

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2003.03.13**

(30) Prioridade(s): **2002.03.22 EP 02100290**

(43) Data de publicação do pedido: **2004.12.22**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.11.19**
240/2008

(73) Titular(es):

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE**

101, RUE DE TOLBIAC 75654 PARIS **FR**
LABORATOIRES SERONO SA **CH**

(72) Inventor(es):

YOLANDE CHVATCHKO **CH**
ALAIN TEDGUI **FR**
ZIAD MALLAT **FR**

(74) Mandatário:

MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE INIBIDORES DE IL-8 PARA O TRATAMENTO E/OU PREVENÇÃO DE
DOENÇAS VASCULARES PERIFÉRICAS**

(57) Resumo:

RESUMO

"UTILIZAÇÃO DE INIBIDORES DE IL-8 PARA O TRATAMENTO E/OU PREVENÇÃO DE DOENÇAS VASCULARES PERIFÉRICAS"

A invenção refere-se à utilização de um inibidor de IL-18 na preparação de um medicamento para tratamento e/ou prevenção de doenças vasculares periféricas. A invenção refere-se ainda à utilização de um inibidor de IL-18 para prevenção de amputação de membro.

DESCRIÇÃO

"UTILIZAÇÃO DE INIBIDORES DE IL-8 PARA O TRATAMENTO E/OU PREVENÇÃO DE DOENÇAS VASCULARES PERIFÉRICAS"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção situa-se no campo das doenças vasculares. Mais especificamente, ela refere-se à utilização de um inibidor de IL-18 para o tratamento e/ou prevenção de doenças vasculares periféricas. A invenção refere-se ainda à utilização de um inibidor de IL-18 para prevenção de amputação.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A citocina interleucina 18 (IL-18) foi inicialmente descrita como um factor de indução do interferão- γ (IFN- γ) (Nakamura *et al.*, 1989). É um sinal inicial do desenvolvimento de respostas de linfócitos T auxiliares de tipo 1 (TH1). A IL-18 actua em conjunto com IL-12, IL-2, antigénios, mitogénios e, possivelmente, outros factores, para induzir a produção de IFN- γ . A IL-18 também intensifica a produção de GM-CSF e IL-2, potencia a proliferação de células T induzidas por anti-CD3 e aumenta a morte mediada por células assassinas naturais.

A IL-18 madura é produzida a partir do seu precursor pela enzima de conversão da IL-1 β (ICE, caspase-1).

O receptor de IL-18 consiste de pelo menos dois componentes, IL-18R alfa e IL-18R beta, que colaboram na

ligação de ligandos. Foram encontrados sítios de ligação de afinidade elevada e baixa para a IL-18 em células T estimuladas por IL-12 murídea (Yoshimoto *et al.*, 1998), sugerindo um complexo receptor de cadeias múltiplas. As duas subunidades receptoras que foram identificadas até à data pertencem ambas à família do receptor de IL-1 (Parnet *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2001). A transdução de sinal da IL-18 envolve a activação de NF- κ B (DiDonato *et al.*, 1997). O complexo receptor de IL-18 consiste de duas cadeias receptoras: uma cadeia de ligação ao ligando designada cadeia IL-18R α e uma cadeia de transdução de sinal designada cadeia IL-18R β . A cadeia IL-18R α foi inicialmente isolada como uma proteína da superfície celular que se ligada a IL-18 marcado radioactivamente; a proteína foi purificada e a sua sequência de aminoácidos revelou identidade com um receptor órfão anteriormente descrito designado proteína relacionada com o IL-1R (IL-1Rrp) (Torigoe *et al.*, 1997).

Recentemente, uma proteína solúvel possuindo uma afinidade elevada para a IL-18 foi isolada de urina humana, e os ADNc humano e de rato, assim como o gene humano foram clonados (Novick *et al.*, 1999; WO 99/09063). A proteína foi designada proteína de ligação à IL-18 (IL-18BP).

A IL-18BP não é domínio extracelular de um dos receptores de IL18 conhecidos, mas uma proteína segregada, que está naturalmente em circulação. Ela pertence a uma nova família de proteínas segregadas, que inclui ainda várias proteínas codificadas por Poxvírus (Novick *et al.*, 1999). A IL-18BP urinária, assim como a recombinante, ligam especificamente

a IL-18 como uma afinidade elevada e modulam a afinidade biológica da IL-18.

O gene da IL-18BP foi localizado no cromossoma humano to 11q13, e não se encontrou nenhum exão que codifique um domínio transmembranar numa sequência genómica de 8,3 kb. Até à data foram encontradas em humanos quatro variantes de excisão-união ou isoformas de IL-18BP geradas por excisão-união alternativa de ARNm. Elas foram designadas IL-18BP a, b, c e d, partilhando todas da mesma extremidade N e diferindo na extremidade C (Novick et al, 1999). Estas isoformas variam na sua capacidade para ligar a IL-18. Das quatro, sabe-se que as isoformas hIL-18BP a e c têm uma capacidade neutralizante da IL-18. A isoforma IL-18BP humana liga-se à IL-18 murídea.

Os distúrbios vasculares periféricos podem ser arteriais (oclusivos ou funcionais), venosos, arteriovenosos combinados (por exemplo fístula arteriovenosa), ou linfáticos. A doença arterial oclusiva inclui oclusão arterial periférica e doença de Buerger, também denominada tromboangeíte obliterante. Os distúrbios arteriais funcionais podem ser vasoespásticos (fenómeno e doença de Raynaud, acrocianose) ou vasodilatadores (eritromelalgia). Eles podem ser secundários relativamente a uma falha local nos vasos sanguíneos ou relativamente a perturbações na actividade do sistema nervoso simpático, ou podem acompanhar uma doença vascular orgânica. As doenças venosas incluem trombose e veias varicosas, os distúrbios arteriovenosos combinados incluem fístula arteriovenosa, e os distúrbios linfáticos incluem linfedema e lipedema.

Oclusão arterial periférica refere-se a uma oclusão da irrigação sanguínea às extremidades, geralmente por placas ateroscleróticas (ateromas), um trombo ou uma embolia.

A oclusão arterial periférica pode resultar em isquemia aguda ou crónica. A isquemia aguda é provocada por uma placa arteriosclerótica proximal que sofreu ruptura, por trombose aguda em doença aterosclerótica preexistente, por uma embolia do coração, aorta ou outros vasos sanguíneos grandes, ou um aneurisma dissecado. A isquemia crónica é provocada por aumento gradual de uma placa ateromatosa.

O aumento contínuo de homocisteína no sangue, pela deterioração de células endoteliais, predispõe à aterosclerose prematura da aorta e suas ramificações, das artérias periféricas, das artérias cerebrais e, possivelmente, das artérias coronárias. Embora os níveis de homocisteína sejam geralmente elevados em associação com outros factores de risco, eles podem ser modificados pela dieta e suplementos de vitamina B.

As síndromes clínicas de oclusão arterial dependem do vaso sanguíneo envolvido, da extensão da obstrução, da velocidade com que a oclusão progride e de ser ou não adequado um fluxo colateral.

A oclusão aguda tem um histórico que inclui o aparecimento súbito de dor intensa, frio, entorpecimento e palidez numa extremidade. A extremidade fica fria e pálida, havendo ausência de pulsação distal à obstrução. A oclusão aguda pode provocar isquemia grave manifestada por perda sensorial e motora e eventualmente (após 6 até 8 h) induração molde de músculos na palpação.

Na oclusão crónica, os sintomas estão relacionados com o desenvolvimento insidioso de isquemia do tecido. O sintoma inicial é a claudicação intermitente. Os sintomas de claudicação são dor, câibra ou sentimento de cansaço que ocorre ao caminhar. Estes sintomas são mais comuns na barriga-da-perna mas podem ocorrer no pé, coxa, bacia ou nádegas.

Eventualmente, a dor isquémica pode ocorrer em repouso, começando nas partes mais distais de um membro como uma dor intensa, persistente que se agrava com o erguer e que impede frequentemente o sono.

O nível de oclusão arterial e a localização da claudicação intermitente estão intimamente correlacionadas, por exemplo a doença aorto-ilíaca provoca frequentemente claudicação nas nádegas, coxas e barrigas-das-pernas, e a pulsação femoral está diminuída ou ausente. Na doença femoropoplíteia, a claudicação é tipicamente na barriga-da-perna, e toda a pulsação abaixo da femoral está ausente. Em doentes com doença dos vasos sanguíneos pequenos (por exemplo, tromboangeíte obliterante, diabetes mellitus), a pulsação femoropoplíteia pode estar presente mas a pulsação está ausente nos pés. A palidez do pé envolvido após 1 a 2 min de elevação, seguida de rubor quando descaído, ajuda a confirmar a insuficiência arterial. O tempo do enchimento venoso no decaimento após elevação excede o limite normal de 15 s. Se os sintomas de claudicação ocorrerem com boa pulsação distal, deverá ser considerada estenose espinal no diagnóstico diferencial.

Um pé gravemente isquémico é doloroso, frio e frequentemente dormente. Em casos crónicos, a pele pode

ficar seca e escamosa com mau crescimento de unhas e pêlo. À medida que a isquemia piora pode surgir ulceração (tipicamente nos dedos ou calcanhar, ocasionalmente na perna), especialmente após trauma local. Duma maneira geral não se observa edema a menos que o doente tenha mantido a perna numa posição pendente para alívio da dor, contudo, uma perna gravemente isquémica pode ser atrófica. Uma oclusão mais extensa pode comprometer a viabilidade do tecido, levando a necrose ou gangrena. Isquemia com rubor, dor e inchaço do pé quando pendente pode imitar celulite ou insuficiência venosa. Testes arteriais não invasivos podem clarificar o diagnóstico.

Entre as doenças vasculares periféricas, a doença de Buerger (Tromboangeíte obliterante) é uma doença obliterante caracterizada por alterações inflamatórias em artérias e veias de tamanhos pequeno e médio.

A doença de Buerger ocorre em fumadores, predominantemente em homens com 20 a 40 anos de idade. Apenas cerca de 5% dos casos ocorrem em mulheres. A frequência de diagnóstico diminuiu drasticamente nos últimos anos devido a uma melhor compreensão das características clínicas e angiográficas desta doença comparativamente à arteriosclerose obliterante.

Embora a causa seja desconhecida, a doença de Buerger não foi documentada em não fumadores, o que envolve o fumo de cigarro como um factor etiológico primário, eventualmente como um tipo retardado de hipersensibilidade ou angeíte tóxica. A tromboangeíte obliterante pode ser uma reacção ao tabaco por indivíduos com um fenótipo específico, devido à maior prevalência de HLA-A9 e HLA-B5 em indivíduos com a

doença; ou um distúrbio autoimune com sensibilidade mediada por células para os colagénios humanos de tipos I e III, os quais são constituintes dos vasos sanguíneos.

Ao contrário da aterosclerose, a doença de Buerger não envolve as artérias coronárias.

A doença envolve artérias de tamanho pequeno e médio e, frequentemente, veias superficiais das extremidades num padrão segmentado. Raramente, vasos sanguíneos noutras partes do organismo são afectados numa fase avançada da doença. O aspecto patológico é o de uma panarterite não purulenta ou panflebite com trombose dos vasos sanguíneos envolvidos. A proliferação de células endoteliais e infiltração da camada da íntima com linfócitos ocorre na lesão aguda, mas a lâmina elástica interna permanece intacta. O trombo torna-se organizado e, mais tarde, recanaliza de modo incompleto. O meio é bem conservado mas pode ser infiltrado por fibroblastos. Uma vez que a túnica adventícia é geralmente infiltrada de modo mais intenso com fibroblastos, as lesões mais antigas apresentam fibrose periarterial, a qual também pode envolver a veia e nervo adjacentes.

