

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 084**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2002 PCT/EP2002/05666**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2002 WO02096456**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2002 E 02740641 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017 EP 1390070**

54 Título: **Uso de inhibidores de IL-18 para tratar o prevenir lesiones en el SNC**

30 Prioridad:

25.05.2001 EP 01112067

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

15.06.2017

73 Titular/es:

**ARES TRADING S.A. (100.0%)
ZONE INDUSTRIELLE DE L'OURIETTAZ
1170 AUBONNE, CH**

72 Inventor/es:

SHOHAMI, ESTHER

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 617 084 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 para tratar o prevenir lesiones en el SNC

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a las condiciones patológicas del cerebro. Más específicamente, se refiere a la utilización de un inhibidor de la IL-18 para el tratamiento y/o la prevención de lesiones en el SNC (sistema nervioso central), en particular de las lesiones traumáticas del cerebro.

Antecedentes de la invención

10 En 1989 se describió una actividad del suero, inducida por endotoxina que inducía interferón γ (IFN- γ) obtenido a partir de células esplénicas de ratón (Nakamura et al., 1989). Esta actividad del suero no funcionaba como un inductor directo del IFN- γ sino más bien como un coestimulante junto con IL-2 o mitógenos. Una tentativa de purificar la actividad a partir de suero de ratón postendotoxina reveló una proteína aparentemente homogénea de 50-55 kDa. Dado que otras citoquinas pueden actuar como coestimulantes para la producción de IFN- γ , el fracaso para neutralizar anticuerpos en IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 o TNF para neutralizar la actividad del suero sugería que se trataba de un factor distinto, en 1995, los mismos científicos demostraron que el coestimulante inducido por IFN- γ para la producción de IFN- γ se hallaba presente en extractos de hígado de ratones preacondicionados con *P. acnes* (Okamura et al., 1995). En este modelo, la población de macrófagos hepáticos (células de Kupffer) se expande y en estos ratones, una dosis baja de lipopolisacáridos (LPS) bacterianos que en los ratones no preacondicionados no es letal, se hace letal. El factor, denominado factor inductor de IFN- γ (IGIF) y posteriormente designado como interleuquina-18 (IL-18), fue purificado hasta homogeneidad a partir de 1.200 g de hígados de ratón tratados con *P. acnes*. Se utilizan oligonucleótidos degenerados a partir de secuencias de aminoácidos de IL-18 purificada para clonar un cADN de IL-18 murino. La IL-18 es una proteína de 18-19 kDa de 157 aminoácidos, que no tienen similitudes obvias con ningún péptido en las bases de datos. Los ARNs mensajeros para IL-18 e interleuquina-12 (IL-12) se detectan fácilmente en las células de Kupffer y en los macrófagos activados. La IL-18 recombinante induce la IFN- γ más potentemente que la IL-12, aparentemente a través de una vía separada (Micallef et al., 1996). De manera similar a la actividad del suero, inducida por endotoxina, la IL-18 no induce el IFN- γ por sí misma, sino que funciona primariamente como un coestimulante con los mitógenos o la IL-2. La IL-18 refuerza la proliferación de las células T, aparentemente por intermedio de una vía dependiente de IL-2, y refuerza la producción de citoquinas Th1 *in vitro* y presenta un sinergismo cuando se combina con la IL-12 en términos de una producción reforzada de IFN- γ (Maliszewski et al., 1990).

25 Después de haberse clonado una forma murina, se informó sobre la secuencia de cADN humano para la IL-18 en 1996 (Ushio et al., 1996).

30 Mediante la clonación de la IL-18 a partir de tejidos afectados y habiendo estudiado la expresión génica de la IL-18, se encontró una asociación de esta citoquina con una enfermedad autoinmune. El ratón NOD (non-obese diabetic, diabético no obeso) desarrolla espontáneamente una insulinitis autoinmune y diabetes, que pueden acelerarse y sincronizarse mediante una simple inyección de ciclofosfamida. Se demostró que el mRNA de IL-18 mediante PCR de transcriptasa inversa en el páncreas de ratones NOD durante las etapas tempranas de la insulinitis. Los niveles de mRNA de IL-18 aumentaron rápidamente con el tratamiento con ciclofosfamida y precedieron una elevación en IFN- γ mRNA, y de la diabetes subsiguiente. Es interesante comprobar que esta cinética mimetiza la de la IL-12-p40 mRNA, resultando una estrecha correlación de los niveles individuales de mRNA. La clonación del cADN de IL-18 a partir del ARN de páncreas seguida por secuenciación reveló la identidad con la secuencia de IL-18 clonada a partir de células de Kupffer y en los macrófagos preactivados *in vivo*. También los macrófagos de ratón NOD respondieron a la ciclofosfamida con la expresión del gen de IL-18 mientras que los macrófagos de ratones Balb/c tratados en paralelo no lo hicieron. Por lo tanto, la expresión de la IL-18 se regula de manera anormal en los ratones NOD autoinmunes y está estrechamente asociada con el desarrollo de la diabetes (Rothe et al., 1997).

35 La IL-18 desempeña un papel potencial en la inmunorregulación o la inflamación por el hecho de aumentar la actividad funcional del ligando Fas sobre las células Th1 (Conti et al., 1997). La IL-18 también se expresa en la corteza adrenal por lo que podría ser un neuroinmunomodulador secretado, desempeñando un rol importante en el funcionamiento del sistema inmune después de una experiencia estresante (Chater, 1986).

40 In vivo, la IL-18 se forma por desdoblamiento de la pro-IL-18, y su actividad endógena parece estar relacionada con la producción de IFN- γ en la letalidad mediado por *P. acnes* y LPS. La IL-18 se produce a partir de su precursor por la enzima convertidora de IL-1 β (enzima convertidora de la IL-1 beta, ICE, caspasa-1).

45 El receptor de IL-18 consiste en por lo menos dos componentes, que cooperan en la ligación al ligando. Se encontraron sitios de liberación de alta y baja afinidad para la IL-18 en células T estimuladas por IL-12 murinas (Yoshimoto et al., 1998), lo que sugiere un complejo de receptor de cadena múltiple. Hasta ahora se han identificado dos subunidades de receptor, ambas pertenecientes de la familia de los receptores de IL-1 y (Parnet et al., 1996). La transducción de la señal de la IL-18 implica la activación de NF- κ B (DiDonato et al., 1997).

50 Recientemente, una proteína soluble provista de una elevada actividad para la IL-18 ha sido aislada a partir de orina humana, y se han descrito los cADNs humano y de ratón (Novick et al., 1999; WO 99/09063). La proteína ha recibido la

denominación de proteína que se liga a la IL-18 (IL-18BP).

Más particularmente, en el documento WO 99/09063 se divulgan proteínas que se ligan a la IL-18 y proteínas homólogas a IL-18BP viralmente codificadas, muteínas, derivados funcionales, fragmentos activos (ver página 3, líneas 28-30), capaces de ligarse a la IL-18. Los diversos IL-18BPs pueden emplearse en el tratamiento y alivio de condiciones en las que interviene la IL-18 en un espectro muy amplio de enfermedades tales como las enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, trastornos isquémicos del corazón, lesión isquémica del cerebro.

La IL-18BP no es el dominio extracelular de uno de los receptores de IL-18 conocidos, sino que se trata de una proteína secretada, de circulación normal. Forma parte de una novedosa familia de proteínas secretadas. La familia incluye además varias proteínas codificadas por Poxvirus que tienen una elevada homología con respecto a la IL-18BP (Novick et al., 1999). La IL-18BP se expresa constitutivamente en el bazo, forma parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas, y presenta una limitada homología con respecto al receptor de IL-1 tipo II; su gen ha sido localizado en el cromosoma humano 11q13, y no se encontró un exón que codificara para un dominio transmembrana en una secuencia genómica de 8,3 kb (Novick et al., 1999).

Cuatro isoformas humanas y dos isoformas de IL-18BP, resultantes del desdoblamiento de mRNA han sido halladas en diversas bibliotecas y se las ha expresado, purificado y evaluado para establecer su ligación y neutralización de las actividades biológicas de la IL-18 (Kim et al., 2000). La isoforma a de IL-18 humana (IL-18BP_a) presentó la máxima afinidad para IL-18 con una velocidad constante, un coeficiente de desintegración lenta, y una constante de disociación (K_d) de 399 pM. La IL-18BP_c comparte el dominio I_G de la IL-18BP_a con excepción de los 29 aminoácidos C terminales; el K_d de IL-18BP_c es 15 veces inferior (2,94 nM). Sin embargo, la IL-18BP_a y la IL-18BP_c neutralizan la IL-18 >95% con un exceso molar de dos. Las isoformas IL-18BP_b e IL-18BP_d carecen de un dominio I_G completo y carecen de la capacidad de ligarse a o de neutralizar la IL-18. Las isoformas IL-18BP_c e IL-18BP_d, que poseen el mismo dominio I_G, también neutralizan >95% la IL-18 con un exceso molar de dos. Sin embargo, la IL-18BP_d murino, que comparte un motivo C terminal común con la IL-18BP_a humana, también neutraliza la IL-18 humana. Mediante modelación molecular se identificó un gran sitio de ligación electrostático e hidrófobo mixto en el dominio I_G de IL-18BP, lo que podría explicar su elevada afinidad al ligando (Kim et al., 2000).

La expresión "lesión traumática del cerebro (TBI, traumatic brain injury)", también simplemente llamada lesión de la cabeza, o lesión cerrada de la cabeza (CHI, closed head injury), se refiere a una lesión del sistema nervioso central en donde existe un daño al cerebro causado por un golpe exterior a la cabeza. Suele suceder durante accidentes de automóvil o de motocicleta, pero también puede suceder como resultado de casi ahogamiento, ataque cardíaco, accidente cerebrovascular e infecciones. Este tipo de lesión traumática del cerebro podría habitualmente deberse a la falta de oxígeno o de suministro de sangre al cerebro, por lo que puede recibir la denominación de "lesión anóxica".

Sucede una lesión cerrada de la cabeza cuando hay un golpe a la cabeza como en un accidente con vehículos motores o una caída. En este caso, el cráneo golpea contra un objeto estacionario y el cerebro, que se halla dentro del cráneo, gira y se retuerce alrededor de su eje (el tallo cerebral), lo que causa un daño localizado o difundido. Asimismo, el cerebro, que es una masa blanda rodeada por un fluido que le permite "flotar", puede rebotar contra el cráneo, resultando un mayor daño.

