

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4885424号
(P4885424)

(45) 発行日 平成24年2月29日 (2012. 2. 29)

(24) 登録日 平成23年12月16日 (2011. 12. 16)

(51) Int. Cl.

F 1

A 6 1 K	38/00	(2006. 01)	A 6 1 K	37/02
A 6 1 P	7/02	(2006. 01)	A 6 1 P	7/02
A 6 1 P	9/00	(2006. 01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	9/10	(2006. 01)	A 6 1 P	9/10

請求項の数 10 (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2003-577930 (P2003-577930)
 (86) (22) 出願日 平成15年3月13日 (2003. 3. 13)
 (65) 公表番号 特表2005-520852 (P2005-520852A)
 (43) 公表日 平成17年7月14日 (2005. 7. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2003/050061
 (87) 国際公開番号 W02003/080104
 (87) 国際公開日 平成15年10月2日 (2003. 10. 2)
 審査請求日 平成18年2月21日 (2006. 2. 21)
 審判番号 不服2009-2164 (P2009-2164/J1)
 審判請求日 平成21年1月30日 (2009. 1. 30)
 (31) 優先権主張番号 02100290.2
 (32) 優先日 平成14年3月22日 (2002. 3. 22)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 508066979
 メルク セロノ ソシエテ アノニム
 スイス連邦、ヴォ、クワンシン 126
 7、サーントル アンデュストリエル (番
 地なし)
 (73) 特許権者 504356627
 ランスティテュ ナショナル ドゥ ラ
 サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ
 ディカル
 フランス共和国、75013 パリ、リュ
 トルビアク 101
 (74) 代理人 100098464
 弁理士 河村 洸
 (74) 代理人 100149630
 弁理士 藤森 洋介

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 末梢脈管疾患の治療および／または予防のための IL-18 阻害剤の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

IL-18 阻害剤を含む四肢の末梢虚血の治療のための医薬であって、IL-18 阻害剤が IL-18 結合タンパク質、または IL-18 の生物学的活性を阻害する、IL-18 結合タンパク質のアイソフォーム、１もしくは複数の保存的なアミノ酸置換を含む IL-18 結合タンパク質のムテイン、免疫グロブリン融合を含む IL-18 結合タンパク質の融合タンパク質もしくは IL-18 結合タンパク質のポリエチレングリコール化誘導体から選択される医薬。

【請求項 2】

四肢の末梢虚血が下肢の末梢虚血である請求項 1 記載の医薬。

【請求項 3】

四肢の末梢虚血が跛行を伴う請求項 1 または 2 記載の医薬。

【請求項 4】

四肢の末梢虚血がバーガー病（閉塞性血栓血管炎）由来である請求項 1、2 または 3 記載の医薬。

【請求項 5】

四肢の末梢虚血が重篤な四肢虚血である請求項 1、2、3 または 4 記載の医薬。

【請求項 6】

四肢の末梢虚血が壊疽および／または潰瘍を伴う請求項 1、2、3、4 または 5 記載の医薬。

10

20

【請求項 7】

四肢の末梢虚血が四肢切断を伴う請求項 1、2、3、4、5 または 6 記載の医薬。

【請求項 8】

IL - 18 阻害剤が 1 つ以上の部位でグリコシル化されている請求項 1、2、3、4、5、6 または 7 記載の医薬。

【請求項 9】

IL - 18 阻害剤のコード配列を含有する発現ベクターを含む四肢の末梢虚血の治療のための医薬であって、IL - 18 阻害剤が IL - 18 結合タンパク質、または IL - 18 の生物学的活性を阻害する、IL - 18 結合タンパク質のアイソフォーム、1 もしくは複数の保存的なアミノ酸置換を含む IL - 18 結合タンパク質のムテインもしくは免疫グロブリン融合を含む IL - 18 結合タンパク質の融合タンパク質から選択される医薬。

10

【請求項 10】

四肢の末梢虚血の治療のための医薬の製造における、IL - 18 阻害剤のコード配列を含有する発現ベクターの使用であって、IL - 18 阻害剤が IL - 18 結合タンパク質、または IL - 18 の生物学的活性を阻害する、IL - 18 結合タンパク質のアイソフォーム、1 もしくは複数の保存的なアミノ酸置換を含む IL - 18 結合タンパク質のムテインもしくは免疫グロブリン融合を含む IL - 18 結合タンパク質の融合タンパク質から選択される使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は脈管疾患の分野にある。より具体的には、本発明は末梢脈管疾患の治療および/または予防のための IL - 18 阻害剤の使用に関する。本発明はさらに、切断の予防のための IL - 18 阻害剤の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

サイトカインであるインターロイキン 18 (IL - 18) は、当初はインターフェロン - γ (IFN - γ) 誘導因子として記載された (ナカムラ (Nakamura) ら、1989 年)。それは、T - リンパ球ヘルパー細胞 1 型 (TH1) 応答の発生における初期シグナルである。IL - 18 は IL - 12、IL - 2、抗原、マイトジェンおよびことによると別の因子と一緒に作用し、IFN - γ の産生を誘導する。IL - 18 はまた、GM - CSF および IL - 2 の産生を促進し、抗 - CD3 誘導性 T 細胞増殖を増強し、そしてナチュラルキラー細胞の Fas - 媒介性細胞死を増加させる。

30

【0003】

成熟 IL - 18 は、IL - 1 β 変換酵素 (ICE、カスパーゼ - 1) によりその前駆体から産生される。

【0004】

IL - 18 受容体は、リガンドの結合において共作用する、少なくとも 2 つの成分、IL - 18 R α および IL - 18 R β からなる。IL - 18 に対する高親和性および低親和性の結合部位がマウス IL - 12 刺激 T 細胞において見出されたことにより (ヨシモト (Yoshimoto) ら、1998 年)、多重鎖受容体複合体 (multiple chain receptor complex) であることが示唆された。これまでに同定された 2 つの受容体サブユニットは、どちらも IL - 1 受容体ファミリーに属している (パルネット (Parnet) ら、1996 年; キム (Kim) ら、2001 年)。IL - 18 のシグナル伝達は NF - κ B の活性化に関与する (デイドネート (DiDonato) ら、1997 年)。IL - 18 受容体複合体は、2 つの受容体鎖: IL - 18 R α 鎖と呼ばれるリガンド結合鎖および IL - 18 R β 鎖と呼ばれるシグナル伝達鎖とで構成される。IL - 18 R α 鎖は当初、放射線標識化 IL - 18 に結合する細胞表面タンパク質として単離された。そのタンパク質は精製され、そのアミノ酸配列が、IL - 1 関連タンパク質 (IL - 1 R r p) と呼ばれる以前に報告されていた孤立受容体と同一であることが明らかになった (トリゴエ (Torigoe) ら、1997 年)。

40

50

【 0 0 0 5 】

近年、IL - 18 に高い親和性を有する可溶性タンパク質がヒトの尿から単離され、ヒトおよびマウスの c D N A ならびにヒト遺伝子がクローニングされた（ノービック（Novick）ら、1999年；国際公開第99/09063号パンフレット）。そのタンパク質はIL - 18 結合タンパク質（IL - 18 B P）と呼ばれている。

【 0 0 0 6 】

IL - 18 B P は、既知のIL - 18 受容体の1つの細胞外ドメインではないが、分泌され、通常循環しているタンパク質である。IL - 18 B P は、分泌タンパク質の新しいファミリーに属し、さらに、そのファミリーはボックスウイルスにコードされるいくつかのタンパク質を含む（ノービックら、1999年）。尿のIL - 18 B P ならびに組換えIL - 18 B P は、特異的に高い親和性でIL - 18 に結合し、IL - 18 の生物学的活性を調節する。

10

【 0 0 0 7 】

IL - 18 B P の遺伝子はヒト染色体の11q13に位置し、8.3kbのゲノム配列中には膜貫通ドメインをコードするエクソンは見出されなかった。択一的mRNAスプライシングにより産生される4つのスプライス変異体、すなわちIL - 18 B P のアイソフォームがこれまでにヒトで見つかっている。それらはIL - 18 B P a、b、cおよびdと名付けられ、すべて共通のN末端を有し、C末端は異なっている（ノービックら、1999年）。これらのアイソフォームは、IL - 18 を結合する能力の点で異なる。4つのうち、hIL - 18 B P アイソフォームaおよびcは、IL - 18 の中和能力を有することが知られている。ヒトIL - 18 B P アイソフォームは、マウスIL - 18 に結合する。

20

【 0 0 0 8 】

末梢脈管疾患には、動脈疾患（閉塞性または機能性）、静脈疾患、複合動静脈疾患（combined arteriovenous）（たとえば、動静脈瘤）、またはリンパ管疾患が含まれ得る。閉塞性動脈疾患には、末梢動脈閉塞やバーガー病（閉塞性血栓性血管炎とも呼ばれる）があげられる。機能性動脈障害は、血管痙攣（レーノー現象およびレーノー病、先端チアノーゼ）または血管拡張（先端紅痛症）であり得る。それらは血管の局所的欠陥または交感神経系活動の妨害（disturbances）に続発するか、または器質的脈管疾患に付随して生じ得る。静脈疾患には静脈血栓症や拡張蛇行静脈があげられ、複合動静脈疾患には動静脈瘤があげられ、そしてリンパ性疾患にはリンパ浮腫および脂肪浮腫があげられる。

30

【 0 0 0 9 】

末梢動脈閉塞とは、一般にアテローム性動脈硬化プラーク（アテローム）、血栓または塞栓症による四肢（extremities）への血液供給の閉塞を意味する。

【 0 0 1 0 】

末梢動脈閉塞は、結果として急性または慢性の虚血を引き起こし得る。急性虚血は、破裂した近位の動脈硬化プラークにより、先在するアテローム硬化症にもとづく急性血栓症により、心臓、大動脈もしくは他の大型の管由来の塞栓により、または解離した動脈瘤により引き起こされる。慢性虚血は、アテロームプラークのゆっくりとした拡大により引き起こされる。

40

【 0 0 1 1 】

持続的な高濃度血中ホモシステインは、内皮細胞を損傷することにより、大動脈およびその分枝、末梢動脈、大脳動脈、ならびにことによると冠状動脈の早発性アテローム性動脈硬化症の素因となる。ホモシステイン濃度は通常ほかの危険因子と関連して上昇するが、それらは食事やビタミンB補給により修正され得る。

【 0 0 1 2 】

動脈閉塞の臨床的諸症状は、罹患血管、閉塞の程度、閉塞の進行の速さ、および側副の流れが充分かどうかにより決まる。

【 0 0 1 3 】

急性閉塞は、四肢に突然起こる激痛、寒気、痺れ、および蒼白などの病歴を有する。四

50

肢は冷たく紫になり、閉塞の遠位では拍動がなくなる。急性閉塞は、感覚および運動の失調、そして最終的には（6～8時間後）触診で圧痛を示す筋肉の硬化により明らかとされる重篤な虚血を引き起こし得る。

