



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **78516** (13) **C2**
(51) **МПК (2006)**
A61K 38/20
A61P 37/08 (2007.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ IL-18-ЗВ'ЯЗУЮЧОГО БІЛКА ДЛЯ ЛІКУВАННЯ І/АБО ПРОФІЛАКТИКИ ГІПЕРЧУТЛИВОСТІ З РЕАКЦІЯМИ ГІПЕРЧУТЛИВОСТІ ТИПУ IV

1

2

(21) 2004031727
(22) 01.08.2002
(24) 10.04.2007
(86) PCT/EP02/08591, 01.08.2002
(31) 01118811.7
(32) 10.08.2001
(33) EP
(31) 02100735.6
(32) 20.06.2002
(33) EP
(46) 10.04.2007, Бюл. № 4, 2007 р.
(72) Шватшко Йоланд, СН, Коско-Вільбуа Марі, FR
(73) АППЛАЙД РЕЗЕЧ СІСТЕМЗ АРС ХОЛДІНГ Н.В., NL
(56) EP A1 1110969 27.06.2001
(57) 1. Застосування IL-18-зв'язуючого білка (IL-18BP) для виробництва лікарського засобу для лікування і/або профілактики розладу у вигляді гіперчутливості з реакціями гіперчутливості типу IV.
2. Застосування за п. 1, де розладом у вигляді гіперчутливості є гіперчутливість уповільненого типу.

3. Застосування за п. 1 або 2, де розладом у вигляді гіперчутливості є контактна гіперчутливість.
4. Застосування за будь-яким з пп. 1-3, в якому IL-18BP є злитий білок, що включає злиття з імуноглобуліном.
5. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де IL-18BP містить щонайменше одну групу поліетиленгліколю (ПЕГ), приєднану до однієї або більше функціональних груп, які є одним або більше бічними ланцюгами на залишках амінокислот.
6. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, в якому інгібітор IL-18 застосовують в кількості від близько 0,001 до 1000 мг/кг ваги тіла або від близько 0,01 до 100 мг/кг ваги тіла, або від близько 0,1 до 10 мг/кг ваги тіла, або близько 5 мг/кг ваги тіла.
7. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де інгібітор IL-18 вводять підшкірно.
8. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де інгібітор IL-18 вводять внутрішньом'язово.
9. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де інгібітор IL-18 вводять місцево.

Даний винахід лежить в області алергій. Більш конкретно, він відноситься до застосування інгібітору IL-18 для лікування і/або профілактики розладів у вигляді гіперчутливості, і, зокрема, розладів, що включають реакції гіперчутливості уповільненого типу організму людини.

Термін алергія або гіперчутливість застосовується, коли має місце адаптивна імунна відповідь у неадекватній формі. Алергічні реакції або реакції гіперчутливості є результатом звичайних корисних імунних відповідей, діючих неадекватно на чужорідні антигени (звичайно, макромолекулам навколишнього середовища) та іноді приводять до запальних реакцій і пошкодження тканин. У таких ситуаціях звичайно нешкідливий стимулятор навколишнього середовища, названий алергеном, викликає імунну відповідь, яка, при повторному

контакті, реактивується з виникненням патологічного пошкодження.

Реакції гіперчутливості є ушкоджувальними імунологічними реакціями на зовнішні антигени. Існує множина класифікацій гіперчутливості. Деякі основані на часі, необхідному для вияву симптомів або шкірних тест-реакцій після контакту з антигеном (наприклад гіперчутливість негайного або уповільненого типу), типі антигену (наприклад реакції на лікарські засоби) або на природі залученого органу. Класифікації звичайно сильно спрощені і не враховують, що може мати місце більше ніж один тип імунної відповіді, або що для виникнення імунологічного пошкодження необхідний більше ніж один тип. Класифікацією, що найбільш широко застосовується є:

Гіперчутливість типу I або негайного типу є

(13) **C2**

(11) **78516**

(19) **UA**

IgE-опосередкованою. Її також називають звичайною алергією. Реакції гіперчутливість негайного типу (тип I) виникають через зв'язування антигену з IgE на тучних клітинах або базофілах.

Розлади у вигляді реакцій гіперчутливості I типу також називають атонічними захворюваннями, вони включають, наприклад, алергічний риніт, алергічний кон'юнктивіт, атонічний дерматит, алергічну набуту бронхіальну астму, кропивницю, системну анафілаксію. Значно збільшилась кількість випадків астми, хоча причини в більшості випадків невідомі. Нещодавно було помічене значне збільшення кількості реакцій типу I при контакті з розчинними у воді білками, що містяться в латексних продуктах (наприклад, гумових рукавичках, стоматологічних прокладках, презервативах, трубках для дихального обладнання, катетерах), особливо серед медичного персоналу і у пацієнтів, що використовували латекс, і у дітей з розщепленим хребтом і урогенітальними природженими дефектами. Частими реакціями на латекс є кропивниця, ангіоневротичний набряк, кон'юнктивіт, риніти, бронхоспазми і анафілаксія.

Пацієнти з атонічними захворюваннями (включаючи атонічний дерматит) звичайно мають спадкову схильність для розвитку опосередкованої антитілом-IgE гіперчутливості до речовин (алергенів), які вдихуються і з'їдаються, що нешкідливі для людей, які не мають алергії. За винятком атонічного дерматиту, антитіла-IgE звичайно опосередковують гіперчутливість.

Гіперчутливість типу II або цитотоксична гіперчутливість включає цитолітичні дії, опосередковані антитілом, комплектом і/або клітинними механізмами. Мішенню в реакціях типу II є поверхня клітини, а її результатом є пошкодження або загибель клітини. Антитіло до пов'язаного з клітиною антигену (тип II) спричиняє руйнування клітини шляхом активації комплекменту або стимуляції фагоцитів. Приклади пошкодження клітин, при яких антитіло взаємодіє з антигенними компонентами клітини, включають Кумбс-позитивну гемолітичну анемію, інфіковану антитілами тромбоцитопенічну пурпуру, лейкопенію, пухирчатку, пемфігоїд, синдром Гудпасчера і перніціозну анемію. Ці реакції мають місце у пацієнтів після переливання несумісної крові, при гемолітичних захворюваннях новонароджених, і при тромбоцитопенії новонароджених, вони також можуть грати роль у мультисистемних захворюваннях, що є виявом гіперчутливості, наприклад при системному червоному вовчаку, СЧВ.

Механізм пошкодження краще усього продемонстрований на прикладі дії на еритроцити. При гемолітичній анемії еритроцити руйнуються в результаті або внутрішньосудинного гемолізу, або захоплення макрофагами, переважно в селезінці. Дослідження *in vitro* показали, що у присутності комплекменту деякі комплекти зв'язувальні антитіла (наприклад, антитіла до групових антитіл крові анти-A і анти-B) викликає швидкий гемоліз. Інші (наприклад антитіло до LE) викликає повільний лізис клітин; в той час як інші не ушкоджують безпосередньо клітини, але викликають їх адгезію і руйнування фагоцитами. Навпаки, антитіла до антитіл реус еритроцитах не активують компле-

мент, і вони руйнують клітини переважно за допомогою позасудинного фагоцитозу. Приклади, в яких антиген є компонентом тканини, включають раннє гостре (гіпергостре) відторгнення трансплантату пересащеної нирки, яке відбувається через присутність антитіла в ендотелії судини, і синдром Гудпасчера, який виникає через реакцію антитіла з базальною мембраною клубочкового і альвеолярного ендотелію. В експериментальному синдромі Гудпасчера комплемент є важливим медіатором пошкодження, але роль комплекменту не визначена чітко при ранньому гострому відторгненні трансплантату.

Приклади реакцій внаслідок зв'язування гаптenu з клітинами або тканиною включають множинну реакцію гіперчутливості до лікарських засобів (наприклад, інфікована пеніциліном гемолітична анемія, див. нижче).

Антирецепторні реакції гіперчутливості змінюють клітинну функцію внаслідок зв'язування антитіла з рецепторами мембрани. При багатьох захворюваннях (наприклад, злаякісна міастенія, хвороба Грейвса, інсулінстійкий діабет), антитіла до рецепторів мембрани клітини були описані. У деяких пацієнтів з діабетом з сильною стійкістю до інсуліну були виявлені антитіла до рецепторів інсуліну, тим самим, запобігаючи зв'язуванню інсуліну з його рецептором. У пацієнтів з хворобою Грейвса було ідентифіковане антитіло до рецептору тироїдстимулюючого гормону (TSH), яке стимулює дію TSH на його рецептор, що приводить до гіпертиреозу.

Механізми типу III в основному включають антитіла, які утворюють імунні комплекси з антигеном. Циркуючі комплекси активують комплемент, приєднуються до еритроцитів (які потім зазнають фароцитазу в селезінці), виходять з кровообігу та ініціюють запалення в тканинах (реакція Артюса), або фагоцитуються макрофагами, які презентують антиген, виділяють цитокіни і активують B- і T-клітини. IgE, IgA, IgG і IgM утворюють комплекси з антигеном. Реакції типу III виникають при відкладенні імунних комплексів в тканинах, особливо в шкірі, суглобах і нирках. Хронічний імунний комплексний нефрит відповідальний за більшість випадків гломерулонефриту у людини. Стани, в яких імунні комплекси (IK), грають, мабуть, роль включають сироваткову хворобу, що викликається сироваткою, лікарським засобом або антитілом вірусного гепатиту; системний червоний вовчак; ревматоїдний артрит; поліартеріїт; криоглобулінемію; пневмоніт внаслідок гіперчутливості; аспергілез бронхів і легень; гострий гломерулонефрит; хронічний мембранопрліферативний гломерулонефрит; і супутні захворювання нирок. Вважають, що при аспергілезі бронхів і легень, викликаних лікарським засобом або сироваткою сироваткової хвороби, і деяких формах ниркоподібних захворювань IgE-опосередкована реакція передуює реакції III типу.

Стандартні моделі реакції III типу на основі тварин являють собою реакцію Артюса і експериментальну сироваткову модель. При реакції Артюса (як правило місцева шкірна реакція) тварин спочатку багато разів імунізують для того, щоб досягнути великої кількості циркулюючих антитіл-

IgG, і потім невеликі кількості антигену вводять внутрішньошкірно. Антиген преципілює з надмірними IgG і активує комплемент, так що швидко виникає запальне, набрякле, хворобливе місцеве пошкодження (через 4-6 год.) і воно може швидко прогресувати до стерильного абсцесу, що містить множини поліморфоядерних клітин, і потім до некрозу тканини. Некротизуючий васкуліт із закупореним просвітом артеріол може бути видний в мікроскоп. Реакції не передують латентний період, оскільки антитіло вже присутнє.

Реакції типу I, II і III викликаються антитілами. Реакції типу IV викликаються Т-лімфоцитами.

Гіперчутливості типу IV, що включає реакції, опосередковані клітинами, звичайно потрібно 12 або більше годин для розвитку, і вона основана на мережах активованих імунних клітин. Основною характеристикою тканин є запалення, і в результаті може розвиватись хронічне запальне захворювання. Гіперчутливість типу IV також називають гіперчутливістю уповільненого типу (типу IV) або DTH. Реакції опосередковуються інтерлейкіном-2, інтерфероном- γ та іншими цитокінами, які виділяються Т-лімфоцитами. При DTH Т-лімфоцити вступають у реакцію з антигеном і виділяють інтерлейкін-9, інтерферон- γ та інші цитокіни. Після того, як Т-клітини сенсibilізовані в результаті первинного впливу антигену, вторинний вплив приводить до реакції гіперчутливості уповільненого типу, місцевої запальної реакції, клінічний прояв якої займає 2-3 дні. Гістологічно ці реакції складаються з інфільтруючих Т-лімфоцитів, макрофагів і випадкових еозинофілів. Експериментально DTH може бути перенесена за допомогою Т-лімфоцитів, але не сироватки, тобто антитіла не задіяні.

DTH може розвинути з звичайної опосередкованої клітинами імунної відповіді на інфекцію, викликану вірусами, грибами і деякими бактеріями, а саме, *Mycobacterium tuberculosis* і *Mycobacterium leprae*. Якщо макрофаги не можуть зруйнувати захоплені мікроорганізми, вони можуть зазнавати диференціації в епітеліальні клітини або багатоядерні гігантські клітини. Множина таких клітин утворює гранульому. Локальне пошкодження тканини є небажаним побічним ефектом даної, в іншому захисної, імунної відповіді. Однак, якщо DTH-відповідь відсутня або ослаблена, Т-лімфоцити не можуть локалізувати мікроорганізми, що вторглись, і у пацієнта розвивається інвазивна агресивна динемінована хвороба, така як гострий туберкульоз.

Контактний дерматит до професійних та інших антигенів також є реакцією типу IV. Агенти, які його викликають, звичайно мають відносно низьку молекулярну масу (<1кД) і не є імуногенними самі по собі, але вони є високо реакційноздатними молекулами, які ковалентно зв'язуються з білками шкіри або тканини. Сенсibilізуюча хімічна сполука відома як гаптен, а білок-хазяїн, з яким він з'єднується, відомий як носій. Спектр потенційних сенсibilізуючих антигенів широкий. Розпізнають дві фази патогенезу: фаза сенсibilізації і фаза вияву. Під час фази сенсibilізації антигенпрезентуючі клітини в шкірі, відомі як клітини Лангерганса, зв'язують комплекс гаптен-(білок-носії) і презентують його Т-лімфоцитам в поєднанні з антигеном MHC класу II.

Індукція Т-клітин може відбуватись через місяці після контакту з невеликою кількістю антигену. Повторний контакт з відповідним антигеном ініціює фазу вияву, при якій ефекторні клітини мігрують в шкіру в напрямі білкового комплексу, презентованого клітинами Лангерганса в епідермісі, з подальшим виділенням цитокіну і шкірним запаленням. Діагностику алергену, що викликає реакцію, здійснюють апікаційними шкірними пробами. Підозрюваний контактний сенсibilізатор наносять на спину пацієнта і закривають на 48 годин. Місце реакції перевіряють після 2 і 24 годин. При позитивній відповіді має місце запалення і ущільнення на ділянці, що тестується.

