

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

304 485

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2002-2843**
(22) Přihlášeno: **20.02.2001**
(30) Právo přednosti:
21.02.2000 EP 00103590
21.02.2000 EP 00103597
04.10.2000 EP 00121651
23.11.2000 EP 00125633
(40) Zveřejněno: **12.02.2003**
(Věstník č. 2/2003)
(47) Uděleno: **16.04.2014**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **28.05.2014**
(Věstník č. 22/2014)
(86) PCT číslo: **PCT/EP2001/001867**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2001/062285**

(56) Relevantní dokumenty:
Tsutsui H et al. J. Immunol., 1997, 159(8), 3961-3967.
WO 99/09063 A1; 65807; 65808; 65812.

(73) Majitel patentu:
Merck Serono S.A., 1202 Geneva, CH
YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT
COMPANY LTD., Rehovot, IL

(72) Původce:
Yolande Chvatchko, Confignon, CH
Charles Dinarello, Boulder, CH
Christine Plater-Zyberk, Geneva, CH
Santer Van Deventer, Haarlem, NL
Menachem Rubinstein, Givat Shmuel, IL
Daniela Novick, Rehovot, IL
Soo-Hyun Kim, Denver, CO, US

(74) Zástupce:
KOREJZOVÁ & SPOL., v.o.s., JUDr. Petra
Korejzová, advokátka, Korunní 810/104 E, 101 00
Praha 10

(54) Název vynálezu:
**Farmaceutický prostředek pro léčení nebo
prevenci alkoholické hepatitidy**

(57) Anotace:
Řešení se týká použití inhibitoru interleukinu IL-18,
kterým je IL-18 vazebný protein (IL-18BP), pro přípravu
léciva k léčení nebo k prevenci alkoholické hepatitidy.
Lécivo s obsahem uvedené látky může obsahovat ještě
další složky, jako jsou interferon, antagonist TNF nebo
inhibitor cyklooxygenázy COX-2.

CZ 304485 B6

Farmaceutický prostředek pro léčení nebo prevenci alkoholické hepatitidy

Oblast techniky

Současný vynález se týká použití inhibitoru interleukinu IL-18, IL-18 vazebného proteinu IL-18BP pro přípravu léčiva k léčení nebo k prevenci alkoholické hepatitidy. Toto léčivo může kromě vazebného proteinu IL-18 BP obsahovat ještě další účinnou složku, kterou může být interferon a/nebo antagonist TNF a/nebo inhibitor cyklooxygenázy COX-2.

Dosavadní stav techniky

V roce 1989 byla popsána endotoxinem indukovaná aktivita séra, která indukovala interferon- γ (IFN- γ), získaný z myších slezinných buněk (M. J. Micallef, T. Ohtsuki, K. Kohno, F. Tanabe, S. Uhsio, M. Namba, T. Tanimoto, K. Torigoe, M. Fujii, M. Ikeda, S. Fukuda a M. Kurimoto; IFN- γ -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, 1996). Tato sérová aktivita nepůsobila jako přímý induktor IFN- γ , ale spíše jako pomocný stimulator společně s interleukinem-2 (IL-2) nebo s mitogeny. Snaha o vyčištění nosiče této aktivity z myšího séra po stimulaci endotoxinem poskytla zdánlivě homogenní bílkovinu o molekulové hmotnosti 50 000 až 55 000. Vzhledem k tomu, že jiné cytokiny mohou působit jako pomocné stimulatory produkce IFN- γ , neschopnost protilátek neutralizujících IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 nebo TNF (faktor nekrózy tumoru, tumor necrosis, factor) neutralizovat tuto sérovou aktivitu naznačila, že šlo o odlišný faktor. V roce 1995 stejní vědci prokázali, že endotoxinem indukovaný pomocný stimulant produkce IFN- γ byl přítomen v jaterních extraktech myší, předem ovlivněných *P. acnes* (D. Novick se spoluautory, Soluble Interferon-alpha Receptor Molecules Are Present in Body Fluids; FEBS Lett. 314, 445-448, 1992). V tomto modelu jaterní populace makrofágů (Kupfferovy buňky) expanduje a malá dávka bakteriálního lipopolysacharidu (LPS), která není u předem neovlivněných myší smrtelná, se u těchto myší stává dávkou smrtelnou. Faktor, pojmenovaný jako indukční faktor IFN- γ (IGIF, IFN- γ -inducing factor) a později označený jako interleukin-18 (IL-18), byl vyčištěn do homogenity z 1 200 gramů jater myší, ovlivněných *P. acnes*. Degenerované oligonukleotidy, získané z aminokyselinových sekvencí vyčištěného IL-18, byly použity ke klonování myší cDNA IL-18 (D. Novick se spoluautory, 1992). IL-18 je bílkovina o molekulové hmotnosti 18 000 až 19 000 o 157 aminokyselinách, která nevykazuje žádnou zřejmou podobnost s jakýmkoliv peptidem v databázích. Přenašečové RNA (mRNA) pro IL-18 a interleukin-12 (IL-12) jsou snadno detegovány v Kupfferových buňkách a aktivovaných makrofázích. Rekombinantní IL-18 indukuje IFN- γ mnohem silněji než IL-12, zřejmě prostřednictvím vlastní dráhy (D. Novick se spoluautory, 1992). Podobně jako endotoxinem indukované sérové aktivity, ani IL-18 neindukuje IFN- γ sám o sobě, ale funguje prvotně jako pomocný stimulant s mitogeny nebo s IL-2. IL-18 zvyšuje proliferaci buněk T, zřejmě prostřednictvím na IL-2 závislé dráhy, a zvyšuje produkci cytokininu Th1 *in vitro*; pokud je kombinován s IL-12, vykazuje synergické působení ve smyslu zvýšení produkce IFN- γ (C. R. Maliszewski, T. A. Sato, T. Vanden Bos, S. Waugh, S. K. Dower, J. Stack, M. P. Beckmann a K. H. Grabstein; Cytokine receptors and B cells functions. I. Recombinant soluble receptor specifically inhibit IL-1- and IL-4-induced B cell activities in vitro. J. Immunol. 144, 3028-3033, 1990).

Bylo prokázáno, že neutralizační protilátky vůči myšímu IL-18 působí preventivně vzhledem k smrtelným účinkům, letálnosti malé dávky LPS u myší, předem ovlivněných *P. acnes*. Jiní autoři popsali důležitost IFN- γ jako mediátoru letálnosti LPS u předem ovlivněných myší. Například neutralizační protilátky anti-IFN- γ chránily myši vůči šoku podobnému Schwartzmanovu šoku (G. Fantuzzi se spoluautory, IL-18 regulation of IFN- γ production and cell proliferation as revealed in interleukin-1b converting enzyme-deficient mice; Blood 91, 2118-2125, 1998) a galaktosaminem ovlivněné myši, deficientní pokud se týká receptoru IFN- γ , byly odolné vůči úmrtí, indukovanému LPS (Byrn, 1990). Nebylo proto neočekávané, že neutralizační protilátky

vůči myšímu IL-18 chránily myši, předem ovlivněné *P. acnes*, vůči letálnímu LPS (Novick se spoluautory, 1992). Léčba anti-myším IL-18 také chránila přežívající myši vůči těžké jaterní cytotoxicitě.

- 5 Poté, co byla klonována myší forma, byla v roce 1996 popsána i lidská sekvence cDNA pro IL-18 (H. Okamura, 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 a M. Kurimoto; Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells; *Nature* **378**, 88–91, 1995). Rekombinantní lidský IL-18 vykazuje aktivitu přírodního IL-18 (H. Okamura se spol., 1995). Lidský rekombinantní IL-18 nevykazuje přímou IFN- γ -indukující aktivitu u lidských buněk T, ale působí jako pomocný stimulátor produkce IFN- γ a jiných cytokinů T-pomocných buněk 1 (T-helper cell-1, Th1) (H. Okamura se spol., 1995). IL-18 je až dosud považován prvotně za pomocný stimulátor produkce cytokinů u Th1 (IFN- γ , IL-2 a faktoru stimulujícího tvorbu kolonií granulocytů-makrofágů, granulocyte-macrophage colony stimulating factor) (K. Izaki, *Jpn. J. Bacteriol.* **33**, 729–742, 1978) a rovněž za pomocný stimulátor cytotoxicity zprostředkované FAS-ligandem u myších klonů buněk přirozených zabijců (D. Novick, H. Engelmann, D. Wallach a M. Rubinstein; Soluble cytokine Receptors are present in normal human urine; *J. Exp. Med.* **170**, 1409–1414, 1989).
- 20 Klonováním IL-18 z postižených tkání a studiím genové exprese IL-18 bylo zjištěno blízké spojení tohoto cytokinu a autoimunitního onemocnění. Neobézní diabetická (non-obese diabetic, NOD) myš spontánně vytváří autoimunitní zánět Langerhansových ostrůvků a diabetes, což lze urychlit a synchronizovat jedinou injekcí cyklofosfamidu. Polymerázovou řetězovou reakcí (polymerase chain reaction, PCR) s reverzní transkripcí byla mRNA IL-18 prokázána ve slinivce 25 NOD myši během časných stádií zánětu Langerhansových ostrůvků. Hladiny mRNA IL-18 rychle vzrostly po ovlivnění cyklofosfamidem a předcházely nárůstu mRNA IFN- γ a následně i diabetu. Je zajímavé, že tyto kinetiky napodobují kinetiky mRNA IL-12-p40, výsledkem čehož je blízký vzájemný vztah mezi jednotlivými hladinami mRNA. Klonování cDNA IL-18 z RNA slinivky a následné sekvenování potvrdilo shodnost se sekvencí IL-18, klonovanou z Kupfferových buněk a *in vivo* předem aktivovaných makrofágů. Také makrofágy NOD-myši odpovídaly 30 na cyklofosfamid genovou expresí IL-18, zatímco paralelně ovlivňované makrofágy z myši Balb/c nikoliv. Exprese IL-18 je tedy u autoimunitních NOD-myši abnormálně regulována a je blízce spojena s rozvojem diabetu (D. Novick se spoluautory, 1992).
- 35 IL-18 hraje možnou roli i v imunoregulaci nebo v zánětu zmnožením funkční aktivity Fas-ligan- du na buňkách Th1 (B. Conti, J. W. Jahng, C. Tinti, J. H. Son a T. H. Joh: Induction of IFN- γ inducing factor in the adrenal cortex; *J. Biol. Chem.* **272**, 2035–2037, 1997). IL-18 je také expri- mován v kůře nadledvinek (adrenal cortex), a proto může být vylučovaným neuroimunomodula- torem, hrajícím důležitou roli v instrumentaci imunitního systému následně po stresujícím zážitku 40 (K. F. Chater se spoluautory; na „Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology“, Akademiai Kaido, Budapest, Maďarsko, str. 45–54, 1986).

- 45 In vivo je IL-18 vytvářen štěpením pro-IL-18 a jeho endogenní aktivita se zdá nasvědčovat produkci IFN- γ u *P. acnes*– a LPS-zprostředkované letality. Zralý IL-18 je vytvářen ze svého prekursoru enzymem konvertujícím IL-1 β (IL-1 β -converting enzyme, ICE, kaspázou-1).

- 50 Receptor IL-18 sestává alespoň ze dvou složek, spolupracujících při vazbě ligandu. Vazná místa pro IL-18 s vysokou afinitou i s nízkou afinitou byla nalezena na myších buňkách T, stimulova- ných IL-12 (T. Yoshimoto, K. Takeda, T. Tanaka, K. Ohkusu, S. Kashiwamura, H. Okamura, S. Akira a K. Nakanishi; *J. Immunol.* **161**, 3400–3407, 1998), což naznačuje přítomnost receptoro- vého komplexu s násobným řetězcem. Dosud byly identifikovány dvě receptorové podjednotky, obě patřící k podskupině receptorů IL-1 (P. Parnet, K. E. Garka, T. P. Bonnert, S. K. Dower a J. E. Sims; *J. Biol. Chem.* **271**, 3967–3970, 1996). Signální transdukce IL-18 zahrnuje aktivaci NF- κ B (J. A. DiDonato, M. Hayakawa, D. M. Rothwarf, E. Zandi a M. Karin; *Nature* **388**, 16514–16517, 1997).
- 55

Různé známé bílkoviny, navazující cytokiny, jsou rozpustnými receptory cytokinů a odpovídají extracelulární oblasti (doménám), navazujícím ligand na odpovídajících receptorech cytokinů na buněčném povrchu. Jsou získány buď případným sestřihem pre-mRNA, běžným pro receptory buněčného povrchu, nebo proteolytickým štěpením receptoru buněčného povrchu. Takové rozpustné receptory byly v minulosti popsány, včetně, mezi jinými, rozpustných receptorů IL-6 a IFN- γ (K. Nakamura, H. Okamura, M. Wada, K. Nagata a T. Tamura; Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production; *Infect.-Immun.* **57**, 590-595, 1989), TNF (T. Dao, K. Ohashi, T. Kayano, M. Kurimoto a H. Okamura; Interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells; *Cell-Immunol.*, **173**, 230-235, 1996; H. Engelmann, T. Aderka, M. Rubinstein, D. Rotman a D. Wallach, A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from necrosis factor toxicity; *J. Biol. Chem.* **264**, 11974-11980, 1989), IL-1 a IL-4 (J. F. John se spoluautory; *Ref. Infect. Dis.* **8**, 693-704, 1986), IFN- α/β (S. Mizushima a S. Nagata; pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector; *Nucleic Acid Res.* **18**, 5322-5328, 1990) a jiné. Jedna z bílkovin, vázajících cytokiny, nazvaná osteoprotegrin (OPG, známá také jako inhibiční faktor osteoklastů - OCIF), patří do podskupiny TNRF/Fas, se zdá být prvním příkladem rozpustného receptoru, který existuje pouze jako vylučovaná bílkovina (D. M. Anderson se spoluautory, A. homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function; *Nature* **390**(6656), 175-179, 1997; D. P. Bollon se spoluautory; *J. Clin. Hematol. Oncol.* **10**, 39-48, 1980).

Nedávno byla rozpustná bílkovina, mající vysokou afinitu k IL-18, izolována z lidské moči a popsány byly lidská a myší cDNA (D. Novick, S.-H. Kim, G. Fantuzzi, L. Reznikov, C. Dinarello a M. Rubinstein; *Immunity* **10**, 127-136, 1999; WO 99/09 063). Bílkovina byla označena jako vazebná bílkovina IL-18 (tj. IL-18BP).

IL-18BP není extracelulární doménou jednoho ze známých receptorů IL-18, ale vylučovanou, přirozeně obíhající bílkovinou. Patří do nové podskupiny vylučovaných bílkovin. Tato podskupina dále zahrnuje různé bílkoviny, kódované Poxvirem, mající vysokou homologii s IL-18BP (D. Novick se spoluautory, 1999). IL-18BP je konstitutivně exprimována ve slezině, patří do imunoglobulinové superskupiny a vykazuje omezenou homologii s receptory IL-1 typu II. Její gen byl lokalizován na lidském chromosomu 11q13, a v genomové sekvenci o velikosti 8 300 nebyl nalezen žádný exon, kódující transmembránovou doménu (D. Novick se spoluautory, 1999).

Čtyři lidské a dvě myší isoformy IL-18BP, vznikající ze sestřihu mRNA a nalezené v různých knihovnách cDNA, byly exprimovány, vyčištěny a testovány vzhledem k vazbě a neutralizaci biologických aktivit IL-18 (S. H. Kim, M. Eisenstein, L. Reznikov, G. Fantuzzi, D. Novick, M. Rubinstein a C. A. Dinarello; Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1190-1195, 2000). Lidská isoforma a IL-18BP (IL-18BP_a) vykazuje nejvyšší afinitu pro IL-18 s rychlým navázáním (on-rate) a pomalým uvolněním (off-rate) a disociační konstantu ($K(d)$) 399 pmol $\times$ Γ^{-1} . IL-18BP_c sdílí imunoglobulinovou doménu IL-18BP_a, kromě 29 C-koncových aminokyselin; $K(d)$ IL-18BP_c je desetinásobně nižší (2,94 nmol $\times$ Γ^{-1}). Přesto IL-18BP_a a IL-18BP_c neutralizují IL-18 z více než 95 % při normálním nadbytku rovném dvěma. IL-18BP_b a IL-18BP_d isoformy postrádají úplnou imunoglobulinovou doménu a postrádají schopnost vázat nebo neutralizovat IL-18.

Myší IL-18BP_c a IL-18BP_d isoformy, mající identickou imunoglobulinovou doménu, rovněž neutralizují z více než 95 % myší IL-18 v molárním nadbytku rovném dvěma. Ovšem myší IL-18BP_d, který sdílí běžnou strukturu C-konce s lidským IL-18BP_a, rovněž neutralizuje lidský IL-18. Molekulární modelace identifikovala široké směsné elektrostatické a hydrofobní vazebné místo v imunoglobulinové doméně IL-18BP, které by mohlo vysvětlovat jeho vysoce afinitní vazbu k ligandu (S. H. Kim se spoluautory; 2000).

Nedávno bylo naznačeno, že interleukin IL-18 se účastní vývoje patogenity u chronických zánětlivých onemocnění, včetně endotoxinového šoku, hepatitidy a autoimunitního diabetes (S. Kawanamura a H. Okamura; Nippon. Rinsho. 56, 1798–1806, 1998). Další zjištění možné role IL-18 v rozvoji jaterního poškození bylo získáno z pokusů, popsaných Tsuijem se spoluautory (H. Tsuij, N. Mukaida, A. Harada, S. Kaneko, E. Matsushita, Y. Nakanuma, H. Tsutsui, H. Okamura, K. Nakanishi, Y. Tagawa, Y. Iwakura, K. Kobayashi a K. Matsushima; J. Immunol. 162, 1049–1055, 1999), ukazujících zvýšenou hladinu IL-18 u lipopolysacharidem indukovaného akutního jaterního poškození na myším modelu. Ovšem mechanismus víceúčelového faktoru IL-18 v rozvoji jaterního poškození nebyl dosud objasněn.

10

Jaterní poškození může mít různé příčiny. Může být způsobeno například virovými nebo bakteriálními infekcemi, přemírou alkoholu, imunologickými poruchami nebo rakovinou.

Virové hepatitidy, způsobené například virem hepatitidy B a virem hepatitidy C, jsou špatně zvládnutelná onemocnění, která postihují velké množství lidí na celém světě. Počet známých virů hepatitidy se stále zvyšuje. Kromě virů hepatitidy B a C byly dosud objeveny alespoň čtyři další viry, vyvolávající virovou hepatitidu, nazvané virus hepatitidy A, virus hepatitidy D, virus hepatitidy E a virus hepatitidy G.

Alkoholické onemocnění jater je jinou široce rozšířenou chorobou, spojenou s chronickým požíváním alkoholu. Imunitní hepatitida je málo se vyskytujícím autoimunitním onemocněním, které je těžko zvládnutelné. Jaterní poškození zahrnuje rovněž poškození žlučových. Primární žlučová, biliární cirhóza (PBC, primary biliary cirrhosis) je autoimunitním onemocněním jater, které je charakterizováno rozkladem intrahepatálních žlučových.

25

Různé studie prokázaly, že poškození jater při chorobách jako jsou alkoholická hepatitida, jaterní cirhóza, virová hepatitida a primární biliární cirhóza, je spojeno s odpovědí pomocných buněk T typu 1 (Th1). V jedné studii byl ustaven nový model jaterního poškození u myši, směřující liposomy s obsahem ovalbuminu do jater, s následným adoptivním přenosem buněk Th1, specifických vůči ovalbuminu. Kombinovaná léčba myši s liposomy obsahujícími ovalbumin a přenosem buněk Th1 vyvolala zvýšení transaminázové aktivity v séru, které bylo souběžné se zvýšením sérových hladin IFN- γ . V ostrém rozporu s tímto zjištěním měl přenos buněk Th2, specifických vůči ovalbuminu, za následek zvýšení sérových hladin IL-4, neindukoval ale jaterní poškození. Jaterní poškození bylo blokováno anti-IFN- γ protilátkami a protilátkami vůči (TNF)- α (vůči faktoru nekrózy tumoru typu α). Tyto nálezy ukazují, že buňky Th1 jsou hlavními efektorovými buňkami při akutním poškození jater (T. Kishimura a A. Ohta; Critical role for antigen-specific Th1 cells in acute liver injury in mice; J. Immunol. 162, 6503–6509, 1999). V jiných studiích bylo prokázáno, že myši nadměrně exprimující IFN- γ vykazují spontánní hepatitidu bez přítomnosti jakéhokoliv patogenu, nebo kteréhokoliv jiného stimulačního činidla (T. Okamoto se spoluautory, Induction of Fas ligand and Fas antigen mRNA expressions in interferon- γ transgenic mouse liver; Jpn. J. Pharmacol. 78(2), 233–235, 1998).

Jiné studie zahrnují odpovědi Th1 v primární biliární cirhóze (PBC). PBC je autoimunitní jaterní onemocnění, které je charakterizováno rozpadem intrahepatálních žlučových. Obecně se předpokládá, že toto poškození žlučového působí buněčný imunitní mechanismus, zahrnující zvláště buňky T. Nedávno bylo navrženo, že důležitým faktorem v patofyziologii různých autoimunitních onemocnění je relativní síla Th1 a Th2 odpovědi. V této studii byla rovnováha podskupin v PBC hodnocena detekcí cytokinů, specifických vůči dvěma podskupinám buněk T, tj. IFN- γ pro buňky Th1 a IL-4 pro buňky Th2. V jaterních řezech 18 pacientů s PBC, 35 pacientů s kontrolními onemocněními včetně chronické aktivní hepatitidy C a extrahepatické žlučové obstrukce (ucpání) a v řezech normálních jater byly počítány pozitivní buňky vzhledem k IFN- γ a IL-4 mRNA, za použití neisotropní *in situ* hybridizace a imunohistochemických metod. Mononukleární buňky, exprimující IFN- γ a IL-4 mRNA, se shlukovaly v zánětlivých portálních traktech PBC jater, ale zřídka byly přítomny v případě extrahepatální biliární obstrukce, alkoholické fibrózy nebo v řezech normálních jater. Pozitivní buňky vzhledem k IFN- γ a IL-4 mRNA byly v PBC

55

- játrech detegovány ve významně větších počtech než u kontrolních jater ($p < 0,01$). Nadto byla v PBC játrech mnohem obvykleji detegována exprese IFN- γ mRNA než exprese IL-4 a hladiny exprese IFN- γ mRNA byly v těsném souladu se stupněm portální zánětlivé aktivity. Buňky pozitivní vůči IFN- γ mRNA byly prvotně detegovány kolem poškozených žlučovodů, které byly obklopeny lymfoidními shluky, agregáty. Údaje ukazují, že buňky Th1 jsou význačnější podskupinou buněk T v lymfoidních infiltrátech při PBC (K. Harada se spoluautory; *In situ nucleic acid hybridization of cytokines in primary biliary cirrhosis: predominance of the Th1 subset*; *Hepatology* 25(4), 791–796, 1997).
- Rovněž se předpokládá, že složení cytokinů při rozpoznání virového antigenu uplatňuje silný vliv na rozlišení virových infekcí a virové clearance. Jedna studie zkoumala, zda cytokinová nerovnováha, orientovaná vůči odpovědi typu Th2, hraje roli v chronické hepatitidě B. Cytokinové profily v mononukleárních buňkách periferní krve, spojených s chronickou hepatitidou B, byly analyzovány prostřednictvím RT-PCR. Během stimulace povrchového antigenu hepatitidy B (HBsAg) byla detegována exprese IFN- γ , IL-2, IL-4 a IL-10 u 41 %, respektive 8, 41 a 50 % pacientů. Mezi těmito cytokiny byla exprese IFN- γ , cytokinu Th1, spojena s vysokými hladinami AST/ALT (aspartátaminotransferázy/alaninaminotransferázy) v séru, představujícími typické markery jaterního poškození. U cytokinů typu Th2 nebyl prokázán ochranný účinek vzhledem k hepatocytům. Byl učiněn závěr, že produkce Th1 cytokinu, IFN- γ , buňkami reagujícími s HBsAg, byla spojena s poškozením hepatocytů při chronické hepatitidě B (M. Lee se spoluautory; *Expression of Th1 a Th2 type cytokines responding to HBsAg and HBxAg in chronic hepatitis B patients*; *J. Korean Med. Sci.* 14(2), 175–181, 1999). V játrech pacientů s hepatitidou B byly popsány vysoké hladiny Fas ligandu a jeho receptoru (CD95) (K. X. Luo se spoluautory; *In situ investigation of Fas/FasL expression in chronic hepatitis B infection and related liver diseases*; *J. Viral. Hepat.* 4(5), 303–307, 1997). Fas ligand je považován za jedno z hlavních cytotoxických činidel, vedoucích k apoptóze hepatocytů.
- Jiná studie identifikovala faktory, spojené s vývojem jaterního poškození 30 neléčených pacientů s chronickou hepatitidou, pozitivních vůči viru hepatitidy typu C/RNA (HCV/RNA). Nekrózně zánětlivé a stavební poškození bylo hodnoceno za použití Ishakovy stupnice. Aktivované jaterní hvězdčkové buňky (HSC, hepatic stellate cells) byly imunohistochemicky vizualizovány pro α -aktin hladkého svalu (α SMA, α -smooth muscle actin) a byly kvantifikovány morfometricky. Množství HCV/RNA bylo stanoveno za použití kompetitivní RT-PCR metody. Ke studiu typu imunitní odpovědi, účastníci se rozvoje jaterního poškození, byly imunohistochemicky stanovovány IFN- γ -pozitivní buňky (jako exprese odpovědi podobné Th1) a byly morfometricky kvantifikovány. Bylo zjištěno, že HSC byly většinou detegovány v blízkosti oblastí lobulárního nekrotického zánětu nebo výstelky fibrotického septa (přepážky). S nekrotickým zánětem a hodnocením stavby byly ve významném souhlasu i α SMA- a Sirius red-pozitivní parenchym, IFN- γ -pozitivní buňky byly detegovány v periportálních oblastech spojených se zánětlivými infiltráty a významně odpovídaly stavebnímu poškození. Proto byl učiněn závěr, že aktivace HSC a vývoj jaterního poškození jsou spojeny s odpovědí podobnou Th1 (G. S. Baroni se spoluautory; *Hepatic stellate cell activation and liver fibrosis are associated with necroinflammatory injury and Th1-like response in chronic hepatitis*; *C. Liver*, 19(3), 212–219, 1999). Podobně jako v případě hepatitidy B byly Fas ligand a jeho receptor nalezeny v játrech a séru pacientů s hepatitidou C (N. Hiramatsu se spoluautory; *Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C*; *C. Hepatology* 19(6), 1354–1359, 1994; M. Okazaki se spoluautory; *Hepatic Fas antigen expression before and after interferon therapy in patients with chronic hepatitis C*; *Dig. Dis. Sci.* 41(12), 2453–2458, 1996).
- Bylo zjištěno, že cytokiny Th1 a jiné markery Th1 jsou spojeny s alkoholickou hepatitidou a jaterní cirhózou. Zánětlivé stimulans a peroxidace lipidů aktivují nukleární faktor κ B (NF- κ B) a zvýšeně regulují prozánětlivé cytokiny a chemokiny. V jedné studii byl stanoven vztah mezi patologickým poškozením jater, endotoxemií, peroxidací lipidů a aktivací NF- κ B a rovněž nerovnováha mezi prozánětlivými a antizánětlivými cytokiny. Potkani albíni (5 ve skupině) byli krmeni ethanolem a dietou, obsahující nasycený tuk, palmový olej, kukuřičný olej nebo rybí olej

nitrožaludeční infuzí. U kontrolních zvířat dextróza isokaloricky nahradila ethanol. Byla provedena patologická analýza a měření endotoxinu, peroxidace lipidů, NF- κ B, hladiny mRNA prozánětlivých cytokinů (TNF α , IL-1 β , IFN- γ a IL-12), C-C chemokinů (redukováných během aktivace, normálních buněk T exprimovaných a vylučovaných, tj. [RANTES], monocytové chemotaktické bílkoviny, tj. [MCP]-1 a makrofágové zánětlivé bílkoviny [MIP]-1- α), C-X-C chemokinů (cytokiny indukovaného neutrofilního chemoatraktantu [CINC], MIP-2, IP-10 a epiteliální neutrofilny aktivující bílkoviny [ENA]-78), a protizánětlivých cytokinů (IL-10, IL-4 a IL-13). U potkanů albínů, vykazujících nekrotické zánětlivé poškození (rybí olej-ethanol a kukuřičný olej-ethanol) byla prokázána aktivace NF- κ B a zvýšená exprese prozánětlivých cytokinů C-C a C-X-C chemokinů. Tyto skupiny měly rovněž nejvyšší hladiny endotoxinu a peroxidace lipidů. Hladiny IL-10 a IL-4 mRNA byl nižší ve skupině, vykazující zánětlivé poškození jater. Aktivace NF- κ B tedy nastává v přítomnosti prozánětlivých stimulů a jejím výsledkem je zvýšená exprese Th1 prozánětlivých cytokinů a chemokinů (A. A. Nanji se spoluautory; Activation of nuclear factor κ B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology* 30(4), 934-943, 1999). U alkoholického jaterního onemocnění jsou rovněž zvýšené Fas ligand a jeho receptor, což opět naznačuje, že v autoimunitním procesu, indukovaném při alkoholické hepatitidě, jsou zúčastněny cytokiny Th1 (P. R. Galle se spoluautory; Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage; *J. Exp. Med.* 182(5), 1223-1230, 1995; J. Taieb se spoluautory; Raised plasma soluble Fas and Fas-ligand in alcoholic liver disease [letter]; *Lancet* 351(9120), 1930-1931, 1998; G. Fiore se spoluautory; Liver tissue expression of CD80 and CD95 antigens in chronic hepatitis C: relationship with biological and histological disease activities; *Microbes* 97(386), 29-38, 1999).