Puede haber un período de pérdida de conciencia inmediatamente después del trauma, que puede durar minutos, semanas o meses. Debido al retorcimiento y rebote, el paciente con una lesión traumática del cerebro usualmente recibe daños o magulladuras en muchas partes del cerebro. Esto lleva la denominación de "daño difuso", o "lesión no por misil" ("diffuse damage" o "non-missile injury"). Los tipos de daños cerebrales que tienen lugar en las lesiones no por misiles pueden clasificarse en primarios o secundarios.

El daño cerebral primario tiene lugar en el momento de la lesión, principalmente en los sitios del impacto, en particular cuando haya una fracción craneana presente. Las grandes contusiones pueden estar asociadas con una hemorragia intracerebral, o estar acompañados por laceraciones corticales. Las lesiones axonales difusas resultan como un resultado de las tensiones de tracción de procesos neuronales producidos por los movimientos rotacionales del cerebro dentro del cráneo. Puede haber pequeñas lesiones hemorrágicas o daños difusos en los axones, que solamente pueden detectarse microscópicamente.

Tiene lugar un daño secundario en el cerebro como resultado de complicaciones que se desarrollan después del momento de la lesión. Incluye la hemorragia intracraneal, el daño traumático a las arterias extracerebrales, la herniación intracraneal, daño hipóxico del cerebro o meningitis.

Una "lesión abierta en la cabeza" es una agresión visible a la cabeza y puede resultar de una herida por arma de fuego, un accidente o un objeto que pase a través del cráneo al interior del cerebro ("lesión al cerebro debido a misil"). Es más probable que este tipo de lesión dañe un área específica del cerebro.

Puede ocurrir una "lesión moderada en el cerebro" sin pérdida de conciencia y posiblemente solamente una sensación de mareo o de confusión que dure un periodo corto. Si bien la atención médica administrada puede ser mínima, las personas con una lesión cerebral sin coma pueden experimentar síntomas y deterioros similares a los experimentados por el sobreviviente de una lesión de coma.

En respuesta al trauma pueden suceder cambios en el cerebro, que requieren una supervisión para prevenir mayores daños. El tamaño del cerebro aumenta frecuentemente después de una severa lesión en la cabeza. Esto se llama “hinchazón cerebral” y tiene lugar cuando hay un incremento en la sangre que llega al cerebro. En una etapa ulterior de la enfermedad puede acumularse agua en el cerebro, lo que se llama “edema cerebral”. Tanto la hinchazón del cerebro como el edema cerebral pueden tener como resultado una excesiva presión en el cráneo denominada “presión intracraneal (ICP; intracranial pressure)”.

“Coma” es un periodo prolongado de inconciencia después de la lesión traumática de la cabeza.

Hay varios niveles de coma. Los niveles de coma pueden medirse mediante la progresión del grado de respuesta de la persona con la lesión en la cabeza. En la fase aguda de la lesión en la cabeza se utiliza la “Escala de Coma de Glasgow”. A medida que el paciente presenta una mejoría o se estabilice, se utiliza la “Escala de Rancho los Amigos” que mide los niveles de pensamiento cognitivo (comprensión y razonamiento).

Las lesiones cerebrales resultan frecuentemente en una debilidad persistente, tal como una epilepsia postraumática, estado vegetativo persistente, o demencia postraumática.

La lesión de la médula espinal es otro tipo de lesión en el SNC. Las lesiones de la médula espinal constituyen la mayoría de las admisiones hospitalarias para paraplejia y tetraplejia. Más del 80% se presenta como resultado de accidentes viales. Desde el punto de vista clínico se conocen dos grupos principales de lesiones: lesiones abiertas y lesiones cerradas.

Las lesiones abiertas causan un trauma directo sobre la medula espinal y en las raíces de los nervios. Las lesiones perforantes pueden causar una disrupción extensiva y hemorragia. Las lesiones cerradas representan la mayoría de las lesiones espinales y están usualmente asociadas con una fractura/dislocación de la columna espinal, lo que usualmente puede reconocerse mediante radiología. El daño en la médula depende de la amplitud de las lesiones óseas y puede considerarse en dos etapas principales: daño primario, que son las contusiones, transacciones de las fibras nerviosas y necrosis hemorrágica, y daños secundarios que son el hematoma extradural, infarto, infección y edema.

Los efectos tardíos de los daños de la médula incluyen: degeneración anterógrada ascendente y descendente de las fibras nerviosas dañadas, siringomielia postraumática, y efectos sistémicos de paraplejia, tales como tracto urinario e infecciones del pecho, llagas de presión y degradación muscular.

La patología de la lesión cerebral traumática es muy compleja y todavía mal entendida. Los esfuerzos de investigación de la última década han señalado un rol importante de las citoquinas liberadas sistemáticamente y localmente dentro del compartimiento intratecal después de una lesión cerebral, y se consideró una hipótesis basada en los descubrimientos de los efectos beneficiosos y adversos, función del tiempo, de uno de estos mediadores (Morganti-Kossmann et al., 1997; Kossmann et al., 1997; Shohami et al., 1999; Scherbel et al., 1999; Whalen et al., 2000).

Shohami *et al.*, 1997, divulga el efecto neuroprotector de tres inhibidores de TNF- α diferentes: HU-211, pentoxifilina e (PTX) y proteína que se liga a TNF- α (TBP, TNF-alpha-binding protein) en las lesiones cerradas de la cabeza (CHI, closed head injury, lesión cerrada de la cabeza) y sugiere (ver página 175, columna derecha, los dos últimos párrafos) que el TNF- α es un mediador primario de la neurotoxicidad en las primeras veinticuatro horas después del trauma de cabeza y llega a la conclusión que si cada uno de estos agentes moduladores del TNF- α se administra dentro de la ventana temporal temprana poslesión, puede mejorar el desenlace neurológico final en las víctimas de trauma cerebral. Por lo tanto, las enseñanzas de Shohami *et al.*, 1997, sugieren tratar la lesión cerebral dentro de las 24 horas.

Como se describió en lo que precede, una citoquina recientemente descubierta de la familia IL-1 es la IL-18. Los estudios recientes han demostrado que la IL-18 se expresa de manera constitutiva en el SNC de ratones, ratas y seres humanos *in vivo* (Culhane et al., 1998; Jander and Stoll, 1998; Prinz et al., 1999; Fassbender et al., 1999; Wheeler et al., 2000), como también en cultivos primarios de astrocitos y microglía, pero no en las neuronas, 5 *in vitro* (Conti et al., 1999). Se detectaron niveles incrementados en el fluido cerebroespinal (CSF) de pacientes con enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central, tales como la meningitis bacteriana y la meningoencefalitis viral, pero no en el CSF de pacientes de esclerosis múltiple (MS) (Fassbender et al., 1999). A diferencia del descubrimiento de niveles de IL-18 intratecal en niveles finalmente bajos en pacientes de MS, se demostró una expresión incrementada de IL-18 mRNA en las médulas espinales de ratas de Lewis con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), el modelo animal para MS (Jander and Stoll, 1998). La expresión y significancia funcional de la IL-18 en los neurotraumas no había sido investigada hasta ahora.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al papel patofisiológico de la IL-18 en las enfermedades del sistema nervioso central. Se basa el descubrimiento de que el tratamiento de ratones con inhibidores de la IL-18, sea al cabo de una hora o al cabo de tres días después de haber experimentado una lesión experimental cerrada en la cabeza (CHI) tiene como resultado una mejor recuperación y una amplitud atenuada del daño cerebral en comparación con los animales de control. Por lo tanto, la invención se refiere a la utilización de un inhibidor de la IL-18 para fabricación de un

medicamento para el tratamiento de una lesión del sistema nervioso central, y en particular de una lesión traumática del cerebro (lesión cerrada del cerebro), en donde el inhibidor de IL-18 se administra en una única dosis a los 3 días después de la lesión.

5 De acuerdo con la invención también se provee la utilización de combinaciones de un inhibidor de la IL-18 con un interferón y/o TNF y/o inhibidores de la inflamación y/o antioxidantes.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un histograma que ilustra los niveles en suero de IL-18 intracerebral (en mg/ml) en cerebro entero (líneas oblicuas), en el hemisferio izquierdo (en negro) o en el hemisferio derecho (gris), bajo diferentes condiciones.

10 La Figura 2 muestra el desarrollo de NSS (Neurological Severity Score, Puntuación de Gravedad Neurológica) medido al cabo de una hora (h); 24 h, 72 h o 168 h después del trauma, sea con 50 µg de IL-18BP administrado intraperitoneales, al cabo de una hora después del trauma (cuadrados), o mediante inyección de vehículo solamente (control, círculos).

15 La Figura 3 muestra el ΔNSS medido a las 24 h, 72 h o 168 h después del trauma, sea con 50 µg de IL-18BP administrado i.p. al cabo de una hora después del trauma (cuadrados) o con inyección de vehículos solamente (control, círculo).

La Figura 4 muestra el ΔNSS medido al cabo de 1 h, 24 h, 3 días (d), 7 d o 14 d después del trauma, sea con 50 µg de IL-18BP administrada i.p., sea en forma de una única dosis a los 3 d después del trauma (rombos) o con una dosis doble a la 1 h y 3 d después del trauma (cuadrados) o inyección de vehículo solamente (control, triángulo)

Descripción de la invención

20 La presente invención se basa el descubrimiento de un efecto beneficioso estadísticamente significativo de un inhibidor de la IL-18 sobre la recuperación a partir de una lesión cerebral en un modelo murino de lesión cerrada en la cabeza. De acuerdo con la presente invención, se ha descubierto además que la IL-18 se regula ascendentemente en el cerebro y en el fluido cerebroespinal después de una lesión traumática del cerebro, lo que indica que esta citoquina proinflamatoria desempeña un rol importante en la patogénesis de la lesión cerebral.

25 Por lo tanto, la invención se refiere a la utilización de un inhibidor de la IL-18, en donde el inhibidor de la IL-18 es una proteína que se liga a la IL-18, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la lesión traumática del cerebro.

30 La invención se refiere además a la utilización de un inhibidor de la IL-18, en donde el inhibidor de la IL-18 es una proteína que se liga a la IL-18, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de complicaciones y efectos tardíos de una lesión traumática del cerebro.

En una realización de la invención, la lesión cerebral es de origen vascular.

35 Dentro del contexto de la presente divulgación, la expresión "lesión del sistema nervioso central" o "lesión del SNC", se refiere a cualquier lesión en el cerebro o médula espinal, independientemente de la edad de la presentación, o de la causa subyacente. La causa subyacente puede ser mecánica, o una infección. La lesión del SNC y sus síntomas e implicaciones clínicos han sido descritos en detalle en Antecedentes de la Invención. La lesión del SNC incluye por ejemplo trauma, o cualquier otro daño en el cerebro o médula espinal, y también puede llevar la denominación de "neurotrauma".

