



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 600**

51 Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01911662 .3**

96 Fecha de presentación : **20.02.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1257292**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.11.2002**

54 Título: **Uso de inhibidores de IL-18.**

30 Prioridad: **21.02.2000 EP 00103590**
21.02.2000 EP 00103597
04.10.2000 EP 00121651
23.11.2000 EP 00125633

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.10.2011

73 Titular/es: **MERCK SERONO SA**
Centre Industriel
1267 Coinsins, Vaduz, CH
YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT Co., Ltd.

72 Inventor/es: **Chvatchko, Yolande;**
Dinarello, Charles;
Plater-Zyberk, Christine;
Van Deventer, Santer;
Rubinstein, Menachem;
Novick, Daniela y
Kim, Soo-Hyun

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 365 600 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de inhibidores de IL-18

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere al uso terapéutico de inhibidores de IL-18 en el tratamiento y/o prevención de la hepatitis alcohólica.

Antecedentes de la invención

10 En 1989, se describió una actividad de suero inducida por endotoxina que inducía interferón- γ (IFN- γ) obtenido a partir de células de bazo de ratón (Micallef et al., 1996). Esta actividad de suero no funcionó como un inductor directo de IFN- γ , sino como un co-estimulante conjuntamente con IL-2 o mitógenos. Un intento de purificar la actividad a partir de suero de ratón post-endotoxina puso de manifiesto una proteína de 50-55 kDa aparentemente homogénea. Como otras citoquinas pueden actuar como co-estimulantes para la producción de IFN- γ , el fallo para neutralizar anticuerpos para IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 o TNF para neutralizar la actividad de suero sugirió que era un factor distinto. En 1995, los mismos científicos demostraron que el co-estimulante inducido por endotoxina para producción de IFN- γ estaba presente en extractos de hígados de ratones previamente acondicionados con *P. acnes* (Novick et al., 1992). En este modelo, la población de macrófagos hepáticos, (células de Kupffer) se expandía y en estos ratones, una dosis baja de lipopolisacárido bacteriano (LPS), que en ratones no preacondicionados no es mortal, se convierte en mortal. El factor, denominado factor inductor de IFN- γ (IGIF) y posteriormente denominado interleucina-18 (IL-18), fue purificado hasta una homogeneidad de 1200 gramos de hígados de ratón tratados con *P. acnés*. Los oligonucleótidos degenerados derivados de secuencias de aminoácidos de IL-18 purificada fueron usados para clonar un cDNA de IL-18 de múridos (Novick et al., 1992). La IL-18 es una proteína de 18-19 kDa de 157 aminoácidos, que no tenía analogías obvias con ningún péptido en las bases de datos. Los RNA mensajeros para IL-18 e interleucina-12 (IL-12) son fácilmente detectados en células de Kupffer y macrófagos activados. La IL-18 recombinante induce IFN-gamma de forma más potente que la IL-12, aparentemente a través de una trayectoria separada (Novick et al., 1992). De forma similar a la actividad de suero inducida por endotoxina, la IL-18 no induce IFN- γ por sí misma, sino que funciona principalmente como un co-estimulante con mitógenos o IL-2. La IL-18 aumenta la proliferación de células T, aparentemente a través de una trayectoria dependiente de IL-2 y aumenta la producción de citoquinas Th1 *in vitro* y exhibe un sinergismo cuando se combina con IL-12 en términos de producción mejorada de IFN- γ (Maliszewski et al., 1990).

30 La neutralización de anticuerpos para IL-18 de ratón se mostró que evitaba la mortalidad de LPS de dosis baja en ratones pre-acondicionados con *P. acnés*. Otros han descrito la importancia de IFN- γ como un mediador de la mortalidad de LPS en ratones pre-acondicionados. Por ejemplo, la neutralización de ratones protegidos con anticuerpos anti- IFN- γ contra un choque de tipo Shwartzman (Fantuzzi et al., 1998), y ratones tratados con galactosamina deficientes en el receptor de IFN- γ eran resistentes a la muerte inducida por LPS (Bym, 1990). Por tanto, no era de esperar que los anticuerpos neutralizantes para IL-18 de múridos protegieran ratones pre-acondicionados con *P. acnes* contra LPS mortal (Novick et al., 1992). El tratamiento de IL-18 anti-múridos protegía también los ratones supervivientes contra una citotoxicidad hepática grave.

40 Después de que la forma de múrido fue clonada, se describió la secuencia de cDNA humano para IL-18 en 1996 (Okamura et al., 1995). La IL-18 humana recombinante exhibe actividad de IL-18 natural (Okamura et al., 1995). La IL-18 recombinante humana está sin actividad inductora de IFN- γ directa sobre células T humanas, pero actúa como una co-estimulante para la producción de IFN- γ y otras citoquinas de células-1 helper T (Th 1) (Okamura et al., 1995). Hasta la fecha, la IL-18 se creía que era principalmente un co-estimulante para la producción de citoquinas de th1 (IFN- γ , IL-2 y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos) (Izaki, 1978) y también como un co-estimulante para la citotoxicidad mediada por ligandos FAS de clones de células asesinas naturales de múridos (Novick et al., 1989).

45 Clonando IL-18 a partir de tejidos afectados y estudiando la expresión de genes de IL-18, se encontró una asociación estrecha de esta citoquina con una enfermedad autoinmune. El ratón diabético no obeso (NOD) desarrolla espontáneamente insulinitis autoinmune y diabetes, que pueden ser aceleradas y sincronizadas mediante una inyección única de ciclofosfamida. El mRNA de IL-18 aumentó rápidamente después del tratamiento con ciclofosfamida y precedió una elevación en mRNA de IFN- γ y posteriormente diabetes. De forma interesante, estas cinéticas emulan la de mRNA de IL-12-p40, dando lugar a una estrecha correlación de los niveles individuales de mRNA. La clonación del cDNA de IL-18 de RNA de páncreas seguida de secuenciado puso de manifiesto una identidad con la secuencia de IL-18 clonada a partir de células de Kupffer y macrófagos pre-activados *in vivo*. También, los macrófagos de ratón NOD respondieron a la ciclofosfamida con una expresión génica de IL-18, mientras que los macrófagos de ratones Balb-c tratados en paralelo no lo hicieron. Por lo tanto, la expresión de IL-18 está anormalmente regulada en ratones NOD autoinmunes y estrechamente asociada con el desarrollo de diabetes (Novick et al., 1992).

La IL-18 desempeña una función potencial en la inmuno-regulación o en la inflamación aumentando la actividad funcional de ligando Fas en células Th1 (Conti et al., 1997). La IL-18 es expresada también en la corteza adrenal y, por lo tanto, puede ser un neuro-inmunomodulador secretado, desempeñando una función importante en la coordinación del sistema inmune a continuación de una experiencia estresante (Chater, 1986).

- 5 *In vivo*, la IL-18 se forma mediante escisión de pro-IL-18 y su actividad endógena parece que toma parte en la producción de IFN- γ en la mortalidad mediada por P. acnés y LPS. La IL-18 madura es producida a partir de su precursor mediante la enzima conversora de IL-10 (enzima beta-conversora de IL-1 de IL-1 ICE, caspasa-1).

10 El receptor de IL-18 consiste en la menos dos componentes que cooperan en la unión a ligandos. Se encontraron sitios de unión de afinidad elevada y baja para IL-18 en células T estimuladas por IL-12 de múridos (Yoshimoto et al., 1998), sugiriendo un complejo receptor de cadena múltiple. Han sido identificadas hasta ahora dos subunidades receptoras, pertenecientes ambas a la familia de receptores de IL-1 (Pamet et al., 1996). La transducción de señales de IL-18 incluye la activación de NF- κ B) (DiDonato et al., 1997).

15 Varias proteínas de unión de citoquinas conocidas son receptores de citoquinas solubles y corresponden a los dominios de unión de ligandos extracelulares de sus receptivos receptores de citoquinas de superficies celulares. Son derivadas mediante escisión alternativa de pre-mRNA, común al receptor de superficie celular, o mediante escisión proteolítica del receptor de superficie celular. Estos receptores solubles han sido descritos en el pasado, e incluyen entre otros, los receptores solubles de IL-6 y de IFN- γ (Nakamura et al., 1989), TNF (Dao et al., 1996; Engelmann et al., 1989), IL-1 e IL-4 (John, 1986), IFN- α/β (Mizushima y Nagata, 1990) y otros. Una proteína de unión a citoquinas, denominada osteoprotegerina (OPG, también conocida como factor inhibidor de osteoclastos, OCIF) y un miembro de la familia TNFR/Fas parece que es el primer ejemplo de un receptor soluble que existe solamente solo como una proteína secretada (Anderson, 1997; Bollon, 1980).

Recientemente, ha sido aislada una proteína soluble que tiene una afinidad elevada por IL-18 a partir de orina humana y se describieron cDNAs humano y de ratón (Novick et al., 1999; documento WO 99/09063). La proteína ha sido denominada proteína de unión a IL-18 (IL-18BP).

- 25 La IL-18BP no es el dominio extracelular de uno de los receptores de IL-18 conocidos, sino una proteína secretada que circula de forma natural. Pertenece a una nueva familia de proteínas secretadas. La familia incluye adicionalmente diversas proteínas codificadas por virus TOX que tienen una elevada homología a IL-18BP (Novick et al., 1999). La IL-18BP es constitutivamente expresada en el bazo, pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y tiene una homología limitada al receptor de tipo II de IL-1. Su gen fue localizado en el cromosoma humano 11q13 y no se encontró ningún exón que codifique un dominio de transmembrana en una secuencia genómica de 8,3 kb (Novick et al., 1999).

35 Cuatro isoformas humanas y dos de ratón de IL-18BP, resultantes de la escisión de mRNA y que se encontraban en diversas bibliotecas de cDNA han sido expresadas, purificadas y valoradas en cuanto a la unión y neutralización de actividades biológicas de IL-18 (Kim et al., 2000). La isoforma humana de IL-18BP (IL-18BP_a) exhibía la mayor afinidad por IL-18 con una elevada velocidad de activación, una baja velocidad de desactivación y una constante de disociación (K(d)) de 399 pM. La IL-18BP_c comparte el dominio de Ig de IL-18BP_a excepto para los aminoácidos 29C-terminales; la K(d) de IL-18BP_c es 18 veces menor (2,94 nM). No obstante la IL-28BP_a y la IL-28BP_c neutralizan IL-18 >95% a un exceso en moles de dos. Las isoformas de IL-18BP_b y de IL-18BP_d carecen de un dominio de Ig completo carecen de la capacidad de unirse o neutralizar IL-18. Las isoformas de múridos IL-18BP_c e IL-18BP_d, que poseen el dominio de Ig idéntico, neutralizan también >95% IL-18 de múridos a un exceso en moles de dos. Sin embargo, la IL-18BP_d de múridos, que comparte un resto C terminal común con IL-18BP_a humana, neutraliza también la IL-18 humana. Una modelación molecular identificó un sitio de unión electrostático e hidrófobo mixtos grande en el dominio de Ig de IL-18BP, que podría colaborar en su elevada unión de afinidad al ligando (Kim et al., 2000).

- 45 Recientemente, se ha sugerido que la interleucina IL-18 está involucrada en el progreso de la patogenicidad en enfermedades inflamatorias crónicas que incluyen choque de endotoxinas, hepatitis y diabetes autoinmune (Kahiwamura and Okamura, 1998). Una indicación adicional de una posible función de la IL-18 en el desarrollo de una lesión de hígado resultó de los experimentos publicados por Tsuij et al. (Tsuij et al., 1999), que mostraron un nivel elevado de IL-18 en una lesión de hígado aguda inducida por lipopolisacáridos en un modelo de ratón. Sin embargo, el mecanismo del factor multi-funcional IL-18 en el desarrollo de la lesión de hígado no ha sido dilucidado hasta ahora.

El deterioro o lesión del hígado puede tener diversas causas. Puede ser debido a infecciones virales o bacterianas, abuso del alcohol, trastornos inmunológicos o cáncer, por ejemplo.

- 55 La hepatitis viral, debida al virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis C, por ejemplo, son enfermedades escasamente elaboradas que afectan a un gran número de personas en todo el mundo. El número de virus

conocidos de hepatitis crece de forma constante. Aparte del virus de la hepatitis B y C, han sido descubiertos hasta ahora al menos otros cuatro virus que provocan hepatitis asociada a virus denominados virus de la hepatitis A, D, E y G.

5 La enfermedad hepática alcohólica es otra enfermedad ampliamente extendida asociada con el consumo crónico de alcohol. La hepatitis inmune es una enfermedad autoinmune rara que es escasamente tratada. La lesión del hígado incluye también deterioros de los conductos biliares. La cirrosis biliar primaria (PBC) es una enfermedad autoinmune del hígado caracterizada por la destrucción de los conductos biliares intrahepáticos.

10 Diversos estudios han demostrado que el deterioro del hígado en enfermedades como la hepatitis alcohólica, cirrosis hepática, hepatitis viral y cirrosis biliar primaria está asociado con las respuestas de células-1 P-helper T(Th1). En un estudio, se estableció un nuevo modelo de lesión hepática en ratones dirigiendo a diana liposomas que contenían ovalbúmina en el hígado, seguido de una transferencia adoptiva de células Th1 específicas de ovalbúmina. El tratamiento combinado de ratones con liposomas que contenían ovalbúmina y transferencia de células Th1, provocó un aumento de la actividad de transaminasas en suero que era paralelo a una elevación de los niveles de IFN- γ en suero. En un contraste marcado, la transferencia de células Th2 específicas de ovalbúmina dio lugar a un aumento de los niveles en suero de IL-4, pero no indujo lesión hepática. La lesión hepática fue bloqueada por anticuerpos anti-IFN- γ y anticuerpos del factor de necrosis anti-tumoral (TNF)- α . Estos descubrimientos indican que las células Th1 son las células efectoras principales en la lesión hepática aguda (Nishimura and Ohta, 1999). En otro conjunto de estudios, se mostró que los ratones se sobreexpresan IFN- γ exhiben hepatitis espontánea sin ningún otro estimulante o agente patógeno (Okamoto et al., 1998).

20 Otro estudio implicó las respuestas de Th1 en la cirrosis biliar primaria (PBC). La PBC es una enfermedad hepática autoinmune caracterizada por la destrucción de los conductos biliares intrahepáticos. Generalmente se cree que los mecanismos inmunes celulares, particularmente los que incluyen células T dan lugar a este deterioro de los conductos biliares. La resistencia relativa de las respuestas de Th1 y Th2 se ha propuesto recientemente que son un factor importante en la patofisiología de diversas enfermedades autoinmunes. En este estudio, se evaluó el equilibrio de subconjuntos en PBC mediante la detección de citoquinas específicas para los dos subconjuntos de células T, IFN- γ para células Th1 e IL-4 para células Th2. El IFN- γ y las células positivas de RNA mensajero (mRNA) de IL-4 fueron contadas en secciones de hígado de 18 pacientes con PBC y 35 testigos de enfermedades que incluían hepatitis C activa crónica, obstrucción biliar extrahepática y hígado normal, usando hibridación *in situ* no isotópica e inmunoistoquímica. Las células mononucleares que expresan IFN- γ y mRNA de IL-4 fueron agregadas en tractos de portales inflamados en hígados de PBC, pero raramente estaban presentes en la obstrucción biliar extrahepática, fibrosis alcohólica o secciones de hígado normal. El IFN- γ y las células positivas de mRNA de IL-4 en hígados de PBC fueron detectadas en números significativamente superiores que en los hígados testigos ($p < 0,01$). Además de ello, la expresión de mRNA de IFN- γ fue más comúnmente detectada que la expresión de IL-4 en hígados de PBC y los niveles de expresión de mRNA de IFN- γ estuvieron ligeramente correlacionados con el grado de actividad inflamatoria del portal. Las células positivas a mRNA de IFN- γ fueron detectadas principalmente alrededor de los conductos biliares que estaban rodeados por agregados linfoides. Los datos indican que las células The1 son el subconjunto de células T más prominente en los infiltrados linfoides en PBC ((Harada et al., 1997).

40 El modelo de citoquinas en reconocimientos de antígenos virales se cree que ejerce una profunda influencia sobre la resolución de infecciones virales y desaparición viral. Un estudio investigó si un desequilibrio de citoquinas orientado hacia la respuesta de tipo Th2 desempeña una función en la hepatitis B crónica. Los perfiles de citoquinas de células mononucleares de sangre periférica asociadas con la hepatitis B crónica fueron analizados mediante RT-PCR. Tras una estimulación con antígenos superficiales de hepatitis B (HbsAg), la expresión de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 fue detectada en un 41%, 8%, 41% y 50% de los pacientes, respectivamente. Entre estas citoquinas, la expresión de IFN- γ de citoquinas de Th1 asociada fue asociada con niveles elevados de AST/ALT (aspartato aminotransferasa/alanina aminotransferasa) en suero, que representan marcadores típicos del deterioro hepático. Las citoquinas de tipo Th2 no se mostró que ejercieran un efecto protector sobre los hepatocitos. En conclusión, la producción de una citoquina Th1, IFN- γ mediante células reactivas por HBSAg se asoció con el deterioro de hepatocitos en la hepatitis B crónica (Lee et al., 1999). Los niveles elevados del ligando Fas y su receptor (CD95) fueron descritos en el hígado de pacientes de hepatitis B (Luo et al., 1997). El ligando FAS se considera que es uno de los agentes citotóxicos principales que conducen a la apoptosis de hepatocitos.