TNF- α se také objevil jako běžná cesta v patogenezi k alkoholu se vztahujícího jaterního nekrotického zánětu. Zvýšené hladiny v játrech a séru byly doloženy u zvířecích modelů alkoholického jaterního onemocnění a u lidského alkoholického onemocnění. Bylo stanoveno, že tento neregulovaný metabolismus TNF hraje roli v mnoha metabolických komplikacích a v jaterním poškození při alkoholickém jaterním poškození (J. Grove se spoluautory; Association of a tumor necrosis factor promoter polymorphism with susceptibility to alcoholic steatohepatitis; *Hepatology* 26(1), 143-146, 1997; C. J. McClain a D. A. Cohen; Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis; *Hepatology* 9(3), 349-51, 1989). V jedné studii bylo například zjištěno, že pacienti s alkoholickou hepatitidou mají vyšší hladiny TNF- α (průměr 26,3 ng/l; 95% CI, 21,7 až 30,9) než normální subjekty (6,9 ng/l; CI, 5,4 až 7,4). Pacienti, kteří následně zemřeli, měli vyšší hladiny TNF- α (34,7 ng/l; CI, 27,8 až 41,6) než ti, kteří přežili, (16,6 ng/l; CI, 14,0 až 19,2). Hladiny TNF- α byly u pacientů s alkoholickou hepatitidou v kladném vztahu k sérovému bilirubinu ($r = 0,74$; $P = 0,0009$) a sérovému kreatininu ($r = 0,81$; $P = 0,0003$). Pacienti s alkoholickou hepatitidou měli vyšší hladiny TNF- α než pacienti s inaktivní alkoholickou cirhózou (11,1 ng/l; CI, 8,9 až 13,3) a silně alkoholické osoby bez jaterního onemocnění (6,4 ng/l; CI, 5,0 až 7,8). Pacienti s abnormální funkcí ledvin měli nižší hladiny TNF- α (14,1 ng/l; CI, 5,4 až 22,8) než pacienti s alkoholickou hepatitidou. Byl učiněn závěr, že zvýšení TNF- α u alkoholické hepatitidy je výraznější u těžkých případů, což naznačuje, že TNF- α hraje roli v patogenezi (G. L. Bird se spoluautory; Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. *Ann. Intern. Med.* 112(12), 917-920, 1990).

TNF zprostředkovává mnoho biologických účinků endotoxinu. Nedávné studie ukázaly, že podání TNF může způsobit poškození jater a že TNF může zprostředkovat lethality (smrtelnost) hepatotoxinu galaktosaminu. Jedním z nejsilnějších induktorů TNF je endotoxin. Vzhledem k tomu, že pacienti s alkoholickým jaterním onemocněním mají často endotoxemii a vzhledem k tomu, že mnoho klinických příznaků alkoholické hepatitidy je známým biologickým působením TNF, byla jeho aktivita stanovována u pacientů s alkoholickou hepatitidou. Základní uvolnění TNF a lipopolysacharidem stimulované uvolnění TNF z monocytů periferní krve, hlavního zdroje produkce TNF, bylo měřeno u 16 pacientů s alkoholickou hepatitidou a u 16 zdravých dobrovolníků. Osm ze 16 pacientů s alkoholickou hepatitidou a pouze 2 ze 16 zdravých dobrovolníků mělo detegovatelnou spontánní aktivitu TNF ($p < 0,05$). Po stimulaci lipopolysacharidem bylo střední uvolnění

monocytárního TNF u pacientů s alkoholickou hepatitidou významně zvýšeno více než dvojnásobně ve srovnání se zdravými kontrolami ($25,3 \pm 3,7$ oproti $10,9 \pm 2,4$ jednotky/ml, $p < 0,005$). Byl tedy učiněn závěr, že monocyty pacientů s alkoholickou hepatitidou vykazují významně zvýšené spontánní a lipopolysacharidem stimulované uvolnění TNF ve srovnání s monocytami zdravých dobrovolníků (McClain a Cohen, 1989).

Bílkovina navazující lipopolysacharid (LBP) a CD14 (receptor Kupffer. buněk) hrají klíčové zprostředkující role při aktivaci buněk endotoxinem. Bylo stanoveno, že od střeva odvozený LPS se účastní podpory patologického poškození jater při alkoholickém jaterním onemocnění. Bylo prokázáno, že potkani albíni, krmení ethanolem v oleji prostřednictvím žaludeční sondy po dobu 4 týdnů, měli zvýšenou hladinu CD14 a LBP a jejich Kupfferovy buňky a hepatocyty byly rovněž zvýšené. Expresí CD14 mRNA rovněž vzrostla u nemyeloidních buněk. Zvýšená exprese LBP a CD14 rychle zvyšuje expresi indukovanou LPS různých prozánětlivých cytokinů a je ve shodě s přítomností patologického jaterního poškození u alkoholického jaterního poškození (G. E. Su se spoluautory; CD14 and lipopolysaccharide binding protein expression in a rat model of alcoholic liver disease; *Am. J. Pathol.* 152(3), 841–849, 1998; T. A. Lukkari se spoluautory; Short-term ethanol exposure increases the expression of Kupffer cell CD14 receptor and lipopolysaccharide binding protein in rat liver. *Alcohol* 34(3), 311–319, 1999).

Arthritida je onemocnění, zahrnující zánět kloubů. Klouby otékají a vykazují ztuhlost, bolestivost, zčervenání nebo zvýšení teploty. Tyto příznaky mohou být doprovázeny ztrátou váhy, horečkou nebo slabostí. Pokud tyto příznaky přetrvávají více než dva týdny, může být příčinou zánětlivá arthritida, například revmatoidní arthritida. Zánět kloubů může být způsoben také infekcí, která může vést k septické artritidě. Velmi běžným typem arthritidy je degenerativní kloubní onemocnění (osteoarthritida).

Léčivy, běžně předepisovanými na arthritidu a s ní spojené stavy, jsou nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAID). NSAID zahrnují aspirin a léky podobné aspirinu. Tyto léky omezují zánět, který je příčinou bolesti kloubu, ztuhlost a otok kloubu. NSAID jsou ovšem nespecifickými léky, majícími množství vedlejších účinků, včetně krvácení do žaludku (domácí webová stránka ortopedického oddělení University of Washington o arthritidě, Frederick Matsen, www.orthop.washington.edu). Kromě NSAID se ke zmírnění příznaků a známek osteoarthritidy a revmatoidní arthritidy u dospělých používá Celebrex™, inhibitor cyklooxygenázy (COX-2). Je rovněž určen pro léčbu pacientů s rodově dědičnou adenomatičnou polypózou.

WO 01/00 229 popisuje kombinaci antagonistů faktoru nekrózy tumoru (TNF) a inhibitorů COX-2 pro léčbu zánětu.

Antagonisté TNF se rovněž využívají k léčbě arthritidy. Antagonisté TNF jsou například popsáno ve WO 91/03 553.

Nedávné studie ukazují, že interleukin IL-18 hraje prozánětlivou roli v kloubním metabolismu. T. Olee se spoluautory (*J. Immunol* 162(2), 1096–1100, 1999) prokázal, že IL-18 je produkován kloubními chondrocyty a indukuje prozánětlivou a ketabolickou odpověď. IL-18 mRNA byla indukována IL-1 β v chondrocytech. Chondrocyty produkovaly prekurzor IL-18 a v odpovědi na stimulaci působením IL-1 vylučovaly zralou formu IL-18. Studie účinku IL-18 na chondrocyty dále prokázala, že inhibuje proliferaci indukovanou TGF- β a zvyšuje produkci oxidu dusnatého. IL-18 stimuloval expresi různých genů v normálních lidských artikulárních chondrocytech včetně indukovatelné syntázy oxidu dusnatého, indukovatelné cyklooxygenázy, IL-6 a stromelysinu. Genová exprese byla spojena se syntézou odpovídajících bílkovin. Léčba normální lidské kloubní chrupavky prostřednictvím IL-18 zvýšila uvolňování glykosaminoglykanů. Tyto poznatky určily IL-18 jako cytokin, který reguluje chondrocytové odpovědi a přispívá k rozpadu chrupavky.

Lokalizace enzymu přeměňujícího interleukin-1 β (ICE, interleukin converting enzyme) / kaspázy-1 v lidských osteoarthritických tkáních a jeho role při zrání IL-1 β a IL-18 byly popsány

N. Sahoo a spoluautory (N. Saha, F. Moldovan, G. Tardif, JP. Pelletier, JM. Cloutier a J. Martel-Pelletier; *Arthritis Rheum.* **42**(8), 1577–1587, 1999). Tito autoři studovali expresi a produkci kaspázy 1 v lidské normální a osteoartritické (OA) chrupavce a v synoviu, kvantifikovali hladinu ICE v OA chondrocytech a zkoumali vztah mezi topografickým rozdělením ICE, IL-1 β a IL-18, stejně jako apoptózu chondrocytů. Pokusy provedené v této studii ukázaly, že ICE byl expri-
 5 mován a syntetizován jak v lidské synoviální membráně, tak i v chrupavce, s významně větším počtem buněk, barvících se pozitivně v OA tkáni než v normální tkáni. Produkce ICE byla před-
 nostně umístěna v povrchové a horní střední vrstvě kloubní chrupavky. Produkce zralého IL-1 β v OA chrupavkových explantátech a chondrocytech byla zcela zablokována léčbou specifickým
 10 inhibitorem ICE, který také značně zmenšil množství buněk, pozitivních vůči IL-18. Vztah mezi aktivním IL-1 β a ICE naznačuje, že ICE může napomáhat vývoji osteoartrity aktivací tohoto prozánětlivého cytokinu a že IL-18 může hrát roli v patologii chrupavky.

Gracie se spoluautory (A. J. Gracie, R. J. Forsey, W. L. Chan, A. Gilmour, B. P. Leung, A. R. Greer, K. Kennedy, R. Carter, X-Q. Wei, D. Xu, M. Field, A. Foulis, F. X. Liew a I. B. McInnes; *J. Clin. Inv.* **104**, 1393–1401, 1999) popsali prozánětlivou roli IL-18 v revmatoidní artritidě. Tito autoři detegovali IL-18 mRNA a bílkovinu v synoviálních tkáních při revmatoidní arthritidě. Ve významně vyšších množstvích než u osteoartritických kontrol. Rovněž bylo prokázáno, že kombinace IL-12 nebo IL-15 s IL-18 indukovala produkci IFN- γ synoviálními tkáněmi *in vitro*.
 15 Kromě toho podávání IL-18 myším imunizovaným kolagenem/nekompletním Freundovým adjuvans usnadnilo vývoj erozivní, zánětlivé arthritidy, což naznačilo, že IL-18 může být prozánětlivý za podmínek *in vivo*.

Ovšem do nynějška byla jako snižující kolagenem indukovanou arthritidu (CIA, která je myším modelem revmatoidní arthritidy) u myší, prokázána, kromě chemických sloučenin, pouze bloká-
 25 da TNF- α a blokáda IL-1 β za použití rozpustných receptorů nebo monoklonálních protilátek (R. O. Williams, L. J. Mason, M. Feldmann, R. N. Maini; Synergy between anti CD4 and anti-tumor necrosis factor in the amelioration of established collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **29**(91), 2762–2766, 1994), a proto byly navrženy jako léčiva pro revmatoidní arthritidu.
 30

Výraz „chronické nebo idiopatické zánětlivé střevní choroby“ zahrnuje alespoň dva stavy: Crohnovu chorobu a ulcerativní kolitidu. Obě jsou chorobami gastrointestinálního traktu, přičemž Crohnova choroba mnohem obvykleji postihuje tenké střevo. Pokud rovněž zahrnuje tlusté stře-
 35 vo, může být odlišení diagnózy od ulcerativní kolitidy (viz níže) problémem.

Chronický zánět a vytváření vředů při Crohnově chorobě obvykle začíná buď ucpaním tenkého střeva, nebo bolestí břicha, která se může podobat akutnímu zánětu slepého střeva; jiné projevy se mohou týkat jejích komplikací. Průběh onemocnění je chronický a může docházet ke zhorše-
 40 ním a zlepšením (remisi) nezávisle na léčení. K nástupu obvykle dochází v časně dospělosti, přibližně polovina všech případů začíná mezi 20 a 30 roky věku a 90 % mezi 10 a 40 lety. Postiženo je o něco více mužů než žen.

Mikroskopie odráží značné vnější příznaky. Projevy zánětu jsou nespojité; je ohniskový nebo ostrůvkovitý. Soustředění lymfocytů a plasmatických buněk jsou nalézána zejména v mukóze (sliznici) a submukóze, ovšem obvykle postihují všechny vrstvy (transmurální zánět). Klasickým mikroskopickým příznakem Crohnovy choroby je přítomnost granulárních buněk, obklopených manžetou lymfocytů. Výskyt idiopatického zánětlivého střevního onemocnění vykazuje značné geografické odchylky. Tato onemocnění se mnohem více vyskytují v severní Evropě a v USA,
 45 než v zemích jižní Evropy, Afriky, Jižní Ameriky a Asie, ačkoli zvýšení urbanizace a prosperity vede k vyššímu výskytu v částech jižní Evropy a v Japonsku (General and Systematic Pathology, Churchill Livingstone, 3. vydání, 2000, JCE Underwood, Ed.).
 50

U Crohnovy choroby existují klinicky dvě hlavní skupiny, z nichž první zahrnuje pacienty, jejichž choroba přechází do trvajících remisí během 3 let od počátku choroby a druhá zahrnuje pacienty, jejichž choroba přetrvává i po 3 letech.

- 5 Pokud se týká etiologie, existuje důkaz přetrvávání a nevhodné aktivace buněk T a makrofágů při Crohnově chorobě spolu se zvýšenou produkcí prozánětlivých cytokinů (zejména interleukinů (IL) 1, 2, 6 a 8, interferonu- γ a TNF- α). Crohnova choroba je charakterizována přetrvávajícím (chronickým) zánětem, doprovázeným fibrózou. Proces fibroblastické proliferace a ukládání kolagenu může být zprostředkován přeměnou růstového faktoru β , který má určité protizánětlivé účinky, zejména odvod fibroblastů, syntézu matrixu a regulaci ke snížení zánětlivých buněk, ale je pravděpodobné, že zmnoženo může být i mnoho dalších mediátorů.

- 15 Ulcerativní (vředovitá) kolitida je nespecifickou zánětlivou poruchou tlustého střeva, obvykle počínající v konečníku a bezprostředně se rozšiřující do různého rozsahu. Na rozdíl od Crohnovy choroby je ulcerativní kolitida omezena na tlusté střevo.

- 20 Existují narůstající důkazy, ukazující, že ulcerativní kolitida je důsledkem pozměněné autoimunitní reaktivity, ovšem poškození sliznice by rovněž mohlo vzniknout z nepatřičné aktivace buněk T a nepřímého poškození, způsobeného cytokiny, proteázami a metabolity reaktivního kyslíku z makrofágů a neutrofilů. Posledně uváděný mechanismus poškození střevního epitelu byl nazván poškozením typu „nevinného kolemjdoucího“ (innocent bystander injury). Důkazem ve prospěch autoimunity je přítomnost samoreaktivních lymfocytů T a autoprotilátek zaměřených vůči epiteliálním buňkám tlustého střeva a endoteliálním buňkám a antineutrofilních cytoplazmatických autoprotilátek (ANCA). Ovšem ulcerativní kolitida by neměla být brána jako autoimunitní onemocnění, v němž je poškození sliznice přímým důsledkem imunologické reakce na vlastní antigeny (General and Systematic Pathology, viz výše).

- 30 Pokud se týká léčby Crohnovy choroby, většina lidí je nejprve léčena léky s obsahem mesalaminu, látky, která pomáhá kontrolovat zánět. Pacienti, kterým tato léčba nepomáhá nebo kteří ji nesnášejí, mohou být převedeni na jiné látky s obsahem mesalaminu, obecně známé jako 5-ASA-činidla. Možné vedlejší účinky mesalaminových přípravků zahrnují nevolnost, zvracení, pálení žáhy, průjem a bolesti hlavy.

- 35 Někteří pacienti berou pro kontrolu zánětu kortikosteroidy. Tyto léky jsou nejúčinnější pro aktivní Crohnovu chorobu, ale mohou působit vážné vedlejší účinky, včetně větší citlivosti vůči infekci.

- 40 K léčbě Crohnovy choroby se také používají léky, potlačující imunitní systém. Nejběžněji se předepisují 6-merkaptopurin a odpovídající lék, azathioprin. Imunosupresivní činidla pracují tak, že blokují imunitní reakci, která přispívá k zánětu. Tyto léky mohou vyvolávat vedlejší účinky, jako jsou nevolnost, zvracení a průjem a mohou snižovat odolnost pacienta vůči infekci. Pokud jsou pacienti léčeni kombinací kortikosteroidů a imunosupresivních činidel, může být dávka kortikosteroidů případně snížena. Některé studie ukazují, že imunosupresivní léky mohou zvyšovat účinnost kortikosteroidů.

- 45 Americký úřad U.S. Food and Drug Administration schválil lék Infliximab k léčbě mírné až těžké Crohnovy choroby, která nereaguje na standardní léčby (mesalaminovými látkami, kortikosteroidy, imunosupresivními činidly) a pro léčení otevřených, drenážovaných píštělů. Infliximab, jehož první léčebné použití je schválené specificky pro Crohnovu chorobu, je monoklonální protilátkou vůči TNF (faktoru nekrózy tumoru). AntiTNF odstraňuje TNF z krevního oběhu před tím, než se dostane do střev, čímž předchází zánětu.

K léčbě bakteriálního přerůstání v tenkém střevu, vyvolaného zúžením, píštěl nebo předcházejícím chirurgickým zákrokem se používají antibiotika. Na tento běžný problém může lékař přede-

psat jedno nebo více z následujících antibiotik: ampicilin, sulfonamid, cephalosporin, tetracyklin nebo metronidazol.

Průjem a křečové bolesti břicha se často zmírňují s ústupem zánětu, ovšem přídatná medikace může být rovněž nezbytná. Použita mohou být různá protiprůjmová činidla, včetně difenoxylátu, Ioperamidu a kodeinu. Pacienti, kteří jsou vzhledem k průjmu dehydratováni, jsou obvykle léčeni tekutinami a elektrolyty.

Existuje tedy potřeba účinné terapie k léčbě a/nebo prevenci zánětlivých střevních onemocnění, zejména Crohnovy choroby a ulcerativní kolitidy, se sníženými vedlejšími účinky, nebo v ideálním případě dokonce bez vedlejších účinků.

Jak histologická, tak i imunologická pozorování ukazují, že buněčně zprostředkovaná imunita a aktivace buněk T jsou klíčovými rysy CD (Crohnovy choroby). Studie prováděné na lidech a na experimentálních modelech ukazují, že u CD má místní imunitní odpověď sklon být především typu Th1 (P. Desreumax, E. Brandt, L. Gambiez, D. Emilie, K. Geboes, O. Klein, N. Ectors, A. Cortot, M. Capron a JF. Colombel; Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease; *Gastroenterology* **113**, 118–126, 1997) a že místně uvolněné cytokiny, jako IFN- γ , IL-1 β a TNF- α přispívají k usnadnění a rozvoji zánětlivé odpovědi (J. M. Reimund, C. Wittersheim, S. Dumont, C. D. Muller, R. Baumann, P. Poindron a B. Duclos; Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease; *J. Clin. Immunol.* **16**, 144–150, 1996).

Cytokin IL-18 hraje důležitou roli v imunitní odpovědi zprostředkované Th1 ve spolupráci s cytokinem IL-12 stimulací sekrece IFN- γ , zvýšením cytotoxicity přirozeně zabíječských buněk a stimulací diferenciac buněk Th1 (S. Ushio se spoluautory; Cloning of the cDNA for human IFN- γ -inducing factor, expression of E. coli and studies on the biologic activities of the protein; *J. Immunol.* **156**, 4274–4279, 1996).

IL-18 působí společně s IL-12, IL-2, s antigeny, s mitogeny, a případně i s dalšími faktory k indukci produkce IFN- γ . IL-18 také zvyšuje produkci GM-CSF (faktoru stimulujícího vznik kolonií) a IL-2, zesiluje pomocí anti-CD3 indukovanou proliferaci buněk T a zvyšuje Fas-zprostředkované zabíjení přirozeně zabíječských buněk. Zralý IL-18 je ze svého prekursoru produkován účinkem enzymu, konvertujícího IL-1 β (ICE, kaspázy-1). Receptor IL-18 sestává z alespoň dvou složek, spolupracujících při vazbě ligandu. Vysokoafinitní a nízkoafinitní vazná místa pro IL-18 byla nalezena v myších buňkách T, stimulovaných IL-12 (T. Okamoto se spoluautory; Induction of Fas ligand and Fas antigen mRNA expressions in interferon- γ transgenic mouse liver; *Jpn. J. Pharmacol.* **78**(2), 233–235, 1998), což ukazuje na receptorový komplex s násobnými řetězci. Dosud byly identifikovány dvě receptorové podjednotky, obě patřící do skupiny receptorů IL-1 (T. Okamoto, K. Yamamura a O. Hino; The mouse interferon- γ transgene chronic hepatitis model (Review, *Int. J. Mol. Med.* **3**(5), 517–520, 1999). Signální transdukce IL-18 zahrnuje aktivaci NF- κ B (Matsumoto se spoluautory, 1997).

Nedávno bylo navrženo, že IL-18 má některé významy v zánětlivých střevních onemocněních (T. T. Pizzaro se spoluautory; IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells; *J. Immunol.* **162**, 6829–6835, 1999; G. Monteleone se spoluautory; Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease; *J. Immunol.* **163**, 143–147, 1999).

Pizzaro se spoluautory (1999) charakterizoval expresi a lokalizaci IL-18 u druhů tlustého střeva a izoloval populace slizničních buněk pacientů s Crohnovou chorobou. Za použití semikvantitativního uspořádání RT-PCR bylo nalezeno zvýšení IL-18 mRNA transkriptů v čerstvě izolovaných střevních epitelálních buňkách a mononukleárních buňkách slizničního vaziva pacientů s CD ve srovnání s ulcerativní kolitidou a s kontrolními pacienty bez zánětu. IL-18 mRNA trans-

kripty byly početnější ve střevních epiteliálních buňkách než v mononukleárních buňkách slizničního vaziva. Imunohistochemická analýza chirurgicky vyňatých tkání tlustého střeva lokalizovala IL-18 jak v mononukleárních buňkách slizničního vaziva (specificky v makrofázích a dendritických buňkách), tak i ve střevních epiteliálních buňkách. Analýza typu „Western blot“ odhalila, že pás o velikosti 18 300, odpovídající jak rekombinantní, tak i zralé lidské bílkovině IL-18, byl přítomen v převážné míře v biopsiích střevní sliznice pacientů s Crohnovou chorobou než s ulcerativní kolitidou. Druhý pás o velikosti 24 000, odpovídající inaktivnímu prekurzoru IL-18, byl detegován v nezánettivých oblastech jak biopsií pacientů s Crohnovou chorobou, tak i ulcerativní kolitidou a byl jedinou formou, nalezenou u nezánettivých kontrol.

Monteleone se spoluautory (1999) potvrdil tyto nálezy. Mononukleární buňky střevní tkáně celé sliznice a podslizničního vaziva (lamina propria) 12 pacientů s Crohnovou chorobou, 9 pacientů s ulcerativní kolitidou a 15 kontrol nevykazujících zánětlivé střevní onemocnění byly testovány vzhledem k IL-18 pomocí RT-PCR a analýzou typu „Western blot“. Transkripty IL-18 byly nalezeny ve všech testovaných vzorcích. Ovšem ve srovnání s pacienty s ulcerativní kolitidou a kontrolami bylo prokázáno zvýšené hromadění mRNA IL-18 v obou vzorcích mononukleárních buněk, ze sliznice i z podslizničního vaziva, pacientů s Crohnovou chorobou.

U Crohnovy choroby byly transkripty IL-18 mnohem četnější ve slizničních vzorcích, odebíraných z postižených oblastí. Pás o velikosti 18 000, odpovídající zralému IL-18, byl nalezen především ve slizničních vzorcích pacientů s Crohnovou chorobou. Ve slizničních vzorcích kontrol bez zánětlivého střevního onemocnění byl IL-18 přítomný jako polypeptid o velikosti 24000. V souladu s tím byla podjednotka IL-1 β -konvertujícího enzymu (ICE) (p20) exprimována ve vzorcích jak s Crohnovou chorobou, tak i pacientů s ulcerativní kolitidou, zatímco ve střevní sliznici kontrol bez zánětlivého střevního onemocnění byl ICE syntetizován pouze jako prekurzor (p45).

Dayer (J-M. Dayer, J. Clin. Inv. 104, 1337-1339, 1999) shrnul odlišné a částečně protichůdné funkce IL-18. Souhrnně je IL-18 pleiotropní interleukin, mající jak funkce zvyšující zánět, tak i funkce zánět uklidňující. Na jedné straně zvyšuje produkci prozánětlivých cytokinů jako TNF- α a tím napomáhá zánětu. Na druhé straně indukuje produkci NO, inhibitoru kaspázy-1 a tím blokuje zrání IL-1 β a IL-18 a případně tak zmírňuje zánět. Tato dvojznačná role IL-18 vážně zpochybňuje účinnost inhibitorů IL-18 v zánětlivých onemocněních. Nadto, vzhledem k vzájemnému působení ohromného množství různých cytokinů a chemokinů v regulaci zánětu, příznivý účinek v léčbě nebo v prevenci zánětlivých onemocnění blokováním pouze jednoho ze zúčastněných není pravděpodobný.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří použití inhibitoru interleukinu IL-18, IL-18 vazebného proteinu IL-18BP, pro přípravu léčiva k léčení nebo k prevenci alkoholické hepatitidy.

Současný vynález se rovněž zabývá použitím inhibitoru interleukinu IL-18, IL-18 vazebného proteinu IL-18BP, pro přípravu léčiva k léčení nebo k prevenci alkoholické hepatitidy, přičemž toto léčivo obsahuje kromě vazebného proteinu IL-18BP ještě další účinnou složku, kterou může být interferon α /nebo antagonist TNF α /nebo inhibitor cyklooxygenázy COX-2

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 zobrazuje histogram, znázorňující hladiny IFN- γ v séru (pg/ml) po injekci různých množství rekombinantní IL-18BP (0; 0,04; 0,4; 4,0 mg/kg) myším, jednu hodinu před injekcí lipopolysacharidu (LPS). Vzorky krve byly odebrány 5 hodin po injekci LPS a analyzovány testem ELISA vzhledem k IFN- γ v oběhu.

Obr. 2 zobrazuje histogram, znázorňující hladiny alanin-aminotransferázy (ALT) v séru. Myším byly injikovány rostoucí dávky lidské rekombinantní IL-18BP (0; 0,04; 0,4; 4,0 mg/kg), a to před injikací lipopolysacharidu myším, senzitivizovaným pomocí *P. acnes*. Vzorke krve byly odebírány 5 hodin po injikaci LPS a byly v nich měřeny hodnoty ALT v séru. SF = Sigma-Frankel: 1SF jednotka AST/ALT vytvoří $4,82 \times 10^{-4}$ μ mol glutamátu za minutu při pH 7,5 a teplotě 25 °C.

Obr. 3 znázorňuje dobu přežití myší po injikaci LPS. Myším byly injikovány různé dávky lidské rekombinantní IL-18BP (0; 0,04; 0,4; 4,0 mg/kg), a to 20 minut před injikací lipopolysacharidu myším, senzitivizovaným pomocí *P. acnes*. Trojúhelníčky: 4 mg/kg; malý kosočtverec: 0,4 mg/kg; velký kosočtverec: 0,04 mg/kg; plná kolečka: žádný IL-18BP (jen LPS).

Obr. 4 znázorňuje hladiny IFN- γ v séru, měřené 5 hodin po injikaci různých množství IL-18BP (0; 0,4; 4 mg/kg), které byly podány 20 minut před injikací LPS myším senzitivizovaným pomocí *P. acnes*.