Гіперчутливість уповільненого типу також є ключовим механізмом, що визначає відторгнення трансплантованих тест-органів.

Деякі клінічні стани, при яких, як вважають, реакції типу IV грають важливу роль, включають контактний дерматит, пневмоніт, що є проявом, відторгнення алотрансплантату, гранульому, викликану внутрішньоклітинними організмами, деякі форми чутливості до лікарських засобів, тиреоїдит і енцефаломієліти після вакцинування проти сказу. Докази для останніх двох станів основані на експериментальних моделях, при захворюваннях людини на появі лімфоцитів в запальному ексудаті щитовидної залози і мозку.

Дерматит також називають екземою. Він відноситься до поверхневих запалень шкіри, гістологічно характеризованих набряком епідермісу і клінічно характеризованих везикулами (при гострому стані), червоністю з погано окресленими краями, набряком, мокнутієм, струпами, злущенням, звичайним свербіжем і ліхенізацією, що викликається розчісуванням або розтиранням.

Часто екзема відноситься до везикулярного дерматиту, але іноді термін обмежений екземою у значенні хронічного дерматиту. Деякі також називають дерматит спонгіозним дерматитом, оскільки спонгіоз (внутрішньоепідермальний набряк) є гістологічною характеристикою.

Контактний дерматит являє собою гостре або хронічне запалення, часто асиметричної або дивної форми, що викликається речовинами, які контактують зі шкірою і викликають токсичні (подразнювальні) або алергічні реакції.

Діагностика реакцій гіперчутливості залежить від типу залученої реакції.

Реакцію типу IV можна передбачити, коли запальна реакція гістологічно характеризується навколосудинними лімфоцитами і макрофагами. Шкірні проби на гіперчутливість уповільненого типу і апікаційні шкірні проби є найбільш доступними методами тестування гіперчутливості уповільненого типу.

Для запобігання загостренню контактного дерматиту апікаційні шкірні проби проводять після того, як контактний дерматит усунений. Підозрюваний алерген (у відповідній концентрації) наносять на шкіру під неабсорбуючий пластир і залишають на 48 годин. Якщо печіння або свербіж починається раніше, пластир видаляють. Позитивний результат тестування являє собою еритему з деяким ущільненням і, іноді, утворенням везикул. Оскільки деякі реакції не виявляються до вида-

лення пластиру, місце реакції повторно перевіряють через 72 і 96 год.

Гіперчутливість також може виявлятися як реакція на лікарські засоби. Раніше, ніж відносити дану реакцію за рахунок лікарського засобу, необхідно зазначити, що плацебо також може викликати множинну симптоматику і навіть об'єктивних показників, таких як висип на шкірі. Проте, дійсні реакції на лікарські засоби складають основну медичну проблему.

При непереносимості лікарських засобів несприятливі реакції виникають при першому ж введенні або нанесенні лікарського засобу. Це може бути та ж токсична реакція, яку звичайно чекають при більш високих дозах, або це може бути перебільшення звичайно помірного побічного ефекту (наприклад антигістамінний седативний ефект). Ідіосинкразія являє собою стан, при якому несприятлива реакція при першому введенні і нанесенні ліків є фармакологічно несподіваною і унікальною.

Характеристики алергічних реакцій на ліки включають IgE-опосередковані реакції, які виникають тільки після того, як пацієнт був підданий впливу лікарського засобу (необов'язково для терапії) один або багато разів без проблем. Як тільки розвивається гіперчутливість, реакція може бути викликана дозами набагато нижче терапевтичних кількостей, і звичайно нижче тих рівнів, які викликають ідіосинкразичні реакції. Клінічні характеристики обмежені у своїх проявах. Шкірний висип (особливо кропивниця), синдром, що нагадує сироваткову хворобу, несподівана лихоманка, анафілаксія та еозинофільні легеневі інфільтрати, які виникають під час лікарської терапії, є, як правило, наслідком гіперчутливості; у деяких випадках анемії, тромбоцитопенії або агранулоцитозу. Рідко, васкуліт виникає після повторного впливу за допомогою лікарського засобу (наприклад, сульфонамідів, йодидів, пеніциліну), та інтерстиціальний нефрит (наприклад метицилін) і пошкодження печінки (наприклад галотан) були описані в умовах, які узгоджуються з розвитком визначеної гіперчутливості.

Найбільш серйозним прикладом гіперчутливості до лікарських засобів є анафілаксія. Однак набагато більш частою реакцією на лікарські засоби є кореподібний висип, знову ж невідомої етіології. Лихоманка і кропивниця також є досить частими наслідками алергії на лікарські засоби. Якщо для терапії застосовується сироватка тварини, сироваткова хвороба є ускладненням, але в цей час сироватка тварини застосовується рідко. Може виникнути серйозний синдром, що нагадує сироваткову хворобу невідомого патогенезу без високих рівнів циркулюючих антитіл IgG, але що звичайно асоціюється з антитілами IgE, особливо при прийомі таких лікарських засобів як пеніцилін.

Реакції гіперчутливості на лікарські засоби основані на здатності білків і великих поліпептидних лікарських засобів стимулювати утворення специфічних антитіл прямими імунологічними механізмами. Можливо, найменшою молекулою, яка є потенційно антигенною, є глюкогон, молекулярна маса якого близько 3500, Більшість молекул лікарських засобів набагато менше і не можуть самі по собі діяти як антигени. Однак, як і гаптени, деякі

ковалентно зв'язуються з білками, і одержані кон'югати стимулюють утворення специфічних антитіл до лікарського засобу. Лікарський засіб, або один з його метаболітів, здатний вступати в хімічну реакцію з білком. Зв'язування з білком сироватки, характерне для багатьох лікарських засобів, є набагато слабшим і не володіє достатньою силою для антигенності.

Специфічна імунологічна реакція була визначена тільки для бензилпеніциліну. Цей лікарський засіб не зв'язується досить сильно з білками тканини або сироватки з утворенням антигенного комплексу, але основний продукт його розкладання, бензилпеніцилінова кислота, може об'єднуватися з білками тканини з утворенням бензилфеніцилоїлу (БФО), головною антигенною детермінантою пеніциліну. Деякі мінорні антигенні детермінанти утворюються у відносно невеликих кількостях механізмами, які набагато менш визначені. Реакції гіперчутливості (I, II, III, IV) найчастіше залучають детермінанту БФО. Антитіла IgE до мінорних детермінант можуть бути відповідальні у деяких пацієнтів за анафілаксію і кропивницю. Антитіла IgE були виявлені до головної, але не до мінорних детермінант. Вони можуть діяти як «блокуючі антитіла» до БФО, модифікуючи або навіть запобігаючи реакції з БФО, в той час як відсутність блокуючих IgG-антитіл до мінорних детермінант може пояснити здатність цих детермінант індукувати анафілаксію.

Всі напівсинтетичні пеніциліни (наприклад, амоксицилін, карбеніцилін, тикарцилін) потенційно вступають у перехресну реакцію з пеніциліном таким чином, що чутливі до пеніциліну пацієнти часто реагують також і на них. Перехресні реакції з цефалоспоринами проходять в меншій мірі. Лікування цефалоспоринами необхідно починати дуже обережно, якщо у пацієнта були випадки гострої реакції (наприклад анафілаксії) до пеніциліну.

Гематологічні, опосередковані антитілами (цитотоксичні, типу II) реакції на лікарські засоби можуть розвиватись за будь-яким з трьох механізмів: при індукованій пеніциліном анемії антитіло взаємодіє з гаптенем, який тісно зв'язується з мембраною еритроциту, викликаючи аглютинацію і посилене руйнування еритроцитів. При індукованій стибофеном і квіндіном тромбоцитопенії лікарський засіб утворює розчинний комплекс з його специфічним антитілом. Потім комплекс вступає в реакцію з сусідніми тромбоцитами (клітини-мішені «невинні свідки») і активує комплемент, який один залишається в мембрані тромбоциту та індукує лізис клітин. При інших гемолітичних анеміях лікарський засіб (наприклад метилдопа), мабуть, хімічно змінює поверхню еритроцитів, тим самим, розкриваючи антиген, який індукує і потім взаємодіє з автоантитілом, звичайно з Rh-специфічністю.

Токсично-ідіосинкратичні і анафілактичні реакції досить унікальні за видами або за часом так, що лікарський засіб, який викликає їх, звичайно легко ідентифікується. Реакції типу сироваткової хвороби найчастіше викликаються пеніцилінами, але іноді їх викликають і сульфонаміди, гідразин, сульфонілсечовини або тіазиди. Фотосенсибілізація є характерною для хлорпромазину, визначених антисептиків в милі, сульфонамідів, псораленів,

демеклоцикліну і гризеофульвіну. Всі ліки за винятком тих, які вважаються абсолютно необхідними, повинні бути відмінені. Якщо є підозра на виникнення лихоманки від лікарського засобу, ліки, які найбільш ймовірно викликають її, відмінюють (наприклад, алопуринол, пеніцилін, ізоніазид, сульфонаміди, барбітурати, квінідин). Ослаблення лихоманки протягом 48 годин вказує саме на цей лікарський засіб. Якщо лихоманка супроводжується гранулоцитопенією, токсичність лікарського засобу найбільш вірогідна, ніж алергія, і набагато більш серйозна.

Алергічні легеневі реакції на лікарські засоби звичайно є інфільтруючими, з еозинофілією, і можуть бути викликані серед інших солями золота, пеніциліном і сульфонамідами. Найбільш частою причиною виникнення гострої інфільтруючої легеневої реакції є нітрофурантоїн. Він ймовірно є алергенним, але звичайно не є еозинофілієм.

Печінкові реакції можуть бути насамперед холестатичними (найчастіше на фенотіазини і еритроміцин естолат) або печінково-клітинними (алопуринол, гідантоїн, солі золота, ізоніазид, сульфонаміди, валпроєва кислота і багато які інші). Звичайною алергічною ниркоподібною реакцією є інтерстиціальний нефрит, в основному через метицилін; також можуть бути залучені інші протимікробні засоби і циметидин.

Синдром, що нагадує системний червоний вовчак, може бути викликаний декількома лікарськими засобами, найчастіше гідралозином і прокаїнамідом. Синдром асоціюють з позитивною пробою на антиядерні антитіла, і він є відносно безпечним, що не зачіпає нирки і ЦНС. Пеніциламін може викликати СЧВ та інші аутоімунні захворювання, найчастіше злякисну міастенію.

У 1989 була описана індукована ендотоксином активність сироватки, що індукує інтерферон- γ (IFN- γ), одержаний у клітинах селезінки мишей [Nakamura et al., 1989]. Дана активність сироватки діяла не як прямий індуктор IFN- γ , а скоріше як коstimулятор разом з IL-2 або мітогенами. При спробі виділити активну речовину з сироватки мишей після впливу ендоксину був виявлений гомогенний білок масою 50-55кДа. Оскільки інші цитокіни можуть діяти як коstimулятори продукції IFN- γ , через нездатність нейтралізуючих антитіл до IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 або TNF нейтралізувати активність сироватки припустимо, вона визначилась особливим фактором. У 1995 ті ж самі дослідники продемонстрували, що індукований ендотоксином коstimулятор продукції IFN- γ є присутнім в екстрактах печінки мишей, попередньо підданої впливу *P. acnes* [Okamura et al., 1995]. У даній моделі популяція печіночних макрофагів (клітини Купффера) збільшувалась, і у даних мишей низькі дози бактеріального ліпополісахариду (ЛПС), що у попередньо непідготовлених мишей не були летальними, ставали смертельними. Фактор, названий IFN- γ -індукуючим фактором (IGIF) і пізніше позначений як інтерлейкін-18 (IL-18), був очищений до гомогенності з 1200 грамів печінки, підданої впливу *P. acnes*, мишей. Вироджені олігонуклеотиди, що походять з послідовностей амінокислот очищеного IL-18, застосовували для клонування кДНК IL-18 мишей. IL-18 є білком з масою 18-19кДа, що скла-

дається з 157 амінокислот, який не має очевидної подібності з яким-небудь пептидом у базі даних. Молекули матричної РНК для IL-18 та інтерлейкіну-12 (IL-12) легко визначаються в клітинах Купффера і активованих макрофагах. Рекombінантний IL-18 стимулюють IFN-гамма більш ефективно, ніж IL-12, очевидно через окремий механізм [Micallef et al., 1996]. Подібно індукованій ендотоксином активності сироватки, IL-18 стимулює IFN- γ не самостійно, а діє переважно як коstimулятор з мітогенами або IL-2. IL-18 підсилює проліферацію Т-клітин, очевидно за IL-2-залежним шляхом, і підсилює продукцію цитокінів Th1 *in vitro* і надає синергічну дію при з'єднанні з IL-12 у відношенні продукції IFN- γ [Maliswewski et al., 1990].

Після клонування мишачих форм в 1996 році була описана послідовність кДНК IL-18 людини [Ushio et al., 1996].

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

IL-18 відіграє потенційну роль в імунорегуванні або запаленні шляхом посилення функціональної активності Fas-ліганду на клітинах Th1 [Conti et al., 1997]. IL-18 також експресується в корі надниркової залози і, отже, може бути секретованим нейроімунномодулятором, що відіграє важливу роль в гармонійній роботі імунної системи у відповідь на стресовий вплив [Chater, 1986].

In vivo IL-18 утворюється шляхом розщеплення про-IL-18 і, очевидно, його ендогенна активність відповідає за продукцію IFN- γ при смертній опосередкованій *P. acnes* і ЛПС. Зрілий IL-18 утворюється з його попередника за допомогою IL-1 β конвертуючого ферменту (IL-1бета-конвертуючого ферменту, ICE, каспаза-1).

