

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03811651.0

A61P 9/10

A61K 48/00

A61K 47/48

A61K 39/395

A61K 38/17

//C07K14 : 715

[43] 公开日 2005 年 8 月 17 日

[11] 公开号 CN 1655845A

[22] 申请日 2003.3.13 [21] 申请号 03811651.0

[30] 优先权

[32] 2002. 3. 22 [33] EP [31] 02100290.2

[86] 国际申请 PCT/EP2003/050061 2003.3.13

[87] 国际公布 WO2003/080104 英 2003.10.2

[85] 进入国家阶段日期 2004.11.22

[71] 申请人 应用研究系统 ARS 股份公司

地址 荷属安的列斯群岛库拉索市

共同申请人 国家健康及医学研究院

[72] 发明人 Y·奇韦提克 A·特奇

Z·马勒特

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 周承泽

权利要求书 2 页 说明书 27 页 附图 5 页

[54] 发明名称 IL-18 抑制剂在治疗和/或预防周围
血管疾病中的用途

[57] 摘要

本发明涉及 IL-18 抑制剂在制备治疗和/或预防周围血管疾病的药物中的用途。本发明还涉及 IL-18 抑制剂在防止截肢中的用途。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. IL-18 抑制剂在制备治疗和/或预防周围血管疾病的药物中的用途。
2. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于, 所述周围血管疾病为周围动
5 脉疾病。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的用途, 其特征在于, 所述周围血管疾病为下
肢的周围血管疾病。
4. IL-18 抑制剂在制备治疗和/或预防跛行的药物中的用途。
5. 如上述任一权利要求所述的用途, 其特征在于, 所述周围血管疾病为
10 伯格氏病(血栓闭塞性血管炎)。
6. 如上述任一权利要求所述的用途, 其特征在于, 所述周围血管疾病为
周围缺血病。
7. 如权利要求 6 所述的用途, 其特征在于, 所述四肢缺血为危重四肢缺
血。
- 15 8. IL-18 抑制剂在制备治疗和/或预防坏疽和/或溃疡的药物中的用途。
9. IL-18 抑制剂在制备防止截肢的药物中的用途。
10. 如权利要求 1-9 中任一权利要求所述的用途, 其特征在于, 所述 IL-18
抑制剂选自: 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1 抑制剂(ICE), 抗 IL-18 的
抗体, 抗任何 IL-18 受体亚基的抗体, IL-18 信号途径抑制剂, 与 IL-18 竞
20 争和阻断 IL-18 受体的 IL-18 拮抗剂, 和 IL-18 结合蛋白, 或其抑制 IL-18
生物活性的同工型、突变蛋白、融合蛋白、功能衍生物、活性片段或者循环
重排衍生物。
11. 如权利要求 10 所述的用途, 其特征在于, IL-18 抑制剂是抗 IL-18
的抗体。
- 25 12. 如权利要求 10 所述的用途, 其特征在于, IL-18 抑制剂是抗 IL-18
受体 α 的抗体。
13. 如权利要求 10 所述的用途, 其特征在于, IL-18 抑制剂是抗 IL-18
受体 β 的抗体。
14. 如权利要求 10-13 中任一权利要求所述的用途, 其特征在于, 所述
30 的 IL-18 抗体是人源化抗体或人抗体。

15. 如权利要求 10 所述的用途，其特征在于，IL-18 抑制剂是 IL-18 结合蛋白，或其抑制 IL-18 生物活性的同工型、突变蛋白、融合蛋白、功能衍生物、活性片段或者循环重排衍生物。

16. 如上述任一权利要求所述的用途，其特征在于，所述 IL-18 抑制剂
5 在一个或多个位点是糖基化的。

17. 如权利要求 10 所述的用途，其特征在于，所述融合蛋白包括免疫球蛋白(Ig)融合蛋白。

18. 如权利要求 10 所述的用途，其特征在于，所述功能衍生物包括连
10 于一个或多个官能团的至少一个部分，而所述官能团是氨基酸残基的一个或多个侧链。

19. 如权利要求 18 所述的用途，其特征在于，所述部分是聚乙烯部分。

20. 一种包括 IL-18 抑制剂的编码序列的表达载体在制备治疗和/或预防周围血管疾病的药物中的用途。

21. 一种能诱导和/或增强 IL-18 抑制剂在细胞中内源性产生的表达载
15 体在制备治疗和/或预防周围血管疾病的药物中的用途。

22. 一种治疗周围血管疾病的方法，其特征在于，所述方法包括对有需要的宿主施用抑制有效量的 IL-18 抑制剂。

IL-18 抑制剂在治疗和/或预防周围血管疾病中的用途

5 技术领域

本发明属于血管疾病领域。更明确地说，它涉及 IL-18 抑制剂在治疗和/或预防周围血管疾病中的用途。本发明还涉及 IL-18 抑制剂在防止截肢中的用途。

10 发明背景

细胞因子白细胞介素 18(IL-18)最初被描述为 γ 干扰素(IFN- γ)的诱导因子(Nakamura 等人, 1989)。它是 T 淋巴细胞辅助细胞类型 1(TH1)应答的发展中的一个早期信号。IL-18 与 IL-12、IL-2、抗原、促分裂素以及可能的其他因子一起作用，从而诱导 IFN- γ 的产生。IL-18 还增强了 GM-CSF 和 IL-2
15 的生产，加强了由 anti-CD3 诱发的 T 细胞增殖，并且增加 Fas 介导的自然杀伤细胞的杀伤作用。

成熟的 IL-18 是通过 IL-1 β 转化酶(ICE, caspase-1)由它的前体产生。

IL-18 受体至少由两个在配体结合过程中共同起作用的组分(IL-18R α 和 IL-18R β)构成。在鼠 IL-12 刺激的 T 细胞中发现了 IL-18 的高亲和力与
20 低亲和力的结合位点(Yoshimoto 等人, 1998)，这暗示了是一个多重的链受体复合物。迄今为止已被识别的两个受体亚基，都属于 IL-1 受体家族(Parnet 等人, 1996; Kim 等人, 2001)。IL-18 的信号转导涉及 NF- κ B 的激活(DiDonato 等人, 1997)。IL-18 的受体复合物由两个受体链构成：一个配体结合链被命名为 IL-18R α 链，而一个信号转导链被命名为 IL-18R β 链。IL-18R α 链最初
25 作为结合于放射性标记的 IL-18 上的细胞表面蛋白质而被分离的；该蛋白质被纯化，而它的氨基酸序列揭示与早先报告的一个名为 IL-1R-相关蛋白(IL-1Rrp)的孤儿受体(Torigoe 等人, 1997)有相同性。

最近，一与 IL-18 有高亲和性的可溶性蛋白质已从人尿液中被分离出来，并且人和小鼠的 cDNA 与人类的基因已被克隆(Norvick 等人, 1999;
30 W099/09063)。该蛋白质被称为 IL-18 结合蛋白(IL-18BP)。

IL-18BP 不是已知 IL-18 受体之一的胞外结构域，而是一个分泌的、自然状态下循环的蛋白。它属于一个新的分泌蛋白家族，该家族还包括数个痘病毒编码的蛋白质(Norvick 等人，1999)。来自尿的以及重组的 IL-18BP 都特异性地和高亲和力地与 IL-18 结合，并且调节 IL-18 的生物亲和力。

- 5 IL-18BP 基因位于人染色体 11q13，在一个 8.3kb 的基因组序列中没找到编码跨膜结构域的外显子。迄今为止，已经在人体中发现了由不同 mRNA 剪接而产生的 4 种 IL-18BP 剪接变异体或同工型。它们被命名为 IL-18BP a, b, c 和 d，都具有相同的 N 末端，但 C 末端有所不同(Norvick 等人，1999)。这些同工型结合于 IL-18 的能力有差异。在这四种之中，已知 hIL-18BP 同工型 a 和 c 具有中和 IL-18 的能力。人 IL-18BP 同工型可结合于鼠 IL-18。

- 10 周围血管疾病(peripheral vascular disorder)可以是动脉的(闭塞性或功能性)，静脉的，动静脉的(比如，动静脉瘘管)，或淋巴的疾病。闭塞性动脉疾病包括周围动脉闭塞和伯格氏病(又称血栓闭塞性血管炎)。功能性动脉疾病可以是血管痉挛(雷诺现象和疾病，肢端发绀症)或血管舒张(红斑性肢痛病)。它们可继发于血管的局部病变或继发于交感神经系统活性的紊乱，或可伴有器质性血管疾病。静脉疾病包括静脉血栓形成和静脉曲张，复合性动静脉疾病包括动静脉瘘管，而淋巴疾病包括淋巴水肿和脂血症(lipedema)。

周围动脉闭塞指末端的血供应受阻塞，通常是由动脉粥样斑块(动脉粥样化)、血栓或栓塞引起。

- 20 周围动脉闭塞可引起急性或慢性局部缺血。急性局部缺血是由破裂的近端动脉粥样斑块、由在先前的动脉硬化疾病基础上发生的急性血栓症、以及由心脏、大动脉或其他大血管的栓塞，或裂开的动脉瘤所引起的。慢性局部缺血由逐渐扩大的动脉粥样斑块引起。

- 25 血液高半胱氨酸的持续上升，通过破坏内皮细胞，从而使大动脉及其分支动脉、末端动脉、脑动脉以及还有可能冠状动脉易于提前发生动脉粥样硬化。虽然高半胱氨酸的水平提高通常与其他一些危险因素有关，但是它们可通过饮食和补充维生素 B 来改善。

动脉闭塞的临床综合病症依赖于所涉及的血管、阻塞的范围、闭塞发展的速度、以及侧支流量是否足够。

- 30 急性闭塞的病史包括突然发生四肢的剧烈疼痛、发冷、麻木、和苍白。四肢冷且无力，闭塞处远端的脉搏消失。急性闭塞会造成严重的缺血，表现

为感觉和运动机能的缺失并且最后(6-8 小时后)触诊可发现肌肉的触痛和硬化。

在慢性闭塞中，症状与组织缺血的隐性发展有关。最初的症状为间歇性跛行综合症。跛行的症状为疼、痛、抽筋或在步行时感觉疲劳。这些症状在小腿上最常见但也可能发生在足部、腿、髌部或臀部。

最后，缺血性疼痛会在休息时发生，在肢的最远端发生剧烈的、无休止的疼痛，这种疼痛可因海拔增加而加剧并且常常使人无法入睡。

动脉闭塞的程度和间歇性跛行综合症的位置紧密相连，比如，大动脉疾病经常造成臀部、髌部和小腿的跛行，而股动脉的脉搏下降或消失。在股腓(femoropopliteal)疾病中，跛行一般发生在小腿上，并且股动脉以下的所有脉搏全都消失。在有小血管疾病的病人中(比如，血栓闭塞性血管炎，糖尿病)，股腓脉搏可能还在，但足脉搏消失了。脚抬起 1 至 2 分钟后变苍白(根据情况可出现皮肤变红)，有助于确认动脉的供血不足。抬起后相关静脉的血液充填时间超过了正常的 15 秒限度。如果跛行症状发生时远端脉搏良好，就应该在鉴别诊断中考虑椎管狭窄的可能性。