Obr. 5 znázorňuje dobu přežití myší, jímž bylo injikováno buď polyklonální IL-18 antisérum, nebo normální králíčí sérum (NRS = kontroly) 30 minut před injikací 40 mg/ml (letální dávka) LPS, získaného z *E. coli* (obr. 5A) nebo z *S. typhimurium* (obr. 5B). Trojúhelníčky: myši, jímž bylo injikováno IL-18 antisérum; plná kolečka: myši injikované NRS. Na ose x jsou vyznačeny dny po stimulaci LPS.

* $p < 0,05$.

Obr. 6 zobrazuje histogram, znázorňující průměr + střední chybu průměru SEM po 5 myších ve skupině, léčených následujícím způsobem. Myším bylo injikováno do břišní dutiny (i.p.) buď antiserum anti-IL-18, rozpustné receptory TNF- α (TNFRp55), nebo vehikulum (fyziologický roztok) a bezprostředně poté jim byl nitrožilně (i.v.) podán konkanavalin A (Con A, Obr. 6A) nebo PEA (*Pseudomonas aeruginosa*, obr. 6B).

** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vůči Con A nebo PEA samotným; # $p < 0,001$ vzhledem k TNFRp55 nebo anti-IL-18 faktoriálu ANOVA.

Obr. 7 znázorňuje účinek IL-18BP na klinická hodnocení (skóre) u myšího modelu artritidy. Obr. 7a znázorňuje diagram, vyjadřující klinická hodnocení, měřená po denním podávání různých množství IL-18BP nebo IFN- γ nebo vehikula (NaCl) myším způsobem i.p. Použité symboly jsou: Plné trojúhelníčky: 10 000 IU IFN- β ; prázdné trojúhelníčky: 10 mg/kg IL-18BP, převrácené trojúhelníčky: 3 mg/kg IL-18BP; prázdné čtverečky: 0,25 mg/kg IL-18BP; plné čtverečky: NaCl. Dny podávání jsou vyjádřeny na ose x, klinické hodnocení (průměrné hodnoty) jsou vyjádřeny na ose y. Statistika byla počítána testem Mann Whitney. Obr. 7B znázorňuje histogram, vyjadřující AUC (plochu pod křivkou), získanou z grafu na obr. 7A; n = počet zvířat.

Obr. 8 znázorňuje účinek IL-18 BP na otok tlapek. Obr. 8A zobrazuje diagram, znázorňující výsledky, získané měřením tloušťky tlapky (otoku) nemocí postižených zadních tlapek jednotlivých zvířat, léčených různým množstvím IL-18BP. Osa y znázorňuje změny tloušťky tlapky v milimetrech od začátku léčby. Použití symboly jsou stejné jako u obr. 7. Obr. 8B znázorňuje histogram, vyjadřující AUC, získanou z obr. 8A; n = počet zvířat.

Obr. 9 vyjadřuje analýzu počtu zadních tlapek postižených nemocí v průběhu akutní artritidy, tj. rozšíření onemocnění na další klouby. Symboly jsou: plné čtverečky: NaCl (kontroly; trojúhelníčky: 10 mg/kg IL-18BP, převrácené trojúhelníčky: 3 mg/kg IL-18BP; kosočtverečky: 1 mg/kg IL-18BP; kolečka: 0,5 mg/kg IL-18BP a prázdné čtverečky: 0,25 mg/kg IL-18BP.

Obr. 10 zobrazuje histogram, znázorňující hodnocení rozpadu (eroze) chrupavky kloubů postižených chorobou.

Obr. 11 zobrazuje histopatologii myších kloubů. Na konci pokusu byla odpreparována packa, na níž se jako první rozvíjela arthritida, byla fixována a zpracována tak, jak je popsáno níže v Příkladu 10. Obr. 11A: normální myší kloub; obr. 11B: kloub arthritické myši; obr. 11C: kloub myši léčené rhIL-18BP.

5

Obr. 12 zobrazuje histogram, znázorňující hladiny protilátek proti kolagenu typu II (anti-collagen type II) isotypu IgG1 (prázdné sloupce) nebo IgG2a (šrafované sloupce) u myší, léčených IL-18BP v dávce 3 mg/kg, nebo fyziologickým roztokem (vehikulem). Měření byla prováděna v den 4 (D4) nebo v den 8 (D8) onemocnění.

10

Obr. 13 zobrazuje histogram, znázorňující hladiny IL-6 v pg/ml u zvířat, léčených IL-18BP v dávce 1, 3 nebo 10 g/kg, 10 000 IU interferonu- β (IFN- β), normálním myším sérem (NMS) nebo fyziologickým roztokem (NaCl).

15

Obr. 14 znázorňuje expresi hIL-18BP a IL-18 mRNA transkriptů ve střevních biopsiích pacientů s aktivní Crohnovou chorobou, ulcerativní kolitidou nebo normálních zdravých jedinců. Reprezentativní produkty RT-PCR jsou znázorněny pro IL-18BP, pro IL-18 a pro provozní „house-keeping“ gen (β -aktin) (Obr. 14A). Poměrná kvantifikace ethidiumbromidem obarvených pruhů byla provedena za použití Kodak Digital Imaging Software a je uvedena jako poměr cílového genu a β -aktinu. Cílový gen je IL-18 na obr. 14B a IL-18BP na obr. 14C.

20

Obr. 15 znázorňuje expresi hIL-18BP mRNA transkriptů, expresi bílkoviny z HUVECs (endoteliálních buněk z lidské pupečnickové krve, human umbilical vein endothelial cells) a expresi bílkoviny z THP1 (lidské linie monocytů). RNA byla izolována z neovlivněných endoteliálních buněk (médiu) a z endoteliálních buněk stimulovaných IL-1 β , TNF- α , IFN- γ nebo HUVEC (obr. 15 B) nebo THP1 (obr. 15C) byl analyzován vzhledem k produkci bílkoviny IL-18BP a IL-18 v testu ELISA.

25

Obr. 16 znázorňuje vývoj tělesné hmotnosti mezi dnem 1 a dnem 10 u myšího modelu IBD (střevního zánětlivého onemocnění) po podání do břišní dutiny (i.p.) buď fyziologického roztoku (NaCl), nebo IL-18BP (8 mg/kg). Změna hmotnosti je vyjádřena v procentech změny tělesné hmotnosti od dne 1. Vyneseny jsou průměrné hodnoty a střední chyba průměru (SEM) dvou skupin, zahrnujících 8 zvířat na skupinu.

30

Obr. 17 znázorňuje výsledky analýzy tlustého střeva, ocasních lymfatických žláz a sleziny, získaných od myší léčených IL-18BP a neléčených IBD myší. Obr. 17 A zobrazuje hmotnost posledních 6 cm tlustého střeva v mg. Obr. 17 B znázorňuje celkové množství buněk, přítomných v ocasní lymfatické žláze. Obr. 17 C zobrazuje procentní množství buněk, pozitivně se barvících vzhledem k CD4⁺/CD69⁺ ve slezině. Údaje představují průměrné hodnoty a SEM; * vyjadřuje významnou odchylku.

35

Obr. 18 znázorňuje množství IFN- γ (obr. 18 A a 18 B) a TNF- α (obr. 18 C a 18 D), produkované po 48 hodinách buňkami ocasní lymfatické žlázy (obr. 18 A a C) a slezinnými buňkami (obr. 18 B a D) po stimulaci účinkem CD3/CD28, přítomnými v supernatantech. Uvedeny jsou průměrné hodnoty a SEM.

40

Obr. 19 znázorňuje obsah TNF- α (obr. 19 A) a IFN- γ (obr. 19 B) v homogenátech tlustého střeva. Údaje jsou korigovány vzhledem ke hmotnosti tlustého střeva. Uvedeny jsou průměrné hodnoty a SEM; * vyjadřuje významnou odchylku.

45

Předkládaný vynález se zakládá na objevu příznivého účinku inhibitoru IL-18 při různých onemocněních a poruchách.

50

Výraz „inhibitor IL–18“ se v kontextu tohoto vynálezu vztahuje k jakékoli molekule, modulující produkci IL–18 a/nebo jeho akci takovým způsobem, že tato produkce IL–18 a/nebo akce je oslabena, snížena, nebo částečně, podstatně či úplně blokována anebo se jí částečně, podstatně či úplně předejde. Výraz „inhibitor IL–18“ je zamýšlen k zahrnutí inhibitorů produkce IL–18, stejně jako inhibitorů akce, působení IL–18.

Inhibitorem produkce může být jakákoli molekula, negativně ovlivňující syntézu, zpracování, nebo zrání IL–18. Inhibitory, uvažovanými podle vynálezu, mohou být například supresory genové exprese interleukinu 18, mRNA s opačným významem (antisense mRNA), redukující nebo zabraňující transkripci IL–18 mRNA nebo vedoucí k degradaci (rozpadu) mRNA, bílkoviny poškozující správné skládání nebo částečně či úplně zabraňující sekreci IL–18, proteázy degradující IL–18, jakmile byl jednou syntetizován, inhibitory proteáz štěpících pro–IL–18 k vytvoření zralého IL–18, jako jsou inhibitory kaspázy–1 a podobně.

Inhibitorem působení IL–18 může být například antagonist IL–18. Antagonisté mohou buď vázat, nebo sekvestrovat molekulu IL–18 samotnou s dostatečnou afinitou a specifíčností k úplnému nebo podstatnému neutralizování IL–18 nebo vazebného místa (vaz. míst) IL–18, odpovědného (odpovědných) za vazbu IL–18 na jeho ligandy (jako například na jeho receptory). Antagonista může také inhibovat signální dráhu IL–18, která se aktivuje v buňkách během vazby IL–18 receptoru.

Inhibitory IL–18 mohou být také rozpustné receptory IL–18 nebo molekuly napodobující receptory, nebo činidla, blokující receptory IL–18, anebo protilátky vůči IL–18, jako polyklonální nebo monoklonální protilátky, nebo jakékoli jiné činidlo či molekula, předcházející vazbě IL–18 na její cílovou strukturu, a tím zmenšující nebo předcházející spuštění intracelulárních nebo extracelulárních reakcí, zprostředkovaných IL–18.

Podle prvního aspektu předkládaného vynálezu jsou inhibitory IL–18 používány k výrobě léčiva pro léčbu a/nebo prevenci jaterního poškození. Vynález se s výhodou týká použití inhibitoru IL–18 pro výrobu léčiva pro léčbu a/nebo prevenci akutních a chronických jaterních onemocnění a ještě lépe alkoholické hepatitidy, virové hepatitidy, imunitní hepatitidy, fulminantní (prudce vzplanuvší) hepatitidy, jaterní cirhózy a primární biliární cirhózy.

Výraz „jaterní poškození“, nebo jaterní choroba, jak je zde používán, zahrnuje množství různých patologických stavů. Některé stavy, uvažované v předkládaném vynálezu, byly podrobně vysvětleny v předcházejícím oddílu „Dosavadní stav techniky“. Další jaterní onemocnění, která mohou být léčena a/nebo jim lze předcházet podle vynálezu, zahrnují například pyrogenní jaterní absces. Nazývá se rovněž „bakteriální játra“ a jde o dutinu, vytvářející hnis uvnitř jater. Příčiny jaterního abscesu jsou mnohé. Může se vyvinout z břišní infekce jako z apendicitidy (zánětu slepého střeva), divertikulitidy, nebo perforace střeva; z infekce v krvi; z infekce v biliárním, žlučovém traktu (jaterní sekrece); nebo z traumatu, kdy se pohmožděná játra stanou infikovanými. Nejběžnějšími organismy, vyvolávajícími jaterní absces, jsou *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* a *Enterobacter aerogenes*. Výskyt je 1 případ na 10 000 lidí.

Alkoholická jaterní onemocnění mohou být léčena a/nebo jim lze předcházet za použití inhibitorů IL–18 podle vynálezu. Zahrnují akutní nebo chronický zánět jater, indukovaný nadužíváním alkoholu. Alkoholická hepatitida obvykle nastává po letech nadměrného pití alkoholu. Čím delší je doba požívání alkoholu a čím větší je spotřeba alkoholu, tím větší je pravděpodobnost rozvoje jaterního onemocnění. Rozvíjí se podvýživenost jako výsledek bezvýznamných (prázdných) kalorií z alkoholu, snížené chuti k jídlu a špatné absorpce (neodpovídající adsorpce živin ze střevního traktu). Podvýživenost přispívá k jaternímu onemocnění. K rozvoji alkoholického jaterního onemocnění rovněž přispívají toxicita ethanolu vzhledem k játrům, individuální citlivost vůči alkoholem indukovanému jaternímu onemocnění a genetické faktory.

Podle předkládaného vynálezu může být jaterní cirhóza léčena a/nebo jí lze předcházet použitím inhibitorů IL-1. Cirhóza je chronickým jaterním onemocněním, které vyvolává poškození jaterní tkáně, zjizvení jater (fibrózu, modulární regeneraci), progresivní snížení funkce jater, nadbytečnou tekutinu v břiše (ascites, vodnatelnost břišní), poruchy krvácivosti (koagulopatii), zvýšený tlak v krevních cévách (portální hypertenze) a poruchy mozkových funkcí (hepatickou encefalopatii). Poškozená a zjizvená játra se stávají neschopnými patřičně odstraňovat odpadní produkty (toxiny) z krve a vytváření jizvové tkáně vede ke zvýšenému tlaku (portální hypertenzi) v žilách mezi střevy a slezinou a játry. Nadměrné požívání alkoholu je hlavní příčinou cirhózy. Další příčiny zahrnují infekce (jako hepatitidu), cystickou fibrózu a zvýšenou absorpci železa a mědi.

Typ cirhózy závisí na příčině onemocnění. Komplikace cirhózy mohou být těžké. Ve Spojených státech je cirhóza devátou hlavní příčinou smrti. Mohou se rozvíjet neurologické obtíže (jako hepatická encefalopatie). Zvýšené shromažďování tekutiny v břišní dutině (ascitus) je vyvoláno úbytkem tělní bílkoviny, nárůstem sodíku a zvýšeným tlakem v jaterních krevních cévách (portální hypertenzi). Portální hypertenze vyvolává zvýšený tlak, objem a plnost krevních cév v jícnu (jícnové žilní městky). Mohou nastat obtíže s krvácením a srážlivostí. Rostoucí tlaky v krevních cévách a problémy srážlivosti krve mohou zvýšit možnost prudkého a život ohrožujícího krvácení.

Další poruchou, která je zde zahrnována pod výraz „jaterní poškození“ podle předkládaného vynálezu, je autoimunitní hepatitida. Jedná se o zánět jater, vyvolaný vzájemnou interakcí s imunitním systémem. Autoimunitní hepatitida je typem chronicky aktivní hepatitidy. Příčinou chronicky aktivní hepatitidy mohou být buněčné imunitní reakce. V krvi pacientů s chronicky aktivní hepatitidou může být nalezeno množství různých cirkulujících autoprotilátů. S chronicky aktivní hepatitidou mohou být spojena další imunitní onemocnění, nebo se mohou vyskytnout u příbuzných pacientů s chronicky aktivní hepatitidou. Těmito onemocněními jsou zánět štítné žlázy, cukrovka (diabetes mellitus), ulcerativní kolitida, Coombs–pozitivní hemolytická anémie, proliferativní glomerulonefritida a Sjogrenův syndrom. Rizikové faktory mohou zahrnovat toto onemocnění, nebo rizikové faktory spojené s chronicky aktivní hepatitidou. Výskyt představuje 4 případy na 10 000 lidí.

Neprůchodnost žlučovýchodů je další poruchou, patřící do rozsahu výrazu „jaterní poškození“. Jedná se o ucpání žlučovýchodů, způsobené poruchou jejich normálního vývoje před narozením (v děloze). Neprůchodnost žlučovýchodů (biliární atrezie) je způsobena nenormálním a nedostatečným vývojem žlučovýchodů v játrech nebo mimo játra. Účelem žlučového systému je odstraňování odpadních produktů z jater a přivádění žlučových solí, nezbytných pro trávení tuků, do tenkého střeva. Při tomto stavu je tok žluči z jater do žlučníku blokován. To může vést k poškození jater a cirhóze jater, která, pokud není léčena, je nakonec smrtelná.

Podle tohoto vynálezu se inhibitory IL-18 rovněž používají k výrobě léčiva pro léčbu a/nebo prevenci chronicky aktivní hepatitidy, nazývané také chronickou agresivní hepatitidou. Je to trvalý zánět jater, který poškozuje jaterní buňky. Příčiny chronické aktivní hepatitidy zahrnují virové infekce, reakce a/nebo užívání drog, metabolické poruchy nebo autoimunitní onemocnění. Rovněž může jít o nepříliš zřejmé příčiny. Onemocnění je charakterizováno nekrózou nebo odumřelím jaterních buněk, aktivním zánětem a fibrózou, což může vést k selhání jater, cirhóze a smrti. Výskyt je 1 případ na 10 000 lidí. Rizikovými faktory jsou autoimunitní onemocnění, dřívější infekce hepatitidou C, nebo přítomnost pozitivních antigenů vzhledem k hepatitidě A nebo hepatitidě B po dobu přes 6 měsíců.

Mírnou, nerozvíjející se formou jaterního zánětu je chronická přetrvávající hepatitida, která je rovněž onemocněním, zahrnovaným pod výraz „jaterní poškození“ podle předkládaného vynálezu.

Podle tohoto vynálezu jsou inhibitory IL-18 používány také k výrobě léčiva pro léčbu a/nebo prevenci primární biliární cirhózy (PBC). PBC je zánětlivým stavem, který vzniká ucpáním toku

žluči v játrech, což vyvolává poškození jaterních buněk. Žlučovody v játrech se stanou zánětlivými z neznámých příčin. Onemocnění postihuje nejčastěji ženy středního věku. Nástup příznaků je postupný a prvním příznakem je svědící kůže. Nastává zánět žlučovodů v játrech a nakonec se rozvíjí jaterní cirhóza. Onemocnění může být spojeno s autoimunitními poruchami. Výskyt představuje 8 případů na 100 000 lidí. Zde uvažované inhibitory IL-18 mohou být použity také k léčbě akutní jaterní otravy, způsobené například vysokým množstvím paracetamolu. Taková akutní jaterní otrava může být způsobena předávkováním paracetamolem, ať už náhodným nebo úmyslným.

Jak je ukázáno níže na příkladech, autoři tohoto vynálezu překvapivě zjistili, že inhibitory IL-18 jsou zvláště účinné v prevenci a léčbě náhle vzplanuvší hepatitidy (akutní hepatitidy). Proto se vynález s výhodou týká prevence a/nebo léčby akutní (fulminantní) hepatitidy.

Podle druhého aspektu předkládaného vynálezu se inhibitory IL-18 používají k výrobě léčiva pro léčbu a/nebo prevenci artritidy.

Výraz „arthritis“, jak je zde používán, zahrnuje veškeré různé typy artritidy a arthritické stavy jak akutní, tak i chronické artritidy, jak jsou definovány například na domácí stránce Ortopedického oddělení University of Washington o arthritidě (www.orthop.washington.edu). Příklady arthritických stavů jsou ankylozní spondylitida (zánět obratlů), bolesti zad, karpální depoziční syndrom, Ehlers–Danlosův syndrom, dna, juvenilní artritida, lupus erythematosus, myozitida, vrozená lomivost kostí (osteogenesis imperfecta), osteoporóza, polyarthritis, polymyozitida (zánět svalů), lupénková artritida, Reiterův syndrom, sklerodermie, artritida se střevním onemocněním, Behcetova choroba, dětská artritida, degenerativní onemocnění kloubů, fibromyalgie, infekční artritida, Lymeovo onemocnění, Marfanův syndrom, osteoarthritis, osteonekróza, Pagetova choroba, revmatická polymyalgie, pseudodna, degenerace (dystrofie) sympatického reflexu, revmatismus, Sjogrenův syndrom, rodově dědičná adenomatózní polypóza a podobně.

S výhodou, podle vynálezu, jsou inhibitory IL-18 poskytovány k léčbě a/nebo prevenci zánětlivé artritidy. Zánětlivá artritida je klasifikována podle přetrvávajícího, stálého nebo opakujícího se průběhu onemocnění jako chronická artritida.

V upřednostněném ztělesnění vynálezu je zánětlivou arthritidou revmatoidní artritida (RA). RA vyvolává zánět výstelky kloubů (synoviální membrány, jednobuněčné vrstvy epitelu) a/nebo vnitřních orgánů. Onemocnění má sklon přetrvávat po mnoho let, typicky postihuje mnoho různých kloubů v celém těle a nakonec působí poškození chrupavek, kostí, šlach a vaziva. Klouby, které mohou být postiženy RA, jsou klouby umístěné například v krku, ramenou, loktech, kyčlích, zápěstích, rukou, kolenou, kotnících a v nohou. V mnoha případech jsou při RA klouby zánětem postiženy v symetrickém rozložení.

RA je převažující u 1 % populace Spojených států, rozprostírá se ve všech etnických skupinách a je zastoupena v každém věku. Vyskytuje se po celém světě a ženy převyšují mezi postiženými RA muže v poměru 3:1.

Jak je znázorněno níže na příkladech, bylo ověřeno, že inhibitor IL-18 vykazuje vysoce účinný přínosný účinek na destrukci chrupavky. Proto se vynález dále týká použití inhibitoru IL-18 k výrobě léčiva pro léčbu a/nebo prevenci destrukce chrupavky, tj. použití inhibitoru IL-18 jako chondroprotektivního činidla. Inhibitor IL-18 může být použit při jakémkoliv stavu, při němž dochází k destrukci nebo erozi chrupavky. Destrukce chrupavky je progresivní úpadek strukturní integrity spojovací kloubní chrupavky. K tomu dochází například při stavech, poškozujících kloubní chrupavku, jako je revmatoidní artritida, juvenilní revmatoidní artritida nebo osteoarthritis, ale také například při infekční synovitidě.

Třetí aspekt předkládaného vynálezu se týká použití inhibitoru IL-18 pro výrobu léčiva k léčbě a/nebo prevenci zánětlivého střevního onemocnění. Je založen na zjištění, že inhibitor IL-18 je

vypnut v zánětlivé mukóze pacientů s Crohnovou chorobou. Dále je založen na zjištění, že podávání odlišných inhibitorů IL-18 vykazuje ochranný účinek u kolitidy na myším modelu.

Útlum IL-18 v chorobou postižené mukóze pacientů s Crohnovou chorobou byl již popsán (G. Monteleone se spoluautory, 1999); T. T. Pizarro se spoluautory, 1999).

Po prokázání přítomnosti velkých množství IL-18BP v zánětlivých oblastech střevní mukózy podle vynálezu bylo ještě daleko překvapivější nalezení přínosného účinku IL-18BP, podávané systematicky, na rozvoj a příznaky kolitidy živočišného modelu. Ačkoliv IL-18BP je již endogenně potlačována ve střevu CD pacientů, jak bylo prokázáno v níže uvedených příkladech, množství IL-18BP, které je tělo schopné vytvořit, se zdá nedostačovat k boji s touto chorobou.

Podle vynálezu je s výhodou zánětlivým střevním onemocněním Crohnova choroba nebo ulcerativní kolitida.

V upřednostňovaném ztělesnění předkládaného vynálezu je inhibitor IL-18 zvolen z inhibitorů kaspázy-1 (ICE), protilátek namířených vůči IL-18, protilátek namířených vůči kterékoliv z podjednotek receptoru IL-18, z inhibitorů signální dráhy IL-18, z antagonistů IL-18, které kompetují s IL-18 a blokují receptor IL-18 a z vazebných bílkovin IL-18, izoform, muteinů, spojených bílkovin, funkčních derivátů, aktivních frakcí nebo oběhem pozměněných derivátů, majících stejnou aktivitu.

Výraz „vazebné bílkoviny IL-18“ je zde používán jako synonymum „IL-18BP“. Zahrnuje vazebné bílkoviny IL-18, jak byly definovány ve WO 99/09 063 nebo Novickem se spoluautory, 1999, včetně sestřihových variant a/nebo izoform vazebných bílkovin IL-18, jak bylo definováno Kimem se spoluautory (S. H. Kim, M. Eizenstein, L. Reznikov, G. Fantuzzi, D. Novick, M. Rubinstein a C. A. Dinarello; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 1190–1195, 2000). Zejména lidské izoformy α a β vazebných bílkovin IL-18 jsou vhodné ve spojitosti s předkládaným vynálezem. Bílkoviny, hodící se podle tohoto vynálezu, mohou být glykosylovány nebo neglykosylovány, mohou být získány z přírodních zdrojů jako je moč, nebo mohou být s výhodou vyráběny rekombinantně. Rekombinantní exprese může probíhat v prokaryotických expresních systémech jako v *E. coli*, v eukaryotických systémech, s výhodou v savčích expresních systémech.

Tak, jak je zde použit, se výraz „muteiny“ vztahuje k analogům IL-18BP, nebo analogům virových IL-18BP, v nichž jsou jeden nebo více z aminokyselinových zbytků přírodních IL-18BP nebo virových IL-18BP nahrazeny odlišnými aminokyselinovými zbytky, nebo jsou odstraněny, anebo je jeden nebo více z aminokyselinových zbytků přidán k přirozené sekvenci IL-18BP, nebo virových IL-18BP, bez podstatné změny aktivity výsledných produktů ve srovnání s divokým typem IL-18BP nebo virových IL-18BP. Tyto muteiny jsou připraveny známými syntetickými postupy a/nebo stranově řízenými postupy mutagenese, nebo jakýmkoliv známými technikami, které jsou k tomu vhodné.

Kterýkoliv z takových muteinů má s výhodou sekvenci aminokyselin dostatečně duplikativní vzhledem k sekvenci IL-18BP, nebo dostatečně duplikativní vzhledem k sekvenci virových IL-18BP, tak, aby měl v podstatě podobnou aktivitu jako IL-18BP. Jednou z aktivit IL-18BP je schopnost vazby IL-18. Pokud má mutein podstatnou vazebnou aktivitu vzhledem k IL-18, může být použit k vyčištění IL-18, jako prostřednictvím afinitní chromatografie a může být tedy považován za mající v podstatě podobnou aktivitu jako IL-18BP. Zda má kterýkoliv daný mutein v podstatě stejnou aktivitu jako IL-18BP může být tedy určeno pomocí rutinních experimentů, které zahrnují podrobení takového muteinu například jednoduchému sendvičovému kompetitivnímu stanovení, který určí, jestli se váže na vhodně označený IL-18, jako je radioimunoassay nebo stanovení ELISA.

Muteiny polypeptidů IL-18BP nebo muteiny virových IL-18BP, které lze použít podle předkládaného vynálezu, nebo nukleové kyseliny, které je kódují, zahrnují konečnou sadu v podstatě

odpovídajících sekvencí jako substitučních peptidů nebo polynukleotidů, které mohou být rutinně získány odborníkem v oboru bez dalšího bádání, na základě poznatků a postupů zde popsanych.

Upřednostňovanými změnami muteinů podle předkládaného vynálezu jsou ty, které jsou známe jako „konzervativní“ substituce. Konzervativní aminokyselinové substituce (náhrady) polypeptidů IL-18BP nebo bílkovin virových IL-18BP, mohou zahrnovat synonymní aminokyseliny, patřící do skupiny, mající dostatečně podobné fyziologické vlastnosti, aby substituce mezi členy skupiny uchovala biologickou funkci molekuly (Grantham; Science 185, 862–864, 1974). Je zřejmé, že ve výše definovaných sekvencích mohou být provedeny také inserce a delece aminokyselin bez změny jejich funkčnosti, zvláště pokud inserce nebo delece zahrnují pouze několik aminokyselin, například méně než 30 a s výhodou méně než 10 a nedojde k odstranění nebo přemístění aminokyselin, které jsou kritické pro funkční konformaci, například cysteinových zbytků. Bílkoviny a muteiny, vyrobené takovými delecemi a/nebo insercemi, spadají do rozsahu předkládaného vynálezu.

Synonymními aminokyselinovými skupinami jsou s výhodou ty, definované v tabulce I. Výhodnější jsou synonymními aminokyselinovými skupinami ty, které jsou definované v tabulce II a nejvýhodnější jsou synonymními aminokyselinovými skupinami ty, které jsou definované v tabulce III.

Tabulka I

Upřednostňované skupiny synonymních aminokyselin

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

Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

Tabulka II

5

Upřednostňované skupiny synonymních aminokyselin

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

Tabulka III

Nejupřednostňovanější skupiny synonymních aminokyselin

5

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

10 Příklady produkce aminokyselinových substitucí v bílkovinách, které lze použít k získání muteinů polypeptidů nebo bílkovin IL-18BP, anebo muteinů virových IL-18BP pro použití v předkládaném vynálezu, zahrnují kroky kteréhokoliv známého postupu, jak jsou předloženy v patentech US RE 33 653, US 4 959 314, US 4 588 585 a US 4 737 462 Marka a spoluautorů; US 5 116 943, Kothse a spoluautorů; US 4 965 195 Namena a spoluautorů; US 4 879 111 Chonga a spoluautorů a US 5 017 691 Leehe a spoluautorů; a lysinem substituované bílkoviny, popsané v patentu US 4 904 584 Shawa a spoluautorů.

