



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0308663-1 B1



(22) Data do Depósito: 13/03/2003

(45) Data de Concessão: 16/07/2019

(54) Título: USO DE INIBIDORES DE IL-18 PARA O TRATAMENTO E/OU PREVENÇÃO DE DOENÇAS VASCULARES PERIFÉRICAS

(51) Int.Cl.: A61K 38/17.

(30) Prioridade Unionista: 22/03/2002 EP 02 100290.2.

(73) Titular(es): MERCK SERONO S.A.; INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM).

(72) Inventor(es): YOLANDE CHAVATCHKO; ALAIN TEDGUI; ZIAD MALLAT.

(86) Pedido PCT: PCT EP2003050061 de 13/03/2003

(87) Publicação PCT: WO 2003/080104 de 02/10/2003

(85) Data do Início da Fase Nacional: 22/09/2004

(57) Resumo: "USO DE INIBIDORES DE IL-18 PARA O TRATAMENTO E/OU PREVENÇÃO DE DOENÇAS VASCULARES PERIFÉRICAS". A presente invenção refere-se ao uso de um inibidor de IL-18 na preparação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de doenças vasculares periféricas. A presente invenção refere-se ainda ao uso de um inibidor de IL-18 para prevenção de amputação de membros.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "USO DE INIBIDORES DE IL-18 PARA O TRATAMENTO E/OU PREVENÇÃO DE DOENÇAS VASCULARES PERIFÉRICAS".

Campo da Invenção

- 5 A presente invenção refere-se a doenças vasculares. Mais especificamente, ela refere-se ao uso de um inibidor de IL-18 para o tratamento e/ou prevenção de doenças vasculares periféricas. A invenção refere-se também ao uso de um inibidor de IL-18 para a prevenção de amputação.

Antecedentes da Invenção

- 10 A citocina interleucina 18 (IL-18) foi descrita inicialmente como um fator indutor de interferon- γ (IFN- γ) (Nakamura *et al.*, 1989). Ela é um sinal precoce no desenvolvimento de respostas de células auxiliaadoras de linfócitos T do tipo 1 (TH1). IL-18 atua junto com IL-12, IL-2, antígenos, mitógenos, e possivelmente outros fatores, para induzir a produção de IFN- γ . IL-18 intensifica também a produção de GM-CSF e IL-2, potencializa a proliferação de células T induzida por anti-CD3, e aumenta a extinção mediada por Fas de células exterminadoras naturais.

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

- 20 O receptor de IL-18 consiste em pelo menos dois componentes, IL-18R alfa e IL-18R beta, cooperando na ligação do ligante. Os sítios de ligação de alta e baixa afinidade para IL-18 foram descobertos em células T estimuladas por IL-12 murinas (Yoshimoto *et al.*, 1998), sugerindo um complexo receptor com múltiplas cadeias. As duas subunidades do receptor, que foram identificadas até agora, pertencem ambas à família de receptores de IL-1 (Parnet *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2001). A transdução dos sinais de IL-18 envolve a ativação de NF- κ B (DiDonato *et al.*, 1997). O complexo receptor de IL-18 consiste em duas cadeias receptoras: uma cadeia que liga o ligante, denominada cadeia de IL-18R α e uma cadeia transdutora de sinais denominada cadeia de IL-18R β . A cadeia de IL-18R α foi isolada inicialmente como uma proteína da superfície celular que se liga a IL-18 marcada radioativamente; a proteína foi purificada e sua sequência de aminoácidos revelou

identidade com um receptor órfão relatado anteriormente, denominado proteína relacionada a IL-1R (IL-1R α) (Torigoe *et al.*, 1997).

Recentemente, uma proteína solúvel que tem uma alta afinidade por IL-18 foi isolada a partir da urina humana, e os cDNAs, humano e de camundongo, bem como o gene humano, foram clonados (Novick *et al.*, 1999; documento nº WO 99/09063). A proteína foi designada proteína ligante de IL-18 (IL-18BP).

IL-18BP não é o domínio extracelular de um dos receptores de IL-18 conhecidos, mas uma proteína secretada em circulação natural. Ela pertence a uma família inusitada de proteínas secretadas, incluindo ainda várias proteínas codificadas por poxvírus (Novick *et al.*, 1999). IL-18BP urinária, bem como a recombinante, ligam-se especificamente a IL-18 com uma alta afinidade e modulam a afinidade biológica de IL-18.

O gene de IL-18BP foi localizado no cromossoma humano 11q13, e nenhum éxon que codifica um domínio transmembrana foi encontrado em uma sequência genômica de 8,3 kb. Quatro variantes de divisão ou isoformas de IL-18BP geradas por divisão alternada do mRNA foram descobertas em seres humanos até agora. Elas foram designadas IL-18BP "a", "b", "c" e "d", todas compartilhando o mesmo terminal N e diferindo no terminal C (Novick *et al.*, 1999). Estas isoformas variam em sua capacidade de ligar-se a IL-18. Uma das quatro, as isoformas hIL18BP "a" e "c" são conhecidas por terem uma capacidade neutralizadora de IL-18. A isoforma IL-18BP humana liga-se a IL-18 murina.

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

venosa e veias varicosas, os distúrbios arteriovenosos combinados incluem fístula arteriovenosa, e os distúrbios linfáticos incluem linfedema e lipedema.

Oclusão arterial periférica refere-se a uma oclusão do fornecimento de sangue para as extremidades, geralmente por placas ateroscleróticas (ateromas), um trombo, ou uma embolia.

A oclusão arterial periférica pode resultar em isquemia aguda ou crônica. A isquemia aguda é causada por uma placa aterosclerótica proximal rompida, por trombose aguda em doença aterosclerótica preexistente, por uma embolia do coração, aorta ou outros vasos grandes, ou por um aneurisma dissecado. A isquemia crônica é causada pelo alargamento gradual de uma placa ateromatosa.

A elevação sustentada de homocisteína sangüínea, pela lesão de células endoteliais, predispõe à aterosclerose prematura da aorta e suas ramificações, das artérias periféricas, das artérias cerebrais, e possivelmente das artérias coronárias. Embora os níveis de homocisteína sejam usualmente elevados em associação com outros fatores de risco, eles podem ser modificados por dieta e suplementos de vitamina B.

As síndromes clínicas de oclusão arterial dependem do vaso envolvido, do grau da obstrução, e de quão rapidamente a oclusão progride, e se o fluxo colateral está adequado.

A oclusão aguda tem uma história que inclui o início súbito de dor severa, friagem, entorpecimento, e palidez em uma extremidade. A extremidade fica fria e pálida, e as pulsações estão ausentes longe da obstrução. A oclusão aguda pode causar isquemia grave manifestada pela perda sensorial e motora, e eventualmente (após 6 a 8 h) endurecimento tenro de músculos após palpação.

Na oclusão crônica, os sintomas estão relacionados ao desenvolvimento insidioso de isquemia tecidual. O sintoma inicial é claudicação intermitente. Os sintomas da claudicação são dor, algesia, câibra, ou sensação de cansaço que ocorre ao andar. Estes sintomas são mais comuns na panturrilha, mas podem ocorrer no pé, coxa, quadril ou nádegas.

Eventualmente, a dor isquêmica pode ocorrer no repouso, co-

O nível da oclusão arterial e a localização da claudicação intermitente correlacionam-se intimamente, como por exemplo, a doença aortoili-

Um pé gravemente isquêmico é doloroso, frio, e frequentemente dormente. Em casos crônicos, a pele pode ficar seca e escamosa com fraco crescimento das unhas e do cabelo. Conforme a isquemia piora, pode aparecer ulceração (tipicamente nos artelhos ou no calcanhar, ocasionalmente na perna), especialmente após traumatismo local. O edema não está usualmente presente, a menos que o paciente tenha mantido a perna em uma posição dependente para alívio da dor; entretanto, uma perna gravemente isquêmica pode ser atrofica. Uma oclusão mais extensa pode comprometer a viabilidade tecidual, levando à necrose ou gangrena. A isquemia com rubor, dor e inchaço do pé após dependência pode mimetizar celulite ou insuficiência venosa. Testes arteriais não-invasivos podem esclarecer o diagnóstico.

A doença de Buerger ocorre em fumantes de cigarros, predominantemente em homens com 20 a 40 anos de idade. Somente cerca de 5%

dos casos ocorrem em mulheres. A frequência de diagnóstico tem diminuído drasticamente nos últimos anos por causa da melhor compreensão das características clínicas e angiográficas desta doença versus arteriosclerose obliterante.

- 5 Embora a causa seja desconhecida, a doença de Buerger não foi documentada em não-fumantes, implicando o tabagismo como fator etiológico primário, talvez como um tipo retardado de hipersensibilidade ou angiite tóxica. A tromboangeíte obliterante pode ser uma reação ao tabaco por pessoas com um fenótipo específico, por causa da maior prevalência de
- 10 HLA-A9 e HLA-B5 em pessoas com a doença; ou um distúrbio auto-imune com sensibilidade mediada por células ao colágeno humano tipos I e II, que são constituintes de vasos sanguíneos.

Diferentemente da arteriosclerose, a doença de Buerger não envolve as artérias coronárias.

- 15 A doença envolve artérias de calibre pequeno e médio e frequentemente veias superficiais das extremidades em um padrão segmentado. Raramente, na doença avançada, os vasos em outras partes do corpo são afetados. A aparência patológica é a de uma panarterite ou panflebite não-supurativa com trombose dos vasos envolvidos. A proliferação de células
- 20 endoteliais e a infiltração da camada íntima com linfócitos ocorrem na lesão aguda, mas a lâmina elástica interna fica intacta. O trombo torna-se organizado e posteriormente recanaliza-se de forma incompleta. A túnica média fica bem preservada, mas pode ser infiltrada com fibroblastos, e as lesões mais antigas apresentam fibrose periarteriais, que também pode en-
- 25 volver a veia e o nervo adjacentes.

- Os sintomas e sinais são aqueles de isquemia arterial e de tromboflebite superficial. O início é gradual, começando na maioria dos vasos distais das extremidades superiores e inferiores, e progredindo proximalmente, culminando em gangrena distal. O paciente pode queixar-se de
- 30 friagem, dormência, formigamento, ou ardência antes que haja evidência objetiva da doença. O fenômeno de Raynaud é comum. A claudicação intermitente ocorre na extremidade envolvida (usualmente o arco do pé ou a

5 volvida, provavelmente causada pela dor severa persistente.

10 ximal.