Os sintomas e sinais são os da isquemia arterial e da tromboflebite superficial. O aparecimento é gradual, começando nos vasos sanguíneos mais distais das extremidades superiores e inferiores e progredindo de modo proximal, culminando em gangrena distal. O doente pode apresentar queixas de frio, entorpecimento, formigueiro ou ardor antes de existir evidência objectiva da doença. O fenómeno de Raynaud é comum. Ocorre claudicação intermitente na extremidade envolvida (habitualmente o arco

do pé ou a perna, mas raramente a mão, braço ou coxa). A dor é persistente com isquemia mais grave, por exemplo, na fase pré-gangrenosa e com ulceração ou gangrena. Frequentemente, a actividade excessiva do sistema nervoso simpático manifesta-se por frio, transpiração excessiva e cianose da extremidade envolvida, provavelmente provocada pela dor intensa, persistente.

A ulceração isquémica e gangrena, geralmente de um ou mais dedos, podem ocorrer numa fase inicial da doença mas não de modo agudo. Estudos não invasivos mostram diminuições acentuadas no débito sanguíneo e tensão arterial nos dedos dos pés, pés e dedos das mãos afectados. A doença progride de modo proximal.

Uma outra doença vascular periférica é a doença arterial periférica, na qual os doentes com doença arterial periférica (PAD) da extremidade inferior podem progredir para isquemia grave com risco para o membro. Dor isquémica em repouso, ulcerações que não cicatrizam e gangrena são todos arautos de maus resultados. Estes doentes estão em risco de perder o membro. A detecção e avaliação urgente de isquemia grave de membros, seguida de revascularização eficiente são necessárias para salvar o membro e conservar o estado geral de saúde.

A isquemia crítica crónica de membros é o resultado final de doença oclusiva arterial, mais comumente a aterosclerose. Além da aterosclerose juntamente com a hipertensão, hipercolesterolemia, tabagismo e diabetes, causas menos frequentes de isquemia crítica crónica de membros incluem doença de Buerger, ou tromboangeíte obliterante, e algumas formas de arterite.

O desenvolvimento de isquemia crítica crónica de membros requer geralmente sítios múltiplos de obstrução arterial que reduzem significativamente o débito sanguíneo aos tecidos. A isquemia tecidual crítica manifesta-se clinicamente como uma dor em repouso, feridas que não cicatrizam (devido aos maiores requisitos metabólicos da cicatrização de feridas) ou necrose de tecido (gangrena).

A dor isquémica em repouso é classicamente descrita como um ardor no dorso e dedos do pé que se acentua durante a noite quando o doente está na cama. A dor isquémica em repouso localiza-se no pé, onde o tecido está mais longe do coração e distal em relação às oclusões arteriais. As feridas que não cicatrizam localizam-se geralmente em áreas de traumatismo no pé provocadas por calçado inadequado ou uma lesão. Duma maneira geral considera-se que uma ferida não cicatriza se ela não responder a um tratamento conservador de quatro até doze semanas tal como mudanças regulares de compressas, evitar traumatismos, tratamento da infecção e eliminação de tecido necrótico.

A gangrena manifesta-se geralmente nos dedos dos pés. Ela desenvolve-se quando a irrigação sanguínea é tão baixa que ocorre necrose espontânea nos tecidos com perfusão mais escassa.

Embora a terapia conservadora cuidadosamente concebida possa beneficiar muitos doentes com isquemia crítica de membros, a natureza grave desta doença pode fazer com que se considere a intervenção cirúrgica. As intervenções cirúrgicas incluem revascularização ou amputação. Se o doente optar pela revascularização e for um candidato aceitável para cirurgia, então realiza-se frequentemente

uma arteriografia para uma melhor avaliação e planeamento da revascularização. Nalguns centros, utiliza-se angiografia com ressonância magnética como uma alternativa ou complemento à arteriografia para minimizar o risco da exposição ao corante. A conservação do membro por meio de revascularização é preferida do ponto de vista custo-benefício, leva a uma melhor qualidade de vida para a maioria dos doentes e está associada a uma menor morbilidade e mortalidade perioperatórias do que a amputação. A conservação do membro deveria ser o objectivo primordial na maioria dos doentes com isquemia crítica crónica de membros.

A viabilidade da revascularização é determinada pelas observações arteriográficas bem como pela disponibilidade de uma conduta para a ponte. A angioplastia ou colocação de endoprótese, ou ambos, tem mais êxito com lesões proximais pequenas, tais como aquelas em doentes com claudicação, mas é pouco provavelmente o único tratamento necessário no tratamento da isquemia crítica de membros devido à natureza multinível da doença oclusiva arterial. A conduta ideal é a veia safena maior, mas outras condutas incluem as veias safenas menores, as veias do braço ou uma conduta protética. Na maior parte das séries cirúrgicas, as taxas de permeabilidade das artérias da barriga-da-perna a três anos variam desde 40 por cento para as pontes protéticas até 85 por cento para as pontes com veia safena. Em comparação, estudos de terapia conservadora demonstraram uma taxa de sucesso de 25 a 49 por cento com feridas que não cicatrizam e uma taxa de 50 a 80 por cento de melhoramento na dor isquémica em repouso.

A amputação primária pode ser indicada em certos doentes, tais como aqueles com necrose tecidular extensa, infecção potencialmente fatal ou lesões não adequadas para revascularização. A decisão de monitorizar o estado do doente com observação cuidadosa e tratamento conservador ou de realizar a revascularização ou amputação depende da avaliação criteriosa dos riscos e benefícios para o doente da cirurgia em relação ao tratamento conservador.

Mais importante ainda, depende da interpretação que o doente faça do carácter invasivo ou conveniência das opções disponíveis. Até mesmo os doentes que não podem caminhar devido à sua condição podem considerar a amputação inapropriada, e nem todos os doentes estão motivados para fazer o trabalho de reabilitação após amputação. Se for tomada a decisão para amputar, o nível de amputação deverá ser aquele que tem a maior probabilidade de cicatrização e ao mesmo tempo dar ao doente a máxima possibilidade de reabilitação funcional.

O diagnóstico de isquemia crítica crónica de membros envolve a manifestação de dor em repouso, feridas que não cicatrizam e gangrena. A dor isquémica em repouso é tipicamente descrita como um ardor no arco do pé ou pé distal que ocorre quando o doente está deitado mas que alivia quando o doente regressa a uma posição na qual os pés estão pendentes. Os parâmetros hemodinâmicos objectivos que apoiam o diagnóstico de isquemia crítica de membros inclui um índice tarso-braquial de 0,4 ou menos, uma tensão sistólica no tornozelo de 50 mm Hg ou menos, ou uma tensão sistólica no dedo do pé de 30 mm Hg ou menos. A intervenção pode incluir terapia conservadora, revascularização ou amputação. Gangrena progressiva, feridas que aumentam

continuamente ou dor isquémica contínua em repouso pode significar uma ameaça ao membro e sugere a necessidade de revascularização em doentes sem riscos cirúrgicos proibitivos. Geralmente são requeridos enxertos em ponte devido à natureza multinível e distal do estreitamento arterial na isquemia crítica de membros. Os doentes com diabetes são mais propensos do que outros doentes para ter doença distal menos adequada a enxerto em ponte. Em comparação com a amputação, a revascularização é mais preferida do ponto de vista custo-benefício e está associada a uma melhor morbidade e mortalidade perioperatória. A conservação de membro deveria ser o objectivo primordial na maioria dos doentes com isquemia crítica de membros.

Actualmente, o tratamento principal de doenças vasculares periféricas inclui o tratamento invasivo tal como angioplastia ou até mesmo amputação de membro. A identificação de fármacos que estimulem a neovascularização periférica sem aumentar a progressão da placa aterosclerótica é de importância terapêutica extrema neste campo médico.

SUMÁRIO INVENÇÃO

A invenção baseia-se na observação de que um inibidor de IL-18 estimula a neovascularização após indução de isquemia periférica num modelo animal experimental. A neovascularização ocorreu em associação com uma activação da sinalização VEGF/Akt e foi acompanhada de um aumento na mobilização e diferenciação de células progenitoras endoteliais da medula óssea.

Com base nestes resultados, são proporcionadas novas abordagens terapêuticas para tratar ou prevenir doenças vasculares periféricas que requerem neo- ou revascularização.

Por conseguinte, a invenção refere-se à utilização de um inibidor de IL-18 como definido nas reivindicações apensas.

DESCRIÇÃO ABREVIADA DOS DESENHOS

Fig. 1: mostra A) Microangiografia representativa das patas posteriores direita isquêmica e esquerda não isquêmica, 3 e 28 dias após oclusão da artéria femoral no rato. B) mostra o índice angiográfico isquêmico/não isquêmico em ratos tratados com pcDNA3-mIL 18BP (IL-18BP) ou plasmídeo vazio (Controlo) durante 3 ou 28 dias. Os valores são média $\pm$ EPM, n=7 por grupo. **p<0,01 versus ratos de controlo.

Fig. 2: mostra A) Alterações induzidas por isquemia no débito sanguíneo das patas traseiras monitorizado in vivo por imagiologia de perfusão por laser Doppler em ratos tratados com pcDNA3-mIL 18BP (IL-18 BP) ou plasmídeo vazio (Controlo). Nas imagens a cores, a perfusão normal é representada a vermelho, uma redução acentuada no débito sanguíneo da pata isquêmica é representada a azul. B) Avaliação quantitativa do débito sanguíneo exprimida como uma taxa de débito sanguíneo na pata isquêmica em relação à não isquêmica. Os valores são média $\pm$ EPM, n=7 por grupo. **p<0,01 versus ratos de controlo.

Fig. 3: mostra A) Transferência de Western representativa do teor de proteína VEGF na pata não isquêmica e isquêmica, 28 dias após oclusão da artéria femoral. B) Avaliação quantitativa dos níveis de proteína VEGF expressos como uma razão do teor de proteína na pata isquêmica em relação à não isquêmica. Os valores são média $\pm$ EPM, n=7 por grupo. **p<0,01 versus controlo não isquémico e †p<0,05 versus controlo isquémico.

Fig. 4: mostra A) Transferência de Western representativa do teor de proteína fosfo-Akt na pata não isquêmica e isquêmica, 28 dias após oclusão da artéria femoral. B) Avaliação quantitativa dos níveis de proteína fosfo-Akt expressos como uma razão do teor de proteína na pata isquêmica em relação à não isquêmica. Os valores são média $\pm$ EPM, n=7 por grupo. *p<0,05, **p<0,01 versus controlo não isquémico e †p<0,05 versus controlo isquémico.

