



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 314 191**

51 Int. Cl.:
A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03714958 .0**

96 Fecha de presentación : **13.03.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1487541**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.2004**

54 Título: **Uso de inhibidores de IL-18 para el tratamiento y/o prevención de enfermedades vasculares periféricas.**

30 Prioridad: **22.03.2002 EP 02100290**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

73 Titular/es: **Laboratoires Serono S.A.**
Centre Industriel
1267 Coinsins, Vaud, CH
Institut National de la Santé et de la Recherche
Medicale

72 Inventor/es: **Chvatchko, Yolande;**
Tedgui, Alain y
Mallat, Ziad

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 314 191 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de inhibidores de IL-18 para el tratamiento y/o prevención de enfermedades vasculares periféricas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de las enfermedades vasculares. Más en concreto, se refiere al uso de un inhibidor de la IL-18 para el tratamiento y/o prevención de enfermedades vasculares periféricas. La invención se refiere también al uso de un inhibidor de la IL-18 para la prevención de la amputación.

10 **Antecedentes de la invención**

La citoquina interleuquina 18 (IL-18) fue descrita inicialmente como un factor inductor de interferón- γ (IFN- γ) (Nakamura *et al.*, 1989). Es una señal temprana en el desarrollo de las respuestas de linfocitos T de tipo celular auxiliar 1 (TH1). La IL-18 actúa junto con la IL-12, IL-2, antígenos, mitógenos y, probablemente, otros factores, para inducir la producción de IFN- γ . La IL-18 también potencia la producción de GM-CSF y de IL-2, aumenta la proliferación de linfocitos de células T inducida por anti-CD3 e incrementa la destrucción mediada por Fas de los linfocitos citolíticos.

La IL-18 madura es producida, a partir de su precursor, mediante la enzima convertora de IL-1 β (ICE, caspasa-1).

El receptor de la IL-18 consiste en al menos dos componente, IL-18R-alfa e IL-18R-beta, que cooperan en la unión al ligando. Se han encontrado sitios de unión de alta y baja afinidad por IL-18 en células T estimuladas con IL-12 murinas (Yoshimoto *et al.*, 1998), lo cual sugiere un complejo de receptor de múltiples cadenas. Las dos subunidades del receptor que se han identificado hasta la fecha pertenecen ambas a la familia de receptores de IL-1 (Parnet *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2001). La transducción de señales de IL-18 implica la activación de NF- κ B (DiDonato *et al.*, 1997). El complejo del receptor de IL-18 consiste en dos cadenas del receptor: una cadena de unión al ligando denominada cadena IL-18R α , y una cadena de transducción de señales denominada cadena IL-18R β . La cadena IL-18R-alfa se aisló inicialmente como una proteína de la superficie celular que se une a IL-18 marcada de modo radiactivo; la proteína se purificó y su secuencia de aminoácidos reveló una coincidencia con un receptor huérfano, previamente descrito, denominado proteína relacionada con IL-1R (IL-1Rrp) (Torigoe *et al.*, 1997).

En fechas recientes, se ha aislado una proteína soluble que tiene una alta afinidad por IL-18 a partir de orina humana, y se han clonado los ADNc de humano y de ratón, así como el gen humano (Novick *et al.*, 1999; documento WO 99/09063). La proteína se ha denominado proteína de unión a IL-18 (IL-18BP).

La IL-18BP no es el dominio extracelular de uno de los receptores de IL18, sino que es una proteína segregada que se encuentra en la circulación de forma natural. Pertenecer a una nueva familia de proteínas segregadas, que incluye también varias proteínas codificadas por poxvirus (Novick *et al.*, 1999). La IL-18BP urinaria, así como la recombinante, se une específicamente a IL-18 con alta afinidad y modula la afinidad biológica de IL-18.

El gen de IL-18BP se ha localizado en el cromosoma humano 11q13, y no se ha descubierto ningún exón que codifique un dominio transmembrana en una secuencia genómica de 8,3 kb. Hasta el momento se han descubierto en el ser humano cuatro variantes de corte y empalme o isoformas de la IL-18BP generados mediante corte y empalme alternativos del ARNm. Se han denominado IL-18BP a, b, c y d, y todas comparten el mismo N-terminal y se diferencian en el C-terminal (Novick *et al.*, 1999). Estas isoformas varían en su capacidad para unirse a la IL-18. De las cuatro, se sabe que las isoformas hIL-18BP a y c tienen una capacidad neutralizante para la IL-18. La isoforma IL-18BP humana se une a la IL-18 murina.

Los trastornos vasculares periféricos pueden ser arteriales (oclusivos o funcionales), venosos, arteriovenosos combinados (por ejemplo, una fístula arteriovenosa), o linfáticos. La enfermedad arterial oclusiva incluyen la oclusión arterial periférica y la enfermedad de Buerger, también denominada tromboangitis obliterante. Los trastornos arteriales funcionales pueden ser vasoespásticos (enfermedad y fenómeno de Raynaud, acrocianosis) o vasodilatadores (eritromelalgia). Pueden aparecer de forma secundaria a un fallo local en los vasos sanguíneos o a trastornos en la actividad del sistema nervioso simpático, o pueden acompañar a una enfermedad vascular orgánica. Las enfermedades venosas incluyen la trombosis venosa y las venas varicosas, los trastornos arteriovenosos combinados incluyen la fístula arteriovenosa, y los trastornos linfáticos incluyen el linfedema y el lipedema.

La oclusión arterial periférica se refiere a una oclusión del suministro sanguíneo a las extremidades, en general por placas ateroscleróticas (ateromas), un trombo, o un embolismo.

La oclusión arterial periférica puede dar como resultado una isquemia aguda o crónica. La isquemia aguda es provocada por una placa arterioesclerótica proximal rota, por una trombosis aguda sobre una enfermedad aterosclerótica preexistente, por un embolismo desde el corazón, la aorta u otros vasos grandes, o un aneurisma diseccionado. La isquemia crónica es provocada por un agrandamiento gradual de una placa ateromatosa.

Un aumento sostenido de la homocisteína sanguínea, que daña a las células endoteliales, predispone a una aterosclerosis prematura de la aorta y sus ramas, las arterias periféricas, las arterias cerebrales y, probablemente, las

ES 2 314 191 T3

arterias coronarias. Aunque los niveles de homocisteína normalmente son elevados cuando se asocian a otros factores de riesgo, pueden modificarse mediante la dieta y los suplementos de vitamina B.

5 Los síndromes clínicos de la oclusión arterial dependen del vaso implicado, del grado de obstrucción, de lo rápido que progresa la oclusión y de si el flujo colateral es adecuado.

10 La oclusión aguda tiene una historia que incluye la aparición repentina de dolor grave, sensación de frío, entumecimiento y palidez en una extremidad. La extremidad aparece fría y pálida, y los pulsos están ausentes en la parte distal a la obstrucción. Una oclusión aguda puede provocar isquemia grave, manifestada por pérdida sensorial y motora y, en último término (después de 6 a 8 h), induración blanda de los músculos cuando se palpan.

15 En la oclusión crónica, los síntomas están relacionados con el desarrollo insidioso de isquemia en tejidos. El síntoma inicial es una claudicación intermitente. Los síntomas de la claudicación son dolores, dolor constante, calambres, o una sensación de cansancio que aparece cuando se pasea. Estos síntomas son más comunes en la pantorrilla, pero pueden aparecer en el pie, el muslo, la cadera o los glúteos.

En último término, el dolor isquémico puede aparecer en reposo, comenzando desde la parte más distal de una extremidad como un dolor grave e implacable que se agrava con la elevación y a menudo impide dormir.

20 El nivel de oclusión arterial y la localización de la claudicación intermitente se correlacionan íntimamente, por ejemplo, la enfermedad aortoiliaca a menudo produce claudicación en los glúteos, caderas y pantorrillas, y los pulsos femorales se reducen o están ausentes. En la enfermedad femoropoplítea, la claudicación se produce, de forma típica, en la pantorrilla, y todos los pulsos por debajo de la femoral están ausentes. En pacientes con enfermedad de vasos pequeños (por ejemplo, tromboangitis obliterante, diabetes mellitus), los pulsos femoropoplíteos pueden estar presentes pero los pulsos en el pie están ausentes. La palidez del pie implicado después de 1 a 2 min de elevación, seguido de rubor tras ponerlos en posición suspendida, ayuda a confirmar la insuficiencia arterial. El tiempo de llenado venoso tras ponerlos en posición suspendida después de una elevación excede el límite normal de 15 segundos. Si los síntomas de la claudicación aparecen con buenos pulsos distales, debe considerarse la estenosis espinal en el diagnóstico diferencial.

30 Un pie gravemente isquémico es doloroso, está frío y a menudo entumecido. En los casos crónicos, la piel puede aparecer seca y escamosa con un deficiente crecimiento de las uñas y el pelo. A medida que empeora la isquemia puede aparecer ulceración (de forma típica en los dedos de los pies o el talón, a veces en la pierna), en especial después de un traumatismo local. El edema normalmente no se encuentra presente, a menos que el paciente haya mantenido la pierna en posición suspendida para aliviar el dolor; sin embargo, una pierna gravemente isquémica puede ser atrófica. Una oclusión más extensiva puede comprometer la viabilidad del tejido, conduciendo a la necrosis o gangrena. Una isquémica con rubor, dolor e hinchamiento del pie tras ponerlo en posición suspendida puede confundirse con la celulitis o la insuficiencia venosa. Unos ensayos arteriales no invasivos pueden aclarar el diagnóstico.

40 Entre las enfermedades vasculares periféricas, la enfermedad de Buerger (tromboangitis obliterante) es una enfermedad obliterante caracterizada por cambios inflamatorios en arterias y venas de tamaño pequeño y mediano.

45 La enfermedad de Buerger aparece en fumadores, predominantemente en hombres de 20 a 40 años. Sólo aproximadamente 5% de los casos aparecen en mujeres. La frecuencia del diagnóstico ha disminuido de forma radical en años recientes debido a una mejor comprensión de las características clínicas y angiográficas de esta enfermedad frente a la arteriosclerosis obliterante.

50 Aunque la causa es desconocida, la enfermedad Buerger no se ha documentado en no fumadores, lo cual implica al consumo de cigarrillos como factor etiológico principal, quizás como un tipo retrasado de hipersensibilidad o angitis tóxica. La tromboangitis obliterante puede ser una reacción al tabaco en personas con un fenotipo específico, debido a la mayor prevalencia de HLA-A9 y HLA-B5 en personas con la enfermedad; o un trastorno autoinmunitario con sensibilidad mediada por células frente al colágeno humano de tipo I y III, que son constituyentes de los vasos sanguíneos.

55 A diferencia de la aterosclerosis, la enfermedad de Buerger no implica a las arterias coronaria.

60 La enfermedad implica a las arterias de tamaño pequeño y mediano y, con frecuencia, a venas superficiales de las extremidades con un patrón segmentado. En casos raros, cuando la enfermedad está avanzada, resultan afectados vasos en otras partes del cuerpo. El aspecto patológico es el de una panarteritis o panflebitis no supurante con trombosis de los vasos implicados. La proliferación de células endoteliales y la infiltración de la capa íntima con linfocitos se produce en la lesión aguda, pero la lámina elástica interna permanece intacta. El trombo se organiza y después se recanaliza de forma incompleta. El medio se conserva bien pero puede resultar infiltrado por fibroblastos. Debido a que la túnica adventicia resulta infiltrada por fibroblastos de forma más extensiva, las lesiones más antiguas muestran fibrosis periarterial, lo cual también puede implicar a las venas y nervios adyacentes.