【0014】

慢性閉塞においては、症状は組織虚血の潜行性の発生に関係している。初期症状は間欠性の跛行である。跛行の症状は、歩行時に現れる痛み、うずき（ache）、痙攣または疲労感である。これらの症状はふくらはぎに最も多く見られるが、足（foot）、大腿部、股関節部または臀部にも現れ得る。

【0015】

最終的には、虚血性の痛みは安静時に起こることもあり、深刻な場合四肢の最も遠位の部分で始まり、挙げること（elevation）により悪化する容赦ない痛みで、そしてしばしば睡眠を妨げる。

【0016】

動脈閉塞のレベルと間欠性跛行の位置との間には密接な相関関係がある（たとえば、大動脈腸骨動脈疾患は、臀部、股関節部およびふくらはぎに跛行を引き起こすことが多く、そして大腿部の脈拍は減弱しているかまたはなくなる）。大腿膝窩動脈疾患では、跛行は通常ふくらはぎに起こり、大腿から下位のすべての脈がなくなる。小管疾患（たとえば、閉塞性血栓性血管炎、真性糖尿病）の患者では、大腿膝窩動脈の脈拍は存在し得るが、足の脈はない。1～2分足を挙げた後の罹患した足の蒼白、その後の足を下ろした際（on dependency）の発赤が、動脈の機能不全を確認するのを助ける。挙げた後、足を下ろした際の静脈の充満時間は、正常な限界である15秒よりも長い。跛行の症候が良好な末梢の脈で現れた場合は、脊髄の狭窄が鑑別診断において考慮されるべきである。

【0017】

高度な虚血状態の足は、痛く、冷たくまたしばしば痺れる。慢性の場合、皮膚が乾燥し、鱗片を伴い、爪や髪の毛の成長が乏しくなり得る。虚血がさらに悪化すると、特に局所的な外傷の後、潰瘍形成がみられる（典型的には、つま先またはかかとに、時には脚（leg）に）。患者が痛みの軽減のために脚を従属する位置に維持しないかぎり、浮腫は通常現れないが、高度な虚血状態の脚は萎縮することがある。より広範囲な閉塞が組織の生存を危うくし、壊死または壊疽を引き起こす。発赤、痛み、下垂した足の腫脹を伴う虚血は、蜂巣炎または静脈不全に似た症状を呈する。動脈の非侵襲性テストにより診断を明確にすることができる。

【0018】

末梢脈管疾患のなかで、バーガー病（閉塞性血栓性血管炎）は、小型および中型動脈ならびに静脈の炎症性の変化によって特徴付けられる閉塞性疾患である。

【0019】

バーガー病は、紙巻きたばこ（cigarette）喫煙者に発生し、主に20～40代の男性に起こる。女性の発症患者は約5%のみである。この診断の頻度は近年劇的に減少している。これは、閉塞性動脈硬化症に対して、この疾患の臨床および血管造影特性がより良く理解されているためである。

【0020】

原因は不明であるが、バーガー病は、非喫煙者では報告されておらず、おそらく、遅延型過敏症または毒性血管炎のように、第一の原因因子として巻きたばこ喫煙が関係している。閉塞性血栓性血管炎は、この疾患の患者にHLA-A9およびHLA-B5の人が非常に多いことから、特定の表現型を有する人でのタバコに対する反応であるか、または血管の構成成分であるI型およびIII型ヒトコラーゲンに対する細胞性過敏症による自己免疫疾患である可能性がある。

【0021】

アテローム性動脈硬化症と異なり、バーガー病は冠状動脈とは関係していない。

【0022】

その疾患は、分節パターンにおける四肢の小型および中型動脈、ならびにしばしば表在

10

20

30

40

50

性静脈と関連している。まれに、進行した疾患においては、体のほかの部分の血管が罹患する。病理学的所見は、罹患血管の血栓を伴う、非化膿性の汎動脈炎または汎静脈炎の所見である。内皮細胞の増殖と内膜層へのリンパ球の浸潤が、急性の病変に生じるが、内弾性板は正常である。血栓は器質化し、その後不完全に再疎通する。中膜はよく保存されるが、線維芽細胞に浸潤され得る。外膜は通常より広範囲に線維芽細胞により浸潤されるので、古い病変ほど動脈周囲の線維化を示す。その線維化は、近接する静脈と神経も巻き込み得る。

【 0 0 2 3 】

その症状と徴候は、動脈虚血と表在性血栓静脈炎のものである。発症は緩やかで、上肢および下肢（lower extremities）の最も遠位の血管に始まり、近位に進行し、最終的に遠位の壊疽となる。患者は、疾患の客観的な徴候があらわれる前に、冷感、痺れ、疼き（tingling）または灼熱痛（burning）を訴えることがある。レーノー現象がよく見られる。間欠性跛行は罹患した四肢にあらわれる（通常足または脚の痛み、まれに手、腕または大腿）。痛みはより重度の虚血、たとえば壊疽の前段階、潰瘍または壊疽で持続する。しばしば、交感神経の働き過ぎが、冷感、多汗、および罹患した四肢のチアノーゼとして明らかにされ、おそらく重度の持続する痛みによる。

10

【 0 0 2 4 】

虚血性潰瘍および壊疽（通常1つ以上の指の壊疽）は、疾患の初期に現れるが急性ではない。非侵襲性の検査は、罹患したつま先、足、および手の指の血流と血圧のひどい減少を示す。疾患は近位に進行する。

20

【 0 0 2 5 】

もう1つの末梢脈管疾患は、下肢末梢動脈疾患（PAD）の患者が、進行して重篤な虚血の徴候のある四肢（limb-threatening ischemia）になり得る、末梢動脈疾患である。虚血性休息痛、非癒合潰瘍形成および壊疽は、不幸な結果のすべての前兆である。これらの患者は、四肢を失う高い危険がある。重篤な四肢虚血の迅速な決断と評価とそれに続く効果的な血管再生（revascularization）は、四肢の救出および全体的な健康の維持のために必要である。

【 0 0 2 6 】

慢性の重篤な四肢虚血は、動脈閉塞症（最も一般的にはアテローム性動脈硬化症）の最終的な結果である。高血圧、高コレステロール血症、紙巻たばこの喫煙および糖尿病と共同して、アテローム性動脈硬化症に加えて、慢性の重篤な四肢虚血の原因は、バーガー病または閉塞性血栓血管炎、および動脈のいくつかの形態などである。

30

【 0 0 2 7 】

慢性の重篤な四肢虚血の発症は、通常、組織への血流が大幅に減少する複数部位の動脈閉塞を必要とする。重篤な組織虚血は、臨床的には休息痛、非癒合創傷（創傷の治癒には代謝の増加が必要なので）または組織壊死（壊疽）として明らかにされる。

【 0 0 2 8 】

虚血性休息痛は、患者が床についている夜に悪化し、母指球およびつま先の焼けるような痛みとして古典的には説明されている。虚血性休息痛は、組織が心臓から最も遠く、動脈閉塞遠位である足に局在化する。非癒合創傷は、通常、合っていない靴や怪我による足の外傷の領域で見られる。創傷は一般的に、通常の包帯の取替え、外傷の回避、感染の治療および壊死組織の切除などの保存療法を4週間から12週間試して反応がない場合に非癒合であるとみなされる。

40

【 0 0 2 9 】

壊疽は、通常つま先に見られる。それは、血液供給が低過ぎて、最も灌流の乏しい組織で自然発生的に壊死が生じる場合に発症する。

【 0 0 3 0 】

注意深く計画された保存的療方は、重篤な四肢虚血の多くの患者に有益なものであるが、それらの疾患の深刻性によっては、手術介入が検討される。外科的介入には血管再生や切断があげられる。患者が血管再生を受けることを望む場合や、許容可能な手術候補者（

50

acceptable operative candidate)である場合、しばしば、さらなる評価のため、そして血管再生の計画のため動脈造影が行なわれる。いくつかのセンターでは、造影剤 (dye) 暴露の危険を最小限に抑えるために動脈造影法に代わるものとしてまたは補完するものとして磁気共鳴血管造影法が使用される。血管再生による四肢保存は費用効率がよく、ほとんどの患者に質の高い生活をもたらし、手術時の疾病率および死亡率が切断よりも低い。四肢保存は、慢性の重篤な四肢虚血のほとんどの患者の目標のはずである。

【 0 0 3 1 】

血管再生が実行できるかどうかは、動脈造影の所見、ならびにバイパス導管 (conduit) の有効性によって決まる。血管形成またはステント留置、またはその両方は、跛行の患者にみられるような、短く、近位の損傷で最も成功しているが、重篤な四肢虚血の場合には、動脈閉塞疾患の多重性により、必要とされる最良の治療法である可能性は低い。理想的なバイパス導管は大伏在静脈であるが、他の導管としては、小伏在静脈、腕静脈または人工導管があげられる。最も外科的な系において、ふくらはぎ動脈の3年のバイパス開存性率は、人工バイパスでの40パーセントから大伏在静脈バイパスでの85パーセントまで変動する。相対的に、保存的治療の研究では、非癒合創傷で25から49パーセントの成功率、そして虚血性休息痛において50から80パーセントの改善率を証明した。

【 0 0 3 2 】

一次切断術は、広範囲の組織壊死、命にかかわる感染または血管再生に適合しない外傷の患者などの特定の患者に示され得る。注意深い待機と保存的取扱いで患者の状態をモニターするという決定、または血管再生もしくは切断を行なうという決定は、保存的取扱いと比較して手術に付随する危険と利点との念入りな評価によって決まる。

【 0 0 3 3 】

より重要なことには、それは、利用可能な選択肢の侵襲性または適合性についての患者の解釈にかかっている。病状により歩けない患者でさえ、切断は不適當であると考え得るし、すべての患者が切断後のリハビリテーションに必要な作業をする気になるわけではない。切断する決断がなされる場合、切断のレベルは、機能的リハビリテーションの最大の機会を患者に与える一方、一番回復の見込みのあるものとすべきである。

【 0 0 3 4 】

慢性の重篤な四肢虚血の診断は、明らかな休息痛、非癒合創傷および壊疽などである。虚血性休息痛は、典型的には、土踏まずまたは足先 (distal foot) の灼熱痛として説明される。その痛みは、患者が横になっているときに現れ、患者が足を下ろした位置に戻ると和らぐ。重篤な四肢虚血の診断を裏付ける客観的な血行動態パラメーターは、くるぶし - 上腕指数0.4以下、くるぶし最大血圧50 mmHg以下、またはつま先最大血圧30 mmHg以下である。介入は、保存的療法、血管再生または切断であり得る。進行性壊疽、急速に広がった創傷または持続的な虚血性休息痛は、四肢への治療を意味し、ひどく高い手術の危険性なく患者における血管再生の必要性を示唆する。重篤な四肢虚血では、動脈狭窄の多重性および末端性のため、バイパス移植術が通常必要とされる。糖尿病の患者は、他の患者より、バイパス移植術があまり適さない末端の疾患にかかる可能性が高い。切断と比較した場合、血管再生はより費用効果がよく、より良い手術に際する疾病率および死亡率を示す。四肢の保存は、ほとんどの重篤な四肢虚血の患者における目標のはずである。