严重缺血脚会又痛又冷，并时常麻木。在慢性的病例中，皮肤是干的且有鳞纹，指/趾甲和毛发生长得差。当局部缺血病情恶化，溃疡可能出现(一般在脚趾或脚后跟上，偶尔会在腿上)，尤其是局部外伤后。水肿通常不会出现，除非病人把腿固定在能靠的位置来减轻痛苦，然而，严重的缺血腿有可能会萎缩。更广泛的闭塞会危及组织活力，导致坏死或坏疽。缺血并伴有相关脚的皮肤发红、疼痛和肿与蜂窝织炎或静脉供血不足很相似。动脉的无创性测试能使诊断明朗化。

在所有周围血管疾病中，伯格氏病(血栓闭塞性血管炎)是一种闭塞性疾病，表现为小型和中型的动脉和静脉中的炎性变化。

伯格氏病发生在吸烟者中，绝大多数为 20 到 40 岁的男子。只有 5%的病例发生在女性身上。近年来，其诊断频率急剧下降，这是因为人们更好地理解了解了这种疾病与动脉硬化闭塞相比在临床和血管造影上的特征。

虽然病因不明，没有记录过在非吸烟者中发现的伯格氏病，这暗示吸烟是主要的致病因素，可能是延发型的超敏性或中毒性脉管炎。血栓闭塞性血管炎可能是特定表型的人对烟草的反应，因为有这种病的患者中有更高的 HLA-A9 和 HLA-B5 水平；或者是一种自身免疫疾病，其中对 I 和 III 型人胶

原有细胞介导的敏感性(胶原是血管的组成成分)。

与动脉硬化症不同，伯格氏病不涉及冠状动脉。

该疾病涉及小型和中型的动脉，并且经常以节段性模式涉及四肢的浅静脉。偶尔，在严重的疾病中，身体其他部位的血管也受影响。病理表现是非化脓性全身动脉炎或全身静脉炎，并有患病血管形成血栓。在急性损害中，发生内皮细胞的增殖和淋巴细胞渗入内膜层，但内部弹性薄层是完整的。血栓变得有组织的并随后不完全地再穿通。血管中层被很好地保持但可被成纤维细胞浸润。原因是外膜通常更广泛地被成纤维细胞所浸润，较早的病区显示出动脉外周的纤维化，这对相邻的静脉和神经也有影响。

- 10 症状和迹象是动脉缺血和表浅性血栓性静脉炎。发作是渐进的，从 upper 肢和下肢最远端的血管开始，并且向近端发展，在远端坏疽处达到顶峰。在疾病的客观症状表现出来之前，病人会抱怨发冷、麻木、麻刺和灼痛。雷诺现象是常见的。间歇性跛行综合症在相应的肢端发生(通常为足弓或腿，但很少为手，手臂或腿)。痛是持续的并伴随着更严重的缺血(如在坏疽之前的阶段)，
- 15 而且伴有溃疡和坏疽。通常地，交感神经的活性过度表现为发冷、出汗过度以及相关肢端变得青紫，这可能是由剧烈、持续的疼痛所引起。

局部缺血性溃疡和坏疽，通常有一个或多个的数字(digits)，会在疾病的早期发生但并不急性发作。无创伤性研究表明，在患病的脚趾、脚和手指上发生严重的血流量下降和血压下降。该疾病向近端发展。

- 20 另一种周围血管疾病是周围动脉疾病，其中下肢患周围动脉疾病(PAD)的病人会发展为严重的、威胁到四肢的局部缺血。缺血性休息痛、无法治愈的溃疡和坏疽都是坏结果的预兆。这些病人失去四肢的风险很高。对严重四肢缺血的及时检测、评估及随后有效的血管再形成，对于挽救四肢和保持全身健康是必需的。

- 25 慢性的危重四肢局部缺血是动脉闭塞疾病的最后结果，最常见的是动脉硬化症。除了与高血压、高胆固醇症、吸烟和糖尿病有关的动脉硬化症之外，导致慢性的危重四肢局部缺血的频率较低的病因包括伯格氏病、或血栓闭塞性血管炎以及某些形式的动脉炎。

- 慢性的危重局部缺血的发展通常需要多个位置的动脉闭塞，从而严重减少了流向组织的血流。危重组织缺血临床表现为休息痛、不可治愈的伤口(由于治愈伤口有更高的代谢需求)或组织坏死(坏疽)。
- 30

缺血性休息痛经典地被描述成在脚和脚趾的团块中的灼痛，当病人在夜里卧床时，疼痛更为明显。缺血性休息痛发生在足部，那里的组织离心脏最远并且位于动脉闭塞处的远端。不可治愈性伤口通常被发现在因穿鞋不合脚或受伤造成的足部创伤区域。通常如果一个伤口经历 4-12 周保守疗法(比如定期换药、避免创伤、治疗感染和清除坏死组织)的尝试之后，还没有起色的话，它就被认为是不可治愈的。

坏疽通常被发现在脚趾。当血流供应太低以致于在血液灌流最差的组织处自发地发生坏疽时，就会得坏疽。

虽然精心设计的保守疗法可以使很多危重四肢缺血患者受益，但是他们患的这种病的严重性可导致考虑手术介入。外科介入包括血管再造术或截肢术。如果病人愿意进行血管再造术并且是可接受的手术候选人，常常进行动脉造影术，以便为血管再造术作进一步的评估和计划。在一些医学中心，核磁共振血管造影术被用来作为动脉造影术的替代或补充，以便降低暴露于染料的风险。用血管造影术来保留四肢是有成效的，可以让大多数病人得到更好的生活质量，并且手术后的发病率和死亡率比截肢术更低。保留四肢应该是大多数慢性危重四肢局部缺血患者的目标。

血管再造术的可行性由动脉造影术发现的情况和旁路通道的可用性所决定。血管成形术或支架放置，或者两者，对于短小的、近端的损伤(比如那些跛行病人的损伤)是最成功的，但不可能是危重四肢缺血情况下所需的唯一治疗手段，因为动脉闭塞疾病有多级的特性。理想的旁路通道为大隐静脉，但其他通道包括小隐静脉、臂静脉或人工通道(prosthetic conduit)。在大多数手术操作中，小腿动脉的三年分流术明显率是从人工通道 40%到隐静脉通道的 85%。作为比较，对保守疗法的研究表明，其对不可治愈性伤口有 25-49%的成功率，以及对缺血性休息痛有 50-80%的改善率。

一些特定的病人可能需要初期的截肢术，例如那些患有不合适血管再造术的大面积组织坏死、威胁生命的感染或损伤的病人。决定是对病人症状进行紧密监控并且施以保守治疗，或是决定实施血管再造术或截肢术，都依赖于对手术与保守疗法相比所带来的风险和益处的仔细评估。

更为重要的是，它依赖于病人对可选方案的创伤性和适当性的理解。甚至一些因为他们的病情状况而不能行走的病人，也认为截肢术是不合适的，而且并不是所有病人都有动力来进行截肢术后康复所需的工作。如果决定进

行截肢术，截肢程度应该使治愈的可能性最大同时让病人有最大机会进行功能恢复。

对慢性危重四肢缺血的诊断包括：休息时显现的疼痛，不可治愈性伤口以及坏疽。缺血性休息痛通常被描述成在足弓或足部远端的灼痛，该疼痛发生在病人横卧时，但当病人回到足部下垂位置时疼痛缓解。支持诊断危重四肢缺血的客观血液动力学参数包括踝臂指数 ≤ 0.4 ，踝收缩压 $\leq 50\text{mm Hg}$ ，或者脚趾收缩压 $\leq 30\text{mm Hg}$ 。干预疗法可包括保守疗法、血管再造术或截肢术。进行性坏疽、迅速扩大的伤口或持续的缺血性休息痛，预示着威胁四肢，并且暗示那些不存在禁止性手术风险的病人有必要实施血管再造术。通常需要旁路移植物，因为危重四肢缺血中狭窄的动脉具有多级和远端的特性。糖尿病患者比其他病人更易患有不适合旁路移植治疗的远端疾病。与截肢术相比较，血管再造术更有成效，并且手术后的发病率和死亡率较低。保留四肢应该是大多数危重四肢缺血患者的目标。

目前，周围血管疾病的主要治疗方法包括创伤疗法，比如血管再造术或甚至截肢。鉴别出能刺激周围新血管形成同时不使动脉粥样硬化斑块恶化的药物，在本医药领域有重大的治疗重要性。

发明内容

本发明基于一个发现：在试验动物模型上诱发周围缺血后，IL-18 抑制剂可以刺激新血管形成。新血管形成的发生与 VEGF/Akt 信号的激活有关，并且伴随着骨髓内皮祖细胞的活动和分化的增多。

基于这些结果，提供了新的需要新血管形成或血管再造术的来治疗或预防周围血管疾病的治疗方法。

因此，本发明涉及用 IL-18 抑制剂来治疗和/或预防周围血管疾病的方法，特别是周围缺血症。

本发明进一步涉及 IL-18 抑制剂在制造治疗和/或预防跛行和坏疽的药物中的用途。

此外，本发明涉及 IL-18 抑制剂在制造防止截断(特别是截肢)的药物中的用途。

为了治疗或预防周围血管疾病，使用包括 IL-18 抑制剂的编码序列的表达载体，以及使用表达载体来诱导和/或增强细胞内 IL-18 抑制剂的内源产

生,也包括在本发明内。

本发明还涉及一种治疗周围血管疾病的方法,包括给予需要治疗的宿主抑制有效量的 IL-18 抑制剂。

5 附图简述

图 1 中的 A) 显示了在小鼠股动脉闭塞 3 天和 28 天后,典型的微血管造影术下的右边缺血性后肢和左边非缺血性后肢。B) 显示了接受了 pcDNA3-mIL18BP(IL-18BP) 或空质粒(对照)治疗 3 或 28 天的小鼠的缺血性/非缺血性的血管造影术的评分。数值为平均值 $\pm$ SEM,每个组 $n=7$ 。 $**p<0.01$,与对照小鼠相比。

图 2 显示了 A) 在用 pcDNA3-mIL18BP(IL-18BP) 或空质粒(对照)治疗的小鼠体内,用激光多普勒灌注成像法监测到的缺血所诱导的后肢血流改变。在彩色编码图像中,正常灌注用红色标出,后肢缺血造成的血流明显减少用蓝色标出。B) 是血流量的定量评估,用缺血性四肢的血流量与非缺血性四肢的血流量之比来表示。数值为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=7$ 。 $**p<0.01$,与对照小鼠相比。

图 3 显示了 A) 为在股动脉闭塞 28 天后,在非缺血性和缺血性腿中 VEGF 蛋白质含量的代表性 Western 印迹结果。B) 为 VEGF 蛋白水平的定量评估,用在缺血性四肢中蛋白质含量与非缺血性四肢中蛋白质含量之比来表示。数值为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=7$ 。与非缺血的对照相比 $**p<0.01$,并且与缺血的对照相比 $^{\dagger}p<0.05$ 。