65 Los síntomas y señales son aquellos de la isquemia arterial y de la tromboflebitis superficial. La aparición es gradual, comenzando en los vasos más distales de las extremidades superiores e inferiores, y avanzando hasta la zona proximal, culminando en gangrena distal. El paciente puede quejarse de sensación de frío, entumecimiento, hormigueo

o quemazón antes de que existan pruebas objetivas de la enfermedad. El fenómeno de Raynaud es habitual. Aparece claudicación intermitente en la extremidad implicada (normalmente el empeine del pie o la pierna, pero en casos raros en las manos, los brazos o los muslos). El dolor resulta persistente con isquemia más grave, por ejemplo, en la etapa pregangrenosa y con ulceración o gangrena. Con frecuencia, la sobreactividad del nervio simpático se manifiesta en
5 sensación de frío, sudoración excesiva y cianosis de la extremidad implicada, probablemente provocadas por el dolor grave y persistente.

La ulceración isquémica y la gangrena, habitualmente de uno o más dedos, puede aparecer en las etapas tempranas de la enfermedad pero no de forma aguda. Los estudios no invasivos muestran una disminución en el flujo y presión
10 sanguíneos en los dedos de los pies, los pies y los dedos de las manos afectados. La enfermedad avanza de manera proximal.

Otra enfermedad vascular periférica es la enfermedad arterial periférica, en la que los pacientes con enfermedad arterial periférica (PAD) de las extremidades inferiores pueden avanzar hasta una isquemia grave que ponga en peligro
15 a las extremidades. Un dolor isquémico en reposo, ulceraciones que no se curan y gangrena son indicios de que la situación es mala. Estos pacientes tienen un alto riesgo de perder las extremidades. Son necesarias una detección y evaluación rápidas de la isquemia grave de extremidades, seguidas de una eficaz revascularización, para que se salven las extremidades y se conserve la salud global.

Una isquemia crítica de las extremidades crónica es el resultado final de la enfermedad arterial oclusiva, de manera más habitual la aterosclerosis. Además de la aterosclerosis en asociación con hipertensión, hipercolesterolemia, el consumo de cigarrillos y la diabetes, otras causas menos frecuentes de isquemia crítica de las extremidades crónica incluyen la enfermedad de Buerger, o tromboangitis obliterante, y algunas formas de arteritis.

El desarrollo de isquemia crítica de las extremidades crónica normalmente requiere múltiples sitios de obstrucción arterial que reduzcan gravemente el flujo de sangre hacia los tejidos. Una isquemia de tejidos crítica se manifiesta de forma clínica como dolor en reposo, heridas que no se curan (debido a los mayores requerimientos metabólicos de la curación de heridas) o necrosis de tejidos (gangrena).

El dolor isquémico en reposo se ha descrito de forma clásica como un dolor quemante en la bola del pie y los dedos de los pies que empeora durante la noche cuando el paciente está en la cama. El dolor isquémico en reposo se localiza en el pie, en donde el tejido se encuentra más alejado del corazón y distal a las oclusiones arteriales. Las heridas que no se curan se encuentran normalmente en las áreas de un traumatismo en el pie provocado por zapatos mal ajustados o por una lesión. Se considera que una herida no se cura, cuando no responde a un ensayo
30 de 4 a 12 semanas de terapia conservadora, tal como cambios regulares de vendas, evitar traumatismos, tratamiento de la infección y desbridación del tejido necrótico.

Normalmente la gangrena aparece en los dedos de los pies. Se desarrolla cuando el suministro de sangre es tan pequeño que se produce una necrosis espontánea en los tejidos que peor son perfusionados.

Aunque una terapia conservadora cuidadosamente diseñada puede beneficiar a muchos pacientes con isquemia crítica de las extremidades, la naturaleza grave de su enfermedad puede conducir a considerar una intervención operativa. Las intervenciones quirúrgicas incluyen la revascularización o la amputación. Si el paciente quiere someterse a una revascularización y es un candidato operativo aceptable, a menudo se realiza una arteriografía para la posterior
45 evaluación y planificación de la revascularización. En algunos centros se utiliza la angiografía de resonancia magnética como alternativa o complemento de la arteriografía para minimizar el riesgo de exposición al tinte. La conservación de la extremidad mediante revascularización es más barata, conduce a una mejor calidad de vida para la mayoría de los pacientes y está asociada con una menor morbilidad y mortalidad perioperativa que la amputación. La conservación de la extremidad debe ser el objetivo en la mayoría de las pacientes con isquemia crítica de las extremidades
50 crónica.

La viabilidad de la revascularización se determina mediante los descubrimientos arteriográficos, así como por la disponibilidad de un conducto de bypass. La angioplastia o la colocación de una endoprótesis vascular, o ambas, tiene más éxito con lesiones pequeñas, proximales, tales como las que aparecen en pacientes con claudicación, pero no es probable que sea el único tratamiento necesario en el caso de una isquemia crítica de las extremidades debido a la naturaleza de múltiples niveles de la enfermedad arterial oclusiva. El conducto ideal del bypass es la vena safena mayor, pero otros conductos incluyen las venas safenas menores, las venas del brazo o un conducto protésico. En la mayoría de las series quirúrgicas, las proporciones de patencia del bypass a los tres años en arterias de ternero varían del 40% para los bypass protésicos al 85% para bypass de la vena safena. En comparación, los estudios de terapia conservadora han demostrado una proporción de éxito del 25% al 49% con heridas que no se curan, y un porcentaje de mejora del 50% al 89% en el dolor isquémico en reposo.

La amputación primaria puede resultar indicada en ciertos pacientes, tales como los que presentan necrosis extensiva de tejidos, infecciones que ponen en peligro la vida o lesiones que no son susceptibles a la revascularización. La decisión de controlar la condición del paciente con una espera atenta y un tratamiento conservador, o de realizar la revascularización o amputación depende de una cuidadosa evaluación de los beneficios y riesgos asociados de la cirugía frente a un tratamiento conservador.

De manera más importante, depende de la interpretación del paciente de la invasividad o adecuación de las opciones disponibles. Incluso los pacientes que no pueden andar debido a su condición pueden considerar inapropiada la imputación, y no todos los pacientes están motivados para realizar el trabajo necesario de rehabilitación después de la amputación. Si se toma la decisión de amputar, el nivel de amputación debe ser el que proporcione la mayor probabilidad de curación, al mismo tiempo que ofrezca la máxima oportunidad al paciente para lograr una rehabilitación funcional.

El diagnóstico de la isquemia crítica de las extremidades crónica implica un dolor manifestado en reposo, heridas que no se curan y gangrena. El dolor isquémico en reposo se describe, de forma típica, como un dolor de quemazón en el empeine o la parte distal del pie que aparece cuando el paciente se encuentra en posición recostada pero que se alivia cuando el paciente vuelve a una posición en la cual los pies están suspendidos. Los parámetros hemodinámicos objetivos que apoyan el diagnóstico de la isquemia crítica de las extremidades incluyen un índice tobillo-braquial de 0,4 o menor, una presión sistólica en el tobillo de 50 mm Hg o menor, o una presión sistólica en los dedos de los pies de 30 mm Hg o menor. La intervención puede incluir la terapia conservadora, la revascularización o la amputación. Una gangrena progresiva, unas heridas que se agrandan con rapidez o un dolor isquémico continuo en reposo pueden significar un peligro para la extremidad y sugieren la necesidad de revascularización en pacientes sin riesgos operativos prohibitivos. A menudo se requieren implantes de bypass debido a la naturaleza distal y de múltiples niveles del estrechamiento arterial en la isquemia crítica de las extremidades. Es más probable que los pacientes con diabetes tengan, en relación con otros pacientes, una enfermedad distal menos susceptible a un injerto de bypass. Comparado con la amputación, la revascularización es más barata y está asociada con una mejor morbilidad y mortalidad perioperativa. La conservación de la extremidad debe ser el objetivo en la mayoría de las pacientes con isquemia crítica de las extremidades.

En la actualidad, el principal tratamiento de las enfermedades vasculares periféricas incluye un tratamiento invasivo, tal como la angioplastia o incluso la amputación de la extremidad. La identificación de fármacos que estimulen la neovascularización periférica sin aumentar el avance de la placa aterosclerótica es de gran importancia terapéutica en este campo médico.

30 Sumario de la invención

La invención se basa en el descubrimiento de que un inhibidor de IL-18 estimula la neovascularización después de la inducción de isquemia periférica en un modelo animal experimental. La neovascularización se produce en asociación con la activación de la señalización de VEGF/Akt y viene acompañada de un aumento en la movilización y diferenciación de células progenitoras endoteliales de la médula ósea.

Basándose en estos resultados, se proporcionan nuevas estrategias terapéuticas para tratar o prevenir las enfermedades vasculares periféricas que requieren neo- o revascularización.

40 Por tanto, la invención se refiere al uso de un inhibidor de IL-18 según se define en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

45 Fig. 1: muestra A) una microangiografía representativa de la pata trasera derecha isquémica e izquierda no isquémica, 3 y 28 días después de la oclusión de la arteria femoral en ratones. B) Muestra la puntuación angiográfica isquémica/no isquémica en ratones tratados con pcDNA3-mIL18BP (IL-18BP) o plásmido vacío (control) durante 3 ó 28 días. Los valores son la media \pm MEE, n = 7 por grupo. $**p < 0,01$ frente a ratones control.

50 Fig. 2: muestra A) cambios inducidos por la isquemia en el flujo sanguíneo de las patas traseras controlados *in vivo* mediante formación de imágenes de perfusión mediante láser Doppler en ratones tratados con pcDNA3-mIL18BP (IL-18 BP) o plásmido vacío (control). En las imágenes con un código de colores, la perfusión normal aparece en rojo, y una reducción marcada en el flujo sanguíneo de la pata trasera isquémica aparece en azul. B) Evaluación cuantitativa del flujo sanguíneo expresada como la proporción entre el flujo sanguíneo en la extremidad isquémica y el flujo sanguíneo en la extremidad no isquémica. Los valores son la media \pm MEE, n = 7 por grupo. $**p < 0,01$ frente a ratones control.

60 Fig. 3: muestra A) una transferencia Western representativa del contenido en proteína VEGF en la pata no isquémica e isquémica, 28 días después de la oclusión de la arteria femoral. B) Evaluación cuantitativa de los niveles de proteína VEGF expresada como la proporción entre el contenido en proteínas en la extremidad isquémica y el contenido en proteínas en la extremidad no isquémica. Los valores son la media \pm MEE, n = 7 por grupo. $**p < 0,01$ frente al control no isquémico, y $\dagger p < 0,05$ frente al control isquémico.

65 Fig. 4: muestra A) una transferencia Western representativa del contenido en proteína fosfo-Akt en la pata no isquémica e isquémica, 28 días después de la oclusión de la arteria femoral. B) Evaluación cuantitativa de los niveles de proteína fosfo-Akt expresada como la proporción entre el contenido en proteínas en la extremidad isquémica y el contenido en proteínas en la extremidad no isquémica. Los valores son la media \pm MEE, n = 7 por grupo. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ frente al control no isquémico, y $\dagger p < 0,05$ frente al control isquémico.

Fig. 5: A) Imágenes representativas de EPC (“endothelial progenitor cells”, células progenitoras endoteliales) aisladas a partir de médula ósea de ratones sin ligadura de la arteria femoral (falsos) y de ratones tratados con pcDNA3-mIL18BP (IL-18BP) o plásmido vacío (control). Las EPC se caracterizaron como células adherentes con tinción doble positiva para AcLDL-Dil y factor de von-Willebrand (vWF). B) Cuantificación de las células doble positivas en ratones tratados con pcDNA3-mIL18BP o plásmido vacío. Los valores son la media \pm MEE, n = 5 por grupo. ***p<0,001, frente a los ratones control, y ††† p<0,001, frente a ratones sin ligadura de la arteria femoral (falsos).