Fig. 5: A) Imagens representativas de EPCs (células progenitoras endoteliais) isoladas de medula óssea de ratos sem constrição da artéria femoral (Simulada) e de ratos tratados com pcDNA3-mIL 18BP (IL-18BP) ou plasmídeo vazio (Controlo). As EPCs foram caracterizadas como células aderentes com revelação positiva dupla para AcLDL-Dil e o factor de von-Willebrand (vWF). B) Quantificação de células positivas duplas em ratos tratados com pcDNA3-mIL 18BP ou plasmídeo vazio. Os valores são média $\pm$ EPM, n=5 por grupo. ***p<0,001, versus ratos de controlo, †††p<0,001, versus ratos sem constrição da artéria femoral (Simulada).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

a presente invenção baseia-se na observação de que os inibidores de IL-18 aumentam significativamente a angiogénese pós-isquémica após isquemia do membro sem afectar a densidade de vasos sanguíneos do membro não isquémico num modelo murídeo da doença in vivo. Portanto, a invenção proporciona uma nova abordagem terapêutica para tratar ou prevenir doenças vasculares periféricas que requerem uma melhor perfusão de tecido.

Por conseguinte, a invenção refere-se à utilização de um inibidor de IL-18 para o fabrico de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de uma doença vascular periférica.

O termo “prevenção” dentro do contexto desta invenção refere-se não só a uma prevenção total de um certo efeito, mas também a qualquer prevenção, atenuação, redução, decréscimo ou diminuição parcial ou considerável do efeito antes ou no aparecimento inicial da doença.

O termo “tratamento” dentro do contexto desta invenção refere-se a qualquer efeito benéfico na progressão da doença, incluindo atenuação, redução, decréscimo ou diminuição do desenvolvimento patológico após aparecimento da doença.

O termo “doença vascular periférica” como aqui utilizado refere-se a doenças ou distúrbios que afectam as artérias, veias e tecidos linfáticos das extremidades. Os distúrbios vasculares periféricos podem ser arteriais (oclusivos ou funcionais), venosos, arteriovenosos combinados (por

exemplo, fístula arteriovenosa) ou linfáticos. A doença arterial oclusiva inclui oclusão arterial periférica e tromboangeíte obliterante. Os distúrbios arteriais funcionais podem ser vasoespásticos (fenómeno e doença de Raynaud, acrocianose) ou vasodilatadores (eritromelalgia). Eles também podem ser secundários a uma falha local nos vasos sanguíneos, ou a perturbações na actividade do sistema nervoso simpático, ou eles podem acompanhar doença vascular orgânica. As doenças venosas incluem trombose venosa e veias varicosas, os distúrbios arteriovenosos combinados incluem fístula arteriovenosa, e os distúrbios linfáticos incluem linfedema e lipedema.

O termo “doença vascular periférica” destina-se a abranger todas as indicações médicas, doenças, distúrbios ou sintomas descritos nos “Antecedentes da Invenção” acima.

O termo “inibidor de IL-18” dentro do contexto desta invenção refere-se a qualquer molécula que module a produção e/ou acção da IL-18 de modo a que a produção e/ou acção da IL-18 seja atenuada, reduzida, ou parcial, considerável ou completamente prevenida ou bloqueada.

Um inibidor da produção pode ser qualquer molécula que afecte negativamente a síntese, processamento ou maturação da IL-18. Os inibidores de acordo com a invenção pode ser, por exemplo, supressores da expressão do gene da interleucina IL-18, ARNm antimessageiros que reduzem ou impeçam a transcrição do ARNm da IL-18 ou que conduzam à degradação do ARNm, proteínas que impeçam a dobragem correcta, ou que previnam parcial ou consideravelmente a secreção de IL-18, proteases que degradam IL-18, assim que ela tiver sido sintetizada, inibidores de proteases que

dissociam a pro-IL-18 para gerar a IL-18 madura, tais como os inibidores da caspase-1, e semelhantes.

Um inibidor da acção da IL-18 pode ser, por exemplo, um antagonista de IL-18. Os antagonistas podem ligar-se ou sequestrar a própria molécula de IL-18 com afinidade e especificidade suficiente para neutralizar parcial ou consideravelmente a IL-18 ou o(s) sítio(s) de ligação da IL-18 responsáveis pela ligação da IL-18 aos seus ligandos (como, por exemplo aos seus receptores). Um antagonista também pode inibir o percurso de sinalização da IL-18, o qual é activado dentro das células após ligação da IL-18 ao seu receptor.

Os inibidores da acção da IL-18 também podem ser receptores solúveis de IL-18 ou moléculas que imitam os receptores, ou agentes que bloqueiam os receptores de IL-18, ou anticorpos contra a IL-18, tais como anticorpos policlonais ou monoclonais, ou qualquer outro agente ou molécula que previna a ligação da IL-18 aos seus alvos, diminuindo ou impedindo desse modo o desencadeamento das reacções intra- ou extracelulares mediadas pela IL-18.

Numa forma de realização preferida da invenção, a doença vascular periférica é uma doença arterial periférica.

“Doença arterial periférica” é um distúrbio que envolve o estreitamento das artérias em qualquer parte desde os braços até à aorta e as artérias das pernas. O aparecimento pode ser súbito ou gradual e resulta geralmente em isquemia (diminuição do fornecimento de oxigénio à área que os vasos sanguíneos irrigam).

Preferencialmente, de acordo com a presente invenção, a doença arterial periférica relaciona-se com as extremidades inferiores. A doença arterial periférica ou oclusão pode ser crónica ou aguda. A doença arterial periférica está frequentemente associada a claudicação.

Portanto, a presente invenção refere-se ainda à utilização de um inibidor de IL-18 para o tratamento e/ou prevenção de claudicação. Claudicação é a dor na perna, em particular na barriga-da-perna, que vai e vem para originar claudicação. A claudicação é tipicamente sentida ao caminhar, e desaparece com o repouso. É, por conseguinte, comumente referida como claudicação intermitente. A natureza geralmente intermitente da dor de claudicação é devida a um fornecimento inadequado temporário de oxigénio aos músculos da perna. O fornecimento enfraquecido de oxigénio é um resultado de estreitamento ou oclusão das artérias que fornecem sangue à perna. Isto limita o fornecimento de oxigénio aos músculos da perna e é especialmente sentido quando aumenta o requisito de oxigénio destes músculos durante o exercício ou caminhar.

Numa forma de realização preferida da invenção, a doença vascular periférica é a Tromboangeíte obliterante (Doença de Buerger). “Doença de Buerger” é uma doença obliterante caracterizada por alterações inflamatórias em artérias e veias de tamanho pequeno ou médio que ocorrem frequentemente em fumadores, predominantemente em homens com 20 a 40 anos de idade.

A doença envolve artérias de tamanho pequeno ou médio e, frequentemente, veias superficiais das extremidades num padrão segmentado.

Numa outra forma de realização preferida, a doença vascular periférica é a isquemia periférica, em particular isquemia de membros. "Isquemia" é uma deficiência na irrigação sanguínea, geralmente devida a oclusão ou traumatismo dos vasos sanguíneos. "Isquemia periférica" refere-se particularmente a isquemia nos membros, isto é os braços ou pernas, levando a uma deficiência no fornecimento de oxigénio ao tecido do membro correspondente.

Ainda noutra forma de realização da presente invenção, a isquemia de membros é a isquemia crítica de membros. "Isquemia crítica de membros" é um estado no qual a irrigação sanguínea do membro é de tal forma deficiente que ameaça a sua sobrevivência. A presença de dor em repouso, ulceração ou gangrena indica isquemia crítica de membros. Gangrena é o termo utilizado para descrever tecido morto, e ela ocorre frequentemente em resultado ou em combinação com a isquemia de membros. É originada uma úlcera isquémica por irrigação sanguínea inadequada.

A isquemia crítica de membros, incluindo gangrena ou úlceras, requer revascularização para prevenir a amputação do membro. Por conseguinte, a presente invenção também se refere à utilização de inibidores de IL-18 para tratamento e/ou prevenção de gangrena e úlceras.

A consequência final da doença vascular periférica, e em particular da isquemia periférica, pode ser a amputação do membro afectado, em particular do membro inferior ou pé afectado. A revascularização levará à reperfunção do tecido afectado e ajudará, desse modo, o processo de cicatrização.

Portanto, a invenção refere-se ainda à utilização de um inibidor de IL-18 para o fabrico de um medicamento para a prevenção de amputação dos membros, em particular de um membro inferior, pé ou dedo(s) do pé.

O inibidor de IL-18 é seleccionado dos inibidores da caspase-1 (ICE), anticorpos dirigidos contra a IL-18, anticorpos dirigidos contra qualquer uma das subunidades do receptor de IL-18, inibidores do percurso de sinalização da IL-18, antagonistas de IL-18 que competem com a IL-18 e bloqueiam o receptor de IL-18 e proteínas de ligação à IL-18, isoformas, proteínas mutadas, proteínas fundidas, derivados funcionais, fracções activas ou derivados permutados circularmente destes que inibem a actividade biológica da IL-18.

O termo "proteínas de ligação à IL-18" é aqui utilizado sinonimamente com "proteína de ligação à IL-18" ou "IL18BP". Ele compreende proteínas de ligação à IL-18 como definidas em WO 99/09063 ou em Novick *et al.*, 1999, incluindo variantes de excisão-união e/ou isoformas das proteínas de ligação à IL-18, como definidas em Kim *et al.*, 2000, as quais se ligam à IL-18. Em particular, as isoformas a e c humanas da IL-18BP são úteis de acordo com a presente invenção. As proteínas úteis de acordo com a presente invenção podem ser glicosiladas ou não glicosiladas, elas podem ser derivadas de fontes naturais, tal como urina, ou elas podem ser preferencialmente produzidas de modo recombinante. A expressão recombinante pode ser realizada em sistemas de expressão procariotas como *E. coli*, ou em sistemas de expressão eucariotas, e preferencialmente em sistemas de expressão mamíferos. Uma linhagem de células que é particularmente bem adequada para

a expressão de proteínas mamíferas é a linhagem de células do Ovário de Hamster Chinês (CHO).

Como aqui utilizado o termo “proteínas mutadas” refere-se a análogos de uma IL-18BP, ou análogos de uma IL-18BP viral, nos quais um ou mais resíduos de aminoácidos de uma IL-18BP natural ou IL-18BP viral estão substituídos por resíduos de aminoácidos diferentes, ou estão suprimidos, ou são adicionados um ou mais resíduos de aminoácidos à sequência natural de uma IL-18BP, ou uma IL-18BP viral, sem alterar consideravelmente a actividade dos produtos resultantes em relação à IL-18BP de tipo selvagem ou IL-18BP viral. Estas proteínas mutadas são preparadas por técnicas de síntese e/ou por técnicas de mutagénese dirigida conhecidas, ou quaisquer outras técnicas adequadas para esse fim.

As proteínas mutadas de acordo com a presente invenção incluem proteínas codificadas por um ácido nucleico, tal como ADN ou ARN, que hibridizam em ADN ou ARN, que codifica uma IL-18BP ou codifica uma IL-18BP viral, como descrito em WO 99/09063, sob condições rigorosas. O termo “condições rigorosas” refere-se às condições de hibridização e lavagem subsequente, as quais os técnicos médios na matéria referem convencionalmente como “rigorosas”. Ver Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, supra, Interscience, N.Y., §§6.3 e 6.4 (1987, 1992), e Sambrook *et al.*, supra. Sem limitação, os exemplos de condições rigorosas incluem condições de lavagem 12-20 °C abaixo do T_m calculado para o híbrido em estudo, por exemplo, em $2 \times \text{SSC}$ e 0,5% de SDS durante 5 minutos, $2 \times \text{SSC}$ e 0,1% de SDS durante 15 minutos; $0,1 \times \text{SSC}$ e 0,5% de SDS a 37 °C durante 30-60 minutos e em seguida, uma $0,1 \times \text{SSC}$ e 0,5% de

SDS a 68 °C durante 30-60 minutos. Os técnicos médios nesta matéria compreendem que as condições rigorosas também dependem do comprimento das sequências de ADN, sondas de oligonucleótidos (tais como 10-40 bases) ou sondas de oligonucleótidos mistas. Se forem utilizadas sondas mistas, é preferível utilizar cloreto de tetrametilamónio (TMAC) em vez de SSC. Ver Ausubel, supra.