【 0 0 3 5 】

現在、末梢脈管疾患の主な治療は、四肢切断と同様に新生血管形成などの侵襲性治療である。アテローム性動脈硬化プラークの発達を増加させることなく末梢新生血管形成を刺激する薬物の同定は、この医学分野における主要で治療上重要なものである。

【 発明の開示 】

【 0 0 3 6 】

本発明は、IL-18阻害剤が、実験的動物モデルにおいて、末梢虚血の誘導ののちの新生血管形成を刺激するという知見に基づく。新生血管形成はVEGF/Aktシグナルの活性化に関連して生じ、骨髄内皮前駆細胞の移動と分化の増加を伴う。

【 0 0 3 7 】

これらの結果に基づき、新生血管形成または血管再生を必要とする末梢脈管疾患を治療または予防するための新規な治療アプローチが提供される。

【 0 0 3 8 】

本発明は、したがって、末梢脈管疾患、とりわけ末梢虚血の治療および／または予防のための I L - 1 8 阻害剤の使用に関する。

【 0 0 3 9 】

本発明はさらに、跛行および壊疽の治療および／または予防のための医薬の製造における I L - 1 8 阻害剤の使用に関する。

【 0 0 4 0 】

さらに、本発明は切断、とくに四肢切断の予防のための医薬の製造における I L - 1 8 阻害剤の使用に関する。

【 0 0 4 1 】

I L - 1 8 阻害剤のコード配列を含有する発現ベクターの使用、ならびに末梢脈管疾患の治療または予防のための、細胞での I L - 1 8 阻害剤の内因性産生を誘導および／または促進するための発現ベクターの使用も本発明の範囲内である。

【 0 0 4 2 】

本発明はさらに、末梢脈管疾患の治療方法であって、それを必要とする患者 (host) に有効阻害量の I L - 1 8 阻害剤を投与することからなる方法に関する。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 4 3 】

本発明は、I L - 1 8 阻害剤が、インビボマウス疾患モデルにおいて、非虚血肢の血管密度に影響を与えることなく、四肢虚血後の、虚血後脈管形成を有意に増加させるという知見にもとづく。したがって、本発明は、組織灌流の促進を必要とする末梢脈管疾患の治療または予防のための新規な治療アプローチを提供する。

【 0 0 4 4 】

本発明はしたがって、末梢脈管疾患の治療および／または予防のための医薬の製造における I L - 1 8 阻害剤の使用に関する。

【 0 0 4 5 】

本明細書の文脈内において、用語「予防」は、ある作用の完全な予防のみならず、疾患の前または疾患の発症初期での任意の部分的なまたは実質的な作用の予防、減衰 (attenuation)、減退 (reduction)、減少 (decrease) または縮小すること (diminishing) を意味する。

【 0 0 4 6 】

本明細書の文脈内において、用語「治療」は、疾患の発症後の病的な状態の発展の減衰、減退、減少または縮小などの、病気の進行に対する任意の有益な作用を意味する。

【 0 0 4 7 】

本明細書において使用される、用語「末梢脈管疾患」は、四肢の動脈、静脈およびリンパ管に影響を及ぼす疾患または障害を意味する。末梢脈管障害は、動脈障害 (閉塞性または機能性)、静脈障害、複合動静脈障害 (たとえば、動静脈瘤)、またはリンパ管障害であり得る。閉塞性動脈疾患には、末梢動脈閉塞症や閉塞性血栓性血管炎があげられる。機能性動脈障害は、血管痙攣 (レーノー現象およびレーノー病、先端チアノーゼ) または血管拡張 (先端紅痛症) であり得る。それらは血管の局所的欠陥または交感神経活動の妨害に続発するか、または有機的な脈管疾患に付随して生じ得る。静脈疾患には静脈血栓症や拡張蛇行静脈があげられ、複合動静脈疾患には動静脈瘤があげられ、そしてリンパ性疾患にはリンパ浮腫および脂肪浮腫があげられる。

【 0 0 4 8 】

末梢脈管疾患は、前記の「発明の背景」に記載されたすべての医学的徴候、疾患、障害または症状を包含することを意味している。

【 0 0 4 9 】

本明細書の文脈内において、用語「ＩＬ－１８阻害剤」は、ＩＬ－１８産生および／または作用を、ＩＬ－１８産生および／または作用が減衰され、減退され、または部分的に、実質的にもしくは完全に妨げられ、または遮断されるように調節する任意の分子を意味する。

【００５０】

産生阻害剤は、ＩＬ－１８の合成、プロセッシングまたは成熟に否定的に影響する任意の分子であり得る。本発明において考慮される阻害剤は、たとえば、インターロイキンＩＬ－１８の遺伝子発現のサプレッサー、ＩＬ－１８ｍＲＮＡの転写を減じるかもしくは妨げるか、または結果としてｍＲＮＡの分解をもたらすアンチセンスｍＲＮＡ、正しい折り畳みを阻害する、または部分的にもしくは実質的にＩＬ－１８の分泌を妨げるタンパク質、いったん合成されたＩＬ－１８を分解するプロテアーゼ、プロ－ＩＬ－１８を切断し成熟ＩＬ－１８を産生するカスパーゼ－１の阻害剤などのプロテアーゼの阻害剤などである。

10

【００５１】

ＩＬ－１８作用の阻害剤は、たとえばＩＬ－１８アンタゴニストであり得る。アンタゴニストは、ＩＬ－１８分子自身に十分な親和性と特異性で結合するかまたはＩＬ－１８分子自身を十分な親和性と特異性で隔離するかのいずれかにより、ＩＬ－１８またはそのリガンド（たとえば、その受容体に）へのＩＬ－１８結合を担うＩＬ－１８結合部位を部分的にもしくは実質的に中和させ得る。アンタゴニストはまた、ＩＬ－１８受容体結合へのＩＬ－１８結合の際に細胞内において活性されるＩＬ－１８シグナル伝達経路を阻害し得る。

20

【００５２】

ＩＬ－１８作用の阻害剤はまた、可溶性ＩＬ－１８受容体もしくはその受容体擬似分子、またはＩＬ－１８受容体遮断剤、またはポリクローナルもしくはモノクローナル抗体などのＩＬ－１８抗体、またはＩＬ－１８のその標的への結合を妨げ、よって、ＩＬ－１８によって媒介される細胞内もしくは細胞外反応の誘発を減少もしくは妨げる任意の他の物質もしくは分子であり得る。

【００５３】

本発明の好ましい実施態様において、末梢脈管疾患は末梢動脈疾患である。

【００５４】

「末梢動脈疾患」は、腕から脚の大動脈および動脈までの任意の動脈の狭窄を伴う障害である。発症は、突然または緩やかであり得、通常結果として虚血（酸素の血管供給領域への送達の減少）になる。

30

【００５５】

好ましくは、本発明にしたがって、末梢動脈疾患は下肢に関する。末梢動脈疾患または末梢動脈閉塞は慢性または急性であり得る。末梢動脈疾患はしばしば跛行を伴う。

【００５６】

したがって、本発明はさらに、跛行の治療および／または予防のためのＩＬ－１８阻害剤の使用に関する。跛行は、脚、特にふくらはぎの痛みであり、それが移り変わり跛行（limping）を生じる。典型的には、跛行は歩行中に感じ、静止中には鎮まる。したがって、一般的に間欠性跛行と呼ばれる。通常、跛行の痛みの間欠性は、脚の筋肉への酸素の一時的な供給不足が原因である。その酸素供給不足は、脚に血液を供給する動脈の狭窄または閉塞の結果である。これは、酸素の脚筋肉への供給を制限し、特にこれらの筋肉の酸素要求が運動や歩行により上昇する際に感じられる。

40

【００５７】

本発明の好ましい実施態様において、末梢脈管疾患は、閉塞性血栓性血管炎（バーガー病）である。「バーガー病」は、小型動脈および中型動脈ならびに静脈における炎症性の変化によって特徴付けられる閉塞性疾患であり、しばしば紙巻タバコ喫煙者に、主に２０～４０歳の男性に起こる。

【００５８】

50

その疾患は、分節パターンにおける四肢の小型および中型動脈、ならびにしばしば表在性静脈と関連している。

【 0 0 5 9 】

さらなる好ましい実施態様において、末梢脈管疾患は、末梢虚血、特に四肢虚血である。「虚血」は血液供給の欠陥であり、通常、血管の閉塞または外傷による。「末梢虚血」は特に四肢（すなわち腕または脚）の虚血を意味し、結果として対応する肢組織の酸素供給の欠乏をもたらす。

【 0 0 6 0 】

本発明のさらになお好ましい態様において、四肢虚血は重篤な四肢虚血である。「重篤な四肢虚血」とは、その肢への血液供給がその生存を脅かすほど乏しい状態である。休息痛、潰瘍形成または壊疽の存在は、重篤な四肢虚血を示唆している。壊疽は死んだ組織を説明するために使用される専門用語であり、しばしば四肢虚血の結果、または四肢虚血と共に生じる。虚血性潰瘍は不十分な血液供給により引き起こされる。

10

【 0 0 6 1 】

壊疽または潰瘍などの重篤な四肢虚血は、その肢の切断を防ぐために血管再生を必要とする。したがって、本発明はまた、壊疽および潰瘍の治療および／または予防のための IL - 18 阻害剤の使用に関する。

【 0 0 6 2 】

末梢脈管疾患、特に末梢虚血の最終的な結果は、罹患した肢、特に罹患した下肢または足（foot）の切断であり得る。血管再生は、罹患した組織の再灌流をもたらし、したがって、治癒過程を助けるであろう。

20

【 0 0 6 3 】

したがって、本発明はさらに、四肢、特に下肢、足またはつま先の切断の予防のための医薬の製造における IL - 18 阻害剤の使用に関する。

【 0 0 6 4 】

本発明の好ましい実施態様において、IL - 18 阻害剤は、カスパーゼ - 1（ICE）阻害剤、IL - 18 に対する抗体、IL - 18 受容体サブユニットのいずれかに対する抗体、IL - 18 シグナル伝達経路の阻害剤、IL - 18 と競争し、かつ IL - 18 受容体を遮断する IL - 18 のアンタゴニスト、および IL - 18 結合タンパク質、IL - 18 の生物学的活性を阻害するそのアイソフォーム、ムテイン、融合タンパク質、機能的誘導体、活性画分、循環置換誘導体（circularly permuted derivatives）から選択される。