15 prenúncios de resultados insatisfatórios. Estes pacientes estão em alto risco de perda de membros. A pronta detecção e avaliação de isquemia grave dos membros, e em seguida, a revascularização eficiente são necessárias para salvar os membros e preservar a saúde geral.

doença arterial oclusiva, mais comumente aterosclerose. Além da aterosclerose em associação com hipertensão, hipercolesterolemia, tabagismo e diabetes, as causas menos freqüentes de isquemia crítica crônica dos membros incluem doença de Buerger, tromboangeíte obliterante, e algumas formas de arterite.

O desenvolvimento da isquemia crítica crônica dos membros requer usualmente múltiplos locais de obstrução arterial que reduzem severamente o fluxo sangüíneo para os tecidos. A isquemia tecidual crítica manifesta-se clinicamente como dor em repouso, feridas não-cicatrizantes (por causa das maiores necessidades metabólicas da cicatrização de feridas) ou necrose dos tecidos (gangrena).

dor ardente na bola do pé e artelhos, que é pior à noite quando o paciente

5 Uma ferida é considerada geralmente como sendo não-cicatrizante se ela deixa de responder a um teste de 4 a 12 semanas de terapia conservadora, tais como trocas de curativos normais, evitação de traumatismos, tratamento da infecção e excisão de tecido necrosado.

10 envolve quando o fornecimento de sangue é tão baixo que ocorre necrose
espontânea na maioria dos tecidos deficientemente perfundidos.

Embora uma terapia conservadora cuidadosamente desenhada possa beneficiar muitos pacientes com isquemia crítica dos membros, a natureza grave da sua doença pode levar à consideração de intervenção operatória. As intervenções cirúrgicas incluem revascularização ou amputação. Se o paciente deseja passar por revascularização e é um candidato operatório aceitável, uma arteriografia é freqüentemente realizada para avaliação adicional e planejamento da revascularização. Em algumas clínicas, usa-se angiografia por ressonância magnética como uma alternativa ou suplemento para a arteriografia, a fim de minimizar o risco de exposição a corantes. A preservação dos membros por meio de revascularização é econômica, leva a uma melhor qualidade de vida para a maioria dos pacientes e está associada a uma morbidez e mortalidade perioperatória mais baixa do que a amputação. A preservação dos membros deve ser a meta na maioria dos pacientes com isquemia crítica crônica dos membros.

A factibilidade da revascularização é determinada pelas descobertas arteriográficas, bem como pela disponibilidade de um canal de desvio. A angioplastia ou colocação de sondas, ou ambas, é mais exitosa com lesões proximais curtas, tais como aquelas em pacientes com claudicação, mas é improvavelmente o único tratamento necessário no acompanhamento de isquemia crítica dos membros por causa da natureza múltipla da doença arterial oclusiva. O canal de desvio ideal é a veia safena magna, mas outros

5 fena. Em comparação, estudos de terapia conservadora demonstraram um índice de sucesso de 25 a 49 por cento com feridas não-cicatrizantes e um índice de 50 a 80 por cento de melhora na dor isquêmica em repouso.

10 da vida ou lesões não suscetíveis à revascularização. A decisão de monitorar a condição do paciente com espera atenta e controle conservador, ou realizar revascularização ou amputação, depende da avaliação cuidadosa dos riscos pelo médico assistente e dos benefícios da cirurgia versus controle conservador.

De forma mais importante, essa decisão depende da interpretação do paciente da capacidade invasiva ou da adequabilidade das opções disponíveis. Mesmo pacientes incapazes de andar por causa da sua condição podem considerar a amputação inadequada, e não todos pacientes estão motivados para fazer o necessário para reabilitação após a amputação.

Caso seja tomada a decisão de amputar, o nível da amputação deve ser tal que tenha a maior possibilidade de cura, e ao mesmo tempo, dando ao paciente a chance máxima de reabilitação funcional.

em repouso é descrita tipicamente como uma dor ardente no arco plantar ou distal do pé, que ocorre enquanto o paciente está em recúbito, mas é aliviada quando o paciente volta para uma posição na qual os pés estão dependentes. Os parâmetros hemodinâmicos objetivos que fundamentam o diagnóstico de isquemia crítica dos membros incluem um índice tornozelo-braquial de 0,4 ou menos, uma pressão sistólica no tornozelo de 50 mm Hg ou menos, ou uma pressão sistólica no hallux de 30 mm Hg ou menos. A intervenção pode incluir terapia conservadora, revascularização ou amputa-

ção. A gangrena progressiva, feridas que ampliam rapidamente ou dor isquêmica contínua em repouso podem significar uma ameaça para o membro e sugerem a necessidade de revascularização em pacientes, sem riscos operatórios proibitivos. Os enxertos de desvios são usualmente necessários por causa da natureza múltipla e distal do estreitamento arterial em isquemia crítica dos membros. Os pacientes com diabetes são mais suscetíveis do que outros pacientes a ter doença distal que é menos suscetível a enxerto de desvio. Comparada com amputação, a revascularização é mais econômica e eficiente e está associada a melhor morbidez e mortalidade perioperatória. A preservação de membros deve ser a meta na maioria dos pacientes com isquemia crítica dos membros.

Atualmente, o principal tratamento de doenças vasculares periféricas inclui o tratamento invasivo, tal como angioplastia ou mesmo amputação da perna. A identificação de drogas que estimulam a neovascularização periférica sem aumentar o progresso das placas ateroscleróticas é de suma importância terapêutica neste campo médico.

Sumário da Invenção

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

Em função desses resultados, novas abordagens terapêuticas para o tratamento ou prevenção de doenças vasculares periféricas que requerem neovascularização ou revascularização são disponibilizadas.

A invenção refere-se, portanto, ao uso de um inibidor de IL-18 para o tratamento e/ou prevenção de doenças vasculares periféricas, particularmente isquemia periférica.

A invenção refere-se ainda ao uso de um inibidor de IL-18 para a fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de claudicação e gangrena.

Além disso, a invenção refere-se ao uso de um inibidor de IL-18 para a fabricação de um medicamento para a prevenção de amputação, particularmente amputação de membros.

5 O uso de um vetor de expressão que compreende a seqüência codificadora de um inibidor de IL-18, bem como o uso de um vetor de expressão para induzir e/ou intensificar a produção endógena de um inibidor de IL-18 em uma célula, para o tratamento ou prevenção de doenças vasculares periféricas também está dentro do âmbito da presente invenção.

10 A invenção refere-se ainda a um método para tratar doenças vasculares periféricas, compreendendo administrar a um hospedeiro, que dele necessita, uma quantidade inibitória eficaz de um inibidor de IL-18.

Breve Descrição dos Desenhos

15 A Figura 1 ilustra: A) microangiografia representativa das patas traseiras direita isquêmica e esquerda não-isquêmica, 3 e 28 dias após oclusão da artéria femoral no camundongo; e B) a pontuação angiográfica isquêmica/não-isquêmica em camundongos tratados com pcDNA3-mIL18BP (IL-18BP) ou plasmídeo vazio (Controle) por 3 a 28 dias. Os valores são médias $\pm$ desvio padrão médio, $n = 7$ por grupo. ** $p < 0,01$ versus camundongos do controle.

20 A Figura 2 ilustra: A) mudanças induzidas por isquemia no fluxo sanguíneo de patas traseiras, monitorado *in vivo* por reprodução de imagem de perfusão com Doppler a laser em camundongos tratados com pcDNA3-mIL18BP (IL-18BP) ou plasmídeo vazio (Controle). Em imagens codificadas em cores, a perfusão normal está representada em vermelho, uma redução acentuada no fluxo sanguíneo da pata traseira isquêmica está representada em azul; B) avaliação quantitativa do fluxo sanguíneo expresso como uma relação entre fluxo sanguíneo na pata traseira isquêmica e aquele em uma

25 pata não-isquêmica. Os valores são médias $\pm$ desvio padrão médio, $n = 7$ por grupo. ** $p < 0,01$ versus camundongos do controle.

30 A Figura 3 ilustra: A) mancha ocidental representativa do teor da proteína VEGF na perna não-isquêmica e isquêmica, 28 dias após oclusão da artéria femoral; B) avaliação quantitativa dos níveis da proteína VEGF

expressos como uma relação entre o teor de proteína na pata traseira isquêmica e aquele em uma pata não-isquêmica. Os valores são médias $\pm$ desvio padrão médio, $n = 7$ por grupo. $**p < 0,01$ versus controle não-isquêmico e $+p < 0,05$ versus controle isquêmico.

- 5 A Figura 4 ilustra: A) mancha ocidental representativa do teor da proteína fosfo-Akt na perna não-isquêmica e isquêmica, 28 dias após oclusão da artéria femoral; B) avaliação quantitativa dos níveis da proteína fosfo-Akt expressos como uma relação entre o teor de proteína na pata traseira isquêmica e aquele em uma pata não-isquêmica. Os valores são médias $\pm$ desvio padrão médio, $n = 7$ por grupo. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ versus controle não-isquêmico e $+p < 0,05$ versus controle isquêmico.
- 10

- A Figura 5 ilustra: A) imagens representativas de EPCs (células progenitoras endoteliais) isoladas a partir da medula óssea de camundongos sem ligadura da artéria femoral (simulada) e de camundongos tratados com pcDNA3-mIL18BP (IL-BP18) ou plasmídeo vazio (controle). As EPCs foram caracterizadas como células aderentes com coloração positiva dupla para AcDL-Dil e fator von-Willebrand vWF); B) quantificação de células duplo-positivas em camundongos tratados com pcDNA3-mIL 18BP ou plasmídeo vazio. Os valores são médias $\pm$ desvio padrão médio, $n = 5$ por grupo. $+++p < 0,001$ versus camundongos do controle, $+++p < 0,001$ versus camundongos sem ligadura da artéria femoral (simulada).
- 15
- 20

Descrição Detalhada da Invenção

- A presente invenção baseia-se na descoberta de que inibidores de IL-18 aumentam significativamente a angiogênese pós-isquêmica após isquemia da pata, sem afetar a densidade dos vasos da pata não-isquêmica em um modelo murino da doença *in vivo*. Portanto, a invenção fornece uma nova abordagem terapêutica para tratar ou prevenir doenças vasculares periféricas que requerem perfusão tecidual intensificada.
- 25

- A invenção refere-se, portanto, ao uso de um inibidor de IL-18 para a fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de uma doença vascular periférica.
- 30

O termo "prevenção" dentro do contexto desta invenção refere-se

não somente a uma prevenção completa de um certo efeito, mas também qualquer prevenção, atenuação, redução, decréscimo ou diminuição parcial ou substancial do efeito antes ou no início precoce da doença.

O termo "tratamento" dentro do contexto desta invenção refere-se a qualquer efeito benéfico sobre a progressão de doença, inclusive atenuação, redução, decréscimo ou diminuição do desenvolvimento patológico após o início da doença.

