

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 341**

51 Int. Cl.:
A61K 38/20 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02774697 .3**
96 Fecha de presentación: **10.10.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1434597**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.07.2004**

54 Título: **Uso de activadores de gp130 en neuropatía diabética**

30 Prioridad:
11.10.2001 EP 01123400

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.05.2012

73 Titular/es:
**MERCK SERONO SA
CENTRE INDUSTRIEL
1267 COINSINS, VAUD, CH**

72 Inventor/es:
**DREANO, Michel y
VITTE, Pierre-Alain**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 381 341 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 activadores de gp130 en neuropatía diabética

5 **Campo de la invención**

La presente invención está relacionada con el dominio de la diabetes mellitus y de las enfermedades del sistema nervioso periférico. En particular, se refiere al uso de sustancias que señalizan mediante la proteína gp130 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la neuropatía diabética. La interleucina IL-6 se usa en esta indicación médica específica.

10

Antecedentes de la invención

La diabetes mellitus es un trastorno del metabolismo de los carbohidratos, esto es, un síndrome caracterizado por la hiperglucemia resultante de la incapacidad relativa o absoluta de secreción de la insulina y/o de acción de la insulina.

15

La clasificación de las diabetes mellitus se basa en la adoptada por el National Diabetes Data Group de Estados Unidos y la Organización Mundial de la Salud (OMS). Anteriormente, la clasificación se basaba en la edad de aparición, la duración y las complicaciones de la enfermedad. La diabetes mellitus gestacional es la intolerancia a los carbohidratos de gravedad variable que hace su aparición o se reconoce por primera vez durante el curso del embarazo. Los pacientes con diabetes mellitus (DM) de tipo I, también conocida como DM insulino dependiente (DMID) o diabetes de aparición juvenil, pueden desarrollar cetoacidosis diabética (CAD). Los pacientes con DM de tipo II, también conocida como DM no insulino dependiente (DMNID) pueden desarrollar coma hiperglucémico hiperosmolar no cetósico (CHHNC). Entre las complicaciones microvasculares tardías comunes se incluyen retinopatía, nefropatía y neuropatías periféricas y autonómicas. Entre las complicaciones macrovasculares se incluyen aterosclerosis coronaria y enfermedad arterial periférica.

25

Diabetes mellitus de tipo I: Aunque puede producirse a cualquier edad, la diabetes mellitus de tipo I se desarrolla más comúnmente en la infancia o en la adolescencia y es el tipo predominante de DM diagnosticado antes de los 30 años. Este tipo de diabetes supone del 10 al 15 % de todos los casos de DM y se caracteriza clínicamente por hiperglucemia y propensión a la cetoacidosis diabética. El páncreas no produce insulina o produce muy poca.

30

Aproximadamente el 80 % de los pacientes con DM de tipo I tienen fenotipos HLA asociados con anticuerpos citoplásmicos contra las células de los islotes detectables en el suero sanguíneo y anticuerpos de superficie contra las células de los islotes (se encuentran en una proporción similar de casos anticuerpos a la descarboxilasa del ácido glutámico y a la insulina).

35

En estos pacientes, la DM de tipo I es el resultado de una destrucción selectiva, inmunomediada, susceptible genéticamente, de más del 90 % de sus células que secretan insulina. Sus islotes pancreáticos muestran insulinitis, que se caracteriza por una infiltración de linfocitos T acompañados de macrófagos y linfocitos B y por la pérdida de la mayoría de las células beta, sin que se vean implicadas las células alfa que secretan el glucagón. Los anticuerpos presentes en el diagnóstico normalmente devienen indetectables después de unos pocos años. Ante todo, pueden ser una respuesta a la destrucción de las células beta, pero algunos son citotóxicos para las células beta y pueden contribuir a su pérdida. La aparición clínica de la DM de tipo I se puede producir en algunos pacientes años después de la aparición insidiosa del proceso autoinmune subyacente. La investigación de estos anticuerpos se incluye en numerosos estudios preventivos en curso.

45

Diabetes mellitus de tipo II: La DM de tipo II es normalmente el tipo de diabetes que se diagnostica en pacientes de más de 30 años, pero también aparece en niños y en adolescentes. Se caracteriza clínicamente por hiperglucemia y resistencia a la insulina. La cetoacidosis diabética es rara. Aunque la mayoría de los pacientes se tratan con control de la dieta, ejercicio y medicamentos por vía oral, algunos pacientes necesitan de forma intermitente o persistente insulina para controlar la hiperglucemia sintomática y prevenir el coma hiperglucémico hiperosmolar no cetósico. La tasa de concordancia en la DM del tipo II en gemelos monocigóticos es superior al 90 %. La DM de tipo II está asociada comúnmente con la obesidad, en especial de la parte superior del cuerpo (visceral/abdominal) y se presenta a menudo después de un período de ganancia de peso. La disminución de tolerancia a la glucosa asociada con la edad está directamente correlacionada con la ganancia de peso típica. Los pacientes de DM de tipo II con obesidad visceral/abdominal pueden tener niveles de glucosa normales después de perder peso.

50

La DM de tipo II constituye un grupo heterogéneo de trastornos en los cuales la hiperglucemia se produce como resultado tanto de una respuesta a la glucosa de secreción de insulina disminuida como de la disminución de la eficacia de la insulina para estimular el consumo de glucosa por el músculo esquelético y la restricción de producción de glucosa hepática (resistencia a la insulina). Sin embargo, la resistencia a la insulina es común y la mayoría de los pacientes con resistencia a la insulina no desarrollarán diabetes, debido a que el cuerpo compensa aumentando adecuadamente la secreción de insulina. La resistencia a la insulina en la variedad común de la DM de tipo II no es el resultado de alteraciones genéticas en el receptor de insulina o en el transportador de glucosa. Sin embargo, probablemente desempeñan un papel los defectos intracelulares post-receptor determinados genéticamente. La hiperinsulinemia resultante puede conducir a otras condiciones comunes, como obesidad (abdominal), hipertensión, hiperlipidemia y enfermedad arterial coronaria (el síndrome de la resistencia a la insulina).

60

65

5 Parece que los factores genéticos son los determinantes principales del desarrollo de la DM de tipo II, a pesar de que no se ha demostrado ninguna asociación entre la DM de tipo II y fenotipos HLA específicos o anticuerpos citoplasmáticos contra las células de los islotes. Una excepción es un subconjunto de adultos no obesos con anticuerpos citoplasmáticos contra las células de los islotes que portan uno de los fenotipos HLA y que pueden desarrollar eventualmente DM de tipo I.

10 Antes de que la diabetes se desarrolle, los pacientes pierden generalmente la respuesta temprana a la glucosa secretoria de insulina y pueden secretar cantidades relativamente grandes de proinsulina. En diabetes establecidas, aunque los niveles de insulina en plasma en ayuno pueden ser normales o incluso estar aumentados en los pacientes de DM de tipo II, la secreción de insulina estimulada por la glucosa disminuye claramente. Los niveles de insulina disminuidos reducen el consumo de glucosa mediado por insulina y fracasan a la hora de reducir la producción de glucosa hepática.

15 La hiperglucemia puede ser no solo una consecuencia sino también una causa de la discapacidad adicional de tolerancia a la glucosa en el paciente diabético (toxicidad de la glucosa) porque la hiperglucemia disminuye la sensibilidad a la insulina y aumenta la producción de glucosa hepática. Una vez que mejora el control metabólico del paciente, normalmente se disminuye la dosis de insulina o del medicamento hipoglucémico.

20 Algunos casos de DM de tipo II se dan en adolescentes jóvenes, no obesos (diabetes de los jóvenes que aparece en la madurez o diabetes MODY por sus siglas en inglés) con una herencia dominante autosómica. Muchas familias con MODY tienen una mutación en el gen de la glucoquinasa. En estos pacientes se han demostrado deterioros o incapacidades en la secreción de la insulina y en la regulación de la glucosa hepática.

25 Las inmunopatías son casos raros de DM, con las características clínicas de la DM de tipo II, que resultan de la herencia heterocigótica de un gen defectuoso, lo que conduce a la secreción de insulina que no se enlaza de manera normal al receptor de insulina. Estos pacientes tienen niveles muy elevados de insulina inmunoreactiva en plasma asociados con respuestas a insulina exógena de glucosa en plasma normales.

30 La diabetes se puede atribuir también a enfermedades pancreáticas: la pancreatitis crónica, en especial en los alcohólicos, se asocia frecuentemente con la diabetes. Tales pacientes pierden tanto los islotes que secretan insulina como los islotes que secretan glucagón. Por lo tanto, pueden ser moderadamente hiperglucémicos y sensibles a dosis bajas de insulina. Dada la falta de contrarregulación eficaz (insulina exógena sin oposición del glucagón), sufren frecuentemente aparición rápida de hipoglucemia. En Asia, África y el Caribe, la DM se observa
35 comúnmente en pacientes gravemente malnutridos jóvenes con deficiencias de proteínas graves y enfermedad pancreática; estos pacientes no son propensos a la cetoacidosis diabética, pero pueden necesitar insulina.

40 Diagnóstico de la diabetes mellitus: en los pacientes asintomáticos, se establece la DM cuando se alcanza el criterio de diagnóstico de hiperglucemia en ayunas: nivel de glucosa en plasma (o suero) igual o mayor de 140 mg/dl (equivalente a igual o mayor de 7,77 mmol/l) después de una noche de ayuno, en dos ocasiones, en un adulto o niño.

45 Un ensayo de tolerancia a la glucosa oral puede ser útil para diagnosticar la DM de tipo II en pacientes cuya tasa de glucosa en ayunas está comprendida entre 115 y 140 mg/dl (6,38 y 7,77 mmol/l) y en aquéllos con una condición clínica que podría estar relacionada con una DM no diagnosticada (por ejemplo, polineuropatía, retinopatía).

50 Tratamiento de la diabetes mellitus: La hiperglucemia es responsable de la mayoría de las complicaciones microvasculares a largo plazo de la diabetes. Se demuestra ello mediante una relación lineal entre los niveles de Hb A_{1c} (véase más adelante) y la tasa a la cual se desarrollan las complicaciones. Otros estudios han sugerido que Hb A_{1c} < 8 % es un umbral por debajo del cual se pueden evitar la mayoría de las complicaciones. De esta forma, la terapia de la DM de tipo I debería intentar intensificar el control metabólico para disminuir Hb A_{1c} evitando a la vez los episodios de hipoglucemia. Sin embargo, el tratamiento debe ser individualizado y debería modificarse cuando las circunstancias hacen inaceptable cualquier riesgo de hipoglucemia (por ejemplo en pacientes con una esperanza de vida corta o en aquéllos con enfermedades cardíacas o cerebrovasculares) o cuando aumenta el riesgo de hipoglucemia de los pacientes (por ejemplo en pacientes que no son de fiar o que tienen neuropatía autonómica).
55

60 En pacientes de DM de tipo II con sobrepeso, es muy importante la dieta para conseguir disminuciones de peso. Si no se mejora la hiperglucemia con la dieta, debe comenzarse el proceso de tratamiento con medicamentos por vía oral.

65 Debería evaluarse de forma sistemática el paciente para detectar si aparecen síntomas o signos de complicaciones, incluyendo inspecciones de los pies y de las pulsaciones y sensaciones en los pies y en las piernas y test de albúmina en orina. Entre los parámetros de las evaluaciones periódicas de laboratorio se incluyen: perfil de grasas, BUN (nitrógeno ureico en sangre) y niveles de creatinina en suero, ECG y una evaluación oftalmológica completa anual.

La hipercolesterolemia o la hipertensión aumentan los riesgos de complicaciones posteriores específicas y necesitan atención especial y tratamiento adecuado. Aunque en la mayoría de los diabéticos se pueden usar con seguridad los agentes β -bloqueantes que bloquean los receptores beta-adrenérgicos (como el propranolol), pueden enmascarar los síntomas β -adrenérgicos de la hipoglucemia inducida por la insulina y pueden deteriorar la respuesta contrarregulatoria normal. En consecuencia, los medicamentos que se pueden elegir son, con frecuencia, los inhibidores ACE y los antagonistas del calcio.

Todos los pacientes deberían llevar a cabo el control de glucosa en plasma y debería enseñarse a los pacientes tratados con insulina a ajustar sus dosis de insulina de acuerdo con ello. Los niveles de glucosa se pueden determinar con analizadores caseros fáciles de usar utilizando una gota de sangre de la yema de los dedos. Para obtener la muestra de la sangre de la yema de los dedos se recomienda utilizar una lanceta movida con un muelle. La frecuencia del ensayo se determina de manera individual. Idealmente, los pacientes diabéticos tratados con insulina deberían determinar su nivel de glucosa en plasma diariamente antes de las comidas, de 1 a 2 horas después de las comidas y a la hora de irse a la cama.

La mayoría de los médicos determinan periódicamente la hemoglobina glicosilada (Hb A_{1c}) para estimar el control de la glucosa en plasma durante el período de 1 a 3 meses precedente. La Hb A_{1c} es un producto estable de la glicosilación no enzimática de la Hb por la glucosa del plasma y se forma a velocidades que aumentan a medida que aumentan los niveles de glucosa en plasma. En la mayoría de los laboratorios, el nivel de Hb A_{1c} normal es de aproximadamente 6 %; en diabéticos con un control deficiente, dicho nivel varía de 9 a 12 %. El ensayo de la Hb A_{1c} no es un ensayo específico para diagnosticar la diabetes; sin embargo, valores elevados de Hb A_{1c} indican, a menudo, que existe diabetes.

Otro ensayo determina el nivel de fructosamina. La fructosamina se produce mediante una reacción química de la glucosa con proteínas del plasma y refleja el control de la glucosa entre las semanas primera y tercera previas. Por lo tanto, este ensayo puede mostrar cambios en el control antes que la Hb A_{1c} y es útil con frecuencia cuando se aplica un tratamiento intensivo y en ensayos clínicos a corto plazo.

Por lo que se refiere al tratamiento con insulina, con frecuencia se prefiere la insulina humana para iniciar el tratamiento con insulina, debido a que es menos antigénica que las variedades derivadas de animales. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes tratados con insulina se desarrollan niveles de anticuerpos contra la insulina detectables, normalmente muy bajos, incluso en los pacientes que reciben preparaciones de insulina humana.

De manera habitual, la insulina se proporciona en preparaciones que contienen 100 U/ml (insulina U-100) y se inyecta por vía subcutánea con jeringas de insulina desechables. Los pacientes que se inyectan rutinariamente dosis menores o iguales de 50 U prefieren generalmente las jeringas de ½ ml, porque se pueden leer más fácilmente y facilitan la medida precisa de dosis más pequeñas. Está diseñado un dispositivo de inyección de insulina de múltiples dosis (NovolinPen), normalmente denominado pluma de insulina, para utilizar un cartucho que contiene la dosis de varios días. La insulina se debe mantener refrigerada, pero no debe congelarse nunca; sin embargo, la mayoría de las preparaciones de insulina son estables durante meses a temperatura ambiente, lo cual facilita su uso en el trabajo o en los viajes.

La diabetes puede estar asociada a otras enfermedades de tipo endocrino. La DM de tipo II puede ser secundaria al síndrome Cushing, a la acromegalia y a feocromocitoma, glucagonoma, aldosterismo primario o somatostatinaoma. La mayoría de estos trastornos están asociados con la resistencia a la insulina hepática o periférica. Muchos pacientes devendrán diabéticos una vez que también disminuye la secreción de insulina. La prevalencia de la DM de tipo I aumenta en pacientes con ciertas enfermedades endocrinas autoinmunes, por ejemplo la enfermedad de Graves, la tiroiditis de Hashimoto y la enfermedad idiopática de Addison.

La diabetes puede ser inducida también por toxinas de las células beta. Por ejemplo la estreptozotocina puede inducir diabetes experimental en ratas pero raramente provoca diabetes en humanos.

Las complicaciones tardías de la diabetes aparecen después de varios años de hiperglucemia controlada de manera deficiente. Los niveles de glucosa aumentan en todas las células excepto donde hay consumo de glucosa mediado por insulina (principalmente en los músculos), lo que da como resultado un incremento de la glicolización y de la actividad de otras rutas metabólicas, que pueden ser causadas por complicaciones. La mayoría de las complicaciones microvasculares se pueden retrasar, evitar o incluso solucionar mediante un control glucémico ajustado, esto es, consiguiendo niveles de glucosa casi normales en ayunas y postprandiales, reflejados por valores casi normales de la hemoglobina glicosilada (Hb A_{1c}). Las enfermedades macrovasculares, tales como la aterosclerosis pueden conducir a enfermedad arterial coronaria sintomática, claudicación, escarificación cutánea e infecciones. Aunque la hiperglucemia puede acelerar la aterosclerosis, muchos años de hiperinsulinemia que preceden la aparición de diabetes (con resistencia a la insulina) pueden desempeñar un papel iniciador muy importante. La amputación de un miembro inferior debido a enfermedad vascular periférica grave, la claudicación intermitente y la gangrena son comunes. La retinopatía de fondo (los cambios iniciales en la retina vistos en los exámenes oftalmológicos o en fotografías de la retina) no alteran la visión de manera significativa, pero pueden progresar hacia un edema macular o retinopatías proliferativas con desprendimiento de retina o hemorragias, que

pueden producir ceguera. Aproximadamente el 85 % de todos los diabéticos desarrollan eventualmente algún grado de retinopatía. La nefropatía diabética es habitualmente asintomática hasta que se desarrolla la última etapa de la enfermedad renal, pero puede provocar el síndrome nefrótico.

5 La neuropatía diabética es una complicación adicional de la diabetes, pero es también común en relación con otras enfermedades.

Habitualmente, la mononeuropatía múltiple es secundaria a los trastornos vasculares del colágeno (por ejemplo, poliarteritis nodosa, lupus eritematoso sistémico (SLE, por sus siglas en inglés), síndrome de Sjögren, artritis reumatoide (RA, por sus siglas en inglés)), a la sarcoidosis, a enfermedades metabólicas (por ejemplo, diabetes, amiloidosis) o a enfermedades infecciosas (por ejemplo, enfermedad de Lyme, infección por VIH). Los microorganismos pueden provocar mononeuropatía múltiple por invasión directa de los nervios (por ejemplo, en la lepra).