图 4 显示了 A) 在股动脉闭塞 28 天后,在非缺血性和缺血性腿中磷酸-Akt 蛋白质(phospho-Akt protein)含量的代表性 Western 印迹结果。B) 是磷酸-Akt 蛋白水平的定量评估,用缺血性四肢中蛋白质含量与非缺血性四肢中蛋白质含量之比来表示。数值为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=7$ 。与非缺血的对照相比 $*p<0.05$, $**p<0.01$;与缺血的对照相比 $^{\dagger}p<0.05$ 。

图 5: A) 从没有股动脉结扎的小鼠(假对照)和用 pcDNA3-mIL18BP 治疗的小鼠(IL-18BP)或者用空质粒治疗的小鼠(对照)的骨髓中分离的 EPC(内皮祖细胞)的代表性图像。EPC 特征是粘附细胞,并且具有对 AcLDL-Dil 和 von-Willebrand 因子(vWF)的双阳性染色结果。B) 用 pcDNA3-mIL18BP 或空质粒进行治疗的小鼠中双阳性细胞的定量。数值为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

与对照相比*** $p < 0.001$, 与没有股动脉结扎的小鼠(假对照)相比^{†††} $p < 0.001$ 。

发明详述

5 本发明基于这样的发现: IL-18 抑制剂能在活体鼠科疾病模型中显著增加四肢缺血后的缺血后血管再形成, 并且不影响非缺血性四肢的血管密度。因此, 本发明提供了一种新治疗方法, 用来治疗或预防需要增强的组织灌注的周围血管疾病。

因此, 本发明涉及 IL-18 抑制剂在制造治疗和/或预防周围血管疾病的药物中的用途。

10 本发明上下文中的术语“预防”不仅指对特定病情的全面防止, 而且还包括对发病之前或疾病早期发作时病症的任何部分的或实质性的防止、减轻、减少、减缓或减弱。

本发明上下文中的术语“治疗”意指任何对病情发展的改善效果, 包括对疾病发作后病情发展的减轻、减少、减缓或减弱。

15 如本文所用, 术语“周围血管疾病”意指那些影响肢端的动脉、静脉、淋巴管的疾病或失调。周围血管疾病可以是动脉的(闭塞性或功能性)、静脉的、动静脉的(比如, 动静脉瘘管)、或淋巴的疾病。闭塞性动脉疾病包括周围动脉闭塞和血栓闭塞性血管炎。功能性动脉疾病可以是血管痉挛(雷诺现象和疾病, 肢端发绀症)或血管舒张(红斑性肢痛病)。它们可继发于血管的局部
20 病变或继发于交感神经系统活性的紊乱, 或可伴有器质性血管疾病。静脉疾病包括静脉血栓形成和静脉曲张, 复合性动静脉疾病包括动静脉瘘管, 而淋巴疾病包括淋巴水肿和脂血症。

术语周围血管疾病包括上面“发明背景”中所述的所有医学适应症、疾病、紊乱或者症状。

25 在本发明上下文中的术语“IL-18 抑制剂”, 意指任何调节 IL-18 的产生和/或活性的分子, 其调节使得 IL-18 的产生和/或活性被减缓、减少, 或部分地、实质性地或完全地被防止或阻断。

产生抑制剂是能负面影响 IL-18 的合成、加工或成熟的任何分子。根据本发明所提到的抑制剂可以是, 例如白细胞介素 IL-18 的基因表达的抑制物,
30 减少或防止 IL-18 mRNA 转录或者导致 mRNA 降解的反义 mRNAs, 妨碍正确折叠或者部分地或实质性防止 IL-18 分泌的蛋白质, 降解 IL-18 的蛋白酶(一旦

IL-18 被合成), 切割 pro-IL-18 以产生成熟 IL-18 的蛋白酶的抑制剂(如比如天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1 的抑制剂)等。

IL-18 活性抑制剂可以是例如 IL-18 拮抗剂。拮抗剂以足够的亲和力和特异性结合于或螯合(sequester)于 IL-18 分子本身,从而部分或基本上中和了 IL-18 或 IL-18 上的负责使 IL-18 结合于其配体(如结合于受体)的结合位点。拮抗剂也可以抑制 IL-18 信号路径, 该路径在 IL-18 和其受体结合之后在细胞内被激活。

IL-18 活性抑制剂也可以是可溶性的 IL-18 受体或模仿受体的分子, 或阻断 IL-18 受体的物质, 或 IL-18 抗体(如多克隆或单克隆抗体), 或能防止 IL-18 结合于其靶目标从而减轻或防止 IL-18 介导的细胞内或细胞外的反应的任何其他物质或分子。

在本发明的较佳实施例中, 周围血管疾病是周围动脉疾病。

“周围动脉疾病”是一种涉及从手臂到腿的主动脉和动脉的任何部位的动脉变窄的疾病。疾病的发作可以是突发的或渐进的, 并且通常导致局部缺血(血管供血区域的供氧减少)。

较佳地, 根据本发明, 周围动脉疾病涉及下肢。周围动脉疾病或闭塞可以是慢性的或急性的。周围动脉疾病通常与跛行有关。

因此, 本发明进一步涉及用 IL-18 抑制剂来治疗和/或预防跛行。跛行是腿部(尤其小腿)的疼痛, 疼痛的不断发作导致了跛行。通常跛行在走路时被感觉到, 而在休息时平息。因此, 它通常被称为间歇性跛行。这种常见的跛行疼痛的间歇性特征是因为对腿部肌肉供氧的暂时不足。不足的氧供应是给腿部供血的动脉变窄或闭塞所造成的。这样限制了对腿部肌肉的供氧并且当这些肌肉的氧需求因锻炼或行走而上升时特别容易被察觉。

在本发明的较佳实施例中, 周围血管疾病为血栓闭塞性血管炎(伯格氏病)。“伯格氏病”为一种闭塞性疾病, 特征是在小型和中型的动脉和静脉上的炎性改变, 通常在吸烟者中发生, 绝大多数是 20 到 40 岁的男性。

该疾病牵涉到小型和中型的动脉, 并且经常以节段性模式涉及四肢的浅静脉。

在另一个较佳实施例中, 周围血管疾病为周围性缺血, 尤其是四肢缺血。“缺血”是一种血供应不足, 通常由血管的闭塞或损伤所致。“周围性缺血”特别指在四肢(如手臂或腿)中的缺血, 从而导致相应四肢组织的供氧不足。

在本发明的另一较佳实施例中，这种四肢缺血是危重四肢缺血。“危重四肢缺血”是这样一种状态，即对四肢的血液供应太少了，以致于威胁到其存活。休息痛、溃疡或坏疽的出现就意味着危重四肢缺血。坏疽一词被用于描述坏死的组织，并且它通常作为四肢缺血所致结果而出现，或者伴随四肢缺血出现。缺血性溃疡是血供应不足所造成的。

危重四肢缺血(包括坏疽或溃疡)，需要实施血管再造术来避免截肢。因此，本发明还涉及用 IL-18 抑制剂来治疗和/或预防坏疽和溃疡。

周围血管疾病的最终后果(尤其是周围缺血)，可导致受到影响的四肢被截断，特别是患病的下肢或脚。血管再造术可以让患病组织重新接受血液供应，因而有助于治愈过程。

因此，本发明进一步涉及用 IL-18 抑制剂来制造用于预防截肢(尤其是下肢、脚或脚趾)的药物。

在本发明的一个较佳实施例中，IL-18 抑制剂选自：天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1(caspase-1)抑制剂(ICE)，针对 IL-18 的抗体，针对任何 IL-18 受体亚基的抗体，IL-18 信号途径的抑制剂，与 IL-18 竞争和阻断 IL-18 受体的 IL-18 拮抗剂，和 IL-18 结合蛋白，或其抑制 IL-18 生物活性的同工型、突变蛋白、融合蛋白、功能衍生物、活性片段或者循环重排衍生物(circularly permuted derivatives)。

如本文所用，术语“IL-18 结合蛋白”与“IL-18 结合蛋白质”或“IL18BP”的意义相同。它包括 W099/09063 或 Novick 等人(1999)中所定义的 IL-18 结合蛋白，包括 IL-18 结合蛋白的剪接变异体和/或同工型(如 Kim 等人，2000 所定义的那样)，它们结合于 IL-18。具体地，IL-18BP 的人同工型 a 和 c 可用于本发明。根据本发明有用的蛋白质可以是糖基化的或非糖基化的，它们可衍生自天然原料(如尿液)，或者较佳地是重组产生的。重组表达可以是在原核表达系统(如大肠杆菌)，或在真核表达系统中进行，并且较佳地在哺乳动物表达系统中进行。一种特别适合表达哺乳动物蛋白的细胞株为中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。

如本文所用，术语“突变蛋白”是指 IL-18BP 的类似物或者病毒性 IL-18BP 的类似物，其中天然 IL-18BP 或病毒性 IL-18BP 的一个或多个氨基酸残基被不同的氨基酸残基所替代，或被缺失，或者一个或多个氨基酸残基被插入 IL-18BP 或者病毒性 IL-18BP 的天然序列中，并且与野生型 IL-18BP 或病毒

性 IL-18BP 相比, 没有显著改变所形成的蛋白产物的活性。这些突变蛋白可用已知的合成方法和/或定点诱变技术或任何其他合适的已知技术制备。

本发明的突变蛋白包括由在严格条件下杂交于编码 IL-18BP 或病毒性 IL-18BP 的 DNA 或 RNA 的核酸(如 DNA 或 RNA)所编码的蛋白质, 正如 W099/09063 中所述的那样。术语“严格条件”是指本领域一般技术人员常规地称为“严格的”杂交条件以及随后的洗涤条件。参照 Ausubel 等人, Current Protocol 偶发 Molecular Biology(分子生物学的目前方案), 同上, Interscience, N.Y., § § 6.3 和 6.4(1987, 1992), 以及 Sambrook 等人(同上)。不起限制作用, 严格条件的例子包括洗涤条件, 在低于所研究的杂交体的 T_m 计算值 12-20 摄氏度下, 如在 $2\times$ SSC 和 0.5% SDS 中洗涤 5 分钟, 在 $2\times$ SSC 和 0.1% SDS 中洗涤 15 分钟; 在 $0.1\times$ SSC 和 0.5% SDS, 于 37 摄氏度洗涤 30-60 分钟并且在 $0.1\times$ SSC 和 0.5% SDS, 于 68 摄氏度洗涤 30-60 分钟。本领域一般技术人员知道, 严格条件还依赖于 DNA 序列、寡核苷酸探针(如 10-40 碱基)或混合的寡核苷酸探针的长度。如果使用混合探针, 优选使用四甲基氯化铵 (TMAC) 来代替 SSC。参考 Ausubel(同上)。

