



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **86750** (13) **C2**
(51) **МПК (2009)**
A61K 38/20
A61P 29/00
A61P 31/12 (2009.01)
A61P 35/04 (2009.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ IL-1F7b, ЗДАТНОГО ЗВ'ЯЗУВАТИСЯ З IL-18R ТА IL-18BP, РАЗОМ З IL-18BP ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЗАХВОРЮВАНЬ, АСОЦІЙОВАНИХ З НАДЛИШКОВОЮ АКТИВНІСТЮ IL-18

1

2

(21) a200504335

(22) 03.10.2003

(24) 25.05.2009

(86) PCT/US03/31378, 03.10.2003

(31) 60/416,827

(32) 08.10.2002

(33) US

(46) 25.05.2009, Бюл.№ 10, 2009 р.

(72) ДІНАРЕЛЛО ЧАРЛЬЗ А., КІМ СОО-ХІУН, БУ-ФЛЕР ФІЛІП

(73) АРЕС ТРЕЙДІНГ С.А.

(56) KUMAR S. ET AL: 'Interleukin-1F7B (IL-1H4/IL-1F7) is processed by caspase-1 and mature IL-1F7B binds to the IL-18 receptor but does not induce IFN-gamma production' CYTOKINE vol. 18, no. 2, April 2002, pages 61 - 71, XP008070058

PAN G. ET AL: 'IL-1H, an Interleukin 1-related protein that binds IL-18 receptor/IL-1Rrp' CYTOKINE vol. 13, no. 1, January 2001, pages 1 - 7, XP002212905

(57) 1. Застосування IL-1F7b, здатного зв'язуватися з IL-18R і IL-18BP, разом з IL-18BP для виробництва лікарського засобу для лікування або профілактики метастазів, вірусних інфекцій або запальних захворювань, вибраних з летальності, пов'язаної з ендотоксином (сепсису), пошкодження печінки, індукованого токсинами або активованими Т-клітинами, або гепатиту С, артриту, ушкодження легень, псоріазу, запального захворювання кишечника, ушкодження головного мозку, ішемічного ушкодження, дисфункції серця або невриту.

2. Застосування за п. 1 для лікування або профілактики запальних захворювань, вибраних з летальності, пов'язаної з ендотоксином (сепсису), ушкодження печінки, індукованого токсинами або активованими Т-клітинами, або гепатиту С, артриту, ушкодження легень, псоріазу, запального захворювання кишечника, ушкодження головного мозку, ішемічного ушкодження, дисфункції серця і невриту.

3. Застосування за п. 1 для профілактики утворення метастазів.

4. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, в якому IL-1F7b вводять системно, підшкірно і/або внутрішньом'язово.

5. Застосування вектора, який містить кодуючу послідовність IL-1F7b, здатного зв'язуватися з IL-18R і IL-18BP, разом з IL-18BP для виробництва лікарського засобу для лікування або профілактики метастазів, вірусних інфекцій або запальних захворювань, вибраних з летальності, пов'язаної з ендотоксином (сепсису), ушкодження печінки, індукованого токсинами або активованими Т-клітинами, або гепатиту С, артриту, ушкодження легень, псоріазу, запального захворювання кишечника, ушкодження головного мозку, ішемічного ушкодження, дисфункції серця і невриту.

6. Застосування за п. 5 для профілактики утворення метастазів.

7. Застосування за будь-яким з пп. 5-6, в якому вектор, що кодує IL-1F7b, вводять системно, підшкірно і/або внутрішньом'язово.

8. Застосування вектора для ендогенної генної активації IL-1F7b, здатного зв'язуватися з IL-18R і IL-18BP, разом з IL-18BP для лікування або профілактики метастазів, вірусних інфекцій або запальних захворювань, вибраних з летальності, пов'язаної з ендотоксином (сепсису), ушкодження печінки, індукованого токсинами або активованими Т-клітинами, або гепатиту С, артриту, ушкодження легень, псоріазу, запального захворювання кишечника, ушкодження головного мозку, ішемічного ушкодження, дисфункції серця і невриту.

9. Застосування за п. 8 для профілактики утворення метастазів.

10. Застосування за будь-яким з пп. 8-9, в якому вектор вводять системно, підшкірно і/або внутрішньом'язово.

11. Застосування інгібітора IL-1F7b, здатного зв'язуватися з IL-18R і IL-18BP, разом з IL-18BP для виробництва лікарського засобу для лікування або профілактики метастазів, вірусних інфекцій або запальних захворювань, вибраних з летальності, пов'язаної з ендотоксином (сепсису), ушкодження печінки, індукованого токсинами або активованими

(19) **UA** (11) **86750** (13) **C2**

Т-клітинами, або гепатиту С, артриту, ушкодження легень, псоріазу, запального захворювання кишечника, ушкодження головного мозку, ішемічного ушкодження, дисфункції серця і неврити.

12. Застосування за п. 11 для лікування або профілактики вірусного захворювання.

13. Застосування за п. 11 для лікування або профілактики злоякісної пухлини.

Даний винахід відноситься до застосування цитокіну, здатного зв'язувати IL-18-зв'язуючий білок та інгібувати активність другого цитокіну, причому другий цитокін є членом сімейства IL-1.

У 1989 р. була описана сироваткова активна речовина, індуквана ендотоксином, яка індукувала інтерферон- γ (IFN- γ), отриманий із клітин селезінки миші [Nakamura et al., 1989]. Дана сироваткова активна речовина не діяла як агент, який напругу індукує IFN- γ , а скоріше як стимулятор, що діє спільно з IL-12, IFN- α/β , TNF або мітогенами. Спроба виділити дану активність із сироватки миші після впливу ендотоксину виявила вочевидь гомогенний білок масою 50-55 кДа [Nakamura et al., 1993]. Оскільки інші цитокіни можуть діяти як спільні стимулятори вироблення IFN- γ , нездатність нейтралізуючих антитіл проти IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 або TNF нейтралізувати вказану сироваткову активність передбачала, що це є іншим фактором. У 1995 р. ті ж дослідники показали, що індукований ендотоксином спільний стимулятор вироблення IFN- γ присутній в екстрактах печінки мишей, попередньо підданих впливу P.acnes [Okamura et al., 1995]. На даній моделі популяція макрофагів печінки (купферівських клітин) розширюється, і для даних мишей низька доза бактеріального ліпополісахариду (LPS), яка для мишей, що не зазнавали попереднього впливу, не є летальною, стає летальною. Чинник, названий IFN- γ -індукуючим фактором (IGIF) і пізніше позначений як інтерлейкін-18 (IL-18), був виділений в гомогенному стані з 1200 грамів печінки мишей, що зазнали впливу P.acnes. Вироджені олігонуклеотиди, отримані з амінокислотних послідовностей виділеного IL-18, використовували для клонування мишачої кДНК IL-18 [Okamura et al., 1995]. Матричні РНК для IL-18 та інтерлейкіну-12 (IL-12) легко виявляються в активованих макрофагах. IL-18 сам по собі не індукує IFN- γ , але діє, головним чином, як спільний з мітогенами або IL-12 стимулятор. У 1996 р. було повідомлення про послідовність людської ДНК для IL-18.

Інтерлейкін IL-18 має спільні структурні риси з сімейством білків IL-1 [Nakamura et al., 1993, Okamura et al., 1995, Ushio et al., 1996 і Bazan et al., 1996]. На відміну від більшості інших цитокінів, які мають чотириспірально пучкову структуру, IL-18 і IL-1 β мають цілком β -складчасту пластинчасту структуру [Tsutsui et al., 1996]. Подібно до IL-1 β , IL-18 синтезується як біологічно не активний попередник (proIL-18), що не має сигнального пептиду [Ushio et al., 1996]. Попередники IL-1 β і IL-18 розщеплюються каспазою-1 (IL-1 β -перетворюючим ферментом або ICE), яка розщеплює попередники після залишку аспарагінової кислоти на позиції P1. Утворені зрілі цитокіни легко вивільняються з клітини [Ghayur et al., 1997, і Gu et al., 1997].

IL-18 являє собою спільний стимулятор вироблення цитокінів (IFN- γ , IL-2 і гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора) клітинами Т-хелперного типу 1 (Th1) [Kohn et al., 1997], а також спільний стимулятор FAS-лігандопосередкованої цитотоксичності клонів натуральних мишачих клітин-кілерів [Tsutsui et al., 1996].

Лімфоцити Th1 беруть участь в імунних відповідях проти пухлин [Seki et al., 2000]. Th1 відповіді включають секрецію цитокінів IL-2, IL-12, IL-18 і IFN- γ , а також дегенерацію специфічних цитотоксичних Т-лімфоцитів, які розпізнають конкретні пухлинні антигени. Th1 відповідь є також життєво важливою зброєю для захисту організму-хазяїна від багатьох мікроорганізмів. Однак, Th1 відповідь також може бути пов'язана з небажаними ефектами, такими як розвиток декількох аутоімунних захворювань, запалення і відторгнення трансплантованого органу.

Цитокінзв'язувальні білки (розчинні цитокінові рецептори) звичайно являють собою позаклітинні лігандзв'язувальні домени відповідних їм цитокінових рецепторів клітинної поверхні. Вони виробляються як шляхом альтернативного сплайсингу, так і шляхом протеолітичного розщеплення рецептора клітинної поверхні. Вказані розчинні рецептори були описані раніше: наприклад, розчинні рецептори IL-6 і IFN- γ [Novick et al., 1989], TNF [Engelmann et al., 1989, і Engelmann et al., 1990], IL-1 та IL-4 [Maliszewski et al., 1990], IFN- α/β [Novick et al., 1994, Novick et al., 1992]. Один цитокінзв'язувальний білок, названий остеопротегерином (OPG, відомий також як фактор інгібіції остеокластів - OCIF), член сімейства TNFR/Fas, вочевидь, є першим прикладом розчинного рецептора, який існує тільки як секретований білок [Anderson et al., 1997, Simonet et al., 1997, Yasuda et al., 1998].

Інтерлейкін-18-зв'язуючий білок (IL-18BP) був виділений по спорідненості на колонії з IL-18 з сечі [Novick et al., 1999]. IL-18BP відмінняє викликати IL-18 індукцію IFN- γ і IL-8, активацію NF- κ B in vitro та індукцію IFN- γ in vivo. IL-18BP являє собою розчинний циркулюючий білок, який конститутивно експресується в селезінці, і належить до суперсімейства імуноглобулінів. Найбільш широко поширена ізоформа IL-18BP, сплайсована варіантна ізоформа а, має високу спорідненість з IL-18 з швидкою швидкістю включення і повільною швидкістю виключення і константою дисоціації (Kd) приблизно 400 пМ [Kim et al., 1999].

Залишки, що беруть участь по взаємодії IL-18 і IL-18BP, були описані за допомогою використання комп'ютерного моделювання [Kim et al., 1999] і оснований на взаємодії IL-1 β і IL-1R типу I [Vigers et al., 1997]. На моделі зв'язування IL-18 з IL-18BP залишок Glu (E) на позиції 42 і залишок Lys (K) на позиції 89 IL-18, як передбачали, зв'язуються з

Lys-130 і Glu-114 в IL-18BP, відповідно [Kim et al., 1999].

IL-18BP конститутивно присутній в багатьох клітинах [Puren et al., 1999] і циркулює у здорових людей [Urushihara et al., 2000]. Висока спорідненість IL-18BP з IL-18, а також висока концентрація IL-18BP, виявлена в циркуляції (молярне перевищення в 20 раз в порівнянні з IL-18), представляють унікальну ситуацію в біології цитокинів. Таким чином, було висловлене припущення, що більшість, якщо не всі, молекул IL-18 в циркуляції зв'язані з IL-18BP. Циркулюючий IL-18BP, який конкурує з рецепторами клітинної поверхні для IL-18, може діяти як природна протизапальна і імунодепресантна молекула.

Вірусні агенти кодувають IL-18BP-подібні білки, наприклад, вірусні білки *M. contagiosum* MC53 і MC54 володіють значною гомологічністю з IL-18BP ссавців [Novick et al., 1999]. Білки *M. contagiosum* MC53 і MC54 мають здатність зв'язувати і нейтралізувати людський IL-18, що подібна до вказаної здатності IL-18BP [Xiang і Moss, 1999]. Білок поксвірусу ектромелії p13, який є гомологічним з IL-18BP, зв'язує людський IL-18 та інгібує його активність *in vitro*. У мишей, інфікованих делеційним мутантним вірусом p13, спостерігалися знижені рівні інфекційності [Born et al., 2000]. Таким чином, ступінь інфекційності, як виявляється, корелює з присутністю вірусного IL-18BP.

Високі рівні циркулюючого IL-18BP можуть бути природним захистом проти надмірних Th1-відповідей на інфекцію і розвитку аутоімунних захворювань.

Цитокіни сімейства IL-1, включаючи IL-8, мають ряд протизапальних і імунорегуляторних властивостей під час первинної і повторної відповіді на інфекцію [Dinarello, 1996 і Nakanishi, 2001]. Шість нових членів генного сімейства інтерлейкіну-1 (IL-1) були відкриті в результаті вивчення бази даних експресованих мічених послідовностей [Barton, 2000, Busfield, 2000, Debets, 2001, Kumar, 2000, Lin, 2001, Mulero, 1999, Pan, 2001 і Smith, 2000]. Вказані білки мають загальний β -порожнистий профіль, що складається з 12 ниток, і значну амінокислотну гомологічність з антагоністом рецепторів IL-1 (IL-1Ra), IL-1 β і IL-18. Вказані нові члени сімейства IL-1 отримані від загального попередника, як і IL-1 і IL-18 [Nicklin, 2002, Taylor, 2002]. За винятком IL-18, кожен знаходиться на одній і тій самій області людської хромосоми 2 [Nicklin, 2002, Mulero, 2000, Taylor, 2002 і Busfield, 2000]. Біологічна функція даних гомологів IL-1 до цього часу невідома. Було описано п'ять різних сплайсованих варіантів нового гомолога IL-1 IL-1H4 (IL-1F7a-e) [Busfield, 2000, Kumar, 2000, Pan, 2001, Smith, 2000, Taylor, 2002]. Перша описана ізоформа, IL-1F7a, має унікальний N-кінець, що складається з екзону 3 гена IL-1 F7, який відсутній в інших сплайсованих варіантах гена. Короткі ізоформи IL-1F7c, IL-1F7d і IL-1F7e не мають екзону 4, 2 або обох, відповідно. Тільки IL-1F7b і c, що містять екзон 1 і 2, експресують N-кінцевий продом, який має потенційний сайт (сайги) розщеплення каспазою-1 (ICE) [Kumar, 2002]. Крім вказаних сплайсованих варіантів, в IL-1F7b існують амінокислотні поліморфізми (V31G і A42T), осно-

вані на мутаціях двох пар нуклеотидів в екзоні 2 [Kumar, 2002, Pan, 2001]. Незважаючи на вивчення обширної бази даних і секвенування локусу гена IL-1, мишачий гомолог IL-1 H4 досі не виявлений. IL-1F7b має значну гомологічність послідовності з IL-18. Відмінною ознакою активності IL-18 є його здатність індукувати IFN- γ в Т-клітинах або натуральних кіл ерах (NK) в присутності IL-2, IL-12 або IL-15 як спільного стимулятора. Активність IL-18 опосередковується комплексом IL-18R, що складається з IL-18R α , який закінчується лігандзв'язувальним ланцюгом [Torigoe, 1997], і IL-18(3), що закінчується сигнальним ланцюгом (3) [Born, 1998, Kim, 2001]. Після зв'язування з ланцюгом IL-18R α і утворення гетерокомплексу з ланцюгом IL-18R β , IL-18 індукує активацію кінази, зв'язаної з рецептором IL-1, і фактора 6, зв'язаного з рецептором TNF (TRAF-6). Вказані активовані кінази в кінцевому результаті приводять до транслокації ядерного фактора κ -B (NF- κ B) (Matsumoto, Robinson). IL-1F7b, як повідомляється, зв'язується з IL-18R α , за результатами дослідження рецепторів pulldown assay [Pan, 2001] або досліджень зв'язування з використанням комп'ютерного чіпа (BiaCore[®]) [Mulero, 2000]. Достовірне, але низькоафінне зв'язування Kd=130мМ спостерігалось тільки для зрілої форми IL-1F7b, без пропептиду, що передбачає біологічний зв'язок з процесингом IL-1F7b зі сторони ICE [Kumar, 2002]. Незважаючи на зв'язування з IL-18R α , не було показано активності, подібної до IL-18, або антагоністичної активності як попередника, так і зрілого IL-1F7b [Pan, 2001, Kumar, 2002].