Qualquer uma dessas proteínas mutadas tem preferencialmente uma sequência de aminoácidos suficientemente duplicativa da de uma IL-18BP, ou suficientemente duplicativa de uma IL-18BP viral, de modo a ter uma actividade comparável à IL-18BP. Uma actividade da IL-18BP é a sua capacidade de ligação à IL-18. Desde que a proteína mutada uma actividade de ligação considerável à IL-18, ela pode ser utilizada na purificação de IL-18, tal como por meio de cromatografia de afinidade, e pode ser assim considerada como tendo uma actividade essencialmente semelhante à IL-18BP. Assim, pode determinar-se se uma dada proteína mutada tem essencialmente a mesma actividade que a IL-18BP por meio de experimentação de rotina compreendendo submeter uma tal proteína mutada, por exemplo, a um ensaio de competição em sanduíche simples para determinar se ela se liga ou não a uma IL-18 apropriadamente marcada, tal como radioimunoensaio ou ensaio ELISA.

Qualquer uma dessas proteínas mutadas tem pelo menos 40% de identidade ou homologia com a sequência de uma IL-18BP ou de um homólogo da IL-18BP codificado por um vírus, como definido na WO 99/09063. Mais preferencialmente, ela tem pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80% ou, muito preferencialmente, pelo menos 90% de identidade ou homologia com aquela.

As proteínas mutadas de polipéptidos de IL-18BP ou proteínas mutadas de IL-18BP virais, que podem ser utilizadas de acordo com a presente invenção, ou os ácidos nucleicos que codificam aquelas, incluem um conjunto finito de sequências essencialmente correspondentes como péptidos de substituição ou polinucleótidos os quais podem ser obtidos de modo rotineiro por um técnico médio na matéria, sem experimentação excessiva, com base nos ensinamentos e orientações aqui apresentadas.

As modificações para proteínas mutadas de acordo com a presente invenção são aquelas que são conhecidas como substituições “conservadoras”. As substituições conservadoras de aminoácidos de polipéptidos ou proteínas de IL-18BP ou IL-18BP virais, podem incluir aminoácidos sinónimos dentro de um grupo os quais têm propriedades físico-químicas suficientemente semelhantes pelo que a substituição entre membros do grupo conservará a função biológica da molécula (Grantham, 1974). É evidente que também poderão ser feitas inserções e supressões de aminoácidos nas sequências anteriormente definidas sem alterar a sua função, particularmente se as inserções ou supressões envolverem apenas alguns aminoácidos, por exemplo, menos de trinta e, preferencialmente, menos de dez, e não removerem ou substituírem aminoácidos que são críticos para uma conformação funcional, por exemplo, resíduos de cisteína. As proteínas e proteínas mutadas produzidas por tais supressões e/ou inserções entram dentro do alcance da presente invenção.

Preferencialmente, os grupos de aminoácidos sinónimos são aqueles definidos no Quadro 1. Mais preferencialmente, os grupos de aminoácidos sinónimos são aqueles definidos no

Quadro 2; e muito preferencialmente os grupos de aminoácidos sinónimos são aqueles definidos no Quadro 3.

QUADRO 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
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

QUADRO 2

Grupos Mais Preferidos de Aminoácidos Sinónimos

Aminoácido	Grupo Sinónimo
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met

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

QUADRO 3

Grupos Muito 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
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser

His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

Os exemplos de produção de substituições de aminoácidos em proteínas que podem ser utilizados para obter proteínas mutadas de polipéptidos ou proteínas de IL-18BP, ou proteínas mutadas de IL-18BP virais, para serem utilizados na presente invenção incluem quaisquer passos de métodos conhecidos, tais como apresentados nas Patentes US 4 959 314, 4 588 585 e 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*; e 5 017 691 de Lee *et al*; e as proteínas substituídas com lisina apresentadas na Patente US 4 904 584 (Shaw *et al*).

O termo "proteína fundida" refere-se a um polipéptido compreendendo uma IL-18BP, ou uma IL-18BP viral, ou uma proteína mutada ou fragmento desta, fundida com outra proteína, a qual tem, por exemplo, um tempo de residência prolongado nos fluidos corporais. Uma IL-18BP ou uma IL-18BP viral, pode ser assim fundida com outra proteína, polipéptido ou semelhantes, por exemplo, uma imunoglobulina ou um fragmento desta.

Os "derivados funcionais" como aqui utilizados cobrem derivados de IL-18BP ou uma IL-18BP viral, e suas proteínas mutadas e proteínas fundidas, que possam ser preparadas a

partir dos grupos funcionais que ocorrem como cadeias laterais nos resíduos ou nos grupos N- ou C-terminais, por meios conhecidos na técnica, e estão incluídos na invenção desde que eles permaneçam farmacêuticamente aceitáveis, isto é eles não destruam a actividade da proteína a qual é essencialmente semelhante à actividade da IL-18BP, ou IL-18BP virais, e não confiram propriedades tóxicas às composições que as contêm.

Estes derivados podem, por exemplo, incluir cadeias lateral de polietileno glicol, as quais podem mascarar sítios antigénicos e prolongar a residência de uma IL-18BP ou uma IL-18BP viral nos fluidos corporais. Outros derivados incluem ésteres alifáticos dos grupos carboxilo, amidas dos grupos carboxilo por reacção com amoníaco ou com aminas primárias ou secundárias, derivados N-acilo de grupos amino livres dos resíduos de aminoácidos preparados com unidades acilo (por exemplo grupos alcanoílo ou aroílo carbocíclicos) ou derivados O-acilo de grupos hidroxilo livres (por exemplo os de resíduos serilo ou treonilo) preparados com unidades acilo.

Como "fracções activas" de uma IL-18BP, ou uma IL-18BP viral, proteínas mutadas e proteínas fundidas, a presente invenção cobre qualquer fragmento ou precursores da cadeia de polipéptido da molécula de proteína sozinha ou em conjunto com moléculas ou resíduos associados ligados àquela, por exemplo, resíduos de açúcar ou fosfato, ou agregados da molécula de proteína ou os resíduos de açúcar sozinhos, desde que a referida fracção possua uma actividade essencialmente semelhante à IL-18BP.

Numa outra forma de realização preferida da invenção, o inibidor de IL-18 é um anticorpo dirigido contra a IL-18 ou o seu receptor, o IL-18R. Os anticorpos dirigidos para qualquer uma das subunidades do IL-18R, chamadas IL-18R α e β , podem ser utilizados de acordo com a presente invenção.

Os anticorpos de acordo com a invenção podem ser policlonais ou monoclonais, quiméricos, humanizados ou até mesmo completamente humanos. Os anticorpos recombinantes e seus fragmentos são caracterizados por uma afinidade de ligação elevada para a IL-18 ou IL-18R *in vivo* e toxicidade baixa. Os anticorpos que podem ser utilizados na invenção são caracterizados pela sua aptidão para tratar doentes durante um período de tempo suficiente para ter uma regressão ou alívio bom a excelente da condição patogénica ou de qualquer sintoma ou grupo de sintomas relacionados com a condição patogénica, e uma toxicidade baixa.

Os anticorpos neutralizantes são rapidamente gerados em animais tais como coelhos, cabras ou ratos por imunização com IL-18 ou IL-18R α ou β . Os ratos imunizados são particularmente úteis para proporcionar fontes de células B para o fabrico de hibridomas, os quais são, por sua vez, cultivados para produzir grandes quantidades de anticorpos monoclonais anti-IL-18.

Os anticorpos quiméricos são moléculas de imunoglobulina caracterizadas por dois ou mais segmentos ou porções derivados de espécies animais diferentes. Dum modo geral, a região variável do anticorpo quimérico é derivada de um anticorpo mamífero não humano, tal como anticorpo monoclonal murídeo, e a região constante de imunoglobulina

é derivada de uma molécula de imunoglobulina humana. Preferencialmente, ambas as regiões e a combinação têm imunogenicidade baixa como determinado de modo rotineiro (Elliott et al., 1994). Os anticorpos humanizados são moléculas de imunoglobulina criadas por técnicas de manipulação genética nas quais as regiões constantes muríneas são substituídas por homólogos humanos, enquanto se mantém as regiões de ligação de antígeno muríneo. O anticorpo quimérico de rato-humano resultante tem preferencialmente uma imunogenicidade reduzida e farmacocinéticas melhoradas em humanos (Knight et al., 1993).

Assim, numa outra forma de realização preferida, o anticorpo contra a IL-18 ou o IL-18R é um anticorpo humanizado. Exemplos preferidos de anticorpos anti-IL-18 humanizados são, por exemplo, descritos no Pedido de Patente Europeia EP 0 974 600.

Ainda numa outra forma de realização preferida, o anticorpo é completamente humano. A tecnologia para produzir anticorpos humanos é descrita em pormenor, por exemplo, na WO00/76310, WO99/53049, US 6 162 963 ou AU5336100.

Um método para a preparação de anticorpos completamente humanos consiste na "humanização" do sistema imunitário humoral de rato, isto é na produção de estirpes de ratos capazes de produzir Ig humana (Xeno-rato), pela introdução de locais de imunoglobulina (Ig) humana em ratos nos quais foram inactivados os genes de Ig endógenos. Os locais de Ig são complexos tanto em termos da sua estrutura física e no rearranjo de genes como nos processos de expressão necessários para produzir no final uma resposta imunitária

lata. A diversidade de anticorpos é inicialmente gerada por rearranjo combinatório entre genes V, D e J diferentes presentes nos locais de Ig. Estes locais também contêm os elementos reguladores disseminados, os quais controlam a expressão do anticorpo, a exclusão alélica, a alteração de classe e a maturação da afinidade. A introdução de transgenes de Ig humanos não rearranjados em ratos demonstrou que a maquinaria de recombinação do rato é compatível com os genes humanos. Além disso, hibridomas que segregam hu-mAbs específico para antígeno de vários isotipos podem ser obtidos por imunização Xeno-rato com antígeno.

Os anticorpos completamente humanos e métodos para a sua produção são conhecidos na técnica (Mendez *et al* (1997); Buggemann *et al* (1991); Tomizuka *et al.*, (2000) Patente WO 98/24893).

Numa forma de realização extremamente preferida da presente invenção, o inibidor de IL-18 é uma IL-18BP, ou uma isoforma, uma proteína mutada, proteína fundida, derivado funcional, fracção activa ou derivado permutado circularmente daquela. Estas isoformas, proteínas mutadas, proteínas fundidas ou derivados funcionais retêm a actividade biológica da IL-18BP, em particular a ligação à IL-18, e têm de um modo preferido essencialmente pelo menos uma actividade semelhante à IL-18BP. Idealmente, estas proteínas têm uma actividade biológica melhorada em comparação com a IL-18BP não modificada. As fracções activas preferidas têm uma actividade que é melhor do que a actividade da IL-18BP, ou as quais têm outras vantagens, como uma melhor estabilidade ou uma menor toxicidade ou

imunogenicidade, ou elas são mais fáceis de produzir em grandes quantidades, ou mais fáceis de purificar.