40 Por ejemplo, la lesión cerebral puede incluir o resultar en uno o más de los siguientes: 1. deterioro de la atención; 2. deterioro cognitivo; 3. deterioro del lenguaje; 4. deterioro de la memoria; 5. trastornos de conducta; 6. trastorno motor; y 6. cualquier otra disfunción neurológica.

La lesión de la médula espinal puede resultar por ejemplo en paraplejia o tetraplejia.

45 Las complicaciones o efectos tardíos de la lesión del SNC también pueden tratarse de acuerdo con la presente divulgación. Las complicaciones y efectos tardíos de las lesiones cerebrales han sido descritos en lo que precede en el capítulo "Antecedentes de la invención", incluyen sin limitación: coma, meningitis, epilepsia postraumática, demencia postraumática, degeneración de las fibras nerviosas, siringomielia postraumática, o hemorragia, por ejemplo.

La presente invención se refiere también a la utilización de los inhibidores de la IL-18 definidos en la presente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una lesión del cerebro que tiene un origen vascular, tal como un daño cerebral hipóxico con infarto cerebral, isquemia, accidente cerebrovascular, o ataque apopléjico.

50 Como se utilizan en la presente, los términos "tratar" y "tratamiento" debe entenderse en el sentido de prevenir, inhibir, atenuar, de manera parcial o total, ocasionar una mejoría en uno o más de los síntomas o causas de una lesión del SNC, como también los síntomas, enfermedades o complicaciones que acompañan una lesión de sistema nervioso central, o de invertir dichos síntomas, enfermedades o complicaciones. Cuando se "trate" una lesión del SNC, las

sustancias de acuerdo con la invención pueden administrarse después de la presentación de la enfermedad. El término "prevención" se refiere a la administración de las sustancias antes de que se observen síntomas de la enfermedad en el paciente.

5 Como se muestra en los ejemplos más abajo, un inhibidor de la IL-18 demostró ejercer su efecto beneficioso sobre las lesiones cerebrales aun cuando se administró después al cabo de 3 días después de haber tenido lugar la lesión cerebral.

Por lo tanto, para tratar la lesión cerebral, el inhibidor de la IL-18 se administra a los tres días después de la lesión.

Dentro del contexto de esta invención, la expresión "inhibidor de la IL-18" se refiere a una proteína que se liga a la IL-18 (IL-18BP).

10 La expresión "proteína que se liga a la IL-18" se utiliza en la presente como sinónimo con "IL-18BP". Comprende proteínas que se ligan a IL-18 definidas en el documento WO 99/09063 o en Novick et al., 1999, e incluye variantes de escisión y/o isoformas de proteínas que se ligan a IL-18, como se define en Kim et al., 2000. En particular, las isoformas a y c de IL-18BP son útiles de acuerdo con la presente invención. Las proteínas útiles de acuerdo con la presente invención pueden estar glicosiladas o no glicosiladas, pueden derivarse de fuentes naturales, tales como orina, o lo que es más preferible se los puede producir recombinantemente. Las expresión recombinante puede llevarse a cabo en sistemas de expresión procariotas tales *E. coli*, o en sistema de expresión eucariotas, y preferiblemente en mamíferos. Una línea de células bien adecuadas para los inhibidores de la IL-18 de la presente invención es la célula de CHO (Chinese Hamster Ovary, Ovario de Hámster Chino).

20 La producción recombinante del inhibidor de la IL-18, cuando se exprese de manera recombinante en células de mamífero o en líneas de células, puede preferiblemente llevarse a cabo en un medio de cultivo de células libre de suero.

25 Tal como utiliza en la presente, el término "muteínas" se refiere a análogos de una IL-18BP, o a análogos de una IL-18BP viral, en los que uno o más de los residuos de aminoácidos de una IL-18BP natural o IL-18BP viral han sido reemplazados por diferentes residuos de aminoácidos, o ha sido deletados o en los que uno o más residuos de aminoácidos han sido añadidos a la secuencia natural de una IL-18BP, o de una IL-18BP viral, sin reducir de manera considerable la actividad de los productos resultantes en comparación con la IL-18BP de tipo salvaje o la IL-18BP viral. Estas muteínas se preparan mediante métodos de síntesis conocidos y/o mediante técnicas de mutagénesis dirigido a sitio, o mediante cualquier otra técnica conocida adecuada.

30 Es preferible que cualquier muteína de este tipo tenga una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativa de la de una IL-18BP, o suficientemente duplicativa de una IL-18BP viral, de manera de tener una actividad sustancialmente similar a la de la IL-18BP. Una de las actividades de la IL-18BP es su capacidad de ligarse a la IL-18. Siempre y cuando la muteína tenga una suficiente actividad de ligación a la IL-18, se la puede utilizar para la purificación de IL-18, tal como mediante cromatografía de actividad, por lo que puede considerarse que tiene una actividad sustancialmente similar a la de la IL-18BP. Por lo tanto, puede determinarse si cualquier muteína dada tiene una actividad sustancialmente similar a la de la IL-18BP mediante experimentación rutinaria que comprende someter una muteína de este tipo, por ejemplo, a un simple ensayo de competición de tipo sándwich para determinar si se liga o no a una IL-18 adecuadamente etiquetada, tal como un ensayo inmunoensayo o un ensayo ELISA. En el documento WO 99/09063 se han descrito con detalle ensayos funcionales simples para evaluar la actividad biológica de la IL-18BP, por ejemplo, en los Ejemplos 2 (ligación a la IL-18 evaluada mediante reticulación) o 5 (inhibición de la IL-18 inducido (inducción de NF-gamma en células mononucleares de la sangre)).

35 Cualquier muteína de este tipo tiene una identidad u homología de por lo menos el 40% con respecto a la secuencia de una IL-18BP o de un homólogo de IL-18BP viralmente codificado. Es más preferible que tenga una identidad u homología de por lo menos el 60%, por lo menos el 60%, por lo menos el 70%, por lo menos el 80%, o de manera sumamente preferible de por lo menos el 90%, con respecto a la secuencia de una IL-BP o de homólogo de IL-18BP viralmente codificado.

Las muteínas de polipéptidos de IL-18 o las muteínas de IL-18BP virales, que pueden utilizarse de acuerdo con la presente divulgación, incluyen un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos de sustitución que una persona con la pericia habitual puede obtener de manera rutinaria, sin una experimentación indebida, sobre la base de las enseñanzas y guías presentadas en la presente.

50 Las muteínas de acuerdo con la presente divulgación incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, que se hibrida a ADN o ARN, que codifica el inhibidor de la IL-18, de acuerdo con la presente invención, bajo condiciones moderadamente o sumamente rigurosas. La expresión "condiciones rigurosas" se refiere a las condiciones de hibridación y lavado subsiguientes, a los que las personas con la pericia habitual se refieren convencionalmente como "estrictas". Ver: Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, supra, Interscience, N.Y., §§6.3 and 6.4 (1987, 1992), y Sambrook et al. (Sambrook, J. C. Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Sin limitación, los ejemplos de condiciones rigurosas incluyen condiciones de lavado a 12-20 °C por debajo de la T_m

calculada del híbrido en estudio, por ejemplo, 2 x SSC y 0,5% SDS durante 5 minutos, 2 x SSC y 0,1% SDS durante 15 minutos; 0,1 x SSC y 0,5% SDS a 37 °C durante 30-60 minutos y después, a 0,1 x SSC y 0,5% SDS a 68 °C durante 30-60 minutos. Las personas con la pericia habitual comprenderán que las condiciones de estrictez también dependen de la longitud de las secuencias de ADN, sondas oligonucleotídicas (tales como de 10-40 bases) o son das oligonucleótidos mixtas. Si se utilizan sondas mixtas, es preferible utilizar cloruro de tetrametilamonio (TMAC, tetramethyl ammonium chloride) en lugar de SSC. Ver Ausubel, supra.

Cualquier muteína de este tipo tiene una identidad y homología del por lo menos el 40% con la secuencia de las SEQ ID NO: 1, 2 ó 3 del listado de secuencias adjunto. Es más preferible que tenga una identidad u homología de por lo menos el 50%, por lo menos el 60%, por lo menos el 70%, por lo menos el 80% o lo que es más preferible, del 90% con respecto a dicha secuencia.

La identidad refleja una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas, determinadas mediante la comparación de las dos secuencias polipeptídicas, respectivamente, por sobre la longitud de las secuencias sometidas a verificación.

Para las secuencias para las que no hay una correspondencia exacta, es posible terminar un “porcentaje de identidad”. En términos generales, las dos secuencias que deben compararse se alinean de manera de obtener una máxima correlación entre las secuencias. Esto puede incluir insertar “huecos” en una o en ambas secuencias, para reforzar el grado de alineación. Es posible determinar un porcentaje de identidad sobre la longitud completa de cada una de las secuencias sometidas a comparación (denominada “alineación global”) que es particularmente adecuada para secuencias de la misma longitud o de una longitud muy similar, o aun longitudes definidas más cortas (denominada longitud local), que es adecuada para secuencia de longitud desigual.

En la técnica se conocen bien métodos para comparar la identidad y homología de dos o más consecuencias. Por lo tanto, por ejemplo, pueden utilizarse los programas puestos a disposición en el Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 9.1 (Devereux J et al., 1984), por ejemplo los programas BESTFIT y GAP, para determinar la identidad porcentual entre dos polinucleótidos y el porcentaje de identidad y el porcentaje de homología entre dos secuencias polipeptídicas. El BESTFIT utiliza el algoritmo de “homología local” de Smith and Waterman (1981) y encuentra la mejor región de similitud entre dos secuencias. Otros programas para determinar la identidad y/o similitud son también conocidos en la técnica, por ejemplo, la familia BLAST de programas (Altschul S F et al, 1990, Altschul S F et al, 1997, accesible en el home page del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson W R, 1990; Pearson 1988).

Los cambios preferidos para las muteínas de acuerdo con la presente divulgación son lo que se conoce como sustituciones “conservadoras”. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de polipéptidos IL-18BP o de proteínas o de IL-18BPs virales, pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tengan propiedades fisicoquímicas suficientemente similares de manera que la sustitución entre miembros del grupo preservará la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Es evidente que las inserciones y deleciones de aminoácidos también pueden efectuarse en las secuencias arriba definidas sin alterar su función, particularmente si las inserciones o deleciones implican unos pocos aminoácidos, por ejemplo, menos de 30, y preferiblemente menos de 10, y que no remuevan ni desplacen aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, por ejemplo, residuos de cisteína. Las proteínas y muteínas producidas por tales supresiones y/o inserciones recaen dentro de los alcance de la presente divulgación.