Було висловлене припущення про те, що інтерлейкін IL-18 бере участь в розвитку патогенності при хронічних запальних захворюваннях, включаючи ендотоксिनний шок, гепатит і аутоімунний діабет [Kahiwamura і Okamura, 1998]. Подальші вказівки на можливу роль IL-18 в розвитку ушкодження печінки були отримані з експериментів, опублікованих Tsuij et al. [Tsuij et al., 1999], які показали підвищений рівень IL-18 при індукованому ліполісахаридами гострому ушкодженні печінки у мишей. Однак, механізм багатифункціонального фактора IL-18 при розвитку ушкодження печінки досі не освітлений.

Ураження або ушкодження печінки може мати різноманітні причини. Це може відбуватися через вірусні або бактеріальні інфекції, зловживання алкоголем, імунні розлади або, наприклад, злоякісні пухлини.

Вірусні гепатити, викликані вірусом гепатиту В і вірусом гепатиту С, наприклад, являють собою захворювання, що погано піддаються лікуванню, які уражають велику кількість людей у всьому світі. Кількість відомих вірусів гепатиту постійно росте. Крім вірусів гепатиту В і С, щонайменше чотири інших віруси, що викликають вірусний гепатит, були відкриті до теперішнього часу, названі вірусами гепатиту А, D, E і G.

Алкогольне захворювання печінки являє собою інше широко поширене захворювання печінки, пов'язане з хронічним вживанням алкоголю. Імунний гепатит являє собою рідке аутоімунне захворювання, яке погано піддається лікуванню. Ушкодження печінки включає також ураження жовчних

протоків. Первинний біліарний цироз (PBC) являє собою аутоімунне захворювання печінки, яке характеризується деструкцією внутрішньопечінкових жовчних протоків.

Декілька досліджень показали, що uszkodження печінки при таких захворюваннях, як алкогольний гепатит, цироз печінки, вірусний гепатит і первинний біліарний цироз, пов'язане з відповідями з боку клітин Т-хелперів-1 (Th1). В одному дослідженні була розроблена нова модель uszkodження печінки на мишах шляхом націлення ліпосом, що містять овалбумін, в печінку, з подальшим адоптивним перенесенням овалбумін-специфічних клітин Th1. Комбінований вплив на мишей ліпосомами, що містять овалбумін, і перенесенням клітин Th1 спричиняло підвищення активності сироваткових трансаминаз, яке спостерігалось паралельно з підвищенням сироваткових рівнів IFN- γ . Різким контрастом було те, що перенесення овалбумін-специфічних клітин Th2 приводило до підвищення рівнів IL-4, але не індувало uszkodження печінки. Uskodження печінки блокувалось антитілами проти IFN- γ і антитілами проти фактора некрозу пухлин (TNF)- α . Вказані факти свідчать про те, що клітини Th1 є головними ефекторними клітинами при гострому uszkodженні печінки [Nishimura і Ohta, 1999]. В іншій серії досліджень було показано, що у мишей з надмірною експресією IFN- γ спостерігається спонтанний гепатит, при відсутності якого б то не було патогена або будь-якого іншого подразника [Okamoto et al., 1998].

Інше дослідження включало вивчення відповідей Th1 при первинному біліарному цирозі (PBC). PBC являє собою аутоімунне захворювання печінки, що характеризується деструкцією внутрішньопечінкових жовчних протоків. Звичайно вважають, що клітинні імунні механізми, особливо із залученням Т-клітин, приводять до uszkodження жовчних протоків. Відносна сила відповідей Th1 і Th2, як припустили нещодавно, є важливим чинником патології різних аутоімунних захворювань. У даному дослідженні баланс субпопуляцій при PBC оцінювали шляхом виявлення цитокінів, специфічних для двох субпопуляцій Т-клітин, тобто, IFN- γ для клітин Th1 і IL-4 для клітин Th2. Клітини, позитивні за матричною РНК (мРНК) IFN- γ і IL-4, підраховували в зрізах печінки від 18 пацієнтів з PBC і 35 контролів захворювання, включаючи хронічний активний гепатит С, позапечінкову біліарну обструкцію і нормальну печінку, з використанням неізотопної гібридизації і імуногістохімічного аналізу *in situ*. Мононуклеарні клітини, що експресують мРНК IFN- γ і IL-4, були агреговані в запалених портальних шляхах печінки з PBC, але рідко були присутніми в зрізах печінки при позапечінковій біліарній обструкції, алкогольному фіброзі або нормальній печінці. Клітини, позитивні за мРНК IFN- γ і IL-4, в печінці з PBC виявляли в достовірно більш високих кількостях, ніж в контрольній печінці ($P < 0,01$). Крім того, експресія мРНК IFN- γ виявлялася частіше, ніж експресія IL-4 в печінці з PBC, і рівні експресії мРНК IFN- γ тісно корелювали з ступенем портальної запальної активності. Клітини, позитивні за мРНК IFN- γ виявляли, головним чином, навколо uszkodжених жовчних протоків, які

були оточені лімфоїдними агрегатами. Дані показують, що клітини Th1 є найбільш поширеною субпопуляцією Т-клітин в лімфоїдних інфільтратах при PBC [Harada et al., 1997]. Цитокіновий профіль для розпізнавання вірусних антигенів, як вважають, має виражений вплив на вихід вірусних інфекцій і вірусний кліренс. В одному дослідженні вивчали, чи відіграє роль дисбаланс цитокінів, орієнтований у бік відповіді типу Th2, при хронічному гепатиті В. Цитокінові профілі мононуклеарних клітин периферичної крові, пов'язані з хронічним гепатитом В, аналізували з допомогою RT-PCR. Після стимуляції поверхневим антигеном гепатиту В (HbsAg) експресію IFN- γ , IL-2, IL-4 і IL-10 виявляли у 41%, 8%, 41% і 50% пацієнтів, відповідно. Серед вказаних цитокінів експресія Th1 цитокіну IFN- γ була пов'язана з високими рівнями сироваткових АСТ/АЛТ (аспартатамінотрансферази/аланінамінотрансферази), які є типовими маркерами uszkodження печінки. Не було виявлено захисного ефекту відносно гепатитів, що викликаються цитокінами типу Th2. На закінчення, вироблення цитокіну Th1, IFN- γ , HbsAg-реактивними клітинами було пов'язане з uszkodженням гепатоцитів при хронічному гепатиті В [Lee et al., 1999]. Високі рівні ліганду FAS і його рецептора (CD95) були виявлені в печінці пацієнтів з гепатитом В [Luo et al., 1997]. Ліганд FAS вважають одним з головних цитотоксичних агентів, який приводить до апоптозу гепатоцитів.

В іншому дослідженні ідентифікували фактори, пов'язані з прогресуванням uszkodження печінки у 30 пацієнтів, позитивних по вірусу гепатиту С/РНК (HCV/RNA), з хронічним гепатитом. Некротичне/запальне і структурне uszkodження оцінювали з використанням шкали Ishak. Активовані печінкові зірчасті клітини (HSC) візуалізували імуногістохімічним аналізом на гладком'язевий α -актин (α -SMA) і визначали їх кількість морфометрично. HCV/RNA в плазмі крові оцінювали з використанням методики конкурентної RT-PCR. Для того, щоб вивчити тип імунної відповіді, що бере участь в прогресуванні uszkodження печінки, IFN- γ -позитивні клітини (як експресія Th1-подібної відповіді) оцінювали з використанням імуногістохімічного аналізу визначали їх кількість морфометрично. Було встановлено, що HSC виявляли, головним чином, поблизу від областей лобулярного некрозу/запалення або від вистілки фіброзного переродку. Паренхіма, позитивна по α -SMA і сиріусу червоному, корелювала достовірно з сумою балів по некрозу/запаленню і структурному uszkodженню. IFN- γ -позитивні клітини виявляли в перипортальних областях, пов'язаних з запальними інфільтратами, і вони достовірно корелювали зі структурним uszkodженням. Таким чином, був зроблений висновок про те, що активація HSC і прогресування uszkodження печінки пов'язані з Th1-подібною відповіддю [Baroni et al., 1999]. Подібно до випадку з гепатитом В, FAS ліганд і його рецептор були виявлені в печінці і сироватці крові пацієнтів з гепатитом С [Hiramatsu et al., 1994; Okazaki et al., 1996; Lioetal, 1998].

Цитокіни Th1 та інші маркери Th1, як було встановлено, пов'язані з алкогольним гепатитом і цирозом печінки. Запальні подразники і перекисне

окислення ліпідів активують нуклеарний фактор κB (NF- κB) і підвищують вироблення прозапальних цитокінів і хемокинів. В одному дослідженні оцінювали взаємовідносини між патологічним ушкодженням печінки, ендотоксемією, перекисним окисленням ліпідів і активацією NF- κB і дисбалансом між про- і протизапальними цитокінами. Щурам (5 на групу) давали етанол і корм, що містив насичений жир, пальмову олію, кукурудзяну олію або рибаційний жир через шлунковий зонд. У контрольних мишей етанол ізокалорично замінювала декстроза. Виконували патологоанатомічний аналіз і здійснювали визначення ендотоксину, перекисного окислення ліпідів, NF- κB і рівні матричної РНК (мРНК) прозапальних цитокінів (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ і IL-12), С-С хемокинів (регуляцію після активації, нормальну експресію і секрецію Т-клітинами [RANTES], моноцитарний хемотаксичний білок [MCP]-1, макрофагальний запальний білок [MIP]-1 α), С-Х-С хемокинів (індукований цитокінами нейтрофільний хемоаттрактант [CINC], MIP-2, IP-10 і епітеліальний нейтрофіл-активуючий білок [ENA]-78) і протизапальних цитокінів (IL-10, IL-4 і IL-13). Активація NF- κB і підвищена експресія прозапальних цитокінів С-С і С-Х-С хемокинів спостерігалася у щурів, що мають некротично-запальне ушкодження (рибаційний жир-етанол і кукурудзяна олія-етанол). У даних групах також спостерігалися найбільш високі рівні ендотоксину і перекисного окислення ліпідів. Рівні мРНК IL-10 і IL-4 були нижчі в групі із запальним ушкодженням печінки. Таким чином, активація NF- κB спостерігається в присутності прозапальних подразників і приводить до підвищення експресії Th1 прозапальних цитокінів і хемокинів [Naji et al., 1999]. FAS ліганд і його рецептор також підвищені при алкогольних захворюваннях печінки, що знову наводить на думку про те, що цитокіни Th1 беруть участь в аутоімунних процесах, індукованих при алкогольному гепатиті [Galle et al., 1995; Taieb et al., 1998; Fiore et al., 1999].

TNF- α також виникає як поширений шлях при патогенезі пов'язаного з алкоголем некрозу-запалення печінки. Підвищені рівні печінкового і сироваткового TNF були зафіксовані документально у експериментальних тварин з алкогольним захворюванням печінки і при алкогольному захворюванні печінки у людини. Було висловлене припущення про те, що вказана дисрегуляція метаболізму TNF відіграє роль в багатьох метаболічних ускладненнях і ушкодженні печінки при алкогольному захворюванні печінки [Grove et al., 1997; McClain and Cohen, 1989]. Наприклад, в одному дослідженні було встановлено, що пацієнти з алкогольним гепатитом мають більш високі рівні TNF- α (в середньому 26,3 нг/л; 95% CI, від 21,7 до 30,9), ніж у нормальних суб'єктів (6,4 нг/л; CI, від 5,4 до 7,4). Пацієнти, які згодом вмирали, мали більш високий рівень TNF- α (34,7 нг/л; CI, від 27,8 до 41,6), ніж ті, які виживали (16,6 нг/л; CI, від 14,0 до 19,2). У пацієнтів з алкогольним гепатитом рівні TNF- α позитивно корелювали з сироватковим білірубіном ($r=0,74$; $P=0,0009$) та із сироватковим креатиніном ($r=0,81$; $P=0,0003$). Пацієнти з алкогольним гепатитом мали більш високі рівні TNF- α в

порівнянні з пацієнтами з неактивним алкогольним цирозом (11,1 нг/л; CI, від 8,9 до 13,3) та з особами, що зловживають алкоголем, без захворювання печінки (6,4 нг/л; CI, від 5,0 до 7,8). Пацієнти з порушеною функцією нирок мали більш низькі рівні TNF- α (14,1 нг/л; CI, від 5,4 до 22,8), ніж у пацієнтів з алкогольним гепатитом. Таким чином, був зроблений висновок про те, що підвищення TNF- α при алкогольному гепатиті найбільш виражене у важких випадках, що наводить на думку про те, що TNF- α грає роль в патогенезі [Bird et al., 1990].

TNF опосередковує багато з біологічних дій ендотоксину. Нещодавні дослідження показали, що введення TNF може викликати ушкодження печінки і що TNF може опосередковувати летальність гепатотоксину галактозаміну. Одним з найбільш могутніх індукторів TNF є ендотоксин. Оскільки у пацієнтів з алкогольним захворюванням печінки часто спостерігається ендотоксемія, і оскільки багато клінічних проявів алкогольного гепатиту являють собою відомі біологічні дії TNF, його активність оцінювали у пацієнтів з алкогольним гепатитом. Базальне і стимульоване ліпополісахаридами вивільнення TNF з моноцитів периферичної крові, головного джерела вироблення TNF, визначали у 16 пацієнтів з алкогольним гепатитом і у 16 здорових добровольців. У восьми з 16 пацієнтів з алкогольним гепатитом і тільки у двох із 16 здорових добровольців була спонтанна активність TNF, що піддавалася виявленню (p менше за 0,05). Після стимуляції ліпополісахаридами середнє вивільнення TNF з моноцитів пацієнтів з алкогольним гепатитом достовірно зростало більш ніж в два рази в порівнянні зі здоровими контролями ($25,3 \pm 3,7$ проти $10,9 \pm 2,4$ одиниць на мл, p менше 0,005). Таким чином, був зроблений висновок про те, що моноцити від пацієнтів з алкогольним гепатитом мали достовірно підвищене спонтанне і стимульоване ліпополісахаридами вивільнення TNF в порівнянні з моноцитами від здорових добровольців [McClain and Cohen, 1989].

