



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(21) Broj prijave:

HR P20020652A A2

HR P20020652A A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: **A 61 K 39/395**

A 61 K 38/17
C 12 N 15/63
A 61 P 1/04
A 61 P 1/16
A 61 P 19/02
A 61 P 37/02
A 61 K 48/00
A 61 K 35/12
A 61 K 38/21
A 61 K 31/00

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 01.08.2002.

(43) Datum objave prijave patenta u HR: 31.12.2004.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/EP01/01867

Datum podnošenja međunarodne prijave 20.02.2001.

(87) Broj međunarodne objave: WO 01/62285

Datum međunarodne objave 30.08.2001.

(31) Broj prve prijave: 00103597.1
00103590.6
00121651.4
00125633.8

(32) Datum podnošenja prve prijave: 21.02.2000.
21.02.2000.
04.10.2000.
23.11.2000.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: EP
EP
EP
EP

(71) Podnositelj prijave:

Applied Research Systems ARS Holding N.V., Pietermaai 15, Curaçao, AN
Yeda Research and Development Co. Ltd., P. O. Box 95, 76100 Rehovot, IL

(72) Izumitelji:

Yolande Chvatchko, Chemin du Vuillonex, 1232 Confignon, CH
Charles Dinarello, 333 15th Street, Boulder, 80302 CO, US
Christine Plater-Zyberk, 16, quai du Cheval-Blanc, 1227 Geneva, CH
Santer Van Deventer, Kleine Houtweg 6, 2012 CH Haarlem, NL
Menachem Rubinstein, Hatomer Street 16, 54042 Givat Shmuel, IL
Daniela Novick, Hanassi Harishon 40, 76302 Rehovot, IL
Soo-Hyun Kim, Apt. C-112, 860 South Oneida Street, Denver, 80224 CO, US

(74) Punomoćnik:

PRODUCTA d.o.o., ZAGREB, HR

(54) Naziv izuma: **UPOTREBA INHIBITORA IL-18**

(57) Sažetak: Izum se odnosi na uporabu inhibitora IL-18 u priređivanju medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju oštećenja jetre. Ovaj izum se nadalje odnosi na uporabu IL-18 inhibitora u priređivanju medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju artritisa, konkretno reumatoidnog artritisa. K tome, izum se odnosi na uporabu inhibitora IL-18 za priređivanje medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju upalnih trbušnih bolesti, konkretno Crohnove bolesti i ulcerativnog kolitisa.

HR P20020652A A2

OPIS IZUMA**Područje izuma**

5 Izum je iz područja genetike i farmakologije.

Ovaj izum odnosi se na terapijsku uporabu IL-18 inhibitora u nekoliko patoloških stanja. Konkretno, izum se odnosi na tretman i/ili prevenciju artritisa, na tretman i/ili prevenciju bolesti jetre te na tretman i/ili prevenciju upalne trbušne bolesti (IBD).

Stanje tehnike

Godine 1989. opisana je endotoksin-inducirana serumska aktivnost koju izaziva interferon- γ (IFN- γ) dobiven iz mišjih stanica slezene (Micallef et al., 1996). Ova serumska aktivnost funkcionira ne kao izravni izazivač IFN- γ već prije kao ko-stimulator zajedno s IL-2 ili mitogenima. Pokušaj da se pročisti aktivnost od post-endotoksinskog mišjeg seruma rezultirao je gotovo homogenim 50-55 kDa proteinom. Budući da drugi citokini djeluju kao ko-stimulansi za proizvodnju IFN- γ , nesposobnost neutralizirajućih antitijela za IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 ili TNF da neutraliziraju serumsku aktivnost, ukazuju da je to bio različiti čimbenik. Godine 1995. isti znanstvenici su pokazali da endotoksin-inducirani ko-stimulator za proizvodnju IFN- γ postoji u ekstraktima jetre miševa koji su prekondicionirani s *P. acnes* (Novick et al., 1992). U ovom modelu, populacija hepatičkih makrofaga (Kupffer-ove stanice) se širi te u ovih miševa niska doza bakterijskih lipopolisaharida (LPS), koja u prekondicioniranih miševa nije letalna, postaje letalna. Čimbenik, nazvan IFN- γ -inducirajući čimbenik (IGIF) i kasnije oblikovani interleukin-18 (IL-18), bio je pročišćen do homogenosti 1 200 grama iz *P. acnes*-tretiranih mišjih jetara. Degenerirani oligonukleotidi koji su izvedeni iz aminokiselinskih sekvencija pročišćenog IL-18 korišten je da se načini nemišji IL-18 cDNA (Novick et al., 1992). IL-18 je jedan 18-19 kDa protein od 157 aminokiselina, koji nema očiglednih sličnosti s bilo kojim peptidom u bazi podataka. Glasničke RNA za IL-18 i interleukin-12 (IL-12) su detektirani u Kupffer-ovim stanicama i aktiviranim makrofagima. Rekombinantni IL-18 izaziva IFN-gama jačim nego što to čini IL-12, očigledno odvojenim putem (Novick et al., 1992). Slično endotoksin-induciranoj serumskoj aktivnosti, IL-18 ne izaziva sam IFN- γ , već funkcionira primarno kao ko-stimulator s mitogenima ili IL-2. IL-18 pojačava T staničnu proliferaciju, očigledno proz IL-2 ovisan put, te pojačava Th1 citokinsku proizvodnju in vitro i pojačava sinergizam kada se kombinira s IL-12 u smislu pojačane proizvodnje IFN- γ (Maliszewski et al., 1990).

Neutraliziranjem antitijela na mišje IL-18, pokazalo se, sprječava letalnost niskih doza LPS u *P. acnes* prekondicioniranih miševa. Ostali su naveli značaj IFN- γ kao medijatora LPS letalnosti u prekondicioniranih miševa. Primjerice, neutraliziranje anti-IFN- γ antitijela zaštićuje mišve od Shwartzman-sličnog šoka (Fantuzzi et al., 1998), dok galaktozamin-tretirani miševi deficitarni u IFN- γ receptoru otporni su prema LPS-induciranoj smrti (Bym, 1990). Dakle, nije neočekivano da neutraliziranje antitijela za mišji IL-18 zaštićuje *P. acnes*-prekondicionirane mišve protiv letalnog LPS LPS (Novick et al., 1992). Anti-mišji IL-18 tretman također zaštićuje preživljavanje miševa u odnosu na uznapređovalu hepatičnu citotoksičnost.

Nakon što je kloniran mišji oblik, humana cDNA sekvencija za IL-18 izvještana je 1996. godine (Okamura et al., 1995). Rekombinantni humani IL-18 pokazuje prirodnu IL-18 aktivnost (Okamura et al., 1995). Humani rekombinantni IL-18 je bez izravne IFN- γ -inducirajuće aktivnosti na humane T stanice, ali djeluje kao ko-stimulator za proizvodnju IFN- γ i drugih T-helper staničnih-1 (Th1) citokina (Okamura et al., 1995). Do danas, IL-18 se smatrao kao primarni ko-stimulator za proizvodnju Th1 citokina (IFN- γ , IL-2 i stimulirajući čimbenik kolonije granulocit-makrofaga) (Izaki, 1978) i također kao stimulator FAS ligand-posredovane citotoksičnosti klonova mišjih prirodnih staničnih uništivača (Novick et al., 1989).

Kloniranjem IL-18 iz zahvaćenih tkiva i proučavanjem IL-18 genske ekspresije, nađena je bliska veza ovog citokina i autoimune bolesti. Mršavi dijabetički (NOD) miševi spontano razvijaju autoimuni inzulitis i diabetes, koji se ubrzava i sonkonizira jednom injekcijom ciklofosfamida. IL-18 mRNA je demonstrirana pomoću reverzne transkriptaze PCR u NOD mišje gušterače tijekom ranog stupnja inzulitisa. Razine IL-18 mRNA povećava se brzo nakon ciklofosfamidnog tretiranja i prethodi porastu IFN- γ mRNA, te nakon toga diabetesu. Zanimljivo, ova kinetika podsjeća na onu IL-12-p40 mRNA, što rezultira bliskom korelacijom pojedinačnih mRNA razina. Kloniranje IL-18 cDNA iz gušterače RNA i nakon toga sekvenciranje pokazalo je identitet sa IL-18 sekvencijom iz Kupffer-ovih stanica i in vivo preaktiviranih makrofaga. Također NOD mišji makrofagi odgovaraju na ciklofosfamid s IL-18 gensko ekspresijom dok makrofagi iz Balb/c miševa koji su paralelno tretirani, ne odgovaraju. Prema tome, ekspresija IL-18 je nenormalno regulirana u autoimunih NOD miševa te je blisko povezana s razvojem šećerne bolesti (Novick et al., 1992).

IL-18 ima moguću ulogu u imunološkom reguliranju ili u upali povećavanjem funkcionalne aktivnosti Fas liganda na TH1 stanice (Conti et al., 1997). IL-18 je također ekspresiran u bubrežnoj kori i prema tome može biti izlučeni neuro-

imunoregulator, pri čemu ima važnu ulogu u usklađivanju imunološkog sustava nakon doživljenog stresa (Chater, 1986).

In vivo, IL-18 nastaje cijepanjem pro-IL-18, te se njegova endogena aktivnost može pripisati proizvodnji IFN- γ u P. acnes te LPS-upravnjanoj smrtnosti. Dozreli IL-18 nastaje iz svoga prekursora pomoću IL-1 β konvertirajućeg enzima (IL-1 beta-konvertirajući enzim, ICE, caspase-1).

IL-18 receptor sastoji se od bar dviju komponenti, koje surađuju pri vezanju liganda. Vezujuća mjesta visokog i niskog afiniteta za IL-18 nađena su u mišjim IL-12 stimuliranim T stanicama (Yoshimoto et al, 1998), što ukazuje na receptorski kompleks višestrukog lanca. Dvije receptorske podjedinice su dosad identificirane, a obje pripadaju IL-1 receptorskog familiji (Pamet et al., 1996). Transdukcija signala IL-18 uključuje aktiviranje NF-KB (DiDonato et al., 1997).

Nekoliko je poznatih citokinskih vezujućih proteina i topljivih citokinskih receptora te odgovaraju domenama ekstracelularnog vezanja liganda njihovih odgovarajućih staničnih površinskih citokinskih receptora. Oni su izvedeni bilo alternativnim izvlačenjem pre-mRNA, što je uobičajeno za stanični površinski receptor, ili proteolitičkim cijepanjem staničnog površinskog receptora. takvi topljivi receptori su već prije opisani, uključujući između ostalog topljive receptore IL-6 i IFN- γ (Nakamura et al., 1989), TNF (Dao et al., 1996; Engelmann et al., 1989), IL-1 i IL-4 (John, 1986), IFN- α/β (Mizushima and Nagata, 1990) te ostale. Jedan citokin-vezujući protein, koji se naziva osteoprotegerin (OPG, također poznat kao inhibitorski čimbenik osteoklasta - OCIF), koji je član TNFR/Fas obitelji, čini se da je prvi primjer topljivog receptora koji postoji samo kao izlučeni protein (Arderson, 1997; Bollon, 1980).

Nedavno, iz humanog urina izdvojen je topljivi protein koji ima visoki afinitet za IL-18, te su opisani humane i mišje cDNA (Novick et al., 1999; WO 99/09063). Protein je označen kao IL-18 vezujući protein (IL-18BP).

IL-18BP nije ekstracelularna domena jednog od poznatih IL18 receptora, već izlučeni, prirodno cirkulirajući protein. On pripada novoj obitelji izlučenih proteina. Obitelj nadalje obuhvaća nekoliko poxvirus-kodiranih proteina koji imaju visoku homologiju za IL-18BP (Novick et al., 1999). IL-18BP je konstruktivno izražen u slezeni, pripada imunoglobulinskoj superfamiliji, te ima ograničenu homologiju za IL-1 tip II receptor. Njegov gen je lokaliziran u ljudskom kromosomu 11q13, i noexon kodiranje za transmembransku domenu nađeno je u 8.3 kb genomskoj sekvenciji (Novick et al., 1999).

Četiri humane i dvije mišje izoforme IL-18BP, koje su rezultat mRNA izdvajanja i nađene su u različitim cDNA bibliotekama su ekspresirane, pročišćene, te procijenjene za vezanje i neutraliziranje IL-18 bioloških aktivnosti (Kim et al., 2000). Humana IL-18BP izoforma a (IL-18BP_a) pokazuje najveći afinitet za IL-18 s rapidnim ubrzanjem, sporim usporjenjem, te konstantom disocijacije (K(d)) od 399 pM. IL-18BP dijele Ig domenu od IL-18BP_a osim za 29 C-terminalnu aminokiselinu; K(d) od IL-18BP_c je 10 puta manji (2,94 nM). Ipak, IL-18BP_a i IL-18BP_c neutraliziraju IL-18 >95% s molarnim suviškom dva. IL-18BP_b i IL-18BP_d izoforme nemaju potpunu Ig domenu i nedostaje im sposobnost da vežu ili neutraliziraju IL-18. Mišje IL-18BP_c i IL-18BP_d izoforme, koje posjeduju identičnu Ig domenu, također neutraliziraju >95% mišji IL-18 s molarnim suviškom dva. Međutim, mišji IL-18BP_d, koji dijeli zajednički C-terminalni motiv s humanim IL-18BP_a, također neutralizira humani IL-18. Molekularno modeliranje identificiralo je velika miješana elektrostatička i hidrofobna vezujuća mjesta u Ig domeni IL-18BP, što bi se moglo pripisati velikom afinitetu vezanja za ligand (Kim et al., 2000).

Nedavno, sugerirano je da je interleukin-18 uključen u progresiju patogenosti u kroničnim upalnim bolestima, uključujući endotoksinski šok, hepatitis, te autoimuni dijabetes (Kahiwamura and Okamura, 1998). Sljedeća naznaka moguće uloge IL-18 u razvoju oštećenja jetre rezultat je eksperimenata koje je publicirao Tsuij et al. (Tsuij et al., 1999), koji su pokazali povećanu razinu IL-18 u lipopolisaharid-induciranom akutnom oštećenju jetre u mišjem modelu. Međutim, mehanizam multi-funkcionalnog čimbenika IL-18 u razvoju oštećenja jetre još nije posve rasvijetljen.

Oštećenje ili bolest jetre mogu imati različite uzroke. Oni mogu biti zbog virusnih ili bakterijskih infekcija, alkohola, imunoloških poremećaja.

Virusni hepatitis, zbog virusa hepatitisa B i hepatitisa C, je bolesti kojom se slabo upravlja koja pogada veliki broj ljudi u svijetu. Broj poznatih virusa hepatitisa stalno raste. Osim virusa hepatitisa B i C, bar četiri druga virusa izazivaju virusni hepatitis, koji se nazivaju hepatitis A, D, E i G virusi.

Alkoholna bolest jetre je sljedeća raširena bolest koja je povezana s kroničnim konzumiranjem alkohola. Imuni hepatitis je rijetka autoimuna bolest kojom se slabo upravlja. Oštećenje jetre također uključuje i oštećenje žučnih putova. Primarna bilijarna siroza (PBC) je autoimuna bolest jetre koja je karakterizirana uništenjem intrahepatičkih žučnih kanala.

Nekoliko istraživanja je pokazalo da je oštećenje jetre u bolestima kao što je alkoholni hepatitis, jetrena ciroza, virusni hepatitis i primarna bilijarna ciroza povezano s odgovorom T-helper stanica-1 (Th1). U jednom istraživanju, utvrđen je novi model oštećenja jetre u miševa ciljanjem liposoma koji sadrže ovalbumin u jetri, nakon čega slijedi adoptivni prijenos ovalbumin-specifičnih Th1 stanica. Kombinirani tretman miševa s liposomima koji sadrže ovalbumin i prijenos Th1 stanica izazvan je povećanjem aktivnosti serumske transaminaze, koja je bila paralelna s povećanom razinom serumskog IFN- γ levels. U oštroj kontrastu, prijenos ovalbumin-specifičnih Th2 stanica rezultira povećanjem razine IL-4 ali ne izaziva oštećenje jetre. Oštećenje jetre je blokirano s anti-IFN- γ antitijelima i antitijelima čimbenika antitumorske nekroze (TNF)- α . Ovi nalazi ukazuju da su Th1 stanice glavne efektorske stanice u akutnom oštećenju jetre (Nishimura and Ohta, 1999). U sljedećem skupu istraživanja pokazalo se da mišja pre-ekspresija IFN- γ pokazuje spontani hepatitis bez bilo kojeg patogenog ili nekog drugog stimulansa (Okamoto et al., 1998).

Drugo istraživanje uključilo je Th1 odgovore u primarnoj bilijarnoj cirozi (PBC). PBC je autoimuna bolest jetre koja je karakterizirana uništenjem intrahepatičkih žučnih putova, te se općenito vjeruje da stanični imuni mehanizmi, poglavito oni koji uključuju S stanice, rezultiraju oštećenjem žučnih putova. Relativna snaga Th1 i Th2 odgovora je nedavno predložena kao značajan čimbenik u patofiziologiji različitih autoimunih bolesti. U ovom istraživanju, podskupna ravnoteža u PBC je procijenjena detektiranjem citokina specifičnih za dva T-stanična podskupa, tj. IFN- γ za Th1 stanice i IL-4 za Th2 stanice. Pozitivne stanice IFN- γ i IL-4 glasnička RNA (mRNA) nađene su u jetrenim sekcijama 18 bolesnika s PBC i 35 bolesnih kontrola koje su uključivale kronični aktivan hepatitis C, ekstrahepatičku bilijarnu opstrukciju, te normalnu jetru, pomoću neizotopske in situ hibridizacije i imunohistokemije. Ekspresija mononuklearnih stanica IFN- γ i IL-4 mRNA je agregirana u upalnim portalnim traktovima u PBC jetri, ali je rijetko prisutna u ekstrahepatičkoj bilijarnoj opstrukciji, alkoholnoj fibrozi ili normalnim sekcijama jetre. IFN- γ i IL-4 mRNA pozitivne stanice u PBC jetri nađene su u značajno većem broju u kontrolnoj jetri ($P < 0,01$). Štoviše, IFN- γ mRNA ekspresija je češće detektirana nego IL-4 ekspresija u PBC jetri, te su razine IFN- γ mRNA ekspresije jače korelirane sa stupnjem portalne upalne aktivnosti. IFN- γ mRNA-pozitivne stanice su porimarno detektirane oko oštećenog žučnog kanala koji je okružen limfoidnim agregatima. Podaci pokazuju da su Th1 stanice prominentniji T-stanični podskup u limfoidnim infiltratima u PBC (Harada et al., 1997).

Citokinska slika prepoznavanja virusnog antigena također, vjeruje se, izražava duboki utjecaj na razdvajanje virusnih infekcija i virusnog oštećenja. U jednom istraživanju ispitano je je li citokinska neravnoteža usmjerena prema Th22 tipu odgovora ima ulogu u kroničnom hepatitisu B. Citokinski profili mononuklearnih stanica periferne krvi koja je povezana s kroničnim hepatitisom B, analizirana je pomoću RT-PCR. Nakon stimuliranja hepatitis B površinskog antigena (HBsAg), ekspresija IFN- γ , IL-2, IL-4 i IL-10 detektirana je u 41%, 8%, 41% i 50% bolesnika. Među ovim citokinima, ekspresija Th1 citokina IFN- γ povezana je s visokim razinama serumskog AST/ALT (aspartat aminotransferaza/alanin aminotransferaza), što predstavlja tipične obilježivače oštećenja jetre. Citokini tipa Th2 nije nađeno da pokazuju zaštitni učinak na hepatocite. Kao zaključak, proizvodnja Th1 citokina, IFN- γ pomoću HBsAg-reaktivnih stanica povezano je s hepatocitnim oštećenjem u kroničnom hepatitisu B (Lee et al., 1999). Visoke razine FAS liganda i njegova receptora (CD95) izvješćeno je za jetru u bolesnika od hepatitisa B (Luo et al, 1997). FAS ligand se smatra da je jedan od glavnih citotoksičnih sredstava koja dovode do hepatocitne apoptoze.

Sljedeće istraživanje je identificiralo čimbenike koji su povezani s progresijom oštećenja jetre u 30 hepatitis C virus/RNA (HCV/RNA)-pozitivnih netretiranih bolesnika s kroničnim hepatitisom. Nekroupalno i arhitekturno oštećenje je procijenjeno korištenjem Ishak-ova indeksa. Aktivirane hepatičke stielne stanice (HSC) vizualizirane su imunohistokemijski za aktin glatkog mišića (aSMA) i kvantificirane morfometrijski. Plazma HCV/RNA je procijenjena pomoću kompetitivne RT-PCR metode.

Da se ispita tip imunog odgovora koji je uključen u progresiji oštećenja jetre, imunohistokemijski su ispitane IFN- γ -pozitivne stanice (kao ekspresija Th1-sličnog odgovora) te kvantitativno pomoću morfometrije. Nađeno je da je HSC detektiran blizu područja lobularne nekroupale ili granične fibrotične septe. aSMA- i Sirius Red-pozitivan parenhim korelirao je značajno s nekroupalom i arhitekturnim indeksom. IFN- γ -pozitivne stanice detektirane su u periportalnom području koji je povezan s upalnim infiltratima i značajno korelira s arhitekturnim oštećenjem. Prema tome, zaključeno je da HSC aktiviranje i progresija oštećenja jetre možemo povezati s Th1-sličnim odgovorom (Baroni et al, 1999). Slično kao u slučaju hepatitisa B, FAS ligand i njegovi receptori su nađeni u jetri i serumu bolesnika hepatitisa C (Hiramatsu et al, 1994; Okazaki et al, 1996; Lio et al., 1998).

Th1 citokini i drugi Th1 obilježivači je nađeno da su povezani s alkoholnim hepatitisom i cirozom jetre.

Upalni stimulansi je nuklearni čimbenik aktivacije lipid peroksidacije κ B (NF- κ B) i doregulator proupalnih citokina i kemokina. U jednom istraživanju, istražen je odnos između patološkog oštećenja jetre, endotoksemije, NF- κ B aktivacije i neravnoteže između pro- i protivupalnih citokina. Štakori (5 po skupini) su hranjeni etanolom i hranom koja sadrži

mast, palmino ulje, kukuruzno ulje ili riblje ulje, intragastričnom infuzijom. U kontrolnih štakora, dekstroza je kalorijski zamijenila etanol.

Patološka analiza je izvršena i izvršeno je mjerenje endotoksina, lipid peroksidacije, NF- κ B, te razina glasnike RNA (mRNA) proupalnih citokina (TNF α , IL-1 β , IFN- γ i IL-12), C-C kemokini (regulirani nakon aktiviranja, normalne T stanice s ekspresijom i izlučivanjem [RANTES], monocitni kemotaktični protein [MCP]-1, protein upale makrofaga [MIP]-1- α), C-X-C kemokini (citokin izazvani neutrofil kemoatraktant [CINC], MIP-2, IP-10, te epitelni neutrofil aktivirajući protein [ENAJ-78], te protivupalni citokini (IL-10, IL-4 i IL-13). Aktiviranje NF- κ B i povećana ekspresija proupalnih citokina C-C i C-X-C kemokina uočeno je u štakora koji pokazuju nekroupalno oštećenje (ribljeulje-etanol i kukuruzno ulje-etanol). Ove skupine također su imale najveću razinu endotoksina i lipid peroksidacije. Razine IL-10 i IL-4 mRNA bile su niže u skupini koja je pokazala upalno oštećenje jetre.

Prema tome, aktiviranje NF- κ B događa se u prisutnosti proupalnog stimulatora te rezultira povećanom ekspresijom Th1 proupalnih citokina i kemokina (Naji et al., 1999). FAS ligand i njegov receptor su također povišeni u alkoholnim bolestima jetre, što opet ukazuje da su Th1 citokini uključeni u autoimuni proces koji je uključen u alkoholnom hepatitisu (Galle et al., 1995; Taieb et al., 1998; Fiore et al., 1999).

TNF- α se također javlja kao opći put u patogenezi alkohol-srodnih hepatičkih nekro-upala. Povećana razina TNF u jetri i serumu dokumentirana je u životinjskom modelu alkoholne bolesti jetre te u humanoj alkoholnoj bolesti jetre. Ova disregulacija TNF metabolizma pretpostavljeno je da ima ulogu u mnogim metaboličkim komplikacijama i u oštećenju jetre zbog alkoholne bolesti jetre (Grove et al., 1997; McClain and Cohen, 1989). Primjerice, nadenno je u jednom istraživanju da bolesnici s alkoholnim hepatitisom imaju veću razinu TNF- α (prosjeak, 26,3 ng/L; 95% CI, 21,7 do 30,9) nego normalne osobe (6,4 ng/L; CI, 5,4 do 7,4). Bolesnici koji su kasnije umrli imali su veću razinu TNF- α (34,7 ng/L; CI, 27,8 do 41,6) nego preživjeli (16,6 ng/L; CI, 14,0 do 19,2).

U bolesnika s alkoholnim hepatitisom, razine TNF- α koreliraju pozitivno sa serum bilirubinom ($r = 0,74$; $P = 0,0009$) i serum kreatininom ($r = 0,81$; $P = 0,0003$). Bolesnici s alkoholnim hepatitisom imali su veću razinu TNF- α od bolesnika s neaktivnom alkoholnom cirozom (11,1 ng/L; CI, 8,9 do 13,3) i nekih alkoholnih osoba bez bolesti jetre (6,4 ng/L; CI, 5,0 do 7,8). Bolesnici s nenormalnom funkcijom bubrega imali su niže razine TNF- α (14,1 ng/L; CI, 5,4 do 22,8) od bolesnika s alkoholnim hepatitisom. Iz toga je zaključeno da porast TNF- α u alkoholnom hepatitisu ne najviše izražen u teškim slučajevima, što ukazuje da TNF- α ima ulogu u patogenezi (Bird et al., 1990).

TNF upravlja mnogim biološkim aktivnostima endotoksina. Nova istraživanja su pokazala da TNF primjena može izazvati oštećenje jetre i da TNF može biti medijator letalnosti hepatotoksin galaktozamina. Jedan od najjačih TNF induktora je endotoksin. Budući da bolesnici od alkoholne bolesti jetre često imaju ednotoksemiju i jer mnoge kliničke manifestacije alkoholnog hepatitisa su poznata biološka djelovanja TNF, njegova aktivnost je procijenjena u bolesnika s alkoholnim hepatitisom. TNF otpuštanje iz perifernih krvnih monocita koje je bazalno i lipopolisaharid-stimulirano, koje je glavni izvor TNF proizvodnje, određeno je u 16 bolesnika s alkoholnim hepatitisom i 16 zdravih dragovoljaca. Osam bolesnika od njih 16 s alkoholnim hepatitisom i samo 2 od njih 16 zdravih dragovoljaca imalo je detektibilnu spontanu TNF aktivnost (p manji od 0,05).

Nakon lipopolisaharidnog stimuliranja, prosječan broj monocitnih TNF otpuštenih u bolesnika s alkoholnim hepatitisom bio je značajno povećan više od dvostruko u odnosu na zdrave ($25,3 \pm 3,7$ vs. $10,9 \pm 2,4$ jedinica po ml, p manji od 0,005). Prema tome je zaključeno da monociti bolesnika koji boluju od alkoholnog hepatitisa imaju značajno povećano spontano i lipopolisaharid-stimulirano TNF otpuštanje u usporedbi s monocitima zdravih dragovoljaca (McClain and Cohen, 1989).

Lipopolisaharid (LPS)-vezujući protein (LBP) i CD14 imaju ključnu ulogu u aktiviranju stanica pomoću endotoksina. IPS koji potječe iz bedra pretpostavljeno je da sudjeluje u patološkom oštećenju jetre pri alkoholnoj bolesti jetre. Pokazalo se da štakori koji su hranjeni intragastrično s etanolom u ulju tijekom 4 tjedna, imaju povećanu razinu CD14 i LBP u svojim Kupffer-ovim stanicama, odnosno hepatocitima. Ekspresija CD14 mRNA bila je također povišena u nemieloidnim stanicama. Pojačani LBP i CD14 ekspresija brzo povećavaju LPC-induciranu ekspresiju različitih proupalnih citokina i korelira s prisutnošću patološkog oštećenja jetre u alkoholnoj bolesti jetre (Su et al., 1998; Lukkari et al., 1999).

Artiritis je bolest koja uključuje upalu zglobova. Zglob izgleda oteknut, ukočen, osjetljiv, crven i topao. Simptomi mogu biti praćeni gubitkom težine, groznicom ili slabošću. Kada ovi simptomi traju dva ili više tjedana, uzrok može biti upalni artritis, npr. reumatoidni artritis. Upala zglobova može također biti izazvana infekcijom, što može dovesti do septičkog artritisa. Opći tip artritisa je degenerativna bolest zglobova (osteoartritis).