Рецептор IL-18 складається з, принаймні, двох компонентів, спільно діючих при зв'язуванні ліганду. Частина зв'язування з високою і низькою спорідненістю для IL-18 були виявлені на стимульованих IL-12 Т-клітинах мишей [Yoshimoto et al., 1998], що дозволило передбачити наявність рецепторного комплексу з множиною ланцюгів. До цього

го часу були ідентифіковані дві субоднини, що обидві належать сімейству рецепторів IL-1 [Parnet et al., 1996]. У трансдукцію сигналу IL-18 залучена активація NF- κ B [DiDonato et al., 1997].

Нещодавно розчинний білок, що має високу спорідненість до IL-18, був виділений з сечі людини, і були описані кДНК людини і миші [Novick et al., 1999; W099/09063]. Даний білок був названий IL-18-зв'язувальний білок (IL-18BP).

IL-18BP є не позаклітинним доменом одного з відомих рецепторів IL-18, а секретованим циркулюючим білком, що зустрічається в природі. Він належить до нового сімейства секретованих білків. Дане сімейство також включає декілька білків, що кодуються вірусом, які мають високу гомологію з IL-18BP [Novick et al., 1999]. IL-18BP, постійно експресований в селезінці, належить до надсімейства імуноглобулінів і має обмежену гомологію з рецептором IL-1 типу II. Його ген локалізований на хромосомі людини 11q13, і не виявлено ензиму, що кодує трансмембранний домен, в геномній послідовності розміром 8,3 т.п.н. [Novick et al., 1999].

Чотири людські і дві мишачі ізоформи IL-18BP, які одержуються в результаті сплайсингу мРНК, виявлені в різних бібліотеках кДНК, були експресовані, очищені і оцінені відносно біологічної активності зв'язування і нейтралізації IL-18 [Kim et al., 2000]. Людська ізоформа IL-18BP (IL-18BP_a) продемонструвала найбільшу спорідненість до IL-18 зі швидким зв'язуванням і повільним від'єднанням і константою дисоціації (K(d)), що становить 399пМ. IL-18BP_c має Ig-домен такий же або IL-18BP_a, за винятком 29 С-кінцевих амінокислот; K(d) IL-18BP_c в 10 разів менше (2,94нМ). Проте, IL-18BP_a і IL-18BP_c нейтралізують IL-18 >95% при молярному надлишку, що дорівнює двом. У ізоформ IL-18BP_b і IL-18BP_d відсутній повний Ig-домен і відсутня здатність до зв'язування або нейтралізації IL-18. Мишачі ізоформи IL-18BP_c і IL-18BP_d, що мають ідентичний Ig домен, також нейтралізують >95% мишачого IL-18 при молярному надлишку, що дорівнює двом. Однак, мишачий IL-18BP_d, який володіє такою ж С-кінцевою послідовністю, що і людський IL-18BP_a, також нейтралізує людський IL-18. Молекулярне моделювання дозволило ідентифікувати велику комбіновану електростатично і гідрофобну ділянку зв'язування в Ig-домени IL-18BP, яка може відповідати за його високоафінне зв'язування з лігандом [Kim et al., 2000].

У 1998 було передбачено, що експресія інтерлейкіну-18 (IL-18) залучена в патогенез контактної гіперчутливості у мишей [Xu et al., 1998]. Xu et al. застосовували мишачу модель контактної гіперчутливості з використанням оксазолону як контактного алергену, і показали індукцію експресії IL-18 в пошкоджених ділянках шкіри. Найвище підвищення регуляції було виявлене через 24 години після контакту з алергеном, потім експресія IL-18 поступово зменшилась.

Інше повідомлення про здатність IL-18 індукувати DTH-відповідь незалежно від IL-18 було опубліковано Kitching et al., 2000. Однак роль IL-18 залишається не ясною, оскільки було описано, що IL-18 сам по собі є потенційно ефективним терапевтичним засобом для пацієнтів з атонічним дерматитом [Nabu et al., 2001], що відповідає декіль-

ком клінічним випробуванням, які дають основу передбачати, що IFN- γ поліпшує симптоми атонічного дерматиту [Reinhold et al., 1990; Hanifm et al., 1993].

Даний винахід оснований на виявленні того, що лікування мишей інгібіторами IL-18 в моделі гіперчутливості типу IV приводить до ослаблення реакції гіперчутливості у тварин у порівнянні з контрольними тваринами. Тому, даний винахід відноситься до застосування інгібітору IL-18 для одержання лікарського засобу для лікування і/або профілактики розладів у вигляді гіперчутливості. Застосування комбінацій інгібітору IL-18 з інтерфероном і/або інгібітором TNF і/або інгібіторами запалення і/або протиалергічними лікарськими засобами також входить в об'єм даного винаходу. В іншому аспекті, даний винахід відноситься до застосування вектора експресії, що містить кодуєчу інгібітор IL-18 послідовність, для лікування і/або профілактики станів гіперчутливості. Винахід також відноситься до застосування клітин, генетично сконструйованих з метою експресії інгібіторів IL-18, для лікування і/або профілактики розладів у вигляді гіперчутливості.

На Фіг.1 показано, що лікування IL-18BP під час провокаційної проби захищає від контактної гіперчутливості (КГЧ). Мишей сенсibilізували DNFB в спину в 0 день і робили провокаційну пробу через п'ять днів у вуха. Набрякання вух вимірювали щодня і виражали у вигляді збільшення набрякання підданих впливу DNFB по відношенню до обробленого розчинником контрольного вуха. Лікування 250 мкг IL-18BP в.о. на одну мишу на день в дні від 5 до 8 значно знижувало набрякання вух (А), в той час як лікування в дні від 0 до 2 не надало впливу при даних параметрах експерименту (В) (n=5 мишей в групі). Квадрати: миші, ліковані IL-18BP, трикутники: контрольні, тобто оброблені фізіологічним розчином тварини.

На Фіг.2 показана міра набрякання вух від дня 5 до дня 30 після першого контакту з гаптенном в день 5 і другого контакту в день 19 в моделі гіперчутливості уповільненого типу з системним введенням 250мкг/миша/день IL-18BP (незафарбовані квадрати) або розчину (зафарбовані квадрати) в дні від 19 до 22.

На Фіг.3 показано, що IL-18BP захищає від КГЧ нейтралізацією IL-18. Мишей, у яких відсутній IL-18 (KO) і мишей дикого типу C57BL/6 порівнювали для визначення їх здатності давати відповідь у вигляді КГЧ. У мишей з відсутністю IL-18 КГЧ розвивається у відповідь на DNFB, хоча менш явно, ніж у мишей дикого типу. Однак у мишей з відсутністю IL-18 не спостерігалось ніякого ефекту від лікування IL-18BP, що вказує на те, що протизапальна дія IL-18BP при КГЧ досягається за рахунок нейтралізації IL-18 (n=5 мишей в групі). Кола: фізіологічний розчин у мишей з дефіцитом IL-18 (KO), ромби: IL-18BP у мишей з дефіцитом IL-18(KO); квадрати: IL-18BP у мишей дикого типу (WT); трикутники: фізіологічний розчин у мишей дикого типу (WT).

На Фіг.4 показано, що IL-18BP не знижує проникності судин під час КГЧ. КГЧ індукували у мишей C57BL/6. Для моніторингу набряку, викликаного реакцією КГЧ, Evans Blue вводили в.в. за 2

години до впливу DNFB. Мишей умертвляли через 24 години і обробляли вуха так, щоб екстрагувати барвник, який проник з судинної мережі і скупчився у навколишніх тканинах. Проникнення в тканини з судин оцінювали як кількість барвника на мг висушеної тканини вуха, скоригована на концентрацію Evans Blue в сироватці і виражена у вигляді відношення підданих впливу і контрольних вух. Хоча лікування IL-18BP на день 4 і день 5 знижувало набрякання до 56% від контрольних вух, оброблених розчином (ліва панель, $p < 0,01$), в проникності судин не спостерігалось значної відмінності між цими двома групами. В обох групах показаний значно збільшений набряк у порівнянні з не сенсibilізованою контрольною групою ($p < 0,05$ і $p < 0,01$).

Як подальший контроль, мишей обробляли 250мкг нерелевантного білка БСА на одну тварину на день. У цих мишей КГЧ розвивалось так само, як і у тварин, оброблених розчином ($n=10$ мишей в групі).

На Фіг.5 лікування IL-18BP зменшує запальну інфільтрацію підданого впливу DNFB вуха. КГЧ індукувала у мишей C57BL/6 як описано. Тварин обробляли IL-18BP або розчином в дні 4-6. Лікування IL-18BP зменшувало набрякання до 58% від контрольної групи з розчином на 7 день. Мишей умертвляли на 7 день, збирали піддані впливу вуха і групували їх ($n=8$) і піддавали ферментативному розщепленню з одержанням суспензії окремих клітин. Клітини характеризували подальшим аналізом FACs, основувшись на CD45-позитивних живих клітинах. Кількість $\alpha\beta$ T-клітин, NK-клітин, нейтрофілів і моноцитів/макрофагів, виявлених у препаратах вуха, виражають як процент від загальної кількості аналізованих клітин (верхні значення). Зниження вказаних типів клітин після лікування IL-18BP по відношенню до контрольної групи з розчином дане в нижніх цифрах.

На Фіг.6 показано, що активація T-клітин ослабляється при лікуванні IL-18BP. Клітини, одержані з підданих впливу DNFB вух, повторно стимулюють при 2×10^5 на комірку планшета з пов'язаними на ньому антитілами до CD3. Під час подальшої культивування протягом 24 годин IL-18BP не додавали. Продукцію IFN- γ вимірювали у трьох повторях за допомогою ELISA. Клітини, одержані від оброблених IL-18BP мишей, продукували тільки 45% IFN- γ , виявленого в культурах клітин, одержаних від контрольних тварин, оброблених розчином.

На Фіг.7 показано, що лікування IL-18BP знижує кількість клітин, продукуючих IFN γ , в запальному інфільтраті вуха. Препарати клітин з підданих впливу DNFB вух стимулювали 50нг/мл PMA* і 500нг/мл лономіцину протягом 4 годин. Секрецію цитокіну блокували додаванням 2мкг/мл брэфелдину А в останні 2 години інкубування. Потім клітини піддавали багатоклірному імуофлуоресцентному фарбуванню на предмет внутрішньоклітинних IFN γ і поверхневих антигенів. Лікування IL-18BP знижувало загальну кількість клітин, позитивних відносно фарбування на предмет IFN γ до 78% від контролю. IFN γ продукував T-клітинами CD8 і, в меншій мірі, T-клітинами CD4. У NK-клітинах і $\alpha\beta$ T-клітинах IFN γ не виявлений, (н.в. - не визначено; * Форбол 12-Міристант 13-Ацетат).

На Фіг.8 Лікування IL-18BP не ослабляє рекрутимент клітин Лангерганса в дренауючий лімфатичний вузол. Мишей забарвлювали нанесенням гаптєну FITC або розчину ацетон/дибутилфталат (1:1) на правий і лівий бік, відповідно. Пахові лімфатичні вузли збирали через 24 години після фарбування. Кон'юговані з гаптєном клітини Лангерганса могли бути визначені за допомогою FACS як клітини FITC $^+$, CD11c $^+$ в лімфатичному вузлі, дренауючому забарвлений FITC бік, але не в лімфатичному вузлі, дренауючому протилежний бік, забарвлений тільки розчином. Процент клітин Лангерганса, що несуть гаптєн, в дренауючому лімфатичному вузлі становив 1,2% від загальної кількості клітин лімфатичного вузла у тварин, лікованих IL-18BP за 24 години і 1 годину до фарбування. Це не відрізнялось значно від кількості, одержаної у контрольних тварин. ($n=5$ дренауючих лімфатичних вузлів на групу).

Даний винахід оснований на виявленні того, що інгібітор IL-18 надає благотворну дію на відновлення після сенсibilізації гаптєном в моделі гіперчутливості типу IV у мишей.

Тому, даний винахід відноситься до застосування інгібітору IL-18 для одержання лікарського засобу для лікування і/або профілактики розладів у вигляді гіперчутливості.

У контексті даного винаходу вираз «розлад, у вигляді гіперчутливості» і «алергічний розлад» є синонімами. Обидва терміни відносяться до розладів або реакцій, викликаних неадекватною адаптивною імунною відповіддю. Реакції гіперчутливості є результатом в корені благотворної імунної відповіді, діючої неадекватно у відношенні чужорідних антигенів, таких як, наприклад звичайні макромолекули навколишнього середовища, яка може привести до запальних реакцій і пошкодження тканини. При розладах, що є виявом гіперчутливості, звичайно нешкідливий стимулятор, алерген, викликає імунну відповідь, яка при повторному контакті реактивується з виникненням патологічного пошкодження.

Розлади у вигляді гіперчутливості, а також їх клінічні симптоми і вияви детально описані в «Рівні техніки» і застосування відповідно до даного винаходу відноситься до, але не обмежено ними, розладів у вигляді гіперчутливості, описаних вище.

У переважному варіанті даного винаходу розлад у вигляді гіперчутливості вибирають з групи, що включає розлади з реакціями гіперчутливості типу I, розлади з реакціями гіперчутливості типу II, розлади з реакціями гіперчутливості типу III або розлади з реакціями гіперчутливості типу IV.

Розлади з гіперчутливістю типу I також називають гіперчутливістю негайного типу або звичайною алергією. Дана гіперчутливість опосередковується IgE. Реакції гіперчутливості негайного типу (тип I) виникають через зв'язування антигену з IgE на тучних клітинах або базофілах. У поняття розладів з реакціями гіперчутливості типу I включені атонічні захворювання, такі як, але не обмежені ними, алергічний риніт, алергічний кон'юнктивіт, атонічний дерматит, алергічна набута бронхіальна астма, кропивниця, системна анафілаксія. Анафілаксія є важкою, загрозливою для життя алергічною реакцією, що виникає при гіперчутливості типу

I (негайній).