55 Otro estudio identificó factores asociados con el progreso de la lesión hepática en 30 pacientes no tratados positivos al virus de la hepatitis C/RNA (HCV/RNA) con hepatitis crónica. El deterioro necroinflamatorio y estructural fue evaluado usando una puntuación de Ishak. Las células suturales hepáticas activadas (CSC) fueron visualizadas mediante inmunohistoquímica en cuanto a α -actina de músculos lisos (α SMA) y cuantificadas mediante morfometría. El HCV/RNA en plasma fue evaluado usando un método competitivo de RT-PCR. Para estudiar el tipo de respuesta inmune involucrada en el progreso de la lesión hepática, fueron evaluadas células positivas a IFN- γ (como expresión de respuesta de tipo Th1) mediante inmunohistoquímica y fueron cuantificadas mediante morfometría. Se encontró que las HSC eran detectadas mayoritariamente en zonas próximas a la necroinflamación lobular o tabiques fibróticos de recubrimiento. La parénquima positiva a α SMA y rojo Sirius se correlacionó significativamente con las

puntuaciones necroinflamatorias y estructurales. Las células positivas a IFN- γ fueron detectadas en zonas periportales asociadas con infiltrados inflamatorios y se correlacionaron significativamente con el deterioro estructural. Por lo tanto, se pudo concluir que la activación y progreso de GSC de lesión hepática están asociados con una respuesta de tipo Th1 (Baroni et al, 1999). Análogamente al caso de la hepatitis B, el ligando de FAS y su receptor se encontraron en el hígado y sueros de pacientes de hepatitis C (Hiramatsu et al, 1994; Okazaki et al, 1996; Lio et al., 1998).

Las citoquinas Th1 y otros marcadores Th1 se encontró que estaban asociados con la hepatitis alcohólica y la cirrosis hepática. Los estímulos inflamatorios y la peroxidación de lípidos activan el factor nuclear κ B (NF- κ B) y sobrerregulan las citoquinas y quimioquinas proinflamatorias. En un estudio, se evaluó la relación entre lesión hepática patológica, endotoxemia, peroxidación de lípidos y activación de NF- κ B y el desequilibrio entre citoquinas pro- y anti-inflamatorias. Fueron alimentadas ratas (5 por grupos) con etanol y una dieta que contenía grasa saturada, aceite de palma, aceite de maíz, aceite de pescado mediante infusión intragástrica. Se substituyó el etanol con dextrosa isocalórica en ratas testigos. Se realizaron análisis patológicos y se tomaron mediciones de niveles de endotoxina, peroxidación de lípidos, NF- κ B y RNA mensajero (mRNA) de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β , IFN- γ e IL-12), quimioquinas C-C (activación regulada, células T normales expresadas y secretadas [RANTES], proteína quimiotáctica de monocitos [MCP]-1, proteína inflamatoria de macrófagos [MIP]-1- α), quimioquinas C-X-C (quimioattractor de neutrófilos inducido por citoquinas [CINC], MIP-2, IP-10 y proteína activadora de neutrófilos epiteliales [ENA]-78) y otras citoquinas anti-inflamatorias (IL-10, IL-4 e IL-13). La activación de NF- κ B y la expresión aumentada de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas C-C y C-X-C fue observada en las ratas que exhibían una lesión necroinflamatoria (aceite de pescado-etanol y aceite de maíz-etanol). Estos grupos tenían también los niveles más elevados de endotoxina y peroxidación de lípidos. Los niveles de mRNA de IL-10 y de IL-4 fueron inferiores en el grupo que exhibía lesión hepática inflamatoria. Por tanto, la activación de NF- κ B se produce en presencia de estímulos proinflamatorios y da lugar a una expresión aumentada de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias Th1 (Naji et al., 1999). El ligando FAS y su receptor eran también elevados en enfermedades hepáticas alcohólicas sugiriendo nuevamente que las citoquinas Th1 están involucradas en los procedimientos autoinmunes inducidos en hepatitis alcohólica (Galle et al., 1995; Taieb et al, 1998; Fiore et al., 1999).

El TNF- α surgió también como una trayectoria común en la patogénesis de la necro-inflamación hepática relacionada con el alcohol. Han sido documentados niveles aumentados de TNF hepático y en suero en modelos de animales de enfermedad hepática alcohólica y en enfermedad hepática alcohólica humana. Este metabolismo desregulado de TNF se ha propuesto que desempeña una función en muchas complicaciones metabólicas y la lesión hepática de la enfermedad hepática alcohólica (Grove et al., 1997; McClain and Cohen, 1989). Por ejemplo, se encontró en un estudio que los pacientes con hepatitis alcohólica tenían niveles superiores de TNF- α media, (26,3 mg/l; 95% CI, 21,7 a 30,9) que en sujetos normales (6,4 ng/l; CI, 5,4 a 7,4). Los pacientes que murieron posteriormente tenían un nivel superior de TNF- α (34,7 ng/l; CI, 27,8 a 41,6) que los supervivientes (16,6 ng/l; CI, 14,0 a 19,2). En pacientes con hepatitis alcohólica, los niveles de TNF- α se correlacionaron positivamente con la bilirrubina en suero ($r=0,74$; $P=0,0009$) y creatinina en suero ($r=0,81$; $P=0,0003$). Los pacientes con hepatitis alcohólica tenían niveles superiores de TNF- α que los pacientes con cirrosis alcohólica inactiva (11,1 ng/l; CI 8,9 a 13,3) y personas gravemente alcohólicas sin enfermedad hepática (6,4 ng/l; CI, 5,0 a 7,8). Los pacientes con una función renal anormal tenían niveles inferiores de TNF- α (14,4 ng/l; CI, 5,4 a 22,8), que los pacientes con hepatitis alcohólica. Por lo tanto se llegó a la conclusión de que las elevaciones de TNF- α en hepatitis alcohólica son más pronunciadas en los casos graves, sugiriendo que el TNF- α desempeña una función en la patogénesis (Bird et al., 1990).

El TNF media en muchas de las acciones biológicas de la endotoxina. Unos estudios recientes han mostrado que la administración de TNF puede provocar una lesión hepática y que el TNF puede mediar en la mortalidad de la hepatotoxina galactosamina. Uno de los inductores de TNF más potentes es la endotoxina. Como los pacientes con enfermedad hepática alcohólica frecuentemente tienen endotoxemia y como muchas de las manifestaciones clínicas de la hepatitis alcohólica son acciones biológicas conocidas del TNF, su actividad fue evaluada en pacientes con hepatitis alcohólica. La liberación de TNF basal y estimulada por lipopolisacáridos de monocitos de sangre periférica, una fuente principal de producción de TNF, fue determinada en 16 pacientes con hepatitis alcohólica y 16 voluntarios sanos. Ochos de los diez y seis pacientes con hepatitis alcohólica y solamente dos de los diez y seis voluntarios sanos tenían actividad de TNF espontánea detectable (p menor que 0,05). Después de una estimulación con lipopolisacáridos, la liberación media de TNF de monocitos a partir de pacientes con hepatitis alcohólica fue significativamente aumentada hasta más del doble que los testigos sanos (25,3 \pm 3,7 frente a 10,9 \pm 2,4 unidades por ml, p menor que 0,005). Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que los monocitos de pacientes con hepatitis alcohólica y tenían una liberación de TNF espontánea y estimulada por lipopolisacáridos significativamente aumentada en comparación con los monocitos de voluntarios sanos (McClain y Cohen, 1989).

La proteína de unión (LBP) a lipopolisacáridos (LPS) y la CD14 desempeñan funciones intermedias claves en la activación de células por endotoxina. El LPS derivado del intestino se ha propuesto que participa en favorecer la lesión patológica en la enfermedad hepática alcohólica. Se demostró que ratas alimentadas por vía intragástrica con etanol en aceite durante 4 semanas tenían niveles elevados de CD14 y LBP en sus células Kupffer y hepatocitos respectivamente. La expresión de mRNA de CD14 era también elevada en células no mieloides. La expresión

aumentada de LBP y CD14 aumenta rápidamente la expresión inducida por LPS de diversas citoquinas pro-inflamatorias y se correlaciona con la presencia de la lesión hepática patológica en lesión hepática alcohólica (Su et al., 1998; Lukkari et al., 1999).

Sumario de la invención

- 5 La presente descripción está basada en el descubrimiento de que los inhibidores de IL-18 son eficaces para el tratamiento y/o la prevención de la hepatitis alcohólica.

Por lo tanto, la descripción se refiere al uso de un inhibidor de IL-18 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de la hepatitis alcohólica.

- 10 El uso de combinaciones de un inhibidor de IL-18 es también considerado según la descripción. Con el fin de aplicar aproximaciones terapéuticas génicas para suministrar el inhibidor de IL-18 a tejidos o células enfermas, otros aspectos de la descripción se refieren al uso de vectores de expresión que comprenden la secuencia codificadora de un inhibidor de IL-18 para el tratamiento y/o la prevención de estados de enfermedad. La descripción se refiere adicionalmente al uso de la activación génica endógena de inhibidores de IL-18 y al uso de células tratadas por ingeniería genética para expresar inhibidores de IL-18 para la prevención y/o el tratamiento de la hepatitis alcohólica.

15 Breve descripción de los dibujos

La Fig. muestra un histograma que expone los niveles en suero de IFN- γ (pg/ml) después de la inyección de diversas cantidades de IL-18BP recombinante (0; 0,04; 0,4; 4 mg/kg) en ratones 1 h antes de la inyección de LPS. Las muestras de sangre fueron tomadas 5 h después de la inyección de LPS y fueron analizadas mediante ELISA en cuanto al IFN- γ en circulación.

- 20 La Fig. 2 muestra un histograma que expone los niveles en suero de alanina aminotransferasa (ALT). Los ratones fueron inyectados con dosis crecientes de IL18BP humana recombinante (0; 0,04; 0,4; 4 mg/kg) antes de la inyección de LPS en ratones sensibilizados con *P. acnes*. Las muestras de sangre fueron tomadas 5 h después de la inyección de LPS y se midieron los niveles en suero de ALT. SF = Sigma-Frankel: 1 unidad SF de AST/ALT formará $4,82 \times 10^{-4}$ μ mol de glutamato/minuto a pH 7,5 y a 25°C.

- 25 La Fig. 3 muestra el tiempo de supervivencia de los ratones después de la inyección de LPS. Los ratones fueron inyectados con dosis diferentes de IL18BP humana recombinante (0; 0,04; 0,004; 4 mg/kg) 20 minutos antes de la inyección de LPS en ratones sensibilizados con *P. acnes*. Triángulos: 4 mg/kg; rombo pequeño: 0,4; rombo grande: 0,04; círculos: ausencia de IL18BP (solamente LPS).

- 30 La Fig. 4 muestra un histograma que expone los niveles en suero de IFN- γ medidos 5 h después de una inyección de cantidades diferentes de IL18BP (0; 0,4; 4 mg/kg) que fueron administradas 20 minutos antes de la inyección de LPS en ratones sensibilizados con *P. acnes*.

- 35 La Fig. 5 muestra la supervivencia de ratones inyectados con antisuero de IL-18 policlonal o suero de conejo normal (NDS = testigo) 30 minutos antes de una inyección con 40 mg/ml (dosis mortal) de LPS derivado de *E. coli* (Fig. 5 A) o *S. thymimurium* (Fig. 5 B). Triángulos: los ratones fueron inyectados con antisuero de IL-18; círculos: los ratones fueron inyectados con NDS. En el eje x, se exponen los días después de la estimulación con LPS. * $p < 0,05$.

- 40 La Fig. 6 muestra un histograma que muestra la media + SEM de cinco ratones por grupo tratados de la siguiente forma. Los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal (i.p.) con antisuero anti-IL-18, receptores de TNF- α solubles (TNFsRp55) o vehículo (solución salina), seguida inmediatamente de la administración intravenosa (i.v.) de Concanavalina A (Con A; Fig. 6 A) o PEA (*Pseudomonas aeruginosa*, Fig. 6 B). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ frente a Con A o PEA solamente; # $p < 0,01$ frente a TNFsRp55 o ANOVA factorial anti-IL-18.

- 45 La Fig. 7 muestra el efecto de IL-18BP sobre puntuaciones clínicas en un modelo en muridos de artritis. La Fig. 7 A muestra un diagrama que expone las puntuaciones clínicas medidas después de una administración diaria de diferentes cantidades de IL-18BP o IFN- β o vehículo (NaCl) i.p. (vía intraperitoneal) a ratones. Símbolos: triángulos negros: 10.000 IU de IFN- β ; triángulos blancos: 10 mg/kg de IL-18BP, triángulos invertidos: 3 mg/kg de IL-18BP, rombos: 1 mg/kg de IL-18BP; círculos: 0,5 mg/kg de IL-18BP; cuadrados blancos: 0,25 mg/kg de IL-18BP y cuadrados negros: NaCl. Los días de tratamiento se exponen en el eje x, las puntuaciones clínicas (valores medios) se exponen en el eje y. Las estadísticas se calcularon mediante el ensayo de Mann Whitney. La Fig. 7 B muestra un histograma que expone la AUC (área bajo la curva) derivada del gráfico de la Fig. 7 A. n = número de animales.

- 50 La Fig. 8 muestra el efecto de IL-18BP sobre el hinchamiento de las patas. La Fig. 8 A muestra un diagrama que expone los resultados obtenidos midiendo el grosor de las patas (hinchamiento) de las patas traseras enfermas de animales individuales tratados con diferentes cantidades de IL-18BP. El eje y muestra el cambio de grosor de las

patas en milímetros desde el comienzo del tratamiento. Los símbolos son como la Fig. 7. La Fig. 8 muestra un histograma que expone la AUC derivada de la Fig. 8 A. n = número de animales.

La Fig. 9 muestra el análisis del número de patas traseras enfermas en el momento de artritis aguda, es decir, la extensión de la enfermedad a articulaciones adicionales. Símbolos: cuadrados negros: NaCl (testigo), triángulos: 10 mg/kg de IL-18BP, triángulos invertidos: 3 mg/kg de IL-18BP, rombos: 1 mg/kg de IL-18BP, círculos: 0,5 mg/kg de IL-18BP y cuadrados blancos: 0,25 mg/kg de IL-18BP.

La Fig. 10 muestra un histograma que expone las puntuaciones de erosión del cartilago de articulaciones enfermas.

La Fig. 11 muestra la histopatología de articulaciones de ratones. Al final de experimento, la pata que desarrolló artritis en primer lugar fue diseccionada, fijada y tratada como se describe en el ejemplo 10 posterior. Fig. 11 A: articulación de ratón normal; Fig. 11 B: articulación de un ratón artrítico; Fig. 11 C: articulación de un ratón tratado con rhIL-18BP.

La Fig. 12 muestra un histograma que expone los niveles de anticuerpos tipo II anti-colágeno del isotipo IgG1 (columna blancas) o IgG2a(columnas rayadas) de ratones tratados con 3 mg/kg de IL-18BP o solución salina (vehículo), respectivamente. Las mediciones se tomaron en el día 4 (D4) o el día 8 (D8) de la enfermedad.

La Fig. 13 muestra un histograma que expone niveles de IL6 en pg/ml de animales tratados con 1, 3 o 10 mg/kg de IL-18BP, 10.000 UI de interferón β (IFN- β), suero de ratón normal (NMS) o solución salina (NaCl), respectivamente.

La Fig. 14 muestra la expresión de transcritos de mRNA de hIL-18BP y de IL-18 en biopsias intestinales de pacientes que sufren enfermedad de Crohn activa, colitis ulcerativa o individuos sanos normales. Los productos representativos de RT-PCR se muestran para IL-18BP, para IL-18 y para un gen doméstico (β -actina) (Fig. 14 A). La cuantificación relativa de bandas teñidas con bromuro de etidio se llevó a cabo usando el programa de ordenador Kodak Digital Imaging Software y se expresa como la relación de gen diana respecto a β -actina. El gen diana es IL-18 en la Fig. 14 B y es IL18BP en la Fig. 14 C.

La Fig. 15 muestra la expresión de transcritos de mRNA de hIL-18BP y de proteína HUVECs (células endoteliales de vena umbilical humana) y la expresión de proteína mediante THP1 (línea celular monocítica humana). El RNA fue aislado a partir de células endoteliales no tratadas (medio) y células endoteliales estimuladas con IL-1 β , TNF α , IFN γ . Testigo positivo: colon de paciente con enfermedad de Crohn, testigo negativo: sin cDNA. La expresión de IL-18BP y de IL-18 se analizó mediante RT-PCR semicuantitativo (Fig. 15 A). La materia sobrenadante del cultivo (medio) no tratado y tras una activación de 24 h con IL-1 β , TNF α , IFN γ de HUVEC (Fig. 15 B) o THP1 (Fig.15 C), las células fueron analizadas en cuanto a la producción de proteínas de IL-18BP y de IL-18 mediante ELISA.

La Fig.16 muestra el desarrollo del peso corporal entre el día 1 y el día 10 en un modelo de ratón de IBD después de una administración intraperitoneal (ip) de solución salina (NaCl) o IL-18BP (8 mg/kg). El cambio de peso se expresa como porcentaje de cambio de peso corporal desde el día 1. Se muestran los valores medios y los SEM de dos grupos, 8 ratones por grupo.