Ліпополісахарид (LPS)-зв'язуючий білок (LBP) і CD 14 відіграють ключову проміжну роль в активації клітин ендотоксином. Було висловлене припущення про те, що отриманий з кишечника LPS бере участь в прогресуванні патологічного ушкодження печінки при алкогольному захворюванні печінки. Було показано, що пацюки, яким давали через шлунковий зонд етанол в олії протягом 4 тижнів, мали підвищені рівні CD 14 і LBP в купферівських клітинах і гепатоцитах, відповідно. Експресія мРНК CD 14 була також підвищена в немієлоїдних клітинах. Підвищена експресія LBP і CD 14 швидко підвищує LPS-індуковану експресію різних прозапальних цитокінів і корелює з наявністю патологічного ушкодження печінки при алкогольному ушкодженні печінки [Su et al., 1998; Lukkari et al., 1999].

Артрит являє собою захворювання, що включає запалення суглобів. У суглобах спостерігається припухання, ригідність, болючість, почервоніння або гіпертермія. Симптоми можуть супроводжуватись зниженням маси тіла, лихоманкою або слабкістю. У випадку, коли вказані симптоми тривають більше двох тижнів, причиною може бути запальний артрит, наприклад, ревматоїдний артрит. За-

палення суглобів також може викликати інфекція, яка може приводити до септичного артрити. Дуже поширеним типом артрити є дегенеративне захворювання суглобів (остеоартрит).

Лікарськими засобами, які найчастіше призначають при артриті і споріднених станах, є нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ - NSAID). НПЗЗ включають аспірин і аспіриноподібні лікарські засоби. Вони зменшують запалення, яке є причиною болю в суглобах, ригідності і припухання суглобів. Однак, НПЗЗ являють собою неспецифічні лікарські засоби, що мають ряд побічних ефектів, включаючи шлункову кровотечу [Сторінка в інтернеті по артриті відділення ортопедії Вашингтонського університету, Frederick Matsen (голова), www.orthop.washington.edu]. Крім НПЗЗ, Celebrex™, інгібітор циклооксигенази (COX-2), використовується для полегшення ознак і симптомів остеоартрити і ревматоїдного артрити у дорослих людей. Він також показаний для лікування пацієнтів з вродженим сімейним аденоматозним поліпозом.

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

Антагоністи TNF використовуються також для лікування артрити. Антагоністи TNF описані, наприклад, в WO 9103553.

Дослідження показують, що інтерлейкін IL-18 відіграє прозапальну роль в метаболізмі суглобів. Olee et al. (1999) показали, що IL-18 виробляється хондроцитами суглобів і індукуює прозапальну і кatabolічну відповідь. мРНК IL-18 була індукована IL-18 в хондроцитах. Хондроцити виробляли попередник IL-18, і у відповідь на стимуляцію IL-1 секретували зрілу форму IL-18. Вивчення впливу IL-18 на хондроцити далі показало, що він інгібує TGF- β -індуковану проліферацію і підвищує вироблення оксиду азоту. IL-18 стимулював експресію декількох генів в нормальних хондроцитах суглобів людини, включаючи індуковану синтазу оксиду азоту, індуковану циклооксигеназу, IL-6 і стромелізин. Експресія генів була пов'язана з синтезом відповідних білків. Дія IL-18 на нормальний суглобовий хрящ людини підвищувала вивільнення глікозаміногліканів. Вказані відкриття ідентифікували IL-18 як цитокін, який регулює відповідь хондроцитів і робить свій внесок в деградацію хряща.

Локалізація інтерлейкін- β -перетворюючого ферменту (ICE)/каспази-1 в остеоартритичних тканинах людини і його роль в дозріванні інтерлейкіну-1 β та інтерлейкіну-18 була показана Saha et al. (1999). Saha et al. вивчали експресію і вироблення каспази-1 в нормальному і остеоартритичному (ОА) хрящі і синовіальній оболонці людини, кількісно визначали рівень ICE в ОА хондроцитах і вивчали взаємовідносини між топографічним розподілом ICE, інтерлейкіну-1 β (IL-1(3)) і IL-18, а також апоптозом хондроцитів. Експерименти, виконані в даному дослідженні, показали, що ICE експресується і синтезується як в синовіальній оболонці, так і в хрящі людини; при цьому кількість клітин, що забарвлюються позитивно в ОА тканині достовірно вище, ніж в нормальній тканині. Вироблення ICE було переважно локалізоване в поверхневому і верхньому проміжному шарах суглобового хря-

ща. Вироблення зрілого IL-1 β в експлантатах і хондроцитах ОА хряща було повністю блоковане впливом специфічного інгібітору ICE, який також виважено зменшував кількість IL-18-позитивних клітин. Взаємовідносини між активними IL-1 β та ICE наводять на думку про те, що ICE може сприяти прогресуванню ОА шляхом активації даного прозапального цитокіну, і що IL-18 може відігравати роль в патології хряща.

Grade et al. (1999) припустили прозапальну роль IL-18 при ревматоїдному артриті. Grade et al. виявили мРНК і білок IL-18 в синовіальних тканинах при ревматоїдному артриті в достовірно більш високих рівнях, ніж у остеоартритичних контролів. Було показано також, що комбінація IL-12 або IL-15 з IL-18 індукуює вироблення IFN- γ синовіальними тканинами *in vitro*. Крім того, введення IL-18 мишам, імунізованим колагеном/неповним ад'ювантом Фрейнда, полегшувало розвиток ерозивного запального артрити, що наводить на думку про те, що IL-18 може володіти прозапальними властивостями *in vivo*.

Однак, до теперішнього часу, не враховуючи хімічні сполуки, тільки блокада TNF- α і IL-1 β шляхом використання розчинних рецепторів або моноклональних антитіл, як було показано, зменшує індукований колагеном артрит у мишей (CIA, який являє собою модель ревматоїдного артрити на мишах) [Williams et al., 1994], і, таким чином, вона була запропонована як спосіб лікування ревматоїдного артрити.

Термін "хронічні або ідіопатичні запальні захворювання кишечника" охоплює щонайменше два стани: хвороба Крона і виразковий коліт. Обидва вони є захворюваннями шлунково-кишкового тракту, причому хвороба Крона найчастіше уражає тонкий кишечник. У випадку, коли вона також залучає товстий кишечник, диференціальний діагноз з виразковим колітом (див. нижче) може бути проблематичним.

Хронічне запалення і покриття виразками при хворобі Крона звичайно починається тонкокишковою непрохідністю або болями в животі, які можуть імітувати гострий апендицит; інші прояви можуть відноситися до її ускладнень. Перебіг захворювання є хронічним, і, незважаючи на лікування, можуть наступати загострення і ремісії. Початок захворювання звичайно припадає на початок дорослого життя; біля половини всіх випадків починається між 20 і 30 роками і 90% - між 10 і 40 роками. Чоловіки хворіють трохи частіше, ніж жінки.

Дослідження під мікроскопом відображає загальну картину. Запалення не є безперервним: воно спостерігається фокусами або ділянками. Скупчення лімфоцитів і плазматичних клітин спостерігаються, головним чином, в слизовій оболонці і підслизовому шарі, але звичайно уражаються всі шари (трансмуральне запалення). Класичною мікроскопічною ознакою хвороби Крона є наявність гранулярних клітин, оточених скупченням лімфоцитів. Поширеність ідіопатичних запальних захворювань кишечника має значні географічні варіації. Вказані захворювання набагато частіше зустрічаються в північній Європі і Сполучених Штатах, ніж в країнах південної Європи, Африки, Південної

Америци і Азії, хоча зростаюча урбанізація і добробут населення приводить до більшої поширеності захворювання в областях південної Європи і Японії [General and Systematic Pathology, Churchill Livingstone, 3-є видання, JCE Underwood, Ed].

При хворобі Крона клінічно розрізняють дві головні групи: перша, що включає пацієнтів, захворювання яких переходить в тривалу ремісію протягом трьох років після початку, і друга, що включає пацієнтів із захворюванням, яке персистує понад три роки.

Якою б не була причина захворювання, є відомості про персистенцію і патологічну активацію Т-клітин і макрофагів при хворобі Крона, з підвищеним виробленням прозапальних цитокінів, зокрема, інтерлейкінів (IL) 1, 2, 6 і 8, інтерферону (IFN)- γ і фактора некрозу пухлин (TNF) α . Хвороба Крона характеризується тривалим (хронічним) запаленням, що супроводжується фіброзом. Процес проліферації фібробластів і відкладення колагену може опосередковуватись трансформуючим фактором росту β який має певні протизапальні властивості, а саме, рекруїтмент фібробластів, синтез матриксу і понижувальну регуляцію клітин запалення, але, ймовірно, в процесі бере участь безліч інших медіаторів.

Виразковий коліт являє собою неспецифічне запальне захворювання товстого кишечника, яке зазвичай починається в прямій кишці і розповсюджується проксимально на різному протязі. На відміну від хвороби Крона, виразковий коліт обмежується товстим кишечником.

Все більше даних свідчать про те, що виразковий коліт є наслідком зміненої аутоімунної реактивності, але ураження слизової оболонки також може виникати внаслідок патологічної активації Т-клітин і непрямого ушкодження, викликаного цитокінами, протеїназами і реакційноздатними кисневими метаболітами з макрофагів і нейтрофілів. Даний останній механізм ушкодження епітелію товстого кишечника отримав назву ушкодження "невинного свідка". Свідченням на користь аутоімунного механізму є присутність аутореактивних Т-лімфоцитів і аутоантитіл, направлених проти епітеліальних і ендотеліальних клітин товстої кишки, а також антинейтрофільних цитоплазматичних аутоантитіл (ANCA). Однак, не треба думати, що виразковий коліт є аутоімунним захворюванням, при якому ураження слизової оболонки є прямим наслідком імунної реакції на аутоантиген [General and Systematic Pathology, див. вище].

Що стосується лікування хвороби Крона, більшість людей спочатку лікують лікарськими засобами, що містять мезаламін, речовина, яка допомагає боротись із запаленням. Пацієнтів, яким вона не допомагає або які її не переносять, можна перевести на інші лікарські засоби, що містять мезаламін, звичайно відомі як 5-ASA агенти. Можливі побічні ефекти препаратів мезаламіну включають нудоту, блювання, печію, діарею і головний біль.

Деякі пацієнти для боротьби із запаленням приймають кортикостероїди. Вказані лікарські засоби є найбільш ефективними для лікування активної хвороби Крона, але вони можуть викликати

серйозні побічні ефекти, включаючи підвищену чутливість до інфекції.

Лікарські засоби, які пригнічують імунну систему, також можна використовувати для лікування хвороби Крона. Частіше за все призначають 6-меркаптопурин і споріднений лікарський засіб, азатіоприн. Імунодепресантні агенти діють шляхом блокування імунної реакції, яка вносить свій вклад в запалення. Вказані лікарські засоби можуть викликати такі побічні ефекти як нудота, блювання і діарея, і можуть знижувати опірність організму по відношенню до інфекції. У випадку, коли пацієнтів лікують комбінацією кортикостероїдів і імунодепресантних лікарських засобів, дозу кортикостероїдів можна в кінцевому результаті знизити. Деякі дослідження припускають, що імунодепресантні лікарські засоби можуть підвищити ефективність кортикостероїдів.

Адміністрація по харчових продуктах і лікарських засобах США дозволила використання лікарського засобу інфліксимаб для лікування помірно і тяжкої хвороби Крона, яка не піддається стандартній медикаментозній терапії (мезаламіновими речовинами, кортикостероїдами, імунодепресантними агентами), і для лікування відкритих нориць, що дренуються. Інфліксимаб, перший лікарський засіб, дозволений для використання конкретно при хворобі Крона, являє собою моноклональне антитіло проти фактора некрозу пухлин (TNF). Анти-TNF видаляє TNF з кровотоку до того, як він досягає кишечника, запобігаючи, таким чином, запаленню.

Антибіотики використовують для лікування надмірного розмноження бактерій в тонкому кишечнику, викликаного стриктурою, норицями або перенесеними оперативними втручаннями. З приводу даної поширеної проблеми лікар може призначити один або більше з наступних антибіотиків: ампіцилін, сульфонамід, цефалоспорин, тетрациклін або метронідазол.

Діарея і переймоподібні болі в животі часто полегшуються, коли зникає запалення, але може бути потрібне додаткове медикаментозне лікування. Можна використовувати декілька агентів проти діареї, включаючи дифеноксилат, лоперамід і кодеїн. Пацієнтів, які зневоднені внаслідок діареї, звичайно лікують рідинами і електролітами.

Все ще залишається потреба в ефективному лікарському засобі для лікування і/або профілактики запальних захворювань кишечника, зокрема, хвороби Крона (CD) і виразкового коліту (UC), який має зменшені побічні ефекти або, в ідеалі, не має побічних ефектів.

Як гістологічні, так і імунологічні дослідження показують, що клітинно-опосередкований імунітет і активація Т-клітин є головними ознаками CD. Дослідження на людях і експериментальних моделях передбачають, що при CD локальна імунна відповідь являє собою переважно відповідь Th1 типу [Desreumaux et al., 1997] і що локально вивільнені цитокіни, такі як IFN- γ , IL-10 і TNF- α , вносять свій вклад в розвиток і поширення запальної відповіді [Reimund et al., 1996].

Цитокін IL-18 відіграє важливу роль в Th1-опосередкованій імунній відповіді спільно з цитокіном IL-12 шляхом стимуляції секреції IFN- γ , поси-

лення цитотоксичності клітин натуральних кілерів і стимуляції диференціювання клітин Th1 [Utschito et al., 1996].

IL-18 діє спільно з IL-12, IL-2, антигенами, мітогенами і, можливо, іншими факторами, індуюючи вироблення IFN- γ . IL-18 також збільшує вироблення GM-CSF і IL-2, потенціює анти-CD3 індуквану проліферацію Т-клітин і підвищує Fas-опосередковане знищення клітин натуральних кілерів. Зрілий IL-18 виробляється з його попередника з участю IL-1 β -перетворюючого ферменту (ICE, каспази-1). Рецептор IL-18 складається щонайменше з двох компонентів, які діють спільно при зв'язуванні ліганду. Сайти зв'язування з IL-18 високої і низької афінності були виявлені в стимульованих мишачих IL-12 Т-клітинах [Okamoto et al., 1998], що передбачають рецепторний комплекс, що складається з безлічі ланцюгів. До теперішнього часу ідентифіковані дві рецепторні субодиниці, обидві з яких належать до сімейства рецепторів IL-1 [Okamoto et al., 1999]. В сигнальній трансдукції IL-18 бере участь активація NF- κ B [Matsumoto et al., 1997].