O termo "doença vascular periférica", como aqui utilizado, refere-se a doenças ou distúrbios que afetam as artérias, veias, e linfáticos das extremidades. Os distúrbios vasculares periféricos podem ser arteriais (oclusivos ou funcionais), venosos, arteriovenosos (como por exemplo, fístula arteriovenosa), ou linfáticos. A doença arterial oclusiva inclui oclusão arterial periférica e tromboangeíte obliterante. Os distúrbios arteriais funcionais podem ser vasoespásticos (fenômeno e doença de Raynaud, acrocianose) ou vasodilatadores (eritromelalgia). Eles podem ser também secundários a uma falha local nos vasos sanguíneos ou a distúrbios na atividade do sistema nervoso simpático, ou podem acompanhar doença vascular orgânica. As doenças venosas incluem trombose venosa e veias varicosas, os distúrbios arteriovenosos combinados incluem fístula arteriovenosa, e os distúrbios linfáticos incluem linfedema e lipedema.

O termo "doença vascular periférica" pretende englobar todas indicações médicas, doenças, distúrbios ou sintomas descritos na seção "Antecedentes da Invenção" acima.

O termo "inibidor de IL-18", dentro do contexto desta invenção, refere-se a qualquer molécula que modula a produção e/ou a ação de IL-18, de tal modo que a produção e/ou a ação de IL-18 seja atenuada, reduzida ou impedida ou bloqueada parcialmente, substancialmente ou completamente.

Um inibidor de produção pode ser qualquer molécula que afeta negativamente a síntese, processamento ou maturação de IL-18. Os inibidores considerados de acordo com a invenção podem ser, por exemplo, supressores da expressão gênica da interleucina IL-18, mRNA's "antisense" que reduzem ou impedem a transcrição do mRNA de IL-18 ou levam à degra-

dação do mRNA, proteínas que prejudicam a dobragem correta, ou impedem parcial ou substancialmente a secreção de proteases de IL-18, uma vez sintetizada, inibidores de proteases que clivam pró-IL-18 para gerar IL-18 madura, tais como inibidores de caspase-1, e similares.

- 5 Um inibidor da ação de IL-18 pode ser um antagonista de IL-18, por exemplo. Os antagonistas podem ligar-se a ou seqüestrar a molécula de IL-18 em si com afinidade e especificidade suficiente para neutralizar parcial ou substancialmente o sítio ou sítios responsáveis pela ligação de IL-18 a seus ligantes (tais como, por exemplo, seus receptores). Um antagonista
- 10 pode também inibir a via sinalizadora de IL-18, que é ativada dentro das células após a ligação de IL-18 receptor ligante.

- Os inibidores da ação de IL-18 podem ser também receptores de IL-18 solúveis ou moléculas que mimetizam os receptores ou agentes que bloqueiam os receptores de IL-18, ou anticorpos de IL-18, tais como anticorpos
- 15 policlonais ou monoclonais, ou qualquer outro agente ou molécula que impede a ligação de IL-18 a seus alvos, diminuindo ou impedindo assim o acionamento das reações intracelulares ou extracelulares mediadas por IL-18.

Em uma modalidade preferida da invenção, a doença vascular periférica é doença arterial periférica.

- 20 "Doença arterial periférica" é um distúrbio que envolve o estreitamento das artérias em qualquer lugar entre os braços e a aorta, e entre as artérias e as pernas. O início pode ser súbito ou gradual, e resulta geralmente em isquemia (diminuição da distribuição de oxigênio para a área suprida pelo vaso).

- 25 De preferência, de acordo com a presente invenção, a doença arterial periférica concerne às extremidades inferiores. A doença ou oclusão arterial pode ser crônica ou aguda. A doença arterial periférica está frequentemente associada à claudicação.

- Portanto, a presente invenção refere-se ainda ao uso de um inibidor de IL-18 para o tratamento e/ou prevenção de claudicação. A claudicação é dor na perna, particularmente na panturrilha, que vem e vai, para causar hesitação no andar. A claudicação é sentida tipicamente enquanto se
- 30

anda, e cessa em repouso. Ela é, portanto, referida comumente como uma claudicação intermitente. A natureza usualmente intermitente da dor de claudicação deve-se a um suprimento inadequado temporário de oxigênio para os músculos da perna. O suprimento deficiente de oxigênio é resultado do

5 estreitamento ou oclusão das artérias que fornecem sangue para as artérias. Isto limita o suprimento de oxigênio para os músculos da perna e é sentido especialmente quando a necessidade de oxigênio desses músculos se eleva com exercício ou caminhando.

Em uma modalidade preferida da invenção, a doença vascular

10 periférica é tromboangeíte obliterante (doença de Buerger). A "doença de Buerger" é uma doença obliterante caracterizada por mudanças inflamatórias em artérias e veias de calibre pequeno e médio, que ocorrem freqüentemente em fumantes, predominantemente em homens com 20 a 40 anos de idade.

A doença envolve artérias de calibre pequeno e médio e fre-

15 qüentemente veias das extremidades em um padrão segmentado.

Em uma outra modalidade preferida, a doença vascular periférica é isquemia periférica, particularmente isquemia dos membros. "Isquemia" é uma deficiência no suprimento de sangue, geralmente devido a uma oclusão ou traumatismo de vasos sangüíneos. "Isquemia periférica" refere-se

20 particularmente à isquemia nos membros, isto é, braços ou pernas, levando a uma deficiência no fornecimento de oxigênio para o tecido do membro correspondente.

Em ainda outra modalidade da presente invenção, a isquemia de membros é isquemia crítica de membros. "Isquemia crítica de membros" é

25 um estado no qual o fornecimento de sangue para o membro é tão deficiente que ameaça sua sobrevivência. A presença de dor em repouso, ulceração ou gangrena indica isquemia crítica dos membros. Gangrena é o termo usado para descrever tecido morto, e ela ocorre freqüentemente como resultado ou em combinação com isquemia de membro. Uma úlcera isquêmica é causada por um suprimento inadequado de sangue.

30

A isquemia crítica de membro, que inclui gangrena e úlceras, requer revascularização para impedir amputação do membro. Portanto, a

presente invenção refere-se também ao uso de inibidores de IL-18 para o tratamento e/ou prevenção de gangrena e úlceras.

A consequência ulterior de doença vascular periférica, e particularmente isquemia periférica, pode ser amputação do membro afetado, particularmente do membro inferior ou pé afetado. A revascularização levará à reperusão do tecido afetado, e ajuda assim o processo de cicatrização.

Portanto, a invenção refere-se ainda ao uso de um inibidor de IL-18 para a fabricação de um medicamento para a prevenção da amputação dos membros, particularmente um membro inferior, pé ou artelho(s).

Em uma modalidade preferida da presente invenção, o inibidor de IL-18 é selecionado entre inibidores de caspase-1 (ICE), anticorpos direcionados contra IL-18, anticorpos direcionados contra qualquer uma das subunidades do receptor de IL-18, inibidores da via sinalizadora de IL-18, antagonistas de IL-18 que competem com IL-18 e bloqueiam o receptor de IL-18, e proteínas, isoformas, muteínas, proteínas fundidas, derivados funcionais, frações ativas ou seus derivados permutados de forma circular, que ligam-se a IL-18, e inibem a atividade biológica de IL-18.

O termo "proteínas que se ligam a IL-18" é aqui utilizado como sinônimo de "proteína que se liga a IL-18" ou "IL18BP". Ele compreende proteínas ligantes de IL-18, como definido no documento nº WO 99/09063 ou em Novick *et al.*, 1999, inclusive variantes de divisão e/ou isoformas de proteínas ligantes de IL-18, como definido em Kim *et al.*, 2000, que se ligam a IL-18. Particularmente, as isoformas humanas "a" e "c" de IL-18BP são úteis de acordo com a presente invenção. As proteínas úteis de acordo com a presente invenção podem ser glicosiladas ou não-glicosiladas, elas podem ser derivadas de fontes naturais, tal como urina, ou elas podem ser de preferência produzidas de forma recombinante. A expressão recombinante pode ser conduzida em sistemas de expressão procariótica, tal como *E. coli*, ou eucarióticos, e de preferência, em sistemas de expressão de mamíferos. Uma linhagem de células que é particularmente bem apropriada para a expressão de proteínas de mamíferos é a linhagem de células do Ovário de Porquinho-da-índia Chinês (CHO).

5 mais resíduos de aminoácidos são adicionados à sequência natural de uma IL-BP18, ou uma IL-18BP viral, sem mudar consideravelmente a atividade dos produtos resultantes, comparado com IL-18BP do tipo selvagem ou IL-18BP viral. Estas muteínas são preparadas por síntese conhecida e/ou por técnicas de mutagênese direcionada a sítios, ou qualquer outra técnica conhecida apropriada para isto.

15 termo "condições severas" refere-se às condições de hibridização e subsequente lavagem, as quais os versados nessas técnicas referem-se convencionalmente como "severas". Vide Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", supra, Interscience, NY, capítulos 6.3 e 6.4 (1987, 1992), e Sambrook *et al.*, supra. Sem limitação, os exemplos de condições severas

20 incluem condições de lavagem 12-20°C abaixo da T_m calculada do híbrido em estudo em, por exemplo, 2 x SSC e 0,5% de SDS por 5 min, 2 x SSC e 0,1% de SDS por 15 min; 0,1 x SSC e 0,5% de SDS a 37°C por 30-60 min, e depois, 0,1 x SSC e 0,5% de SDS a 68°C por 30-60 min. Os versados nessas técnicas devem entender que as condições de severidade dependem

25 também do comprimento das seqüências de DNA, sondas de oligonucleotídeos (tais como 10-40 bases) ou sondas de oligonucleotídeos mistas. Caso sejam usadas sondas mistas, é preferível usar cloreto de tetrametil-amônio (TMAC) em vez de SSC. Vide Ausubel, supra.

30 aminoácidos suficientemente duplicativa daquela de uma IL-18BP, ou suficientemente duplicativa de uma IL-18BP viral, tal como ter uma atividade comparável a IL-18BP. Uma atividade de IL-18BP é sua capacidade de ligar-se a

IL-18. Desde que a muteína tenha atividade ligante substancial a IL-18, ela pode ser usada na purificação de IL-18, tal como por meio de cromatografia por afinidade, e assim sendo, ser considerada como tendo atividade substancialmente similar à de IL-18BP. Assim sendo, pode-se determinar se qualquer dada muteína tem substancialmente a mesma atividade que IL-18BP por meio de experimentação rotineira, compreendendo submeter essa muteína, por exemplo, a um ensaio simples de competição por intercalação, para determinar se ela liga-se ou não a uma IL-18 adequadamente marcada, tal como um radioimunoensaio ou ensaio ELISA.

