



УКРАЇНА

(19) UA (11) 80396 (13) C2
(51) МПК (2006)
A61K 38/20
A61P 25/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ IL-18-ЗВ'ЯЗУЮЧОГО БІЛКА ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЗАКРИТОЇ ТРАВМИ ГОЛОВИ

1

(21) 20031212328
(22) 23.05.2002
(24) 25.09.2007
(86) РСТ/ЕР02/05666, 23.05.2002
(31) 01112067.2
(32) 25.05.2001
(33) ЕР
(46) 25.09.2007, Бюл. № 15, 2007 р.
(72) Шохам Естер, ІТ
(73) АРЕС ТРЕЙДІНГ С.А., СН
(56) WO A 99/46248 16.09.1999
ЕР А 0974600 26.01.2000
WO A 99/09063 25.02.1999
(57) 1. Застосування інгібітору IL-18 для одержання лікарського препарату для лікування закритої травми голови, викликаній не інсультом і не ішемічним ушкодженням головного мозку, де інгібітор IL-18 вибраний з IL-18-зв'язуючого білка (IL-18BP), його ізоформи, мутеїну, злитого білка або функціонального похідного, що зберігають біологічну активність IL-18BP.
2. Застосування за п. 1, де інгібітор IL-18 глікозилюваний в одному або декількох місцях.
3. Застосування за п. 1 або 2, де злитий білок включає злиття з імуноглобуліном (Ig).
4. Застосування за будь-яким з пп. 1-3, де функціональне похідне включає щонайменше одну складову, прикріплену до однієї або більше функціональних груп, які є одним або більше бічними ланцюгами на залишках амінокислот.
5. Застосування за пунктом 4, де вказаною складовою є частина поліетиленгліколю (PEG).
6. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де лікарський препарат, крім того, містить інтерферон для одночасного, послідовного або роздільного застосування.
7. Застосування за пунктом 6, де інтерфероном є інтерферон- α або інтерферон- β .
8. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де лікарський препарат, крім того, включає фактор некрозу пухлин (TNF) для одночасного, послідовного або роздільного застосування.
9. Застосування за пунктом 8, де TNF є TNF- α .
10. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де лікарський препарат, крім того, включає протизапальний агент для одночасного, послідовного або роздільного застосування.

2

11. Застосування за пунктом 10, де протизапальним агентом є COX-інгібітор, особливо COX-2 інгібітор.
12. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де лікарський препарат, крім того, включає антиоксидант для одночасного, послідовного або роздільного застосування.
13. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де інгібітор IL-18 застосовують в кількості близько 0,001-100 мг/кг ваги тіла або близько 0,01-10 мг/кг ваги тіла, або близько 0,1-5 мг/кг ваги тіла, або близько 1-3 мг/кг ваги тіла.
14. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де інгібітор IL-18 вводять підшкірно.
15. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де інгібітор IL-18 вводять щодня.
16. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де інгібітор IL-18 вводять через день.
17. Застосування інгібітору IL-18 для одержання лікарського препарату для лікування ускладнень або пізніх результатів закритої травми голови, викликаній не інсультом і не ішемічним ураженням мозку, де інгібітор IL-18 вибраний з IL-18-зв'язуючого білка (IL-18BP), його ізоформи, мутеїну, злитого білка або функціонального похідного, що зберігають біологічну активність IL-18BP.
18. Застосування за п. 17, де інгібітор IL-18 глікозилюваний в одному або декількох місцях.
19. Застосування за п. 17 або 18, де злитий білок включає злиття з імуноглобуліном (Ig).
20. Застосування за будь-яким з пп. 17-19, де функціональне похідне включає щонайменше одну складову, прикріплену до однієї або більше функціональних груп, які є одним або більше бічними ланцюгами на залишках амінокислот.
21. Застосування за п. 20, де вказаною складовою є частина поліетиленгліколю (PEG).
22. Застосування за будь-яким з пп. 17-21, де лікарський препарат, крім того, містить інтерферон для одночасного, послідовного або роздільного застосування.
23. Застосування за п. 22, де інтерфероном є інтерферон- α або інтерферон- β .
24. Застосування за будь-яким з пп. 17-23, де лікарський препарат, крім того, включає фактор некрозу пухлин (TNF) для одночасного, послідовного або роздільного застосування.

(19) UA (11) 80396 (13) C2

25. Застосування за п. 24, де TNF є TNF- α .
26. Застосування за будь-яким з пп. 17-25, де лікарський препарат, крім того, включає протизапальний агент для одночасного, послідовного або роздільного застосування.
27. Застосування за п. 26, де протизапальним агентом є COX інгібітор, особливо COX-2 інгібітор.
28. Застосування за будь-яким з пп. 17-27, де лікарський препарат, крім того, включає антиоксидант для одночасного, послідовного або роздільного застосування.

29. Застосування за будь-яким з пп. 17-28, де інгібітор IL-18 застосовують у кількості близько 0,001-100 мг/кг ваги тіла або близько 0,01-10 мг/кг ваги тіла, або близько 0,1-5 мг/кг ваги тіла, або близько 1-3 мг/кг ваги тіла.
30. Застосування за будь-яким з пп. 17-29, де інгібітор IL-18 вводять підшкірно.
31. Застосування за будь-яким з пп. 17-30, де інгібітор IL-18 вводять щодня.
32. Застосування за будь-яким з пп. 17-31, де інгібітор IL-18 вводять через день.

Даний винахід відноситься до сфери патологічних станів головного мозку. Точніше, він відноситься до застосування інгібітору IL-18 для лікування і/або запобігання пошкодженню центральної нервової системи (ЦНС), особливо, травматичного пошкодження головного мозку.

У 1989 році була описана ендотоксин-індукована активність сироватки, яка індукує інтерферон- γ (IFN- γ), одержаний в клітинах селезінки мишей (Nakamura et al., 1989). Дана активність сироватки діяла не як прямий індуктор IFN- γ , а швидше як коstimулятор разом з IL-2 або мітогенами. У спробі виділити активну речовину з сироватки мишей після впливу ендотоксину був виявлений, ймовірно, гомогенний білок масою 50-55 кД. Оскільки інші цитокіни можуть діяти як коstimулятори продукції IFN- γ , через нездатність нейтралізуючих антитіл до IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 або TNF нейтралізувати активність сироватки передбачили, що вона визначалася особливим фактором. У 1995 році тими ж дослідниками було продемонстровано, що ендотоксин-індукований коstimулятор продукції IFN- γ знаходиться в екстрактах печінки мишей, заздалегідь підданих впливу Р.аспес (Okamura et al., 1995). У даній моделі популяція печінкових макрофагів (клітини Купфера) збільшувалася, і у даних мишей низькі дози бактерійного ліпополісахариду (LPS), які у заздалегідь непідготовлених мишей не були смертельними, ставали смертельними. Фактор, названий П'АБРу-індукуючим фактором (IGF) і пізніше позначений як інтерлейкін-18 (IL-18), був очищений до гомогенності з 1200 грамів печінки мишей, підданих впливу Р.аспес. Вироджені олігонуклеотиди, що походять з послідовностей амінокислот очищеного IL-18, застосовували для клонування кДНК IL-18 мишей. IL-18 є білком з масою 18-19 кД, що складається з 157 амінокислот, який не має очевидної схожості з яким-небудь пептидом з баз даних. Молекули матричної РНК для IL-18 і інтерлейкіну-12 (IL-12) легко визначають в клітинах Купфера і активованих макрофагах. Реконбінантний IL-18 стимулює IFN-гамма більш ефективно, ніж IL-12, ймовірно, через окремий механізм (Micallef et al., 1996). Подібно до ендотоксин-індукованої активності сироватки, IL-18 стимулює IFN- γ не самостійно, а діє переважно як коstimулятор з мітогенами або IL-2. IL-18 посилює проліферацію Т-клітин, ймовірно по IL-2-залежному шляху і посилює продукцію цитокінів Th1 in vitro і надає синергічну дію при поєднанні з IL-12 відносно продукції IFN- γ (Maliszewski et al., 1990).

Після клонування мишачої форми, у 1996 р. було повідомлено про послідовність кДНК IL-18 людини (Ushio et al., 1996).

Шляхом клонування IL-18 з уражених тканин і вивчення експресії гена IL-18 була виявлена тісна асоціація даного цитокіну з аутоімунними захворюваннями. У мишей без ожиріння з діабетом (NOD) спонтанно розвивається аутоімунний інсуліт і діабет, які можуть бути посилені і синхронізовані шляхом однієї ін'єкції циклофосфаміду. Наявність мРНК IL-18 продемонстрована методом ПЛР із зворотною транскриптазою в підшлунковій залозі NOD-мишей під час ранніх стадій інсуліту. Рівні мРНК IL-18 швидко збільшувалися після лікування циклофосфамідом і передували збільшенню мРНК IFN- γ і, згодом, діабету. Цікаво, що дана кінетика повторює таку мРНК IL-12-p40, приводячи до тісної кореляції між індивідуальними рівнями мРНК. Клонування кДНК IL-18 з панкреатичної РНК з подальшим секвенуванням виявило ідентичність з послідовністю IL-18, клонованою з клітин Купфера і заздалегідь активованих in vivo макрофагів. Також макрофаги NOD-мишей реагували на циклофосфамід експресією гена IL-18, в той час як макрофаги мишей лінії Balb/c, оброблених паралельно, не реагували. Отже, регуляція експресії IL-18 порушена у NOD-мишей з аутоімунною патологією і тісно асоційована з розвитком діабету (Rothe et al., 1997).

IL-18 грає потенційну роль в імунорегуляції або в запаленні шляхом посилення функціональної активності Fas-ліганду на клітинах Th1 (Conti et al., 1997). IL-18 також експресується в корі надниркових залоз і, отже, може бути секретованим нейроімунomodулятором, що грає важливу роль в гармонійній роботі імунної системи у відповідь на стресовий вплив (Chater, 1986).

In vivo IL-18 утворюється шляхом розщеплення про-IL-18 і, ймовірно, його ендогенна активність відповідає за продукцію IFN- γ при смертності, опосередкованій Р.аспес і LPS. Зрілий IL-18 утворюється з його попередника за допомогою IL-1 β -конвертуючого ферменту (IL-1бета-конвертуючий фермент, ICE, каспаза-1).

Рецептор IL-18 складається як мінімум з двох компонентів, діючих спільно при скріпленні ліганду. Високо- і низькоафінні зв'язуючі ділянки для IL-18 були виявлені на стимульованих IL-12 Т-клітинах мишей (Yoshimoto et al., 1998), що дозволило передбачити наявність рецепторного комплексу з множиною ланцюгів. До цього часу були ідентифіковані дві субодиниці рецептора, що оби-

дві належать до сімейства рецепторів IL-1 (Pamet et al., 1996). У трансдукцію сигналу IL-18 залучена активація NF- κ B (DiDonato et al., 1997).

Недавно з сечі людини був виділений розчинний білок, що володіє високою афінністю до IL-18, і були описані кДНК людини і миші (Novick et al., 1999; WO 99/09063). Даний білок був названий IL-18-зв'язуючим білком (IL-18BP).

IL-18BP є не позаклітинним доменом одного з відомих рецепторів IL-18, а секретованим, який зустрічається в природі, циркулюючим білком. Він належить до нового сімейства секретованих білків. Дане сімейство, крім того, включає декілька білків, що кодуються поксвірусом, які володіють високою гомологічністю з IL-18BP (Novick et al., 1999). IL-18BP постійно експресується в селезінці, належить до суперсімейства імуноглобулінів і має обмежену гомологію з рецептором IL-1 типу II. Його ген локалізований на людській хромосомі 11q13 і в геномній послідовності розміром 8,3 т.п.н. не виявлено екзону, що кодує трансмембранний домен (Novick et al., 1999).