Нещодавно було висловлене припущення, що IL-18 бере деяку участь при запальних захворюваннях кишечника [Pizarro et al., 1999; Monteleone et al., 1999].

Pizarro et al. (1999) описали експресію і локалізацію IL-18 в зразках товстого кишечника і ізольованих популяціях клітин слизової оболонки від пацієнтів з хворобою Крона. Використовуючи напівкількісний протокол RT-PCR, кількість транскриптів мРНК IL-18, як було встановлено, зростає в щойно виділених епітеліальних клітинах кишечника і мононуклеарних клітинах lamina propria при CD, в порівнянні з пацієнтами з виразковим колітом і з контрольними пацієнтами, що не мають запалення. Транскрипти мРНК IL-18 спостерігалися в більшій кількості в епітеліальних клітинах кишечника в порівнянні з мононуклеарними клітинами lamina propria. Імуногістохімічний аналіз хірургічно резекованих тканин товстого кишечника показав локалізацію IL-18 як в мононуклеарних клітинах lamina propria (особливо, в макрофагах і дендритних клітинах), так і в епітеліальних клітинах кишечника. Аналіз вестерн-блот показав, що смугу 18,3кДа, відповідну як рекомбінантному, так і зрілому людському білку IL-18, виявляли переважно в біоптатах слизової оболонки при CD в порівнянні з UC; другу смугу 24кДа, відповідну неактивному попереднику IL-18, виявляли в незапалених ділянках біоптатів як при CD, так і при UC, і вона була єдиною формою, яку знаходили у контролів, що не мали запалення.

Monteleone et al. (1999) підтвердили вказані дані. Цільну тканину слизової оболонки кишки і мононуклеарні клітини lamina propria від 12 пацієнтів з хворобою Крона і 9 пацієнтів з виразковим колітом і від 15 контролів з незапальними захворюваннями кишечника піддавали аналізу на предмет IL-18 з використанням напівкількісної RT-PCR і аналізу вестерн-блот. Транскрипти для IL-18 виявили у всіх зразках, що аналізувалися. Однак, підвищене скупчення мРНК IL-18 було виявлене в зразках як слизової оболонки, так і мононуклеарних клітин lamina propria при хворобі Крона, в порівнянні з виразковим колітом і контролями. При хворобі Крона транскрипти для IL-18 спостерігалися в більшій кількості в зразках слизової оболонки, взятих з уражених областей. Смугу 18кДа, відповідну зрілому IL-18, виявляли переважно в зразках слизової оболонки при хворобі Крона. У зразках слизової оболонки контролів без IBD IL-18 був присутнім у вигляді поліпептиду 24кДа. Постійно активна субодиниця (p20) IL-1 β -перетворюючого ферменту (ICE) експресувалася в зразках як при CD, так і при UC, в той час як в слизовій оболонці товстої кишки контролів без IBD ICE синтезувався тільки у вигляді попередника (p45).

Ohta et al. в 2001 р. показали, що експресія IL-18 зростає в шкірі, ураженій псоріазом, в порівнянні з експресією в нормальній шкірі. Їх дані показують, що IL-18, отриманий з кератиноцитів, бере участь в розвитку Th1 відповіді в псоріатичних ураженнях і що його біологічна активність, як виявилось, суворо регулюється при запаленні шкіри.

На декількох моделях експериментальних тварин було показано, що антитіла, які нейтралізують ендогенний IL-18, зменшують тяжкість захворювання. Летальність, пов'язана з ендотоксиком, відвертається при використанні анти-IL-18. Навіть на моделях, які є незалежними від інтерферону- γ , нейтралізація IL-18 пролонгує виживання. Анти-IL-18 також захищають печінку від клітинного ушкодження, індукованого токсинами або активованими Т-клітинами. На моделях метастазів меланоми в печінку блокада IL-18 знижує адгезію злоякісних клітин шляхом запобігання підвищуючої регуляції IL-18 відносно експресії молекули адгезії-1 ендотелію судин. IL-18 і IL-12 діють синергічно відносно стимуляції вироблення IFN- γ Т-клітинами і клітинами натуральними кілерами, але нейтралізація IL-18 запобігає індукції IFN- γ . IL-18, подібно декільком цитокинам, можна використати для посилення захисту хазяїна проти пухлин у мишей, механізм, який найчастіше є залежним від IFN- γ . Проте, саме прозапальні властивості IL-18, ймовірно, вносять свій вклад в посилення захисту хазяїна. На моделях артриту, ушкодження легень або запального захворювання кишечника нейтралізація IL-18 виявляє важливу роль даного цитокину в опосередковуванні запалення [Dinarello, 2000].

Опубліковані дані свідчать, що IL-18 може відігравати патологічну роль в запальних захворюваннях ЦНС. Як було показано, нейтралізація IL-18 захищає експериментальних тварин від ушкодження головного мозку [Yatsiv et al., 2002], ішемічного ушкодження [Mallat et al., 2002], серцевої дисфункції [Raeburn, 2002] і невриту [Yu et al., 2002].

Однак, є свідчення, що IL-18 сприяє захисту хазяїна від пухлин у мишей. Наприклад, у сингенних мишей клітини мишачої карциноми молочної залози, що експресують мишачий IL-12 або мишачий IL-18, були менш онкогенними і утворювали пухлини більш повільно, ніж контрольні клітини, які не експресують [Coughlin et al., 1998]. Дослідження по нейтралізації антитіл показали, що протипухлинні ефекти вимагають наявності IFN- γ . У дослідженні, проведеному Tasaki, спостерігався

захисний імунітет, індукований в клітинах мишачої карциноми товстого кишечника, за допомогою експресії інтерлейкіну-18. Клітини раку товстого кишечника, трансдуковані векторами, що кодують ген IL-18, не могли утворювати підшкірних пухлин після введення імунокомпетентним мишам, і ставали резистентними до інокульованих нетрансдукованих клітин раку товстого кишечника. Імуногістохімічний аналіз показав, що кількість кровоносних судин в пухлинах товстого кишечника з клітинами, трансдукованими векторами IL-18, значно зменшувалась. Втрата онкогенності трансдукованими IL-18 клітинами товстого кишечника не спостерігалася у імунокомпрометованих мишей. Таким чином, IL-18, секретований з пухлинних клітин, діє як ад'ювант, оскільки він стимулює Т-хелперні клітини типу I індукувати протипухлинну відповідь [Tasaki et al., 2000].

Було висловлене припущення, що IFN- γ проявляє свою протизапальну дію *in vivo* у пацієнтів з хронічним гепатитом С, крім іншого, за допомогою індукції IL-18BP [Kaseretal., 2002].

У попередній роботі було встановлено, що в порівнянні зі здоровими особами, рівні IL-18BP були значно підвищені при багатьох захворюваннях, таких як сепсис [Novick, 2001], гостра реакція трансплантат проти хазяїна [Zecchina, 2001], хвороба Крона [Corbaz, 2002]. Однак, також було встановлено, що у даних пацієнтів рівні IL-18 в циркуляції є дуже високими і, отже, рівні IL-18BP, присутні в циркуляції, можуть бути недостатніми для повної нейтралізації IL-18.

Таким чином, існує потреба в забезпеченні засобів для лікування і/або профілактики захворювань, при яких в патогенезі бере участь цитокін з сімейства IL-1, такий як IL-18.

Даний винахід належить до застосування цитокіну-1, переважно, з сімейства IL-1, більш переважно, IL-1F7b, або його ізоформи, злитого білка, функціонального похідного або фрагмента, здатного зв'язуватися з IL-18BP або його мутеїном, злитим білком, функціональним похідним або фрагментом, і здатним інгібувати рецептор цитокіну-2; цитокін-2 є членом сімейства IL-1, переважно, IL-18; для виробництва лікарського засобу для лікування або профілактики захворювання, яке викликається або ускладнюється індукуванням вказаного рецептора цитокіну-2.

Більш конкретно, цитокін-1 інгібує активність цитокіну-2 шляхом зв'язування з сигнальним ланцюгом рецептора цитокіну-2. Таким чином, цитокін-1 можна застосовувати для лікування або профілактики запальних захворювань, вибраних з летальності, пов'язаної з ендотоксином (сепсису), ушкодження печінки, індукованого токсинами або активованими Т-клітинами, або гепатиту С, артриту, ушкодження легень, псоріазу, запального захворювання кишечника, ушкодження головного мозку, ішемічного ушкодження, дисфункції серця і невриту, або для лікування або профілактики утворення метастазів. Якщо це бажано, лікарський засіб за даним винаходом може додатково містити IL-18BP або його мутеїн, злитий білок, функціональне похідне або фрагмент.

Замість білка цитокіну-1, можна використати вектор, що кодує вказаний цитокін-1, для виробни-

цтва лікарського засобу для лікування або профілактики захворювання, яке викликається або ускладнюється індукуванням вказаного рецептора цитокіну-2.

Вказані вище білок (білки) і/або вектори за даним винаходом можна вводити системно, підшкірно і/або внутрішньом'язово.

Крім того, даний винахід відноситься до вектора для ендогенної генної активації цитокіну-1, переважно, з сімейства IL-1, більш переважно, IL-1F7b, здатного зв'язуватися з IL-18BP або його мутеїном, злитим білком, функціональним похідним або фрагментом, і здатним інгібувати рецептор цитокіну-2; цитокін-2 є членом сімейства IL-1, переважно, IL-18; для лікування або профілактики захворювання, яке викликається або ускладнюється індукуванням вказаного рецептора цитокіну-2. Більш конкретно, цитокін-1 інгібує активність цитокіну-2 шляхом зв'язування з сигнальним ланцюгом рецептора цитокіну-2. Більш конкретно, даний винахід відноситься до застосування цитокіну-1 для лікування або профілактики запальних захворювань, таких як летальність, пов'язана з ендотоксином (сепсис), ушкодження печінки, індукване токсинами або активованими Т-клітинами, або гепатит С, артрит, ушкодження легень, псоріаз, запальне захворювання кишечника, ушкодження головного мозку, ішемічне ушкодження, дисфункція серця і неврит, або для лікування або профілактики утворення метастазів. Якщо це бажано, лікарський засіб за даним винаходом може додатково містити IL-18BP або його мутеїн, злитий білок, функціональне похідне або фрагмент.

Вектор для ендогенної генної активації за даним винаходом можна вводити системно, підшкірно і/або внутрішньом'язово.

У іншому аспекті, даний винахід відноситься до застосування інгібітору цитокіну-1, переважно, з сімейства IL-1, більш переважно, IL-1F7b, або його ізоформи, мутеїну, злитого білка, функціонального похідного або фрагмента, здатного зв'язуватися з IL-18BP або його мутеїном, злитим білком, функціональним похідним або фрагментом, і здатним інгібувати рецептор цитокіну-2; цитокін-2 є членом сімейства IL-1, переважно, IL-18; для лікування або профілактики захворювання, яке запобігається або полегшується індукуванням вказаного рецептора цитокіну-2. Більш конкретно, винахід відноситься до застосування інгібітору цитокіну-1 за даним винаходом для лікування або профілактики вірусного захворювання або для лікування або профілактики злоякісної пухлини.

Інгібітори цитокіну-1 включають, наприклад, антитіла, безсмыслову нуклеїнову кислоту, РНКі або розчинний рецептор цитокіну-2 або його фрагмент, здатний зв'язуватися з цитокіном-1.

Крім того, даний винахід належить до способу інгібування рецептора цитокіну-2; цитокін-2 є членом сімейства IL-1, переважно, IL-18; у пацієнта, який в цьому має потребу, що включає введення терапевтично ефективною кількістю цитокіну-1, переважно, IL-1F7b, або його ізоформи, злитого білка або фрагмента, здатного зв'язуватися з IL-18BP або його ізоформою, мутеїном, злитим білком, або фрагментом. Більш конкретно, цитокін-1 інгібує активність цитокіну-2 шляхом зв'язування з сигна-

льним ланцюгом рецептора цитокіну-2. Більш конкретно, винахід відноситься до застосування цитокіну-1 для лікування або профілактики запальних захворювань, вибраних з летальності, пов'язаної з ендотоксином (сепсису), ушкодження печінки, індукованого токсинами або активованими Т-клітинами, або гепатиту С, артриту, ушкодження легень, псоріазу, запального захворювання кишечника, ушкодження головного мозку, ішемічного ушкодження, дисфункції серця і невриту, або для лікування або профілактики утворення метастазів. Якщо це бажано, IL-18BP або його ізоформу, мутеїн, злитий білок, функціональне похідне або фрагмент можна вводити спільно з цитокіном-1. Цитокін-1 за даним винаходом можна вводити системно, підшкірно і/або внутрішньом'язово.

Альтернативно, спосіб за даним винаходом включає введення векторів, що кодуєть вказаний цитокін-1.

Крім того, даний винахід відноситься до способу інгібітору рецептора цитокіну-2; цитокін-2 є членом сімейства IL-1, переважно, IL-18; у пацієнта, який в цьому має потребу, що включає введення терапевтично ефективної кількості вектора для генної активації цитокіну-1, переважно, IL-1F7b, або його ізоформи, мутеїну, злитого білка або фрагмента, здатного зв'язуватися з IL-18BP або його ізоформою, мутеїном, злитим білком або фрагментом. Більш конкретно, цитокін-1 інгібує активність цитокіну-2 шляхом зв'язування з сигнальним ланцюгом рецептора цитокіну-2. Цитокін-1 можна застосовувати для лікування або профілактики запальних захворювань, таких як летальність, пов'язана з ендотоксином (сепсис), ушкодження печінки, індуковане токсинами або активованими Т-клітинами, або гепатит С, артрит, ушкодження легень, псоріаз, запальне захворювання кишечника, ушкодження головного мозку, ішемічне ушкодження, дисфункція серця і неврит, або для лікування або профілактики утворення метастазів. Якщо це бажано, IL-18BP або його мутеїн, злитий білок, функціональне похідне або фрагмент можна вводити спільно з цитокіном-1. Вектор для генної активації за даним винаходом можна вводити системно, підшкірно і/або внутрішньом'язово.

В іншому аспекті даний винахід відноситься до способу інгібування цитокіну-1, переважно, з сімейства IL-1, більш переважно, IL-1F7b, або його ізоформи, злитого білка, функціонального похідного або фрагмента, здатного зв'язуватися з IL-18BP або його ізоформою, мутеїном, злитим білком або фрагментом і здатним інгібувати активність цитокіну-2; цитокін-2 є членом сімейства IL-1, переважно, IL-18; для лікування або профілактики захворювання, яке запобігається або полегшується індукуванням вказаного рецептора цитокіну-2. Більш конкретно, спосіб за даним винаходом включає інгібітор цитокіну-1 для лікування або профілактики вірусного захворювання або для лікування або профілактики злоякісної пухлини.