15

Výraz „spojená bílkovina“ (fúzní protein) se vztahuje k polypeptidu obsahujícímu IL-18BP, nebo virové IL-18BP, nebo mutein či jeho fragment, spojené s jinou bílkovinou, která má například zvýšenou dobu přetrvání v tělních tekutinách. IL-18BP nebo virové IL-18BP tedy mohou být spojeny s jinou bílkovinou, polypeptidem nebo podobně, například imunoglobulinem nebo jeho fragmentem.

20

„Funkční deriváty“, jak jsou zde užity, zahrnují deriváty IL-18BP nebo virové IL-18BP a jejich muteiny a spojené bílkoviny, které mohou být připraveny z funkčních skupin, které se vyskytují jako vedlejší řetězce na zbytcích N-nebo C-koncových skupin, pomocí prostředků známých v oboru a jsou zahrnuty do rozsahu vynálezu, pokud zůstávají farmaceuticky přijatelnými, tj. nepoškozují aktivitu bílkoviny, která je v podstatě stejná jako aktivita IL-18BP nebo virových IL-18BP a nepropůjčují prostředkům, které je obsahují, toxické vlastnosti.

Takové deriváty mohou například zahrnovat polyethylenglykolové vedlejší řetězce, které mohou maskovat antigenní místa a prodlužovat dobu přetrvání IL-18BP nebo virových IL-18BP v tělních tekutinách. Jiné deriváty zahrnují alifatické estery karboxylových skupin, amidy karboxylových skupin získané reakcí s amoniakem nebo s primárními či sekundárními aminy, N-acylové deriváty volných aminokyselin, aminokyselinových zbytků vytvořených s acylovými částicemi (například alkanoyl nebo karbocyklické aroylové skupiny) nebo O-acylové deriváty volných hydroxylových skupin (například deriváty serylových nebo threonylových zbytků), vytvořených s acylovými částicemi.

Jako „aktivní frakce“ IL-18BP nebo virových IL-18BP, muteinů a spojených bílkovin zahrnuje předkládaný vynález jakýkoliv fragment nebo prekurzor polypeptidového řetězce bílkovinné molekuly samotné nebo společně s připojenými molekulami či na ně vázanými zbytky, například cukernými nebo fosfátovými zbytky, nebo agregáty bílkovinné molekuly nebo cukerní zbytky samy o sobě, za předpokladu, že uvedená frakce má v podstatě stejnou aktivitu jako IL-18BP.

V ještě dalším upřednostňovaném ztělesnění vynálezu je inhibitory IL-18 protilátka vůči IL-18. Protilátka vůči IL-18 (anti-IL-18 antibody) mohou být polyklonální nebo monoklonální, chimerické, humanizované nebo dokonce plně humánní. Rekombinantní protilátky a fragmenty jsou charakterizovány vysoce afinitní vazbou k IL-18 za podmínek *in vivo* a nízkou toxicitou. Protilátky, které mohou být použity podle vynálezu, jsou charakterizovány schopností léčit pacienty po dobu, dostačující k poskytnutí dobré až vynikající regrese nebo zmírnění patogenního stavu či jiného příznaku nebo skupiny příznaků, vztahujících se k patogennímu stavu a nízkou toxicitou.

Neutralizující protilátky lze snadno vyvolat u zvířat, jako jsou králíci, kozy nebo myši imunizací prostřednictvím IL-18. Imunizované myši jsou zvláště vhodné k poskytnutí zdrojů buněk B pro výrobu hybridomů, které jsou naopak kultivovány k produkci velkých množství monoklonálních protilátek vůči IL-18.

Chimerickými protilátkami jsou imunoglobulinové molekuly, charakterizované dvěma nebo více segmenty či částmi, získanými z různých živočišných druhů. Obecně je variabilní oblast chimerické protilátky získána z nehumánní savčí protilátky, jako z myší monoklonální protilátky a konstantní oblast imunoglobulinu je získána z humánní (lidské) imunoglobulinové molekuly. Obě oblasti i jejich kombinace mají s výhodou nízkou imunogenitu, jak je rutinně stanoveno (M. J. Elliott, R. N. Maini, M. Feldmann, A. Long-Fox, P. Charles, H. Bijl a J. N. Woody, Lancet 344, 1125–1127, 1994). Humanizované protilátky jsou imunoglobulinové molekuly, vytvořené technikami genetického inženýrství, při nichž jsou myší konstantní oblasti nahrazeny lidskými při zachování myších oblastí navazujících antigen. Výsledné myší-lidské chimerické protilátky mají s výhodou sníženou imunogenitu a zlepšené farmakokinetické vlastnosti u lidí (D. M. Knight se spoluauctory; Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody; Mol. Immunol 30(16), 1443–1453, 1993).

V dalším upřednostňovaném ztělesnění je tedy protilátkou vůči IL-18 humanizovaná protilátka vůči IL-18. Upřednostňované příklady humanizovaných protilátek vůči IL-18 jsou popsány například v Evropské patentové přihlášce EP 0 974 600.

V ještě dále upřednostňovaném ztělesnění je protilátka vůči IL-18 plně humánní. Postup výroby lidských protilátek je popsán podrobně například ve WO 00/76 310, WO 99/53 049,

US 6 162 963 nebo AU 533 61 00. Plně humánní protilátky jsou s výhodou rekombinantní protilátky, produkované u transgenních zvířat například xenomyší, zahrnující celé funkční lidské Ig lokusy, nebo jejich části.

- 5 Inhibitorem IL-18 je ve vysoce upřednostňovaném ztělesnění předkládaného vynálezu IL-18BP, nebo izoforma, mutein, spojená bílkovina, funkční derivát, aktivní frakce nebo v oběhu pozměněný derivát aktivní frakce. Tyto izoformy, muteiny, spojené bílkoviny nebo funkční deriváty vykazující přetrvávající biologickou aktivitu IL-18BP, zejména vazbu na IL-18, a s výhodou mají v podstatě alespoň aktivitu podobnou IL-18BP. V ideálním případě mají takové bílkoviny biologickou aktivitu, která je dokonce vyšší než u nemodifikovaných IL-18BP. Upřednostňované
- 10 aktivní frakce mají aktivitu, která je lepší než aktivita IL-18BP, nebo která má další výhody, jako lepší stálost nebo nižší toxicitu nebo imunogenitu, nebo jsou lépe vyráběny ve velkých množstvích, nebo se snadněji čistí.
- 15 Sekvence IL-18BP a jejich sestřihové varianty/izoformy mohou být brány z WO 99/09 063 nebo z prací Novicka a spoluautorů, 1999 či Kima a spoluautorů, 2000.

Funkční deriváty IL-18BP mohou být pro zlepšení vlastností bílkoviny jako je stálost, poločas rozpadu, biologická dostupnost, snášenlivost v lidském těle nebo imunogenita připojeny na polymery. K dosažení těchto požadavků mohou být IL-18BP navázány například na polyethylenglykol (PEG). Polyethylenglykolace se může provádět známými postupy, popsány například ve WO 92/130 95.

20

V upřednostňovaném ztělesnění předkládaného vynálezu je tedy IL-18BP polyethylenglykolována.

25

V dalším upřednostňovaném ztělesnění tohoto vynálezu je inhibitorem IL-18 spojená bílkovina, obsahující celou vazebnou bílkovinu IL-18 nebo její část, spojenou s celým imunoglobulinem nebo jeho částí. Odborníkovi v oboru bude zřejmé, že výsledná spojená bílkovina si zachová biologickou aktivitu IL-18BP, zejména vazbu IL-18. Spojení může být přímé, nebo prostřednictvím krátkého spojovacího peptidu, který může mít délku jednoho až tří aminokyselinových zbytků nebo může být delší, například mít délku 13 aminokyselinových zbytků. Uvedený spojovací peptid může být například tripeptidem o sekvenci E-F-M (Glu-Phe-Met), nebo může být aminokyselinovou spojovací sekvencí, zahrnující 13 aminokyselinových zbytků Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met, vloženou mezi sekvenci IL-18BP a imunoglobulinovou sekvenci. Výsledná spojená bílkovina má zlepšené vlastnosti jako prodlouženou dobu přetrvání v tělních tekutinách (poločas), zvýšenou specifickou aktivitu, zvýšenou úroveň exprese, nebo je usnadněno čištění této spojené bílkoviny.

30

35

V upřednostněném ztělesnění je IL-18BP spojena s konstantní oblastí molekuly imunoglobulinu. S výhodou je spojena s oblastmi těžkého řetězce jako například s CH2 a CH3 doménami lidského IgG1. Vytváření specifických spojených bílkovin, obsahujících IL-18BP a část imunoglobulinu, je například popsáno v příkladu 11, WO 99/09 063. Pro vytváření spojených bílkovin podle předkládaného vynálezu jsou vhodné také další izoformy imunoglobulinových molekul, jako izoformy IgG2 nebo IgG4, nebo jiné třídy imunoglobulinu, jako například IgM nebo IgA. Spojené bílkoviny mohou být monomerní nebo multimerní, hetero- nebo homomultimerní.

40

45

Interferony jsou známy především pro své inhibiční účinky na virovou replikaci a buněčnou proliferaci. Interferon gama hraje například důležitou roli v usnadnění imunitních a zánětlivých odpovědí. Uvádí se, že interferon beta (IFN- β , interferon typu I), má protizánětlivou roli. Studie, zveřejněné K. A. Triantaphyllopoulos, R. Williamsem, H. Tailorem a Y. Chernakovskim; Arthritis and Rheumatism 42, 92-99, 1999, naznačuje, že IFN- β má přínosný účinek v léčbě revmatoidní artritidy, jak bylo prokázáno na myším modelu tohoto onemocnění, modelu kolagenem indukované artritidy (CIA). Tento přínosný účinek IFN- β byl potvrzen v níže uvedených příkladech.

50

55

Vynález se také týká použití kombinace inhibitoru IL-18 a interferonu k výrobě léčiva pro léčbu artritidy, zejména revmatoidní artritidy.

- 5 Interferony mohou být ke zlepšení stálosti bílkovin spojeny s polymery. Konjugát interferonu beta a polyolu polyethylenglykolu (PEG) byl popsán například ve WO 99/553 77.

V jiném upřednostňovaném ztělesnění tohoto vynálezu je interferonem interferon-beta (IFN-β) a ještě lépe IFN-β 1a.

10

Inhibitor produkce a/nebo působení IL-18 se s výhodou používá souběžně či následně s interferonem nebo odděleně.

- 15 V ještě dalším ztělesnění tohoto vynálezu se inhibitor IL-18 používá v kombinaci s antagonistou TNF. Antagonisté TNF uplatňují svou aktivitu různými způsoby. Za prvé se mohou antagonisté TNF vázat na molekulu TNF samotnou nebo ji sekvestrovat s dostatečnou afinitou a specifičností k částečnému nebo podstatnému neutralizování epitopu nebo epitopů TNF, odpovědných za vazbu receptoru TNF (zde nazývaní „sekvestrační antagonisté“). Sekvestračním antagonistou může být například protilátka namířena vůči TNF.

20

Antagonisté TNF mohou alternativně inhibovat signální dráhu TNF, aktivovanou buněčnými povrchovými receptory po navázání TNF (zde nazývaní „signální antagonisté“). Obě skupiny antagonistů jsou užitečné, buď samy o sobě, nebo dohromady v kombinaci s inhibitorem IL-18, pro léčbu artritidy a zvláště revmatoidní artritidy.

25

- Antagonisty TNF je snadné identifikovat a stanovit rutinním testováním kandidátů vzhledem k jejich účinku na aktivitu přirozeného TNF v citlivých buněčných liniích *in vitro*, například lidských buňkách B, v nichž TNF vyvolává proliferaci a sekreci imunoglobulinu. Stanovení zahrnuje formování TNF při různých naředěních kandidáta antagonistické látky, například od 0,1 do stonásobku molárního množství TNF, použitého ve stanovení a kontroly bez přítomnosti TNF nebo antagonisty (A. Tucci, H. James, R. Chicheportiche, J. Y. Bonnefoy, J. M. Dayer a R. H. Zubler, J. Immunol. 148, 2778–2784, 1992).

- 35 Upřednostňovanými antagonisty TNF pro použití podle předkládaného vynálezu jsou sekvestrační antagonisté. Z nich jsou upřednostňovány takové polypeptidy, které navazují TNF s vysokou afinitou a vykazují nízkou imunogenost. Zvláště upřednostňované jsou molekuly rozpustných receptorů TNF a neutralizační protilátky vůči TNF. V předkládaném vynálezu jsou například užitečné TNF-RI a TNF-II. Zkrácené formy těchto receptorů, obsahující extracelulární domény receptorů nebo jejich funkční části, jsou zvláště upřednostňovanými antagonisty podle tohoto vynálezu. Zkrácené rozpustné receptory TNF typu I a typu II jsou popsány například v EP 914 431.

- 45 Zkrácené formy receptorů TNF jsou rozpustné a byly detegovány v moči a séru jako vazebné bílkoviny, inhibující TNF, o velikosti 30 000 a 40 000, které jsou nazývány TBPI a TBPII (H. Engelmann, D. Novick a D. Wallach; 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, 1990). Podle vynálezu se upřednostňuje souběžné, následné nebo oddělené použití inhibitoru IL-18 s antagonistou TNF a/nebo interferonem.

- 50 Podle vynálezu jsou TBPI a TBPII upřednostňovanými antagonisty TNF pro použití v kombinaci s inhibitorem IL-18. Deriváty, fragmenty, oblasti a biologicky aktivní části receptorových molekul funkčně připomínají receptorové molekuly, které mohou být rovněž použity v předkládaném vynálezu. Takový biologicky aktivní ekvivalent nebo derivát receptorové molekuly odpovídá části polypeptidu, nebo sekvenci kódující receptorovou molekulu, má dostatečnou velikost a je

schopný navazovat TNF s takovou afinitou, že interakce s membránově vázaným receptorem TNF je inhibována nebo blokována.

5 V dalším upřednostňovaném ztělesnění vynálezu je lidský rozpustný TNF-RI (TBPI) antagonistou TNF pro použití podle tohoto vynálezu. Přírodní a rekombinantní molekuly rozpustného receptoru TNF a způsoby jejich výroby byly popsány v evropských patentech EP 308 378, EP 398 327 a EP 433 900.

10 Inhibitor IL-18 může být používán souběžně nebo následně s inhibitorem TNF, nebo odděleně. Výhodně je použita kombinace protilátky IL-18 nebo antiséra a rozpustného receptoru TNF, majícího aktivitu inhibující TNF.

15 V dalším upřednostňovaném ztělesnění tohoto vynálezu léčivo dále obsahuje inhibitor COX, s výhodou inhibitor COX-2. Inhibitory COX jsou v oboru známy. Specifické inhibitory COX-2 jsou popsány například ve WO 01/00 229.

20 Vynález se dále týká použití kombinace inhibitorů IL-18 a/nebo interferonů a/nebo antagonistů TNF a/nebo inhibitorů COX-2. Tato kombinace je vhodná pro léčbu a/nebo prevenci artritidy, zejména revmatoidní artritidy, a pro léčbu a/nebo prevenci jaterního poškození a pro léčbu a/nebo prevenci zánětlivého střevního onemocnění, zejména Crohnovy choroby a ulcerativní kolitidy. Aktivní složky mohou být použity souběžně, následně nebo odděleně.

25 V upřednostňovaném ztělesnění předkládaného vynálezu je inhibitor IL-18 použit v množství přibližně 0,0001 až 10 mg/kg tělesné hmotnosti, nebo přibližně 0,01 až 5 mg/kg tělesné hmotnosti nebo přibližně 0,1 až 3 mg/kg tělesné hmotnosti nebo přibližně 1 až 2 mg/kg tělesné hmotnosti. V ještě dále upřednostňovaném ztělesnění je inhibitor IL-18 použit v množství přibližně 0,1 až 1000 µg/kg tělesné hmotnosti nebo 1 až 100 µg/kg tělesné hmotnosti nebo přibližně 10 až 50 µg/kg tělesné hmotnosti.

30 Vynález se dále týká použití expresního vektoru, obsahujícího sekvenci kódující inhibitor IL-18, pro přípravu léčiva k léčbě a/nebo prevenci artritických stavů nebo artritidy, zejména revmatoidní artritidy, pro léčbu jaterního poškození a pro léčbu zánětlivého střevního onemocnění. Genový léčebný přístup je tedy použit k léčbě a/nebo prevenci onemocnění. Výhodně bude exprese inhibitoru IL-18 probíhat místně, *in situ*, čímž účinně zablokuje IL-18 přímo v tkáni (tkáních) nebo v buňkách postižených onemocněním.

35 K léčbě a/nebo prevenci artritidy může být vektor genové léčby, obsahující sekvenci inhibitoru produkce a/nebo působení IL-18, injikován přímo do nemocného kloubu, čímž se lze vyhnout problémům, spojených se systematickým podáváním vektorů genové léčby, jako nařazení vektoru, nalezení a zacílení cílových buněk nebo tkání a vedlejších účinků.

40 Použití vektoru k indukci a/nebo zvýšení endogenní produkce inhibitoru IL-18 v buňce, normálně klidné vzhledem k expresi inhibitoru IL-18, nebo exprimující nedostatečná množství inhibitoru, spadají rovněž do rozsahu vynálezu. Vektor může obsahovat regulační sekvence, které jsou funkční v buňkách, jež mají exprimovat inhibitor IL-18. Takové regulační sekvence mohou být například promotory nebo enhancery. Regulační sekvence pak mohou být zavedeny na správné místo (lokus) genomu homologní rekombinací, čímž operativně svážou regulační sekvenci s genem, jehož expresi je žádoucí indukovat nebo zvýšit. Tento postup se obvykle označuje jako „endogenní genová aktivace“ (EGA) a je popsán příklad ve WO 91/099 55.

50 Odborníkovi v oboru bude zřejmé, že za použití stejného postupu je rovněž možné snížit expresi IL-18, zavedením negativního regulačního prvku, jako například uklidňujícího prvku do lokusu genu IL-18, což vede k utlumení nebo zabránění exprese IL-18. Odborníkovi v oboru bude zřejmé, že takové utlumení nebo uklidnění exprese IL-18 má stejný účinek jako použití inhibitoru IL-18 k prevenci a/nebo léčbě onemocnění.

Vynález se dále týká použití buněk, které byly geneticky upraveny k produkci inhibitoru IL-18 pro výrobu léčiva k léčbě a/nebo prevenci jaterního poškození, artritidy nebo zánětlivého střevního onemocnění.

5

Vynález se dále týká farmaceutických prostředků, zvláště vhodných k prevenci a/nebo léčbě zánětlivé artritidy, jaterního poškození nebo zánětlivého střevního onemocnění, které obsahují léčebně účinné množství inhibitoru IL-18 a léčivě účinné množství interferonu. Jako inhibitor IL-18 může prostředek obsahovat inhibitory kaspázy-1, protilátky vůči IL-18, protilátky vůči 10 kterékoli z podjednotek receptoru IL-18, inhibitory signální dráhy IL-18, antagonisty IL-18 kompetující s IL-18 a blokující receptor IL-18 a vazebné bílkoviny IL-18, izoformy, muteiny, spojené bílkoviny, funkční deriváty, aktivní frakce nebo oběhově pozměněné deriváty takových látek, mající stejnou aktivitu. IL-18BP, jeho izoformy, muteiny, spojené bílkoviny, funkční deri- 15 váty, aktivní frakce anebo oběhově pozměněné deriváty, jak byly popsány výše, jsou upřednostňovanými aktivními přísadami farmaceutických prostředků.

Interferonem, obsaženým ve farmaceutickém prostředku, je s výhodou IFN- β .

V ještě dalším upřednostňovaném ztělesnění farmaceutický prostředek obsahuje léčebně účinná 20 množství inhibitoru IL-18, volitelně interferon a antagonistu TNF. Antagonisty TNF mohou být protilátky neutralizující aktivitu TNF, nebo rozpustné zkrácené fragmenty TNF receptoru, nazývané také TBPI a TBPII. Farmaceutický prostředek podle tohoto vynálezu může dále obsahovat jeden nebo více inhibitorů COX, s výhodou inhibitory COX-2.

25 Definice „farmaceuticky přijatelný“ by měla zahrnovat jakýkoliv nosič, který neinterferuje s účinností biologické aktivní přísady a který není toxický vůči hostiteli, kterému je podáván. Pro parenterální podávání může být aktivní bílkoviny (bílkoviny) formována například v jednotce dávkovací formy pro injekce v prostředí jako je solný roztok, roztok dextrózy, sérový albumin a Ringerův roztok.

30

Aktivní přísady farmaceutického prostředku podle tohoto vynálezu mohou být podávány různými způsoby. Cesty podání zahrnují intradermální, transdermální (například v pomalu se uvolňujících 35 přípravcích), intramuskulární, intraperitoneální, intravenózní, subkutánní, orální, epidurální, místní a intranasální cesty). Použita může být i jakákoliv jiná léčebně účinná cesta podání, například absorpce epiteliální nebo endoteliální tkáně nebo genovou léčbou, kdy se pacientovi podává (například prostřednictvím vektoru), molekula DNA, kódující aktivní činidlo, vyvolávající expresi a sekreci aktivního činidla *in vivo*. Kromě toho může být bílkovina (bílkoviny) podle vynálezu podávána společně s jinými složkami biologicky aktivních činidel, jako farmaceuticky přijatel- 40 ných povrchově aktivních látek, pomocných látek, nosičů, ředidel a vehikul.

40

Pro parenterální (například intravenózní, subkutánní, intramuskulární) podání může být aktivní 45 bílkovina (bílkoviny) formována jako roztok, suspenze, emulze nebo lyofilizovaný prášek ve spojení s farmaceuticky přijatelným parenterálním vehikulem (například vodou, solným roztokem, roztokem dextrózy a přídavnými látkami, které udržují izotoničnost (například mannitol) nebo chemickou stálost (konzervačními látkami a pufry)). Prostředek se sterilizuje běžně použí- 50 vanými postupy.

Biologická dostupnost aktivní bílkoviny (bílkovin) podle tohoto vynálezu může být zlepšena 55 konjugacími postupy, které zvyšují poločas molekuly v lidském těle, například navázáním molekuly na polyethylenglykol, jak je popsáno v PCT patentové přihlášce WO 92/13 095.

Léčebně účinná množství aktivní bílkoviny (bílkovin) budou funkcí mnoha proměnných, včetně 60 typu antagonisty, afinity antagonisty vzhledem k IL-18, jakékoliv zbytkové cytotoxické aktivity vykazované antagonisty cesty podávání, klinického stavu pacienta, včetně požadavku udržení netoxické hladiny endogenní aktivity IL-18.

55

„Léčebně účinné množství“ je takové, že při jeho podání inhibitor IL–18 vyvolává inhibici biologické aktivity IL–18. Dávka podávaná, ať v jedné nebo více dávkách, léčenému jednotlivci, se bude měnit v závislosti na různých faktorech, zahrnujících farmakokinetické vlastnosti inhibitoru IL–18, cestu podávání, stav pacienta a jeho charakteristiky (pohlaví, věk, tělesná hmotnost, zdravotní stav, tloušťka), rozsah příznaků, probíhající léčbu, četnost léčby a požadovaný účinek. Příprava a manipulace se stanoveným rozmezím dávek je zcela ve způsobilosti odborníka, stejně jako *in vitro* a *in vivo* způsoby stanovení inhibice IL–18 u léčeného jedince.

Podle vynálezu se inhibitor IL–18 používá v množství přibližně 0,0001 až 10 mg/kg tělesné hmotnosti, nebo přibližně 0,01 až 5 mg/kg tělesné hmotnosti nebo přibližně 0,1 až 3 mg/kg tělesné hmotnosti nebo přibližně 1 až 2 mg/kg tělesné hmotnosti. V ještě dále upřednostňovaném ztělesnění je inhibitor IL–18 použit v množství přibližně 0,1 až 1000 µg/kg tělesné hmotnosti nebo 1 až 100 µg/kg tělesné hmotnosti nebo přibližně 10 až 50 µg/kg tělesné hmotnosti.

Cestou podání, která je upřednostňována podle vynálezu, je podání subkutánním způsobem. Dále je upřednostňovaným způsobem podle vynálezu také podání intramuskulární.

V dalších upřednostňovaných ztělesněních se inhibitor IL–18 podává denně nebo každý druhý den.

Denní dávky jsou obvykle podávány rozděleny na části nebo ve formě prodlouženého uvolňování, účinné k získání požadovaných výsledků. Druhé nebo následné podávání může být prováděno ve stejném, menším nebo větším dávkování než byla původní či předchozí podávaná dávka. Druhé nebo následné podávání může být podáváno během nástupu nebo před nástupem onemocnění.

Inhibitor IL–18 může být podle vynálezu podáván léčenému jedinci profylakticky nebo léčebně (terapeuticky) před dalším léčebným režimem nebo činidlem, souběžně s ním nebo následně s dalším léčebným režimem nebo činidlem (například u vícečetných lékových režimů), v léčebně účinném množství, zejména s interferonem a/nebo antagonistou TNF a/nebo inhibitorem COX. Aktivní činidla, která jsou podávána souběžně s jinými léčebnými činidly, mohou být podávána ve stejných nebo v odlišných prostředcích.

Vynález se dále týká způsobu výroby farmaceutického prostředku, který zahrnuje smísení účinného množství inhibitoru IL–18 a/nebo interferonu a/nebo antagonisty TNF a/nebo inhibitoru COX s farmaceuticky přijatelným nosičem.

Po uvedení popisu vynálezu bude nyní vynález snáze srozumitelný s odkazem na následující příklady, které jsou poskytnuty pouze k ozřejmění a nejsou zamýšleny jako omezující předkládaný vynález.

Příklady provedení vynálezu

Část 1: příklady 1 až 8, týkající se použití inhibitorů IL–18 při jatrním poškození.

Příklad 1: Produkce IL–18BP–His tagu

Vyčištěná rekombinantní lidská IL–18BP, obsahující His-tag (r-hIL–18BP–His tag, označení) byla produkována v buňkách CHO (vaječnickové buňky čínského křečka). Produkce rekombinantních bílkovin v eukaryotických buňkách je odborníkovi v oboru známa. Pro konstrukci vhodných vektorů, nesoucích DNA, kódující IL–18BP a vhodných pro transfekci eukaryotických buněk k produkci rekombinantní IL–18BP jsou dostupné dobře známé metody. Pro expresi v buňkách

se DNA, kódující IL-18BP (viz například Novick se spoluautory, 1999), krájí a prochází insercí do expresních vektorů, vhodných pro transfekci buněk. Jinou možností je příprava takové DNA pomocí PCR s vhodnými pozitivními a negativními (sense- a antisense-) primery. Výsledné konstrukty cDNA jsou potom vloženy do vhodně konstruovaných eukaryotických expresních vektorů postupy dobře známými v oboru (T. Maniatis, „Cell Biology: A Comprehensive Treatise, díl 3: Gene Expression“, Academic Press, NY, 563–608, 1980). Rekombinantní bílkovina byla vyčištěna do více než 95% čistoty a bylo zjištěno, že je biologicky aktivní v podmínkách *in vitro* i *in vivo* s vysokou afinitou k svému ligandu.

Příklad 2: Ochranný účinek IL-18BP vůči endotoxinem indukovanému úmrtí v myším modelu

Myší model byl použit k testu, zda IL-18BP, inhibitor IL-18, dokáže ochránit myši vůči vysoké dávce lipopolysacharidů (LPS). LPS vyvolává akutní jaterní poškození s následným rychlým úmrtím myší.

4 mg/kg rekombinantní lidské IL-18BP (rhIL-18BP-his) obsahující histidinovou značku, his-tag, (získané rekombinantní produkci bílkoviny) byly injikovány intraperitoneálně myším kmene C57BL/6. O jednu hodinu později bylo myším injikováno 60 mg/kg LPS (smrtná dávka). Přežití myší bylo srovnáno se skupinou zvířat, která obdržela pouze samotný LPC (žádný IL-18BP).

Pět ze 7 myší po injikaci rhIL-18BP-his přežilo injikaci LPS, na rozdíl od kontrolní skupiny, v níž veškerá zvířata uhynula během 3 dnů.

Krevní vzorky byly odebrány 5 hodin po injikaci LPS v přítomnosti nebo nepřítomnosti zvýšených dávek rhIL-18BP-his a byly analyzovány testem ELISA vzhledem k obíhajícímu IFN- γ (obr. 1). Dávky 0,4 a 4 mg/kg rhIL-18BP indukovaly dvojnásobné snížení IFN- γ v séru. Tato inhibice nebyla přítomna při nižších dávkách rhIL-18BP (0,004 a 0,4 mg/kg).