Чотири людські і дві мишачі ізоформи IL-18BP, що виходять в результаті сплайсінгу мРНК, виявлені в різних бібліотеках кДНК, були одержані, очищені і оцінені відносно біологічної активності зв'язування і нейтралізації IL-18 (Kim et al., 2000). Людська ізоформа α IL-18BP (IL-18BP α) показала найбільшу афінність до IL-18 з швидким зв'язуванням і повільним від'єднуванням і константою дисоціації ($K(d)$), що становить 399 пМ. IL-18BP α має Ig-домен такий же як IL-18BP α , крім 29 С-кінцевих амінокислот; $K(d)$ IL-18BP α в 10 раз менше (2,94 нМ). Проте, IL-18BP α і IL-18BP α нейтралізують IL-18 > 95% при молярному надлишку в два рази. У ізоформ IL-18BP β і IL-18BP δ відсутній повний Ig-домен і відсутня здатність до зв'язування або нейтралізації IL-18. Мишачі ізоформи IL-18BP α і IL-18BP δ , що володіють ідентичним Ig-доменом, також нейтралізують >95% мишачого IL-18 примілярному надлишку в два рази. Однак, мишачий IL-18BP δ , який володіє такою ж С-кінцевою послідовністю, що і людський IL-18BP α , також нейтралізує людський IL-18. Молекулярне моделювання дозволило ідентифікувати великі комбіновані електростатичні і гідрофобні зв'язуючі ділянки в Ig-домени IL-18BP, які можуть відповідати за його високоафінне зв'язування з лігандом (Kim et al., 2000).

Травматичне пошкодження головного мозку (ТБІ), яке також просто називається травмою голови або закритою травмою голови (СНІ), відноситься до пошкодження центральної нервової системи, при якому пошкодження головного мозку викликане зовнішнім ударом по голові. Це частіше за все зустрічається при автомобільних або велосипедних аваріях, але може також розвиватися внаслідок неповного утоплення, серцевого приступу, інсульту або інфекцій. Даний тип травматичного пошкодження головного мозку звичайно розвивається внаслідок нестачі кисню або кровопостачання головного мозку і внаслідок цього може бути віднесений до «аноксичного пошкодження».

Закрите пошкодження голови розвивається внаслідок удару по голові, наприклад, при автомо-

більній аварії або при падінні. У цьому випадку, череп ударяється об стаціонарний об'єкт, і головний мозок, що знаходиться всередині черепа, повертається і скручується навколо осі (стовбура головного мозку), викликаючи місцеве або поширене пошкодження. Також, головний мозок, м'яка маса, оточена рідиною, що дозволяє йому «плавати», може рикошетувати від черепа, що сприяє подальшому пошкодженню.

Після травми може мати місце період несвідомого стану, який може продовжуватися хвилини, тижні або місяці. Внаслідок обертання і віддачі, пацієнт з травматичним пошкодженням головного мозку звичайно має пошкодження або контузію багатьох відділів головного мозку. Це називається дифузним пошкодженням або «нереактивним пошкодженням» головного мозку. Типи пошкодження головного мозку, що є при нереактивних пошкодженнях, можуть бути класифіковані як первинні або вторинні.

Первинне пошкодження головного мозку розвивається в момент травми, переважно в місцях впливу, особливо, коли має місце перелом черепа. Великі контузії можуть бути асоційовані з внутрішньомозковим крововиливом або можуть супроводжуватися кортикальними розривами. Розсіяні пошкодження аксонів з'являються внаслідок зсуву і деформації розтягнення нейрональних паростків, що викликаються ротаційними рухами головного мозку всередині черепа. Також можуть мати місце невеликі геморагічні пошкодження або дифузне пошкодження аксонів, що може бути визначено тільки за допомогою мікроскопа.

Вторинне пошкодження головного мозку розвивається внаслідок ускладнень, що розвиваються після моменту травми. Ці пошкодження включають внутрішньочерепний крововилив, травматичне пошкодження позачерепних артерій, утворення внутрішньочерепних гриж, гіпоксичне пошкодження головного мозку або менингіт.

«Відкрита травма голови» являє собою видиме пошкодження голови і може розвинути внаслідок вогнепального поранення, нещасного випадку або пошкодження головного мозку предметом, що пройшов через череп («реактивне пошкодження головного мозку»). Для даного типу травм голови більш характерне пошкодження специфічної ділянки головного мозку.

Так зване «м'яке пошкодження головного мозку» може розвиватися без втрати свідомості і, можливо, супроводжуватися тільки почуттям оніміння або сплутаного стану свідомості протягом короткого часу. Хоча забезпечуваний медичний догляд може бути мінімальним, пацієнти з пошкодженням головного мозку без коми можуть відчувати симптоми і порушення, схожі на такі, що відчуються тими, що вижили після травматичної коми.

У відповідь на травму, в головному мозку розвиваються зміни, які вимагають спостереження для запобігання подальшому пошкодженню. Розмір головного мозку часто збільшується після серйозної травми голови. Цей стан називається набуханням головного мозку і розвивається при збільшенні кількості крові в головному мозку. З плином захворювання вода може скучуватися в головному мозку, що називається набряком голо-

ного мозку. Як набухання головного мозку, так і набряк головного мозку приводить до надмірного тиску в головному мозку, який називається внутрішньочерепним тиском ("ICP").

Кома є тривалим періодом несвідомого стану, що розвивається безпосередньо після травматичного пошкодження голови.

Існує декілька ступенів коми. Ступені коми можуть бути оцінені по прогресуванню міри реагування пацієнта з травмою голови. У гострій фазі травми голови застосовується шкала коми Глазго. При поліпшенні стану пацієнта або його стабілізації застосовується шкала «Rancho Los Amigos Scale», яка оцінює міру когнітивного (розуміння і здібності до міркування) мислення.

Пошкодження головного мозку часто приводить до персистуючих порушень, таких як посттравматична епілепсія, персистуючий вегетативний стан або посттравматична деменція.

Пошкодження спинного мозку є іншим типом пошкоджень ЦНС. Пошкодження спинного мозку є причиною більшості госпіталізацій з паралепією і тетраплегією. Більше 80% розвиваються внаслідок дорожніх аварій. Клінічно виділяють дві головних групи пошкоджень: відкриті пошкодження і закриті пошкодження.

Відкриті пошкодження викликають пряму травму спинного мозку і нервових корінців. Проривні пошкодження можуть викликати поширені розриви і крововиливи. Закриті пошкодження, що є причиною більшості спинномозкових пошкоджень, звичайно асоційовані з переломом/зміщенням хребтного стовпа, що звичайно визначається радіологічно. Пошкодження спинного мозку залежить від протяжності пошкодження кісток і розглядається як дві головні стадії: первинне пошкодження, яким є удари, розтин нервових волокон і геморагічний некроз, і вторинне пошкодження, яким є екстрадуральна гематома, інфаркт, інфекція і набряк.

Пізні результати пошкодження спинного мозку включають: висхідну і низхідну антероградну дегенерацію пошкоджених нервових волокон, посттравматичну сирингомієлію і системні вияви паралепії, такі як інфекції сечового тракту і грудної клітини, пролежні і м'язова слабкість.

Патологія травматичного пошкодження головного мозку є комплексною і до цього часу неясною. Науково-дослідні праці в останні десять років підкреслюють важливу роль цитокінів, що вивільняються системно і локально в підболонокковому відділі після пошкодження головного мозку і передбачають наявність подвійного ефекту прозапальних цитокінів, таких як TNF, IL-6 або IL-8, на основі виявлення залежних від часу корисних і побічних ефектів даних медіаторів (Morganti-Kossmann et al., 1997; Kossmann et al., 1997; Shohami et al., 1999; Scherbel et al., 1999; Whalen et al., 2000). Як описано вище, недавно відкритим цитокіном сімейства IL-1 є IL-18. Недавні дослідження продемонстрували, що IL-18 постійно експресується в ЦНС мишей, щурів і людини *in vivo* (Culhane et al., 1998; Jander and Stall, 1998; Prinz et al., 1999; Fassbender et al., 1999; Wheeler et al., 2000), так само, як і в первинних культурах астроцитів і мікроглії, але не нейронів, *in vitro* (Conti et al.,

1999). Підвищені рівні IL-18 визначали в спинномозковій рідині (СМР) пацієнтів із запальними захворюваннями ЦНС, такими як бактерійний менингіт і вірусний менингоенцефаліт, але не в СМР у пацієнтів з розсіяним склерозом (MS) (Fassbender et al., 1999). На відміну від виявленого, як правило, низького підболоноккового рівня IL-18 у пацієнтів з MS, в спинному мозку щурів лінії Lewis з експериментальним аутоімунним енцефаломієлітом (EAE), моделі дослідження на тваринах MS, була продемонстрована підвищена експресія мРНК IL-18 (Jander and Stall, 1998). Експресія і функціональне значення IL-18 при нейротравмі до цього часу не досліджувалося.

Даний винахід відноситься до патофізіологічної ролі IL-18 при захворюваннях ЦНС. Він оснований на виявленні того, що лікування мишей інгібіторами IL-18, через одну годину або три дні після експериментального закритого пошкодження голови (СНІ), приводить до поліпшення відновлення і меншої протяжності пошкодження головного мозку в порівнянні з контрольними тваринами. Тому даний винахід відноситься до застосування інгібітору IL-18 для одержання лікарського препарату для лікування і/або запобігання пошкодженню центральної нервової системи (ЦНС) і зокрема травматичному пошкодженню головного мозку.

Застосування комбінацій інгібітору IL-18 з інтерфероном і/або TNF, і/або інгібіторами запалення, і/або антиоксидантами також забезпечується згідно з даним винаходом. З метою застосування підходів генної терапії для доставки інгібітору IL-18 в пошкоджені тканини або клітини, подальші аспекти даного винаходу відносяться до застосування молекул нуклеїнових кислот, що включають кодуєчу послідовність інгібітору IL-18 для лікування і/або запобігання пошкодженню ЦНС. Даний винахід також відноситься до застосування клітин, генетично сконструйованих з метою експресії інгібіторів IL-18, для запобігання і/або лікування пошкодження ЦНС.

Фіг.1 показує гістограму, що зображує рівень в плазмі внутрішньомозкового IL-18 (нг/мл) в цілому мозку (заштрихований), в лівій півкулі (чорний), або в правій півкулі (сірий) в різних умовах.

Фіг.2 показує розвиток оцінки по шкалі NSS (Neurological Severity Score) через 1 годину (год.), 24 год., 72 год. або 168 год. після травми, з введенням внутрішньочеревинно 50 мкг IL-18BP через 1 год. після травми (квадрати) або з ін'єкцією тільки розчинника (контроль, кола).

Фіг.3 показує Δ NSS, що оцінюється через 24 год., 72 год. або 168 год. після травми, з введенням внутрішньочеревинно 50 мкг IL-18BP через 1 год. після травми (квадрати) або з ін'єкцією тільки розчинника (контроль, кола).

Фіг.4 показує Δ NSS, що оцінюється через 1 год., 24 год., 3 дні (д), 7 д або 14 д після травми з введенням внутрішньочеревинно 50 мкг IL-18BP однократно на 3-й після травми (ромби) або в подвійній дозі через 1 годину і на 3-й день після травми (квадрати) або ін'єкції тільки розчинника (контроль, трикутники).

Даний винахід оснований на виявленні статистично достовірного корисного ефекту інгібітору IL-

18 на відновлення після пошкодження головного мозку в моделі закритої травми голови на мишах. Відповідно до даного винаходу, надалі було виявлено, що IL-18 підвищується в головному мозку і спинномозковій рідині після травматичного пошкодження головного мозку, що показує, що даний прозапальний цитокін грає важливу роль в патогенезі пошкодження головного мозку.