Гіперчутливість типу II або цитотоксична гіперчутливість включає цитолітичні дії, опосередковані антитілом, комплектом і/або клітинними механізмами. Антитіло до пов'язаного з клітиною антигену (тип II) спричиняє руйнування клітини шляхом активації комплексу або стимуляції фагоцитозу. Розлади з гіперчутливістю типу II відповідно до даного винаходу включають, наприклад, Кумбс-позитивну гемолітичну анемію, індуковану антитілами тромбоцитопенічну пурпуру, лейкопенію, пухирчатку, пемфігоїд, синдром Гудпасчера і перніціозну анемію. Ці реакції мають місце у пацієнтів після переливання несумісної крові, при гемолітичних захворюваннях новонароджених, і при тромбоцитопенії новонароджених, вони також можуть грати роль в мультисистемних захворюваннях, що є виявом гіперчутливості, (наприклад при системному червоному вовчаку, СЧВ).

Розлади з гіперчутливістю III типу включають реакції, в яких антитіла утворюють імунні комплекси з антигеном. Циркуючі комплекси активують комплемент, приєднуються до еритроцитів, які потім піддаються фотоцитозу селезінки, виходять з системи кровообігу і спричиняють запалення тканин. Ця реакція називається реакцією Артюса. Альтернативно, комплекси фагоцитозуються макрофагами, які презентують антиген, виділяють цитокіни і активують В і Т-клітини. IgE, IgA, IgG і IgM утворюють комплекси з антигеном. Реакції типу III виникають, як правило, при відкладенні імунних комплексів в тканинах, особливо у шкірі, суглобах і нирках. Хронічний імунний комплексний нефрит відповідальний за більшість випадків гломерулонефриту у людини. Відповідно до даного винаходу розлади гіперчутливості типу III включають, наприклад сироваткову хворобу, що викликається сироваткою, лікарськими засобами або антитілом вірусного гепатиту; СЧВ; ревматоїдний артрит (РА); поліартерит; криоглобулінемію; гіперчутливий пневмоніт; аспергілез бронхів і легень; гострий гломерулонефрит; хронічний мембрано-проліферативний гломерулонефрит; і супутні захворювання нирок.

Розлади з гіперчутливістю типу IV включають опосередковані клітинами реакції, і їх розвиток звичайно займає 12 або більше годин. Розлади з гіперчутливістю типу IV можуть включати запалення, і результатом може бути хронічне запальне захворювання. Гіперчутливості типу IV також називають гіперчутливістю уповільненого типу або DTH. Після того як тільки Т-клітини сенсibilізовані внаслідок первинного впливу, вторинний вплив приводить до реакції гіперчутливості уповільненого типу. Ця реакція є місцевою запальною відповіддю, яка іноді займає 2-3 дні для клінічного вияву.

У переважному варіанті даного винаходу, розлад з гіперчутливістю є гіперчутливістю уповільненого типу. Таким чином, даний винахід переважно відноситься до всіх видів клінічних станів, в яких реакції типу IV грають важливу роль, таких як контактна гіперчутливість уповільненого типу, дерматит, контактний дерматит, гіперчутливий пневмоніт, відторгнення алотрансплантату, гранульому, викликану внутрішньоклітинними організмами,

деякі форми чутливості до лікарських засобів, тиреоїдит і енцефаломієліти після вакцинавання проти сказу.

DTH може виникнути при звичайній опосередкованій клітинами імунній відповіді на зараження вірусами, грибами і деякими бактеріями, а саме, *Mycobacterium tuberculosis* і *Mycobacterium leprae*. Іншими зовнішніми агентами, що викликають DTH, можуть бути секретії рослин, тварин, комах і рептилій, хімічні або біохімічні антигени. Вони можуть походити з природних або синтетичних джерел. Різні типи волокон, тканин і подібних, таких як латекс, що застосовується у хірургічних рукавичках, можуть викликати опосередковану Т-клітинами реакцію гіперчутливості у деяких індивідуумів. Зовнішні агенти, які викликають реакцію, можуть бути агентами, що надходять з водою, такими як розчинені солі і мінерали, що зустрічаються, наприклад, у навколишньому середовищі, у вугледобувній, металургійній і хімічній промисловості.

В іншому переважному варіанті даного винаходу розладом з гіперчутливістю є контактний дерматит або контактна гіперчутливість. Контактний дерматит, який також є реакцією типу IV, є реакцією на професійні та інші антигени. Агенти, що викликають контактний дерматит, звичайно мають відносно низьку молекулярну масу (<1кД) і не є імуногенними самі по собі, але вони являють собою високо реакційноздатні молекули, які ковалентно зв'язуються з білками шкіри або тканин. Сенсibilізуюча хімічна сполука відома як гаптен, білок-хазяїн, з яким він з'єднується, відомий як носій. Відома множина гаптенів, що викликають контактний дерматит. Для того щоб виявити, чи буде у пацієнта розвиватись контактний дерматит у відповідь на вказаний сенсibilізатор, підозрюваний контактний сенсibilізатор наносять на спину пацієнта і закривають на 48 годин. Місце реакції перевіряють після 2 і 24 годин. При позитивній відповіді має місце запалення і ущільнення на ділянці, що тестується.

Гіперчутливість уповільненого типу також є ключовим механізмом, що визначає відторгнення трансплантованих тест-органів, і тому даний винахід також відноситься до застосування інгібітору IL-18 для запобігання відторгнення трансплантату.

Термін «інгібітор IL-18» в контексті даного винаходу відноситься до будь-якої молекули, яка модулює продукцію IL-18 і/або дію IL-18 таким чином, що продукція і/або його дія IL-18 ослабляється, зменшується або частково, істотно або повністю запобігається або блокується. Термін «інгібітор IL-18» охоплює інгібітори продукції IL-18, також або інгібітори дії IL-18.

Інгібітором продукції може бути будь-яка молекула, що негативно впливає на синтез, процесінг або дозрівання IL-18. Інгібітори відповідно до даного винаходу можуть бути, наприклад, супресорами експресії гена інтерлейкіну IL-18, антисмисловими мРНК, такими, що зменшують або запобігають транскрипції мРНК IL-18 або ведуть до деградації мРНК, білками, що порушують правильне укладання, або такими, що частково або істотно запобігають секретії IL-18, протеазами, сприяючими деградації IL-18, після того, як він був синтезований, інгібіторами протеаз, що розщеп-

люють про-IL-18 з одержанням зрілого IL-18, такими як інгібітори каспази-1, і подібними.

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

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

У переважному варіанті даного винаходу інгібітор IL-18 вибирають з інгібіторів каспази-1 (ICE), антитіл до IL-18, антитіл до будь-яких під одиниць рецептору IL-18, інгібіторів шляху передачі сигналу за участю IL-18, антагоністів IL-18, які конкурують з IL-18 і блокують рецептор IL-18, і зв'язувальних IL-18 білків, ізоформ, мутеїнів, злитих білків, функціональних похідних, активних фракцій або похідних циркулярної перестановки, що мають ту ж дію.

Термін «зв'язувальні IL-18 білки» в даному описі застосовується як синонім терміну «зв'язувальний IL-18 білок» або «IL-18BP». Він включає зв'язувальні IL-18 білки такі, як визначені в WO 99/09063 або у Novick et al., 1999, включаючи варіанти сплайсингу і/або ізоформи зв'язувальних IL-18 білків, як визначено у Kit et al., 2000, які зв'язуються з IL-18. Зокрема, відповідно до даного винаходу застосовуються людські ізоформи а і с IL-18BP. Білки, що застосовуються відповідно до даного винаходу, можуть бути глікозилізованими або неглікозилізованими, вони можуть бути одержані з природних джерел, таких як сеча, або вони можуть бути переважно одержані рекомбінантним шляхом. Рекомбінантна експресія може проводитись в прокаріотних системах експресії, таких як E.coli, або в еукаріотній, переважно - системі експресії ссавців.

В даному описі термін «мутеїни» відноситься до аналогів IL-18BP або аналогів вірусного IL-18BP, в яких один або більше амінокислотних залишків IL-18BP, що зустрічається в природі, або вірусного IL-18BP заміщені іншими амінокислотними залишками, або делетовані, або один або більше амінокислотних залишків додані до послідовності, що зустрічається в природі, IL-18BP або вірусного IL-18BP, без надання значного впливу на активність одержаних продуктів у порівнянні з диким типом IL-18BP або вірусним IL-18BP. Дані мутеїни одержують відомим синтезом і/або сайтно-направленими методами мутагенезу, або будь-яким іншим відомим методом, відповідним для даної мети.

Мутеїни відповідно до даного винаходу включають білки, що кодуються нуклеїновою кислотою,

такою як ДНК або РНК, яка гібридується з ДНК або РНК, яка кодує IL-18BP або кодують вірусний IL-18BP, відповідно до даного винаходу, в жорстких умовах. Термін «жорсткі умови» відноситься до умов гібридизації і подальшого промивання, які фахівці в даній області техніки звичайно називають «жорсткими». [Див. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, раніше, Interscience, N.Y., §§6.3 і 6.4 (1987, 1992) і Sambrook et al.], раніше. Не обмежуючись ними, приклади жорстких умов включають умови промивання при температурі на 12-20°C нижче розрахованої Tm гібриду, що вивчається, у наприклад 2xSSC і 0,5% SDS протягом 5 хвилин, 2xSSC і 0,1% SDS протягом 15 хвилин; 0,1xSSC і 0,5% SDS при температурі 37°C протягом 30-60 хвилин і потім 0,1xSSC і 0,5% SDS при температурі 68°C протягом 30-60 хвилин. Фахівці в даній області техніки розуміють, що жорсткість умов також залежить від довжини послідовності ДНК, олігонуклеотидних зондів (таких як 10-40 основ) або суміші олігонуклеотидних зондів. Якщо застосовується суміш зондів, переважно замість SSC застосовувати хлорид тетраметиламонію (ТМАС). Див. Ausubel, раніше.

Ідентичність відображає взаємовідношення між двома або більше поліпептидними послідовностями або двома або більше полінуклеотидними послідовностями, що визначаються шляхом порівняння послідовностей. Загалом, ідентичність відноситься до точної відповідності нуклеотиду нуклеотиду або амінокислоти амінокислоті у двох полінуклеотидних або двох поліпептидних послідовностях, відповідно, по всій довжині послідовностей, що порівнюються.

Для послідовностей, в яких немає точної відповідності, може бути визначений «% ідентичності». Загалом, дві послідовності, що порівнюються, вирівнюють для одержання максимальної відповідності між ними. Даний процес може включати додавання «інтервалів» в одну або в обидві послідовності для збільшення міри вирівнювання. % ідентичності може бути визначений для всієї довжини кожної послідовності (так назване глобальне вирівнювання), яка порівнюється, що особливо підходить для послідовностей однакової або дуже схожої довжини, або для більш коротких, визначених довжин (так назване локальне вирівнювання), що більше підходить для послідовностей з нерівними довжинами.

Способи порівняння ідентичності і гомології двох або більше послідовностей добре відомі в даній області техніки. Так, наприклад, є програмне забезпечення від Wisconsin Sequence Analysis Package, версія 9.1 (Devereux J et al., 1984), наприклад, програми BESTFIT і GAP можуть застосовуватись для визначення % ідентичності між двома полінуклеотидами і % ідентичності і % гомології між двома поліпептидними послідовностями. BESTFIT використовує алгоритм «локальної гомології» Smith and Waterman (1981) і виявляє найкращу одиничну ділянку схожості між двома послідовностями. Інші програми для визначення ідентичності і/або схожості між послідовностями також відомі в даній області техніки, наприклад, ряд програм BLAST [Altschul SF et al, 1990, Altschul SF et al, 1997, доступні з домашньої сторінки NCBI

на www.ncbi.nlm.nih.gov) і FASTA [Pearson WR, 1990; Pearson 1998].

Будь-який такий мутеїн переважно має послідовність амінокислот, в достатній мірі дублюючу послідовність IL-18BP, або в достатній мірі дублюючу послідовність вірусного IL-18BP так, щоб володіти значною мірою схожою активністю з IL-18BP. Одним з видів активності IL-18BP є його здатність зв'язувати IL-18. Поки мутеїн володіє істотною активністю зв'язування IL-18, він може застосовуватись для очищення IL-18, такого як за допомогою афінної хроматографії, і тому можна вважати, що він володіє значною мірою схожою активністю, з IL-18BP. Отже, можна визначити, чи володіє будь-якою конкретний мутеїн активністю, значною мірою схожою з IL-18BP, за допомогою звичайних експериментів, що включають як об'єкт такий мутеїн, наприклад, методом простого «конкурентного» сендвіч-аналізу для визначення, чи зв'язує він відповідним чином помічений IL-18, такого як радіоімунологічний аналіз або аналіз ELISA.

У переважному варіанті будь-який такий мутеїн має, принаймні, 40% ідентичності або гомології з послідовністю або IL-18BP, або кодованого вірусом гомолу IL-18BP, як визначено у WO 99/09063. Більш переважно, щоб він мав, принаймні, 50%, принаймні, 60%, принаймні, 70%, принаймні, 80% або, найбільш переважно, принаймні, 90% ідентичності або гомології з ними.

Мутеїни поліпептидів IL-18BP або мутеїни вірусних IL-18BP, які можуть застосовуватись відповідно до даного винаходу, або кодує їх нуклеїнова кислота, включають обмежений набір значною мірою відповідних послідовностей, як наприклад, заміщувальні пептиди або поліпептиди, які можуть бути звичайно одержані фахівцем в даній області техніки, без надмірного експериментування, основуючись на методах та інструкціях, представлених тут.