As sequências de IL-18BP e das suas variantes de excisão-união/isoformas podem ser retiradas de WO99/09063 ou de Novick *et al.*, 1999, bem como de Kim *et al.*, 2000.

Os derivados funcionais da IL-18BP podem ser conjugados com polímeros para melhorar as propriedades da proteína, tal como a estabilidade, semivida, biodisponibilidade, tolerância pelo organismo humano, ou imunogenicidade. Para atingir este objectivo, a IL18-BP pode ser ligada, por exemplo, a Polietilenoglicol (PEG). A PEGuilação pode ser realizada por métodos conhecidos descritos, por exemplo, na WO 92/13095.

Portanto, numa forma de realização da presente invenção, os inibidores de IL-18, a IL-18BP é PEGuilada.

Numa outra forma de realização da invenção, o inibidor de IL-18 compreende uma fusão de imunoglobulina, isto é o inibidor de IL-18 é uma proteína fundida compreendendo a totalidade ou parte de uma proteína de ligação da IL-18, a qual está fundida com a totalidade ou uma porção de uma imunoglobulina. Os métodos para preparar proteínas de fusão de imunoglobulina são bem conhecidos na técnica, tais como, por exemplo, os descritos na WO 01/03737. O especialista na técnica compreenderá que a proteína de fusão resultante da invenção retém a actividade biológica da IL-18BP, em particular a ligação à IL-18. A fusão pode ser directa, ou via um péptido de ligação curto o qual pode ser tão curto quanto 1 até 3 resíduos de aminoácidos de comprimento ou mais compridos, por exemplo, 13 até 20 resíduos de

aminoácidos de comprimento. O referido grupo de ligação pode ser, por exemplo, um tripéptido da sequência E-F-M (Glu-Phe-Met), ou uma sequência de ligação com 13 aminoácidos compreendendo Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met introduzidos entre a sequência de IL-18BP e a sequência de imunoglobulina. A proteína de fusão resultante tem propriedades melhoradas, tais como um tempo de residência prolongado nos fluidos corporais (semivida), maior actividade específica, maior nível de expressão ou a purificação da proteína de fusão é facilitada.

Numa forma de realização preferida, a IL-18BP está fundida à região constante de uma molécula de Ig. Preferencialmente, por exemplo, ela está fundida às regiões de cadeia pesada, como os domínios CH2 e CH3 da IgG1 ou IgG2 humana. A geração de proteínas de fusão específicas compreendendo IL-18BP e uma porção de uma imunoglobulina é, por exemplo, descrita no exemplo 11 da WO 99/09063. Outras isoformas de moléculas de Ig também são adequadas para a geração de proteínas de fusão de acordo com a presente invenção, tais como as isoformas IgG₂ ou IgG₄, ou outras classes de Ig como, por exemplo, IgM ou IgA. As proteínas de fusão podem ser monoméricas ou multiméricas, hetero- ou homomultiméricas.

Ainda noutra forma de realização da invenção, utiliza-se um inibidor de IL-18 em combinação com uma ou mais de outras moléculas activas nas condições clínicas da invenção, tais como vasodiladores, bloqueadores de Ca, aspirina, bloqueadores beta ou semelhantes. Por exemplo, os antagonistas de TNF também podem ser utilizados em combinação com um inibidor de IL-18 de acordo com a

presente invenção. Os antagonistas de TNF exercem a sua actividade de vários modos. Em primeiro lugar, os antagonistas podem ligar ou sequestrar a própria molécula de TNF com afinidade e especificidade suficientes para neutralizar parcial ou consideravelmente o epítopo de TNF ou os epítopos responsáveis pela ligação ao receptor de TNF (doravante designados "antagonistas sequestrantes"). Um antagonista sequestrante pode ser, por exemplo, um anticorpo dirigido contra o TNF.

Alternativamente, os antagonistas de TNF podem inibir o percurso de sinalização do TNF activado pelo receptor da superfície celular após ligação do TNF (doravante designados "antagonistas de sinalização"). Ambos os grupos de antagonistas são úteis, quer sozinhos quer em conjunto, em combinação com um inibidor de IL-18, na terapia ou prevenção da doença vascular periférica.

Os antagonistas de TNF são facilmente identificados e avaliados pelo rastreio em rotina de candidatos quanto ao seu efeito na actividade de TNF nativo em linhagens celulares susceptíveis *in vitro*, por exemplo células B humanas, nas quais o TNF provoca proliferação e secreção de imunoglobulina. O ensaio contém a formulação de TNF a várias diluições do antagonista candidato, por exemplo desde 0,1 até 100 vezes a quantidade molar de TNF utilizado no ensaio, e controlos sem TNF ou apenas antagonista (Tucci *et al.*, 1992).

Os antagonistas sequestrantes são os antagonistas de TNF preferidos para serem utilizados de acordo com a presente invenção. Entre os antagonistas sequestrantes são preferidos os polipéptidos que ligam o TNF com afinidade

elevada e possuem imunogenicidade baixa. As moléculas do receptor de TNF solúveis e os anticorpos neutralizantes em relação ao TNF são particularmente preferidos. Por exemplo, o TNF-RI e TNF-RII solúveis são úteis na presente invenção. As formas truncadas destes receptores, compreendendo os domínios extracelulares dos receptores ou partes funcionais destes, são antagonistas mais particularmente preferidos de acordo com a presente invenção. Receptores de TNF de tipo I e tipo II, solúveis, truncados são descritos, por exemplo, na EP914431.

As formas truncadas dos receptores de TNF são solúveis e foram detectadas na urina e soro como proteínas de ligação inibidoras de TNF com 30 kDa e 40 kDa, as quais são designadas TBPI e TBPII, respectivamente (Engelmann *et al.*, 1990). De acordo com a invenção é preferida a utilização simultânea, sequencial ou separada do inibidor de IL-18 com o antagonista de TNF.

Noutra forma de realização preferida, o TNF-RI humano solúvel (TBPI) é o antagonista de TNF a ser utilizado de acordo com a invenção. As moléculas de receptor de TNF solúveis naturais e recombinantes, e os métodos para a sua produção foram descritos nas Patentes Europeias EP 308 378, EP 398 327 e EP 433 900.

Os derivados, fragmentos, regiões e porções biologicamente activas das moléculas receptores que se assemelhem funcionalmente às moléculas de receptor também podem ser utilizados na presente invenção. Este equivalente ou derivado biologicamente activo da molécula de receptor refere-se à porção do polipéptido, ou da sequência que codifica a molécula de receptor, que é de tamanho

suficiente e capaz de ligar o TNF com uma afinidade tal que é inibida ou bloqueada a interacção com o receptor de TNF ligado à membrana.

O inibidor de IL-18 pode ser utilizado simultânea, sequencial ou separadamente com o inibidor de TNF.

Noutra forma de realização preferida da presente invenção, o inibidor de IL-18 é utilizado numa quantidade de cerca de 0,01 até 100 mg/kg ou de cerca de 1 até 10 mg/kg ou 2 até 5 mg/kg.

O inibidor de IL-18 de acordo com a invenção é preferencialmente administrado por via sistémica, e preferencialmente por via subcutânea ou intramuscular. Ele pode ser administrado diariamente, ou dia sim, dia não. As formulações de libertação prolongada tornam possível uma administração menos frequente, tal como, por exemplo, uma vez por semana.

A invenção refere-se ainda à utilização de um vector de expressão compreendendo a sequência de codificação de um inibidor de IL-18 na preparação de um medicamento para a prevenção e/ou tratamento de uma doença vascular periférica. Assim, é considerada uma abordagem de terapia de genes para administrar o inibidor de IL-18 ao sítio em que é necessário. A fim de tratar e/ou prevenir a doença vascular periférica, o vector de terapia de genes compreendendo a sequência de um inibidor de IL-18 pode ser injectado, por exemplo, directamente no tecido doente, evitando assim problemas envolvidos na administração sistémica de vectores de terapia de genes, como a diluição

dos vectores, a necessidade de atingir e visar as células ou tecidos alvo, e os efeitos secundários.

De acordo com a invenção, é também contemplada a utilização de um vector para induzir e/ou melhorar a produção endógena de um inibidor de IL-18 numa célula normalmente silenciosa relativamente à expressão de um inibidor de IL-18, ou a qual expressa quantidades do inibidor que não são suficientes. O vector pode compreender sequências reguladoras funcionais nas células desejadas para expressar o inibidor ou IL-18. Estas sequências reguladoras podem ser, por exemplo, promotores ou intensificadores. A sequência reguladora pode ser depois introduzida no local certo do genoma por recombinação homóloga, ligando assim operacionalmente a sequência reguladora com o gene, cuja expressão se pretende induzir ou intensificar. A tecnologia é geralmente referida como "Activação de Gene Endógeno" (EGA), e é descrita, por exemplo, na WO 91/09955.

Será compreendido pelo especialista na técnica que também é possível parar directamente a expressão de IL-18, sem utilizar um inibidor de IL-18, com a mesma técnica. Para o fazer, um elemento de regulação negativo, como por exemplo um elemento de silenciamento, pode ser introduzido no local do gene da IL-18, originando assim uma regulação negativa ou prevenção da expressão da IL-18. O especialista na técnica compreenderá que essa regulação negativa ou silenciamento da expressão da IL-18 tem o mesmo efeito que a utilização de um inibidor de IL-18 para prevenir e/ou tratar a doença.

A invenção refere-se ainda à utilização de uma célula que foi geneticamente modificada para produzir um inibidor de

IL-18 no fabrico de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de uma doença vascular periférica.

O inibidor de IL-18 a ser utilizado de acordo com a presente invenção pode ser preferencialmente administrado como uma composição farmacêutica, opcionalmente em combinação com uma quantidade terapeuticamente eficaz de um inibidor de TNF ou outro fármaco activo no tratamento ou prevenção de uma doença vascular periférica.

A IL-18BP e as suas isoformas, proteínas mutadas, proteínas fundidas, derivados funcionais, fracções activas ou derivados permutados circularmente como descritos acima são os ingredientes activos preferidos das composições farmacêuticas.

A definição de “farmaceuticamente aceitável” pretende abranger qualquer veículo, que não interfira com a eficácia da actividade biológica do ingrediente activo e que não seja tóxico para o hospedeiro ao qual é administrado. Por exemplo, para administração parentérica, a(s) proteína(s) activa(s) pode(m) ser formulada(s) numa forma de dosagem unitária para injeção em veículos tais como soro fisiológico, solução de dextrose, albumina de soro e solução de Ringer.

Os ingredientes activos da composição farmacêutica de acordo com a invenção podem ser administrados a um indivíduo numa variedade de modos. As vias de administração incluem as vias intradérmica, transdérmica (por exemplo, em formulações de libertação lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutânea, oral, intracraniana, epidural, tópica e intranasal. Pode ser

utilizada qualquer outra via de administração terapêuticamente eficaz, por exemplo absorção através dos tecidos epitelial ou endotelial ou por terapia de genes em que é administrada ao doente uma molécula de ADN que codifica o agente activo (por exemplo, via um vector), a qual faz com que o agente activo seja expressado e segregado in vivo. Além disso, a(s) proteína(s) de acordo com a invenção podem ser administradas em conjunto com outros componentes de agentes biologicamente activos tais como tensioactivos, excipientes, portadores, diluentes e veículos farmacêuticamente aceitáveis.