Отже, даний винахід відноситься до застосування інгібітору IL-18 для одержання лікарського препарату для лікування і/або запобігання пошкодженню центральної нервової системи (ЦНС).

Даний винахід крім того відноситься до застосування інгібітору IL-18 для одержання лікарського препарату для лікування і/або запобігання ускладненням і пізнім наслідкам пошкодження ЦНС.

У переважних варіантах втілення винаходу пошкодженням ЦНС є травматичне пошкодження головного мозку або закрита травма голови.

У подальших переважних варіантах втілення винаходу пошкодженням ЦНС є пошкодження спинного мозку.

Крім того, в подальшому переважному варіанті втілення винаходу пошкодження головного мозку має судинне походження.

У контексті даного винаходу, вираження «пошкодження центральної нервової системи» або «пошкодження ЦНС» відноситься до будь-якого пошкодження головного або спинного мозку, незалежно від періоду часу від початку або причини, що його викликала. Причиною може бути, наприклад, механічний вплив або інфекція. Пошкодження ЦНС, його клінічні симптоми і наслідки детально описані в розділі «Передумови винаходу». Пошкодження ЦНС включає, наприклад, травму або інше пошкодження головного або спинного мозку і також може бути назване нейротравмою.

Пошкодження головного мозку може, наприклад, включати або приводити до одного або декількох виявів з наступного: 1. погіршення уваги; 2. порушення когнітивних функцій; 3. порушення мовних функцій; 4. порушення пам'яті; 5. порушення поведінки; 6. моторні розлади; 7. будь-які інші неврологічні порушення.

Пошкодження спинного мозку може, наприклад, приводити до розвитку параплегії або тетраплегії.

Ускладнення або пізні результати пошкодження ЦНС також можна лікувати і/або запобігти відповідно до даного винаходу. Ускладнення і пізні результати пошкодження головного мозку описані вище в розділі «Передумови винаходу». Вони включають, але не обмежені вказаним, наприклад, кому, менінгіт, посттравматичну епілепсію, посттравматичну деменцію, дегенерацію нервових волокон або посттравматичну сирингомієлію, або крововилив.

Даний винахід також відноситься до застосування інгібіторів IL-18 для одержання лікарського препарату для лікування і/або запобігання будь-якому пошкодженню головного мозку судинного походження, такого як гіпоксичне пошкодження головного мозку при церебральному інфаркті, ішемія, цереброваскулярна катастрофа або інсульт.

Терміни «лікування» і «запобігання», що застосовується в даному описі, розуміють як часткове або повне запобігання, інгібування, послаблення, поліпшення або регресію одного або більше симптомів або причин пошкодження ЦНС, а також симптомів, захворювань або ускладнень, супроводжуваних пошкодженням ЦНС. При «лікуванні» пошкодження ЦНС речовини згідно з даним винаходом вводять після початку захворювання, «запобігання» відноситься до введення речовин до того, як у пацієнта будуть помічені симптоми захворювання.

Лікування пошкодження ЦНС є переважним відповідно до даного винаходу. Переважно, з метою лікування пошкодження ЦНС, інгібітор IL-18 вводять по можливості якнайшвидше після пошкодження ЦНС, наприклад, протягом першої години після пошкодження. Однак, як показано в прикладах, нижче, було показано, що один інгібітор IL-18 надає свою позитивну дію на пошкодження головного мозку навіть при введенні через три дні після розвитку пошкодження головного мозку. Тому, з метою лікування пошкодження ЦНС, переважне введення інгібітору IL-18 протягом трьох днів після пошкодження.

Термін «інгібітор IL-18» в контексті даного винаходу відноситься до будь-якої молекули, що модулює продукцію і/або дію IL-18 таким чином, що продукція і/або дія IL-18 ослабляється, меншає або частково, істотно або повністю запобігається або блокується. Термін «інгібітор IL-18» містить в собі інгібітори продукції IL-18, так само як інгібітори дії IL-18.

Інгібітором продукції може бути будь-яка молекула, що негативно впливає на синтез, процесінг або дозрівання IL-18. Інгібітори, що розглядаються згідно з даним винаходом, можуть бути, наприклад, супресорами експресії гена інтерлейкіну IL-18, антисмисловими мРНК, що зменшують і що запобігають транскрипції мРНК IL-18 або ведуть до деградації мРНК, білками, що порушують правильне укладання, або частково або істотно запобігають секреції IL-18, протеазами, сприяючими деградації IL-18, після того, як він був синтезований, інгібіторами протеаз, що розщеплюють про-IL-18 з метою утворення зрілого IL-18, такими як інгібітори каспази-1 і подібними.

Інгібітором дії IL-18 може бути, наприклад, антагоніст IL-18. Антагоністи можуть зв'язувати або ізолювати саму молекулу IL-18 з достатньою афінністю і специфічністю з частковою або істотною нейтралізацією IL-18 або IL-18-зв'язуючої ділянкою(ок), відповідальним за зв'язування IL-18 з його лігандами (як, наприклад, з його рецепторами). Антагоніст може також інгібувати шлях передачі сигналу з участю IL-18, який активується в клітинах після зв'язування IL-18 з його рецептором.

Інгібіторами дії IL-18 також можуть бути розчинні рецептори IL-18 або молекули, що імітують рецептори, або агенти, що блокують рецептори IL-18, або антитіла до IL-18, такі як поліклональні або моноклональні антитіла або будь-які інші агенти або молекули, що запобігають скріпленню IL-18 з його мішенями, що зменшують або запобігають ініціюванню внутрішньо- або позаклітинних реакцій, опосередкованих IL-18.

У переважному варіанті втілення даного винаходу інгібітор IL-18 вибирають з інгібіторів каспази-1 (ICE), антитіл до IL-18, антитіл до будь-яких субодиниць рецептора IL-18, інгібіторів шляху передачі сигналу з участю IL-18, антагоністів IL-18, які конкурують з IL-18 або зв'язуються і блокують рецептор IL-18, і IL-18-зв'язуючих білків, ізоформ, мутеїнів, злитих білків, функціональних похідних, активних фракцій або похідних циркулярної перестановки або їх солей.

Термін «IL-18-зв'язуючі білки» в даному описі застосовується синонімічно з «IL-18BP». Він включає IL-18 зв'язуючі білки, визначені в WO 99/09063 або в Novick et al., 1999, включаючи варіанти сплайсінгу і/або ізоформи IL-18-зв'язуючих білків, як визначено в Kim et al., 2000. Зокрема, людські ізоформи а і с IL-18BP є корисними відповідно до даного винаходу. Білки, корисні відповідно до даного винаходу, можуть бути глікозильованими або неглікозильованими і можуть бути одержані з натуральних джерел, таких як сеча, або вони можуть переважно бути одержані рекомбінантним шляхом. Рекомбінантна експресія може виконуватися за допомогою прокаріотичних систем експресії, таких як *E. coli*, або еукаріотичних, і переважно, систем експресії ссавців. Клітинною лінією, особливо добре відповідною для інгібіторів IL-18 даного винаходу, є клітини яєчника китайського хом'яка (CHO).

Рекомбінантна продукція інгібітору IL-18, при рекомбінантній експресії в клітинах ссавців або клітинних лініях, може переважно здійснюватися в середовищі для клітинних культур, що не містить сироватку.

Термін "мутеїн", що застосовується в даному описі, відноситься до аналогів IL-18BP або аналогів вірусного IL-18BP, в яких один або більше амінокислотних залишків IL-18BP, що зустрічається в природі, або вірусного IL-18BP заміщені відмінними амінокислотними залишками або делетовані, або один або більше амінокислотних залишків додані до послідовності IL-18BP, що зустрічається в природі, або вірусного IL-18BP, без значного зниження активності одержаних продуктів в порівнянні з диким типом IL-18BP або вірусним IL-18BP. Дані мутеїни одержують шляхом відомої технології синтезу і/або шляхом технології сайто-направленого мутагенезу, або будь-якої іншої відомої відповідної технології.

Будь-який такий мутеїн переважно має послідовність амінокислот, що достатньо дублює таку IL-18BP, або достатньо дублюючу вірусний IL-18BP так, щоб володіти значною мірою схожою активністю з IL-18BP. Однією з дій IL-18BP є його здатність зв'язувати IL-18. Поки мутеїн володіє істотною активністю зв'язування IL-18, він може застосовуватися для очищення IL-18, такого як за допомогою афінної хроматографії, і тому можна вважати, що він володіє значною мірою схожою активністю з IL-18BP. Отже, можна визначити, чи володіє будь-якою конкретний мутеїн активністю, значною мірою схожою з IL-18BP, за допомогою звичайних експериментів, що включають як об'єкт такий мутеїн, наприклад, методом простого конкурентного сендвіч-аналізу для визначення, чи зв'язує він спеціально помічений IL-18, такого як радіо-

імуноаналіз або аналіз ELISA. Прості функціональні дослідження для оцінки біологічної активності IL-18BP були детально описані в WO 99/09063, наприклад, в прикладах 2 (зв'язування IL-18, що оцінюється шляхом утворення поперечних міжмолекулярних зв'язків) або 5 (інгібування індукованих IL-18 індукції IFN- γ в мононуклеарних клітинах крові).

У переважному варіанті втілення винаходу будь-який такий мутеїн має, щонайменше, 40% ідентичності або гомології з послідовністю IL-18BP або кодованим вірусом гомологом IL-18BP. Більш переважно, щоб він мав, щонайменше, 50%, щонайменше, 60%, щонайменше, 70%, щонайменше, 80% або, найбільш переважно, щонайменше, 90% ідентичності або гомології з ними.

Мутеїни поліпептидів IL-18BP або мутеїни вірусних IL-18BP, які можуть бути використані відповідно до даного винаходу, або нуклеїнова кислота, що кодує їх, включають обмежений набір значною мірою відповідних послідовностей як, наприклад, що замінюють пептиди або полінуклеотиди, які можуть бути звичайно одержані звичайним фахівцем в області техніки без надмірного експериментування, основуючись на вченні і керівництві, представленим в даному описі.

Мутеїни відповідно до даного винаходу включають білки, що кодуються нуклеїновою кислотою, такою як ДНК або РНК, яка гібридизується з ДНК або РНК, яка кодує інгібітор IL-18, відповідно до даного винаходу, при помірно або дуже жорстких умовах. Термін «жорсткі умови» відноситься до умов гібридизації і подальшого промивання, які звичайно розглядаються фахівцями в даній області техніки як «жорсткі». Дивись Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, раніше, Interscience, N.Y., §§6.3, 6.4 (1987, 1992), і Sambrook et al. (Sambrook, J.C., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Без обмежень, приклади жорстких умов включають умови промивання при температурі на 12-20°C нижче розрахованої T_m гібрида, що досліджується, в, наприклад, 2 x SSC (хлорид натрію + цитрат натрію) і 0,5% SDS (додецилсульфат натрію) протягом 5 хвилин, 2 x SSC і 0,1% SDS протягом 15 хвилин; 0,1 x SSC і 0,5% SDS при 37°C протягом 30-60 хвилин і потім, 0,1 x SSC і 0,5% SDS при 68°C протягом 30-60 хвилин. Звичайні фахівці в даній області техніки розуміють, що жорсткість умов також залежить від довжини послідовностей ДНК, олігонуклеотидних зондів (таких як 10-40 основ) або суміші олігонуклеотидних зондів. При застосуванні суміші зондів, переважно застосовувати хлорид тетраметиламонію (TMAC), замість SSC. Дивись Ausubel, раніше.

У переважному варіанті втілення винаходу будь-який такий мутеїн має, щонайменше, 40% ідентичності або гомології з послідовністю SEQ ID NO:1, 2 або 3 в прикладеному списку послідовностей. Більш переважно, щоб він мав, щонайменше, 50%, щонайменше, 60%, щонайменше, 70%, щонайменше, 80% або, найбільш переважно, щонайменше, 90% ідентичності або гомології з ним.

