють оболонку.

Тому винахід, крім того, відноситься до застосування химери IL6RIL6 для виробництва лікарського засобу для індукції проліферації і/або, диференціювання шванновських клітин, а також мієлінізації шванновськими клітинами в периферичній нервовій системі.

Згідно з даним винаходом, крім того, було показано, що химера IL-6 може індукувати ремієлінізацію периферичних нервів *in vivo*. Після аксотомії сідничного нерва у пацюків і накладення проксимального і дистального обрізків химера IL-6 могла індукувати регенерацію периферичних нервів і ремієлінізацію перерізаних волокон *in vivo*. У присутності химери IL-6 виявили 4-кратне збільшення кількості і товщини мієлінізованих волокон, і збільшення ремієлінізації більш віддалених волокон. Тому винахід крім того відноситься до застосування химери IL6RIL6 для виробництва лікарського засобу для індукції ремієлінізації в периферичній нервовій системі.

Більш того, також було виявлено, згідно з даним винаходом, що химера IL-6 може індукувати експресію генів, що кодують компоненти білків мієліну, таких як гени MBP, PLP і PO в мієлінізуючих клітинах периферичної нервової системи, таких як шванновські клітини, і в клітинах центральної нервової системи, таких як олігодендроцити. Тому винахід, крім того, відноситься до застосування химери IL6RJL6 для виробництва лікарського засобу для індукції мієлінізації і/або ремієлінізації олігодендроцитами в центральній нервовій системі.

Згідно з даним винаходом, також було виявлено, що додавання химери IL6RIL6 до культур ліній клітин меланоми мишей B16/F10.9 індукує експресію гена МБР в межах 6-12 годин. Індукуються інші гени, які кодують білки мієліну, такі як ген SYPAзи, тоді як експресія генів, які залучені в меланогенез (утворення меланінових пігментів), таких як ген тирозинази, сильно репресована. Клітини F10.9, оброблені IL6RIL6, також зазнають помітної морфологічної зміни, і придбавають фенотип, подібний фенотипу шванновських клітин. Феїотипічні зміни і індукція специфічних генів мієліну підтверджують гіпотезу про те, що IL6RIL6 викликає трансдиференціювання клітин з стану меланоцитів в стан мієлінізуючих клітин. Оскільки в ембріонові клітини, мігруючи з нервового гребінця, можуть давати початок або меланоцитам, або мієлінізуючим шванновським клітинам і олігодендроцитам, передбачається, що IL6RIL6 може впливати на долю клітин і стимулювати утворення мієлінізуючих клітин. Тому винахід також відноситься до застосування химери TL6RIL6 для виробництва

лікарського препарату для індукції, стимулювання, посилення або прискорення утворення мієлінізуючих клітин в периферичній і в центральній нервовій системі і/або для індукції трансдиференціювання меланоцитів в мієлінізуючі клітини.

Крім того, відповідно до даного винаходу, показано, що IL6RIL6 діє при придушенні гомеобоксного гена Pax-3, гена, який експресується в клітинах ембріонального нервового гребінця перед тим, як вони диференціюються в мієлінізуючі шванновські клітини [Kioussi and Gruss, 1996]. Відомо, що Pax-3 репресує ген MBP. Тому, мабуть, репресія Pax-3 є ключовою подією в кінцевому дозріванні мієлінізуючих клітин. Отже, IL6RIL6 діє на ключове перемикання диференціювання (а саме, репресію *pax-3*).

Pax-3 є транс-активатором фактора транскрипції MITF, пов'язаного з мікрофталмією, який, в свою чергу, індукує і підтримує експресію гена тирозинази і інших генів, які відповідають за меланітичний фенотип. Тому виявлення швидкої репресії Pax-3 за допомогою IL6RIL6 може пояснити молекулярні події, які стимулюють мієлінізуючу активність клітин, що походять з нервового гребінця. Після пошкодження нерва мієлінізовані аксони зазнають демієлінізації в ході валеровського переродження. Під час цього процесу в шванновських клітинах меншає експресія гена MBP і інших родинних білків мієліну. Має місце супутній процес стимуляції Pax-3 і GFAP, який означає реверсію від мієлінізуючих SC до немієлінізуючих і проліферуючих SC [Kioussi and Gruss, 1996]. Згідно з даним винаходом, химера IL6RIL6, мабуть, є ефективним цитокіном для повернення в початковий стан після процесу валеровської дегенерації нервів за допомогою репресування Pax-3 і індукування SC до відновлення їх мієлінізуючої активності. Такі ж міркування можуть бути застосовані до демієлінізуючих захворювань головного мозку, оскільки, подібно процесам при травмі, нейродегенерації при цих захворюваннях посилюється внаслідок процесу демієлінізації, що здійснюється макрофагами і іншими запальними клітинами. Тому винахід також стосується застосування химери IL6RIL6 для виробництва лікарського засобу для лікування пошкодження нервів і/або травматичної дегенерації нервів і/або пошкодження аксонів.

IL6RIL6 можна ін'єкувати мишам, в яких аутоїмунна демієлінізація була індукована імунізацією MBP, як модельна система хронічного рецидивуючого неуважного склерозу [Cannella et al, 1998]. Здатність IL6RIL6 індукувати гени білків мієліну і диференціювання мієлінізуючих гліальних клітин можна спостерігати *in vivo*, використовуючи цей фармацевтичний зразок. Тому винахід, крім того, відноситься до застосування химери IL6RIL6 для виробництва лікарського засобу для лікування і/або запобігання аутоїмунних демієлінізуючих захворювань, зокрема, для лікування і/або запобігання неуважному склерозу.

Також було показано, що химера IL-6 володіє нейропротекторною дією, запобігаючи втраті життєздатності нервових клітин, індукованої екситотоксичними агентами в районах, залучених до кодування пам'яті і що виявляють ранню дегенерацію при хворобі Альцгеймера і ішемії.

Виявлено, що химера 1L-6 захищає нейрони від нейротоксичності, індукованої глутаматом. Тому винахід відноситься до виробництва лікарського засобу для захисту нервових клітин від загибелі, зокрема, внаслідок дії нейротоксичних агентів, і для лікування і/або запобігання нейродегенеративних захворювань, подібних, наприклад, хворобі Альцгеймера, хворобі Паркінсона або БАС.

Крім того, до неврологічних захворювань, які можна лікувати химерою IL6RIL6, відносяться інсульти, порушення рухів, епілепсія, біль і тому подібне.

Мають на увазі, що визначення «фармацевтично прийнятний» охоплює будь-який носій, який не заважає ефективності біологічної активності активного інгредієнта і який не токсичний для господаря, якому його вводять. Наприклад, для парентерального введення химера IL6RIL6 може бути приготована в дозованій лікарській формі для ін'єкції в таких наповнювачах як фізіологічний розчин, розчин декстрази, сироватковий альбумін або розчин Рінгера.