任何这样的突变蛋白优选具有与 IL-18BP 高度相同的氨基酸序列, 或者与病毒性 IL-18BP 高度相同的氨基酸序列, 从而具有与 IL-18BP 相当的活性。IL-18BP 的一种活性是其结合 IL-18 的能力。只要突变蛋白有对 IL-18 实质性的结合活性, 它就可用于纯化 IL-18(如通过亲和层析), 因而就可被认为具有与 IL-18BP 实质上相似的活性。因此, 可通过常规实验来确定任一给定的突变蛋白是否实质上具有与 IL-18BP 相同的活性, 该实验包括对该突变蛋白进行简单的夹心竞争测试, 以测定它是否结合于适当标记的 IL-18(如放射免疫测试或 ELISA 测试)。

在一个较佳实施例中, 与 IL-18BP 或病毒编码的 IL-18BP 类似物的序列相比, 任何这类突变蛋白具有至少 40% 的相同性或同源性, 如 W099/09063 中所定义的那样。更佳地, 它具有至少 50%, 至少 60%, 至少 70%, 至少 80%, 或最佳地至少 90% 的相同性或同源性。

本发明可用的 IL-18BP 多肽的突变蛋白或者病毒性 IL-18BP 的突变蛋白, 或相应的编码核酸, 包括由基本一致的、作为置换肽或多核苷酸序列所构成的有限集合, 这些物质可由本技术一般技术人员基于本文的教导和指导, 在无过分试验的情况下, 通过常规方法制得。

根据本发明，突变蛋白的优选改变是已知的“保守性”置换。IL-18BP的多肽或蛋白质或病毒性 IL-18BP 的保守性氨基酸置换，可包括一组内的近似氨基酸，这些近似氨基酸有足够相似的物理化学特性以致于在组成员之间的置换将保持分子的生物功能(Grantham, 1974)。很清楚，还可在上述氨基酸序列中插入或缺失氨基酸，而不改变它们功能，尤其是如果这些插入或缺失只涉及到少数氨基酸，比如少于 30 个，较佳地少于 10 个，并且不取消或置换那些对功能构象至关重要的氨基酸，比如半胱氨酸残基。由这些插入和/或缺失所产生的蛋白质和突变蛋白属于本发明的范围之内。

较佳地，相似氨基酸(synonymous amino acid)组为表 1 所定义的那些；更佳地，相似氨基酸组为表 2 所定义的那些；最佳地，相似氨基酸组为表 3 所定义的那些。

表 1

优选的相似氨基酸组

氨基酸	相似组
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

表 2

更优选的相似氨基酸组

氨基酸	相似组
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

5

表 3

最优选的相似氨基酸组

氨基酸	相似组
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

可通过在蛋白质内的产生氨基酸置换，得到用于本发明的 IL-18BP 多肽或蛋白的突变蛋白或者病毒性 IL-18BP 的突变蛋白，其例子包括任何已知的方法步骤，如在 Mark 等人的美国专利 4959314, 4588585, 4737462; Koths et al. 的美国专利 5116943, Namen 等人的美国专利 4965195; Chong 等人的美国专利 4879111, 和 Lee 等人的美国专利 5017691 中所述的方法；以及美国专利 4904584 (Shaw 等人) 中所述的赖氨酸置换蛋白质。

术语“融合蛋白”是指一种多肽，其中包含 IL-18BP 或病毒性 IL-18BP, 或其突变蛋白或片段，并和其他蛋白质(如在体液中有更长保留时间的蛋白)融合在一起。因而 IL-18BP 或病毒性 IL-18BP 可与其他蛋白质、多肽等融合，

如免疫球蛋白或其片段。

如本文所用，“功能衍生物”涵盖 IL-18BP 或病毒性 IL-18BP 的衍生物，以及它们的突变蛋白和融合蛋白，这些物质可用本领域已知的手段，从作为残基侧链或作为 N 末端或 C 末端基团存在的官能团制备而得，并且只要它们
5 仍然是医学上可接受的（即它们没有破坏蛋白的与 IL-18BP 或病毒性 IL-18BP 的活性基本相似的活性，并且不会使含该物质的组合物具有毒性），那么它们就被包括在本发明中。

这些衍生物可以例如包括聚乙二醇支链，它可掩盖抗原位点并且延长 IL-18BP 或病毒性 IL-18BP 在体液中的停留时间。其他的衍生物包括羧基的
10 脂肪酯，羧基通过与氨或伯胺或仲胺反应而形成的酰胺，氨基酸残基的自由氨基与酰基部分（如烷酰基或碳环芳酰基基团）形成的 N-酰基衍生物，或自由羟基（如丝氨酸酰基或苏氨酸酰基残基的羟基）与酰基部分形成的 O-酰基衍生物。

作为 IL-18BP 和病毒性 IL-18BP、突变蛋白和融合蛋白的“活性片段”，本发明包括了单独的蛋白质分子多肽链或其与相关分子或残基相连（如糖或
15 磷酸残基）的多肽链的任何片段或前体，或蛋白质分子或糖残基自身的聚集体，只要所述片段具有与 IL-18BP 基本上相似的活性。

在本发明的另一较佳例中，IL-18 抑制剂是针对 IL-18 或其受体（IL-18R）的抗体。针对任何 IL-18R 亚基（称为 IL-18R α 和 β ）的抗体，可根据本发明使用。

20 本发明的抗体可以是多克隆的或单克隆的、嵌合的、人源化的、或者甚至是全人的。重组抗体及其片段的特征为在体内可高亲和力地结合于 IL-18 或 IL-18R 并且毒性低。可在本发明中使用的抗体的特征是，能够治疗病人一段足够时间，从而良好直至优异地减轻或缓和病症，或与病症有关的任何症状或症候群，并且具有低毒性。

25 通过用 IL-18 或 IL-18R α 或 β 进行免疫，可在动物（如兔子、山羊或小鼠）中容易产生中和抗体。免疫的小鼠特别适用于提供生产杂交瘤的 B 细胞源，杂交瘤依次培养以产生大量的抗 IL-18 单克隆抗体。

嵌合抗体是免疫球蛋白，其特征是有衍生自不同动物种类的两个或多个的片段或部分。通常，嵌合抗体的可变化区衍生自非人哺乳动物的抗体，如
30 鼠单克隆抗体，而免疫球蛋白的恒定区衍生自人免疫球蛋白分子。较佳地，两个区域及其组合用常规方法测定（Elliot 等人，1994）都具有低免疫原性。

人源化抗体为用基因工程技术所产生的免疫球蛋白分子；其中鼠的恒定区被人的相应区域所替代，同时保留鼠的抗原结合区域。形成的鼠-人嵌合抗体较佳地在人体中具有降低的免疫原性和改进的药物动力特性(Knight 等人，1993)。

5 因此，在另一较佳例中，抗 IL-18 或 IL-18R 的抗体是人源化抗体。人源化的抗-IL-18 抗体的较佳例子在例如欧洲专利申请 EP0974600 中有描述。

在另一较佳实施例中，抗体是全人的。在例如 W000/76310, W099/53049, US6162963 或 AU5336100 中对产生人抗体的技术有详尽的描述。

一种制备全人抗体的方法包括对小鼠体液免疫系统的“人源化”，即通
10 过把人免疫球蛋白(Ig)的基因座引入到小鼠体内(小鼠体内的内源性 Ig 基因已被失活)，产生可制造人 Ig 的小鼠品系(异小鼠(Xenomice))。Ig 基因座在其物理结构以及为了最终产生广泛免疫应答所需的基因重排和表达的过程两方面都是复杂的。抗体多样性主要是由 Ig 基因座中不同的 V, D 和 J 基因的组合重排所产生的。这些基因座还包含散布的调控元件，这些调控元件控制抗
15 体表达、等位基因的排斥、类别转换以及亲和力成熟。将非重排的人 Ig 转基因引入小鼠已表明，小鼠的重组机制与人类基因是相容的。此外，分泌抗原特异性的各种同种型 hu-mAb 的杂交瘤，可以通过用抗原免疫异小鼠而得到。

全人抗体及其产生方法是本领域中已知的(Mendez 等人(1997);Buggemann 等人(1991);Tomizuka 等人,(2000) 专利 WO 98/24893)。

20 在本发明高度优选的实施例中，IL-18 抑制剂为 IL-18BP，或其同工型、突变蛋白、融合蛋白、功能衍生物、活性片段或循环重排衍生物。这些同工型、突变蛋白、融合蛋白或功能衍生物保留了 IL-18BP 的生物活性(尤其是结合于 IL-18)，并且较佳地具有本质上至少一种与 IL-18BP 相似的活性。理想地，与未经修饰的 IL-18BP 相比，这些蛋白质有增强的生物活性。较佳的活
25 性片段具有比 IL-18BP 活性更好的活性，或具有其他优势，例如更好的稳定性或更低的毒性或免疫原性，或者它们更容易大批量生产，或更容易纯化。

IL-18BP 及其剪接变异体/同工型的序列可从 W099/09063 或 Novick 等人(1999)以及 Kim 等人(2000)的文献中得到。

IL-18BP 的功能衍生物可偶联于聚合体以便改进蛋白质的特性，比如稳
30 定性、半衰期、生物利用度、人体耐受性、或免疫原性。为了达到该目的，IL-18BP 可连接于例如聚乙二醇(PEG)。PEG 化可由已知的方法实施，例如

W092/13095 所描述的方法。

因此，在本发明的较佳实施例中，IL-18 抑制剂(特别是 IL-18BP)是 PEG 化的。

在本发明另一较佳实施例中，IL-18 抑制剂包括免疫球蛋白融合形式，
5 即 IL-18 抑制剂是包括融合于全长或部分免疫球蛋白的全长或部分 IL-18 结合蛋白的融合蛋白。制造免疫球蛋白的融合蛋白的方法为本技术中熟知的，例如 W001/03737 中所描述的方法。本领域技术人员会理解，本发明形成的融合蛋白保留了 IL-18BP 的生物活性，尤其是结合于 IL-18 的活性。融合可以是直接融合，或者通过短连接肽了解，连接肽的长度可以短至 1-3 个氨基酸
10 残基，或长达例如 13-20 氨基酸残基。所述连接肽可以是引入的位于 IL-18BP 序列与免疫球蛋白序列之间的，例如序列为 E-F-M(Glu-Phe-Met)的三肽，或含 Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met 的 13 聚氨基酸连接肽序列。形成的融合蛋白具有改进的特性，比如在体液中更长的保留时间(半衰期)、更高的特异活性、增加的表达水平，或者有助于融合蛋白的纯
15 化。

在一个较佳实施例中，IL-18BP 被融合于 Ig 分子的恒定区。较佳地，它被融合于重链区域，比如人 IgG1 或 IgG2 的 CH2 和 CH3 区。包含 IL-18BP 和免疫球蛋白片段的特异性融合蛋白的生产方法，在例如 W099/09063 的实施例 11 中有描述。Ig 分子的其他同工型也适合用来生产本发明的融合蛋白，比如
20 同工型 IgG2 或 IgG4，或其他 Ig 类型如 IgM 或 IgA。融合蛋白可以是单体或多聚体，异多聚体或同多聚体。