Příklad 3: IL-18BP má ochranný účinek vůči jaternímu poškození u myšího modelu onemocnění.

Myší model fulminantní (prudce vzplanuvší) hepatitidy byl použit v testování účinku IL-18BP. U myší se rozvíjí akutní jaterní poškození, pokud jsou vystaveny následnému podání *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) a lipopolysacharidu (LPS).

Myším kmene C57BL/6, senzitivizovaných LPS, byly následně injikovány rostoucí dávky rhIL-18BP-his (4; 0,4; 0,004; 0 mg/kg) v různých časech (1 hodina, 20 minut, současně). Pokud byl rhIL-18BP-his podáván i.p. ve stejnou dobu jako LPS, žádná z myší nepřežila a hladiny IFN- γ a TNF- α v oběhu byly nezměněné. Překvapivě však rhIL-18BP (4 a 0,4 mg/kg) indukovala 70% snížení alaninaminotransferázy (markeru jaterního poškození) v oběhu, jak je znázorněno na obr. 2.

Kromě toho bylo sledováno přežití myší (obr. 3): pokud byla rhIL-18BP podána i.p. 20 minut před LPS, potom 2 nejvyšší dávky IL-18BP (4 a 0,4 mg/kg) oddálily uhynutí myší o 10 hodin ve srovnání se zvířaty kontrolní skupiny, která místo IL-18BP obdržela NaCl.

Výsledky měření sérových hladin IFN- γ jsou znázorněny na obr. 4. rhIL-18BP (4 mg/kg) inhibovala z 90 % hladiny IFN- γ v oběhu a z 80 % alaninaminotransferázu v oběhu (není znázorněno).

Pokud byla rhIL-18BP-his podána 1 hodinu před LPS, byly křivky přežití a hladiny IFN- γ v oběhu podobné těmto křivkám, získaným při podání rhIL-18BP-his 20 minut před LPS, ale hladiny alaninaminotransferázy v oběhu nebyly ovlivněny (není znázorněno).

Kromě toho byla tkáň myších jater analyzována hematoxilin–eosinovým barvením a tunelovou mikroskopií. Játra myši, u nichž byla předem indukována těžká hepatitida, vykazovala závažné nekrózy ve srovnání s normální jaterní tkání. Jaterní tkáň myši ovlivněných IL–18BP naproti tomu vykazovala významně menší nekrotická ložiska, než tomu bylo u neovlivněných myši.

5

Příklad 4: Protilátky vůči IL–18 chrání proti smrtelné endotoxemii

Pro zjištění, zda by blokáda IL–18 pomocí protilátek vůči IL–18 mohla chránit myši vůči smrtelným dávkám bakteriálních lipopolysacharidů, byly myším C57BL/6J nejprve injikovány neutralizační králičí anti–myši IL–18 protilátky (polyklonální), nebo normální králičí sérum (NDS) jako kontrola. 30 minut po podání protilátek byly injikovány smrtelné dávky LPS, získaného buď z *E. coli* (obr. 5A), nebo *S. typhimurium* (obr. 5B). Pokus zahrnoval 10 až 12 myši na skupinu a byl proveden 2x při dvou různých příležitostech.

15

Jak je znázorněno na obr. 5A, ovlivnění myši anti–IL–18 antisérem zabraňovalo mortalitě indukované 40 mg/kg LPS z *E. coli*. 100 % myši přežilo po působení anti IL–18, zatímco u myši, ovlivněných normálním králičím sérem, přežilo pouze 10 % zvířat ($p < 0,005$).

Obr. 5B ukazuje, že myši ovlivněné protilátkami, byly rovněž chráněny vůči smrtelným účinkům *S. typhimurium* (přežití: 50 % vůči 0 %; $p < 0,005$).

Příklad 5: Blokáda IL–18 a TNF– α chrání myši vůči ConA– a PEA–indukované hepatotoxicitě

25

Ke stanovení role IL–18 a TNF– α v jaterním poškození byly použity 2 experimentální modely hepatotoxicity. Injekce Concanavalinu A (ConA) a *Pseudomonas aeruginosa* (PEA) myším indukovaly v obou případech jaterní poškození a jsou modely hepatitidy zprostředkované buňkami T.

30

Myši C57BL/6J byly předem ovlivněny anti–IL–18 antisérem nebo rozpustným TNF– α receptorem, TNFRp55. Jako indikátory jaterního poškození byly měřeny sérové hladiny alaninaminotransferázy (ALT), obr. 6.

Jak je znázorněno na obr. 6A, jak anti–IL–18 antisérum, tak i rozpustné TNF–receptory významně snížily sérové hladiny ALT, indukované Con A ve srovnání s kontrolní injekcí samotného vehikula (apyrogenního fyziologického roztoku). Společné podání rozpustných TNF–receptorů a anti–IL–18 antiséra vedlo k úplné inhibici jaterního poškození, indukovaného Con A.

Jak je znázorněno na obr. 6B, u myši, jimž bylo injikováno PEA vyvolala neutralizace buď inhibitory TNF– α , nebo anti–IL–18 protilátkami 93 a 83% inhibici sérových hladin ALT. Kombinovaná blokáda působením obou vyvolala 99% ochranu.

Příklad 6: Hladiny IL–18–vazebné bílkoviny v séru jsou zvýšené u pacientů s chronickým jaterním onemocněním

Hladiny IL–18BP v plazmě byly měřeny u 133 pacientů s chronickým jaterním onemocněním (CLD) různého původu a u 31 zdravé kontroly specifickým testem ELISA, za použití IL–18BP monoklonálních protilátek.

50

Hladiny IL–18BP v plazmě byly významně vyšší u CLD pacientů ($12,91 \pm 0,89$ ng/ml; průměr $\pm$ SEM) než u zdravých subjektů ($4,96 \pm 0,43$ ng/ml, $p < 0,001$). Pacienti s cirhózou měli významně vyšší hladiny než pacienti s necirhotickým CLD ($19,23 \pm 1,28$ ng/ml, $n = 67$, oproti $6,49 \pm 0,51$ ng/ml, $n = 66$, $p < 0,001$). Pacienti se stádiem B podle Child–Pughovy klasifikace měli vyšší

55

hladiny IL-18BP než ti, se stadiem A ($22,48 \pm 2,44$ ng/ml oproti $9,57 \pm 1,25$ ng/ml, $p < 0,001$). Nebyl zde ovšem žádný významný rozdíl mezi stadiem B a C ($22,48 \pm 2,44$ ng/ml oproti $20,62 \pm 4,75$ ng/ml, $p = 0,7$). Hladiny IL-18BP v plazmě pozitivně korelovaly s GOT, rychlostí sedimentace bilirubinu a erytrocytů. Negativní korelace byla nalezena v případě doby prothrombinu.

Lze uzavřít, že výsledky prokázaly zvýšení hladin IL-18BP v plazmě u CLD a jejich souvztažnost se závažností onemocnění nezávisle na etiologii onemocnění. Ačkoli jde o endogenního antagonistu prozánětlivého IL-18, zvýšené hladiny IL-18BP se nezdály být dostatečné k paralyzování zdrcujících prozánětlivých mediátorů při CLD.

Příklad 7: Inhibice alkoholické hepatitidy působením IL-18BP

4 skupiny potkanů albínů (5 zvířat na skupinu) byly krmeny ethanolem a dietou, obsahující kukuřičný olej, pomocí žaludeční infuze po dobu 4 týdnů. U kontrolních zvířat dextróza isokaloricky nahradila ethanol. Zvířatům byla denně injikována myší IL-18BP (1 mg/kg), nebo fyziologický roztok. Jaterní řezy byly podrobeny patologické analýze a v séru byly měřeny hodnoty jaterních enzymů, TNF- α , Fas-ligandu a IFN- γ . Nekrotické zánětlivé poškození a exprese jaterních enzymů, IFN- γ , Fas-ligandu a IFN- γ byly pozorovány u zvířat, jimž byl po podání ethanolu injikován fyziologický roztok.

Zvířata, jimž byla injikována myší IL-18BP, byla chráněna vůči nekrotickému zánětlivému poškození a hladiny jaterních enzymů, TNF- α , Fas-ligandu a IFN- γ byly významně sníženy ($> 90 \%$).

Příklad 8: Inhibice concanavalinem A indukované hepatitidy pomocí IL-18BP

Myším Balb/C byla injikována myší IL-18BP (1 mg/kg) nebo fyziologický roztok a 2 hodiny poté 12 mg/kg concanavalinu A (Con A); aplikace IL-18BP byla opakována denně. Jaterní poškození bylo hodnoceno stanovením sérových hladin jaterních enzymů, TNF- α , Fas-ligandu a IFN- γ . Hepatická histopatologie je hodnocena ve srovnání se zvířaty, ovlivněnými pouze concanavalinem A.

Předchozí ovlivnění IL-18BP významně snižuje sérové hladiny jaterních enzymů a TNF- α a v histopatologickém hodnocení nejsou ve srovnání s kontrolními zvířaty, ovlivněnými Con A, známky zánětu.

Část II: příklady 9 a 10, týkající se použití inhibitoru IL-18 při arthritidě.

Příklad 9: Produkce IL-18BP-his tagu (značky)

K pokusu, popsanému podrobně níže v příkladu 10, byla rekombinantní lidská IL-18BP, obsahující histidinovou značku (his-tag) šesti zbytků (r-hIL-18BP-His tag), produkována v CHO buňkách a byla vyčištěna tak, jak je popsáno Kimem se spoluautory, 2000. Rekombinantní bílkovina byla vyčištěna do více než 95% čistoty a bylo ověřeno, že je biologicky aktivní *in vitro* a *in vivo* s vysokou afinitou k svému ligandu.

Produkce rekombinantních bílkovin v jiných eukaryotických systémech, se značkami (tagy), usnadňujícími čištění rekombinantních bílkovin nebo bez nich, je odborníkům v oboru známa. Dobře známé metody jsou dostupné pro konstrukci vhodných vektorů, nesoucích DNA, která kóduje IL-18BP a vhodných pro transfekci eukaryotických buněk k produkci rekombinantní IL-18BP. Pro expresi v buňkách je DNA, kódující IL-18BP (viz například Novick se spoluautory, 1999) vyříznuta z klonovacího vektoru a vložena do expresních vektorů, vhodných k transfekci

ci buněk. Alternativně může být taková DNA připravena pomocí PCR s vhodnými pozitivními a negativními primery. Výsledné cDNA konstrukty jsou potom vloženy do vhodně konstruovaných eukaryotických expresních vektorů postupy známými v oboru (Maniatis se spoluautory, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982).

5

Příklad 10: Blokáda endogenního IL-18 u myšího modelu artritidy

Metody

10

Indukce kolagenem indukované artritidy (CIA)

CIA byla indikována u myších samců DBA/1 (8 až 12 týdnů starých) imunizací hovězím přírodním kolagenem typu II (CII), jak bylo dříve popsáno (C. Plater-Zyber, JY. Bonnefoy, Marked amelioration of established collagen induced arthritis by treatment with antibodies to CD23 in vivo. Nat. Med. 1, 781–785, 1995). Počínaje dnem 25 po imunizaci CII byly myši denně testovány vzhledem k nástupu onemocnění.

15

Léčba pomocí rhIL-18BP-6his

20

Léčba DBA/1 imunizovaných pomocí CII byla zahájena při prvním výskytu klinických známek onemocnění. K neutralizování endogenního IL-18 u kolagenem ovlivněných myší byla použita rekombinantní, lidská IL-18BP, obsahující tag (značku) šesti histidinů (rh-IL-18BP 6his). Značka rh-IL-18BP 6his byla injikována denně po dobu 7 dnů v pěti různých koncentracích 10, 3, 1, 0,5 a 0,25 mg/kg intraperitoneálně. Kontrolní myši ve skupině placebo dostávaly pouze vehikulum (0,9% NaCl).

25

Hodnocení vývoje onemocnění

30

Klinické stanovení (klinické hodnocení)

Počínaje prvním projevem klinických příznaků byly myši každý den testovány osobou, neseznámenou s léčbou (naslepo). Každá končetina byla známkována vzhledem k závažnosti onemocnění (hodnocení 0 až 3,5, maximální hodnocení = 14/myš). Vývoj otoku (zánětu) byl měřen na první tlapce, která vykazovala známky onemocnění, za použití přesných měřítek (Proctest 2T, Kroeplin Langenmesstechnik). Vývoj onemocnění byl hodnocen denně po dobu 8 dnů od jeho nástupu a po uplynutí této doby byly všechny myši usmrceny a tlapky byly shromážděny pro histopatologické hodnocení.

35

Histologické hodnocení erozí chrupavky a mikroskopického zánětu.

40

Po ukončení pokusů, tj. v den 8 po nástupu onemocnění, byly myši usmrceny a tlapka, na níž se vyvinuly první známky onemocnění, byla odňata. Klouby byly fixovány, odvápněny a obaleny parafinem. Byly připraveny standardní řezy (5 až 7 μ m) kloubů a barveny hematoxilin/eosin/Safraninem O. Každý kloub byl známkován dvěma hodnotícími, neseznámenými s protokolem léčby (bez destrukce chrupavky nebo kosti = 0; umístěné eroze chrupavky = 1 až 2; rozšířenější eroze = 3; obecná destrukce chrupavky a přítomnost kostních erozí = 4). Konečná známka každé myši byla průměrem výsledků ze všech známkovaných kloubů. Mikroskopický zánět nebo synovitida byly známkovány od 0 do 4 následujícím způsobem: bez zánětu = 0; slabé ztlustění vrstvy výstelky a/nebo malý počet infiltrovaných buněk ve vrstvě pod výstelkou = 1 až 2; ztlustění vrstvy výstelky a/nebo silnější influx buněk ve vrstvě pod výstelkou = 3; přítomnost buněk v synoviálním prostoru a synovium vysoce infiltrováno mnoha buňkami zánětu = 4.

50

Stanovení protilátek vůči kolagenu

Protilátky vůči hovězímu kolagenu typu II byly určovány za použití enzymového imunisorbčního stanovení (ELISA). Měřeny byly titry IgG1 a IgG2a. V krátkosti, destičky byly povlečeny 10 µg hovězího kolagenu a poté byla nespecifická vazebná místa blokována 0,1 mol x l⁻¹ ethanolaminem (Sigma). Přidána byla sériová zředění 1:2 séra a následovala inkubace s isotypově specifickou kozí anti-myší peroxidázou (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA) a substrátem (kyselina 5-aminosalicylová, Sigma). Destičky byly odečítány při vlnové délce 492 nm. Titry byly vyjádřeny jako průměr ± SD (směrodatná odchylka) zředění, což poskytuje polo-maximální hodnotu.

Stanovení IL-6

Hladiny IL-6 byly stanoveny komerčním testem ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN, UAS). Biologická aktivita IL-6 byla stanovována v proliferativním stanovení za použití buněk B9. V krátkosti, 5 x 10³ buněk B9 v 200 µl 5% média FCS-RPMI 1640 na jamku bylo kultivováno v mikrotitrační destičce s kulatými dny a inkubováno po dobu 3 dnů za použití lidského rekombinantního IL-6 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) jako standardy. Na konci inkubace bylo přidáno 0,5 µCi ³[H]thymidinu (NEN-Dupont, Boston, MA, USA) na jamku. Po 3 hodinách byly buňky shromážděny a byla stanovena inkorporace thymidinu. Limit detekce pro biologické stanovení IL-6 byl jeden pg/ml.

Statistická analýza

Významnost rozdílů byla stanovena pomocí Mann Whitneyova testu za použití programu statistické analýzy SigmaStat a programu GraphPad Prism.

Výsledky

Myší experimentální model, CIA (kolagenem indukovaná artritida), byl použit pro hodnocení účinnosti IL-18BP jako činidla k léčbě artritidy. Podání kolagenu a nekompletního Freundova adjuvans indukovalo u myší DBA/1 vývoj erozivní, zánětlivé artritidy a představuje ideální příležitost k využití léčebného potenciálu IL-18BP. Endogenní IL-18 byl neutralizován použitím IL-18BP a stanoven byl účinek na různé patologické parametry.

Provedena byla studie závislosti na dávce. Tři skupiny myší DBA/1 s kolagenem indukovanou artritidou byly léčebně ovlivněny (tj. po nástupu onemocnění) pěti dávkami IL-18BP, podávanými intraperitoneálně. Při první klinické známce onemocnění byla podána IL-18BP v koncentracích 10, 3, 1, 0,5 nebo 0,25 mg/kg. Jako kontrolní látka byla použita injekce fyziologického roztoku (chloridu sodného). Kromě toho bylo způsobem i.p. podáno 10 000 IU interferonu beta (IFN-β) ke zhodnocení účinku interferonu v tomto experimentálním modelu artritidy. Účinek na závažnost onemocnění byl sledován denně vizuálním známkováním každé jednotlivé tlapky, jak bylo popsáno výše. Myši byly usmrceny v den 8 v nástupu onemocnění.

Měřeny byly následující hodnoty:

- vizuální klinické známkování (0 až 3,5/tlapku) (obr. 7A a B)
- otok kloubu (v mm, měřeno posuvným měřítkem), první tlapky s projevy nemoci za předpokladu, že to byla zadní tlapka (obr. 8)
- počet tlapek postižených onemocněním (obr. 9)
- známkování eroze první tlapky s projevy nemoci (destrukce chrupavky 0 až 4, obr. 10)
- histopatologická analýza první tlapky s příznaky artritidy (obr. 11)

- hladiny protilátek vůči kolagenu typu II (obr. 12)
- hladiny IL-6 (obr. 13)

Klinická závažnost onemocnění

5

Jak je znázorněno na obr. 7A a B, klinická závažnost onemocnění byla významně snížena ve skupinách, léčených pomocí rhIL-18BP v dávce 1 mg/ml ($p < 0,001$) a 0,5 mg/ml ($0,01 < p < 0,05$). Myši, které obdržely malou dávku rhIL-18BP (0,25 mg/kg) nebo vysokou dávku 10 mg/kg, měly klinické známkování podobné jako skupina placebo. Dávka 1 mg/kg IL-18BP měla přibližně stejný účinek jako interferon-beta (označený na obrázku 7A jako IFNb).

10

Zánět kloubů a opuchnutí tlapy (otok)

15

Makroskopický zánět (opuchnutí) byl studován měřením otoku tlapy od dne 1 po nástupu onemocnění do dne 8, konce pokusu. Výsledky jsou znázorněny na obr. 8 A a B. Účinné dávky IL-18BP byly 1, 3 a 10 mg/kg. Podání nižších dávek nevykazovalo přínosný účinek na opuchnutí tlapek. Jak je znázorněno na obr. 8A a 8B, přínosný účinek na opuchnutí tlapek vykázal interferon-beta (IFN β) v koncentraci 10 000 IU.

20

Mikroskopická synovitida byla testována po skončení pokusu v histopatologických řezech a byla vyjádřena jako známkování („známkování synovitidy“). Výsledky zánětu (opuchnutí) a známkování synovitidy jsou shrnuty v tabulce 1. Zatímco léčba rhIL-18BP v dávkách 1 a 3 mg/kg vyvolala směřování k redukci opuchnutí, léčba jakoukoliv dávkou IL-18BP měla pouze omezený účinek na zánětlivou synovitidu (tabulka 1).

25

Tabulka 1: účinek léčby IL-18BP na kloubní zánět

Léčba	Opuchnutí (AUC, průměr $\pm$ SEM)	Známkování synovitidy (průměr $\pm$ 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

AUC = plocha pod křivkou

30

Obr. 9 ukazuje, že počet tlapek, postižených onemocněním, byl snížen po podání IL-18BP. Zejména léčebné injekce IL-18BP v dávkách 1 a 0,5 mg/kg snížily počet tlapek postižených onemocněním, což prokazuje, že blokáda IL-18 *in vivo* zastavuje rozšiřování artritidy na další klouby. Léčba dávkou 1 a 0,5 mg/kg IL-18BP se dokonce zdá být schopnou navrátit některé artritické klouby k normálnímu stavu.

35

Ochrana vůči kloubní destrukci

Léčba myši pomocí rhIL-18BP vyvolala ochranu kloubů vůči destrukci (obr. 10). Semikvantita-
 5 tivní známkovací systém prokázal, že kostní eroze vykazala dávkově závislý ochranný účinek,
 který byl významný při dávkách 10 a 3 mg/kg ($p < 0,05$, obr. 10). Myši, dostávající rhIL-18BP
 v dávce 1 mg/kg, prokazovaly menší erozi než myši, jímž bylo podáváno pouze vehikulum. Při
 dávkách 0,5 a 0,25 mg/kg nebyla žádná ochrana pozorována. Je zajímavé, že účinek IL-18BP na
 kloubní ochranu byl při dávkách 3 a 10 mg/kg srovnatelný nebo dokonce výraznější než přínosný
 10 účinek interferonu-beta a v dávce 10 000 IU.

Obr. 11 znázorňuje histologii zdravého (A) a onemocněním postiženého (B) kloubu ve srovnání
 s kloubem, získaným od zvířete, léčeného pomocí IL-18BP (C). Na konci pokusu byly odebrány
 řezy z těch tlapek, na nichž se nejdříve vyvinula artritida.

15 Kloub arthritické myši vykázal závažnou destruktivní artritidu s úbytkem chrupavky, erozemi
 a množstvím infiltrovaných buněk v zánětlivém synoviu. Kloub myši léčené pomocí rhIL-18BP
 vykazoval téměř normální chrupavku navzdory přítomnosti zánětlivých buněk v synoviálním
 prostoru. Projevilo se zde nejen větší množství chrupavky, ale chrupavka měla rovněž hladší
 20 vzhled.

Léčba anti-IL-18 moduluje hladiny protilátek vůči kolagenu typu II.

25 Myši sCIA měly v oběhu zvýšené hladiny IgG1 a IgG2a protilátek vůči kolagenu typu II. Proti-
 látky isotypu IgG1 jsou spojeny s onemocněními, zprostředkovanými buňkami Th 2, zatímco
 protilátky isotypu IgG2a a IgG2b jsou spojeny s onemocněními, zprostředkovanými buňkami Th
 1.

30 Isotypy protilátek IgG1 a IgG2a vůči kolagenu typu II (CII) byly stanoveny v séru zvířat, která
 byla léčena pomocí IL-18BP (obr. 12). Hladiny isotypů IgG1 a IgG2 vůči CII byly léčbou IL-
 18BP nevýznamně modifikovány v den 4 nebo 8 (D4, D8) klinického onemocnění. Ovšem po
 8 dnech léčby pomocí rhIL-18BP bylo při dávkách 1 a 3 mg/kg pozorováno 2,6 a 3,4 násobné
 snížení kolagenně specifických poměrů IgG1/IgG2a. Obr. 12 znázorňuje pokus, při němž bylo
 použito dávky 3 mg/kg. V podstatě stejné výsledky byl získány za použití IL-18BP v množství
 35 1 mg/kg. Snížený poměr IgG1/IgG2a anti-CII protilátek ukazuje na sníženou koncentraci proti-
 látek isotypu IgG2a vůči kolagenu typu II a zvýšenou koncentraci protilátek isotypu IgG1 vůči
 kolagenu typu II, což ukazuje, že u tohoto modelu artritidy dochází k posunu směrem k one-
 mocnění zprostředkovanému buňkami Th 2.

40 Snížení hladin IL-6 po neutralizaci IL-18

K porozumění účinku blokády IL-18 byly měřeny hladiny IL-6 v sérech zvířat, léčených IL-
 18BP. Obr. 13 ukazuje, že hladiny biologicky aktivního IL-6 byly významně sníženy u zvířat,
 která byla léčena pomocí IL-18BP, a to v případě všech sledovaných dávek; tj. při podání 1, 3
 45 a 10 mg/kg, stejně jako po podání interferonu-beta (IFN β). Imunoaktivní hladiny IL-6, měřené
 v sérech zvířat, léčených rhIL-18BP v dávce 3 mg/kg, byly významně sníženy ($p < 0,0023$) ve
 srovnání se zvířaty, která obdržela pouze fyziologický roztok. Hladiny IL-6 v séru nemocných
 zvířat, léčených IL-18BP v dávkách 1,3 nebo 10 mg/kg, nebo dávkou 10 000 IU interferonu-
 beta, byly podobné normálnímu myšínmu séru (NMS), získanému od zdravých zvířat, to jest od
 50 zvířat, která neonemocněla zánětlivou chorobou.

Tato zjištění ukazují, že IL-18 řídí hladiny IL-6 během nástupu onemocnění. Vzhledem k tomu,
 že IL-6 je markerem zánětu, tato zjištění prokazují, že léčba nemocných myší pomocí IL-18BP
 snižuje u zvířat zánět.

55

Z výše uvedených pokusů je možné učinit následující závěry:

- podání IL–18BP snižuje klinickou závažnost artritidy
- IL–18BP inhibuje další rozvoj nebo rozšíření onemocnění
- 5 – podání IL–18BP snižuje otok
- podání IL–18BP snižuje poškození chrupavky
- hladiny IL–6 v séru jsou po léčbě pomocí IL–18BP sníženy a poměry protilátek vůči CII IgG1/IgG2a klesají
- 10 Výše uvedené údaje ukazují, že neutralizace biologické aktivity IL–18 po nástupu onemocnění představuje protirevmatickou léčbu modifikující onemocnění. Výsledky jasně prokazují, že blokáda IL–18 snižuje klinický vývoj artritidy a, což je důležitější, zastavuje rozvoj destrukce chrupavky a kosti. Blokáda IL–18 prostřednictvím IL–18BP, anti–IL–18 protilátek nebo prostřednictvím kteréhokoliv jiného činidla, blokujícího IL–18, tedy představuje novou protirevmatickou léčbu, modifikující onemocnění.
- 15

Předcházející popis specifických ztělesnění ukazuje obecnou povahu vynálezu, takže ostatní mohou, za použití běžných znalostí, snadno modifikovat a/nebo adaptovat specifická ztělesnění pro různá použití, aniž by byl překročen základní koncept. Proto by takové změny a modifikace měly být a jsou zamýšleny jako odpovídající vyznění a rozmezí popsaných ztělesnění. Je zřejmé, že frazeologie a terminologie, které jsou zde použity, slouží pro účely popisu a nemají být jeho omezením.

Část III: příklady 11 a 12, týkající se zánětlivého střevního onemocnění.

25

Příklad 11: Expres IL–18BP endoteliálními buňkami a makrofágy během aktivní Crohnovy choroby

30 Shromáždění vzorků

Biopsie střevní sliznice byly izolovány ze vzorků, chirurgicky odebraných pacientům s CD nebo UC (ulcerativní kolitidou). Zahrnuto bylo 14 pacientů trpících CD (3 muži a 11 žen) o průměrném věku 37,8 roku (od 20 do 78 let) a s průměrnou dobou onemocnění 8,3 roku (od 1 do 21 let). U 8 pacientů bylo onemocnění lokalizováno v tenkém střevě a u 6 v tlustém střevě. 12 pacientů užívalo imunosupresivní léky. Diagnóza aktivní CD byla učiněna po histopatologickém testování a na základě následujících kritérií: přítomnosti vředovitosti, zvýšeného množství buněk zánětu a transmurálního zánětu. Identifikováno bylo 7 pacientů s aktivní CD a 7 pacientů s neaktivním onemocněním. Mezi aktivními a neaktivními CD pacienty nebyly pozorovány žádné významné rozdíly, pokud se týká věku, lokalizace onemocnění, pohlaví, léčby a trvání onemocnění. Průměrný věk pěti pacientů s UC (3 muži a 2 ženy) byl 37,6 roku (od 30 do 44 let). Onemocnění bylo u všech pacientů lokalizováno v tlustém střevě a všichni používali imunosupresivní léčbu. Průměrná doba onemocnění byla 4 roky (od 1 do 9 roku). Kontrolní vzorky byly získány od 5 pacientů, kteří podstoupili odstranění poruch, jež nesouvisely s infekčním střevním onemocněním (IBD) (3 muži a 2 ženy). Průměrný věk této skupiny byl 55,2 roku (od 24 do 76 let). U všech pacientů bylo onemocnění lokalizováno v tlustém střevě.