Химеру IL6RIL6 можна вводити пацієнту, який потребує такого введення, різними шляхами. Шляхи введення включають в себе інтрадермальний, трансдермальний (наприклад, в композиціях уповільненого вивільнення), внутрішньом'язовий, внутрішньочеревний, внутрішньовенний, підшкірний, пероральний, епідуральний, локальний і інтраназальний шляхи. Можна використовувати будь-який інший терапевтично ефективний шлях введення, наприклад, абсорбцію через епітеліальні або ендотеліальні тканини, або за допомогою генної терапії, при якій пацієнту вводять молекулу ДНК, що кодує химеру IL6RIL6 (наприклад, за допомогою вектора), яка викликає експресію і секрецію химери IL6RIL6 *in vivo*. Крім того, химеру IL6RIL6 можна вводити разом з іншими компонентами біологічно активних агентів, таких як фармацевтично прийнятні поверхово-активні речовини, ексципієнти, носії, розріджувачі і наповнювачі.

Для парентерального (наприклад, внутрішньовенного, підшкірного, внутрішньом'язового) введення химеру IL6RIL6 можна приготувати в композиції у вигляді розчину, суспензії, емульсії або ліофілізованого порошку разом з фармацевтично прийнятним парентеральним наповнювачем (наприклад, водою, фізіологічним розчином, розчином декстрази) і добавками, які підтримують ізотонічність (наприклад, маніт) або хімічну стабільність (наприклад, консерванти або буфери). Композицію стерилізують способами, що традиційно використовуються.

«Ефективна кількість» відноситься до кількості активних інгредієнтів, яка є достатньою, щоб вплинути на течію і тяжкість описаних вище захворювань, приводячи до ослаблення або ремісії такої патології. Ефективна кількість буде залежати від шляху введення і стану пацієнта.

Доза, введена індивідууму у вигляді однократної або багаторазових доз, буде варіювати, в залежності від багатьох факторів, включаючи фармакокінетичні властивості химери IL6RIL6, шлях введення, стан і характеристики пацієнтів (стать, вік, маса тіла, здоров'я, ріст), міра виявлення симптомів, супутнє лікування, частота лікування і ба-

жаний ефект. Можливе коректування і маніпулювання встановленими межами доз в рамках компетенції фахівців, а також способів *in vitro* і *in vivo* визначення ремієлінізації нервів.

Хоч винахід буде описаний в зв'язку з його конкретним варіантом, буде зрозуміло, що він допускає додаткові модифікації. Мається на увазі, що дана заявка охоплює будь-які варіації, застосування або переробки винаходу, які загалом слідує принципам винаходу і які включають в себе такі відступи від даного опису, які узгодяться з відомою або звичайною практикою в області, до якої відноситься винахід, і які можуть бути застосовані до основних елементів, вказаних вище, як викладено нижче в рамках прикладеної формули винаходу.

Всі цитовані тут матеріали, включаючи статті або анотації в журналах, опубліковані і неопубліковані заявки на видачу патенту, видані або іноземні патенти, або будь-які інші матеріали, включені тут у вигляді посилань в повному об'ємі, включаючи всі дані, таблиці, фігури і текст, представлені в дитованих матеріалах. Крім того, повний зміст цитованих публікацій в межах матеріалів, що використовуються при підготовці даної заявки, також включений у вигляді посилань в повному об'ємі.

Даний винахід тепер буде описаний більш детально на основі наступних не обмежувальних прикладів і супроводжуючих малюнків.

#### Приклади

Приклад 1: Вплив IL6RIL6 на мієлінізацію і ремієлінізацію *in vitro*

У спинному мозку дорсальний корінець містить по суті чутливі нейрони, які формують синапи в гангліях дорсальних корінців (DRG). Під час ембріогенезу у мишей (на e14-e15 день), DRG є відповідним джерелом нейронів і ембріональних шванновських клітин, які ще не диференційовані в мієлінізуючі SC: Способи отримання експлантатів DRG для культур *in vitro* описані Li (1998). Культивування здійснювали на покривних склах, вміщених в лунки планшетів Costar, в середовищі F12/DMEM (Gibco). Покрівні скла покривали або колагеном, або полі-D-лізином, по суті, з однаковими результатами. Культивування проводили або в середовищі без добавок факторів росту або цитокінів, або в середовищі з добавкою фактора росту нервів (NGF/ 40нг/мл), або в середовищі з добавкою химерних рекомбінантних білків IL6RIL6 (3мкг/мл). Культури перевіряли щодня за допомогою світлової мікроскопії, використовуючи інвертований мікроскоп Olympus, з'єднаний з системою візуалізації за допомогою відеокамери (система Leica LIDA). Частиину покривних стекол фіксували в формальдегіді, і білки МБР мітили першими моноклональними антитілами до основних білків мієліну і кон'югованими з флуоресцеїном другими антитілами. Тіла нейронних клітин і аксони фарбували антитілами до білків нейрофіламентів. Деяке покрівні стекла перевіряли скануючою електронною мікроскопією (ЕМ).

Через 2-5 днів на експлантатах DRG, що культивуються без добавок, показали, що клітини, що зросли з експлантата були або полігональними, або що мають форму овалу. Однак в тому випадку, коли додавали NGF, клітини овальної форми утворювали довгі паростки-аксони, які формували

рідку мережу, що забарвлюється антитілами до нейрофіламентів. Деякі аксони були довгими і роздвоєними, але шванновських клітин вздовж аксонів не було видно. Навпаки, в культурах з додаванням IL6RIL6 були видні не тільки нервові клітини з аксонами, забарвленими на нейрофіламенти, але також і шванновські клітини, що з'являються у вигляді плоских клітин, які мали довгі біполярні вирости з кінцевими розгалуженнями. Ці вирости не були забарвлені на білки нейрофіламентів. При скануючій ЕМ ці шванновські клітини були чітко видні вздовж аксонних паростків з мембранними збираннями, що починають накручуватися навколо аксона.

Фарбування анти-MBP виявило позитивно забарвлені шванновські клітини в культурах, оброблених IL6RIL6, зокрема, в рядах клітин, які були вистроєні одна за іншою. З іншого боку, спостерігалася невелика специфічна для МБР флуоресценція в культурах, оброблених NGF без IL6RIL6.

Схожі результати спостерігали в культурах DRG з ембріонів пацюків, отриманих на e15 день.

Шванновські клітини, отримані з сідничного нерва миші, також культивували *in vitro* з IL6RIL6 в концентрації 1,4мкг/мл, і вимірювали рівень РНК-транскрипту МБР. Для порівняння такі ж культури обробляли 20мкМ форсколіном, хімічним агентом, який штучно збільшує рівні циклічного АМФ в клітинах, і, як відомо, індукуює МБР [Lemke and Chao, 1988]. Результати показали, що IL6RIL6 був так само ефективний, як і форсколін в індукції експресії гена МБР, і більш ефективним в підтримці рівнів РНК МБР через 3 дні культивування (Фіг.1).