Es preferible que los aminoácidos sinónimos sean aquellos definidos en la Tabla 1.

Es más preferible que los aminoácidos sinónimos sean aquellos definidos en la Tabla 2, y más preferiblemente los aminoácidos sinónimos son aquellos definidos en la Tabla 3.

TABLA 1

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

ES 2 617 084 T3

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

TABLA 2

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
Lie	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
Aspecto	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu

Trp

Trp

TABLA 3

Grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Lie	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 Los ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que pueden utilizarse para obtener muteínas para obtener polipéptidos o proteínas de IL-18BP, o muteínas de IL-18BPs vales, para su utilización en la presente invención, incluyen cualquier etapa de método conocido, tales como los presentados en las Patentes US Nros. 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 con sustituciones de proteína presentadas en la Patente US N.º 4.904.584 (Shaw et al.).

10 La expresión "proteína fusionada" se refiere a un polipéptido que comprende un polipéptido que contiene una IL-18BP, o una IL-18BP viral, o una de sus muteínas, fusionada con otra proteína, que, por ejemplo, tiene un tiempo de permanencia prolongado en los cuerpos corporales. Una IL-18BP o una IL-18BP viral, puede por lo tanto estar fusionada a otra proteína, polipéptido o similar, por ejemplo, una inmunoglobulina o uno de sus fragmentos.

15 La expresión "derivados funcionales", tal como se utiliza en la presente, abarca derivados de IL-18BPs o de una IL-18BP viral, y sus muteínas y proteínas fusionadas, que pueden prepararse a partir de los grupos funcionales que se presentan como cadenas laterales en los residuos o en los grupos N o C terminales, mediante medios conocidos en la técnica, y se hallan incluidos en la invención siempre y cuando permanezcan siendo farmacéuticamente aceptables, es decir, que no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de la IL-18BP, o de las IL-18BP virales, y que no confiera propiedades tóxicas en las composiciones que las contengan.

Estos derivados pueden incluir por ejemplo, cadenas laterales de polietilenglicol, que pueden enmascarar sitios antigénicos de una IL-18BP o de una IL-18BP viral en los fluidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo por reacción con amoníaco o con amidas primarias o secundarias, derivados N-acilo de grupos amino libres de los residuos de aminoácidos formados con restos acilo (por ejemplo, grupos alcanóilo o aroílo carbocíclicos) o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres (por ejemplo, los de grupos serilo o treonilo) formados con restos acilo.

Como "fragmentos activos" de una IL-18BP, o de una IL-18BP viral, muteínas y proteínas fusionadas, la presente invención abarca cualquier fragmento o precursores de la cadena polipeptídica de la molécula de proteína sola junto con moléculas asociadas o residuos ligados a ella, por ejemplo, azúcar o residuos fosfato, o agregados de la molécula de proteína o del residuo azúcar por sí mismos, siempre y cuando dicha fracción tenga una actividad sustancialmente similar a la de la IL-18BP,

El término "sales" se refiere tanto a sales de grupos carboxilo como a sales de adición de ácido de grupos amino de la molécula inhibidora de la IL-18, o sus análogos., Las sales de un grupo carboxilo pueden formarse mediante medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, de amonio, férricos o de zinc, y similares, y sales con bases orgánicas tales como aquellos formados por ejemplo con aminas, tales como trietilamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de adición de ácido incluyen por ejemplo, sales con ácidos minerales, tales como por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos tales como por ejemplo ácido acético y ácido oxálico. Por supuesto, cualquiera de dichas sales debe conservar la actividad biológica del OPN relevante para la presente invención, es decir, ejercer un efecto proliferante sobre los oligodendrocitos.

Las secuencias de IL-18BP y de sus variantes de escisión/ isoformas pueden tomarse del documento 99/09063 o de Novick et al., 1999, como también de Kim et al., 2000.

Los derivados funcionales de la IL-18BP pueden ser conjugados a polímeros para mejorar las propiedades de la proteína, tales como la estabilidad, semivida, biodisponibilidad, tolerancia por el cuerpo humano, o inmunogenicidad. Para lograr este objetivo, el derivado funcional puede comprender por lo menos un resto fijado a uno o más grupos funcionales, que se presentan en forma de una o más cadenas laterales en los residuos de aminoácidos. Un grupo funcional de este tipo puede ser polietilenglicol (PEG). La PEGilación puede llevarse cómo mediante métodos conocidos, descritos en el documento O 92/13095.

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

En otra realización preferida de la invención, el inhibidor de la IL-18 es una proteína fusionada que comprende la totalidad o parte de una proteína que se liga a una proteína IL-18, que está fusionada a la totalidad o a parte de una inmunoglobulina. La persona con pericia en especialidad comprenderá que la proteína de fusión resultante conserva la actividad biológica de la IL-18BP, en particular la liberación a la IL-18. La fusión puede estar dirigida, o por intermedia de un péptido ligador corto que puede ser breve, tal como de 1 a 3 residuos de aminoácidos de longitud o mayor, por ejemplo, 13 aminoácidos de longitud. Dicho ligador puede ser un tripéptido de la secuencia E-F-M (Glu-Phe-Met), por ejemplo, o una secuencia ligadora de 13 aminoácidos que comprende Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met introducido entre la secuencia de IL-18BP y la secuencia de inmunoglobulina. La proteína de fusión resultante tiene propiedades mejoradas, tales como un tiempo de residencia prolongado en los fluidos corporales (semivida), una mayor actividad específica, un nivel de expresión incrementado, o se facilita la purificación de la proteína de fusión.

En una realización preferida, la IL-18BP está fusionada a la región constante de una molécula de Ig. Es preferible que esté fusionada a regiones de cadena pesada tales como los dominios CH2 y CH3 de la IgG1 humana, por ejemplo. La generación de proteínas de fusión específicas que comprenden IL-18BP y una porción de una inmunoglobulina se explicó en el Ejemplo 11 de WO 99/09063, por ejemplo. Otras isoformas de molécula de Ig son también adecuadas para la generación de proteínas de fusión de acuerdo con la presente invención, tal como las isoformas IgG₂ o IgG₄, u otras clases de Ig, tales como IgM o IgA, por ejemplo. Las proteínas de fusión pueden monoméricas o multiméricas, hetero- u homomultiméricas.

Los interferones se conocen predominantemente por sus efectos inhibidores sobre la replicación viral y sobre la proliferación celular; el Interferón- γ , por ejemplo, desempeña un papel importante en la promoción de las inmunorrespuestas y de las respuestas inflamatorias. Se afirma que el Interferón β (IFN- β), un tipo de interferón de tipo I, desempeña un papel antiinflamatorio.

Por lo tanto, la invención se refiere también a la utilización de una combinación de una IL-18BP con un interferón en la fabricación de un medicamento para tratamiento de las lesiones cerebrales traumáticas.

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

En otra realización preferido de la invención, el interferón es interferón β (IFN- β), más preferiblemente IFN- β 1a.

La IL-18BP se utiliza preferiblemente al mismo tiempo, secuencialmente o por separado con el interferón.

El factor de la necrosis de los tumores ha sido descrito en la literatura y tiene efectos tanto protectores como tóxicos en las lesiones cerebrales (Shohami et al., 1999). En el siguiente Ejemplo 1, la inyección de TNF en ratones después de un severo trauma cerebral resultó en una disminución significativa de los niveles de IL-18 en el cerebro, lo que indica que el TNF puede tener un efecto beneficioso sobre la recuperación de una lesión cerebral traumática. Por ello, una realización preferida de la invención se refiere a la utilización de un inhibidor de la IL-18 combinado con TNF para la preparación de un medicamento para el tratamiento de las lesiones cerebrales para uso simultáneo, secuencial o separado.

5

De acuerdo con la presente invención, se prefiere la combinación de los inhibidores de la IL-18 con TNF alfa.

10 En otra realización preferida de la invención, el medicamento incluye además un agente antiinflamatorio, tal como NSAID (nonsteroidal anti-inflammatory drug, fármaco antiinflamatorio no esteroide). En una realización preferida, se utiliza un inhibidor COX, y más preferiblemente un inhibidor COX-2, combinado con un inhibidor de la IL-18. Los inhibidores COX se conocen en la técnica. Inhibidores COX específicos se divulgan en el documento WO 01/00229, por ejemplo. Los componentes activos pueden utilizarse simultáneamente, secuencialmente, o por separado.

15 Se ha descrito que el estrés oxidativo, en particular la ROS (reactive oxygen species, especies reactivas de oxígeno) desempeñan un papel en la patofisiología de las lesiones cerebrales (Shohami et al., 1997).

Por ello, en una realización preferida de la presente invención, el medicamento comprende además un antioxidante, para su utilización simultánea, secuencial o separada. En la técnica se conoce muchos ante oxidantes, tales como las vitaminas A, C o E, o el ácido 5-aminosalicílico, o la superóxido dismutasa.

20 En otra realización preferida de la presente invención, el inhibidor de la IL-18 se utiliza en la cantidad de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 0,1 a 3 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 1 a 2 mg/kg de peso corporal.

Y en otra realización, el inhibidor de la IL-18 se utiliza en una cantidad de aproximadamente 0,1 a 1.000 g/kg de peso corporal o de 1 a 100 µg/kg de peso corporal o de aproximadamente 25 a 50 µg/kg de peso corporal.

25 La invención se refiere además a composiciones farmacéuticas, particularmente útiles para el tratamiento de las lesiones cerebrales traumáticas inflamatorias, que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de la IL-18 y/o una cantidad terapéuticamente efectiva de un interferón y/o de una cantidad farmacéuticamente efectiva de TNF y/o una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente inflamatorio y/o de una cantidad farmacéuticamente efectiva de un agente antioxidante.

30 El interferón comprendido en la composición farmacéutica es preferiblemente IFN-beta o IFN-alfa.

Y en otra realización preferida, la composición farmacéutica comprende cantidades terapéuticamente efectivas de TNF alfa. La composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede además comprender uno o más inhibidores COX.

35 La definición de "farmacéuticamente aceptable" tiene por objeto abarcar cualquier portador, que no interfiera con la efectividad de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el anfitrión al que se lo administra. Por ejemplo, para la administración parenteral, la o las proteínas activas pueden formularse en un formato de dosis unitaria para la inyección en vehículos tales como soluciones salinas, solución de dextrosa, albúmina de suero, y solución de Ringer.