Ідентичність відображає взаємовідношення між двома або більше поліпептидними послідовностями або двома або більше полінуклеотидними послідовностями, що визначається шляхом порівняння послідовностей. У загальних рисах, ідентичність відноситься до точної відповідності нуклеотиду з нуклеотидом або амінокислоти з амінокислою в двох полінуклеотидних або поліпептидних послідовностях, відповідно, при порівнянні по всій довжині послідовності.

Для послідовностей, в яких немає точної відповідності, можна визначати «% ідентичності». У загальних рисах, дві послідовності, що порівнюються, вирівнюються для одержання максимальної відповідності між послідовностями. Даний процес може включати додання «інтервалів» в одну або обидві послідовності для посилення міри вирівнювання. % ідентичності можна визначати по всій довжині кожної послідовності, що порівнюється, (так зване глобальне вирівнювання), яке особливо підходить для послідовностей однакової або дуже схожої довжини, або для більш коротких, визначених послідовностей (так зване локальне вирівнювання), що більш підходить для послідовностей нерівної довжини.

Способи порівняння ідентичності і гомології двох або більше послідовностей добре відомі в області техніки. Так, наприклад, програми, що є в Wisconsin Sequence Analysis Package, версія 9.1 (Devereux J. et al., 1984), наприклад, програми BESTFIT і GAP, можуть застосовуватися для визначення % ідентичності між двома полінуклеотидами і % ідентичності і % гомології між двома поліпептидними послідовностями. BESTFIT використовує алгоритм «локальної гомології»

Smith and Waterman (1981) і виявляє найкращу єдину аналогічну ділянку між двома послідовностями. Інші програми для визначення ідентичності і/або схожості між послідовностями також відомі в області техніки, наприклад, сімейство програм BLAST (Altschul S.F. et al, 1990, Altschul S.F. et al., 1997, доступне на домашній сторінці NCBI за адресою www.ncbi.nlm.nih.gov) і FASTA (Pearson W.R., 1990; Pearson 1988).

Переважними змінами для мутеїнів відповідно до даного винаходу є такі, відомі як «консервативні» заміни. Консервативні амінокислотні заміни поліпептидів або протеїнів IL-18BP або вірусних IL-18BP можуть включати синонімічні амінокислоти в межах групи, які володіють в достатній мірі схожими фізико-хімічними властивостями, такі заміни між членами групи дозволяють зберегти біологічну функцію молекули (Grantham, 1974). Ясно, що вставки і делеції амінокислот також можуть бути зроблені в охарактеризованих вище послідовностях без порушення їх функції, особливо, якщо вставки або делеції залучають усього декілька амінокислот, наприклад, менше тридцяти, і переважно, менше десяти і не видаляють або не переміщують амінокислоти, що є критичними для функціональної конформації, наприклад, залишки цистеїну. Протеїни і мутеїни, одержані шляхом таких делецій і/або вставок, відносяться до сфери дії даного винаходу.

Переважно, групи синонімічних амінокислот визначені в Таблиці 1. Більш переважно, групи синонімічних амінокислот визначені в Таблиці 2; і найбільш переважно, групи синонімічних амінокислот визначені в Таблиці 3.

Таблиця 1

Переважні групи синонімічних амінокислот

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gin, Lys, Glu, His
Leu	He, 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, He, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
He	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, He
Phe	Trp, Met, Tyr, He, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, He, 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, He, Val, Leu, Met
Trp	Trp

Таблиця 2

Більш переважні групи синонімічних амінокислот

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, He, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, He
Gly	Gly
He	He, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, He, 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, lie, Val, Leu
Trp	Trp

Таблиця 3

Найбільш переважні групи синонімічних амінокислот

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

Приклади одержання замінів амінокислот в білках, які можуть бути використані для одержання мутеїнів поліпептидів або білків IL-18BP, або мутеїнів вірусних IL-18BP для застосування в даному винаході, включають будь-які відомі стадії способу, такі як представлені в патентах США 4 959 314, 4 588 585 і 4 737 462, видані Mark et al.; 5 116 943, виданому Koths et al., 4 965 195, виданому Namen et al., 4 879 111, виданому Chong et al; і 5 017 691,

виданому Lee et al; і лізинзаміщених білків, представлених в патенті США № 4 904 584 (Shaw et al).

Термін «злитий білок» відноситься до поліпептиду, що включає IL-18BP або вірусний IL-18BP або їх мутеїн, або їх фрагмент, в злитті з іншим білком, який, наприклад, має більш тривалий час існування в рідких середовищах організму. Так, IL-18BP або вірусний IL-18BP може бути злитий з іншим білком, поліпептидом або т.п. наприклад, імуноглобуліном або його фрагментом.

Термін «функціональні похідні», що застосовуються в даному описі, включає похідні IL-18BP або вірусного IL-18BP і їх мутеїни і злиті білки, які можуть бути одержані з функціональних груп, які зустрічаються у вигляді бічних ланцюгів на залишках або N- або C-кінцевих груп, за допомогою способів, відомих в області техніки, і вони включаються в даний винахід доти, поки вони залишаються фармацевтично прийнятними, тобто вони не порушують активність білка, яка значною мірою схожа з активністю IL-18BP або вірусного IL-18BP, і не додають токсичних властивостей композиціям, що містять їх.

Дані похідні можуть, наприклад, включати бічні ланцюги поліетиленгліколю, які можуть маскувати антигенні ділянки і подовжувати час життя IL-18BP або вірусного IL-18BP в рідких середовищах організму. Інші похідні включають аліфатичні складні ефіри карбоксильних груп, аміди карбоксильних груп внаслідок реакції з аміаком або з первинними або вторинними амінами, N-ацильні похідні вільних аміногруп амінокислотних залишків, що утворюються з ацил-складовими (наприклад, алканойльні або карбоциклічні ароїльні групи), або О-ацильні похідні вільних гідроксильних груп (наприклад, таких серинових або треонінових залишків), що утворюються з ацил-складовими.

Як «активні фракції» IL-18BP або вірусного IL-18BP, мутеїнів і злитих білків, даний винахід охоплює будь-які фрагменти або попередники поліпептидного ланцюга білкової молекули як такої, або разом з асоційованими молекулами або залишками, пов'язаними з нею, наприклад, залишками нуклеару або фосфату, або агрегати білкових молекул або тільки залишків нуклеару, при умові, що вказана фракція має активність, значною мірою схожу з IL-18BP.

Термін «солі» в даному описі відноситься як до солей карбоксильних груп, так і до кислотно-адитивних солей аміногрупи молекули інгібітору IL-18 або його аналогів. Солі карбоксильної групи можуть бути утворені за допомогою способів, відомих в області техніки, і включають неорганічні солі, наприклад, солі натрію, кальцію, амонію, заліза або цинку і т.п., і солі з органічною основою, як такі, що утворюються, наприклад, з амінами, такими як триетаноламін, аргініном або лізіном, піперидином, прокаїном і т.п. Кислотно-адитивні солі включають, наприклад, солі з мінеральними кислотами, такими як, наприклад, соляна кислота або сірчана кислота, і солі з органічними кислотами, такими як, наприклад, оцтова кислота або щавлева кислота. Звичайно, будь-яка така сіль повинна зберігати біологічну активність OPN, відповідну для даного винаходу, тобто надавати проліферативну дію на олігодендроцити.

У наступному переважному варіанті втілення винаходу інгібітором IL-18 є антитіло до IL-18. Антитіла до IL-18 можуть бути поліклональними або моноклональними, химерними, гуманізованими або навіть повністю людськими. Рекombінантні антитіла і їх фрагменти характеризуються високою афінністю зв'язування з IL-18 *in vivo* і низькою токсичністю. Антитіла, які можуть застосовуватися в даному винаході, характеризуються їх здатністю до лікування пацієнтів протягом періоду, достат-

нього для досягнення хорошої регресії або полегшення патогенного стану або будь-якого симптому або групи симптомів, що відноситься до патогенного стану, і низькою токсичністю.

Нейтралізуючі антитіла легко одержують від тварин, таких як кролики, кози або миші, шляхом імунізації IL-18. Імунізовані миші є особливо корисними для забезпечення джерела В-клітин для одержання гібридом, які в свою чергу культивують для одержання великих кількостей анти-IL-18 моноклональних антитіл.

Химерними антитілами є молекули імунoglobulinу, що характеризуються двома або більше сегментами або частинами, що походять від різних видів тварин. Як правило, варіабельну ділянку химерного антитіла одержують з антитіла ссавця, не людини, такого як мишає моноклональне антитіло, а константну ділянку імунoglobulinу одержують з молекули людського імунoglobulinу. Переважно, щоб обидві ділянки і їх комбінація володіли низькою імуногенністю при звичайному визначенні (Elliott et al., 1994). Гуманізовані антитіла є молекулами імунoglobulinів, створеними шляхом технологій генної інженерії, при яких мишає константні ділянки замінюють людськими копіями, зберігаючи мишає ділянки, зв'язуючі антиген. Одержане мишає-людське химерне антитіло переважно володіє зниженою імуногенністю і поліпшеною фармакокінетикою у людей (Knight et al., 1993).

Таким чином, в подальшому переважному варіанті втілення винаходу антитілом до IL-18 є гуманізоване антитіло до IL-18. Переважні приклади гуманізованих анти-IL-18 антитіл описані, наприклад, в Європейській патентній заявці EP 0974600.

У ще одному переважному втіленні винаходу антитіло до IL-18 є повністю людським. Технологія одержання людських антитіл описана детально, наприклад, в WO 00/76310, WO 99/53049, US 6 162 963 або AU 5336100. Повністю людськими антитілами є переважно рекombінантні антитіла, що одержуються від трансгенних тварин, наприклад, ксеномішей, що включають повністю або частково функціональні локуси людського Ig.

У високо переважному варіанті втілення даного винаходу інгібітором IL-18 є IL-18BP, або його ізоформа, мутеїн, злитий білок, функціональне похідне, активна фракція або похідне циркулярної перестановки. Дані ізоформи, мутеїни, злиті білки або функціональні похідні зберігають біологічну активність IL-18BP, особливо в зв'язуванні IL-18, і переважно мають по суті як мінімум активність, схожу з IL-18BP. В ідеалі, такі білки володіють біологічною активністю, яка навіть вище при порівнянні з немодифікованим IL-18BP. Переважні активні фракції володіють активністю, кращою, ніж активність IL-18BP, або мають подальші переваги, такі як краща стабільність або більш низька токсичність або імуногенність, або їх легше одержувати у великих кількостях, або легше очищати.

Послідовності IL-18BP і його варіантів/ізоформ сплайсінгу можуть бути одержані з WO 99/09063 або з Novick et al., 1999, так само як з Kim et al., 2000.

Функціональні похідні IL-18BP можуть бути кон'юговані з полімерами з метою поліпшення

властивостей білка, таких як стабільність, час напівжиття, біодоступність, переносимість організмом людини або імуногенність. Для досягнення цієї цілі функціональні похідні можуть включати, щонайменше, одну складову, прикріплену до однієї або більше функціональних груп, які зустрічаються як один або більше бічних ланцюгів на залишках амінокислот. Такою складовою може бути, наприклад, поліетиленгліколь (PEG). PEG-илування може здійснюватися відомими способами, наприклад, описаними в WO 92/13095.

Отже, в переважному варіанті втілення даного винаходу інгібітори IL-18, і особливо IL-18BP, є PEG-ильованими.