Descripción detallada de la invención

La presente invención está basada en el descubrimiento de que los inhibidores de IL-18 aumentan significativamente la angiogénesis postisquémica después de isquemia en una extremidad sin afectar a la densidad de los vasos de la extremidad no isquémica en un modelo de enfermedad murino *in vivo*. Por tanto, la invención proporciona una nueva estrategia terapéutica para tratar o prevenir las enfermedades vasculares periféricas que requieren una mayor perfusión de los tejidos.

Por tanto, la invención se refiere al uso de un inhibidor de IL-18 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad vascular periférica.

El término “prevención” en el contexto de esta invención se refiere no sólo a una prevención completa de un cierto efecto, sino también a cualquier prevención, atenuación, reducción, disminución o decrecimiento parcial o sustancial del efecto antes o en la aparición temprana de la enfermedad.

El término “tratamiento” en el contexto de esta invención se refiere a cualquier efecto beneficioso sobre el avance de la enfermedad que incluye la atenuación, la reducción, la disminución o el decrecimiento del desarrollo patológico una vez iniciada la enfermedad.

La expresión “enfermedad vascular periférica”, tal como se emplea en la presente, se refiere a enfermedades o trastornos que afectan a las arterias, venas y conductos linfáticos de las extremidades. Los trastornos vasculares periféricos pueden ser arteriales (oclusivos o funcionales), venosos, arteriovenosos combinados (por ejemplo, una fístula arteriovenosa), o linfáticos. La enfermedad arterial oclusiva incluye la oclusión arterial periférica y la tromboangiitis obliterante. Los trastornos arteriales funcionales pueden ser vasoespásticos (enfermedad y fenómeno de Raynaud, acrocianosis) o vasodilatadores (eritromelalgia). También pueden aparecer de forma secundaria a un fallo local en los vasos sanguíneos o a trastornos en la actividad del sistema nervioso simpático, o pueden acompañar a una enfermedad vascular orgánica. Las enfermedades venosas incluyen la trombosis venosa y las venas varicosas, los trastornos arteriovenosos combinados incluyen la fístula arteriovenosa, y los trastornos linfáticos incluyen el linfedema y el lipedema.

La expresión “enfermedad vascular periférica” pretende incluir todas las indicaciones médicas, enfermedades, trastornos o síntomas descritos en los antecedentes de la invención anteriormente.

La expresión “inhibidor de IL-18” en el contexto de esta invención se refiere a cualquier molécula que module la producción y/o la acción de IL-18, de modo que la producción y/o la acción de IL-18 se atenúe, se reduzca, o se evite o se bloquee parcial, sustancial o completamente.

Un inhibidor de la producción puede ser cualquier molécula que afecte negativamente a la síntesis, el procesamiento o a la maduración de IL-18. Los inhibidores considerados en la invención pueden ser, por ejemplo, supresores de la expresión génica de la interleuquina IL-18, ARNm antisentido que reducen o previenen la transcripción del ARNm de IL-18 o que conducen a la degradación del ARNm, proteínas que impiden el plegamiento correcto, o que evitan parcial o sustancialmente la secreción de IL-18, proteasas que degradan la IL-18 tras haber sido sintetizada, inhibidores de proteasas que rompen la pro-IL-18 que genera la IL-18 madura, tales como inhibidores de caspasa-1, y similares.

Un inhibidor de la acción de IL-18 puede ser, por ejemplo, un antagonista de IL-18. Los antagonistas se pueden unir o pueden secuestrar la molécula de IL-18 misma, con una afinidad y una especificidad suficientes para neutralizar parcial o sustancialmente la IL-18 o el(los) sitio(s) de unión de IL-18 responsable(s) de la unión de IL-18 a sus ligandos (como, por ejemplo, a sus receptores). Un antagonista también puede inhibir la vía de señalización de IL-18, que se activa dentro de las células tras la unión de la IL-18 a su receptor de unión.

Los inhibidores de la acción de IL-18 también pueden ser receptores de IL-18 solubles o moléculas que imiten a estos receptores, o agentes que bloquean los receptores de IL-18, o anticuerpos contra IL-18, tales como anticuerpos policlonales o monoclonales, o cualquier otro agente o molécula que evite la unión de IL-18 a sus dianas, disminuyendo o evitando, con ello, la activación de las reacciones intra- o extracelulares mediadas por IL-18.

En una realización preferida de la invención, la enfermedad vascular periférica es la enfermedad arterial periférica.

La “enfermedad arterial periférica” es un trastorno que implica el estrechamiento de las arterias en cualquier punto desde los brazos hasta la aorta y las arterias de las piernas. La aparición puede ser repentina o gradual y produce, en general, isquemia (disminución del transporte de oxígeno hacia el área suministrada por el vaso).

ES 2 314 191 T3

Preferiblemente, según la presente invención, la enfermedad arterial periférica implica a las extremidades inferiores. La oclusión o enfermedad arterial periférica puede ser crónica o aguda. La enfermedad arterial periférica está asociada frecuentemente con una claudicación.

5 Por tanto, la presente invención se refiere además al uso de un inhibidor de la IL-18 para el tratamiento y/o prevención de la claudicación. La claudicación es un dolor en la pierna, en particular en la pantorrilla, que aparece y desaparece y provoca cojera. La claudicación se advierte, de forma típica, cuando se está andando y desaparece en reposo. Por tanto, se denomina habitualmente claudicación intermitente. La naturaleza habitualmente intermitente del dolor de la claudicación es debida a un suministro inadecuado temporal de oxígeno a los músculos de la pierna.
10 El deficiente suministro de oxígeno es el resultado de un estrechamiento u oclusión de las arterias que suministran sangre a la pierna. Esto limita el suministro de oxígeno a los músculos de la pierna y se advierte, en especial, cuando el requerimiento de oxígeno de estos músculos aumenta con el ejercicio o el paseo.

15 En una realización preferida de la invención, la enfermedad vascular periférica es la tromboangitis obliterante (enfermedad de Buerger). La “enfermedad de Buerger” es una enfermedad obliterante caracterizada por cambios inflamatorios en arterias y venas de pequeño y mediano tamaño que a menudo se produce en fumadores, predominantemente en hombres de 20 a 40 años.

20 La enfermedad implica a las arterias de tamaño pequeño y mediano y, con frecuencia, a venas superficiales de las extremidades con un patrón segmentado.

25 En otra realización preferida, la enfermedad vascular periférica es la isquemia periférica, en particular la isquemia de las extremidades. La “isquemia” es una deficiencia en el suministro de sangre, en general debido a una oclusión o un traumatismo en los vasos sanguíneos. La “isquemia periférica” se refiere, en particular, a la isquemia en las extremidades, es decir, los brazos o las piernas, que conduce a una deficiencia en el suministro de oxígeno del correspondiente tejido de la extremidad.

30 En otra realización de la presente invención, la isquemia de las extremidades es la isquemia crítica de las extremidades. La “isquemia crítica de las extremidades” es un estado en que el suministro de sangre a la extremidad es tan bajo que amenaza su supervivencia. La presencia de dolor en reposo, ulceración o gangrena indica una isquemia crítica de las extremidades. La gangrena es el término utilizado para describir al tejido muerto, y a menudo se produce como resultado o en combinación con isquemia de las extremidades. Una úlcera isquémica es provocada por un suministro inadecuado de sangre.

35 La isquemia crítica de las extremidades, incluyendo gangrena o úlceras, requiere la revascularización para evitar la amputación de la extremidad. Por tanto, la presente invención se refiere además al uso de inhibidores de la IL-18 para el tratamiento y/o prevención de la gangrena y las úlceras.

40 La consecuencia final de una enfermedad vascular periférica y, en particular, de la isquemia periférica puede ser la amputación de la extremidad afectada, en particular la extremidad inferior o pie afectado. Una revascularización conduce a la reperfusión del tejido afectado y, por tanto, ayuda al proceso de curación.

45 Por tanto, la invención se refiere además al uso de un inhibidor de IL-18 para la fabricación de un medicamento para la prevención de la amputación de las extremidades, en particular de una extremidad inferior, pie o dedo(s) del pie.

50 El inhibidor de IL-18 se selecciona de inhibidores de la caspasa-1 (ICE), anticuerpos dirigidos contra IL-18, anticuerpos dirigidos contra cualquiera de las subunidades del receptor de IL-18, inhibidores de la vía de señalización de IL-18, antagonistas de IL-18 que compiten con IL-18 y bloquean al receptor de IL-18, y proteínas de unión a IL-18 o sus isoformas, muteínas, proteínas condensadas, derivados funcionales, fracciones activas o derivados circularmente permutados que inhiban la actividad biológica de IL-18.

55 La expresión “proteínas de unión a IL-18” se emplea en la presente como sinónimo de “proteína de unión a IL-18” o “IL18BP”. Comprende proteínas de unión a IL-18 como se define en el documento WO 99/09063, o en Novick *et al.*, 1999, incluyendo los variantes de corte y empalme y/o las isoformas de las proteínas de unión a IL-18, como se define en Kim *et al.*, 2000, que se unen a IL-18. En particular, las isoformas humanas a y c de IL-18BP son útiles según la presente invención. Las proteínas útiles según la presente invención puede estar glicosiladas o no glicosiladas, pueden derivarse de fuentes naturales, tales como orina, o puede producirse preferiblemente de modo recombinante. La expresión recombinante puede realizarse en sistemas de expresión procariotas, como *E. coli*, o en sistemas de expresión eucariotas, y preferiblemente de mamíferos. Una línea celular que resulta particularmente adecuada para la expresión de proteínas de mamífero es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO).
60

65 Tal como se emplea en la presente, el término “muteínas” se refiere a análogos de una IL-18BP, o análogos de una IL-18BP vírica, en los que uno o más restos aminoácidos de una IL-18BP natural o IL-18BP vírica está reemplazado por restos aminoácidos diferentes, o están delecionados, o uno o más restos aminoácidos se añaden a la secuencia natural de una IL-18BP, o una IL-18BP vírica, sin cambiar considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con la IL-18BP de tipo salvaje o IL-18BP vírica. Estas muteínas se preparan mediante síntesis conocidas y/o mediante técnicas de mutagénesis dirigida específica de sitio, o mediante cualquier otra técnica conocida adecuada para ello.

ES 2 314 191 T3

Las muteínas según la presente invención incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, que se hibrida con ADN o ARN, que codifica una IL-18BP o que codifica una IL-18BP vírica, como se describe en el documento WO 99/09063, bajo condiciones rigurosas. La expresión "condiciones rigurosas" se refiere a las condiciones de hibridación y posterior lavado que los expertos en la técnica denominan convencionalmente "rigurosas". Véase Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, *supra*, Interscience, N.Y., §§6.3 y 6.4 (1987, 1992), y Sambrook *et al.*, *supra*. Sin limitación, los ejemplos de condiciones rigurosas incluyen condiciones de lavado 12-20°C por debajo de la T_m calculada del híbrido bajo estudio, por ejemplo, en 2 x SSC y SDS al 0,5% durante 5 minutos, 2 x SSC y SDS al 0,1% durante 15 minutos; 0,1 x SSC y SDS al 0,5% a 37°C durante 30-60 minutos y, a continuación, 0,1 x SSC y SDS al 0,5% a 68°C durante 30-60 minutos. Los expertos en la técnica entenderán que las condiciones rigurosas también dependen de la longitud de las secuencias de ADN, las sondas oligonucleotídicas (tales como 10-40 bases) o las sondas oligonucleotídicas mixtas. Si se emplean sondas mixtas, resulta preferible utilizar cloruro de tetrametilamonio (TMAC) en lugar de SSC. Véase Ausubel, *supra*.