При дослідженні клітин гангліїв дорсальних корінців (DRG) 18-денного ембріона було виявлено, що химера IL-6 індукуює експресію мРНК МБР і РО протягом 3 днів, тоді як мРНК Рах-3 в цій же клітинній системі була сильно інгібована. Дозозалежна крива дії химери IL-6 на експресію генів РО і МБР свідчить про максимальну дію химери IL-6 при концентрації 500нг/мл. Отже, химера IL-6 виступає як важливий індуктор експресії гена мієліну в нормальних нейрогліальних клітинах.

Для подальшого дослідження дії химери IL-6 створили лінії шванновських клітин, отриманих з сідничного нерва пацюка або з клітин ганглія дорсальних корінців (DRG) пацюка.

Виявили, що лінія шванновських клітин, отриманих з сідничного нерва пацюка, відповідає на дію химери IL-6, як було визначено за допомогою ОТ-ПЛР і Нозерн-блот-аналізом, 2-3-кратною індукцією гена РО, білковий продукт якого формує приблизно 50% мієліну периферичних нервів.

Для того, щоб дослідити активацію транскрипції компонентів гена мієліну химерою IL-6, ввели промотор МБР в експресуючий вектор вище за течією репортерного гена люциферази, і тестували в лінії шванновських клітин сідничного нерва пацюка. У цих клітинах спостерігали індукцію транскрипційної активності з промотору МБР аж до 7-кратної індукції у відповідь на химеру IL-6 у відсутність форсколіну. В додатковому аналізі репортерного гена виявили, що химера IL-6 викликає в цих клітинах 2,5-кратну індукцію транскрипції з промотору гена РО.

Приведені вище результати свідчать про те,

що химера IL-6 надає пряму дію на транскрипцію генів мієліну в комітованих шванновських клітинах.

Була виділена додаткова лінія шванновських клітин з ганглія дорсального корінця (DRG) пацюка і названа лінією клітин СН. Виявлено, що ця лінія клітин володіє низькою швидкістю росту, і її ріст залежить від химери IL-6 (140нг/мл). Цікаво, що СН-клітини мали зірчасту морфологію, подібну олігодендроцитам. Клітини, мабуть, були функціональними по відношенню до індукції мієлінізації химерою IL-6. Клітини експресували PO I MBP і гинули при вирощуванні в середовищі, що містить сироватку, у відсутність химери.

Приклад 2: Інгібування проліферації олігодендроцитів *in vitro*

Досліджували вплив химери IL-6 на клітини центральної нервової системи. Встановлено, що диференціювання олігодендроцитів пов'язане з інгібуванням їх проліферації, і таким чином, із стимуляцією утворення оболонки і мієлінізації олігодендроцитами.

Тому тестували здатність химери IL6R/IL6 інгібувати проліферацію олігодендроцитів *in vitro*. У цьому експерименті використали клітинну лінію первинних олігодендроцитів миші (олігодендрогліальні клітини), іморталізовані за допомогою онкогену t-neu (лінія клітин «oli-neu»). Створення і властивості лінії клітин oli-neu, а також умови культивування [описані Jung et al. (1995)].

Вимірювали проліферацію недиференційованих клітин oli-neu через 1, 2 і 3 дні у відповідь на різні кількості химери IL6R/IL6 (1мкг/мл, 500нг/мл, 250нг/мл, 125нг/мл і 0нг/мл (контроль)). Кількісно визначали швидкість зростання за допомогою вимірювання метаболічної активності клітин за допомогою флуориметричного/колориметричного індикатора зростання, Alamar Blue. Вказаний агент містить індикатор окислення-відновлення, який виявляє як флуоресценцію, так і зміни свого забарвлення у відповідь на хімічне відновлення ростового середовища внаслідок зростання клітин. Агент, що використовується і аналіз [описані у Ahmed, et al. (1994) і в патенті США 5501959].

Результати показані на Фіг.2. Додавання химери IL6R/IL6 в культуральне середовище олігодендроцитів веде до різко вираженого зниження росту вже через 48 годин. Через 72 години ріст скорочувався до 40-50%, в порівнянні з контролем. Цікаво, що сама висока кількість химери IL6R/IL6 (1мкг) була менш ефективною, ніж більш низькі кількості від 500 до 125нг/мл.

Експеримент показав, що химера IL6R/IL6 сильно інгібує проліферацію олігодендроцитів *in vitro*, свідчаючи про те, що вона стимулює диференціювання олігодендроцитів. Оскільки олігодендроцити є гліальними клітинами, що продукують мієлінові оболонки в ЦНС, химера IL6R/IL6 може бути агентом, активно стимулюючим ремієлінізацію *in vivo*.

Приклад 3: Вплив химери IL6R/IL6 на морфологію олігодендроцитів

Для того, щоб дослідити вплив химери IL6 на морфологію олігодендроглії, клітини oli-neu (дивися приклад 2) культивували протягом 3 днів в присутності 1мкг/мл химери IL6R/IL6.

Дибутил-цАМФ (дбцАМФ) є агентом, який, як

відомо, індукує диференціювання олігодендроцитів [дивися, наприклад, Jung et al. (1995)]. Для того, щоб дослідити, який вплив на морфологію здійснює химера IL6R/IL6 додатково до впливу дбцАМФ, клітини oli-neu заздалегідь обробляли протягом 3 днів дбцДМФ перед додаванням химери IL6R/IL6 плюс дбцАМФ. У паралелі клітини обробляли химерою IL6R/IL6 без попередньої обробки.

Зміни морфології оцінювали за допомогою фазово-контрастної мікроскопії або імуногістохімічним фарбуванням на маркери олігодендроцитів CNPазу (діестеразу 2', 3'-циклічних нуклеозид-3'-фосфатів) і GalC (сіалогангліозиди і сульфатиди) і використовуючи антитіла A2B5, специфічні для ліпиду мієліну галактоцереброзиду.

Додавання химери IL6R/IL6 явно індукувало морфологічні зміни в клітинах oli-neu. Тіла клітин збиралися рядами, і їх паростки ставали більш подовженими. Самі клітини довшали і здавалися злитими, що свідчило про досягнутий стан диференціювання.

Експресія маркерів олігодендроцитів була показана за допомогою імуногістохімії. Клітини були позитивні відносно специфічних маркерів олігодендроцитів - антигену A2B5 і OMPазу, але були негативними відносно маркера астроглії GFAP, таким чином, свідчаючи, що дійсно підтримувався фенотип олігодендроцитів.

Попередня обробка дбцАМФ і комбінована обробка химерою IL6R/IL6 і дбцАМФ збільшували кількість олігодендроцитів, утворюючих оболонку, через 3 дні. У порівнянні з подовженими клітинами, видимими в присутності однієї химери IL6R/IL6, морфологічно клітини виглядали навіть більш диференційованими. Можна було спостерігати клітини, що мають вигляд листа, що свідчило про досягнутий стан диференціювання.