Para administração parentérica (por exemplo intravenosa, subcutânea, intramuscular), a(s) proteína(s) activa(s) podem ser formuladas como uma solução, suspensão, emulsão ou pó liofilizado em associação com um veículo parentérico farmacêuticamente aceitável (por exemplo água, soro fisiológico, solução de dextrose) e aditivos que mantêm a isotonicidade (por exemplo, manitol) ou estabilidade química (por exemplo, conservantes e tampões). A formulação é esterilizada por técnicas comumente utilizadas.

A biodisponibilidade da(s) proteína(s) activa(s) de acordo com a invenção também pode ser melhorada utilizando procedimentos de conjugação que aumentam a semivida da molécula no corpo humano, por exemplo, através da ligação da molécula a polietileno glicol, como descrito no Pedido PCT de Patente WO 92/13095.

As quantidades terapêuticamente eficazes da(s) proteína(s) activa(s) serão uma função de muitas variáveis, incluindo o tipo de antagonista, a afinidade do antagonista para a IL-18, qualquer actividade citotóxica residual exibida

pelos antagonistas, a via de administração, o estado clínico do doente (incluindo a intenção de manter um nível não tóxico de actividade endógena de IL-18).

Uma “quantidade terapeuticamente eficaz” é tal que quando administrada, o inibidor de IL-18 origina a inibição da actividade biológica da IL-18. A dosagem administrada, como doses simples ou múltiplas, a um indivíduo variará em função de uma variedade de factores, incluindo as propriedades farmacocinéticas do inibidor de IL-18, a via de administração, as condições e características do doente (género, idade, peso corporal, estado de saúde, tamanho), extensão dos sintomas, tratamentos concorrentes, frequência de tratamento e o efeito desejado. O ajuste e manipulação das gamas de dosagem estabelecidas estão bem dentro da aptidão dos especialistas na técnica, bem como os métodos in vitro e in vivo de determinação da inibição da IL-18 num indivíduo.

De acordo com a invenção, o inibidor de IL-18 é utilizado numa quantidade de cerca de 0,001 até 100 mg/kg ou cerca de 0,01 até 10 mg/kg de peso corporal, ou cerca de 0,1 até 5 mg/kg de peso corporal ou cerca de 1 até 3 mg/kg de peso corporal ou cerca de 2 mg/kg de peso corporal.

A via de administração que é preferida de acordo com a invenção é a administração pela via subcutânea. A administração intramuscular é mais preferida de acordo com a invenção. A fim de administrar o inibidor de IL-18 directamente no local de acção, é também preferido administrá-lo por via tópica.

Noutras formas de realização preferidas, o inibidor de IL-18 é administrado diariamente ou dia sim, dia não.

As doses diárias são geralmente dadas em doses divididas ou na forma de libertação prolongada eficaz para se obter os resultados desejados. A segunda administração ou as administrações subsequentes podem ser realizadas a uma dosagem que é igual, menor ou maior do que a dose inicial ou anteriormente administrada ao indivíduo. Uma segunda ou outra administração subsequente pode ser administrada durante ou antes do aparecimento da doença.

De acordo com a invenção, o inibidor de IL-18 pode ser administrado profiláctica ou terapêuticamente a um indivíduo antes, simultânea ou sequencialmente com outros regímenes ou agentes terapêuticos (por exemplo, regímenes farmacológicos múltiplos), numa quantidade terapêuticamente eficaz, em particular com um inibidor de TNF e/ou outro agente protector vascular. Os agentes activos que são administrados simultaneamente com outros agentes terapêuticos podem ser administrados na mesma ou em composições diferentes.

A invenção refere-se ainda a um método de preparação de uma composição farmacêutica compreendendo misturar uma quantidade eficaz de um inibidor de IL-18 e/ou um antagonista de TNF com um veículo farmacêuticamente aceitável.

É descrito um método de tratamento de uma doença vascular periférica, compreendendo a administração de uma quantidade farmacêuticamente eficaz de um inibidor de IL-18, opcionalmente em combinação com uma quantidade

farmaceuticamente eficaz de um antagonista de TNF, a um doente necessitado daquele.

Tendo agora descrito completamente esta invenção, será compreendido pelos especialistas na técnica que a mesma pode ser realizada dentro de uma gama lata de parâmetros, concentrações e condições equivalentes sem que se saia do espírito e âmbito da invenção e sem experimentação excessiva.

A referência a passos de métodos conhecidos, passos de métodos convencionais, métodos conhecidos ou métodos convencionais não é de modo algum um reconhecimento de que qualquer aspecto, descrição ou forma de realização da presente invenção seja descrito, ensinado ou sugerido na técnica relevante.

A descrição precedente de formas de realização específicas revela de modo tão completo a natureza geral da invenção que outros podem, aplicando o conhecimento dentro da perícia na técnica (incluindo o conteúdo das referências aqui citadas), modificar e/ou adaptar facilmente tais formas de realização específicas para várias aplicações, sem experimentação excessiva, e sem se sair do conceito geral da presente invenção. Portanto, tais adaptações e modificações estão dentro do significado e gama de equivalentes das formas de realização descritas, com base nos ensinamentos e orientações aqui apresentadas. Entender-se-á que a fraseologia ou terminologia aqui utilizada é para efeitos de descrição e não de restrição, pelo que a terminologia ou fraseologia da presente especificação deve ser interpretada pelo especialista à luz dos ensinamentos e

orientações aqui apresentados, em combinação com o conhecimento de um técnico médio na matéria.

EXEMPLOS

Exemplo 1: A inibição da IL-18 reduz a isquemia periférica

Métodos:

Introdução de isquemia na pata posterior

Ratos C57BL/6J machos (Iffa Credde, Lyon, França) foram submetidos a cirurgia para induzir isquemia das patas posteriores. Os animais foram anestesiados por inalação de isoflurano. A constrição foi efectuada na artéria femoral direita, 0,5 cm proximal à bifurcação das artérias safena e poplítea. Os ratinhos (7 animais por grupo) foram depois alojados em condições específicas isentas de agentes patogénicos durante 3 ou 28 dias. A fim de examinar a função da IL-18BP na angiogénese induzida por isquemia, um grupo de ratos foi injectado com 60 µg do plasmídeo de expressão de IL-18BP murídeo, pcDNA3-mIL18BP em ambos os músculos tibial cranial, como anteriormente descrito (Mallat et al., 2001). Os ratos de controlo foram injectados com a mesma dosagem do plasmídeo de controlo vazio. Foram fornecidos impulsos eléctricos transcutâneos (8 impulsos eléctricos de onda quadrada de 200 V/cm, duração de 20 ms a 2 Hz) por um electropulsador PS-15 (Genetronics) utilizando dois eléctrodos de placa em aço inoxidável, colocados 4,2 a 5,3 mm afastados um do outro, em cada lado da perna. Esta estratégia foi utilizada porque foi anteriormente demonstrado que ela aumenta os níveis de IL-18BP no plasma, diminui a actividade da IL-18 no plasma

e inibe o desenvolvimento e progressão da placa aterosclerótica (Mallat *et al.*, 2001).

Quantificação da Angiogénese

Microangiografia

A densidade de vasos sanguíneos foi avaliada por microangiografia de alta definição no final do período de tratamento, como anteriormente descrito (Silvestre *et al.*, 2000; Silvestre *et al.*, 2001). Resumidamente, os ratos foram anestesiados (inalação de isoflurano) e foi injectado um meio de contraste (sulfato de bário, 1 g/mL) através de um cateter introduzido na aorta abdominal. As imagens (3 por animal) adquiridas por um transdutor de raios X digital foram montadas para se obter uma imagem completa dos membros posteriores. A densidade de vasos sanguíneos foi exprimida como uma percentagem de pixels por imagem ocupados por vasos sanguíneos na área de quantificação. Uma zona de quantificação foi delineada pelo local da constrição na artéria femoral, o joelho, o bordo do fémur e o limite externo da pata.

Densidade capilar

A análise microangiográfica foi concluída pela avaliação das densidades capilares em músculos isquémicos e não isquémicos, como anteriormente descrito (Silvestre *et al.*, 2000; Silvestre *et al.*, 2001). Secções de tecido congelado (7 μ m) foram incubadas com anticorpo monoclonal de ratazana dirigido contra CD31 (20 μ g/mL, Pharmingen) para identificar capilares. As revelações imunológicas foram visualizadas utilizando sistemas de avidina-biotina

peroxidase de rábano silvestre (estojo Vectastain ABC elite, Vector Laboratories). As densidades capilares foram calculadas em campos aleatoriamente escolhidos de área definida, utilizando o software Histolab (Microvision).

Imagiologia de Perfusão por Laser Doppler

A fim de proporcionar evidência funcional das alterações induzidas pela isquemia na vascularização foram realizadas experiências de Imagiologia de Perfusão por Laser Doppler, como anteriormente descrito (Silvestre et al., 2000; Silvestre et al., 2001). Resumidamente, os pêlos em excesso foram retirados da pata com um creme depilatório antes da imagiologia, e os ratos foram colocados numa placa de aquecimento a 37 °C para minimizar a variação de temperatura. Mesmo assim, para corrigir para variáveis, incluindo luz e temperatura ambiente, a perfusão calculada foi expressa como uma razão da pata isquêmica em relação à pata não isquêmica.

Análise Estatística

Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. Foi utilizada a análise de variância ANOVA unifactorial para comparar cada parâmetro. Foram em seguida efectuadas comparações utilizando o teste t post-hoc de Bonferonni para identificar que diferenças de grupo contribuem para a ANOVA global significativa. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

Resultados:

Microangiografia

No dia 3, as razões de índice angiográfico das patas isquémica/não isquémica não estavam afectadas, em qualquer um dos grupos (Fig. 1). Pelo contrário, no dia 28, o índice angiográfico mostrou um aumento de 1,6 vezes em ratos tratados com IL-18BP em comparação com os controlos ($p < 0,01$).

Densidade capilar

Os dados microangiográficos foram confirmados através da análise da densidade capilar após revelação com CD31. No dia 28, a densidade capilar da pata isquémica de ratos de controlo era inferior à da pata não isquémica (415 ± 31 contra 688 ± 42 vasos/ mm^2 , $p < 0,01$). No entanto, a densidade capilar da pata isquémica de ratos tratados com IL-18BP era significativamente superior (aumento de 1,4 vezes) à dos ratos de controlo (588 ± 48 contra 415 ± 31 vasos/ mm^2 , respectivamente, $p = 0,01$) e não diferiam do nível observado na pata não isquémica.

Imagiologia de perfusão por laser doppler

As determinações microangiográficas e de densidade capilar estavam associadas a alterações na perfusão sanguínea. Houve uma recuperação do débito sanguíneo das patas posteriores tanto nos ratos tratados como nos ratos não tratados. No entanto, nos ratos tratados com IL-18BP, foi evidente um maior aumento no débito sanguíneo (perfusão do pé) no dia 28 em comparação com os animais de controlo (1,5 vezes, $p < 0,01$, Figura 2).

Exemplo 2: Regulação do nível das proteínas VEGF, fosfo-Akt e eNOS

Método:

A expressão de VEGF, fosfo-Akt e eNOS (proteína óxido nítrico-sintase endotelial) foi determinada por transferência de western nas patas isquêmica e não isquêmica, como anteriormente descrito (Silvestre *et al.*, 2000; Silvestre *et al.*, 2001).