Cualquier de estas muteínas preferiblemente tiene una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicada de la de una IL-18BP, o suficientemente duplicada de una IL-18BP vírica, de manera que tenga una actividad comparable a la IL-18BP. Una actividad de la IL-18BP es su capacidad para unirse a IL-18. Siempre que la muteína tenga una actividad de unión sustancial con la IL-18 puede utilizarse en la purificación de IL-18, tal como mediante una cromatografía de afinidad y, por tanto, puede considerarse que tiene una actividad sustancialmente similar a la IL-18BP. Por tanto, puede determinarse si cualquier muteína dada tiene sustancialmente la misma actividad que IL-18BP mediante experimentación rutinaria que comprende someter a dicha muteína, por ejemplo, a un ensayo de competición de "sandwich" sencillo para determinar si se une o no a una IL-18 marcada de forma apropiada, tal como un radioinmunoensayo o un ensayo ELISA.

Cualquiera de estas muteínas tiene una coincidencia u homología de al menos 40% con la secuencia de una IL-18BP o un homólogo de IL-18BP codificado en virus, según se define en el documento WO 99/09063. Más preferiblemente, tiene una coincidencia u homología de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o, lo más preferible, al menos 90% con éstas.

Las muteínas de polipéptidos de IL-18BP o las muteínas de IL-18BP víricas que pueden utilizarse según la presente invención, o el ácido nucleico que las codifica, incluyen un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes, como polinucleótidos o péptidos de sustitución, que un experto en la técnica puede obtener de manera rutinaria sin experimentación indebida, basándose en las indicaciones y directrices presentadas en la presente.

Los cambios para las muteínas según la presente invención son lo que se conoce como sustituciones "conservadoras". Las sustituciones de aminoácidos conservadoras de polipéptidos o proteínas de IL-18BP o IL-18BP víricos pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tengan unas propiedades fisicoquímicas suficientemente similares de forma que la sustitución entre miembros del grupo conservará la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Está claro que las inserciones y las deleciones de aminoácidos también se pueden realizar en las secuencias definidas anteriormente sin alterar su función, en particular si las inserciones o las deleciones sólo implican a unos pocos aminoácidos, por ejemplo, menos de treinta, y preferiblemente menos de diez, y no eliminan o desplacen a los aminoácidos que son decisivos para una conformación funcional, por ejemplo, los restos cisteína. Las proteínas y las muteínas producidas mediante tales deleciones y/o inserciones entran en el ámbito de la presente invención.

Preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la tabla 1. Más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la tabla 2; y lo más preferible, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la tabla 3.

TABLA 1

Grupos preferidos de aminoácidos sinónimos

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

ES 2 314 191 T3

5	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
10	Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
	Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
	Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
15	Asp	Glu, Asn, Asp
	Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
	Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
20	Trp	Trp

TABLA 2

Grupos de Aminoácidos Sinónimos Más Preferidos

30	Aminoácido	Grupo Sinónimo
	Ser	Ser
	Arg	His, Lys, Arg
35	Leu	Leu, Ile, Phe, Met
	Pro	Ala, Pro
	Thr	Thr
40	Ala	Pro, Ala
	Val	Val, Met, Ile
	Gly	Gly
45	Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
	Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
50	Tyr	Phe, Tyr
	Cys	Cys, Ser
	His	His, Gln, Arg
55	Gln	Glu, Gln, His
	Asn	Asp, Asn
60	Lys	Lys, Arg
	Asp	Asp, Asn
	Glu	Glu, Gln
65	Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
	Trp	Trp

ES 2 314 191 T3

TABLA 3

Grupos de aminoácidos sinónimos más preferidos

	Aminoácido	Grupo Sinónimo
5	Ser	Ser
	Arg	Arg
10	Leu	Leu, Ile, Met
	Pro	Pro
15	Thr	Thr
	Ala	Ala
	Val	Val
20	Gly	Gly
	Ile	Ile, Met, Leu
25	Phe	Phe
	Tyr	Tyr
	Cys	Cys, Ser
30	His	His
	Gln	Gln
	Asn	Asn
35	Lys	Lys
	Asp	Asp
40	Glu	Glu
	Met	Met, Ile, Leu
45	Trp	Met

Los ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que pueden emplearse para obtener muteínas de polipéptidos o proteínas de IL-18BP, o muteínas de IL-18BP víricas, para su uso en la presente invención incluyen cualquiera de las etapas de métodos conocidos, tales como las presentadas en las patentes de EEUU 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462 de Mark *et al.*; 5.116.943 de Kothe *et al.*, 4.965.195 de Namen *et al.*; 4.879.111 de Chong *et al.*; y 5.017.691 de Lee *et al.*; y las proteínas sustituidas con lisina, presentadas en la patente de EE.UU. n° 4.904.584 (Shaw *et al.*).

La expresión “proteínas condensadas” se refiere a un polipéptido que comprende una IL-18BP, o una IL-18BP vírica, o una muteína o fragmento de éstas, condensado con otra proteína que, por ejemplo, tenga un mayor tiempo de residencia en los fluidos corporales. Por tanto, una IL-18BP o una IL-18BP vírica puede estar condensada a otra proteína, polipéptido o similares, por ejemplo, una inmunoglobulina o su fragmento.

Los “derivados funcionales”, tal como se emplean en la presente, cubren a los derivados de IL-18BP o de IL-18BP víricas, y sus muteínas y proteínas condensadas, que pueden prepararse a partir de los grupos funcionales que aparecen como cadenas laterales sobre los restos o los grupos N- o C-terminales, mediante medios conocidos en la técnica, y se incluyen en la invención con la condición de que sigan siendo farmacéuticamente aceptables, es decir, no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de una IL-18BP, o IL-18BP víricas, y que no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen.

Estos derivados pueden incluir cadenas laterales de polietilenglicol, que pueden enmascarar a los sitios antigénicos y extender la residencia de una IL-18BP o una IL-18BP vírica en los fluidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo mediante una reacción con amoniaco o con aminas primarias o secundarias, derivados de N-acilo de grupos amino libres de los restos aminoácidos formados con

ES 2 314 191 T3

restos acilo (por ejemplo, grupos alcanofilo o arofilo carbocíclicos) o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres (por ejemplo, los de los restos serilo o treonilo) formados con restos acilo.

5 Con la expresión "fracciones activas" de una IL-18BP, o una IL-18BP vírica, sus muteínas y proteínas condensadas, la presente invención cubre cualquier fragmento o precursor de la cadena polipeptídica de la molécula de proteína individual o junto con moléculas asociadas o restos unidos a ella, por ejemplo, restos azúcar o fosfato, o agregados de la molécula de proteína o los restos azúcar individuales, con la condición de que dicha fracción tenga una actividad sustancialmente similar a la de IL-18BP.

10 En otra realización preferida de la invención, el inhibidor de IL-18 es un anticuerpo dirigido contra IL-18 o su receptor, el IL-18R. Los anticuerpos dirigidos contra cualquiera de las subunidades de IL-18R, denominadas IL-18R α y β , pueden utilizarse según la presente invención.

15 Los anticuerpos según la invención pueden ser policlonales o monoclonales, quiméricos, humanizados o, incluso, totalmente humanos. Los anticuerpos recombinantes y sus fragmentos se caracterizan por su unión de alta afinidad de unión a IL-18 o IL-18R *in vivo* y su baja toxicidad. Los anticuerpos que pueden utilizarse en la invención se caracterizan por su capacidad para tratar pacientes durante un periodo suficiente como para producir una regresión o alivio de bueno a excelente de la afección patogénica o de cualquier síntoma o grupo de síntomas relacionados con una afección patogénica, y una baja toxicidad.

20 Los anticuerpos neutralizantes pueden generarse con facilidad en animales, tales como conejos, cabras o ratones, mediante una inmunización con IL-18 o IL-18R α o β . Los ratones inmunizados son particularmente útiles para proporcionar fuentes de células B para la fabricación de hibridomas, que, a su vez, se cultivan para producir grandes cantidades de anticuerpos monoclonales anti-IL-18.

25 Los anticuerpos quiméricos son moléculas de inmunoglobulinas caracterizadas por dos o más segmentos o porciones derivadas de especies animales diferentes. En general, la región variable del anticuerpo quimérico se obtiene a partir de un anticuerpo de mamífero no humano, tal como un anticuerpo monoclonal murino, y la región constante de la inmunoglobulina se obtiene a partir de una molécula de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, tanto las regiones como la combinación tienen una inmunogenicidad baja, según se determina de manera rutinaria (Elliott *et al.*, 1994).
30 Los anticuerpos humanizados son moléculas de inmunoglobulinas creadas mediante técnicas de ingeniería genética en las que las regiones constantes murinas son reemplazadas por sus homólogos humanos mientras que se mantienen las regiones murinas de unión al antígeno. El anticuerpo quimérico de ratón-humano resultante tiene preferiblemente una menor inmunogenicidad y una mejor farmacocinética en seres humanos (Knight *et al.*, 1993).

35 Por tanto, en otra realización preferida, el anticuerpo contra IL-18 o IL-18R es un anticuerpo humanizado. Los ejemplos preferidos de anticuerpos anti-IL-18 humanizados se describen en la solicitud de patente europea EP 0974600, por ejemplo.

40 En otra realización preferida, el anticuerpo es totalmente humano. La tecnología para producir anticuerpos humanos se describe en detalle, por ejemplo, en los documentos WO00/76310, WO99/53049, US 6.162.963 o AU5336100.

45 Un método para la preparación de anticuerpos completamente humanos consiste en la "humanización" del sistema inmunológico humoral de ratón, es decir en la producción de razas de ratón capaces de producir Ig humana (xenorratones), mediante la introducción de loci de inmunoglobulinas (Ig) humanas en ratones en los cuales se han inactivado los genes Ig endógenos. Los loci de Ig son complejos en términos tanto de su estructura física como de los procesos de expresión y redistribución de los genes requeridos para producir, en último término, una amplia respuesta inmunológica. La diversidad de anticuerpos es principalmente generada por una redistribución combinatoria entre diferentes genes V, D, y J presentes en los loci de Ig. Estos loci también contienen los elementos reguladores interespaciados, los cuales controlan la expresión de los anticuerpos, la exclusión alélica, el cambio de clases y la maduración de afinidad.
50 La introducción de transgenes de Ig humana no redispuestos en ratones ha demostrado que la maquinaria de recombinación en ratones es compatible con genes humanos. Además, pueden obtenerse hibridomas que segregan hu-mAbs específicos de antígenos con diversos isotipos mediante inmunización de xenorratones con un antígeno.

55 Los anticuerpos totalmente humanos y los métodos para su preparación son conocidos en la técnica (Mendez *et al.* (1997); Buggemann *et al.* (1991); Tomizuka *et al.*, (2000); patente WO 98/24893).

60 En una realización muy preferida de la presente invención, el inhibidor de la IL-18 es un IL-18BP, o sus isoformas, muteínas, proteínas condensadas, derivados funcionales, fracciones activas o derivados circularmente permutados. Estas isoformas, muteínas, proteínas condensadas o derivados funcionales mantienen la actividad biológica de IL-18BP, en la unión a IL-18, y preferiblemente tienen esencialmente al menos una actividad similar a IL-18BP. De manera ideal, estas proteínas tienen una mayor actividad biológica, comparadas con IL-18BP sin modificar. Las fracciones activas preferidas tienen una actividad que es mejor que la actividad de IL-18BP, o tienen otras ventajas, tales como una mejor estabilidad o una menor toxicidad o inmunogenicidad, o son más fáciles de producir en grandes cantidades, o más fáciles de purificar.

65 Las secuencias de IL-18BP y sus isoformas/variantes de corte y empalme pueden obtenerse en el documento WO99/09063, o en Novick *et al.*, 1999, así como en Kim *et al.*, 2000.

Los derivados funcionales de IL-18BP pueden conjugarse con polímeros para mejorar las propiedades de la proteína, tales como la estabilidad, semivida, biodisponibilidad, tolerancia por el cuerpo humano, o inmunogenicidad. Para lograr este objetivo, la IL18-BP puede unirse, por ejemplo, a polietilenglicol (PEG). La PEGilación se puede realizar mediante métodos conocidos, descritos en el documento WO 92/13095, por ejemplo.