La Fig. 17 muestra los resultados de análisis de colonos, nódulos linfáticos caudales y de bazo derivados de IL-18BP tratado frente a ratones IBD no tratados. La Fig. 17 A expone el peso de los últimos 6 centímetros de colon en mg. La Fig. 17 B muestra el número total de células presentes en el nódulo linfático caudal. La Fig. 17 C expone el porcentaje del nódulo linfático caudal. La Fig. 17 expone el porcentaje de células con teñido positivo para CD4*/CD69* en el bazo. Los datos representan valores medios y SEM*. El * indica una diferencia significativa.

La Fig. 18 muestra la cantidad de IFN- γ (Fig. 18 A y B) y TNF α (Fig. 18 C y D) producido después de 48 horas por células de nódulos linfáticos caudales (Fig. 18 A y C) y células de bazo (Fig. 18 B y D) después de una estimulación con CD3/CD28 presente en las materias sobrenadantes. Se muestran medias y SEM.

La Fig. 19 muestra el contenido de TNF α (Fig. 19 A) y de IFN γ (Fig. 19 B) en homogenatos de colon. Los datos están corregidos para el peso de colon. Se muestran valores medios y SEM. El * indica una diferencia significativa.

Descripción de la invención

La presente descripción se basa en el descubrimiento de un efecto ventajoso de un inhibidor de IL-18 en hepatitis alcohólica.

La expresión "inhibidor de IL-18", dentro del contexto de esta descripción, se refiere al cualquier molécula que module la producción de IL-18 y/o la activación de forma que se atenúe, reduzca o se evite o bloquee de forma parcial o sustancialmente completa la producción y/o acción de IL-18. La expresión "inhibidor de IL-18" está previsto

que abarque inhibidores de la producción de IL-18, así como inhibidores de la acción de IL-18.

Un inhibidor de la producción puede ser cualquier molécula que acepte negativamente a la síntesis, tratamiento o maduración de IL-18. Los inhibidores considerados según la descripción pueden ser, por ejemplo, supresores de la expresión génica de la interleucina IL-18, mRNAs antisentidos que reducen o eviten la transcripción del mRNA de IL-18 o conduzcan a la degradación del mRNA, proteínas que dificulten un correcto plegado o eviten de forma parcial o sustancial la secreción de IL-18, proteasas que degraden IL-18, una vez que ha sido sintetizada, inhibidores de proteasas que escinden pro-IL18 con el fin de generar IL-18 madura como inhibidores de caspasa-1 y similares.

Un inhibidor de la acción de IL-18 puede ser, por ejemplo, un antagonista de IL-18. Los antagonistas pueden unirse a la propia molécula de IL-18 o secuestrarla con una afinidad y especificidad suficientes para neutralizar de forma parcial o sustancial la IL-18 o el(o los) sitio(s) de unión de IL-18 responsable(s) de la unión de IL-18 a sus ligandos (como, por ejemplo, a sus receptores). Un antagonista puede inhibir también la trayectoria señalizadora de IL-18 que es activada en las células tras la unión de IL-18/receptor.

Los inhibidores de la acción de de IL-18 pueden ser también receptores de IL-18 solubles o moléculas que emulen los receptores o agentes que bloqueen los receptores de IL-18 o anticuerpos de IL-18, como anticuerpos policlonales o monoclonales o cualquier otro agente o molécula que evite la unión de IL-18 a sus dianas, disminuyendo o evitando así la activación de reacciones intra- o extra- celulares mediadas por IL-18.

Según la presente descripción, los inhibidores de IL-18 son usados para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de la hepatitis alcohólica.

La expresión lesión hepática, o enfermedad hepática, como se usa en la presente memoria descriptiva, comprende una diversidad de estados patológicos diferentes. Varios de los estados contemplados en la presente descripción han sido descritos en detalle en la sección anterior de "antecedentes de la invención". Otras enfermedades hepáticas que pueden ser tratadas y/o prevenidas según la descripción comprenden, por ejemplo absceso hepático pirógeno. Se denomina también hígado bacteriano y es una cavidad que produce pus en el hígado. Las causas de un acceso hepático son múltiples. Se puede desarrollar a partir de una infección abdominal como apendicitis, diverticulitis o perforación intestinal, una infección sanguínea, una infección del tracto biliar (secreción hepática) o un trauma cuando un hígado dañado resulta infectado. Los organismos más comunes que provocan accesos hepáticos son *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y *Enterobacter aerogenes*. La incidencia es de uno de cada 10.000 personas.

Las enfermedades hepáticas alcohólicas pueden ser tratadas y/o prevenidas usando inhibidores de IL-18 según la descripción. Comprenden inflamación aguda o crónica del hígado inducida por el abuso del alcohol. La hepatitis alcohólica se produce normalmente después de años de ingestión excesiva de bebidas. Cuanto mayor es la duración del uso del alcohol y mayor el consumo de alcohol, mayor es la probabilidad de desarrollar la enfermedad hepática. La mal nutrición se desarrolla como consecuencia de las calorías vacías del alcohol, apetito reducido y mala absorción (absorción inadecuada de nutrientes en el tracto intestinal). La mal nutrición contribuye a la enfermedad hepática. La toxicidad del etanol para el hígado, la susceptibilidad individual a la enfermedad hepática inducida por alcohol y los factores genéticos contribuyen también al desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica.

En una realización preferida de la presente descripción, el inhibidor de IL-18 se selecciona entre inhibidores de caspasa-1 (ICE, anticuerpos dirigidos contra IL-18, anticuerpos dirigidos contra cualquiera de las subunidades de receptores de IL-18, inhibidores de la trayectoria señalizadora de IL-18, antagonistas de IL-18 que compiten con IL-18 y bloquean el receptor de IL-18 y proteínas de unión a IL-18, isoformas, muteínas, proteínas fusionadas, derivados funcionales, fracciones activas o derivados circularmente permutadas de las mismas que tengan la misma actividad.

La expresión "proteínas de unión a IL-18" se usa en la presente memoria descriptiva de forma sinónima a "IL-18BP". Comprende proteínas de unión a IL-18 como se definen en el documento WO 99/09063 o por Novick et al., 1999, que incluyen variantes de escisión y/o isoformas de proteínas de unión a IL-18, como se define por Kim et al., 2000. En particular, las isoformas humanas a y c de IL-18BP son útiles de acuerdo con la presente descripción. Las proteínas útiles según la presente descripción pueden ser glicosiladas o no glicosiladas, pueden ser derivadas de fuentes naturales, como la orina, o pueden ser producidas preferentemente de forma recombinante. La expresión recombinante se puede llevar a cabo en sistemas de expresión procarióticos como *E. coli* o en sistemas de expresión eucarióticos, preferentemente en mamíferos.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "muteínas" se refiere a análogos de una IL-18BP o análogos de una IL-18BP viral, en la que uno o más residuos de aminoácidos de IL-18BP natural o IL-18BP viral están sustituidos con diferentes residuos de aminoácidos o son suprimidos o son añadidos uno o más residuos de aminoácidos a la secuencia natural de una IL-18BP, o una IL-18BP viral, sin alterar considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con la IL-18BP de tipo salvaje o IL-18BP viral. Estas muteínas son preparadas mediante síntesis conocidas y/o técnicas de mutagénesis dirigidas al sitio o cualquier otra técnica conocida adecuada para las mismas.

- 5 Cualquiera de estas muteínas tiene preferentemente una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativa de la de una IL-18BP o suficientemente duplicativa de una IL-18BP viral, de forma que tenga una actividad sustancialmente similar a la IL-18BP. Una actividad de IL-18BP es su capacidad de unión a IL-18. En la medida en que la muteína tiene una actividad de unión sustancial a IL-18, puede ser usada en la purificación de IL-18, como por medio de cromatografía de afinidad y, por tanto, se puede considerar que tiene una actividad sustancialmente similar a IL-18BP. Por tanto, se puede determinar si cualquier muteína dada tiene sustancialmente la misma actividad que IL-18BP por medio de una experimentación rutinaria que comprende someter esta muteína, por ejemplo, a un ensayo de competición en emparedado simple para determinar si se une o no a una IL-18 apropiadamente marcada, como un radioinmunoensayo o ensayo ELISA.
- 10 Las muteínas de polipéptidos de IL-18BP o muteínas de IL-18BPs virales, que puede ser usadas de acuerdo con la presente descripción, o la codificación de ácidos nucleicos para las mismas, incluyen un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos o polinucleótidos de sustitución que pueden ser rutinariamente obtenidos por un experto en la técnica sin una experimentación excesiva basándose en las explicaciones y normas presentadas en la presente memoria descriptiva.
- 15 Los cambios preferidos para las muteínas de acuerdo con la presente descripción son las que se conocen como sustituciones "conservativas". Las sustituciones de aminoácidos conservativas de polipéptidos o proteínas de IL-18BP o IL-18BPs virales pueden incluir aminoácidos sinónimos con un grupo que tenga propiedades fisicoquímicas suficientemente similares para que la sustitución entre miembros del grupo conserve la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Está claro que las inserciones y deleciones de aminoácidos se pueden hacer también en las secuencias anteriormente definidas sin alterar su función, particularmente si las inserciones o deleciones incluyen solamente unos pocos aminoácidos, por ejemplo, menos de treinta, y, preferentemente menos de diez y no suprimen ni desplazan aminoácidos que sean críticos para una conformación funcional, por ejemplo, residuos de cisteína. Las proteínas y muteínas producidas mediante estas deleciones y/o inserciones entran dentro de las provisiones de la presente descripción.
- 20
- 25 Preferentemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla I. Más preferentemente, los grupos aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla II y, lo más preferentemente, los grupos aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla III.

Tabla I

30 Grupos preferidos de aminoácidos sinónimos

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

ES 2 365 600 T3

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

TABLA II

Grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

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

Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

TABLA III

Grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

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

5 Ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que pueden ser usados para obtener muteínas de polipéptidos o proteínas de IL-18BP o muteínas de IL-18BPs virales para ser usadas en la presente descripción incluyen cualquiera de las etapas de los métodos conocidos, como los que se presentan en las patentes de EE.UU. RE 33.653, 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462 de Mark et al; 5.116.943 de Koths et al., 4.965.195 de Namen et al; 4.879.111 de Chong et al; y 5.017.691 de Lee et al; y proteínas sustituidas con lisina presentadas en la
 10 patente de EE.UU. No. 4.904.584 (Shaw et al).

La expresión "proteína fusionada" se refiere a un polipéptido que comprende una IL-18BP o IL-18BP viral o una muteína o fragmento de la misma, fusionado con otra proteína que, por ejemplo, tiene un tiempo de residencia prolongado en fluidos corporales. Una IL-18BP o una IL-18BP viral, por tanto, puede estar fusionada a otra proteína polipéptido o similar, por ejemplo, una inmunoglobulina o un fragmento de la misma.

5 "Derivados funcionales", como se usa en la presente memoria descriptiva, abarca derivados de IL-18BPs o IL-18BP viral y sus muteínas y proteínas fusionadas, que pueden ser preparados a partir de los grupos funcionales que se producen como cadenas laterales en los residuos de los grupos N- o C-terminales, por medios conocidos en la técnica y, están incluidos en la descripción en la medida en que permanecen farmacéuticamente aceptables, es decir, no destruyen la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de IL-18BP o IL-18BPs virales y no confieren propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen.

15 Estos derivados pueden incluir, por ejemplo, cadenas laterales de polietilenglicol, que pueden enmascarar sitios antigénicos y prolongar la residencia de una IL-18BP o una IL-18BP viral en fluidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilos, amidas de los grupos carboxilos mediante reacción con amoniaco o con aminas primarias o secundarias, derivados de N-acilo de los grupos aminos libres de los residuos de aminoácidos formados con restos acilos (por ejemplo, grupos alcanilo o aroilo carbocíclicos) o derivados de O-acilo de los grupos hidroxilos libres (por ejemplo, los de residuos serilo o treonilo) formados con restos acilos.

20 Como "fracciones activas" de una IL-18BP o una IL-18BP viral, muteínas y proteínas fusionadas, la presente descripción abarca cualquier fragmento o precursores de la cadena de polipéptido de la molécula de proteína sola o conjuntamente con moléculas asociadas o residuos unidos a la misma, por ejemplo, residuos de azúcares o fosfatos o agregados de la molécula de la proteína o los propios residuos de azúcares, con la condición de que dicha fracción tenga una actividad sustancialmente similar a IL-18BP.

25 En una realización preferida adicional de la descripción, el inhibidor de IL-18 es un anticuerpo de IL-18. Los anticuerpos anti-IL-18 pueden ser policlonales o monoclonales, quiméricos humanizados o incluso completamente humanos. Los anticuerpos recombinantes y sus fragmentos se caracterizan por una elevada afinidad de unión a IL-18 *in vivo* y una baja toxicidad. Los anticuerpos que pueden ser usados en la descripción se caracterizan por su capacidad para tratar pacientes durante un período suficiente para tener una excelente regresión o alivio del estado patógeno o cualquier síntoma o grupo de síntomas relacionados con un estado patógeno y una baja toxicidad.

30 Los anticuerpos neutralizantes se hacen surgir fácilmente en animales como conejos, cabras o ratones mediante inmunización con IL-18. Los ratones inmunizados son particularmente útiles para proporcionar fuentes de células B para la fabricación de hibridomas que, a su vez, son cultivados para producir grandes cantidades de anticuerpos monoclonales anti-IL-18.

35 Los anticuerpos quiméricos son moléculas de inmunoglobulinas caracterizadas por dos o más segmentos o partes derivados de diferentes especies de animales. Generalmente, la región variable del anticuerpo quimérico es derivada de un anticuerpo de mamífero no humano, como un anticuerpo monoclonal de murido y la región constante de inmunoglobulina es derivada de una molécula de inmunoglobulina humana. Preferentemente, las dos regiones y la combinación tienen una baja inmunogenicidad, según se determina rutinariamente (Elliott et al., 1994). Los anticuerpos humanizados son moléculas de inmunoglobulinas creadas mediante técnicas de ingeniería genética en las que las regiones constantes de muridos son sustituidas con contrapartes humanas, mientras retienen las regiones de unión de antígenos de muridos. El anticuerpo quimérico de ratón-humano resultante tiene preferentemente una inmunogenicidad reducida y características farmacocinéticas mejoradas en seres humanos (Knight et al., 1993).

Por tanto, en una realización preferida adicional, el anticuerpo de IL-18 es un anticuerpo de IL-18 humanizado. Ejemplos preferidos de anticuerpos anti-IL-18 humanizados se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente europea EP 0.974.600.

45 Todavía, en una realización preferida adicional, el anticuerpo de IL-18 es completamente humano. La tecnología para producir anticuerpos humanos se describe en detalle, por ejemplo, en los documentos WO 00176310, WO 99/53049, US 6.162.963 o AU 536100. Los anticuerpos completamente humanos son preferentemente anticuerpo recombinantes, producidos en animales transgénicos, por ejemplo xeno-ratones, que comprenden la totalidad o parte de sitios de Ig humanos funcionales.

50 En una realización altamente preferida de la presente descripción, el inhibidor de IL-18 es una IL-18BP, o una isoforma, una muteína, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma. Estas isoformas, muteínas, proteínas fusionadas o derivados funcionales retienen la actividad biológica de IL-18BP, en particular la unión a IL-18 y, preferentemente, tienen esencialmente al menos una actividad similar a IL-18BP. Idealmente, estas proteínas tienen una actividad biológica que es incluso aumentada en comparación con IL-18BP sin modificar. Las fracciones activas preferidas tienen una actividad que es mejor que la actividad de

IL18BP o que tienen ventajas adicionales, como una mejor estabilidad o una toxicidad o inmunogenicidad inferior, o son más fáciles de producir en grandes cantidades o más fáciles de purificar.

Las secuencias de IL-18BP y sus variantes de escisión/isoformas se pueden tomar del documento WO 99/09063 de Novick et al., 1999, así como de Kim et al., 2000.

- 5 Los derivados funcionales de IL-18BP pueden estar conjugados a polímeros con el fin de mejorar las propiedades de la proteína como la estabilidad, semi-vida, biodisponibilidad, tolerancia a los fluidos humanos o inmunogenicidad. Para conseguir este objetivo, la IL-18BP puede estar unida, por ejemplo, a polietilenglicol (PEG) la PEGilación se puede llevar a cabo mediante métodos conocidos, descritos, por ejemplo, en el documento WO 92/13095.

Por lo tanto, en una realización preferida de la presente descripción, la IL-18BP está PEGilada.

- 10 En una realización preferida adicional de la descripción, el inhibidor de IL-18 es una proteína fusionada que comprende la totalidad o parte de una proteína de unión a IL-18, que está fusionada a la totalidad o parte de una inmunoglobulina. El experto en la técnica comprenderá que la proteína de fusión resultante retiene la actividad biológica de IL-18BP, en particular la unión a IL-18. La fusión puede ser directa o a través de un péptido conector corto que puede ser tan corto como de 1 a 3 residuos de aminoácidos de longitud o más largo, por ejemplo, de 13
15 residuos de aminoácidos de longitud. Dicho conector puede ser un tripéptido de la secuencia E-F-M (Glu-Phe-Met), por ejemplo, una secuencia conectora de 13 aminoácidos que comprende Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met introducida entre la secuencia de IL-18BP y la secuencia de inmunoglobulina. La proteína de fusión resultante tiene propiedades mejoradas, como un tiempo de resistencia prolongado en fluidos corporales (semi-vidas, actividad específica aumentada, nivel de expresión aumentado o se facilita la purificación de la proteína de
20 fusión.