30

【 0 0 6 5 】

「IL - 18 結合タンパク質類」という用語は、本明細書において、「IL - 18 結合タンパク質」または「IL 18 BP」と同義で使用される。それは、国際公開第 99 / 09063 号パンフレットまたはノービックら、1999 年に記載されているような IL - 18 結合タンパク質を含み、キムら、2000 年に記載されているような IL - 18 に結合する IL - 18 結合タンパク質のスプライス変異体および／またはアイソフォームを含む。特に、IL - 18 BP のヒトアイソフォーム a および c は本発明において有用である。本発明による有用なタンパク質は、グリコシル化されていてもまたはグリコシル化されていなくても良く、それらは尿などの天然源由来であっても良く、またはそれらは、好ましくは組換えにより生産されていても良い。組換え体発現は、大腸菌などの原核生物発現系で実施されても良く、または真核生物、好ましくは哺乳類の発現系で実施されても良い。哺乳類タンパク質の発現に特に良く適している細胞株は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株である。

40

【 0 0 6 6 】

本明細書において使用される場合、「ムテイン」という用語は、IL - 18 BP の類似体またはウイルス性 IL - 18 の類似体を意味し、該類似体においては、野生型 IL - 18 BP もしくはウイルス性 IL - 18 BP と比較して得られる産物の活性を目立って変化させることなく、天然 IL - 18 BP またはウイルス性 IL - 18 BP の 1 つ以上のアミ

50

ノ酸残基が、異なるアミノ酸残基で置換されているか、もしくは欠失されているか、または1つ以上のアミノ酸残基がIL-18BPもしくはウイルス性IL-18BPの生来の配列に付加されている。これらのムテインは、既知の合成法によっておよび/または位置指定突然変異誘発技術、またはそれに好適な任意の他の既知の技術によって製造される。

【0067】

本発明によるムテインは、IL-18BPをコードするかまたはウイルス性IL-18BPをコードするDNAもしくはRNAに、ストリンジェントな条件下で国際公開公報第99/09063号パンフレットに記載されたように、ハイブリダイズするDNAまたはRNAなどの核酸によってコードされたタンパク質を含む。「ストリンジェントな条件」という用語は、当業者が従来から「ストリンジェント」と呼ぶ、ハイブリダイゼーションおよびその後の洗浄条件を意味する。アスベル (Ausubel) ら、カレント プロトコール

イン モレキュラー バイオロジー、スーブラ、インターサイエンス、ニューヨーク (Current Protocols in Molecular Biology, supra, Interscience, N.Y.), § 6.3および6.4 (1987年、1992年)、およびサンプロック (Sambrook) ら、スーブラ (supra) 参照。制限なく、ストリンジェントな条件の例は、試験下のハイブリッドの推定T_mの12~20 低い洗浄条件など、たとえば2×SSCおよび0.5%のSDSを5分間、2×SSCおよび0.1%のSDSを15分間; 0.1×SSCおよび0.5%のSDSを37 で30~60分間、ついで0.1×SSCおよび0.5%のSDSを68 で30~60分間である。当業者であれば、ストリンジェントな条件がDNA配列、オリゴヌクレオチドプローブ (たとえば10~40塩基) または混合オリゴヌクレオチドプローブの長さに依存することは理解される。もし混合プローブを用いる場合、SSCの代わりにテトラメチルアンモニウムクロライド (TMAC) を用いることが好ましい。アスベル上記参照。

【0068】

任意のこのようなムテインは、好ましくは、IL-18BPに相当する活性を有するほど、IL-18BPの配列に十分に重複する、またはウイルス性IL-18BPに十分に重複するアミノ酸配列を有する。IL-18BPの1つの活性は、IL-18を結合するその能力である。ムテインがIL-18に実質的な結合活性を有する限り、IL-18の精製において (たとえば、アフィニティークロマトグラフィーの手段など) 使用することができ、そのため、IL-18BPと実質的に同様の活性を有するとみなされる。したがって、任意の所定のムテインが、IL-18BPと実質的に同じ活性を有するかどうかは、適切に標識されたIL-18に結合するか否かを決定するための、たとえば、単純なサンドイッチ阻害アッセイ (たとえば、放射免疫アッセイまたはELISAアッセイ) に、そのようなムテインを供することからなるルーチンの実験方法によって決定され得る。

【0069】

好ましい態様において、任意のこのようなムテインは、国際公開第99/09063号パンフレットに記載されているように、IL-18BPまたはウイルスにコードされたIL-18BP相同物のいずれかの配列と少なくとも40%同一性または相同性を有する。より好ましくは、それは、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または最も好ましくは少なくとも90%同一性または相同性を有する。

【0070】

本発明により使用され得るIL-18BPポリペプチドのムテインまたはウイルス性IL-18BPのムテイン、あるいはそれをコードする核酸は、本明細書中で示された教示および指導に基づいて、過度の実験をすることなく、当業者によってルーチンな手順で得られる置換ペプチドまたはポリヌクレオチドと実質的に一致する配列の有限の一群を含む。

【0071】

本発明によるムテインの好ましい変更は、「保存的 (な) (conservative)」置換として公知である。IL-18BPポリペプチドもしくはタンパク質またはウイルス性IL-18BPの保存的なアミノ酸置換とは、十分に類似した物理化学的な特性を有する群の範

囲内の同義アミノ酸を含み得るものであり、その群のメンバー間における置換は分子の生物学的機能を保存するものであろう (Grantham, 1974)。とくに挿入または欠失が、たとえば 30 以下、好ましくは 10 以下のわずかなアミノ酸を含むものであり、たとえばシステイン残基など機能的配座に重要なアミノ酸の除去または入れ替えをしない場合、アミノ酸の挿入および欠失もまた、その機能を変化させることなく前記配列内でなされることは明らかである。このような欠失および/または挿入によって産生されるタンパク質およびムテインは、本発明の範囲内である。

【 0 0 7 2 】

好ましくは、同義のアミノ酸群は、表 1 に規定される群である。より好ましくは、同義のアミノ酸群は、表 2 に規定される群である。そして、最も好ましくは、同義のアミノ酸群は、表 3 に規定される群である。

10

【 0 0 7 3 】

【表 1】

表 1

同義アミノ酸の好ましい群

アミノ酸

同義の群

Ser

Ser, Thr, Gly, Asn

Arg

Arg, Gln, Lys, Glu, His

Leu

Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu

10

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

20

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

30

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

【 0 0 7 4 】

40

【表 2】

表 2

同義アミノ酸のより好ましい群

アミノ酸	同義の群	
Ser	Ser	
Arg	His, Lys, Arg	
Leu	Leu, Ile, Phe, Met	10
Pro	Ala, Pro	
Thr	Thr	
Ala	Pro, Ala	
Val	Val, Met, Ile	
Gly	Gly	
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu	20
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe	
Tyr	Phe, Tyr	
Cys	Cys, Ser	
His	His, Gln, Arg	
Gln	Glu, Gln, His	
Asn	Asp, Asn	30
Lys	Lys, Arg	
Asp	Asp, Asn	
Glu	Glu, Gln	
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu	
Trp	Trp	

【 0 0 7 5 】

40

【表 3】

表 3

同義アミノ酸の最も好ましい群

アミノ酸	同義の群	
Ser	Ser	
Arg	Arg	
Leu	Leu, Ile, Met	10
Pro	Pro	
Thr	Thr	
Ala	Ala	
Val	Val	
Gly	Gly	
Ile	Ile, Met, Leu	20
Phe	Phe	
Tyr	Tyr	
Cys	Cys, Ser	
His	His	
Gln	Gln	
Asn	Asn	30
Lys	Lys	
Asp	Asp	
Glu	Glu	
Met	Met, Ile, Leu	
Trp	Met	40

【0076】

本発明における使用のための、IL-18BPポリペプチドもしくはタンパク質のムテイン、またはウイルスIL-18BPのムテインを得るために使用され得るタンパク質のアミノ酸置換の製造例としては、マーク(Mark)らによる米国特許第4,959,314号明細書、同第4,588,585号明細書および同第4,737,462号明細書；コース(Koths)らによる同第5,116,943号明細書、ナーメン(Namen)らによる同第4,965,195号明細書、コング(Chong)らによる同第4,879,111号明細書、リー(Lee)らによる同第5,017,691号明細書などにおいて示された周知の方法手順；および米国特許第4,904,584号明細書(ショウ(Shaw)ら)に示されたリジン置換タンパク質を含む。

【0077】

用語「融合タンパク質」は、たとえば体液内において長期の滞留時間を有する他のタンパク質と融合された、IL-18BPまたはウイルス性IL-18BPまたはそのムテインもしくは断片からなるポリペプチドを意味する。IL-18BPまたはウイルス性IL-18BPは、このようにたとえば免疫グロブリンまたはその断片といった他のタンパク質、ポリペプチドなどと融合され得る。

【0078】

本明細書中で用いられる「機能的誘導体」は、本技術分野において周知の方法で、残基の側鎖またはN末もしくはC末基として存在する官能基から製造され得るIL-18BPまたはウイルス性IL-18BPの誘導体、ならびに、そのムテインおよび融合タンパク質を含み、薬学的に許容し得るかぎり、すなわちIL-18BPまたはウイルス性IL-18BPの活性と実質的に類似しているタンパク質の活性を破壊せず、それを含む組成物に毒性を与えないかぎり、本発明に含まれる。

10

【0079】

これらの誘導体としては、たとえば、ポリエチレングリコール側鎖を含むことができ、該側鎖は、抗原部位を覆い、かつIL-18BPまたはウイルス性IL-BPの体液中での滞留を拡大し得る。他の誘導体としては、カルボキシル基の脂肪族エステル、アンモニアまたは一級アミンもしくは二級アミンとの反応によるカルボキシル基のアミド、アシル部分（たとえば、アルカノイル基または炭素環式アロイル基）と形成されるアミノ酸残基の遊離アミノ基のN-アシル誘導体、あるいはアシル部分と形成される遊離ヒドロキシル基（たとえば、セリル基またはトレオニル基のヒドロキシル基）のO-アシル誘導体があ

20

【0080】

IL-18BPまたはウイルス性IL-18BP、ムテインおよび融合タンパク質の活性画分がIL-18BPと実質的に類似した活性を有する場合、本発明では、該「活性画分」として、タンパク質分子のポリペプチド鎖の断片または前駆体単独、またはそれと結合する関連分子または残基（たとえば糖またはリン酸塩残基、またはタンパク質分子または糖残基自身の集合体）を伴うタンパク質分子のポリペプチド鎖の断片または前駆体を含む。

【0081】

本発明のさらに好ましい実施態様において、IL-18阻害剤は、IL-18に対する抗体、またはその受容体であるIL-18Rに対する抗体である。IL-18R α および β と呼ばれる任意のIL-18Rサブユニットに対する抗体が、本発明にしたがって使用され得る。

30

【0082】

本発明による抗体は、ポリクローナルもしくはモノクローナル、キメラ、ヒト化した、または完全にヒトのものであり得る。組換え抗体およびその断片は、インビボにおけるIL-18またはIL-18Rと結合する高い親和性、および低毒性によって特徴付けられる。本発明において用いることができる抗体は、病的な状態またはあらゆる症状または病的な状態に関連する症状群を極めて軽減または緩和するために十分な期間、患者を治療することができる能力、および低毒性によって特徴付けられる。