У наступному переважному варіанті втілення винаходу інгібітором IL-18 є злитий білок, що включає цілий IL-18-зв'язуючий білок або його частину, який зв'язаний з цілим імуноглобуліном або його частиною. Фахівці в області техніки розуміють, що злитий білок, що одержується, зберігає біологічну активність IL-18BP, особливо відносно зв'язування з IL-18. Злиття може бути безпосереднім або через короткий лінкерний пептид, який може складати від 1 до 3 амінокислотних залишків в довжину або більше, наприклад, 13 амінокислотних залишків в довжину. Вказаний лінкер може бути, наприклад, трипептидом з послідовністю E-F-M (Glu-Phe-Met) або лінкер з послідовністю з 13 амінокислот, що включає Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln, вставленим між послідовністю IL-18BP і послідовністю імуноглобуліну. Одержаний злитий білок володіє поліпшеними властивостями, такими як збільшений час існування в рідких середовищах організму (час напівжиття), збільшена специфічна активність, збільшений рівень експресії або полегшене очищення злитого білка.

У переважному варіанті втілення винаходу IL-18BP з'єднаний з константною ділянкою молекули Ig. Переважно, він з'єднаний з ділянками важких ланцюгів, наприклад, такими як домени CH2 і CH3 людського IgG1. Утворення специфічних злитих білків, що включають IL-18BP і частину імуноглобуліну, описане, наприклад, в прикладі 11 WO 99/09063. Інші ізоформи молекули Ig також є відповідними для утворення злитих білків згідно з даним винаходом, такі як IgG2 або IgG4 або інші класи Ig, наприклад, такі як IgM або IgA. Злиті білки можуть бути мономерними або мультимерними, гетеро- або гомомультимерними.

Інтерферони особливо відомі своєю інгібуючою дією на реплікацію вірусів і клітинну проліферацію. Інтерферон-γ, наприклад, грає важливу роль в стимуляції імунної і запальної відповідей. Вважається, що інтерферон β (IFN-β, інтерферон тину I) грає протизапальну роль.

Отже, даний винахід відноситься до застосування комбінації інгібітору IL-18 і інтерферону в одержанні лікарського препарату для лікування пошкодження ЦНС.

Інтерферони також можуть бути кон'юговані з полімерами з метою поліпшення стабільності білків. Кон'югат між інтерфероном β і високомолекулярним спиртом поліетиленгліколем (PEG), наприклад, описаний в WO 99/55377.

В іншому переважному варіанті втілення винаходу інтерфероном є інтерферон-β (IFN-β), і більш переважно, IFN-β 1a.

Інгібітор продукції і/або дії IL-18 переважно застосовується одночасно, послідовно або роздільно з інтерфероном.

Фактор некрозу пухлини, як описано в літературі, володіє як захисною, так і токсичною дією при пошкодженні головного мозку (Shohami et al., 1999). У Прикладі 1, нижче, ін'єкція TNF мишам після тяжкої травми головного мозку, приводила до істотного зниження рівнів IL-18 в головному мозку, що показує, що TNF може володіти корисним ефектом на відновлення після травматичного пошкодження головного мозку. Отже, переважний варіант втілення даного винаходу відноситься до застосування інгібітору IL-18 в комбінації з TNF для одержання лікарського препарату для лікування і/або запобігання пошкодженню головного мозку, для одночасного, послідовного або роздільного застосування.

Комбінація інгібіторів IL-18 з TNF альфа є переважною відповідно до даного винаходу.

У наступному переважному варіанті втілення даного винаходу лікарський препарат крім того містить протизапальний агент, такий як НСПЗЗ (нестероїдні протизапальні засоби). У переважному варіанті втілення винаходу в комбінації з інгібітором IL-18 застосовується COX-інгібітор, і більш переважно, COX-2-інгібітор. COX-інгібітори відомі в області техніки. Специфічні інгібітори COX-2, наприклад, описані в WO 01/00229. Активні компоненти можуть застосовуватися одночасно, послідовно або роздільно.

Була описана роль окислювального стресу, особливо реактивних форм кисню (ROS), в патофізіології пошкодження головного мозку (Shohami et al., 1997).

Отже, в переважному варіанті втілення даного винаходу лікарський препарат крім того включає антиоксидант, для одночасного, послідовного або роздільного застосування. Безліч антиоксидантів відомі в області техніки, такі як вітаміни А, С або Е, або 5-аміносаліцилова кислота, або супероксиддисмутаза.

У наступному переважному варіанті втілення даного винаходу інгібітор IL-18 застосовується в кількості близько 0,001-100 мг/кг ваги тіла або близько 0,01-10 мг/кг ваги тіла, або близько 0,1-3 мг/кг ваги тіла, або близько 1-2 мг/кг ваги тіла.

У ще одному варіанті втілення винаходу інгібітор IL-18 застосовується в кількості близько 0,1-1000 мкг/кг ваги тіла або 1-100 мкг/кг ваги тіла або близько 10-50 мкг/кг ваги тіла.

Даний винахід крім того відноситься до застосування молекули нуклеїнової кислоти, що включає кодуєчу послідовність інгібітору IL-18, мутеїну, функціонального похідного або їх активної фракції, в одержанні лікарського препарату для запобігання і/або лікування пошкодження ЦНС.

Переважно, молекула нуклеїнової кислоти крім того включає послідовність вектора експресії, наприклад, для застосування генної терапії для введення інгібітору IL-18 згідно з винаходом.

Переважно, молекулу нуклеїнової кислоти вводять внутрішньом'язово.

З метою лікування і/або запобігання пошкодженню ЦНС, вектор генної терапії, що включає послідовність інгібітору продукції і/або дії IL-18, можна вводити прямо в уражену тканину, наприклад, внаслідок цього уникаючи проблем, пов'язаних з системним введенням векторів генної терапії, таких як розведення векторів, досягнення і вплив на клітини-мішені або тканини-мішені, і побічних ефектів.

Застосування вектора для стимуляції і/або посилення ендогенної продукції інгібітору IL-18 в клітинах, в нормі не секретируючих інгібітор IL-18, або які експресують недостатні кількості інгібітору, також розглядається відповідно до даного винаходу для лікування і/або запобігання пошкодженню ЦНС. Вектор може включати регуляторні елементи, що функціонують в клітинах, в яких бажана експресія інгібітору IL-18. Такими регуляторними послідовностями або елементами можуть бути, наприклад, промотори або енхансери. Регуляторна послідовність потім може бути вбудована в правильний локус геному шляхом гомологічної рекомбінації, відповідно, оперативно зв'язуючи регуляторну послідовність з геном, експресію якого потрібно індукувати або посилити. Дана технологія звичайно відноситься до "ендогенної активації гена" (EGA), і вона описана, наприклад, в WO 91/09955.

Фахівці в області техніки розуміють, що також можливо безпосередньо зупинити експресію IL-18, без використання інгібітору IL-18, за допомогою такої ж технології. Щоб це здійснити, негативний регуляторний елемент, як, наприклад, елемент, що викликає мовчання, можна вбудувати в локус гена IL-18, що приводить до зниження або запобігання експресії IL-18. Фахівці в області техніки розуміють, що таке пониження регуляції або припинення експресії IL-18 володіє таким же ефектом, що і застосування інгібітору IL-18 з метою запобігання і/або лікування захворювання.

Даний винахід більше того відноситься до застосування клітини, яка була генетично модифікована з метою продукції інгібітору IL-18, в одержанні лікарського препарату для лікування і/або запобігання пошкодженню ЦНС.

Крім того, даний винахід відноситься до фармацевтичної композиції, особливо корисної для запобігання і/або лікування запального пошкодження ЦНС, яка включає терапевтично ефективну кількість інгібітору IL-18 і/або терапевтично ефективну кількість інтерферону, і/або фармацевтично ефективну кількість TNF, і/або фармацевтично ефективну кількість протизапального агента, і/або фармацевтично ефективну кількість антиоксидантного агента.

Як інгібітори IL-18 дана композиція може включати інгібітори каспази-1, антитіла до IL-18, антитіла до будь-якої субодиниці рецептору IL-18, інгібітори шляху передачі сигналу з участю IL-18, антагоністи IL-18, які конкурують з IL-18 і блокують рецептор IL-18, і IL-18-зв'язуючі білки, їх ізоформи, мутеїни, злиті білки, функціональні похідні, активні фракції або похідні циркулярної перестановки, що володіють такою ж активністю.

IL-18BP і його ізоформи, мутеїни, злиті білки, функціональні похідні, активні фракції або похідні

циркулярної перестановки, як описано вище, є переважними інгредієнтами фармацевтичних композицій.

Інтерфероном, включеним в фармацевтичну композицію, є переважно IFN-бета або IFN-альфа.

У ще одному переважному варіанті втілення даного винаходу фармацевтична композиція включає терапевтично ефективну кількість TNF» альфа. Фармацевтична композиція згідно з даним винаходом може крім того містити один або більше COX-інгібіторів.

Визначення «фармацевтично прийнятний» означає будь-який носій, який не впливає на ефективність біологічної активності активного інгредієнта і не є токсичним для організму-хазяїна, якому вводиться. Наприклад, для парентерального введення активний білок(ки) можуть бути складені в формі . одиниці дозування для ін'єкцій в розчинниках, таких як фізіологічний розчин, розчин декстрази, сироватковий альбумін або розчин Рінгера.

Активні інгредієнти фармацевтичної композиції згідно з даним винаходом можна вводити індивіду різними шляхами. Шляхи введення включають інтрадермальний, трансдермальний (наприклад, в препаративних формах повільного вивільнення), внутрішньом'язовий, внутрішньочеревинний, внутрішньовенний, підшкірний, пероральний, інтракраніальний, епідуральний, ректальний, місцевий і інтраназальний шляхи. Можуть бути використані будь-які інші терапевтично ефективні шляхи введення, наприклад, всмоктування через епітеліальні або ендотеліальні тканини або шлях генної терапії, де молекулу ДНК, що кодує активний агент, вводять пацієнту (наприклад, за допомогою вектора), що викликає експресію активного агента і його секрецію *in vivo*. Крім того, білок(ки) згідно з даним винаходом можна вводити разом з іншими компонентами біологічно активних агентів, такими як фармацевтично прийнятні поверхнево-активні речовини, наповнювачі, носії, розріджувачі і розчинники.

Для парентерального (наприклад, внутрішньовенного, підшкірного, внутрішньом'язового) введення активний білок(ки) можуть бути представлені у вигляді розчину, суспензії, емульсії або ліофілізованого порошку разом з фармацевтично прийнятним розчинником для парентерального введення (наприклад, водою, фізіологічним розчином, розчином декстрази) і допоміжними речовинами, які підтримують ізотонічність (наприклад, маніт) або хімічну стабільність (наприклад, консерванти і буферні розчини). Препаративну форму стерилізують шляхом звичайних технологій, що застосовуються.

Біодоступність активного білка(ів) згідно з даним винаходом також може бути поліпшена шляхом застосування процесів кон'югації, які збільшують час напівжиття молекули в людському тілі, наприклад, зв'язуванням молекули з поліетиленгліколем, як описано в патентній заявці PCT WO 92/13095.

Терапевтично ефективні кількості активного білка(ів) є похідним від безлічі параметрів, включаючи тип антагоніста, афінність антагоніста IL-18, будь-яку залишкову цитотоксичну активність, що виявляється антагоністами, шлях введення, кліні-

чний стан пацієнта (включаючи бажаність досягнення нетоксичного рівня активності ендogenous IL-18).

«Терапевтично ефективна кількість» є такою, при введенні якої інгібітор IL-18 приводить до інгібування біологічної активності IL-18. Дозування, яке вводять, в одній дозі або в декількох дозах індивіду, варіює в залежності від безлічі чинників, включаючи фармакокінетичні властивості інгібітору IL-18, шлях введення, стан пацієнта і його характеристики (стать, вік, вага тіла, стан здоров'я, ріст), вираженість симптомів, супутнє лікування, частота лікування і бажані ефекти. Кваліфіковані фахівці здатні здійснювати корекцію і маніпуляцію у встановленому діапазоні доз, а також методи як *in vitro*, так і *in vivo* для визначення інгібування IL-18 у індивіда.