Medikamenti koji se standardno propisuju za artritis i srodna stanja su nesteroidni protivupalni lijekovi (NSAID). NSAID obuhvaća aspirin i aspirinu slične lijekove. Oni smanjuju upalu, što je uzrok boli u zglobo, ukočenost i oticanje zgloba. Međutim, NSAID su nespecifični lijekovi koji pokazuju određen broj sporednih učinaka, uključujući krvarenje u želucu (Homepage of the Department of Orthopaedics of the University of Washington on Arthritis, Frederick Matsen (Chairman), www.orthop.washington.edu). Uz NSAID, Celebrex™, inhibitor ciklooksigenaze (COX-2), koristi se za uklanjanje znakova i simptoma osteoartritisa i reumatoidnog artritis u odraslih. On se također daje za tretiranje bolesnika s familijarnom adenomatoznom polipozom.

Patent WO 01/00229 opisuje kombinaciju antagonista tumorskog čimbenika nekroze (TNF) i COX-2 inhibitora za tretiranje upale.

TNF antagonisti također se koriste za tretiranje artritis. TNF antagonisti opisani su, primjerice, u WO 9103553. Novija istraživanja ukazuju da interleukin-18 ima proupalnu ulogu u metabolizmu zgloba. Olee et al. (1999) pokazali su da IL-18 nastaje pomoću zglobnih kondrocita i izaziva proupalu i katabolički odgovor. IL-18 mRNA je inducirana pomoću IL-1β u kondrocitima. Kondrociti proizvode IL-18 prekursor te kao odgovor na IL-1 stimuliranje izlučuju zreli oblik IL-18. Istraživanja o učinku IL-18 na kondrocite dalje pokazuju da on inhibira TGF-β-induciranu proliferaciju i pojačava proizvodnju dušikova oksida. IL-18 stimulira ekspresiju nekoliko gena u normalnim humanim zglobnim kondrocitima uključujući dušik-oksidi sintazu, inducirajući ciklooksigenazu, IL-6 i stromelizin. Genska ekspresija povezana je sa sintezom odgovarajućih proteina. Tretiranje normalne humane zglobne hrskavice s IL-18 povećava otpuštanje glikozaminoglikana. Ovaj nalaz identificira IL-18 kao citokin koji regulira odgovore kondrocita i sudjeluje pri propadanju hrskavice.

Lokaliziranje interleukin-1β-konvertirajućeg enzima (ICE)/caspase-1 u humanom osteoartritičnom tkivu i njegova uloga u sazrijevanju interleukina-1 beta i interleukina-18, objašnjena je od Saha et al. (1999). Saha et al. istražili su ekspresiju i proizvodnju caspase-1 u humanom normalnoj i osteoartritičnoj (OA) hrskavici i sinoviju, kvantificirali razinu ICE u OA kondrocitima, te ispitali odnos između topografske raspodjele ICE, interleukina-1β (IL-1β) i IL-18, kao i apoptozu kondrocita. Eksperimenti koji su načinjeni u ovom istraživanju ukazuju da ICE ekspresiran i sintetiziran u humanoj sinovialnoj opni i hrskavici, sa značajno većim brojem stanica pozitivno obojenim u OA tkivu nego u normalnom tkivu. ICE proizvodnja je poželjno locirana u superficijalnim i gornjim srednjim slojevima zglobne hrskavice. Proizvodnja sazrelog IL-1 beta u OA hrskavičnim eksplantima i kondrocitima je u potpunosti blokirana tretiranjem sa specifičnim ICE inhibitorom, koji također značajno smanjuje broj IL-18 pozitivnih stanica. Odnos između aktivnog IL-1 beta i ICE ukazuje da ICE može potaknuti OA progresiju aktiviranjem ovog proupalnog citokina, te da IL-18 ima ulogu u patologiji hrskavice.

Gracie et al (1999) su ukazali na proupalnu ulogu IL-18 u reumatoidnom artritisu. Grade et al. su detektirali da su IL-18 mRNA i protein u sinovijalnom tkivu reumatoidnog artritis značajno veće razine nego u osteoartritičnih kontrola. Također se pokazalo da kombinacija IL-12 ili IL-15 s IL-18 izaziva IFN-γ proizvodnju pomoću sinovijalnog tkiva in vitro. Nadalje, IL-18 primjena kolagen/nepotpuni Freundov adjuvant-imuniziranog miša olakšava razvoj erozivnog, upalnog artritis, što ukazuje da IL-18 može biti proupalni in vivo.

Međutim do sada, osim kemijskih spojeva, samo blokada TNFα i IL-1β korištenjem topljivih receptora pokazala je smanjenje mišjeg kolagen-izazvanog artritis (CIA, što je mišji model za reumatoidni artritis) (Williams et al., 1994), te je preporučeno kao terapija za reumatoidni artritis.

Pojam "kronična ili idiopatska upalna trbušna bolest" obuhvaća dva stanja: Crohn-ovu bolest i ulcerativni kolitis. Obje su bolesti probavnog sustava, pri čemu Crohn-ova bolest obično zahvaća tanko crijevo. Kada također zahvaća kolon, diferencijalna dijagnoza od ulcerativnog kolitisa (vidi niže) može biti problem.

Kronična upala i ulceracija u Crohnovoj bolesti obično počinje bilo s oštećenjem tankog crijeva ili bolom u trbuhu koji može oponašati akutni apendicitis; ostale pojave mogu s epovezati s komplikacijama. Tijek bolesti je kroničan, te bez obzira na terapiju može biti pogoršanja i remisija. Javlja se obično u ranoj zreloj dobi, pri čemu polovina slučajeva započinje u starosti 20 i 30 godina te 90% između 10 i 40 godina. Pogodeno je nešto više muškaraca nego žena.

Mikroskopski su se pokazale velike promjene. Upalna pojava je diskontinuirana: ona je fokalna ili raspršena. Nakupine limfocita i plazma stanica nađene su uglavnom u mukozi i submukozi ali obično zahvaća sve slojeve (transmuralna upala). Klasičan mikroskopski izgled Crohnove bolesti je prisutnost granulnih stanica koje su okružene ovojnicom limfocita. Incidencija idiopatskih upalnih trbušnih bolesti pokazuje značajnu geografsku varijaciju. te bolesti imaju bitno veću incidenciju u sjevernoj Europi i Sjedinjenim državama nego u krajevima južne Europe, Afrike, Južne Amerike i Azije, premda povećana urbanizacija i prosperitet dovodi do veće incidencije u dijelovima južne Europe i Japana (General and Systematic Pathology, Churchill Livingstone, 3rd edition 2000, JCE Underwood, Ed.).

U Crohnovoj bolesti, klinički postoje dvije glavne skupine: prva obuhvaća bolesnike čija bolest prelazi u trajnu remisiju unutar tri godine od pojave, a druga skupina obuhvaća bolesnike s bolešću koja traje manje od tri godine.

Bez obzira na etiologiju, postoji dokaz postojanja i neodgovarajućeg T-staničnog i makrofagnog aktiviranja u Crohn-ovoj bolesti s povećanom proizvodnjom proupalnih citokina, konkretno interleukina (IL) 1, 2, 6 i 8, interferona (IFN)- γ i čimbenika tumorske nekroze (TNF) α . Crohn-ova bolest je karakterizirana kroničnom upalom koja je praćena fibrostima. Proces fibroblastične proliferacije i taloženja kolagena može se oblikovati transformiranjem čimbenika rasta β , koji ima određenu protivupalno djelovanje, odnosno jačanje fibroblasta, sintezu matrice i podreguliranje upalnih stanica, ali je vjerojatno da je uključen i jedan broj drugih posrednika.

Ulcerativni kolitis je nespecifični upalni poremećaj debelog crijeva, obično počinje u rektumu i širi se proksimalno s različitim dosegom. Za razliku od Crohn-ove bolesti, ulcerativni kolitis je ograničen na debelo crijevo.

Postoji sve više dokaza koji ukazuju da je ulcerativni kolitis posljedica promijenjene autoimunološke reaktivnosti, ali mukozno oštećenje može također biti posljedica neodgovarajućeg T staničnog aktiviranja i posrednog oštećenja koje donose citokini, proteaze i reaktivni kisikovi metaboliti iz makrofaga i neutrofila. Ovaj posljednji mehanizam oštećenja kolonskog epitela često se naziva "ozljeda nedužnog promatrača". Činjenica koja govori u prilog autoimunosti je prisutnost samoreaktivnih T-limfocita i autoantitijela koja su sumjerena protiv epitelnih stanica kolona i endotelinih stanica, te anti-neutrofilna citoplazmatska auto-antitijela (ANCA). Međutim, ulcerativni kolitis treba smatrati autoimunom bolešću u kojoj je mukozno oštećenje izravna posljedica imunološke reakcije samo-antigena (opća i sistemska patologija, vidi niže).

U svezi s terapijom Crohnove bolesti, većina ljudi je prvo tretirana s lijekovima koji sadrže mesalamin, tvar koja pomaže kontrolu upale. Bolesnici koji nemaju koristi od nje ili koji je ne mogu podnijeti, moraju biti podvrgnuti drugom lijeku koji sadrži mesalamin, koji su općenito poznati kao 5-ASA sredstva. Mogući prateći učinci pripravaka mesalamina su mučnina, povraćanje, lupanje srca, proljev i glavobolja.

Neki bolesnici za kontrolu upale uzimaju kortikosteroide. Ovi lijekovi su najučinkovitiji za aktivnu Crohnovu bolest, ali oni mogu izazvati ozbiljne usputne pojave, uključujući veću osjetljivost na upalu.

Lijekovi koji suprimiraju imunološki sustav također se koriste za tretiranje Crohnove bolesti. Standardno propisani je 6-merkaptopurin i srodni lijek, azathioprine. Imunosupresivna sredstva djeluju blokiranjem imunološke reakcije koja doprinosi upali. Ovi lijekovi mogu uzrokovati sporedne učinke kao što je mučnina, povraćanje i proljev, te mogu smanjiti otpornost bolesnika protiv infekcije. Kada su bolesnici tretirani s kombinacijom kortikosteroida i imunosupresivnih lijekova, doza kortikosteroida se eventualno može smanjiti. Neka istraživanja ukazuju da imunosupresivni lijekovi mogu pojačati učinkovitost kortikosteroida.

The U.S. Food and Drug Administration odobrila je lijek infliximab za tretiranje umjerene do uznapredovale Crohnove bolesti koja ne odgovara na standardnu terapiju (mesalaminske tvari, kortikosteroidi, imunosupresivna sredstva) te za tretiranje otvorenih, drenažnih fistula. Infliximab, prvi tretman koji je odobren posebno za Crohnovu bolest, je monoklonsko antitijelo anti-tumorskog čimbenika nekroze (TNF). Anti-TNF uklanja TNF iz krvnog toka prije nego dosegne crijeva, čime se sprječava upala.

Antibiotici se koriste za tretiranje bakterijskog bujanja u tankom crijevu što je izazvano stezanjem, fistulama ili prethodnim kirurškim zahvatom. Zbog ovog općeg problema, liječnik može propisati jedan ili više sljedećih antibiotika: ampicilin, sulfonamid, cefalosporin, tetraciklin ili metronidazol.

Proljev i bol u trbuhu često nestaju povlačenjem bolesti, ali može biti potreban i dodatan lijek. Može se koristiti nekoliko lijekova protiv proljeva, uključujući difenoksilat, loperamid i kodein. Bolesnici koji se dehidrirali zbog proljeva obično se tretiraju tekućinom s elektrolitima.

Ostaje potreba za učinkovitom terapijom da bi se tretirala i/ili spriječila upalna trbušna bolest, konkretno Crohnova bolest i ulcerativni kolitis, koja bi imala smanjenje sporedne učinke ili bi idealno bila oslobođena sporednih učinaka.

I histološka i imunološka promatranja ukazuju da su stanično-posredovani imunitet i T-stanično aktiviranje ključna svojstva CD. Istraživanja s ljudima i eksperimentalni modeli sugeriraju da, u CD, lokalni imunološki odgovor nastoji biti pretežno Th1 tipa (Desreumaux, et al. 1997) i da lokalno otpušteni citokini, kao što su IFN- γ , IL-1 β i TNF- α , sudjeluju u poticanju i širenju upalnog odgovora (Reimund et al. 1996).

Citokin IL-18 ima značajnu ulogu u Th1 posredovanom imunološkom odgovoru u suradnji s citokinom IL-12 stimuliranjem IFN- γ izlučivanja, pojačavanjem citotoksičnosti prirodnog staničnog ubojice, te stimuliranjem TH1 stanične diferencijacije (Uchito et al, 1996).

IL-18 djeluje zajedno s IL-12, IL-2, antigenima, mitogenima i eventualno drugim čimbenicima da se izazove proizvodnja IFN- γ . IL-18 također pospješuje proizvodnju GM-CSF i IL-2, pojačava anti-CDS izazvanu T staničnu proliferaciju, te povećava Fas-upravljano uništavanje prirodnih uništivača stanica. Sazreli IL-18 nastaje iz svojih prekursora pomoću IL-1 β konvertirajućeg enzima (ICE, caspase-1). IL-18 receptor sastoji se od dviju komponenti, koje surađuju pri vezanju liganda. Vezujuća mjesta s jakim i slabim afinitetom za IL-18 nađena su u mišjim IL-12 stimuliranim T stanicama (Okamoto et al., 1998), što ukazuje na receptorski kompleks višestrukog lanca. Dvije receptorske podjedinice su do sada identificirane, a obje pripadaju IL-1 receptorskoj familiji (Okamoto et al., 1999). Transdukcija signala IL-18 uključuje aktiviranje NF- κ B (Matsumoto, et al 1997).

Nedavno, sugerirano je da IL-18 ima određenu ulogu u upalnoj trbušnoj bolesti (Pizarro, et al. 1999; Monteleone, et al. 1999).

Pizarro et al. (1999) karakterizirali su ekspresiju i lokaliziranje IL-18 u kotonskim uzorcima i izolirali populaciju mukoznih stanica iz bolesnika s Crohn-ovom bolešću. Koristeći polukvantitativni RT-PCR protokol, IL-18 mRNA transkripti su povećano nađeni u svježe izoliranim intestinalnim epitelnim stanicama i lamina propria mononuklearnim stanicama iz CD u usporedbi s ulcerativnim kolitisom i neupalnim kontrolnim bolesnicima. IL-18 mRNA transkripti su bili bogatiji intestinalnim epitelnim stanicama u usporedbi s lamina propria mononuklearnim stanicama. Imunohistokemijska analiza kirurški resekiranih tkiva kolona lokalizirala je IL-18 na lamina propria mononuklearne stanice (specifično, makrofagi i dendritne stanice), kao i na intestinalnim epitelnim stanicama. *Western blot* analiza dala je da se 18,3-kDa vrpca, koja je konzistentna s rekombinantnim i sazelelim humanim IL-18 proteinom, nalazi predominantno u CD vs UC intestinalnim mukoznim biopsijama, a druga vrpca od 24 kDa, koja je konzistentna s inaktivnim IL-18 prekursorom, detektirana je u neupalnim područjima u CD i UC biopsijama i to je bio isključivi oblik koji je nađen u neupalnim kontrolama.

Monteleone et al. (1999) potvrdili su ove nalaze. Cijelo mišićno intestinalno tkivo i lamina propria mononuklearne stanice za bolesnike 12 Crohnovih bolesti i 9 ulcerativnih kolitisa, te 15 kontrola s neupalnom trbušnom bolešću, ispitano je na IL-18 pomoću semikvantitativne RT-PCR i *Western blot* analize. Transkripti IL-18 nađeni su u svim ispitanim uzorcima. Međutim, povećano IL-18 mRNA akumuliranje uočeno je u mukoznim i lamina propria mononuklearnim stanicama za Crohnovu bolest, u usporedbi s ulcerativnim kolitisom i kontrolama. U Crohnovoj bolesti, transkripti za IL-18 bili su obilniji u mukoznim uzorcima koji su uzeti iz obuhvaćenim područja. 18-kDa vrpca konzistentna sa sazelelim IL-18 je pretežno nađena u mukoznim uzorcima Crohnove bolesti. U mukoznim uzorcima od ne-IBD kontrola, IL-18 se nalazi kao 24-kDa polipeptid. Sukladno s tim, podjedinica aktivnog IL-1 beta-konvertirajućeg enzima (ICE) (p20) je ekspresirana u uzorcima bilo iz CD ili UC, pri čemu, u mukozi kolona od ne-IBD kontrola, ICE je sintetiziran samo kao prekursor (p45).

Dayer (1999) je dao prikaz različitih i djelomično proturječnih funkcija IL-18. Ukratko, IL-18 je pleiotropni interleukin koji ima i upalno pojačavajuće i prigušujuće funkcije. S jedne strane, on pojačava proizvodnju proupalnih citokina poput TNF α , dakle podržava upalu. S druge strane, on potiče proizvodnju NO, inhibitora caspase-1, pa tako blokira sazrijevanje IL-1 β i IL-18, te eventualno prigušuje upalu. Ova neobična uloga IL-18 ozbiljno preispituje učinkovitost IL-18 inhibitora u upalnim bolestima. Štoviše, zbog interakcije cijelog niza različitih citokina i kemokina u regulaciji upale, pozitivan učinak u terapiji ili prevenciji upalnih bolesti blokiranjem samo jednog od sudionika nije predvidljiva.

Sažetak izuma

Ovaj izum se temelji na nalazu da su inhibitori IL-18 učinkoviti u tretiranju i/ili prevenciji različitih bolesti i poremećaja.

Prvi cilj ovog izuma je da se definira novi način tretiranja i/ili prevencije oštećenja jetre. Izum se prema tome odnosi na uporabu IL-18 inhibitora za proizvodnju medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju oštećenja jetre, akutnog i kroničnog. Konkretno, ovaj izum se odnosi na tretiranje i/ili prevenciju alkoholnog hepatitisa, virusnog hepatitisa, imunološkog hepatitisa, fulminantnog hepatitisa, ciroze jetre i primarne bilijarne ciroze.

Drugi cilj ovog izuma je da se definira novi način tretiranja i/ili prevencije artritisa. Izum se također odnosi na uporabu IL-18 inhibitora u priređivanju medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju artritisa. Pozitivan učinak IL-18 inhibitora obuhvaća smanjenje uznapredovalosti bolesti, kao i sprječavanje širenja bolesti. Ovaj nalaz je neočekivan, jer iz stanja tehnike koje je navedeno gore, ne može se zaključiti da bi blokada jednog specifičnog čimbenika koji je uključen u

artritisu, ustvari interleukina IL-18, trebala dovesti do ublažavanja artritisa ili čak do liječenja oboljelih artritičnih zglobova.

Također je nađeno da primjena IL-18 inhibitora značajno smanjuje eroziju hrskavice u mišjem modelu artritisa. Ovaj izum se nadalje odnosi na uporabu inhibitora IL-18 u proizvodnji medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju propadanja hrskavice.

Treći cilj ovog izuma je da se definira novi način tretiranja i/ili prevencije upalne trbušne bolesti, (IBD), konkretno Crohn-ove bolesti i ulcerativnog kolitisa. Izum se prema tome također odnosi na uporabu IL-18 inhibitora u proizvodnji medikamenta za tretiranje i/ili sprječavanje IBD. Sukladno s ovim izumom, nađeno je da se koncentracija IL-18BP mRNA i proteina povećava u upalnim područjima mukoze u biopsijama koje su načinjene u bolesnika s Crohn-ovom bolešću. Nadalje, pokazalo se da dva različita inhibitora IL-18 štite životinje od bolesti u mišjem modelu upalne trbušne bolesti.

Uporaba kombinacije IL-18 inhibitora i/ili nekog interferona i/ili TNF antagonista i/ili COX-2 inhibitora također, smatramo, obuhvaćena je ovim izumom. Da bi se primijenili genski terapijski pristupi unošenja IL-18 inhibitora teT oboljelom tkivu i stanicama, sljedeći aspekti izuma odnose se na uporabu ekspresijskih vektora koji sadrže kodirajuću sekvenciju IL-18 inhibitora za tretiranje i/ili prevenciju bolesnih stanja. Ovaj izum se nadalje odnosi na uporabu endgoneog genskog aktiviranja IL-18 inhibitora te na uporabu stanica koje su genetski oblikovane da se izvrši ekspresija IL-18 inhibitora za tretiranje i/ili prevenciju oštećenja jetre, artritisa i IBD.

Sažet opis crteža

Slika 1 prikazuje histogram na kojemu je prikazana razina IFN- γ (pg/ml) u serumu nakon injekcije različitih količina rekombinantnog IL18BP (0; 0,04; 0,4; 4 mg/kg) u miševa 1 sat prije injekcije IPS. Krvni uzorci uzeti su 5 h nakon injekcije IPS i analizirani pomoću ELISA da se odredi cirkulirajući IFN- γ .

Slika 2 prikazuje histogram na kojemu je prikazana razina alanin aminotransferaze (ALT) u serumu. Miševi su injicirani s rastućim dozama rekombinantnog humanog IL18BP (0; 0,04; 0,4; 4 mg/kg) prije injiciranja IPS u *P. acnes* senzibiliziranih miševa. Krvni uzorci su uzeti 5 h nakon LPS injekcije i izmjerene su razine ALT u serumu. SF = Sigma-Frankel: 1 SF jedinica AST/ALT daje $4,82 \times 10^{-4}$ nmol glutamat/min za pH 7,5 na 25°C.

Slika 3 prikazuje vrijeme preživljavanja miševa nakon LPS injekcije. Miševi su injicirani s različitim dozama rekombinantnog humanog IL18BP (0; 0,04; 0,004; 4 mg/kg) 20 min prije injekcije LPS u *P. acnes* senzibiliziranih miševa. Trokutići: 4 mg/kg; maleni romboid: 0,4; veliki romboid: 0,04; kružići: bez IL18BP (samo LPS).

Slika 4 prikazuje histogram na kojemu su prikazane razine IFN- γ u serumu, mjereno 5 h nakon injekcije različitih količina IL18BP (0; 0,4; 4 mg/kg), koje su primijenjene 20 min prije LPS injekcije u *P. acnes* senzibiliziranih miševa.

Slika 5 prikazuje preživljavanje miševa koji su injicirani bilo s poliklonskim IL-18 antiserumom ili normalnim serumom kunića (NDS = kontrola) 30 min prije injekcije s 40 mg/ml (letalna doza) LPS izvedenog iz *E. coli* (slika 5A) ili *S. typhimurium* (slika 5B). Trokutići: miševi koji su injicirani s IL-18 antiserumom; kružići: miševi su injicirani s NDS. Na x-osi, navedeni su dani nakon LPS podražaja. * $p < 0,05$.

Slika 6 prikazuje histogram, na kojemu su prikazane vrijednosti prosjek + SEM za pet miševa u skupini koji su tretirani na sljedeći način. Miševi su injicirani intraperitonealno (i.p.) bilo s anti-IL-18 antiserumom, topljivim TNF- α receptorima (TNFRp55) nosačem (otopina soli), nakon čega slijedi intravenska (i.v.) primjena Concanavalin-a A (Con A; Slika 6A) ili PEA (*Pseudomonas aeruginosa*, Slika 6B). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. ConA ili samo PEA; # $p < 0,01$ vs. bilo TNFRp55 ili anti-IL-18 faktorska ANOVA.

Slika 7 prikazuje učinak IL-18BP na klinički indeks u mišjem modelu artritisa. Slika 7A prikazuje dijagram na kojem su prikazani klinički indeksi koji su izmjereni nakon dnevne primjene različitih količina IL-18BP ili IFN-p ili nosača (NaCl) i.p. (intraperitonealno) miševima. Simboli: puni trokutići: 10 000 IU IFN-p; prazni trokutići: 10 mg/kg IL-18BP, obrnuti trokutići: 3 mg/kg IL-18BP, romboidi: 1 mg/kg IL-18BP; kružići: 0,5 mg/kg IL-18BP; prazni kvadratići: 0,25 mg/kg IL-18BP, te puni kvadratići: NaCl. dani tretmana su nanoseni na x-osi, a klinički indeks (prosječna vrijednost) na y-osi. Statistika je učinjena primjenom Mann Whitney testa. Slika 7B prikazuje histogram koji prikazuje AUC (područje pod krivuljom) koje se nalazi pod krivuljom 7A. n = broj životinja.

Slika 8 prikazuje djelovanje IL-18BP na oticanje šape. Slika 8A prikazuje dijagram koji prikazuje rezultate koji su dobiveni mjerenjem debljine šape (oticanje) oboljelih stražnjih šapa pojedinih životinja koje su tretirane s različitim količinama IL-18BP. Na y-osi su prikazane promjene debljine šape u milimetrima od početka tretmana. Simboli su kao na slici 7. Slika 8B prikazuje histogram koji prikazuje AUC koji se odnosi na sliku 8A. n = broj životinja.

Slika 9 prikazuje analizu broja oboljelih stražnjih šapa u vrijeme akutnog artritisa, tj. širenje bolesti na daljnje zglobove. Simboli: ispunjeni kvadrati: NaCl (kontrola), trokutići: 10 mg/kg IL-18BP, obrnuti trokutići: 3

mg/kg IL-18BP, romboidi: 1 mg/kg IL-18BP, kružići: 0,5 mg/kg IL-18BP te prazni kvadratići: 0,25 mg/kg IL-18BP.

Slika 10 prikazuje histogram na kojemu su prikazani indeksi erozije hrskavice oboljelih zglobova.

Slika 11 prikazuje histopatologiju mišjih zglobova. na kraju eksperimenta, šapa na kojoj se prvo razvio artritis je odsječena, učvršćena i obrađena na način koji je opisan u primjeru 10, niže. Slika 11A: normalni mišji zglob; Slika 11B: zglob artritnog miša; Slika 11C: zglob miša koji je tretiran s rhlIL-18BP.

Slika 12 prikazuje histogram koji prikazuje razinu anti-kolagen tip II antitijela izotipa IgG1 (prazni stupac) ili IgG2a (ispunjeni stupac) miša koji je tretiran s 3 mg/kg IL-18BP ili fiziološkom otopinom (nosač). Mjerenja su izvršena na dan 4 (D4) ili dan 8 (D8) bolesti.

Slika 13 prikazuje histogram koji prikazuje razinu IL-6 u pg/ml u životinja koje su tretirane s 1, 3 ili 10 mg/kg IL-18BP, 10 000 IU interferona β (IFN- β), normalnim mišjim serumom (NMS), odnosno fiziološkom otopinom (NaCl).

Slika 14 prikazuje ekspresiju hIL-18BP i IL-18 mRNA transkripata u intestinalnim biopsijama bolesnika koji boluju od aktivne Crohnove bolesti, ulcerativnog kolitisa ili normalnih zdravih osoba. Reprezentativni RT-PCR produkti prikazani su za IL-18BP, za IU 8 domaći gen (β -aktin) (slika 14A). Relativno kvantificiranje etidumbromid-obojenih vrpce izvršeno je pomoću Kodak Digital Imaging Software te je dano kao odnos ciljani gen-aktin. Ciljani gen je IL-18 na slici 14B i IL-18BP na slici 14C.

Slika 15 prikazuje ekspresiju hIL-18BP mRNA transkripata i proteina pomoću HUVEC (humane xx umbilical vein endotelne stanice) i ekspresiju proteina pomoću THP1 (humana monocitna stanična linija). RNA je izoliran iz netretiranih endotelnih stanica (medij) i endotelnih stanica koje su stimulirane s IL-1 β , TNF α , IFN γ . Pozitivna kontrola: kolon bolesnika s Crohn-ovom bolešću, negativna kontrola: bez cDNA. IL-18BP i IL-18 ekspresija je analizirana pomoću semikvantitativne RT-PCR (slika 15A). Kultura supernatanta iz netretiranih stanica (medij) i stanica nakon 24 h aktivacije s IL-1 β , TNF α , IFN γ od HUVEC (slika 15B) ili THP1 (slika 15C), analizirane su na IL-18BP i IL-18 proizvedene proteine pomoću ELISA.

Slika 16 prikazuje razvoj tjelesne težine između dana 1 i dana 10 u mišjem modelu IBD nakon intraperitonealne (i.p.) primjene bilo fiziološke otopine (NaCl) ili IL-18BP (8 mg/kg). Promjena težine izražena je kao postotak promjene tjelesne težine od dana 1. Prikazane su prosječne vrijednosti i SEM za dvije skupine, 8 miševa u skupini.

Slika 17 prikazuje rezultate analiza kolona, kaudalnih limfnih čvorova i slezene miševa koji su tretirani s IL-18BP i onih s netretiranim IBD. Slika 17A prikazuje težinu posljednjih 6 cm kolona u mg. Slika 17B prikazuje ukupan broj stanica koje se nalaze u kaudalnom limfnom čvoru. Slika 17C prikazuje postotak stanica koje se pozitivno boje na CD4VCD69* u slezeni. Podaci prikazuju prosječne vrijednosti i SEM. * označava značajnu razliku.