Фіг.1. Схожість послідовностей людського IL-18 і IL-1F7b

Показані людський IL-18 (№ в каталозі D49950) і людський IL-1F7b (№ в каталозі AF200496). Лінійна будова була створена з використанням системи Expert Protein Analysis System

(ExPasy[®]) з додатковим доведенням вручну. Амінокислотна ідентичність IL-18 з IL-1F7b становить 28%, а схожість - 55%. Підкреслені амінокислоти представляють сайт розщеплення ICE в IL-18 і прогнозований сайт розщеплення в IL-1F7b.

Фіг.2 показує, що IL-1F7b ні стимулює, ні інгібує вироблення IFN- γ , індуковане IL-18.

Фіг.2A. На людські клітини NKO, культури цільної людської крові, PBMC (стимульовані спільно з IL-12 (1нг/мл) і клітини KG-1 (стимульовані спільно з TNF- α (10нг/мл) впливали 100нг/мл рекомбінантного IL-1F7b (попередника і зрілої форми) або IL-18. Через 18г (48г для KG-1) визначали IFN- γ в надосадовій рідині. Результати показані як середнє \pm СОС трьом незалежним експериментам.

Фіг.2B. Індукція IL-18 (20нг/мл) клітин NK в присутності IL-12 (1нг/мл) і підвищення концентрації попередника і зрілої форми IL-1F7b. Дані представляють середнє \pm СОС трьом незалежним експериментам.

Фіг.3A і Фіг.3B показують перехресне зшивання IL-1F7b і позаклітинного домену 3 IL-18R α .

Фіг.3A. Відновний SDS-PAGE IL-1F7b, поперечно зшитого з IL-18R α : D3. Після блотингу на нітроцелюлозі поперечно зшиті білки візуалізували монокліональним mAb антитілом проти IL-18R α .

Фіг.3B. Утворення трикомпонентного комплексу IL-18R α - і β -ECD в присутності IL-18, але не IL-1F7b, після хімічного поперечного зшивання. Після вестерн-блотингу комплекси візуалізували міченим анти-his₆ монокліональним антитілом проти міченого his₆ IL-18R β .

Фіг.4A і Фіг.4B показують перехресне зшивання IL-1F7b і IL-18BP.

Фіг.4A. Виявлення поперечно зшитих білків (1,5мкг кожного) за допомогою аналізу вестерн-блот з використанням кролячої анти-IL-18BP сироватки.

Фіг.4B. Імунопреципітація поперечно зшитих білків (10мкг кожного) за допомогою mAb проти IL-18BP. Смуги поперечно зшитих IL-1F7b/IL-18BP і контролю (IL-18BP \pm BS3, поперечно зшиваючий агент) забарвлювали з використанням кролячої анти-IL-1F7b сироватки. Комплекс IL-18/IL-18BP виявляли з використанням кролячої анти-IL-18 сироватки.

Фіг.5A і Фіг.5B показують, що IL-1F7b посилює здатність IL-18BP інгібувати індуковане IL-18 вивільнення IFN- γ клітинами NKO.

Зрілий IL-1F7b 250нг/мл (A, 0=9) (фігура 5A) або попередник IL-1F7b (Фіг.5B) 250нг/мл (B, 0=8), IL-18 (25нг/мл) і розведення IL-18BP в RPMI/FCS 10% інкубували в 96-ямкових мікротитраційних планшетах протягом 1г до додання клітин NKO (0,5 \times 10⁶/мл) і IL-12 1нг/мл. Після 16г інкубації з клітинами надосадову рідину збирали і вимірювали IFN- γ . Величини виражали як процентну частку IFN- γ , виробленого клітинами NKO, стимульованими IL-18 25нг/мл плюс IL-12 1нг/мл, при відсутності IL-1F7b або IL-18BP. Статистичний аналіз здійснювали з використанням парного t-критерію Ст'юдента (***) величина p < 0,001).

Фіг.6 показує експресію IL-1F7b в трансфікованих RAW264.7.

Після стабільної трансфекції лізати окремих клонів (5×10^6 клітин) розділяли за допомогою SDS-PAGE і аналізували на експресію IL-1F7b з використанням аналізу вестерн-блот. Кроляча анти-IL-1F7b сироватка (розведення 1:500) специфічним чином забарвлювала IL-1F7b-позитивні клони.

Винахід відноситься до застосування цитокіну-1 (наприклад, IL-1F7b), здатного зв'язуватися з IL-18BP або його ізоформою, мутеїном, злитим білком, функціональним похідним або фрагментом і здатним інгібувати рецептор цитокіну-2; цитокін-2 є членом сімейства IL-1 (наприклад, IL-18R); для виробництва лікарського засобу для лікування або профілактики захворювання, яке викликається або ускладнюється індукуванням вказаного рецептора цитокіну-2. У даному описі терміни "інгібування рецептора цитокіну-2" і "інгібування активності цитокіну-2" є взаємозамінними. Таким чином, винахід відноситься до застосування цитокіну-1, здатного зв'язуватися з IL-18BP або його ізоформою, мутеїном, злитим білком, функціональним похідним або фрагментом і здатним інгібувати активність цитокіну-2, що являє собою цитокін-2, який є членом сімейства цитокінів IL-1. Винахід заснований на відкритті того факту, що IL-1F7b, як було показано, посилює інгібування активності IL-18 з допомогою IL-18BP. Було встановлено, що IL-1F7b зв'язується з IL-18BP, а комплекс інгібує активацію IL-18R з допомогою IL-18, можливо, із залученням сигнального ланцюга IL-18R (тобто, IL-18RP).

Цитокін-1, згідно з даним винаходом, може, переважно, бути членом сімейства IL-1, таким як IL-1F7b, IL-18, IL-1 і IL-1Ra. Згідно з даним винаходом, цитокін-1 і цитокін-2 є двома різними цитокінами. Наприклад, вибирають наступні комбінації цитокіну-1 і цитокіну-2: IL-1F7b (цитокін-1) і IL-18 (цитокін-2), IL-1F7b (цитокін-1) і IL-1 (цитокін-2), IL-18 (цитокін-1) і IL-1 (цитокін-2), IL-1 (цитокін-1) і IL-18 (цитокін-2), IL-1F7b (цитокін-1) і IL-1Ra (цитокін-2), IL-1Ra (цитокін-1) і IL-18 (цитокін-2) і IL-18 (цитокін-1) і IL-1Ra (цитокін-2).

IL-1F7b (який називається також IL-1H4) був відкритий нещодавно як новий член зростаючого сімейства білків, що має гомологічність послідовності з IL-1 α/β , IL-1Ra і IL-18 (сімейство IL-1). Хоч IL-1F7b зв'язується з однією з субодиниць рецептора IL-18, одиницею IL-18Ra, вказане зв'язування не має результатом агоністичну або антагоністичну функцію IL-18. Відповідно до даного винаходу, використовуючи хімічне поперечне зшивання, IL-1F7b зв'язується з IL-18Ra, але на відміну від IL-18, IL-1F7b не залучає ланцюг IL-18RP для утворення функціонально активного трикомпонентного комплексу.

Послідовності IL-1F7b і IL-18 порівнювали, і було встановлено, що білки мають дві спільні консервативні амінокислоти, тобто, амінокислоти E35 і K124 в IL-1F7b і E42 і K89 в IL-18. Залишки E42 і K89 в IL-18 є важливими як для активності, так і для інгібування IL-18, оскільки вони беруть участь в зв'язуванні з IL-18R α (активація) і з IL-18BP (інгібування).

Крім цього, заявники встановили за допомогою експериментів з поперечного зшивання, що IL-1F7b зв'язується з IL-18BP і аналогічно до IL-18, IL-1F7b може зв'язуватися з IL-18BP через ті ж два залиш-

ки консервативних амінокислот, які є важливими для зв'язування з IL-18R α (тобто, амінокислоти E35 і K124). Таким чином, після утворення IL-1F7b комплексу з IL-18BP, IL-1F7b, можливо, більше не здатний зв'язуватися з IL-18R α . Було встановлено, що IL-1F7b не тільки зв'язується з IL-18BP, але і підвищує його активність, тобто, посилює інгібування активності IL-18. Дана активність була виявлена як у попередника, так і у зрілого білка IL-1F7b. Оскільки IL-1F7b в комплексі з IL-18BP не здатний зв'язуватися з IL-18R α , інгібування активності IL-18, можливо, викликається зв'язуванням вказаного комплексу з сигнальним ланцюгом IL-18R β . Таким чином, (β -ланцюг може бути залучений в комплекс, що позбавляє β -ланцюг можливості формувати функціональний рецепторний комплекс з IL-18R α і IL-18.

Таким чином, винахід охоплює інгібування передачі сигналу через рецептор цитокіну-2; цитокін-2 є членом сімейства IL-1; іншим цитокіном (цитокін-1) або його ізоформою, мутеїном, алельним варіантом або фрагментом, здатним зв'язуватися з IL-18BP або його ізоформою, мутеїном, алельним варіантом або фрагментом.

Імуногістохімічні дослідження по локалізації показали присутність IL-1F7b в популяції моноцитів, що підтверджує роль IL-1F7b як натурального експресованого модулятора біологічної активності IL-18.

Термін "мутеїни", що використовується в цьому документі, відноситься до аналогів цитокіну-1, таких як IL-1F7b, в яких один або більше амінокислотних залишків цитокіну-1, наприклад, IL-1F7b, замінені на інші амінокислотні залишки або опущені, або один або більше амінокислотних залишків додані до IL-1F7b, без значної зміни активності отриманих продуктів в порівнянні з IL-1F7b. Більш конкретно, один або більше амінокислотних залишків IL-1F7b, але не більше за 30, переважно, не більше за 20, більш переважно, не більше за 10, найбільш переважно, один або два амінокислотних залишки, можуть бути замінені на інші амінокислотні залишки або бути відсутніми або можуть бути додані. Вказані мутеїни отримують з використанням відомих методик синтезу і/або сайтно-направленого мутагенезу або з використанням будь-якої іншої відповідної для даної мети методики.

Мутеїни відповідно до даного винаходу включають білки, що кодуються нуклеїновою кислотою, такою як ДНК або РНК, яка гібридизується з ДНК або РНК, яка кодує цитокін-1, такий як IL-1F7b, відповідно до даного винаходу, при суворих умовах. Термін "суворі умови" відноситься до умов гібридизації і подальшого відмивання, які фахівцями звичайно відносяться до "суворих". Див. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, supra, Interscience, N.Y., §§ 6.3 і 6.4 (1987, 1992) і Sambrook et al., supra. Без обмеження, приклади суворих умов включають умови відмивання при 12-20°C, нижче розрахованої T_m гібрида, що вивчається, в, наприклад, 2×SSC і 0,5% SDS протягом 5 хвилин, 2×SSC і 0,1% SDS протягом 15 хвилин, 0,1×SSC і 0,5% SDS при 37°C протягом 30-60 хвилин, а потім, 0,1×SSC і 0,5% SDS при 68°C протя-

гом 30-60 хвилин. Фахівці в даній галузі розуміють, що суворі умови також залежать від довжини послідовностей ДНК, олігонуклеотидних зондів (таких як 10-40 нуклеотидів) або змішаних олігонуклеотидних зондів. Якщо використовуються змішані зонди, перевагу слід надавати використанню хлориду тетраметиламонію (TMAC) замість SSC. Див. Ausubel, supra.

Будь-який подібний мутеїн переважно має амінокислотну послідовність, достатньо дуплікативну послідовність цитокіну-1, такого як IL-IF7b, таким чином, щоб він мав активність, практично аналогічну активності IL-IF7b. Однією активністю IL-IF7b є його здатність зв'язуватися з IL-18BP. Таким чином, можна визначити, чи має будь-який даний мутеїн практично таку ж активність як у IL-IF7b, за допомогою рутинного експериментування, що включає піддавання вказаного мутеїну, наприклад, простому конкурентному сандвіч-аналізу для того, щоб визначити, чи зв'язується він з відповідним чином міченим IL-18BP чи ні, такому як радіоімунаналіз або аналіз ELISA.

У переважному варіанті здійснення даного винаходу будь-який подібний мутеїн володіє щонайменше 40% ідентичністю або гомологічністю з амінокислотною послідовністю IL-IF7b. Більш переважно, він володіє щонайменше 50%, щонайменше 60%, щонайменше 70%, щонайменше 80% або, найбільш переважно, щонайменше 90% ідентичністю або гомологічністю з вказаною дмінокислотною послідовністю.

Мутеїни цитокіну-1, такого як IL-IF7b, які можна використовувати відповідно до даного винаходу, або кодуєчі їх нуклеїнові кислоти включають обмежений ряд практично відповідних послідовностей як заміняючі пептиди або полінуклеотиди, які може отримати звичайним способом фахівець, без зайвого експериментування, на основі ідей і керівництва, представлених в цьому документі.

Переважні зміни для мутеїнів відповідно до даного винаходу являють собою зміни, які відомі як "консервативні" заміни. Консервативні амінокислотні заміни цитокіну-1, такого як IL-IF7b, можуть включати синонімічні амінокислоти в межах групи, яка має досить схожі фізико-хімічні властивості, таким чином, що заміна між членами групи буде зберігати біологічну функцію молекули [Grantham, 1974]. Зрозуміло, що інсерції і делеції амінокислот також можуть бути вироблені у вказаних вище послідовностях без зміни їх функції, особливо, якщо інсерції або делеції торкаються тільки малої кількості амінокислот, наприклад, менше тридцяти і, переважно, менше десяти, і не видаляють або переміщують амінокислоти, які є ключовими для функціональної конформації, наприклад, залишки цистеїну. Білки і мутеїни, отримані в результаті подібних делецій і/або інсерцій, входять в об'єм даного винаходу.

Переважно, групи синонімічних амінокислот є тими, які визначені в таблиці 1. Більш переважно, групи синонімічних амінокислот є тими, які визначені в таблиці 2; і, найбільш переважно, групи синонімічних амінокислот є тими, які визначені в таблиці 3.

Таблиця 1

Переважні групи синонімічних амінокислот

Амінокислота Синонімічна група

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

Таблиця 2

Більш переважні групи синонімічних амінокислот

Амінокислота Синонімічна група

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

Таблиця 3

Найбільш переважні групи синонімічних амінокислот

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

Приклади здійснення амінокислотних замінів в білках, які можна використовувати для отримання мутеїнів цитокіну-1, таких як поліпептиди або білки IL-1F7b, для використання в даному винаході включають будь-які відомі стадії методів, 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 лізин-заміщені білки, представлені в патенті США № 4 904 584 [Shaw et al.].

Термін "злитий білок" відноситься до поліпептиду, включаючи цитокін-1, переважно, IL-1F7b, або його фрагменту, злитому з іншим білком, який, наприклад, більш тривало існує в рідинах організму. IL-1F7b, таким чином, може бути злитий з іншим білком, поліпептидом і т.п., наприклад, імуноглобуліном або його фрагментом.