Переважними змінами для мутеїнів відповідно до даного винаходу є ті, які називають «консервативними» замінами. Консервативні заміни амінокислот поліпептидів або білків IL-18BP або вірусних IL-18BP можуть включати синонімічні амінокислоти в межах груп, які володіють в достатній мірі схожими фізико-хімічними властивостями, такі заміни між членами групи дозволяють зберегти біологічну функцію молекули [Grantham, 1974]. Зрозуміло, що вставки і делеції амінокислот також можуть бути зроблені в охарактеризованих вище послідовностях без порушення з функцій, особливо якщо вставки і делеції залучають тільки декілька амінокислот, наприклад менше тридцяти, і переважно, менше десяти, і не видаляють або не переміщують амінокислоти, які є критичними для функціональної конформації, наприклад цистеїнові залишки. Білки і мутеїни, одержані шляхом таких делецій і/або вставками, входять в об'єм даного винаходу.

Переважно, групами синонімічних амінокислот є ті, які представлені в таблиці 1. Більш переважно, групами синонімічних амінокислот є ті, які представлені в таблиці 2; і найбільш переважно, групами синонімічних амінокислот є ті, які представлені в таблиці 3.

Таблиця 1

Переважні групи синонімічних амінокислот

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

Таблиця 2

Більш переважні групи синонімічних амінокислот

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

Таблиця 3

Найбільш переважні групи синонімічних амінокислот

Амінокислота	Синонімна кислота
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
Gin	Gin
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

Приклади одержання заміни амінокислот в білках, які можуть застосовуватись для одержання

мутеїнів поліпептидів або білків IL-18, або мутеїнів вірусних IL-18BP для застосування відповідно до даного винаходу, включають будь-які відомі стадії способу, такі як представлені у [патентах США №№4959314, 4588858 і 4737462, виданих Mark et al.; 5116943, виданій Koths et al.; 4965195, виданій Namen et al.; 4879111, виданій Chong et al.; і 5017691, виданій Lee et al.; і лізинзаміщених білків, представлених у патенті США №4904584 (Shaw et al)].

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

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

Дані похідні можуть, наприклад, включати бічні ланцюги поліетиленгліколю, які можуть маскувати антигенні ділянки і продовжувати час життя IL-18BP або вірусного IL-18BP в рідких середовищах організму. Інші похідні включають аліфатичні ефіри карбоксильних груп, амідні карбоксильних груп, одержані реакцією з аміаком або з первинними або вторинними амінами, N-ацильні похідні вільних аміногруп залишків амінокислот, одержані з ацильними групами (наприклад, алканолільними або карбоциклічними ароїльними групами), або O-ацильні похідні вільних гідроксильних груп (наприклад, груп серинових або треонінових залишків), одержані з ацильними групами.

Як «активні фракції» IL-18BP або вірусного IL-18BP, мутеїнів і злитих білків даній винахід включає будь-які фрагменти або попередники поліпептидного ланцюга молекули білка як такої або разом з асоційованими з нею молекулами або пов'язаними з нею залишками, наприклад, цукром або фосфатними залишками, або агрегатами молекули білка або залишками цукру, за умови, що вказана фракція має активність значною мірою схожу IL-18BP.

Термін «солі» в даному описі відноситься як до солей карбоксильних груп, так і до кислотно-адитивних солей аміногруп молекули інгібітору IL-18 або їх аналогів. Солі карбоксильної групи можуть бути одержані методами, відомими в даній області техніки, і включають неорганічні солі, наприклад, натрієві, кальцієві, амонієві, залізни або цинкові солі, і подібні, і солі з органічними основами, наприклад, з амінами, такими як триетаноламін, аргінін або лізин, піперидин, прокаїн і подібні. Кислотно-адитивні солі включають, наприклад,

солі з мінеральними кислотами, такими як, наприклад, хлористоводнева кислота або сірчана кислота, і солі з органічними кислотами, такими як, наприклад, оцтова кислота або щавлева кислота. Звичайно, будь-які такі солі повинні зберігати біологічну активність інгібітору IL-18 відповідно до даного винаходу, таку як надання благотворної дії на DHT, наприклад.

В іншому переважному варіанті даного винаходу інгібітором IL-18 є антитіло до IL-18. Антитіла до IL-18 можуть бути поліклональними або моноклональними, химерними, гуманізованими або навіть повністю людськими. Реконбінантні антитіла і їх фрагменти характеризуються високою мірою спорідненості зв'язування з IL-18 *in vivo* і низькою токсичністю. Антитіла, які можуть застосовуватись відповідно до даного винаходу, характеризуються здатністю лікувати пацієнтів протягом періоду часу, достатнього для одержання від хорошої до чудової регресії або полегшення патогенного стану або будь-якого симптому або групи симптомів, що відносяться до патогенного стану, і низькою токсичністю.

Нейтралізуючі антитіла легко одержують у тварин, таких як кролики, кози або миші, імунізацією IL-18. Імунізовані миші особливо корисні для забезпечення джерел B-клітин для одержання гібридом, які, в свою чергу, культивують для одержання великих кількостей анти-IL-18 моноклональних антитіл.

Химерні антитіла являють собою молекули імуноглобуліну, що характеризуються двома або більше сегментами або частинами, що походять від різних видів тварин. Як правило, варіабельну ділянку химерного антитіла одержують з антитіла ссавця, що не відноситься до людини, такого як мишаче моноклональне антитіло, а константну ділянку імуноглобуліну одержують з молекули імуноглобуліну людини. Переважно, щоб обидві ділянки і їх комбінація мали низьку імуногенність, що визначається звичайним шляхом [Elliott et al., 1994]. Гуманізовані антитіла являють собою молекули імуноглобуліну, створені методами генної інженерії, при яких мишачі константні ділянки замінюють відповідними людськими ділянками, при цьому зберігають мишачі зв'язувальні антигенні ділянки. Одержане мишаче-людське химерне антитіло переважно має знижену імуногенність і поліпшену фармакокінетику у людини [Knight et al., 1993].

Таким чином, у ще одному переважному варіанті, антитіло до IL-18 являє собою гуманізоване антитіло до IL-18. Переважні приклади гуманізованих антитіл до IL-18 описані, наприклад, в заявці на європейський патент EP 0974600.

У ще одному переважному варіанті антитіло до IL-18 є повністю людським. Технологія одержання людських антитіл детально описана, наприклад, у WO 00/76310, WO 99/53049, US 6162963 або AU5336100. Повністю людськими антитілами є реконбінантні антитіла, що переважно одержуються у трансгенних тварин, наприклад ксеномишей, що включають повністю або частково функціональні локуси імуноглобуліну людини.

У найбільш переважному варіанті даного винаходу інгібітором IL-18 є IL-18BP або його ізофо-

рма, мутеїн, злитий білок, функціональне похідне, активна фракція або похідне циркулярної перестановки. Дані ізоформи, мутеїни, злиті білки або функціональні похідні зберігають біологічну активність IL-18BP, зокрема, зв'язуються з IL-18, і переважно мають, по суті, як мінімум, активність, схожу з IL-18BP. В ідеалі, такі білки володіють підвищеною біологічною активністю у порівнянні з немодифікованим IL-18BP. Переважні активні фракції володіють активністю, яка краще активності IL-18BP, або мають подальші переваги, такі як краща стабільність або менша токсичність або імуногенність, або їх легше одержувати у великих кількостях, або легше очищати.

Послідовності IL-18BP і його варіантів/ізоформів сплайсингу можуть бути одержані з [WO 99/09063 або у Nivick et al., 1999, а також у Kirm et al., 2000].

Функціональні похідні IL-18BP можуть бути кон'юговані з полімерами для поліпшення властивостей білка, таких як стабільність, період напіврозпаду, біодоступність, переносимість організму людини або імуногенність. Для досягнення цієї мети IL-18BP може бути пов'язаний, наприклад з поліетиленгліколем (ПЕГ). ПЕГування може проводитись відомими методами, описаними, наприклад у WO 92/13095.

Отже, в переважному варіанті функціональне похідне містить, принаймні, одну складову, приєднану до однієї або більше функціональних груп, які зустрічаються як один або більше бічних ланцюгів на залишках амінокислот.

Варіант, в якому такою складовою є поліетиленгліколь (ПЕГ) найбільш переважний.

В іншому переважному варіанті даного винаходу інгібітором IL-18 є злитий білок, що містить цілий IL-18 зв'язувальний білок або його частину, який з'єднаний з цілим імуноглобуліном або його частиною. Методи одержання білків, злитих з імуноглобуліном, добре відомі в даній області техніки, деякі з них описані, наприклад у WO 01/03737. Фахівець в даній області техніки зрозуміє, що злитий білок, який одержується відповідно до даного винаходу, зберігає біологічну активність IL-18BP, зокрема, відносно зв'язування з IL-18. Злиття може бути безпосереднім або через короткий лінкерний пептид, який може мати від 1 до 3 амінокислот в довжину або більше, наприклад 13 залишків амінокислот в довжину. Вказаний лінкер може бути, наприклад, трипептидом з послідовністю E-F-M (Glu-Phe-Met), або лінкером з послідовністю, з 13 амінокислот, що включає Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met, введеним між послідовністю IL-18BP і послідовністю імуноглобуліну. Одержаний злитий білок має поліпшені властивості, такі як збільшений час існування в рідких середовищах організму (період напіврозпаду), підвищену специфічну активність, підвищений рівень експресії, або поліпшується очищення злитого білка.

У переважному варіанті IL-18BP з'єднаний з константною ділянкою молекули Ig. Переважно, він з'єднаний з ділянками важких ланцюгів, наприклад, такими як домени CH2 або CH3 людського IgG1, наприклад. Створення специфічних злитих білків, що містять IL-18BP і частину імуноглобулі-

ну, описане, наприклад у прикладі 11 WO 99/09063. Інші ізоформи молекул Ig також підходять для створення злитих білків відповідно до даного винаходу, такі як ізоформи IgG₂ або IgG₄, або інші класи Ig, такі як IgM або IgA, наприклад. Злиті білки можуть бути мономерними або мультимерними, гетеро- або гомомультимерними.

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

Таким чином, даний винахід також відноситься до застосування комбінації інгібітору IL-18 та інтерферону у виробництві лікарських засобів для лікування розладів, що є проявом гіперчутливості.

Інтерферони можуть також бути кон'юговані з полімерами для поліпшення стабільності білків. Кон'югат між інтерфероном і багатоатомним спиртом поліетиленгліколем (ПЕГ) описаний, наприклад у WO 99/55377.

В іншому переважному варіанті відповідно до даного винаходу інтерфероном є інтерферон-β (IFN-β) і більш переважно, IFN-β Ia.

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

У ще одному переважному варіанті відповідно до даного винаходу інгібітор IL-18 застосовують у поєднанні з антагоністом TNF. Антагоністи TNF надають свою дію декількома шляхами. По-перше, антагоністи можуть зв'язуватись або ізолювати саму молекулу TNF з достатньою спорідненістю і специфічністю для часткової або значною мірою повної нейтралізації епітопу TNF або епітопів, відповідальних за зв'язування з рецептором TNF (далі названий «ізолюючим антагоністом»). Ізолюючим антагоністом може бути, наприклад антитіло, направлене проти TNF.

Альтернативно, антагоністи TNF можуть інгібувати шляхом передачі сигналу за участю TNF, активований рецептором клітинної поверхні після зв'язування TNF (далі названі «сигналізуючі антагоністи»). Обидві групи антагоністів є корисними, окремо або разом, з інгібітором IL-18 для лікування розладів, що є виявом гіперчутливості.

Антагоністи TNF можуть бути легко ідентифіковані і оцінені звичайним скринінгом кандидатів за їх дією на активність природного TNF відносно чутливих ліній клітин *in vitro*, наприклад, В-клітин людини, в яких TNF викликає проліферацію і секрецію імуноглобуліну. Дослідження включає композицію TNF при різній мірі розрідженості випробуваного антагоніста, наприклад від 0,1 до 100 разів від молярної кількості TNF, що використовується в дослідженні, і контрольну композицію, що не містить TNF або містить тільки антагоніст [Tucci et al., 1992].

Ізолюючі антагоністи є переважними антагоністами TNF, що застосовуються відповідно до даного винаходу. Серед ізолюючих антагоністів переважні ті поліпептиди, які зв'язують TNF з високою спорідненістю і володіють низькою імуногенністю. Розчинні молекули рецептора TNF і нейтралізуючі антитіла до TNF особливо переважні.

Наприклад, розчинні TNF-RI і TNF-RII застосовуються відповідно до даного винаходу. Зрізані форми цих рецепторів, які містять позаклітинні домени рецепторів або їх функціональні частини, є особливо переважними антагоністами відповідно до даного винаходу. Зрізані розчинні рецептори TNF тип-I і тип-II описані, наприклад у EP914431.

Зрізані форми рецепторів TNF є розчинними і були виявлені в сечі і сироватці як білки з М.м 30кДа і 40кДа, що зв'язують та інгібують TNF, які називають TBPI і TBPII, відповідно [Engelmann et al., 1990]. Одночасне, послідовне або роздільне застосування інгібітору IL-18 з антагоністом TNF і/або інтерфероном є переважним відповідно до даного винаходу.

Відповідно до даного винаходу TBPI і TBPII є переважними антагоністами TNF для застосування в поєднанні з інгібітором IL-18. Похідні, фрагменти, ділянки і біологічно активні частини молекул рецептора, функціонально схожі на молекули рецепторів, також можуть застосовуватись відповідно до даного винаходу. Такі біологічно активні еквіваленти або похідні молекули рецептора відносяться до частини поліпептиду, або послідовності, що кодує молекулу рецептора, які мають достатній розмір і здатні зв'язувати TNF з такою спорідненістю, що взаємодія з пов'язаним з мембраною рецептором TNF інгібується або блокується.