15 La polineuropatía debida a enfermedades febriles agudas puede ser el resultado de una toxina (por ejemplo en la difteria) o de una reacción autoinmune (por ejemplo en el síndrome Guillain-Barré); la polineuropatía que algunas veces sigue a inmunizaciones es probablemente también autoinmune.

20 Los agentes tóxicos provocan generalmente polineuropatía pero algunas veces mononeuropatía. Entre tales agentes se incluyen emetina, hexobarbital, barbital, clorobutanol, sulfonamidas, fenitoína, nitrofurantoína, los alcaloides de la vinca, metales pesados, monóxido de carbono, fosfato de triortocresilo, ortodinitrofenol, muchos disolventes, otros venenos industriales y ciertos medicamentos antirretrovirales contra el SIDA (por ejemplo, zalcitabina, didanosina).

25 Las deficiencias nutricionales y los trastornos metabólicos pueden dar como resultado polineuropatía. La deficiencia de vitamina B es a menudo la causa (por ejemplo en alcoholismo, beriberi, anemia perniciosa, deficiencia de piridoxina inducida por isoniacida, síndromes de mala absorción e hiperémesis gravídica). La polineuropatía se produce también en el hipotiroidismo, la porfiria, la sarcoidosis, la amiloidosis y la uremia.

30 La malignidad puede provocar polineuropatía a través de gammapatía monoclonal (mieloma múltiple, linfoma), invasión amiloide o deficiencias nutricionales o como un síndrome paraneoplásico.

35 Las polineuropatías debidas a trastornos metabólicos, como la diabetes mellitus o el fallo renal, se desarrollan lentamente, a menudo durante meses o años. Con frecuencia comienzan con anomalías sensoriales en las extremidades inferiores que a menudo son más graves a nivel distal que proximal. Con frecuencia resultan marcados efectos como hormigueo periférico, entumecimiento, dolor ardiente o deficiencias en la propiocepción de las uniones y sensaciones vibratorias. A menudo el dolor es peor por la noche y se puede agravar tocando el área afectada o por los cambios de temperatura. En los casos graves, hay signos objetivos de pérdida sensorial, típicamente con una distribución de "guantes y medias". Los reflejos del tendón de Aquiles y de otros tendones profundos están ausentes o disminuidos. Se pueden desarrollar úlceras indoloras o articulaciones de Charcot cuando la pérdida sensorial es profunda. Los déficits sensoriales o propioceptivos pueden conducir a maneras anormales de andar. La afección motora da como resultado atrofia y debilidad muscular distal. El sistema nervioso autónomo puede verse involucrado adicional o selectivamente, lo que conduce a diarrea nocturna, incontinencia urinaria y fecal, impotencia o hipotensión postural. Los síntomas vasomotores varían. La piel puede ser más pálida y seca de lo normal, algunas veces con manchas oscuras; la sudoración puede ser excesiva. En casos prolongados, graves, son comunes cambios tróficos (piel suave y brillante, uñas picadas o con crestas, osteoporosis).

40 El tratamiento del trastorno sistémico (por ejemplo, diabetes mellitus, fallo renal, mieloma múltiple, tumor) puede detener la progresión y mejorar los síntomas, pero la recuperación es lenta. Las neuropatías entrampadas pueden necesitar inyecciones de corticosteroides o descompresión quirúrgica. La terapia física y los entablillados disminuyen la probabilidad o gravedad de las contracturas.

45 La diabetes mellitus puede provocar polineuropatía distal sensoriomotora (lo más común), mononeuropatía múltiple y mononeuropatía focal (esto es, de los nervios craneales oculomotor o abducens). Comúnmente, la polineuropatía se produce como una polineuropatía predominantemente sensorial, simétrica, distal, que provoca déficits sensoriales, que empiezan y habitualmente están caracterizados por una distribución de "guantes y medias".

50 Generalmente, la neuropatía periférica se define como un síndrome de pérdida sensorial, atrofia y debilidad muscular, reflejos de los tendones profundos disminuidos y síntomas vasomotores, solos o en cualquier combinación. La enfermedad puede afectar un único nervio (mononeuropatía), dos o más nervios en áreas separadas (mononeuropatía múltiple) o muchos nervios de manera simultánea (polineuropatía). Principalmente puede estar afectado el axón (como en la diabetes mellitus, enfermedad de Lyme o uremia o con agentes tóxicos) o la vaina de mielina o la célula Schwann (como en la polineuropatía inflamatoria crónica o aguda, en las leucodistrofias o en el síndrome Guillain-Barré). El daño en las fibras grandes con mielina o en las pequeñas sin mielina produce principalmente la pérdida de las sensaciones de dolor y temperatura; el daño de las fibras grandes mielinizadas produce defectos motores o propioceptivos. Algunas neuropatías (por ejemplo debidas a toxicidad del plomo, uso del antibiótico dapsona, picaduras de garrapatas, porfiria o síndrome Guillain-Barré) afectan

principalmente a las fibras motoras; otras (por ejemplo, debidas a ganglionitis de la raíz dorsal de cáncer, lepra, SIDA, diabetes mellitus o intoxicación crónica con piridoxina) afectan ante todo a los ganglios de la raíz dorsal o las fibras sensoriales, produciendo síntomas sensoriales. Ocasionalmente, están también involucrados los nervios craneales (por ejemplo, en el síndrome de Guillain-Barré, en la enfermedad de Lyme, en la diabetes mellitus y en la difteria).

La causa más común de un daño localizado a un único nervio es un traumatismo. La actividad muscular violenta o una sobreextensión forzosa de una articulación pueden producir una neuropatía focal, como también pueden hacerlo pequeños traumatismos repetitivos (por ejemplo, el agarre con fuerza de herramientas pequeñas, la vibración excesiva de martillos neumáticos). La parálisis por compresión afecta normalmente a los nervios superficiales (ulnar o cubital, radial, peroneal) en las prominencias huesudas (por ejemplo cuando se está profundamente dormido o anestesiado, en personas delgadas o caquéticas o a menudo en alcohólicos) o en los canales estrechos (por ejemplo, en el síndrome del túnel carpiano). La parálisis por compresión puede ser también el resultado de tumores, hiperostosis anquilosante, escayolas, muletas o posturas prolongadas que produzcan calambres (por ejemplo, en jardinería). también pueden causar neuropatías las hemorragias en un nervio y la exposición al frío o a la radiación. La mononeuropatía puede producirse también como resultado de una invasión directa de un tumor.

La polineuropatía diabética puede provocar entumecimientos, hormigueos y parestesias en las extremidades y, con menos frecuencia, hiperestésias y dolores profundamente asentados graves y debilitantes. Los espasmos en los tobillos normalmente disminuyen o no existen. Se deben excluir otras causas de polineuropatía. Las mononeuropatías dolorosas, agudas, que afectan a los nervios craneales tercero, cuarto o sexto así como a otros nervios, tales como el femoral, pueden mejorar de manera espontánea durante semanas o meses, aparecen con más frecuencia en los diabéticos más viejos y se atribuyen a infecciones de los nervios. La neuropatía autonómica se produce principalmente en diabéticos con polineuropatía y puede provocar hipotensión postural, sudoración desordenada, impotencia y eyaculación retrógrada en los hombres, función de la vejiga deteriorada, vaciado gástrico retrasado (algunas veces con síndrome de descarga), disfunciones del esófago, estreñimiento o diarrea y diarrea nocturna. Una disminución de la respuesta de las pulsaciones a la maniobra de Valsalva o una variación de pulsaciones que no cambia durante tiempo durante la respiración profunda son evidencias de neuropatía autonómica en diabéticos.

La polineuropatía diabética es la causa principal de úlceras en el pie y problemas de articulaciones, que son causas importantes de morbosidad en la diabetes mellitus. En la polineuropatía diabética, la denervación sensorial deteriora la percepción de traumatismos producidos por causas tan comunes como zapatos que no ajustan bien o guijarros. Las alteraciones en la propiocepción conducen a un patrón anormal de distribución del peso y algunas veces al desarrollo de articulaciones de Charcot.

Los pacientes con úlceras en el pie infectadas no sienten dolor con frecuencia debido a la neuropatía y no tienen síntomas sistémicos hasta tarde, en un desarrollo del proceso descuidado. Las úlceras profundas y, en particular las úlceras asociadas con cualquier celulitis detectable necesitan hospitalización inmediata, puesto que pueden desarrollarse toxicidad sistémica e incapacidad permanente. Una parte esencial del control de la situación es la eliminación quirúrgica del tejido muerto, pero algunas veces es necesaria la amputación.

La interleucina - 6 (IL-6) es una citoquina multifuncional producida y secretada por varios tipos de células diferentes. Esta citoquina pleiotrópica desempeña un papel central en los mecanismos de defensa celular que incluyen la respuesta inmune, la respuesta de fase aguda y la hematopoyesis. La IL-6 es una glicoproteína con un peso molecular de 20 a 26 kDa que tiene 185 aminoácidos que ha sido previamente clonada (May et al, (1986); Zilberstein et al (1986); Hirano et al, (1986)). La IL-6 ha sido previamente denominada factor 2 estimulador de las células B (BSF-2, por sus siglas en inglés), interferón-beta 2 y factor de estimulación de hepatocitos. La IL-6 es secretada en varios tejidos diferentes entre los que se incluyen el hígado, el bazo y la médula ósea y por diversos tipos de células, entre los que se incluyen monocitos, fibroblastos, células endoteliales, células B y T. A nivel de transcripción, la IL-6 se activa por diversas señales incluyendo virus, ARN de doble cadena, bacterias y lipopolisacáridos bacterianos y citoquinas inflamatorias como IL-1 y TNF.

Se ha implicado a la IL-6 en la patogénesis de las enfermedades del sistema central nervioso inflamatorias humanas. Por ejemplo, en pacientes con esclerosis múltiple se ha demostrado la presencia de niveles de IL-6 aumentados en plasma y en fluido cerebroespinal (Frei et al, (1991)).

Experimentos recientes sobre los efectos de la IL-6 sobre células de los sistemas nerviosos central y periférico indican que la IL-6 puede tener efectos protectores sobre las células neuronales, así como algún impacto sobre los procesos neurodegenerativos inflamatorios (Gadient y Otten, 1997; Mendel et al., 1998). Se encontró que la IL-6 evitaba la muerte de células inducida por glutamato en neuronas del hipocampo (Yamada et al., 1994) y estriatales (Toulmond et al., 1992). En ratones transgénicos que expresan niveles altos tanto de IL-6 humana como de IL-6R soluble (sIL-6-R) humana, se observó una aceleración en la regeneración de los nervios después de dañar el nervio hipogloso como se muestra mediante etiquetado retrógrado de los núcleos hipoglosales en el cerebro (Hirota et al, 1996). Además, ha habido algunas evidencias de que la IL-6 está implicada en una enfermedad neurológica, el trastorno desmielinizante esclerosis múltiple (MS, por sus siglas en inglés) (Mendel et al., 1998). Los ratones que no tenían el gen de la IL-6 eran resistentes a la inducción experimental de la enfermedad. Por otra parte, ha habido

informes que indican que la IL-6 tiene un efecto negativo sobre la supervivencia neuronal durante la fase post-traumática temprana después de daños en los nervios (Fischer et al., 2001).

5 Las actividades biológicas de la IL-6 están mediadas por un sistema receptor de membrana que comprende dos proteínas diferentes, una denominada receptor IL-6 o gp80 y la otra gp130 (revisión de Hirano et al, 1994). La gp130 es una glicoproteína de transmembrana con una longitud de 918 aminoácidos, incluyendo un dominio intracelular de 277 aminoácidos; es una subunidad constituyente de varios receptores de citoquinas, incluyendo los de las IL-6, IL-11, LIF, oncostatina M, CNTF (factor neurotrófico ciliar, por sus siglas en inglés), CT-1. Puesto que la IL-6 es el prototipo de las citoquinas que actúan a través de la gp130, esta familia de citoquinas se denomina también "citoquinas de tipo IL-6".

15 La gp130 participa en la formación de receptores de alta afinidad para estas citoquinas enlazándose a cadenas receptoras de baja afinidad. De acuerdo con ello, la gp130 ha sido también denominada "convertidor de afinidad". El enlace del ligando a un receptor de citoquina conduce a la dimerización de la gp130 (mostrada para el receptor de IL-6) o a la heterodimerización (mostrada para los receptores de LIF, oncostatina M y CNTF) con una proteína relacionada con la gp130 conocida como subunidad LIFRbeta. La unión de los ligandos respectivos se asocia con la activación/asociación de una familia de quinasas de tirosina denominadas quinasas Janus (JAK, por las siglas en inglés), como el primer paso de la transducción de señales intracelular. Los procesos de señalización intracelular incluyen la fosforilación de la tirosina y factores de activación denominados STAT (transductor de señal y activador de transcripción, por sus siglas en inglés).

20 El producto del gen de la gp130 humana parece ser homólogo a dos loci cromosómicos distintos en los cromosomas 5 y 17. La presencia de dos secuencias de gen gp130 distintas está restringida a los primates y no se halla en otros vertebrados.

25 Se ha demostrado que las actividades de señalización de la IL-6, IL-11, CNTF, oncostatina M y LIF se pueden bloquear de manera específica mediante diferentes anticuerpos monoclonales dirigidos contra la gp130. Además de esto, se han encontrado anticuerpos monoclonales que activan directamente la gp130 independientemente de la presencia de citoquinas o sus receptores.

30 Se ha mostrado que otros anticuerpos monoclonales dirigidos contra la gp130 inhiben las funciones mediadas por la IL-6. En el suero humano se han encontrado formas solubles de la gp130 (sgp130) con masas moleculares de 90 y 130 kda. Pueden inhibir funciones biológicas de aquellas citoquinas utilizando sistemas receptores que tienen la gp130 como un componente.

35 Las formas solubles de la IL-6R gp80 (sIL-6R), correspondientes al dominio extracelular de la gp80, son productos naturales del cuerpo humano que se encuentran como glicoproteínas en la sangre y en la orina (Novick et al., 1990, 1992). Una propiedad excepcional de las moléculas sIL-6R es que pueden actuar como agonistas potentes de la IL-6 en muchos tipos de células, incluyendo células humanas (Taga et al., 1989, Novick et al. 1992). Incluso sin el dominio intracitoplasmático de la gp80, la sIL-6R es aún capaz de desencadenar la dimerización de la gp130 en respuesta a la IL-6, lo que a su vez media la posterior transducción de señal específica IL-6 y los efectos biológicos (Murakami et al., 1993). La sIL-6R tiene dos tipos de interacción con la gp130; ambos son esenciales para las actividades biológicas específicas de la IL-6 (Halimi et al., 1995) y se propuso que el complejo receptor IL-6 activo es una estructura hexámera formada por dos cadenas gp130, dos ligandos IL-6R y dos ligandos IL-6 (Ward et al., 1994; Paonessa et al, 1995).

40 Se han descrito las moléculas quiméricas (proteínas de fusión) que enlazan el receptor de la IL-6 soluble y la IL-6 (Chebath et al., 1997; Fischer et al., 1997; y los documentos de las patentes WO 99/02552 y WO 97/32891). Han sido denominadas quimera IL-6R/IL-6 e hiper-IL-6 respectivamente y serán denominadas en lo que sigue IL-6R/IL-6. Las quimeras IL-6R/IL-6 fueron generadas fusionando las regiones de codificación enteras de los cADN que codifican el receptor de la IL-6 soluble (sIL-6R) y la IL-6 (Fischer et al., 1997; Chebath et al., 1997). La quimera IL-6R/IL-6 recombinante se produjo en células CHO (células de ovario de hámster chino, por sus siglas en inglés) (Chelbath et al., 1997, WO99/02552). La quimera IL-6R/IL-6 se enlaza in vitro a la cadena de la gp130 con una eficacia mayor que la mezcla de IL-6 con sIL-6R (Kollet et al, 1999).

55 El documento de la patente de Estados Unidos número US 6054294 describe el uso de la NMT-1 para tratar la neuropatía diabética.

60 El documento de la patente WO 96/27672 se refiere a la replicación defectuosa del vector del herpes viral para expresar un gen de interés en una población de células objetivo de tal forma que se proporcione terapia para enfermedades del sistema nervioso como las polineuropatías metabólicas asociadas con la diabetes mellitus.

65 Vinik et al. (2001), Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes 8, 205-212 se refieren a la importancia y a la disminución de la disponibilidad de los factores neurotróficos en la diabetes.

Resumen de la invención

Según la presente invención, se ha encontrado que la administración de sustancias que señalizan a través de la glicoproteína gp130 da como resultado un efecto beneficioso significativo en un modelo animal establecido de neuropatía diabética. Una sustancia probada como ejemplo fue la IL-6. Esta sustancia mostró un efecto beneficioso significativo estadísticamente en la neuropatía diabética, como se indica por la mejora de varios parámetros relativos a la vitalidad de los nervios.

Por lo tanto, la invención se refiere al uso de una sustancia que señala a través de la gp130 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o para la prevención de la neuropatía diabética, en el que dicha sustancia es:

a) la IL-6;

b) un fragmento de a) que se une a la gp80 e inicia la señalización a través de la gp130;

c) una variante de a) o b) que tiene una identidad de secuencia con a) o b) de al menos 70 % y que inicia la señalización a través de la gp130;

d) una variante de a) o b) que está codificada por una secuencia de ADN que se hibrida con el complemento de la secuencia de ADN nativo que codifica a) o b) bajo condiciones moderadamente estrictas y que inicia la señalización a través de la gp130 o

e) una sal, proteína de fusión o derivado funcional de a), b), c) o d) que inicia la señalización a través de la gp130, de modo que el derivado funcional se puede preparar a partir de grupos funcionales que aparecen como cadenas laterales sobre los restos o los grupos N- o C-terminales por medios conocidos en la técnica y que permanece aceptable farmacéuticamente en el sentido de que no destruye la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de la IL-6 y que no proporciona propiedades tóxicas a las composiciones que la contienen.