40 Los ingredientes activos de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención pueden administrarse a un individuo de diversas maneras. Las vías de administración incluyen la vía intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, intracraneal, epidural, rectal, tópica e intranasal.

45 Para la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular), la o las proteínas activas pueden formularse como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado asociado con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, agua, solución salina, solución de dextrosa) y aditivos que mantienen la isotonicidad (por ejemplo, manitol) o estabilidad química (por ejemplo, agentes de conservación y tampones). La formulación se esteriliza mediante técnicas de uso común.

50 La biodisponibilidad de la o de las proteínas activas de acuerdo con la invención también puede mejorarse utilizando procedimientos de conjugación que incrementan la semivida de la molécula en el cuerpo humano, por ejemplo por el hecho de ligar la molécula a polietilenglicol, tal como se describe en la Solicitud de Patente PCT WO 92/13095.

Las cantidades terapéuticamente efectivas de la o de las proteínas activas será una función de muchas variables, que incluyen el tipo de antagonista, la afinidad del antagonista para la IL-18, cualquier actividad citotóxica residual presentada por los antagonistas, la vía de administración, la condición clínica del paciente (lo que incluye la deseabilidad de mantener un nivel no tóxico de la actividad de la IL-18 endógena).

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" es tal que cuando se lo administra, el inhibidor de la IL-18 tiene como resultado una inhibición de la actividad biológica de la IL-18. La dosis administrada, en forma de dosis simples o múltiples, a un individuo variará en función de una variedad de factores, que incluyen las propiedades farmacocinéticas del inhibidor de la IL-18, la vía de administración, las condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, masa corporal), la amplitud de los síntomas, tratamientos simultáneos, frecuencia del tratamiento y efecto deseado. El ajuste y la manipulación de los intervalos de dosificación establecidos se hallan perfectamente dentro de la capacidad de las personas expertas, y además pueden utilizarse métodos *in vitro* e *in vivo* para determinar la inhibición de la IL-18 en un individuo.

De acuerdo con la invención, el inhibidor de la IL-18 se utiliza en la cantidad de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg o de aproximadamente 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0,1 a 5 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 1 a 3 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 1 a 2 mg/kg de peso corporal. Como alternativa, los inhibidores de la IL-18 pueden administrarse en cantidades de aproximadamente 0,1 a 1.000 µg/kg de peso corporal o de aproximadamente 1 a 100 µg/kg de peso corporal o de aproximadamente 10 a 50 µg/kg de peso corporal.

La vía de administración preferida de acuerdo con la invención es la administración por vía subcutánea. De acuerdo con la invención también se prefiere la administración intramuscular. Para administrar el inhibidor de la IL-18 directamente a su lugar de acción, también se prefiere administrarlo por día intracraneal o intratecal. La vía intracraneal se prefiere especialmente en forma combinada en el caso de las lesiones abiertas de la cabeza (lesión del cerebro por misiles).

De acuerdo con la invención, el inhibidor de la IL-18 puede administrarse profilácticamente o terapéuticamente a un individuo antes de, simultáneamente o secuencialmente con otros regímenes o agentes terapéuticos (por ejemplo, regímenes de múltiples fármacos), en una cantidad terapéuticamente efectiva, en particular con interferón y/o un TNF y/u otro agente inflamatorio tal como un inhibidor CO y/o un antioxidante. En función de la lesión cerebral, puede considerarse la administración conjunta de un antagonista-TNF en lugar de TNF como tal (Shohami et al., 1999). Los agentes activos que se administran al mismo tiempo con otros agentes terapéuticos pueden administrarse en las mismas composiciones o en composiciones diferentes.

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

EJEMPLOS

Materiales y Métodos

Modelo de trauma

Los ratones utilizados en este estudio eran machos con una edad de 8 a 16 semanas que pesaban de 30 a 35 g cada uno. Se los crió en un entorno específicamente libre de agentes patógenos, se los mantuvo bajo condiciones estándar de temperatura y luz en jaulas de 4 a 6 animales, y se los alimentó con comida y agua a voluntad. El estudio se llevó a cabo de acuerdo con las directivas del Comité Institucional de Cuidados Animales de la Universidad Hebrea de Jerusalén, Israel. Se llevó a cabo el CHI experimental utilizando el dispositivo de caída por peso anteriormente desarrollado (Chen et al., 1996). En pocas palabras, después de inducida la anestesia con éter, se efectuó una incisión longitudinal en la línea central, se retrajo la piel y se expuso el cráneo. Se identificó el área frontal anterior y se colocó un cono de teflón en punta a aproximadamente 1 mm lateralmente con respecto a la línea central, en el plano coronal medio. Se fijó la cabeza y se dejó caer un peso de 75 g sobre el cono desde una altura de 18 cm, resultando una lesión focal en el hemisferio izquierdo. Detrás del trauma, los ratones recibiendo oxigenación de soporte con oxígeno al 100% durante no más de 2 minutos y se los llevó de regreso a su jaulas.

Evaluación de los niveles de IL-18 en los cerebros de ratón

Para la cuantificación de los niveles intracraneales de la IL-18, unos ratones de la cepa C57BL/6 (B6) (total n=62) fueron asignados a seis grupos distintos: (1) "controles normales"; ratones B6 no tratados (n=10). (2) "anestesia bajo éter"; los ratones fueron anestesiados con éter durante 10 minutos y decapitados después de 24 h (n=10) o 7 días (n=10). (3) "operación ficticia"; estos ratones experimentaron anestesia e incisión longitudinal en el escabelo y fueron sacrificados después de 24 h (n=15) o 7 días. (4) "grupo de trauma"; se llevó a cabo el CHI experimental anteriormente descrito, y los animales fueron decapitados bajo anestesia con éter a las 4 h (n=7), 24 h (n=7), y 7 días (n=7) después del trauma. (5) "inyección de TNF"; para evaluar un posible rol del TNF en la regulación de la IL-18 intracerebral, los ratones fueron sea anestesiados con éter, se les inyectó intracerebroventricularmente (i.c.v.) con 200 ng de TNF recombinante murino (R&D Systems, Abingdon, RU) en solución salina tamponadas con fosfato 10 µl (PBS) y se los sacrificó después de 24 h (n=10). (6) "inyección ficticia"; estos animales recibieron inyecciones i.c.v. de vehículo solamente (10 µl de PBS estéril) y se los sacrificó posteriormente después de 24 h (n=6), como un grupo de control a los animales que recibieron inyecciones de TNF. En la totalidad de los ratones, se extrajeron los cerebros inmediatamente después de la decapitación, se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almaceno a -70 °C hasta análisis. Los cerebros

del grupo de trauma fueron separados en hemisferio izquierdo (ipsilateral) y derecho t (contralateral), para permitir una comparación de los niveles de la IL-18 en el hemisferio lesionado con el hemisferio no lesionado. Se llevó a cabo la homogeneización de los tejidos con un instrumento Polytron (Kinematica, Kriens, Suiza) utilizándose una dilución 1:4 en tampón de extracción frío bajo hielo (W/W) que contenía Tris 50 mM (pH 7,2), NaCl 150 mM, Triton-X-100 1% (Boehringer Mannheim, Rotkreuz, Suiza), y cóctel de inhibidor de proteasa I (Boehringer Mannheim). El material homogeneizado fue sometido a sacudidas sobre hielo durante 90 minutos y seguidamente se sometió a centrifugación durante 15 minutos a 3.000 g y a 4 °C. Los materiales sobrenadantes fueron distribuidos en alícuotas y almacenadas a -70 °C hasta análisis. Se midieron las concentraciones de proteína total en lo extractos de cerebro mediante el ensayo de Bradford (Bio Rad Laboratories, Múnich, Alemania), y se descubrió que era muy constante en todos los ratones evaluados (12,1 ± 2,1 mg/ml; media ± SD). La cuantificación de los niveles de citoquina intracerebral fue llevada a cabo mediante ELISA específico para IL-18 murino, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Abingdon, RU). La sensibilidad del ensayo era de 54 pg/ml. Para la comparación de los niveles de IL-18 intracerebral entre los diferentes grupos de animales, a todas las concentraciones inferiores al límite de detección de 5 pg/ml se les asignó un valor de 4,9 pg/ml. Las muestras fueron procesadas no diluidas en cavidades por duplicado y se calculó una concentración final a partir de la OD media de muestras duplicadas. Se determinó el OD mediante un espectrofotómetro (Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, VA) bajo la longitud de onda de extinción de 405 nm.

Protocolo del tratamiento de la IL-18BPI

Para los estudios se utilizaron ratones Sabra macho de la cepa de la Universidad Hebrea (n=40) para los estudios con la IL-18BP. Se llevaron a cabo la anestesia y el CHI experimental como se describe en lo que precede. Para el protocolo de tratamiento, los animales fueron divididos en dos grupos: en el grupo A (grupo de control, n=16), los ratones fueron sometidos a CHI experimental, se les inyectó vehículo solamente (PBS) después de una hora, y se los observó durante 7 para su evaluación neurológica (ver más abajo). En el grupo B ("grupo de estudio, n=18), los animales recibieron inyecciones intraperitoneales de 50 p/g de IL-18BP inmediatamente después de la determinación de la puntuación neurológica en el instante t= 1 h después de CHI. Dado que la primera unidad de la barrera sangre-cerebro incrementó de cinco a seis veces entre las uno o cuatro horas después del CHI, previamente determinado en el mismo modelo experimental (Chen et al. 1996), la IL-18BP está disponible para el cerebro bajo estas condiciones. Dos grupos adicionales de ratones fueron tratados de acuerdo con los grupos A y B (grupo C: "grupo de control"; grupo D: "grupo de estudio", 10 respectivamente) y se los decapitó después de 48 h, seguido por disección del cerebro para la evaluación del edema postraumática, como se describe más abajo.

Evaluación del deterioro neurológico

Para la evaluación de deterioro neurológico postraumático, se ha previamente desarrollado y validado un NSS (Neurological Severity Store, Puntuación de Gravedad Neurológica) (Stahel et al., 2000).

La puntuación consiste en 10 tareas clínicas individuales relacionados con la función motora., estado de alerta, y comportamiento fisiológico, en donde se asigna un punto por no realizar la tarea y cero puntos por realizarla (Tabla 4). Un NSS máximo de 10 puntos indica una severa disfunción neurológica, al no realizar la totalidad de las tareas, mientras que una puntuación de cero se asigna a los ratones no lesionados saludables. El NSS a la 1 hora después del trauma refleja la gravedad inicial de la lesión y está estrechamente correlacionado con el desenlace clínico (Beni-Adani et al. 2001). La evaluación de la realización de las tareas hoy llevada a cabo por dos investigadores a ciegas acerca de los grupos de estudio en los instantes de tiempo 1 h, 24 h, 72 h, y 7 días después del CHI experimental. El ANSS, calculado como la diferencia entre el NSS a t=1 h y el NSS en cualquier instante de tiempo posterior, es un parámetro que refleja el grado de recuperación espontánea después de la lesión cerebral, como anteriormente descrito (Chen et al. 1996).