"Функціональні похідні", як використовується в цьому документі, відносяться до похідних цитокіну-1, переважно, IL-1F7b, і його мутеїну і злитих білків, які можна отримати з функціональних груп, які присутні як бокові ланцюги на залишках або N- або C-кінцевих групах, з використанням відомих фахівцям методик, і включені в даний винахід, якщо тільки вони залишаються фармацевтично прийнятними, тобто вони не порушують активність білка, яка є практично аналогічною активності IL-1F7b, і не додають токсичних властивостей композиціям, що їх містять.

Вказані похідні можуть, наприклад, включати поліетиленгліколеві бокові ланцюги, які можуть маскувати антигенні сайти і продовжувати існування цитокіну-1, переважно, IL-1F7b, в рідинах організму. Інші похідні включають аліфатичні складні ефіри карбоксильних груп, амідні карбоксильних груп шляхом взаємодії з аміаком або з первинними або вторинними амінами, N-ацильні похідні вільних аміногруп амінокислотних залишків, утворені з ацильними частинами (наприклад, алканойльними або карбоциклічними ароїльними

групами) або O-ацильні похідні вільних гідроксильних груп (наприклад, залишків серину або треоніну), утворені з ацильними частинами.

Під "фрагментами" цитокіну-1, переважно, IL-1F7b або його мутеїнів і злитих білків в даному винаході мають на увазі будь-який фрагмент або попередників поліпептидного ланцюга білкової молекули нарізно або разом з асоційованими молекулами або залишками, приєднаними з ним, наприклад, залишками цукру або фосфату, або агрегати білкової молекули або самі залишки цукру, за умов, що вказана фракція має практично аналогічну активність з IL-1F7b, таку як зв'язування з IL-18BP і інгібування рецептора цитокіну-2.

Даний винахід відноситься також до цитокіну-1, переважно, ізоформам IL-1F7b, мутеїну, злитим білкам, функціональним похідним, активним фракціям або їх похідним з циклічними перестановками. Вказані ізоформи, мутеїни, злиті білки або функціональні похідні зберігають біологічну активність цитокіну-1, зокрема, зв'язування з IL-18BP і, переважно, посилення інгібування цитокіну-2. Наприклад, мутеїни IL-1F7b зберігають здатність зв'язуватися з IL-18BP і, переважно, посилювати інгібування IL-18. Мутеїни зберігають амінокислоту, що бере участь в зв'язуванні цитокіну-1 з IL-18BP. Наприклад, у випадку IL-1F7b мутеїни зберігають амінокислоти E35 і K124. В ідеалі вказані мутеїни мають підвищену біологічну активність в порівнянні з немодифікованим цитокіном-1. Переважні активні фракції мають активність, яка перевершує активність цитокіну-1 або яка має додаткові переваги, такі як більш висока стабільність або більш низька токсичність або імуногенність, або їх легше виготовляти у великих кількостях або легше очищувати.

Цитокін-1, переважно, IL-1F7b, можна використовувати в фармацевтичній композиції для лікування або профілактики запальних захворювань або утворень метастазів, які викликаються або обтяжуються цитокіном-2, переважно, IL-18. Було встановлено, що при декількох запальних захворюваннях рівень циркулюючого IL-18BP у пацієнтів є високим, однак концентрація IL-18BP може бути недостатньою для повної нейтралізації високих концентрацій IL-18, що виявляються в циркуляції у даних пацієнтів. Таким чином, введення цитокіну-1, переважно, IL-1F7b, вказаним пацієнтам, що мають вже підвищений рівень IL-18BP, може допомогти повністю інгібувати дію IL-18. Альтернативно, IL-1F7b і IL-18BP можна вводити пацієнтам разом для лікування або профілактики запальних захворювань, вибраних з летальності, пов'язаної з ендотоксином (сепсису), ушкодження печінки, індукованого токсинами або активованими Т-клітинами, або гепатиту С, артрити, ушкодження легень, псоріазу, запального захворювання кишечника, ушкодження головного мозку, ішемічного ушкодження, дисфункції серця і неврити, або для лікування або профілактики утворення метастазів.

Оскільки було встановлено, що IL-1F7b не тільки зв'язується з IL-18BP, але також підвищує його активність (інгібування активності IL-18), спільне введення IL-1F7b з IL-18BP може мати переваги, якщо бажано введення IL-18BP в більш низьких кількостях.

Цитокін-1, переважно, IL-1F7b, вводять відповідним шляхом, в залежності від захворювання. Так, його можна вводити, наприклад, місцево, системно, підшкірно і внутрішньом'язово.

Нейтралізація IL-18 у експериментальних тварин виявила важливу роль вказаного цитокіну в опосередкуванні запалення [Interleukin-18, a proinflammatory cytokine. Dinarello C.A. Eur. Cytokine Netw. 2000 Sep.; 11(3): 483-6]. Таким чином, даний винахід відноситься до застосування цитокіну-1 або експресуючого вектора, що включає кодуючу послідовність цитокіну-1, переважно, IL-1F7b, для виготовлення лікарського засобу для лікування або профілактики запалення. Таким чином, цитокін-1, переважно, IL-1F7b, можна вводити для лікування або профілактики запальних захворювань, при яких відомо, що IL-18 бере участь в їх патогенезі, таких як летальність, пов'язана з ендотоксиком (сепсис), ушкодження печінки, індуковане токсинами або активованими Т-клітинами, або гепатит С, артрит, ушкодження легень, псоріаз, запальне захворювання кишечника, ушкодження головного мозку, ішемічне ушкодження, дисфункція серця і неврит.

Даний винахід відноситься також до застосування експресуючого вектора для виготовлення лікарського засобу для профілактики утворення метастазів, оскільки блокада IL-18 знижує адгезію злоякісних клітин шляхом запобігання підвищуючій регуляції IL-18 відносно експресії молекули адгезії-1 ендотелію судин. Таким чином, розглядається підхід генної терапії з метою доставки цитокіну-1 до сайту, де він потрібен. Для того, щоб лікувати захворювання, вектор генної терапії, що включає послідовність цитокіну-1 (наприклад, IL-1F7b), можна ввести шляхом ін'єкції безпосередньо в уражену тканину, що дозволяє уникнути проблем, пов'язаних з системним введенням векторів генної терапії, таких як розведення вектора, досягнення і націлення на клітини або тканини-мішені або побічні ефекти. Альтернативно, експресуючий вектор, що включає кодуючу послідовність цитокіну-1 за даним винаходом, можна вводити за допомогою внутрішньом'язової ін'єкції.

Цитокін-1, переважно, IL-1F7b, і його ізоформи, мутеїни, злиті білки, функціональні похідні або активні фракції, як описано вище, є переважними активними інгредієнтами фармацевтичних композицій. IL-18BP і його ізоформи, мутеїни, злиті білки, функціональні похідні або активні фракції, як описано вище, можуть бути додатково включені як активний інгредієнт в фармацевтичні композиції.

Визначення "фармацевтично прийнятний" включає будь-який носій, який не заважає ефективності біологічної активності активного інгредієнта і не є токсичним для хазяїна, якому його вводять. Наприклад, для парентерального введення активний білок (білки) можна виготовляти у вигляді стандартної лікарської форми для ін'єкцій, в таких носіях як фізіологічний розчин, розчин декстрази, сироватковий альбумін і розчин Рінгера.

Активні інгредієнти фармацевтичної композиції за даним винаходом можна вводити індивідууму різними шляхами. Шляхи введення включають внутрішньошкірний, черезшкірний (наприклад, в композиціях з уповільненим вивільненням), внут-

рішньом'язовий, інтраперитонеальний, внутрішньовенний (системний), підшкірний, пероральний, інтракраніальний, епідуральний, місцевий і інтраназальний шляхи. Можна використати будь-який інший терапевтично ефективний шлях введення, наприклад, всмоктування через епітеліальні або ендотеліальні тканини, або за допомогою генної терапії, при якій пацієнту вводять молекулу ДНК, що кодує активний агент (наприклад, за допомогою вектора), що викликає експресію і секрецію активного агента *in vivo*. Крім того, білок (білки) за даним винаходом можна вводити шляхом з іншими компонентами біологічно активних агентів, такими як фармацевтично прийнятні поверхнево-активні агенти, наповнювачі, носії і розріджувачі.

Для парентерального введення (наприклад, внутрішньовенного, підшкірного, внутрішньом'язового) активний білок (білки) можна виготовляти у вигляді розчину, суспензії, емульсії або ліофілізованого порошку, разом з фармацевтично прийнятним парентеральним носієм (наприклад, водою, фізіологічним розчином, розчином декстрази) і допоміжними агентами, які підтримують ізотонічність (наприклад, манітом) або хімічну стабільність (наприклад, консервантами і буферними агентами). Композицію стерилізують за допомогою звичайних технологій.

Біологічну доступність активного білка (білків) за даним винаходом можна також поліпшити за допомогою процедур кон'югації, які збільшують напівперіод існування молекули в організмі людини, наприклад, зв'язуючи молекулу з подієтиленгліколем, як описано в патентній заявці PCT WO 92/13095.

Цитокін-1, переважно, IL-1F7b, або його ізоформи, мутеїни, злиті білки, функціональні похідні або активні фракції, як описано вище, можна використати для інгібування активності цитокіну-2 у пацієнтів, які страждають на запальні захворювання, такі як сепсис, ушкодження печінки, індуковане токсинами або активованими Т-клітинами, артрит, ушкодження легень, псоріаз або запальне захворювання кишечника. Цитокін-1 за даним винаходом або його ізоформи, мутеїни, злиті білки, функціональні похідні або активні фракції, як описано вище, можна також використовувати для профілактики утворення метастазів, оскільки блокада IL-18 знижує адгезію злоякісних клітин шляхом запобігання підвищуючій регуляції IL-18 відносно експресії молекули адгезії-1 ендотелію судин. Вказані вище способи включають введення терапевтично ефективної кількості цитокіну-1, наприклад, IL-1F7b, пацієнту, який в цьому має потребу, цитокін-1 можна вводити разом з IL-18BP або його ізоформами, мутеїнами, злитими білками, функціональними похідними або активними фракціями, як описано вище.

Терапевтично ефективні кількості активного білка (білків) будуть залежати від багатьох чинників, включаючи тип, афінність по відношенню до IL-18BP, будь-яка залишкова цитотоксична активність, властива мутантам, шлях введення, клінічний стан пацієнта.

"Терапевтично ефективна кількість" означає таку кількість цитокіну-1, такого як IL-1F7b, яка після введення приводить до підвищення інгібую-

чої активності IL-18BP або його ізоформ, мутеїнів, злитих білків, функціональних похідних або активних фракцій, як описано вище, відносно IL-18. До за, що вводиться індивідууму, однократна або множинна, може варіювати в залежності від ряду чинників, включаючи шлях введення, стан і характеристики пацієнта (стать, вік, маса тіла, здоров'я, розмір), поширення симптомів, супутнє лікування, частота лікування і бажаний ефект. Підбір і маніпуляції з встановленими межами доз знаходяться в компетенції фахівців, як і методи визначення активності цитокіну-1 *in vitro* і *in vivo*.

Застосування вектора для індукції і/або підвищення ендогенного вироблення цитокіну-1, переважно, IL-1F7b, в клітині, що звичайно не експресує цитокін-1 або експресує в недостатній кількості цитокін-1, також входить в об'єм даного винаходу. Вектор може включати регуляторні послідовності, функціональні в клітинах, для яких бажана експресія цитокіну. Дані регуляторні послідовності включають промотори або енхансери. Регуляторну послідовність потім вводять у відповідний локус геному шляхом гомологічної рекомбінації, оперативно зв'язуючи регуляторну послідовність з геном, експресію якого потрібно індукувати або підвищити. Дану технологію звичайно називають "ендогенною генною активацією" (EGA), і вона описана, наприклад, в WO 91/09955.

Фахівцеві буде зрозуміло, що можливо також припинити експресію цитокіну-1 за допомогою тих самих методик, наприклад, введенням елемента негативної регуляції, такого як елемент, що мовчить, в локус гена цитокіну-1, що приводить до понижувальної регуляції або запобігання експресії цитокіну-1. Фахівцеві буде зрозуміло, що подібна знижувальна регуляція або введення елемента, що мовчить, в цитокін-1 має таку ж дію як використання інгібітору цитокіну-1 з метою профілактики і/або лікування захворювання.

Таким чином, у випадку, коли бажане зменшення ефекту IL-18, такого як запальні захворювання, або для інгібування утворення метастазів, буде бажаним підвищення кількості або активності цитокіну-1, наприклад, IL-1F7b, в клітині. IL-18BP можна вводити разом з цитокіном-1, наприклад, IL-1F7b, для лікування суб'єкта, який в цьому має потребу.

Однак, зменшення кількості або активності цитокіну-1, наприклад, буде бажаним в ситуаціях, коли потрібне посилення ефекту IL-18, наприклад, для лікування/профілактики пухлини або для лікування або профілактики вірусного захворювання. Таким чином, використання цитокіну-1 і, переважно, IL-1F7b, як мішень також входить в об'єм даного винаходу.

Приклад 1:

Вплив IL-1F7b на стимуляцію вироблення IFN-

γ

На основі описаного зв'язування IL-1F7b з ланцюгом IL-18Rα [Pan, 2001, Kumar, 2002], були сплановані експерименти для того, щоб встановити, чи стимулює IL-1F7b, подібно до IL-18, після зв'язування з рецептором IL-18α, вироблення IFN-γ в клітинах. Молекула повної довжини (попередник IL-1F7b) або зріла молекула (зрілий IL-1F7b), що використовують E21 як N-кінець в передбаче-

ному сайті розщеплення ICE (див. Фіг.1), використовувалася в наступних експериментах. Людські клітини NKO [Kim, 2000], культури цільної людської крові, мононуклеарні клітини людської крові (PBMC) (спільно стимульовані IL-12 від Preprotech в дозі 1нг/мл) (отримання PBMC див. в прикладі 8) або клітини KG-1 (спільно стимульовані TNF-α в дозі 10нг/мл) (лінію отримували з ATCC Rockville, MD) стимулювали 100нг/мл рекомбінантного IL-1F7b (попередником або зрілою формою з прикладу 5) або IL-18. IFN-γ визначали (з допомогою електрохемілюмінесценції в рідкій фазі (ECL) в Puren, 1998) в кондиціонованому середовищі клітин через 18 годин після стимуляції (48 годин для KG-1). У той час як IL-18 виражено стимулював вироблення IFN-γ (Фіг.2A), ні попередник, ні зріла форма IL-1F7b не стимулювали ніякого вироблення IFN-γ у вказаних клітинах.

Таким чином, на відміну від IL-18, зв'язування IL-1F7b з ланцюгом IL-18Rα не запускає вироблення IFN-γ, тобто, зв'язування IL-1F7b з ланцюгом IL-18Rα не залучає ланцюг IL-18Rβ і, таким чином, не утворюється функціонально активний трикомпонентний комплекс.