45

Semikvantitativní RT–PCR pro lidský IL–18 a IL–18BP

50 Ze zmražených střevních biopsií pacientů s CD, s UC nebo kontrolních pacientů byla extrahována celková RNA. Tato extrakce byla provedena za použití prostředku Trizol (Gibco) podle instrukcí výrobce. Získané vzorky byly kvantifikovány měřením absorbance při 260 nm. Celistvost RNA byla ověřena elektroforézou v 1% agarózovém gelu. cDNA byla syntetizována z jednoho mikrogramu celkové RNA za použití systému reverzní transkripce Promega podle pokynů výrob-

ce. Reakce PCR byly prováděny v celkovém objemu 50 μ l v přítomnosti 1U AmpliTag-DNA-polymerázy (Perkin Elmer, Roche, USA), 2,5 mmol $\times$ l⁻¹ dNTPs (Amersham, USA) a 50 pmol dopředu směřujících a reverzních PCR primerů. Reakce byly inkubovány v zařízení PTC-200 Peltier Effect Thermal Cycler (MJ Research, USA) za následujících podmínek: denaturace 1 min. při 94 °C; temperování 1 min. při 55 °C a rozšíření 1 min. při 72 °C. Stanoveno bylo optimální množství cyklů pro IL-18BP, IL-18 a β -aktin před nasycením pásů (31, 28 a 25). PCR primery byly označeny na základě zveřejněných sekvencí (AF110799, D49950, X00351) následovně: IL-18, reverzní 5'-GCGTCACTACACTCAGCTAA-3'; dopředu směřující 5'-GCCTAGAGGTATGGCTGTAA-3'; IL-18BP, dopředu směřující 5'-ACCTGTCTACCTGGAGTGAA-3'; reverzní 5'-GCACGAAGATAGGAAGTCTG-3'; β -aktin, reverzní 5'-GGAGGAGCAATGATCTTGATCTTC-3'; dopředu směřující 5'-GCTCACCATGGATGATGATATCGC-3'. K vyloučení zmožení genomické DNA znečišťující vzorky byly PCR reakce prováděny v nepřítomnosti cDNA templátu. Produkty PCR (10 μ l) byl analyzován v 1% agarózových gelech, podrobených elektroforéze v TAE pufru. Velikost produktů PCR byla po následném obarvení gelu ověřena srovnáním se standardem o velikosti 1 000 (ladder Gibco). Poměrná kvantifikace ethidiumbromidem barvených pásů byla provedena pod UV světlem za použití analytického softwaru Kodak Digital Sciences a byla uváděna jako poměr cílového genu (hIL-18BP, hIL-18) vůči domácímu genu (h β -actin).

20 Vytváření monoklonálních protilátek zaměřených vůči hIL-18BP

Myším kmenem BALB/c bylo subkutánně injikováno do všech 4 končetin, stejně jako do šije, 50 μ g isoformy rhIL-18BP-6-his (vyčištěné z vaječnickových buněk čínského křečka, Interpharm Laboratories, Nes Ziona, Izrael) v PBS (fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku) spolu s adjuvantním činidlem (MPL + TDM emulze, RIBI Immunochem Research, Inc.) v den 0, 7 a 28. Čtyři dny po třetí imunizaci byly získány lymfatické žlázy a štěpeny pomocí 2,4 μ g/ml kolagenázy (kolagenáza IV, Worthington Biochemical Corp.) a 0,1% DNázy (Sigma). Izolované buňky byly poté spojeny s myelomatickými buňkami Sp2/0 za použití polyethylenglykolu 1 000 (Fluka). Buňky byly opětně suspendovány v médiu DMEM-F12, s 10% FCS (s fetálním telecím sérem, Gibco) v přítomnosti HAT (hypoxanthinu, aminopterinu a thymidinu) a byly rozděleny do destiček o 96 jamkách v koncentraci 5×10^{-4} buněk/ml. Vzorky supernatantu hybridomové kultury byly testovány vzhledem k přítomnosti reaktivních protilátek v přímém stanovení. K tomu účelu byly destičky ELIAS povlečeny kozími anti-myšími F(ab')₂ protilátkami (Jackson Immuno Research, Milan analytica, Švýcarsko). Poté byly přidány supernatanty hybridomové kultury a následně biotinylovaný rhIL-18BP-6his (vyčištěný z buněk COS, viz Novick se spoluautory, 1999), za nebo bez přítomnosti rhIL-18 (vyčištěného z rekombinantní E.coli, Serono Pharmaceutical Research Institute, Ženeva). Nakonec byla vyvinuta streptavidinová křenová peroxidáza (HRP) (Jackson Immuno Research, Milan analytica, Švýcarsko) za použití o-fenylendiaminu (OPD, Sigma). Nikoliv neutralizující protilátky byly vybrány a dále klonovány (subklonovány). V této studii byly použity 95-H20, myší IgG1 monoklonální protilátky.

Imunohistochemické studie k lokalizování IL-18BP-pozitivních buněk.

Vzorky tkáně byly lomivě zmrazeny a uchovávány při teplotě -80 °C. Získány byly sériové kryorezy (10 μ m), které byly připevněny na podložní sklička pokrytá poly-L-lysinem (Polylabo, Plan-Ies-Ouates, Švýcarsko) a fixovány v ledovém acetonu. Lokalizace lidské IL-18BP bílkoviny byla analyzována imunohistochemicky za použití Mab 95-H20. Po krátké rehydrataci v PBS byly řezy po dobu 30 minut preinkubovány v PBS, doplněném 2% fetálním telecím sérem (FCS, Cansera, Ontario, Kanada), 1% lidským sérem (AB⁺ sérum, transfuzní centrum, Annemasse, Francie) a 0,5% hovězím sérovým albuminem (BSA, Sigma, St. Louis, MO, USA). Endogenní peroxidázová aktivita byla blokována umístěním sklíček do roztoku PBS, 2% FCS, 1% lidského séra, 0,5% BSA a 1% peroxidu vodíku (Fluka, Švýcarsko) po dobu 1 hodiny. Po promytí v PBS byly řezy přes noc inkubovány v nezředěném kultivačním supernatantu Mab 95-H20. Po dalším promytí v PBS byly řezy inkubovány s biotinylovanými kozími anti-myšími protilátkami (Jack-

son Immuno Research, Milan analytica, Švýcarsko) (5 µg/ml) v PBS, obsahujícím 0,5% BSA, po dobu 1 hodiny. Citlivost barvení byla zvýšena inkubací s komplexem avidin DH/biotinylovaná HRP (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, CA, USA) po dobu 30 minut. Poté byla sklíčka promyta v PBS a vyvíjena za použití roztoku 30% peroxidu vodíku, 3,3-amino-9-ethylkarbazolu (AEC, Sigma) a N,N-dimethylformamidu (Merck) v acetátovém pufru o pH 5. Po opačném barvení hematoxylinem (Sigma) byly řezy povlečeny glycerolem a přikryty krycími sklíčky. Jako izotypová kontrola byly použity myši IgG1 protilátky (R a D systém).

Ke stanovení buněčné lokalizace lidské IL-18BP byla v řezech střevní sliznice provedena dvoubarevná imunohistochemická studie. Po 10 minutách rehydratace v PBS byly řezy preinkubovány 30 minut v PBS, doplněném 2% FCS, 1% lidským sérem a 0,5% BSA. Pro společnou lokalizaci s endoteliálními buňkami byly řezy inkubovány přes noc s biotinylovaným Mab 95-H20 (20 µg/ml), smíseným s FITC-konjugovaným myším anti-lidským CD 31 (1:50) (Pharmingen, CA, USA) v PBS/0,5% BSA. Pro společnou lokalizaci s makrofágy byly řezy inkubovány přes noc s biotinylovaným Mab 95-H20 (20 µg/ml), smíseným s FITC konjugovaným anti-lidským CD 68 (1:25) (Dako, Dánsko). Po promytí v PBS byla přidána na dobu 1 hodiny streptavidinová texaská červen (streptavidin Texas-Red, Southern Biotechnology Associates, AL, USA). Sklíčka byla opět promyta a řezy byly pokryty moviolem a překryta krycími sklíčky. Jako isotypová kontrola byly použity biotinylované myši IgG1 protilátky (Pharmingen s následnou aplikací streptavidinové texaské červeně.

Buněčná kultura

Endoteliální buňky z lidského pupečníku (HUVEC), Clonetics corp., San Diego, CA, USA) byly kultivovány za použití média pro růst endoteliálních buněk (EGM), doplněného lidským rekombinantním epidermálním růstovým faktorem (hEGF, 10 ng/ml), hydrocortisonem (1 µg/ml), gentamycinem a amphotericinem, B(50 ng/ml), hovězím mozkovým extraktem (BBE, 3 mg/ml) a 2% fetálním hovězím sérem (FBS, Clonetics corp., San Diego, USA), podle pokynů výrobce. Misky pro buněčné kultury byly předem povlečeny lidským fibronectinem (10 µg/cm², Boehringer, Mannheim). Buňky byly inkubovány ve vlhčeném inkubátoru s přívodem CO₂ a pokusy byly prováděny za použití buněk HUVEC po třetím pasážování. Buňky HUVEC byly ovlivňovány lidským IL-1β (10 ng/ml), TNF-α (10 ng/ml) a IFN-γ (20 ng/ml) (R a D system, Německo) po dobu 24 hodin. Po skončení kultivačního období byly shromážděny buňky, izolována RNA a ta byla podrobena RT-PCR k analýze IL-18BP a IL-18 mRNA transkriptu. Supernatanty byly shromážděny a analyzovány vzhledem k expresi bílkoviny IL-18BP a IL-18 prostřednictvím testu ELISA.

Lidská buněčná linie monocytů THP-1 byla udržována v suspenzní kultuře v médiu RPMI, doplněném 10%, tepelně inaktivovaným FCS, L-glutaminem (2 mmol x l⁻¹) penicilinem-streptomycinem (10 U/ml, Gibco BRL, Life Technologies) a b-merkaptioethanolem (50 µmol x l⁻¹, Fluka). Inkubovány byly ve zvlhčovaném inkubátoru s 5% CO₂ a pasážovány 1:10 po každých pěti dnech. Tři dny před pokusem byly lidské monocytové buňky rozlišeny (diferencovány) při hustotě 0,4 x 10⁶ buněk/ml vitaminem D3 (80 nM) (Biomol Research Laboratories, USA) a ponechány adherovat. Jakmile došlo k diferenciaci, byly k buněčným kulturám přidány LPS (100 ng/ml, Calbiochem), lidský IL-1β (10 ng/ml), TNFα (10 ng/ml) a IFNγ (20 ng/ml). Po 48 hodinách byly shromážděny supernatanty a analyzovány vzhledem k expresi bílkoviny IL-18BP a IL-18 pomocí testu ELISA.

Měření produkce lidské IL-18BP a IL-18

Přítomnost IL-18BP byla hodnocena testem ELISA v bezbuněčných supernatantech HUVEC, jak nestimulovaných, tak stimulovaných kokteilem cytokinů (IL-1β, TNFα a IFNγ) po dobu 24 hodin a v bezbuněčných supernatantech buněčné linie THP-1, a to jak nestimulovaných, tak stimulovaných po dobu 48 hodin (LPS, IL-1β, TNFα a IFNγ). K tomu účelu byly destičky přes

- noc povlékány zachycenými Mab (klon 657.27 při 0,5 mg/100 ml/jamku, Interpharm Laboratories, Nes Ziona, Israel), zaměřeným vůči rhIL-18BP (isoformě a). Rozpustný rhIL-18 byl poté detegován za použití králičích polyklonálních protilátek (v naředění 1:10 000), podnícených vůči rhIL-18BP-6his (vyčištěné z vaječnickových buněk čínského křečka, Interpharm Laboratories, Nes Ziona, Israel) s následnou inkubací s afinitně vyčištěným kozím anti-králičím IgG, konjugovaným s peroxidázou (naředění IgG = 1:20 000) (Jackson Immuno Research, Milan analytica, Švýcarsko). Zachycení Mab, stejně jako králičí polyklonální protilátky, bylo testováno způsobem „Western blot“ k potvrzení specifity IL-18BP. Jako standard byla použita rekombinantní hIL-18BP-6his. Citlivost testu ELISA byla 100 pg/ml. Souběžně byly hladiny IL-18 kvantifikovány za použití sady „lidský IL-18 ELISA“ (MBL, Immunotech). Citlivost ELISA byla 12,5 pg/ml.

Expres hIL-18BP-His6 v buňkách CHO

- Rekombinantní lidská IL-18BP (hIL-18Pa-His6-tag) byla vyčištěna z vaječnickových buněk čínského křečka, CHO (Interpharm Laboratories, Nes Ziona, Israel).

Výsledky

- Expres IL-18BP mRNA transkriptů ve střevních biopsiích

- Analýza exprese IL-18BP mRNA byla provedena pomocí RT-PCR v tkáňových homogenátech střevních vzorků, chirurgicky odebraných pacientům buď s aktivní CD, nebo neaktivní CD, nebo s UC a v homogenátech nezánettivých střevních tkání (obr. 14). IL-18BP a aktinové transkripty byly detegovány ve všech testovaných střevních homogenátech. Podobně byly transkripty pro IL-18 nalezeny ve všech tkáňových homogenátech od CD či UC pacientů i od nikoli-IBD kontrol (obr. 14 A). Poměr IL-18BP nebo IL-18 a kontrolních hladin mRNA aktinu vykazoval statisticky významné zvýšení (jak je popsáno níže) v množství transkriptů jak pro IL-18BP, tak IL-18 v biopsiích, získaných od pacientů s aktivní CD ve srovnání s biopsiemi pacientů s neaktivní CD, UC a nikoli-IBD kontrolami (obr. 14 B a C). Tyto údaje ukazují, že IL-18BP je ve slizniční tkáni během aktivní CD usměřována směrem nahoru (up-regulated) a poskytují první důkaz, že hladina exprese IL-18BP jasně rozlišuje aktivní CD a neaktivní CD, UC a nikoli-IBD kontroly.

Statistická analýza exprese transkriptů IL-18BP mRNA ve střevních biopsiích

- Provedena byla analýza odchylek, variační analýza, sdružující dohromady veškeré dostupné údaje. Výsledek jasně určil statisticky se vymykající výsledky jednoho z pacientů ze skupiny s aktivní CD (velice vysoký poměr opt. hustoty OD pro IL-18, jmenovitě 16252 a velmi nízký OD poměr pro IL-18BP, jmenovitě 1058). Těchto několik ojedinělých a velmi atypických měření neumožňovalo ověření modelu ANOVA (hodnota p v testu Shapira-Wilkse pro normalitu zbytků < 0,0001). Bylo proto rozhodnuto těchto několik měření ve statistické analýze ignorovat.

- Použitý model ANOVA bere v úvahu faktory Skupina (Kontrolní, Aktivní CD, Neaktivní CD a UC), Bílkovina (IL-18 nebo IL-18BP) a Počet pacientů (23 pacientů). Mezi Skupinami existuje významný rozdíl (hodnota p < 0,0001). Je také zajímavé zaznamenat, že rozdíl v poměru OD mezi IL-18 a IL-18BP není významný (hodnota p = 0,369). Kromě toho byla rovněž stanovena korelace mezi expresí IL-18 a IL-18BP. Koeficient korelace mezi IL-18 a IL-18BP je rovný 0,67, což ukazuje na pevné spojení mezi poměrem OD, měřeným pro IL-18 a IL-18BP. Při ověřování výsledků, týkajících se účinku „Skupiny“, byla použita Scheffého metoda pro srovnání různých skupin. Lze uzavřít, že poměr OD pro skupinu „Aktivní CD“ je významně větší než pro skupiny „Kontroly“ (+3280), „UC“ (+2950) a zvláště než pro „Inaktivní CD“ (+4580) pro expresi jak IL-18BP, tak i IL-18.

Imunohistochemická lokalizace IL-18BP ve střevních tkáních

Pro vyhodnocení buněčné exprese IL-18BP *in situ*, místně, bylo použito imunohistochemického stanovení za použití monoklonálních protilátek specifických vůči hIL-18BP v kryotických řezech, připravených ze střevních tkání pacientů s aktivní CD a kontrolních osob bez IBD. Buňky pozitivní vůči IL-18BP byly detegovány ve slizničním vazivu (lamina propria), podslizničním vazivu a ve vrstvě svalu (není uvedeno). Pozitivně obarvené mononukleární buňky, přítomné ve slizničním vazivu a v podslizničním vazivu, vykazovaly bohatý cytoplasm, puchýřkovité jádro ve tvaru sítě a morfologicky byly v souladu s tkáňovými makrofágy. Ve svalové vrstvě měly pozitivně obarvené buňky bohatý cytoplasm, někdy s otevřenou buněčnou dutinou uprostřed, připomínající pozitivní barvení mikrocévek, a byly morfologicky v souladu s endoteliálními buňkami. Monoklonálními protilátkami vůči hIL-18BP byly rovněž specificky barveny široké cévy. Významné zvýšení pozitivně obarvených buněk, pozorovaných ve vzorcích získaných od pacientů s aktivní CD, ve srovnání se vzorky, získanými od kontrol bez IBD, bylo v souladu se zvýšenou expresí IL-18BP, pozorovanou při analýze RT-PCR. Přilehlé řezy byly inkubovány s odpovídajícími myšími isotypovými kontrolami.

Identifikace buněk produkujících IL-18BP, přítomných v slizničních biopsiích

Buňky pozitivní vzhledem k IL-18BP, přítomné v zánětlivých střevních tkáních, byly identifikovány za použití specifických markerů (označovačů) makrofágů (anti-CD68) a endoteliálních buněk (anti-CD31) (není znázorněno). CD68-pozitivní buňky (v zelené) a IL-18BP-pozitivní buňky (v červené) byly detegovány ve slizničním vazivu a v podslizničním vazivu střevní tkáně pacientů s aktivní CD (není znázorněno). CD31-pozitivní buňky (v zelené) a IL-18BP-pozitivní buňky (v červené) byly detegovány v podslizničním vazivu. K potvrzení, že makrofágy a endoteliální buňky byly rovněž pozitivní vzhledem k IL-18BP, byly obě barvy, zeť z anti-CD68 nebo anti-CD31 a červen z anti-IL-18BP analyzovány společně k prokázání toho, že veškeré buňky, které vázaly anti-IL-18BP protilátky, byly buď CD68-pozitivní, nebo CD31 pozitivní (oranžovo-žlutá barva). Dvojitě imunitní značení prokázalo, že makrofágy a endoteliální buňky byly hlavním zdrojem barvení IL-18BP v zánětlivých tkáních, získaných od pacientů s CD.

Expres IL-18BP mRNA a bílkoviny endoteliálními buňkami

Pro určení schopnosti lidských endoteliálních buněk produkovat IL-18BP, stejně jako k potvrzení výsledků získaných imunitním barvením a RT-PCR v celkových biopsiích, byly provedeny další pokusy typu RT-PCR na lidských buňkách z pupečnickové krve (HUVEC) (obr. 15). Endoteliální buňky byly ovlivněny směsí cytokinů (hIL-1 β , hTNF α , hIFN γ) a po 24 hodinách byly shromážděny pro extrakci RNA a analýzu PCR. Poměr hladin mRNA IL-18BP a kontrolního aktinu prokázal po 24 hodinách u ovlivněných buněk ve srovnání s nestimulovanými buňkami zvýšení množství transkriptů IL-18BP. Kromě toho se zdá, že mRNA IL-18BP je konstitutivně exprimována v endoteliálních buňkách. Analyzována byla také hladina mRNA IL-18 a u ovlivněných buněk vykazovala slabé zvýšení. Ovšem u nestimulovaných endoteliálních buněk k expresi mRNA IL-18 nedochází.

Stanovení ELISA s kultivačními supernatanty nestimulovaných buněk (médiem) a buňkami HUVEC, ovlivňovanými po dobu 24 hodin odhalilo, že bílkovina IL-18BP byla přítomna jak v médiu, tak i ve stimulovaných buňkách s třicetinasobným zvýšením po 24 hodinách stimulace (obr. 15 B).

Expres bílkoviny IL-18BP buněčnou linií monocytů (THP-1)

Expres IL-18 a IL-18BP byla analyzována v kultivačních supernatantech jak nestimulovaných, tak i stimulovaných diferenciovaných buněk THP-1 pomocí testu ELISA (obr. 15 C). Tento po-

kus odhalil zvýšení exprese IL-18BP po 48 hodinách stimulace prostřednictvím LPS, hIL-1 β , hTNF α , hIFN γ . Souběžně byla po stimulaci zvýšena také sekrece IL-18 (obr. 15 C).

Souhrn

5

V předkládané studii byla charakterizována exprese IL-18BP a lokalizace ve slizniční tkáni, získané od pacientů s Crohnovou chorobou a s ulcerativní kolitidou. Za použití semikvantitativního uspořádání RT-PCR bylo zjištěno, že transkripty mRNA IL-18BP byly v biopsiích sliznice pacientů s aktivní Crohnovou chorobou zvýšené ve srovnání s pacienty s ulcerativní kolitidou a s kontrolními pacienty bez zánětlivého onemocnění. Imunohistochemická analýza biopsií sliznice lokalizovala bílkovinu IL-18BP do endoteliálních buněk a makrofágů, infiltrujících sliznici během Crohnova onemocnění. Exprese IL-18 BP endoteliálními buňkami a aktivovanými makrofágy byla potvrzena v primárních lidských pupečnickových endoteliálních buňkách (HUVEC) a v buněčné linii monocytů THP1, stimulovaných *in vitro*. Tyto buňky po stimulování vylučovaly biologicky aktivní IL-18BP.

15

Příklad 12: Léčba inhibitory IL-18 zlepšuje experimentální kolitidu

20

Materiál a metody

Myši a indukce kolitidy

25

Veškeré pokusy schválil Výbor pro etiku studií na zvířatech, University of Amsterdam, Nizozemí. Myši BALB/c byly získány od Harlan Sprague Dawley Inc. (Horst, Nizozemí). Myši byly ustájeny za obvyklých podmínek a zaopatřeny pitnou vodou a potravou (AM-II 10 mm, Hope Farms, Woerden, Nizozemí).

30

Pokusy byly prováděny za použití myších samic BALB/c ve věku 8 a 10 týdnů. Kolitida byla indukována rektálním podáním dvou dávek (oddělených sedmidenním intervalem) 2 mg 2,4,6-trinitrobenzensulfonové kyseliny, TNBS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) ve 40% ethanolu (Merck, Darmstadt, Německo) za použití vinylového katetru, který byl zasunut do konečníku v délce 3 cm (10 myši ve skupině). Během nakapávání byly myši pod anestézi isofluranem (1-chlor-2,2,2-trifluorethyl-isofluran-difluormethylether, Abbott Laboratories Ltd., Queenborough, Kent, Velká Británie) a po nakapání byly po dobu 60 sekund drženy ve svislé poloze. Kontrolní zvířata podstoupila stejné zacházení, ale do konečníku jim byla nakapána fyziologická sůl. Veškeré myši byly usmrceny devátý den po prvním podání TNBS (tj. 48 hodin po druhém podání TNBS).

35

40

Myši byly i. p. ovlivněny (léčeny) lidským IL-18BP v 500 μ l 0,9% fyziologického roztoku.

45

HIL-18BP je šestinásobně histidinem označená lidská rekombinantní bílkovina, vytvářená v expresním systému CHO. HIL-18BP byla biologicky aktivní, neboť inhibovala produkci IFN γ v buněčné linii KG-1 a snižovala produkci IFN γ myšími splenocyty (Kim se spoluautory, 2000).

Hodnocení zánětu

50

Tělesné hmotnosti byly zaznamenávány denně. Slezina, ocasní lymfatické žlázy a tlustá střeva byly odebrány po usmrcení zvířat. Tlustá střeva byla odebrána středovým řezem a podélně otevřena. Po odstranění fekálního materiálu byla zaznamenána vlhká hmotnost distálních 6 cm a použita jako index pro ztlustění střešní stěny spojeného s onemocněním. Následně byla tlustá střeva podélně rozdělena na dvě části, z nichž jedna byla použita k histologickým stanovením.

Histologická analýza

Podélně rozdělená tlustá střeva byla svinuta, fixována ve 4% formaldehydu a zalita do parafínu pro rutinní histologické stanovení. Dva hodnotící, kteří nebyli seznámeni s rozvržením léčby, známkovali následující parametry: 1) procento zahrnuté plochy, 2) hyperplazii folikulárních shluků, 3) otok, 4) erosi/vředovitost, 5) úbytek krypty a 6) infiltraci mono- a polymorfonukleárních buněk. Procento zahrnuté plochy a úbytek krypty byly známkovány v rozmezí od 0 do 4 následujícím způsobem: 0, normální; 1, menší než 10 %; 2, 10 %; 3, 10 až 50 %; 4, více než 50 %. Eroze (narušení) byly definovány jako 0, pokud byl epitel intaktní, 1 pro postižení slizničního vaziva (lamina propria), 2 pro vředovitost, postihující podslizniční vazivo a 3 pro transmurní vředovitost (procházející celou stěnou). Závažnost dalších parametrů byla známkována od 0 do 3 následovně: 0, nepřítomné; 1, slabé; 2, mírné; 3, silné. Toto známkování je v rozmezí od 0 do maxima 26 bodů.

Homogenáty tlustého střeva

Tlusté střevo bylo odebráno a pomocí tkáňového homogenizátoru byly v 9 objemech Greenburgerova lyzovacího pufru (300 mmol $\times$ l^{-1} NaCl, 15 mmol $\times$ l^{-1} Tris, 2 mmol $\times$ l^{-1} MgCl₂, 2 mmol $\times$ l^{-1} Triton /X-10/, Pepstatin A, Leupeptin, Aprotinin (všechny po 20 ng/ml), pH 7,4) připraveny homogenáty. Tkáň byla po dobu 30 minut lyzována v ledu a následně dvojnásobně odstředěna (10 minut, 14 000 g). Homogenáty byly až do použití skladovány při -20 °C.

Buněčná kultura a stanovení ELISA pro cytokiny

K přípravě buněčné suspenze slezinných buněk a buněk ocasní lymfatické žlázy byly použity filtrové buněčné oddělovače (Becton/Dickinson Labware, New Jersey, USA). Buňky byly suspendovány v médiu RPMI 1640 (BioWhittaker-Boehringer, Verviers, Belgie), obsahujícím 10% FCS a ciproxin (10 μ g/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Slezinné buňky byly odstředěny se sterilním prostředkem Ficoll (Pharmacia, Uppsala, Švédsko), mononukleární buňky převedeny do RPMI a buněčné suspenze byly spočítány. Celkové množství 1×10^5 buněk na myš bylo inkubováno v 200 μ l RPMI (BioWhittaker Europe, A Cambrex Company, Verviers, Belgie), obsahujícím antibiotika a 10% FCS, v jamkách v trojitém uspořádání (triplikáty). Buňky byly stimulovány předchozím potažením protilátkou anti-CD3 (koncentrace 1:30; klon 145.2C11) a rozpustnou protilátkou anti-CD28 (koncentrace 1:1000, Pharmingen). Supernatanty byly odstraněny po 48 hodinách a koncentrace IFN- γ (Pharmingen) a TNF- α (R&D systems, Abingdon, Velká Británie) byly měřeny ve stanovení ELISA.

Průtoková cytometrie

Izolované slezinné buňky byly promyty pufrem Facs (PBS, tj. fosfátem pufovaný fyziologický roztok, obsahující 0,5 % BSA, 0,3 mmol/l EDTA a 0,01% azid sodný) a poté byly po zbytek postupu udržovány v ledu. Množství 2×10^5 buněk na jamku (mikrotitrační kultivační destička o 96 jamkách se špičatým dnem, Greiner B.V. labor technieken, Alphen aan de Rijn, Nizozemí) bylo kultivováno a následujícími protilátkami (mAbs): Cy-crom-konjugovanými krysími anti-myšími CD4 (klon RM-4-5), Fitc-konjugovanými krysími anti-myšími CD69 a Fitc-konjugovanými krysími anti-myšími CD25 (Pharmingen, San Diego, CA, USA). Lymfocyty byly propouštěny dopředu směřujícím a bočním rozptylovačem za použití průtokového cytometru FACScan ve spojení se software Facscan (Becton Dickinson, Mountain View, USA) a odpočítáno bylo 5 000 buněk. Výsledky jsou vyjádřeny jako procentní množství prošlých buněk, pozitivních vzhledem k použitým mAbs.

Statistická analýza

Hodnoty jsou uváděny jako průměr $\pm$ SEM (stř. chyba průměru) na léčebnou skupinu. Rozdíly mezi skupinami byly analyzovány za použití neparametrického Mann–Withneyova U testu. Hmotnostní změny v čase byly analyzovány jednocestnou varianční analýzou. Hodnota $p < 0,05$ byla považována za významnou. Pro veškeré analýzy byl použit SPSS statistický software (SPSS Inc., Chicago, USA).

10 Výsledky

IL–18BP chrání vůči hmotnostnímu úbytku u myšího modelu kolitidy

Pro zjištění role IL–18 v experimentální kolitidě a zejména ochranného účinku vazebné bílkoviny IL–18 (IL–18BP) byla u myší kmene BALB/c indukována TNBS kolitida. Tento model sestává z Místního vystavení trinitrobenzensulfonové kyselině (TNBS) ve 40% ethanolu. To vyvolává reakci přecitlivělosti opožděného typu vůči haptenu (trinitrofenylem) modifikovanému vlastnímu Antigenu a odpovědí je typ Th–1 se zvýšenou produkcí prozánětlivého cytokinu.