- En una realización preferida, la IL-18BP está fusionada a la región constante de una molécula de Ig. Preferentemente, está fusionada a regiones de cadenas pesadas, como los dominios CH2 y CH3 de IgG1 humana, por ejemplo. La generación de proteína de fusión específicas que comprenden IL-18BP y una parte de una inmunoglobulina se describen en el ejemplo 11 del documento WO 99/09063, por ejemplo. Otras isoformas de
25 moléculas de Ig son también adecuadas para la generación de proteínas de fusión según la presente descripción como las isoformas IgG₂ o IgG₄ u otras clases de Ig, como IgM o IgA, por ejemplo. Las proteínas de fusión pueden ser monómeras o multímeras, hetero- u homo-multímeras.

- Los interferones son predominantemente conocidos por los efectos inhibidores sobre la replicación viral y la proliferación celular. El interferón- γ , por ejemplo, desempeña una función importante en el favorecimiento de
30 respuestas inmunes e inflamatorias. El interferón β (IFN- β , un interferón de tipo I) se dice que desempeña una función anti-inflamatoria. Los estudios publicados por Triantaphyllopoulos et al (1999) indicaron que el IFN- β tiene un efecto beneficioso en la terapia de la artritis reumatoide, como se muestra en un modelo de ratones de la enfermedad, el modelo de artritis inducida por colágeno (CIA). Este efecto beneficioso del IFN- β fue confirmado en los ejemplos posteriores.

- 35 La descripción se refiere también al uso de una combinación de un inhibidor de IL-18 y un interferón en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de artritis, en particular artritis reumatoide.

Los interferones pueden estar conjugados a polímeros con el fin de mejorar la estabilidad de las proteínas. Un conjugado entre interferón β y el poliol polietilenglicol (PEG) ha sido descrito en el documento WO 99/55377, por ejemplo.

- 40 En otra realización preferida de la descripción, el interferón es interferón β (IFN- β) y, más preferentemente IFN- β -1 a.

El inhibidor de la producción y/o acción de IL-18 es preferentemente usado de forma simultánea, secuencial o separada con el interferón.

- Todavía, en una realización adicional de la descripción, se usa un inhibidor de IL-18 en combinación con un antagonista de TNF. Los antagonistas de TNF ejercen su actividad de diversas formas. En primer lugar, los
45 antagonistas se pueden unir o secuestrar la propia molécula de TNF con suficientes afinidad y especificidad para neutralizar parcial o sustancialmente el epitopo o epitopos de TNF responsables de la unión al receptor de TNF (en lo sucesivo denominados "antagonistas secuestrantes". Un antagonista secuestrante puede ser, por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra TNF.

- 50 Alternativamente, los antagonistas de TNF pueden inhibir la trayectoria señalizadora de TNF activada por el receptor de la superficie celular después de la unión a TNF (en lo sucesivo denominados "antagonistas de señalización". Ambos grupos de antagonistas son útiles, solos o conjuntamente, en combinación con un inhibidor de IL-18 en la terapia de la artritis, en particular artritis reumatoide.

- Los antagonistas de TNF pueden ser fácilmente identificados y evaluados mediante una selección rutinaria de candidatos en cuanto a su efecto sobre la actividad de TNF nativo sobre líneas celulares susceptibles *in vitro*, por ejemplo, células B humanas, en la que el TNF provoca la proliferación y secreción de inmunoglobulina. El ensayo contiene la formulación de TNF a diluciones variables de antagonista candidato, por ejemplo, de 0,1 a 100 veces la cantidad en moles de TNF usada en el ensayo y testigos sin TNF o solamente antagonista (Tucci et al., 1992).
- Los antagonistas secuestrantes son los antagonistas de TNF preferidos para ser usados según la presente descripción. Entre los antagonistas secuestrantes, son preferidos los polipéptidos que se unen a TNF con una afinidad elevada y poseen una baja inmunogenicidad. Las moléculas receptoras de TNF solubles y los anticuerpos neutralizantes para TNF son particularmente preferidos. Por ejemplo, el TNF-RI y TNF-RII solubles son útiles en la presente descripción. Las formas truncadas de estos receptores, que comprenden los dominios extracelulares de los receptores o partes funcionales de los mismos son los antagonistas más particularmente preferidos según la presente descripción. Los receptores de tipo I y tipo II de TNF truncados se describen en el documento EP 914431, por ejemplo.
- Las formas truncadas de los receptores de TNF son solubles y han sido detectadas en orina y suero en forma de proteínas de unión inhibitoras de TNF de 30 kDa y 40 kDa, que se denominan TBPI y TBPII, respectivamente (Engelmann et al., 1990). El uso simultáneo, secuencial o separado del inhibidor de IL-18 con el antagonista de TNF y/o un interferón es preferido según la descripción.
- Según la descripción, el TBPI y TBPII son antagonistas de TNF preferidos para ser usados en combinación con un inhibidor de IL-18. Los derivados, fragmentos, regiones y partes biológicamente activas de las moléculas receptoras se asemejan funcionalmente a las moléculas receptoras que pueden ser usadas también en la presente descripción. Este derivado biológicamente activo o equivalente de la molécula receptora se refiere a una parte del polipéptido, o de la secuencia que codifica la molécula receptora, que es de tamaño suficiente y capaz de unirse a TNF con una afinidad tal que es inhibida o bloqueada la interacción con el receptor de TNF unido a la membrana.
- En una realización preferida adicional, el TNF-RI soluble humano (TBPI) es el antagonista de TNF que va a ser usado según la descripción. Las moléculas receptoras de TNF solubles, naturales y recombinantes y los métodos de su producción han sido descritos en las patentes europeas EP 308.378, EP 398.327 y EP 433.900.
- El inhibidor de IL-18 puede ser usado de forma simultánea, secuencial o separada con el inhibidor de TNF. Ventajosamente, se usa una combinación de un anticuerpo de IL-18 o antisuero y un receptor soluble de TNF que tenga actividad inhibitora de TNF.
- En una realización preferida adicional de la descripción, el medicamento comprende adicionalmente un inhibidor de COX, preferentemente un inhibidor de COX-2. Los inhibidores de COX son conocidos en la técnica. Se describen inhibidores de COX-2 específicos, por ejemplo, en el documento WO 01/00229.
- La descripción se refiere adicionalmente al uso de una combinación de inhibidores de IL-18 y/o interferones y/o antagonistas de TNF y/o inhibidores de COX-2. La combinación es adecuada para el tratamiento y/o la prevención de artritis, en particular artritis reumatoide y para el tratamiento y/o la prevención de lesión hepática y para el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de inflamación intestinal, en particular la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa. Los componentes activos pueden ser usados de forma simultánea, secuencial o separada.
- En una realización preferida de la presente invención, el inhibidor de IL-18 es usado en una cantidad de aproximadamente 0,00001 a 10 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 0,01 a 5 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 0,1 a 3 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 1 a 2 mg/kg de peso corporal, todavía, en una realización preferida adicional, el inhibidor de IL-18 es usado en una cantidad de aproximadamente 0,1 a 1.000 µg/kg de peso corporal o 1 a 100 µg/kg de peso corporal o aproximadamente 10 a 50 µg/kg de peso corporal.
- La descripción se refiere adicionalmente al uso de un vector de expresión que comprende la secuencia codificadora de un inhibidor de IL-18 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de estados artríticos o artritis en particular artritis reumatoide, para el tratamiento de una lesión hepática y para el tratamiento de la enfermedad de inflamación intestinal. Por tanto, se usa una aproximación terapéutica génica para tratar y/o prevenir la enfermedad. Ventajosamente, la expresión del inhibidor de IL-18 será entonces *in situ*, bloqueando así eficazmente la IL-18 directamente en el(o los) tejido(s) o células aceptados por la enfermedad.
- Con el fin de tratar y/o prevenir la artritis, el vector de terapia génica que comprende la secuencia de un inhibidor de la producción y/o acción de IL-18 puede ser directamente inyectado en la articulación enfermada, por ejemplo, evitando así los problemas relacionados con la administración sistémica de vectores de terapia génica como la dilución de vectores, alcanzando y dirigiendo a diana en las células o testigos dianas y de efectos secundarios.
- El uso de un vector para incidir y/o aumentar la producción endógena de un inhibidor de IL-18 en una célula

normalmente silente para la expresión de un inhibidor de IL-18, o que expresa cantidades del inhibidor que no son suficientes, puede estar contemplado también según la descripción. El vector puede comprender secuencias reguladoras funcionales en las células que se desea que expresen el inhibidor de IL-18. Estas secuencias reguladoras pueden ser promotores o mejoradores, por ejemplo. La secuencia reguladora puede ser seguidamente introducida en el lugar correcto del genoma mediante recombinación homóloga, conectando así funcionalmente la

5

Se comprenderá por el experto en la técnica que es posible también interrumpir la expresión de IL-18 usando la misma técnica, por ejemplo, introduciendo un elemento de regulación negativa como, por ejemplo un elemento silenciador en el lugar del gen de IL-18, conduciendo así a una infra-regulación o prevención de la expresión de IL-18. El experto en la técnica comprenderá que esta interrupción de la regulación o silenciado de la expresión de IL-18 tiene el mismo efecto que el uso de un inhibidor de IL-18 con el fin de prevenir y/o tratar la enfermedad.

10

La descripción se refiere adicionalmente al uso de una célula que ha sido genéticamente modificada para producir un inhibidor de IL-18 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una lesión hepática, artritis o enfermedad de inflamación intestinal.

15

La descripción se refiere adicionalmente a composiciones farmacéuticas, particularmente útiles para la prevención y/o el tratamiento de artritis inflamatoria, lesión hepática o enfermedad de inflamación intestinal, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de IL-18 y una cantidad terapéuticamente eficaz de un interferón. Como inhibidor de IL-18, la composición puede comprender inhibidores de caspasa-1, anticuerpos contra IL-18, anticuerpos contra cualquiera de las subunidades de receptores de IL-18, inhibidores de la trayectoria señalizadora de IL-18, antagonistas de IL-18 que compiten con IL-18 y bloquean el receptor de IL-18 y proteínas de unión a IL-18 isoformas, muteínas, proteínas fusionadas, derivados funcionales, fracciones activas o sus derivados circularmente permutados que tienen la misma actividad.

20

La IL-18BP y sus isoformas, muteínas, proteínas fusionadas, derivados funcionales, fracciones activas o derivados circularmente permutados como se describen anteriormente son los ingredientes activos preferidos de las composiciones farmacéuticas.

25

El interferón comprendido en la composición farmacéutica es preferentemente IF- β . Todavía, en otra realización preferida, la composición farmacéutica comprende cantidades terapéuticamente eficaces de un inhibidor de IL-18, opcionalmente un interferón y un antagonista de TNF. Los antagonistas de TNF pueden ser anticuerpos que neutralizan la actividad de TNF o fragmentos de receptores de TNF truncados solubles, también denominados TBPI y TPBII. La composición farmacéutica según la descripción puede comprender adicionalmente uno o más inhibidores de COX, preferentemente inhibidores de COX-2.

30

La definición de "farmacéuticamente aceptable" está previsto que abarque cualquier vehículo que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxica para el hospedante al que es administrada. Por ejemplo, para una administración parenteral, la(s) proteína(s) activa(s) puede(n) ser formulada(s) en una forma de dosificación unitaria para una inyección en vehículos como solución salina, solución de dextrosa, albumina de suero y solución de Ringer.

35

Los ingredientes activos de la composición farmacéutica según la descripción pueden ser administrados a un individuo en una diversidad de formas. Las vías de administración incluyen las vías intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en formulaciones de liberación lenta, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, epidural, tópica e intranasal. Puede ser usada cualquier otra vía de administración terapéuticamente eficaz, por ejemplo, absorción a través de tejidos epiteliales o endoteliales o mediante una terapia génica en la que una molécula de DNA que codifica el agente activo es administrada al paciente (por ejemplo, a través de un vector) que provoca que el agente activo sea expresado y secretado *in vivo*. Además, la(s) proteína(s) según la descripción puede(n) ser administrada(s) conjuntamente con otros componentes de agentes biológicamente activos como tensioactivos farmacéuticamente aceptables, excipientes, portadores, diluyentes y vehículos.

40

Para una administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular), la(s) proteína(s) puede(n) ser formulada(s) en forma de una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, agua, solución salina o solución de dextrosa) y aditivos que mantengan la isotonicidad (por ejemplo, manitol) o la estabilidad química (por ejemplo, conservantes y tampones). La formulación es esterilizada mediante técnicas comúnmente usadas.

50

La biodisponibilidad de la(s) proteína(s) activa(s) según la descripción puede ser mejorada también usando procedimientos de conjugación que aumentan la semi-vida de la molécula en el cuerpo humano, por ejemplo, uniendo la molécula a polietilenglicol, como se describe en la solicitud de patente PCT WO 92/13095.

Las cantidades terapéuticamente eficaces de la(s) proteína(s) activa(s) serán una función de muchas variables que incluyen el tipo de antagonista, la afinidad del antagonista por IL-18, cualquier actividad citotóxica residual exhibida por los antagonistas, la vía de administración, el estado clínico del paciente (incluido el deseo de mantener un nivel no tóxico de actividad de IL-18 endógeno).

5 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es la que cuando es administrada, el inhibidor de IL-18 da lugar a la inhibición de la actividad biológica de IL-18. La dosificación administrada, en forma de dosis únicas o múltiples, a un individuo, variará dependiendo de una diversidad de factores que incluyen propiedades farmacocinéticas del inhibidor de IL-18, la vía de administración, las condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, talla) alcance de los síntomas, tratamientos concurrentes, frecuencia de tratamiento y el efecto deseado. El
10 ajuste y la manipulación de los intervalos de dosificaciones establecidos están dentro de la capacidad de los expertos en la técnica así como los métodos *in vitro* e *in vivo* para determinar la inhibición de IL-18 en un individuo.

Según la descripción, el inhibidor de IL-18 es usado en una cantidad de aproximadamente 0,0001 a 10 mg/kg o aproximadamente 0,01 a 5 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 0,01 a 5 mg de peso corporal o aproximadamente 0,1 a 3 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 1 a 2 mg/kg de peso corporal. Otras
15 cantidades preferidas de los inhibidores de IL-18 son cantidades de aproximadamente de 0,1 a 100 µg/kg de peso corporal o aproximadamente 1 a 100 µg/kg de peso corporal o aproximadamente 10 a 50 µg/kg de peso corporal.

La vía de administración que es preferida según la descripción es la administración por vía subcutánea. La administración intramuscular es adicionalmente preferida según la descripción.

En otras realizaciones preferidas, el inhibidor de IL-18 es administrado diariamente o en días alternados.

20 Las dosis diarias son habitualmente proporcionadas en dosis divididas o en una forma de liberación sostenida eficaz para obtener los resultados deseados. Se pueden realizar segundas o posteriores administraciones a una dosificación que sea igual, menor o mayor que la dosis inicial o previa administrada al individuo. Una administración segunda o posterior puede ser administrada durante o antes de la aparición de la enfermedad.

Según la descripción, el inhibidor de IL-18 puede ser administrado de forma profiláctica o terapéutica a un individuo de forma anterior, simultánea o secuencial con otros regímenes o agentes terapéuticos (por ejemplo, regímenes de fármacos múltiples), En una cantidad terapéuticamente eficaz, en particular con un interferón y/o un antagonista de TNF y/o un inhibidor de COX. Los agentes activos que son administrados simultáneamente con otros agentes terapéuticos pueden ser administrados a las mismas o diferentes composiciones.

La descripción se refiere adicionalmente a un método para la preparación de una composición farmacéutica que comprende mezclar una cantidad eficaz de un inhibidor de IL-18 y/o un interferón y/o un antagonista de TNF y/o un inhibidor de COX con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tras haber expuesto la descripción, será más fácilmente comprendida haciendo referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración y no está previsto que limiten la presente invención.

Ejemplos

35 Ejemplo 1: Producción de etiqueta de IL-18BP-His

Se produjo IL18BP humana recombinante purificada que contenía una etiqueta de His (etiqueta de r-hIL-18BP-His) en células de CHO. La producción de proteínas recombinantes en células eucarióticas es conocida por el experto en la técnica. Están disponibles métodos bien conocidos para construir vectores apropiados que portan DNA que codifica la IL18BP y son adecuados para la transfección de células eucarióticas con el fin de producir IL-18BP
40 recombinante. Para la expresión en células, el DNA que codifica IL-18BP (véase, por ejemplo, Novick et al., 1999) es cortado e insertado en vectores de expresión adecuados para las transfección de células. Alternativamente, este DNA puede ser preparado mediante PCR con cebadores de sentido y antisentido adecuados. Los constructos de cDNA resultantes son seguidamente insertados en vectores de expresión eucarióticos apropiadamente construidos mediante técnicas bien conocidas en el estado de la técnica (Manaitis, 1982). La proteína recombinante fue
45 purificada hasta más de 95% de pureza y se encontró que era biológicamente activa *in vitro* e *in vivo* con una afinidad elevada hacia su ligando.