Slika 18 prikazuje količinu IFN γ (slika 18A i B) i TNF α (slika 18C i D) koja je proizvedena nakon 48 sati u stanicama kaudalnog limfnog čvora (slika 18A i C) i stanicama slezene (slika 18B i D) nakon stimuliranja s CD3/CD28 koji se nalaze u supernatantima. Prikazani su prosjek i SEM.

Slika 19 prikazuje sadržaj TNF α (slika 19A) i IFN γ (slika 19B) u homogenatima kolona. Podaci su korigirani za težinu kolona. Prikazane su prosječne vrijednosti i SEM. * označava značajnu razliku.

Opis izuma s primjerima realizacije

Ovaj izum temelji se na nalazu o blagotvornom učinku inhibitora IL-18 u različitim bolestima i poremećajima.

Pojam "inhibitor IL-18" u kontekstu ovog izuma odnosi se na neku molekulu koja modulira proizvodnju IL-18 i/ili djeluje na takav način da je proizvodnja i/ili djelovanje IL-18 usporeno, smanjeno ili djelomično, bitno ili u potpunosti spriječeno ili blokirano. Pojam "IL-18 inhibitor" znači da su njime obuhvaćeni inhibitori proizvodnje IL-18 kao i inhibitori IL-18 djelovanja.

Inhibitor proizvodnje može biti neka molekula koja negativno djeluje na sintezu, obradu ili sazrijevanje IL-18. Ono što se smatra inhibitorima, sukladno ovom izumu, mogu primjerice biti supresori genske ekspresije interleukina-18, protivsmislena mRNA koj smanjuje ili sprječava transkripciju IL-18 mRNA ili vodi degradiranju mRNA, proteini koji slabe točno savijanje, ili djelomično ili potpuno sprječavaju izlučivanje IL-18, proteaze koje degradiraju IL-18, kada su jednom sintetizirani, inhibitori proteaza cijepaju pro-IL-18 da bi generirali dozreli IL-18, kao što su inhibitori caspase-1, i slično.

Inhibitor djelovanja IL-18 može biti IL-18 antagonist, primjerice. Antagonisti mogu bilo vezati ili izdvojiti samu IL-18 molekulu s dovoljnim afinitetom i specifičnošću da djelomično ili potpuno neutralizira IL-18 ili IL-18 vezujuća mjesta koja su odgovorna za IL-18 vezanje za njegove ligande (slično kao za njegove receptore). Antagonist može također inhibirati IL-18 signalne puteve, koji su aktivirani unutar stanica nakon IL-18/receptor vezanja.

Inhibitori djelovanja IL-18 mogu također biti topljivi IL-18 receptori ili molekule koje oponašaju receptore, ili sredstva koja blokiraju IL-18 receptore, ili IL-18 antitijela, kao što su poliklonska i monoklonska antitijela, ili bilo koje drugo sredstvo ili molekula koja sprječava vezanje IL-18 za njegovu metodu, tako da slabi ili sprječava aktiviranje intra- ili ekstracelularnih reakcija koje su posredovane s IL-18.

Sukladno prvom aspektu ovog izuma, inhibitori IL-18 koriste za u proizvodnji medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju oštećenja jetre. Poželjno, izum se odnosi na uporabu IL-18 inhibitora u proizvodnji medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju akutnih i kroničnih bolesti jetre, te poželjnije alkoholnog hepatitisa, virusnog hepatitisa, imunog hepatitisa, fulminantnog hepatitisa, ciroze jetre i primarne bilijarne ciroze.

Pojam oštećenje jetre ili bolest jetre, kako se ovdje rabi, obuhvaća cijeli niz različitih patoloških stanja. Nekoliko ovih stanja koja se podrazumijevaju ovim izumom objašnjeno je detaljno u dijelu "Stanje tehnike". Daljnje bolesti jetre koje se mogu tretirati i/ili spriječiti sukladno ovom izumu, uključuju primjerice pirogeni apsces jetre. To se također naziva bakterijska jetra, koja unutar jetre stvara šupljinu. Uzroci apscesa jetre su višestruki. On se može razviti iz abdominalne infekcije kao što su apendicitis, divertikulitis ili perforirani trbuh, infekcija krvi, infekcija žučnog trakta (izlučivanje jetre) ili traume pri čemu zgnječena jetra postaje inficirana. Najpoznatiji organizmi koji izazivaju apsces jetre su *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* i *Enterobacter aerogenes*. Incidencija je 1 čovjek na 10000 ljudi.

Alkoholne bolesti jetre mogu se tretirati i/ili spriječiti korištenjem IL-18 inhibitora, sukladno ovom izumu. To obuhvaća akutnu ili kroničnu upalu jetre koja je izazvana alkoholom. Alkoholni hepatitis obično se javlja nakon više godina prekomjernog uživanja alkohola. Što je dulje vrijeme uživanja alkohola i što je veće konzumiranje alkohola, veća je mogućnost za razvoj bolesti jetre. Slaba ishrana javlja se kao rezultat nedovoljnih kalorija iz alkohola, smanjenog apetita i nedovoljne apsorpcije (nedovoljna apsorpcija hranjivih tvari iz probavnog trakta). Slaba ishrana doprinosi bolesti jetre. Toksičnost etanola za jetru, pojedinačna osjetljivost na bolesti jetre koje su izazvane alkoholom, te genetski čimbenici doprinose razvoju alkoholne bolesti jetre.

Sukladno s ovim izumom, ciroza jetre može se tretirati i/ili spriječiti pomoću IL-18 inhibitora. Hiroza je kronična bolest koja izaziva oštećenje jetrenog tkiva, ozljedu jetre (fibroza, nodularna regeneracija), progresivno opadanje jetrene funkcije, suvišak tekućine u abdomenu (ascites), poremećaj krvarenja (koagulopatija), povećani tlak u krvnim žilama (portalna hipertenzija) i poremećaj u mozgu (hepatička encefalopatija). Oštećena i ozljeđena jetra postaje nesposobna da adekvatno ukloni otpadne produkte (toksine) iz krvi, te stvaranje ožiljnog tkiva vodi do povećanog tlaka (portalne hipertenzija) u venama između crijeva i slezene prema jetri. Prekomjerna uporaba alkohola je glavni uzrok ciroze. Ostali uzroci obuhvaćaju infekcije (kao što je hepatitis), bolesti i poremećaji drenažnog sustava (kao što je bilijarna stenoza ili opstrukcija), cistična fibroza, te povećana apsorpcija željeza i bakra.

Tip ciroze ovisi o uzroku ciroze. Komplikacije ciroze mogu biti teške. U SAD, ciroza je 6. vodeći uzrok smrti. Mogu se razviti neurološki problemi (kao što je hepatička encefalopatija). Povećano skupljanje tekućine u abdominalnoj šupljini (ascites) izazvano je smanjenjem tjelesnih proteina, povećanog natrija i povećanog tlaka unutar jetrenih krvnih žila (portalna hipertenzija). Portalna hipertenzija može izazvati povećani tlak, veličinu i ispunjenost krvnih žila u jednjaku. Može doći do problema s krvarenjem i zgrušavanjem. Povećani tlak unutar krvnih žila i problemi sa zgrušavanjem mogu povećati mogućnost napredovanja po život opasne hemoragije.

Sljedeći poremećaj koji je obuhvaćen pojmom "oštećenje jetre" sukladno ovom izumu je autoimuni hepatitis. To je upala jetre izazvana interakcijom s autoimunim sustavom. Autoimuni hepatitis je tip kroničnog aktivnog hepatitisa. Stanične imune reakcije mogu biti uzrok kroničnog aktivnog hepatitisa. U krvi bolesnika s kroničnim aktivnim hepatitisom može se naći cijeli niz cirkulirajućih antitijela. Ostale autoimune bolesti mogu se povezati s kroničnim aktivnim hepatitisom, ili se mogu javiti u rođaka bolesnika s aktivnim kroničnim hepatitisom. Te su bolesti tiroiditis, diabetes melitus, ulcerativni kolitis, Coombs-pozitivna hemolitička anemija, proliferacijski glomerulonefritis i Sjogren-ov sindrom. Čimbenici rizika mogu uključivati ove bolesti ili čimbenike rizika koji su povezani s kroničnim aktivnim hepatitisom. Incidencija iznosi 4 čovjeka od 10 000 ljudi.

Bilijarna atrezija je sljedeći poremećaj unutar dosega pojma "oštećenje jetre". To je opstrukcija žučnih putova koja je izazvana njihovom nemogućnošću da se normalno razviju prije rođenja (in utero). Bilijarna atrezija je izazvana nenormalnim i neodgovarajućim razvojem žučnih putova unutar ili izvan jetre. Svrha bilijarnog sustava je uklanjanje otpadnih tvari iz jetre, te donijeti žučne soli koje su neophodne za probavu masti u tankom crijevu. U tom stanju, tok žuči od jetre prema gušterači je blokiran. To može dovesti do oštećenja jetre i ciroze jetre, te ako se ne tretira, može biti fatalno.

Sukladno ovom izumu, IL-18 inhibitori također se koriste za proizvodnju medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju kroničnog aktivnog hepatitisa, koji se također naziva kronični agresivni hepatitis. To je produžena upala jetre koja oštećuje stanice jetre. Uzroci kroničnog aktivnog hepatitisa uključuju virusnu infekciju, reakciju na lijek, metaboličke poremećaje ili autoimune bolesti. Također ne mora biti neki očigledan razlog. Bolest je karakterizirana nekrozom ili

smrću stanica jetre, aktivnom upalom i fibrozom koja može dovesti do otkazivanja jetre, ciroze i smrti. Incidencija je 1 čovjek na 10 000 ljudi. Čimbenici rizika su autoimune bolesti, prethodna infekcija hepatitisom C ili pozitivnim hepatitisom A ili hepatitis B antigenom tijekom 6 mjeseci.

- 5 Kronični perzistentni hepatitis je blagi, neprogresivni oblik upale jetre, te je to također bolest koja je obuhvaćena pojmom "oštećenje jetre" sukladno ovom izumu.

Sukladno ovom izumu, IL-18 inhibitori su također korišteni u proizvodnji medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju bilijarne ciroze (PBC). PBC je upalno stanje koje je rezultat opstrukcije toka žuči u jetri, što izaziva oštećenje jetrenih stanica. Žučni kanali unutar jetre postaju opaljeni zbog nepoznatog razloga. Bolest najčešće zahvaća žene u srednjoj dobi. Pojava simptoma je postepena, s kožom koja svrbi kao prvim simptomom. Dolazi do upale žučnih vodova u jetri. Eventualno, razvija se ciroza jetre. Bolest može biti povezana a autoimunim poremećajima. Incidencija je 8 ljudi na njih 100 000. Smatra se da se IL-18 inhibitori također mogu koristiti za tretiranje akutnog hepatičkog trovanja, koji je primjerice izazvan velikom količinom paracetamola. takvo akutno trovanje može doći zbog visoke doze paracetamola, bilo slučajno ili namjerno.

Kao što je prikazano u primjerima niže, izumitelji ovog izuma našli su da su IL-18 inhibitori osobito učinkoviti u prevenciji i tretmanu fulminantnog hepatitisa (akutni hepatitis). Prema tome, izum se poželjno odnosi na prevenciju i/ili tretiranje fulminantnog hepatitisa.

Sukladno drugom aspektu ovog izuma, IL-18 inhibitori se koriste za proizvodnju medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju artritisa.

Pojam "arthritis", kako se ovdje rabi, obuhvaća sve različite tipove artritisa i artritičnih stanja, akutni i kronični artritis, kao što je primjerice definirano u Homepage of the Department of Orthopaedics of the University of Washington on Arthritis (www.orthop.washington.edu). Primjeri artritičnih stanja su ankilozni spondilitis, bol u leđima, sindrom karpalnog odlaganja, Ehlers-Danlos-sindrom, mladenački artritis, lupus erythematosus, miozitis, osteogenesis imperfecta, osteoporoza, poliarteritis, polimiozitis, psorijatički artritis, Reitter-ov sindrom, skleroderma, artritis s trbušnom bolešću, Behcets-ova bolest, dječji artritis, degenerativna bolest zglobova, fibromialgija, infektivni artritis, Lyme-ova bolest, Marfan-ov sindrom, osteoartritis, osteonekroza, Paget-ova bolest, polymyalgia rheumatica, pseudogicht, refleksna simpatička distrofija, reumatoidni artritis, Sjogren-ov sindrom i familijarna adenomatozna polipoza i slično.

Poželjno, sukladno ovom izumu, inhibitori IL-18 koriste se za tretiranje i/ili prevenciju upalnog artritisa. Upalni artritis klasificira se kao kronični artritis, sukladno perzistentnom, kontinuiranom ili rekurentnom tijeku bolesti.

U poželjnoj realizaciji ovog izuma, upalni artritis je reumatoidni artritis (RA). Ra izaziva upalu na spoju zglobova (sinovijalna opna, jedan stanični sloj epitela) i/ili unutrašnjih organa. Bolest nastoji perzistirati nekoliko godina, tipično pogađajući više različitih zglobova u tijelu te konačno može izazvati oštećenje hrskavice, kostiju i ligamenata. Zglobovi koji mogu biti zahvaćeni s RA su zglobovi u vratu, ramenima, laktovima, bedrima, zapešćima, rukama, koljenima, člancima i stopalima. U mnogim slučajevima, u RA zglobovi se upaljeni na simetričan način.

RA se nalazi u oko 1% populacije Sjedinjenih država, raspodijeljen u svim etničkim skupinama i starosti. On se nalazi posvuda u svijetu, a žene premašuju muškarce brojem 3 prema 1.

Kao što je prikazano u primjerima niže, inhibitor IL-18 nađeno je da pokazuje osobito učinkovit povoljan učinak na eroziju hrskavice. Izum se prema tome dalje odnosi na uporabu inhibitora IL-18 u proizvodnji medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju propadanja hrskavice, tj. na uporabu IL-18 inhibitora kao zaštitnog sredstva. IL-18 inhibitor može se koristiti u bilo kojem stanju u kojem dolazi do propadanja ili erozije hrskavice. Propadanje hrskavice je progresivno odstupanje strukturnog integriteta hrskavice u zglobovima. Do njega dolazi primjerice u stanjima koja djeluju na zglobnu hrskavicu kao što je reumatoidni artritis, juvenilni reumatoidni artritis ili osteoartritis, ali također i upalni sinovitis.

Treći aspekt ovog izuma odnosi se na uporabu IL-18 inhibitora za proizvodnju medikamenta za proizvodnju i/ili prevenciju upalne trbušne bolesti. On se temelji na nalazu da je inhibitor IL-18 doreguliran u upalnoj mukozi CD bolesnika. On se nadalje temelji na nalazu da primjena različitih inhibitora IL-18 ima zaštitni učinak na mišji model kolitisa.

Doreguliranje IL-18 u oboljeloj mukozi CD bolesnika već je opisano u tehnici (Monteleone, et al. 1999; Pizarro, et al. 1999).

Nakon što je demonstrirana prisutnost velikih količina IL-18BP u upalnim područjima intestinalne mukeze sukladno ovom izumu, još je više iznenađujuće naći izraženo pozitivan učinak IL-18BP koj je primijenjen sistemski, na razvoj i simptome kolitisa u životinjskom modelu. Premda je IL-18BP već doreguliran endogeno u crijevu CD bolesnika, kao što je demonstrirano u primjerima niže, količina IL-18BP tijela dovoljna je za proizvodnju, ali se ne čini dovoljnom za borbu protiv bolesti.

Poželjno, sukladno ovom izumu, upalna trbušna bolest je Crohnova bolest ili ulcerativni kolitis.

U poželjnoj realizaciji ovog izuma, inhibitor L-18 je odabran između inhibitora caspase-1 (ICE), antitijela koje su usmjerena protiv IL-18, antitijela koja su usmjerena protiv IL-18 receptorskih podjedinica, inhibitora IL-18 signalnog puta, antagonista IL-18 koji kompetiraju s IL-18 i blokiraju IL-18 receptor, IL-18 vezujućih proteina, izoformi, muteina, združenih proteina, funkcionalnih derivata, aktivnih frakcija ili njegovih cirkularno permutiranih derivata koji su identične aktivnosti.

Pojam "IL-18 vezujući proteini" kako se ovdje rabi sinonim je s "IL18BP". ON obuhvaća IL-18 vezujuće proteine kao što je definirano u WO 99/09063 ili u Novick et al., 1999, uključujući spojene inačice i/ili izoforme IL-18 vezujućih proteina, kao što je definirano u Kirn et al., 2000. Konkretno, humane izoforme a i c od IL-18BP korisne su sukladno ovom izumu. Proteini koji mogu biti korisni sukladno ovom izumu mogu biti glikozilirani ili neglikozilirani, oni mogu biti izvedeni iz prirodnih izvora, kao što je urin, ili poželjno mogu biti proizvedeni rekombinantno. Rekombinantna ekspresija može se izvršiti u prokariotskim ekspresijskim sustavima poput E. coli, ili u eukariotskim, te poželjno u ekspresijskim sustavima sisavaca.

Kako se ovdje rabi, pojam "muteini" odnosi se na analoge IL-18BP ili analoge virusnog IL-18BP, u kojem je jedna ili više aminokiselinskih rezidua prirodnog IL-18BP ili virusnog IL-18BP zamijenjeno različitim aminokiselinskim reziduama ili uklonjeno, ili je jedna ili više aminokiselinskih rezidua dodano prirodnoj sekvenciji IL-18BP ili virusnog IL-18BP, bez značajne promjene aktivnosti dobivenih produkata u odnosu prema divljem tipu IL-18BP ili virusnom IL-18BP. Ovi muteini se priređuju poznatom sintezom i/ili in situ tehnikama mutageneze, ili bilo kojom drugom odgovarajućom tehnikom.

Svaki takav mutein poželjno ima sekvenciju aminokiselina koja je dovoljno duplikativna one IL-18BP, ili dovoljno duplikativna virusne IL-18BP, tako da posjeduje praktički identičnu aktivnost onoj IL-18BP. Jedna aktivnost IL-18BP je njegova sposobnost vezanja IL-18. Sve dok mutein ima aktivnost praktički jednaku vezivnoj aktivnosti IL-18, on se može koristiti u pročišćavanju IL-18, kao što se vrši afinitetnom kromatografijom, pa prema tome može se smatrati da ima praktički sličnu aktivnost za IL-18BP. Prema tome, može se odrediti da li neki dani mutein ima praktički identičnu aktivnost kao IL-18BP pomoću rutinskog eksperimentiranja uspoređivanjem takvog muteina, npr. s jednostavnim "sendvič" postupkom analize da se odredi veže li se on ili ne za odgovarajuće obilježeni IL-18, kao što je radioimunološka analiza ili ELISA analiza.

Muteini IL-18BP polipeptida ili muteini virusnih IL-18BP, koji se mogu koristiti sukladno ovom izumu, ili nukleinske kiseline koje ga kodiraju, uključuju konačan skup u potpunosti odgovarajućih sekvencija kao što su supstitucijski peptidi ili polinukleotidi koje može rutinski dobiti onaj koji poznaje ovo područje, bez nepotrebnog eksperimentiranja, temeljem činjenica i vodiča koji je ovdje naveden.

Poželjne promjene za muteine sukladno ovom izumu su one poznate kao "konzervativne" supstitucije. Konzervativne aminokiselinske supstitucije IL-18BP polipeptida ili proteina ili virusnog IL-18BP, može uključivati sinonimne aminokiseline unutar skupine koje imaju fizičkokemijska svojstva koja su dovoljno slična da supstitucija između članova skupine zadržava biološku funkciju molekule (Grantham, 1974). Vrlo je bitno da ubacivanje ili uklanjanje aminokiselina može također biti učinjeno u gore navedenim sekvencijama bez promjene njihovih funkcija, konkretno ako ubacivanje ili uklanjanje može uključivati nekoliko aminokiselina, npr. manje od trideset, te poželjno manje od deset, te da se ne uklanjaju ili zamjenjuju aminokiseline koje su kritične za funkcionalnu konformaciju, npr. cistein rezidue. Proteini i muteini koji su dobiveni takvim uklanjanjima i/ili ubacivanjima su unutar dosega ovog izuma.

Poželjno, sinonimne skupine aminokiselina su one definirane u tablici I. Poželjnije, sinonimne skupine aminokiselina su one definirane u tablici II, te najpoželjnije sinonimne skupine aminokiselina su one definirane u tablici III.

Tablica I

Poželjne skupine sinonimnih aminokiselina

Aminokiselina

Ser

Arg

Leu

Sinonimna skupina

Ser, Thr, Gly, Asn

Arg, Gin, Lys, Glu, His

Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu

	Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
	Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gin, Thr
	Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
	Val	Met, Tyr, Phe, lie, Leu, Val
5	Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
	lie	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, He
	Phe	Trp, Met, Tyr, He, Val, Leu, Phe
	Tyr	Trp, Met, Phe, He, Val, Leu, Tyr
	Cys	Ser, Thr, Cys
10	His	Glu, Lys, Gin, Thr, Arg, His
	Gin	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gin
	Asn	Gin, Asp, Ser, Asn
	Lys	Glu, Gin, His, Arg, Lys
	Asp	Glu, Asn, Asp
15	Glu	Asp, Lys, Asn, Gin, His, Arg, Glu
	Met	Phe, He, Val, Leu, Met
	Trp	Trp

	Tablica II	
20	Poželjnije skupine sinonimnih aminokiselina	
	Aminokisclina	Sinonimna skupina
	Ser	Ser
	Arg	His, Lys, Arg
	Leu	Leu, He, Phe, Met
25	Pro	Ala, Pro
	Thr	Thr
	Ala	Pro, Ala
	Val	Val, Met, He
	Gly	Gly
30	He	He, Met, Phe, Val, Leu
	Phe	Met, Tyr, He, Leu, Phe
	Tyr	Phe, Tyr
	Cys	Cys, Ser
	His	His, Gin, Arg
35	Gin	Glu, Gin, His
	Asn	Asp, Asn
	Lys	Lys, Arg
	Asp	Asp, Asn
	Glu	Glu, Gin
40	Met	Met, Phe, lie, Val, Leu
	Trp	Trp

	Tablica III	
	Najpoželjnije skupine sinonimnih aminokiselina	
45	Aminokisclina	Sinonimna skupina
	Ser	Ser
	Arg	Arg
	Leu	Leu, He, Met
	Pro	Pro
50	Thr	Thr
	Ala	Ala
	Val	Val
	Gly	Gly
	He	Ile, Met, Leu
55	Phe	Phe
	Tyr	Tyr
	Cys	Cys, Ser
	His	His
	Gin	Gin
60	Asn	Asn
	Lys	Lys
	Asp	Asp

Glu
Met
Trp

Glu
Met, He, Leu
Met

5 Primjeri dobivanja aminokiselinskih supstitucija u proteinima koji se mogu koristiti za dobivanje muteina IL-18BP polipeptida ili proteina, ili muteina virusnog IL-18BPS, za uporabu u ovom izumu uključuju bilo koji od poznatih metodskih stupnjeva, kao što su oni prikazani u američkim patentima RE 33,653, 4,959,314, 4,588,585 i 4,737,462, od Mark et al; 5,116,943 od Koths et al., 4,965,195 od Namen et al; 4,879,111 od Chong et al; te 5,017,691 od Lee et al; te lizin supstituirane proteine koji su navedeni u američkom patentu br. 4,904,584 (Shaw et al).

10 Pojam "združeni protein" odnosi se na polipeptid koji sadrži IL-18BP ili virusni IL-18BP, ili mutein ili njegov fragment, koji je sjedinjen s drugim proteinom, koji primjerice ima produženo vrijeme obitavanja u tjelesnim tekućinama. IL-18BP ili virusni IL-18BP, dakle može se povezati s drugim proteinom, polipeptidom ili slično, npr. imunoglobulinom ili njegovim fragmentom.

15 "Funkcionalni derivati" kako se ovdje rabe, pokrivaju derivate IL-18BPS ili virusnog IL-18BP, te njihove muteine ili združene proteine, koji se mogu prirediti iz funkcionalnih skupina koje se nalaze na bočnim lancima na reziduama ili N- ili O-terminalnim skupinama, na način koji je poznat u tehnici, te su obuhvaćeni ovim izumom sve dok su farmaceutski prihvatljivi, tj. ne uništavaju aktivnost proteina koja je suštinski slična aktivnosti IL-18BP ili virusnog IL-18BPs, te ne unose toksična svojstva u smjese koje ih sadrže.

20 Ovi derivati mogu, primjerice, uključivati polietilenglikolske bočne lance, koji mogu maskirati antigenska mjesta i produžiti obitavanje IL-18BP ili virusnog IL-18BP u tjelesnim tekućinama. Ostali derivati uključuju alifatske estere karboksilnih skupina, amide karboksilnih skupina reakcijom s amonijakom ili primarnim ili sekundarnim aminima, N-acil derivate slobodnih amino skupina rezidua aminokiselina koji su anstali s acilnim vrstama (npr. alkanoil ili alkanoilna ili karbociklička aroilna skupina) ili O-acil derivati slobodnih hidroksilnih skupina (primjerice oni serilnih ili treonilnih rezidua) koji su nastali s acilnim vrstama.

25 Kao "aktivne frakcije" od IL-18BP, ili virusnog IL-18BP, muteina i sjedinjenih proteina, ovaj izum pokriva bilo koji fragment ili prekursore polipeptidnog lanca same proteinske molekule ili molekule koja je povezana s pridruženim molekulama ili reziduama koje su s njom vezane, npr. šećerne ili fosfatne rezidue, ili agregati proteinske molekule ili samih šećernih rezidua, pod uvjetom da je navedena frakcija suštinski slična aktivnosti IL-18BP.

30 U sljedećoj poželjnoj realizaciji ovog izuma, inhibitor IL-18 je IL-18 antitijelo. Anti-IL-18 antitijela mogu biti poliklonska ili monoklonska, kimerna, humanizirana ili potpuno humana. Rekombinantna antitijela i njihovi fragmenti karakterizirani su visokim afinitetom vezanja za

35 Rekombinantna antitijela i njihovi fragmenti karakterizirani su visokim afinitetom vezanja za IL-18 in vivo i slabe toksičnosti. Antitijela koja se mogu koristiti u ovom izumu karakterizirana su sposobnošću da se tretiraju bolesnici u periodu koji je dovoljan da se postigne dobra do odlična regresija ili uklanjanje patogenih stanja ili bilo kojeg simptoma ili skupine simptoma koji su povezani s patogenim stanjem, te niskom toksičnošću.

40 Neutralizirajuća antitijela su često povišena u životinja kao što su kunići, koza ili miš putem imuniziranja s IL-18. Imunizirani miš je osobito koristan za osiguravanje izvora B stanica za proizvodnju hibridoma, koji se opet uzgaja da se dobiju velike količine anti-IL-18 monoklonskih antitijela.

45 Kimerna antitijela su imunoglobulinske molekule koje su karakterizirane s dva ili više segmenata ili dijelova koji su izvedeni od različitih životinjskih vrsta. Općenito, promjenjivo područje kimernog antitijela izvedeno je iz ne-humanog antitijela sisavca, kao što je mišje monoklonsko antitijelo, a imunoglobulinsko konstantno područje izvedeno je iz humane imunoglobulinske molekule. Poželjno, oba područja i kombinacija imaju slabu imunogenost što je rutinski određeno (Elliott et al., 1994). Humanizirana antitijela i imunoglobulinske molekule su kreirane pomoću tehnika genetskog inženjeringa u kojima se mišja konstantna područja zamjenjuju humanim protivdijelovima, pri čemu su sačuvana mišja antigenska vezna područja. Dobiveno miš-humano kimerno antitijelo poželjno ima smanjenu imunogenost i poboljšanu farmakokinetiku u ljudi (Knight et al., 1993).

50 Prema tome, u sljedećoj poželjnoj realizaciji, IL-18 antitijelo je humanizirano IL-18 antitijelo. Poželjni primjeri humaniziranih anti-IL-18 antitijela opisani su u europskoj patentnoj publikaciji EP 0 974 600, primjerice.

55 U sljedećoj poželjnoj realizaciji, IL-18 antitijelo je u cijelosti humano. Tehnologija proizvodnje humanih antitijela opisana je detaljno, primjerice u WO00/76310, WO99/53049, US 6,162,963 ili AU5336100. Cjelovito humana antitijela su poželjno rekombinantna antitijela, proizvedena u transgenim životinjama, npr. ksenomišu, koja sadrže sve dijelove funkcionalnih humanih Ig mjesta.