Tabla 4: Puntuación de gravedad neurológica (NSS) para los ratones con lesión en la cabeza.

Tarea	Descripción	Puntos por éxito
Salir de un círculo	Capacidad e iniciativa para salir de un círculo de 30 cm de diámetro con	0 / 1
Mono-/hemiparesia	Paresia del miembro superior o inferior del lado contralateral	0 / 1
Caminar erguido	Estado de alerta, iniciativa y capacidad motora para caminar erguido	0 / 1
Reflejo de sobresalto	Reflejo innato; el ratón saltará en respuesta a	0 / 1
Comportamiento de búsqueda	Comportamiento fisiológico como signo de "interés"	0 / 1
Equilibrio sobre viga	Capacidad de equilibrarse sobre una viga de 7 mm de ancho durante por lo menos	0 / 1

Equilibrio sobre varilla redonda	Capacidad de equilibrarse sobre una varilla redonda de 5 mm de diámetro durante	0 / 1
Caminata sobre viga: 3 cm	Capacidad de cruzar una viga de 30 cm de longitud de 3 cm de ancho	0 / 1
Caminata sobre viga: 2 cm	Misma tarea, dificultad incrementada sobre una viga de 2 cm de ancho	0 / 1
Caminata sobre viga: 1 cm	Idem, dificultad incrementada sobre una viga de 1 cm de ancho	0 / 1

Puntuación máxima: 10

Evaluación del edema cerebral

5 La amplitud del edema cerebral fue evaluada determinando el contenido de agua en los tejidos en el hemisferio lesionado, como se describió anteriormente (Chen et al. 1996). En pocas palabras, 5 ratones fueron anestesiados como anteriormente descritos a las 48 después del trauma, lo que corresponde a un instante del tiempo en el que el edema es todavía significativo en este sistema de modelo (Chen et al. 1996). Después de la decapitación, se retiraron el cerebelo y el tallo cerebral y se preparó un segmento cortical de aproximadamente 20 mg tomado de un área cercano al sitio del trauma y de su hemisferio contralateral. Se utilizó el hemisferio derecho (no lesionado) como control
10 interno. Las rebanadas de tejido fueron pesadas y secadas durante 24 h a 95 °C. Después de pesar las secciones “secas”, el porcentaje de contenido del agua en el cerebro se calculó como:

$$\%H_2O = [(peso húmedo - peso seco) \times 100] / peso seco.$$

Pacientes con lesión cerebral

15 Diez pacientes con CHI severo aislado (edad media \pm SD: 37 \pm 10 años, intervalo 24-57 años; 9 varones y una mujer), admitidos en la División Trauma del Hospital de la Universidad de Zúrich, fueron incluido en este estudio. Todos los pacientes tenían una puntuación de la Escala de Coma de Glasgow (GCS) e < 8 después de resucitación cardiopulmonar (Teasdale and Jennett, 1974). Después de evaluación de escaneo CT, todos los pacientes recibieron catéteres intraventriculares para drenado CSF terapéutico cuando la presión intracraneal (ICP, intracranial pressure) superó los 15 mm Hg. Ninguno de los pacientes fue tratado con esteroides. Los pacientes con múltiples lesiones que requerían intervenciones por lesiones torácicas, abdominales, pélvicas, espinales, o fracturas de huesos largos, fueron
20 excluidos del estudio. Los desenlaces individuales fueron evaluados mediante GOS (Glasgow Outcome Scale) (Jennett and Bond, 1975). El protocolo para CSF y para la recolección de suero fue aprobado por el Comité Profesional de Ética del Hospital de la Universidad de Zúrich.

Recolección de muestras y análisis de IL-18s

25 El CSF y muestras de suero correspondientes de los pacientes de CHI (n=10) fue recolectado diariamente en una instante de tiempo fijo. El CSF de control fue recolectado de pacientes que experimentaron drenado espinal de diagnóstico (n=5). Estos pacientes no tenían signos de enfermedad de SNC inflamatorio, en base a valores de CSF normales de proteína, glucosa, y recuento celular (no se muestran los datos). En el grupo CHI, la recolección de las muestras fue llevada a cabo durante 10 después del trauma, a menos que el catéter ventricular haya sido retirado
30 anteriormente, por ejemplo en casos en los que el ICP permaneció en el intervalo normal (< 15 mm Hg) durante más de 24 horas. Se recolectó un total de 106 CSF correspondientes y de muestras de suero en los pacientes de trauma analizados en este estudio. Todas las muestras fueron inmediatamente centrifugadas después de la recolección, distribuidas en alícuotas y congeladas a -70 °C hasta análisis. La cuantificación de los niveles de la IL-18 en el n CSF y en el suero se llevó a cabo mediante ELISA específico para IL-18 humana, para lo cual se utilizaron kits disponibles
35 en el comercio (R&D Systems, Abingdon, RU). En cuanto al ensayo murino, la sensibilidad del ELISA era de 5 pg/ml, y la concentración final de la IL-18 se calculó a partir del OD medio determinado en muestras por duplicado con una longitud de onda de extinción de 405 nm. Para la comparación de los niveles de la IL-18 CSF entre los pacientes de CHI y los controles, a todas las concentraciones debajo de un límite de detección de 5 pg/ml se les asignó un valor de 4,9 pg/ml.

Análisis de los datos

45 Se llevaron a cabo análisis estadísticos de los datos en software disponible en el comercio (SPSS 9.0 para Windows™). Se utilizó el ensayo U no paramétrico de Mann-Whitney para el análisis de los datos que no se distribuían normalmente, tales como las puntuaciones neurológicas (NSS y ANSS). Se utilizó el ensayo t no apareado de Student para la comparación de las concentraciones intracerebrales de IL-18 en los diferentes grupos de ratones y para el análisis de las diferencias en el contenido de agua en el cerebro en los ratones tratados con IL-18BP vs. ratones tratados con vehículo. La comparación de los niveles de IL-18 humano, sea en CSF diario vs. muestras de suero correspondientes en pacientes de CHI, o en trauma vs. CSF de control, se determinó atizando el modelo general lineal para medidas generales de ANOVA. Se consideró que un valor $p < 0,05$ era estadísticamente significativo

Resultados

EJEMPLO 1: niveles de IL-18 cerebrales en ratones

- Como se muestra en la Figura 1, la IL-18 era detectable mediante ELISA en homogeneizados de cerebro de ratones de control sin tratar ("normales") de la cepa B6 ($n=10$), con un nivel medio de $27,7 \pm 1,7$ [$+ SEM$] ng/ml. En los grupos experimentales, la inducción de la anestesia con éter solo o en combinación con operación "ficticia" (es decir, anestesia con éter e incisión longitudinal en el cuero cabelludo) resultó en niveles de IL-18 intracraneales elevados de $48,9 \pm 1,1$ ng/ml (grupo de "éter", $n = 8$) y $54,3 \pm 2,7$ ng/ml (grupo "ficticio", $n=13$), respectivamente ($p < 0,01$ vs. ratones "normales", ensayo de Student no apareado, Figura 1). La diferencia entre los animales tratados con "éter" y "ficticio" no era estadísticamente significativo ($p = 0,16$).
- En el grupo de trauma ($n = 21$), la inducción del CHI resultó en elevados niveles de IL-18 tanto en el hemisferio lesionado como en el contralateral dentro de las 4 h ($60,6 \pm 3,3$ and $59,8 \pm 5,0$ ng/ml, respectivamente) a 24 h ($56,9 \pm 2,1$ y $56,3 \pm 3,7$ ng/ml, respectivamente) después del trauma; sin embargo, los niveles no fueron significativamente más elevados en comparación con el grupo "éter" ni en comparación con el grupo "ficticio" ($p > 0,05$).
- En contraste con ello, a los 7 días después del CHI, se detectó un incremento significativo en la concentración intracerebral de IL-18 en el hemisferio lesionado, en comparación con los animales anestesiados con éter u operados "ficticio" ($67,6 \pm 5,1$ ng/ml vs. $42,2 \pm 0,8$ and $45,2 \pm 0,5$ ng/ml, respectivamente, $p < 0,01$), mientras que los niveles de IL-18 en el hemisferio contralateral no se habían elevado de manera significativa por arriba de estos dos grupos de control ($63,2 \pm 6,0$ ng/ml; $p = 0,06$).
- Para evaluar el rol del TNF, un mediador crucial de la inflamación en este modelo de trauma (Shohami et al. 1999), con respecto a la regulación de los niveles intracerebrales de IL-18, un grupo adicional de ratones of B6 ($n=10$) recibieron inyecciones i.c.v. de 200 ng TNF recombinante murino en PBS estéril 10 μ l y fueron sacrificados después de 24 h. Como se muestra en la Figura 1, una inyección "simulada" con vehículo solamente ($n = 6$) resultó en una regulación ascendente significativa de IL-18 intracerebral dentro de las 24 h, en comparación con ratones B6 no tratados ($53,6 \pm 3,9$ vs. $27,7 \pm 1,7$ ng/ml; $p < 0,001$).
- La inyección de TNF indujo una significativa atenuación de los niveles de IL-18 en el compartimiento intracraneal dentro de las 24 h ($22,1 \pm 6,9$ ng/ml; $n=10$), en comparación con el grupo de control que recibió inyecciones "simuladas" a las 24 h ($53,6 \pm 3,9$ ng/ml; $p < 0,001$). Los niveles de IL-18 en el "grupo TNF" eran aún inferiores que en los ratones normales no tratados ($27,7 \pm 1,7$ ng/ml), si bien en este caso la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0,45$).
- EJEMPLO 2: Efecto del tratamiento con IL-18BP sobre la recuperación neurológica después del trauma
- Para investigar la hipótesis de que la inhibición de la IL-18 podría facilitar la recuperación en el caso de una lesión cerebral, se comparó la recuperación en diferentes estantes del tiempo después de una única inyección de IL-18BP. Se sabía previamente que el NSS (Neurological Severity Store) al cabo de una hora después del estroma refleja con mayor exactitud la magnitud del trauma y se correlaciona con el volumen del tejido lesionado como puede observarse en MRI y en histología.
- A efectos de obtener grupos de animales control más comparable, se asignaron ratones a diferentes grupos de tratamiento después de haberse evaluado su NSS inicial a $t = 1$ h. Como se muestra en la Figura 2 (NSS en IL-18BP (cuadrados) vs. Control (círculos) ambos grupos tuvieron un NSS similar (1 h) ($7,69 \pm 0,3023$ y $7,44 \pm 0,3627$ control y IL-18BP respectivamente), lo que indica un grado comparable de la gravedad de las lesiones).
- La evaluación del NSS en momentos posteriores (1-7 días) reveló que los animales tratados intraperitonealmente (i.p.) con h IL-18BP presentaban un daño neurológico considerablemente menor, como se puso en evidencia mediante los honores de NSS, que alcanzaron una significancia a los siete días después del trauma ($p = 0,045$).
- Se calculó la velocidad de la cooperación, expresada como $\Delta NSS(t) = NSS(1h) - NSS(t)$. Un valor superior de ANSS refleja una mayor recuperación y un ΔNSS cero o negativo refleja ausencia de recuperación o empeoramiento. En la Figura 3 se ilustran los valores de ΔNSS de los dos grupos. En dos instantes de tiempo, tanto a las 24 horas, a los siete días la diferencia entre los valores de ΔNSS promedios alcanzaron significancia.
- Se llevó a cabo otro experimento para investigar si el tratamiento con IL-18BP, administrado a los tres días después la lesión, puede ser efectivo. El tema del momento oportuno para efectuar el tratamiento es crítico, y hasta ahora la terapia ha demostrado ser efectiva cuando se la administra más allá de unas pocas horas. Ya que se ha descubierto que la IL-18 de por sí se eleva a los siete días después del trauma, y que el tratamiento con IL-18BP administrada una hora después del trauma condujo a un máximo efecto también en el día 7, se decidió ahora tratar los ratones en el día 3 de la lesión. Para fines de comparación, se trató otro grupo a 1 h y a 3 d con IL-18BP. El grupo de control fue tratado con el control (solvente) solamente.
- Los resultados de estos experimentos se ilustran en la Figura 4, en la cual puede observarse que un único tratamiento administrado en el día 3 es tan efectivo como el administrado 1 h después del CHI y nuevamente a los 3 días.