El uso de células que expresan sustancias que señalizan a través de la gp130 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la neuropatía diabética es un objeto adicional de la presente invención. Además, de acuerdo con la presente invención, los vectores que comprenden la secuencia de codificación de las sustancias que señalizan a través de la gp130 se usan para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la neuropatía diabética.

Breve descripción de los dibujos

La [figura 1](#) muestra el desarrollo del peso corporal en animales de experimentación.

La [figura 2](#) muestra el alcance o extensión de la glucemia a los 10 días (A) y a los 40 días (B) de la inducción de diabetes en las series experimentales de animales que reciben administración intraperitoneal.

La [figura 3](#) muestra el tiempo en segundos que necesitaron los animales que reciben administración intraperitoneal para sacudir su cola colocada sobre una fuente de calor.

La [figura 4](#) muestra el potencial de acción muscular compuesto (CMAP, por sus siglas en inglés) de los animales que reciben administración intraperitoneal en latencia por segundo.

La [figura 5](#) muestra la velocidad de conducción del nervio sensorial (SNVC, por sus siglas en inglés) en m/s en los animales experimentales que reciben administración intraperitoneal.

La [figura 6](#) muestra el diámetro del axón en micrómetros en los animales experimentales que reciben administración intraperitoneal.

La [figura 7](#) muestra el diámetro de la fibra en micrómetros en los animales experimentales que reciben administración intraperitoneal.

La [figura 8](#) muestra el espesor de la mielina en micrómetros en los animales experimentales que reciben administración intraperitoneal.

La [figura 9](#) muestra el número de fibras mielinizadas por campo en los animales experimentales que reciben administración intraperitoneal.

La [figura 10](#) es un dibujo esquemático que ilustra la estructura de la quimera IL-6R/IL-6 (figura para comparación).

La [figura 11](#) muestra el desarrollo del peso corporal en animales experimentales del grupo A de animales que reciben administración subcutánea.

La [figura 12](#) muestra el alcance de la glucemia a los 10 días y a los 41 días de la inducción de la diabetes en los animales experimentales del grupo A de animales que reciben administración subcutánea.

La [figura 13](#) muestra el tiempo en segundos necesario para sacudir la cola colocada sobre una fuente de calor de los animales experimentales del grupo A de animales que reciben administración subcutánea.

ES 2 381 341 T3

- La [figura 14](#) muestra el número de cuadrados cruzados (A) y de levantamientos de las patas traseras (B) en animales experimentales del grupo A de animales que reciben administración subcutánea.
- 5 La [figura 15](#) muestra el potencial de acción muscular compuesto (CMAP) expresado en latencia por segundo) en animales experimentales del grupo A de animales que reciben administración subcutánea.
- La [figura 16](#) muestra la velocidad de conducción del nervio sensorial (SNVC) en m/s en animales experimentales del grupo A de animales que reciben administración subcutánea.
- 10 La [figura 17](#) muestra el diámetro de la fibra en micrómetros en animales experimentales del grupo A de animales que reciben administración subcutánea.
- La [figura 18](#) muestra el diámetro del axón en micrómetros en animales experimentales del grupo A de animales que reciben administración subcutánea.
- 15 La [figura 19](#) muestra el espesor de mielina en micrómetros en animales experimentales del grupo A de animales que reciben administración subcutánea.
- 20 La [figura 20](#) muestra el porcentaje de fibras degeneradas en animales experimentales del grupo A de animales que reciben administración subcutánea.
- La [figura 21](#) muestra el porcentaje de fibras mielinizadas en animales experimentales del grupo A de animales que reciben administración subcutánea.
- 25 La [figura 22](#) muestra el desarrollo del peso corporal en animales experimentales del grupo B de animales que reciben administración subcutánea.
- La [figura 23](#) muestra el alcance de la glucemia a los 10 días y a los 40 días de la inducción de la diabetes en los animales experimentales del grupo B de animales que reciben administración subcutánea.
- 30 La [figura 24](#) muestra el tiempo en segundos necesario para sacudir la cola colocada sobre una fuente de calor de los animales experimentales del grupo B de animales que reciben administración subcutánea.
- 35 La [figura 25](#) muestra el número de cuadrados cruzados (A) y de levantamientos de las patas traseras (B) en animales experimentales del grupo B de animales que reciben administración subcutánea.
- La [figura 26](#) muestra el potencial de acción muscular compuesto (CMAP) expresado en latencia por segundo en animales experimentales del grupo B de animales que reciben administración subcutánea.
- 40 La [figura 27](#) muestra la velocidad de conducción del nervio sensorial (SNVC) en m/s en animales experimentales del grupo B de animales que reciben administración subcutánea.
- La [figura 28](#) muestra el diámetro de la fibra en micrómetros en animales experimentales del grupo B de animales que reciben administración subcutánea.
- 45 La [figura 29](#) muestra el diámetro del axón en micrómetros en animales experimentales del grupo B de animales que reciben administración subcutánea.
- 50 La [figura 30](#) muestra el espesor de mielina en micrómetros en animales experimentales del grupo B de animales que reciben administración subcutánea.
- La [figura 31](#) muestra el porcentaje de fibras degeneradas en animales experimentales del grupo B de animales que reciben administración subcutánea.
- 55 La [figura 32](#) muestra el porcentaje de fibras mielinizadas en animales experimentales del grupo B de animales que reciben administración subcutánea.
- La [figura 33](#) muestra el desarrollo del peso corporal en animales experimentales del grupo C de animales que reciben administración subcutánea.
- 60 La [figura 34](#) muestra el alcance de la glucemia a los 10 días y a los 40 días de la inducción de la diabetes en los animales experimentales del grupo C de animales que reciben administración subcutánea.
- 65 La [figura 35](#) muestra el tiempo en segundos necesario para sacudir la cola colocada sobre una fuente de calor de los animales experimentales del grupo C de animales que reciben administración subcutánea.

La figura 36 muestra el número de cuadrados cruzados (A) y de levantamientos de las patas traseras (B) en animales experimentales del grupo C de animales que reciben administración subcutánea.

5 La figura 37 muestra el potencial de acción muscular compuesto (CMAP) expresado en latencia por segundo en animales experimentales del grupo C de animales que reciben administración subcutánea.

La figura 38 muestra la velocidad de conducción del nervio sensorial (SNVC) en m/s en animales experimentales del grupo C de animales que reciben administración subcutánea.

10 La figura 39 muestra el diámetro de la fibra en micrómetros en animales experimentales del grupo C de animales que reciben administración subcutánea.

15 La figura 40 muestra el diámetro del axón en micrómetros en animales experimentales del grupo C de animales que reciben administración subcutánea.

La figura 41 muestra el espesor de mielina en micrómetros en animales experimentales del grupo C de animales que reciben administración subcutánea.

20 La figura 42 muestra el porcentaje de fibras degeneradas en animales experimentales del grupo C de animales que reciben administración subcutánea.

25 La figura 43 muestra el porcentaje de fibras mielinizadas en animales experimentales del grupo C de animales que reciben administración subcutánea.

Descripción detallada de la invención

30 La invención se basa en el hallazgo de que la administración de sustancias que señalizan a través de la gp130 produce como resultado un efecto antinociceptivo y regenerativo de los nervios en un modelo animal establecido de neuropatía diabética. Por lo tanto, la invención se refiere al uso de una sustancia que inicia la señalización a través del receptor de la interleucina-6 humana, (IL-6) gp130, para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la neuropatía diabética, de manera que dicha sustancia es:

- 35 a) la IL-6;
- b) un fragmento de a) que se une a la gp80 e inicia la señalización a través de la gp130;
- c) una variante de a) o b) que tiene una identidad de secuencia con a) o b) de al menos 70 % y que inicia la señalización a través de la gp130;
- 40 d) una variante de a) o b) que está codificada por una secuencia de ADN que se hibrida con el complemento de la secuencia de ADN nativo que codifica a) o b) bajo condiciones moderadamente estrictas y que inicia la señalización a través de la gp130 o
- e) una sal, proteína de fusión o derivado funcional de a), b), c) o d) que inicia la señalización a través de la gp130, de modo que el derivado funcional se puede preparar a partir de grupos funcionales que aparecen como cadenas laterales sobre los restos o los grupos N- o C-terminales por medios conocidos en la técnica y que permanece aceptable farmacéuticamente en el sentido de que no destruye la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de la IL-6 y que no proporciona propiedades tóxicas a las composiciones que la contienen.

50 Una "sustancia que señala a través de la gp130" es, en este documento, la IL-6 o cualquiera de las otras sustancias listadas en la reivindicación 1. La IL-6 es un ejemplo de tal activador indirecto de la gp130. La IL-6 induce la homodimerización de la gp130.

55 Los términos "tratar" o "prevenir", tal como se usan en este documento, deberían entenderse como: prevenir, evitar, inhibir, atenuar, mejorar o revertir uno o más síntomas o causa(s) de la neuropatía diabética, así como síntomas, enfermedades o complicaciones que acompañan a la neuropatía diabética. Cuando "tratan" la neuropatía diabética, las sustancias de acuerdo con la invención se dan después de la aparición de la enfermedad; "prevención" se refiere a la administración de las sustancias antes de que se note en el paciente cualquier signo de enfermedad. La administración preventiva es especialmente útil en pacientes de alto riesgo, como aquéllos pacientes que han sufrido de diabetes mellitus ya durante un período prolongado de tiempo.

60 El término "neuropatía diabética" se refiere a cualquier forma de neuropatía diabética o a uno o más síntomas o trastornos que acompañan a la neuropatía diabética o son provocados por ella o a las complicaciones de la diabetes que afectan a los nervios, según se describe con detalle en la introducción previa.

65 En una realización preferida de la invención, la neuropatía diabética es una polineuropatía. En la polineuropatía diabética, muchos nervios están afectados simultáneamente.

En una realización preferida adicional, la neuropatía diabética es una mononeuropatía. En la mononeuropatía focal,

la enfermedad afecta a un único nervio, como a uno de los nervios craneales oculomotor o abducens. El trastorno se denomina mononeuropatía múltiple cuando se ven afectados dos o más nervios en áreas separadas.

La sustancia es:

- 5 a) la IL-6;
- b) un fragmento de a) que se une a la gp80 e inicia la señalización a través de la gp130;
- c) una variante de a) o b) que tiene una identidad de secuencia con a) o b) de al menos 70 % y que inicia la señalización a través de la gp130;
- 10 d) una variante de a) o b) que está codificada por una secuencia de ADN que se hibrida con el complemento de la secuencia de ADN nativo que codifica a) o b) bajo condiciones moderadamente estrictas y que inicia la señalización a través de la gp130 o
- e) una sal, proteína de fusión o derivado funcional de a), b), c) o d) que inicia la señalización a través de la gp130, en el que el derivado funcional se puede preparar a partir de grupos funcionales que aparecen como cadenas laterales sobre los restos o los grupos N- o C-terminales por medios conocidos en la técnica y que permanece aceptable farmacéuticamente en el sentido de que no destruye la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de la IL-6 y que no proporciona propiedades tóxicas a las composiciones que la contienen.

El uso de la propia IL-6 es altamente preferido, según la invención. La IL-6 puede ser IL-6 natural, es decir IL-6 aislada de una fuente natural o IL-6 producida por recombinación. De acuerdo con la invención se prefiere en particular la IL-6 producida por recombinación.

Tal y como se usa en este documento, el término "variante" se refiere a análogos de la IL-6, en los cuales uno o más de los restos de aminoácidos de los componentes de la IL-6 que aparecen en la naturaleza se sustituyen por restos de aminoácidos diferentes, o son eliminados, o se añaden uno o más restos de aminoácidos a la secuencia original de la IL-6, sin cambiar de manera considerable la actividad de los productos resultantes respecto de la de la IL-6 original. Estas variantes se preparan mediante técnicas de síntesis y/o de mutagénesis dirigida al sitio conocidas o por cualquier otra técnica que sea adecuada para ello.

Las variantes de acuerdo con la presente invención incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, como ADN o ARN, que hibridan con el complemento del AND o ADN que codifica la IL-6 en condiciones rigurosas o moderadamente rigurosas. El término "condiciones rigurosas o estrictas" se refiere a las condiciones de la hibridación y el lavado posterior, que las personas expertas en la técnica denominan "rigurosas". Véase al respecto Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, supra, Interscience, N.Y. párrafos 6.3 y 6.4 (1987, 1992) y Sambrook et al. (Sambrook, J.C., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY).

Sin limitación, ejemplos de condiciones rigurosas incluyen condiciones de lavado a 12-20 °C por debajo de la T_m calculada del híbrido que se está estudiando en, por ejemplo, 2 x SSC y 0,5 % SDS durante 5 minutos, 2 x SSC y 0,1 % de SDS durante 15 minutos; 0,1 x SSC y 0,5 % de SDS a 37 °C durante 30-60 minutos y luego, un 0,1 x SSC y 0,5 % de SDS a 68 °C durante 30-60 minutos. Las personas expertas en esta técnica comprenden que las condiciones de rigor dependen también de la longitud de las secuencias de ADN, de las sondas de oligonucleótidos (como de 10-40 bases) o de las sondas de oligonucleótidos mixtas. Si se usan sondas mixtas, es preferible utilizar cloruro de tetrametilamonio (TMAC por sus siglas en inglés) en lugar de SSC (véase Ausubel, supra). "Condiciones moderadamente rigurosas" se refiere a condiciones de lavado a temperaturas más bajas, a concentraciones más bajas de sal o de detergente, como en 0,2 x SSC / 0,1 % SDS a 42 °C (Ausubel et al. 1989, supra).

Cualquier tal variante tiene preferentemente una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativa de la de la IL-6, de forma que tiene una actividad sustancialmente similar a la de la IL-6 o incluso mejor.

Una actividad característica de la IL-6 es su capacidad de enlazarse a la parte gp80 del receptor de la IL-6. Las personas expertas en la técnica apreciarán que un ensayo de tipo ELISA similar al descrito con detalle en el ejemplo 7 de la página 39 del documento de la patente WO99/02552 se puede desarrollar para el enlace de la IL-6 a la gp80. En tanto en cuanto la variante tiene actividad enlazante sustancial a su región de enlace respectiva de la gp80, se puede considerar que tiene sustancialmente actividad similar a la IL-6. En consecuencia, se puede determinar si cualquier variante dada tiene al menos sustancialmente la misma actividad que la IL-6 por medio de experimentos de rutina que comprenden someter tal variante por ejemplo a un ensayo de enlace de tipo sándwich sencillo para determinar si se enlaza o no a una gp80 inmovilizada, como se describe en el ejemplo 7 del documento de la patente WO 99/02552.

En una realización preferida, cualquiera de tales variantes tiene al menos 70 %, al menos 80 % o, más preferentemente, al menos 90 % de identidad u homología con la secuencia de la IL-6 madura.

La identidad refleja una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de nucleótidos, determinada comparando las secuencias. En general, la identidad se refiere a una correspondencia exacta de las dos secuencias de nucleótidos o de polipéptidos, nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido, respectivamente, a lo largo de todas las secuencias que se comparan.

- 5 Para secuencias en las que no hay una correspondencia exacta, se puede determinar un “% de identidad”. En general, las dos secuencias que se van a comparar se alinean para dar una correlación máxima entre las secuencias. Ello puede incluir insertar “huecos” (“gaps”) en una de las secuencias o en ambas, para aumentar el grado de alineación. Se puede determinar un % de identidad a lo largo de toda la longitud de cada una de las secuencias que se van a comparar (denominado alineación global), que es especialmente adecuado para secuencias de la misma longitud o de longitudes muy similares o bien un % de identidad sobre tramos más cortos de las secuencias (denominado alineación local), que es más adecuado para secuencias de longitud desigual.
- 10 En la técnica son bien conocidos los métodos para comparar la identidad y la homología de dos o más secuencias. Así, por ejemplo, se pueden usar programas disponibles en el Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 9.1 (Devereux, J. et al., 1984), por ejemplo los programas BESTFIT and GAP, para determinar el % de identidad entre dos nucleótidos y el % de identidad y el % de homología entre dos secuencias de polipéptidos. BESTFIT usa el algoritmo de “homología local” de Smith y Waterman (1981) y encuentra la mejor región individual de semejanza entre las dos secuencias. Se conocen en la técnica otros programas para determinar identidad y/o similitud entre secuencias, por ejemplo la familia de programas BLAST (Altschul, S.F. et al., 1990; Altschul, S.F. et al., 1997, accesibles a través de la página web del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson, W.R., 1990; Pearson, 1988).
- 15
- 20 Las variantes de la IL-6 que se pueden usar según la presente invención, o los ácidos nucleicos que las codifican, incluyen un conjunto finito de secuencias que corresponden sustancialmente como péptidos o nucleótidos de sustitución que se puede obtener de forma rutinaria por cualquier persona conocedora de la técnica, sin excesiva experimentación, tomando como base las enseñanzas y las orientaciones presentadas en este documento.
- 25 Los cambios preferidos para variantes de acuerdo con la presente invención son los que se conocen como sustituciones “conservadoras”. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de la IL-6 pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tiene propiedades fisicoquímicas suficientemente similares; esa sustitución entre miembros del grupo conservará la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Es claro que también se pueden hacer inserciones y supresiones de aminoácidos en las secuencias definidas previamente sin alterar su función, en particular si las inserciones o supresiones solo involucran unos pocos aminoácidos, por ejemplo menos de treinta y preferentemente menos de diez y no eliminan o desplazan aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, como por ejemplo grupos de cisteína. Las proteínas y sus variantes producidas mediante tales supresiones y/o inserciones caen dentro de la esfera de la presente invención.
- 30
- 35 Preferentemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la tabla 1. Más preferentemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la tabla 2 y lo más preferido es que los grupos de aminoácidos sinónimos sean los definidos en la tabla 3.

Tabla 1: Grupos preferidos de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Aro, 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
40 Trp	Trp

Tabla 2 Grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

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

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

Tabla 3: Los grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

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

5 Ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que se pueden usar para obtener muteínas de la IL-6 para uso en la presente invención son cualesquiera etapas de métodos conocidos, como las presentadas en los documentos de las patentes de Estados Unidos números 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, atribuidas a Mark et al.; 5.116.943 atribuida a Kohts et al.; 4.965.195 atribuida a Namen et al.; 4.879.111 atribuida a Chong et al. y 5.017.691 atribuida a Lee et al. y las proteínas sustituidas con lisina presentadas en el documento de la patente de Estados Unidos número 4.904.584 (Shaw et al.).