在本发明的另一实例中，IL-18 抑制剂和本发明临床条件中一个或多个其他活性分子(如血管扩张剂、Ca 阻滞剂、阿司匹林、 β 阻滞剂等)一起使用，。例如，根据本发明，TNF 拮抗剂也可与 IL-18 抑制剂联用。TNF 拮抗剂通过几个途径发挥其活性。首先，拮抗剂以足够的亲和力和特异性结合于或螯合于
25 个途径发挥其活性。首先，拮抗剂以足够的亲和力和特异性结合于或螯合于 TNF 分子本身，从而部分或基本上中和了 TNF 表位或负责 TNF 受体结合的表位(以下称为“螯合拮抗剂”)。螯合拮抗剂(sequestering antagonist)可以是例如针对 TNF 的抗体。

或者，TNF 拮抗剂能抑制在 TNF 结合后由细胞表面受体所激活的 TNF 信号途径(以下称为“信号拮抗剂”)。这两组拮抗剂在周围血管疾病的治疗或
30 预防中都很有用，无论是单独使用或一起使用，或者与 IL-18 抑制剂合用。

TNF 拮抗剂能通过常规筛选候选物，根据体外其对天然 TNF 对易感细胞系(如人 B 细胞，TNF 在该 B 细胞中导致增殖和免疫球蛋白的分泌)的活性的影响而轻易鉴别和评估。测试包括在不同稀释度的候选拮抗剂下(例如为测试中 TNF 摩尔量的 0.1 到 100 倍)的 TNF 制剂，和没有 TNF 或只有拮抗剂的对照

5 (Tucci 等人，1992)。

螯合拮抗剂为优选用于本发明的 TNF 拮抗剂。在螯合拮抗剂中，那些高亲和性地结合于 TNF 并且具有低免疫原性的多肽是优选的。可溶 TNF 受体分子和 TNF 的中和抗体是特别优选的。例如，可溶的 TNF-RI 和 TNF-RII 可用于本发明。这些受体的截短形式，包括受体的胞外区域或其功能片段，是本发

10 明更特别优选的拮抗剂。例如，截短的可溶 TNF I 型和 II 型受体在 EP914431 中有描述。

TNF 受体的截短形式是可溶的，并且已在尿液和血清中作为 30kDa 和 40kDa TNF 抑制性结合蛋白质被发现，该抑制性结合蛋白质分别被称为 TBPI 和 TBPII(Engelmann 等人，1990)。根据本发明，IL-18 抑制剂和 TNF 拮抗

15 剂的同时使用、依次使用、抑或分开使用都是优选的。

在另一较佳实施例中，人的可溶 TNF-RI(TBPI)是用于本发明的 TNF 拮抗剂。天然的和重组的可溶 TNF 受体分子及其生产方法，在欧洲专利 EP308378, EP398327 和 EP433900 中有描述。

受体分子的衍生物、片段、区域以及生物活性部分，在功能上类似于也

20 可用于本发明的受体分子。这种受体分子的生物活性等同物或衍生物是指多肽的一部分，或编码受体分子的序列的一部分，它们有足够大小并且能够以足够高的亲和性结合 TNF，以致于与膜结合的 TNF 受体之间的相互作用被抑制或阻断。

IL-18 抑制剂可与 TNF 抑制剂同时使用，依次使用或分开使用。

25 在本发明的另一较佳实施例中，IL-18 抑制剂的用量为约 0.01-100mg/kg 或 1-10mg/kg 或 2-5mg/kg。

根据本发明，IL-18 抑制剂较佳全身施用，并且较佳地为皮下或肌肉施用。它可每天或隔天施用。缓释制剂可使施用更不频繁，比如一周一次。

本发明还涉及含 IL-18 抑制剂编码序列的表达载体的用途，它被用于制

30 备预防和/或治疗周围血管疾病的药物。因此，为了将 IL-18 抑制剂输送至所需部位，可考虑基因疗法。例如，为了治疗和/或预防周围血管疾病，包含

IL-18 抑制剂序列的基因治疗载体可被例如直接注射入患病组织，从而避免基因治疗载体的全身给药的所涉及的问题，比如载体的稀释，到达和定位于靶细胞或组织，以及副作用。

在通常不表达 IL-18 抑制剂或抑制剂表达数量不足的细胞中，使用载体来引起和/或增强内源性产生 IL-18 抑制剂的方法，也在本发明构思中。载体可包括在需要表达 IL-18 抑制剂的细胞中起作用的调控序列。例如，这种调控序列可以是例如启动子或增强子。调控序列然后通过同源重组引入基因组的正确位置，这样使调控序列与需要诱导或增强表达的基因可操作地连接。该技术通常被称为“内源基因激活”(EGA)，并且在例如 W091/09955 中有描述。

本领域技术人员会理解，可用同样技术直接关闭 IL-18 的表达，而不使用 IL-18 抑制剂。为此，负调控元件(如沉默元件)可引入 IL-18 基因座，从而导致下调或防止 IL-18 表达。本领域技术人员会理解，这种使 IL-18 表达的下调或沉默与用 IL-18 抑制剂来预防和/或治疗疾病有相同效果。

本发明还涉及已被基因修饰从而产生 IL-18 抑制剂的细胞的用途，它被用于生产治疗和/或预防周围血管疾病的药物。

根据本发明中使用的 IL-18 抑制剂，优选以药物组合物形式施用，并且可任选地与治疗有效量的 TNF 抑制剂或其他在治疗或预防周围血管疾病中有效的药物联用。

如上所述的 IL-18BP 以及它的同工型、突变蛋白、融合蛋白、功能衍生物、活性片段或循环重排衍生物是药物组合物中较佳的活性成份。

“药学上可接受”的定义包括任何载体，其并不干扰活性成份的生物活性的有效性，并且施用后对宿主没有毒性。例如，对肠胃外给药而言，活性蛋白质可在诸如盐、葡萄糖溶液、血清白蛋白和 Ringer 氏溶液等载体中，配制成用于注射的单位剂型。

根据本发明的药物组合物中的活性成份可以通过几种方法施用于人。给药途径包括皮内、透皮(例如在缓释剂型中)、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、口服、颅内、硬膜外、局部、和鼻内的途径。可以施用任何其他在治疗上有效的给药途径，例如通过上皮或内皮组织的吸收或通过基因疗法(其中编码活性成分的 DNA 分子被施用于病人(如通过载体)，这导致了该活性成分在体内表达和分泌。此外，本发明的蛋白质可与其他一些生物活性物质成分(例如药

学上可接受的表面活性剂、赋形剂、载体、稀释剂和运载体)一起施用。

对于肠胃外给药(如静脉内、皮下、肌内)来说,活性蛋白质可以与药
学上可接受的肠胃外载体(例如水、盐水、葡萄糖溶液)以及维持渗透压(如甘露
醇)或化学稳定性(如防腐剂和缓冲剂)的添加剂一起配制成溶液、悬浮液、乳
5 液或冻干粉末。制剂可用常用的技术进行灭菌。

本发明的活性蛋白质的生物利用度也可通过延长分子在人体中半衰期
的偶联法加以改善,例如如 PCT 专利申请 W092/13095 中所述的那样,把分子
连于聚乙二醇。

活性蛋白质的治疗有效量是一个有很多变量的函数,包括拮抗剂的类
10 型,拮抗剂对 IL-18 的亲合性,拮抗剂所体现的任何残余细胞毒活性,给药
途径,病人的临床状况(包括维持无毒水平的内源 IL-18 活性的愿望)。

“治疗有效量”是指施用,IL-18 抑制剂导致抑制 IL-18 的生物活性。
施用于个体的剂量(作为单剂或多剂)可随各种不同因素而变化,包括 IL-18
抑制剂的药物动力学特性、给药途径、病人症状和特征(性别、年龄、体重、
15 健康状况、体格)、病症的程度、并行的治疗、治疗的频率和所需的效果。对
已建立的剂量范围进行调整和操作,以及用体外和体内的方法来测定个体中
IL-18 受抑制,都在本领域技术人员的技能之内。

根据本发明,IL-18 抑制剂的用量为大约 0.001-100mg/kg 或大约
0.01-10mg/kg 体重,或大约 0.1-5mg/kg 或大约 1-3mg/kg 体重,或大约 2mg/kg
20 体重。

根据本发明较佳的给药途径是皮下途径。根据本发明,肌内给药是更佳
的。为了把 IL-18 抑制剂直接施用于起作用的位置,局部给药也是较佳的。

在更佳实施例中,IL-18 抑制剂是每天或隔天施用的。

每天的剂量通常分开几次或通过持续释放方式给予,以便有效地得到所
25 需效果。第二次或随后的给药剂量可以与第一次或以前施用于个体的剂量相
同、更小或更大。第二次或随后的给药可以在疾病发作之中或之前给予。

根据本发明,IL-18 抑制剂可以预防性或治疗性地以治疗有效量施用于
个体,在其他治疗方案或药物(如多药物方案)之前,同时或之后给予,尤其
是与 TNF 抑制剂和/或其他血管保护剂一起使用。和其他治疗剂同时施用的活
30 性剂可在相同或不同的组合物给予。

本发明还涉及一种制备药物组合物的方法,它包括将有效量的 IL-18 抑

制剂和/或 TNF 拮抗剂与药学上可接受的载体混合。

本发明还涉及一种治疗周围血管疾病的方法，包括将药物有效量的 IL-18 抑制剂(可任选地与药物有效量的 TNF 拮抗剂一起)施用于需要治疗的病人。

5 在现已充分描述了本发明之后，本领域技术人员会理解，在不脱离本发明的精神和范围以及无需过分实验的情况下，本发明可在大范围的等价参数、浓度和条件下实施。

虽然本发明是通过一系列具体实施例来描述的，然而应理解，本发明还可以有其他改进。本申请意在覆盖总体上按照本发明原理的任何本发明的变化、用途或改进，并且包括脱离本公开内容的变化形式，只要这些脱离形式
10 在本发明相关领域是已知或常规的操作，并且适用于在随附的权利要求书范围内中所列出必要技术特征。

所有在本文引用的文献，包括期刊文章或摘要，公开或未公开的美国或外国的专利申请，授权的美国或外国的专利或任何其他文献，通过在此引用
15 而全部纳入本文，包括所引用的文献中所出现的所有的数据、表格、附图和文本。此外，在本文所引用的文献中所引用的全部文献内容，也通过在此引用而全部纳入本文。

对已知方法步骤、常规方法步骤、已知方法或常规方法的引用，并非表示本发明的任何方面、描述或实例已在相关领域中被公开、教导或暗示。

20 前面对具体实例的描述对本发明的普遍本质作了如此全面的披露，以致于其他人可以通过运用本领域技能内的知识(包括本文所引用的参考文献的内容)，在没有过分试验的情况下，在不脱离本发明的总体概念的情况下，很容易地修改或变动这些具体实例以便用于各种应用。因此，基于本文所给的教导和指导，这些变动和修改被认为被包括在所公开的实施例的等价范畴内。
25 应理解，本文的措词或术语是为了描述而非用于限制，所以本说明书的术语或措词应由熟练技术人员，根据本文所给的教导和指导并结合本技术领域一般技术人员的知识，作出解释。