Resultados:

VEGF. No dia 3, não foram observadas nenhuma alteração no nível da proteína VEGF entre as patas isquêmica e não isquêmica, em qualquer um dos grupos. No dia 28, nos ratos de controle, o teor de proteína VEGF tendeu a aumentar na pata isquêmica quando comparada com a não isquêmica, mas esse aumento não teve significância estatística. Pelo contrário, o nível de proteína VEGF da pata isquêmica estava acentuadamente regulada positivamente em 120% nos ratos tratados com IL-18BP em comparação com os controles ($p < 0,05$) (Figura 3).

Fosfo-Akt. No dia 3, o nível de proteína fosfo-Akt estava inalterado em patas posteriores isquêmicas e não isquêmicas, qualquer que fosse o tratamento. No dia 28, nos ratos de controle, o teor de proteína fosfo-Akt estava aumentado em 60% na pata posterior isquêmica em relação ao da não isquêmica ($p < 0,01$). Este aumento no teor de fosfo-Akt da pata isquêmica duplicou em ratos tratados com IL-18BP (110% de aumento, $p < 0,05$ em comparação com o aumento na pata isquêmica de ratos de controle) (Figura 4).

eNOS. No dia 3, o teor de proteína eNOS estava inalterado em patas isquémicas ($107 \pm 8\%$ contra $103 \pm 24\%$) e patas não isquémica ($100 \pm 12\%$ contra $94 \pm 21\%$) para animais de controlo e tratados com IL-18BP, respectivamente. No dia 28, nos ratos de controlo, os níveis de eNOS estavam aumentados em 55% na pata isquémica em relação à não isquémica ($155 \pm 8\%$ contra $100 \pm 11\%$, respectivamente, $p < 0,05$). Um tal aumento não foi afectado pelo tratamento com IL-18BP ($160 \pm 12\%$, $P = 0,61$ contra o controlo isquémico).

Exemplo 3: Efeito da IL-18BP em EPC (Células progenitoras endoteliais)

Métodos:

Análise por Citometria de Fluxo

Julga-se que as células EPC sejam derivadas de células progenitoras hematopoiéticas Sca-1-positivas (Takahashi *et al.*, 1999). A percentagem de células mononucleares que expressam a proteína marcadora de EPC, Sca-1, foi então determinada por citometria de fluxo. Sete dias após isquemia, as células mononucleares foram isoladas de sangue periférico (300 μL) e da medula óssea de ratos tratados com o plasmídeo pcDNA3 vazio ou o plasmídeo pcDNA3-mIL18BP ($n=5$ por grupo). As células de medula óssea foram obtidas lavando as tíbias e os fémures. As células mononucleares de baixa densidade foram isoladas por centrifugação de gradiente de densidade com Ficoll. As células mononucleares foram depois incubadas com anticorpos monoclonais contra a Sca-1 conjugados com isotiocinato de fluoresceína (FITC)

(D7, BD Pharmingen). Anticorpos de isotipo idêntico serviram de controles.

Ensaio de Diferenciação de EPC

Imediatamente após isolamento, 5.10^6 células mononucleares derivadas de medula óssea também foram aplicadas em placas de cultura de células de 35 mm revestidas com vitronectina de plasma de ratazana (Sigma) e gelatina (0,1%) e mantidas em meio basal endotelial (EBM2, Bio whittaker). Após 4 dias em cultura, as células não aderentes foram removidas e as células aderentes sofreram análise imunoquímica.

A fim de detectar a captação de lipoproteína de baixa densidade acetilada, marcada com 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (AcLDL-Dil), as células foram incubadas com AcLDL-Dil (Tebu) a 37 °C durante 1 hora. As células foram depois fixadas com 2% de paraformaldeído, incubadas com um anticorpo policlonal de coelho primário dirigido contra o factor de von-Willbrand (vWF) (DAKO) durante 1 hora, e com anticorpo monoclonal anti-IgG (H+L) de coelho marcado com FITC durante 30 min (Coulter). As células reveladas duplamente positivas para AcLDL-Dil e vWF foram consideradas como sendo EPC, e foram contadas por poço. Três investigadores independentes avaliaram o número de EPC por poço contando três campos de potência elevada seleccionados aleatoriamente. Os resultados são depois exprimidos como percentagem do número total de células mononucleares.

Resultados:

Julga-se que as EPC sejam derivadas de células mononucleares Sca-1 positivas (Takahashi *et al.*, 1999). A percentagem de células mononucleares Sca-1 positivas no sangue periférico permaneceu inalterada em ratos tratados com IL-18BP em comparação com os animais de controlo ($31,5 \pm 13\%$ contra $28,5 \pm 13\%$, respectivamente). De modo semelhante, o número total de células mononucleares Sca-1 positivas isoladas de medula óssea não diferiram entre ratos tratados com IL-18BP e animais de controlo ($4,35 \pm 0,95\%$ contra $5,87 \pm 0,22\%$, respectivamente). Além disso, o tratamento com IL-18BP não afectou o número total de células mononucleares no sangue periférico ou medula óssea (dados não apresentados).

As EPC foram isoladas e cultivadas a partir de células mononucleares de medula óssea e caracterizadas como células duplamente reveladas positivas para AcLDL-Dil e vWF. A percentagem de células com revelação positiva dupla foi praticamente indetectável em animais não isquémicos ($<5\%$, $n=4$). A isquemia induziu um aumento acentuado na percentagem de células com revelação positiva dupla para AcLDL-Dil e vWF ($48 \pm 3\%$, $p < 0,001$ contra animais não isquémicos). Um tal efeito foi ainda aumentado por tratamento com IL-18BP ($48 \pm 3\%$ nos controlos contra $85 \pm 2\%$ em ratos tratados com IL-18BP, $p < 0,001$) (Figura 5). Assim, o tratamento com IL-18BP parece estimular a diferenciação de células mononucleares em EPC em vez de aumentar o número de células progenitoras em circulação.

REFERÊNCIAS

1. Buggemann et al., Eur. J. Immunol. 21:1323-1326 (1991)
2. DiDonato, J A, Hayakawa, M, Rothwarf, D M, Zandi, E e Karin, M. (1997). Nature 388, 16514-16517.
3. Elliott, M. J., Maini, R. N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H., e Woody, J. N., 1994, Lancet 344, 1125-1127.
4. Engelmann, H., Novick, D., e Wallach, D., 1990, J. Biol. Chem. 265, 1531-1536.
5. Grantham (1974), Science, 185. 862-864.
6. Kim S H, Eisenstein M, Reznikov L, Fantuzzi G, Novick D, Rubinstein M, Dinarello C A. Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97:1190-1195.
7. Kim S H et al., J. Immuno. 2001, 166, pp. 148-154.
8. Knight D M, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallan B, Moore M A, Vilcek J, Daddona P, et al. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. Mol Immunol 1993 November 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. e

- Jakobovits, A. (1997). "Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice". *Nature Genetics*, 15, 146-56.
12. Nakamura, K, Okamura, H, Nagata, K e Tamura, T. (1989). *Infect. Immun.* 57, 590-595.
 13. Novick, D, Kim, S-H, Fantuzzi, G, Reznikov, L, Dinarello, C, e Rubinstein, M (1999). *Immunity* 10,127-136.
 14. Parnet, P, Garka, K E, Bonnert, T P, Dower, S K, e Sims, J E. (1996), *J. Biol. Chem.* 271, 3967-3970.
 15. Silvestre, J. S., Mallat Z, Duriez M, Tamarat R, Bureau M F, Scherman D, Duverger N, Branellec D, Tedgui A, Levy B I. 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 e Levy B I. 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., Magner, 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., Taniai, 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., e Zubler, R. H., 1992, J. Immunol. 148, 2778-2784.
21. Yoshimoto T, Takeda, K, Tanaka, T, Ohkusu, K, Kashiwamura, S, Okamura, H, Akira, S e Nakanishi, K (1998). J. Immunol. 161, 3400-3407.

Lisboa, 26 de Novembro de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um inibidor de IL-18 no fabrico de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de uma doença vascular periférica das extremidades, em que o inibidor de IL-18 é seleccionado de um inibidor da caspase-1 (ICE), um anticorpo contra a IL-18, um anticorpo contra qualquer uma das subunidades do receptor de IL-18 e uma proteína de ligação à IL-18, ou uma isoforma, proteína mutada, proteína fundida ou derivado funcional de uma proteína de ligação à IL-18 que inibe a actividade biológica da IL-18, compreendendo a proteína mutada uma ou mais substituições conservadoras de aminoácidos, compreendendo a proteína fundida uma fusão de imunoglobulina e estando o derivado funcional PEGuilado.
2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a doença vascular periférica é doença arterial periférica.
3. Utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a doença vascular periférica é a doença vascular periférica das extremidades inferiores.
4. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a doença vascular periférica das extremidades é acompanhada de claudicação.

5. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a doença vascular periférica é a doença de Buerger (Tromboangeíte Obliterante).
6. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a doença vascular periférica é isquemia periférica.
7. Utilização de acordo com a reivindicação 6, em que a isquemia periférica é a isquemia crítica de membros.
8. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a doença vascular periférica das extremidades é acompanhada de gangrena e/ou úlcera.
9. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a doença vascular periférica das extremidades é acompanhada de amputação de membro.
10. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o inibidor de IL-18 é um anticorpo dirigido contra a IL-18.
11. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o inibidor de IL-18 é um anticorpo dirigido contra o receptor α da IL-18.

12. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o inibidor de IL-18 é um anticorpo dirigido contra o receptor β da IL-18.
13. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 até 12, em que o anticorpo contra a IL-18 é um anticorpo humanizado ou humano.
14. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o inibidor de IL-18 está glicosilado em um ou mais sítios.
15. Utilização de um vector de expressão compreendendo a sequência de codificação de um inibidor de IL-18 na preparação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de uma doença vascular periférica das extremidades, em que o inibidor de IL-18 é seleccionado de um anticorpo contra a IL-18, um anticorpo contra qualquer uma das subunidades do receptor de IL-18 e uma proteína de ligação à IL-18, ou uma isoforma, proteína mutada ou proteína fundida de uma proteína de ligação à IL-18 que inibe a actividade biológica da IL-18, compreendendo a proteína mutada uma ou mais substituições conservadoras de aminoácidos e compreendendo a proteína fundida uma fusão de imunoglobulina.
16. Utilização de um vector de expressão para induzir e/ou intensificar a produção endógena de um inibidor de IL-18 numa célula na preparação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de uma doença vascular periférica das extremidades, em que o inibidor de

IL-18 é seleccionado de um anticorpo contra a IL-18, um anticorpo contra qualquer uma das subunidades do receptor de IL-18 e uma proteína de ligação à IL-18, ou uma isoforma, proteína mutada ou proteína fundida de uma proteína de ligação à IL-18 que inibe a actividade biológica da IL-18, compreendendo a proteína mutada uma ou mais substituições conservadoras de aminoácidos e compreendendo a proteína fundida uma fusão de imunoglobulina.