Згідно з даним винаходом інгібітор IL-18 застосовують в кількості близько 0,0001-100 мг/кг або близько 0,01-10 мг/кг ваги тіла, або близько 0,1-5 мг/кг ваги тіла, або близько 1-3 мг/кг ваги тіла, або близько 1-2 мг/кг ваги тіла. Як альтернатива, інгібітори IL-18 можна вводити в кількості близько 0,1-1000 мкг/кг ваги тіла або близько 1-100 мкг/кг ваги тіла, або близько 10-50 мкг/кг ваги тіла.

Шляхом введення, переважним згідно з даним винаходом, є введення підшкірно. Внутрішньом'язове введення також переважне згідно з даним винаходом. З метою введення інгібітору IL-18 безпосередньо в місце його дії, також переважно його вводять інтракраніальним або підоболонковим шляхом. Інтракраніальний шлях є особливо переважним при відкритому пошкодженні голови (реактивне пошкодження головного мозку).

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

Добові дози звичайно застосовують у вигляді окремих доз або в формах з уповільненим вивільненням, ефективних для досягнення бажаних результатів. Друге або подальші введення можуть здійснюватися в таких же дозах, менших або більших в порівнянні з початковою або попередньою дозою, що вводиться даному індивіду. Друге або подальші введення можна вводити під час або до розвитку захворювання.

Згідно з даним винаходом інгібітор IL-18 можна вводити профілактично або терапевтично індивіду до, одночасно або послідовно з іншими терапевтичними заходами або агентами (наприклад, прийом множини лікарських препаратів), в терапевтично ефективній кількості, особливо з інтерфероном і/або TNF, і/або іншим протизапальним агентом, таким як COX-інгібітор і/або антиоксидант. У залежності від пошкодження головного мозку можна представити спільне введення антагоніста TNF замість самого TNF (Shohami et al., 1999). Активні агенти, які вводять одночасно з іншими терапевтичними агентами, можна вводити в тих же самих або в інших композиціях.

Даний винахід крім того відноситься до способу одержання фармацевтичної композиції, що включає суміш ефективної кількості інгібітору IL-18 і/або інтерферону, і/або антагоніста TNF, і/або COX-інгібітору з фармацевтично прийнятним носієм.

Даний винахід крім того відноситься до способу лікування пошкодження ЦНС, що включає введення фармацевтично ефективної кількості інгібітору IL-18 пацієнту, потребуючому цього.

Всі посилання, що цитуються в даному описі, включаючи журнальні статті або реферати, опубліковані або неопубліковані патенти США або зарубіжні патентні заявки, видані патенти СІПА або зарубіжні патенти або будь-які інші посилання повністю включені в даний опис у вигляді посилання, включаючи всі дані, таблиці, креслення і текст, представлений в посиланнях, що цитуються. Крім того, повний зміст посилальних документів, що цитуються в посилальних документах, що приводяться в даному описі, також повністю включені як посилання.

Посилання на відомі стадії способів, стадії традиційних способів, відомі способи або традиційні способи в будь-якому випадку не є донущенням того, що будь-який аспект, опис або варіант втілення даного винаходу описаний, розкритий або передбачений у відповідній області техніки.

Вищенаведений опис специфічних варіантів втілення винаходу так повно розкриває загальну суть даного винаходу, що інші, застосовуючи спеціальні знання в області техніки (включаючи зміст посилальних документів, що цитуються в даному описі), легко можуть модифікувати і/або адаптувати для різного застосування такі специфічні варіанти втілення винаходу, без надмірного експериментування, без відхилення від загальної ідеї даного винаходу. Отже, така адаптація і модифікації мають на меті знаходитися в діапазоні еквівалентів описаних варіантів втілення винаходу, основаних на вченні і керівництві, представленим в даному описі. Зрозуміло, що фразеологія або термінологія в даному описі застосовується з метою опису, а не для обмеження, так що термінологія і фразеологія даного опису повинна бути інтерпретована фахівцем в області техніки в світлі вчення і керівництва, представленого в даному описі, в комбінації зі знаннями звичайного фахівця в області техніки.

Після опису винаходу, для більш повного його розуміння представлені посилання на наступні приклади, які представлені для ілюстрації і не мають на меті обмежити даний винахід.

Приклади

Мишами, що застосовуються в даному дослідженні, були самці у віці 8-16 тижнів, що важили 30-35 г. Їх вирощували в специфічному вільному від патогенів середовищі, тримали при стандартних умовах температури і світла в клітках по 4-6 тварин і забезпечували їжею і водою у вільному режимі. Дослідження проводили відповідно до керівництва Institutional Animal Care Committee, Hebrew University, Jerusalem, Israel. Експериментальне закриття пошкодження голови проводили з використанням пристрою з падаючим вантажем, розробленим раніше (Chen et al. 1996). Коротко, після проведення ефірної анестезії проводили серединний подовжній розріз, шкіру розсовували і оголяли череп. Визначали ліву передню лобову область і туди вміщували тefлоновий конус з наконечником на ~ 1мм убік від середньої лінії, в середньо-вінцевій площині. Голову фіксували, і вантаж вагою 75 г онускали на конус з висоти 18

см, що приводило до локального пошкодження лівої півкулі. Після травми, миші одержували підтримуючу оксигенацію 100% O₂ не довше 2 хвилин, і потім їх вміщували назад в клітки.

Оцінка рівнів IL-18 в головному мозку мишей

Для визначення інтракраніальних рівнів IL-18, миші лінії C57BL/6 (B6) (всього n=62) були розподілені на шість окремих груп: (1) «група нормального контролю», неліковані миші лінії B6 (n=10). (2) «група ефірної анестезії», мишам виробляли анестезію ефіром протягом 10 хвилин і обезголювали через 24 години (n=10) або 7 днів (n=10). (3) «група псевдооперації»; дані миші піддавались анестезії і подовжньому розрізу скальпа і були умертвлені через 24 години (n=15) або 7 днів. (4) «група травми»; виконували експериментальну закрити травму голови, як описано вище, і тварин обезголювали під ефірною анестезією через 4 години (n=7), 24 години (n=7) і 7 днів (n=7) після травми. (5) «група ін'єкції TNF»; для оцінки можливої ролі TNF в регуляції інтрацеребрального IL-18, миші зазнавали ефірної анестезії, інтрацеребровентрикулярно (i.c.v.) вводили 200нг мишачого рекомбінантного TNF (R&G Systems, Abingdon, UK) в 10 мкл стерильного фосфатно-буферного соляного розчину (PBS), і мишей умертвляли через 24 години (n=10). (6) «група псевдоін'єкції»; даним тваринам вводили i.c.v. тільки розчинник (10 мкл стерильного PBS) і їх умертвляли через 24 години (n=6), як контрольну групу для тварин, яким вводили TNF. У всіх мишей після обезголювання негайно видаляли головний мозок, який вмилять заморожували в рідкому азоті і зберігали при -70°C до проведення аналізу. Головний мозок з групи травми був розділений на ліву (іпсилатеральну) і праву (контралатеральну) півкулю з метою проведення порівняння рівнів IL-18 в пошкодженій і непошкодженій півкулі. Гомогенізацію тканин проводили за допомогою Polytron (Kinematica, Kriens, Switzerland), використовуючи розведення 1:4 в крижаному екстракційному буфері (мас/мас), що містить 50 mM Tris (pH 7,2), 150 mM NaCl, 1% Triton-X-100 (Boehringer Mannheim, Rotkreuz, Switzerland) і суміш інгібіторів протеаз (Boehringer Mannheim). Гомогенат струшували на льоду протягом 90 хвилин і потім центрифугували протягом 15 хвилин при 3000 x g і 4°C. Потім надосадову рідину ділили на рівні частини і зберігали при -70°C до проведення аналізу. Концентрацію загального білка в екстрактах головного мозку вимірювали методом Bradford (Bio Rad Laboratories, Munich, Germany) і виявили, що вона була постійною у всіх оцінюваних мишей (12,1±2,1 мг/мл; сепеліне±SD). Визначення кількісних рівнів інтрацеребральних цитокінів проводили методом ELISA, специфічним для мишачого IL-18, відповідно до інструкцій виробника (R&G Systems, Abingdon, UK). Чутливість аналізу становила 5 пг/мл. Для порівняння рівнів

інтрацеребрального IL-18 між різними групами тварин, всі концентрації нижче за рівень визначення в 5 пг/мл були оцінені як 4,9 пг/мл. Потім нерозведені зразки були вміщені в парні комірки, і була розрахована їх остаточна концентрація по середній оптичній щільності (OD). OD визначали з допомогою спектрофотометра (Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, VA) при гасінні довжини хвилі 405 нм.

Протокол лікування IL-18BP

Самців щурів Sabra лінії Hebrew University (n=40) застосовували для дослідження IL-18BP. Анестезію і експериментальну СШ проводили, як описано вище. Для протоколу лікування тварин розділили на дві групи: в групі А («контрольна група», n=16) мишей піддали експериментальній СШ, через 1 годину зробили ін'єкцію тільки розчинника (PBS) і через 7 днів провели неврологічне обстеження (дивись нижче). У групі В («група дослідження», n=18), мишам вводили внутрішньочеревинно 50мкг IL-18BP відразу ж після огляду по неврологічній шкалі при часі t=1 година після СНІ. Оскільки проникність гематоенцефалічного бар'єра підвищується в 5-6 разів між 1 і 4 годинами після СНІ, як раніше було визначено в такій же експериментальній моделі (Chen et al., 1996), при цих умовах IL-18BP мав доступ в головний мозок. Дві додаткові групи мишей лікували так само, як групи А і В (група С: «контрольна група»; група D: «група дослідження», відповідно), і їх обезголювали через 48 годин, після цього проводили розкриття головного мозку для оцінки посттравматичного набряку, як описано нижче.

Оцінка неврологічних порушень

Для оцінки посттравматичних неврологічних порушень була розроблена і затверджена шкала Neurological Severity Score (NSS) (Stahel et al., 2000).

Шкала складається з 10 індивідуальних клінічних завдань на моторну функцію, швидкість реакції і фізіологічну поведінку, де один бал привласнюється за невиконання завдання і нуль балів за успішне виконання (Таблиця 4). Максимум NSS в 10 балів свідчить про тяжку неврологічну дисфункцію, з невиконанням всіх завдань, тоді як нуль балів досягається здоровими мишами без пошкодження. NSS через 1 годину після травми відображає початкову тяжкість пошкодження і високо корелює з клінічним результатом (Beni-Adani et al., 2001). Оцінку проходження завдань проводили двоє дослідників, які не знали групи дослідження, через 1 годину, 24 години, 72 години і 7 днів після експериментальної СШ. Δ NSS, що розраховується як різниця між NSS при t=1 година і NSS в будь-якій більш пізній часовій точці, є параметром, який відображає міру спонтанного відновлення після пошкодження головного мозку, як описано раніше (Chen et al., 1996).