10 Se han descrito variantes específicas de la IL-6 que son útiles en relación con la presente invención (WO9403492A1). Además, el documento de la patente EP667872B1 describe IL-6 mutante con actividad biológica mejorada respecto de la de la IL-6 de tipo natural. Además de esto, el documento de la patente EP656117B1 describe métodos para aislar superagonistas de la IL-6. Los mutantes o superagonistas se pueden usar según la invención.

15 El término "proteína de fusión" se refiere a un polipéptido que comprende IL-6 o una variante o un fragmento de ella, fusionado con otra proteína que, por ejemplo, tiene un tiempo de residencia ampliado en los fluidos del cuerpo. En consecuencia, la IL-6 se puede fusionar con otra proteína, polipéptido o similar, por ejemplo una inmunoglobulina o un fragmento suyo.

20 El término "derivados funcionales", tal como se usa en este documento, cubre derivados de la IL-6 y sus variantes y proteínas de fusión, que se pueden preparar a partir de grupos funcionales que aparecen como cadenas laterales sobre los restos o grupos N- o C-terminales, por medios conocidos en la técnica y se incluyen en la invención en la medida en que permanecen aceptables farmacéuticamente, es decir, en la medida en que no destruyen la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de la IL-6 y que no confieren propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen.

Estos derivados pueden, por ejemplo, incluir cadenas laterales de polietilenglicol que pueden enmascarar sitios antigénicos y ampliar la residencia de la IL-6 en los fluidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxílicos mediante reacción con amoníaco o con aminas primarias o secundarias; derivados N-acilo de grupos amino libres de los restos de aminoácidos formados con grupos acilo (por ejemplo grupos alcanilo o aroilo carbocíclico) o derivados O-acilo de grupos hidroxilo libres (por ejemplo los de los grupos serilo o treonilo) formados con grupos acilo.

De acuerdo con la presente invención, un "fragmento" puede ser por ejemplo una fracción activa de IL-6. El término fragmento se refiere a cualquier subconjunto de la molécula, es decir un péptido más corto que conserva la actividad biológica deseada, es decir que tiene actividad agonista de la gp130. Se pueden preparar fácilmente fragmentos eliminando aminoácidos de cualquier extremo de la molécula IL-6 y ensayando las propiedades de unirse al gp80 del fragmento resultante. Se conocen en la técnica proteasas para eliminar un aminoácido cada vez del extremo N-terminal o del extremo C-terminal de un polipéptido y, por lo tanto, determinar fragmentos que mantengan la actividad biológica deseada implica experimentación puramente rutinaria.

Como fragmentos de IL-6, variantes y proteínas de fusión suyas, la presente invención cubre además cualquier fragmento o precursores de la cadena polipeptídica de la molécula de proteína sola o junto con moléculas asociadas o restos enlazados a ello, por ejemplo restos de azúcares o fosfato, o agregados de la molécula de proteína o de los restos de azúcar por ellos mismos, siempre que dicha fracción tenga actividad agonística sobre la gp130 y, en particular, sobre la gp130.

El término "sales" se refiere en este documento tanto a las sales de los grupos carboxilo como a las sales de adición ácida de los grupos amino de la molécula de IL-6 o sus análogas. Las sales de un grupo carboxilo se pueden formar por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo sales de sodio, de calcio, de amonio, férricas o de zinc y sales con bases orgánicas, como las formadas, por ejemplo, con aminas como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína o similares. Las sales de adición ácidas incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales, como, por ejemplo, ácido clorhídrico o sulfúrico y sales con ácidos orgánicos, como por ejemplo ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cualquiera de tales sales debe mantener la actividad biológica de la IL-6, es decir, la capacidad para activar la señalización a través de la gp130.

En una realización preferida de la invención, la sustancia de la invención se glicosila en uno o más sitios.

En el documento de la patente WO 99/02552 (PCT/IL98/00321) se ha descrito una forma glicosilada de una quimera IL-6R/IL-6. La quimera IL-6R/IL-6 descrita en ese documento es una glicoproteína recombinante que se obtuvo por fusión de la secuencia codificadora completa del receptor δ -Val de la IL-6, soluble y que aparece naturalmente, (Novick et al., 1990) con la secuencia codificadora completa de la IL-6 de origen natural madura, ambas de origen humano. La persona conocedora de la técnica se dará cuenta de que la IL-6 glicosilada se puede producir también por medio de recombinación, es decir, por expresión en sistemas de expresión eucarióticos.

De acuerdo con la presente invención, el agonista se puede producir en cualquier tipo de células eucarióticas o procarióticas adecuadas, como células de levadura, células de insectos, bacterias y similares. Preferentemente, se produce en células de mamíferos, más preferentemente en células CHO (ovario de hámster chino) preparadas por ingeniería genética, como se describe para la IL-6R/IL-6 en el documento de la patente WO 99/02552. Si bien se prefiere la proteína de origen humano, las personas conocedoras de la técnica se darán cuenta de que, de acuerdo con la invención, se puede usar una proteína de fusión similar de cualquier otro origen, mientras mantenga la actividad biológica descrita en este documento.

En una realización adicional de la invención, la sustancia de la invención no está glicosilada. De forma ventajosa, la molécula quimérica se puede producir entonces en células de bacterias, que no son capaces de sintetizar grupos glicosilo, pero que normalmente tienen un rendimiento alto de proteína recombinante producida. La producción de IL-6 no glicosilada se ha descrito con detalle en el documento de la patente EP504751B1, por ejemplo.

Todavía en otra realización adicional, la sustancia según la invención comprende una fusión con inmunoglobulina, es decir, las moléculas según la invención se fusionan con toda o parte de una inmunoglobulina y, en particular, a un fragmento Fc de una inmunoglobulina. En la técnica se conocen bien los métodos para preparar proteínas de fusión con inmunoglobulina, como los descritos en el documento WO 01/03737, por ejemplo. La persona conocedora de la técnica comprenderá que la proteína de la invención resultante de la fusión mantiene la actividad biológica de la IL-6, es decir, la estimulación de la señalización a través de la gp130. Idealmente, la proteína de fusión resultante tiene propiedades mejoradas, como un tiempo de residencia en los fluidos del cuerpo ampliado (vida media), actividad específica aumentada, nivel de expresión aumentado o purificación más fácil de la proteína de fusión.

Preferentemente, la sustancia de la invención se fusiona a la región constante de una molécula Ig. Se puede fusionar a las regiones de cadena pesadas, como los dominios CH2 y CH3 de la IgG1 humana, por ejemplo. También son adecuadas otras isoformas de la Ig para la generación de proteínas de fusión según la presente invención, como las isoformas IgG₂ o IgG₄ u otras clases Ig, como IgM o Ig A, por ejemplo. En consecuencia, las

proteínas de fusión pueden ser monoméricas o multiméricas, hetero u homomultiméricas.

Con el fin de mejorar las propiedades de la proteína, como la estabilidad, la vida media, la biodisponibilidad, la tolerancia por el cuerpo humano o la inmunogenicidad, se pueden conjugar derivados funcionales de la sustancia de la invención con polímeros.

Por lo tanto, una realización preferida de la invención se refiere a un derivado funcional de la sustancia de la invención que comprende al menos una fracción molecular unida a uno o más grupos funcionales que aparecen como una o más cadenas laterales sobre los restos de aminoácidos.

Una realización de la invención muy preferida se refiere a una sustancia de la invención unida a polietilenglicol (PEG). La denominada "PEGilación" se puede llevar a cabo mediante métodos conocidos, como los descritos en el documento de la patente WO 92/13095, por ejemplo.

Preferentemente, la sustancia que señala a través de la gp130 se usa en una cantidad que varía de aproximadamente 0,1 a 1000 µg/kg o de aproximadamente 1 a 500 µg/kg o menos de aproximadamente 100 µg/kg. Se prefiere usar más la sustancia que señala a través de la gp130 en una cantidad de aproximadamente 1 µg/kg o 3 µg/kg o 10 µg/kg o 30 µg/kg.

En una realización preferida de la invención, la sustancia que señala a través de la gp130 se administra diariamente. En una realización más preferida, la sustancia que señala a través de la gp130 se administra tres veces a la semana. En una realización todavía más preferida, la sustancia que señala a través de la gp130 se administra una vez a la semana.

La sustancia de la invención se puede administrar por cualquier vía adecuada. De acuerdo con la presente invención, la vía subcutánea es muy preferida.

La sustancia de la invención se puede entregar en su lugar de acción en cualquier formulación adecuada. Preferentemente, se puede entregar en forma de células que expresan y/o secretan IL-6, una variante, una proteína de fusión o una fracción activa suya. Como se ilustra más adelante en los ejemplos para comparación, las células que expresan y secretan la quimera IL-6R/IL-6 en cantidades suficientes se han generado por transfección en células utilizando un vector de expresión adecuado.

La invención, por lo tanto, se refiere además al uso de una célula que expresa una sustancia según la invención, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la neuropatía diabética. Las células se pueden administrar en cualquier forma adecuada. Sin embargo, como modo de entrega se prefiere con mucho una célula que expresa y preferentemente secreta IL-6 encapsulada en polímero. El procedimiento de encapsulación se describe con detalle por ejemplo por Emerich et al (1994) o en el documento de la patente de Estados Unidos US 5.853.385. Son bien conocidas en la técnica las líneas celulares adecuadas y los sistemas de expresión estable.

La entrega de la sustancia según la invención se puede llevar a cabo usando un vector, como un vector de expresión, que comprende la secuencia codificadora de la IL-6, una variante, una proteína de fusión o fragmentos suyos. El vector comprende todas las secuencias reguladoras necesarias para la expresión de la proteína necesaria en el cuerpo humano y preferentemente en las células nerviosas periféricas. Las secuencias reguladoras para los vectores de expresión son conocidas por las personas diestras en la técnica. Por lo tanto, la invención se refiere también al uso de un vector que comprende la secuencia de codificación de una sustancia según la invención para fabricar un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la neuropatía diabética.

De acuerdo con la invención, se puede usar cualquier vector conocido en la técnica. Sin embargo, se prefiere con mucho el uso de un vector de terapia génica derivado viralmente.

La sustancia de la invención se administra preferentemente al cuerpo humano como una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede comprender el polipéptido de la invención como tal, o células que expresan dicho polipéptido, o un vector de expresión, en particular un vector de terapia génica lentiviral que comprende la secuencia de codificación de la IL-6, de una variante, de una proteína de fusión o de fragmentos activos de ellos, opcionalmente junto con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes aceptables farmacéuticamente, para el tratamiento y/o la prevención de la neuropatía diabética.

Se pretende que la definición de "aceptable farmacéuticamente" abarque cualquier vehículo que no interfiere en la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no es tóxico para el huésped o paciente a quien se le administra. Por ejemplo, para administración parenteral, el componente activo se puede formular en forma de dosis unitarias para inyección en vehículos como suero salino, disolución de dextrosa, suero de albúmina y disolución de Ringer.

El componente activo se puede administrar a un paciente por distintas vías. Entre las vías de administración se incluyen las vías intradérmica, transdérmica (por ejemplo en formulaciones de liberación lenta), intramuscular,

intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, epidural, tópica e intranasal. Se puede usar cualquier otra vía terapéuticamente eficaz, por ejemplo la absorción a través de tejidos epiteliales o endoteliales o mediante terapia génica en la que una molécula de ADN se administra al paciente (por ejemplo mediante un vector) lo cual provoca que el polipéptido se exprese y se secrete in vivo. Además, la molécula activa se puede administrar junto con otros componentes de agentes activos biológicamente como tensioactivos, vehículos, excipientes y diluyentes aceptables farmacéuticamente.

Para la administración parenteral (esto es, intravenosa, subcutánea, intramuscular), el componente activo se puede formular como una disolución, una suspensión, una emulsión o un polvo liofilizado, asociado con un vehículo parenteral aceptable farmacéuticamente (por ejemplo agua, suero salino, disolución de dextrosa) y aditivos que mantengan la isotonicidad (por ejemplo manitol) o la estabilidad química (por ejemplo, conservantes y tampones). La formulación se esteriliza utilizando las técnicas comunes.

En lo que sigue, se describirá la invención con más detalle con los ejemplos no limitadores siguientes y los dibujos que acompañan este texto.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de IL-6 (ejemplo de trabajo) y de quimera IL-6R/IL-6 (ejemplo de comparación) en células CHO (ovario de hámster china)

Quimera IL-6R/IL-6 (ejemplo de comparación)

Se fusionaron las secuencias de cADN que codifican para el receptor de la IL-6 soluble (forma natural de la sIL-6 encontrada en orina, Oh et al., 1997) con las que codifican para IL-6 madura. Estaban también presentes secuencias para tres aminoácidos de puente (EFM): El gen de fusión se insertó en un vector de expresión bajo el control del promotor CMV (citomegalovirus) y se introdujo en las células CHO. Se desarrolló un proceso de producción y la proteína recombinante resultante se purificó mediante inmunopurificación utilizando un anticuerpo monoclonal anti-IL-6R. La proteína quimera IL-6 purificada ha demostrado ser glicosilada y tener un peso molecular aparente de 85000.

La figura 10 muestra esquemáticamente la composición de la quimera IL-6R/IL-6. La proteína madura comprende 524 aminoácidos.

Una proteína producida y purificada como se acaba de describir es adecuada para ser administrada según la invención.

IL-6 (ejemplo de trabajo)

IL-6 humana recombinante (r-hIL-6) se produce en células de ovario de hámster china (células CHO) tratadas mediante ingeniería genética. El proceso de producción comienza con el crecimiento y expansión de células a partir de un banco de células de trabajo (o WCB por sus siglas en inglés) y continúa bajo condiciones en las que se secreta r-hIL-6 al medio de cultivo. La r-hIL-6 recolectada en el medio de cultivo se purifica mediante inmunocromatografía utilizando un anticuerpo monoclonal (mAB) específico anti-IL-6. Se usan etapas adicionales de purificación para rendir un producto con un nivel muy alto de pureza.

La r-hIL-6 se suministra como una preparación liofilizada, estéril, que contiene excipientes adecuados. Está disponible en dos cantidades diferentes, 35 µg y 350 µg y se reconstituye para su uso con agua para inyección. Normalmente, el volumen de reconstitución para un vial del producto final de la formulación es 0,5 ml de agua. El producto terminado debe almacenarse en su envase original a temperaturas inferiores a 25 °C.

Se ha confirmado la estructura de la r-hIL-6 mediante espectroscopía de masas con bombardeo atómico rápido (FAB-MS por sus siglas en inglés), mapa triptico y secuenciado de aminoácidos. Para determinar la composición y la estructura de las fracciones de carbohidratos de la IL-6 se usaron FAB (bombardeo atómico rápido) y espectroscopia de masas por ionización por electropulverización (electrospray). En el sitio de la N-glicosilación se identificó un resto de asparagina-46 y el análisis preliminar del carbohidrato N-enlazado mostró que las especies dominantes eran estructuras monosialil fucosil biantenaria y disialil fucosil biantenaria. El sitio de O-glicosilación se identificó como treonina -138 o -139.

Ejemplo 2: Efecto de la IL-6 en el modelo de la neuropatía diabética inducida por estreptozotocina con administración intraperitoneal

Materiales y métodos

Animales

Se distribuyeron ratas macho Sprague Dawley de seis semanas de edad (Janvier, Le Genest-St-Isle, Francia) en 9

5 grupos experimentales (n = 10) de acuerdo con una tabla de aleatoriedad: (a) un grupo de control con vehículo, al que se le inyectaba disolución salina estéril –BSA al 0,02 % (peso/volumen); (b) un grupo de control que consistía en animales a los que se inyectaba con IL-6 a una dosis de 100 µg/kg disuelta en una disolución salina estéril –BSA al 0,02 %; (c) un grupo intoxicado con estreptozotocina (STZ) al que se le inyectaba una disolución salina estéril –BSA 0,02%; (d) 5 grupos intoxicados con STZ tratados, que consistían en animales que recibían inyecciones de compuesto de IL-6 a 5 dosis diferentes: 1, 3, 10, 30 y 100 µg/kg; (e) un grupo intoxicado con STZ y tratado con un compuesto de referencia: 4-metilcatecol (4-MC) a la dosis de 10 µg/kg.

10 Los animales fueron alojados en grupos (2 animales por jaula) y se mantuvieron en una habitación con temperatura controlada (21-22 °C) y con un ciclo invertido de luz-oscuridad (12 h/12 h) con comida y agua disponibles *ad libitum*. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con los requisitos institucionales para el tratamiento de los animales.

Inducción de la diabetes y tratamiento farmacológico

15 Se indujo la diabetes mediante inyección de una disolución tamponada de estreptozotocina (Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, Francia) en la vena safena magna izquierda despojada quirúrgicamente, a una dosis de 55 mg/kg de peso del cuerpo. El medicamento se disolvió inmediatamente antes de la inyección en un tampón citrato de 0,1 mol/l de pH 4,5. El día de la inyección de la STZ se consideró el día (D) 0.

20 Una semana más tarde, en el D 10, se determinó la glucemia en cada uno de los animales utilizando un glucómetro (Glucotrend test, Roche, Mannheim, Alemania) con sangre de la vena de la cola. Los animales que presentaban un valor por debajo de 260 mg/dl se excluyeron del estudio. La glucemia se comprobó de nuevo el D 40, al final del experimento.

25 El tratamiento intraperitoneal (IP) (vehículo, IL-6 y 4-MC) se realizó todos los días desde el D 11 al D 40.

Planificación de los experimentos

Todos los días se registraron los pesos corporales y la tasa de supervivencia.