В іншому переважному варіанті людський розчинний TNF-RI (TBPI) являє собою антагоніст TNF, що застосовується відповідно до даного винаходу. Природні і рекомбінантні розчинні молекули TNF-рецептора і способи їх одержання описані в європейських патентах EP 308378, EP 398327 і EP 433900.

Інгібітор IL-18 може застосовуватись одночасно, послідовно або роздільно з інгібітором TNF.

В іншому переважному варіанті даного винаходу лікарський засіб додатково містить протизапальний агент, такий як NSAID (не стероїдний протизапальний лікарський засіб). У переважному варіанті COX-інгібітор, і найбільш переважно, COX-2 інгібітор, застосовують у поєднанні з інгібітором IL-18. COX-інгібітори відомі в даній області техніки. Визначені COX-2 інгібітори, наприклад, описані в WO 01/00229. Активні компоненти можуть застосовуватись одночасно, послідовно або роздільно.

Реакції гіперчутливості часто лікують протиалергічними лікарськими засобами, такими як антигістамінні препарати, кромолін, глюкокортикоїди або симпатоміметики. Тому даний винахід також відноситься до комбінаторної терапії, що включає інгібітор IL-18 і протиалергічний засіб. Застосування антигістаміну і/або кромоліну, і/або глюкокортикоїду, і/або симпатоміметичного засобу при роздільному, послідовному або одночасному застосуванні з інгібітором IL-18 є переважним відповідно до даного винаходу.

У наступному переважному варіанті даного винаходу інгібітор IL-18 застосовують в кількості від близько 0,0001 до 1000мг/кг ваги тіла, або від близько 0,001 до 100мг/кг ваги тіла, або від близько 0,01 до 10мг/кг ваги тіла, або від близько 0,1 до 5мг/кг ваги тіла, або від близько 1 до 3мг/кг ваги тіла.

Інгібітор IL-18 відповідно до даного винаходу переважно вводять місцево, тобто, локально. При контактному дерматиті, наприклад інгібітор IL-18 можна вводити безпосередньо в пошкоджену ділянку шкіри.

В іншому варіанті даного винаходу інгібітор IL-18 вводять системно, переважно підшкірно або внутрішньом'язово.

Даний винахід, крім того, відноситься до застосування вектора експресії, що включає кодуючу послідовність інгібітору IL-18, при одержанні лікарського засобу для профілактики і/або лікування розладів у вигляді гіперчутливості. Таким чином, передбачається підхід з використанням генної терапії для доставки інгібітору IL-18 в сайт, в якому він потрібний. Для лікування і/або профілактики розладу у вигляді гіперчутливості, вектор генної терапії, що містить послідовність інгібітору продукції і/або дії IL-18, може бути ін'єктований безпосередньо в уражену тканину, наприклад, дозволяючи таким чином уникнути проблем, виникаючих при системному введенні векторів генної терапії, таких як розбавлення векторів, досягнення або ураження клітин-мішеней або тканин-мішеней і побічних ефектів.

Застосування вектора для інфікування і/або збільшення ендогенної продукції інгібітору IL-18 в клітині, звичайно не активної відносно експресії інгібітору IL-18, або яка експресує недостатню кількість інгібіторів, також передбачене даним винаходом. Вектор може містити регуляторні послідовності, що функціонують у клітинах, в яких потрібно експресувати інгібітор IL-18. Такі регуляторні послідовності можуть бути, наприклад, промоторами або енансерами. Регуляторна послідовність може бути потім введена в правильний локус геному шляхом гомологічної рекомбінації, таким чином регуляторна послідовність функціонально зв'язується з геном, експресію якого потрібно інфікувати або посилити. Технологію звичайно називають «Ендогенна активація гена» (EGA), і вона описана, наприклад у WO 91/09955.

Фахівцеві в даній області техніки повинно бути зрозуміло, що також можливо зупинити експресію IL-18 безпосередньо, не застосовуючи інгібітор IL-18, тим же методом. Для цього негативний регуляторний елемент, такий як, наприклад, елемент, який викликає мовчання, можна вбудувати в локус гена IL-18, що приведе до зниження або припинення експресії IL-18. Фахівець в даній області техніки розуміє, що таке зниження регуляції або припинення експресії IL-18 має той же ефект, що і застосування інгібітору IL-18 для профілактики і/або лікування захворювання.

Даний винахід також відноситься до застосування клітини, яка була генетично модифікована з метою продукції інгібітору IL-18, для виробництва лікарського засобу для лікування і/або профілактики розладів у вигляді гіперчутливості.

Даний винахід також відноситься до фармацевтичних композицій, особливо корисних для профілактики і/або лікування розладів у вигляді гіперчутливості, які включають терапевтично ефективну кількість інгібітору IL-18 і/або терапевтично ефективну кількість інтерферону, і/або терапевтично ефективну кількість інгібітору TNF, і/або

фармацевтично ефективну кількість протизапального агента, і/або фармацевтично ефективну кількість протиалергічного агента, зокрема, антигістаміну.

Як інгібітор IL-18 композиція може містити інгібітори 1-каспази, антитіла до IL-18, антитіла до будь-якої субодиниці рецептора IL-18, інгібітори шляхом передачі сигналу за участю IL-18, антагоністи IL-18, які конкурують з IL-18 і блокують рецептор IL-18, і зв'язувальні IL-18 білки, їх ізоформи, мутеїни, злиті білки, функціональні похідні, активні фракції або похідні циркулярної перестановки, що мають ту ж активність.

IL-18BP і його ізоформи, мутеїни, злиті білки, функціональні похідні, активні фракції або похідні циркулярної перестановки, такі як описані вище, є переважними активними інгредієнтами фармацевтичної композиції.

Інтерферон, що міститься у фармацевтичній композиції, переважно є IFN- γ .

У ще одному переважному варіанті фармацевтична композиція включає терапевтично ефективну кількість інгібітору TNF альфа. Фармацевтична композиція відповідно до даного винаходу також може включати один або більше COX-інгібіторів.

Визначення «фармацевтично прийнятний» охоплює будь-які носії, які не впливають на ефективність біологічної активності активного інгредієнта і не є токсичними для пацієнта, якому їх вводять. Наприклад, при парентеральному введенні активний білок(ки) може бути складений у формі одиниці дозування для ін'єкцій в носіях, таких як фізіологічний розчин, розчин декстрази, альбумін сироватки і розчин Рінгера.

Активні інгредієнти фармацевтичних композицій відповідно до даного винаходу можуть вводиться індивідууму множиною способів. Способи введення включають внутрішньошкірний, черезшкірний (наприклад препаративні форми з повільним вивільненням), внутрішньом'язовий, внутрішньоочеревинний, внутрішньовенний, підшкірний, пероральний, інтракраніальний, епідуральний, місцевий, ректальний та інтраназальний способи. Можуть застосовуватись будь-які інші терапевтично ефективні способи введення, наприклад, абсорбція через епітеліальні або ендотеліальні тканини, або шлях генної терапії, де молекулу ДНК, що кодує активний агент, вводять пацієнту (наприклад через вектор), що викликає експресію і секрецію активного агента *in vivo*. Крім того, білок(ки) відповідно до даного винаходу можна вводити разом з іншими компонентами біологічно активних агентів, такими як фармацевтично прийнятні поверхово-активні речовини, наповнювачі, носії, розріджувачі і розчинники.

Для парентерального (наприклад, внутрішньовенного, підшкірного, внутрішньом'язового) введення активний білок(ки) можуть бути представлені у вигляді розчину, суспензії, емульсії або ліофілізованого порошку у поєднанні з фармацевтично прийнятним носієм для парентерального введення (наприклад, водою, фізіологічним розчином, розчином декстрази) і домішками, які підтримують ізотонічність (наприклад маніт) або хімічну стабільність (наприклад, консерванти і буфери). Препаративну форму стерилізують звичайними

методами. Біодоступність активного білка(ів) відповідно до даного винаходу також може бути поліпшена методиками кон'югування, які збільшують період напіврозпаду молекули в тілі людини, наприклад, зв'язуванням молекули з поліетиленгліколем, як описано в заявці на патент PCT WO 92/13095.

Терапевтично ефективні кількості активного білка(ів) є похідними від множини параметрів, включаючи тип антагоніста, спорідненість антагоніста з IL-18, будь-яку залишкову цитотоксичну активність, виявлену антагоністом, спосіб введення, клінічний стан пацієнта (включаючи бажаність досягнення нетоксичного рівня активності ендогенного IL-18).

«Терапевтично ефективною кількістю» є така кількість, при введенні якої інгібітору IL-18 приводить до інгібування біологічної активності IL-18. Доза, що вводиться пацієнту у вигляді одиничної або множинної дози, може варіювати в залежності від множини факторів, включаючи фармакокінетичні властивості інгібітору IL-18, спосіб введення, стан і характеристики пацієнта (стать, вік, вага тіла, стан здоров'я, зріст), тяжкість симптомів, супутнє лікування, частота лікування і бажаний ефект. Коректування і зміна вказаних доз, а також *in vivo* і *in vitro* методи визначення інгібування IL-18 у пацієнта знаходиться в компетенції фахівця в даній області техніки.

Відповідно до даного винаходу інгібітор IL-18 застосовують в кількості від близько 0,001 до 100мг/кг або від близько 0,01 до 10мг/кг ваги тіла, або від близько 0,1 до 5мг/кг ваги тіла, або від близько 1 до 3мг/кг ваги тіла або близько 2мг/кг ваги тіла.

Способом введення, який є переважним відповідно до даного винаходу, є введення підшкірно. Також відповідно до даного винаходу переважним є внутрішньом'язове введення. Для введення інгібітору IL-18 безпосередньо в місце його дії також переважно вводиться його місцево.

У ще одному переважному варіанті інгібітор IL-18 вводять щодня або через день.

Щоденні дози звичайно застосовують у вигляді розділених доз або у формах з уповільненим вивільненням, ефективних для досягнення бажаних результатів. Друге і подальше введення можуть проводитись в дозі, яка є такою ж, менше або більше вихідної або попередньої дози, що вводиться пацієнту. Друге або подальше введення може здійснюватись під час або до розвитку захворювання.

Відповідно до даного винаходу інгібітор IL-18 можна вводити індивідууму профілактично або терапевтично до, одночасно або послідовно з іншими терапевтичними заходами або агентами (наприклад прийом декількох лікарських засобів), у терапевтично ефективній кількості, зокрема, з інтерфероном і/або інгібітором TNF і/або іншим протизапальним агентом, таким як інгібітор COX, і/або антиалергічним агентом. Активні інгредієнти, які вводять одночасно з іншими терапевтичними засобами, можуть вводиться в одній або в різних композиціях.

Даний винахід також відноситься до способу одержання фармацевтичної композиції, що містить

суміш ефективної кількості інгібітору IL-18 і/або інтерферону, і/або антагоніста TNF, і/або інгібітору СОХ з фармацевтично прийнятним носієм.

Даний винахід, крім того, відноситься до способу лікування розладів, що є виявом гіперчутливості, який включає введення фармацевтично ефективної кількості інгібітору IL-18 пацієнту, що потребує цього.

Виходячи з представленого вище повного опису, фахівцеві в даній області техніки буде зрозуміло, що те ж саме може бути здійснено в широкому спектрі еквівалентних параметрів, концентрацій і умов, не виходячи за рамки даного винаходу, і без надмірного експериментування.

Хоча даний винахід описаний в поєднанні з конкретними варіантами здійснення, повинно бути зрозуміло, що можливі подальші модифікації. Дана заявка охоплює будь-які варіанти, застосування або адаптацію даного винаходу, які дотримуються загальною, принципів винаходу і включають такі відхилення від даного опису, які відомі або звичайно використовуються в області техніки, до якої відноситься даний винахід, і можуть бути віднесені до представлених раніше в даному описі суттєвих ознак, визначених у формулі винаходу.

Всі представлені тут посилання, включаючи журнальні статті або абстракти, опубліковані або неопубліковані патенти США або зарубіжні патентні заявки, видані патенти США або інших країн або будь-які інші посилання повністю включені в даний опис у вигляді посилань, включаючи всі дані, таблиці, фігури і текст, представлені у вказаних посиланнях. Крім того, повний зміст посилальних документів, вказаних у посилальних документах, що наводяться в даному описі, також повністю включені як посилання.

Посилання на стадії відомих методів, стадії звичайних методів, відомі методи або звичайні методи не є допущенням того, що будь-який аспект, опис або варіант втілення даного винаходу описаний, розкритий або запропонований у відповідній області техніки.

Представлений вище опис конкретних варіантів так розкриває загальну суть даного винаходу, що інші, застосовуючи спеціальні знання в області техніки (включаючи зміст вказаних в даному описі посилальних документів), легко можуть модифікувати і/або адаптувати для різних областей застосування такі конкретні варіанти втілення без надмірного експериментування, не виходячи із загальної концепції даного винаходу. Тому такі адаптації і модифікації мають на увазі як еквіваленти описаних варіантів втілення, оснований на описі та інструкціях, представлених вище. Повинно бути зрозуміло, що фразеологія або термінологія застосовується тільки в описових цілях і не обмежує даний винахід, таким чином фразеологія або термінологія даного опису повинна бути інтерпретована фахівцями в даній області техніки в світлі описів та інструкцій даного винаходу, разом зі знаннями фахівця в даній області техніки.

Приклади

Приклад 1: Обробка IL-18BP знижує контактну гіперчутливість

У всіх представлених нижче прикладах використовувалась мишача модель експериментально

індукованої контактної гіперчутливості (КГЧ). Міру КГЧ вимірюють за набряканням вуха у відповідь на сенсibiliзатор, що наноситься місцево.

Тест на набрякання вуха миші, який використали для одержання даних, представлених на Фіг.1-3 (див. нижче), детально описаний [Garrigue et al., 1994]. Коротко, мишей сенсibiliзували нанесенням локально 25мкл 0,5% розчину 2,4-динітрофторбензолу [ДНФБ; Sigma Chemical Co.] в ацетоні/оливковій олії (4:1) на поголений живіт (0 день). Через п'ять днів 20мкл 0,2% ДНФБ в тому ж носії наносили на праві вуха і тільки носій на ліві вуха.