实施例

30 实施例 1：抑制 IL-18 减少了周围局部缺血

方法：

后肢缺血简介

对雄性 C57BL/6J 小鼠 (Iffa Creddo, Lyon, 法国) 进行手术, 以便诱导单侧的后肢缺血。通过吸入异氟烷使动物麻醉。在右股动脉上进行结扎, 离隐静脉动脉和腘动脉的分叉近端 0.5 厘米。然后小鼠 (每组 7 只) 居住于特定的无菌室 3 天或 28 天。为了检测 IL-18BP 在缺血引起的血管生成中的作用, 用以前所述的方法 (Mallat 等人, 2001), 在一组小鼠在胫骨和腓骨肌肉中都注射了 60 μ g 鼠 IL-18BP 表达质粒 pcDNA3-mIL18BP。对照小鼠注射了相同剂量的对照空质粒。用 PS-15 电脉冲仪 (Genetronics), 用两根间隔 4.2-5.5 毫米的不锈钢平板电极, 在腿的每侧传送经皮电脉冲 (200V/cm, 持续 20 毫秒, 2 赫兹的 8 方波电脉冲)。使用这个策略是因为以前的研究表明它可提升 IL-18BP 的血浆水平, 减少血浆 IL-18 活性并且抑制动脉粥样硬化斑块的发展和恶化 (Mallat 等人, 2001)。

血管生成的定量分析

15 微血管造影术

按以前所描述的方法 (Silvestre 等人, 2000; Silvestre 等人, 2001), 在治疗最后阶段通过高精度微血管造影术来评价血管密度。简言之, 小鼠被麻醉 (吸入异氟烷), 然后通过导入到腹腔大动脉的导管将造影剂 (硫酸钡, 1g/ml) 注入。通过数码 X 射线传感器得到的图像 (每个动物 3 张) 被组合起来以得到后肢的完整图像。血管密度由每个图像的定量区域中血管占据的像素百分比来表达。对股动脉结扎处、膝盖、股骨边缘以及腿的外部界限划定了定量区域。

毛细血管的密度

按以前所述的方法 (Silvestre 等人, 2000; Silvestre 等人, 2001), 通过对缺血性和非缺血性肌肉中毛细血管的密度的评估来完成微血管造影术分析。冷冻的组织切片 (7 μ m) 与针对 CD31 大鼠单克隆抗体 (20 μ g/ml, Pharmingen) 一起孵育以鉴别毛细血管。通过使用亲和素-生物素辣根过氧化物酶系统 (Vectastain ABC kit elite, Vector Laboratories), 使免疫印迹显现。使用 Histolab 的软件 (Microvision), 在一定面积的随机选定区域计算毛细血管密度。

激光多普勒灌注成像

为了提供在血管形成中由缺血所引起的变化的功能证据，按以前所述的方法(Silvestre 等人，2000;Silvestre 等人，2001)，进行了激光多普勒灌注成像实验。简言之，多余的体毛在成像前用脱毛膏从四肢上脱掉，并且小鼠被放在 37℃ 的加热板上以减少温度变化。然而，为了说明变数(包括环境光亮度与温度)，经过计算的灌注被表达为缺血性腿和非缺血性腿的比率。

统计分析

结果被表达为平均值±SEM。变量 ANOVA 的单向分析法被用来比较每个参数。然后进行 Post hoc Bonferonni 氏 t 检验比较，以便鉴别出哪一个组的差异造成了显著的整体 ANOVA。p<0.05 的数值被认为在统计上是显著的。

10 结果：

微血管造影术

在第 3 天，每一组的缺血性/非缺血性腿的血管造影的评分比率未受到影响(图 1)。相反，在第 28 天，血管造影评分显示，与对照相比，用 IL-18BP 治疗的小鼠中增加了 1.6 倍(p<0.01)。

15 毛细血管密度

在 CD31 染色后，微血管造影术数据得到了毛细血管密度分析的确认。在第 28 天，对照小鼠的缺血性腿的毛细血管密度比非缺血性腿的毛细血管密度低(415±31 对 688±42 根血管/平方毫米，p<0.01)。然而，用 IL-18BP 治疗的小鼠的缺血性腿的毛细血管密度比对照小鼠的缺血性腿的毛细血管密度要高出很多(增加了 1.4 倍)(分别为 588±48 对 415±31 根血管/平方毫米，p=0.01)，并且与非缺血性腿中观察到的水平没有区别。

激光多普勒灌注成像

微血管造影术和毛细血管密度的测量结果与血液灌注中的改变相关。后肢血流的恢复在接受治疗和未接受治疗的小鼠中都有发生。然而，在接受 IL-18BP 治疗的小鼠中，在第 28 天所观察到的血流量的增幅(脚部灌注)比对照动物更大(1.5 倍，p<0.01，图 2)。

实施例 2: VEGF，磷酸-Akt 以及 eNOS 蛋白水平的调节

方法：

30 按以前所述的方法(Silvestre 等人，2000;Silvestre 等人，2001)，通过 Western 印迹结果测定 VEGF、磷酸-Akt 和 eNOS(内皮氮氧合酶蛋白)在

缺血性以及非缺血性腿中的表达。

结果:

VEGF。第3天,在任一组中,在缺血性和非缺血性腿上都没有观察到 VEGF 蛋白水平的变化。第28天,与非缺血性腿相比,在对照小鼠中 VEGF 蛋白质
5 含量趋于在缺血性腿中增加,但还不具有统计上的显著性。相反,与对照相比,缺血性腿中的 VEGF 蛋白水平在 IL-18BP 治疗的小鼠中显著地上调了 120% ($p < 0.05$) (图3)。

磷酸-Akt。第3天,无论是否治疗,在缺血性和非缺血性腿中的磷酸-Akt 蛋白水平都无改变。第28天,在对照小鼠中,缺血性后肢中磷酸-Akt 蛋白
10 含量比非缺血性后肢中的含量增加了 60% ($p < 0.01$)。在缺血性腿中磷酸-Akt 蛋白含量的这种增长在接受 IL-18BP 治疗的小鼠中增加了一倍(增加了 110%, $p < 0.05$, 与对照小鼠的缺血性腿中的增长相比) (图4)。

eNOS。第3天,eNOS 蛋白含量在对照和接受 IL-18BP 治疗的动物的缺血性 ($107 \pm 8\%$ 对 $103 \pm 24\%$) 和非缺血性腿 ($100 \pm 12\%$ 对 $94 \pm 21\%$) 中都未受影响。
15 第28天,在对照小鼠中,在缺血性腿中 eNOS 水平与非缺血性腿的相比提高了 55% (分别为 $155 \pm 8\%$ 对 $100 \pm 11\%$, $p < 0.05$)。这种增长不受 IL-18BP 治疗的影响 ($160 \pm 12\%$, 与缺血性对照相比 $P = 0.61$)。

实施例 3: IL-18BP 对 EPC(内皮祖细胞)的影响

20 方法:

流式细胞计量分析

EPC 细胞被认为是衍生自 Sca-1-阳性的造血祖细胞(Takahashi 等人, 1999)。然后,用流式细胞分析来测定表达 EPC 标记蛋白质 Sca-1 的单核细胞的百分比。缺血七天后,从接受空 pcDNA3 质粒治疗或接受 pcDNA3-mIL18BP
25 质粒治疗的小鼠(每组 $n = 5$)的外周血 ($300 \mu l$) 和骨髓中分离出单核细胞。骨髓细胞通过冲洗胫骨和股骨而得到。用 Ficoll 通过密度梯度离心法分离出低密度单核细胞。然后单核细胞与偶联有荧光素异硫氰酸酯(FITC)的、抗 Sca-1 的单克隆抗体 (D7, BD Pharmingen) 一起被孵育。同种型-相同的 (isotype-identical) 抗体被用作对照。

30 EPC 分化分析

在分离之后,立刻将 5×10^6 个骨髓衍生的单核细胞也置于包被有小鼠血

浆玻璃结合蛋白(vitronectin)(Sigma)和明胶(0.1%)的35mm细胞培养皿上,并且维持在内皮基础培养基中(EBM2, Bio whittaker)。培养了四天后,非粘附细胞被去除,粘附细胞进行免疫化学分析。

为了检测 1,1'-双十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吲哚羰花青
5 (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine)标记的、乙酰化的低密度脂蛋白(AcLDL-Dil)的摄取情况,将细胞与 AcLDL-Dil(Tebu)一起在 37° C 孵育 1 小时。然后用 2%多聚甲醛固定细胞,与抗 von-Willbrand 因子(vWF)的兔子多克隆第一抗体(DAKO)一起孵育一小时,然后与 FITC 标记的抗兔子 IgG(H+L)的单克隆抗体一起孵育 30 分钟(Coulter)。对 AcLDL-Dil
10 和 vWF 都为阳性的双染色细胞被判定为 EPC,并且对每个孔中的这些细胞进行计数。三个独立调查员通过对三个随机选定的高倍区域进行计数,而评估每个孔中的 EPC 数量。然后,数据表示为以单核细胞总数的百分比。

结果:

EPC 被认为是衍生自 Sca-1 阳性的单核细胞(Takahashi 等人, 1999)。
15 与对照动物相比,接受 IL-18BP 治疗的小鼠的周围血管中 Sca-1 阳性的单核细胞的百分比保持不变(分别为 $31.5 \pm 13\%$ 对 $28.5 \pm 13\%$)。类似地,从骨髓中分离出的 Sca-1 阳性单核细胞总数,在 IL-18BP 治疗小鼠和对照小鼠中没有区别(分别为 $4.35 \pm 0.95\%$ 对 $5.87 \pm 0.22\%$)。此外,IL-18BP 治疗未对周围血液或骨髓的单核细胞总数产生影响(数据未显示)。

20 从骨髓的单核细胞中分离出 EPC 并培养,然后并以 AcLDL-Dil 和 vWF 阳性的双染色细胞进行表征。具有双阳性染色结果的细胞百分比,在非缺血性动物中几乎无法检测($<5\%$, $n=4$)。缺血诱导对 AcLDL-Dil 和 vWF 呈阳性的双染色细胞的百分比显著增加($48 \pm 3\%$, $p<0.001$, 相对于非缺血性动物)。这种效果通过 IL-18BP 治疗进一步扩大(对照中的 $48 \pm 3\%$ 对 IL-18BP 治疗小鼠
25 中的 $85 \pm 2\%$, $p<0.001$) (图 5)。因此,IL-18BP 治疗似乎刺激单核细胞分化成 EPC,而不是增加了循环的祖细胞数量。