30 Los ensayos de sacudida de la cola y de electromiografía (EMG) se realizaron una vez a la semana, de acuerdo con la siguiente planificación:

- D -7 : línea base (sacudida de la cola y EMG)
- D 0 : inducción de la diabetes mediante inyección de STZ
- 35 D 10 : medida de la glucemia
- D 11 : comienzo del tratamiento (IL-6 y 4-MC)
- D 25 : ensayos de EMG y sacudida de la cola
- D 40 : control de glucemia, ensayos de EMG y sacudida de la cola, eliminación del nervio ciático

Ensayo de sensibilidad: sacudida de la cola

40 La cola de la rata se colocó bajo una lámpara controlada por un disparador como fuente de calor (Bioseb, París, Francia). Se registró la latencia antes de que la rata sacudiera su cola para separarla de la fuente de calor. Una alteración sensorial aumenta la latencia de la sacudida. Se llevaron a cabo dos ensayos y se calculó el valor medio que es el que se guardó como valor característico.

Electromiografía

45 Se realizaron registros electrofisiológicos utilizando un electromiógrafo (EMG) Neuromatic 2000M (Dantec, Les Ulis, Francia). Se anestesiaron las ratas mediante una inyección intraperitoneal de 60 mg/kg de clorhidrato de ketamina (Imalgene 500®, Rhône Mérieux, Lyon, Francia). Se mantuvo la temperatura normal del cuerpo a 30 °C con una lámpara de calentamiento y se controló con un termómetro de contacto (Quick, Bioblock Scientific, Illkirch, Francia) colocado en la superficie de la cola.

50 El potencial de acción muscular compuesto (CMAP) se registró en el músculo gastrocnemio después de estimulación del nervio ciático. En la pata trasera se colocaron un electrodo de referencia y una aguja activa. Una aguja de tierra se insertó en la parte baja de la espalda de la rata. Se estimuló el nervio ciático con un único pulso de 0,2 ns a una intensidad supramáxima. Se registró la velocidad de la onda motora expresada en ms.

60 También se registró la velocidad de conducción del nervio sensorial (SNCV). Los electrodos de la piel de la cola se colocaron como sigue: una aguja de referencia se insertó en la base de la cola y otra aguja ánodo se colocó separada 30 mm de la aguja de referencia hacia el extremo de la cola. Entre las agujas ánodo y de referencia se insertó un electrodo aguja de tierra. Se estimuló el nervio caudal con una serie de 20 pulsos (durante 0,2 ms) a una intensidad de 12,8 mA. La velocidad se expresó en m/s.

Análisis morfométrico

65 Al final del estudio (D 40) se llevó a cabo un análisis morfométrico. Se anestesiaron los animales con una inyección IP de 100 mg/kg de Imalgene 500 ®. Se extirpó un segmento de 5 mm del nervio ciático para análisis histológico. El

tejido se fijó durante la noche con disolución de glutaraldehído al 4 % (Sigma, L'Isle d'Abeau-Chesnes, Francia) en disolución de tampón fosfato (pH = 7,4) y se mantuvo en sacarosa al 30 % a + 4 °C hasta su uso. La muestra de nervio se fijó en disolución de tetraóxido de osmio al 2 % (Sigma, L'Isle d'Abeau-Chesnes, Francia) en disolución de tampón fosfato durante 2 h, se deshidrató en disoluciones de alcohol diluidas en serie y se incrustó en resina Epon. Los tejidos incrustados se colocaron entonces a + 70 °C durante los 3 días de polimerización. Con un micrótomo se cortaron secciones transversales de 1,5 µm, se tiñeron con una disolución de azul de toluidina al 1 % (Sigma, L'Isle d'Abeau-Chesnes, Francia) durante 2 minutos, se deshidrataron y se montaron en medio de montaje Eukitt. Se examinaron veinte secciones por muestra utilizando un microscopio óptico (Nikon, Yokio, Japón) y 6 cortes escogidos al azar se analizaron utilizando un software de análisis de imágenes digital semiautomático (Biocom, Francia). Por cada corte se estudiaron dos campos escogidos al azar. Se calcularon los siguientes parámetros: (a) diámetro de la fibra; (b) diámetro del axón; (c) espesor de la mielina (véase más adelante).

Para contar el número total de fibras por sección del nervio, se escogieron al azar 3 láminas o cortes por muestra y se analizaron 2 campos por cada lámina.

Análisis de los datos

El análisis de los datos se realizó utilizando el análisis de la varianza de un factor o de medida repetida (ANOVA) y el ANOVA simple. Se utilizó el test de Dunnett cuando el test anova indicaba una diferencia significativa. No se realizaron análisis retrospectivos ("post-hoc"). Se fijó el nivel de significación a $p < 0,05$. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (e.e.m).

Resultados

Peso animal

Como se ilustra en la figura 1, se detectó en este estudio una diferencia entre grupos significativa en la evolución del peso corporal [$F(8, 296) = 19,47$ y $p < 0,001$; ANOVA de medidas repetidas]. De D5 a D 40, los animales intoxicados con STZ y tratados con IL-6 mostraron una disminución significativa en el peso del cuerpo ($p < 0,05$; ANOVA simple y $p < 0,05$ control frente a STZ; control / IL-6 (100 µg/kg) frente a STZ; control frente a STZ + IL-6 y control / IL-6 (100 µg/kg) frente a STZ + IL-6; test de Dunnett).

Los animales diabéticos tratados con IL-6 a una dosis de 10 µg/kg presentaron un peso corporal significativamente más alto que aquellos tratados con otras dosis de IL-6 [$F(5, 185) = 1,16$ y $p = 0,08$; ANOVA de medidas repetidas].

Puede notarse que los animales intoxicados con STZ y tratados con IL-6 a la dosis de 100 µg/kg presentaron un peso corporal que disminuyó a lo largo de todo el estudio (empezando desde el principio del tratamiento).

Glucemia

La figura 2a muestra que en D 10 los animales de control presentaban un valor de glucemia igual a 100 mg/dl. Por otro lado, las ratas intoxicadas con STZ presentaban una concentración de glucosa en plasma superior a 260 mg/dl y se consideraron diabéticas.

La figura 2b muestra que las ratas intoxicadas con STZ todavía eran diabéticas el D 40.

Ensayo de sensibilidad: sacudida de la cola

Hubo una diferencia significativa entre grupos en la evolución de los rendimientos en el ensayo de sacudida de la cola [$F(8, 16) = 2,07$ y $p = 0,013$; ANOVA de medidas repetidas] (figura 3). La latencia antes de que las ratas sacudieran su cola para separarla del calor aumentó de manera significativa en los animales diabéticos no tratados (control/vehículo frente a STZ/vehículo $p < 0,001$; test de Dunnett). En los días D 25 y D 40, el tiempo de reacción no aumentó en los animales tratados con IL-6 a dosis de 1, 3, 10 y 100 µg/kg y tratados con 4-MC a dosis de 10 µg/kg. De hecho, no se encontraron diferencias significativas entre estos dos grupos ($p > 0,05$; test de Dunnett).

Medidas electrofisiológicas

Latencia del potencial de acción muscular compuesto (CMAP)

Hubo una diferencia significativa entre los grupos en la latencia del CMAP a lo largo del estudio [$F(8, 16) = 5,901$ y $p < 0,001$; ANOVA de medidas repetidas]. La latencia aumentó de manera significativa en las ratas diabéticas no tratadas (en los días 25 y 40; $p < 0,001$; ANOVA simple). Este aumento fue menos importante en los grupos tratados con la IL-6, especialmente en el caso del grupo tratado con IL-6 a una dosis de 10 µg/kg que no presentaba, los días 25 y 40, diferencias significativas con el valor de latencia del grupo control/vehículo (figura 4).

Además, el día 25, cada grupo intoxicado con STZ y tratado con IL-6 presentaba una latencia CMAP significativamente más corta que la latencia CMAP del grupo vehículo/STZ ($p = 0,001$, test de Dennett).

La misma conclusión es válida para el día 40.

Se observó una diferencia significativa entre los animales intoxicados con STZ y tratados con IL-6 (dosis de 10 µg/kg) y los otros cuatro grupos tratados con IL-6 (con dosis de 1, 3, 30 y 100 kg) (D 25: $p = 0,002$, D 40: $p = 0,003$;

test ANOVA simple). Los animales tratados con dosis de 3 µg/kg y 10 µg/kg presentaban una latencia significativamente más baja que los grupos intoxicados con STZ y tratados con 1, 30 y 100 µg/kg ($p < 0,05$; test de Dunnett) en el día 25 y también en el día 40.

5 *Velocidad de conducción del nervio sensorial (SNCV)*

En el estudio se notó una diferencia significativa entre los grupos en la SNCV [$F(8,16) = 5,518$ y $p < 0,001$; ANOVA de medidas repetidas] (figura 5). Las ratas diabéticas mostraban una disminución significativa de la SNCV (los días 25 y 40: $p < 0,001$; ANOVA simple) en contraste con el grupo control/vehículo. Además, en el día 25 no se observó diferencia significativa entre el grupo control/vehículo y el grupo tratado con 10 µg/kg de IL-6 ($p = 0,426$; test de Dunnett) mientras que se observó una diferencia significativa entre todos los otros grupos. El día 25 solo los grupos tratados con dosis de 10 µg/kg y 30 µg/kg presentaban una diferencia significativa con el grupo STZ/vehículo (10 µg/kg frente a grupos vehículo STZ: $p < 0,001$, 30 µg/kg frente a grupos STZ: $p = 0,004$; tests de Dunnett). En el día 40, los animales tratados con 10 µg/kg no mostraron diferencias significativas con los animales tratados con STZ/vehículo; sin embargo, el valor de SNCV para este grupo fue más alto que el de los otros animales tratados con STZ/IL-6.

Podría notarse que la SNCV aumenta gradualmente a lo largo del estudio en los animales del grupo control/vehículo debido a una maduración normal de la estructura del nervio periférico (Gao et al.; 1995, Malone et al., 1996).

20 *Análisis morfométrico* *Diámetro del axón*

Se encontró una diferencia significativa entre grupos en el diámetro del axón ($p < 0,001$; ANOVA simple) (figura 6). Los animales del grupo vehículo / STZ mostraron una disminución significativa en el diámetro del axón en comparación con las ratas de control ($p = 0,08$; test de Dunnett). El tratamiento con IL-6 invirtió esta disminución del diámetro del axón, desde la dosis de 3 µg/kg (ratas tratadas con IL-6 frente a STZ / vehículo $p < 0,001$; test de Dunnett). Además, se notó una diferencia significativa entre el grupo de control y el grupo control / IL6 (100 µg/kg) ($p < 0,001$; test de Dunnett). No se encontró diferencia significativa entre el grupo control / vehículo y el grupo tratado con 4-MC ($p = 0,657$; test de Dunnett).

30 *Diámetro de la fibra*

La figura 7 muestra que había una diferencia significativa entre los nueve grupos en el diámetro de la fibra ($p < 0,001$, ANOVA simple). La administración de STZ conduce a una disminución significativa del diámetro de la fibra (control / vehículo frente a STZ / vehículo $p = 0,005$; test de Dunnett). Se observó una diferencia significativa entre las ratas vehículo / STZ y las ratas tratadas con IL-6 / STZ ($p < 0,005$; test de Dunnett). Los animales tratados con IL-6 mostraron un diámetro de fibra mayor que los animales vehículo / STZ. Además, se encontró una diferencia significativa entre el grupo de control y el grupo control / IL-6 (100 µg/kg) ($p < 0,001$; test de Dunnett). Los animales tratados con 4-MC con la dosis de 10 µg/kg no presentaban diferencias significativas con el grupo control /vehículo ($p = 0,628$; test de Dunnett).

40 *Espesor de la mielina*

La comparación de los espesores de mielina reveló una diferencia significativa entre los 9 grupos ($p < 0,001$; ANOVA simple) (figura 8). El espesor de la mielina era significativamente menor en los animales del grupo vehículo / STZ que en los del grupo control / vehículo y en los de los grupos de animales tratados con IL-6 (con dosis de 3, 10, 30 y 100 µg/kg) ($p < 0,01$; test de Dunnett). Cabe señalar que todos los animales de los grupos STZ / tratados con IL-6 presentaban un espesor de mielina significativamente más alto que el grupo vehículo / STZ. Además, se notó una diferencia significativa entre los grupos control / vehículo y control / IL-6 (100 µg/kg) ($p < 0,001$; test de Dunnett).

Número total de fibras mielinizadas

Como se muestra en la figura 9, hubo una diferencia significativa entre grupos en el número total de fibras mielinizadas ($p < 0,001$; ANOVA simple). Los animales del grupo vehículo / STZ mostraron un número menor de fibras que los animales de control ($p < 0,001$; test de Dunnett). En contraste, los animales de los grupos /STZ / tratados con IL-6 tenían un número de fibras mayor que los animales del grupo vehículo / STZ ($p < 0,001$; test de Dunnett). Los animales intoxicados con STZ tratados con 4-MC tenían un número total de fibras análogo al de los animales de control. Además, no se notó diferencia significativa entre el grupo control / vehículo y el grupo control / IL-6 (100 µg/kg).

Conclusión

En este estudio, se han usado como modelo de neuropatía inducida animales intoxicados con estreptozotocina y que desarrollaron diabetes varios días más tarde. El animal deviene diabético 3 o 4 días después de la inducción.

Los animales diabéticos fueron tratados con diferentes dosis de IL-6 (1, 3, 10, 30 y 100 µg/kg) permanentemente durante 30 días. El tratamiento se administró por vía intraperitoneal cada día empezando 10 días después de la inducción hasta el sacrificio del animal 40 días después de la inducción con STZ. Este tratamiento podría considerarse como un tratamiento curativo en el que se ha administrado IL-6 después de los primeros daños moleculares provocados por una hiperglucemia prolongada.

El presente protocolo muestra que un tratamiento con IL-6 de 30 días induce una neuroprotección frente a la neuropatía diabética. El análisis de comportamiento con la sacudida de la cola y los ensayos con el EMG (velocidades sensorial y motora) muestran el efecto neuroprotector de la IL-6, en especial con las dosis de 3 y 10 µg/kg.

Tanto las dosis bajas como las concentraciones altas mostraron efecto neuroprotector. De hecho, cuanto mayor es la dosis del tratamiento, menos significativo es el efecto neuroprotector. Además, la dosis más alta (100 µg/kg) no presenta un efecto pronunciado y parece tener un efecto tóxico sobre el comportamiento general de los animales intoxicados con STZ. Los animales de control (no tratados con STZ) tratados con IL-6 a 100 µg/kg estaban más excitados que los animales de control con vehículo o que las ratas STZ tratadas con bajas concentraciones de IL-6. Además, estos animales (los del grupo IL-6 100 µg/kg) presentaban dificultades para ser manipulados por el experimentador. Lo mismo se observó en el grupo STZ / IL-6 100 µg/kg. No obstante, estos animales parecían menos excitados (probablemente debido a su debilidad a causa de su gran pérdida de peso corporal).

El efecto neuroprotector se enfoca sobre las fibras sensoriales así como sobre las fibras motoras (la velocidad CMAP no se alteró con el tratamiento con IL-6).

En lo que se refiere al análisis morfológico, la neuroprotección inducida por el tratamiento IL-6 es muy clara para todas las dosis estudiadas. Las fibras de los animales STZ / vehículo mostraban una disminución de la vaina de mielina y una alteración del axón, que induce finalmente una degeneración de las fibras (mostrada con una disminución del número total de fibras).

En este estudio se demostró que el tratamiento con IL-6 (especialmente 10 µg/kg) protegía la vaina de mielina y la degeneración axonal.

Debe notarse que la dosis alta de IL-6 (100 µg/kg) induce un efecto dañino sobre las fibras en animales sanos. De hecho, las fibras parecen sufrir, no hay pérdida de fibra, pero la vaina y el aspecto general de las fibras se alteran. Sin embargo este efecto no se registra en los animales diabéticos tratados con esta dosis grande de IL-6 (el efecto tóxico se enfoca principalmente sobre el comportamiento general del animal caracterizado por una gran disminución del peso corporal).

En conclusión, la IL-6 induce un claro efecto neuroprotector después de un tratamiento crónico de 30 días tanto en las fibras sensoriales como en las fibras motoras, probablemente actuando mediante efecto directo sobre la fibra y reduciendo el proceso inflamatorio de neurodegeneración.

Ejemplo 3: Efecto de la IL-6 en el modelo de la neuropatía diabética inducida por estreptozotocina con administración subcutánea (ejemplo de trabajo)

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la IL-6 a través de la vía subcutánea a diferentes dosis y ritmos en el mismo modelo de neuropatía.

Animales

Estudio A

Se distribuyeron ratas macho Sprague Dawley de seis semanas de edad (Janvier, Le Genest-St-Isle, Francia) en 6 grupos experimentales de acuerdo con una tabla de aleatorización: (a) un grupo de control de vehículo (n = 4), a las que se inyectó una disolución de suero salino –BSA 0,02 % (peso/volumen); (b) un grupo intoxicado con estreptozotocina (STZ) (n = 10) a las que se inyectó una disolución estéril de suero salino –BSA 0,02 %; (c) 4 grupos intoxicados con STZ (n = 10) tratados, que consistían en animales que recibían diariamente inyecciones subcutáneas (SC) del compuesto de IL-6 en 4 dosis diferentes: 1, 3, 10, 30 µg/kg.

Los animales fueron alojados en grupos (2 animales por jaula) y se mantuvieron en una habitación con temperatura controlada (21-22 °C) y con un ciclo invertido de luz-oscuridad (12 h/12 h) con comida y agua disponibles *ad libitum*. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con los requisitos institucionales para el tratamiento de los animales.

Estudio B

Se distribuyeron ratas macho Sprague Dawley de seis semanas de edad (Janvier, Le Genest-St-Isle, Francia) en 7 grupos experimentales de acuerdo con una tabla de aleatorización: (a) un grupo de control de vehículo (n = 4), a las que se inyectó una disolución de suero salino –BSA 0,02 % (peso/volumen); (b) un grupo intoxicado con estreptozotocina (STZ) (n = 10) a las que se inyectó una disolución estéril de suero salino –BSA 0,02 %; (c) 4 grupos intoxicados con STZ (n = 10) tratados, que consistían en animales que recibían 3 veces por semana inyecciones subcutáneas (SC) del compuesto de IL-6 en 4 dosis diferentes: 1, 3, 10, 30 µg/kg; (d) un grupo intoxicado con STZ, tratado (n = 10), que consistía en animales que recibían inyecciones IP del compuesto IL-6 en dosis de 10 µg/kg.