Este experimento demuestra el drástico efecto beneficioso de la administración de una sola vez de IL-18BP, administrada sea 1 h o 3 d después de una lesión cerrada de la cabeza, sobre la recuperación de la lesión traumática de la cabeza en un modelo murino experimental.

EJEMPLO 3: Niveles elevados de IL-18 en CSF humano después de lesión cerebral

- 5 Se evaluaron los niveles de IL-18 en el CSF diario y en mus de suero de 10 pacientes con CHI severo hasta 10 días después del trauma. Los datos demográficos y clínicos de los pacientes se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5: datos demográficos y clínicos de pacientes con CHI severo^a

Paciente N°	Edad/años) sexo	GCS ^b	GOC ^c	IL-18 en CSF ^d (pg/m) mediano [intervalo] ^e		IL-18 en el suero (pg/ML) mediano [intervalo] ^e	
1	48/m	3	1	283	[78-966]	57,5	[12-66]
2	31/m	7	4	228,4	[22-745]	19,7	[4.9-108]
3	26/m	5	3	208,5	[20-392]	37,2	[14-163]
4	57/m	5	4	72,6	[30-286]	48,9	[14-104]
5	24/m	4	5	32,6	[4,9-155]	17	[4,9-58]
6	36/m	8	1	49,4	[10-290]	16,7	[12-67]
7	38/f	3	4	17,9	[11-100]	13	[4,9-46]
8	35/m	3	3	69,8	[4,9-329]	19,8	[7-77]
9	37/m	3	4	37	[23-75]	57,3	[25-98]
10	41/m	7	5	4,9	[4,9-169]	26,2	[15-38]
Control CSFG = 10 4,9 [4,9-7,8]							

^aCHI, closed head injury (lesión cerrada de la cabeza)

^bGCS, Puntuación de Coma de Glasgow (Teasdale and Jennett, 1974).

- 10 ^cGOS = Puntuación de Desenlace de Glasgow a los 3 meses después de la lesión; 5 = asintomático; 4 = discapacidad moderada; 3 = discapacidad severa; 2 = estado vegetativo persistente; 1 = muerte (Jennett and Bond, 1975).

^dCSF = cerebrospinal fluid (fluido cerebrospinal).

^e A los niveles de IL-18 inferiores al límite de detección de 5 pg/ml se les asignó un valor de 4,9 pg/ml.

- 15 Como se muestra en la Tabla 5, los niveles intratecales de IL-18 eran significativamente elevados en 9/10 pacientes de CHI, en comparación con el CSF de control de 5 pacientes sin trauma ni enfermedad neurológica inflamatoria ($p < 0,05$; ANOVA de medidas repetidas). Solamente un paciente (#10) tenía niveles de IL-18 CSF, que no eran significativamente elevados en comparación con el CSF de control ($p = 0,31$). Los niveles medianos y los intervalos individuales de la IL-18 en el CSF y en el suero se presentan en la Tabla 5.

- 20 Lo notable es que las máximas concentraciones de IL-18 en el CSF (966 ng/ml) eran de hasta 200 veces superiores en los pacientes con lesiones de cabeza que en los controles. La IL-18 intracerebral fue detectable mediante ELISA en el 90% de todos los casos de CSF en el grupo de trauma, mientras que solamente el 40% de las muestras de CSF de control tenían niveles de IL-18 intracerebral detectables (es decir, $> 4,9$ ng/ml). En 8/10 pacientes de CHI, las concentraciones medianas de IL-18 era significativamente más elevadas en el CSF que en el suero ($p < 0,05$; medidas repetidas de ANOVA). Sin embargo, en dos pacientes (#9,10) los niveles medianos de la IL-10 en el suero superaron las correspondientes concentraciones de CSF, como se muestra en la Tabla 5.

- 25 Estos resultados muestran que hay niveles significativamente elevados de IL-18 en el fluido cerebrospinal de los pacientes con lesión traumática de la cabeza. La adición de IL-18BP puede reducir estos elevados niveles, y puede por lo tanto ejercer su efecto beneficioso sobre la recuperación de las lesiones cerradas de la cabeza, como se muestra en el Ejemplo 2 precedente.

- 30

Referencias

1. Altschul S F et al, J Mol Biol, 215, 403-410, 1990, Altschul S F et al, Nucleic Acids Res., 25:389-3402,1997
2. Chater, K. F. et al., in "Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology", Akademiai Kaido, Budapest, Hungary (1986), pp. 45-54).
- 5 3. Chen, Y., S. Constantini, V. Trembovler, M. Weinstock, y E. Shohami. 1996. An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. J. Neurotrauma 13:557-68
4. Conti, C.B., N.Y. Calingasan, Y. Kim, H. Kim, Y. Bae, E. Gibson, y T.H. Joh. 1999. Cultures of astrocytes and microglia express interleukin-18. Mol. Brain Res. 67:46-52
- 10 5. Conti, B., J. W. Jahng, C. Tinti, J. H. Son, y T. H. Joh. 1997. Induction of interferon-gamma inducing factor in the adrenal cortex. J. Biol. Chem. 272:2035- 2037.
6. Culhane, A.C, M.D. Hall, N.J. Rothwell, y G.N. Luheshi. 1998. Cloning of rat brain interleukin-18 cDNA. Mol. Psychiatry 3:362-6
- a. Devereux J et al, Nucleic Acids Res, 12, 387-395, 1984.
7. DiDonato, J A, Hayakawa, M, Rothwarf, D M, Zandi, E y Karin, M. (1997), Nature 388, 16514-16517.
- 15 8. Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H., y Woody, J.N., 1994, Lancet 344, 1125-1127.
9. Fassbender, K., O. Mielke, T. Bertsch, F. Muehlhauser, M. Hennerici, M. Kurimoto, y S. Rossol. 1999. Interferon-gamma-inducing factor (IL-18) and interferon-gamma in inflammatory CNS diseases. Neurology 53:1104-6
- 20 10. Jander, S., y G. Stoll. 1998. Differential induction of interleukin-12, interleukin- 18, and interleukin-1 p covering enzyme mRNA in experimental autoimmune encephalomyelitis of the Lewis rat. J. Neuroimmunol. 91:93-9
11. Lancet 1975 Mar 1;1(7905):480-4. Jennett B, Bond M.
12. Izaki, K. (1978) Jpn. J. Bacteriol. 33:729-742).
- 25 13. 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.
14. Kossman, T., P.F. Stahel, P.M. Lenzlinger, H. Redl, R.W. Dubs, O. Trentz, G. Schlag, y M.C. Morganti-Kossmann. 1997. Interleukin-8 released into the cerebrospinal fluid after brain injury is associated with blood brain-barrier dysfunction and nerve growth factor production. J. Cereb. Blood Flow Metab. 17:280-9
- 30 15. 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
16. 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.
- 35 17. Micallef, M. J., T. Ohtsuki, K. Kohno, F. Tanabe, S. Ushio, M. Namba, T. Tanimoto, K. Torigoe, M. Fujii, M. Ikeda, S. Fukuda, y 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.
- 40 18. Morganti-Kossmann, M.C., P.M. Lenzlinger, V. Hans, P. Stahel, E. Csuka, E. Ammann, R. Stocker, O. Trentz, and T. Kossman. 1997. Production of cytokines following brain injury: beneficial and deleterious for the damaged tissue. Mol. Psychiatry 2:133-6