U osobito poželjnoj realizaciji ovog izuma, inhibitor IL-18 je IL-18BP ili izoforma, mutein, sjedinjeni protein, funkcionalni derivat, aktivna frakcija ili njegov cirkularno permutirani derivat. Ove izoforme, muteini, sjedinjeni proteini ili funkcionalni derivati zadržavaju biološku aktivnost IL-18BP, konkretno vezanje za IL-18, te poželjni imaju bar takvu aktivnost koja je slična onoj IL-18BP. Idealno, takvi proteini imaju biološku aktivnost koja je čak povećana u usporedbi s nemodificiranim IL-18BP. Poželjne aktivne frakcije imaju aktivnost koja je bolja od aktivnosti IL-18BP, ili koja ima daljnje prednosti, poput bolje postojanosti ili manje toksičnosti ili imunogenosti, ili ih je lakše dobiti u većim količinama, ili ih je lakše pročistiti.

Sekvencije IL-18BP i njegove srodne inačice/izoforme mogu se uzeti iz WO99/09063 ili iz Novick et al., 1999, kao i iz Kirn et al., 2000.

Funkcionalni derivati IL-18BP mogu biti konjugirani za polimere da bi se poboljšala svojstva proteina, kao što je postojanost, poluživot, biološka raspoloživost, tolerancija za ljudski organizam ili imunogenost. Da bi se to postiglo, IL-18BP može se vezati za, primjerice, polietilenglikol (PEG). PEGiliranje može se provesti poznatim metodama, koje su primjerice opisane u WO 92/13095.

Prema tome, u poželjnoj realizaciji ovog izuma, IL-18BP je PEGiliran.

U sljedećoj poželjnoj realizaciji ovog izuma, inhibitor IL-18 je sjedinjeni protein koji sadrži sve ili dio vezujućih proteina IL-18, koji su združeni s cijelim imunoglobulinom ili jednim dijelom. Osoba koja poznaje ovo područje zna da nastali združeni protein zadržava biološku aktivnost od IL-18BP, konkretno vezanje za IL-18. Sjedinjavanje može biti izravno ili putem kratkog vezivnog proteina koji može iznositi 1 do 3 aminokiselinskih ostataka ili više, primjerice 13 aminokiselinskih ostataka. Navedeno vezivo može biti tripeptid sekvencije E-F-M (Glu-Phe-Met), primjerice, ili 13-aminokiselinska vezna sekvencija koja sadrži Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met koja je uvedena između IL-18BP sekvencije i imunoglobulinske sekvencije. Nastali združeni protein ima poboljšana svojstva, kao što je produženo vrijeme zadržavanja u tjelesnim tekućinama (vrijeme poluživota), povećana specifična aktivnost, povećana razina ekspresije ili je olakšano pročišćavanje združenog proteina.

U poželjnoj realizaciji, IL-18BP je sjedinjen s konstantnim područjem neke Ig molekule. Poželjno, on je sjedinjen s teškim lančastim područjem, kao što su CH2 i CH3 domene humanog IgG1, primjerice. Generiranje specifičnih fuzijskih proteina obuhvaća IL-18BP i dio imunoglobulina koji je primjerice opisan u primjeru 11 za WP99/0906. Ostale izoforme Ig molekula su također pogodne za generiranje fuzijskih proteina sukladno ovom izumu, kao što su izoforme IgG₂ ili IgG₄, ili druge Ig klase, poput IgM ili IgA, primjerice. Fuzijski proteini mogu biti monomerni ili multimerni, hetero- ili homomultimerni.

Interferoni su dominantno poznati u svezi s inhibitorskim učinkom na virusno repliciranje i staničnu proliferaciju. Interferon γ , primjerice, ima značajnu ulogu u pospješivanju imunoloških i upalnih odgovora. Interferon β (IFN- β , interferon tipa I), rečeno je da ima protivupalnu ulogu. Istraživanja koja je objavio Triantaphyllopoulos sa suradnicima (1999) ukazuju da IFN- β ima blagotvoran učinak u terapiji reumatoidnog artritisa, kao što je pokazano u mišjem modelu bolesti, modelu kolagen-izazvanog artritisa (CIA). Ovaj pozitivan učinak IFN- β potvrđen je u primjerima niže.

Izum se također odnosi na uporabu kombinacije inhibitora IL-18 i nekog interferona pri proizvodnji medikamenta za tretiranje artritisa, konkretno reumatoidnog artritisa.

Interferoni mogu biti također konjugirani za polimere da bi se povećala stabilnost proteina. Konjugat između interferona β i poliol polietilenglikola (PEG) opisan je primjerice u WO99/55377.

U daljnjoj poželjnoj realizaciji ovog izuma, interferon je interferon- β (IFN- β), te poželjnije IFN- β 1a.

Inhibitor proizvodnje i/ili djelovanja IL-18 poželjno se koristi istovremeno, sekvencijalno ili odvojeno od interferona.

U daljnjoj realizaciji ovog izuma, inhibitor IL-18 koristi se u kombinaciji s a TNF antagonistom. TNF antagonisti pokazuju svoju aktivnost na nekoliko načina. Prvo, antagonisti se mogu vezati za TNF molekulu ili iskazati svoju aktivnost na nekoliko načina. Prvo, antagonisti se mogu vezati za TNF molekulu ili je izdvojiti s dovoljnim afinitetom i specifičnošću da djelomično ili potpuno neutraliziraju TNF epitop ili epitope koji su odgovorni za TNF receptorsko vezanje (ovdje označeno kao "sekvestrirajući antagonisti"). Sekvestrirajući antagonist može primjerice biti antitijelo koje je usmjereno protiv TNF.

Alternativno, TNF antagonisti mogu inhibirati TNF signalizacijske putove koji su aktivirani pomoću stanica površinskog receptora nakon TNF vezanja (ovdje označeno kao "signalizirajući antagonisti"). Obje skupine antagonista

su korisne, bilo same ili zajedno, u kombinaciji s IL-18 inhibitorom, u terapiji artritisa, konkretno reumatoidnog artritisa.

TNF antagonisti se mogu identificirati i evaluirati rutinskim screening-om kandidata u svezi s njihovim djelovanjem na aktivnost nativnog TNF osjetljive stanične linije in vitro, primjerice humane B stanice, u kojima TNF izaziva proliferaciju i imunoglobulinsko izlučivanje. Analiza sadrži TNF formulaciju različitog razrjeđenja kandidatskog antagonista, npr. od 0,1 do 100 puta molarne količine TNF koja se koristi u analizi, te kontrole bez TNF ili samo antagonista (Tucci et al., 1992).

Sekvestrirajući antagonisti su poželjni TNF antagonisti koji se koriste sukladno ovom izumu. Među sekvestrirajućim antagonistima, poželjni su oni polipeptidi koji vežu TNF s visokim afinitetom i posjeduju malenu imunogenost. Molekule topljivih TNF receptora i neutralizirajućih antitijela na TNF su osobito poželjne. Primjerice, topljivi TNF-RI i TNF-RI I korisni su u ovom izumu. Krnji oblici ovih receptora, koji sadrže ekstracelularne domene receptora ili njegovih funkcionalnih dijelova, su poželjniji antagonisti u skladu s ovim izumom. Krnji topljivi TNF tip-I i tip-II receptori su opisani primjerice u EP914431.

Krnji oblici TNF receptora su topljivi i detektirani su u urinu i serumu kao 30 kDa i 40 kDa TNF inhibirajući vezujući proteini, koji su nazvani TBPI, odnosno TBPII (Engelmann et al., 1990). Istovremena, sekvencijalna ili odvojena uporaba IL-18 inhibitora s TNF antagonistom i/ili interferonom je poželjna, sukladno ovom izumu.

Sukladno s ovim izumom, TBPI i TBPII su poželjni TNF antagonisti koji se koriste u kombinaciji s IL-18 inhibitorom. Derivati, fragmenti, područja i biološki aktivni dijelovi molekula receptora funkcionalno podsjećaju na receptorske molekule koje se mogu također koristiti u ovom izumu. Takvi biološki aktivan ekvivalent ili derivat receptorske molekule odnosi se na dio polipeptida, ili na sekvenciju koja kodira receptorsku molekulu, koja je dovoljne veličine i može vezati TNF s takvim afinitetom da je interakcija s membranski vezanim TNF receptorom usporena ili blokirana.

U sljedećoj poželjnoj realizaciji, humani topljivi TNF-RI (TBPI) je TNF antagonist koji se može koristiti sukladno ovom izumu. Molekule prirodnog i rekombinantnog topljivog TNF receptora te metode njihove proizvodnje opisani su u europskim patentima EP 308 378, EP 398 327 i EP 433 900.

IL-18 inhibitor može se koristiti istovremeno, sekvencijalno ili odvojeno s TNF inhibitorom. Koristi se kombinacija IL-18 antitijela ili antiseruma te topljivog receptora TNF, koji posjeduje TNF inhibirajuću aktivnost.

U daljnjoj poželjnoj realizaciji ovog izuma, medikament također sadrži COX-inhibitor, poželjno COX-2 inhibitor. COX inhibitori poznati su u tehnici. Specifični COX-2 inhibitori opisani su primjerice u WO 01/00229.

Ovaj izum se nadalje odnosi na uporabu kombinacije IL-18 inhibitora i/ili interferona i/ili TNF antagonista i/ili COX-2 inhibitora. Kombinacija je odgovarajuća za tretiranje i/ili prevenciju artritisa, konkretno reumatoidnog artritisa, te za tretiranje i/ili prevenciju oštećenja hetre te za tretiranje i/ili prevenciju upalne trbušne bolesti, konkretno Crohnove bolesti i ulcerativnog kolitisa. Aktivne komponente mogu se primijeniti istovremeno, sekvencijalno ili odvojeno.

U poželjnoj realizaciji ovog izuma, inhibitor IL-18 koristi se u količini od oko 0,0001 do 10 mg/kg tjelesne težine, ili oko 0,01 do 5 mg/kg tjelesne težine ili oko 0,1 do 3 mg/kg tjelesne težine ili oko 1 do 2 mg/kg tjelesne težine. U daljnjoj poželjnoj realizaciji, inhibitor IL-18 koristi se u količini od oko 0,1 do 1000 µg/kg tjelesne težine ili 1 do 100 µg/kg tjelesne težine ili oko 10 do 50 µg/kg tjelesne težine.

Ovaj izum se nadalje odnosi na uporabi ekspresijskih vektora koji sadrže kodirajuću sekvenciju inhibitora IL-18 u priređivanju medikamenta za prevenciju i/ili tretiranje artritičnih stanja ili artritisa, konkretno reumatoidnog artritisa, za tretiranje oštećenja jetre, te za tretiranje upalne trbušne bolesti. Pristup genske terapije se dakle koristi za tretiranje i/ili sprječavanje bolesti. Ekspresija IL-18 inhibitora će onda biti in situ, tako da se učinkovito blokira IL-18 izravno u tkivu ili stanicama pogođenima bolešću.

Da bi se tretirao i/ili spriječio artritis, vektor genske terapije koji sadrži sekvenciju proizvodnje inhibitora IL-18 ili njegova djelovanja može se primjerice injicirati izravno u oboljeli zglobov, tako da se izbjegnu problemi koji su povezani sa sistemskom primjenom vektora genske terapije, poput razrjeđenja vektora, dosizanje i pogađanje ciljanih stanica i tkiva, te sporedni učinci.

Uporaba vektora za induciranje i/ili pojačanje endogene proizvodnje inhibitora IL-18 u stanici koja normalno ne odgovara na ekspresiju IL-18 inhibitora, ili koja vrši ekspresiju u količini koja nije dovoljna, također je obuhvaćena ovim izumom. Vektor može sadržavati regulacijske sekvencije koje su funkcionalne u stanici koje žele vršiti ekspresiju inhibitora ili IL-18. Takve regulacijske sekvencije mogu biti promotori ili pojačivači, primjerice. Regulacijske

sekvencije mogu se zatim unijeti na pravo mjesto genoma homolognom rekombinacijom, tako da se operativno povežu regulacijske sekvencije s genom, za kojega se ekspresija mora izazvati ili pojačati. Ova tehnologija s eponekad označava kao "endogena genska aktivacija" (EGA), te je primjerice opisana u WO 91/09955.

- 5 Osoba koja poznaje ovo područje može pretpostaviti da je također moguće zaustaviti IL-18 ekspresiju pomoću identične tehnike, tj. uvođenjem negativnog regulacijskog elementa, poput npr. prigušenog elementa, u genski lokus IL-18, što dovodi do potisnute regulacije ili prevencije ekspresije IL-18. Osoba koja poznaje ovo područje će pretpostaviti da takva potisnuta regulacija ili odsutnost ekspresije IL-18 ima identičan učinak kao uporaba nekog IL-18 inhibitora da bi se spriječila i/ili tretirala bolest.

10 Izum se nadalje odnosi na uporabu stanice koja je genetički modificirana da se dobije inhibitor IL-18 u proizvodnji medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju oštećenja jetre, artritisa ili upalne trbušne bolesti.

- 15 Izum se nadalje odnosi na farmaceutske smjese, osobito korisne za prevenciju i/ili tretiranje upalnog artritisa, oštećenja jetre ili upalne trbušne bolesti, što obuhvaća terapijski učinkovitu količinu inhibitora IL-18 i terapijski učinkovitu količinu interferona. Kao inhibitor IL-18, smjesa može sadržavati caspase-1 inhibitore, antitijela protiv IL-18, antitijela protiv bilo koje podjedinice IL-18 receptora, inhibitore IL-18 signalizirajućeg puta, antagoniste IL-18 koji kompetiraju s IL-18 i blok IL-18 receptore, te IL-18 vezujuće proteine, izoforme, muteine, združene proteine, funkcionalne derivate, aktivne frakcije ili cirkulatorno permutirane derivate koji su identične aktivnosti.

20 IL-18 i njegove izoforme, muteini, sjedinjeni proteini, funkcionalni derivati, aktivne frakcije ili cirkularno permutirani derivati kao što je prije opisano su poželjni aktivni sastojci farmaceutskih smjesa. Interferon koji je sadržan u farmaceutskoj smjesi je poželjno IFN- β .

- 25 U sljedećoj poželjnoj realizaciji, farmaceutska smjesa sadrži terapijski učinkovite količine IL-18 inhibitora, poželjno interferona, te TNF antagonist. TNF antagonisti mogu biti antitijela koja neutraliziraju TNF aktivnost, ili topljivi krnji TNF receptorski fragmenti, također nazvani TBPI i TBPII. Farmaceutska smjesa sukladno ovom izumu također može sadržavati jedan ili više COX inhibitora, poželjno COX-2 inhibitora.

- 30 Definicija pojma "farmaceutski prihvatljiv" znači da je obuhvaćen svaki nosač, koji ne utječe na učinkovitost biološke aktivnosti aktivnog sastojka i koji nije otrovan za domaćina kojemu s eprimjenjuje. Primjerice, za parenteralnu primjenu, aktivni proteini mogu biti formulirani u jediničnom dozirajućem obliku za injiciranje u nosačima kao što je fiziološka otopina, otopina dekstroze, serumski albumin i Ringerova otopina.

- 35 Aktivni sastojci farmaceutske smjese sukladno ovom izumu mogu se primijeniti osobi na mnogo načina. Putovi primjene obuhvaćaju intradermalni, transfermalni (npr. formulacije sa sporim otpuštanjem), intramuskularni, intraperitonealni, intravenski, supkutani, oralni, epiduralni, topički i intranazalni. Može se koristiti bilo koji drugi terapijski učinkovit put primjene, primjerice apsorpcija kroz epitelna ili endotelna tkiva ili pomoću genske terapije pri čemu se DNA molekula koja kodira aktivno sredstvo primjenjuje bolesniku (npr. putem vektora), što uzrokuje da se izvrši ekspresija aktivnog sredstva i izluči in vivo. Nadalje, proteini sukladno ovom izumu mogu se primijeniti zajedno s drugim komponentama biološki aktivnih sredstava kao što su farmaceutski prihvatljivi surfaktanti, ekscipijenti, nosači i razrjeđivači.

- 40 Za parenteralnu (tj. intravensku, supkutanu, intramuskularnu) primjenu, aktivni proteini mogu biti formulirani kao otopina, suspenzija, emulzija ili liofilizirani prah u sprezi s farmaceutski prihvatljivim parenteralnim nosačem (npr. voda, fiziološka otopina, otopina dekstroze) i dodacima koji zadržavaju izotoničnost (npr. manitol) ili kemijsku postojanost (npr. konzervansi i pufere). Formulacija je sterilizirana općenito korištenim tehnikama.

- 50 Biološka raspoloživost proteina, sukladno ovom izumu, može se također poboljšati korištenjem konjugacijskih procesa kojima se produžava vrijeme poluživota molekule u ljudskom tijelu, primjerice vezivanjem molekule za polietilenglikol, kao što je opisano u PCT patentnoj prijavi WO 92/13095.

- 55 Terapijski učinkovite količine aktivnih proteina bit će funkcija mnogih promjenjivica, uključujući tip antagonista, afinitet antagonista za IL-18, bilo kakvu ostatnu citotoksičnu aktivnost koju pokazuju antagonisti, način primjene, kliničko stanje bolesnika (uključujući poželjnost zadržavanja netoksične razine endogene IL-18 aktivnosti).

- 60 "Terapijski učinkovita količina" je takva da nakon primjene, IL-18 inhibitor rezultira inhibiranjem biološke aktivnosti IL-18. Primijenjena doza, kao jedna ili višestruka doza, će za jedinku varirati ovisno o više čimbenika, uključujući IL-18 inhibitorska farmakokinetička svojstva, način primjene, stanje bolesnika i svojstva (spol, starost, tjelesna težina, zdravlje, veličina), uznapredovalosti simptoma, konkurentnom tretmanu, frekvenciji tretiranja i efektu koji se želi postići. Ugađanje i upravljanje ustanovljenom doznom rasponu je unutar sposobnosti osoba koje poznaju ovo područje, kao i in vitro i in vivo metode određivanja inhibiranja IL-18 u jedinke.

Sukladno ovom izumu, inhibitor IL-18 koristi se u količini od oko 0,0001 do 10 mg/kg ili oko 0,01 do 5 mg/kg tjelesne težine, ili oko 0,01 do 5 mg/kg tjelesne težine ili oko 0,1 do 3 mg/kg tjelesne težine ili oko 1 do 2 mg/kg tjelesne težine. Daljnje poželjne količine IL-18 inhibitora su količine od oko 0,1 do 1000 mg/kg tjelesne težine ili oko 1 to 100 mg/kg tjelesne težine ili oko 10 do 50 mg/kg tjelesne težine.

Način primjene koji je poželjan za ovaj izum je primjena potkožnim putem. Intramuskularna primjena je sljedeći poželjan način primjene sukladno ovom izumu.

U daljnjoj poželjnoj realizaciji, inhibitor IL-18 primjenjuje se dnevno ili svaki drugi dan.

Dnevne doze su obično dane u podijeljenim dozama ili u obliku produženog otpuštanja što je djelotvorno da se dobiju željeni rezultati. Druga ili kasnije primjene mogu se provesti s doziranjem koje je identično, manje ili veće od početnog ili prethodnog doziranja koje je primijenjeno. Druga ili kasnije primjene mogu uslijediti tijekom pojave ili prije pojave bolesti.

Sukladno ovom izumu, IL-18 inhibitor može se primijeniti profilaktički ili terapijski nekoj osobi prije, istovremeno ili sekvencijalno s drugim terapijskim režimima ili sredstvima (npr. režimi više lijekova), u terapijski učinkovitoj dozi, konkretno s interferonom i/ili TNF antagonistom i/ili COX inhibitorom. Aktivna sredstva koja se primjenjuju istovremeno s drugim terapijskim sredstvima mogu se primijeniti u identičnim ili različitim smjesama.

Izum se nadalje odnosi na metodu za priređivanje farmaceutske smjese koja je dobivena miješanjem učinkovite količine nekog IL-18 inhibitora i/ili nekog interferona i/ili TNF antagonista i/ili COX inhibitora s farmaceutski prihvatljivim nosačem.

Nakon opisa izuma, on se može bolje razumjeti iz primjera koji slijede i ovdje su samo kao ilustracija, te nisu ograničenje ovog izuma.

PRIMJERI

DIO I: Primjeri 1 do 8, koji se odnose na uporabu IL-18 inhibitora pri oštećenju jetre

Primjer 1: Proizvodnja IL-18BP-His taga

Pročišćeni rekombinantni humani IL-18BP koji sadrži his-tag (r-hIL-18BP-His tag) dobiven je u CHO stanicama. Dobivanje rekombinantnih proteina u eukariotskim stanicama poznato je osobama koje poznaju ovo područje. Raspoložive su dobro poznate metode za izgradnju odgovarajućih vektora, koji nose DNA koja kodira za IL-18BP i koji su pogodni za transfekciju eukariotskih stanica da bi se dobio rekombinantni IL-18BP. Za ekspresiju u stanicama, DNA kodiranje za IL-18BP (vidi np. (Novick et al., 1999) je izrezana i ubačena u ekspresijske vektore koji su pogodni za transfekciju stanica. Alternativno, takva DNA može se prirediti pomoću PCR s odgovarajućim smislenim i protivsmislenim počecima (primjer). Dobiveni cDNA konstrukti su zatim ubačeni u odgovarajuće sagrađene eukariotske ekspresijske vektore tehnikama koje su dobro poznate u tehnici (Manaitis, 1982). rekombinantni protein je pročišćen na čistoću preko 95% i nađeno je da je biološki aktivan in vitro i in vivo s visokim afinitetom prema ligandu.

Primjer 2: Zaštitno djelovanje IL18BP protiv endotoksinom-izazvane smrti u mišjem modelu

Mišji model je korišten za testiranje može li IL18BP, inhibitor IL-18, zaštititi mišveve od visokih doza lipopolisaharida (LPS). LPS potiče akutno oštećenje jetre, nakon čega vrlo brzo slijedi uginanje miševa.

4 mg/kg rekombinantnog, humanog IL-18BP (rhIL18BPHis) koji sadrži his-tag (dobiven rekombinantnom proizvodnjom proteina) injiciran je intraperitonealno (i.p.) u C57BL/6 miševa. 1 h kasnije, injicirano je 60 mg/kg LPS (letalne doze). Vrijeme preživljavanja miševa uspoređeno je sa skupinom životinja koje su primile samo LPS (bez IL18BP).

Pet od sedam miševa koji su injicirani s rhIL-18BP-his preživjeli su LPS injekciju za razliku od kontrolnih miševa, koji su svi uginuli unutar 3 dana.

Krvni uzorci uzeti su 5 h nakon LPS injekcije u odsutnosti ili prisutnosti rastućih doza rhIL-18BP-his te su analizirani pomoću ELISA na cirkulirajući IFN- γ (slika 1). 0,4 i 4 mg/kg rhIL-18BP izazvalo je dvostruko smanjenje serumskog IFN- γ . Ovo inhibiranje izostalo je za niže doze rhIL-18BP (0,004 i 0,4 mg/kg).

Primjer 3: IL18BP ima zaštitno djelovanje protiv ozljede jetre u mišjem modelu bolesti

Korišten je mišji model fulminantnog hepatitisa da se ispita učinak IL18BP. Miševi su razvili akutno oštećenje jetre kada su podvrgnuti sekvencijalnoj primjeni *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) i lipopolisaharidu (LPS).

Miševima su injicirane rastuće doze rhIL-18BP-his (4; 0,4 ; 0,04; 0 mg/kg) u različitim vremenima (1 h, 20 min, istovremeno) prije injiciranja LPS u C57BL/6 *P. acnes* senzibiliziranih miševa. Kada je rhIL-18BP-his primijenjen i.p. u isto vrijeme kada i LPS, nijedan miš nije preživio i razine cirkulirajućeg IFN- γ i TNF- α nisu promijenjene. Iznenadujuće, rhIL-18BP (4 i 0,4 mg/kg) izazvao je 70% smanjenje cirkulacije alanin aminotransferaze (biljeg oštećenja jetre), kao što je prikazano na slici 2.

K tome, praćeno je preživljavanje miševa (slika 3): Kada je rhIL-18BP primijenjen i.p. 20 minuta prije LPS, dvije najveće doze IL-18BP (4 i 0,4 mg/kg) odgodile su uginuće miševa za 10 h, u usporedbi s kontrolnim miševima koji su primili NaCl umjesto IL-18BP.

Rezultati mjerenja razina IFN- γ u serumu prikazani su na slici 4. rhIL-18BP (4 mg/kg) inhibirao je 90% razine cirkulirajućeg IFN- γ i 80% cirkulirajuće alanin aminotransferaze (nije prikazano).

Kada je rhIL-18BP-his primijenjen 1 h prije LPS, krivulje preživljavanja i razine cirkulirajućeg IFN- γ bili su slični onima koji su uočeni kada je rhIL-18BP-his primijenjen 20 min prije LPS, ali razina cirkulirajuće alanin aminotransferaze nije promijenjena (nije prikazano).

Uz ovo, tkivo mišje jetre analizirano je pomoću hematoksilin-eozinskog bojenja, kao i tunelnom mikroskopijom. Jetra miševa, u kojih je prije izazvan jaki hepatitis, pokazali su uznapredovalu nekrozu u odnosu na normalno krivo jetre. Nasuprot tome, tkivo jetre u miševa koji su tretirani s IL-18BP pokazalo je značajno manje nekrotičnih žarišta nego netretirani miševi.

Primjer 4: AntML-18 antitijela zaštićuju od letalne endotoksemije

Da bismo procijenili može li blokada IL-18 s IL-18 antitijelima zaštititi miševe od letalnih doza bakterijskih lipopolisaharida, C57BL/6J miševi su injicirani s neutralizirajućim anti-mišjim IL-18 antitijelom kunića (polidonal) ili normalnim serumom kunića (NDS) kao kontrolom. 30 min nakon tretmana antitijelom, injicirana je letalna doza LPS koji potječe iz *E. coli* (slika 5A) ili *S. typhimurium* (slika 5B). Eksperimentima je obuhvaćena skupina 10-12 miševa, koji su izvršeni dva puta u dva navrata.

Kao što je prikazano na slici 5A, tretiranje miševa s anti-IL-18 antiserumom spriječilo je smrtnost koja je izazvana s 40 mg/kg *E. coli* LPS. 100% miševa preživjelo je nakon anti-IL-18 tretmana vs. 10% preživjelih u miševa koji su tretirani s normalnim serumom kunića ($p < 0,005$).

Slika 5B pokazuje da su antitijelom tretirani miševi također zaštićeni od letalnih učinaka *S. typhimurium* (50% vs. 0% preživljavanja; $p < 0,05$).

Primjer 5: Blokada IL-18 i TNF- α štiti miševe od ConA- i PEA-inducirane hepatotoksičnosti

Korištena su dva eksperimentalna modela hepatotoksičnosti da se odredi uloga IL-18 i TNF- α u oštećenju jetre. Injekcija Concanavalin-a A (Con A) i *Pseudomonas aeruginosa* (PEA) u miševa izazivaju oštećenje jetre, te su modeli T stanični posredovanog hepatitisa.

C57BL/6J miševi su prethodno tretirani s anti-IL-18 antiserumom ili topljivim TNF- α receptorom, TNFRp55. Razina alanin aminotransferaze (ALT) u serumu je mjerena kao pokazatelj oštećenja jetre (slika 6).

Kao što je prikazano na slici 6A, i IL-18 antiserum i topljivi TNF-receptori značajno smanjuju razinu ConA-induciranog serumskog ALT, u usporedbi s kontrolnom injekcijom samog nosača (apirogena fiziološka otopina). Ko-primjena topljivog TNF receptora i IL-18 antiseruma dovodi do potpunog inhibiranja Con-A izazvanog oštećenja jetre.

Kao što je prikazano na slici 6B, i PEA-injiciranih miševa, neutraliziranje bilo TNF- α inhibitora ili anti-IL-18 antitijela rezultira s 93%, odnosno 83% inhibiranja razine ALT u serumu. Kombinirano blokiranje s oba rezultira sa 99% zaštite.

Primjer 6: Razina u plazmi IL-18-vezujućeg proteina povišena je u bolesnika s kroničnom bolešću jetre

Razina IL-18 BP u plazmi mjerena je u 133 bolesnika s kroničnom bolešću jetre (CLD) različitih etiologija, te 31 zdravom kontrolom pomoću specifične ELISA analize, korištenjem IL-18BP monoklonskog antitijela.

Razina u plazmi IL-18 BP značajno je viša u CLD bolesnika ($12,91 \pm 0,89$ ng/ml; prosjek $\pm$ SEM) nego u zdravih osoba ($4,96 \pm 0,43$ ng/ml, $p < 0,001$). Cirozni bolesnici imali su značajno veće razine nego bolesnici s neciroznim CLD ($19,23 \pm 1,28$ ng/ml, $n=67$, vs. $6,49 \pm 0,51$ ng/ml, $n=66$, $p < 0,001$). Bolesnici u stupnju B prema Child-Pugh klasifikaciji imali su višu razinu IL-18 BP nego oni sa stupnjem A ($22,48 \pm 2,44$ ng/ml vs. $9,57 \pm 1,25$ ng/ml, $p < 0,001$). Međutim, nema značajne razlike između Child B i C (stupnja $22,48 \pm 2,44$ ng/ml vs. $20,62 \pm 4,75$ ng/ml, $p=0,7$). Razina IL-18 BP u plazmi u pozitivnoj je korelaciji s GOT, bilirubinom i brzinom taloženja eritrocita. Nađena je negativna korelacija s protrombinskim vremenom.