На закінчення, обробка химерою IL6R/IL6 в результаті приводила до морфологічної зміни олігодендроцитів *in vitro*, таким чином, далі підтверджуючи її роль як індуктора олігодендрогліального диференціювання і мієлінізації.

Приклад 4: Вплив химери IL-6 на взаємодію нейронів і шванновських клітин

При культивуванні DRG мишей в присутності інгібіторів синтезу ДНК арабінози C (AraC) і фтордезоксіуридину (FudR) нервові клітини можуть утворювати аксони, в той час як проліферація гліальних клітин інгібована. Такі культури DRG можна використовувати як джерело нервових клітин з немієлінізованими аксонами. До цих культур екзогенно додають шванновські клітини, щоб дослідити взаємодію між нейронами і шванновськими клітинами.

Клітини ліній шванновських клітин сідничного нерва пацюка мітили Fluorogold, міткою, яка проникає через бішарову ліпідну мембрану клітин і зберігається протягом протяжного періоду часу, не впливаючи на функцію клітин. Спільне культивування нейронів і вказаних шванновських клітин в присутності химери IL-6 приводить до значного збільшення скріплення шванновських клітин вздовж аксонів клітин в межах 5 годин. Клітини довшать, і через декілька днів можна спостерігати, як їх флуоресуюча цитоплазма утворює регу-

лярну оболонку навколо аксонів. У відсутність химери або у відсутність NGF шванновські клітини зв'язуються набагато менше і не утворюють оболонку. Дані результати показують, що химера IL-6 впливає дуже швидким чином на взаємодію гліальних клітин з нейронами, свідчаючи про те, що індуються або активуються адгезивні молекули. Вказана система дозволяє дослідити різні стадії процесу мієлінізації, на які впливає химера IL-6.

Приклад 5: Вплив химери IL6R/IL6 на мієлінізацію в змішаних культурах нейронів і олігодендроцитів

Для того, щоб далі дослідити активність химери IL6R/IL6, що індукує мієлінізацію, готували дисоційовані культури з півкуль головного мозку мишей E15 (15 ембріональний день). Підготовка і умови культивування [описані Lubetzki et al. (1993)]. Первинні клітини підтримували в культурі протягом 8 днів перед додаванням IL6R/IL6 (1,5мкг/мл) протягом 11 днів.

МБР (основний білок мієліну) і специфічний для олігодендроцитів білок PLP (протеоліпідний білок) є маркерами зрілих і/або мієлінізованих олігодендроцитів і є головними компонентами мієліну ЦНС. Тому їх можна використати як маркери для оцінки активної мієлінізації, що має місце в культурі клітин.

В умовах культивування на 4 день мієлінізація не відбувається. Тому мРНК на 4 день використали в цьому експерименті як калібрувальний контроль. На 19 день в умовах культивування в культурі клітин спостерігається мієлінізація.

Таким чином, для того, щоб кількісно виміряти мРНК MBP і PLP екстрагували мРНК з необроблених і оброблених лунок на 4 і 19 день.

мРНК MBP, PLP і GAPDH, яка служила як РНК внутрішнього контролю, вимірювали за допомогою кількісної ОТ-ПЛР в реальному часі [Medhurst et al. (2000)], використовуючи прилад для визначення послідовностей PE Applied Biosystems Prism, модель 7700.

Результати підсумовані в таблиці I, приведені нижче. Провели два незалежних експерименти. Експресія мРНК показана у вигляді кратної експресії контрольної РНК на 4 день. В обох експериментах химера IL6R/IL6 чітко посилювала експресію MBP і PLP в два рази, ще раз підтверджуючи роль химери IL6R/IL6 як індуктора або підсилювача мієлінізації.

Таблиця

Експресія MBP і PLP в первинних культурах кортикальних клітин

	Контроль на 4 день	Контроль на 19 день	Химера IL6R/IL6 на 19 день
Експеримент I			
MBP	1	72	181
PLP	1	1265	2157
Експеримент II			
MBP	1	187	2157
PLP	1	1884	4198

На закінчення, приклади з 1 по 5 показують, що химера IL6R/IL6 володіє антипроліферативною, такою, що індукує диференціювання і мієліні-

зацію активністю. Вказана активність химери IL6R/IL6 суворо свідчить про сприятливу дію химери IL6R/IL6 на ремієлінізацію в периферичній і центральній нервовій системі. Цей ефект можна використовувати при всіх розладах, заснованих на дефектах мієлінізації; демієлінізації або недостатній мієлінізації нейронів ЦНС або ПНС. Тому химера IL6R/IL6 може бути ефективним агентом для лікування порушень ремієлінізації і/або демієлінізації, подібних, наприклад, неухваленому склерозу.

Приклад 6: Вплив химери IL-6 на регенерацію периферичних нервів in vivo

Після аксотомії сідничного нерва у пацюків і накладення проксимального і дистального відрізків периферичні нерви можна індукувати до регенерації, і перерізані волокна можна індукувати до ремієлінізації in vivo [Sahenk et al. 1994]. Досліджували вплив химери IL6R/IL6 на ремієлінізацію периферичних нервів після аксотомії. Пацюкам (7 тварин) вводили химеру IL6R/IL6 внутрішньочеревно через кожні два дні в дозі 100мкг/кг протягом 12 днів, починаючи з дня операції. Контрольним тваринам (9 пацюків) ін'єктували PBS. Через 12 днів частини регенеруючого нерва на 2,5 і 5мм нижче за аксотомію аналізували за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії, і оцінювали кількість позитивних волокон.

У присутності химери IL-6 виявили 2,5-кратне збільшення кількості мієлінізованих волокон на відстані 2,5мм нижче за аксотомію, в порівнянні з контролем, обробленими PBS. Крім того, було виявлено, що химера збільшує ремієлінізацію більш віддалених волокон, індукуючи 5,2-кратне збільшення кількості мієлінізованих волокон на 5мм дистальніше за розріз. Це важливе, оскільки ремієлінізація знижується по мірі того, як відстань від розрізу збільшується. Вплив CNTF спостерігали на відстані 0,5мм від розрізу, а в присутності химери IL-6 виявляється набагато більш віддалений вплив, і більш сильний - на відстані 5мм, ніж на відстані 2,5мм. Товщина мієлінізованих волокон також збільшувалася більш ніж в 2 рази після обробки химерою. Загалом химера IL-6, мабуть, індукує ремієлінізацію приблизно ] 0% волокон, в порівнянні з інтактними пацюками без аксотомії.