40

【0083】

中和抗体は、IL-18またはIL-18R α もしくは β で免疫されたウサギ、ヤギまたはマウスなどの動物によって容易に作出することができる。免疫されたマウスはとくに、ハイブリドーマを製造するためのB細胞の供給源を提供するのに有効であり、次には、ハイブリドーマは大量の抗IL-18モノクローナル抗体を産生するために培養される。

【0084】

キメラ抗体は、異なる動物種由来の2つ以上の断片または部分によって特徴づけられる免疫グロブリン分子である。一般的に、キメラ抗体の可変領域は、マウスモノクローナル抗体のようなヒトではない哺乳動物の抗体由来であり、免疫グロブリンの定常領域はヒトの免疫グロブリン分子由来である。好ましくは、両方の領域およびその組み合わせは、決

50

まりきった手順によって決定されるように低い免疫原性を有する（エリオット（Elliott）ら、1994年）。ヒト化抗体は、マウスの定常領域をマウスの抗原結合領域に残したままヒトの対応物で置き換えるという、遺伝子工学技術によって創出された免疫グロブリン分子である。得られるマウス-ヒトキメラ抗体は、ヒトにおいて、好ましくは免疫原性が減少し、薬物動態が改善される（ナイト（Knight）ら、1993年）。

【0085】

したがって、さらに好ましい実施態様において、IL-18またはIL-18R抗体はヒト化抗体である。ヒト化抗IL-18抗体の好ましい例は、たとえば欧州特許出願第0974600号明細書に記載されている。

【0086】

さらになお好ましい実施態様において、抗体は完全にヒトのものである。ヒト抗体を産生する技術は、たとえば国際公開第00/76310号パンフレット、国際公開第99/53049号パンフレット、米国特許第6,162,963号明細書またはオーストラリア特許第5336100号明細書に詳細に記載されている。

【0087】

完全なヒト抗体の1つの製造方法は、マウス体液免疫系の「ヒト化」、すなわちヒト免疫グロブリン（Ig）遺伝子座の、内因性Ig遺伝子が不活性化されているマウスへの導入による、ヒトIgを産生できるマウス株（キセノマウス）の産生から構成されている。Ig遺伝子座は、それらの物理的構造および遺伝子再整列ならびに最終的に広い免疫応答を産生するために必要とされる発現過程の両方の点から複雑である。抗体の多様性は、Ig遺伝子座に存在する異なるV、DおよびJ遺伝子のあいだの主にコンビナトリアル再整列により産生される。これらの遺伝子座も、抗体の発現、対立遺伝子の排除（allelic exclusion）、クラススイッチ、および親和性の成熟を制御する、点在した制御要素を含む。再整列されていないヒトIg導入遺伝子のマウスへの導入は、マウスの組換え機構がヒト遺伝子に適合することを証明した。さらに、様々なアイソタイプの抗原特異human Absを分泌するハイブリドーマを、抗原によるキセノマウス免疫により得ることができる。

【0088】

完全なヒト抗体とそれらの産生方法は、本技術分野において既知である（メンデズ（Mendez）ら、（1997年）；ブゲマン（Buggemann）ら、（1991年）；トミヅカ（Tomizuka）ら、（2000年）、特許、国際公開第98/24893号パンフレット）。

【0089】

本発明の非常に好ましい実施態様において、IL-18阻害剤は、IL-18BPまたはそのアイソフォーム、ムテイン、融合タンパク質、機能的誘導体、活性画分もしくは循環置換誘導体である。それらアイソフォーム、ムテイン、融合タンパク質または機能的誘導体は、とくにIL-18と結合するというIL-18BPの生物学的活性を保持し、好ましくは、本質的には少なくともIL-18BPと類似した活性を有する。理想的には、そのようなタンパク質は、非修飾のIL-18BPと比較して増大した生物学的活性を有する。好ましい活性画分は、IL-18BPの活性よりも優れた活性を有するか、もしくはより優れた安定性またはより低い毒性もしくは免疫原性などのさらなる利点を有し、または大量に産生することがより容易であるか、もしくは精製がより容易である。

【0090】

IL-18BPおよびそのスプライス変異体/アイソフォームの配列は、キムら、2000年によるものだけでなく、国際公開第99/09063号パンフレットまたはノービックら、1999年によって提供される。

【0091】

IL-18BPの機能的誘導体は、安定性、半減期、バイオアベイラビリティ、人体による寛容または免疫原性などのタンパク質の性質を改善するために、ポリマーと結合されてもよい。これらの目標を達成するために、IL-18BPは、たとえばポリエチレングリコール（PEG）に結合しても良い。ポリエチレングリコール化（PEGylation）は、

たとえば国際公開第 9 2 / 1 3 0 9 5 号パンフレットに記載されている周知の方法によって行なわれ得る。

【 0 0 9 2 】

したがって、本発明の好ましい実施態様において、I L - 1 8 阻害剤および特に I L - 1 8 B P はポリエチレングリコール化される。

【 0 0 9 3 】

本発明のさらに好ましい実施態様において、I L - 1 8 阻害剤は免疫グロブリン融合物である。すなわち、I L - 1 8 阻害剤は、免疫グロブリンの全てまたは一部に融合した I L - 1 8 結合タンパク質の全てまたは一部からなる融合タンパク質である。免疫グロブリン融合タンパク質を作製する方法は、たとえば国際公開第 0 1 / 0 3 7 3 7 号パンフレットに記載されたもののよう

10

に、当技術分野において公知である。当業者であれば、本発明の得られる融合タンパク質が、特に I L - 1 8 への結合といった I L - 1 8 B P の生物学的活性を保持することを理解するであろう。融合は、直接、または 1 から 3 アミノ酸残基長の短いリンカーペプチド、もしくはより長いたとえば 1 3 から 2 0 アミノ酸残基長のリンカーペプチドを介してなるものであってよい。該リンカーは、たとえば配列 E - F - M (G l u - P h e - M e t) のトリペプチド、または I L - 1 8 B P 配列と免疫グロブリン配列とのあいだに導入される G l u - P h e - G l y - A l a - G l y - L e u - V a l - L e u - G l y - G l y - G l n - P h e - M e t からなる 1 3 アミノ酸リンカー配列であり得る。得られる融合タンパク質は、体液内での長い滞留時間 (半減期) 、増大した特異的な活性、上昇した発現レベルまたは融合タンパク質の精製が容易になるなどの改善された性質を有する。

20

【 0 0 9 4 】

好ましい実施態様において、I L - 1 8 B P は I g 分子の定常領域に融合される。好ましくは、それは、たとえばヒトの I g G 1 または I g G 2 の C H 2 および C H 3 ドメインのような重鎖領域に融合される。I L - 1 8 B P および免疫グロブリンの部分を含む特異的な融合タンパク質の産生は、たとえば国際公開第 9 9 / 0 9 0 6 3 号パンフレットの実施例 1 1 に記載されている。I g G₂ もしくは I g G₄、またはたとえば I g M もしくは I g A のような他の I g クラスのアイソフォームなど、I g 分子の他のアイソフォームもまた、本発明における融合タンパク質の産生に適する。融合タンパク質は、モノマーまたはマルチマー、ヘテロもしくはホモのマルチマーであり得る。

30

【 0 0 9 5 】

本発明のなおさらなる実施態様において、I L - 1 8 阻害剤は、本発明の臨床状態にかかわる 1 つ以上の分子、たとえば血管拡張薬、C a ブロッカー、アスピリン、ベータ - ブロッカーなどとの組み合わせで使用される。T N F アンタゴニストもまた本発明にもとづき I L - 1 8 阻害剤と組み合わせて使用され得る。T N F アンタゴニストは、いくつかの方法でその活性を発揮する。まず、アンタゴニストは T N F 分子自体に十分な親和性と特異性で結合するか、または T N F 分子を隔離し、T N F 受容体結合を担う T N F エピトープを部分的または実質的に中和することができる (以下「隔離アンタゴニスト」という) 。隔離アンタゴニストは、たとえば T N F に対する抗体であり得る。

【 0 0 9 6 】

あるいは、T N F アンタゴニストは、T N F 結合の後に細胞表面の受容体によって活性化される T N F シグナル伝達経路を阻害することができる (以下、「シグナル伝達アンタゴニスト」という) 。両群のアンタゴニストは、末梢脈管疾患の治療または予防において、I L - 1 8 阻害剤と組み合わせて、単独または一緒にいずれでも有用である。

【 0 0 9 7 】

T N F アンタゴニストは、候補を、インビボで、たとえば、T N F が増殖と免疫グロブリンの分泌を引き起こすヒト B 細胞などの感受性細胞株における天然 T N F の活性に対するそれらの効果について、ルーチンスクリーニングすることにより容易に同定および評価される。このアッセイは、候補アンタゴニストの希釈を、そのアッセイに用いる T N F のモル量の 0 . 1 倍 ~ 1 0 0 倍まで変化させた場合の T N F 処方および T N F なしまたはア

50

ンタゴニストのみの対照を含む（トゥシ（Tucci）ら、1992年）。

【0098】

隔離アンタゴニストが本発明にしたがって使用される好ましいTNFアンタゴニストである。隔離アンタゴニストの中でも、TNFに高い親和性で結合し、低い免疫原性を有するポリペプチドが好ましい。可溶性TNF受容体分子およびTNFの中和抗体が特に好ましい。たとえば、可溶性TNF-R IおよびTNF-R IIが本発明において有用である。これら受容体の切断型は、受容体の細胞外ドメインまたはその機能部分からなり、本発明のより特に好ましいアンタゴニストである。切断型可溶性TNF I型受容体およびII型受容体は、たとえば欧州特許出願第914431号明細書に記載されている。

【0099】

TNF受容体の切断型は可溶性であり、尿および血清中に30kDaおよび40kDaのTNF阻害結合タンパク質として検出されており、それぞれTBPIおよびTBPIIと呼ばれている（エンゲルマン（Engelmann）ら、1990年）。IL-18阻害剤とTNFアンタゴニストとの同時、連続または個別使用は、本発明により好ましい。

【0100】

さらに好ましい実施態様において、ヒト可溶性TNF-R I（TBPI）が本発明により使用されるTNFアンタゴニストである。天然のおよび組換えの可溶性TNF受容体分子とそれらの産生方法は、欧州特許出願第308378号明細書、同第398327号明細書および同433900号明細書に記載されている。

【0101】

受容体分子の誘導体、断片、領域および生物学的活性部分は機能的に受容体分子と似ており、本発明において使用することができる。そのような受容体分子の生物学的に活性な等価物または誘導体は、十分な大きさで、膜結合TNF受容体との相互作用が阻害または遮断されるような親和性でTNFに結合できる、ポリペプチドの部分、または受容体分子をコードする配列の部分を意味する。