Kao zaključak, rezultati pokazuju da je razina IL-18 BP u plazmi povišena u CLD i korelira sa uznapredovalošću bolesti, neovisno o etiologiji bolesti. Mada je endogeni antagonist proupalnog IL-18, povećana razina IL-18 BP čini se da nije dovoljna da se suprostavi dominantnim proupalnim medijatorima u CLD.

Primjer 7: Inhibiranje alkoholnog hepatitisa pomoću IL-18BP

Četiri skupine po 5 štakora (5 po skupini) je hranjeno etanolom i hranom koja je sadržavala kukuruzno ulje unutarželučanom infuzijom, tijekom 4 tjedna. U kontrolnih štakora, dekstroza je izokalorijski zamijenila etanol. Štakori su dnevno injicirani s mišjim IL-18BP (1 mg/kg), ili fiziološkom otopinom. Patološka analiza je načinjena na jetrenim sekcijama i mjerenjima u serumu jetrenih enzima, TNF- α , Fas liganda i IFN- γ . Nekroupalno oštećenje i ekspresija jetrenih enzima, TNF- α , Fas liganda i IFN- γ uočeni su u miševa koji su hranjeni etanolom i injicirani fiziološkom otopinom.

Štakori koji su injicirani s mišjim IL-18BP zaštićeni su od nekroupalnog oštećenja i razina enzima jetre, TNF- α , Fas ligand i IFN- γ su značajno smanjeni.

Primjer 8: Inhibiranje Concanavalin A-izazvanog hepatitisa pomoću IL-18BP

Balb/c miševi su injicirani s 12 mg/kg Concanavalin-a A (Con A) sa ili bez injekcije mišjeg IL-18BP (1 mg/kg), 2 h prije Con A primjene i zatim dnevno. Procijenjeno je oštećenje jetre određivanjem razine u serumu enzima jetre, TNF- α , Fas liganda i IFN- γ . Jetrena histopatologija je uspoređena s miševima koji su tretirani samo s Concanavalin-om A.

Prethodni tretman s IL-18BP značajno smanjuje serumsku razinu enzima jetre i TNF- α bez ikakvog dokaza o upali pri histopatološkom ispitivanju, u usporedbi s kontrolnim miševima koji su tretirani s Con A.

DIO II: Primjeri 9 i 10 koji se odnose na uporabu IL-18 inhibitora pri artritisu

Primjer 9: Proizvodnja IL-18BP-His tag

Za eksperiment koji je detaljno opisan u primjeru 10 niže, rekombinantni humani IL-18BP koji sadrži his-tag od 6 rezidua (r-hIL-18BP-His tag) dobiven je u CHO stanicama i pročišćen je kao što je opisao Kirn sa suradnicima, 2000. Rekombinantni protein je pročišćen s čistoćom preko 95% i nađeno je da je biološki aktivan in vitro i in vivo s visokim afinitetom za svoj ligand.

Proizvodnja rekombinantnih proteina u drugim eukariotskim sustavima, sa ili bez tag-ova, olakšava pročišćavanje rekombinantnih proteina, što je poznato osobama koje poznaju ovo područje. Postoje dobro poznate metode za izgradnju odgovarajućih vektora, koji nose DNA koja kodira za IL-18BP i koja je odgovarajuća za transfekciju eukariotskih stanica da bi se dobio rekombinantni IL-18BP. Za ekspresiju u stanicama, DNA koja kodira za IL-18BP (vidi, npr. Novick et al., 1999) izrezana je iz klonirajućeg vektora i ubačena u ekspresijske vektore koji su pogodni za transfekciju stanica. Alternativno, takva DNA može se prirediti pomoću PCR s pogodnim smislenim i protivsmislenim zaglavljlama. Dobiveni cDNA konstrukti se zatim ubacuju u odgovarajuće izgrađene eukariotske ekspresijske vektore tehnikama koje su dobro poznate u tehnici (Maniatis et al., 1982).

Primjer 10: Blokada endogenog IL-18 u mišjem modelu artritisa**Metode**5 *Induciranje kolagen-izazvanog artritisa (CIA)*

CIA je izazvan u muških DBA/1 miševa (8-12 tjedana stari) imuniziranjem s prirodnim tipom II volovskog kolagena (CII) kao što je prije opisano (Plater-Zyberk et al, 1995). Nakon dana 25 post-CII imunizacije, miševi su dnevno ispitani na pojavu bolesti.

10 *Tretiranje s rhIL-18BP-6his*

Tretiranje CII-imuniziranih DBA/1 miševa započelo je nakon prve pojave kliničkih znakova bolesti. Rekombinantni, humani IL-18BP koji sadrži tag od 6 histidina (rh-IL-18BP_{6his}) korišten je za neutraliziranje endogenog IL18 u kolagen tretiranih miševa. rh-IL-18BP-6his injiciran je dnevno tijekom 7 dana sa 5 različitih koncentracija 10, 3, 1, 0,5, 0,25 mg/kg/intraperitonealno injiciranje (i.p.). Placebo kontrolni miševi dobili su samo nosač (0,9% NaCl).

15 *Procjena razvoja bolesti*
Klinička procjena (klinički indeksi)

Nakon prve pojave kliničkih simptoma, miševi su ispitivani svaki dan od strane ispitivača koji je bio slijep za tretman. Svaki ud je procijenjen na uznapredovalost bolesti (indeks 0-3,5, maks. indeks = 14/miš). Napredovanje edema (upale) mjereno je na prvoj šapi koja je pokazala znakove bolesti, korištenjem preciznog kalipera (Proctest 2T, Kroeplin Langenmesstechnik)

Napredovanje bolesti procijenjeno je dnevno tijekom 8 dana nakon pojave, nakon čega su svi miševi žrtvovani i sakupljene su šape za histopatološko ispitivanje.

25 *Histološka procjena propadanja hrskavice i mikroskopske upale*

Na kraju eksperimenta, tj. 8 dana nakon pojave, miševi su žrtvovani i šapa na kojoj su se prvo razvili znakovi bolesti je odvojena. Zglobovi su učvršćeni, dekalificirani i uronjeni u parafin. Načinjene se standardne sekcije (5 do 7 pm) zglobova koje su obojene sa hematoksilin/eozin/safranin O. Svaki zglob je ocijenjen od strane 2 ispitivača koji nisu znali za protokol tretmana (nema uništenja hrskavice ili kosti = 0; lokalizirana erozija hrskavice = 1-2; jače erozije = 3; opće propadanje hrskavice i pojava erozije kostiju = 4). Konačni indeks za svakog miša bio je prosjek rezultata za sve ocijenjene zglobove. Mikroskopska upala ili sinovitis ocijenjen je od 0 do 4, na sljedeći način: bez upale = 0; blago stanjenje graničnog sloja i/ili nešto infiltriranih stanica u subgraničnom sloju = 1-2; stanjenje graničnog sloja i/ili izraženiji influks stanica u subgraničnom sloju = 3; prisutnost stanica u sinovijalnom prostoru i sinovij koji je jako infiltriran s više upalnih stanica = 4.

Određivanje anti-kolagenskih antitijela

Antitijela protiv volovskog kolagena tipa II ispitani su pomoću enzimski vezana imunosorpcijske analize (ELISA). Izmjereni su titri IgG1 i IgG2a. Ukratko, ploče su prevučene s 10 µg volovskog kolagena i nakon toga su nespecifična vezujuća mjesta blokirana s 0,1 M etanolaminom (Sigma). Serijska 1:2 razrjeđenja seruma su dodana, te je slijedila inkubacija s izotip specifičnom kozjom anti-mišjom peroksidazom (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA) i supstratom (5-aminosalicilna kiselina, Sigma). Ploče su očitane na 492 nm. Titri su izraženi kao prosjek±SD razrjeđenja, što daje polovicu maksimalne vrijednosti.

45 *IL-6 analize*

Razina IL-6 određena je komercijalnom ELISA analizom (R&D systems, Minneapolis, MN, USA). IL-6 bioaktivnost određena je proliferacijskom analizom pomoću B9 stanica. Ukratko, 5×10^3 B9-stanica u 200 µl 5% FCS-RPMI 1640 medija po jažici je stavljeno u mikrotitarsku ploču s okruglim dnom te je inkubirano tri dana pomoću humanog rekombinantnog IL-6 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) kao standarda, na kraju inkubiranja, svakoj jažici dodano je 0,5 µl ^3H timidina (NEN-Dupont, Boston, MA, USA). tri sata kasnije, stanice su sakupljene i određena je ugradnja timidina. Granica detektiranja za IL-6 bioanalizu bila je 1 pg/ml.

Statistička analiza

Značajnost razlike procijenjena je pomoću Mann Whitney testa, programom SigmaStat statističke analize i GraphPad Prism programom.

Rezultati

Mišji eksperimentalni model, CIA (kolagen inducirani artritis), upotrebljen je za procjenu učinkovitosti IL-18BP kao sredstva za tretiranje artritisa. Primijenjeni kolagen i nepotpuni Freundov adjuvant u DBA/1 miša izaziva razvoj erozivnog, upalnog artritisa i predstavlja idealnu mogućnost da se iskoristi terapijski potencijal IL-18BP. Nakon toga, endogeni IL-18 je neutraliziran pomoću IL-18BP i procijenjen je učinak na različite patogene parametre.

Izvršeno je ispitivanje u svezi s dozom. Terapeutski su tretirane tri skupine DBA/1 miševa s kolagen-induciranim artritisom (nakon pojave bolesti) s 5 doza IL-18BP i.p. (intraperitonealno). IL-18BP u koncentracijama 10, 3, 1, 0,5 ili 0,25 mg/kg primijenjen je na prvi klinički znak bolesti. kao kontrola korištena je injekcija fiziološke otopine (natrijev klorid, NaCl). K tome, 10 000 IU interferona β (IFN- β) primijenjeno je i.p. da se procijeni učinak IFN u ovom eksperimentalnom modelu artritisa. Učinak na uznapredovalost bolesti praćen je dnevno vizualnom procjenom svake pojedinačne šape, kao što je prije opisano. Miševi su žrtvovani 8 dana nakon pojave bolesti.

Izmjerene su sljedeće vrijednosti:

- vizualni klinički indeks (0-3,5 po šapi) (slika 7A i B)
- oticanje zglobova/edem (u mm, mjereno kaliperom) prve oboljele šape, pod uvjetom da je to stražnja šapa (slika 8)
- broj šapa koje su zahvaćene bolešću (slika 9)
- indeks erozije prve oboljele šape (0-4 propadanje hrskavice, slika 10).
- histopatološka analiza šape koja je prva razvila artritis (slika 11)
- razina antitijela anti-kolagenskog tipa II (slika 12)
- razina IL-6 (slika 13).

Klinička uznapredovalost bolesti

Kao što je prikazano na slikama 7A i B, klinička uznapredovalost bolesti značajno je opala u skupini tretiranih s 1 mg/ml ($P < 0,01$) i 0,5 mg/ml ($0,01 < P < 0,05$) rhIL-18BP. Miševi koji su dobili malenu dozu rhIL-18BP (0,25 mg/kg) ili veliku dozu od 10 mg/kg imali su klinički indeks sličan placebo skupini. Doza od 1 mg/kg IL-18BP približno je toliko učinkovita kao i interferon β (označeno IFN β na slici 7A).

Upala zglobova i oticanje šape (edem)

Makroskopska upala (oticanje) ispitano je mjerenjem edema šape od 1 dana nakon pojave bolesti do dana 8, kraja eksperimenta. Rezultati su prikazani na slikama 8A i B. Učinkovite doze IL-18BP bile su 1, 3 i 10 mg/kg. Primjena manjih doza nije rezultirala povoljnim učinkom na oticanje šapa. Kao što je prikazano na slikama 8A i 8B, interferon- β (IFN β) u koncentraciji od 10 000 IU imao je blagotvoran učinak na oticanje šapa.

Mikroskopski sinovitis ispitano je na kraju eksperimenta na histopatološkim sekcijama i izražen je ako indeks ("indeks sinovitisa"). rezultat upale (oticanje) i indeks sinovitisa su sumarno prikazani u tablici 1. Premda tretman s rhIL-18BP s dozama 1 and 3 mg/kg rezultira trendom prema smanjenju oticanja, tretman s bilo kojim doziranjem IL-18BP imao je tek ograničen učinak na upalni sinovitis (Tablica 1).

Tablica 1: Djelovanje IL-18BP tretmana na upalu zglobova

Tretiranje	Oticanje (AUC, prosjek $\pm$ sem)	Indeks sinovitisa (prosjek $\pm$ sem)
RhIL-18BP-6his 3 mg/kg	1,55 $\pm$ 0,64	2,17 $\pm$ 0,5
1 mg/kg	1,53 $\pm$ 0,60	1,98 $\pm$ 0,4
0,5 mg/kg	3,38 $\pm$ 0,70	1,92 $\pm$ 0,5
0,25 mg/kg	3,06 $\pm$ 0,90	2,08 $\pm$ 0,5
Placebo	3,11 $\pm$ 0,77	2,23 $\pm$ 0,3

Slika 9 prikazuje da broj šapa koje su zahvaćene bolešću opada nakon primjene IL-18BP. Konkretno, terapijske injekcije IL-18BP u dozama 1 i 0,5 mg/kg smanjuje broj šapa koje su zahvaćene bolešću, što demonstrira da blokada IL-18 in vivo zaustavlja širenje artritisa za druge zglobove. Tretiranje s 1 i 0,5 mg/kg IL-18BP se čak čini dovoljnim za pretvaranje nekih artritičnih zglobova u normalne.

Zaštita od propadanja zglobova

Tretiranje miševa s rhIL-18BP rezultira zaštitom zglobova od propadanja (slika 10). Sustav semikvantitativnog indeksiranja pokazuje da propadanje kostiju pokazuje zaštitni učinak koji je povezan s dozom, a značajan je za 10 i 3 mg/kg ($P < 0,05$, slika 10). Miševi koji su primili 1 mg/kg rhIL-18BP imali su manje oštećenja od miševa koji su primili samo nosač. Nikakva zaštita nije uočena za doze 0,5 mg/kg i 0,25 mg/kg. zanimljivo, učinak zaštite zglobova za doze 3 i 10 mg/kg IL-18BP bio je usporediv ili čak i izraženiji od pozitivnog učinka od 10 000 IU interferona β (IFN- β).

Slika 11 prikazuje histologiju zdravih (A) i oboljelih (B) zglobova u usporedbi sa zglobovom životinje koja je tretirana s IL-18BP (C). Sekcije su uzete na kraju eksperimenta u onih šapa koje su razvile artritis.

Zglob artritičnog miša pokazao je uznapredovali destruktivni artritis s povlačenjem hrskavice i oštećenjima te brojnim infiltriranim stanicama u upaljenom sinoviju. U zglobovima miša koji je tretiran s rhIL-18BP, hrskavica je bila gotovo

normalna, ez obzira na prisutnost upalnih stanica u prostoru sinovija. Tu nije bila samo veća količina hrskavice, već je hrskavica izgledala gladom.

Anti-IL-18 tretman mijenja razine anti-tip II kolagen antitijela

- 5 CIA miševi imali su povećanu razinu IgG1 i IgG2a anti-tip II kolagen antitijela u cirkulaciji. Antitijela izotipa IgG1 povezana su s TH2 posredovanim bolestima, pri čemu su antitijela izotipa IgG2a i IgG2b povezana s Th1 posredovanim bolestima. Artritis je obično klasificiran kao TH1 posredovana bolest.

- 10 Anti-tip II kolagen (CII) IgG1 i IgG2a izotipovi antitijela određeni su u serumu životinja koje su tretirane s IL-18BP (slika 12). Razine anti-CH IgG izotipova IgG1 i IgG2a bile su značajno promijenjene IL-18BP tretmanom na dan 4 ili 8 (D4, D8) kliničke bolesti. Međutim, 2,6 i 3,4 struko smanjenje kolagen-specifičnog IgG1/IgG2a odnosa uočeno je nakon 8 dana rhIL-18BP-tretmana, za 1 i 3 mg/kg. Slika 12 prikazuje eksperiment u kojem je korišteno 3 mg/kg. Praktički identičan rezultat se dobije kada se koristi količina od 1 mg/kg IL-18BP. Smanjeni odnos IgG1/IgG2a anti-CII antitijela indicira umanjenu koncentraciju anti-tip II kolagen antitijela izotipa IgG2a i povećanu koncentraciju anti-tip II kolagen antitijela izotipa IgG1, što ukazuje da postoji pomak prema TH2-posredovanoj bolesti u ovom modelu artritisa.

Smanjenje IL-6 razina nakon IL-18 neutraliziranja

- 20 Da bi se dobio uvid u učinke IL-18 blokade, IL-6 je mjereno u serumu IL-18BP tretiranih životinja. Slika 13 prikazuje da je razina bioaktivnog IL-6 značajno smanjena u životinja koje su primile IL-18BP tretman za sve mjerene doze, tj. za 1, 3 i 10 mg/kg, kao i za interferon β (IFN β). Imunoaktivne razine IL-6 koje su izmjerene u životinja tretiranih s 3 mg/kg rhIL-18BP bile su značajno smanjene ($P < 0,0023$) u usporedbi sa životinjama koje su tretirane fiziološkom otopinom. Razina IL-6 u serumu oboljelih životinja koje su tretirane s 1, 3 ili 10 mg IL-18BP ili 10 000 IU IFN- β bila je slična kao za normalni mišji serum (NMS) iz skupa zdravih životinja, tj. onih životinja koje nisu imale upalnu bolest.
- 25 Ovi nalazi pokazuju da IL-18 kontrolira razinu IL-6 tijekom pojave bolesti. Budući da je IL-6 obilježivač upale, ovi nalazi pokazuju da tretiranje oboljelih miševa s IL-18BP smanjuje upalu u životinja.

Iz gore navedenih eksperimenata, mogu se definirati sljedeći zaključci:

- Primjena IL-18BP smanjuje kliničku uznapredovalost bolesti
 - IL-18BP inhibira daljnje napredovanje ili širenje bolesti
 - Primjena IL-18BP smanjuje edem
 - Primjena IL-18BP smanjuje propadanje hrskavice
 - Razina IL-6 u serumu iščezava i odnosi IgG1/IgG2a anti-CII se smanjuju nakon IL-18BP terapije.
- 35 Gore navedeni podaci pokazuju da neutralizacija IL-18 bioaktivnosti nakon pojave bolesti predstavlja antireumatsku terapiju kojom se preoblikuje bolest. Rezultati jasno pokazuju da IL18 blokada smanjuje kliničko napredovanje artritisa, te što je važnije, zaustavlja napredovanje propadanja hrskavice i kostiju. IL18 blokada pomoću IL-18BP, anti-IL-18 antitijela ili bilo kojim drugim IL-18 blokirajućim sredstvom, prema tome predstavlja novu antireumatsku terapiju kojom se mijenja bolest.

- 40 Gore navedeni opis specifičnih realizacija ukazuje na opću prirodu izuma tako da netko drugi može, primjenom općeg znanja, jednostavno promijeniti i/ili prilagoditi različitim primjenama specifične realizacije bez udaljavanja od općeg načela, i prema tome, takva prilagođavanja i promjene treba smatrati da potpadaju pod značenje i raspon ekvivalenata opisanih realizacija. Podrazumijeva se da frazeologija ili terminologija koja se ovdje rabi je samo zbog opisa i nije ograničena.

DIO III: Primjeri 11 i 12 koji se odnose na upalnu trbušnu bolest

Primjer 11: IL-18BP ekspresija pomoću endotelnih stanica i makrofaga tijekom aktivne Crohnove bolesti

Sakupljanje uzoraka

- 50 Crijevne mukozne biopsije izolirane su iz kirurških resekcija uzoraka bolesnika s CD ili UC. Uključeno je četrnaest bolesnika (tri muška i jedanaest ženskih) s prosječnom starošću 37,8 godina (raspon 20-78 godina) te trajanjem bolesti od 8,3 godina (raspon 1-21 godina). U osam bolesnika bolest je locirana u ileumu i u šest u kolonu. Dvanaest bolesnika koristilo je imunosupresijske lijekove. Dijagnoza aktivnog CD učinjena je histopatološkim ispitivanjem koje se temelji na sljedećim kriterijima: prisutnost ulceracija, povećani broj upalnih stanica i transmuralna upala. Nađeno je sedam bolesnika s aktivnim CD i sedam bolesnika s neaktivnom bolešću. Nema uočenih značajnih razlika u starosti, lokalizaciji bolesti, spolu, primjeni lijekova i trajanju bolesti između aktivnih i neaktivnih CD bolesnika. Prosječna starost 5 UC bolesnika (tri muška i dva ženska) bila je 37,6 godina (raspon 30-44 godina). U svih bolesnika bolest je bila lokalizirana u kolonu i svi su bili na imunosupresijskoj terapiji. Prosječno trajanje bolesti bilo je 4 godine (raspon 1-9 godina). Kontrolni uzorci bili su dobiveni od 5 bolesnika koji su bili podvrgnuti resekciji za ne-IBD srodne bolesti (tri muškarca i dvije žene). Prosječna starost ove skupine bila je 55,2 godine (raspon 24-76 godina). U svih bolesnika, bolest je bila lokalizirana u kolonu.

Semikvantitativna RT-PCR za humani IL-18 i IL-18BP

Ukupna RNA bila je ekstrahirana iz zamrznutih biopsija bolesnika s CD, s UC ili kontrolnih bolesnika. RNA ekstrahiranje izvršeno je pomoću Trizol (Gibco) sukladno savjetima proizvođača. Dobiveni uzorci bili su kvantizirani mjerenjem apsorbancije na 260 nm. Integritet RNA bio je procijenjen elektroforezom na 1% agaroznim gelovima. cDNA bila je sintetizirana iz 1 µg ukupne RNA korištenjem Promega sustava reverzne transkripcije, sukladno protokolu proizvođača. PCR reakcije izvršene su u ukupnom volumenu od 50 µl u prisutnosti 1U AmpliTaq DNA polimeraze (Perkin Elmer, Roche, U.S.A.), 2,5 mM dNTPs (Amersham, U.S.A) i 50 pmol izravnih i reverznih PCR primera. Reakcijska smjesa je inkubirana u PTC-200 Peltier termičkom ciklatoru (MJ Research, U.S.A) u sljedećim uvjetima: denaturiranje 1 min na 94°C, aneliranje 1 min na 55°C i produžetak 1 min na 72°C. Određen je optimalni broj ciklusa za IL-18BP, IL-18 i β-aktin prije zasićenja vrpce (31, 28, odnosno 25). PCR zaglavlja (primer) oblikovani su temeljem publiciranih sekvencija (AF110799, D49950, X00351) na sljedeći način: IL-18, reverzno 5'- GCGTCACTACACTCAGCTAA-3'; naprijed 5'-GCCTAGAGGTATGGCTGTAA-3'; IL-18BP, naprijed 5'-ACCTGTCTACCTGGAGTGAA-3'; reverzno 5'- GCACGAAGATAGGAAGTCTG-3'; β-aktin, reverzno 5'-GGAGGAGCAATGATCTTGATCTTC-3'; naprijed 5'- GCTCACCATGGATGATGATATCGC-3'. Da se isključi pojačavanje genomske DNA koja sadrži uzorke, izvršene su PCR reakcije u odsutnosti cDNA šablone. PCR produkti (10 µ) analizirani su na 1% agaroznim gelovima koji su elektroforezirani u 1x TAE puferu. Veličina PCR produkata provjerena je uspoređivanjem s 1 Kb uzorkom (Gibco) nakon bojenja gelova. Relativno kvantificiranje etidij-bromid obojenih vrpce izvršeno je pod UV svjetlom pomoću Kodak Digital Sciences analitičkog softvera, te je dobiven kao odnos ciljanog gena (hIL-18BP, hIL-18) prema genu domaćina (hβ-aktin).

Stvaranje monoklonskih antitijela usmjerenih hIL-18BP.

BALB/c miševi su injicirani potkožno u četiri uda, kao i u anus, s 50 µg izoformnog rhIL-18BP-6his (pročišćen iz jajčanih stanica kineskog zamorca, Interpharm Laboratories, Nes Ziona, Israel) u PBS s adjuvantom (MPL +TDM emulzija, RIBI Immunochem Research, Inc.) na dane 0, 7 i 28. Četiri dana nakon treće imunizacije, limfni čvorovi su dobiveni i probavljeni s 2,4 µg/ml kolagenazom (kolagenaza IV, Worthington Biochemical Corp.) i 0,1% Dnase (Sigma). Izdvojene stanice su zatim združene s Sp2/0 mijelomskim stanicama pomoću PEG 1000 (FLUKA). Stanice su zatim resuspendirane u DMEM-F12, 10% FCS (Gibco) u prisutnosti HAT (hipoksantin, aminopterin, timidin) te raspodijeljene u 96 jažica s koncentracijom 5×10^4 stanica/ml. Uzorci supernatanta hibridomske kulture je skeniran na prisutnost reaktivnih antitijela izravnom screening analizom. U tu svrhu, ELISA ploče su prevučene s kozjim anti-mišjim F(ab')₂ antitijelima (Jackson Immuno Research, Milan analytica, Switzerland), dodan je supernatant hibridomske kulture i nakon toga biotinizirani rhIL-18BP-6his (pročišćen od COS stanica kao što je opisano (Novick, et al. 1999), sa ili bez rhIL-18 (pročišćeno od rekombinantne E. Coli, Serono Pharmaceutical Research Institute, Geneva), te konačno streptavidin-peršin peroksidaza (HRP) (Jackson Immuno Research, Milan analytica, Switzerland) razvijena s o-fenilendiaminom (OPD) (Sigma). Ne-neutralizirajuća antitijela su odabrana i suklonirana. U ovom istraživanju, korišteno je 95-H20 mišje IgG1 monoklonsko antitijelo.

Imunohistokemijska istraživanja lokalizacije IL-18BP-pozitivnih stanica

Uzorci tkiva su zamrznuti i držani na -80°C. Dobivene su serijske kriosekcije (10 µm), koje su postavljene na poli-1-lizin-prevučene Superfrost/Plus stakla (Polylabo, Plan-les-Ouates, Switzerland) i učvršćene u ledeno-hladnom acetonu. Lokalizacija humanog IL-18BP proteina analizirana je imunokemijski pomoću Mab 95-H20. Nakon kratkog rehidriranja u PBS, sekcije su prethodno inkubirane 30 minuta u PBS kojem je dodan 2% serum telećeg zametka (PCS) (Cansera, Ontario, Canada), 1% humani serum (AB* serum, Transfusion Center, Annemasse, France) i 0,5% volovskog serum albumina (BSA) (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A). Aktivnost endogene peroksidaze je blokirana stavljanjem ploča u otopinu PBS, 2% PCS, 1% humani serum, 0,5% BSA i 1% vodikov peroksid (H₂O₂) (Fluka, Switzerland) tijekom 1 h. Nakon ispiranja u PBS, sekcije su inkubirane preko noći s nerazrijeđenim supernatantom kulture Mab 95-H20. Nakon drugog ispiranja u PBS, sekcije su inkubirane s biotiniziranim kozjim anti-mišjim antitijelom (Jackson Immuno Research, Milan analytica, Switzerland) (5 µg/ml) u PBS koji sadrži 0,5% BSA tijekom 1 h. Osjetljivost bojenja je povećana inkubiranjem s avidinDH/biotiniziranim HRP kompleksom (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, CA, U.S.A) tijekom 30 min. Ploče su zatim isprane s PBS i razvijene korištenjem otopine 30% H₂O₂, 3,3-amino-9-etil karbazola (AEC) (Sigma), N,N-dimetilformamida (Merck) u acetatnom puferu, pH 5. Nakon protiv-bojanja s hematoksilinom (Sigma), sekcije su prevučene s glicerolom i ploča je pokrivena. Kao izotipska kontrola korišteno je mišje IgG1 antitijelo (R i D sistem).