Приклад 7: Індукція гена MBP за допомогою IL6R/IL6 в культурах клітин меланоми B16-F10.9

Ембріональним джерелом меланоцитів шкіри, які продукують меланінові пігменти, і шванновських клітин є спільні клітини-лопередники, мігруючи з нервового гребінця ембріонів мишей e8. Меланоми являють собою злоякісні пухлини, що розвиваються в шкірі з меланоцитів, і тому також походять з попередників нервового гребінця. Лінія клітин B16 отримана з спонтанної меланоми мишей Balb/c, і клон F10.9 виділяли з B16 за їх фенотипом, відповідним високо злоякісним метастазам. Клітини F10.9, як і інші клітини B16, продукують чорний пігмент еумеланін і багаті на тирозиназу, перший фермент меланогенного шляху [Bertolotto et al. 1996].

Клітини F10.9 висівали в 96-лункові мікроплашети при концентрації 30000 клітин/лунка і культивували протягом 3 днів в середовищі DMEM з 10% FCS в присутності або у відсутності IL6R/IL6 в концентраціях 0,3-1мкг/мл. Екстрагували сумарну



клітинну РНК і аналізували за допомогою Нозерн-блотів із зондами ДНК для MBP. У клітинах F10.9 мРНК MBP були дуже сильно індуковані IL6R/IL6 через 48 годин (Фіг.3А). Дослідження часового ходу показало, що збільшення РНК MBP починалося через 12 годин після додавання химери IL6RIL6 до культур клітин.

Химера IL6RIL6 індукує не тільки експресію гена MBP, але також фосфодіестерази циклічного 2'3' АМФ або CNPазі, яка є іншим компонентом мієліну і маркером диференційованих шванновських клітин. Клітини також утворюють подовжені паростки на протилежних полюсах тіла клітини, і шикуються в культурах в довгі ряди як звичайні шванновські клітини.

Несподівано IL6RIL6 перемикала фенотип клітин F10.9 з клітин, що продукують меланін, на шванновські клітини, що продукують мієлін. Ферментативна активність тирозинази і продукція меланіну повністю зникали через 48 годин після додавання химери IL6RIL6 до клітин.

MITF є транскрипційним фактором, який активує ген тирозинази [Bertolotto et al, 1996]. Обробка клітин F10.9 химерою IL6RIL6 сильно репресує експресію гена MITF. Сам MITF трансактивується гомеотичним фактором транскрипції Pax-3 (Watanabe et al. 1998), і вимірювання мРНК Pax-3 в клітинах F10.9, оброблених IL6RIL6, показали, що експресія Pax-3 знижується, починаючи з 6 годин і аж до 48 годин (Фіг.3В). Відомо, що Pax-3 репресує ген МБР (Kioussi and Gruss, 1996). Тому вплив химери IL6RIL6 можна приписати впливу на генну регуляцію гомеобоксного гена Pax-3, який експресується під час розвитку ембріональних шванновських клітин перед мієлінізацією, і повинен бути репресований для того, щоб відбувалася мієлінізація. Крім того, в нервах, що дегенерують і демієлінізуються Pax-3 знов експресується в шванновських клітинах, коли ці клітини перестають продукувати МБР. Тому дуже важливо, що IL6RTL6 може як репресувати Pax-3, так і викликати диференціювання шванновських клітин в клітини, що мієлінізують за допомогою індукції генів білків мієліну.

Приклад 8: Ін'єкції IL6RIL6 в моделі хронічного рецидивуючого неухважного склерозу у мишей

У мишей лінії SJL/J розвивається експериментальний аутоімунний енцефаломієліт (ЕАЕ) після імунізації 0,4мг бичачого MBP в неповному ад'юванті Фройнда, що містить 60мкг *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco). Захворювання можна пасивно перенести сингенному реципієнту за допомогою внутрішньовенної ін'єкції 30 мільйонів клітин лімфатичного вузла, взятих через 10 днів після імунізації. Клінічні симптоми паралічу з'являються через період часу від тижня до 10 днів. Після гострої фази слідує ремісія і рецидиви. Цим мишам ін'єкують IL6RIL6 внутрішньочеревно або підшкірно в дозах 1, 3 і 5мкг на мишу (маса тіла біля 25г). Ін'єкції вводять 4 рази на тиждень, щонайменше протягом 3 тижнів, починаючи або на 3, або на 7 день після пасивного перенесення. При клінічній оцінці тварин слідували і проводили класифікацію за наступними критеріями: 1) втрата ригідності хвоста; 2) слабкість задніх кінцівок; 3) односторонній параліч кінцівок; 4) двосторонній

параліч кінцівок; 5) летальність. Головний мозок і спинний мозок тварин досліджували за допомогою світлової мікроскопії після фарбування мієліну стійко блакитним люксом. Можна встановити вплив IL6RIL6 на пониження клінічної міри хвороби і зменшення демієлінізації білої речовини головного мозку.

Приклад 9: Нейропротекторна дія химери IL6 на нейротоксичність по відношенню до нейронів і олігодендроцитів

Органотипові культури надають унікальну стратегію, за допомогою якої можна дослідити багато які аспекти фізіології і патології головного мозку. Довготривалі культури зрізів гіпокампу, району, залученого до кодування пам'яті і району, в якому виявляється рання дегенерація при хворобі Альцгеймера і ішемії, є особливо корисними в цьому відношенні, внаслідок виразності механізмів синаптичної пластичності (наприклад, довготривалого потенціювання) і реагування на патологічні інсульти (наприклад, екситотоксичність).

Культури готували, [як описано раніше Bahr et al. (Bahr 1995)], з невеликими модифікаціями. Гіпокампи вирізали у пацюків Wistar восьмиденного віку, і зрізи товщиною 400мкм накладали на пористу і прозору мембрану Millicell-CM (Millipore) і культивували в 6 лунках багатолункових планшетів. На кожну мембрану вміщували чотири зрізи. Середовище для культивування складалася з 50% мінімально необхідного середовища (+25мМ HEPES, +4мМ NaHCO<sub>3</sub>, +NaOH pH7,2), 25% сироватки коня і 25% розчину Хенкса, глюкози (6,4г/л), пеніциліну/стрептоміцину (10мл/л), L-глутаміну (2мМ). Культури тримали в 5% CO<sub>2</sub>-інкубаторі, встановленому при температурі 37°C, щонайменше, протягом 3 тижнів до використання. Середовище міняли кожний тиждень.

Зрізи гіпокампу піддавали впливу JL6 або химери IL6 при концентраціях в межах від 10пг/мл до 10мкг/мл протягом 15хв., потім додавали 50мкМ NMDA ще протягом 30хв. Культури вміщували в свіже середовище з додаванням або без IL6 або химери IL6. Для кожної експериментальної точки використали щонайменше чотири зрізи. Загибель клітин, індуковану NMDA, оцінювали або через 1, або через 3-7 днів після експериментального пошкодження, інкубуючі культури протягом 1 години в свіжому середовищі, що містить йодит пропідію (PI 5мкл/мл). Завдяки своїм гідрофобним властивостям PI входить в зруйновані клітини і зв'язується з ядерним хроматином. Оцінювали червону флуоресценцію, що випускається, (маркер загибелі клітин), використовуючи інвертований флуоресцентний мікроскоп (Zeiss), пов'язаний з камерою сполученого пристрою інтенсифікації заряду. Кількісну оцінку загальної флуоресценції проводили за допомогою системи аналізу зображення (Image Pro Plus).