- 10 Em uma modalidade preferida, qualquer dessas muteínas que tenha pelo menos 40% de identidade ou homologia com a seqüência de uma IL-BP ou um homólogo de IL-BP codificado de forma viral, como definido no documento nº WO 99/09063. Mais preferivelmente, ela tem pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, ou mais preferi-
- 15 velmente, pelo menos 90% de identidade ou homologia com ela.

- As muteínas de polipeptídeos de IL-18BP ou muteínas de IL-BPs virais, que podem ser usadas de acordo com a presente invenção, ou que codificam ácidos nucleicos delas, incluem um conjunto finito de seqüências substancialmente correspondentes como peptídeos ou polinucleotídeos de
- 20 substituição que podem ser obtidos rotineiramente pelos versados nessas técnicas, sem experimentação desnecessária, baseado nos ensinamentos e nas orientações aqui apresentadas.

- As mudanças preferidas nas muteínas de acordo com a presente invenção são as conhecidas como substituições "conservativas". As
- 25 substituições conservativas de aminoácidos de polipeptídeos ou proteínas de IL-18BP ou IL-18BPs virais, podem incluir aminoácidos sinônimos dentro de um grupo, que têm propriedades físico-químicas suficientemente similares, de tal modo que a substituição entre membros do grupo conservará a função biológica da molécula (Grantham, 1974). É evidente que inserções e
- 30 deleções de aminoácidos também podem ser feitas nas seqüências definidas acima sem alterar sua função, particularmente se as inserções ou deleções envolverem somente alguns aminoácidos, como por exemplo, menos de

trinta, e de preferência menos de dez, e não removerem ou deslocarem aminoácidos que são críticos para uma conformação funcional, como por exemplo, resíduos de cisteína. As proteínas e muteínas produzidas por tais deleções e/ou inserções caem dentro do âmbito da presente invenção.

- 5 De preferência, os grupos de aminoácidos sinônimos são aqueles definidos na Tabela 1. Mais preferivelmente, os grupos de aminoácidos sinônimos são aqueles definidos na Tabela 2; e mais preferivelmente, os grupos de aminoácidos sinônimos são aqueles definidos na Tabela 3.

TABELA 1

10 Grupos Preferidos de Aminoácidos Sinônimos

Aminoácido	Grupo Sinônimo
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

TABELA 2Grupos Mais Preferidos de Aminoácidos Sinônimos

Aminoácido	Grupo Sinônimo
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

TABELA 3Grupos Muito Mais Preferidos de Aminoácidos Sinônimos

Aminoácido	Grupo Sinônimo
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala

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

Os exemplos da produção de substituições de aminoácidos em proteínas, que podem ser usados para obter muteínas de polipeptídeos ou proteínas de IL-18BP, ou muteínas de IL-18BPs virais, para uso na presente invenção, incluem quaisquer etapas de métodos conhecidos, tais como apresentados nas patentes n^{as} US 4.959.314, US 4.588.585, e US 4.737.462, expedidas para Mark *et al.*; US 5.116.943 expedida para Kothe *et al.*; US 4.965.195 expedida para Namen *et al.*; US 4.879.111 expedida para Chong *et al.*; e US 5.017.691 expedida para Lee *et al.*; e as proteínas substituídas com lisina apresentadas na patente n^o US 4.904.584, expedida para Shaw *et al.*

10 O termo "proteína fundida" refere-se a um polipeptídeo que compreende uma IL-18BP, ou uma IL-18BP viral, ou uma muteína ou fragmento dela, fundida com outra proteína, a qual, por exemplo, tem um tempo de residência estendido em fluidos corporais. Uma IL-18BP ou IL-18BP viral pode estar assim fundida a outra proteína, polipeptídeo ou similares, como

15 por exemplo, uma imunoglobulina ou um fragmento dela.

O termo "derivados funcionais", como aqui utilizado, cobre derivados de IL-18BPs ou uma IL-18BP viral, e suas muteínas e proteínas fundidas, que podem ser preparadas a partir de grupos funcionais que ocorrem

como cadeias laterais nos resíduos ou nos grupos terminais N ou C, por meios conhecidos na técnica, e são incluídos na invenção, desde que eles permaneçam farmacêuticamente aceitáveis, isto é, eles não destruam a atividade da proteína que é substancialmente similar à atividade de IL-18BP, ou IL-18BPs virais, e não confiram propriedades tóxicas às composições que as contêm.

Esses derivados podem incluir, por exemplo, cadeias laterais de polietilenoglicol, que podem mascarar sítios antigênicos e estendem o tempo de residência de uma IL-18BP ou uma IL-18BP viral em fluidos corporais.

10 Outros derivados incluem ésteres alifáticos de grupos carboxila, amidas de grupos carboxila, pela reação com amônia, ou com aminas primárias ou secundárias, derivados N-acílicos dos grupos amino de resíduos de aminoácidos formados com porções acila (por exemplo, grupos alcanoíla ou aroíla carbocíclicos) ou derivados O-acílicos de grupos hidroxila livres (por exemplo, aqueles de resíduos serila ou treonila) formados com porções acila.

Como "frações ativas" de uma IL-18BP, ou uma IL-18BP viral, muteínas e proteínas fundidas, a presente invenção cobre qualquer fragmento ou precursores da cadeia polipeptídica da molécula de proteína sozinha ou junto com moléculas ou resíduos associados ligados a elas, por exemplo,

20 resíduos de açúcares ou fosfatos, ou agregados da molécula protéica ou dos resíduos dos açúcares em si, desde que a dita fração tenha atividade substancialmente similar à de IL-18BP.

Em uma outra modalidade preferida da invenção, o inibidor de IL-18 é um anticorpo direcionado contra IL-18 ou seu receptor, o IL-18R. Os anticorpos direcionados contra qualquer uma das subunidades de IL-18R, denominadas IL-18R α e IL-18R β , podem ser usados de acordo com a presente invenção.

25

Os anticorpos, de acordo com a invenção, podem ser policlonais ou monoclonais, quiméricos, humanizados, ou mesmo completamente humanos. Os anticorpos recombinantes e seus fragmentos caracterizam-se por

30 ligação de alta afinidade a IL-18 ou IL-18R *in vivo* e baixa toxicidade. Os anticorpos que podem ser usados na invenção caracterizam-se pela sua capa-

cidade de tratar pacientes por um período suficiente para ter regressão ou alívio bom a excelente da condição patogênica ou qualquer sintoma ou grupo de sintomas relacionados a uma condição patogênica, e uma baixa toxicidade.

5 Compostos neutralizadores são facilmente gerados em animais tais como coelhos, cabras ou camundongos por imunização com IL-18 ou IL-18R α ou β . Os camundongos imunizados são particularmente úteis para fornecer fontes de células B para a fabricação de hibridomas, os quais, por sua vez, são cultivados para produzir grandes quantidades de anticorpos monoclonais anti-IL-18.

10 Anticorpos quiméricos são moléculas de imunoglobulinas caracterizadas por dois ou mais segmentos ou partes derivadas de espécies de animais diferentes. Geralmente, a região variável do anticorpo quimérico é derivada de um anticorpo de mamífero não-humano, tal como um anticorpo monoclonal murino, e a região constante de imunoglobulina é derivada de
15 uma molécula de imunoglobulina humana. De preferência, ambas regiões e a combinação têm baixa imunogenicidade, como determinado rotineiramente (Elliott *et al.*, 1994). Os anticorpos humanizados são moléculas de imunoglobulina criadas por técnicas de engenharia genética, nas quais as regiões
20 constantes murinas são substituídas por correspondentes humanos, e ao mesmo tempo retendo as regiões ligantes de antígenos murinos. O anticorpo quimérico de camundongo/humano resultante tem, de preferência, imunogenicidade reduzida e melhores farmacocinéticas em seres humanos (Knight *et al.*, 1993).

25 Assim sendo, em uma outra modalidade preferida, o anticorpo de IL-18 ou IL-18R é um anticorpo humanizado. Os exemplos preferidos de anticorpos anti-IL-18 humanizados estão descritos no pedido de patente europeia EP 0 974 600, por exemplo.

Em ainda outra modalidade preferida, o anticorpo é completamente
30 humano. A tecnologia para produzir anticorpos humanos está descrita detalhadamente, por exemplo, nos documentos WO 00/76310, WO 99/53049, US 6.162.963 ou AU 5336100.

Um método para a preparação de anticorpos completamente humanos consiste em "humanização" do sistema imunológico humoral de camundongos, isto é, produção de cepas de camundongos capazes de produzir Ig humana (xenocamundongos), pela introdução de *loci* de imunoglobulina humana (Ig) em camundongos nos quais os genes de Ig endógena foram inativados. Os *loci* de Ig são complexos em termos de sua estrutura física e do rearranjo genético e processos de expressão necessários para ulteriormente produzir uma resposta imunológica ampla. A diversidade de anticorpos é gerada principalmente pelo rearranjo combinatório entre diferentes genes V, D e J presentes nos *loci* de Ig. Estes *loci* contêm também os elementos reguladores entremeados que controlam a expressão de anticorpos, a exclusão alélica, a comutação de classes e a maturação por afinidade. A introdução de transgenes de Ig humana não-rearranjados em camundongos tem demonstrado que o mecanismo de recombinação de camundongos é compatível com genes humanos. Além disso, hibridomas que secretam hu-mAbs específicos de antígenos de vários isótipos podem ser obtidos por imunização de xenocamundongos com antígeno.

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

Em uma modalidade altamente preferida da presente invenção, o inibidor de IL-18 é uma IL-18BP, ou uma sua isoforma, muteína, proteína fundida, derivado funcional, fração ativa ou derivado permutado de forma circular. Estas isoformas, muteínas, proteínas fundidas ou derivados funcionais retêm a atividade biológica de IL-18BP, particularmente a ligação à IL-18, e de preferência, têm essencialmente pelo menos uma atividade similar à de IL-18BP. Idealmente, tais proteínas têm uma atividade biológica intensificada, comparado com IL-18BP não-modificada. As frações ativas preferidas têm uma atividade que é melhor do que a atividade de IL-18BP, ou têm outras vantagens, tais como melhor estabilidade ou uma toxicidade ou imunogenicidade mais baixa, ou elas são mais fáceis de produzir em grandes quantidades, ou são mais fáceis de purificar.

As seqüências de IL-18BP e suas variantes/isoformas de divisão podem ser obtidas no documento WO 99/09063 ou em Novick *et al.*, 1999, bem como em Kim *et al.*, 2000.