【0102】

IL-18阻害剤は、TNF阻害剤と同時に、連続的または別々に使用され得る。

【0103】

本発明のさらに好ましい実施態様において、IL-18阻害剤は、約0.01～100mg/kg体重、または約1～10mg/kg体重、または約2～5mg/kg体重の量で使用される。

【0104】

本発明のIL-18阻害剤は、好ましくは全身的に、好ましくは皮下または筋肉内に投与される。それは毎日または隔日に投与される。徐放処方により、たとえば1週間に1回などの低い頻度での投与が可能となる。

【0105】

本発明はさらに、末梢脈管疾患の予防および/または治療のための医薬の製造における、IL-18阻害剤のコード配列を含有する発現ベクターの使用に関する。したがって、遺伝子治療的アプローチが、IL-18阻害剤をそれが必要とされる部位へ送達するために考慮される。末梢脈管疾患を治療および/または予防するために、IL-18阻害剤の配列を含む遺伝子治療ベクターは、直接、たとえば患部組織に注射され得る。これにより、ベクターの希釈、標的細胞または組織への到達およびターゲティングならびに副作用などの遺伝子治療ベクターの全身性投与に関わる問題を回避できる。

【0106】

通常IL-18阻害剤が発現されていない細胞、または阻害剤の発現量が充分ではない細胞において、IL-18阻害剤の内因的な産生を誘導および/または増強するためのベクターの使用もまた、本発明より検討される。そのベクターは、IL-18阻害剤を発現することが所望される細胞において機能する調節配列を含む。そのような調節配列は、たとえばプロモーターまたはエンハンサーであり得る。その調節配列は、そののち相同組換えによってゲノムの適当な座に導入され得、したがって作動可能に調節配列と遺伝子とを

10

20

30

40

50

連結させることにより必要とされる発現が誘導または増強される。その技術は、通常「内因性遺伝子活性化」(E G A)と呼ばれ、たとえば国際公開第91/09955号パンフレットに記載されている。

【0107】

同じ技術を用いて、IL-18阻害剤を使用せずに直接IL-18の発現を抑えることが可能であることは、当業者によって理解されるであろう。そのようにするためには、たとえばサイレンシング因子のような負の調節因子をIL-18の遺伝子座に導入することによって、IL-18発現のダウンレギュレーションまたは予防を導くことができる。そのようなIL-18発現のダウンレギュレーションまたはサイレンシングが、疾患を予防および/または治療するためのIL-18阻害剤の使用と同じ効果を有することは、当業者

10

【0108】

本発明はさらに、末梢脈管疾患の治療および/または予防のための医薬の製造における、IL-18阻害剤を産生するために遺伝子的に改変された細胞の使用に関する。

【0109】

本発明にしたがって使用されるIL-18阻害剤は、任意に治療的有効量のTNF阻害剤または末梢脈管疾患の治療もしくは予防にかかわる他の薬物と組み合わせて、医薬組成物として好ましく投与され得る。

【0110】

IL-18BPおよびそのアイソフォーム、ムテイン、融合タンパク質、機能的誘導体、活性画分または循環置換誘導体は、前記したように、医薬組成物の好ましい活性成分である。

20

【0111】

「薬学的に許容し得る」という定義は、活性成分の生物学的活性の有効性を妨害せず、投与される患者に有害でない任意の担体を包含することを意味する。たとえば、非経口投与に対しては、活性タンパク質は、注射剤のため、生理食塩水、デキストロース溶液、血清アルブミンおよびリンガー溶液などのビヒクルの中で単位投与量形態に処方され得る。

【0112】

本発明の医薬組成物の活性成分は、多様な方法で個体に投与することができる。投与経路は、皮内、経皮(たとえば、徐放製剤で)、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、経口、頭蓋内、硬膜外、局所および鼻腔内経路である。任意のほかの治療的に有効な投与経路、たとえば、上皮もしくは内皮組織を通した吸収、または活性薬剤をコードするDNA分子を患者に投与し(たとえば、ベクターを介し)、インビボで該活性薬剤が発現および分泌するようにした遺伝子治療などが使用できる。さらに、本発明のタンパク質は、薬学的に許容し得る界面活性剤、賦形剤、担体、希釈剤およびビヒクルなどのほかの生物学的に活性な薬剤成分と一緒に投与することができる。

30

【0113】

非経口(たとえば、静脈内、皮下、筋肉内など)投与については、活性タンパク質は、薬学的に許容し得る非経口ビヒクル(たとえば、水、生理食塩水、デキストロース溶液)および等張性を維持する添加物(たとえばマンニトール)または化学安定性を維持する添加物(たとえば防腐剤および緩衝液)と共同して、溶液、懸濁液、エマルジョンまたは凍結乾燥粉末として製剤化され得る。製剤は、一般的に使用される技術により滅菌される。

40

【0114】

本発明の活性タンパク質のバイオアベイラビリティーも、人体において分子の半減期を増加させる共役前駆体を使用すること、たとえば国際公開第92/13095号パンフレットに記載されているように分子をポリエチレングリコールに連結することなどにより改善することができる。

【0115】

活性タンパク質の治療的有効量は、アンタゴニストのタイプ、アンタゴニストのIL-18に対する親和性、アンタゴニストによって示される任意の残留細胞毒性活性、投与経

50

路、患者の臨床状態（内因性 IL - 18 活性の非毒性レベルの維持の望ましさなど）などを含む多くの変数の関数となるであろう。

【 0 1 1 6 】

「治療的有效量」は、投与した際に、IL - 18 阻害剤が結果として IL - 18 の生物学的活性の阻害を生じるようなものである。単回または複数回投与量として個体に投与される服用量は、IL - 18 阻害剤の薬物動態特性、投与経路、患者の状態や特徴（性別、年齢、体重、健康状態、サイズ）、症状の程度、同時治療、治療の頻度ならびに望ましい効果などの多様な因子に依存して変化する。確立される服用量の範囲の調整や操作は、個体における IL - 18 の阻害のインビトロおよびインビボ測定法と同様に、当業者の能力の範囲内である。

10

【 0 1 1 7 】

本発明によれば、IL - 18 阻害剤は、体重の約 0 . 0 0 1 ~ 1 0 0 m g / k g または約 0 . 0 1 ~ 1 0 m g / k g、または体重の約 0 . 1 ~ 5 m g / k g、または体重の約 1 ~ 3 m g / k g、または体重の約 2 m g / k g で使用される。

【 0 1 1 8 】

本発明によって好ましい投与経路は、皮下経路による投与である。筋肉内投与は、本発明によればさらに好ましい。IL - 18 阻害剤を直接的にその作用箇所に投与するために、それを局所的に投与することもまた好ましい。

【 0 1 1 9 】

さらに好ましい実施態様において、IL - 18 阻害剤は毎日または隔日に投与される。

20

【 0 1 2 0 】

1 日用量は、通常、所望の結果を得るために有効な分割用量または徐放形態で投与される。2 回目以降の投与は、個体に投与された開始または事前の用量と同じか、それより少ないかまたはそれより多い服用量で行われ得る。2 回目以降の投与は、疾患の発症中またはそれより以前に投与され得る。

【 0 1 2 1 】

本発明によれば、IL - 18 阻害剤は、ほかの治療法または治療剤、特に TNF 阻害剤および / またはほか脈管保護剤に先んじて、同時にまたは連続して（多剤療法）、治療的有效量で、予防的にまたは治療的に個体に投与され得る。ほかの治療的薬剤と同時に投与される活性薬剤は、同一または異なる組成物で投与することができる。

30

【 0 1 2 2 】

本発明はさらに、有効量の IL - 18 阻害剤および / または TNF アンタゴニストを薬学的に許容し得る担体と混合することからなる医薬組成物の製造方法に関する。

【 0 1 2 3 】

本発明はさらに、末梢脈管疾患の治療方法であって、それを必要とする患者に医薬的有效量の IL - 18 阻害剤を（任意には医薬的有效量の TNF アンタゴニストと組み合わせて）投与することからなる方法に関する。

【 0 1 2 4 】

ここまで本発明を十分に説明してきたので、同様のことが等しいパラメーター、濃度および条件の範囲内で、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、また過度の実験をすることなく行なうことができるということは当業者によって充分理解されるであろう。

40

【 0 1 2 5 】

本発明は、その特定の実施態様に関連して説明されているが、さらなる変更が可能であるということは理解されるであろう。この出願は、概して本発明の原理を受けて本発明の任意の変化、用途、適応を保護することを意図しており、本発明の属する技術分野の既知のまたは一般的な手法の範囲内となる本開示からの逸脱および下記の通り添付のクレームの範囲で前記の本質的な特徴にあてはまるような本発明からの逸脱も含む。

【 0 1 2 6 】

本明細書において引用される、雑誌の論文もしくは要旨、公開もしくは非公開の米国もしくは外国特許出願、公布された米国もしくは外国特許または任意のほかの参考文献など

50

のすべての参考文献は、引用される参考文献に示されたすべてのデータ、表、図および文章を含めて、本明細書において言及することにより完全に組み込まれる。さらに、本明細書において引用される参考文献中で引用される参考文献の全内容も、言及することにより完全に組み込まれる。

【0127】

既知の方法手段、常套的な方法手段、既知の方法または常套的な方法への言及は、本発明のあらゆる局面、記載または実施態様が関連技術において開示、教示または示唆されるものであると認めるものではない。

【0128】

特定の実施態様の先行する記載は、第三者が、当業者の知識（本明細書で引用された参考文献の内容を含む）を適用することによって、過度の実験をすることなく、本発明の全体的な概念から逸脱することなく、特定の実施態様などのさまざまな適用のために、容易に修飾および／または適応させることができるほど、本発明の全体的な性質を十分に示すものであろう。したがって、本明細書で紹介された教示および手引きに基づく、そのような適応および修飾は、開示された実施態様と同等の範囲の意味であると意図される。本明細書の表現または専門用語は、本明細書で紹介された教示および手引きによる見地と当業者の知識とを組み合わせ、当業者に理解されるものであるため、本明細書での表現または専門用語は、説明を目的とするものであって限定するためのものではない。

【実施例1】

【0129】

IL-18の障害が末梢虚血を軽減する

方法：

後足虚血の導入

雄性C57BL/6Jマウス（イファクレド（Iffa Creddo）、リヨン、フランス）に、片側の後足虚血を導入するために外科手術を施した。動物にイソフルレン吸入により麻酔をかけた。結紮を右大腿動脈上、伏在動脈および膝窩動脈の分岐から0.5cm近位に行なった。つぎにマウス（1群当たり7匹）を、特定の無菌条件下で3日または28日間収容した。虚血誘導脈管形成におけるIL-18BPの役割を調べるため、1群のマウスに60μgのマウスIL-18BP発現プラスミド、pcDNA3-mIL-18BPを両脛骨上方筋（tibial cranial muscles）に、既に説明されているように注射した（マラット（Mallat）ら、2001年）。対照マウスには同じ用量の対照空プラスミドを注射した。経皮電気パルス（200V/cmの8方形波電気パルス、2Hzで20ms持続時間）は、ステンレススチールプレート電極を用いるPS-15電気パルセーター（ジェネトロニクス（genetronics））（脚の両脇に4.2～5.3mm離して設置）により送達された。この方法は、IL-18BP血漿濃度を増加し、血漿IL-18活性を減少し、アテローム性動脈硬化プラークの発達および進行を阻害するということが既に示されているので使用した（マラットら、2001年）。