Виявлено, що як IL-6, так і химера IL-6 захищають клітини гіпокампу від загибелі, індукованої NMDA. Виявлено, що через один день в культурі IL-6 в концентрації в межах від 0,1 до 10нг/мл захищала приблизно 50%-30% нейронів, відповідно, тоді як химера IL-6 в концентрації в межах від 0,05 до 1пг/мл захищала приблизно 40%-75% нейронів. Максимальна захисна дія химери IL-6 (захист 75%

клітин) спостерігалася при концентрації 0,5пг/мл (Fig.3).

Виявлено, що захисна дія IL-6 знижується згодом. Життєздатність нервових клітин знижувалася після обробки, і через два дні захисна дія IL-6 зберігалася тільки при концентрації 0,1нг/мл IL-6, при цьому захисна дія виявлялася тільки на 30% клітин на 5 день. У протилежність цьому, химера IL-6 в концентрації 0,5пг/мл володіла пролонгованою дією, зберігаючи приблизно 60% клітин на 5 день (Fig.4).

Присутність олігодендроцитів в органотипових зрізах визначали імуногістохімічним фарбуванням Gal-C, специфічним маркером олігодендроцитів. Через 2-3 тижні *in vitro* органотипові зрізи піддавали 30-хвилинному впливу 50мкМ NMDA, який індукує некротичну клітинну загибель клітин, присутніх в цих культурах. Дійсно, як було визначено за допомогою ОТ/ПЛР, після обробки NMDA в цих культурах припинялася експресія всіх МБР, яка характерна для олігодендроцитів.

Активация іонотрофних рецепторів глутамату являє собою первинну подію в процесі нейротоксичності, ініційованої збуджуючими амінокислотами. Первинні культури нейронів мозочка новонароджених пацюків (які містять >97% нейронів) використовували для дослідження ефектів химери IL6 на індуковану глутаматом нейротоксичність, і порівнювали з ефектами IL-6.

Первинні культури зернистих клітин мозочка готували з пацюків Sprague-Dawley 8-денного віку, як описане [Pizzi et al. 1993]. Клітини висівали на чашки, покриті полі-L-лізіном і культивували в основному середовищі Ігла, що містить 10% інактивованої теплом фетальної бичачої сироватки, глутамін (2мМ), гентаміцин (50мкг/мл) і KCl (25мМ), при щільності  $2,5 \times 10^5$  клітин/см<sup>2</sup>. Цитозинарабінозид (10мкМ) додавали до культур через 18 годин після посіву, щоб не допустити проліферацію нервових клітин. Експерименти проводили після культивування нейронів протягом 10 днів.

Якщо не обумовлено особливо, культури піддавали впливу 50мкМ глутамату протягом 15хв. в розчині Лока, не утримуючому Mg<sup>++</sup>. IL6 або химеру IL6 додавали за 5хв. до обробки глутаматом. Потім в чашки повертали кондиціоноване культуральне середовище при 37°C в атмосфері 95%-повітря/5% CO<sub>2</sub>, і через 18-24 години вимірювали життєздатність клітин.

Життєздатність клітин оцінювали через 18 годин за допомогою прижиттєвого фарбування сумішшю діацетату флуоресцеїну і йодиду пропідію, як описано раніше (Pizzi et al. 1993). Процент нейронів, що вижили в моношарі підраховували, оцінюючи співвідношення між фарбуванням діацетатом флуоресцеїну (зелені життєздатні клітини) і фарбуванням діацетатом флуоресцеїну плюс йодидом пропідію (сумарні клітини) на мікрофотографіях трьох репрезентативних полів кожного моношару. Значення брали для трьох аналогічних чашок.

У той час як IL-6 не індукував захисної дії на зернисті клітини мозочка пацюків в межах доз від 0,1 до 10нг/мл, химера IL-6 в концентрації 0,1пг/мл і 1пг/мл захищала, відповідно 40-20% нервових клітин від нейротоксичності, індукованої глутаматом.

том.

Приклад 10: Вплив химери IL6R/IL6 на виживаність нейронів верхніх шийних гангліїв після видалення NGF

Нейропротекторну дія, що надається химерою IL6R/IL6, також досліджували в системі культивування периферичних нейронів.

Нейрони верхніх шийних гангліїв (SCG) виділяли з верхніх шийних гангліїв пацюків PO-P3 (дні з 0 по 3 постнатального розвитку). Нейрони витримували протягом 4 днів в середовищі, утримуючому 5% сироватки пацюків і NGF. NGF потрібно нейронам для виживання, оскільки позбавлення NGF приводить до загибелі клітин внаслідок індукції апоптозу. Початкове середовище замінювали середовищем без NGF, що містить нейтралізуючі антитіла до фактора росту. У цій тимчасовій точці додавали 0,1 або 1мкг/мл химери IL6R/IL6 в 1% ДМСО в кінцевій концентрації. Культури витримували при 37°C протягом 24 годин.

Вплив химери IL6R/IL6 на виживаність нейронів, позбавлених NGF, через 24 години обробки оцінювали за допомогою мікроскопії, а також на основі мітохондріальної активності клітин, яку вимірювали в МТТ-аналізі, детально описаному Mosmann (1983). Концентрації химери IL6R/IL6, що використовуються не виявляли ніякої токсичної дії або дії на морфологію нейронів SCG, оброблених NGF.

Додавання химери IL6R/IL6 в концентрації 100нг/мл і 1мкг/мл спасало до 40% нейронів SCG від нейронної загибелі, яка була індукована видаленням NGF, як можна бачити за результатами МТТ-аналізу (Fig.6). Таким чином, химера IL6R/IL6 володіє нейропротекторною дією на периферичні нейрони, свідчаючи про активність при нейродегенеративних захворюваннях, подібних, наприклад, хворобі Альцгеймера, хворобі Паркінсона або БАС (бічному аміотрофічному склерозу).

Тепер, після повного опису винаходу, фахівцям в даній області буде зрозуміло, що те ж саме можна виконувати в широких межах еквівалентних параметрів, концентрацій і умов, не відходячи від суті і не виходячи за рамки винаходу і без надмірного експериментування.

Посилання

Abramsky, O, and Ovadia, H. (1997) *Frontiers in Multiple Sclerosis, clinical research and therapy*. Manin Dunitz publisher, London.

Ahmed S.A., Gogal, R.M, Jr., Walsh, (1994) A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation, *J. of Immunol. Methods* 170, 211-224.

Anderson, D.J. (1997) Cellular and molecular biology of neural crest cell lineage determination. *Trends Genet.* 13, 276-280.