Os derivados funcionais de IL-18BP podem ser conjugados a polímeros, para melhorar as propriedades da proteína, tais como estabilidade, meia-vida, biodisponibilidade, tolerância pelo corpo humano, ou imunogenicidade. Para atingir esta meta, IL-18BP pode ser ligada, por exemplo, a polietilenoglicol(PEG). A "PEGuilação" pode ser conduzida por métodos conhecidos, descritos no documento WO 92/13095, por exemplo.

Portanto, em uma modalidade preferida da presente invenção, os inibidores de IL-18, e particularmente IL-18BP, são "PEGuilados".

Em uma outra modalidade preferida da invenção, o inibidor de IL-18 compreende uma fusão com imunoglobulina, isto é, o inibidor de IL-18 é uma proteína fundida que compreende o todo ou uma parte de uma proteína ligante de IL-18, que está fundida ao todo ou uma parte de uma imunoglobulina. Os métodos para fabricar proteínas de fusão com imunoglobulina são bem-conhecidos na técnica, tais como aqueles descritos no documento WO 01/03737, por exemplo. Os versados na técnica devem entender que a proteína de fusão resultante da invenção retém a atividade biológica de IL-18BP, particularmente a ligação à IL-18. A fusão pode ser direta, ou por intermédio de um peptídeo ligante curto que pode ser tão curto quanto um comprimento de 1 a 3 resíduos de aminoácidos ou mais longos, como por exemplo, um comprimento de 13 a 20 resíduos de aminoácidos. O dito ligante pode ser um tripeptídeo da seqüência E-F-M (Glu-Phe-Met), por exemplo, ou uma seqüência ligante com 13 aminoácidos que compreende Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met, introduzida entre a seqüência de IL-18BP e a seqüência de imunoglobulina. Proteína de fusão resultante tem melhores propriedades, tais como um tempo de residência estendido em fluidos corporais (meia-vida), maior atividade específica, maior nível de expressão, ou a purificação da proteína de fusão é facilitada.

Em uma modalidade preferida, IL-18BP está fundida à região constante de uma molécula de Ig. De preferência, ela está fundida a regiões

com cadeia pesada, tais como os domínios CH2 e CH3 de IgG1 ou IgG2 humana, por exemplo. A geração de proteínas de fusão específicas que compreende IL-18BP e uma parte de uma imunoglobulina está descrita no Exemplo 11 do documento WO 99/09063, por exemplo. Outras isoformas de

5 moléculas de Ig também são apropriadas para a geração de proteínas de fusão de acordo com a presente invenção, tais como as isoformas IgG₂ ou IgG₄, ou outras classes de Ig, como IgM ou IgA, por exemplo. As proteínas de fusão podem ser monoméricas ou multiméricas, heteromultiméricas ou homomultiméricas.

10 Em ainda outra modalidade da invenção, um inibidor de IL-18 é usado em combinação com uma ou mais outras moléculas ativas nas condições clínicas da invenção, tais como vasodilatadores, bloqueadores de cálcio, aspirina, β -bloqueadores, ou similares. Antagonistas de TNF também podem ser usados em combinação com um inibidor de IL-18 de acordo com

15 a presente invenção, por exemplo. Os antagonistas de TNF exercem sua atividade de várias maneiras. Em primeiro lugar, os antagonistas podem ligar-se ou seqüestrar a molécula de TNF em si com afinidade e especificidade suficientes para neutralizar parcial ou substancialmente o epítopo ou epítopos de TNF responsáveis pela ligação do receptor de TNF (aqui doravante denominados "antagonistas seqüestradores"). Um antagonista seqüestrador pode ser, por exemplo, um anticorpo direcionado contra TNF.

20 Alternativamente, os antagonistas de TNF podem apresentar a via sinalizadora de TNF ativada pelo receptor da superfície celular depois da ligação de TNF (aqui doravante denominados "antagonistas sinalizadores").

25 Ambos grupos de antagonistas são úteis, seja isoladamente ou juntos, em combinação com um inibidor de IL-18, na terapia ou prevenção de doença vascular periférica.

Os antagonistas de THF são identificados e avaliados facilmente por triagem rotineira de candidatos quanto ao seu efeito sobre a atividade de

30 TNF nativo sobre linhagens de células suscetíveis *in vitro*, como por exemplo, células B humanas, nas quais TNF causa proliferação e secreção de imunoglobulina. O ensaio contém uma formulação de TNF em diluições vari-

adas de antagonista candidato, como por exemplo, 0,1 a 100 vezes a quantidade molar de TNF usada no ensaio, e controles com nenhum TNF ou somente antagonista (Tucci *et al.*, 1992).

Os antagonistas seqüestradores são os antagonistas de TNF preferidos a serem usados de acordo com a presente invenção. Dentre os antagonistas seqüestradores, aqueles polipeptídeos que se ligam a TNF com alta afinidade e possuem baixa imunogenicidade são preferidos. As moléculas dos receptores de TNF solúveis e os anticorpos neutralizadores para TNF são particularmente preferidos. Por exemplo, TNF-RI e TNF-RII solúveis são úteis na presente invenção. As formas truncadas destes receptores, compreendendo domínios extracelulares dos receptores ou partes funcionais deles, são antagonistas mais particularmente preferidos de acordo com a presente invenção. Os receptores solúveis truncados de TNF do tipo I e tipo II estão descritos no documento EP 914431, por exemplo.

As formas truncadas dos receptores de TNF são solúveis e foram detectadas na urina e soro como proteínas ligantes inibitórias de TNF com 30 kDa e 40 kDa, que são denominadas TBPI e TBPII, respectivamente (Engelmann *et al.*, 1990). O uso simultâneo, seqüencial, ou separado do inibidor de IL-18 com o antagonista de TNF é preferido de acordo com a invenção.

Em uma outra modalidade preferida, TNF-RI (TBPI) humano solúvel é o antagonista de TNF a ser usado de acordo com a invenção. As moléculas dos receptores de TNF solúveis naturais e recombinantes e os métodos para sua produção foram descritos nas patentes européias EP 308 378, EP 398 327 e EP 433 900.

Os derivados, fragmentos, regiões e partes biologicamente ativas das moléculas dos receptores assemelham-se funcionalmente às moléculas dos receptores que também podem ser usadas na presente invenção. Tal equivalente ou derivado biologicamente ativo da molécula do receptor refere-se à parte do polipeptídeo, ou à seqüência que codifica a molécula do receptor, que tem um tamanho suficiente e é capaz de ligar-se a TNF com uma afinidade tal que a interação com o receptor de TNF ligado à membrana

seja inibida ou bloqueada.

O inibidor de IL-18 pode ser usado simultaneamente, seqüencialmente ou separadamente com o inibidor de TNF.

Em uma outra modalidade preferida da presente invenção, o inibidor de IL-18 é usado em uma quantidade entre cerca de 0,01 e 100 mg/kg ou entre cerca de 1 e 10 mg/kg ou 2 a 5 mg/kg.

O inibidor de IL-18, de acordo com a invenção, é administrado, de preferência, por via sistêmica, e de preferência, por via subcutânea ou intramuscular. Ele pode ser administrado diariamente, ou a cada dois dias.

10 As formulações com liberação prolongada tornam possível administrar menos freqüentemente, tal como uma vez por semana, por exemplo.

A invenção refere-se ainda ao uso de um vetor de expressão que compreende a seqüência codificadora de um inibidor de IL-18 na preparação de um medicamento para a prevenção e/ou tratamento de uma doença vascular periférica. Assim sendo, uma abordagem de terapia gênica é considerada, para distribuir o inibidor de IL-18 para o local onde ele é necessário. Para tratar e/ou prevenir uma doença vascular periférica, o vetor de terapia gênica, que compreende a seqüência de um inibidor de IL-18, pode ser injetado diretamente dentro do tecido doente, como por exemplo, evitando assim os problemas envolvidos na administração sistêmica de vetores de terapia gênica, tais como diluir os vetores, alcançar e atingir as células ou tecidos-alvo, e os efeitos colaterais.

15

20

O uso de um vetor para induzir e/ou intensificar a produção endógena de um inibidor de IL-18 em uma célula normalmente silenciosa para a expressão de um inibidor de IL-18, ou que expressa quantidades do inibidor que não são suficientes, também está contemplado de acordo com a invenção. O vetor pode compreender seqüências reguladoras funcionais nas células desejadas para expressar o inibidor ou IL-18. Tais seqüências reguladoras podem ser promotores ou intensificadores, por exemplo. A seqüência reguladora pode ser então introduzida dentro do *locus* correto do genoma por recombinação homóloga, ligando assim de forma operacional a seqüência reguladora ao gene, cuja expressão se precisa induzir ou intensificar. A

25

30

tecnologia é usualmente referida como "Ativação Endógena de Genes" (EGA), e ela está descrita, por exemplo, no documento WO 91/09955.

Os versados na técnica devem entender que é possível também interromper a expressão de IL-18 diretamente, sem usar um inibidor de IL-18, com a mesma técnica. Para fazer isto, um elemento de regulação negativa, como por exemplo, um elemento silenciador, pode ser introduzido dentro do *locus* do gene de IL-18, levando assim a uma regulação descendente ou impedimento da expressão de IL-18. Os versados na técnica devem entender que tal regulação descendente ou silenciamento da expressão de IL-18 tem o mesmo efeito que usar um inibidor de IL-18, para prevenir e/ou tratar uma doença.

A invenção refere-se ainda ao uso de uma célula, que tenha sido geneticamente modificada para produzir um inibidor de IL-18, na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de uma doença vascular periférica.

O inibidor de IL-18 a ser usado de acordo com a presente invenção pode ser, de preferência, administrado como uma composição farmacêutica, opcionalmente em combinação com uma quantidade terapeuticamente eficaz de um inibidor de TNF ou outra droga ativa no tratamento ou prevenção de uma doença vascular periférica.

IL-18BP e suas isoformas, muteínas, proteínas fundidas, derivados funcionais, frações ativas ou derivados permutados de forma circular, como descritos acima, são os ingredientes ativos preferidos das composições farmacêuticas.

A definição de "farmaceuticamente aceitável" significa que engloba qualquer veículo que não interfere com a eficácia da atividade biológica do ingrediente ativo e que não é tóxico para o hospedeiro ao qual ele é administrado. Por exemplo, no caso de administração parenteral, a proteína ou proteínas ativas podem ser formuladas em uma forma de dosagem unitária para injeção em veículos tais como solução salina, solução de dextrose, albumina sérica e solução de Ringer.