【0130】

脈管形成の定量化

細血管造影法

治療期間の終わりに高解像度細血管造影法により血管密度を、既に説明されているように評価した（シルベスター（Silvestre）ら、2000年；シルベスターら、2001年）。簡単に説明すると、マウスに麻酔をかけ（イソフルラン吸入）、造影培地（硫酸バリウム 1g/ml）を腹大動脈に導入したカテーテルを通して注入した。デジタルX線変換器により得た画像（動物（animals）につき3つ）を、後足の完全な図を得るためにアセンブルした。血管の密度は、定量化領域における血管で占められた画像あたりの画素の割合として表わした。定量化区域は、大腿動脈の結紮場所、膝、大腿部の端および脚の外側の境界で線引きした。

【0131】

毛細管密度

細血管造影分析は、既に説明されているように、虚血および非虚血筋肉における毛細管密度の評価により完了した（シルベスターら、2000年；シルベスターら、2001年）。凍結組織切片（7 μm ）をCD31に対するラットのモノクローナル抗体（20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ファーマーミンゲン（Pharmingen））と共にインキュベートし、毛細管を同定した。免疫染色は、アビジン - ビオチン ホースラディッシュペルオキシダーゼ可視化システム（ベクタステイン ABC キット エリート（Vectastain ABC kit elite）、ベクター ラボラトリーズ（Vector Laboratories））を使用して可視化した。規定された領域の無作為に選択されたフィールドで、ヒストラプ ソフトウェア（Histolab software）（マイクロビジョン（Microvision））を用いて毛細管密度を計算した。

【0132】

10

レーザードップラー灌流イメージング

脈管新生の虚血誘導変化に対する機能的証拠を提供するために、レーザードップラー灌流イメージング実験を、既に説明されているように行なった（シルベスターら、2000年；シルベスターら、2001年）。簡単に説明すると、イメージングの前に脱毛クリームで四肢から過剰な毛を除去し、温度変化をできるだけ少なくするために、マウスを37の加熱プレートに置いた。それでもなお、周囲の光と温度などの変数を説明するために、計算された灌流は虚血脚と非虚血脚との比率として表わした。

【0133】

統計的分析

結果は平均 $\pm$ SEMとして表わした。各パラメーターを比較するために一方向分散分析 ANOVAを使用した。この後に、どの群の差異が有意な全 ANOVAの原因であるかを同定するためにボンフェローニの t 検定（Bonferonni's t test）比較を行なった。p < 0.05の値を統計的に有意であるとみなした。

20

【0134】

結果：

細血管造影法

3日目では、各群において虚血 / 非虚血脚の血管造影スコア率は影響されなかった（図1）。対照的に、28日目では、血管造影スコアは、対照と比較してIL-18BP処理マウスにおいて1.6倍の増加を示した（p < 0.01）。

【0135】

30

毛細管密度

細血管造影データは、CD31染色後、毛細管密度分析によって確認された。28日目では、対照マウスの虚血脚の毛細管密度は非虚血脚よりも低かった（415 $\pm$ 31 対 688 $\pm$ 42 血管 / mm^2 、p < 0.01）。しかしながら、IL-18BP処置マウスの虚血脚の毛細管密度は対照マウスより有意に高く（1.4倍の増加）（それぞれ、588 $\pm$ 48 対 415 $\pm$ 31 血管 / mm^2 、p = 0.01）、非虚血脚で見られたレベルとは異なっていた。

【0136】

レーザードップラー灌流イメージング

細血管造影測定および毛細管密度測定は、血液灌流の変化と関連していた。後足の血流の回復は、処置および未処置の両方のマウスで起こった。しかしながら、IL-18BP処置マウスでは、血流（足灌流）のより大きな増加が、対照動物と比較して28日目までに明らかとなった（1.5倍、p < 0.01、図2）。

40

【実施例2】

【0137】

VEGF、ホスホ-AktおよびeNOSタンパク質濃度の制御

方法

VEGF、ホスホ-AktおよびeNOS（内皮性一酸化窒素合成タンパク質）の発現を、虚血脚および非虚血脚におけるウエスタンブロットにより、既に説明されているように測定した（シルベスターら、2000年；シルベスターら、2001年）。

50

【 0 1 3 8 】

結果

V E G F

3日目では、虚血脚および非虚血脚の各群のあいだでV E G Fタンパク質濃度に変化は観測されなかった。28日目では、対照マウスにおいて、V E G Fタンパク質含量が、非虚血脚と比較した場合、虚血脚で増加傾向にあったが、これは統計的有意には至らなかった。一方、虚血脚足のV E G Fタンパク質濃度は、対照と比べてI L - 1 8 B P処置マウスで120%目に見えて上方調節された ($p < 0.05$) (図3)。

【 0 1 3 9 】

ホスホ-A k t

3日目では、ホスホ-A k tタンパク質濃度は、どの処置でも虚血後足および非虚血後足において変化はなかった。28日目では、対照マウスにおいて、ホスホ-A k tタンパク質含量は、虚血後足において非虚血後足の含有量より60%増加した ($p < 0.01$)。虚血脚のホスホ-A k t含量のこの増加は、I L - 1 8 B P処置マウスにおいて2倍であった (110%増加、対照マウスの虚血脚の増加と比較して $p < 0.05$) (図4)。

【 0 1 4 0 】

e N O S

3日目では、e N O Sタンパク質含量は、それぞれ、対照およびI L - 1 8 B P処置マウスについて虚血脚 ($107 \pm 8\%$ 対 $103 \pm 24\%$) および非虚血脚 ($100 \pm 12\%$ 対 $94 \pm 21\%$) で影響されなかった。28日目では、対照マウスにおいて、e N O S濃度は、非虚血脚に対して虚血脚で55%上昇した (それぞれ、 $155 \pm 8\%$ 対 $100 \pm 11\%$ 、 $p < 0.05$)。この増加はI L - 1 8 B P処置に影響されなかった ($160 \pm 12\%$ 、 $p = 0.61$ 対 虚血対照)。

【実施例3】

【 0 1 4 1 】

E P C s (内皮前駆細胞) に対するI L - 1 8 B Pの作用

方法

フローサイトメトリー分析

E P C s細胞は、S c a - 1陽性造血前駆細胞から誘導されると考えられる (タカハシ (Takahashi) ら、1999年)。次に、E P C sマーカータンパク質、S c a - 1を発現する単核細胞の割合をフローサイトメトリーにより決定した。虚血の7日後、単核細胞を、空のp c D N A 3プラスミドまたはp c D N A 3 - m I L 1 8 B Pプラスミドのいずれかで処置したマウス (各群 $n = 5$) の末梢血 ($300 \mu l$) および骨髓から単離した。骨髓細胞は脛骨および大腿骨をフラッシングすることにより得た。低密度単核細胞は、フィコールを用いた密度勾配遠心分離により単離した。次に単核細胞をフルオレセインイソチオシアネート (F I T C) 結合S c a - 1モノクローナル抗体 (D 7、B D ファーミングエン (Pharmingen)) と共にインキュベートした。アイソタイプの同一抗体が対照として供された。

【 0 1 4 2 】

E P C 分化分析

単離直後、 5×10^6 骨髓由来単核細胞も、ラット血漿ビトロネクチン (シグマ) とゼラチン (0.1%) をコートした35mm細胞培養皿に置き、内皮基底培地 (E B M 2、バイオ ホイッター (Bio whittaker)) に維持した。培養4日後、非接着性細胞を除去し、接着性細胞を免疫化学分析した。

【 0 1 4 3 】

1, 1' - オクタデシル - 3, 3, 3', 3' - テトラメチルインドカルボシアニン標識アセチル化低密度リポタンパク質 (A c L D L - D i l) の取り込みを検出するために、細胞をA c L D L - D i l (T e b u) と共に37 で1時間インキュベートした。次に細胞を2%パラホルムアルデヒドで固定し、第1のポリクローナルウサギ抗体およびフォンヴィレブランド因子 (v W F) (ダコ (DAKO)) と1時間インキュベートし、F I T

10

20

30

40

50

C 標識モノクローナル抗ウサギ Ig G (H + L) と 30 分間インキュベートした (コールター (Coulter))。AcLDL-Dil と vWF の両方に陽性の二重染色細胞を EPCs であると判定し、それらをウェルごとに計測した。3 人の独立した調査員がウェルごとの EPCs の数を 3 つの無作為に選択された高出力フィールドを計測することにより評価した。次に結果を単核細胞の総数の割合として表わした。

【0144】

結果

EPCs は、Sca-1 陽性単核細胞から誘導されると考えられる (タカハシら、1999 年)。末梢血における Sca-1 陽性単核細胞の割合は、IL-18BP 処置マウスでは対照動物と比較して不変のままであった (それぞれ、 $31.5 \pm 1.3\%$ 対 $28.5 \pm 1.3\%$)。同様に、骨髓から単離された Sca-1 陽性単核細胞の全体の数は、IL-18BP 処置マウスと対照マウスとの間で相違しなかった (それぞれ、 $4.35 \pm 0.95\%$ 対 $5.87 \pm 0.22\%$)。さらに、IL-18BP 処置は、末梢血単核細胞または骨髓単核細胞の総数に影響しなかった (データは示さず)。

【0145】

EPCs は骨髓単核細胞から単離、培養され、AcLDL-Dil と vWF とに陽性の二重染色細胞として特徴付けられた。二重陽性染色細胞の割合は、非虚血動物においてはほとんど検出不可能であった ($< 5\%$ 、 $n = 4$)。虚血は、AcLDL-Dil と vWF とに対する二重陽性染色細胞の割合の目立った増加を誘導した ($48 \pm 3\%$ 、 $p < 0.001$ 対 非虚血動物)。この効果はさらに IL-18BP 処置によって拡大された (対照で $48 \pm 3\%$ 対 IL-18BP 処置マウスで $85 \pm 2\%$ 、 $p < 0.001$) (図 5)。したがって、IL-18BP 処置は、循環前駆細胞の数を増加させるというよりむしろ単核細胞の EPCs への分化を刺激すると思われる。

【0146】

[参考文献]

1. Buggemann et al., Eur. J. Immunol. 21:1323-1326 (1991).
2. DiDonato, J A, Hayakawa, M, Rothwarf, D M, Zandi, E and Karin, M. (1997), Nature 388, 16514-16517.
3. Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H., and Woody, J.N., 1994, Lancet 344, 1125-1127.
4. Engelmann, H., D. Novick, and D. Wallach. 1990, J. Biol. Chem. 265:1531-1536.
5. Grantham (1974), Science, 185:862-864.
6. 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.
7. Kim SH et al., J. Immuno. 2001, 166, pp.148-154.
8. Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallan 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.
9. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
10. Meldrum, D. R., Cleveland, J. C., Jr., Cain, B.S., Meng, X. & Harken, A.H. (1998) Ann Thorac Surg 65, 439-43.
11. Mendez, M.M., Green, L.L., Corvalan, J.R.F., Jia X-C., Maynard-Currie, E.E., Yang, X-D., Gallo, M.L., Louie, D.M., Lee, D.V., Erickson, K.L., Luna, J., Roy, C.M-N., Abderrahim, H., Kirshenbaum, F., Noguchi, M., Smith, D.M., Fukushima, A., Hales, J.F., Finer, M.H., Davis, C.G., Zsebo, K.M. and Jakobovits, A. (1997). Unfunctional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice Nature Genetics, 15, 146-56.
12. Nakamura K, Okamura H, Wada M, Nagata K, Tamura T. Infect Immun 1989 Feb;57(

2):590-595.