Були виконані експерименти для того, щоб встановити, чи діє IL-1F7b як антагоніст IL-18, що запобігає зв'язуванню IL-18 з ланцюгом IL-18Rα і, отже, інгібує його біологічну активність і вироблення IFN-γ. Лінію людських клітин NK стимулювали IL-18 (20нг/мл) в присутності IL-12 (1нг/мл), із зростаючими концентраціями попередника і зрілого IL-1F7b, і моніторували вироблений IFN-γ. Отримані результати не показали інгібування попередником або зрілим IL-1F7b індукованого IL-18 IFN-γ, навіть коли IL-1F7b використовували в концентрації, що до 40 разів перевищує концентрацію IL-18 (Фіг.2B) або коли IL-1F7b заздалегідь інкубували протягом тривалого періоду часу з випробуваними клітинами до додання IL-18. Схожі результати були отримані для людських PBMC (дані не представлені).

Дані результати показують, що IL-1F7b ні стимулює, ні інгібує вироблення IFN-γ, індуковане IL-18.

Приклад 2:

Вивчення зв'язування IL-1F7b з рецептором IL-18

Є повідомлення про те, що IL-18 зв'язується з IL-18Rα через третій позаклітинний домен (IL-18Rα: D3) [Azam, 2002]. Для того, щоб вивчити зв'язування IL-1F7b з IL-18Rα, третій позаклітинний домен CD3 IL-18Rα індивідуально експресували в *E.coli* у вигляді міченого his6 білка і виділяли з використанням афінної хроматографії Talon. Потім IL-1F7b інкубували з вказаним очищеним IL-18Rα: D3 і здійснювали поперечне зшивання хімічним шляхом (приклад 7). Як показано на Фіг.3A, SDS-PAGE і аналіз вестерн-блот виявили комплекс 43кДа, що відповідає поперечно зшитим IL-1F7b і IL-18Rα: D3. Поперечне зшивання з IL-18Rα спостерігалось як з попередником, так і зі зрілим IL-1F7b. Вказані результати передбачають, що IL-18Rα: D3 є принципово важливим для зв'язування з IL-1F7b, той самий домен, який, як було показано раніше, є важливим для зв'язування з IL-18.

Після зв'язування IL-18 з IL-18R α залучається IL-18R β і утворюється активний трикомпонентний комплекс: IL-18/IL-18R α /IL-18R β . Таким чином, наступний експеримент був розроблений для того, щоб перевірити, чи запускає зв'язування IL-18R α з IL-1F7b, подібно до IL-18, утворення трикомпонентного комплексу IL-1F7b/IL-18R α /IL-18R β . Позаклітинні домени IL-18R α і IL-18R β вироблялися в клітинах Cos для того, щоб гарантувати правильну посттрансляційну модифікацію, таку як глікозилювання [Azam, 2002]. Після інкубації і хімічного поперечного зшивання IL-18, IL-18R α і IL-18R β високомолекулярний комплекс, що складається з IL-18R α , IL-18R β і IL-18, спостерігався при використанні аналізу SDS-PAGE поперечно зшитих білків (Фіг.3B). Однак, на відміну від IL-18, коли попередник або зрілий IL-1F7b інкубували з IL-18R α і IL-18 R β , вказаний трикомпонентний комплекс не спостерігався (Фіг.3B).

Таким чином, дані результати показують, що активний трикомпонентний комплекс не утворюється після зв'язування IL-1F7b з IL-18R α , тобто IL-18R β не притягується.

Приклад 3:

Зв'язування IL-1F7b з IL-18BP

Порівнювали амінокислотну послідовність IL-18 і IL-1F7b. Як показано на Фіг.1, IL-1F7b має дві спільні амінокислоти з IL-18, які в останньому є консервативними, E42 і K89. Як було показано, E42 і K89 відіграють ключову роль для активності IL-18 і для зв'язування з IL-18BP [Novick, 1999]. Таким чином, на основі подібності послідовностей IL-1F7b і IL-18 вивчали можливість зв'язування IL-1F7b з IL-18BP.

IL-1F7b (попередник або зрілу форму, 1,5мкг) або IL-18 (1,5мкг) інкубували в присутності або за відсутності IL-18BP і впливали поперечно зшиваючим реагентом B S3 (приклад 7). Виготовляли дві контрольні групи, що містили тільки білок IL-18BP; одну контрольну групу інкубували в присутності, а іншу - за відсутності поперечно зшиваючого реагенту B S3. Білки розчиняли на 10% SDS-PAGE в відновлювальних умовах і проводили блотинг на нітроцелюлозі. Білки виявляли в блотах за допомогою поліклональних антитіл, специфічних відносно IL-1F7b або IL-18. Результати, підсумовувані на Фіг.4A, показують нові смуги, які виявляються тільки в групах, що містять, крім IL-18BP, попередник IL-1F7b, зрілий IL-1F7b або IL-18, але не в контрольних групах. У блотах ідентифікували нову смугу приблизно 66кДа, яка містить попередник IL-1F7b, зв'язаний з IL-18BP, і нову смугу приблизно 64кДа, яка містить зрілий IL-1F7b, зв'язаний з IL-18BP (Фіг.4A).

Крім цього, здійснювали дослідження імунпреципітації з IL-1F7b (10мкг) або IL-18 (10мкг), інкубованими в присутності або за відсутності IL-18BP (10мкг) і поперечно зшитими. Білки, зв'язані і поперечно зшиті з IL-18BP, піддавали спільній імунпреципітації з використанням моноклональних антитіл, специфічних відносно IL-18BP. Імунні комплекси розчиняли на SDS-PAGE і проводили блотинг на нітроцелюлозі. Б лоти проявляли антитілами, специфічними відносно IL-1F7b або IL-18.

Спостерігали ті самі смуги 64 і 66кДа в дослідженнях спільної преципітації з IL-18BP (Фіг.4B). Дані поперечно зшиті смуги 64 і 66кДа відображають комплекси зрілий IL-1F7b/IL-18BP і попередник IL-1F7b/IL-18BP, відповідно. Дані результати підтверджують, що IL-1F7b зв'язується з IL-18BP.

Приклад 4:

Вплив IL-1F7b на інгібування активності IL-18, опосередкованої IL-18BP.

У світлі відкриття того факту, що IL-1F7b зв'язується з IL-18BP (див. попередній приклад), можливо, через той самий домен, з яким зв'язується IL-18, вивчали вплив IL-1F7b на інгібування активності IL-18, опосередкованої IL-18BP. Робоча гіпотеза полягала в тому, що IL-1F7b може конкурувати з IL-18 за зв'язування з IL-18BP, і, отже, IL-18 буде в меншій мірі нейтралізований IL-18BP в присутності IL-1F7b.

Зрілий IL-1F7b 250нг/мл або попередник IL-1F7b 250нг/мл інкубували з IL-18 (25нг/мл) і зростаючими концентраціями IL-18BP (1,56 - 50нг/мл) на 96-ямкових мікротитраційних планшетах протягом 1 г і додавали разом з IL-12 (1нг/мл) до клітин NKO (0,5×10⁶/мл). Після 16г інкубації надосадову рідину збирали і моніторували IFN- γ (за допомогою електрохемілюмінесценції в рідкій фазі (ECL) в ref Puren 1998).

Результати показують, що, протилежно гіпотезі, при низькій концентрації IL-18BP присутність IL-1F7b підвищує здатність IL-18BP інгібувати IFN- γ , індукований IL-18 (Фіг.5A і B). При 6,25нг/мл IL-18BP і в присутності зрілого IL-1F7b активність IL-18 зменшується з 76 до 55% (21% додаткове зниження активності). При 3,12нг/мл IL-18BP і в присутності зрілого IL-1F7b активність IL-18 зменшується з 59 до 40% (19% додаткове зниження активності). Попередник IL-1F7b в даному дослідженні був менш активним, ніж зрілий IL-1F7b (Фіг.5B). Даний ефект IL-1F7b мав високу відтворюваність і спостерігався тільки при низькій концентрації IL-18BP. Схожі результати були отримані при використанні PBMC (дані не представлені).

Приклад 5: Локалізація IL-1F7b

IgG, специфічні відносно IL-1F7b, були отримані з поліклональної кролячої анти-IL-1F7b сироватки і використані для вивчення експресії IL-1F7b в людських PBMC. Специфічність кролячої анти-IL-1F7b сироватки і препарату IgG вивчали двома різними способами, з використанням трансфекції RA W264.7 клітин макрофагів кДНК IL-1F7b. Спочатку IL-1F7b антисироватка специфічно розпізнавала IL-1F7b в лізаті IL-1F7b трансфікованих клітин RA W264.7 (Фіг.6). Потім, з допомогою конфокальної цифрової мікроскопії очищені по спорідненості анти-IL-1F7b IgG розпізнавали експресію IL-1F7b в трансфікованих RA W264.7, але не в імітуючих контрольних клітинах (не показано). Свіжовиділені людські PBMC (приклад 8) забарвлювали проти- IL-1F7b за допомогою очищених по спорідненості поліклональних кролячих IgG проти людського IL-1F7b в концентрації 1мкг/мл. За допомогою конфокального лазерного мікроскопа отримували сумарну картину моноцитів людської крові, що експресують IL-1F7b. Спостерігалася експресія IL-1F7b як в цитоплазмі, локалізованій на внутрішній поверхні плазматичної мембрани,

так і в ядрі (не показано). Зафарбовування в популяції лімфоцитів не спостерігалось.

Приклад 6:

Експресія і виділення білка

Наступні олігонуклеотидні праймери використовували для клонування кДНК IL-1F7b з бібліотеки селезінки людини (Clontech®HLOO11B, BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA): смисловий праймер 5'GTTGAGTAATAAACTCAACG (SEQ ID NO: 1), зворотний праймер 5'GTTCAATGGGGCAGTTTC (SEQ ID NO: 2) (специфічний для клону AF200496 (GenBank®) [Kumar, 2000]. КДНК IL-1F7b реампліфікували з використанням другої пари праймерів, з введенням сайтів розщеплення для EcoRI на кінці 5' і XbaI на кінці 3' (смисловий праймер 5'-ATATGAATTCATGTCCT1TGTGGGGGAG (SEQ ID NO: 3); зворотний праймер 5'-TATATCTAGAAGTTTCCTAATCGCTGACC (SEQ ID NO: 4). Використовуючи ТА-клонування, кДНК IL-1F7b перенесли в pGEM-T Easy® [Promega Corp. Madison, WI], згідно з інструкціями виробника, і верифікували коректну послідовність. КДНК IL-1F7b потім лігували в pPROEXTMHTa (Gibco-BRL) для бактеріальної експресії, з використанням сайту EcoRI і XbaI. Вектор pPROEXTMHTa містить N-кінцеву мітку Hisx6 для афінного очищення експресованого білка. Плазмиду pPROEXTMHTa/IL-1H4 трансформували в компетентний штам E.coli DH5a (Gibco-BRL). Інкубовану протягом ночі культуру (10мл) додавали до 200мл середовища LB, що містило 100мкг/мл ампіциліну, і вирощували до досягнення щільності 0,6-1 ОП₆₀₀.

Експресію білка індукували додаванням ізопропілтіогалактозиду (0,3мМ) і інкубацією при 37°C при струшуванні протягом 3 годин. Бактерії збирали центрифугуванням (5000 x g протягом 15 хвилин при 4°C) і центрифугальний осад суспендували в 25мл буфера Talon (50мМ NaH₂PO₄, 10мМ Tris-HCl, 100мМ NaCl, pH 8). Клітини лізували ультразвуком (4 x 10-секундних серій) на льоду, з подальшим центрифугуванням (4000 x g протягом 30хв. при 4°C). IL-1F7b отримували з тілець включення шляхом обробки сечовиною 8М. Надосадову рідину після обробки сечовиною освітлювали центрифугуванням, діалізували проти буфера Talon і вміщували на 2мл колонку міні-Talon. Колонку промивали 30-кратними об'ємами буфера Talon, а потім елюювали 5мл 100мМ імідазолу в буфері Talon. Елюент, що містив очищений по спорідненості IL-1F7b, відділяли з використанням препаративної SDS-PAGE. Гель забарвлювали з використанням Coomassie Blue® (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) і вирізуали смугу, що містила IL-1H4. Гель, що містив IL-1F7b, використовували для отримання поліклональних сироваток від кроликів, згідно з стандартними протоколами (Rockland Inc. Gilbertsville, AP). Повна довжина (попередник) і зрілий IL-1F7b (Текінець E21), використані в біологічних аналізах і для досліджень по поперечному зшиванню, вироблялися в E.coli, як описано раніше [Kumar, 2002].

Приклад 7:

Поперечне зшивання білків

Очищені білки змішували в 30мкл PBS і інкубували протягом 2 годин на льоду.

Потім в S3 (Біс(сульфосукцинілід)суберат) (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL) додавали до кінцевої концентрації 1мМ і суміш інкубували протягом 1 години при КТ. Реакцію гасили додаванням Tris-Cl, pH 7,4 (кінцева концентрація 20мМ). Після кип'ятіння протягом 5хв. білки розділяли з використанням 10% SDS-PAGE в відновлювальних умовах і проводили блотинг на нітроцелюлозі. Поперечно зшиті білки виявляли з допомогою кролячої антисироватки проти людського IL-18BP, IL-1F7b або IL-18 в розведенні 1:500.

Приклад 8:

Виділення PBMC

PBMC виділяли із залишкових лейкоцитів, позбавлених тромбоцитів, або з гепаринізованої крові здорових донорів. Лейкоцити, позбавлені тромбоцитів, або цільну кров розбавляли 1:1 фізіологічним розчином і вміщували на градієнти Ficoll-Histopaque (Sigma), як описано раніше [Kim, 2001]. Після центрифугування клітини на розділі шарів збирали, промивали три рази в фізіологічному розчині і ресуспендували в RPMI. Ізольовані PBMC тримали на льоду до початку дослідження.

Список літератури

Посилання, наведені нижче і включені в заяву, включені в цей документ як посилання.

1. Anderson, D.M., Maraskovsky, E., Billingsley, W.L., Dougall, W.C., Tometsko, M.E., Roux, E.R., Teepe, M.C., DuBose, R.F., Cosman, D., Galibert, L. (1997) "A. homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function." *Nature*, 390, 175-179.
2. Azam, T., Novick, D., Bufler, P., Reznikov, L. L., Yoon, D. Y., Rubinstein, M. Dinarrello, C A. & Kim, S. H. (2002) *J Immunol* submitted.
3. Barton, J. L., Herbst, R., Bosisio, D., Higgins, L. & Nicklin, M. J. (2000) *Eur J Immunol* 30, 3299-308.
4. Busfield, S. J., Comrack, C A., Yu, G., Chickering, T. W., Smutko, J. S., Zhou, H., Leiby, K. R., Holmgren, L. M, Gearing, D. P. & Pan, Y. (2000) *Genomics* 66, 213-6.
5. Bazan, J. F., Timans, J. C. and Kaselein, R. A. (1996) "A newly defined interleukin-1?" *Nature* 379, 591.
6. Born, T.L., Morrison, L.A., Esteban, D.J., VandenBos, T., Thebeau, L.G., Chen, N., Spriggs, M.K., Sims, J.E., Buller, R.M. (2000) "A poxvirus protein that binds to and inactivates IL-18, and inhibits NK cell response." *J Immunol* 164, 3246-54.
7. Corbaz et al.: *J Immunol* 2002 Apr 1; 168(7):3608-16.
8. Coughlin, CM., Salhany, K.E., Wysocka, M., Aruga, E., Kurzawa, H., Chang, A.E., Hunter, C.A., Fox, J.C., Trinchieri, G. and Lee, W.M. (1998) "Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis." *J Clin Invest* Mar, 101, 1441-52.
9. Debets, R., Timans, J. C., Homey, B., Zurawski, S., Sana, T. R., La, S., Wagner, J., Edwards, G., Clifford, T., Menon, S., Bazan, J. F. & Kastelein, R. A. (2001) *J Immunol* 167, 1440-6.