Por tanto, en una realización de la presente invención, los inhibidores de IL-18, e IL-18BP están PEGilados.

En otra realización de la invención, el inhibidor de IL-18 comprende una fusión de inmunoglobulina, es decir, el inhibidor de IL-18 es una proteína condensada que comprende todo o parte de una proteína de unión a IL-18, que está condensada con toda o una porción de una inmunoglobulina. Los métodos para fabricar proteínas de fusión con inmunoglobulinas son bien conocidos en la técnica, tales como los descritos en el documento WO 01/03737, por ejemplo. Los expertos en la técnica comprenderán que la proteína de fusión de la invención resultante mantiene la actividad biológica de IL-18BP, en particular la unión a IL-18. La fusión puede ser directa, o a través de un péptido conector corto que puede ser tan corto como de 1 a 3 restos aminoácidos de longitud o más largo, por ejemplo, de 13 a 20 restos aminoácidos de longitud. Dicho conector puede ser un tripéptido con la secuencia E-F-M (Glu-Phe-Met), por ejemplo, o una secuencia conectora de 13 aminoácidos que comprende Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met introducidos entre la secuencia de IL-18BP y la secuencia de la inmunoglobulina. La proteína de fusión resultante tiene unas propiedades mejoradas, tales como un tiempo de residencia más largo en los fluidos corporales (semivida), una actividad específica incrementada, un nivel de expresión acrecentado o se facilita la purificación de la proteína de fusión.

En una realización preferida, la IL-18BP se condensa con la región constante de una molécula de Ig. Preferiblemente, se condensa con regiones de la cadena pesada, tales como los dominios CH2 y CH3 de la IgG1 o IgG2 humana, por ejemplo. La generación de proteínas de fusión específicas que comprenden IL-18BP y una porción de una inmunoglobulina se describen en el ejemplo 11 del documento WO 99/09063, por ejemplo. Otras isoformas de las moléculas de Ig también resultan adecuadas para la generación de proteínas de fusión según la presente invención, tales como las isoformas IgG₂ o IgG₄, u otras clases de Ig, tales como IgM o IgA, por ejemplo. Las proteínas de fusión pueden ser monómeras o multímeras, hetero- u homomultímeras.

En otra realización de la invención, se emplea un inhibidor de IL-18 en combinación con una o más moléculas diferentes activas en las afecciones clínicas de la invención, tales como vasodiladores, bloqueantes de Ca, aspirina, beta-bloqueantes o similares. También pueden utilizarse antagonistas de TNF en combinación con un inhibidor de IL-18 según la presente invención, por ejemplo. Los antagonistas de TNF ejercen su actividad de distintos modos. En primer lugar, los antagonistas pueden unirse o secuestrar la molécula de TNF misma con la suficiente afinidad y especificidad para parcial o sustancialmente neutralizar el epitopo o epitopos responsables de la unión del TNF al receptor (en lo sucesivo denominados "antagonistas secuestrantes"). Un antagonista secuestrante puede ser, por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra TNF.

Como alternativa, los antagonistas de TNF pueden inhibir la vía de señalización de TNF activada por el receptor de la superficie celular después de la unión de TNF (en lo sucesivo denominados "antagonistas de señalización"). Ambos grupos de antagonistas son útiles, por sí solos o en juntos, en combinación con un inhibidor de IL-18, en la terapia o prevención de la enfermedad vascular periférica.

Los antagonistas de TNF se identifican fácilmente y se evalúan mediante selección rutinaria para su efecto sobre la actividad del TNF natural sobre líneas celulares susceptibles *in vitro*, por ejemplo, linfocitos B humanos, en los que el TNF produce la proliferación y la secreción de inmunoglobulinas. El ensayo contiene una formulación de TNF en diversas diluciones del antagonista candidato, por ejemplo, de 0,1 a 100 veces la cantidad molar de TNF utilizando en el ensayo, y controles sin TNF o sólo con antagonista (Tucci *et al.*, 1992).

Los antagonistas secuestrantes son los antagonistas de TNF preferidos para emplear según la presente invención. Entre los antagonistas secuestrantes, los polipéptidos que se unen a TNF con alta afinidad y que poseen baja inmunogenicidad son los preferidos. Las moléculas del receptor de TNF solubles y los anticuerpos neutralizantes contra TNF son particularmente preferidos. Por ejemplo, TNF-RI y TNF-RII solubles son útiles en la presente invención. Las formas truncadas de estos receptores que comprenden los dominios extracelulares de los receptores o porciones funcionales de los mismos, son antagonistas particularmente preferidos de acuerdo con la presente invención. Los receptores de TNF de tipo I y de tipo II solubles truncados se describen en el documento EP914431, por ejemplo.

Las formas truncadas de los receptores de TNF son solubles y se han detectado en orina y suero como proteínas de unión inhibitoras de TNF de 30 kDa y 40 kDa, que se denominan TBPI y TBPII, respectivamente (Engelmann *et al.*, 1990). El uso simultáneo, secuencial o separado del inhibidor de IL-18 con el antagonista de TNF se prefiere según la invención.

En otra realización preferida, el TNF-RI (TBPI) soluble y humano es el antagonista de TNF para emplear según la invención. Las moléculas solubles naturales y recombinantes del receptor de TNF y los métodos para su producción, están descritos en las patentes europeas EP 308378, EP 398327 y EP 433900.

Los derivados, los fragmentos, las regiones y las porciones biológicamente activas de las moléculas del receptor, que se parecen funcionalmente a las moléculas del receptor, también se pueden utilizar en la presente invención. Dicho equivalente o derivado biológicamente activo de la molécula receptora se refiere a la porción del polipéptido o de la

ES 2 314 191 T3

secuencia que codifica la molécula del receptor que tiene el suficiente tamaño y es capaz de unirse a TNF con una afinidad tal, que se inhiba o se bloquee la interacción con el receptor de TNF unido a la membrana.

El inhibidor de IL-18 se puede emplear simultánea, secuencial o separadamente con el inhibidor de TNF.

En otra realización preferida de la presente invención, el inhibidor de IL-18 se usa en una cantidad de aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg, o de aproximadamente 1 a 10 mg/kg, o de 2 a 5 mg/kg.

El inhibidor de IL-18 según la invención se administra preferiblemente por vía sistémica, y preferiblemente por vía subcutánea o intramuscular. Puede administrarse a diario o en días alternos. Las formulaciones de liberación sostenida hacen posible administrarlos con menos frecuencia, tal como una vez semanal, por ejemplo.

La invención se refiere además al uso de un vector de expresión que comprende la secuencia codificadora de un inhibidor de IL-18 para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad vascular periférica. Por tanto, se considera una estrategia de terapia génica para transportar el inhibidor de IL-18 hasta el sitio en el que se requiere. Para tratar y/o prevenir una enfermedad vascular periférica, el vector de terapia génica que comprende la secuencia de un inhibidor de IL-18 puede inyectarse directamente en el tejido enfermo, por ejemplo, evitando, con ello, los problemas implicados en la administración sistémica de vectores de terapia génica, tales como la dilución de los vectores, el alcanzar las células o tejidos diana, y los efectos secundarios.

El uso de un vector para inducir y/o potenciar la producción endógena de un inhibidor de IL-18 en una célula que normalmente es silenciosa para la expresión de un inhibidor de IL-18, o que expresa cantidades del inhibidor que no son suficientes, también se contempla según la invención. El vector puede comprender secuencias reguladoras funcionales en las células deseadas para expresar el inhibidor o IL-18. Tales secuencias reguladoras pueden ser, por ejemplo, promotores o potenciadores. La secuencia reguladora entonces puede introducirse en el locus correcto del genoma mediante recombinación homóloga, uniéndose operablemente, con ello, la secuencia reguladora con el gen, cuya expresión se requiere inducir o potenciar. La tecnología se denomina habitualmente activación de genes endógenos ("Endogenous Gene Activation", EGA), y se describe, por ejemplo, en el documento WO 91/09955.

Un experto en la técnica entenderá que también es posible eliminar la expresión de IL-18 directamente, sin utilizar un inhibidor de IL-18, con la misma técnica. Para hacer esto, un elemento de regulación negativa, tal como, por ejemplo, un elemento silenciador, puede introducirse en el locus del gen de IL-18, lo cual conduce a una infrarregulación o prevención de la expresión de IL-18. Un experto en la técnica entenderá que dicha infrarregulación o silenciamiento de la expresión de IL-18 tiene el mismo efecto que el uso de un inhibidor de IL-18 para evitar y/o tratar la enfermedad.

La invención se refiere además al uso de una célula que se ha modificado genéticamente para que produzca un inhibidor de IL-18 para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad vascular periférica.

El inhibidor de IL-18 para ser empleado según la presente invención puede administrarse preferiblemente como una composición farmacéutica, opcionalmente en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de TNF u otro fármaco activo en el tratamiento o prevención de una enfermedad vascular periférica.

La IL-18BP y sus isoformas, mutéínas, proteínas condensadas, derivados funcionales, fracciones activas o derivados circularmente permutados, según se describieron anteriormente, son los principios activos preferidos de la composiciones farmacéuticas.

La definición de "farmacéuticamente aceptable" significa que incluye cualquier vehículo que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del principio activo y que no sea tóxico para el receptor al que se administra. Por ejemplo, para la administración por vía parenteral, la(s) proteína(s) activa(s) se puede(n) formular en forma de dosificación unitaria para la inyección en vehículos, tales como disolución salina, disolución de dextrosa, seroalbúmina y disolución de Ringer.

Los principios activos de la composición farmacéutica según la invención se pueden administrar a un individuo en una variedad de formas. Las vías de administración incluyen la vía intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en formulación de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, intracraneal, epidural, tópica e intranasal. Puede emplearse cualquier otra vía de administración terapéuticamente eficaz, por ejemplo absorción a través de tejidos epiteliales o endoteliales, o mediante una terapia génica en la que una molécula de ADN que codifica el agente activo se administra al paciente (por ejemplo, a través de un vector), lo cual provoca que el agente activo se exprese y se segregue *in vivo*. Además, la(s) proteína(s) según la invención se puede(n) administrar junto con otros componentes de agentes biológicamente activos, tales como tensioactivos, excipientes, portadores, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

Para la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular), la(s) proteína(s) activa(s) puede(n) formularse como una disolución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado, en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, agua, disolución salina, disolución de dextrosa) y aditivos para mantener la isotonicidad (por ejemplo, manitol) o la estabilidad química (por ejemplo, conservantes y tampones). La formulación se esteriliza mediante técnicas empleadas de forma habitual.

ES 2 314 191 T3

La biodisponibilidad de la(s) proteína(s) activa(s) según la invención también puede mejorarse utilizando procedimientos de conjugación que aumentan la semivida de la molécula en el cuerpo humano, por ejemplo, uniendo la molécula a polietilenglicol, según se describe en la solicitud de patente PCT WO 92/13095.

5 Las cantidades terapéuticamente eficaces de la(s) proteína(s) activa(s) estarán en función de muchas variables, incluyendo el tipo de antagonista, la afinidad del antagonista por la IL-18, cualquier actividad citotóxica residual que muestren los antagonistas, la vía de administración, la afección clínica del paciente (incluyendo el deseo de mantener un nivel no tóxico de actividad IL-18 endógena).

10 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es la que cuando se administra, el inhibidor de IL-18 produce una inhibición de la actividad biológica de IL-18. La dosificación administrada, en forma de dosis única o múltiple, a un individuo, variará dependiendo de una diversidad de factores, que incluyen las propiedades farmacocinéticas del inhibidor de IL-18, la vía de administración, el estado y las características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, altura), el grado de extensión de los síntomas, los tratamientos simultáneos, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado. El ajuste y la manipulación de los intervalos establecidos de dosificación entran dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, así como los métodos *in vitro* e *in vivo* para determinar la inhibición de IL-18 en un individuo.