Da bi se identificirala stanična lokalizacija humanog IL-18BP, provedeno je dvobojno imunohistološko ispitivanje na mukoznim intestinalnim sekcijama. Nakon 10 min. rehidriranja u PBS, sekcije su prethodno inkubirane tijekom 30 minuta u PBS kojemu je dodano 2% PCS, 1% humani serum i 0,5% BSA. Za ko-lokaliziranje s endotelnim stanicama, sekcije su inkubirane preko noći s biotiniziranim Mab 95-H20 (20 µg/ml) koji je pomiješan s FITC-konjugiranim mišjim anti-humanim CD31 (1:50) (Pharmingen, CA, U.S.A) u PBS / 0,5% BSA. Za ko-lokaliziranje s makrofagima, sekcije su inkubirane preko noći s biotiniziranim Mab 95-H20 (20 µg/ml) koji je pomiješan s FITC-konjugiranim anti-humanim CD68 (1:25) (Dako, Denmark). Nakon ispiranja u PBS, dodan je streptavidin Texas-Red (Southern

Biotechnology Associates, AL, U.S.A) tijekom 1 h. Ploče su ponovo isprane i sekcije su prevučene moviolom i pokrivene. Kao izotipska kontrola korišteno je biotinizirano miše IgG1 antitijelo (Pharmingen) te nakon toga streptavidin Texas-Red.

5 *Stanična kultura*

Humane pupčane žilne endotelne stanice (HUVEC) (Clonetics Corp., San Diego, CA) uzgojene su pomoću medija za uzgoj, endotelnih stanica (EGM) kojemu je dodan humani rekombinantni epidermalni čimbenik rasta (hEGF) (10 ng/ml), hidrokortizon (1 µg/ml), gentamicin i amfotericin B (50 µg/ml), ekstrakt volovskog mozga (BBE) (3 mg/ml) i 2% serum volovskog zametka (FBS) (Clonetics Corp., San Diego, CA) sukladno uputama proizvođača. Posude s kulturom tkiva
10 bile su prethodno prevučene s humanim fibronektinom (10 µg/cm²) (Boehringer, Mannheim). Stanice su inkubirane u vlažnom 5% CO₂ inkubatoru te su eksperimenti provedeni pomoću HUVEC na prolazu 3. HUVEC je tretiran s humanim IL-1β (10 ng/ml), TNFα (10 ng/ml) i IFNγ (20 ng/ml) (R and D system, Germany) tijekom 24 h. na kraju perioda uzgoja, stanice su skupljene, RNA izdvojen i podvrgnut RT-PCR za IL-18BP i IL-18 mRNA transkriptnu analizu. Supernatanti su skupljeni i analizirani na IL-18BP i IL-18 proteinsku ekspresiju pomoću ELISA.

15 Humana monocitna stanična linija THP-1 držana je u suspenziji kulture u RPMI mediju uz 10% toplinski inaktiviranog PCS, L-glutamin (2 mM), penicilin-streptomycin (10 U/ml) (Gibco BRL, Life Technologies) i p-merkaptotanol (50 µM) (Fluka). Oni su inkubirani u vlažnom 5% CO₂ inkubatoru te propušteni na 1:10 svakih 5 dana. Tridana prije eksperimentiranja, humane monocitne stanice su diferencirane s gustoćom 0,4x10⁶ stanica/ml s vitaminom D3 (80 nM) (Biomol Research Laboratories, USA) te su ostavljene da adheriraju. kada su jednom diferencirane, LPS (100 ng/ml) (Calbiochem), humani IL-1β (10 ng/ml), TNFα (10 ng/ml) i IFNγ (20 ng/ml) dodani su staničnim kulturama. Nakon 48 h, supernatanti su skupljeni i analizirani na IL-18BP i IL-18 proteinsku ekspresiju pomoću ELISA.

Mjerenje proizvodnje humanog IL-18bp i IL-18

25 Prisutnost IL-18BP provjerena je pomoću ELISA u stanično slobodnim supernatantima od HUVEC, nestimuliranim i stimuliranim 24 h s koktelom citokina (IL-1β, TNFα, IFNγ), kao i iz THP-1 stanične linije, nestimulirane i stimulirane tijekom 48h (LPS, IL-1β, TNFα, IFNγ). U tu svrhu, ploče su prevučene preko noći s uhvatnim Mab (klon 657,27 na 0,5 µg / 10071/jažica, Interpharm Laboratories, Nes Ziona, Israel) koje je usmjereno protiv rhIL-18BP (izoforna a). Topljivi hIL-18BP zatim je detektiran pomoću poliklonskog antitijela kunića (razrijeđeno na 1/10 000) usmjerenog
30 protiv rhIL-18BP-6his (pročišćen iz jajčanih stanica kineskog zamorca, Interpharm Laboratories, Nes Ziona, Israel), nakon čega slijedi inkubiranje s peroksidazno konjugiranim afinitetno pročišćenim kozjim protiv-kunića IgG (razrijeđen na 1/20 000) (Jackson Immuno Research, Milan analytica, Switzerland). Uхватni Mab, kao i poliklonsko antitijelo kunića, ispitano je pomoću *Western Blot* da bi se potvrdila IL-18BP specifičnost. Rekombinantni hIL-18BP-6his korišten je kao standard. Osjetljivost ELISA bila je 100 pg/ml. Paralelno, razina IL-18 bila je kvantificirana pomoću
35 humanog IL-18 ELISA pribora (MBL, Immunotech). Osjetljivost ELISA analize bila je 12,5 pg/ml.

Ekspresija hIL-18BPα-IIIS6 u CHIO stanicama

Rekombinantni humani IL-18BP (hIL-18BPα His6-tag) pročišćen je od jajčanih stanica kineskog zamorca (Interpharm Laboratories, Nes Ziona, Israel).

40 Rezultati

Ekspresija IL-18BP mRNA transkripata u intestinalnim biopsijama

45 Analiza na IL-18BP mRNA ekspresiju izvršena je pomoću RT-PCR na tkivnim homogenatima iz kirurških uzoraka kolona za bolesnike bilo s aktivnim CD, neaktivnim CD ili UC, te iz neupalnih intestinalnih tkiva (slika 14). IL-18BP i aktin transkripti su detektirani u svim ispitanim intestinalnim homogenatima. Slično, transkripti za IL-18 nađeni su u svim tkivnim homogenatima bilo za CD, UC ili ne-IBD kontrole (slika 14A). Odnos IL-18BP ili IL-18 prema razini kontrolne aktin mRNA pokazao je statistički značajan porast (kao što je prije opisano) u količini transkripata za IL-18BP i IL-18 u biopsijama koje su dobivene od bolesnika s aktivnim CD u odnosu na biopsije bolesnika s
50 neaktivnim CD, UC ili ne-IBD kontrolama (slika 14B i C). Ovi podaci pokazuju da je IL-18BP doreguliran u mukoznom tkivu tijekom aktivnog CD i daje jasan dokaz da razina IL-18BP ekspresije jasno diferencira aktivan CD od neaktivnog CD, UC i ne-IBD kontrola.

Statistička analiza ekspresije IL-18BP mRNA transkripata u intestinalnim biopsijama

55 Izvršena je analiza varijance, pri čemu su svi podaci zajedno grupirani. Rezultat jasno ukazuje na statističke odskoke bez obzira na rezultate za jednog od bolesnika iz aktiven CD skupine (vrlo visok OD odnos IL 18, odnosno 16252, te vrlo maleni OD odnos za IL 18BP, odnosno 1058.). Ovaj usamljen i vrlo netipičan par mjerenja nije omogućio provjeru valjanosti ANOVA modela (p-vrijednost testa Shapiro-Wilks za normalitet ostataka < 0,0001). dakle, odlučeno je da se u statističkoj analizi zanemari ovaj par mjerenja.

60

ANOVA model uzео je u obzir faktorsku skupinu (kontrola, aktivan CD, neaktivan CD, te UC), protein (IL-18 ili IL-18BP), te broj bolesnika (23 bolesnika). Postoji značajna razlika među skupinama (p -vrijednost $< 0,0001$), također je zanimljivo naglasiti da razlika OD odnosa između IL-18 i IL-18BP nije značajna (p -vrijednost=0,369). Štoviše, korelacija između IL-18 i IL-18BP ekspresije također je izvršena. Koeficijent korelacije između IL-18 i IL-18BP jednak je 0,67, što ukazuje na jaku vezu između OD odnosa koji je izmjeren za IL-18 i IL-18BP. Slijedeći rezultate koji se odnose na efektu skupine, korištena je metoda Scheffe za uspoređivanje različitih skupina. Može se zaključiti da je OD odnos za aktivan CD značajno veći od onoga za kontrole (+3280), UC (+2590), te posebno inaktivnog CD (+4580), za IL-18BP i IL-18 ekspresiju.

Imunohistokemijsko lokaliziranje IL-18BP u intestinalnim tkivima

Da se procijeni stanična ekspresija IL-18BP *in situ*, izvršena je imunohistokemija pomoću anti-hIL-18BP specifičnih monoklonskih antitijela na kriosekcijama koje su priredene iz intestinalnog tkiva dobivenog od bolesnika s aktivnim CD i od ne-IBD kontrola. IL-18BP pozitivne stanice bile su detektirane u lamina propria, submukozi i unutar mišićnog sloja (nije prikazano). Pozitivno obojene mononuklearne stanice koje postoje unutar lamina propria i submukoze imaju bogatu citoplazmu, vezikularni retiformni nukleus, te su morfološki konzistentne s tkivnim makrofagima. U mišićnom sloju, pozitivno obojene stanice imaju obilnu citoplazmu, pri čemu je ponekad otvoren lumen u sredini, što ukazuje na pozitivno bojanje mikroprostora, te su morfološki konzistentne s endotelnim stanicama. Veliki prostori su također specifično obojeni pomoću anti-hIL-18BP monoklonskih antitijela. Značajno povećanje pozitivno obojenih stanica uočeno je u uzoraka koji su dobiveni od bolesnika s aktivnim CD, u usporedbi s uzorcima koji su dobiveni od ne-IBD kontrola, korelira s povećanom IL-18BP ekspresijom koja je uočena pomoću RT-PCR analize. Susjedne sekcije su inkubirane s odgovarajućom mišjom izotipskom kontrolom.

Identificiranje proizvedenih IL-18BP stanica koje se nalaze u mukoznim biopsijama

IL-18BP pozitivne stanice koje se nalaze u upalnim intestinalnim tkivima identificirane su korištenjem specifičnih obilježivača za makrofage (anti-CD68) i endotelne stanice (anti-CD31) (nije prikazano). CD68 pozitivne stanice (zeleno) i IL-18BP pozitivne stanice (crveno) detektirane su unutar lamina propria i submukozi intestinalnih tkiva aktivnog CD (nije prikazano). CD31 pozitivne stanice (zeleno) i IL-18BP pozitivne stanice (crveno) detektirane su u submukozi, da se potvrdi da su makrofagi i endotelne stanice također pozitivne za IL-18BP, analizirane su zajedno obje boje, zelena od anti-CD68 ili anti-CD31 i crvena od anti-IL-18BP, te se pokazalo da sve stanice koje vežu anti-IL-18BP antitijela su bilo CD68 pozitivne ili CD31 pozitivne (žuto-narančasto). Dvostruko imunoobilježavanje pokazuje da su makrofagi i endotelne stanice glavni izvor IL-18BP bojenja unutar upalnih tkiva koja su dobivena od bolesnika s CD.

Ekspresija IL-18BP mRNA i proteina pomoću endotelnih stanica

Da bi se ispitala sposobnost humanih endotelnih stanica da proizvedu IL-18BP, kao i da se potvrde rezultati koji su dobiveni imunobojanjem i RT-PCR na totalnim biopsijama, izvršeni su daljnji RT-PCR eksperimenti na humanim pupčanim žilnim endotelnim stanicama (HUVEC) (slika 15A). Endotelne stanice tretirane su s koktelom citokina (hIL-1 β , hTNF α , hIFN γ) te sakupljene nakon 24 h za RNA ekstrakciju i PCR analizu. Odnos IL-18BP prema razini kontrolne aktin mRNA pokazuje određeno povećanje količine IL-18BP transkripata u tretiranim stanicama u usporedbi s nestimuliranim stanicama nakon 24 h.

Štoviše, IL-18BP mRNA čini se da je konstitutivno ekspresiran u endotelnim stanicama. Razina IL-18 mRNA također je analizirana i demonstriran je lagani porast u tretiranim miševima. Međutim, IL-18 mRNA nije ekspresiran u nestimuliranim endotelnim stanicama.

ELISA sa supernatantima kulture nestimuliranih stanica (medij) i HUVEC tretirani tijekom 24 sata je pokazala da je IL-18BP protein prisutan i u mediju i u stimuliranim stanicama s 30x povećanjem nakon 24 sata stimuliranja (slika 15B).

Ekspresija IL-18BP proteina pomoću monocitne stanične (THP-1)

Ekspresija IL-18 i IL-18BP analizirana je u supernatantima kulture nestimuliranih i stimuliranih, diferenciranih THP-1 stanica pomoću ELISA analize (slika 15C). Eksperiment je pokazao povećanje IL-18BP ekspresije nakon 48h stimuliranja s IPS, hIL-1 β , hTNF α , hIFN γ . Paralelno, IL-18 izlučivanje je povećano nakon stimuliranja (slika 15C).

Sažetak

U ovom istraživanju, karakterizirana je ekspresija IL-18BP i lokaliziranje u mukoznom tkivu koje je dobiveno od bolesnika s Crohn-ovom bolešću i ulcerativnim kolitisom. Pomoću semikvantitativnog RT-PCR protokola, nađeno je da su IL-18BP mRNA transkripti povećani u mukoznim biopsijama bolesnika s Crohnovom bolešću u odnosu na one s ulcerativnim kolitisom i neupalne kontrolne bolesnike. Imunohistokemijska analiza mukoznih biopsija lokalizirala je IL-18BP protein unutar endotelnih stanica te u makrofagima koji infiltriraju mukuza tijekom Crohn-ove bolesti. Ekspresija IL-18BP pomoću endotelnih stanica i aktiviranih makrofaga potvrđena je u primarnim humanim

umbilikalnim žilnim endotelnim stanicama (HUVEC) i u THP1 monocitnoj staničnoj liniji, stimuliranoj *in vitro*. Nakon stimuliranja, ove stanice izlučile su bioaktivni IL-18BP.

Primjer 12: Tretiranje s IL-18 inhibitorima poboljšava eksperimentalni kolitis

Materijal i metode

Miševi i izazivanje kolitisa

The Animal Studies Ethics Committee u University of Amsterdam, The Netherlands, odobrio je sve eksperimente. BALB/c miševi dobiveni su iz Harlan Sprague Dawley Inc (Horst, the Netherlands). Miševi su udomljeni u standardnim uvjetima, te im je davana voda za piće i hrana (AM-II 10mm, Hope Farms, Woerden, The Netherlands).

Eksperimenti su provedeni s 8 i 10 tjedana starim ženjkama BALB/c miševa. Kolitis je izazvan s rektalnom primjenom dvije doze (odvojeno intervalom od 7 dana) po 2 mg 2,4,6-trinitrobenzen sulfonske kiseline (TNBS) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) u 40% etanolu (Merck, Darmstadt, Germany), pomoću vinilnog katetera koji je postavljen 3 centimetra od anusa (10 miševa u skupini). Tijekom ukapavanja, miševi su anestetizirani pomoću izoflurana (1-klor-2,2,2,-trifluoretil-izofluran-difluormetil-eter, Abbott Laboratories Ltd., Queenborough, Kent, UK), te su nakon ukapavanja držani uspravno 60 sekundi. Kontrolni miševi su podvrgnuti identičnom postupku, ali im je ukapana fiziološka otopina. Svi su miševi žrtvovani 9 dana nakon prve TNBS primjene (tj. 48 sati nakon drugog TNBS podražaja).

Miševi su tretirani s humanim IL-18BP u 500 µl 0,9% otopine soli intra-peritonealno.

hIL-18BP je 6 puta histidin obilježen humani rekombinantni protein koji nastaje u CHO ekspresijskom sustavu. hIL-18BP je biološki aktivan jer inhibira nastajanje IFN γ u KG-1 staničnoj liniji te smanjuje nastajanje IFN γ u stanicama mišje slezene (Kim et al, 2000).

Procjena upale

Dnevno je zabilježena tjelesna težina. Uzeti su slezena, kaudalni limfni čvor i koloni nakon žrtvovanja. Koloni su uklonjeni incizijom srednjom linijom te su uzdužno otvoreni. Nakon uklanjanja materijala fecesa, zabilježena je mokra težina distalnih 6 cm i korištena je kao indeks debljine stijenke crijeva koji ovisi o bolesti. Nakon toga, koloni su uzdužno podijeljeni u dva dijela, a jedna od njih je korišten za histološku procjenu.

Histološka analiza

Uzdužno podijeljeni koloni su smotani, učvršćeni u 4% formalinu i stavljeni u parafin za rutinsku histologiju. Dva istraživača koja su bila slijepa za alociranje tretmana miševa zabilježila su sljedeće parametre: 1) postotak uključene površine, 2) hiperplazija folikularnih agregata, 3) edem, 4) erozija/ulceracija, 5) gubitak žlijezde, te 6) infiltriranje mono- i polimorfonuklearnih stanica. Postotak uključene površine i gubitak žlijezde ocijenjen je skalom koaj je u rasponu od 0 do 4, na sljedeći način: 0, normalno; 1, manje od 10%; 2, 10%; 3, 10 do 50%; 4, više od 50%. Erozijske su definirane kao 0 ako je netaknuti epitel, 1 za uključivanje lamina propria, 2 ulceracija obuhvaća submukozu, te 3 kada ulceracija prolazi kroz stijenku. Uznapredovalost ostalih parametara je ocijenjen na skali od 0 do 3 na sljedeći način: 0, nema; 1, slabo; 2, umjereno; 3, jako. Ova skala ima raspon od 0 do najviše 26 točaka.

Homogenizacija kolona

Uzet je kolon i homogeniziran je s homogenizatorom tkiva u 9 volumena Greenburger lizatnog pufera (300 mM NaCl, 15 mM Tris, 2 mM MgCl₂, 2mM Triton (X-100), Pepstatin A, Leupeptin, Aprotinine (sve 20 ng/ml), pH 7,4) . Tkivo je lizirano 30 minuta na ledu nakon čega je dva puta centrifugirano (10 min, 14 000 g). Homogenizati su do upotrebe pohranjeni na -20°C.

Stanična kultura i EUSA za citokine

Za priređivanje suspenzije stanica slezene i kaudalnog limfnog čvora, korišteno je filtersko stanično cjedilo (Becton/Dickinson Labware, New Jersey, USA). Stanice su suspendirane u RPMI 1640 mediju (BioWhittaker -Boehringer, Verviers, Belgium) koji sadrži 10% PCS i ciproksin (10 µg/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Stanice slezene su centrifugirane sa sterilnim Ficoll-om (Pharmacia, Uppsala, Sweden), mononuklearne stanice su prenesene u RPMI i izbjorane su stanične suspenzije. Ukupan broj od 1×10^5 stanica po mišu je inkubiran u 200 µl RPMI (BioWhittaker Europe, A Cambrex Company, Verviers, Belgium) koji sadrži antibiotike i 10% fetalnog seruma u triplikatnim jažicama. Stanice su stimulirane s prethodnim prevlačenjem s anti-CD3 antitijelom (1:30 koncentracija; 145.2C11 klon) i topljivim anti-CD28 antitijelom (1:1000 koncentracija; Phamningen). Supernatanti su uklonjeni nakon 48 sati i IFN- γ (Pharmingen) i TNF- α (R&D systems, Abingdon, United Kingdom) koncentracije su izmjerene ELISA analizom.

Protočna citometrija

Izdvojene stanice slezene su isprane s Facs puferom (PBS koji sadrži 0,5% BSA, 0,3 mmol/L EDTA i 0,01% natrijeva azida) i držane na ledu tijekom ostatka postupka. 2×10^5 stanica po jažici (96 jažica na mikroploči, Greiner B.V. labor
 5 technik, Alphen aan de Rijn, The Netherlands) inkubirane su sa sljedećim antitijelima: (mAbs): Cy-chrome-conjugated rat anti-mouse CD4 (clone RM4-5), Fite-conjugated rat anti-mouse CD69 and Fite-conjugated rat anti-mouse CD25 (Pharmingen, San Diego, CA). Limfociti su ispitani prednjim i bočnim raspršenjem pomoću FACScan protočnim citometrom u sprezi s Facscan softverom (Becton Dickinson, Mountain View, USA) te je izbrojano 5000 leukocita. Rezultati su izraženi kao postotak stanica koje su bile pozitivne za korištene mAbs.

Statistička analiza

Vrijednosti su dane kao prosjek i SEM po tretiranoj skupini. Razlike između skupina analizirane su korištenjem neparametrijskog Mann-Whitney U-testa. Promjene težine s vremenom analizirane su one-way analizom varijance. $P < 0,05$ je smatran kao značajan. Za sve analize korišten je SPSS statistički softver (SPSS Inc., Chicago, USA).

*Rezultati**IL-18BP zaštita od gubitka težine u mišjem modelu kolitisa*

Da se ispita uloga IL-18 u eksperimentalnom kolitisu te konkretno zaštitni učinak IL-18 vezujućeg proteina (IL-18BP), TNBS kolitis izazvan je u BALB/c miševa. Ovaj model sastoji se od lokalnog izlaganja tri-nitrobenzen sulfonskoj
 20 kiselini (TNBS) u 40% etanolu. On izaziva odgođeni tip reakcije hiperosjetljivosti prema hapten (trinitrofenil) modificiranom antigenu, te je odgovor Th1-tip s pojačanom pro-upalnom citokinskom proizvodnjom.

Miševi su tretirani s humanim IL-18BP ili kontrolom intraperitonealno (i.p.) na dnevnoj osnovi.

25 Dnevna intraperitonealna doza koja je bila u rasponu od 12,5 μ g do 50 μ g hIL-18BP nije utjecala na uznapredovalost bolesti (podaci nisu prikazani). Međutim, korištenje dnevne doze od 200 μ g hIL-18BP koja je primijenjena intraperitonealno bilo je učinkovito u smanjenju tjelesne težine u svezi sa izazivanjem bolesti.

Kao što se očekivalo, intrarektalno ukapavanje TNBS rezultirala je proljevom i povraćanjem. Kao što je prikazano na sl.
 30 16, životinje u obje tretirane skupine izgubile su 15% osobne osnovne težine na treći dan. Međutim, za razliku od kontrolnih miševa, počevši od 4. dana nakon ukapavanja TNBS, životinje koje su bile tretirane s hIL-18BP brzo su se oporavile od početnog gubitka težine, te se vratile na svoju osnovnu težinu 8. dana. U kontrolnih miševa, druga primjena TNBS na dan 8 rezultirala je značajnim gubitkom težine, što je ustvari spriječeno primjenom hIL-18BP. Primjena hIL-18BP u miševa kojih u tretirani fiziološkom otopinom nije imala učinka (podaci nisu prikazani). Dakle, primjena hIL-18BP značajno smanjuje gubitak težine koji je povezan s TNBS-izazvanim kolitisom ($p < 0,05$).
 35

Učinak na parametre upale

Desetog dana su miševi žrtvovani i određena je težina posljednjih 6 cm kolona (slika 17A). U TNBS kolitisu težina kolona se povećala u usporedbi s miševima koji su tretirani fiziološkom otopinom. Ovo povećanje težine je značajno
 40 manje u hIL-18BP-tretiranih miševa ($181,6 \text{ mg} \pm 11,4$ u odnosu prema $268 \text{ mg} \pm 27,3$ za miševe koji su tretirani fiziološkom otopinom ($p < 0,05$)). Prethodno je izvješćeno da je TNBS kolitis povezan s povećanom migracijom stanica u kaudalne limfne čvorove (Camoglio et al, 2000). IL-18BP tretman smanjio je broj stanica koje su zauzele kaudalni limfni čvor u odnosu na broj stanica u kaudalnom limfnom čvoru TNBS miševa koji su tretirani s fiziološkom otopinom (slika 17B).

45 Promjena u CD69 ekspresiji, koji je rani T limfocitni aktivacijski marker, određena je pomoću Facscan analita (slika 17C). Postotak CD4* stanica slezene koje vrše ekspresiju CD69 bio je 11,4% u TNBS-tretiranih miševa, ali u TNBS miševa koji su tretirani s hIL-18BP postotak CD4VCD69* bio je 7,3% ($P < 0,05$).

Proizvodnja citokina slezene, stanica kaudalnog limfnog čvora i homogenata kolona

50 Da se istraži djelovanje hIL-18BP na sposobnost T-limfocita da proizvedu pro-upalnu citokinsku sintezu nakon aktiviranja T-staničnog receptora, stanice su izolirane iz kaudalnog limfnog čvora i slezene i stimulirane tijekom 48 sati s anti CD3/CD28 antitijelima. U supernatantima izmjerena je proizvodnja IFN γ i TNF α (slika 18). Nije uočena značajna razlika između proizvodnje citokina hIL-18BP miševa i kontrolno tretiranih miševa. Dakle, neutraliziranje IL-18 pomoću hIL-18BP nije uzrokovalo opće smanjenje sposobnosti T-limfocita da odgovore na aktiviranje T-staničnih receptora.
 55

Homogenati kolona su analizirani na njihovu razinu citokina, tako da je mjerena lokalna proizvodnja citokina (slika 19). Nije nađena razlika IFN γ razina u homogenatima kolona TNBS miševa i TNBS miševa koji su tretirani s hIL-18BP ($134 \text{ pg/ml} \pm 7,8$, odnosno $139 \text{ pg/ml} \pm 23$). Međutim, razine TNF α su značajno smanjene u homogenatima kolona miševa
 60 tretiranih s hIL-18BP od $110 \text{ pg/ml} \pm 3$ u TNBS miševa prema $59 \text{ pg/ml} \pm 27$ u hIL-18BP tretiranih TNBS miševa.

Histološki nalazi

Da se ispita hIL-18BP-posredovano smanjenje upalnih parametara koji također djeluju na histološki indeks, načinjena je histopatološka analiza na parafinskim prerezima. Ukupni upalni indeks na histologiju se značajno smanjio u miševa tretiranih s hIL-18BP u odnosu na kontrolnu skupinu miševa ($15,9 \pm 1,1$ u netretiranih miševa prema $9,8 \pm 1,3$ u NL-18BP tretiranih miševa) (nije prikazano), uglavnom kao rezultat smanjenja broja leukocita koji su infiltrirali mukozu ($p < 0,05$). Značajan nalaz je bio potpuna odsutnost mukoznih ulceracija u miševa tretiranih s IL-18BP ($p < 0,05$). Nalazi su sažeto prikazani u tablici 2, niže. Potpuna prevencija ulceracija u miševa tretiranih s IL-18BP je osobito značajna..

Tablica 2 : Različiti parametri jezgre kolitisa TNBS miševa koji su tretirani s otopinom soli ili s rhIL-18BPa.

	TNBS miševi (kontrola)	TNBS miševi tretirani s hIL-18BP
% uključene površine	$3,4 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,5$
Folikulni agregati	$2,0 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,4$
Edem	$2,1 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,3$
Fibroza	$0,85 \pm 0,26$	$0,50 \pm 0,2$
Ulceracije	$2,0 \pm 0,3$	$0,0 \pm 0,0^*$
Gubitak žlijezde	$1,7 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,3$
Polimorfne jezgre stanica	$2,6 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,2^*$
Mono jezgre stanica	$1,1 \pm 0,1$	$0,33 \pm 0,21^*$

Podaci su predstavljani kao prosjek $\pm$ SEM na skali 0-4, * predstavlja značajnu razliku.

Zaštita anti-mIL-18 poliklonskih antitijela od bolesti u mišjem modelu kolitisa koji je izazvan sa natrijevim dekstran sulfatom

U ovom modelu, natrijev dekstran sulfat (DSS), id je dan u vodi za piće polazeći od dana 0 sve do žrtvovanja životinja. Anti-IL-18BP poliklonska antitijela primijenjena su na dan 0, 4 i 8, i.p. Doze su bile 200 i 400 μ l seruma kunića. Najveća doza (400 μ l) dala je značajno smanjenje gubitka težine, kliničkog indeksa, rektalnog krvarenja i skraćivanja kolona (nije prikazano). Tretiranje kunića s anti-IL-18 pokazalo je kašnjenje početka bolesti i spriječilo je progresiju (nije prikazano).

Sažetak

Gore navedeni primjer 12 pokazuje da neutraliziranje IL-18 primjenom bilo hIL-18BP ili poliklonskog seruma za IL-18 značajno smanjuje uznapredovalost eksperimentalno izazvanog kolitisa u miševa.

Miševi koji su tretirani s hIL-18BP intra-peritonealno brzo su se oporavili od početnog gubitka tjelesne težine, u usporedbi s kontrolno tretiranim miševima. Ostali parametri upale kolona koji su mjereni težinom kolona i influkksom stanica u kaudalni limfni čvor smanjeni su u hIL-18BP tretiranih miševa. Histopatologija tretiranih miševa karakterizirana je smanjenjem uznapredovalošću propadanja tkiva (ulceracije) te je količina infiltrirajućih stanica značajno smanjena. Djelovanje ML-18BP je također sistemsko, što se pokazalo sa smanjenom ekspresijom CD69 pomoću stanica slezene.