Ejemplo 2: efecto protector de IL18BP contra la muerte inducida por endotoxinas en el modelo de múridos

Se usó un modelo de múridos para ensayar si la L18BP, un inhibidor de IL-18, protegería ratones contra una dosis elevada de lipopolisacáridos (LPS). Los LPS provocan una lesión hepática seguida de la muerte rápida de los ratones.

Se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p) 4 mg/kg de IL-18BP humana (rhIL18BPHis) que contenían una etiqueta de His (resultante de la producción recombinante de la proteína) en ratones C57B6. Después de 1 h, se inyectaron 60 mg/kg de LPS (dosis mortales). La supervivencia de los ratones se comparó con un grupo de animales que recibieron LPS solamente (sin IL18BP).

- 5 Cinco de cada siete ratones inyectados con rhIL-18BP-his sobrevivieron a la inyección de LPS en contraste con los ratones testigos, en los que todos los animales murieron en tres días.

Se tomaron muestras de sangre 5 h después de inyección de LPS en ausencia o presencia de dosis crecientes de rhIL-18BP-his y se analizaron mediante ELISA en cuanto a IFN- γ en circulación (Fig. 1). 0,4 y 4 mg/kg de rhIL-18BP indujeron una reducción de dos veces en el IFN- γ en suero. Esta inhibición se perdió a dosis inferiores de rhIL-18BP (0,004 y 0,4 mg/kg).

Ejemplo 3: La IL18Bp tiene un efecto protector contra la lesión hepática en un modelo de enfermedad de móridos

Se usó un modelo de ratones de hepatitis fulminante para ensayar el efecto de IL18BP. Los ratones desarrollaron una lesión hepática aguda cuando fueron sometidos a una administración secuencial de *Propionibacterium acnes* (P. acnes) y lipopolisacárido (LPS).

15 Los ratones fueron inyectados con dosis crecientes de rhIL-18BP-his (4; 0,4; 0,04; 0 mg/kg) a diversos valores del tiempo (1 h, 20 min, simultáneamente) antes de que la inyección de LPS en ratones C57BU6 sensibilizados con P. acnes. Cuando la rhIL-18BP-his fue proporcionada i.p al mismo tiempo que LPS, ninguno de los ratones sobrevivió y los niveles de IFN- γ y TNF- α en circulación resultaron inalterados. Sorprendentemente, la rhIL-18BP (4 y 0,4 mg/kg) indujo una reducción de 70% de alanina aminotransferasa en circulación (un marcador de lesión hepática), como se muestra en la Fig. 2.

Además de esto, se verificó la supervivencia de ratones (Fig. 3): cuando la rhIL-18BP fue proporcionada i.p. 20 minutos antes de LPS, las dos dosis más elevadas de ILP-18-BP (4 y 0,4 mg/kg) retrasaron la muerte de los ratones en 10 veces en comparación con los ratones testigos que recibieron NaCl en lugar de IL-18BP.

25 Los resultados de la medición de niveles de IFN- γ en suero se muestran en la Fig.4. La rhIL-18BP (4 mg/kg) inhibió un 50% de los niveles de IFN- γ en circulación y un 80% la alanina aminotransferasa en circulación (no mostrado).

Cuando la rhIL-18BP-his fue proporcionada 1 h antes de LPS, las curvas de supervivencia y los niveles de IFN γ en circulación fueron similares a los observados cuando la rhIL-18BP-his fue proporcionada 20 min antes del LPS, pero los niveles de alanina aminotransferasa en circulación resultaron inalterados (no mostrado).

30 Además de esto, el tejido de hígado de mórido fue analizado mediante tinción con hematoxilina-eosina, así como mediante microscopía de efecto túnel. Los hígados de los ratones, en los que había sido inducida anteriormente una hepatitis grave, mostraron necrosis grave en comparación con el tejido de hígado normal. En contraste con esto, el tejido de hígado de los ratones tratados con IL-18BP mostró significativamente menos focos necróticos que los ratones sin tratar.

Ejemplo 4: Anticuerpos anti-IL-18 protegidos contra endotoxemia mortal.

35 Con el fin de evaluar si el bloqueo de IL-18 con anticuerpos de IL-18 protegería los ratones contra dosis mortales de lipopolisacáridos bacterianos, los ratones C57BU6J fueron inyectados en primer lugar con un anticuerpo de IL-18 anti-ratón de conejo neutralizante (policlonal) o suero de conejo normal (NDS) como testigo. 30 minutos después del tratamiento con anticuerpos, se inyectó una dosis mortal de LPS derivado de *E. coli* (Fig. 5 A) o *S. typhimurium* (Fig. 5 B). Los experimentos incluyeron 10-12 ratones/grupo y se realizaron dos veces en dos ocasiones diferentes.

40 Como se muestra en la Fig. 5 A, el tratamiento de los ratones con el antisuero anti-IL-18 evitó la mortalidad inducida por 40 mg/kg de LPS de *E. coli*. Un 100% de los ratones sobrevivieron después del tratamiento del anti-IL-18 frente a un 10% de supervivencia en ratones tratados con suero de conejo normal ($p < 0,005$).

La Fig. 5 B muestra que los ratones tratados con anticuerpos estaban protegidos también contra los efectos mortales de *S. typhimurium* (50% frente a 0% de supervivencia; $p < 0,05$).

45 Ejemplo 5: El bloqueo de IL-18 y TNF- α protege los ratones de la hepatotoxicidad inducida por Con A y PEA.

Se usaron dos modelos experimentales de hepatotoxicidad para evaluar la función de IL-18 y PNF- α en una lesión hepática. La inyección de Concanavalina A (Con A) y *Pseudomonas aeruginosa* (PEA) en ratones indujeron ambas una lesión hepática y son modelos de hepatitis mediada por células T.

Fueron pretratados ratones C57BL/6J con un antisuero anti-IL18 o un receptor de TNF- α soluble TNFsRp55. Se midieron los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) en suero como indicadores de la lesión hepática (Fig. 6).

5 Como se muestra en la Fig. 6 A, tanto el antisuero de IL-18 como los receptores de TNF solubles redujeron significativamente los niveles de LT en suero inducidos por ConA, en comparación con una inyección testigo del vehículo solo (solución salina de pirógenos). Una administración conjunta de TNF soluble y antisuero de IL-18 condujo a una inhibición completa de la lesión hepática inducida por Con-A.

Como se muestra en la Fig. 6 B, en ratones inyectados con PEA, la neutralización de inhibidores de TNF- α o anticuerpos anti-IL-18 dio lugar a una inhibición de 93% y 83% de los niveles de ALT en suero, respectivamente. Un bloqueo combinado de ambos dio lugar a una protección de 99%.

10 Ejemplo 6: Los niveles en plasma de proteína de unión a IL-18 son elevados en pacientes con enfermedad hepática crónica.

Los niveles en plasma de IL-18BP se midieron en 133 pacientes con enfermedad hepática crónica (CLD) de etiologías variables y 31 testigos sanos mediante un ensayo ELISA específico, usando un anticuerpo monoclonal de IL-18BP.

15 Los niveles en plasma de IL-18BP fueron significativamente superiores en pacientes de CLD ($12,91 \pm 0,89$ ng/ml; promedio \pm SEM) que en sujetos sanos ($4,96 \pm 0,43$ ng/ml, $p < 0,001$). Los pacientes cirróticos tenían niveles significativamente superiores a los pacientes sin CLD cirrótico ($19,23 \pm 1,28$ ng/ml, $n = 67$ frente a $6,49 \pm 0,51$ ng/ml, $n = 66$, $p < 0,001$). Los pacientes con la fase B de la clasificación de Child-Pugh tenían niveles superiores de IL-18BP que los de la fase A ($22,148 \pm 2,44$ ng/ml frente a $9,57 \pm 1,25$ ng/ml, $p < 0,001$). Sin embargo, no hubo
20 diferencias significativas entre los niveles en plasma B y C de Child ($22,48 \pm 2,44$ ng/ml frente a $20,62 \pm 4,75$ ng/ml, $p = 0,7$). Los niveles en plasma de IL-18BP se correlacionaron positivamente con la velocidad de sedimentación de GOT, bilirrubina y eritrocitos. Se encontró una correlación negativa con el tiempo de protrombina.

25 En conclusión, los resultados muestran que los niveles en plasma de IL-18BP son elevados en la CLD y se correlacionan con la gravedad de la enfermedad independientemente de la etiología de la enfermedad. Aunque son un antagonista endógeno de la IL-18 proinflamatoria, los niveles aumentados de IL-18BP parece que no son suficientes para contrarrestar los mediadores abrumadoramente proinflamatorios en la CLD.

Ejemplo 7: Inhibición de hepatitis alcohólica por IL-18BP

30 Cuatro grupos de ratas (5 por grupo) son alimentados con etanol y una dieta que contiene aceite de maíz mediante infusión intragástrica durante 4 semanas. La dextrosa sustituye de forma isocalórica al etanol en ratas testigos. Las ratas son inyectadas diariamente con IL-18BP de ratón (1 mg/kg) o solución salina). Se realizan análisis patológicos sobre secciones hepáticas y se toma mediciones de las enzimas hepáticas en suero, TNF- α , ligando Fas y de IFN- γ . Se observa una lesión necroinflamatoria y la expresión de enzimas hepáticas, TNF- α , ligando Fas e IFN- γ en las ratas alimentadas con etanol que fueron inyectadas con solución salina.

35 Las ratas inyectadas con IL-18BP de ratón están protegidas de la lesión necroinflamatoria y de los niveles de enzimas hepáticas TNF- α , ligando Fas e IFN- γ se reducen significativamente (>90%).

Ejemplo 8: Inhibición de hepatitis inducida por concanavalina A mediante IL-18BP

40 Se inyectan ratones Balb/c con 12 mg/kg de concanavalina A (Con A) con o sin inyección de IL-18BP de muridos (1mg/kg) 2 h antes de la administración de Con A y a continuación diariamente. El deterioro hepático se evalúa determinando los niveles en suero de enzimas hepáticas, TNF- α , ligando Fas e IFN- γ . La histopatología hepática se compara con ratones tratados con concanavalina A solamente.

El pretratamiento con IL-18BP reduce significativamente los niveles en suero de enzimas hepáticas y TNF- α sin evidencia de inflamación ni examen histopatológico en comparación con ratones testigos tratados con Con A.

Referencias

- 45 1. Afford, S. C., et al., Distinct patterns of chemokine expression are associated with leukocyte recruitment in alcoholic hepatitis and alcoholic cirrhosis. *J Pathol*, 1998. 186 (1) : p. 82-9.
2. Anderson, D. M., et al., A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 1997. 390 (6656): p. 175-179.

3. Baroni, G. S., et al., Hepatic stellate cell activation and liver fibrosis are associated with necroinflammatory injury and Th1-like response in chronic hepatitis C. *Liver*, 1999.19 (3): p. 212-9.
4. Bird, G. L., et al., Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. *Ann Intern Med*, 1990.112 (12): p. 917-20.
- 5 5. Bollon, D. P., et al. (1980) *J. Clin. Hematol. Oncol.* 10: 39-48.
6. Botstein, D., et al. (1982) *Miami Wint. Symp.* 19: 265-274.
7. Broach, J. R., in "The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces* : Life Cycle and Inheritance", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 445-470 (1981).
8. Broach, J. R., (1982) *Cell* 28: 203-204.
- 10 9. Byrn R. A. et al., 1990, *Nature (London)* 344: 667-670.
10. Camoglio L, te Velde AA, de Boer A, ten Kate FJ, Kopf M, van Deventer SJ. Hapten-induced colitis associated with maintained Th1 and inflammatory responses in IFN-gamma receptor-deficient mice. *Eur J Immunol* 2000 ; 30: 1486-95.
- 15 11. Car, B. D., V. M. Eng, B. Schnyder, L. Ozmen, S. Huang, P. Gallay, D. Heumann, M. Aguet, and B. Ryffel. 1994. Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. *J. Exp. Med.* 179: 1437-44 issn: 00221007.
12. Chater, K. F. et al., in "Sixth International Symposium on Actinocyetates Biology", Akademiai Kaido, Budapest, Hungary (1986), pp. 45-54).
- 20 13. Conti, B., J. W. Jahng, C. Tinti, J. H. Son, and T. H. Joh. 1997. Induction of interferon-gamma inducing factor in the adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* 272: 2035 2037.
14. Dao, T., K. Ohashi, T. Kayano, M. Kurimoto, and H. Okamura. 1996. Interferon gamma-inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells. *Cell-Immunol.* 173: 230-5 issn: 0008-8749.
15. Dayer, J-M (1999). *J. Cin. Inv.* 104,1337-1339.
- 25 16. Desreumaux P, Brandt E, Gambiez L, Emilie D, Geboes K, Klein O, Ectors N, Cortot A, Capron M, Colombe JF. Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997; 113: 118-126.
17. DiDonato, J A, Hayakawa, M, Rothwarf, D M, Zandi, E and Karin, M. (1997), *Nature* 388,16514-16517.
18. Elliott, M. J., Maini, R. N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H., and Woody, J. N., 1994, *Lancet* 344, 1125-1127.
- 30 19. Engelmann, H., D. Aderka, M. Rubinstein, D. Rotman, and D. Wallah. 1989. A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. *J. Biol. Chem.* 264: 11974-11980.
20. Engelmann, H., D. Novick, and D. Wallah. 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.
- 35 21. Fantuzzi, G., et al., IL-18 regulation of IFN- γ production and cell proliferation as revealed in interleukin-1 β converting enzyme-deficient mice. *Blood*, 1998.91: p. 2118-2125.
22. Fiore, G., et al., Liver tissue expression of CD80 and CD95 antigens in chronic hepatitis C: relationship with biological and histological disease activities. *Microbios*, 1999.97 (386): p. 29-38
- 40 23. Galle, P. R., et al., Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med*, 1995.182 (5): p. 1223-30.

24. Gracie, A J, Forsey, R J, Chan, W L, Gilmour, A, Leung, B P, Greer, A R, Kennedy, K, Carter, R, Wei, X-Q, Xu, D., Field, M, Foulis, A, Liew, F Y, and Mannes, I B. (1999). *J. Clin. Inv.* 104: 1393-1401
25. Grantham (1974), *Science*, 185:862-864.
- 5 26. Grove, J., et al., Association of a tumor necrosis factor promoter polymorphism with susceptibility to alcoholic steatohepatitis [see comments]. *Hepatology*, 1997. 26 (1): p. 143-6.
27. Gryczan, T., "The Molecular Biology of the Bacilli", Academic Press, NY (1982), pp. 307-329).
28. Gutkind, J. S., et al., A novel c-fgr exon utilized in Epstein-Barr virus-infected B lymphocytes but not in normal monocytes. *Molec. Cell. Biol.*, 1991.11: p. 1500-1507.
- 10 29. Harada, K., et al., In situ nucleic acid hybridization of cytokines in primary biliary cirrhosis: predominance of the Th1 subset. *Hepatology*, 1997.25 (4): p. 791-6.
30. Heremans, H., J. Van Damme, C. Dillen, R. Dijkmans, and A. Billiau. 1990. Interferon gamma, a mediator of lethal lipopolysaccharide-induced Shwartzman like shock reactions in mice. *J. Exp. Med.* 171: 1853-69 issn: 0022-1007.
- 15 31. Hill, D. B., et al., Increased plasma interleukin-6 concentrations in alcoholic hepatitis. *J Lab Clin Med*, 1992.119 (5): p. 547-52.
32. Hill, D. B., L. S. Marsano, and C. J. McClain, Increased plasma interleukin-8 concentrations in alcoholic hepatitis. *Hepatology*, 1993.18: p. 576-580.
33. Hiramatsu, N., et al., Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 1994.19 (6): p. 1354-9.
- 20 34. Huang, Y. S., et al., Serum levels of interleukin-8 in alcoholic liver disease: relationship with disease stage, biochemical parameters and survival. *J Hepatol*, 1996.24 (4): p. 377-84.
35. Iio, S., et al., Serum levels of soluble Fas antigen in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol*, 1998.29 (4): p. 517-23.
36. Izaki, K. (1978) *Jpn. J. Bacteriol.* 33: 729-742).
- 25 37. John, J. F., et al. (1986) *Rev. Infect. Dis.* 8: 693-704).
38. Kahiwamura, S., Okamura, H. (1998), *Nippon. Rinsho.* 56, pp. 1798-1806.
39. Kendall, K. J. et al. (1987) *J. Bacteriol.* 169: 4177-4183).
40. Kim SH, Eisenstein M, Reznikov L, Fantuzzi G, Novick D, Rubinstein M, Dinarello CA. Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL 18 binding protein to inhibit IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 ; 97: 1190-1195.
- 30 41. Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallon B, Moore MA, Vilcek J, Daddona P, et al. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol* 1993 Nov 30: 16 1443-53
42. Kohno, K., J. Kataoka, T. Ohtsuki, Y. Suemoto, I. Okamoto, M. Usui, M. Ikeda, and M. Kurimoto. 1997. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J. Immunol.* 158: 1541-1550.
- 35 43. Lee, M., et al., Expression of Th1 and Th2 type cytokines responding to HBsAg and HBxAg in chronic hepatitis B patients. *J Korean Med Sci*, 1999.14 (2): p. 175-81.
44. Lukkari, T. A., et al., Short-term ethanol exposure increases the expression of Kupffer cell CD14 receptor and lipopolysaccharide binding protein in rat liver. *Alcohol Alcohol*, 1999.34 (3): p. 311-9.
- 40 45. Luo, K. X., et al., In situ investigation of Fas/FasL expression in chronic hepatitis B infection and related liver