Таблиця 4

Шкала Neurological Severity Score (NSS) для мишей з пошкодженням голови

Завдання	Опис	Бали за виконання/не виконання
Вихід з кола	Здатність і ініціатива вийти з кола діаметром 30 см протягом 3 хвилин	0/1
Моно-/Геміпарез	Парез верхньої і/або нижньої кінцівки на контралатеральній стороні	0/1
Ходьба по прямій	Швидкість реакції, ініціатива і моторна здатність ходити по прямій	0/1
Рефлекс переляку	Природжений рефлекс; миша відскакує у відповідь на гучний плеск в долоні	0/1
Шукаюча поведінка	Фізіологічна поведінка як знак «інтересу» в навколишньому середовищі	0/1
Балансування на перекладині	Здатність балансувати на перекладині шириною 7 мм протягом як мінімум 10 секунд	0/1
Балансування на круглій паличці	Здатність балансувати на круглій паличці діаметром 5 мм протягом як мінімум 10 секунд	0/1
Ходьба по балці: 3 см	Здатність пройти 30 см в довжину по балці, шириною 3 см	0/1
Ходьба по балці: 2 см	Те ж завдання, підвищеної складності, на балці, шириною 2 см	0/1
Ходьба по балці: 1 см	Те ж, підвищеної складності, на балці шириною 1 см	0/1
Максимальний бал		10

Оцінка набряку мозку

Виразеність набряку мозку оцінювали шляхом визначення вмісту води в тканинах пошкодженої півкулі, як описано раніше (Chen et al., 1996). Коротко, мишей піддавали анестезії, як описано вище через 48 годин після травми, що відповідало часовій точці, в якій набряк все ще залишається істотним в даній модельній системі (Chen et al., 1996). Після обезголовлювання видаляли мозочок і стовбур мозку і одержували сегмент кори головного мозку вагою ~20 мг з ділянки, що межує з місцем пошкодження, і з контралатеральної півкулі. Праву (непошкоджену) півкулю використали як внутрішній контроль. Зрізи тканини зважували і висушували протягом 24 годин при 95°C. Після зважування «сухих» зрізів розраховували процентний вміст води в головному мозку, як

$$\%H_2O = [(\text{волога маса} - \text{суха маса}) \times 100] / \text{волога маса}$$

Пацієнти з пошкодженням головного мозку

У дане дослідження були включені 10 пацієнтів з ізолюваною тяжкою CHI (середній вік \pm SD: 37 \pm 10 років; діапазон 24-57 років; 9 чоловіків і 1 жінка), доставлені в травматологічне відділення University Hospital Zurich. Всі пацієнти мали оцінку по шкалі коми Глазго (GCS) < 8 після серцево-легеневої реанімації (Teasdale and Jennett, 1974). Після КТ-дослідження, всім пацієнтам були встановлені інтравентрикулярні катетери для терапевтичного дренажу цереброспинальної рідини (CSF) при підвищенні внутрішньочерепного тиску (ICP) вище за 15 мм рт. ст. Жоден з пацієнтів не одержував лікування стероїдами. Пацієнтів з множинними пошкодженнями, які вимагали втручання з приводу супутніх пошкоджень грудної клітини, черевної порожнини, порожнини таза, спинного мозку або переломів довгих кісток, виключали з дослі-

дження. Індивідуальний вихід оцінювали, використовуючи шкалу Glasgow Outcome Scale (GOS) (Jennett and Bond, 1975). Протокол дослідження зразків СМР і сироватки був затверджений Ethics Board Committee, University Hospital, Zurich.

Збір зразків і аналіз IL-18

Зразки СМР і відповідні зразки сироватки у пацієнтів з CHI (n=10) одержували щодня в один фіксований час. Контрольну СМР одержували від пацієнтів, які піддавалися діагностичній спинномозковій пункції (n=5). Дані пацієнти не мали ознак запальних захворювань ЦНС, на основі нормальних рівнів в СМР білка, глюкози і кількостей клітин (дані не представлені). У групі CHI відбирання зразків здійснювали протягом 10 днів після травми, крім тих випадків, коли вентрикулярний катетер видаляли раніше, наприклад, у випадках, коли ICP залишалось в нормальних межах (< 15 мм рт. ст.) протягом більше 24 годин. Всього 106 відповідних зразків СМР і сироватки було одержано у пацієнтів з травмами, що беруть участь в даному дослідженні. Всі зразки центрифугували відразу ж після одержання, ділили на рівні частини і заморожували при -70°C до проведення аналізу. Кількісне визначення рівнів IL-18 в СМР і сироватці проводили методом ELISA, специфічним для людського IL-18, застосовуючи комерційно доступні набори (R&D Systems, Abingdon, UK). Як і для аналізу у мишей, чутливість ELISA становила 5 пг/мл, і остаточну концентрацію IL-18 розраховували на основі середньої оптичної щільності, що визначається в парних зразках при гасінні довжини хвилі 405 нм. Для порівняння рівнів IL-18 в СМР між пацієнтами з CHI і групою контролю, всі концентрації нижче за межу визначення 5 пг/мл були оцінені як 4,9 пг/мл.

Аналіз даних

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою комерційно доступного програмного забезпечення (SPSS 9,0 для Windows™). Непараметричний критерій Mann-Whitney-U застосовували для аналізу даних, що не мають нормального розподілу, таких як оцінка по неврологічних шкалах (NSS і Δ NSS). Непарний t-критерій Ст'юдента застосовували для порівняння інтрацеребральних концентрацій IL-18 в різних групах мишей і для аналізу різниці у вмісті води в головному мозку у мишей, лікованих IL-18BP в порівнянні з мишами, яким вводили розчинник. Порівняння рівнів IL-18 у людей, як в щоденній СМР в порівнянні з відповідними зразками сироватки у пацієнтів з СШ, так і СМР при травмі в порівнянні з групою контролю, проводили, застосовуючи загальну лінійну модель для повторних вимірювань ANOVA. Статистично значущим був прийнятий р-критерій $< 0,05$.

Результати

Приклад 1

Інтрацеребральні рівні IL-18 у мишей

Як показано на Фіг.1, IL-18 визначався методом ELISA в гомогенатах головного мозку у нелікованих («нормальних») контрольних мишей лінії B6 ($n=10$), із середнім рівнем $27,7 \pm 1,7$ [\pm SEM] нг/мл. В експериментальних групах, стимуляція тільки ефірною анестезією або в поєднанні з «помилковою» операцією (наприклад, ефірна анестезія і подовжній розріз скальпа) приводили до істотного підвищення рівня інтракраніального IL-18 до $48,9 \pm 1,1$ нг/мл («ефірна» група, $n=8$) і $54,3 \pm 2,7$ нг/мл («псевдо» група, $n=13$), відповідно ($p < 0,01$ в порівнянні з «нормальними» мишами, непарний t-критерій Ст'юдента; Фіг.1). Різниця між тваринами з впливом «ефіру» і «псевдо»-оперованими не була статистично достовірною ($p=0,16$).

У групі травми ($n=21$) індукція СНІ приводила до підвищення рівня IL-18 як в пошкодженій, так і в контралатеральній півкулі всередині 4 годин ($60,6 \pm 3,3$ і $59,8 \pm 5,0$ нг/мл, відповідно) - 24 годин ($56,9 \pm 2,1$ і $56,3 \pm 3,7$ нг/мл, відповідно) після травми, однак рівні не були достовірно вищими в порівнянні з групами «ефіру» і «помилковою» ($p > 0,05$).

На відміну від цього, через 7 днів після СНІ визначили істотне підвищення концентрації інтрацеребрального IL-18 в пошкодженій півкулі в порівнянні з тваринами, що зазнали ефірної анестезії або псевдооперації ($67,6 \pm 5,1$ нг/мл проти $42,2 \pm 0,8$ і $45,2 \pm 0,5$ нг/мл відповідно; $p < 0,01$), в той час як рівні IL-18 в контралатеральній півкулі не були істотно підвищені в порівнянні з даними двома контрольними групами ($63,2 \pm 6,0$ нг/мл; $p=0,06$).

З метою оцінки ролі TNF, ключового медіатора запалення в даній моделі травми (Shohami et al., 1999), відносно регуляції інтрацеребральних рівнів IL-18 додатковій групі мишей лінії B6 ($n=10$) було введено і.с.р. 200 нг мишачого рекомбінантного TNF в 10 мкл стерильного PBS, і їх умертвили через 24 години. Як показано на Фіг.1, «псевдо» ін'єкція тільки розчинника ($n=6$) приводила до достовірного підвищення інтрацеребрального IL-18 протягом 24 годин, в порівнянні з нелікованими нормальними мишами лінії B6 ($53,6 \pm 3,9$ проти $27,7 \pm 1,7$ нг/мл; $p < 0,001$).

Введення TNF індукувало істотне зменшення рівнів IL-18 в інтракраніальному відділі протягом

24 годин ($22,1 \pm 6,9$ нг/мл; $n=10$) в порівнянні з контрольною групою з «псевдо» ін'єкцією через 24 години ($53,6 \pm 3,9$ нг/мл; $p < 0,001$). Рівні IL-18 в «групі TNF» були навіть нижчими, ніж у нелікованих нормальних мишей ($27,7 \pm 1,7$ нг/мл), хоча в цьому випадку різниця не була статистично достовірною ($p=0,45$).

Приклад 2

Ефект від лікування IL-18BP на неврологічне відновлення після травми

З метою вивчити гіпотезу, що інгібування IL-18 може полегшувати відновлення при пошкодженні головного мозку, порівнювали відновлення в різні часові точки після однієї ін'єкції IL-18BP. Раніше було показано, що оцінка по шкалі Neurological Severity Score (NSS) через 1 годину після травми найбільш точно відображає вираженість травми і корелює з об'ємом пошкоджених тканин, що видно при MPT і при гістологічному дослідженні.

З метою одержання груп тварин з порівнянню травмою, миші були розподілені на різні групи лікування після початкової оцінки по шкалі NSS при $t=1$ година. Як показано на Фіг.2 (NSS в групі IL-18BP (квадрати) проти Контролю (кола), обидві групи мали схожий початковий рівень NSS (1 год.) ($7,69 \pm 0,3023$ і $7,44 \pm 0,3627$ контроль і IL-18BP відповідно), свідчаючи про порівнянну тяжкість пошкодження).

Оцінка по NSS в більш пізній час (1-7 днів) виявила, що тварини, ліковані IL-18BP внутрішньочеревинно (і.р.) мають відносно менше неврологічне пошкодження, що виходить з оцінки по шкалі NSS, що досягло достовірності на 7 день після травми ($p=0,045$).

Розраховували рівень відновлення, виражений як Δ NSS(t) = NSS(1 год.) - NSS(t). Більший рівень Δ NSS відображає краще відновлення, а нульовий або негативний NSS відображає відсутність відновлення або погіршення. Фіг.3 відображає значення Δ NSS в двох групах. У двох часових точках, обидві через 24. години і 7 днів, різниця між середніми значеннями Δ NSS досягла достовірності.

Проводили інший експеримент для вивчення, чи може бути ефективним лікування IL-18BP, що проводиться на 3-й день після пошкодження. Проблема часу лікування є критичною, і поки було показано, що терапія буде ефективною при її початку протягом декількох годин. Після того як було виявлено, що IL-18 сам по собі зростає на 7-й день після травми, і лікування IL-18BP, що дається через 1 годину після травми, дає найбільший ефект також на 7 день, було вирішено спробувати лікувати мишей на 3 день після пошкодження. Для порівняння, іншу групу лікували IL-18BP через 1 годину і на 3 день після пошкодження. Контрольну групу обробляли тільки розчинником (носієм).

Результати даного експерименту подані на Фіг.4, з якої стає ясным, що однократне лікування, що проводиться на 3 день, є таким же ефективним, як і таке, що проводиться через 1 годину після СНІ і знову на 3 день.

Даний експеримент продемонстрував разючий корисний ефект однократного введення IL-18BP, що проводиться через 1 годину або 3 дні після закритого пошкодження голови, на відновлення

після травматичного пошкодження голови в експериментальній моделі на мишах.

Приклад 3

Підвищені рівні IL-18 в СМР людей після пошкодження головного мозку Рівні IL-18 визначали

в щоденних зразках СМР і сироватки від 10 пацієнтів з тяжкою СНІ протягом 10 днів після травми. Демографічні і клінічні дані пацієнтів представлені в Таблиці 5.