20 Myši byly ovlivněny (léčeny) lidskou IL–18BP nebo kontrolním roztokem intraperitoneálně na denním základě.

Denní intraperitoneální dávky, pohybující se v rozmezí od 12,5 do 50 μ g hIL–18BP, neovlivnily závažnost onemocnění (údaje nejsou předloženy). Ovšem použití dávky 200 μ l hIL–18BP, denně podávané intraperitoneálně, bylo účinné ke snížení ztráty hmotnosti ve spojení s indukci onemocnění.

Podle očekávání intrarektální nakapání TNBS vyvolalo průjem a vyčerpanost. Jak je znázorněno na obr. 16, zvířata v obou ovlivňovaných skupinách v den 3 ztrácela 15 % základní hmotnosti. Na rozdíl od kontrolních zvířat se však myši, léčené hIL–18BP počínaje dnem 4 po nakapání TNBS, z původní ztráty hmotnosti rychle vzpamatovaly a svoji základní hmotnost obnovily v den 8. U kontrolních myší druhé podání TNBS v den 8 opět vyvolalo významný úbytek hmotnosti, kterému bylo v podstatě zamezeno v případě podání hIL–18BP. Podání hIL–18BP myším, které obdržely fyziologický roztok, nemělo žádný účinek (údaje nejsou uvedeny). Podání hIL–18BP tedy významně oslabilo hmotnostní úbytek, spojený s kolitidou, indukovanou TNBS ($p < 0,05$).

Účinek zánětlivých parametrů

40 Myši byly usmrceny v den 10 a stanovena byla hmotnost posledních 6 cm jejich tlustého střeva (Obr. 17 A). U TNBS–kolitidy hmotnost tlustého střeva vzrostla ve srovnání s myšmi, jimž byl poskytnut fyziologický roztok. Tento přírůstek hmotnosti byl významně menší u myší ovlivňovaných hIL–18BP (181,6 mg $\pm$ 11,4) ve srovnání s myšmi, jimž byl poskytnut fyziologický roztok (268 mg $\pm$ 27,3); $p < 0,05$. Dříve bylo popsáno, že TNBS–kolitida je spojena s rostoucí buněčnou migrací do ocasních lymfatických žláz (L. Camoglio se spoluautory; Hapten–induced colitis associated with maintained Th1 and inflammatory responses in IFN–gamma receptor–deficient mice; Eur. J. Immunol. 30, 1486–1495; 2000). Ovlivnění (léčba) prostřednictvím IL–18BP snížilo počet buněk, napadajících ocasní lymfatické žlázy (Obr. 17 B) ve srovnání s počtem buněk v ocasních lymfatických žlázách myší s TNBS kolitidou, ovlivňovaných fyziologickým roztokem.

55 Změna exprese CD69, což je marker aktivace časných lymfocytů T, byla stanovena analýzou „Facsan“ (obr. 17 C). Procentní množství splenocytů CD4⁺, exprimujících CD69, bylo 11,4 % u myší ovlivněných TNBS, ale procentní množství CD4⁺/CD69⁺ u myší ovlivněných TNBS a léčených prostřednictvím hIL–18BP činilo 7,3 % ($p < 0,05$).

Produkce cytokinů buňkami sleziny, ocasní lymfatické žlázy a homogenáty tlustého střeva

Pro zjištění účinku hIL-18BP na schopnost lymfocytů T produkovat po aktivaci receptoru buňky T syntézu prozáněťových cytokinů byly buňky izolovány z ocasní lymfatické žlázy a sleziny a byly 48 hodin stimulovány prostřednictvím protilátek CD3/CD28. V supernatantech byla měřena produkce IFN- γ a TNF α , obr. 18. V produkci cytokinů myšmi ovlivněnými hIL-18BP a kontrolními zvířaty nebyly pozorovány žádné významné rozdíly. Neutralizace IL-18 prostřednictvím hIL-18BP tak nezpůsobila obecné snížení schopnosti lymfocytů T odpovídat na aktivaci T-buňčného receptoru.

Homogenáty tlustého střeva byly analyzovány vzhledem k hladinám cytokinů, čímž se měřila místní produkce cytokinů (obr. 19). V homogenátech tlustého střeva nebyl nalezen rozdíl v hladinách IFN- γ u myší ovlivněných TNBS a u myší ovlivněných TNBS a léčených hIL-18BP (134 pg/ml $\pm$ 7,8 a 139 pg/ml $\pm$ 23). Ovšem hladiny TNF- α byly významně sníženy v homogenátech tlustého střeva myší léčených hIL-18BP, a to z 110 pg/ml $\pm$ 3 u myší ovlivněných TNBS na 59 pg/ml $\pm$ 2,7 u myší ovlivněných TNBS a léčených hIL-18BP.

Histologické nálezy

Ke zjištění, zda snížení parametrů zánětu, zprostředkovává účinkem hIL-18BP, rovněž ovlivňuje histologické hodnocení byla provedena histopatologie v parafinových řezech. Celkové známkování zánětu, pokud se týká histologie, bylo oproti kontrolně ovlivněným myším u myší ovlivněných hIL-18BP významně sníženo (15,9 $\pm$ 1,1 u neovlivněných myší vůči 9,8 $\pm$ 1,3 u myší ovlivněných hIL-18BP) (údaje nejsou uvedeny), zejména v důsledku snížení počtu leukocytů, infiltrujících sliznici ($p < 0,05$). Pozoruhodným zjištěním byla úplná nepřítomnost vředovitosti ve sliznici u myší, ovlivněných IL-18BP ($p < 0,05$). Zjištění jsou shrnuta níže v Tabulce 2. Zvláště pozoruhodná je úplná prevence vředovitosti u myší, ovlivněných IL-18BP.

Tabulka 2: Různé položky známkování kolitidy u myší ovlivněných TNBS, léčených buď fyziologickým roztokem, nebo hIL-18BP.

	kontrolní myši, ovlivň. TNBS	myši ovlivň. TNBS a léčené hIL-18BP
% poškozené plochy	3,4 $\pm$ 0,4	32, $\pm$ 0,5
shluky měchýřků (folikulů)	2,0 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,4
otok	2,1 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,3
fibróza	0,85 $\pm$ 0,26	0,5 $\pm$ 0,2
vředovitost	2,0 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0*
ztráta krypty	1,7 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,3
polymorfonukleární buňky	2,6 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,2*
mononukleární buňky	1,1 $\pm$,01	0,33 $\pm$ 0,21*

údaje jsou udány jako průměr $\pm$ SEM v rozmezí 0 až 4, * představuje významnou odchylku

Polyklonální protilátky anti-mIL-18 chrání vůči onemocnění u myšího modelu dextranulfátem sodným indukované kolitidy

- 5 U tohoto modelu byl do vody k pití počínaje dnem 0 až do usmrcení zvířat přidáván dextranulfát sodný (DSS). Polyklonální protilátky vůči IL-18BP byly podávány intraperitoneálně v den 0, 4 a 8. Dávky představovaly 200 a 400 μ l králíčího séra. Vyšší dávka (400 μ l) poskytla významné snížení úbytku hmotnosti, klinického hodnocení, rektálního krvácení a zkrácení tlustého střeva (není znázorněno). Léčba králíci anti-mIL-18BP vykazala prodloužení v iniciaci onemocnění
- 10 a zabraňovala jeho rozvoji (není znázorněno).

Souhrn

- 15 Příklad 12, uvedený výše, ukazuje, že neutralizace IL-18 podáním buď hIL-18BP nebo polyklonálního antiséra vůči IL-18 účinně snižuje závažnost pokusně indukované kolitidy u myší.

Myši, léčené denně intraperitoneálním podáním hIL-18BP, se rychle zotavily, ve srovnání s kontrolními zvířaty, z prvotního úbytku hmotnosti. Další parametry střevního zánětu, měřené hmotností střeva a návalem (influxem) buněk do ocasní lymfatické žlázy, nebyly u myší léčených hIL-18BP sníženy. Histopatologie léčených myší byla charakterizována snížením závažnosti

20 destrukce tkáně (vředovitosti) a množství infiltrovaných buněk bylo značně sníženo. Účinek hIL-18BP byl také systémový, jak je prokázáno sníženou expresí CD9 buňkami sleziny.

Místní produkce TNF- α , měřená ve střevních homogenátech, byla významně snížena u myší TNBS, léčených hIL-18BP. To ukazuje, že TNF- α hraje důležitou roli ve vývoji onemocnění. Hladiny IFN- γ byly srovnatelné u myší TNBS a u myší TNBS, léčených pomocí hIL-18BP, což může být vysvětleno přebytkem stimulů, indukujících IFN- γ .

25

Lze uzavřít, že výše uvedené údaje dokládají přínosný účinek inhibitorů IL-18 při léčbě zánětlivých střevních onemocnění.

30

35 PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití inhibitoru interleukinu-18, kterým je IL-18 vazebný protein, IL-18BP, pro přípravu léčiva pro léčení nebo prevenci alkoholické hepatitidy.

40

2. Použití podle nároku 1, při němž je IL-18 vazebný protein polyethylenglykolován.

3. Použití podle nároku 1, při němž je inhibitorem IL-18 fúzní protein, který obsahuje celý IL-18 vazebný protein, nebo jeho část, spojený s imunoglobulinem nebo jeho částí, přičemž tento fúzní protein se váže na IL-18.

45

4. Použití podle nároku 3, při němž fúzní protein obsahuje celou konstantní oblast imunoglobulinu nebo její část.

50 5. Použití podle nároku 4, při němž imunoglobulin náleží k isotypu IgG1 nebo IgG2.

6. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, při němž léčivo dále obsahuje interferon.

7. Použití podle nároku 1, při němž interferonem je interferon- β .

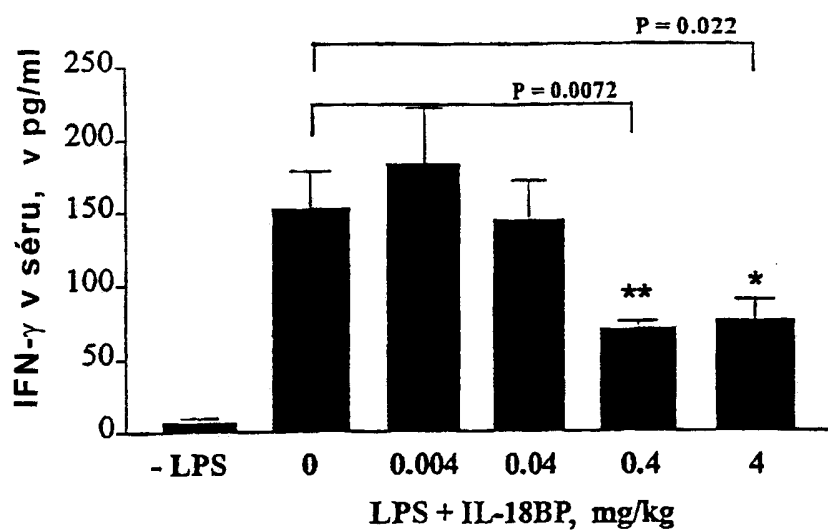
55

8. Použití podle nároku 6 nebo 7, při němž se léčivo připravuje ve formě, vhodné pro podání inhibitoru IL-18 a interferonu současně, postupně nebo odděleně.
- 5 9. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8, při němž léčivo dále obsahuje antagonistu faktoru nekrózy tumorů TNF.
- 10 10. Použití podle nároku 1, při němž antagonistou TNF je rozpustný receptor TNF I, TBPI, nebo rozpustný receptor TNF II, TBPII.
11. Použití podle nároku 9 nebo 10, při němž se léčivo připravuje ve formě, vhodné pro podání inhibitoru IL-18 a antagonisty TNF současně, postupně nebo odděleně.
12. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 11, při němž léčivo dále obsahuje inhibitor cyklo-oxygenázy COX.
- 15 13. Použití podle nároku 12, při němž inhibitorem COX je inhibitor COX-2.
14. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 13, při němž se inhibitor IL-18 použije v množství 0,0001 až 10 mg/kg tělesné hmotnosti.
- 20 15. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 14, při němž se inhibitor IL-18 použije v množství 0,01 až 5 mg/kg tělesné hmotnosti.
16. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 14, při němž se inhibitor IL-18 použije v množství 0,1 až 3 mg/kg tělesné hmotnosti.
- 25 17. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 14, při němž se inhibitor IL-18 použije v množství 1 až 2 mg/kg tělesné hmotnosti.
18. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 13, při němž se inhibitor IL-18 použije v množství 0,1 až 1000 µg/kg tělesné hmotnosti.
19. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 14, při němž se inhibitor IL-18 použije v množství 1 až 100 µg/kg tělesné hmotnosti.
- 35 20. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 14, při němž se inhibitor IL-18 použije v množství 10 až 50 µg/kg tělesné hmotnosti.
21. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 20, při němž se inhibitor IL-18 nachází ve formě, vhodné pro podkožní podání.
- 40 22. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 20, při němž se inhibitor IL-18 nachází ve formě, vhodné pro nitrosvalové podání.
23. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 22, při němž se inhibitor IL-18 nachází ve formě, vhodné pro každodenní podání.
- 45 24. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 22, při němž se inhibitor IL-18 nachází ve formě, vhodné pro podání ob den.
- 50 25. Použití expresního vektoru s obsahem kódové sekvence pro IL-18 vazebný protein pro výrobu léčiva pro léčení nebo prevenci alkoholické hepatitidy.

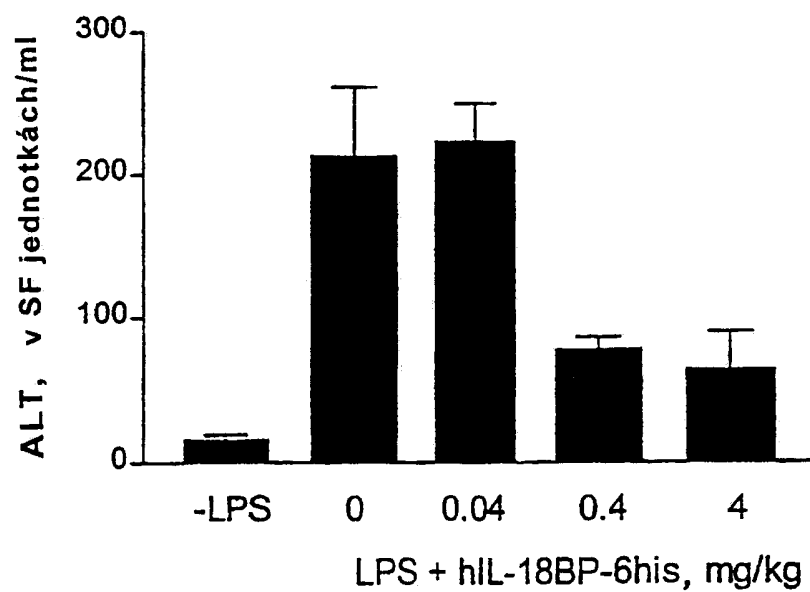
26. Použití podle nároku 25 pro genovou terapii.
27. Použití buňky, která byla geneticky modifikována k produkci IL-18 vazebného proteinu, pro
5 výrobu léčiva pro léčení nebo prevenci chronického poškození jater alkoholickou hepatitidou.

10

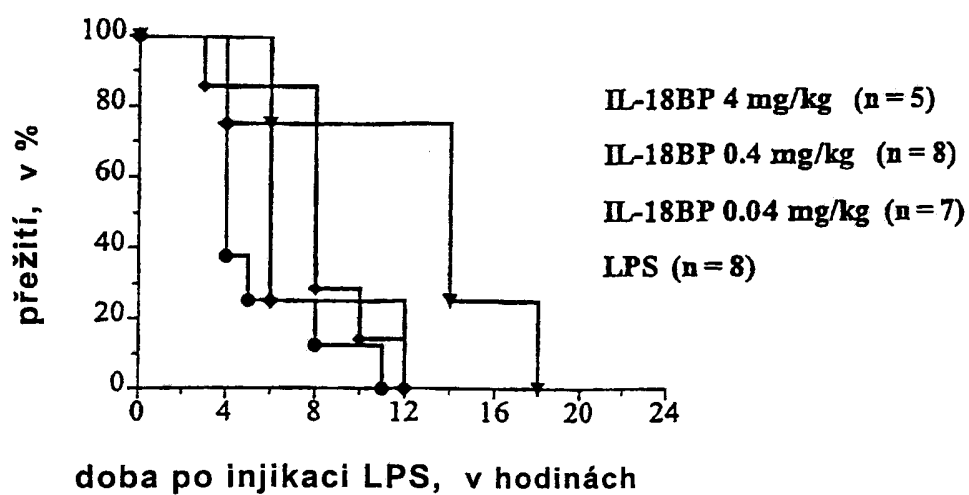
15 výkresů



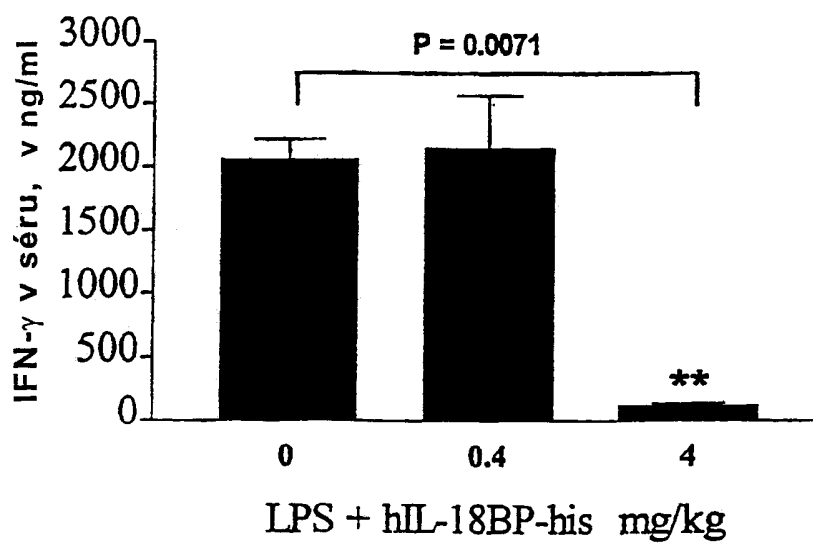
Obr. 1



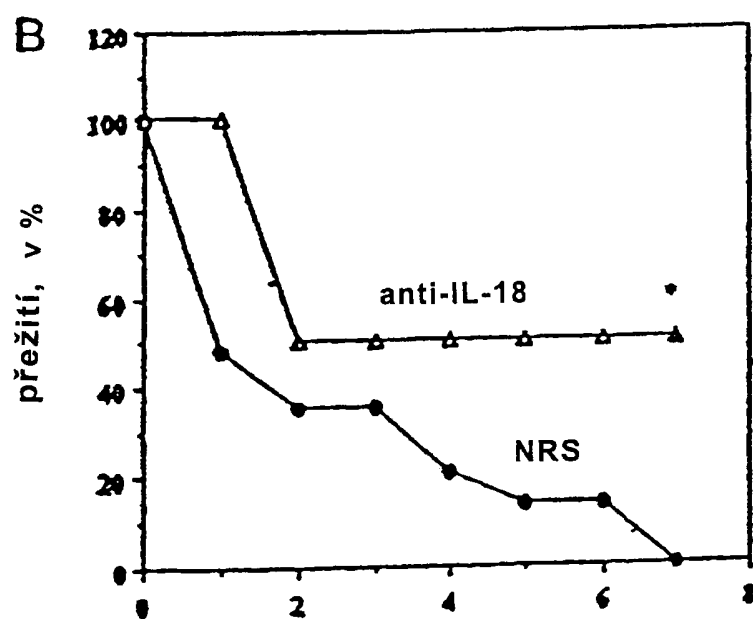
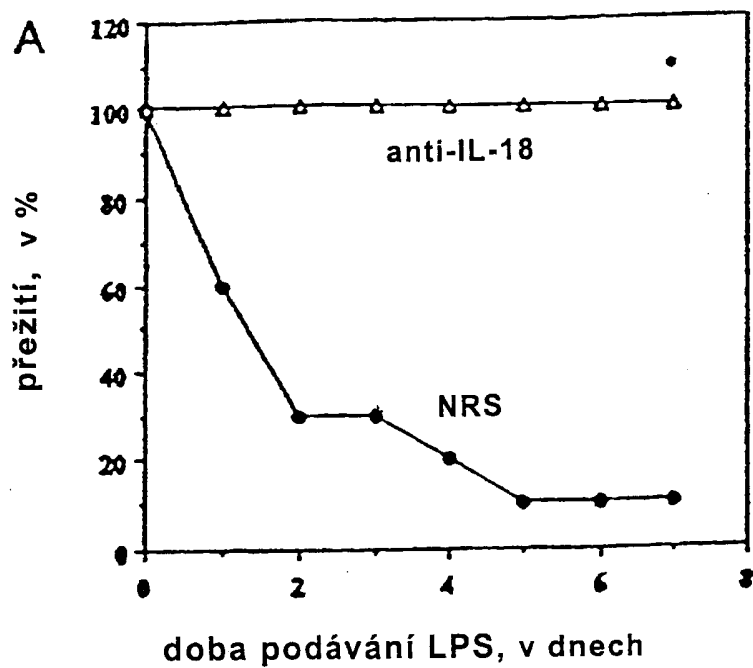
Obr. 2