参考文献

1. Buggemann 等人, *Eur. J. Immunol.* 21: 1323-1326 (1991)
2. DiDonato, J A, Hayakawa, M, Rothwarf, D M, Zandi, E 和 Karin, M. (1997).
Nature 388, 16514-16517.
- 5 3. Elliott, M. J., Maini, R. N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H. 和 Woody, J. N., 1994, *Lancet* 344, 1125-1127.
4. Engelmann, H., Novick, D. 和 Wallach, D., 1990, *J. Biol. Chem.* 265, 1531-1536.
5. Grantham (1974), *Science*, 185.862-864.
- 10 6. Kim SH, Eisenstein M, Reznikov L, Fantuzzi G, Novick D, Rubinstein M, Dinarello CA. 6 个天然存在的 IL-18 结合蛋白抑制 IL-18 的结构要求 (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.
- 15 7. Kim SH 等人, *J. Immuno.* 2001, 166, pp. 148-154.
8. Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallon B, Moore MA, Vilcek J, Daddona P, 等人, 小鼠-人嵌合的抗-TNF 抗体的构建和初步表征 (Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody). *Mol Immunol* 1993 Nov 30: 16
20 1443-53
9. Maniatis 等人, *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.
- 25 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. 和 Jakobovits, A. (1997). 兆碱基的人免疫球蛋白基因座的功能性移植导致在小鼠中重演人抗体应答 ("Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice"). *Nature Genetics*, 15, 146-56.
- 30

12. Nakamura, K, Okamura, H, Nagata, K 和 Tamura, T. (1989). *Infect. Immun.* 57, 590-595.
13. Novick, D, Kim, S-H, Fantuzzi, G, Reznikov, L, Dinarello, C 和 Rubinstein, M (1999). *Immunity* 10, 127-136.
- 5 14. Parnet, P, Garka, K E, Bonnert, T P, Dower, S K 和 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. 在小鼠后肢中缺血诱导的血管生成过程中白细胞介素 10 的抗血管形成作用(Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb). *Circ. Res.* 87:448-452.
- 10 16. Silvestre, J. S., Mallat Z, Tamarat R, Duriez M, Tedgui A 和 Levy BI. 2001. 在缺血组织中白细胞介素 10 对基质金属蛋白酶的调节作用: 在缺血诱导的血管生成中的角色(Regulation of Matrix Metalloproteinase activity in ischemic tissue by interleukin-10: Role in ischemia-induced angiogenesis). *Circ. Res.* 89: 259-264.
- 15 17. Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J. M., Asahara, T. 1999. 骨髓衍生内皮祖细胞为新血管形成进行的缺血诱导和细胞因子诱导的活动 (Ischemia-and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization). *Nat Med.* 5 : 434-438.
- 20 18. Torigoe, K., Ushio, S., Okura, T., Kobayashi, S., Tani, M., Kunikida, T., Murakami, T., Sanou, O., Kojima, H., Fuji, M., Ohta, T., Ikeda, M., Ikegami, H. & Kurimoto, M. (1997) *J Biol Chem* 272, 25737-25742.
- 25 19. Tomizuka 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727 (2000)
20. Tucci, A., James, H., Chicheportiche, R., Bonnefoy, J. Y., Dayer, J. M. 和 Zubler, R. H., 1992, *J. Immunol.* 148, 2778-2784.
21. Yoshimoto T, Takeda, K, Tanaka, T, Ohkusu, K, Kashiwamura, S, Okamura, H, Akira, S 和 Nakanishi, K (1998). *J. Immunol.* 161, 3400-3407.
- 30