- diseases. *J Viral Hepat*, 1997.4 (5): p. 303-7.
46. Maliszewski, C. R., T. A. Sato, T. Vanden Bos, S. Waugh, S. K. Dower, J. Slack, M. P. Beckmann, and K. H. Grabstein. 1990. Cytokine receptors and B cell functions. I. Recombinant soluble receptors specifically inhibit IL-1- and IL-4- induced B cell activities in vitro. *J. Immunol.* 144: 3028-3033.
- 5 47. Maniatis, T., in "Cell Biology: A Comprehensive Treatise, Vol. 3: Gene Expression", Academic Press, NY, pp. 563-608 (1980).
48. Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
49. Martinez, F., et al., Ethanol and cytokine secretion. *Alcohol*, 1992.9 (6): p. 455-8.
- 10 50. McClain, C. J., et al., Tumor necrosis factor and alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*, 1998.22 (5 Suppl) : p. 248S-252S.
51. McClain, C. J. and D. A. Cohen, Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatology*, 1989.9 (3): p. 349-51.
- 15 52. Micallef, M. J., T. Ohtsuki, K. Kohno, F. Tanabe, S. Ushio, M. Namba, T. Tanimoto, K. Torigoe, M. Fujii, M. Ikeda, S. Fukuda, and M. Kurimoto. 1996. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells : synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur-J-Immunol* 26: 1647-51 issn: 0014-2980.
53. Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acid Res.* 18: 5322-5328.
- 20 54. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, Luzzza F, Fusco A, Pallone F. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* 1999 ; 163: 143-147.
55. Muhl H, Kampf H, Bosmann M, Frank S, Radeke H, Pfeilschifter J. Interferon gamma mediates gene expression of IL-18 binding protein in nonleukocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 ; 267: 960-963.
56. Nakamura, K., H. Okamura, M. Wada, K. Nagata, and T. Tamura. 1989. Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infect-immun* 57: 590-5 issn: 0019-9567.
- 25 57. Nanji, A. A., et al., Activation of nuclear factor K B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology*, 1999.30 (4): p. 934-43.
58. Nishimura, T. and A. Ohta, A critical role for antigen-specific Th1 cells in acute liver injury in mice. *J. Immunol*, 1999.162: p. 6503-6509.
- 30 59. Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein. 1994. The Human Interferon alpha/beta Receptor-Characterization and Molecular Cloning. *Cell* 77: 391-400.
60. Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein. 1992. Soluble Interferon-alpha Receptor Molecules Are Present in Body Fluids. *FEBS Lett* 314: 445-448.
61. Novick, D., H. Engelmann, D. Wallah, and M. Rubinstein. 1989. Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J. Exp. Med.* 170: 1409-1414.
- 35 62. Novick, D, Kim, S-H, Fantuzzi, G, Reznikov, L, Dinarello, C, and Rubinstein, M (1999). *Immunity* 10, 127-136.
63. Ohlinger, W., et al., Immunohistochemical detection of tumor necrosis factor- α , other cytokines and adhesion molecules in human livers with atcohoficr hepatitis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1993.423 (3): p. 169-76.
- 40 64. Okamura, H., H. Tsutsui, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, K. Hattori, K. Akita, M. Namba, F. Tanabe, K. Konishi, S. Fukuda, and M. Kurimoto. 1995. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature* 378: 88-91.
65. Okamoto, T., et al., Induction of Fas ligand and Fas antigen mRNA expressions in interferon- γ transgenic mouse liver. *Jpn J Pharmacol*, 1998.78 (2): p. 233-5.

66. Okazaki, M., et al., Hepatic Fas antigen expression before and after interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci*, 1996.41 (12): p. 2453-8.
67. Okamoto, T., K. Yamamura, and O. Hino, The mouse interferon- γ transgene chronic hepatitis model (Review). *Int J Mol Med*, 1999.3 (5): p. 517-20.
- 5 68. Olee T, Hashimoto S, Quach J, Lotz M. (1999). *J Immunol* 162: 2 1096-100
69. Parnet, P, Garka, K E, Bonnert, T P, Dower, S K, and Sims, J E. (1996), *J. Biol. Chem.* 271,3967-3970.
70. Plater-Zyberk C, Bonnefoy JY. Marked amelioration of established collagen induced arthritis by treatment with antibodies to CD23 in vivo. *Nat Med* 1995 ; 1: 781-785.
- 10 71. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadharm J, Smith MF, Jr., Foley E, Moskaluk CA, Bickston SJ, Cominelli F. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 1999 ; 162: 6829-6835.
72. Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Baumann R, Poindron P, Duclos B. Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Clin Immunol* 1996; 16: 144-150.
- 15 73. Rothe, H., N. A. Jenkins, N. G. Copeland, and H. Kolb. 1997. Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novelcytokine, IGIF, which is located near Idd2. *J-Clin-Inves.* t 99: 469-74 issn: 0021-9738.
74. Saha N, Moldovan F, Tardif G, Pelletier JP, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. (1999). *Arthritis Rheum* 42: 8 1577-87.
75. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and M. T., *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. ed. 1989, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- 20 76. Simonet, W. S., et al., Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997.89 (2): p. 309-319.
77. Sheron, N., et al., Elevated plasma interleukin-6 and increased severity and mortality in alcoholic hepatitis. *Clin Exp Immunol*, 1991.84 (3): p. 449-53.
- 25 78. Sompayrac, L. H. and K. L. Danna, Efficient infection of monkey cells with DNA of simian virus 40. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 1981.78: p. 7575-7578.
79. Sparks, C. A., et al., Assignment of the nuclear mitotic apparatus protein NuMA gene to human chromosome 11q13. *Genomics*, 1993.17: p. 222-224.
80. Su, G. L., et al., CD14 and lipopolysaccharide binding protein expression in a rat model of alcoholic liver disease. *Am J Pathol*, 1998.152 (3): p. 841-9.
- 30 81. Taieb, J., et al., Raised plasma soluble Fas and Fas-ligand in alcoholic liver disease [letter]. *Lancet*, 1998.351 (9120): p. 1930-1.
82. Triantaphyllopoulos, K A, Williams, R, Tailor, H, and Chernakovsky, Y (1999). *Arthritis and Rheumatism* 42,90-99.
83. Tsutsui, H., K. Nakanishi, K. Matsui, K. Higashino, H. Okamura, Y. Miyazawa, and K. Kaneda. 1996. IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J. Immunol.* 157: 3967-73 issn: 0022-1767.
- 35 84. Tsuij, H., Mukaida, N., Harada A., Kaneko, S., Matsushita, E., Nakanuma, Y., Tsutsui, H., Okamura, H., Nakanishi, K., Tagawa, m Y, Iwakura, Y., Kobayashi, K., and Matsushima, K. (1999), *J. Immunol.* 162, pp. 1049-1055.
85. Tucci, A., James, H., Chicheportiche, R., Bonnefoy, J. Y., Dayer, J. M., and Zubler, R. H., 1992, *J. Immunol.* 148, 2778-2784.
- 40 86. Ushio, S., M. Namba, T. Okura, K. Hattori, Y. Nukada, K. Akita, F. Tanabe, K. Konishi, M. Micallef, M. Fujii, K. Torigoe, T. Tanimoto, S. Fukuda, M. Ikeda, H. Okamura, and M. Kurimoto. 1996. Cloning of thecDNA for human IFN-gamma inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J.*

Immunol. 156: 4274-4279.34. Okayama, H. and Berg, P. (1983) A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 3: 280-289.

87. Williams RO, Mason LJ, Feldmann M, Maini RN. Synergy between ant ; ; CD4 and anti-tumor necrosis factor in the amelioration of established collagen-induced arthritis. Proc Natl Acad Sci U S A 1994 Mar 29 91: 7 2762-6.

5 88. Yasuda, H., et al., Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. Endocrinology, 1998.139: p. 1329-1337.

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un inhibidor de IL-18 seleccionado entre el grupo de un anticuerpo de IL-18 y una proteína de unión a IL-18, o una isoforma, una muteína, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado del mismo que tiene esencialmente la misma actividad que una proteína de unión a IL-18, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una lesión hepática crónica seleccionada entre el grupo que consiste en hepatitis alcohólica.
2. El uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo de IL-18 es un anticuerpo de IL-18 humanizado.
3. El uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo de IL-18 es un anticuerpo de IL-18 humano.
4. El uso según la reivindicación 1, en el que la proteína de unión a IL-18 está PEGilada.
- 10 5. El uso según la reivindicación 1, en el que el inhibidor de IL-18 es una proteína fusionada que comprende la totalidad o parte de una proteína de unión a IL-18 fusionada a la totalidad o parte de una inmunoglobulina y en el que la proteína fusionada se une a IL-18.
6. El uso según la reivindicación 5, en el que la proteína fusionada comprende la totalidad o parte de la región constante de una inmunoglobulina.
7. El uso según la reivindicación 6, en el que la inmunoglobulina es del isotipo IgG1 o IgG2.
- 15 8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medicamento comprende adicionalmente un interferón.
9. El uso según la reivindicación 8, en el que el interferón es interferón- β .
10. El uso según la reivindicación 8 ó 9, en el que el inhibidor de IL-18 es usado de forma simultánea, secuencial o separada con el interferón.
- 20 11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medicamento comprende adicionalmente un antagonista del factor de necrosis tumoral (TNF).
12. El uso según la reivindicación 11, en el que el antagonista del TNF es un receptor I de TNF soluble (TBPI) y/o receptor II de TNF soluble (TBPII).
- 25 13. El uso según la reivindicación 11 ó 12, en el que el inhibidor de IL-18 y/o el interferón se usan de forma simultánea, secuencial o separada con el antagonista de TNF.
14. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medicamento comprende adicionalmente un inhibidor de COX.
15. El uso según la reivindicación 14, en el que el inhibidor de COX es un inhibidor de COX-2.
- 30 16. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor de IL-18 es usado en una cantidad de aproximadamente 0,0001 a 10 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 0,01 a 5 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 0,1 a 3 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 1 a 2 mg/kg de peso corporal.
17. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor de IL-18 es usado en una cantidad de aproximadamente 0,1 a 1.000 μ g/kg de peso corporal o 1 a 100 μ g/kg de peso corporal o aproximadamente 10 a 50 μ g/kg de peso corporal.
- 35 18. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor de IL-18 es administrado por vía subcutánea.
19. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor de IL-18 es administrado por vía intramuscular.
- 40 20. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor de IL-18 es administrado diariamente.

21. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor de IL-18 es administrado en días alternados.

5 22. Uso según de un vector de expresión que comprende la secuencia codificadora de la proteína de unión a IL-18 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una lesión hepática crónica seleccionada entre el grupo que consiste en hepatitis alcohólica.

23. Uso según la reivindicación 22, para una terapia génica.

24. Uso de una célula que ha sido genéticamente modificada para producir un inhibidor de IL-18, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una lesión hepática crónica seleccionada entre el grupo que consiste en hepatitis alcohólica.

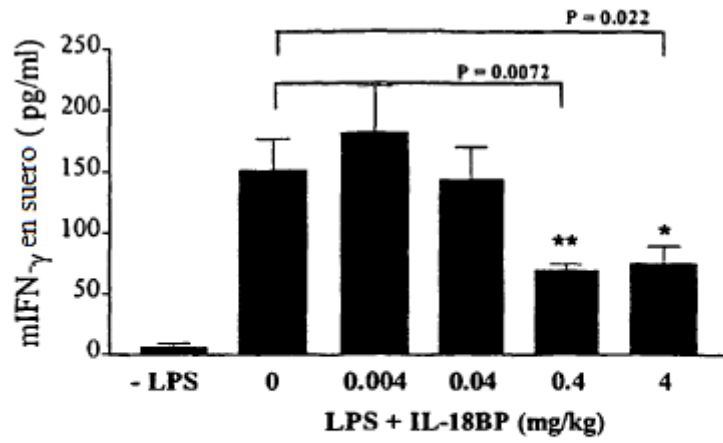


Fig. 1

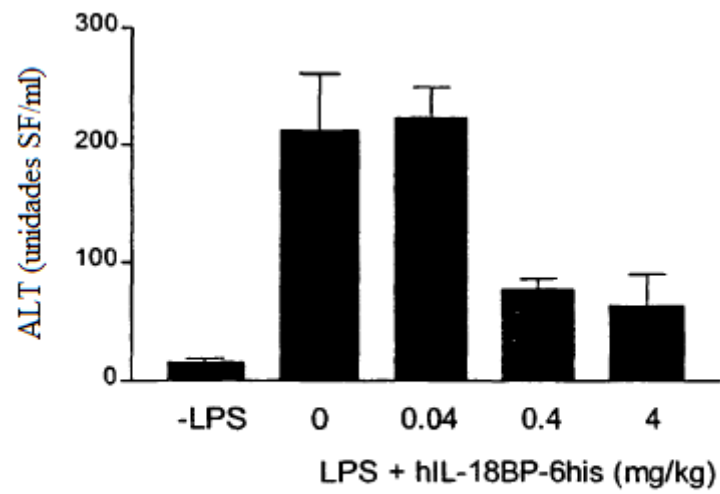


Fig. 2

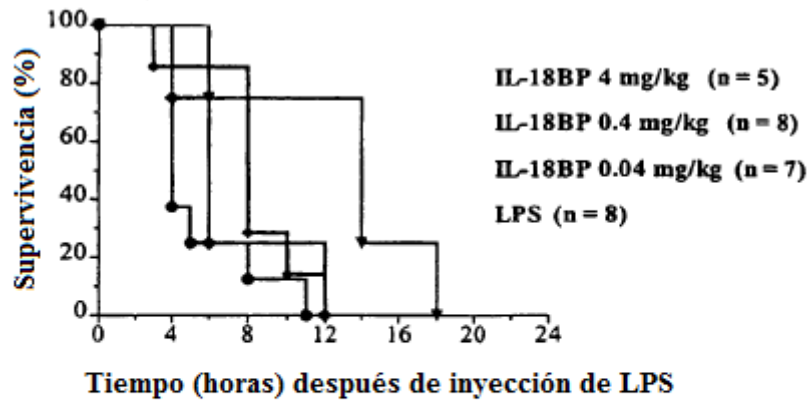


Fig. 3

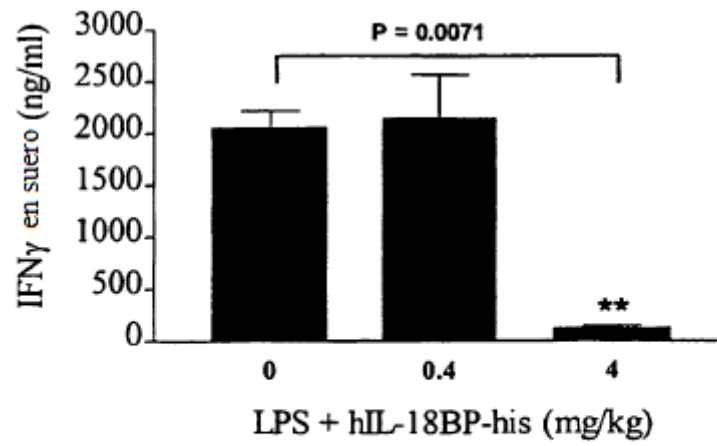


Fig. 4

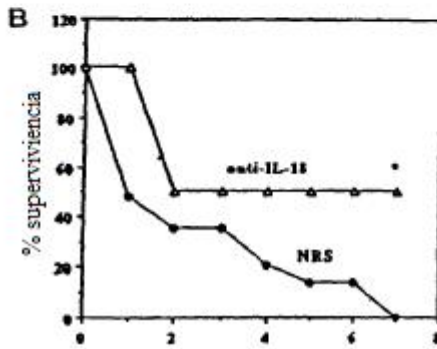
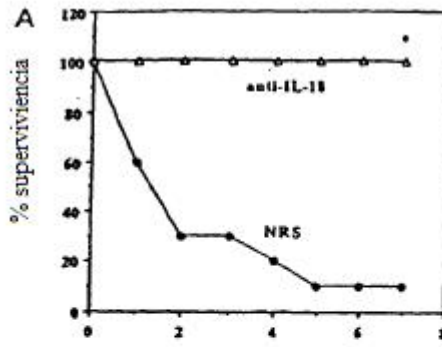


Fig. 5

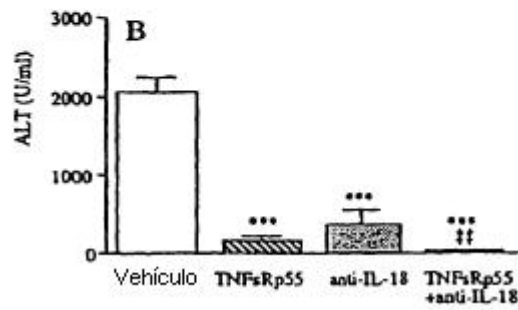
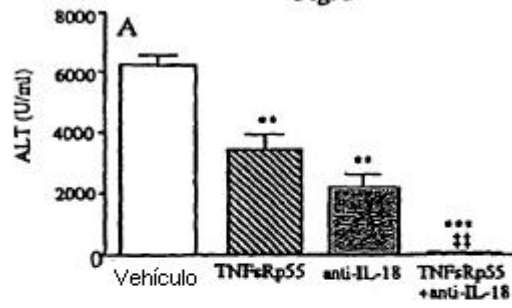