Os ingredientes ativos da composição farmacêutica, de acordo



Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" é tal que, quando administrada, o inibidor de IL-18 resulta na inibição da atividade biológica de IL-18. A dosagem administrada, como dose única ou doses múltiplas, a um indivíduo variará dependendo de uma série de fatores, inclusive das propriedades farmacocinéticas do inibidor de IL-18, via de administração, condições e características (sexo, idade, peso corporal, saúde, porte) do paciente, extensão dos sintomas, tratamentos concomitantes, frequência do tratamento e do efeito desejado. O ajuste e a manipulação de faixas de dosagem estabelecidas estão dentro da capacidade dos versados na técnica, bem como os métodos *in vitro* e *in vivo* para determinar a inibição de IL-18 em um indivíduo.

De acordo com a invenção, o inibidor de IL-18 é usado em uma quantidade entre cerca de 0,001 e 100 mg/kg ou entre cerca de 0,01 e 10 mg/kg, ou entre cerca de 0,1 e 5 mg/kg de peso corporal, ou cerca de 1 a 3 mg/kg de peso corporal, ou cerca de 2 mg/kg de peso corporal.

A via de administração, que é preferida de acordo com a invenção, é a administração por via subcutânea. A administração intramuscular é ainda preferida de acordo com a invenção. Para administrar o inibidor de IL-18 diretamente no local da sua ação, prefere-se também administrar por via tópica.

Em outras modalidades preferidas, o inibidor de IL-18 é administrado diariamente ou a cada dois dias.

As doses diárias são usualmente dadas em doses divididas ou na forma de liberação prolongada eficaz para obter os resultados desejados. Uma segunda administração ou administração subsequente pode ser realizada em uma dosagem que é igual, menor ou maior do que a dose inicial ou anterior administrada ao indivíduo. Uma segunda administração ou administração subsequente pode ser administrada durante ou antes do início da doença.

De acordo com a invenção, o inibidor de IL-18 pode ser administrado de forma profilática ou terapêutica a um indivíduo antes, simultaneamente ou seqüencialmente com outros esquemas ou agentes terapêuticos

(por exemplo, esquemas com múltiplas drogas), em uma quantidade terapeuticamente eficaz, particularmente com um inibidor de TNF e/ou outro agente vascularprotetor. Os agentes ativos que são administrados simultaneamente com outros agentes terapêuticos podem ser administrados na
5 mesma composição ou em composições diferentes.

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

10 A invenção refere-se ainda a um método para tratar uma doença vascular periférica, compreendendo administrar uma quantidade farmaceuticamente eficaz de um inibidor de IL-18, opcionalmente em combinação com uma quantidade farmaceuticamente eficaz de um antagonista de TFN, a um paciente que dela necessita.

15 Tendo sido agora descrita esta invenção, os versados na técnica devem avaliar que a mesma pode ser realizada dentro de uma ampla faixa de parâmetros, concentrações e condições equivalentes, sem fugir do espírito e do âmbito da invenção e sem experimentação desnecessária.

Embora esta invenção tenha sido descrita em relação a suas
20 modalidades específicas, deve-se entender que ela pode ser modificada adicionalmente. Este pedido de patente pretende cobrir quaisquer variações, usos ou adaptações da invenção, que seguem, em geral, os princípios da invenção e incluindo tais afastamentos da presente descrição, conforme eles entrem em prática dentro desta área técnica à qual a invenção pertence, e
25 conforme possam ser aplicados às características aqui anteriormente enunciadas, como se segue no âmbito das reivindicações apensas.

Todas as referências aqui citadas, inclusive artigos ou resumos de periódicos, pedidos de patente norte-americanos ou estrangeiros, publicados ou não publicados, ou quaisquer outras referências, são aqui inteiramente incorporadas como referência, inclusive todos dados, tabelas, figuras
30 e textos apresentados nas referências citadas. Adicionalmente, os teores inteiros das referências citadas dentro das referências aqui citadas também

são inteiramente incorporados como referência.

A referência a etapas de métodos conhecidos, etapas de métodos convencionais, métodos conhecidos ou métodos convencionais, não é de forma alguma uma admissão de que qualquer aspecto, descrição ou modalidade da presente invenção está descrita, enunciada ou sugerida nas técnicas relevantes.

A descrição precedente das modalidades específicas revelará assim completamente a natureza geral da invenção, de tal modo que outras pessoas podem, aplicando os conhecimentos dentro da habilidade dos versados na técnica (inclusive os teores das referências aqui citadas), modificar e/ou adaptar facilmente para várias aplicações tais modalidades específicas, sem experimentação desnecessária, sem fugir do conceito geral da presente invenção. Portanto, pretende-se que tais adaptações e modificações estejam dentro do significado de uma série de equivalentes das modalidades descritas, baseado nos ensinamentos e orientações aqui apresentados. Deve-se entender que a fraseologia ou terminologia aqui utilizada é com o propósito de descrição e não-limitação, de tal modo que a terminologia ou fraseologia do presente relatório descritivo deva ser interpretada pelos versados na técnica à luz dos ensinamentos e orientações aqui apresentados, em combinação com os conhecimentos dos versados na técnica.

Exemplos

Exemplo 1

Inibição de IL-18 Reduz Isquemia Periférica

Métodos:

25 Introdução de Isquemia na Pata Traseira

Camundongos C57BL/6J machos (Iffa Creddo, Lyon, França) sofreram cirurgia para induzir isquemia unilateral da pata traseira. Os animais foram anestesiados por inalação de isoflurano. A ligadura foi realizada na artéria femoral direita, 0,5 cm perto da bifurcação da veia safena e das artérias poplíteas. Os camundongos (7 animais por grupo) foram então alojados sob condições específicas isentas de patógenos por 3 ou 28 dias. Para examinar o papel de IL-18BP na angiogênese induzida por isquemia, um

grupo de camundongos recebeu injeção com 60 μ g do plasmídeo de expressão de IL-18BP murino, pcDNA3-mIL18BP em ambos músculos cranianos tibiais, como descrito anteriormente (Mallat *et al.*, 2001). Os camundongos do controle receberam injeção com a mesma dosagem do plasmídeo de controle vazio. Pulsos elétricos transcutâneos (8 pulsos elétricos de onda quadrada de 200 V/cm, 20 min de duração a 2 Hz) foram distribuídos por um eletropulsador PS-15 (Genetronics), usando dois eletrodos de placa de aço inoxidável, colocados afastados 4,2 a 5,3 mm, em cada lado da perna. Esta estratégia foi usada porque demonstrou-se anteriormente que ela aumenta os níveis plasmáticos de IL-18BP, diminui a atividade plasmática de IL-18 e inibe o desenvolvimento e a progressão de placas ateroscleróticas (Mallat *et al.*, 2001).

Quantificação da Angiogênese

Microangiografia

A densidade dos vasos foi avaliada por microangiografia de alta definição no final do período de tratamento, como descrito anteriormente (Silvestre *et al.*, 2000; Silvestre *et al.*, 2001). Resumidamente, os camundongos são anestesiados (inalação de isoflurano) e um meio de contraste (sulfato de bário, 1 g/ml) foi injetado através de um cateter introduzido dentro da aorta abdominal. As imagens (3 por animal) captadas por um transdutor de raios X foram montadas para obter uma visão completa das patas traseiras. A densidade dos vasos foi expressa como uma percentagem de pixels por imagem ocupada pelos vasos na área de quantificação. Uma zona de quantificação foi delineada no lugar da ligadura na artéria femoral, joelho, borda do fêmur e limite externo da perna.

Densidade Capilar

A análise microangiográfica foi completada pela avaliação das densidades capilares em músculos isquêmicos e não-isquêmicos, como descrito anteriormente (Silvestre *et al.*, 2000; Silvestre *et al.*, 2001). Seções de tecido congelado (7 μ m) foram incubadas com anticorpo monoclonal do rato direcionado contra CD31 (20 μ g/ml, Pharmingen), para identificar capilares. As imunocolorações foram visualizadas usando sistemas de visualiza-

ção com peroxidase de rábano silvestre e avidina-biotina (Vectastain ABC kit elite, Vector Laboratories). As densidades capilares foram calculadas em campos escolhidos aleatoriamente de uma área definida, usando o software Histolab (Microvision).

5 **Formação de Imagens de perfusão por Doppler a Laser**

Para conseguir evidência funcional quanto a mudanças na vascularização induzidas por isquemia, foram realizados experimentos de formação de Imagens de perfusão por Doppler a Laser, como descrito anteriormente (Silvestre *et al.*, 2000; Silvestre *et al.*, 2001). Resumidamente, os pêlos em excesso foram removidos com creme depilatório da pata antes da formação das imagens, e os camundongos foram colocados sobre placa de aquecimento a 37°C, para minimizar a variação de temperatura. Contudo, para considerar as variáveis, inclusive a luz e a temperatura ambientais, a perfusão calculada foi expressa como uma relação entre a perna isquêmica e a não-isquêmica.

15 Análise Estatística

Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão médio. A análise unidirecional da variância ANOVA foi usada para comparar cada parâmetro. Comparações do teste post-hoc de Bonferonni foram então realizadas para identificar quais diferenças entre grupos são responsáveis pelo ANOVA significativo global. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

20 Resultados:

Microangiografia

25 No terceiro dia (dia 3), as relações das pontuações angiográficas das pernas isquêmica/não-isquêmica não foram afetadas, em qualquer um dos dois grupos (Figura 1). Em contraste, no dia 28, a pontuação angiográfica apresentou um aumento de 1,6 vez em camundongos tratados com IL-18BP, comparado com os controles ($p < 0,01$).

30 Densidade Capilar

Os dados microangiográficos foram confirmados por análise da densidade capilar depois de coloração de CD31. No dia 28, a densidade ca-

5

Formação de Imagens de Perfusão por Doppler a Laser

10

15

Regulação de VEGF, Nível de Proteína fosfo-Akt e eNOS

Método:

20

Resultados:

25

30

do tratamento. No dia 28, nos camundongos do controle, o teor da proteína fosfo-Akt foi aumentado em 60% na pata traseira isquêmica, comparado com a não-isquêmica ($p < 0,01$). Este aumento no teor de fosfo-Akt da perna isquêmica duplicou em camundongos tratados com IL-18BP (110% de aumento, $p < 0,05$, comparado com o aumento na perna isquêmica dos camundongos do controle) (Figura 4).

eNOS: No dia 3, o teor da proteína eNOS não foi afetado na isquêmica ($107 \pm 8\%$ versus $103 \pm 24\%$) e nas pernas não-isquêmicas ($100 \pm 12\%$ versus $94 \pm 21\%$) para o controle e animais tratados com IL-18BP, respectivamente. No dia 28, nos camundongos do controle, os níveis de eNOS foram elevados em 55% na perna isquêmica em relação à não-isquêmica ($155 \pm 8\%$ versus $100 \pm 11\%$, respectivamente, $p < 0,05$). Tal aumento não foi afetado pelo tratamento com IL-18BP ($160 \pm 12\%$, $p = 0,61$, versus controle isquêmico).