Los animales fueron alojados en grupos (2 animales por jaula) y se mantuvieron en una habitación con temperatura controlada (21-22 °C) y con un ciclo invertido de luz-oscuridad (12 h/12 h) con comida y agua disponibles *ad libitum*.

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con los requisitos institucionales para el tratamiento de los animales.

Estudio C

5 Se distribuyeron ratas macho Sprague Dawley de seis semanas de edad (Janvier, Le Genest-St-Isle, Francia) en 6 grupos experimentales de acuerdo con una tabla de aleatorización: (a) un grupo de control de vehículo (n = 4), a las que se inyectó una disolución de suero salino –BSA 0,02 % (peso/volumen); (b) un grupo intoxicado con estreptozotocina (STZ) (n = 10) a las que se inyectó una disolución estéril de suero salino –BSA 0,02 %; (c) 4 grupos intoxicados con STZ (n = 10) tratados, que consistían en animales que recibían una vez a la semana inyecciones SC del compuesto de IL-6 en 4 dosis diferentes: 1, 3, 10, 30 µg/kg.

10 Los animales fueron alojados en grupos (2 animales por jaula) y se mantuvieron en una habitación con temperatura controlada (21-22 °C) y con un ciclo invertido de luz-oscuridad (12 h/12 h) con comida y agua disponibles *ad libitum*. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con los requisitos institucionales para el tratamiento de los animales.

Inducción de la diabetes y tratamiento farmacológico

20 Se indujo la diabetes mediante inyección de una disolución tamponada de estreptozotocina (Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, Francia) en la vena safena magna izquierda despojada quirúrgicamente, a una dosis de 55 mg/kg de peso del cuerpo. El medicamento se disolvió inmediatamente antes de la inyección en un tampón citrato de 0,1 mol/l de pH 4,5. El día de la inyección de la STZ se consideró el día (D) 0.

25 Una semana más tarde, en el D 10, se determinó la glucemia en cada uno de los animales utilizando un glucómetro (Glucotrend test, Roche, Mannheim, Alemania) con sangre de la vena de la cola. Los animales que presentaban un valor por debajo de 260 mg/dl se excluyeron del estudio. La glucemia se comprobó de nuevo el D 40, al final del experimento.

El tratamiento (vehículo e IL-6) se realizó todos los días desde el D 11 al D 40.

Planificación de los experimentos

30 Todos los días se registraron los pesos corporales y la tasa de supervivencia.

Los ensayos de sacudida de la cola y de electromiografía (EMG) se realizaron una vez a la semana, de acuerdo con la siguiente planificación:

35 D -7 : línea base (sacudida de la cola, actividad locomotora y EMG)
 D 0 : inducción de la diabetes mediante inyección de STZ
 D 10 : medida de la glucemia
 D 11 : comienzo del tratamiento (IL-6)
 40 D 24 : ensayo de sacudida de la cola
 D 25 : actividad locomotora en campo abierto (OF, por las siglas en inglés)
 D 26 : ensayo EMG
 D 38 : ensayo de sacudida de la cola
 D 39 : actividad locomotora en OF
 45 D 40 : control de glucemia, ensayo EMG, eliminación del nervio ciático

Ensayo de sensibilidad: sacudida de la cola

50 La cola de la rata se colocó bajo una lámpara controlada por un disparador como fuente de calor (Bioseb, París, Francia). Se registró la latencia antes de que la rata sacudiera su cola para separarla de la fuente de calor. Una alteración sensorial aumenta la latencia de la sacudida. Se llevaron a cabo dos ensayos y se calculó el valor medio que es el que se guardó como valor característico.

Actividad locomotora en campo abierto

55 El animal se colocó en un campo abierto (OF) de plexiglás (80 x 80 x 40 cm). El suelo se dividió en 16 cuadrados iguales. Para cada animal, se registró la actividad locomotora espontánea y el número de levantamientos sobre las patas traseras durante un período de 10 minutos.

Electromiografía

60 Se realizaron registros electrofisiológicos utilizando un electromiógrafo (EMG) Neuromatic 2000M (Dantec, Les Ulis, Francia). Se anestesiaron las ratas mediante una inyección intraperitoneal de 60 mg/kg de clorhidrato de ketamina (Imalgene 500®, Rhône Mérieux, Lyon, Francia). Se mantuvo la temperatura normal del cuerpo a 30 °C con una lámpara de calentamiento y se controló con un termómetro de contacto (Quick, Bioblock Scientific, Illkirch, Francia) colocado en la superficie de la cola.

65 El potencial de acción muscular compuesto (CMAP) se registró en el músculo gastrocnemio después de estimulación del nervio ciático. En la pata trasera se colocaron un electrodo de referencia y una aguja activa. Una

aguja de tierra se insertó en la parte baja de la espalda de la rata. Se estimuló el nervio ciático con un único pulso de 0,2 ns a una intensidad supramáxima. Se registró la velocidad de la onda motora expresada en ms.

5 También se registró la velocidad de conducción del nervio sensorial (SNCV). Los electrodos de la piel de la cola se colocaron como sigue: una aguja de referencia se insertó en la base de la cola y otra aguja ánodo se colocó separada 30 mm de la aguja de referencia hacia el extremo de la cola. Entre las agujas ánodo y de referencia se insertó un electrodo aguja de tierra. Se estimuló el nervio caudal con una serie de 20 pulsos (durante 0,2 ms) a una intensidad de 12,8 mA. La velocidad se expresó en m/s.

10 *Análisis morfométrico*

Al final del estudio (D 40) se llevó a cabo un análisis morfométrico. Se anestesiaron los animales con una inyección IP de 100 mg/kg de Imalgene 500 ®. Se extirpó un segmento de 5 mm del nervio ciático para análisis histológico. El tejido se fijó durante la noche con disolución de glutaraldehído al 4 % (Sigma, L'Isle d'Abeau-Chesnes, Francia) en disolución de tampón fosfato (pH = 7,4) y se mantuvo en sacarosa al 30 % a + 4 °C hasta su uso. La muestra de nervio se fijó en disolución de tetraóxido de osmio al 2 % (Sigma, L'Isle d'Abeau-Chesnes, Francia) en disolución de tampón fosfato durante 2 h, se deshidrató en disoluciones de alcohol diluidas en serie y se incrustó en resina Epon. Los tejidos incrustados se colocaron entonces a + 70 °C durante los 3 días de polimerización. Con un micrótopo se cortaron secciones transversales de 1,5 µm, se tiñeron con una disolución de azul de toluidina al 1 % (Sigma, L'Isle d'Abeau-Chesnes, Francia) durante 2 minutos, se deshidrataron y se montaron en medio de montaje Eukitt. Se examinaron veinte secciones por muestra utilizando un microscopio óptico (Nikon, Yokio, Japón) y 6 cortes escogidos al azar se analizaron utilizando un software de análisis de imágenes digital semiautomático (Biocom, Francia). Por cada corte se estudiaron dos campos escogidos al azar. Se calcularon los siguientes parámetros: (a) diámetro de la fibra; (b) diámetro del axón; (c) espesor de la mielina (véase más adelante).

25 Para contar el número total de fibras por sección del nervio, se escogieron al azar 3 láminas o cortes por muestra y se analizaron 2 campos por cada lámina.

Análisis de los datos

30 El análisis de los datos se realizó utilizando el análisis de la varianza de un factor o de medida repetida (ANOVA) y el ANOVA simple. Se utilizó el test de Dunnett cuando el test anova indicaba una diferencia significativa. No se realizaron análisis retrospectivos ("post-hoc"). Se fijó el nivel de significación a $p < 0,05$. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (e.e.m).

Resultados

35 Estudio A

Peso de los animales

Como se ilustra en la figura 11, se detectó en este estudio una diferencia entre grupos significativa en la evolución del peso corporal [$f(5, 185) = 9,20$ y $p < 0,001$; ANOVA de medidas repetidas]. Desde D 5 a D 40, los animales intoxicados con STZ / tratados con IL-6 presentaron una disminución significativa en el peso corporal ($p < 0,05$; ANOVA simple y $p < 0,05$ control frente a STZ; control frente a STZ + IL-6; test de Dunnett).

Los animales diabéticos tratados con IL-6 con una dosis de 10 µg/kg presentaron un peso corporal significativamente más alto que el de los animales con otras dosis de IL-6 [$f(4, 148) = 2,93$ y $p < 0,001$; ANOVA de medidas repetidas].

Glucemia

La figura 12 muestra que en el día 10 los animales de control presentaban un valor de glucemia igual a 120 mg/dl. Por otro lado, las ratas intoxicadas con STZ presentaban una concentración de glucosa en plasma más alta de 260 mg/dl y fueron consideradas diabéticas.

50 Se notó que las ratas intoxicadas con STZ eran todavía diabéticas el día 41 (la rata nº 2 del grupo STZ / IL-6 (10 µg/kg) ha sido eliminada del estudio debido a que su glucemia estaba por debajo de 260 mg/dl).

Ensayo de sensibilidad: sacudida de la cola

55 No hubo diferencias significativas entre grupo en la evolución de los rendimientos en el test de sacudida de la cola [$F(5, 10) = 1,81$ y $p < 0,072$; ANOVA de medidas repetidas] (figura 13). No obstante, la latencia antes de que las ratas sacudieran su cola para retirarla del calor aumentó en los animales diabéticos no tratados y tratados con IL-6 a dosis más altas. En el D 38, el tiempo de reacción no aumentó en los animales tratados con IL-6 a dosis de 1 y 3 µg/kg. de hecho, no se encontró diferencia significativa entre estos grupos ($p > 0,05$; test de Dunnett).

Actividad locomotora en campo abierto (OF)

60 Como se muestra en las figuras 14A y 14B, hubo una diferencia significativa en el estudio entre los grupos en el número de cuadrados cruzados y de levantamientos sobre las patas traseras [respectivamente, $F(5,10) = 5,99$ con $p < 0,001$ y $F(5,10) = 4,22$ con $p < 0,001$; ANOVA de medidas repetidas]. Los días 25 y 40, los animales diabéticos, tratados o no, mostraron una actividad locomotora más baja que se caracterizó por una disminución significativa del número de cuadrados cruzados y de levantamientos sobre las patas traseras (control frente a STZ / IL-6 $p < 0,01$;

test de Dunnett).

Conviene señalar que los animales tratados con las dosis de 1 y 3 µg/kg presentaban una actividad locomotora mayor que las ratas STZ / vehículo.

5 *Medidas electrofisiológicas*
Latencia del potencial de acción muscular compuesto
 Hubo una diferencia significativa entre los grupos en la latencia del CMAP a lo largo del estudio [F (5,10) = 5,71 y p < 0,001; ANOVA de medidas repetidas]. La latencia aumentó de manera significativa en las ratas diabéticas sin tratar (en los días 26 y 41 p < 0,01; ANOVA simple). Además, este aumento fue menos importante en cada uno de los grupos tratados con IL-6 (figura 15).

Los días 26 y 41, cada uno de los grupos STZ / tratados con IL-6 presentó una latencia CMAP significativamente más corta que la latencia CMAP del grupo STZ / vehículo (p = 0,05, test de Dunnett).

15 *Velocidad de conducción del nervio sensorial*
 Se notó una diferencia significativa en la SNCV entre los grupos en el estudio [F (5,10) = 3,78 y p < 0,001; ANOVA de medidas repetidas] (figura 16). Las ratas diabéticas presentaron una disminución significativa de la SNCV (los días 26 y 41: p < 0,01; ANOVA simple) en contraste con el grupo control / vehículo.

20 Los días 26 y 41, todos los animales tratados con IL-6 presentaron una diferencia significativa con el grupo STZ / vehículo (p < 0,05; test de Dunnett). Además, el día 41 no se observó diferencia significativa entre el grupo control / vehículo y los grupos tratados con dosis de 3 y 30 µg/kg de IL-6 (respectivamente, p = 0,054 y p = 0,184; test de Dunnett) mientras que se vio una diferencia significativa entre todos los otros grupos.

25 *Análisis morfométrico*
Diámetro de la fibra
 Como se muestra en la figura 17, se vio una diferencia significativa entre grupos en el diámetro de la fibra (p < 0,001; ANOVA simple). Se observó una disminución en el diámetro de la fibra en ratas diabéticas en comparación con el grupo control / vehículo (p < 0,001; test de Dunnett). Además, el tratamiento con IL-6 previene de manera significativa la disminución del diámetro, para todas las dosis ensayadas (STZ / vehículo frente a STZ / tratados con IL-6: p < 0,05; test de Dunnett).

35 *Diámetro del axón*
 Hubo una diferencia significativa entre grupos en el diámetro del axón (p < 0,001; ANOVA simple) (figura 18). El grupo STZ / vehículo presentó una disminución significativa del diámetro del axón (control / vehículo frente a STZ / vehículo: p < 0,001; test de Dunnett). Los animales tratados con IL-6 a todas las dosis presentaban un diámetro del axón significativamente más alto que las ratas diabéticas no tratadas (p < 0,05; test de Dunnett).

40 *Espesor de la mielina*
 Se encontró una diferencia entre grupos significativa en el espesor de la mielina (p < 0,001; ANOVA simple) (figura 19). Se observó una disminución significativa del espesor de la mielina en ratas diabéticas en comparación con los animales del grupo control / vehículo (p < 0,001; test de Dunnett). Además, esta disminución era significativamente menos importante en los grupos tratados con IL-6 (p < 0,05; test de Dunnett).

45 *Porcentaje de fibras degeneradas*
 Como se muestra en las figuras 20 y 21, las ratas diabéticas y no tratadas mostraron un descenso significativo de fibras mielinizadas (p < 0,001; ANOVA simple). El tratamiento diario con IL-6 con dosis de 3, 10 y 30 µg/kg disminuyó de manera significativa el porcentaje de fibras degeneradas en comparación con el grupo STZ / vehículo (p < 0,001; test de Dunnett).

50 *Estudio B*
Peso de los animales
 Hubo una diferencia significativa entre grupos en la evolución del peso corporal [F(6, 168) = 9,24 y p < 0,001; ANOVA de medidas repetidas] (figura 22). Del D 5 al D 40, los animales intoxicados con STZ presentaron una disminución significativa en el peso corporal (p < 0,05; ANOVA simple y p < 0,001 grupos control / vehículo frente a STZ y control / vehículo frente a intoxicados con STZ y tratados con IL-6; test de Dunnett).

No se encontraron diferencias significativas en el peso corporal del D 5 al D 40 entre los grupos STZ tratados con IL-6 [F(5,125) = 1,08 y p = 0,26; ANOVA de medidas repetidas].

60 *Glucemia*
 Como se ilustra en la figura 23, el día 10 las ratas intoxicadas con STZ presentaban una concentración de glucosa en plasma mayor de 260 mg/dl mientras que los animales de control presentaban un valor de glucemia alrededor de 100 mg/dl.

65 Además, el día 40 las ratas intoxicadas con STZ todavía eran diabéticas; de hecho su glucemia era mayor de 500

mg/dl.

Ensayo de sensibilidad: sacudida de la cola

5 Hubo una diferencia significativa entre grupos en la evolución de los rendimientos en el ensayo de la sacudida de la cola [F(6, 12) = 2,13 y p = 0,02; ANOVA de medidas repetidas] (figura 24). Los días 24 y 38 las ratas diabéticas y no tratadas presentaban un aumento significativo en el tiempo de reacción en comparación con los grupos control / vehículo y STZ / tratadas con IL-6 (p < 0,05; test de Dunnett).

Además, el tiempo de reacción aumentó menos en los animales tratados con IL-6 a dosis de 10 y 30 µg/kg.

Actividad locomotora en campo abierto (OF)

10 Como se muestra en las figuras 25A y 25B, hubo en el estudio una diferencia significativa entre grupos en el número de cuadrados cruzados y de levantamientos sobre las patas traseras. Los días 25 y 40, los animales diabéticos, tratados o no, mostraron una actividad locomotora más baja que se caracterizó por una disminución significativa del número de cuadrados cruzados y de levantamientos sobre las patas traseras (control frente a STZ / vehículo y control frente a STZ / IL-6 p < 0,05; test de Dunnett).

Medidas electrofisiológicas

Latencia del potencial de acción muscular compuesto

20 Como se muestra en la figura 26, hubo una diferencia significativa entre grupos en la latencia del CMAP en el estudio [F(6, 12) = 3,97 y p < 0,001; ANOVA de medidas repetidas]. Los días 26 y 40 se observó un aumento significativo de la latencia en las ratas diabéticas no tratadas y en los animales tratados con IL-6 a dosis bajas (p < 0,001; ANOVA simple). Además, no se encontró diferencia significativa entre los grupos control / vehículo y STZ /tratados con IL-6 (10 y 30 µg/kg) (p > 0,05; ANOVA simple).

Velocidad de conducción del nervio sensorial

25 Hubo una diferencia significativa entre grupos en la medida de la SNCV en el estudio [F(6, 12) = 3,38 y p < 0,001; ANOVA de medidas repetidas]. (figura 27). Desde el día 26, las ratas diabéticas y tratadas o no presentaron una disminución de la SNCV (D 26: p < 0,001 y D 40: p < 0,001; ANOVA simple).

30 El día 26, los animales de los grupos control / vehículo y STZ / tratados con IL-6 presentaron una SNCV significativamente más alta que la de las ratas STZ / vehículo (p < 0,05; test de Dunnett).

35 El día 40, las ratas tratadas con IL-6 a dosis más altas presentaron valores de SNCV mayores que los del grupo STZ / vehículo.