19. Nakamura K, Okamura H, Wada M, Nagata K, Tamura T. *Infect Immun* 1989 Feb;57(2):590-5
20. Novick, D, Kim, S-H, Fantuzzi, G, Reznikov, L, Dinarello, C, and Rubinstein, M (1999). *Immunity* 10, 127-136.
21. Okamura H, Nagata K, Komatsu T, Tanimoto T, Nukata Y, Tanabe F, Akita K, Torigoe K, Okura T, Fukuda S, et al. *Infect Immun* 1995 Oct;63(10):3966-72
- 5 22. Parnet, P, Garka, K E, Bonnert, T P, Dower, S K, y Sims, J E. (1996), *J. Biol. Chem.* 271, 3967-3970.
- a. Pearson W R, *Methods in Enzymology*, 183, 63-99,1990
- b. Pearson W R and Lipman D J, *Proc Nat Acad Sci USA*, 85, 2444- 2448,1988
23. Prinz, M., y U.K. Hanisch. 1999. Murine microglial cells produce and respond to interleukin-18. *J. Neurochem.* 72:2215-8
- 10 24. *J Clin Invest* 1997 Feb 1;99(3):469-74 Rotbe H, Jenkins NA. Copeland NG, Kolb H.
25. Scherbel, U., R. Raghupathi, M. Nakamura, K.E. Saatman, J.Q. Trojanowski, E. Neugebauer, M.W. Marino, and T.K. McIntosh. 1999. Differential acute and chronic responses of tumor necrosis factor-deficient mice to experimental brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8721-6
- 15 26. Shohami, E., I. Ginis, y J.M. Hallenbeck. 1999. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev.* 10:119-30
27. Shohami, E; Beit-Yannai E., Horowitz M; Kohen R (1997): *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17.1007-1019.
28. Teasdale G, Jennett B. *Lancet* 1974 Jul 13;2(7872):81-4
29. Stahel PF, Shohami E, Younis FM, Kariya K, Otto VI, Lenzlinger PM, Grosjean MB, Eugster HP, Trentz O, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000 Feb;20(2):369-80
- 20 30. Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, Tanabe F, Konishi K, Micallef M, Fujii M, Torigoe K, Tanimoto T, Fukuda S, Ikeda M, Okamura H, Kurimoto M. *J Immunol* 1996 Jun 1 ;156(11):4274-9
31. Wheeler, R.D., A.C. Culhane, M.D. Hall, S. Pickering-Brown, N.J. Rothwell, y G.N. Luheshi. 2000. Detection of the interleukin-18 family in rat brain by RT-PCR. *Mol. Brain Res.* 77:290-3
- 25 32. Whalen, M.J., T.M. Carlos, P.M. Kochanek, S.R. Wisniewski, M.J. Bell, R.S. Clark, S.T. DeKosky, D.W. Marion, y P.D. Adelson. 2000. Interleukin-8 is increased in cerebrospinal fluid of children with severe head Injury. *Crit. Care Med.* 28:929-34
33. Yoshimoto T, Takeda, K, Tanaka, T, Ohkusu, K, Kashiwamura, S, Okamura, H, Akira, S y Nakanishi, K (1998), *J. Immunol.* 161,3400-3407.
34. Shohami E., Gallily R., Mechoulam R., Bass R. y Ben-HurT. (1997), *J. Neuroimmunol.* 72, 169-177.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un inhibidor de la IL-18, en donde el inhibidor de la IL-18 es una proteína que se liga a la IL-18 (IL-18 BP) para la producción de un medicamento para el tratamiento de las lesiones traumáticas del cerebro (lesión cerrada de la cabeza), administrándose la IL-18 BP en una única dosis a los tres días después de la lesión.
- 5 2. El uso según la reivindicación 1, en donde la proteína que se liga a la IL-18 está glicosilada en uno o más sitios.
3. El uso según la reivindicación 1, en donde la IL-18 BP está fusionada a la totalidad o a una parte de una inmunoglobulina (Ig).
- 10 4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el medicamento comprende además un interferón.
5. El uso según la reivindicación 4, en donde el interferón es interferón- α o interferón- β .
6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el medicamento comprende además TNF (Factor de Necrosis de los Tumores).
7. El uso según la reivindicación 6, en donde el TNF es TNF alfa.
- 15 8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el agente comprende además un agente antiinflamatorio.
9. El uso según la reivindicación 8, en donde el agente inflamatorio es un inhibidor de COX, en particular un inhibidor de COX-2.
- 20 10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el medicamento comprende además un antioxidante.
11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el inhibidor de la IL-18 se utiliza en gran cantidad de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 0,1 a 5 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 1 a 3 mg/kg de peso corporal.
- 25 12. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el inhibidor de IL-18 se administra por vía subcutánea.

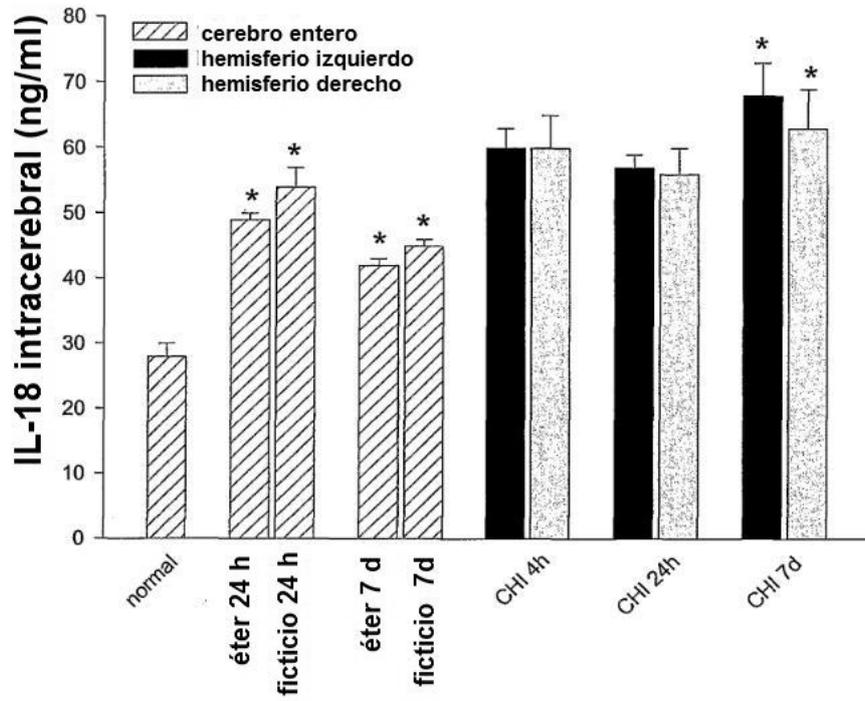


Fig. 1

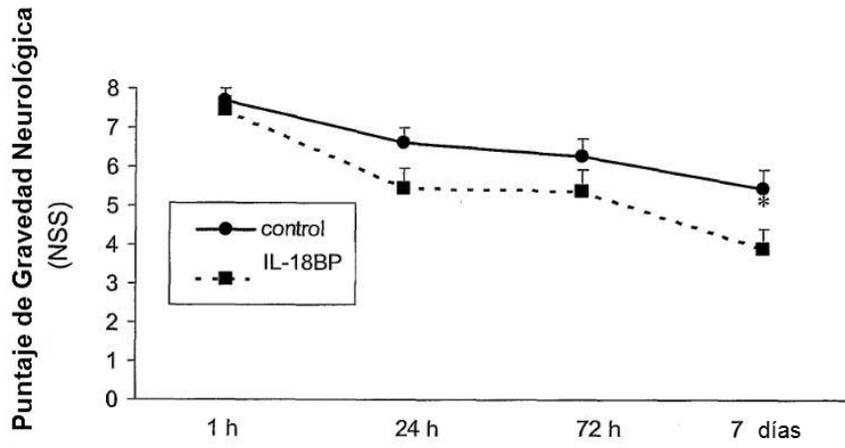


Fig. 2

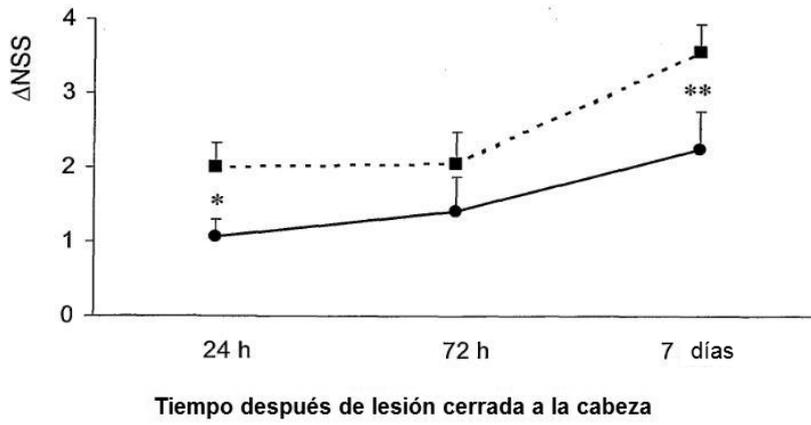


Fig. 3

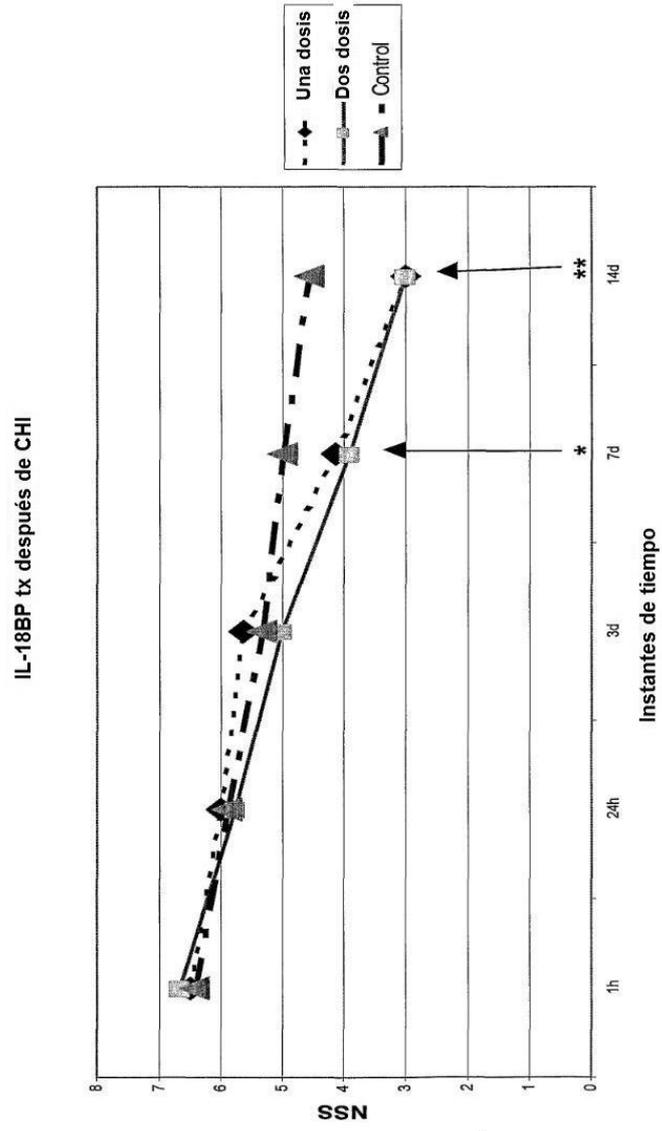


Fig. 4