15 Exemplo 3

Efeito de IL-18BP sobre EPCs (células progenitoras epiteliais)

Métodos:

Análise de Citometria de Fluxo

Acredita-se que as células EPCs são derivadas de células progenitoras hematopoéticas Sca-1-positivas (Takahashi *et al.*, 1999). A percentagem de células mononucleares que expressam a proteína marcadora de EPCs Sca-1 foi então determinada por citometria de fluxo. Sete dias após a isquemia, as células mononucleares foram isoladas do sangue periférico ($300 \mu\text{l}$) e da medula óssea de camundongos tratados com o plasmídeo pcDNA3 vazio ou o plasmídeo pcDNA3-mIL18BP ($n = 5$ por grupo). As células da medula óssea foram obtidas enxaguando as tíbias e fêmures. As células mononucleares de baixa densidade foram isoladas por centrifugação com gradiente de densidade com Ficoll. As células mononucleares foram então incubadas com anticorpos monoclonais conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) contra Sca-1 (D7, BD Pharmingen). Anticorpos idênticos a isótipos serviram como controles.

Ensaio de Diferenciação de EPCs

Imediatamente após o isolamento, 5×10^6 células mononucleares derivadas da medula óssea também foram colocadas em placas de cultura de células de 35 mm revestidas com vitronectina do plasma do rato (Sigma) e gelatina (0,1%) e mantidas em meio basal endotelial (EBM2, Bio Whittaker). Depois de 4 dias em cultura, as células não aderentes foram removidas e as células aderentes foram submetidas à análise imunoquímica. Para detectar a absorção de lipoproteína de baixa densidade acetilada marcada com 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (AcLDL-Dil), as células foram incubadas com AcLDL-Dil (Tebu) a 37°C por 1 h. As células foram então fixadas com paraformaldeído a 2%, incubadas com um anticorpo de coelho policlonal primário direcionado contra o fator von-Willbrand (vWF) (DAKO) por 1 h, e com IgG anti-coelho monoclonal marcado com FITC (H+L) por 30 min (Coulter). As células positivas com coloração dupla para AcLDL-Dil e também vWF foram julgadas como sendo EPCs, e elas foram contadas por cavidade. Três investigadores independentes avaliaram o número de EPCs por cavidade contando três campos de alta potência selecionados aleatoriamente. Os resultados estão expressos como percentagem do número total de células mononucleares.

Resultados:

Acredita-se que as EPCs derivam de células mononucleares Sca-1-positivas (Takahashi *et al.*, 1999). A percentagem de células mononucleares Sca-1-positivas no sangue periférico permaneceu não modificada nos animais tratados com IL-18BP, comparado com os camundongos do controle ($31,5 \pm 13\%$ versus $28,5 \pm 13\%$, respectivamente). Similarmente, o número global de células mononucleares Sca-1-positivas isoladas da medula óssea não diferiu entre os camundongos tratados com IL-18BP e os animais do controle ($4,35 \pm 0,95\%$ versus $5,87 \pm 0,22\%$, respectivamente). Além disso, o tratamento com IL-18BP não afetou o número total de células mononucleares do sangue periférico ou da medula óssea (dados não ilustrados).

As EPCs foram isoladas e cultivadas a partir de células mononucleares da medula óssea e caracterizadas como células de coloração dupla

positivas quanto a AcLDL-Dil e vWF. A percentagem de células com coloração dupla-positiva foi quase não detectável nos animais não-isquêmicos (< 5%, n = 4). A isquemia induziu um aumento acentuado na percentagem de células com coloração dupla positiva para AcLDL-Dil e vWF ($48 \pm 3\%$, $p < 0,001$ versus os animais não-isquêmicos). Tal efeito foi expandido ainda mais pelo tratamento com IL-18BP ($48 \pm 3\%$ nos controlos versus $85 \pm 2\%$ nos camundongos tratados com IL-18BP, $p < 0,001$) (Figura 5). Assim sendo, o tratamento com IL-18BP parece estimular a diferenciação de células mononucleares em EPCs ao invés de aumentar o número de células progenitoras na circulação.

REFERÊNCIAS

1. Buggemann et al., Eur. J. Immunol. 21:1323-1326 (1991)
2. DiDonato, J A, Hayakawa, M, Rothwarf, D M, Zandi, E and Karin, M. (1997). Nature 388, 16514-16517.
- 5 3. Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H., and Woody, J.N., 1994, Lancet 344, 1125-1127.
4. Engelmann, H., Novick, D., and 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. Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:1190-1195.
7. Kim SH et al., J. Immuno. 2001, 166, pp. 148 – 154.
- 15 8. Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallon B, Moore MA, Vilcek J, Daddona P, et al. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. Mol Immunol 1993 Nov 30:16 1443-53
9. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- 20 10. Meldrum, D. R., Cleveland, J. C., Jr., Cain, B. S., Meng, X. & Harken, A. H. (1998) Ann Thorac Surg 65, 439-43.
11. Mendez, M.M., Green, L.L., Corvalan, J.R.F., Jia X-C., Maynard-Currie, E.E., Yang, X-D., Gallo, M.L., Louie, D.M., Lee, D.V., Erickson, K.L.,
- 25 Luna, J., Roy, C.M-N., Abderrahim, H., Kirshenbaum, F., Noguchi, M., Smith, D.M., Fukushima, A., Hales, J.F., Finer, M.H., Davis, C.G., Zsebo, K.M. and Jakobovits, A. (1997). "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 and Tamura, T. (1989). Infect. Immun. 57, 590-595.
13. Novick, D, Kim, S-H, Fantuzzi, G, Reznikov, L, Dinarello, C, and

- Rubinstein, M (1999). *Immunity* 10, 127-136.
14. Parnet, P, Garka, K E, Bonnert, T P, Dower, S K, and Sims, J E. (1996), *J. Biol. Chem.* 271, 3967-3970.
 - 5 15. Silvestre, J.S., Mallat Z, Duriez M, Tamarat R, Bureau MF, Scherman D, Duverger N, Branellec D, Tedgui A, Levy BI. 2000. Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ. Res.* 87: 448-452.
 - 10 16. Silvestre, J.S., Mallat Z, Tamarat R, Duriez M, Tedgui A and Levy BI. 2001. Regulation of Matrix Metalloproteinase activity in ischemic tissue by interleukin-10: Role in ischemia-induced angiogenesis. *Circ. Res.* 89: 259-264.
 - 15 17. Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J.M., Asahara, T. 1999. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 5:434-438.
 18. Torigoe, K., Ushio, S., Okura, T., Kobayashi, S., Taniai, M., Kunikate, T., Murakami, T., Sanou, O., Kojima, H., Fuji, M., Ohta, T., Ikeda, M., Ikegami, H. & Kurimoto, M. (1997) *J Biol Chem* 272, 25737-25742.
 19. Tomizuka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727 (2000)
 - 20 20. Tucci, A., James, H., Chicheportiche, R., Bonnefoy, J.Y., Dayer, J.M., and Zubler, R.H., 1992, *J.Immunol.* 148, 2778-2784.
 - Yoshimoto T, Takeda, K, Tanaka, T, Ohkusu, K, Kashiwamura, S, Okamura, H, Akira, S and Nakanishi, K (1998). *J. Immunol.* 161, 3400-3407.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma proteína de ligação a IL-18 (IL18BP), caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença vascular periférica das extremidades.

5 2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a doença vascular periférica é doença arterial periférica.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a doença vascular periférica é doença vascular periférica das extremidades inferiores.

10 4. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a doença vascular periférica das extremidades é acompanhada de claudicação.

15 5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a doença vascular periférica é doença de Buerger (tromboangeíte obliterante).

6. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a doença vascular periférica é isquemia periférica.

20 7. Uso, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a isquemia periférica é isquemia crítica dos membros.

8. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a doença vascular periférica das extremidades é acompanhada de gangrena e/ou úlcera.

25 9. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a doença vascular periférica das extremidades é acompanhada da amputação de membros.

10. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que a proteína de ligação a IL-18 (IL18BP) é glicosilada em um ou mais sítios.

30 11. Uso de um vetor de expressão compreendendo a sequência codificadora de proteína de ligação a IL-18 (IL18BP), caracterizado pelo fato de que é para preparação de um medicamento para o tratamento de uma

doença vascular periférica das extremidades.

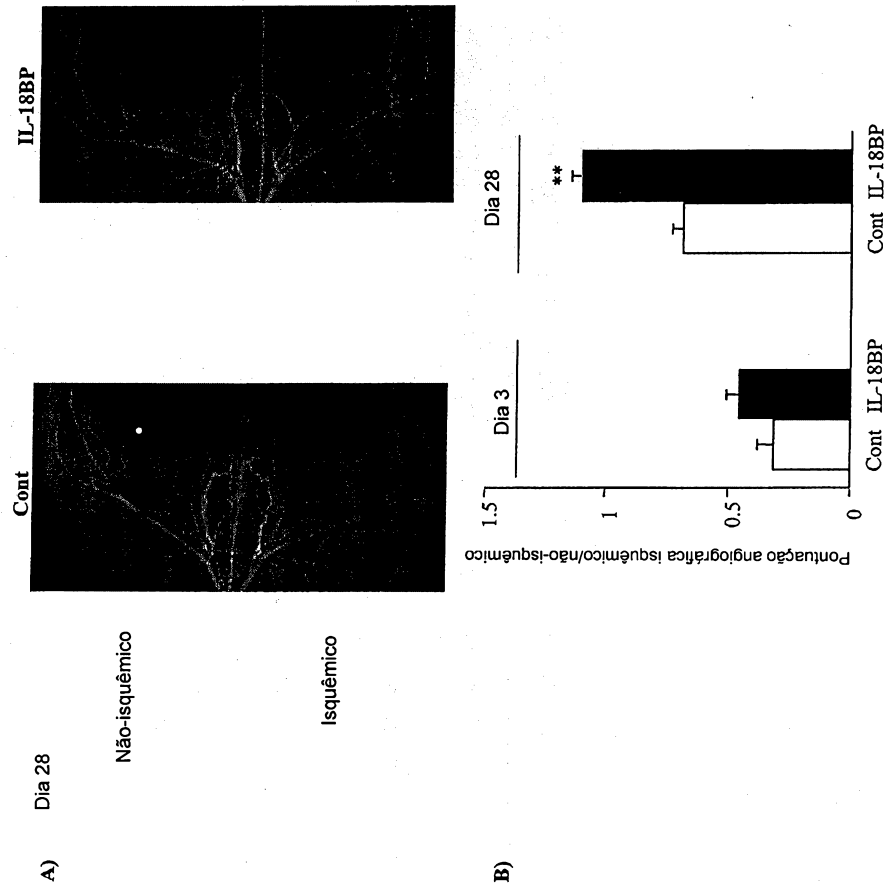
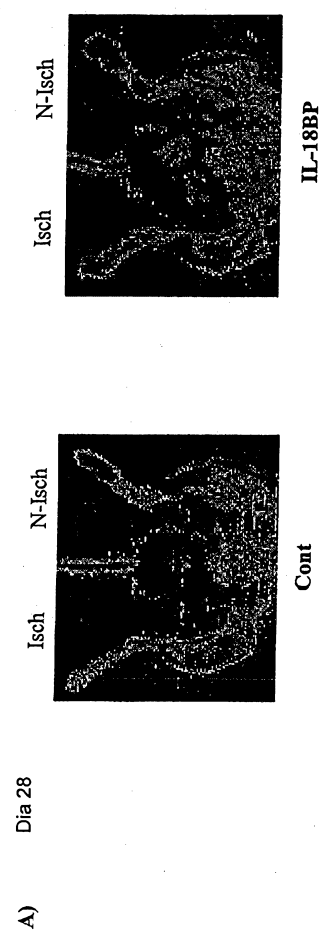