Lokalna proizvodnja $TNF\alpha$, mjerena u homogenatima kolona, značajno je smanjena u TNBS miševa koji su tretirani s ML-18BP. To ukazuje da $TNF\alpha$ ima značajnu ulogu u napredovanju bolesti. Razine $IFN\gamma$ usporedive su između TNBS miševa i TNBS miševa tretiranih s hIL-18BP, što se može objasniti redundancijom $IFN\gamma$ -inducirajućih stimulatora.

Kao zaključak, gore prikazani podaci pokazuju povoljan učinak inhibitora IL-18 u tretiranju upalnih trbušnih bolesti.

Reference

1. Afford, S.C., et al, Distinct patterns of chemokine expression are associated with leukocyte recruitment in alcoholic hepatitis and alcoholic cirrhosis. JPathol, 1998. 186(1): p. 82-9.
2. Anderson, D.M., et al, A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature, 1997. 390(6656): p. 175-179.
3. Baroni, G.S., et al, Hepatic stellate cell activation and liver fibrosis are associated with necroinflammatory injury and Th1-like response in chronic hepatitis C. Liver, 1999. 19(3): p. 212-9.
4. Bird, G.L., et al., Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. Ann Intern Med, 1990. 112(12): p. 917-20.
5. Boilon, D. P., et al. (1980) J. Clin. Hematol. Oncol. 10:39-48.
6. Botstein, D., et al. (1982) Miami Wint. Symp. 19:265-274.

7. Broach, J. Ft, in *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 445-470(1981).
8. Broach, J.R., (1982) *Cell* 28:203-204.
9. Bym R. A. et al., 1990, *Nature (London)* 344:667-670.
- 5 10. Camoglio L, te Velde AA, de Boer A, ten Kate FJ, Kopf M, van Deventer SJ. Hapten-induced colitis associated with maintained Th1 and inflammatory responses in IFN-gamma receptor-deficient mice. *Eur J Immunol* 2000;30:1486-95.
11. Car, B. D., V. M. Eng, B. Schnyder, L. Ozmen, S. Huang, P. Gallay, D. Heumann, M. Aguet, and B. Ryffel. 1994. Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. *J. Exp. Med.* 179:1437-44 issn: 0022-1007.
12. Chater, K. F. et al., in "Sixth International Symposium on Actinocyetales Biology", Akademiai Kiado, Budapest,
- 10 Hungary (1986), pp. 45-54).
13. Conti, B., J. W. Jahng, C. Tinti, J. H. Son, and T. H. Joh. 1997. Induction of interferon-gamma inducing factor in the adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* 272:2035-2037.
14. Dao, T., K. Ohashi, T. Kayano, M. Kurimoto, and H. Okamura. 1996. Interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells. *Cell-Immunol.* 173:230-5 issn: 0008-8749.
- 15 15. Dayer, J-M (1999). *J. Clin. Inv.* 104, 1337-1339.
16. Desreumaux P, Brandt E, Gambiez L, Emilie D, Geboes K, Klein O, Ectors N, Cortot A, Capron M, Colombel JF. Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997;113:118-126.
17. DiDonato, J A, Hayakawa, M, Rothwarf, D M, Zandi, E and Karin, M. (1997), *Nature* 388, 16514-16517.
- 20 18. Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bi, H., and Woody, J.N., 1994, *Lancet* 344,1125-1127.
19. Engelmann, H., D. Aderka, M. Rubinstein, D. Rotman, and D. Wallach. 1989. A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. *J. Biol. Chem.* 264:11974-11980.
- 25 20. Engelmann, H., D. Novick, and D. Wallach. 1990. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. *J. Biol. Chem.* 265:1531-1536.
21. Fantuzzi, G., et al., IL-18 regulation of IFN-g production and cell proliferation as revealed in interleukin-1b converting enzyme-deficient mice. *Blood*, 1998. 91: p. 2118-2125.
- 30 22. Fbre, G., et al., Liver tissue expression of CD80 and CD95 antigens in chronic hepatitis C: relationship with biological and histological disease activities. *Microbios*, 1999. 97(386): p. 29-38
23. Galle, P.R., et al., Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med*, 1995.182(5): p. 1223-30.
24. Grade, A J, Forsey, R J, Chan, W L, Gilmour, A, Leung, B P, Greer, A R, Kennedy, K, Carter, R, Wei, X-Q, Xu, D., Field, M, Foulis, A, Liew, F Y, and McInnes, I B.(1999). *J. Clin. Inv.* 104: 1393-1401
- 35 25. Grantham (1974), *Science*, 185. 862-864.
26. Grove, J., et al., Association of a tumor necrosis factor promoter polymorphism with susceptibility to alcoholic steatohepatitis [see comments]. *Hepatology*, 1997. 26(1): p. 143-6.
27. Gryczan, T., "The Molecular Biology of the Bacilli", Academic Press, NY (1982), pp. 307-329).
- 40 28. Gutkind, J.S., et al., A novel c-fgexon utilized in Epstein-Barr virus-infected B lymphocytes but not in normal monocytes. *Mol. Cell. Biol.*, 1991. 11: p. 1500-1507.
29. Harada, K., et al., In situ nucleic acid hybridization of cytokines in primary biliary cirrhosis: predominance of the Th1 subset. *Hepatology*, 1997. 25(4): p. 791-6.
30. Heremans, H., J. Van Damme, C. Dillen, R. Dijkmans, and A. Billiau. 1990. Interferon gamma, a mediator of lethal lipopolysaccharide-induced Shwartzman-like shock reactions in mice. *J. Exp. Med.* 171:1853-69 issn: 0022-1007.
- 45 31. Hill, D.B., et al., Increased plasma interleukin-6 concentrations in alcoholic hepatitis. *J Lab Clin Med*, 1992. 119(5): p. 547-52.
32. Hill, D.B., LS. Marsano, and C.J. McClain, Increased plasma interleukin-8 concentrations in alcoholic hepatitis. *Hepatology*, 1993.18: p. 576-580.
- 50 33. Hiramatsu, N., et al., Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 1994. 19(6): p. 1354-9.
34. Huang, Y.S., et al., Serum levels of interleukin-8 in alcoholic liver disease: relationship with disease stage, biochemical parameters and survival. *J Hepatol*, 1996. 24(4): p. 377-84.
35. Iio, S., et al., Serum levels of soluble Fas antigen in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol*, 1998. 29(4): p. 517-23.
- 55 36. Izaki, K. (1978) *Jpn. J. Bacteriol.* 33:729-742).
37. John, J. F., et al. (1986) *Rev. Infect. Dis.* 8:693-704).
38. Kahiawamura, S., Okamura, H. (1998), *Nippon. Rinsho.* 56, pp. 1798-tS06.
39. Kendall, K. J. et al. (1987) *J. Bacteriol.* 169:4177-4183).
40. Kirn SH, Eisenstein M, Reznikov L, Fantuzzi G, Novick D, Rubinstein M, Dinarello CA. Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1190-1195.

41. Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scaillon B, Moore MA, Vilcek J, Daddona P, et al. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol* 1993 Nov 30;16:1443-53
42. Kohno, K., J. Kataoka, T. Ohtsuki, Y. Suemoto, I. Okamoto, M. Usui, M. Ikeda, and M. Kurimoto. 1997. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J. Immunol.* 158:1541-1550.
43. Lee, M., et al., Expression of Th1 and Th2 type cytokines responding to HBsAg and HBxAg in chronic hepatitis B patients. *J Korean Med Sci*, 1999. 14(2): p. 175-81.
44. Lukkari, T.A., et al., Short-term ethanol exposure increases the expression of Kupffer cell CD14 receptor and lipopolysaccharide binding protein in rat liver. *Alcohol Alcohol*, 1999. 34(3): p. 311-9.
45. Luo, K.X., et al., In situ investigation of Fas/FasL expression in chronic hepatitis B infection and related liver diseases. *J Viral Hepat*, 1997.4(5): p. 303-7.
46. Maliszewski, C. R., T. A. Sato, T. Vanden Bos, S. Waugh, S. K. Dower, J. Slack, M. P. Beckmann, and K. H. Grabstein. 1990. Cytokine receptors and B cell functions. I. Recombinant soluble receptors specifically inhibit IL-1- and IL-4-induced B cell activities in vitro. *J. Immunol.* 144:3028-3033.
47. Maniatis, T., in "Cell Biology: A Comprehensive Treatise, Vol. 3: Gene Expression", Academic Press, NY, pp. 563-608 (1980).
48. Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
49. Martinez, F., et al., Ethanol and cytokine secretion. *Alcohol*, 1992. 9(6): p. 455-8.
50. McClain, C.J., et al., Tumor necrosis factor and alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*, 1998. 22(5 Suppl): p. 248S-252S.
51. McClain, C.J. and D.A. Cohen, Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatology*, 1989. 9(3): p. 349-51.
52. Micallef, M. J., T. Ohtsuki, K. Kohno, F. Tanabe, S. Ushio, M. Namba, T. Tanimoto, K. Torigoe, M. Fujii, M. Ikeda, S. Fukuda, and M. Kurimoto. 1996. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur-J-Immunol* 26:1647-51 issn: 0014-2980.
53. Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector *Nucleic Acid Res.* 18:5322-5328.
54. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, Luzzza F, Fusco A, Pallone F. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* 1999;163:143-147.
55. Muhl H, Kampfer H, Bosmann M, Frank S, Radeke H, Pfeilschifter J. Interferon-gamma mediates gene expression of IL-18 binding protein in nonleukocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:960-963.
56. Nakamura, K., H. Okamura, M. Wada, K. Nagata, and T. Tamura. 1989. Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infect-Immun* 57:590-5 issn: 0019-9567.
57. Nanji, A.A., et al., Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology*, 1999. 30(4): p. 934-43.
58. Nishimura, T. and A. Ohta, A critical role for antigen-specific Th1 cells in acute liver injury in mice. *J. Immunol*, 1999.162: p. 6503-6509.
59. Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein. 1994. The Human Interferon alpha/beta Receptor - Characterization and Molecular Cloning. *Cell* 77:391-400.
60. Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein. 1992. Soluble Interferon-alpha Receptor Molecules Are Present in Body Fluids. *FEBS Lett* 314:445-448.
61. Novick, D., H. Engelmann, D. Wallach, and M. Rubinstein. 1989. Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J. Exp. Med.* 170:1409-1414.
62. Novick, D, Kim, S-H, Fantuzzi, G, Reznikov, L, Dinarello, C, and Rubinstein, M (1999). *Immunity* 10, 127-136.
63. Ohlinger, W., et al., Immunohistochemical detection of tumor necrosis factor-alpha, other cytokines and adhesion molecules in human livers with alcoholic hepatitis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1993. 423(3): p. 169-76.
64. Okamura, H., H. Tsutsui, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, K. Hattori, K. Akita, M. Namba, F. Tanabe, K. Konishi, S. Fukuda, and M. Kurimoto. 1995. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378:88-91.
65. Okamoto, T., et al., Induction of Fas ligand and Fas antigen mRNA expressions in interferon-gamma transgenic mouse liver. *Jpn J Pharmacol*, 1998. 78(2): p. 233-5.
66. Okazaki, M., et al., Hepatic Fas antigen expression before and after interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci*, 1996. 41(12): p. 2453-8.
67. Okamoto, T., K. Yamamura, and O. Hino, The mouse interferon-gamma transgene chronic hepatitis model (Review). *Int J Mol Med*, 1999. 3(5): p. 517-20.
68. Olee T, Hashimoto S, Quach J, Lotz M. (1999). *J Immunol* 162:2 1096-100
69. Pamet, P, Garka, K E, Bonnert, T P, Dower, S K, and Sims, J E. (1996), *J. Biol. Chem.* 271,3967-3970.
70. Plater-Zyberk C, Bonnefoy JY. Marked amelioration of established collagen-induced arthritis by treatment with antibodies to CD23 in vivo. *Nat Med* 1995;1:781-785.

71. Pizarro TT, Michie MB, Bentz M, Woratanadham J, Smith MF, Jr., Foley E, Moskaluk CA, Bickston SJ, Cominelli F. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 1999; 162:6829-6835.
72. Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Baumann R, Poindron P, Duclos B. Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Clin Immunol* 1996; 16:144-150.
73. Rothe, K, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, and H. Kolb. 1997. Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, (GIF, which is located near Idd2. *J-Clin-Inves.t* 99:469-74 issn: 0021-9738.
74. Saha N, Moldovan F, Tardif G, Pelletier JP, Cloutier JM, Martel-Pelletier J.(1999). *Arthritis Rheum* 42:8 1577-87.
75. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and M. T., *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. ed. 1989, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
76. Simonet, W.S., et al., Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997. 89(2): p. 309-319.
77. Sheron, N., et al., Elevated plasma interleukin-6 and increased severity and mortality in alcoholic hepatitis. *Clin Exp Immunol*, 1991. 84(3): p. 449-53.
78. Sompayrac, L.H. and K.L. Danna, Efficient infection of monkey cells with DMA of simian virus 40. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 1981. 78: p. 7575-7578.
79. Sparks, C.A., et al., Assignment of the nuclear mitotic apparatus protein NuMA gene to human chromosome 11q13. *Genomics*, 1993. 17: p. 222-224.
80. Su, G.L., et al., CD14 and lipopolysaccharide binding protein expression in a rat model of alcoholic liver disease. *Am J Pathol*, 1998. 152(3): p. 841-9.
81. Taieb, J., et al., Raised plasma soluble Fas and Fas-ligand in alcoholic liver disease [letter]. *Lancet*, 1998. 351(9120): p. 1930-1.
82. Triantaphyllopoulos, K A, Williams, R, Taylor, H, and Chernakovsky, Y (1999). *Arthritis and Rheumatism* 42, 90-99.
83. Tsutsui, H., K. Nakanishi, K. Matsui, K. Higashino, H. Okamura, Y. Miyazawa, and K. Kaneda. 1996. IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J. Immunol.* 157:3967-73 issn: 0022-1767.
84. Tsuij, H., Mukaida, N., Harada A., Kaneko, S., Matsushita, E., Nakanuma, Y., Tsutsui, H., Okamura, H., Nakanishi, K., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Kobayashi, K., and Matsushima, K.(1999), *J. Immunol.* 162, pp. 1049-1055.
85. Tucci, A., James, H., Chicheportiche, R., Bonnefoy, J.Y., Dayer, J.M., and Zubler, R.H., 1992, *J.Immunol.* 148,2778-2784.
86. Ushio, S., M. Namba, T. Okura, K. Hattori, Y. Nukada, K. Akita, F. Tanabe, K. Konishi, M. Micallef, M. Fujii, K. Torigoe, T. Tanimoto, S. Fukuda, M. Ikeda, H. Okamura, and M. Kurimoto. 1996. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J. Immunol.* 156:4274-4279.
87. Williams RO, Mason LJ, Feldmann M, Maini RN. Synergy between anti-CD4 and anti-tumor necrosis factor in the amelioration of established collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Mar 29 91:7 2762-6.
88. Yasuda, H., et al., Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*, 1998.139: p. 1329-1337.
89. Yoshimoto T, Takeda, K, Tanaka, T, Ohkusu, K, Kashiwamura, S, Okamura, H, Akira, S and Nakanishi, K (1998), *J. Immunol.* 161, 3400-3407.

PATENTNI ZAHTEJEVI

1. Uporaba IL-18 inhibitora u proizvodnji medikamenta, **naznačena time** što se medikament primjenjuje za tretiranje i/ili prevenciju oštećenja jetre.
2. Uporaba prema zahtjevu 1, **naznačena time** što je oštećenje jetre akutno.
3. Uporaba prema zahtjevu 1, **naznačena time** što je oštećenje jetre kronično.
4. Uporaba prema bilo kojem zahtjevu 1 to 3, **naznačena time** što je oštećenje jetre alkoholni hepatitis, virusni hepatitis, imuni hepatitis, fulminantni hepatitis, ciroza jetre i primarna bilijarna ciroza.
5. Uporaba prema zahtjevu 4, **naznačena time** što je oštećenje jetre fulminantni hepatitis.
6. Uporaba inhibitora IL-18 u proizvodnji medikamenta, **naznačena time** što se odnosi na tretiranje i/ili prevenciju artritisa.
7. Uporaba prema zahtjevu 6, **naznačena time** što je artritis – upalni artritis.
8. Uporaba prema zahtjevu 7, **naznačena time** što je upalni artritis – reumatoidni artritis.
9. Uporaba IL-18 u proizvodnji medikamenta, **naznačena time** što je namijenjen za tretiranje i/ili prevenciju oštećenja hrskavice.
10. Uporaba IL-18 inhibitora u proizvodnji medikamenta, **naznačena time** što je namijenjen za tretiranje i/ili prevenciju upalne trbušne bolesti.

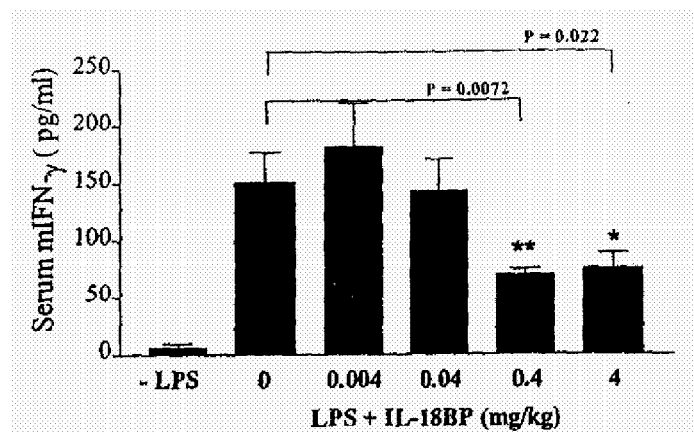
11. Uporaba prema zahtjevu 10, **naznačena time** što je upalna trbušna bolest – Crohn-ova bolest.
12. Uporaba prema zahtjevu 10, **naznačena time** što je upalna trbušna bolest - ulcerativni kolitis.
13. Uporaba prema bilo kojem zahtjevu 1 do 12, **naznačena time** što je inhibitor IL-18 odabran iz skupa kojega sačinjavaju caspase-1 (ICE) inhibitori, antitijela za IL-18, antitijela za bilo koju od IL-18 receptorskih podjedinica, inhibitori IL-18 signalizirajućeg puta, antagonisti IL-18 koji kompetiraju s IL-18 i blok IL-18 receptorom, te IL-18 vezujući proteini, izoforme, muteini, sjedinjeni proteini, funkcionalni derivati, aktivne frakcije ili njegovi cirkulatorno permutirani derivati koji imaju praktički dientičnu aktivnost kao IL-18 vezujući protein.
14. Uporaba prema zahtjevu 13, **naznačena time** što je IL-18 - IL-18 antitijelo.
15. Uporaba prema zahtjevu 14, **naznačena time** što je IL-18 antitijelo - humanizirano IL-18 antitijelo.
16. Uporaba prema zahtjevu 15, **naznačena time** što je IL-18 antitijelo - humano IL-18 antitijelo.
17. Uporaba prema zahtjevu 13, **naznačena time** što je inhibitor IL-18 jedan IL-18 vezujući protein, ili izoforma, mutein, sjedinjeni protein, funkcionalni derivat, aktivna frakcija ili njegov cirkularno permutirani derivat.
18. Uporaba prema zahtjevu 17, **naznačena time** što je IL-18 vezujući protein PEGiliran.
19. Uporaba prema zahtjevu 17, **naznačena time** što je inhibitor IL-18 sjedinjeni protein koji sadrži sve ili dio IL-18 vezujućih proteina koji su sjedinjeni sa svim ili dijelom imunoglobulina, pri čemu se sjedinjeni protein veže za IL-18.
20. Uporaba prema zahtjevu 19, **naznačena time** što sjedinjeni protein obuhvaća cijelo područje ili samo dio konstantnog područja imunoglobulina.
21. Uporaba prema zahtjevu 20, **naznačena time** što je imunoglobulin IgG1 ili IgG2 izotipa.
22. Uporaba prema bilo kojem prethodnom zahtjevu, **naznačena time** što medikament također sadrži interferon.
23. Uporaba prema zahtjevu 22, **naznačena time** što je interferon - interferon- β .
24. Uporaba prema zahtjevu 22 ili 23, **naznačena time** što se inhibitor IL-18 koristi istovremeno, sekvencijalno ili odvojeno s interferonom.
25. Uporaba prema bilo kojem prethodnom zahtjevu, **naznačena time** što medikament također sadrži antagonist faktora tumorske nekroze, (TNF) antagonist.
26. Uporaba prema zahtjevu 25, **naznačena time** što je TNF antagonist - TBPI i/ili TBPII.
27. Uporaba prema zahtjevu 25 ili 26, **naznačena time** što se inhibitor IL-18 i/ili interferon koriste istovremeno, sekvencijalno ili odvojeno s TNF antagonistom.
28. Uporaba prema bilo kojem prethodnom zahtjevu, **naznačena time** što medikament dodatno sadrži COX-inhibitor.
29. Uporaba prema zahtjevu 28, **naznačena time** što je COX-inhibitor - COX-2 inhibitor.
30. Uporaba prema bilo kojem prethodnom zahtjevu, **naznačena time** što se inhibitor IL-18 koristi u količini oko 0,0001 do 10 mg/kg tjelesne težine, ili oko 0,01 do 5 mg/kg tjelesne težine ili oko 0,1 do 3 mg/kg tjelesne težine ili oko 1 do 2 mg/kg tjelesne težine.
31. Uporaba prema bilo kojem prethodnom zahtjevu, **naznačena time** što se IL-18 koristi u količini oko 0,1 do 1000 μ g/kg tjelesne težine ili 1 do 100 μ g/kg tjelesne težine ili oko 10 do 50 ng/kg tjelesne težine.
32. Uporaba prema bilo kojem prethodnom zahtjevu, **naznačena time** što se IL-18 inhibitor primjenjuje supkutano.
33. Uporaba prema bilo kojem prethodnom zahtjevu, **naznačena time** što se IL-18 inhibitor primjenjuje intramuskularno.
34. Uporaba prema bilo kojem prethodnom zahtjevu, **naznačena time** što se IL-18 inhibitor primjenjuje dnevno.
35. Uporaba prema bilo kojem prethodnom zahtjevu, **naznačena time** što se IL-18 inhibitor primjenjuje svaki drugi dan.
36. Uporaba ekspresijskog vektora koji sadrži kodirajuću sekvenciju inhibitora IL-18, **naznačena time** što se rabi u proizvodnji medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju oštećenja jetre.
37. Uporaba ekspresijskog vektora koji sadrži kodirajuću sekvenciju inhibitora IL-18, **naznačena time** što se rabi u proizvodnji medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju artritisa.
38. Uporaba ekspresijskog vektora koji sadrži kodirajuću sekvenciju inhibitora IL-18, **naznačena time** što se rabi u proizvodnji medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju upalne trbušne bolesti.
39. Uporaba prema bilo kojem zahtjevu 36 do 38, **naznačena time** što se odnosi na gensku terapiju.
40. Uporaba vektora za izazivanje i/ili pojačavanje endogene proizvodnje inhibitora IL-18 u stanici, **naznačena time** što se odnosi na proizvodnju medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju oštećenja jetre.
41. Uporaba vektora za izazivanje i/ili pojačavanje endogene proizvodnje inhibitora IL-18 u stanici, **naznačena time** što se odnosi na proizvodnju medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju artritisa.
42. Uporaba vektora za izazivanje i/ili pojačavanje endogene proizvodnje inhibitora IL-18 u stanici, **naznačena time** što se odnosi na proizvodnju medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju upalne trbušne bolesti.
43. Uporaba stanica koje su genetski modificirane, **naznačena time** što se proizvodi inhibitor IL-18 u proizvodnji medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju oštećenja jetre.
44. Uporaba stanica koje su genetski modificirane, **naznačena time** što se proizvodi inhibitor IL-18 u proizvodnji medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju artritisa.
45. Uporaba stanica koje su genetski modificirane, **naznačena time** što se proizvodi inhibitor IL-18 u proizvodnji medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju upalne trbušne bolesti.
46. Farmaceutska smjesa, **naznačena time** što sadrži terapijski učinkovitu količinu inhibitora IL-18 i terapijski učinkovitu količinu interferona.

47. Farmaceutska smjesa, **naznačena time** što sadrži terapijski učinkovitu količinu inhibitora IL-18 i terapijski učinkovitu količinu TNF antagonista.
48. Farmaceutska smjesa, **naznačena time** što sadrži terapijski učinkovitu količinu inhibitora IL-18 i terapijski učinkovitu količinu COX-2 inhibitora.
- 5 49. Farmaceutska smjesa, **naznačena time** što sadrži terapijski učinkovitu količinu IL-18 inhibitora u kombinaciji s terapijski učinkovitom količinom nekog ili svih interferona, TNF antagonista ili COX-2 inhibitora.
50. Metoda za tretiranje i/ili prevenciju oštećenja jetre, **naznačena time** što obuhvaća primjenu domaćinu kojemu je to potrebno određene učinkovite inhibirajuće količine IL-18 inhibitora.
- 10 51. Metoda za tretiranje i/ili prevenciju artritisa, **naznačena time** što obuhvaća primjenu domaćinu kojemu je to potrebno određene učinkovite inhibirajuće količine IL-18 inhibitora.
52. Metoda za tretiranje i/ili prevenciju upalne trbušne bolesti, **naznačena time** što obuhvaća primjenu domaćinu kojemu je to potrebno određene učinkovite inhibirajuće količine IL-18 inhibitora.

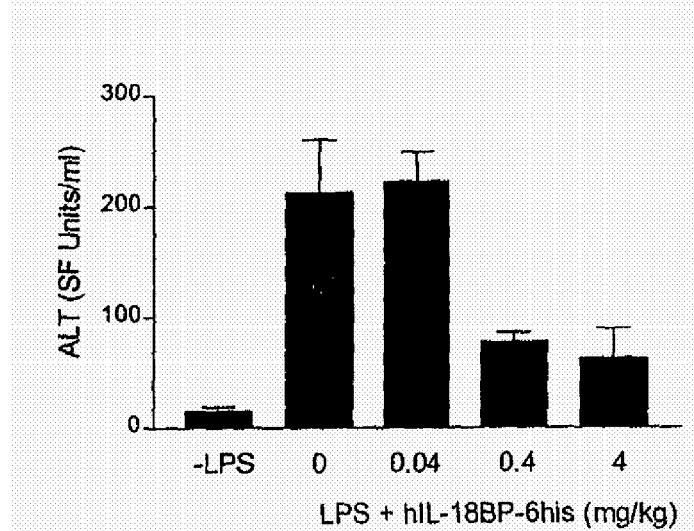
15 SAŽETAK

Izum se odnosi na uporabu inhibitora IL-18 u priređivanju medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju oštećenja jetre. Ovaj izum se nadalje odnosi na uporabu IL-18 inhibitora u priređivanju medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju artritisa, konkretno reumatoidnog artritisa. K tome, izum se odnosi na uporabu inhibitora IL-18 za priređivanje medikamenta za tretiranje i/ili prevenciju upalnih trbušnih bolesti, konkretno Crohnove bolesti i ulcerativnog kolitisa.