Миші одержували щодня, в 5-8 дні, 250мкг/миша/день rhIL-18BP (рекомбінантного IL-18BP людини або фізіологічний розчин в контрольній групі внутрішньоочеревинно (в.о.) (Фіг.1А) або вони одержували IL-18BP в дні 0-2 (Фіг.1В).

Товщину вуха вимірювали подвійним товщиноміром [Mitutoyo Corp., Kawasaki, Japan], і набрякання вуха оцінювали відніманням значення до контакту зі значення після контакту, і подальшим відніманням будь-якого значення набрякання, визначеного для обробленого носієм протилежного вуха.

Набрякання вуха вимірювали на 0, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 16 дні.

Іншу модель використали для одержання даних, представлених на Фіг.4-6, див. приклади нижче. IL-18-зв'язувальний білок (IL-18BP) застосовували для нейтралізації IL-18 під час експериментально індукованої контактної гіперчутливості (КГЧ) нанесенням 2,4-динітрофторбензолу (ДНФБ). Умови експерименту були наступні:

1. 0 день: сенсibiliзація

25мкл ДНФБ (0,5% в ацетоні/оливковій олії (4/1) як носій) на поголену спину

2. 5 день: контакт

5мкл ДНФБ (0,2%) на кожну зовнішню і внутрішню частину правого вуха 5мкл носія на кожну дорзальну і вентральну частину лівого вуха

3. 6 день: зчитування

Перевірка товщини вуха як ознаки запалення
Значення виражені як збільшення набрякання (мкм) підданого впливу вуха до контрольного вуха

4. 6 і 7 дні: обробка величин товщини вух для аналізу

В цій моделі піки набрякання припадають між 6 і 7 вдень. IL-18 нейтралізували щоденними ін'єкціями 250мкг IL-18BP (у фізіологічному розчині) на тварину, або під час сенсibiliзації в 0, 1 і 2 дні, або під час контакту в 4, 5 і 6 дні.

Реакцією при контактній гіперчутливості (КГЧ) є гаптенспецифічні запалення шкіри, опосередковані Т-клітинами. Більшість гаптенів індукують олігоклональні Т-клітинною відповіддю, що включають в основному ефекторні Т-клітини CD8⁺, в той час як Т-клітини CD4⁺регулюють реакцію КГЧ у формі її зниження [Bour, H., et al, 1995; Grabbe et al., 1998]. Для дослідження ролі IL-18 в КГЧ мишей сенсibiliзували нанесенням на шкіру ДНФБ, а потім піддавали повторному контакту через 5 днів нанесенням гаптену на шкіру вуха. При повторному нанесенні гаптену мишам вводили в.о. 250мкг/миша/день rhIL-18BP або фізіологічний

розчин. IL-18BP або фізіологічний розчин як контроль вводили щодня протягом 3 днів, на 5-8 дні після першої сенсibiliзації ДНФБ (0 день). Повторний контакт з ДНФБ на 5 день спричиняв значне набрякання вуха в обох групах (Фіг.1А). Міра набрякання у мишей, оброблених фізіологічним розчином (трикутники), була набагато більш вираженою, ніж у мишей, лікованих IL-18BP (квадрати), причому вухо поверталось до практично нормального стану вже на 9 день.

Зміна набрякання вуха, що спостерігається при лікуванні IL-18BP, в дні 0-2, була статистично незначущою (Фіг.1В). Час введення IL-18BP, мабуть, є важливим фактором для досягнення сприятливої дії при лікуванні IL-18BP.

В даній моделі контактної гіперчутливості/контактного дерматиту на основі мишей триденне лікування інгібітором IL-18BP давало значний сприятливий ефект на міру набрякання/запалення, викликаного обробкою гаптенем.

Приклад 2. Лікування IL-18BP знижує контактну гіперчутливість після вторинного впливу

Мишей С57BL/6 сенсibiliзували нанесенням на шкіру поголеного живота 25мкл 0,5% розчину ДНФБ (0 день). Мишей піддавали першому впливу 20мкл 0,2% ДНФБ на вухо на 5 день. На 19 день мишей піддавали другому впливу ДНФБ. Набрякання вуха вимірювали в 0 день (сенсibiliзація гаптенем), 5 день перший вплив, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 16, 19 дні (другий вплив), 20, 21, 22, 23, 26, 28 і 30 дні. Середні значення з середньоквадратичними відхиленнями для кожної групи представлені на Фіг.2. Мишей обробляли щодня 250мкг/миша/день IL-18BP в.о. (n=5; Фіг.2 незафарбовані квадрати) або фізіологічним розчином (n=5; Фіг.2, зафарбовані квадрати) в дні з 19 до 23.

Як показано на Фіг.2, лікування IL-18BP значно знижувало набрякання вуха, особливо після вторинного впливу гаптенем.

Тому терапія з використанням IL-18BP особливо підходить для терапії розладів у вигляді гіперчутливості, при яких пацієнти звичайно повторно зазнають впливу одного і того ж алергену і потребують лікування для того, щоб подолати запальні реакції, викликані впливом.

Приклад 3: IL-18BP захищає від КГЧ за допомогою нейтралізації IL-18

Для того, щоб пересвідчитись, що захист від набрякання досягається при терапії IL-18BP завдяки нейтралізації IL-18, мишей дикого типу С57BL/6 і мишей, у яких відсутній IL-18, порівнювали за їх здатністю давати відповідь у вигляді КГЧ. Миші з відсутністю IL-18 розвивали КГЧ у відповідь на ДНФБ, хоча менш помітну, ніж у мишей дикого типу. Однак у мишей з відсутністю IL-18 ефекту від лікування IL-18BP відмічено не було, як показано на Фіг.3, що вказує на те, що протизапальна дія IL-18BP при КГЧ досягається за рахунок IL-18 (n=5 мишей на групу).

Приклад 4: IL-18BP не знижує проникності судин

КГЧ індукували у мишей С57BL/6 як описано вище. Для моніторингу набряку, викликаного реакцією КГЧ, вводили Evans Blue в.в. за 2 години до контакту з ДНФБ. Мишей умертвляли через 24 години, і вуха обробляли для виділення барвника,

який проник з судин і акумулювався в навколишніх тканинах. Проникність судин оцінювали як кількість барвника на мг висушеної тканини вуха, скориговану на концентрацію Evans Blue в сироватці, і виражали у вигляді відношення піддане впливу/контрольне вухо. Хоча лікування IL-18BP в 4 і 5 день знижувало набрякання до 56% від контрольної групи, яка одержує носій, (Фіг.4, ліва частина, $p < 0,01$) не відмічалась значна різниця у проникності судин в обох групах (Фіг.4, права частина). Обидві групи показали значно збільшений набряк у порівнянні з несенсibiliзованою контрольною групою ($p < 0,05$ і $p < 0,01$). Для подальшого контролю мишей обробляли 250мкг нерелевантного білка БСА на одну тварину на день. У цих мишей КГЧ розвивалась так само, як і у оброблених носієм контрольних тварин (n=10 мишей в групі).

In vivo дослідження проникності судин (Evans Blue)

принцип: ін'єкція (в.в.) Evans Blue і екстракція з тканини-мішені (вухо)

Дані для оцінки:

Стандартна крива Evans Blue (ОЩ₆₂₀/нг)

Концентрація Evans Blue в крові (ОЩ₆₂₀/мл або мкг/мл, відповідно)

Вага висушеної тканини вуха (іпсилатерального і протилежного, мг)

Вміст Evans Blue у вухах (іпсилатерального і протилежного, ОЩ₆₂₀/мкг або нг/мг, відповідно)

Протокол в поєднанні з індукованою ДНФБ КГЧ

на 5 день експериментально індукованої КГЧ вводять 100мкл Evans Blue^α [^α 7,5мг/мл Evans Blue (S2129) у фізіологічному NaCl, 100мкл, в.в.] в.в. ретроорбітально за 2 години до контакту миші з ДНФБ

вводять IL-18BP в.о. за 1 годину до контакту

на 6 день (24 години після контакту вуха з ДНФБ) вимірюють набрякання і умертвляють тварин

беруть зразки крові і обробляють таким чином додають 30мкл сироватки до 970мкл формаміду (→1/33 розбавлення)

визначають ОЩ при 620нм (→1 ОЩ₆₂₀ дорівнює 33 ОЩ₆₂₀/мл)

збирають іпсилатеральні і протилежні вуха і обробляють таким чином:

сушать 24 години при 80°C

визначають суху вагу

подрібноють і екстрагують барвник за допомогою 1мл формаміду, обережно струшуючи протягом 24 годин при 55°C

фільтрують для видалення залишків^β [β фільтр для зразка-препарату Whatman 5мкм РТЕЕ міш., №6984.0350

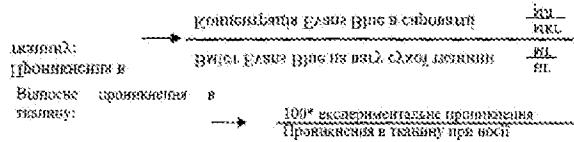
¹ Збалансований сольовий розчин Хенкса без Ca²⁺ і Mg²⁺ (GIBCO №14170.070)

² 2,5% трипсин/ЕДТК (10x) (GIBCO №35400-027)

³ 1% Бичачий сироватковий альбумін у фізіологічному розчині з фосфатним буфером, наповнюють кювети, осаджують при кімнатній температурі протягом декількох годин, щоб дозволити жирам сплисти вгору

визначають ОЩ при 620нм

Значення, що розраховуються



Результати:

В основному в набрякання під час КГЧ залучені два процеси: проникнення рідини з судинної мережі в навколишні тканини, що приводить до набряку, і трансудація запальних клітин з кровоносних судин в місце пошкодження тканини.

Застосування Evans Blue як індикатора показало, що незважаючи на загальне зниження набрякання, лікування IL-18BP не знижує проникності судин (Фіг.4).

Приклад 5: лікування IL-18BP знижує запальну інфільтрацію і утворення $IFN\gamma$ в підданому впливу ДНФБ вусі

КГЧ індукували у мишей C57BL/6 як описано вище. Тварин обробляли IL-18BP або носієм в 4-6 дні. Лікування IL-18BP знижувало набрякання до 58% від контрольної групи на 7 день. Мишей умертвляли на 7 день, піддані впливу вуха збирали, розділяли на групи (n=8) і піддавали ферментативному розщепленню з одержанням суспензії відділених клітин. Клітини характеризували аналізом FACS, що відтинає CD45-позитивні живі клітини. Кількість $\alpha\beta$ -клітин, NK-клітин, нейтрофілів і моноцитів/макрофагів, виявлених в препараті вуха, виражали в процентному відношенні до загальної кількості клітин, що аналізуються. Також розраховували зниження кількості вказаних типів клітин після лікування IL-18BP по відношенню до контролю з носієм.

Для вимірювання продукції $IFN\gamma$, клітини, одержані з підданих впливу ДНФБ вух, повторно стимулювали при 2×10^5 на комірку планшета з пов'язаними на ньому анти-CD3 антитілами. Протягом подальших 24 годин культивування IL-18BP не додавали. Продукцію $IFN\gamma$ вимірювали в трьох повторях за допомогою ELISA.

Препарати клітин з підданих впливу ДНФБ вух стимулювали 50нг/мл PMA* і 500нг/мл лонміцину протягом 4 годин. Секрецію цитокіну блокували додаванням 2мкг/мл брэфелдину А протягом останніх 2 годин інкубування. Потім клітини піддавали багатоклітинному імуофлуоресцентному фарбуванню на предмет внутрішньоклітинного $IFN\gamma$ і поверхневих антигенів. $IFN\gamma$ вироблявся Т-клітинами CD8 і, в меншій мірі, Т-клітинами CD4. У NK-клітинах і $\gamma\delta$ -клітинах $IFN\gamma$ виявлений не був. (н.в., не виявлено; * Форбол 12-Міристант 13-Ацетат).

Одержання суспензії окремих клітин

Ферментативне розщеплення мишачих вух з одержанням суспензії окремих клітин основане на протоколах з [Schulter, G and Steinman, R.M. (1985) і Stingl et al., (1983)].

1. відрізають вуха, розділяють по 5 вух на препарат
2. промивають 70% етанолом
3. розділяють за допомогою пінцета
4. вміщують дермою вниз на 7,5мл ССРХ¹ при температурі 37°C
5. додають 5мл 2,5% трипсину² (10х) з одер-

жанням кінцевої концентрації 1%

6. інкубують протягом 35хв. при температурі 37°C

7. переносять половинки вух дермою вниз на нейлонове сито (сито для клітин), вміщене в 10мл ССРХ/80% FCS на льоду, і обережно перемішують для виймання клітин з позаклітинної матриці

8. видаляють сита з великими залишками

9. двічі промивають холодним ССРХ/10% FCS

10. рахують клітини Аналіз FACS

1. повторно суспендують клітини в забарвлюючому буфері³ для FACS, всі подальші стадії проводять на льоду

2. використовують 10^6 клітин на фарбування

3. додають 1мкг FC-Block, 10хв.

4. додають антитіла CD45 в поєднанні з антитілами, направленими проти цікавлячих маркерів, 1мкг кожного, 30хв.