Fig. 6

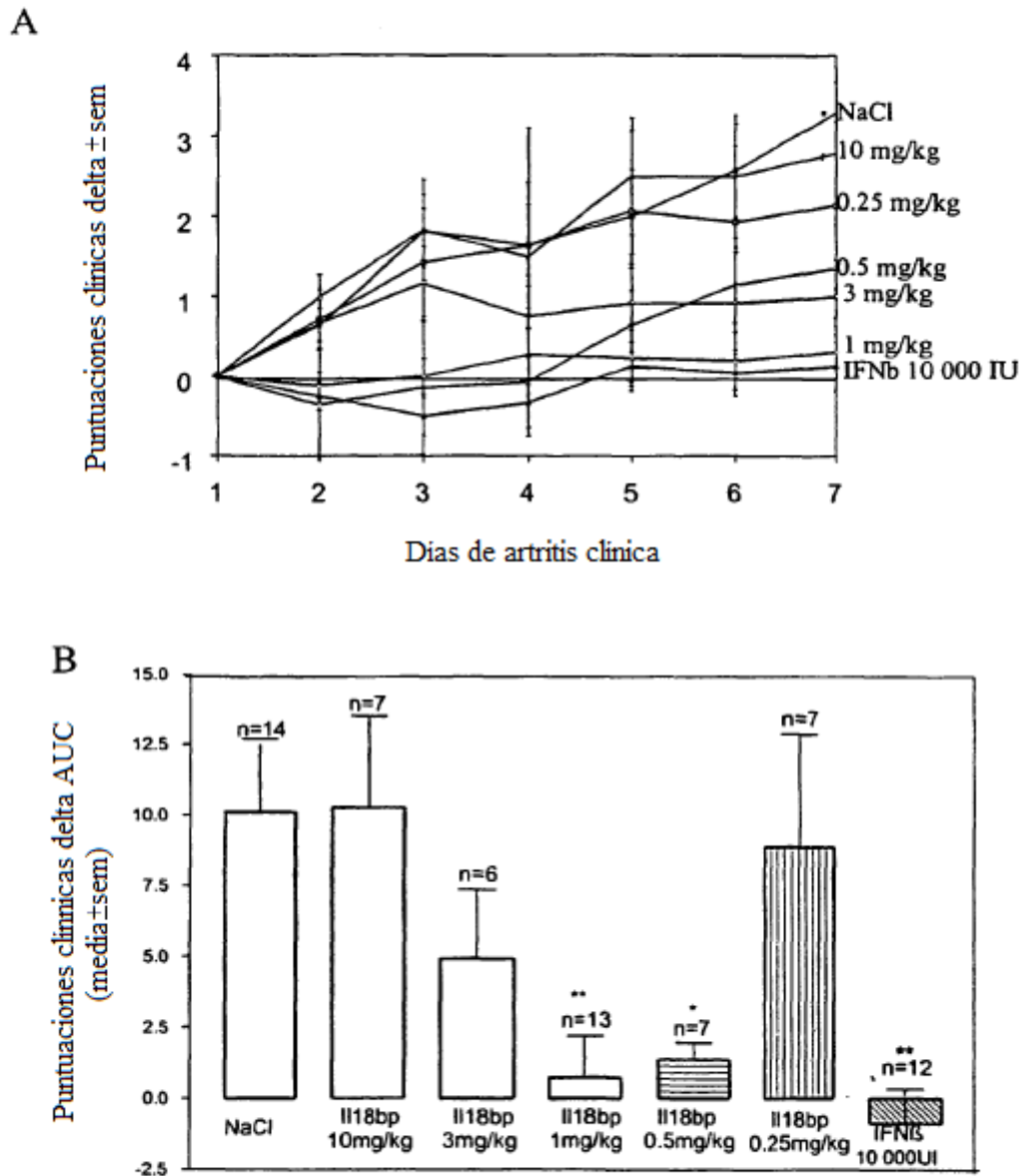


Fig. 7

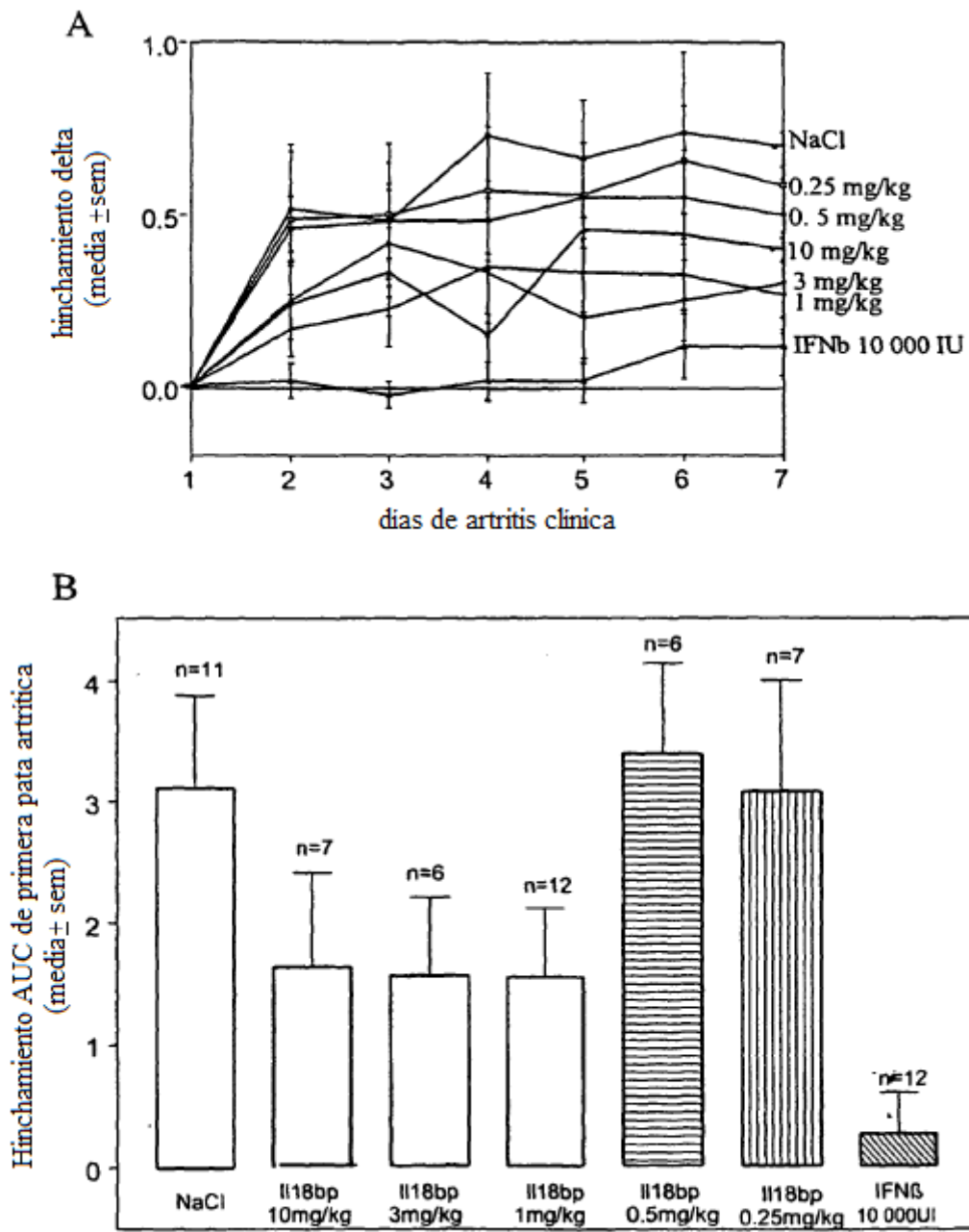


Fig. 8

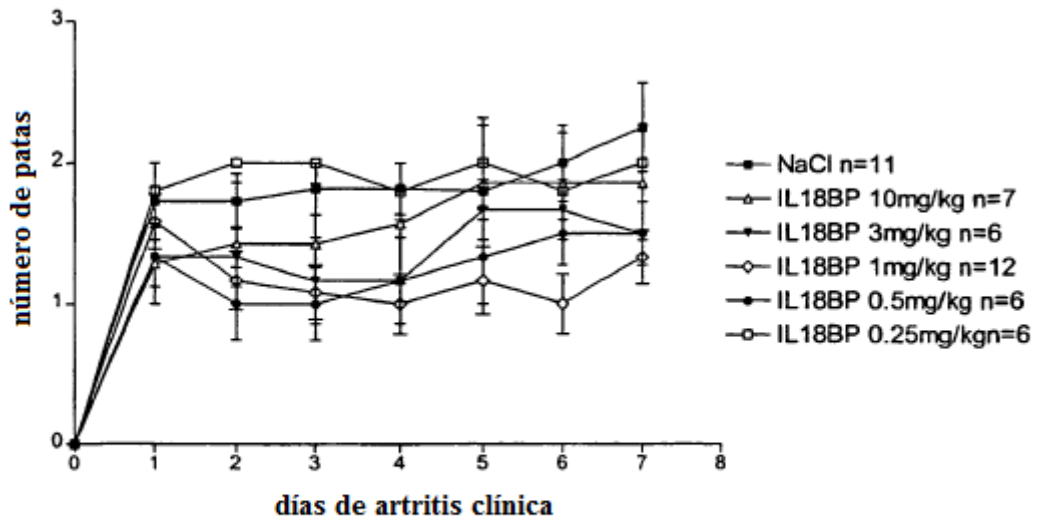


Fig. 9

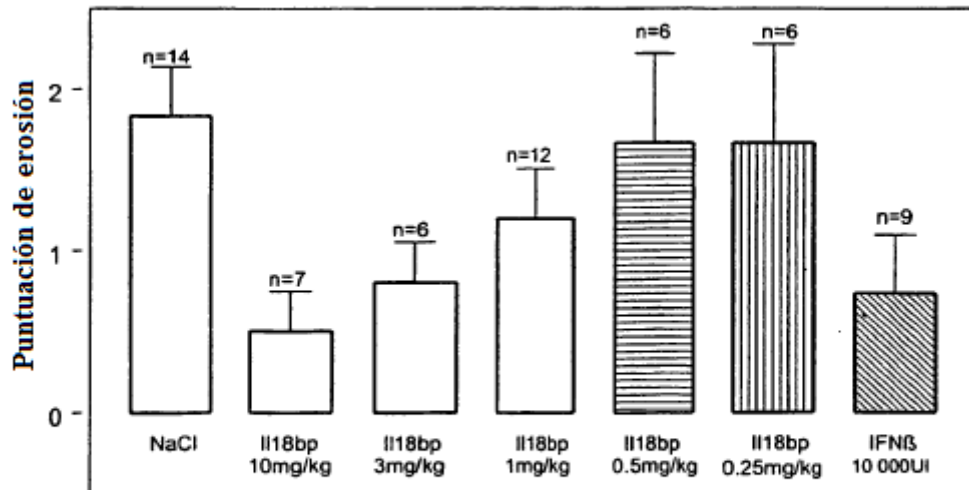


Fig. 10

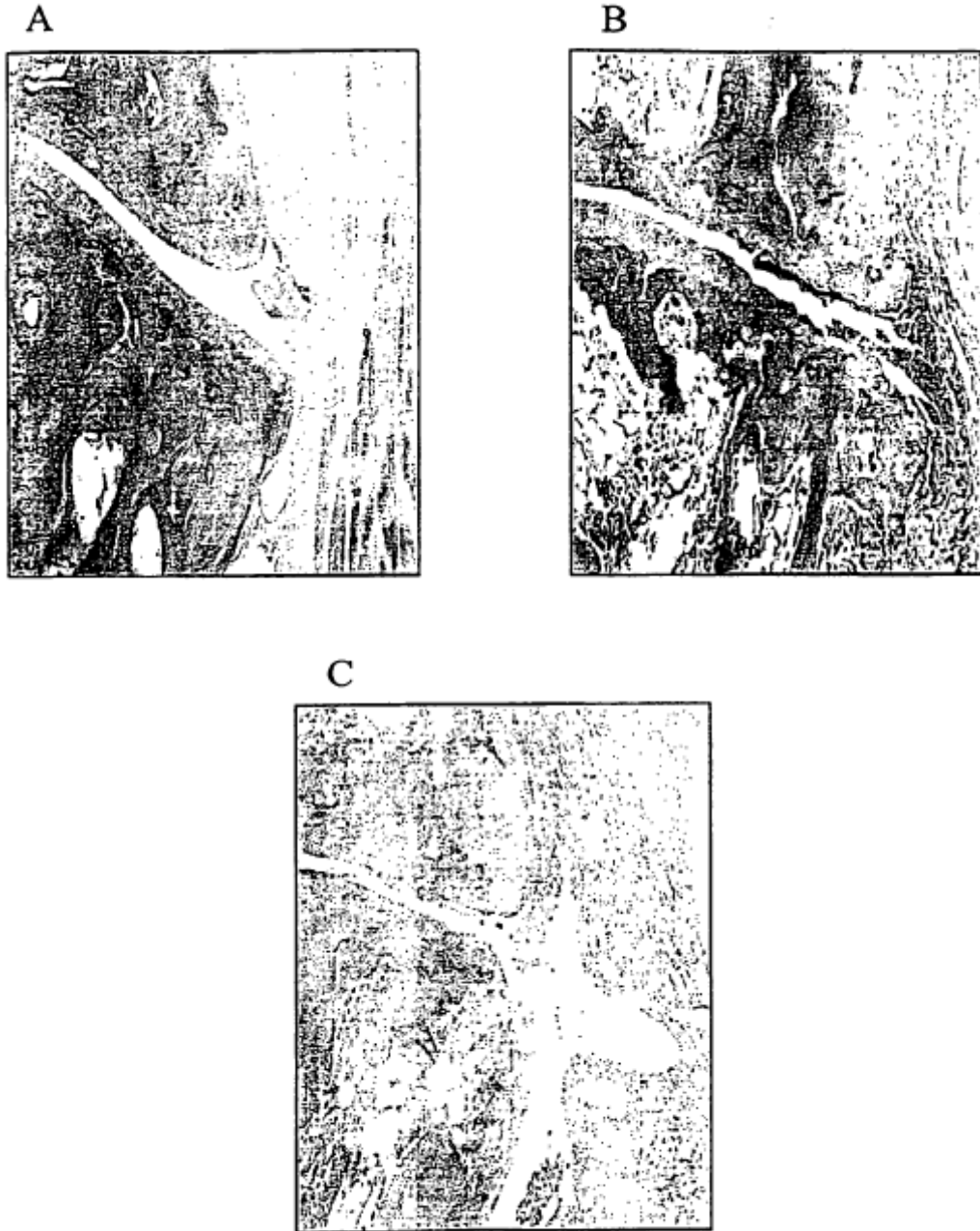


Fig. 11

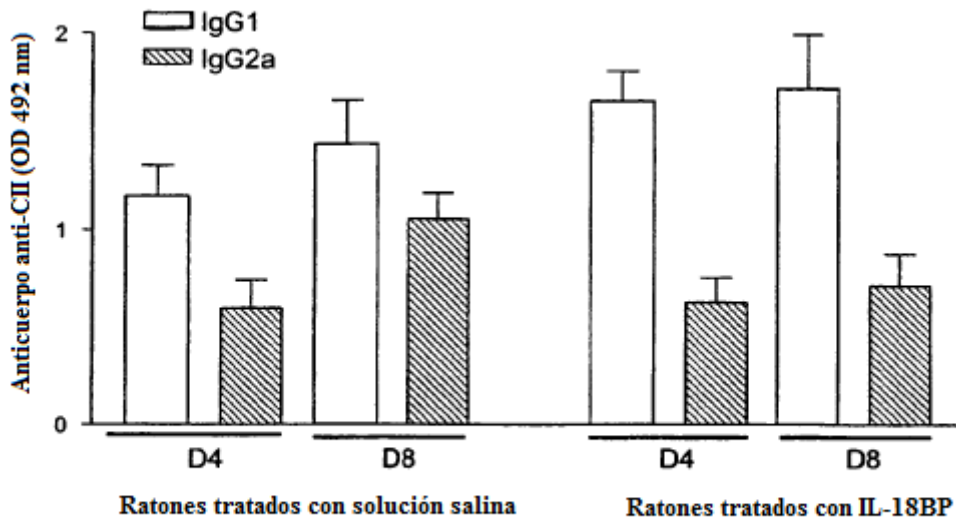


Fig. 12