20 Según la invención, el inhibidor de IL-18 se emplea en una cantidad de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg, o de aproximadamente 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0,1 a 5 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 1 a 3 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal.

25 La vía de administración que se prefiere según la invención es la administración por vía subcutánea. La administración por vía intramuscular también se prefiere según la invención. Para administrar el inhibidor de IL-18 directamente hasta el lugar de su acción también resulta preferible administrarlo por vía tópica.

En otras realizaciones preferidas, el inhibidor de IL-18 se administra diariamente o cada dos días.

30 Las dosis diarias se proporcionan generalmente en dosis divididas o en una forma de liberación sostenida, eficaz para obtener los resultados deseados. La segunda administración u otras posteriores se pueden realizar con una dosificación que sea la misma, menor o superior a la dosis inicial o la dosis previa administrada al individuo. Una segunda administración u otra posterior se puede administrar durante el comienzo de la enfermedad o antes de la misma.

35 Según la invención, el inhibidor de IL-18 puede administrarse de modo profiláctico o terapéutico a un individuo antes, de modo simultáneo o secuencial con otros agentes o regímenes terapéuticos (por ejemplo, regímenes de múltiples fármacos), en una cantidad terapéuticamente eficaz, en particular con un inhibidor de TNF y/u otro agente protector vascular. Los agentes activos que se administran simultáneamente con otros agentes terapéuticos se pueden administrar en las mismas composiciones o en diferentes composiciones.

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

45 Se describe un método de tratamiento de una enfermedad vascular periférica, que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de IL-18, opcionalmente en combinación con una cantidad farmacéuticamente eficaz de un antagonista de TNF, a un paciente que lo necesite.

50 Habiendo descrito a fondo esta invención, los expertos en la técnica apreciarán que ésta puede realizarse dentro un amplio intervalo de parámetros, concentraciones y condiciones equivalentes, sin apartarse del espíritu y alcance de la invención y sin experimentación indebida.

La referencia a etapas de métodos conocidas, etapas de métodos convencionales, métodos conocidos o métodos convencionales no supone admitir que cualquier aspecto, descripción o realización de la presente invención se describa, indique o sugiera en la técnica pertinente.

55 La anterior descripción de las realizaciones específicas también revelará completamente la naturaleza general de la invención que otros, aplicando el conocimiento de los expertos en la técnica (incluyendo los contenidos de las referencias citadas en la presente), pueden modificar y/o adaptar con facilidad para diversas aplicaciones de estas realizaciones específicas, sin experimentación indebida, y sin apartarse del concepto general de la presente invención. Por tanto, estas adaptaciones y modificaciones pretenden estar dentro del significado y gama de equivalentes de las realizaciones descritas, basándose en las indicaciones y directrices presentadas en la presente. Debe entenderse que la fraseología o terminología en la presente tiene el propósito de describir y no limitar, de forma que la terminología o fraseología de la presente descripción debe ser interpretada por los expertos en la técnica a la luz de las indicaciones y directrices presentadas en la presente, en combinación con el conocimiento de los expertos en la técnica.

65

Ejemplos

Ejemplo 1

5 *La inhibición de la IL-18 reduce la isquemia periférica*

Métodos

Introducción de la isquemia en la pata trasera

10 Ratonos macho C57BL/6J (Iffa Creddo, Lyon, Francia) se sometieron a cirugía para inducir una isquemia unilateral en las patas traseras. Los animales se anestesiaron mediante inhalación de isoflurano. Se realizó la ligadura en la arteria femoral derecha, 0,5 cm proximal a la bifurcación de las arterias safena y poplítea. Entonces los ratones (7 animales por grupo) se mantuvieron bajo condiciones específicas exentas de patógenos durante 3 ó 28 días. Para estudiar el papel de IL-18BP en la angiogénesis inducida por isquemia, un grupo de ratones fueron inyectados con 60 μg del plásmido de expresión de IL-18BP murina, pcDNA3-mIL18BP, en ambos músculos craneales tibiales, como se ha descrito previamente (Mallat *et al.*, 2001). Los ratones control se inyectaron con la misma dosificación del plásmido control vacío. Se administraron pulsos eléctricos transcutáneos (8 pulsos eléctricos de ondas cuadradas de 200 V/cm, 20 ms de duración a 2 Hz) mediante un electropulsador PS-15 (Genetronics) utilizando dos electrodos de placas de acero inoxidable, colocadas de 4,2 a 5,3 mm entre sí, en cada lado de la pierna. Se empleó esta estrategia porque previamente había demostrado que aumenta los niveles plasmáticos de IL-18BP, había disminuido la actividad plasmática de IL-18, y había inhibido el desarrollo y el avance de las placas ateroscleróticas (Mallat *et al.*, 2001).

Cuantificación de la angiogénesis

25 *Microangiografía*

Se evaluó la densidad de los vasos mediante una microangiografía de alta definición al final de periodo de tratamiento, como se ha descrito previamente (Silvestre *et al.*, 2000; Silvestre *et al.*, 2001). Brevemente, los ratones se anestesiaron (inhalación de isoflurano) y se inyectó medio de contraste (sulfato de bario, 1 g/ml) a través de un catéter introducido en la aorta abdominal. Se montaron imágenes (3 por animal) adquiridas mediante un transductor de rayos X digital, para obtener una visión completa de las patas traseras. La densidad de los vasos se expresó como porcentaje de píxeles por imagen ocupados por vasos en el área de cuantificación. Se delineó una zona de cuantificación formada por el lugar de la ligadura en la arteria femoral, la rodilla, el extremo del fémur y el límite externo de la pata.

35 *Densidad capilar*

Se completó el análisis de microangiografía mediante la evaluación de las densidades capilares en músculos isquémicos y no isquémicos, como se describió previamente (Silvestre *et al.*, 2000; Silvestre *et al.*, 2001). Se incubaron secciones de tejido congeladas (7 μm) con anticuerpo monoclonal de rata dirigido contra CD31 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Pharmin-gen) para identificar los capilares. Se visualizó la inmunotinción utilizando sistemas de visualización de peroxidasa de rábano y avidina-biotina (kit elite Vectastain ABC, Vector Laboratories). Se calcularon las densidades capilares en campos elegidos al azar de un área definida, utilizando el programa informático Histolab (Microvision).

Formación de imágenes de perfusión de láser Doppler

45 Para proporcionar pruebas funcionales de los cambios en la vascularización inducidos por isquemia, se realizaron experimentos de formación de imágenes de perfusión de láser Doppler, como se describió previamente (Silvestre *et al.*, 2000; Silvestre *et al.*, 2001). Brevemente, el exceso de pelo de la extremidad se eliminó mediante una crema depilatoria antes de la formación de imágenes, y los ratones se colocaron en una placa calefactora a 37°C para minimizar la variación de temperatura. No obstante, para tomar en cuenta las variables, incluyendo la temperatura y la luz ambiental, la perfusión calculada se expresó como una proporción entre la pata isquémica y la pata no isquémica.

Análisis estadístico

55 Los resultados se expresan como media \pm MEE. Se empleó un análisis de la varianza ANOVA de una vía para comparar cada parámetro. Entonces se realizaron comparaciones del ensayo de la t de Bonferonni post-hoc para identificar cuáles eran las diferencias en los grupos que eran las responsables de una ANOVA global significativa. Se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

60 *Resultados*

Microangiografía

65 En el día 3, las proporciones de puntuación angiográfica para la pata isquémica/no isquémica no se vieron afectadas en ningún grupo (fig. 1). Por contraste, en el día 28, la puntuación angiográfica mostró un aumento de 1,6 veces en ratones tratados con IL-18BP comparado con los controles ($p < 0,01$).

Densidad capilar

Los datos microangiográficos fueron confirmados mediante análisis de la densidad capilar después de tinción con CD31. En el día 28, la densidad capilar de la pata isquémica de los ratones control era menor que la de la pata no isquémica (415 ± 31 frente a 688 ± 42 vasos/mm², $p < 0,01$). Sin embargo, la densidad capilar de la pata isquémica de ratones tratados con IL-18BP fue significativamente mayor (un aumento de 1,4 veces) que en los ratones control (588 ± 48 frente a 415 ± 31 vasos/mm², respectivamente, $p = 0,01$) y no era diferente del nivel observado en la pata no isquémica.

10 *Formación de imágenes de perfusión de láser Doppler*

Las microangiografía y las medidas de densidad capilar se asociaron con los cambios en la perfusión de sangre. Se produjo una recuperación del flujo sanguíneo en la pata trasera en los ratones tratados y no tratados. Sin embargo, en ratones tratados con IL-18BP, un mayor aumento en el flujo sanguíneo (perfusión del pie) resultó evidente en el día 28, comparado con los animales control (1,5 veces, $p < 0,01$, figura 2).

Ejemplo 2

20 *Regulación del nivel de proteínas VEGF, fosfo-Akt y eNOS**Método*

Se determinó la expresión de VEGF, fosfo-Akt y eNOS (proteína de óxido nítrico sintasa endotelial) mediante análisis Western en la pata isquémica y la pata no isquémica, como se describió previamente (Silvestre *et al.*, 2000; Silvestre *et al.*, 2001).

Resultados

30 *VEGF.* En el día 3, no se observaron cambios en el nivel de proteínas VEGF entre la pata isquémica y la pata no isquémica en ninguno de los grupos. En el día 28, en los ratones control, el contenido en proteínas VEGF tendía a aumentar en la pata isquémica cuando se compara con la pata no isquémica, pero esto no alcanzó la significancia estadística. Por contraste, el nivel de proteínas VEGF en la pata isquémica fue drásticamente sobreexpresado en 120% en los ratones tratados con IL-18BP comparados con los controles ($p < 0,05$) (figura 3).

35 *Fosfo-Akt.* En el día 3, el nivel de proteínas fosfo-Akt permaneció sin cambios en las patas traseras isquémica y no isquémica cualquiera que fuera el tratamiento. En el día 28, en los ratones control, el contenido en proteínas fosfo-Akt aumentó en 60% en la pata trasera isquémica frente a la pata no isquémica ($p < 0,01$). Este aumento en el contenido en fosfo-Akt de la pata isquémica se dobló en los ratones tratados con IL-18BP (aumento del 110%, $p < 0,05$ comparado con el aumento en la pata isquémica en los ratones control) (figura 4).

40 *eNOS.* En el día 3, el contenido en proteínas eNOS no resultó afectado en la pata isquémica ($107 \pm 8\%$ frente a $103 \pm 24\%$) y la pata no isquémica ($100 \pm 12\%$ frente a $94 \pm 21\%$) para los animales control y tratados con IL-18BP, respectivamente. En el día 28, en los ratones control, los niveles de eNOS aumentaron en 55% en la pata isquémica con referencia a la pata no isquémica ($155 \pm 8\%$ frente a $100 \pm 11\%$, respectivamente, $p < 0,05$). Este aumento no se vió afectado por el tratamiento con IL-18BP ($160 \pm 12\%$, $P = 0,61$ frente al control isquémico).

Ejemplo 3

50 *Efecto de IL-18BP sobre EPC (células progenitoras endoteliales)**Métodos**Análisis de citometría de flujo*

55 Se cree que las células EPC derivan de células progenitoras hematopoyéticas Sca-1-positivas (Takahashi *et al.*, 1999). El porcentaje de células mononucleares que expresan la proteína marcadora de EPC Sca-1 entonces se determinó mediante citometría de flujo. Siete días después de la isquemia se aislaron células mononucleares a partir de sangre periférica ($300 \mu\text{l}$) y de médula ósea de ratones tratados con el plásmido pcDNA3 vacío o el plásmido pcDNA3-IL18BP ($n = 5$ por grupo). Se obtuvieron células de médula ósea enjuagando las tibias y los fémures. Se aislaron células mononucleares de baja densidad mediante una centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll. Las células mononucleares entonces se incubaron con anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) contra Sca-1 (D7, BD Pharmingen). Los anticuerpos con isotipo idéntico actuaron como control.