Fig. 1



B)

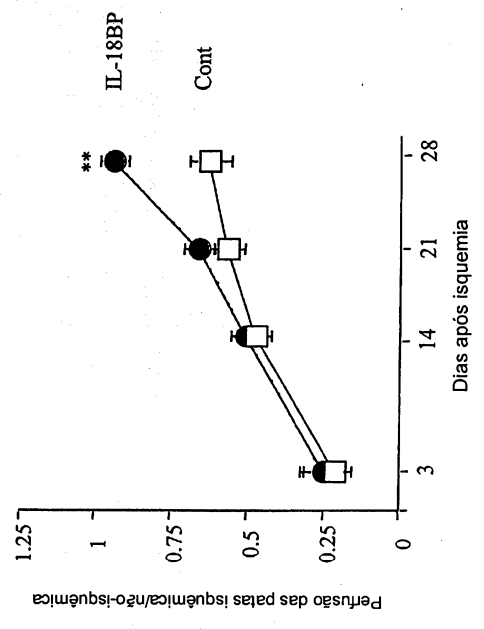


Fig. 2

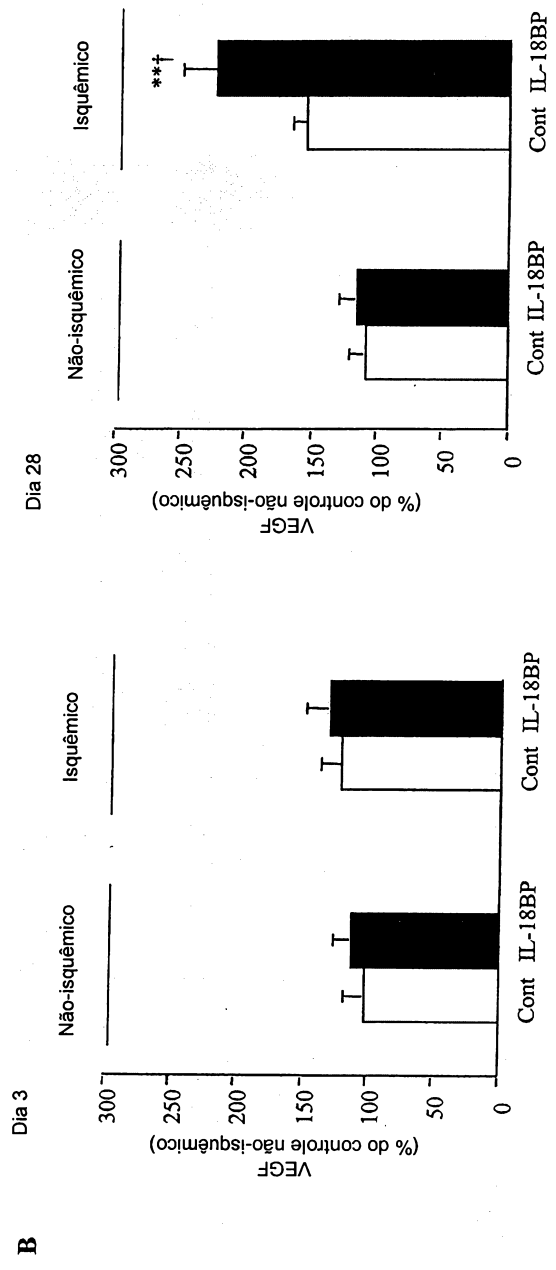
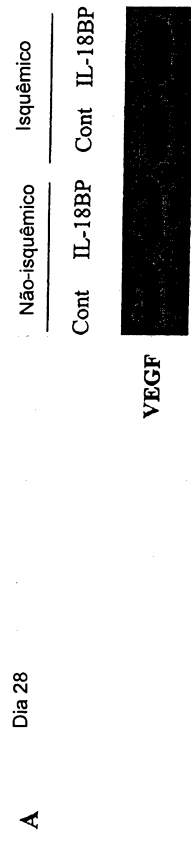


Fig. 3

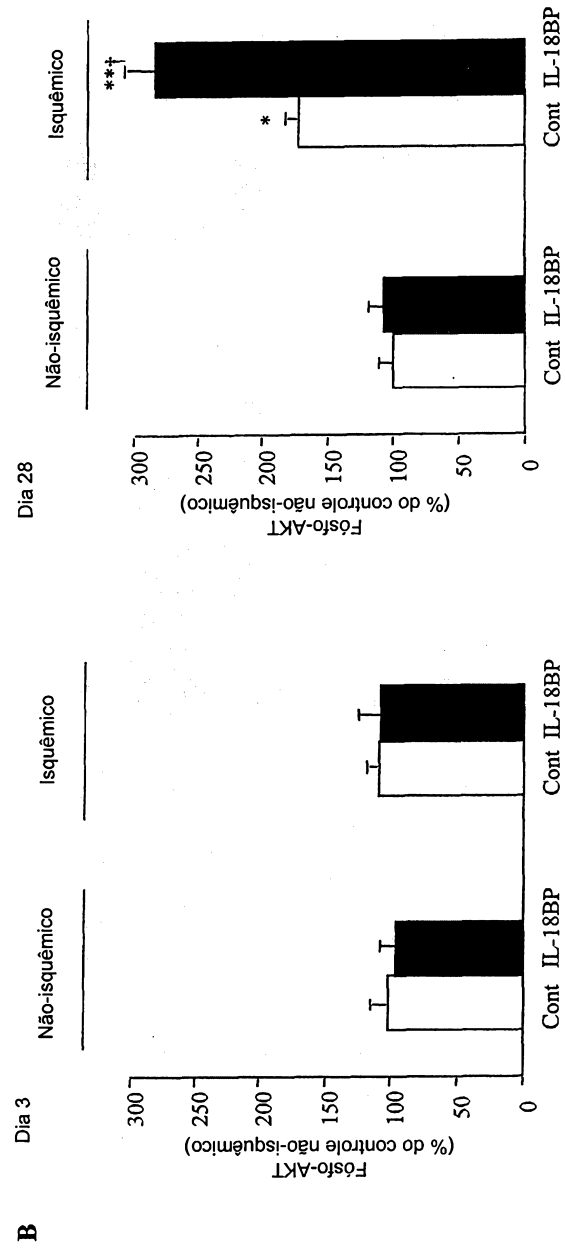
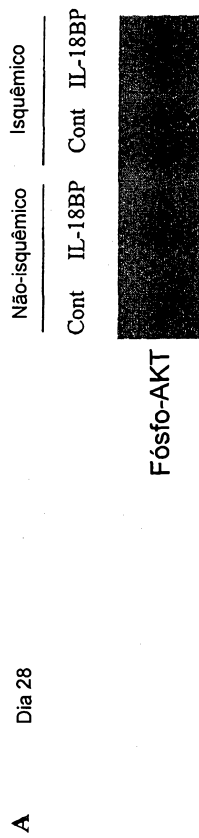


Fig. 4

5/5

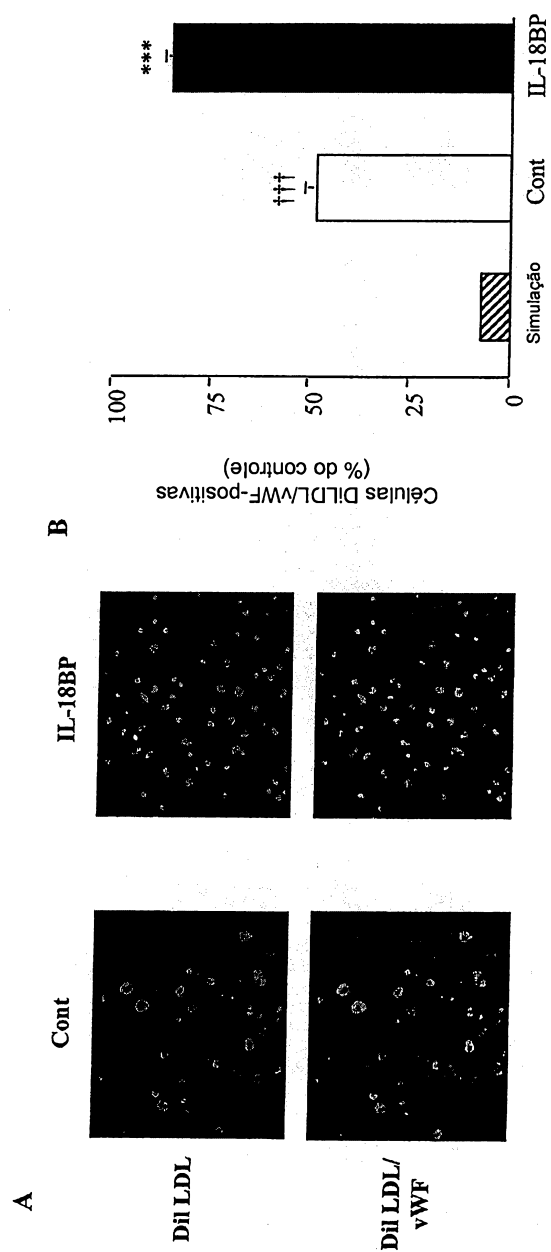


Fig. 5