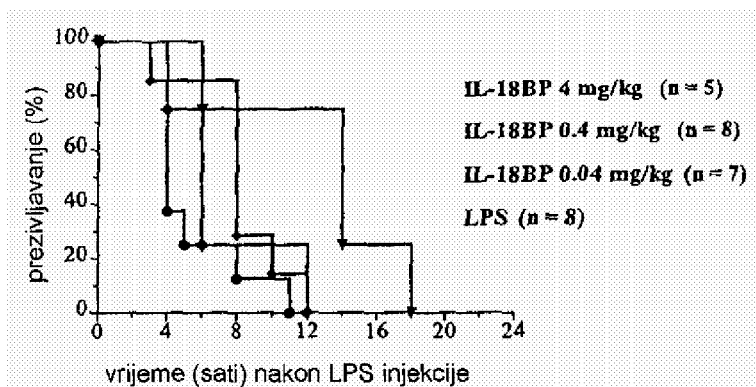
20



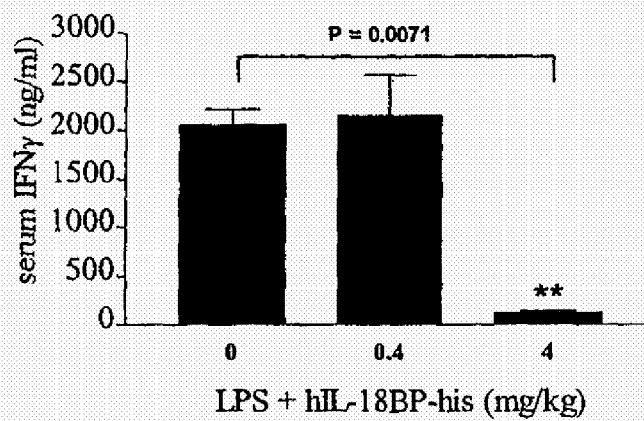
Slika 1



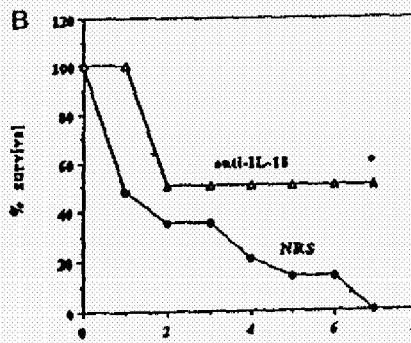
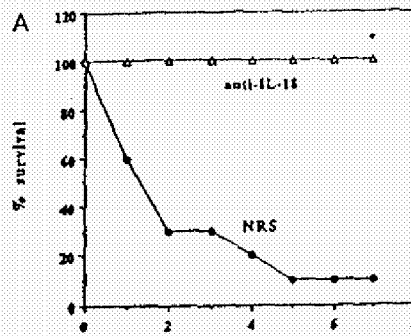
Slika 2



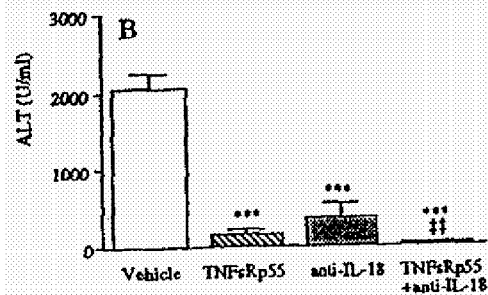
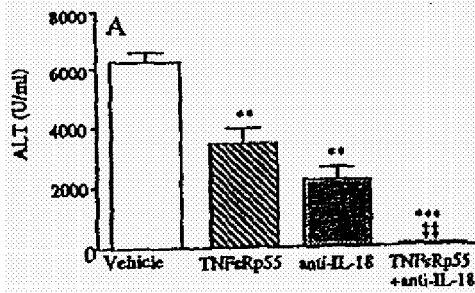
Slika 3



Slika 4

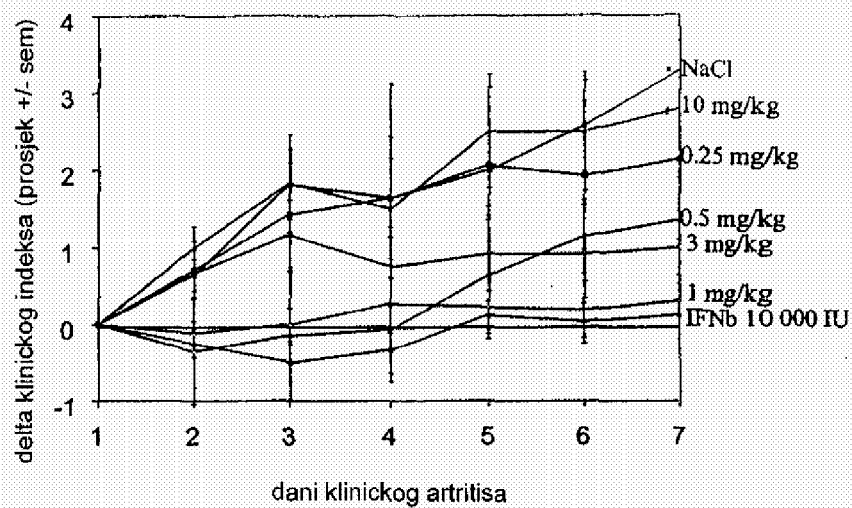


Slika 5

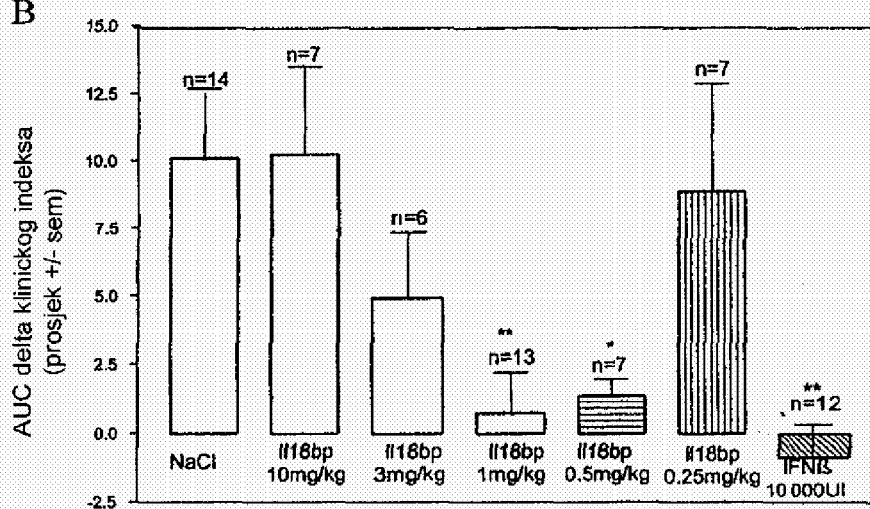


Slika 6

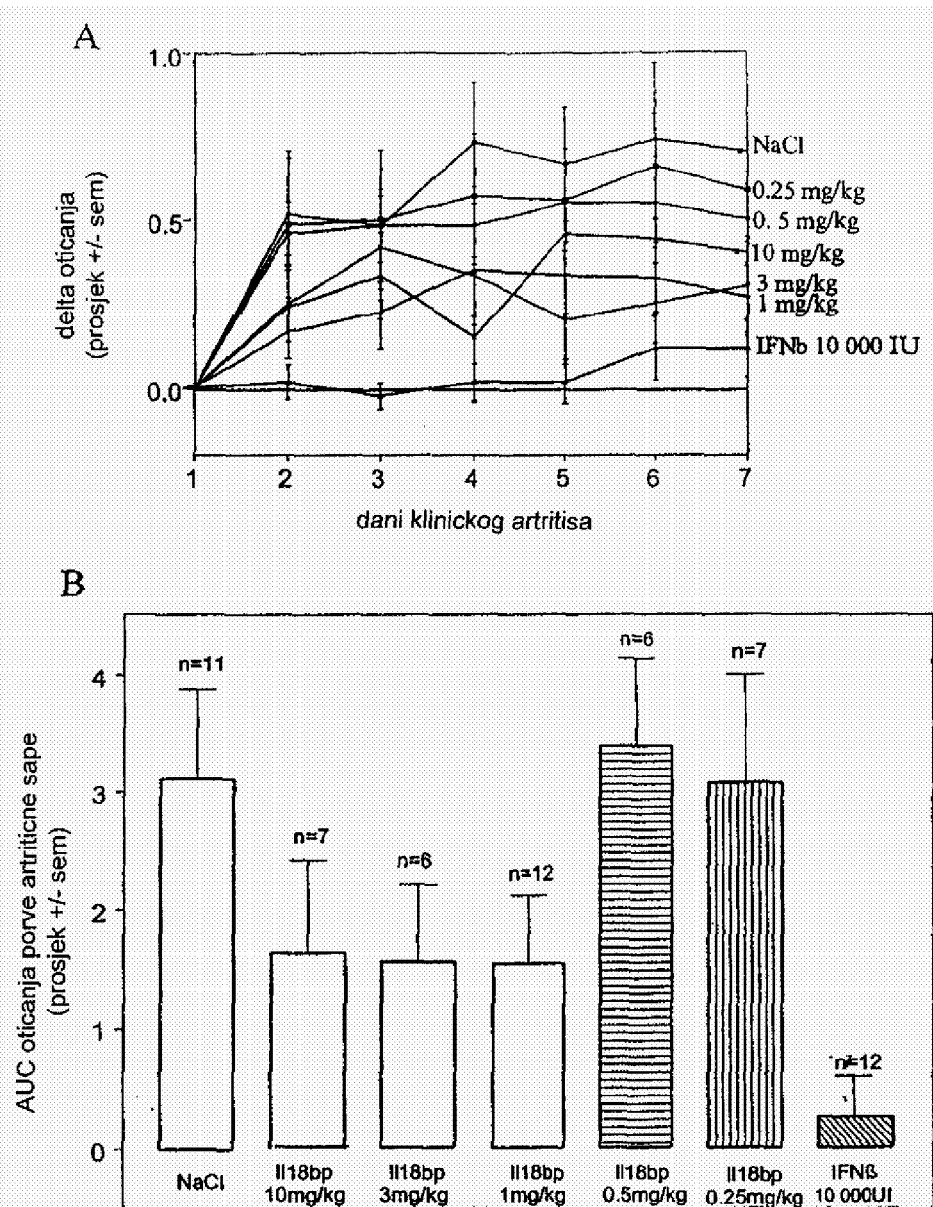
A



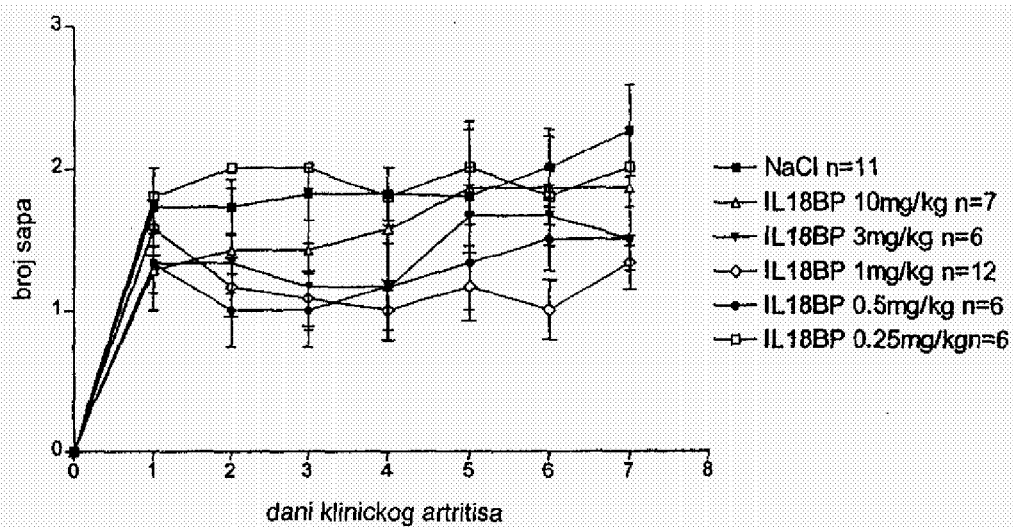
B



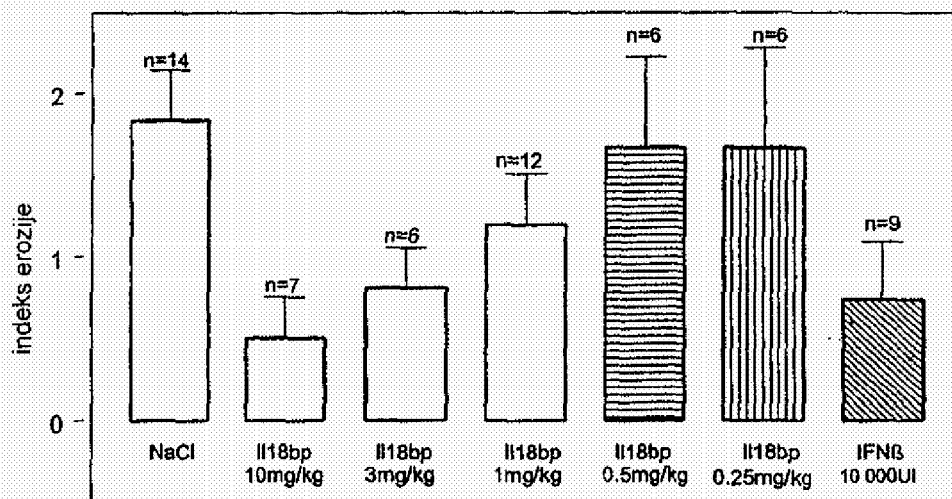
Slika 7



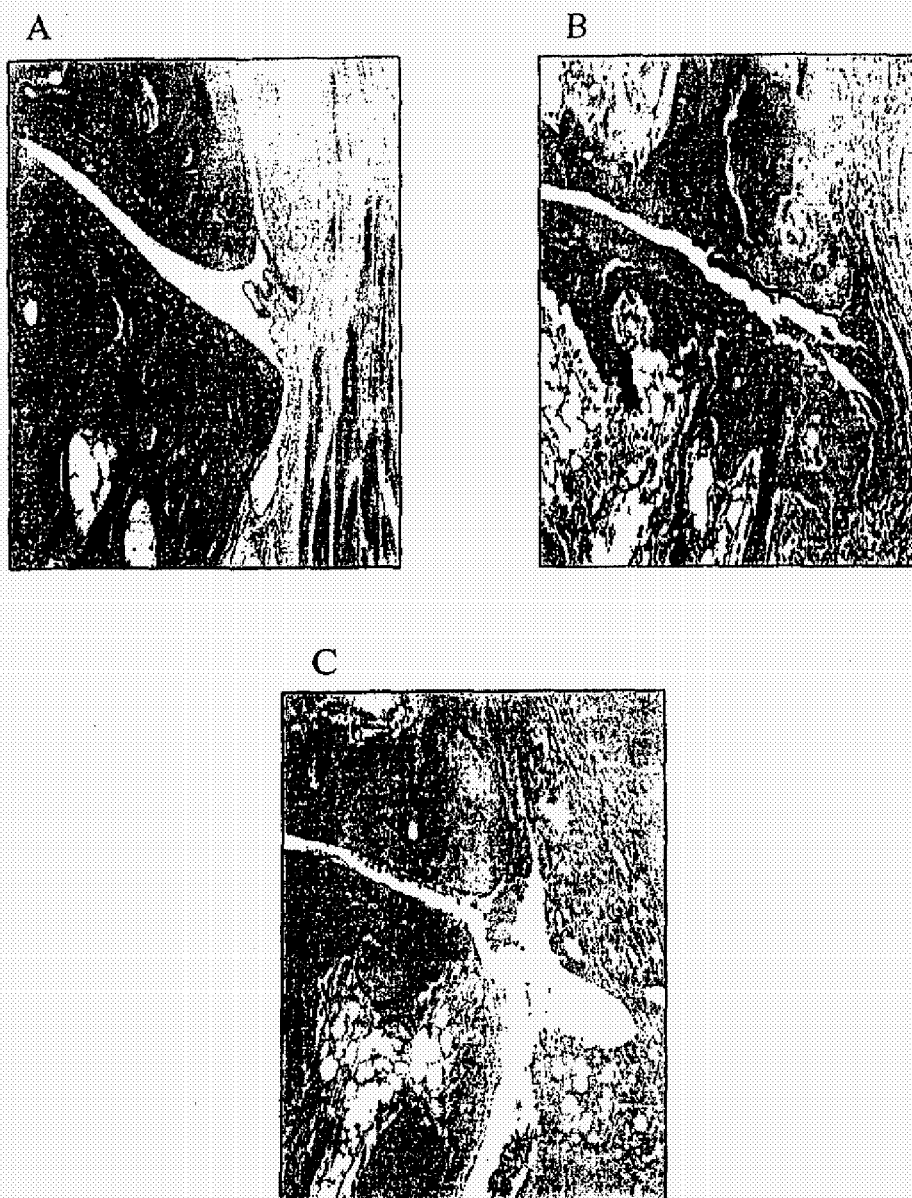
Slika 8



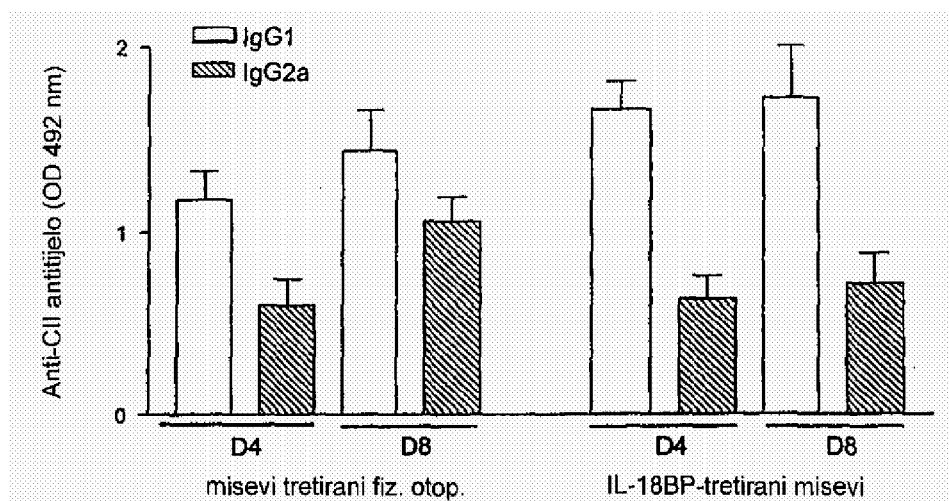
Slika 9



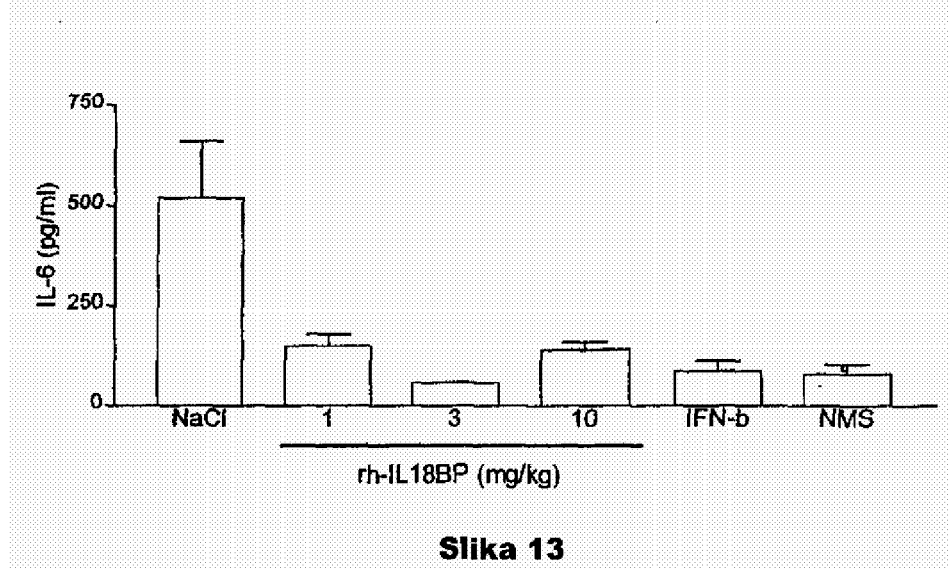
Slika 10



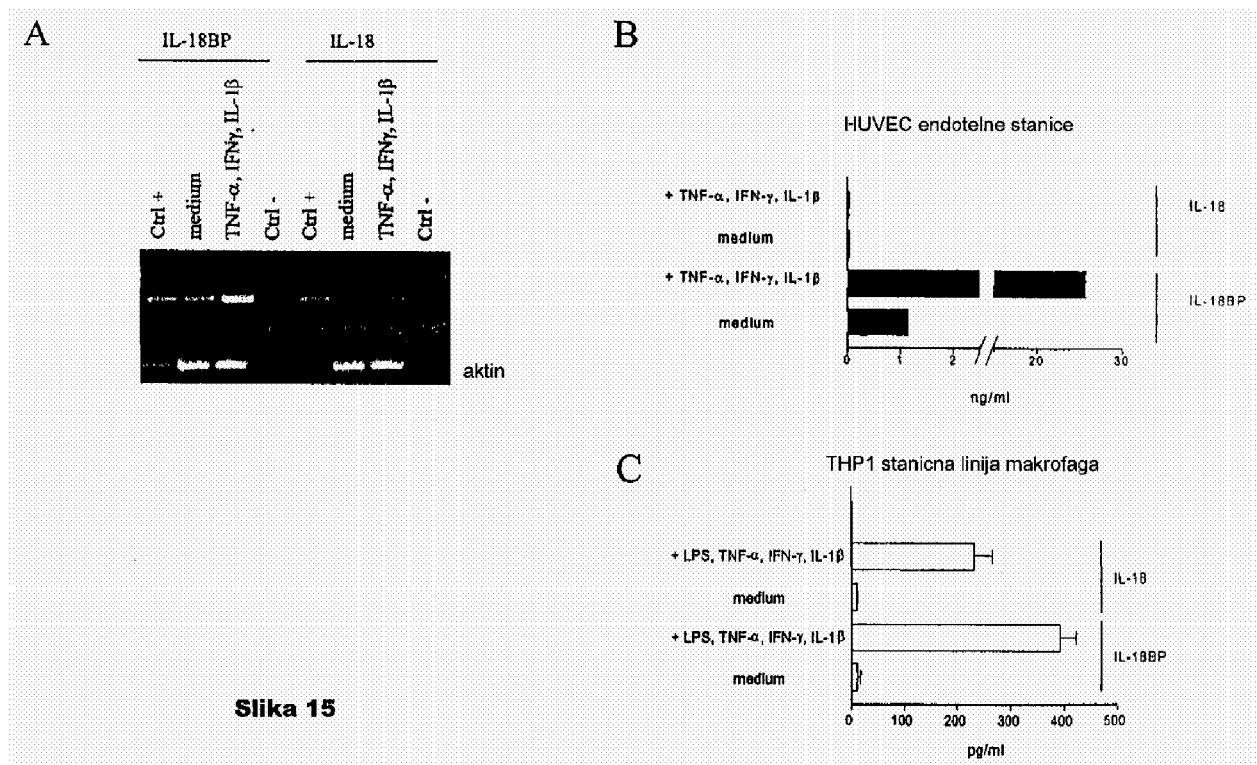
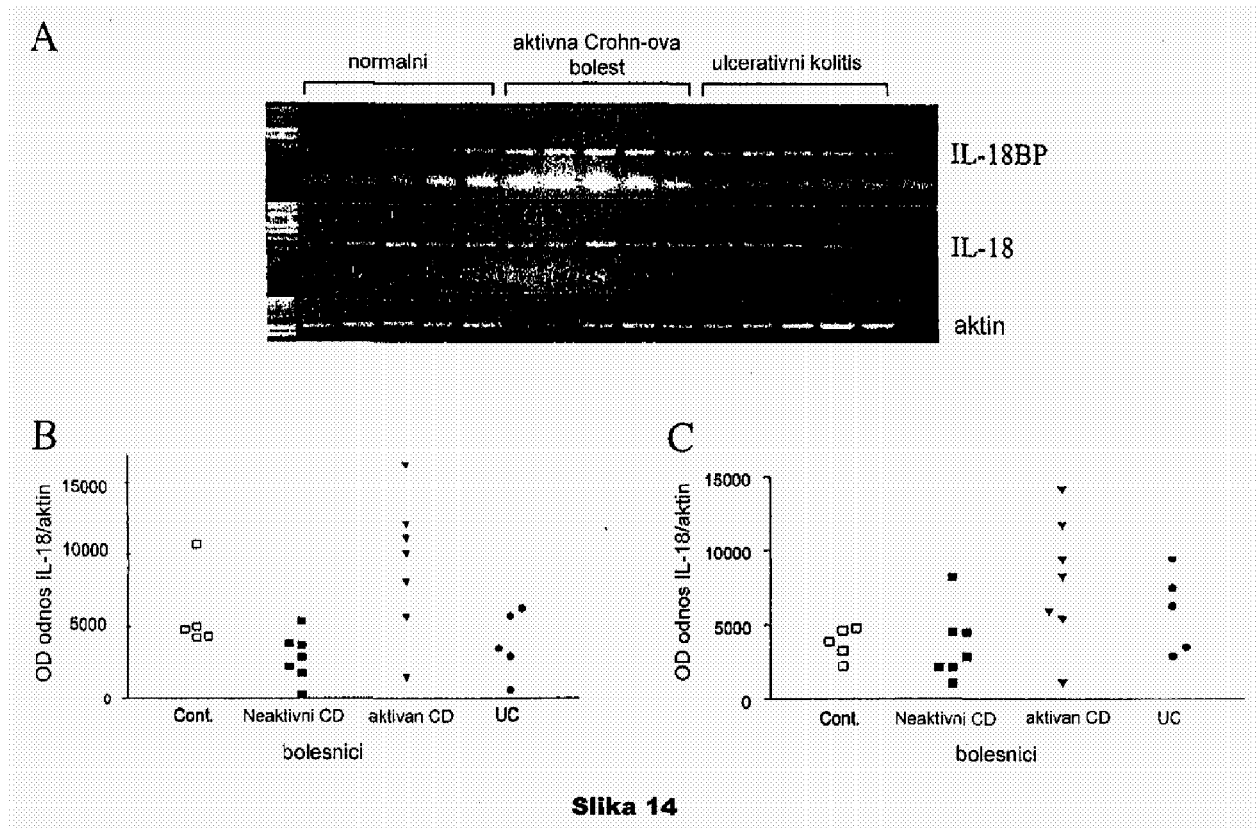
Slika 11

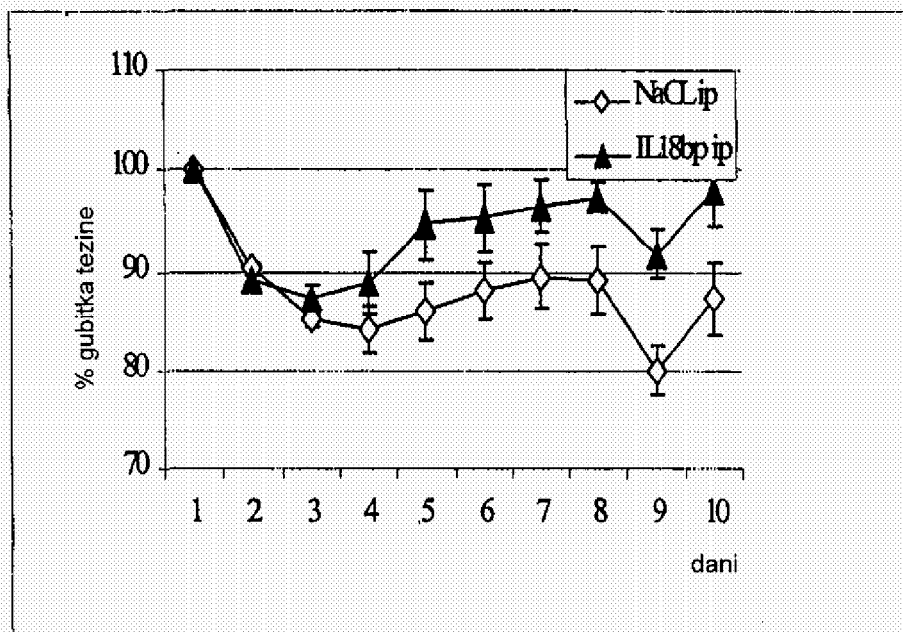


Slika 12

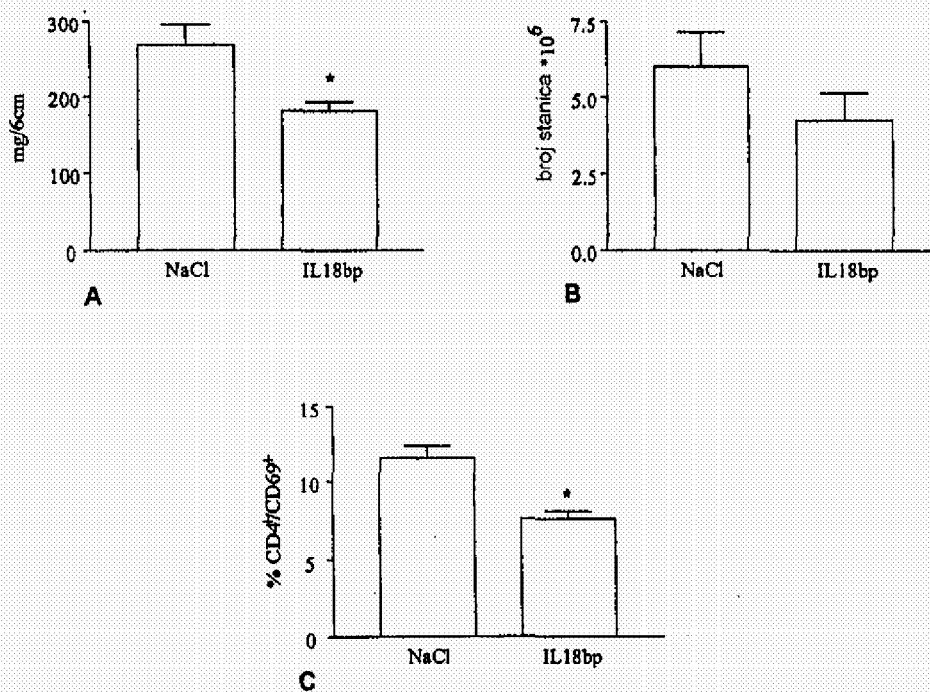


Slika 13





Slika 16



Slika 17