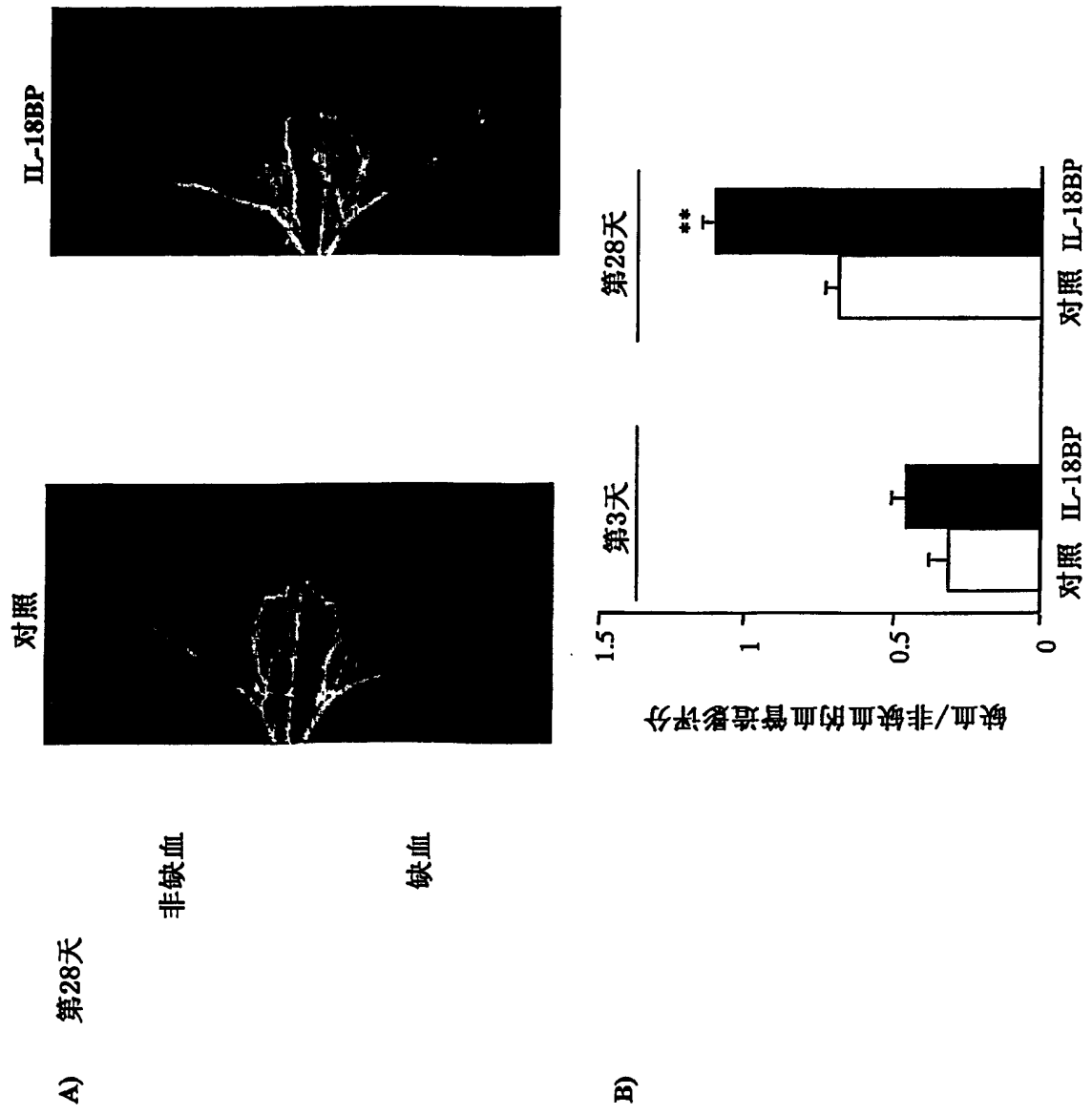


图 1

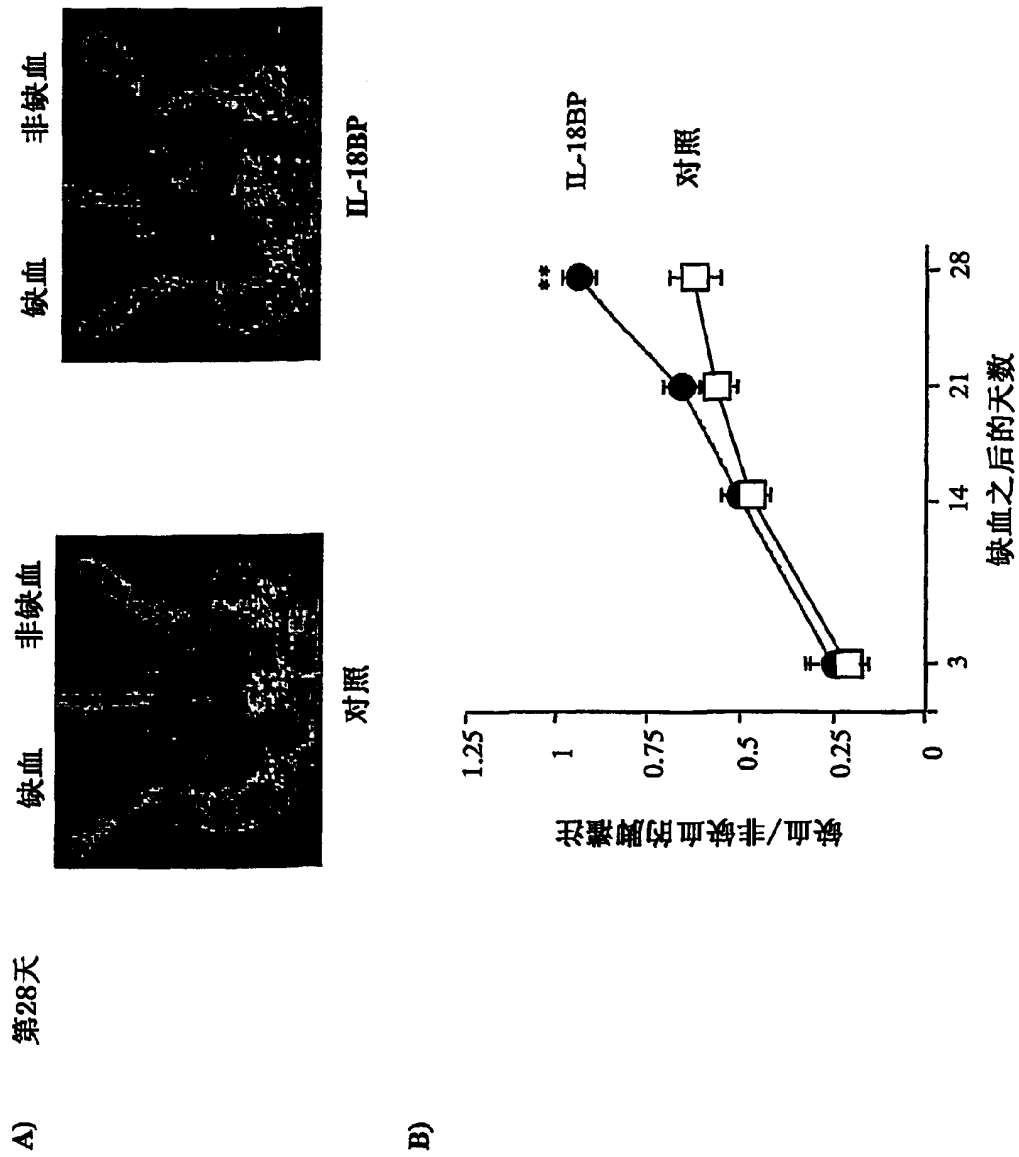


图 2

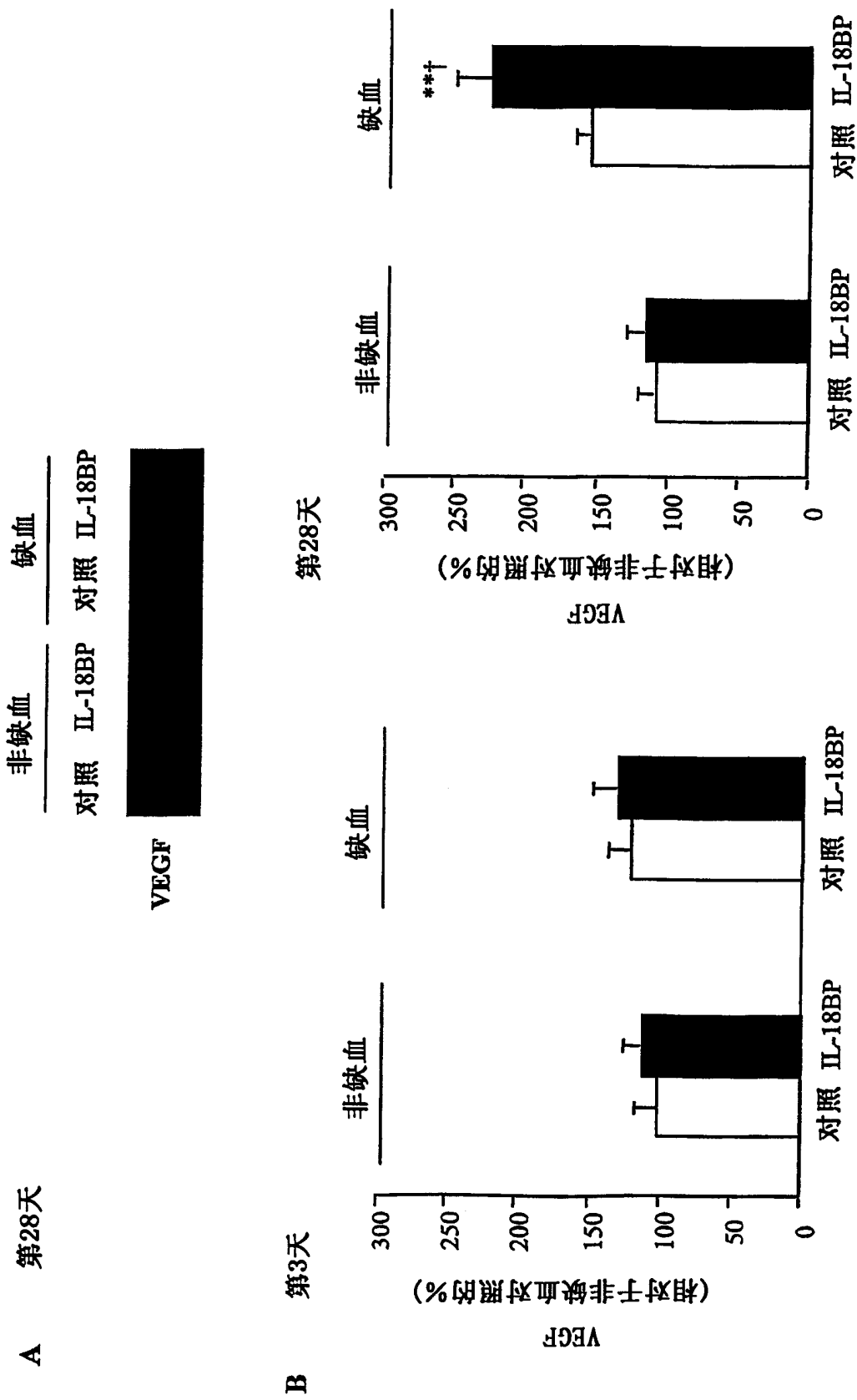


图 3

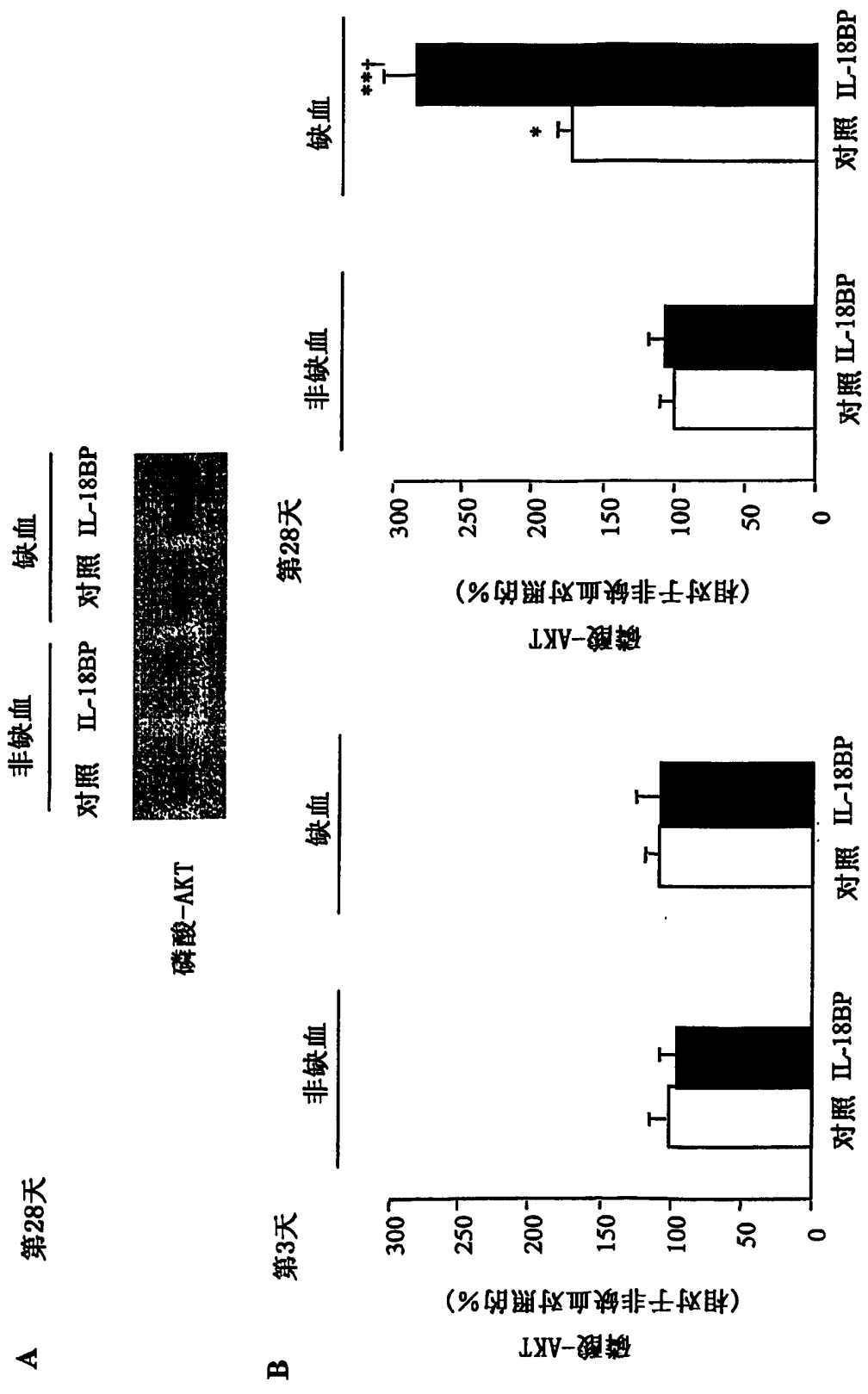


图 4

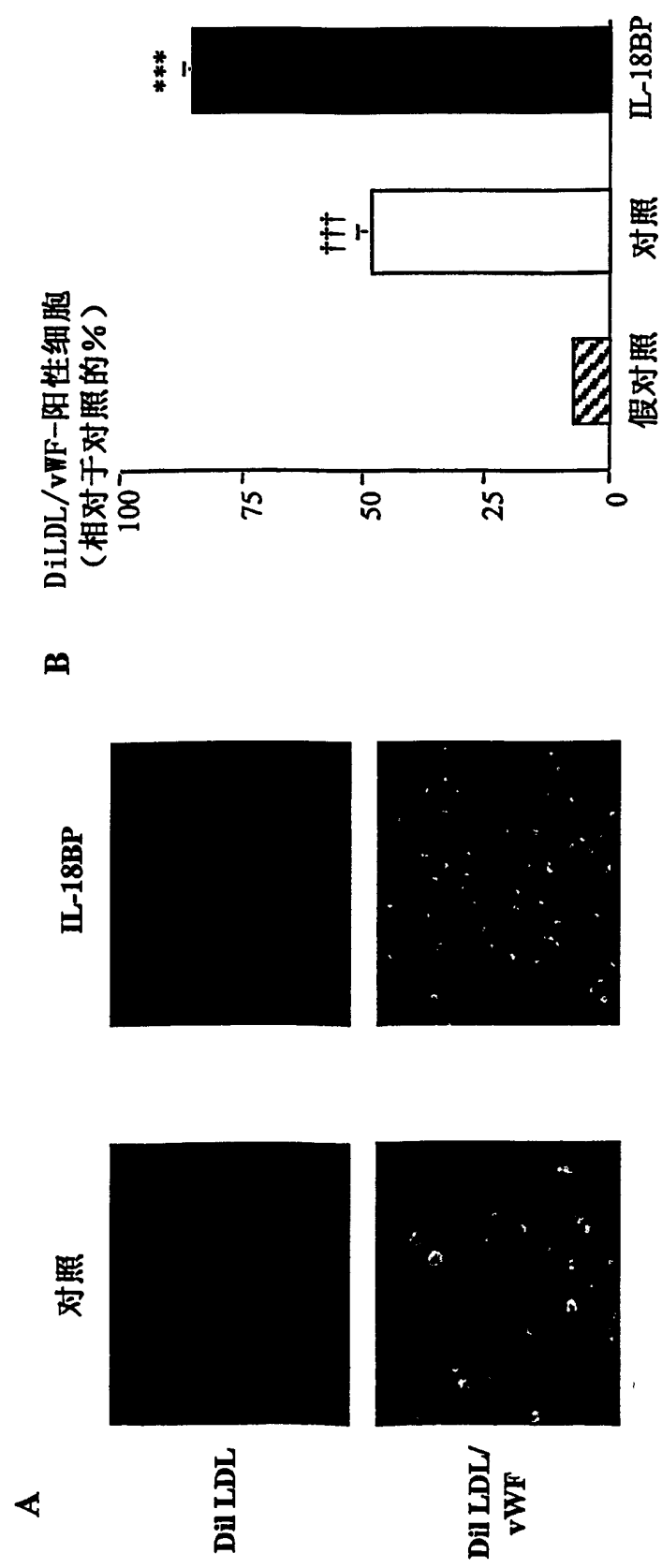


图 5