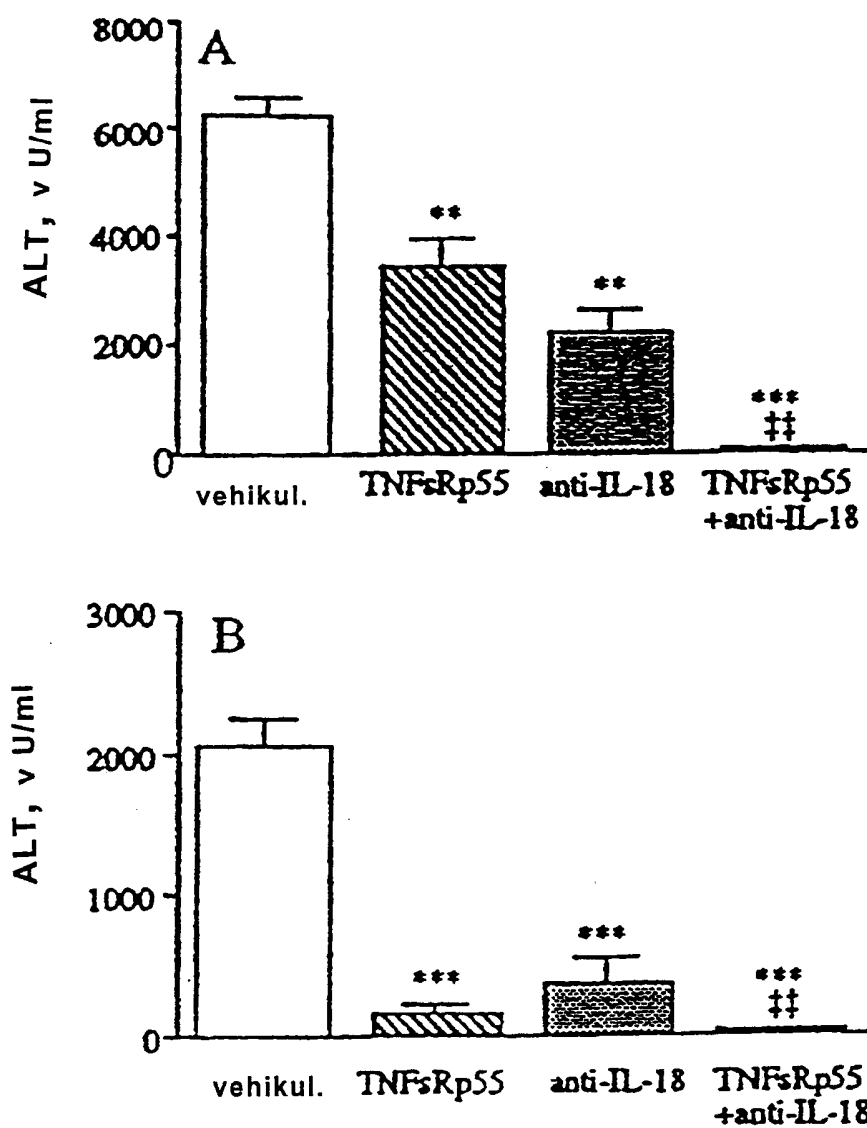
Obr. 3



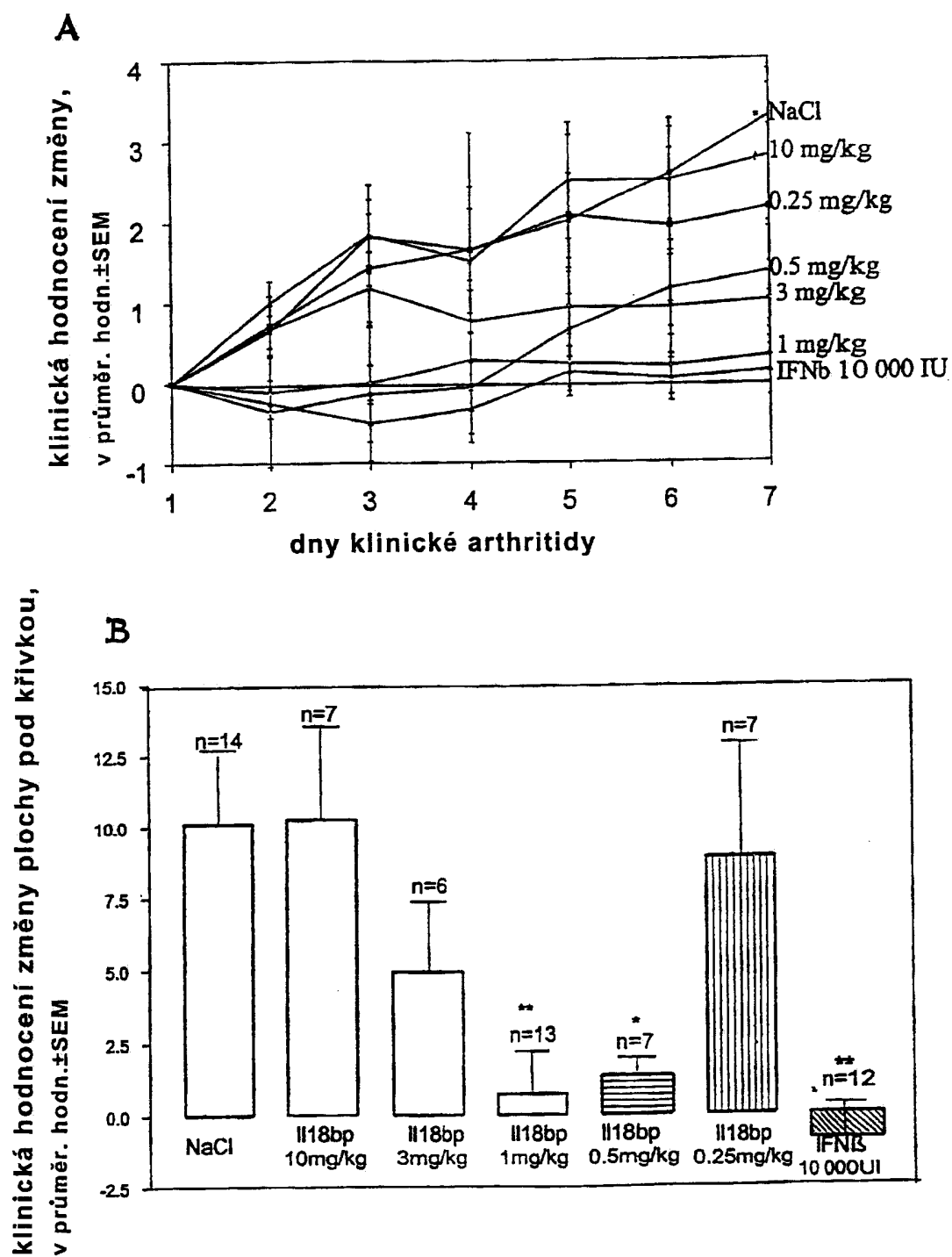
Obr. 4



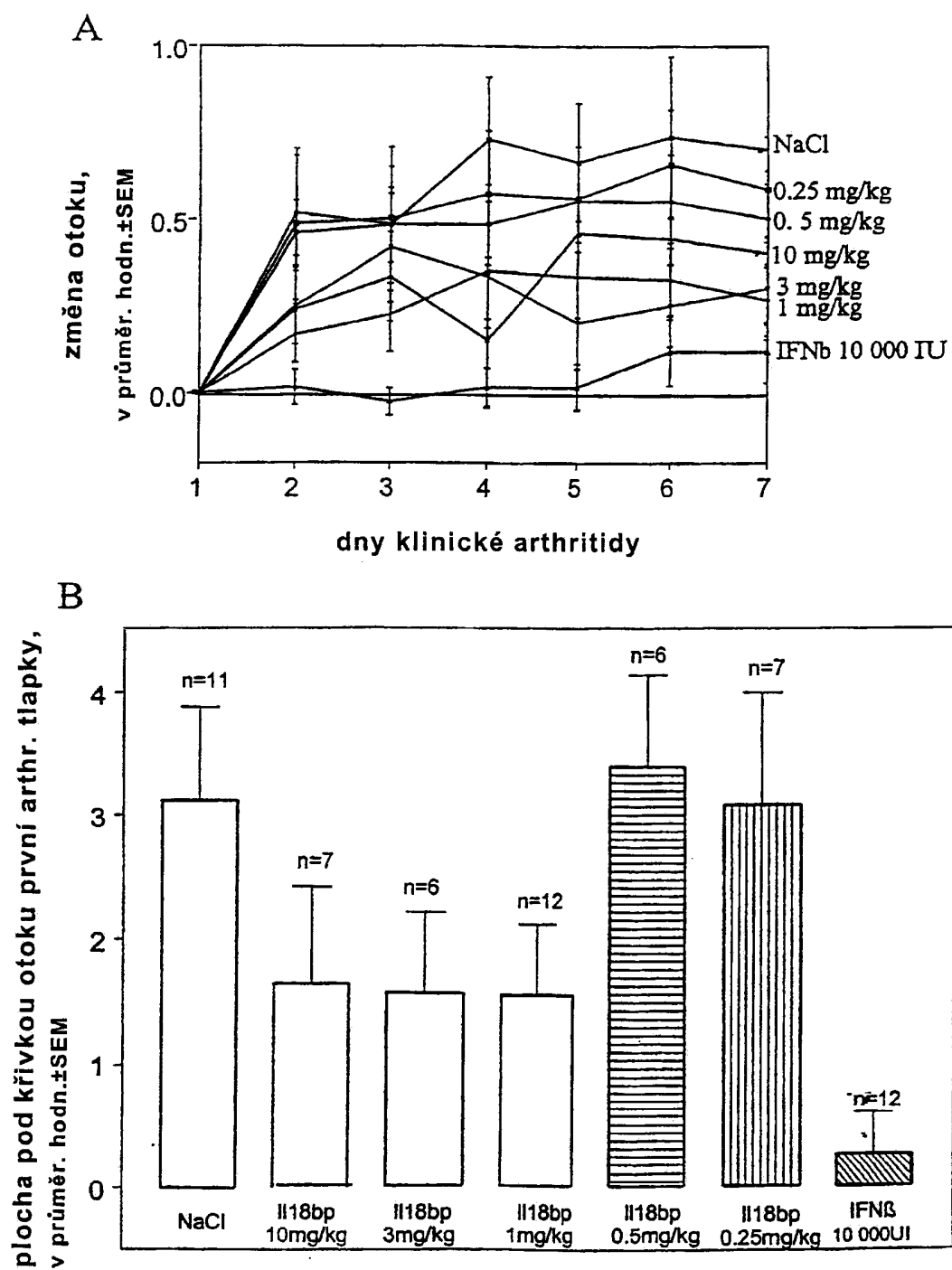
Obr. 5



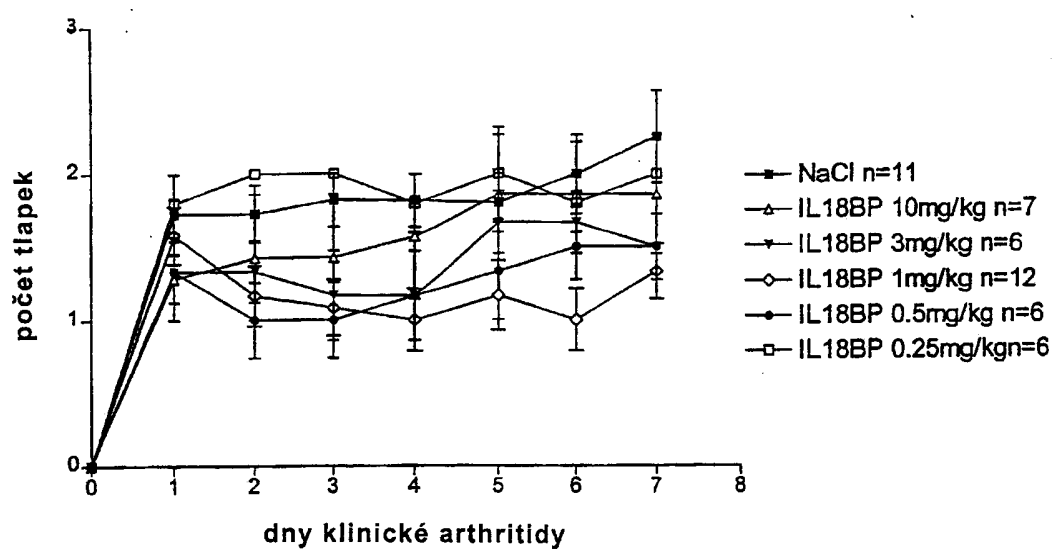
Obr. 6



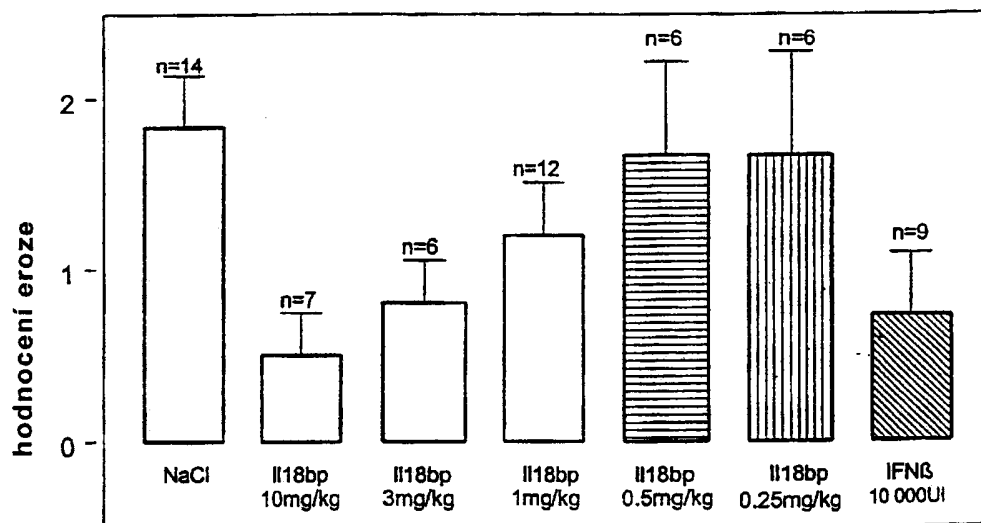
Obr. 7



Obr. 8



Obr. 9



Obr. 10

A



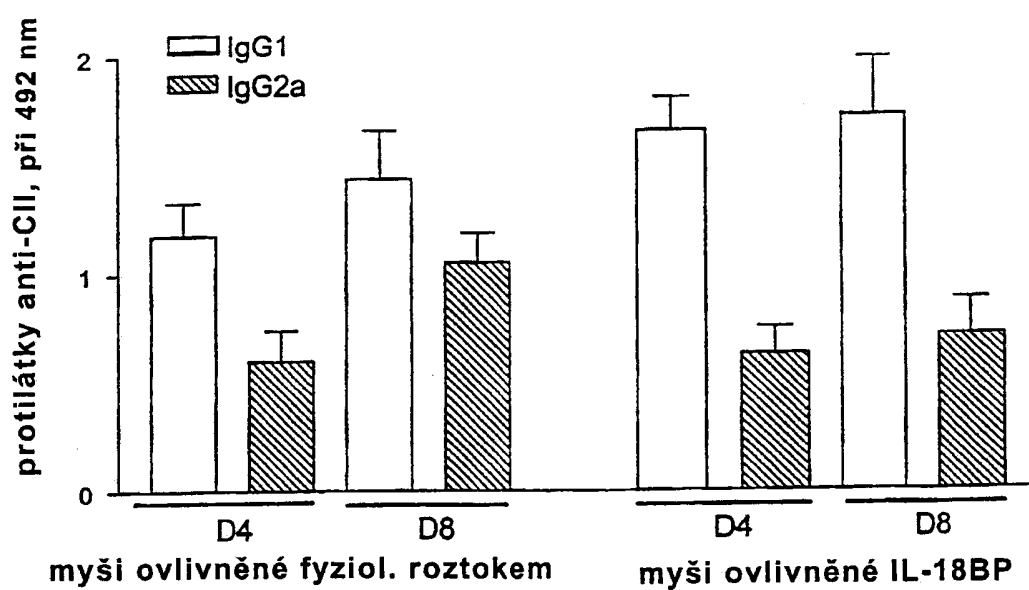
B



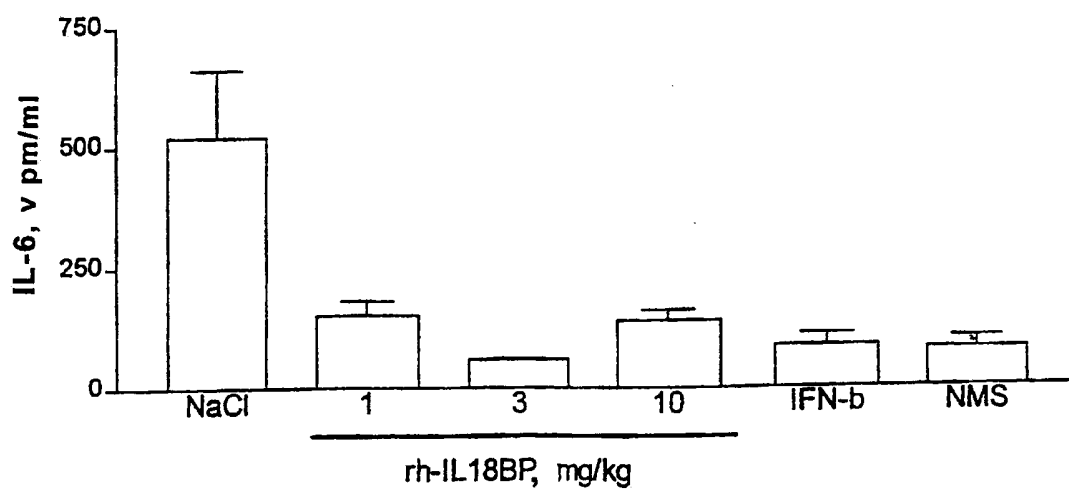
C



Obr. 11

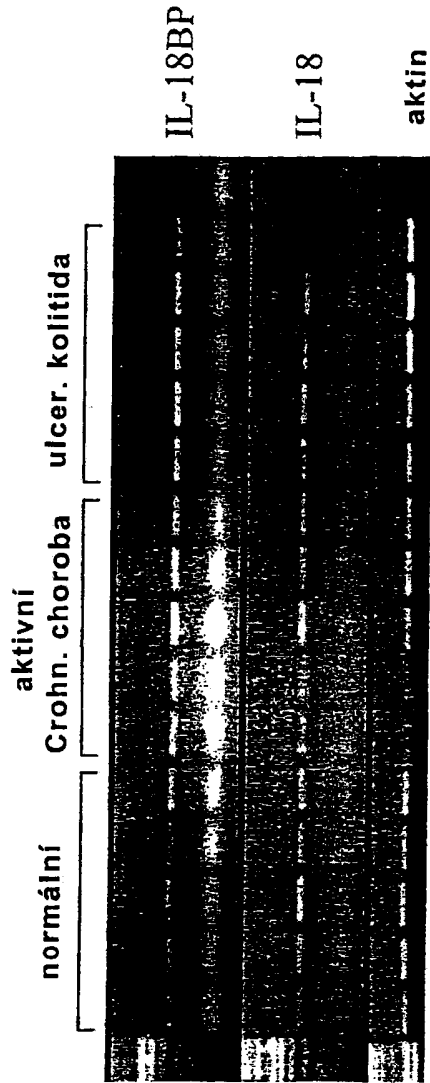


Obr. 12

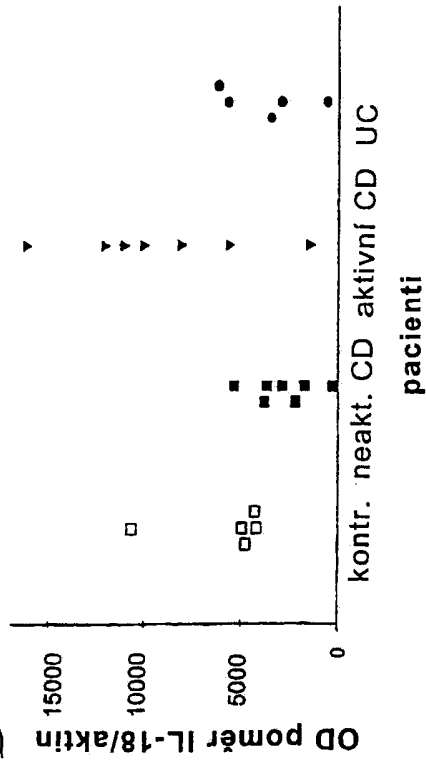


Obr. 13

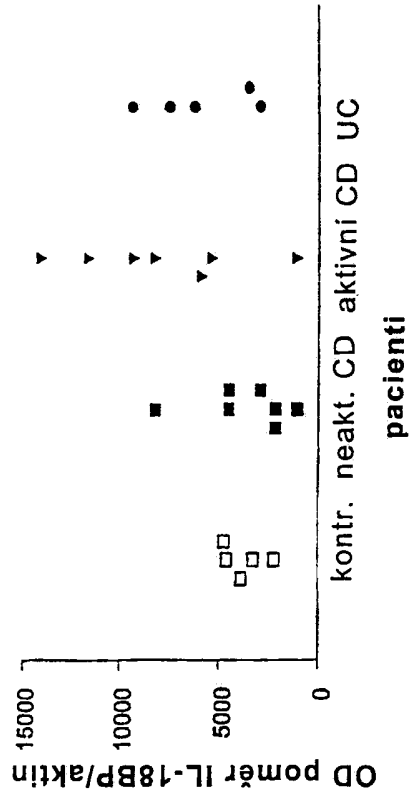
A



B

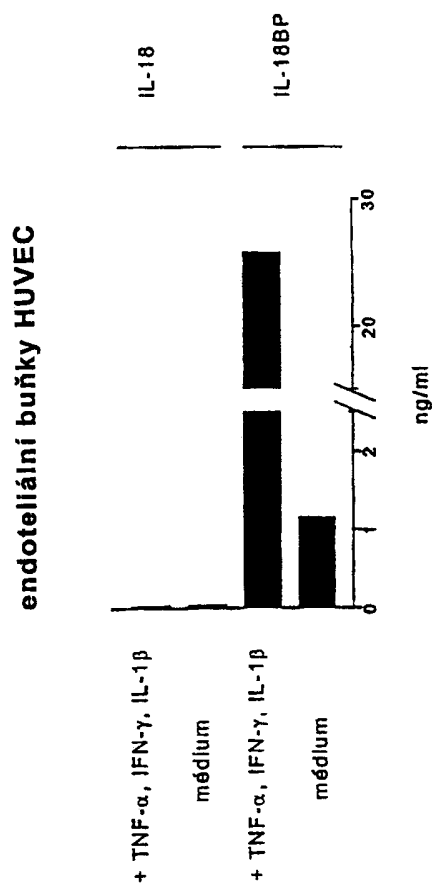


C

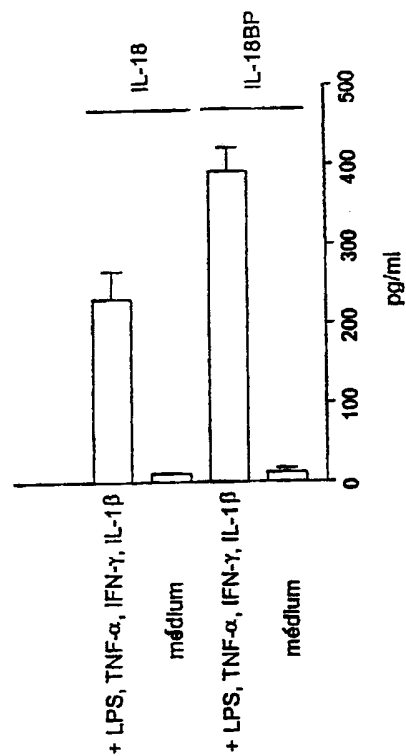


Obr. 14

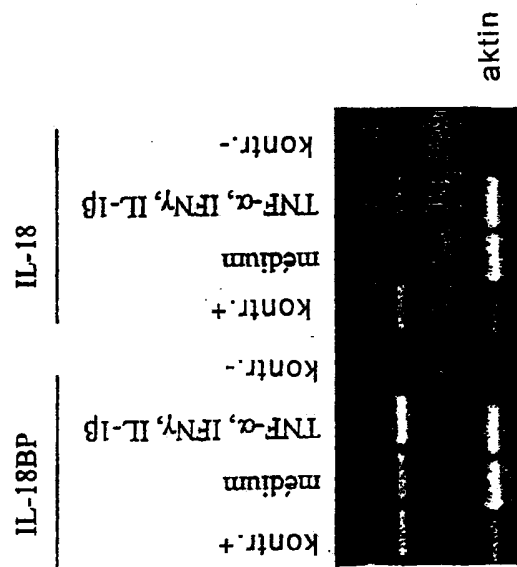
B



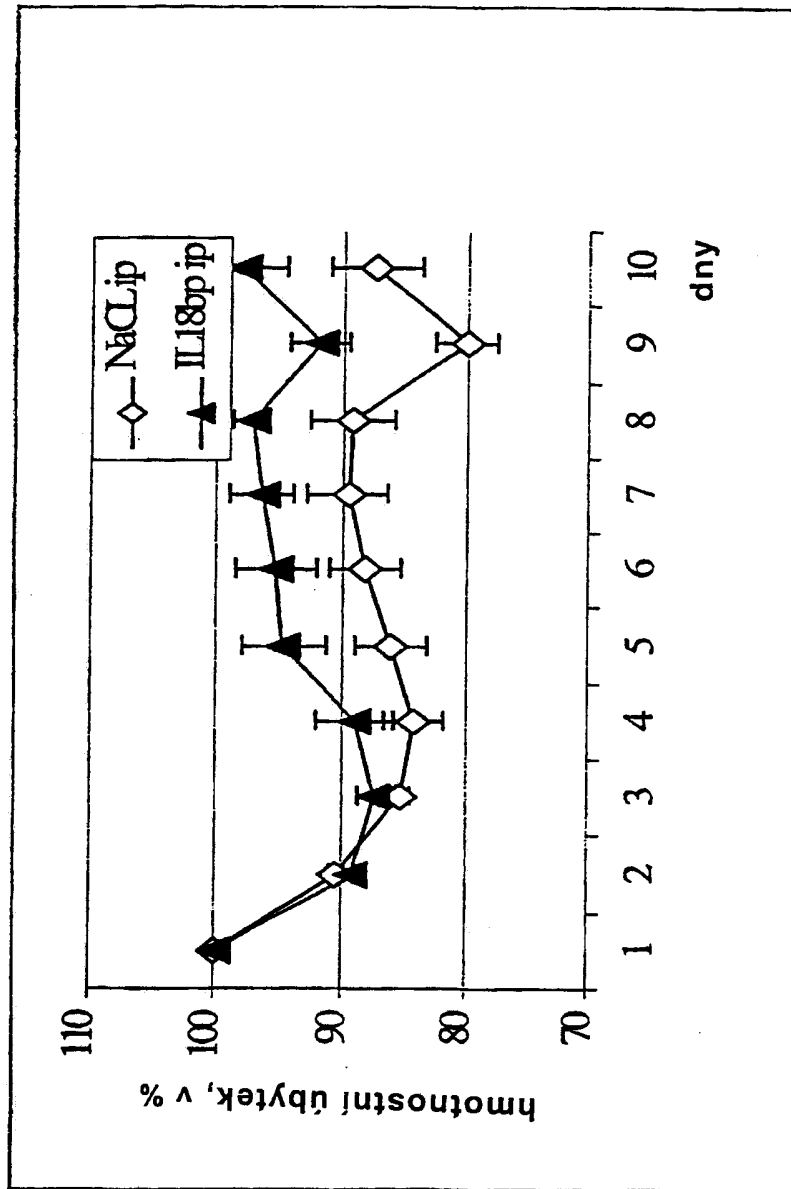
buň. linie makrofágů THP1



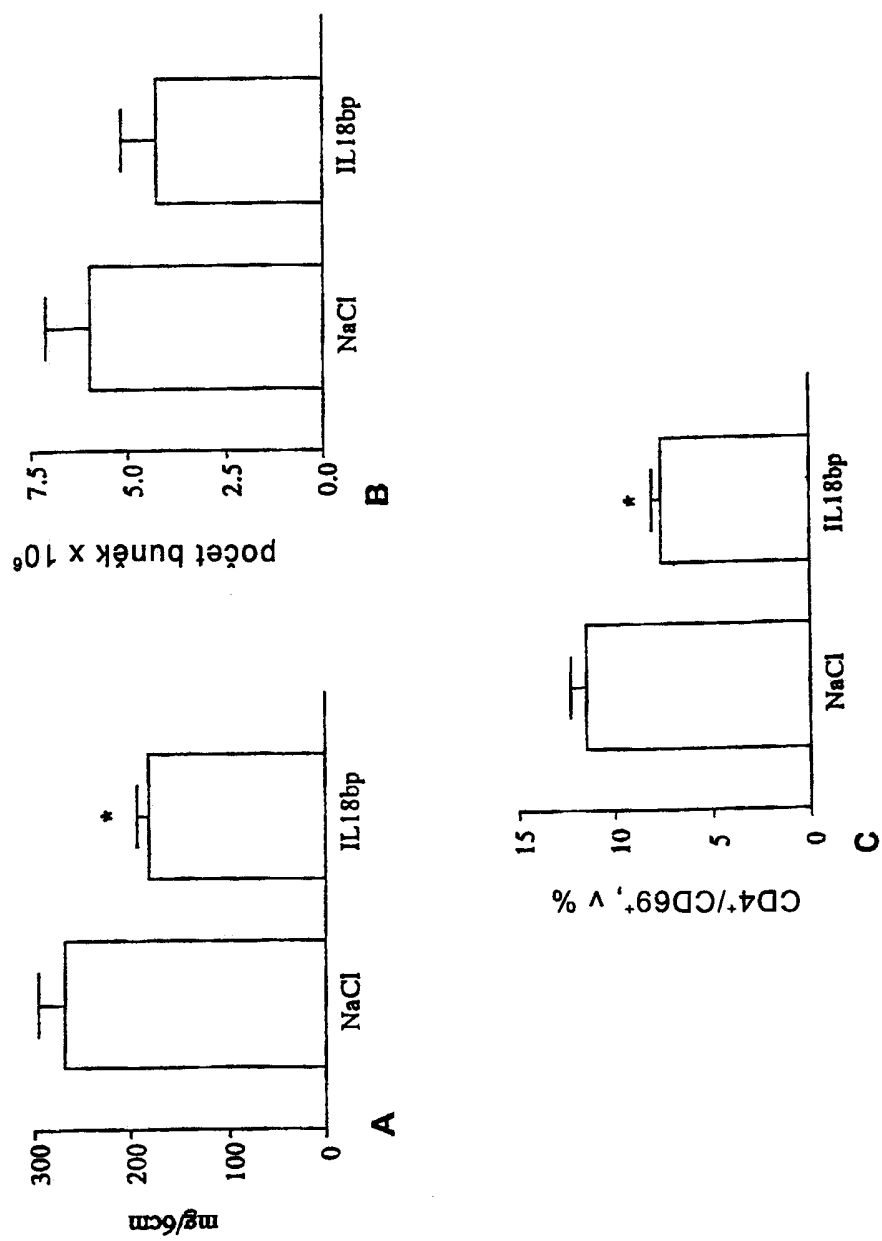
A



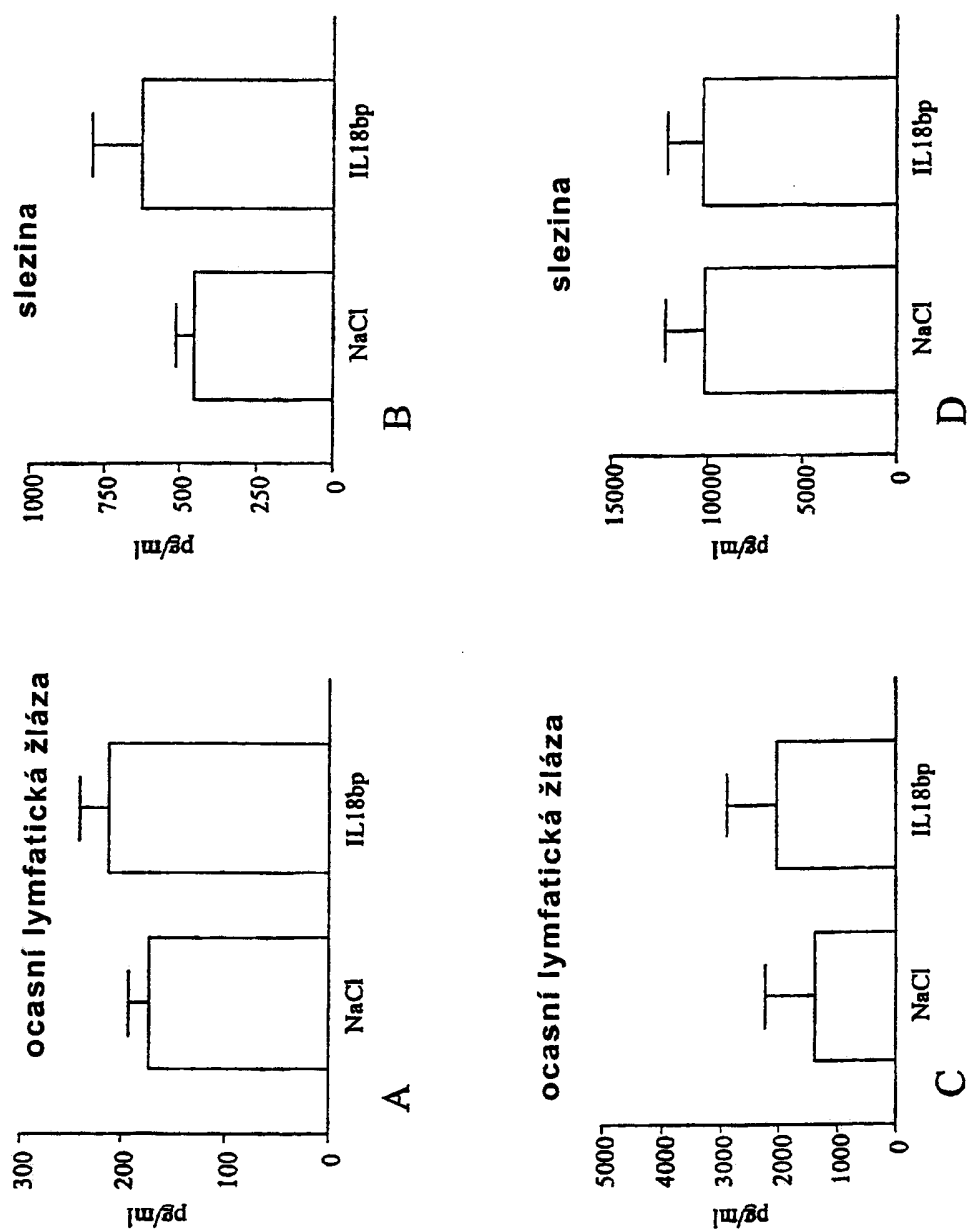
Obr. 15



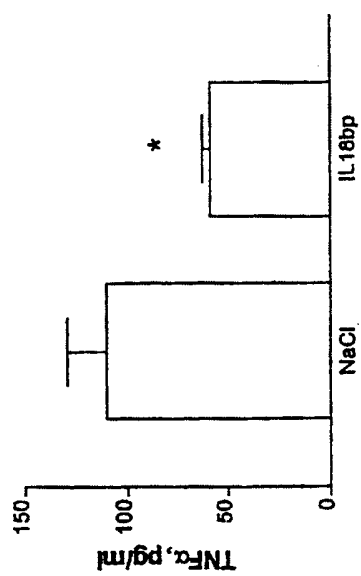
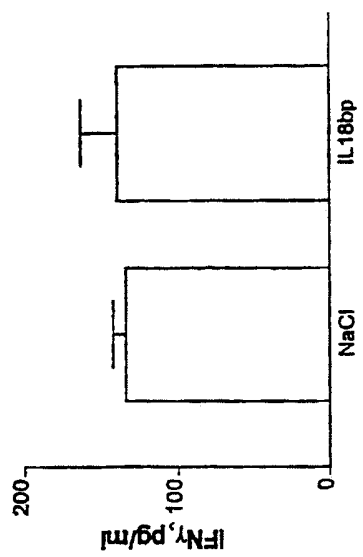
Obr. 16



Obr. 17



Obr. 18



Obr. 19

Konec dokumentu