65 *Ensayo de diferenciación de EPC*

Inmediatamente después del aislamiento, $5 \cdot 10^6$ células mononucleares derivadas de médula ósea también se colocaron sobre placas de cultivo de células de 35 mm revestidas con vitronectina plasmática de rata (Sigma) y gelatina (al

0,1%) y se mantuvieron en medio basal endotelial (EBM2, Bio whittaker). Después de 4 días de cultivo, se retiraron las células no adherentes, y las células adherentes se sometieron a análisis inmunohistoquímicos.

5 Para detectar la captación de lipoproteína de baja densidad marcada con 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (AcLDL-Dil), las células se incubaron con AcLDL-Dil (Tebu) a 37°C durante 1 hora. Entonces las células se fijaron con paraformaldehído al 2%, se incubaron con un anticuerpo de conejo policlonal primario dirigido contra el factor de von-Willbrand (vWF) (DAKO) durante 1 hora, y con IgG (H+L) anticonejo monoclonal marcado con FITC durante 30 min (Coulter). Se consideró que las células con tinción dual positivas para AcLDL-Dil y vWF eran EPC, y se contaron por pocillo. Tres investigadores independientes evaluaron el número de EPC por pocillo contando tres campos de alta potencia seleccionados al azar. Los resultados entonces se expresan como porcentaje del número total de células mononucleares.

Resultados

15 Se cree que las células EPC derivan de células mononucleares Sca-1-positivas (Takahashi *et al.*, 1999). El porcentaje de células mononucleares Sca-1-positivas en la sangre periférica permaneció sin cambios en los ratones tratados con IL-18BP comparados con animales control ($31,5 \pm 13\%$ frente a $28,5 \pm 13\%$, respectivamente). De forma similar, el número global de células mononucleares Sca-1-positivas aisladas a partir de médula ósea no difirió entre los ratones tratados con IL-18BP y los animales control ($4,35 \pm 0,95\%$ frente a $5,87 \pm 0,22\%$, respectivamente). Además, el tratamiento con IL-18BP no afectó al número total de células mononucleares de sangre periférica o de médula ósea (los datos no se muestran).

20 Las EPC se aislaron y se cultivaron a partir de células mononucleares de médula ósea y se caracterizaron como células de tinción dual positivas para AcLDL-Dil y vWF. El porcentaje de células con tinción doble positiva fue casi indetectable en animales no isquémicos ($<5\%$, $n = 4$). La isquemia indujo un marcado aumento en el porcentaje de células con tinción doble positiva para AcLDL-Dil y vWF ($48 \pm 3\%$, $p < 0,001$ frente a animales no isquémicos). Este efecto fue aún más expandido por el tratamiento con IL-18BP ($48 \pm 3\%$ en los controles frente a $85 \pm 2\%$ en ratones tratados con IL-18BP, $p < 0,001$) (figura 5). Por tanto, el tratamiento con IL-18BP parece estimular la diferenciación de células mononucleares en EPC, en lugar de aumentar el número de células progenitoras en circulación.

30 Referencias

1. Buggemann *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 21:1323-1326 (1991).
2. DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E. y Karin, M. (1997), *Nature*, 388, 16514-16517.
- 35 3. Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H., y Woody, J.N., 1994, *Lancet*, 344, 1125-1127.
4. Engelmann, H., Novick, D., y Wallach, D., 1990, *J. Biol. Chem.*, 265, 1531-1536.
- 40 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.
- 45 7. Kim S.H. *et al.*, *J. Immunol.*, 2001, 166, pp. 148-154.
8. Knight D.M., Trinh H., Le J., Siegel S., Shealy D., McDonough M., Scallon B., Moore M.A., Vilcek J., Daddona P., *et al.*, Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody, *Mol. Immunol.*, noviembre 1993, 30:16 1443-53.
- 50 9. Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1982.
10. Meldrum, D.R., Cleveland, J.C, Jr., Cain, B.S., Meng, X., y Harken, A.H. (1998), *Ann. Thorac. Surg.*, 65, 439-443.
- 55 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. y Jakobovits, A. (1997), "Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice", *Nature Genetics*, 15, 146-156.
- 60 12. Nakamura, K., Okamura, H., Nagata, K. y Tamura, T. (1989), *Infect. Immun.*, 57, 590-595.
- 65 13. Novick, D., Kim, S.-H., Fantuzzi, G., Reznikov, L., Dinarello, C. y Rubinstein, M. (1999), *Immunity*, 10, 127-136.

ES 2 314 191 T3

14. **Parnet, P., Garka, K.E., Bonnert, T.P., Dower, S.K., y 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. y 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.L., Magner, M.L., 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., Tani, M., Kunikate, T., Murakami, T., Sanou, O., Kojima, H., Fuji, M., Ohta, T., Ikeda, M., Ikegami, H., y Kurimoto, M.** (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 25737-25742.

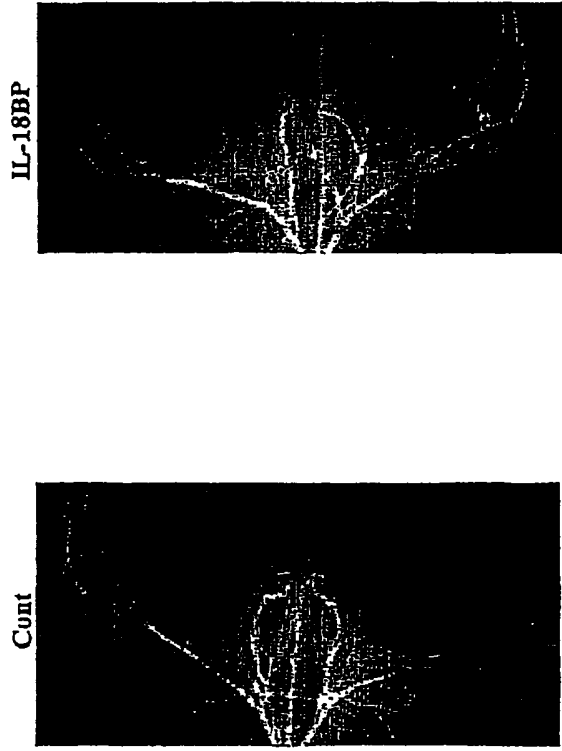
19. **Tomizuka et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:722-727 (2000).

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

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de un inhibidor de IL-18 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad vascular periférica de las extremidades, en el que el inhibidor de IL-18 se selecciona de un inhibidor de la caspasa-1 (ICE), un anticuerpo contra IL-18, un anticuerpo contra cualquiera de las subunidades del receptor de IL-18, y una proteína de unión a IL-18, o una isoforma, muteína, proteína condensada o derivado funcional de una proteína de unión a IL-18 que inhiba la actividad biológica de IL-18, comprendiendo la muteína una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras, comprendiendo la proteína condensada una inmunoglobulina de fusión, y estando el derivado funcional PEGilado.
- 10 2. El uso según la reivindicación 1, en el que la enfermedad vascular periférica es la enfermedad arterial periférica.
- 15 3. El uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que la enfermedad vascular periférica es la enfermedad vascular periférica de las extremidades inferiores.
- 20 4. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad vascular periférica de las extremidades viene acompañada de claudicación.
- 25 5. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad vascular periférica es la enfermedad de Buerger (tromboangitis obliterante).
- 30 6. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad vascular periférica es la isquemia periférica.
- 35 7. El uso según la reivindicación 6, en el que la isquemia periférica es la isquemia crítica de las extremidades.
- 40 8. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad vascular periférica de las extremidades viene acompañada de gangrena y/o úlceras.
- 45 9. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad vascular periférica de las extremidades viene acompañada de amputación de extremidades.
- 50 10. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor de IL-18 es un anticuerpo dirigido contra IL-18.
- 55 11. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor de IL-18 es un anticuerpo dirigido contra el receptor α de IL-18.
- 60 12. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor de IL-18 es un anticuerpo dirigido contra el receptor β de IL-18.
- 65 13. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el anticuerpo contra IL-18 es un anticuerpo humanizado o humano.
14. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor de IL-18 está glicosilado en uno o más sitios.
15. El uso de un vector de expresión que comprende la secuencia codificadora de un inhibidor de IL-18 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad vascular periférica de las extremidades, en el que el inhibidor de IL-18 se selecciona de un anticuerpo contra IL-18, un anticuerpo contra cualquiera de las subunidades del receptor de IL-18, y una proteína de unión a IL-18, o una isoforma, muteína o proteína condensada de una proteína de unión a IL-18 que inhiba la actividad biológica de IL-18, comprendiendo la muteína una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras, y comprendiendo la proteína condensada una inmunoglobulina de fusión.
16. El uso de un vector de expresión para inducir y/o potenciar la producción endógena de un inhibidor de IL-18 en una célula para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad vascular periférica de las extremidades, en el que el inhibidor de IL-18 se selecciona de un anticuerpo contra IL-18, un anticuerpo contra cualquiera de las subunidades del receptor de IL-18, y una proteína de unión a IL-18, o una isoforma, muteína o proteína condensada de una proteína de unión a IL-18 que inhiba la actividad biológica de IL-18, comprendiendo la muteína una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras, y comprendiendo la proteína condensada una inmunoglobulina de fusión.



A) Día 28

No isquémico

Isquémico

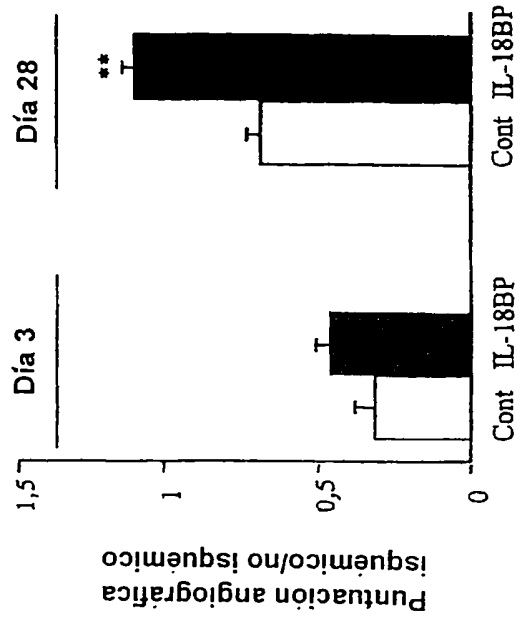
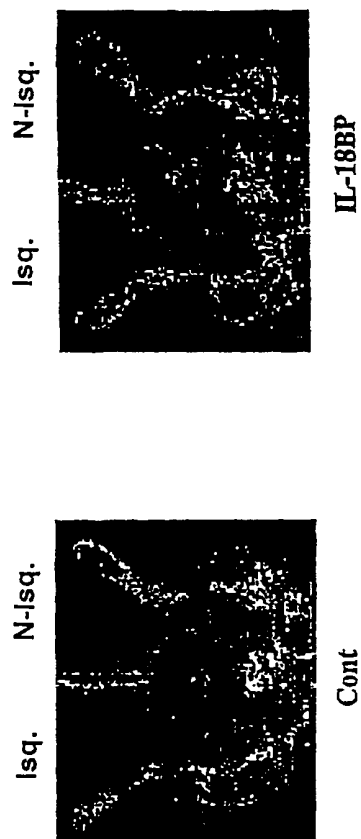


Fig. 1

A) Día 28



B)