Análisis morfométrico

Diámetro de la fibra

40 Como se muestra en la figura 28, se notó una diferencia significativa entre grupos en el diámetro de la fibra (p = 0,045; ANOVA simple). Los animales intoxicados con STZ presentaron una disminución significativa del diámetro de la fibra en comparación con las ratas del grupo control / vehículo (p < 0,05; test de Dunnett). El tratamiento diario con IL-6 por vía IP previno esta disminución del diámetro de la fibra (STZ / vehículo frente a STZ / IL-6 por vía IP: p = 0,026; test de Dunnett)

Diámetro del axón

45 Hubo una diferencia significativa entre grupos en el diámetro del axón (p = 0,034; ANOVA simple) (figura 29). Se observó una disminución significativa del diámetro del axón en animales intoxicados con STZ (p < 0,05; test de Dunnett). Las ratas tratadas con IL-6 con una dosis de 10 µg/kg por la vía IP presentaron una diferencia significativa con los animales STZ / vehículo (p = 0,045; test de Dunnett).

Espesor de la mielina

50 Se encontró una diferencia significativa entre grupos en el espesor de la mielina (p = 0,05; ANOVA simple) (figura 30). Los animales intoxicados con STZ presentaron una disminución significativa del espesor de la mielina (p < 0,05; test de Dunnett). Un tratamiento diario con IL-6 por vía IP prevenía de esta disminución del espesor de la mielina (STZ / vehículo frente a STZ / IL-6 por vía IP: p < 0,005; test de Dunnett).

Porcentaje de fibras degeneradas

60 Como se ilustra en las figuras 31 y 32, se encontró una diferencia significativa entre grupos en el porcentaje de fibras degeneradas (p < 0,001; ANOVA simple). Este porcentaje era significativamente más alto en el grupo STZ / vehículo que en el grupo control / vehículo (p < 0,001; test de Dunnett). El porcentaje disminuyó de manera significativa en los animales tratados con IL-6 (STZ / vehículo frente a STZ / IL-6: p < 0,001; test de Dunnett).

Estudio C

Peso de los animales

65 Como se ilustra en la figura 33, se observó en este estudio una diferencia entre grupos significativa en la evolución del peso corporal [F(5, 145) = 15,46 y p < 0,001; ANOVA de medidas repetidas]. Del día 5 al día 40, los animales

intoxicados con STZ presentaron una disminución significativa en el peso corporal ($p < 0,001$; ANOVA simple y $p < 0,001$ control / vehículo frente a STZ, control / vehículo frente a grupos intoxicados con STZ y tratados con IL-6; test de Dunnett).

- 5 Además, los animales tratados con IL-6 a la dosis de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ presentaron una disminución de peso corporal significativamente menos importante que los animales de los otros grupos tratados con IL-6 [$F(4, 104) = 2,17$ y $p < 0,001$; ANOVA de medidas repetidas].

Glucemia

- 10 La figura 34 muestra que el grupo control / vehículo presentaba un valor de glucemia inferior a 120 mg/dl los días 10 y 40. Por otra parte, las ratas intoxicadas con STZ presentaron una concentración de glucosa en plasma superior a 260 mg/dl, de forma que fueron consideradas diabéticas los días 10 y 40.

Ensayo de sensibilidad: sacudida de la cola

- 15 Hubo una diferencia significativa entre grupos en el tiempo de reacción durante el estudio [$F(5,10) = 2,30$ y $p = 0,02$; ANOVA de medidas repetidas] (figura 35). La latencia antes de que las ratas sacudieran su cola para separarla del calor aumentó de manera significativa en los animales STZ / vehículo (los días 24 y 38: $p < 0,005$; ANOVA simple). El día 24 no había diferencia significativa en la latencia de reacción entre los grupos control /vehículo y STZ / IL-6 (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ($p = 0,31$; test de Dunnett). El día 38, las ratas tratadas con IL-6 a dosis de 10 y 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ presentaron un tiempo de reacción similar al del control ($p = 0,3$; test de Dunnett).

Actividad locomotora en campo abierto (OF)

- 25 Hubo una diferencia significativa entre grupos en el número de cuadrados cruzados y en el de levantamiento de las patas traseras en el estudio (respectivamente [$F(5,10) =$ con $p <$ y $F(5,10) = 2,15$ con $p = 0,028$; ANOVA de medidas repetidas] (figuras 36A y 36B). Los días 25 y 39 (figuras 36A y 36B), los animales intoxicados con STZ, tratados o no, presentaron una actividad locomotora significativamente más baja que la de las ratas de control ($p < 0,05$; test de Dunnett). Esta diferencia se notó en el número medio de cuadrados cruzados y en el número de levantamientos de las patas traseras en todo el período en el que se tomaron registros. No obstante, el grupo de animales tratados con IL-6 con la dosis de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ presentaba una actividad locomotora mayor que el grupo STZ / vehículo.

Medidas electrofisiológicas

Latencia del potencial de acción muscular compuesto

- 35 No se notó en el estudio diferencia significativa entre los grupos en la latencia del CMAP [$F(5,10) = 1,33$ y $p = 0,23$; ANOVA de medidas repetidas] (figura 37). Sin embargo, se observó una diferencia significativa entre los grupos los días 26 y 40 ($p < 0,05$; ANOVA simple). Las ratas intoxicadas con STZ presentaron una latencia aumentada en comparación con el grupo control / vehículo. Además, este aumento era menos importante en los grupos tratados con IL-6 a dosis altas; de hecho, se notó una diferencia significativa entre los grupos STZ / vehículo y STZ / IL-6 (el día 26: STZ / vehículo frente a STZ / IL6 a 3, 10, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$: $p < 0,005$ y el día 40: STZ / vehículo frente a STZ / IL6 a 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$: $p < 0,005$; test de Dunnett).

Velocidad de conducción del nervio sensorial

- 45 Como se ilustra en la figura 38, se notó en el estudio una diferencia entre grupos significativa en la velocidad de conducción del nervio sensorial [$F(5,10) = 2,18$ y $p = 0,025$; ANOVA de medidas repetidas]. Se observó una disminución significativa de la velocidad en animales intoxicados con STZ (grupos control / vehículo frente a STZ / vehículo y STZ / IL-6: $p < 0,05$; test de Dunnett). Además, el tratamiento con IL-6 a dosis de 10 y 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ condujo a pérdidas de velocidad menos importantes en los animales diabéticos (el día 26, STZ / IL-6 a dosis de 10 y 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ frente a STZ / vehículo: $p < 0,05$; test de Dunnett).

50 *Análisis morfométrico*

Diámetro de la fibra

- 55 Como se muestra en la figura 39, se notó una diferencia significativa entre grupos en el diámetro de la fibra ($p < 0,001$; ANOVA simple). Los animales intoxicados con STZ presentaron una disminución significativa del diámetro de la fibra en comparación con las ratas del grupo control / vehículo ($p < 0,005$; test de Dunnett). Los animales tratados con IL-6 (a todas las dosis) presentaron un diámetro de fibra significativamente más alto que las ratas del grupo STZ / vehículo ($p < 0,05$; test de Dunnett).

Diámetro del axón

- 60 Hubo una diferencia significativa entre grupos en el diámetro del axón ($p < 0,001$; ANOVA simple) (figura 40). Se observó una disminución significativa del diámetro del axón en los animales intoxicados con STZ ($p < 0,01$; test de Dunnett). Las ratas tratadas con IL-6 a dosis de 1, 3, 10 y 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ presentaron una diferencia significativa respecto de los animales del grupo STZ / vehículo ($p < 0,05$; test de Dunnett).

Espesor de la mielina

- 65 Se encontró una diferencia significativa entre grupos en el espesor de la mielina ($p < 0,001$; ANOVA simple) (figura 41). Los animales intoxicados con STZ presentaron una disminución significativa del espesor de la mielina ($p <$

0,001; test de Dunnett). Un tratamiento diario subcutáneo con IL-6 previno esta disminución del espesor de la mielina (STZ / vehículo frente a STZ / IL-6 a 1 y 30 µg/kg; $p < 0,005$; test de Dunnett).

Porcentaje de fibras degeneradas

5 Como se ilustra en las figuras 42 y 43, se encontró una diferencia significativa entre grupos en el porcentaje de fibras mielinizadas funcionales ($p < 0,001$; ANOVA simple). Este porcentaje fue significativamente más bajo en el grupo STZ / vehículo que en el grupo control / vehículo ($p < 0,001$; test de Dunnett). El porcentaje aumentó de manera significativa en los animales tratados con IL-6 a dosis de 3, 10 y 30 µg/kg ($p < 0,001$; test de Dunnett).

10 *Conclusión*

En este estudio, se han usado como modelo de neuropatía inducida animales intoxicados con estreptozotocina y que desarrollaron diabetes varios días más tarde.

15 Los animales diabéticos fueron tratados de forma continuada con diferentes dosis de IL-6 (1, 3, 10 y 30 µg/kg) durante 30 días. El tratamiento se administró por vía subcutánea cada día (estudio A), 3 veces por semana (estudio B) y una vez por semana (estudio C) empezando 10 días después de la inducción hasta el sacrificio del animal 40 días después de la inducción con STZ. Estos tratamientos podrían considerarse como un tratamiento curativo en el que se ha administrado IL-6 después de los primeros daños moleculares provocados por una hiperglucemia prolongada.

20 El presente protocolo muestra que un tratamiento de 30 días con IL-6, cualquiera que sea el programa de administración, induce una neuroprotección contra la neuropatía diabética. Los análisis de comportamiento con los ensayos de sacudida de la cola y EMG (velocidades sensorial y motora) muestran el efecto neuroprotector de la IL-6 administrada por vía subcutánea.

25 El efecto neuroprotector se enfoca sobre las fibras sensoriales así como sobre las fibras motoras (la velocidad CMAP no se alteró cuando los animales fueron tratados con el compuesto de IL-6). El compuesto previene la pérdida de la vaina de mielina y la degeneración de las fibras.

30 En comparación con un tratamiento IP diario (véase el estudio previo realizado en Neurofit, agosto de 2001), la IL-6 administrada diariamente por vía subcutánea parece ser tan eficaz como el tratamiento intraperitoneal (véase ejemplo 2) a todas las dosis ensayadas. Además, una dosis más baja, caracterizada por la administración de la IL-6 una o tres veces por semana no conduce a una disminución del efecto neuroprotector del compuesto. Parece que el tratamiento de 3 veces por semana presenta el mejor efecto neuroprotector (en especial a 10 y 30 µg/kg) sin ningún efecto secundario en el comportamiento general de los animales intoxicados con STZ.

REFERENCIAS

1. Altschul S F et al, J Mol Biol, 215, 403-410, 1990

40 2. Altschul S F et al, Nucleic Acids Res., 25: 389-3402, 1997

3. Britland ST, Young RT, Sharma AK, and Clarke BF, Diabetes, 39, 898-908. (1990)

4. Brighton, B and Hayden, MR: S Afr Med J.1981 Feb 21; 59(8): 250.

5. Chebath, J., Fischer, D., Kumar, A, Oh, J.W., Kollet, O., Lapldot, T., Fischer, M.,Rose-John, S., Nagler, A., Slavin, S. and Revel, M. Eur. Cytokine Netw. 1997 8,359-365.

45 6. Devereux J et al., Nucleic Acids Res, 12, 387-395, 1984.

7. Emerich, DF, Cain, CK, Greco, C, Saydoff, JA, Hu, ZV, Liu, H, Lindner, MD, Cell Transplant, 1997 May-Jun; 6(3): 249-66.

8 Emerich, D.F., Lindner, M.D., Winn, S.R., Chen, E.-Y., Frydel, B.R. and Kordower, J.H., (1996), J, Neurosci., 16, 5168-5181.

50 9. Emerich DF, Winn SR, Hantraye PM, Peschanski M, Chen EY, Chu Y, McDermott P, Baetge EE, Kordower JH, Nature. 1997 Mar 27; 386(6623):395-9.

10. Emerich DF, Hammang JP, Baetge EE, Winn SR; Exp Neurol. 1994 Nov; 130(1):141 -50.

11. Filscher M, Goldschmlit J, Peschel C, Brakenhoff JP, Kallen KJ, Wollmer A, Grotzinger J, Rose-John S, Nat Biotechnol. 1997 Feb; 15(2):142-5

55 12. Fisher et al., J. Neuroimmunology 119 (2001) 1-9

13. Frei et al., J. Neuroimmunol., 31:147 (1991)

14. Hallmi H, Elsanstein M, Oh J, Revel M and Chebath, J. Eur. Cytokine Netw. 1995, 6: 135-143.
15. Hirano et al, 1986 Nature (London) 234-73 (1986)
16. Hirano T, Matsuda T and Nakajima K., Stem cells 1994, 12:262-277.
17. Hlrota H, Kiyama H, Kishimoto T, Taga T, J Exp Med. 1996 Jun 1;183(6):2627-34.
- 5 18. Ishikawa et al., 1999, Cell Mol Neurobiol. 19,587-96
19. Lin B, Nasir J, Katchman MA, McDonald H, Zeisler J, Goldberg YP, Hayden MR, Genomics. 1995 Feb 10; 25(3):707-15.
20. May et al, Proc Natl Acad Sci USA 83:8957 (1986).
- 21 . Mendel, I., Katz, A., Kozak, N., Ben-Nun, A. and Revel, M. Eur. J. Immunol. 1998 28, 1727-1737.
- 10 22. Murakami M, Hibi M, Nakagawa N, Nakagawa T., Yasukawa K., Yamanishi K., Taga T., Kishimoto T, Science. 1993 Jun 18; 260(5115):1808-10.
23. Novick, D., Shulman, L.M., Chen, L. and Revel, M., Cytokine 1992 4, 6-11 .
24. Novick D, Shulman L.M., Chen, L and Revel M., Cytokine 1992, 4: 6-11.
25. Novick, D., Engelmann, H., Wallach D., Leitner O., Revel M., Rubinstein, M., Journal of Chromatography
- 15 1990.510:331-7.
26. Paonessa G, Graziani R, Deserio A, Savino R, Clapponi L, Lahmm A, Salvati AL,
27. Toniatti C and Ciliberto G. EMBO J. 1995; 14: 1942-1951.
28. Pearson W R, Methods In Enzymology, 183, 63-99,1990
29. Pearson W R and Lipman O J, Proc Nat Acad Sci USA. 85, 2444-2448, 1986
- 20 30. Rakieten. N., Rakieten. M.L., and Nadkarni. M.V., *Studies on the diabetogenic action of streptozotocin*, Cancer Chemother. Rep., 1963, 29, 91 .
- 31 . Rudas B. Streptozotocin. Azmeimittel- Forschung, 22, 830-861 . (1972)
32. Smith and Waterman J Mol Biol, 147,195-197, 1981, Advances In Applied Mathematics, 2,482-489, 1961.
33. Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki ,K. Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T. and Kishimoto, T., Cell,1989
- 25 58, 573-581.
34. Toulmond. S ., Vlge. X., Fage, D. and Benavifdes. J., Neurosci Lett 1992, 144. 49-52.
35. Ward LD, Howlett GJ., Discolo G., Yasukawa K., Hammacher A., Moritz RL and Simpson RJ. High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor and gp130, J. Biol. Chem., 1994, 269: 23286-23289.
- 30 36. Yamada. M .• and Hatanaka. H.: Brain Res 1994, 643, 173-80.
37. Zilberstein et al, EMBO J 5:2529 (1986)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una sustancia que señala a través de la glicoproteína gp130 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la neuropatía diabética, en el que dicha sustancia es:
 - a) la IL-6;
 - b) un fragmento de a) que se une a la gp80 e inicia la señalización a través de la gp130;
 - c) una variante de a) o b) que tiene una identidad de secuencia con a) o b) de al menos 70 % y que inicia la señalización a través de la gp130;
 - 10 d) una variante de a) o b) que está codificada por una secuencia de ADN que se hibrida con el complemento de la secuencia de ADN nativo que codifica a) o b) bajo condiciones moderadamente estrictas y que inicia la señalización a través de la gp130 o
 - e) una sal, proteína de fusión o derivado funcional de a), b), c) o d) que inicia la señalización a través de la gp130, de modo que el derivado funcional se puede preparar a partir de grupos funcionales que aparecen como cadenas laterales sobre los restos o los grupos N- o C-terminales por medios conocidos en la técnica y que permanece aceptable farmacéuticamente en el sentido de que no destruye la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de la IL-6 y que no proporciona propiedades tóxicas a las composiciones que la contienen.
- 20 2. Uso, según la reivindicación 1, en el que la neuropatía diabética es una polineuropatía.
3. Uso, según la reivindicación 1, en el que la neuropatía diabética es una mononeuropatía.
- 25 4. Uso según la reivindicación 1, en el que la IL-6 es IL-6 recombinante.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la sustancia está glicosilada en uno o más sitios.
- 30 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la sustancia no está glicosilada.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la proteína de fusión comprende una inmunoglobulina (Ig) de fusión.
- 35 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el derivado funcional comprende al menos una parte o fracción de la molécula unida a uno o más grupos funcionales que pueden presentarse como una o más cadenas laterales de los restos de aminoácidos.
9. Uso según la reivindicación 8, en el que la fracción molecular es una fracción de polietileno.
- 40 10. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la sustancia que señala a través de la gp130 se usa en una cantidad que varía de aproximadamente 0,1 a 1000 µg/kg o aproximadamente 1 a 500 µg/kg o menos de aproximadamente 100 µg/kg.
- 45 11. Uso según la reivindicación 10, en el que la sustancia que señala a través de la gp130 se usa en una cantidad de aproximadamente 1 µg/kg o 3 µg/kg o 10 µg/kg o 30 µg/kg.
12. Uso según una de las reivindicaciones 1-11, en el que la sustancia que señala a través de la gp130 se administra diariamente.
- 50 13. Uso según una de las reivindicaciones 1-11, en el que la sustancia que señala a través de la gp130 se administra tres veces por semana.
14. Uso según una de las reivindicaciones 1-11, en el que la sustancia que señala a través de la gp130 se administra una vez por semana.
- 55 15. Uso de un vector que comprende la secuencia de codificación para la IL-6 para inducir y/o aumentar la producción endógena de IL-6 en una célula para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la neuropatía diabética.
- 60 16. Uso de una célula que ha sido modificada genéticamente para producir una sustancia según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la neuropatía diabética.
- 65 17. Uso de un vector de expresión que comprende la secuencia de codificación de una sustancia según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la neuropatía diabética.