Lisboa, 26 de Novembro de 2008

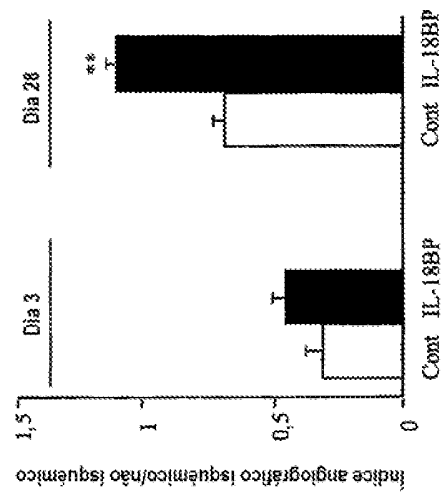
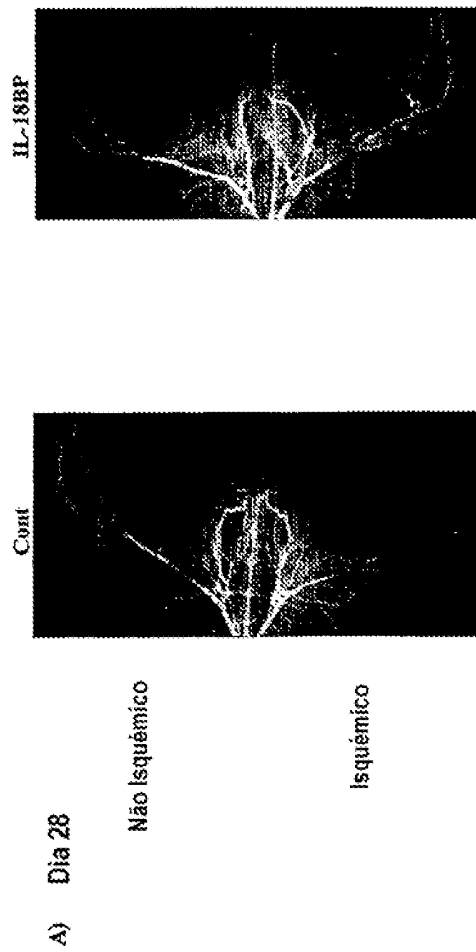


Fig. 1



B)

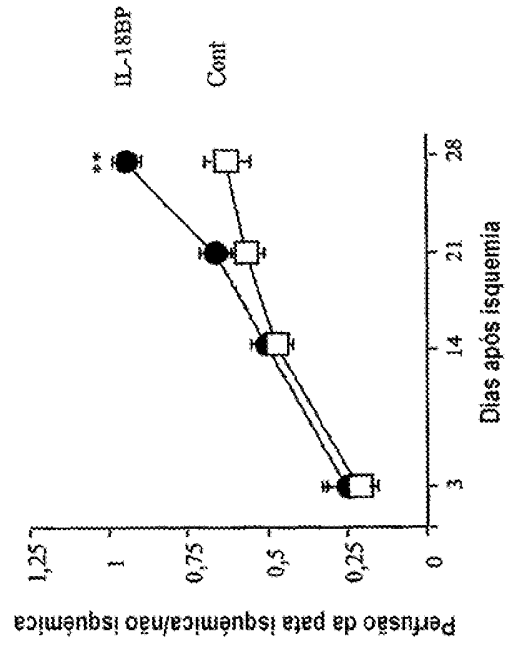


Fig. 2

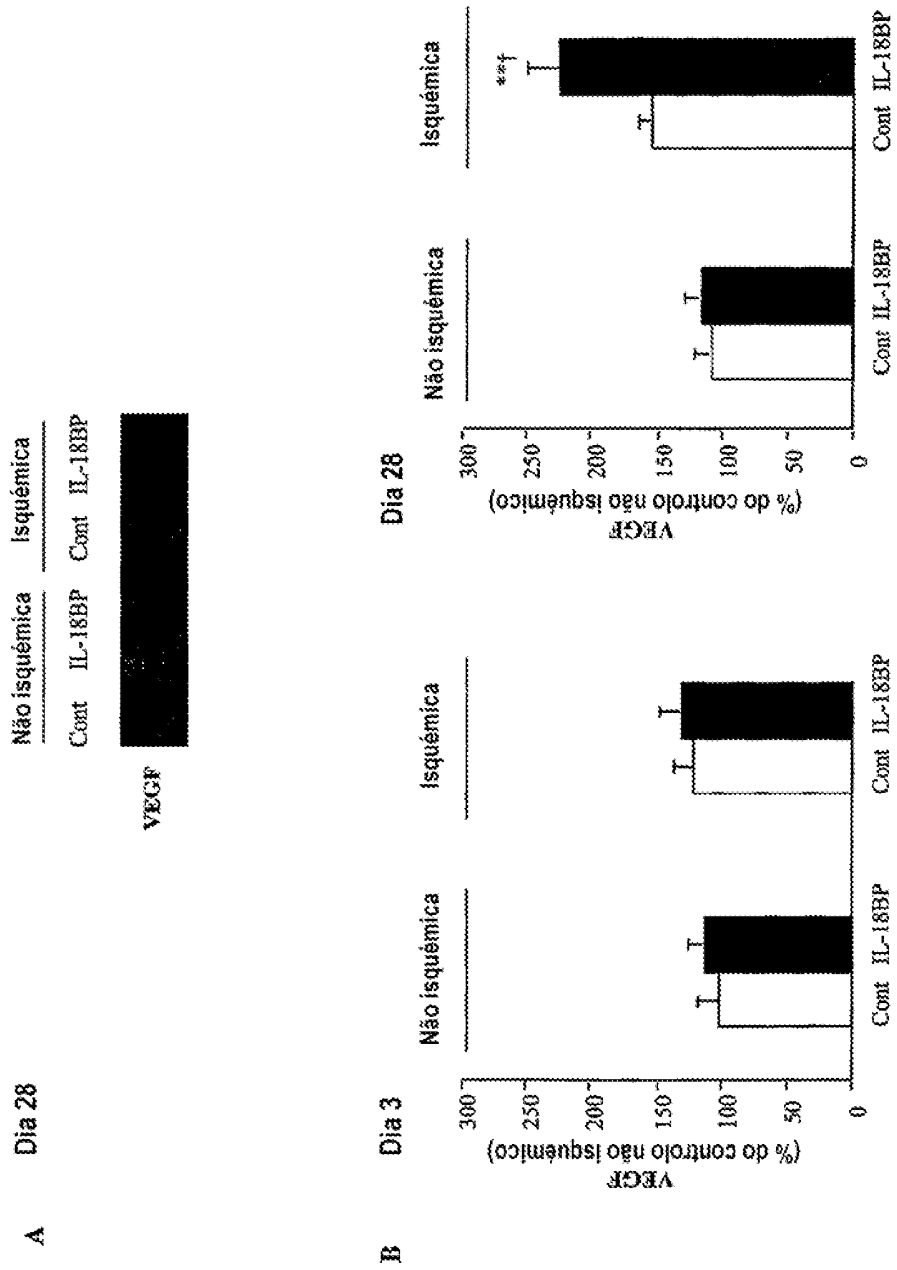


Fig. 3

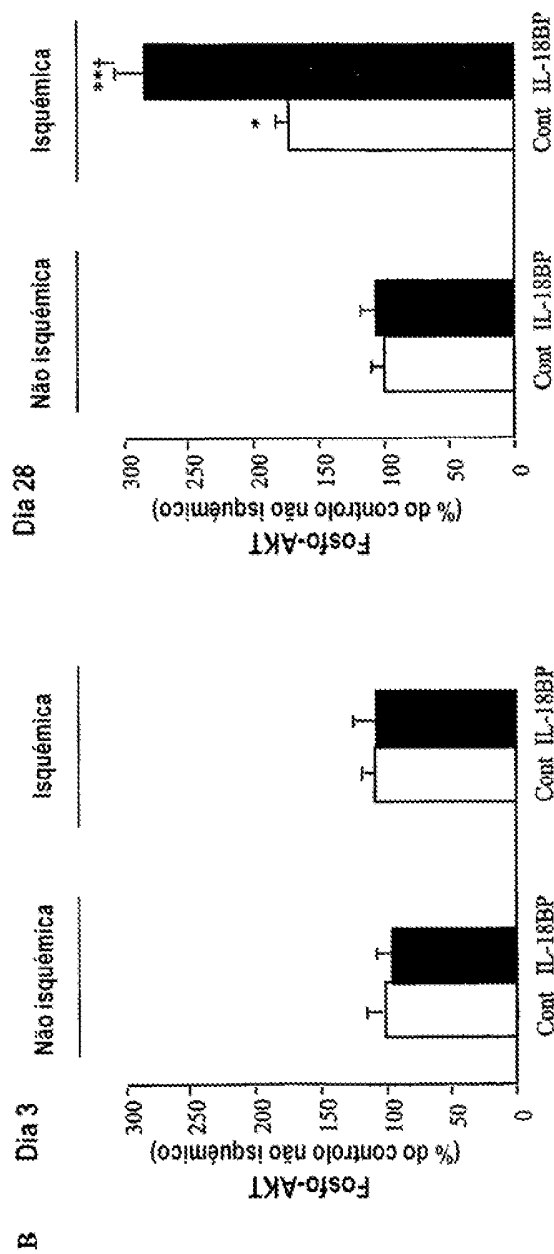
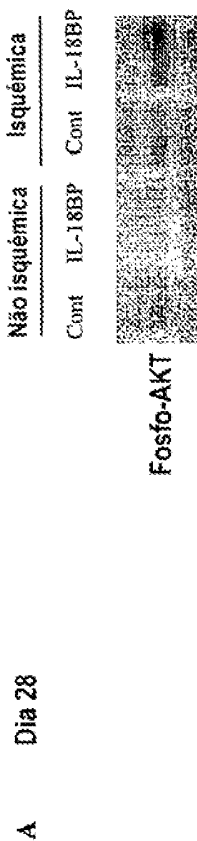


Fig. 4

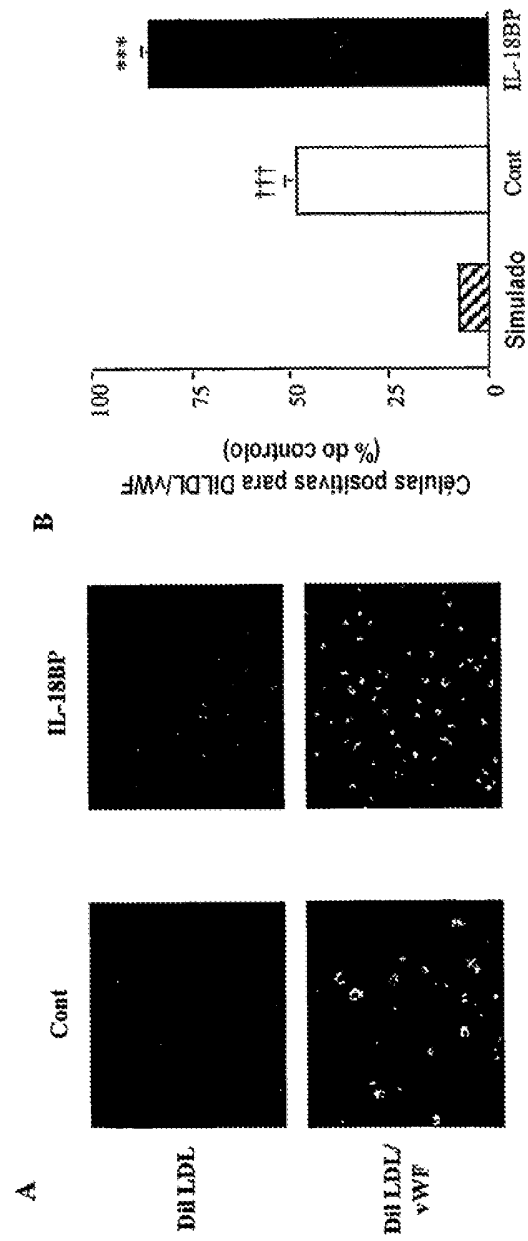


Fig. 5