10. Desreumaux, P., Brandt, E., Gambiez, L., Emilie, D., Geboes, K., Klein, O., Ectors, N., Cortot, A., Capron, M., Colombel, J.F. (1997) *Gastroenterology* 113, 118-26.
11. Dinarello, C. A. (1996) *Blood* 87, 2095-147.
12. Dinarello "Interleukin-18, a proinflammatory cytokine." *Eur Cytokine Netw* 2000 Sep; 11(3):483-6.
13. Engelmann, H., Aderka, D., Rubinstein, M., Rotman, D. and Wallach, D. (1989) "A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity" *J. Biol. Chem.* 264, 11974-11980.
14. Engelmann, H., Novick, D. and Wallach, D. (1990) "Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors." *J. Biol. Chem.* 265, 1531-1536.
15. Ghayur, T., Banerjee, S., Hugunin, M., Butler, D., Herzog, L., Carter, A., Quintal, L., Sekut, L., Talanian, R., Paskind, M., Wong, W., Kamen, R., Tracey, D., and Alien, H. (1997) "Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production." *Nature* 386, 619-623.
16. Gong, J. H., Maki, G., Klingemarm, H. G. (1994) "Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells." *Leukemia* 8:652.
17. Gu, Y., Kuida, K., Tsutsui, H., Ku, G., Hsiao, K., Fleming, M. A., Hayashi, N., Higashino, K., Okamura, H., Nakanishi, K., Kurimoto, M., Tanimoto, T., Flavell, R. A., Sato, V., Harding, M. W., Livingston, D. J., and Su, M. S. (1997) "Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme." *Science* 275, 206-209.
18. Kaser A, Novick D, Rubinstein M, Siegmund B, Enrich B, Koch RO, Vogel W, Kim SH, Dinarello CA, and Tilg H. *Clin Exp Immunol* 2002 Aug; 129 (2):332-8.
19. Kim, S.H., Eisenstein, M., Reznikov, L., Fantuzzi, G., Novick, D., Rubinstein, M. and Dinarello, C.A. (2000) "Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18." *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 1190-5.
20. Kohno, K., J. Kataoka, T. Ohtsuki, Y. Suemoto, I. Okamoto, M. Usui, M. Ikeda, and M. Kurimoto. (1997) "IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12." *J. Immunol.* 158:1541-1550.
21. Kumar, S., McDonnell, P. C., Lehr, R., Tiemey, L., Tzimas, M. N., Griswold, D. E., Capper, E. A., Tai-Singer, R., Wells, G. L., Doyle, M. L. & Young, P.R. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 103-14.
22. Lin, H., Ho, A. S., Haley-Vicente, D., Zhang, J., Bernal-Fussell, J., Pace, A. M., Hansen, D., Schweighofer, K., Mize, N. K. & Ford, J. E. (2001) *J Biol Chem* 276, 20597-602.
23. Mallat, Silvestre J, Le Ricoussanne S, Lecomte-Raclet L, Corbaz A, Clergue M, Duriez M, Barateau V, Akira S, Tedgui A, Tobelem G, Chvatchko Y and Levy BI. (2002) *Ore Res.* 91 (5), 441-8.
24. Matsumoto, S., Tsuji-Takayama, K., Aizawa, Y., Koide, K., Takeuchi, M., Ohta, T., Kurimoto, M. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234, 454-7.
25. Monteleone, G., Trapasso, F., Parrello, T., Biancone, L., Stella, A., Juliano, R., Luzzza, F., Fusco, A., Pallone, F. (1999) *J. Immunol.* 163, 143-7.
26. Mulero, J. J., Pace, A. M., Nelken, S. T., Loeb, D. B., Correa, T. R., Drnmanac, R. & Ford, J. E. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 263, 702-6.
27. Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H. & Okamura, H. (2001) *Annu Rev Immuno* 19, 423-74.
28. Nakamura, K., Okamura, H., Wada, M., Nagata, K. and Tamura, T. (1989). "Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production." *Infect-Immun* 57, 590-5 issn: 0019-9567.
29. Nakamura, K., Okamura, H., Nagata, K., Komatsu, T. and Tamura, T. (1993) "Purification of a factor which provides a costimulatory signal for gamma interferon production." *Infect. Immun.* 61, 64-70.
30. Novick, D., Engelmann, H., Wallach, D. and Rubinstein, M. (1989) "Soluble cytokine receptors are present in normal human urine." *J. Exp. Med.* 170, 1409-14.
31. Novick, D., Cohen, B. and Rubinstein, M. (1992) "Soluble Interferon-alpha Receptor Molecules Are Present in Body Fluids." *FEBS Lett* 314, 445-8.
32. Novick, D., Cohen, B. and Rubinstein, M. (1994) "The Human Interferon alpha/beta Receptor-Characterization and Molecular Cloning." *Cell* 77, 391-400.
33. Novick, D., Kim, S., Fantuzzi, G., Reznikov, L.L., Dinarello, C.A. and Rubinstein, M. (1999) "Interleukin-18 Binding Protein: A Novel Modulator of the Th1 Cytokine Response". *Immunity* 10, 127, 36.
34. Novick, D., Schwartzburd, B., Pinkus, R., Suissa, D., Belzer, I., Sthoeger, Z., Keane, W. F., Chvatchko, Y., Kim, S. H., Fantuzzi, G., Dinarello, C. A. & Rubinstein, M. (2001) *Cytokine* 14, 334-42.
35. Ohta Y, Hamada Y, Katsuoka K. *Arch Dermatol Res* 2001 Jul; 293 (7):334-42
36. Okamura, H., Tsutsui, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., Hattori, K., Akita, K., Namba, M., Tanabe, F., Konishi, K., Fukuda, S., and Kurimoto, M. (1995) "Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells." *Nature* 378, 88-91.
37. Pan, G., Risser, P., Mao, W., Baldwin, D. T., Zhong, A. W., Filvaroff, E., Yansura, D., Lewis, L., Eigenbrot, C; Henzel, W. J. & Vandlen, R. (2001) *Cytokine* 13, 1-7.
38. Pizarro, T.T., Michie, M.H., Bentz, M., Woraratanadham, J., Smith, M.F., Foley, E., Moskaluk, C.A., Bickston, S.J., Cominelli, F. (1999) *J. Immunol.* 162, 6829-35.
39. Puren, A. J., Fantuzzi, G., Gu, Y., Su, M. S. & Dinarello, C. A. (1998) *J Clin Invest* 101, 711-21.
40. Puren, A. J., Razeghi, P., Fantuzzi, G. & Dinarello, C. A. (1998) *J Infect Dis* 178, 1830-4.
41. Puren, A.J., Fantuzzi, G., Dinarello, C.A. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 2256-61.
42. Raeburn CD, Dinarello C A, Zimmerman MA, Calkins CM, Pomerantz BJ, McIntyre RC Jr, Harken

AH and Meng X. (2002) AM J PHYSIOL HEART CIRC PHYSIOL 283 (2), H650-7.

43. Reimund, J.M., Wittersheim, C, Dumont, S., Muller, CD., Kermey, J.S., Baumann, R., Poindron, P., Duclos, B. (1996) Gut 39, 684-9.

44. Seki, S, Habu, Y., Kawamura, T., Takeda, K., Dobashi, H., Ohkawa, T., Hiraide, H. (2000) "The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses." Immunol Rev 174,35-46.

45. Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.H., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Boyle, WJ. (1997). "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density". Cell, 89, 309-19.

46. Smith, D. E., Renshaw, B. R., Ketchum, R. R., Kubin, M., Garka, K. E. & Sims, J. E. (2000) J Biol Chem 275, 1169-75.

47. Tasaki et al (2000) Cancer Gene Ther (2):247-54. Tsutsui, H., K. Nakanishi, K. Matsui, K. Higashino, H. Okamura, Y. Miyazawa, and K. Kaneda. (1996) "IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones". J. Immunol. 157,3967-73 issn: 0022-1767.

48. Urushihara, N., Iwagaki, H., Yagi, T., Kohka, H., Kobashi, K., Morimoto, Y., Yoshino, T., Tanimoto, T., Kurimoto, M., Tanaka, N. (2000) "Elevation of

serum interleukin-18 levels and activation of Kupffer cells in biliary atresia." J Pediatr Surg 35,446-9.

49. 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., and Kurimoto, M. (1996) J. Immunol. 156, 4274-9

50. Vigers, G.P., Anderson, L.J., Gaffes, P., Brandhuber, B.J. (1997) "Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1 beta." Nature 386,190-4.

51. Xiang, Y. and Moss, B.(1999)" IL-18 binding and inhibition of interferon gamma induction by human poxvirus-encoded proteins." Proc Natl Acad Sci USA 96, 11537-42.

52. Yasuda, H., Shima, K, Nakagawa, N., Mochizuki, S.I., Yano, K., Fujise, N., Sato, Y., Goto, M., Yamaguchi, K., Kuriyama, M., Kanno, T., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K. (1998) "Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro." Endocrinology, 139, 1329-37.

53. Yatsiv I, Morganti-Kossmann MC, Perez D, Dinarello CA, Novick D, Rubinstein M, Otto VI, Rancan M, Kossmann T, Redaelli CA, Trentz O, Shohami E, and Stahel PF. J Cereb Blood Metab 2002 Aug; 22 (8):971-8.

54. Yu S, Chen Z, Mix E, Zhu SW, Winbald B, Ljunggren HG, Zhu J. J Neuropathol Exp Neurol 2002; 61 (7):614-22.

55. Zecchina et al J Hematother Stem Cell Res 2001.

```

huIL-18  MAAEPVEDKCFNFVAMKFIDKT-LYPIAED---DEN---LESDYFGKLE---S--K
          :      .:::  .: . . .: : :  :.  . : :
huIL-1F7b  M-----SFVG---ENSGVTMGSSDKKDEPQCCELDPAVSPLEPGPSLPA

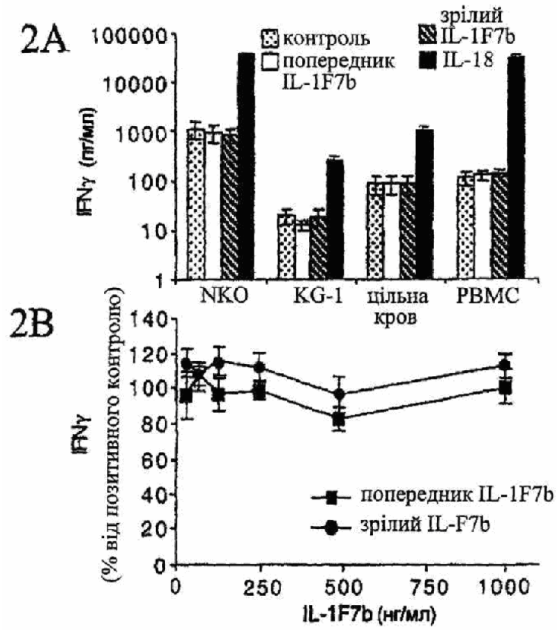
huIL-18  LS-V-----IRILN-----DQ---VLPTDQGN-----RP-LF---EDM
          ., :      .: : :      : :  : : : :      : : :
huIL-1F7b  MNFVHTSPKVKNLNPKKFSIRHQDEKVLVLDSCRLIAVPDKNYIRPEIFFALASSL

huIL-18  TSDSCRDHAPRTIFI-IS-----KY--KJ---SQPRGMAVTISVKCEKISTLSCEN
          . . . . .: : . : : : : : : : : : : : : : : : :
huIL-1F7b  SSASAEEKGSP--ILLGVSGEGFCLYCDKDKGQSHP-----SLQLKKKELMKLAQ-

huIL-18  KIISPKEMTFPDNIKDTYSDILFPQRSVPGHDKMQPSSSYEGYFL--ACE-KE-
          : :      . . . : : . : : : : : : : : : : :
huIL-1F7b  -----KE-----SARRPFITYFAQV-GSMN-K-LESAHPGWFICTSCNCNEP

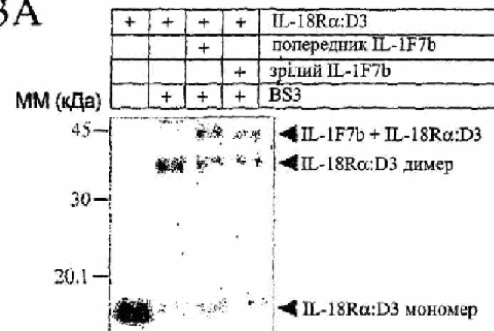
huIL-18  ---KDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQ-----NE--D
          : :      . : . . : : : : : : : : :
huIL-1F7b  VGVTDKF-----ENR---KHTEFSFPQVCKAEMSPSEVSD

```

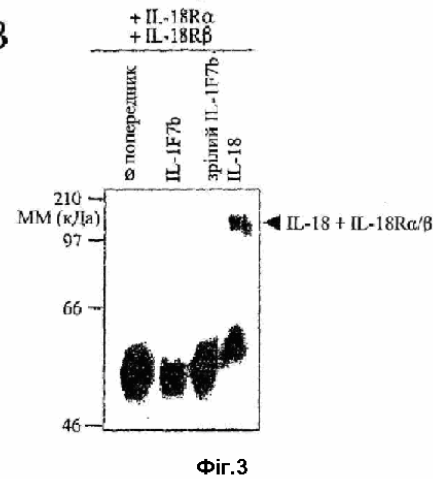


Фиг.2

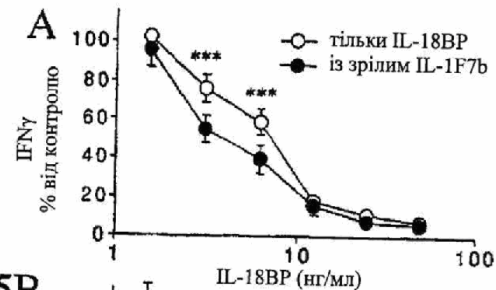
3A



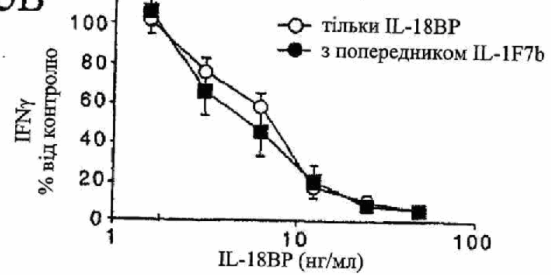
3B



5A



5B



Фиг.5