5. двічі промивають

6. збирають в загальному $0,5 \times 10^6$ випадків за допомогою FACS

7. аналізують специфічні маркери після відсікання живих клітин CD45+. Результати:

Для дослідження запальної інфільтрації в місці контакту одержували суспензії окремих клітин з не підданих і підданих впливу вух і аналізували за допомогою FACS, відтинаючи живі клітини CD45+ (Фіг.5). Як показано, CD45+ клітини, присутні в не підданих впливу вухах, є в основному $\gamma\delta$ -клітинами і дендритними клітинами шкіри. Запальний інфільтрат через 24 години після впливу складався з Т-клітин CD8 і CD4, нейтрофілів, моноцитів і NK-клітин, збільшуючи загальний рівень клітин CD45+ у вусі приблизно в два рази. Відповідно до зниження набрякання, обробка IL-18BP знижувала загальну кількість лейкоцитів, які інфільтрують місце контакту. Це впливало на всі різні типи клітин запального інфільтрату. Зниження складало від 20% до 40% в залежності від типу клітини.

Дослідження подальших характеристик властивостей інфільтрату, одержаного з вух лікованих IL-18BP мишей, показувало погіршену продукцію $IFN\gamma$ при повторній стимуляції анти-CD3 (Фіг.6). Аналіз FACS показував, що $IFN\gamma$ в основному утворюється Т-клітинами CD8 і в меншій мірі Т-клітинами CD4. Цікаво, що $\gamma\delta$ -клітини і NK-клітини не залучені до продукції $IFN\gamma$ (Фіг.7)

Приклад 6: IL-18BP не ослабляє рекрутименту клітин Лангерганса

Метод:

Мишей забарвлювали шляхом нанесення гаптенів FITC (50мкл 4мг/мл розчини) або носія ацетон/дибутилфталат (1:1) на правий і лівий боки, відповідно. Пахові лімфатичні вузли збирали через 24 години після фарбування. Кон'юговані з гаптенем клітини Лангерганса визначаються за допомогою FACS як клітини FITC+, CD11c+ в лімфатичному вузлі, дренаючому забарвленій FITC бік, але не визначаються в лімфатичному вузлі, дренаючому протилежний бік, забарвлений тільки носієм, (n=5 дренаючих лімфатичних вузлів на групу).

Результати:

Міграція клітин Лангерганса (LC), що несуть антиген, в дренаючий лімфатичний вузол залежить від прозапальних цитокінів IL-1 β і TNF α і ре-

гулюється каспазою-1 [Antonopoulos et al., 2001; Kimber et al., 1992]. Отже, IL-18, як вважають, сприяє пересуванню LC [Cumberbatch et al., 2001]. Тому лікування IL-18BP могло б ослабити рекрутний LC і, отже, ослабити імунну відповідь на DNFB під час фази впливу. Для перевірки цієї гіпотези мишей забарвлюють шляхом нанесення гаптени FITC або носія на правий і лівий бік, відповідно. Дренуючи шкіру пахові лімфатичні вузли збирали через 24 години після фарбування, і оцінювали кількість клітин FITC+ на лімфатичний вузол. Лікування тварин IL-18BP за 24 години і 1 годину до фарбування не змінювало кількість (LC), що несуть гаптен LC, присутніх в дренажному лімфатичному вузлі через 24 години після фарбування (Fig.8). Тому в даній моделі немає значного внеску IL-18 в пересуванні LC.

Приклад 7: IL-18BP знижує тривалість гіперчутливості уповільненого типу в іншій мишачій моделі DHT

Методи

Гіперчутливість уповільненого типу

Мишей сенсibiliзували внутрішньовенною ін'єкцією 10^6 BALB/с-спленоцитів і піддавали повторному впливу на 5 день 13×10^6 BALB/с-спленоцитами (50мкл ФРФБ) в праві подушечки лап. У контрольні ліві подушечки лап вводили 50мкл ФСБ. Набрякання правої подушечки лапи розраховують для різних днів віднімання значення перед впливом і значення набрякання, виміряного в лівих подушечках лап, зі значення після впливу.

В експериментах адаптивного перенесення суспензію клітин з лімфатичних вузлів сенсibiliзованих спленоцитів або не оброблених мишей BALB/с піддавали виснаженню відносно клітин B220+ і CD8+ інкубуванням з щурячим антимишачим B220-FITC і CD8-FITC з подальшим розділенням на колонках MACS з парамагнітними анти-FITC мікрошариками [Miltenyi Biotech, Auburn, California, США]. Елюйовані препарати, збагачені Т-клітинами CD4+, вводять в хвостову вену реципієнтної миші (2×10 клітин/миша). Через 16 годин мишам вводять 13×10^6 BALB/с-спленоцитів (без еритроцитів) в праві подушечки лап, і набрякання відстежують всі подальші дні. Результат

Гіперчутливість уповільненого типу (DHT) викликається Т-клітинами CD4+ з очевидним регулюванням у формі зниження Т-клітинами CD8+ [Grabbe et al., 1998]. Поведінка Т-клітин CD4+ від мишей, лікованих IL-18BP, вивчають на моделі DHT. Тваринних C57BL/6 сенсibiliзують внутрішньовенною ін'єкцією 10^6 алогенних BALB/с-спленоцитів. Через 5 днів 13×10^6 BALB/с-спленоцитів вводять в праві подушечки лап, разом з або 10мг/кг рекомбінантного IL-18BP людини в.о., або носієм. Місцеве запалення вимірюють визначенням набрякання подушечки лап через 24 години. References

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

2. Antonopoulos, C, M. Cumberbatch, R.J. Dearman, R.J. Daniel, I. Kimber, and R.W. Groves. 20.01. Functional caspase-1 is required for Langerhans cell migration and optimal contact

sensitization in mice. J Immunol 166:3672-3677.

3. Bour, H., et al. 1995. Major histocompatibility complex class 1-restricted CDS+T cells and class 11-restricted CD4+T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. Eur. J. Immunol. 25:3006-3010.

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

5. Conti, B., J.W. Jahng, C. Tinti, J.H. Son, and T.H. Job. 1997. Induction of interferon-gamma inducing factor in the adrenal cortex. J. Biol. Chem. 272:2035-2037.

6. Cumberbatch, M., R.J. Dearman, C. Antonopoulos, R.W. Groves, and I. Kimber. 2001. Interleukin (IL)-18 induces Langerhans cell migration by a tumour necrosis factor-alpha- and IL-1 beta-dependent mechanism. Immunology 102:323-330.

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

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

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

10. Engelmann, H., D. Novick, and D. Wallach. 1990. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. J. Biol. Chem. 265:1531-1536.

11. Garrigue J. L., Nicolas J. F., Fragnals R., Benezra C, Bour H., Schmitt D. Contact Dermatitis 1994 Apr.; 30(4):231-7

12. Grabbe, S., and Schwarz, T. 1998. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. Immunol. Today. 19:37-44

13. Habu et al., J. Immunol. 2001,166: 5439-5347.

14. Hanifm et al. (1993). J. Am. Acad. Dermatol. 28:189.

15. Kirn S. H., Eisenstein M., Reznikov L., Fantuzzi G., Novick D., Rubinstein M., Dinarello C. A. Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. Proc. Natl Acad. Sci USA 2000;97:1190-1195.

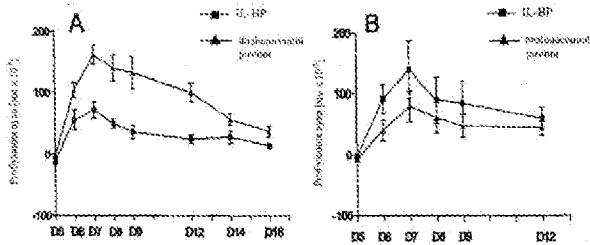
16. Kimber, I. and M. Cumberbatch. 1992. Stimulation of Langerhans cell migration by tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha). J. Invest. Dermatol. 99:488-508.

17. Maliszewski, C.R., T.A. Sato. T. Vanden Bos, S. Waugh, S.K. Dower, J. Slack, M.P. Beckmann, and K.H. Grabstein. 1990. Cytokine receptors and B cell functions. I. Recombinant soluble receptors specifically inhibit IL-1- and IL-4-induced B cell activities in vitro. J. Immunol. 144:3028-3033.

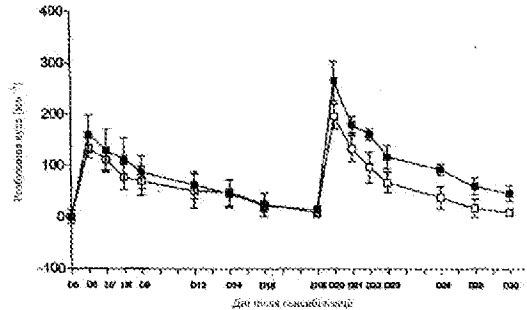
18. Micallef, M.J., T. Ohtsuki, K. Kohno, F. Tanabe, S. Ushio, M. Namba, T. Tanimoto, K. Torigoe, M. Fujii, M. Ikeda, S. Fukuda, and M. Kurimoto. 1996. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. Eur-J-Immunol 26:1647-51 issn: 0014-2980.

19. Nakamura K., Okamura H., Wada M., Nagata K., Tamura T. Infect. Immun. 1989Feb.;57(2):590-5
 20. Novick, D.Kim, S-H, Fantuzzi, G., Reznikov, L., Dinarello, C, and Rubinstein, M. (1999). Immunity 10,127-136.
 21. Okamura H., Nagata K., Komatsu T., Tanimoto T., Nukata Y., Tanabe F., Akita K., Torigoe K., Okura T., Fukuda S., et al. Infect. Immun. 1995 Oct.;63(10):3966-72
 22. Pamet, P, Garka, K. E., Bonnert, T. P., Dower, S.K, and Sims, J. E. (1996), J. BiolChem. 271, 3967-3970.
 23. Reinhold et al. (1990). Lancet 335:1282.
 24. Rothe H., Jenkins N.A., Copeland N.G., Kolb H.J. Clin. Invest. 1997 Feb. 1;99(3):469-74
 25. Schuler.G. and Steinman, Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. J. Exp. Med. 161, 526-546.

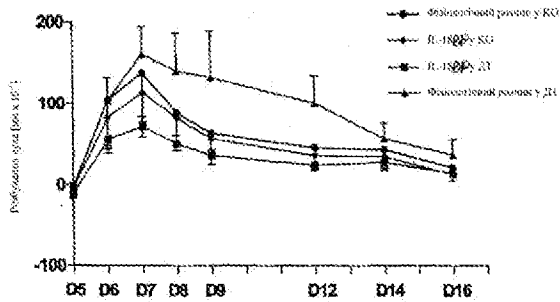
26. Stingl, L.A., Sander, D.N., Lijima, M, Wolff, K., Pehamberger, H., and Stingl.G. (1983). Mechanism of UV-B-induced impairment of the antigen-presenting capacity of marine epidermal cells. J. Immunol. 130,1586-1591.
 27. Tucci, A., James, H., Chicheportiche, R., Bonnefoy, J.Y., Dayer, J.M., and Zubler, R.H., 1992, J.Immunol. 148, 2778-2784.
 28. Ushio S., Namba M., Okura T., Hattori K., Nukada Y., Akita K., Tanabe F., Konishi K., Micallef M, Fujii M., Torigoe K., Tanimoto T., Fukuda S., Ikeda M., Okamura H., Kurimoto M. J. Immunol. 1996 Jun.1;156(11):4274-9
 29. Yoshimoto T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K., Kashiwamura, S., Okamura, H., Akira, S. and Nakanishi, K, (1998), J. Immunol. 161, 3400-3407.
 30. Xu et al. (1998). J. of Interferon and Cytokine Research 18:653-659.



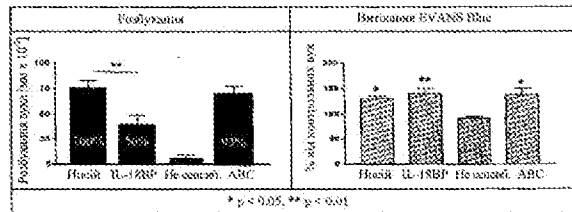
Фиг. 1



Фиг. 2



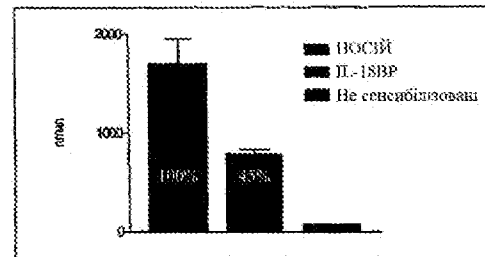
Фиг. 3



Фиг. 4

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАРКЕР	ИФА ИЛИ ИЛ-18BP	ИЛ-18BP	ИЛ-18BP	
Генетический	CD45	4.47 100%	3.86 88.9%	2.73 61.3%
CD4	0.07 100%	0.03 71.4%	0.02 28.6%	
CD8	0.24 100%	0.17 70.8%	0.02 8.3%	
NK1.1	0.11 100%	0.07 59.4%	0 0%	
CD4	0.34 100%	0.26 68.7%	0.02 3.7%	
CD11b	0.33 100%	0.42 79.2%	0.09 3.7%	

Фиг. 5

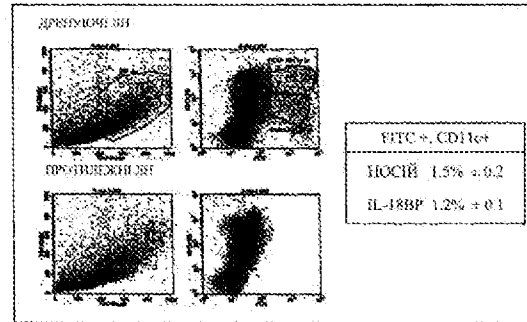


Фиг. 6

IFN γ +	НОСН	IL-18BP	Не селекціоновані	
всє	100%	77.8%	-	ВІДНОСНО
CD4	0.18	0.14	Н.О	% ВІД ЗАГАЛЬНОГО
CD8	0.05	0.03	Н.О	
NK	Н.О	Н.О	Н.О	
$\gamma\delta$ T	Н.О	Н.О	Н.О	

Стимулювання ГМА/лімфоцитів протягом 4 годин

Фіг. 7



Фіг. 8