Bahr, Long-term hippocampal slices: a model system for investigating synaptic mechanisms and pathologic processes. *J Neurosci Res*, 42, 294-305.

Bertolono, C., Bille, K., Ortonne, J.P. and Ballotti, R. (1996) Regulation of tyrosinase gene expression by cAMP in B16 melanoma involves two CATGTG motifs surrounding the TATA box: implication of the microphthalmia gene product. *J. Cell.Biol.* 134,747-755.

Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, Bhatt A, Frank DA, Rozovsky I, Stahl N, Yancopoulos GD, Grönberg ME (1997) Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* 278, 477-483.

Cannella, B., Hoban, C.J. Gao, Y.L. et al (1998) The neuregulin, glial growth factor 2, diminishes autoimmune demyelination and enhances remyelination in a chronic relapsing model for Multiple Sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 10100-10105.

Chebath, J., Fischer, D., Kumar, A., Oh, J.W., Kollet, O., Lapidot, T., Fischer, M., Rose-John, S., Nagler, A., Slavin, S. and Revel, M. (1997) Interleukin-6 receptor- Interleukin-6 fusion proteins with enhanced Interleukin-6 type pleiotropic activities. *Eur. Cytokine Netw.* 8, 359-365.

Chen, L.E., Liu, K. Seaber, A.V., Katragadda, S., Kirk, C and Urbaniak, J.R. (1998) Recombinant human glial growth factor 2 (rhGGF2) improves functional recovery of crushed peripheral nerve (a double-blind study) *Neurochem. Int.*, 33, 341-351.

Fraser, S. E. and Bronner-Fraser, M. (1991). Migrating neural crest cells in the trunk of the avian embryo are multipotent. *Development* 112, 913-920.

Gadient, R.A. and Otten, U.H. (1997) Interleukin-6 (IL-6) - A molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog. Neurobiol.*, 52, 379-390.

Hartung, H.P., van der Meche, F.G, Pollard, J.D, (1998) Guillain-Barre syndrome, CIDP and other chronic immune-mediated neuropathies. *Curr. Opin. Neurol.*, 11,497-513.

Hirota, H., Kiyama, H., Kishimoto, T. and Taga, T. (1996) Accelerated nerve regeneration in mice by upregulated expression of Interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma, *J. Exp. Med.*, 183, 2627-2634.

Ho, P.R., Coan, G.M., Cheng, E.T., Niell, C., Tarn, D.M., Shou, H., Sierra, D, and Terris, D.J. (1998) Repair with collagen tubules linked with brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor in a rat sciatic nerve injury model. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 124, 761-766.

Ip NY, Nye SH, Boulton TG, Davis S, Taga T, Li Y, Birren SJ, Yasukawa K, Kishimoto T, Anderson DJ, et al (1992) CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the IL-6 signal transducing receptor component gp130. *Cell* 69:1121-32.

Jessen, K. R. and Mirsky, R. (1991). Schwann cell precursors and their development. *Glia* 4,185-194.

Jung, M., Kramer, E., Grzenkowski, M, Blakemore, W., Aguzzi, A., Khazai, K., Chlichia, K., von Blankenfeld, O., Kettenmann, and Trotter, J. (1995). Lines of Murine Oligodendroglial Precursor Cells Immortalized by an Activated neu Tyrosine Kinase Show Distinct Degrees of Interaction with Axons In Vitro and In Vivo. *Eur. J. of Neuroscience* 7, 1245-1265.

Kahn, M.A. and De Vellis, J, (1994) Regulation of an oligodendrocyte progenitor cell line by the interleukin-6 family of cytokines. *Glia*. 12, 87-98.

Kollet, O., Aviram, R., Chebath, J., ben-Hur, H., Nagler, A., Shultz, L, Revel, M, and Lapidot, T, (1999) The soluble IL-6 receptor/IL-6 fusion protein enhances maintenance and proliferation of human

CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup>/SCID repopulating cells (SRC) in vitro. *Blood*, in press.

Kioussi, C and Gruss, P. (1996) Making a Schwann. *Trends Genet.*, 12, 84-86.

Lee, D.A., Zurawel, R.H. and Windebank, A.J, (1995) Ciliary Neurotrophic factor expression in Schwann cells is induced by axonal contact. *J. Neurochem.* 65, 564-568.

Lemke, G. and Chao, M. (1988), Axons regulate Schwann cell expression of the major myelin and NGF receptor genes. *Development* 102, 499.

Li, R., (1998) Culture methods for selective growth of normal rat and human Schwann cells, *Meth, Cell. Biol.*, 57, 167-186.

Lipton, S, A., and Rosenberg, P A. (1994). Excitatory amino acids as a Final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med*, 330, 613-22.

Lubetzki, C, Demerens, C, Anglade, P., Villarroya, H., Frankfurter, A, Lee., V. M.-Y., and Zalc, B. (1993) Even in culture, oligodendrocytes myelinate solely axons. *PNAS* 90, 6820-6824.

Mayer, M., Bhakoo, K. and Noble, M. (1994) Ciliary Neurotrophic factor and Leukemia Inhibitory factor promote the generation, maturation and survival of oligodendrocytes in vitro. *Development*, 120, 143-153.

McDonald, J.W, Althomsons, S.P., Hyrc, K, L., Choi, D. W., and Goldberg, Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nat Med*, 4, 291-7.

Medhurst, A.D., Hamson, dbcAMP, Read, S.J., Campbell, C.A., Robbins, M.J. and Pangalos, M.N. (2000) The use of TaqMan. RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models. *J. Neurosci. Methods* 15, 9-20.

Mendel, I., Katz, A., Kozalc, N., Ben-Nun. A. and Revel, M. (1998) Interleukin-6 functions in autoimmune encephalomyelitis; a study in gene-targeted mice. *Eur. J. Immunol*, 28, 1727-1737.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol, Methods* 65, 55-63.

Murakami, M., Hibi, M., Nakagawa, N., Nakagawa, T., Yasukawa, K., Yamanishi, K., Taga, T. and Kishimoto, T. (1993) IL-6 induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 260, 1808-1810.

Novick, D., Shulman, L.M., Chen, L, and Revel, M. (1992) Enhancement of interleukin-6 cytostatic effect on human breast carcinoma cells by soluble IL-6 receptor from urine and reversion by monoclonal antibodies. *Cytokine*, 4, 6-11.

Panioni, L., Garcia, J. H., and Gutierrez, J.A. Cerebral white matter is highly vulnerable to ischemia. *Stroke*, 27,1641-6.

Pizzi M., Fallacara, C, Arrighi, V., Memo, M., and Spano, P.F., (1993) Attenuation of excitatory amino acid toxicity by metabotropic glutamate receptor agonists and aniracetam in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurochem*, 61,683-9.