Таблиця 5

Демографічні і клінічні дані пацієнтів з тяжкою СНІ^a

№ пацієнта	Вік (роки)/ стать	GCS ^b	GOS ^c	IL-18В в СМР ^d (пг/мл) сере- дне [діапазон] ^e	IL-18 в сироватці (пг/мл) середнє [діапазон] ^e
1	48/ч	3	1	283 [78-966]	57,5 [12-66]
2	31/ч	7	4	228,4 [22-745]	19,7 [4,9-108]
3	26/ч	5	3	208,5 [20-392]	37,2 [14-163]
4	57/ч	5	4	72,6 [30-286]	48,9 [14-104]
5	24/ч	4	5	32,6 [4,9-155]	17 [4,9-58]
6	36/ч	8	1	49,4 [10-290]	16,7 [12-67]
7	38/ж	3	4	17,9 [11-100]	13 [4,9-46]
8	35/ч	3	3	69,8 [4,9-329]	19,8 [7-77]
9	37/ч	3	4	37 [23-75]	57,3 [25-98]
10	41/ч	7	5	4,9 [4,9-169]	26,2 [15-38]
Контрольна СМР (n=5)				4,9 [4,9-7,8]	

^aСНІ, закрита травма голови

^bGCS, Glasgow Outcome Score (шкала коми Глазго) (Teasdale and Jennett, 1974).

^cGOS = Glasgow Outcome Score через 3 місяці після пошкодження;

5 = відсутність симптомів, 4 = помірна втрата працездатності, 3 = тяжка втрата працездатності, 2 = персистуючий вегетативний стан, 1 = смерть (Jennett and Bond, 1975).

^dСМР = спинномозкова рідина.

^eрівні IL-18 нижче за межу визначення 5 пг/мл були розцінені як рівень 4,9 пг/мл.

Як показано в Таблиці 5, підоболонкові рівні IL-18 були достовірно підвищені у 9/10 пацієнтів в порівнянні з контрольною СМР від 5 пацієнтів без травми або запального неврологічного захворювання ($p < 0,05$; повторні вимірювання ANOVA). Тільки у одного пацієнта (№10) рівень IL-18 не був достовірно підвищеним при порівнянні з контрольною СМР ($p = 0,31$). Середні рівні і індивідуальні коливання IL-18 в СМР і сироватці представлені в Таблиці 5.

Примітно, що максимальні концентрації IL-18 в СМР (966 нг/мл) були більш ніж в 200 разів вище у пацієнтів з пошкодженням голови, ніж в контрольній групі. Інтрацеребральний рівень IL-18 визначався методом ELISA у 90% всіх зразків СМР в групі з травмою, в той час як тільки 40% контрольних зразків СМР мали інтрацеребральні рівні IL-18, що визначаються (тобто $> 4,9$ нг/мл). У 8/10 пацієнтів з СНІ середні концентрації IL-18 були достовірно вище в СМР, ніж в сироватці ($p < 0,05$; повторні вимірювання ANOVA). Однак, у двох пацієнтів (№ 9, 10) середні рівні IL-18 в сироватці були вище відповідних концентрацій в СМР, як показано в Таблиці 5.

Дані результати показують, що рівні IL-18 в спинномозковій рідині пацієнтів з травматичним пошкодженням голови істотно підвищені. Додання IL-18BP може знизити ці підвищені рівні і внаслідок цього може надавати корисний ефект на відновлення після закритого пошкодження голови, як показано в Прикладі 2 вище.

Джерела інформації

1. Altschul S.F. et al, J Mol Biol, 215, 403-410, 1990, Altschul S.F. et al, Nucleic Acids Res., 25:389-3402, 1997.

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

3. Chen, Y., S. Constantini, V. Trembovier, M. Weinstock, and E. Shohami. 1996. An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. J. Neurotrauma 13:557-68.

4. Conti, CB., N.Y. Calingasan, Y. Kim, H. Kim, Y. Bae, E. Gibson, and T.H. Joh. 1999. Cultures of astrocytes and microglia express interleukin-18. Mol. Brain Res. 67:46-52.

5. 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.

6. Culhane, AC, M.D. Hall, N.J. Rothwell, and G.N. Luheshi. 1998. Cloning of rat brain interleukin-18 cDNA. Mol. Psychiatry 3:362-6.

a. Devereux J. et al., Nucleic Acids Res, 12,387-395, 1984.

7. DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E. and Karin, M. (1997), Nature 388,16514-16517.

8. Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H., and Woody, J.N., 1994, Lancet 344,1125-1127.

9. Fassbender, K., O. Mielke, T. Bertsch, F. Muehlhauser, M. Hennerici, M. Kurimoto, and S. Ros-

sol. 1999. Interferon- γ -inducing factor (IL-18) and interferon- γ in inflammatory CNS diseases. *Neurology* 53:1104-6.

10. Jander, S., and G. Stoll. 1998. Differential induction of interleukin-12, interleukin-18, and interleukin- γ converting enzyme mRNA in experimental autoimmune encephalomyelitis of the Lewis rat. *J. Neuroimmunol.* 91:93-9.

11. *Lancet* 1975 Mar 1;1(7905):480-4. Jennett B., Bond M.

12. Izaki, K. (1978) *Jpn. J. Bacteriol.* 33:729-742).

13. Kim S.H., Eisenstein M., Reznikov L., Fantuzzi G., Novick D., Rubinstein M., Dinarello C. A. 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.

14. Kossmann, T., P.F. Stahel, P.M. Lenzinger, H. Redl, R.W. Dubs, O. Trentz, G. Schlag, and M.C. Morganti-Kossmann. 1997. Interleukin-8 released into the cerebrospinal fluid after brain injury is associated with blood brain-barrier dysfunction and nerve growth factor production. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17:280-9.

15. Knight D.M., Trinh H., Le J., Siegel S., Shealy D., McDonough M., Scallon B., Moore M.A., 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.

16. Maliszewski, C. R., T. A. Sato, T. Vanden Bos, S. Waugh, S. K. Dower, J. Slack, 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.

17. 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- γ -inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon- γ production. *Eur-J-Immunol* 26:1647-51 issn: 0014-2980.

18. Morganti-Kossmann, M.C, P.M. Lenzinger, V. Hans, P. Stahel, E. Csuka, E. Ammann, R. Stacker, O. Trentz, and T. Kossmann. 1997. Production of cytokines following brain injury: beneficial and deleterious for the damaged tissue. *Mol. Psychiatry* 2:133-6.

19. Nakamura K., Okamura H., Wada M., Nagata K., Tamura T. *Infect Immun* 1989 Feb; 57(2):590-5.

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

21. Okamura H., Nagata K., Komatsu T., Tanimoto T., Nukata Y., Tanabe F., Akita K., Torigoe K., Okura T., Fukuda S., et al. *Infect Immun* 1995 Oct;63(10):3966-72.

22. Parnet, P., Garka, K.E., Bonner, TP., Dower, S.K., and Sims, J.E. (1996), *J. Biol. Chem.* 271, 3967-3970.

a. Pearson W.R., *Methods in Enzymology*, 183, 63-99, 1990.

b. Pearson W.R. and Lipman D.J., *Proc Nat Acad Sci USA*, 85,2444-2448,1988.

23. Prinz, M., and U.K. Hanisch. 1999. Murine microglial cells produce and respond to interleukin-18. *J. Neurochem.* 72:2215-8.

24. *J Clin Invest* 1997 Feb. 1;99(3):469-74 Rothe H., Jenkins N.A., Copeland N.G., Kolb H.

25. Scherbel, U., R. Raghupathi, M. Nakamura, K.E. Saatman, J.Q. Trojanowski, E. Neugebauer, M.W. Marino, and 1999. Differential acute and chronic responses of tumor necrosis factor-deficient mice to experimental brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8721-6.

26. Shohami, E., I. Ginis, and J.M. Hallenbeck. 1999. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev.* 10:119-30.

27. Shohami, E; Beit-Yannai E., Horowitz M; Kohen R (1997): *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17,1007-1019.

28. Teasdale G., Jennett B. *Lancet* 1974 Jul 13;2(7872):81-4.

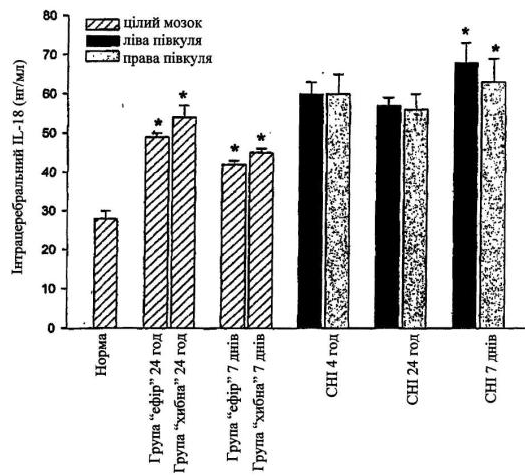
29. Stahel P.F., Shohami E., Younis F.M., Kariya K., Otto V.I., Lenzinger P.M., Grosjean M.B., Eugster H.P., Trentz O., Kossmann T., Morganti-Kossmann M.C. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2000 Feb; 20(2):369-80.

30. Ushio S., Namba M., Okura T., Hattori K., Nukada Y., Akita K., Tanabe F., Konishi K., Micallef M., Fujii M., Torigoe K., Tanimoto T., Fukuda S., Ikeda M., Okamura H., Kurimoto M. *J Immunol* 1996 Jun 1; 156(11):4274-9.

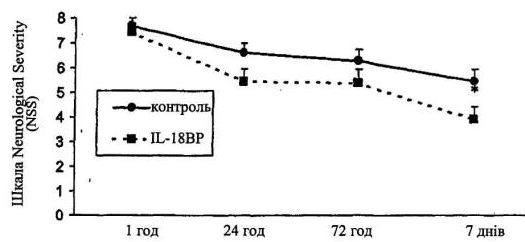
31. Wheeler, R.D., A.C. Culhane, M.D. Hall, S. Pickering-Brown, N.J. Rothwell, and G.N. Luheshi. 2000. Detection of the interleukin-18 family in rat brain by RT-PCR. *Mol. Brain Res.* 77:290-3.

32. Whalen, M.J., T.M. Carlos, P.M. Kochanek, S.R. Wisniewski, M.J. Bell, R.S. Clark, 2000. Interleukin-8 is increased in cerebrospinal fluid of children with severe head injury. *Crit. Care Med.* 28:929-34.

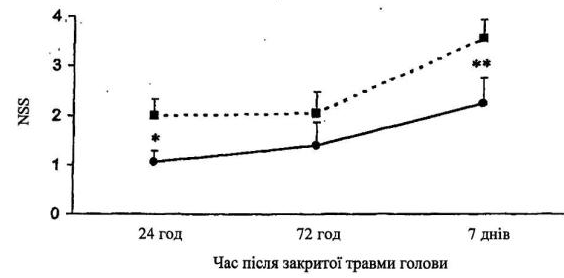
33. Yoshimoto T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K., Kashiwamura, S., Okamura, H., Akira, S. and Nakanishi, K. (1998), *J. Immunol.* 161, 3400-3407.



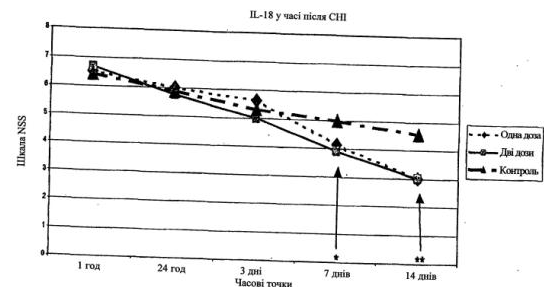
Фіг. 1



Фіг.2



Фіг. 3



Фіг. 4