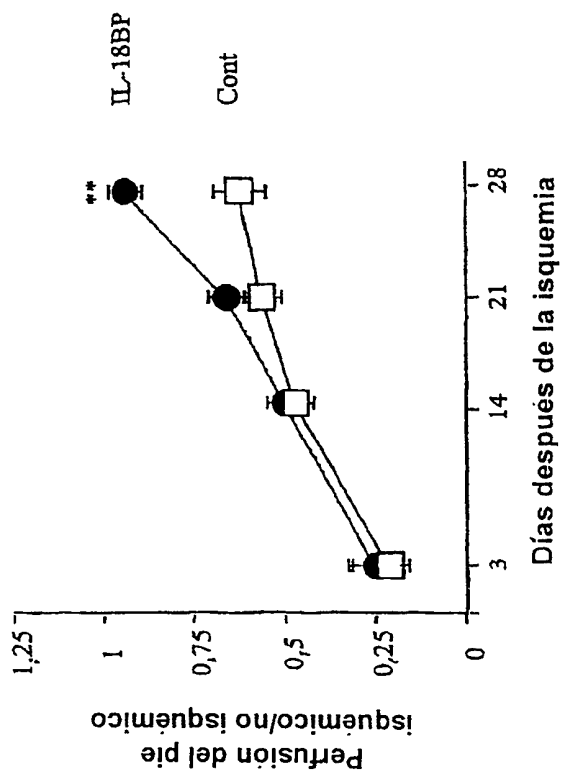


Fig. 2

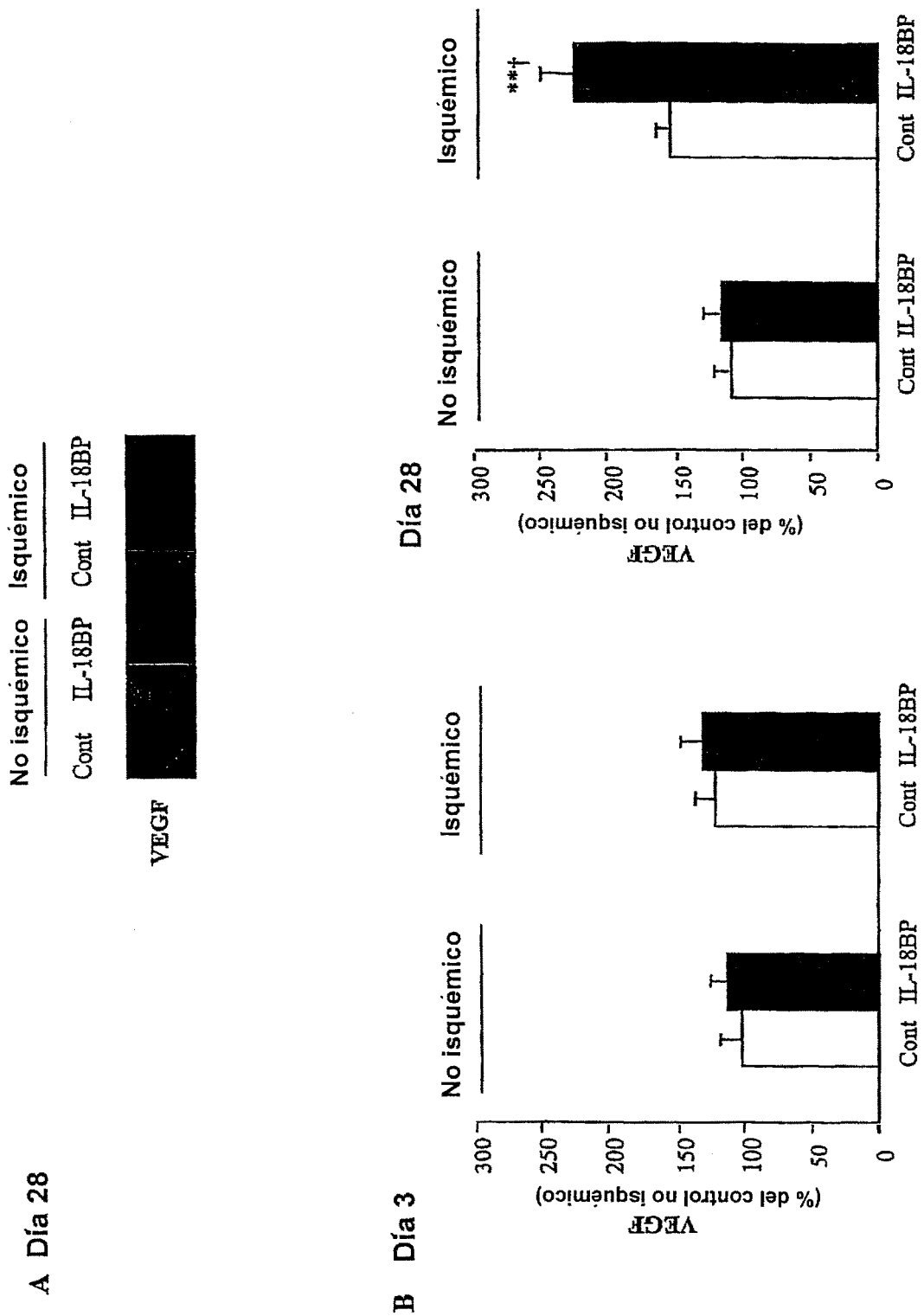


Fig. 3

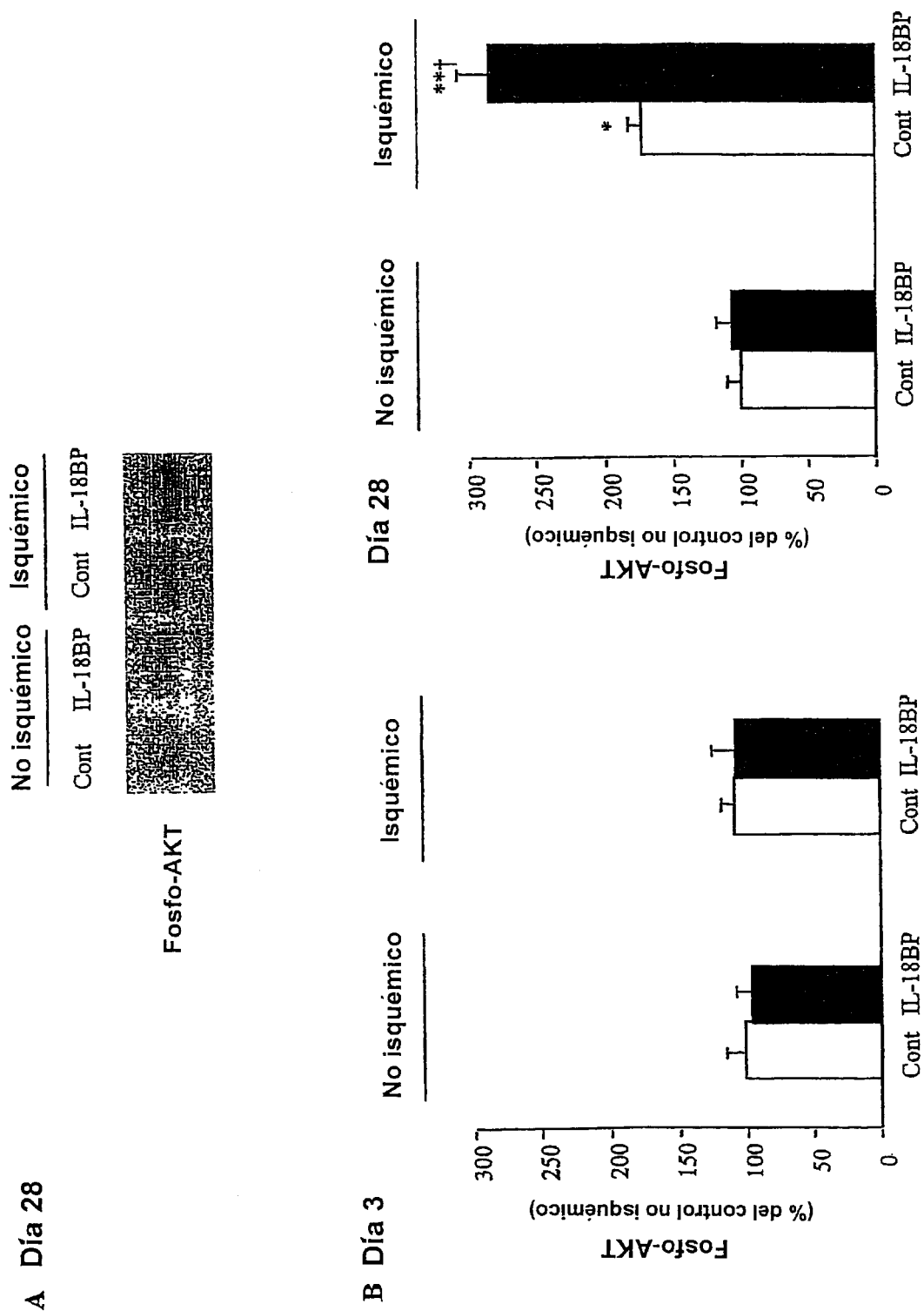


Fig. 4

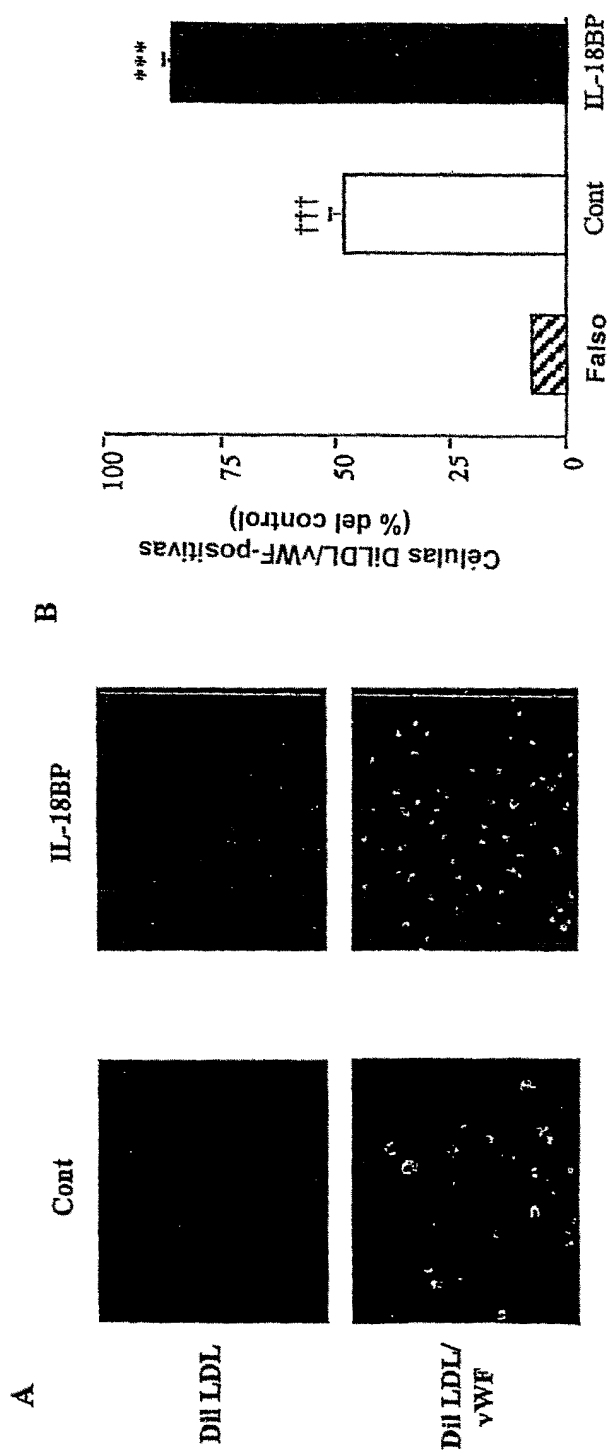


Fig. 5