Pohlau, D., Aktas, O., Epplen, C. Hartung, H.P., Hoffmann, V. and Przuntek, H. (1998) Promoting remyelination as a future therapeutic principle in Multiple Sclerosis. *Nervenarzt*, 69, 841-850.

Sahenk, Z., Seharaseyon, J., and Mendell, J.R. (1994) CNTF potentiates peripheral nerve regeneration. *Brain Res*, 655, 246-50.

Stocker, K.M, Sherman, L., Ree, S. and Ciment, G. (1991) Basic FGF and TGF-beta1 influence commitment to melanogenesis in neural crest-derived cells of avian embryos. *Development*, 111, 635-645.

Taga, T., Hibin M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T. and Kishimoto, T. (1989) Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer gp130. *Cell*, 58, 573-581.

Topliko, P., Murphy, P. and Charnay, P. (1996) Embryonic development of Schwann cells: Multiple roles for Neuregulins along the pathway, *Mol. Cell. Neurosci*, 8, 71-75.

Toulmond, S., Vige, X., Fage, D., and Benavides, J. (1992), Local infusion of interleukin-6 attenuates the neurotoxic effects of NMDA on rat striatal

cholinergic neurons. *Neurosci Lett*, 144, 49-52.

Trapp, B. D., Hauer, P., and Lemke, G. (1988), Axonal regulation of myelin protein mRNA levels in actively myelinating Schwann cells. *J. Neurosci*, 8, 3515.

Trojaborg W (1998) Acute and chronic neuropathies: new aspects of Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating poly neuropathy, an overview and an update. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 107, 303-316.

Watanabe, A., Takeda, K., Plopis B. and Tachibana, M. (1998) Epistatic relationship between Waardenburg syndrome genes MITF and Pax3, *Nature Genet.*, 18, 283-286.

Yamada, M., and Hatanaka, H. (1994). Interleukin-6 protects cultured rat hippocampal neurons against glutamate-induced cell death. *Brain Res*. 643, 173-80.

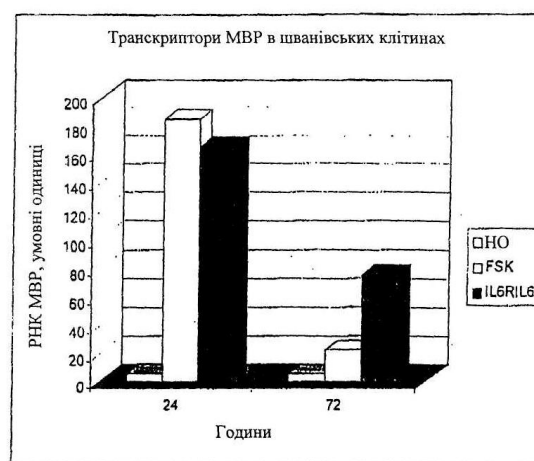


Fig. 1

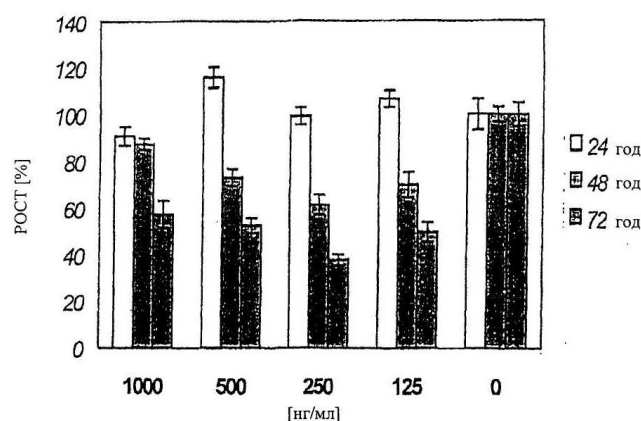
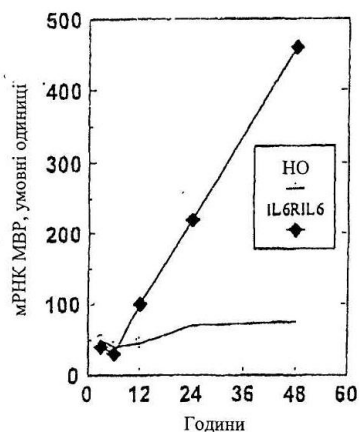
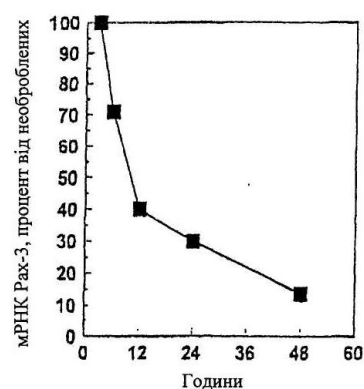


Fig. 2



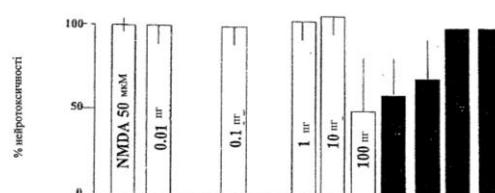
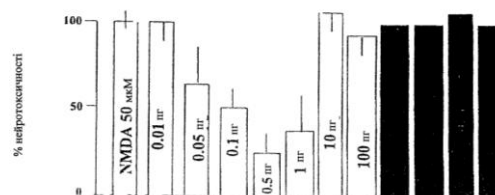
A



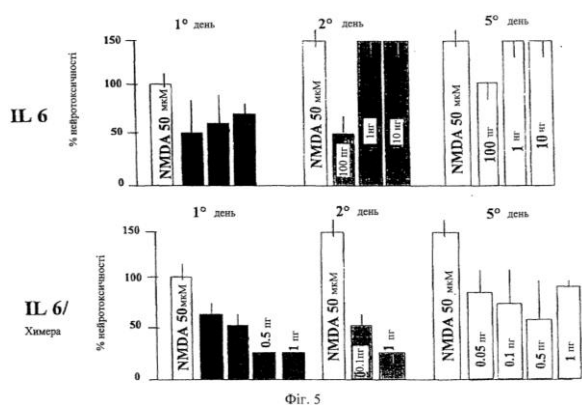
B

Фіг. 3

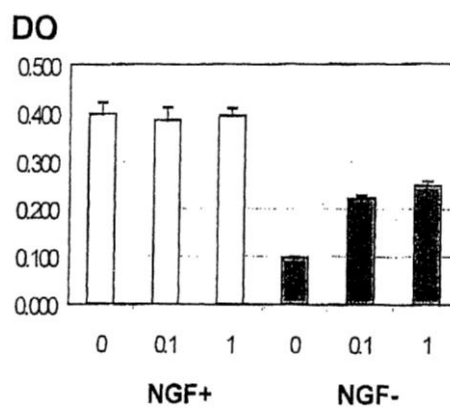
IL 6

IL 6/  
Химера

Фіг. 4



Фіг. 5



Фіг. 6