13. Novick, D, Kim, S-H, Fantuzzi, G, Reznikov, L, Dinarello, C, and Rubinstein, M (1999). *Immunity* 10, 127-136.

14. Parnet, P, Garka, K E, Bonnert, T P, Dower, S K, and Sims, J E. (1996), *J. Biol. Chem.* 271, 3967-3970.

15. Silvestre, J.S., Mallat Z, Duriez M, Tamarat R, Bureau MF, Scherman D, Duverger N, Branellec D, Tedgui A, Levy BI. 2000. Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ. Res.* 87:448-452.

16. Silvestre, J.S., Mallat Z, Tamarat R, Duriez M, Tedgui A and Levy BI. 2001. Regulation of Matrix Metalloproteinase activity in ischemic tissue by interleukin-10: Role in ischemia-induced angiogenesis. *Circ. Res.* 89:259-264.

17. Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Mager, M., Isner, J.M., Asahara, T. 1999. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 5:434-438.

18. Torigoe, K., Ushio, S., Okura, T., Kobayashi, S., Tanai, M., Kunikate, T., Murakami, T., Sanou, O., Kojima, H., Fuji, M., Ohta, T., Ikeda, M., Ikegami, H. & Kurimoto, M. (1997) *J Biol Chem* 272, 25737-25742.

19. Tomizuka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727 (2000).

20. Tucci, A., James, H., Chicheportiche, R., Bonnefoy, J.Y., Dayer, J.M., and Zuber, R.H., 1992, *J. Immunol.* 148, 2778-2784.

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

【図面の簡単な説明】

【 0 1 4 7 】

【図1】A)は、マウスの大腿動脈閉塞後3日および28日目の、右の虚血後足および左の非虚血後足の代表的な細血管造影を示す。B)は、3日間または28日間の、p c D N A 3 - m I L 1 8 B P 処置マウス (I L - 1 8 B P) または空のプラスミド処置マウス (対照) における、虚血 / 非虚血血管造影スコアを示す。値は平均 ± S E M で示し、各群 n = 7 である。 ** p < 0 . 0 1 対 対照マウス。

【図2】A)は、p c D N A 3 - m I L 1 8 B P 処置マウス (I L - 1 8 B P) または空のプラスミド処置マウス (対照) において、インビボでレーザードップラー灌流イメージングによりモニターした後足血流の虚血誘導変化を示す。色分けした画像において、正常な灌流を赤で示し、虚血後足の著しい血流の減少を青で示す。B)は、非虚血肢の血流に対する虚血肢の血流の割合として表わされる血流の定量的評価を示す。値は平均 ± S E M で示し、各群 n = 7 である。 ** p < 0 . 0 1 対 対照マウス。

【図3】A)は、非虚血脚および虚血脚における、大腿動脈閉塞後28日目の V E G F タンパク質含量の代表的なウエスタンブロットを示す。B)は、非虚血肢でのタンパク質含量に対する虚血肢でのタンパク質含量の割合として表わされる V E G F タンパク質濃度の定量的評価を示す。値は平均 ± S E M で示し、各群 n = 7 である。 ** p < 0 . 0 1 対 非虚血対照、および † p < 0 . 0 5 対 虚血対照。

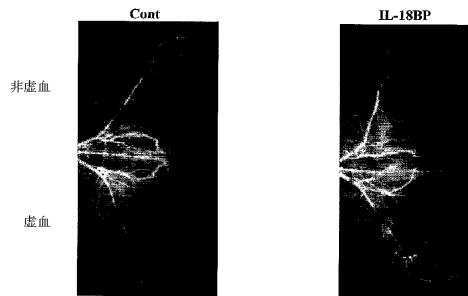
【図4】A)は、非虚血脚および虚血脚における、大腿動脈閉塞後28日目のホスホ - A k t タンパク質含量の代表的なウエスタンブロットを示す。B)は、非虚血肢でのタンパク質含量に対する虚血肢でのタンパク質含量の割合として表わされるホスホ - A k t タンパク質濃度の定量的評価を示す。値は平均 ± S E M で示し、各群 n = 7 である。 * p < 0 . 0 5 , ** p < 0 . 0 1 対 非虚血対照、および † p < 0 . 0 5 対 虚血対照。

【図5】A)は、大腿動脈の結紮なしのマウス (偽) の骨髓および p c D N A 3 - m I L 1 8 B P 処置マウス (I L - 1 8 B P) または空のプラスミド処置マウス (対照) の骨髓から単離される E P C s (内皮前駆細胞) の代表的な画像を示す。E P C s は、A c L D L - D i l およびフォンヴィレブランド因子 (v W F) に対する二重陽性染色を有する接

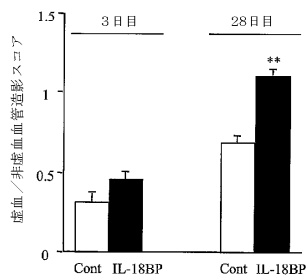
着性細胞として特徴付けられた。B) は、p c D N A 3 - m I L 1 8 B P 処置マウスまたは空のプラスミド処置マウスにおける二重陽性細胞の定量化を示す。値は平均 $\pm$ S E M で示し、各群 $n = 5$ である。*** $p < 0.001$ 対 対照マウス、††† $p < 0.001$ 対 大腿動脈結紮をしていないマウス (偽)。

【図 1】

A) 28日目

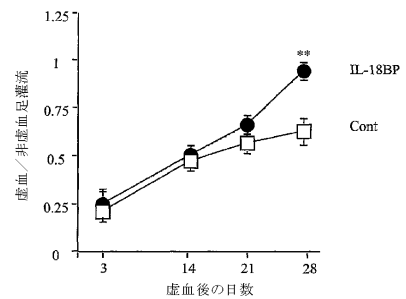
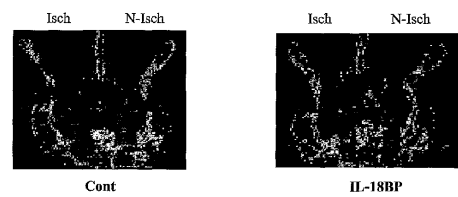


B)

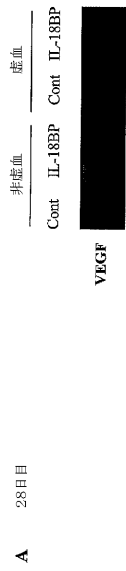


【図 2】

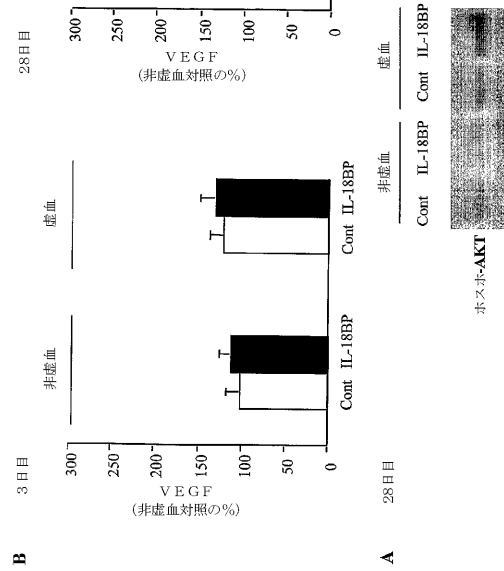
A) 28日目



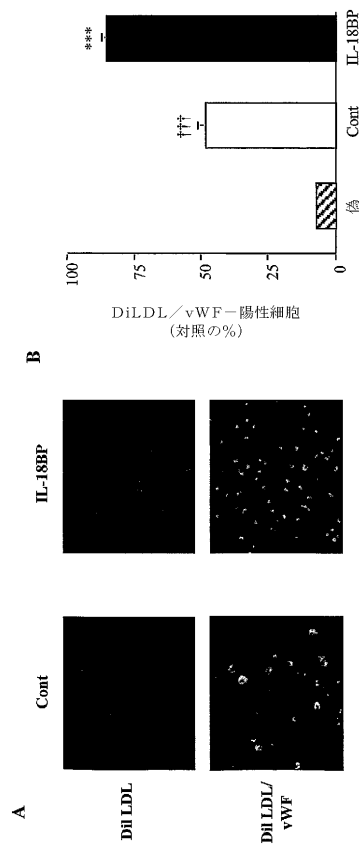
【図 3】



【図 4】



【図 5】



フロントページの続き

(74)代理人 100154449

弁理士 谷 征史

(72)発明者 シュバチュコ、ヨランド

スイス連邦、セアシュ - 1 2 3 2 コンフィニョン、シュメン ドュ ビュイローネ 4 6

(72)発明者 テッドギュイ、アラン

フランス共和国、エフ - 7 5 0 0 1 パリ、リュ ドゥ リボリ 1 3 8

(72)発明者 マラ、ジア

フランス共和国、エフ - 7 8 5 8 0 アルベビル、レジダーンズ ドゥ ラ クロイ、1

合議体

審判長 横尾 俊一

審判官 田名部 拓也

審判官 大久保 元浩

(56)参考文献 国際公開第 0 1 / 8 5 2 0 1 (W O , A 2)

メルクマニアル (第 1 7 版 日本語版) , 1 9 9 9 年 , 日経 B P 社 , p p . 1 7 9 0 - 1 7 9 5

薬理学 (第 7 刷) , 株式会社廣川書店 , 1 9 9 2 年 , p p . 2 4 6 - 2 5 0

多田祐輔 , 総合臨床 , 1 9 9 6 年 , V o l . 4 5 , N o . 9 , p p . 2 1 6 9 - 2 1 7 6

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K45/00-45/08

A61K39/00-39/395

A61K38/00-38/58

CA(STN)

REGISTRY(STN)

MEDLINE(STN)

BIOSIS(STN)

EMBASE(STN)