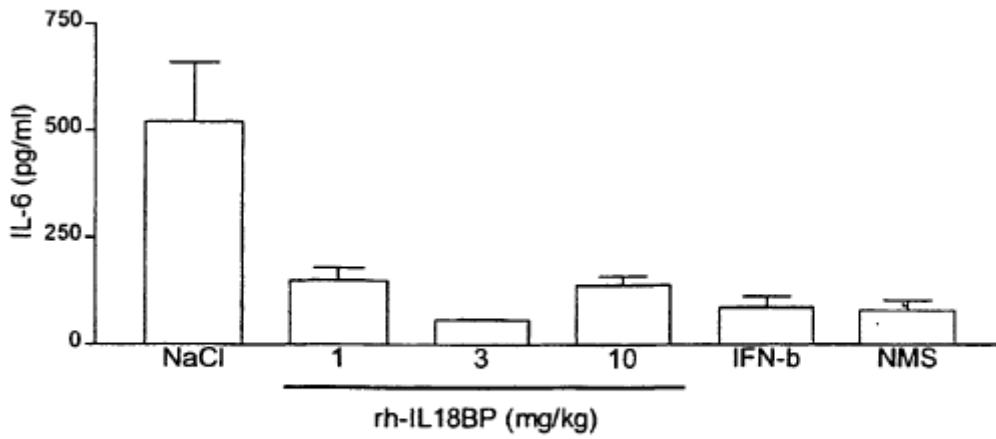


Fig.13

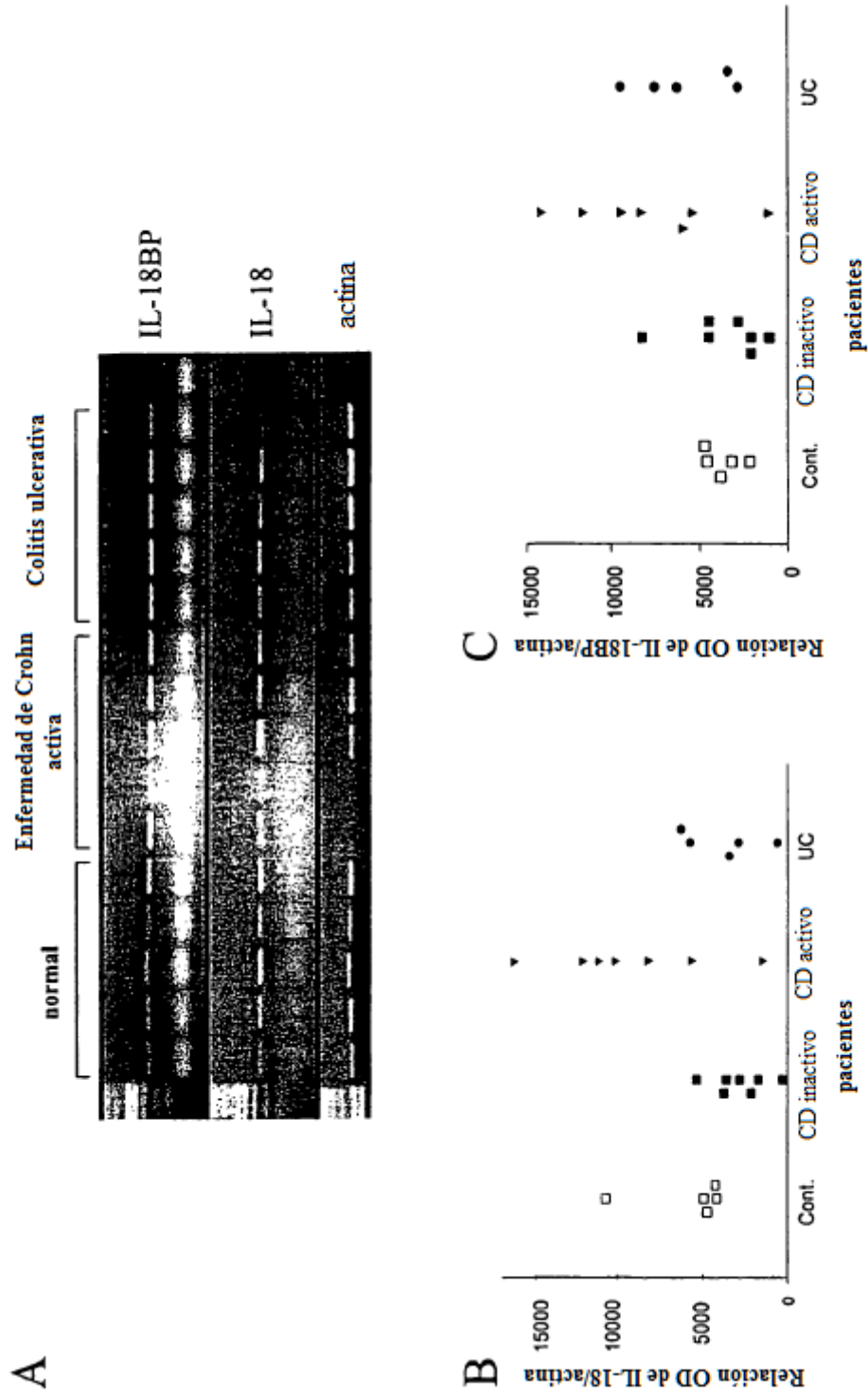


Fig. 14

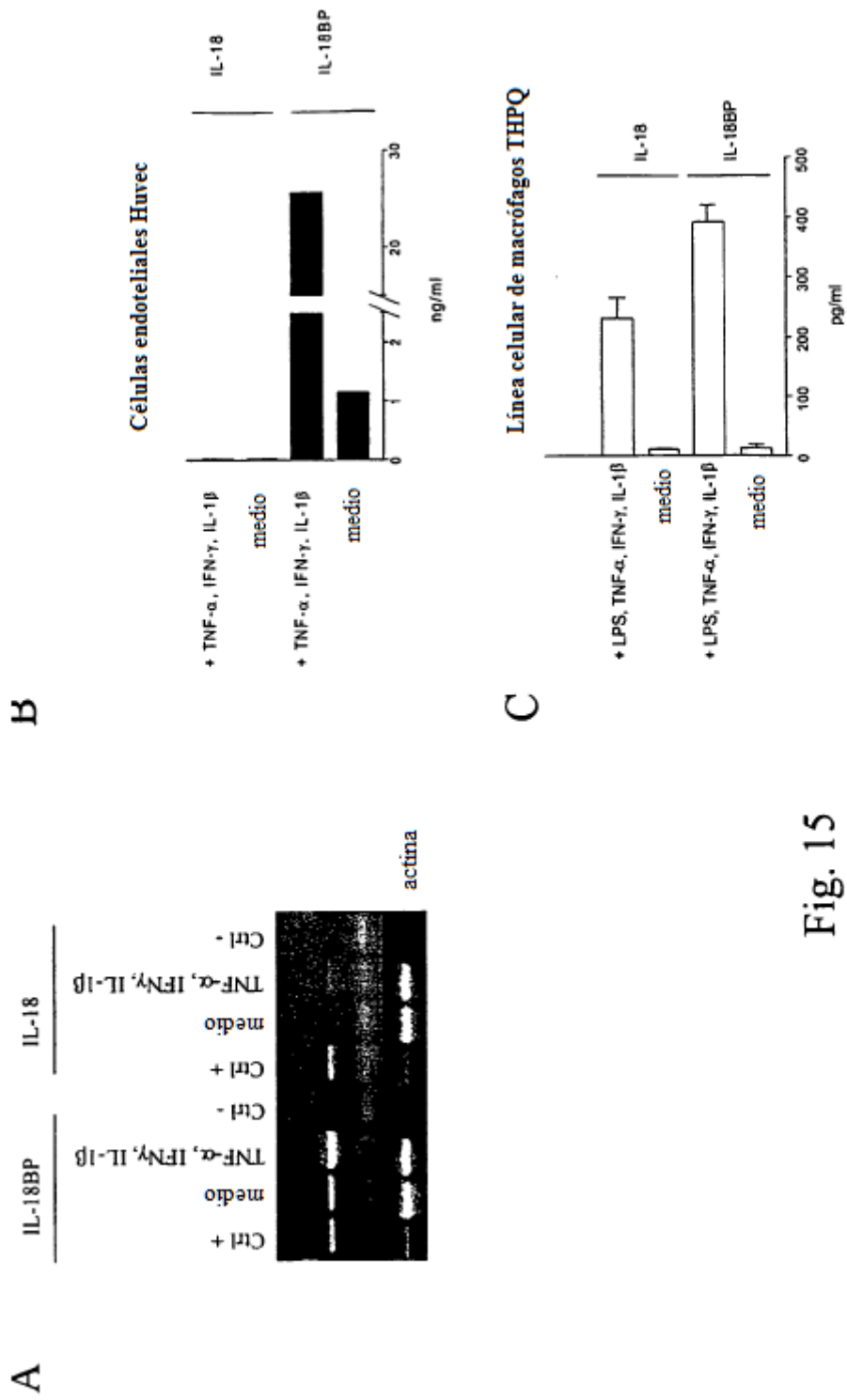


Fig. 15

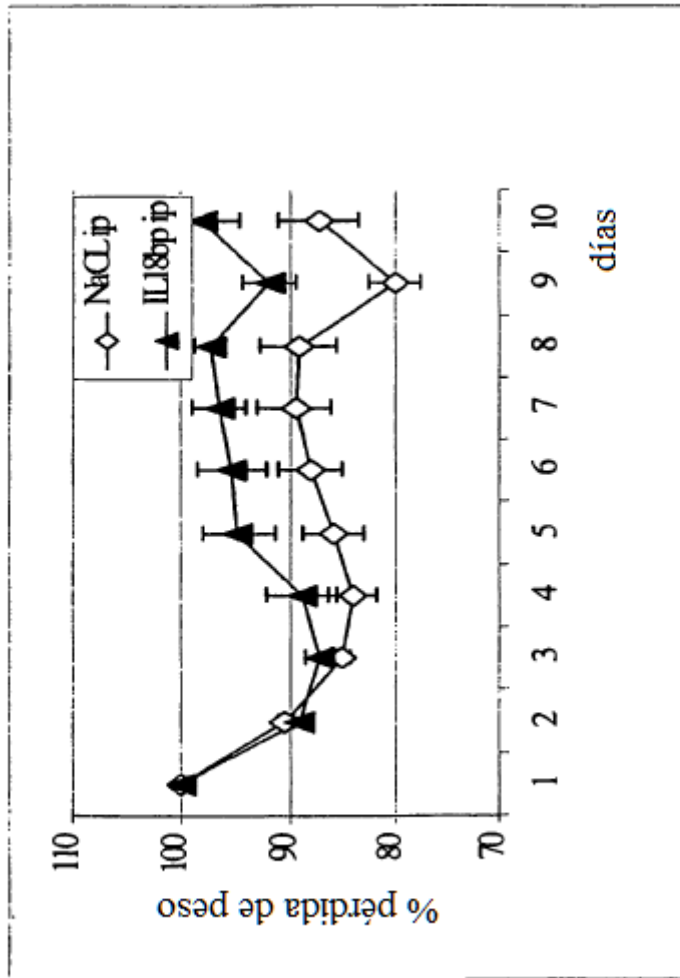


Fig.16

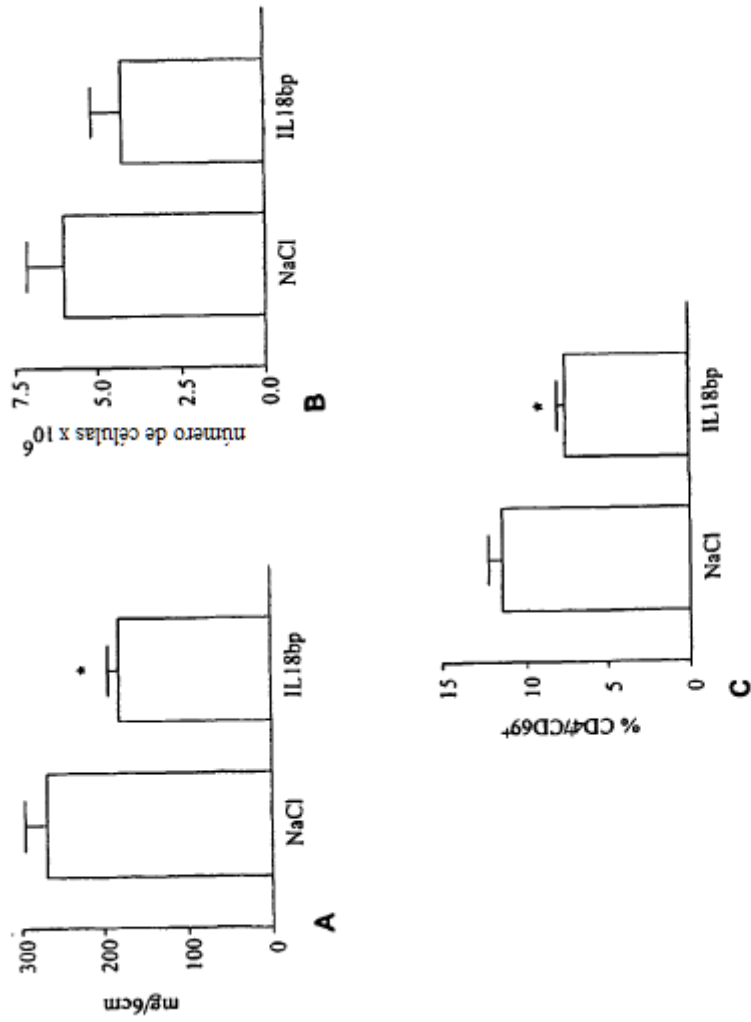


Fig. 17

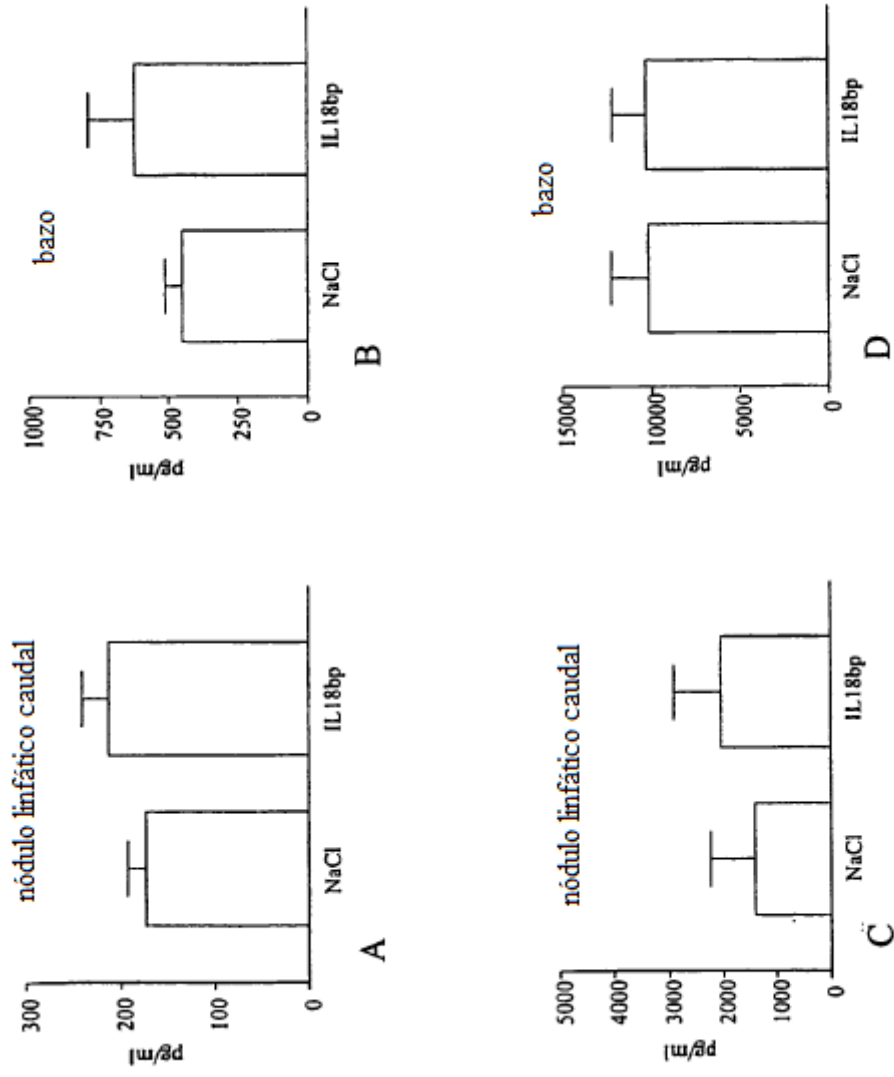


Fig. 18

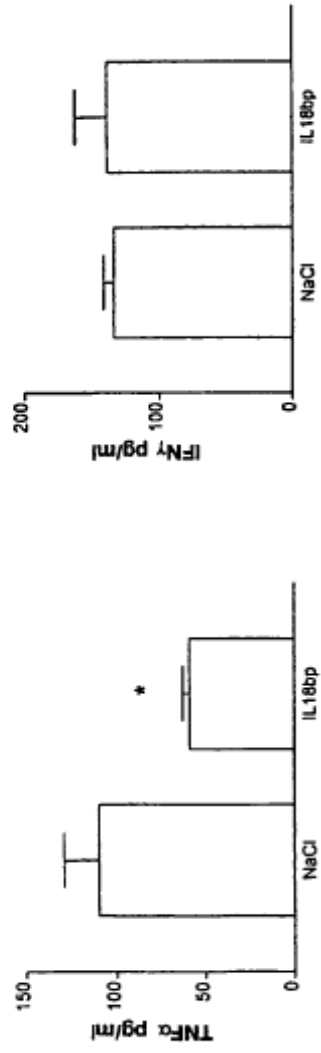


Fig. 19