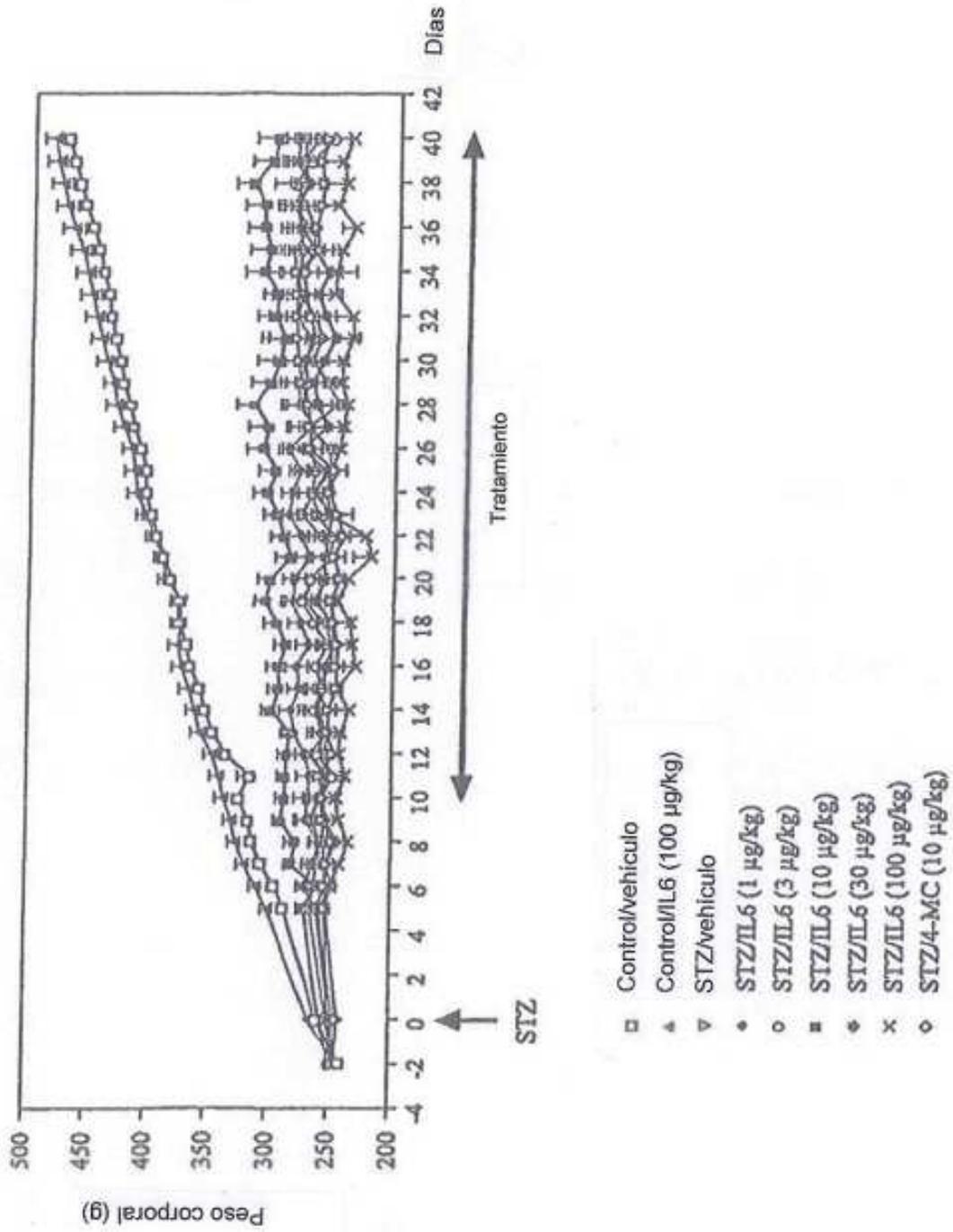
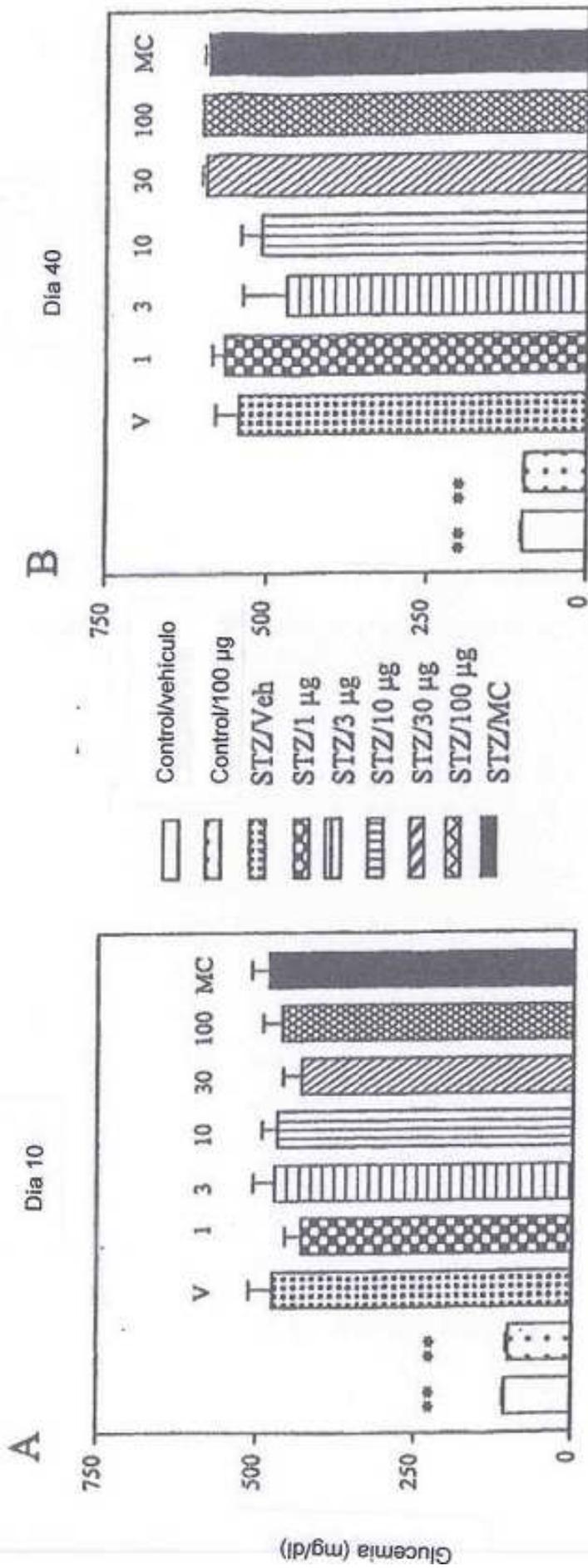


Fig. 1



** p < 0,001 (frente a grupo STZ/Vehículo)

Fig. 2

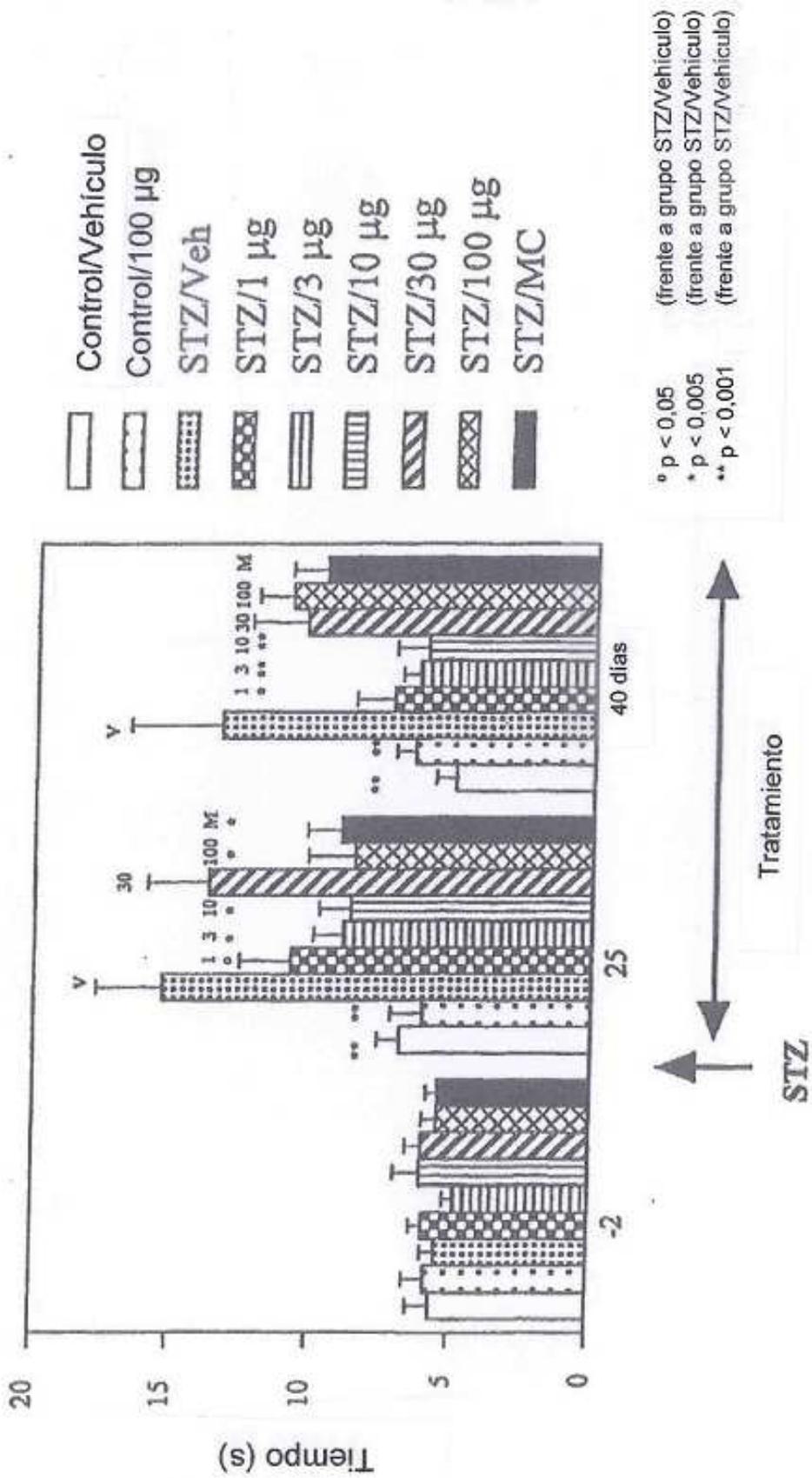


Fig. 3

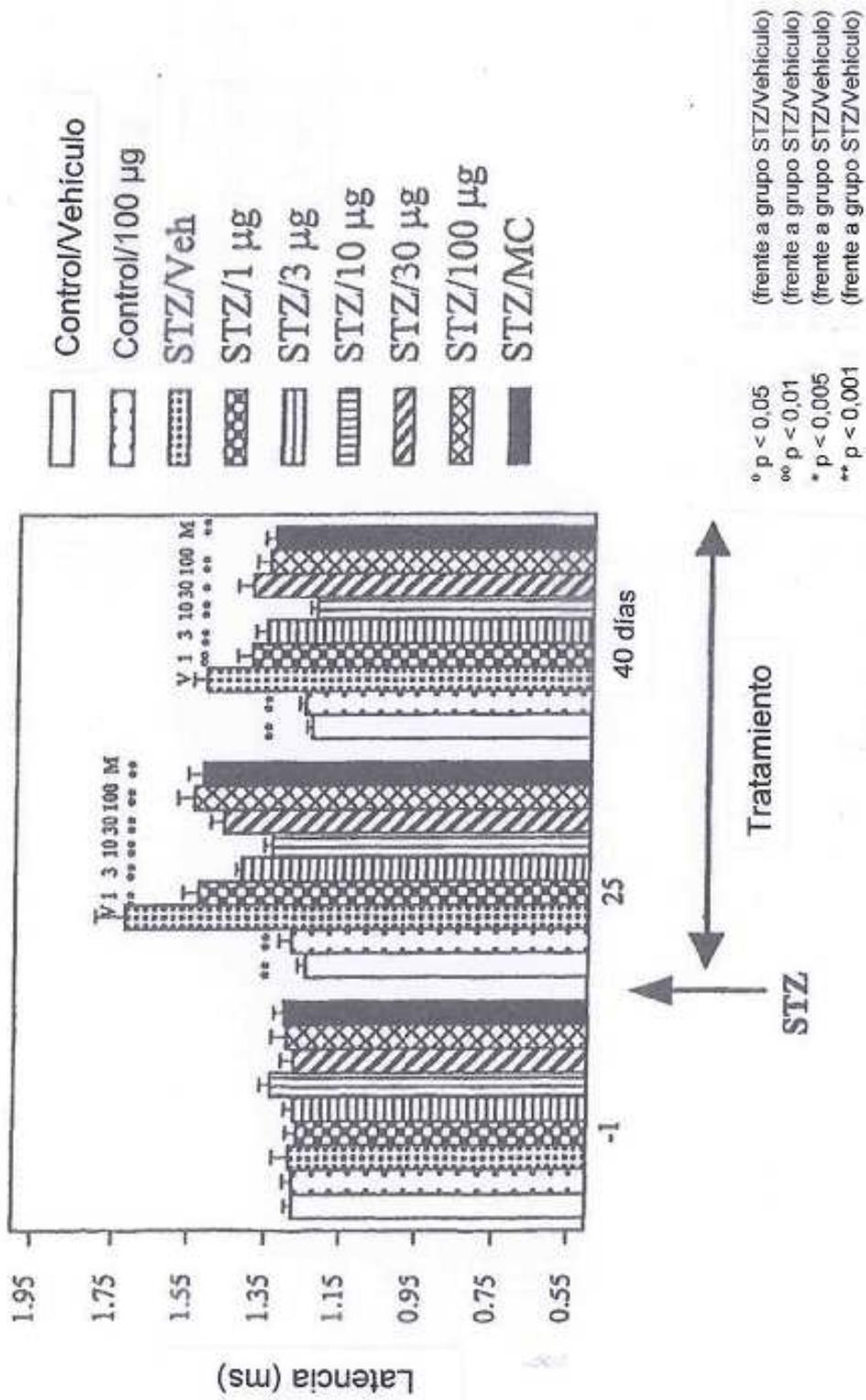


Fig. 4

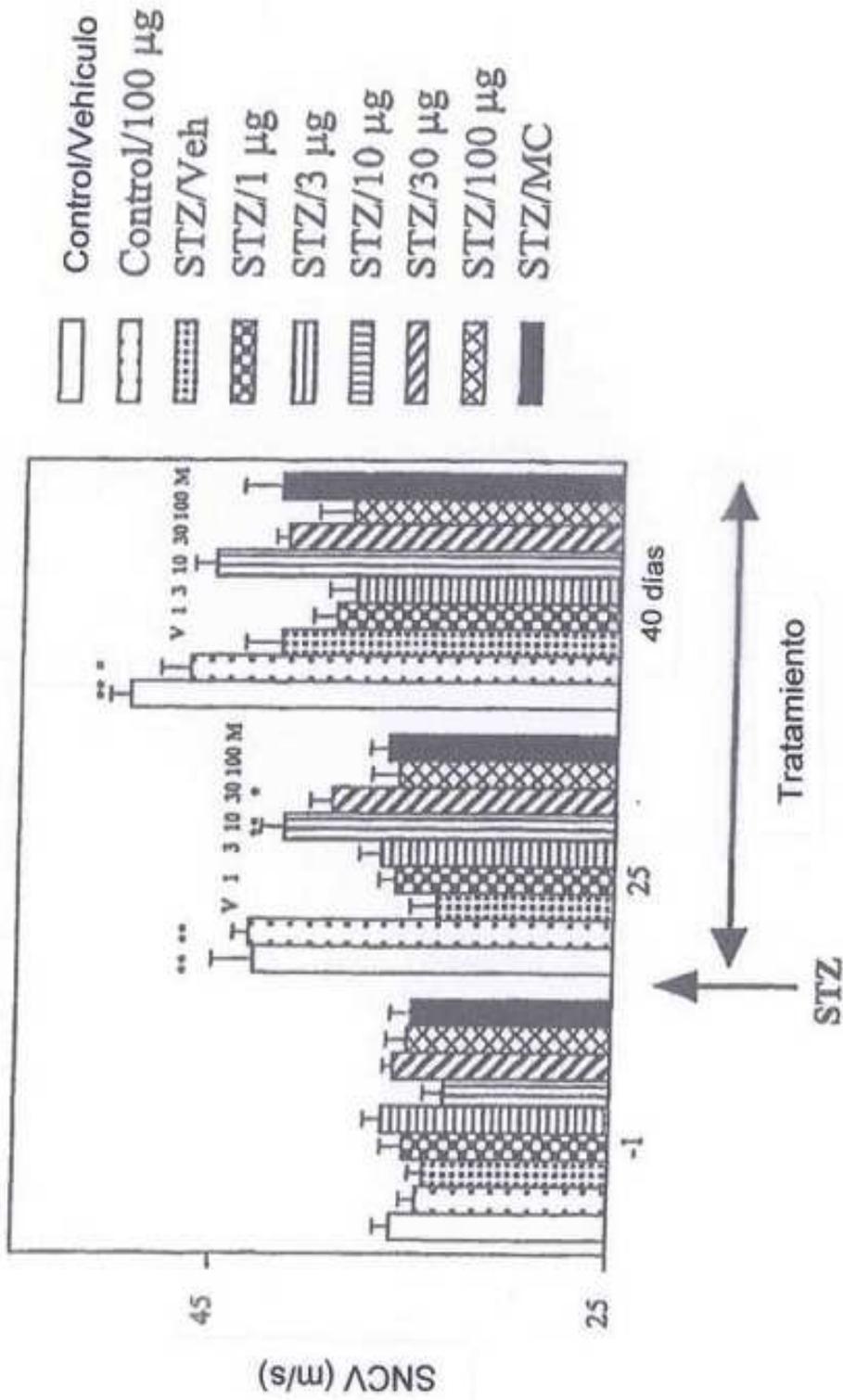


Fig. 5

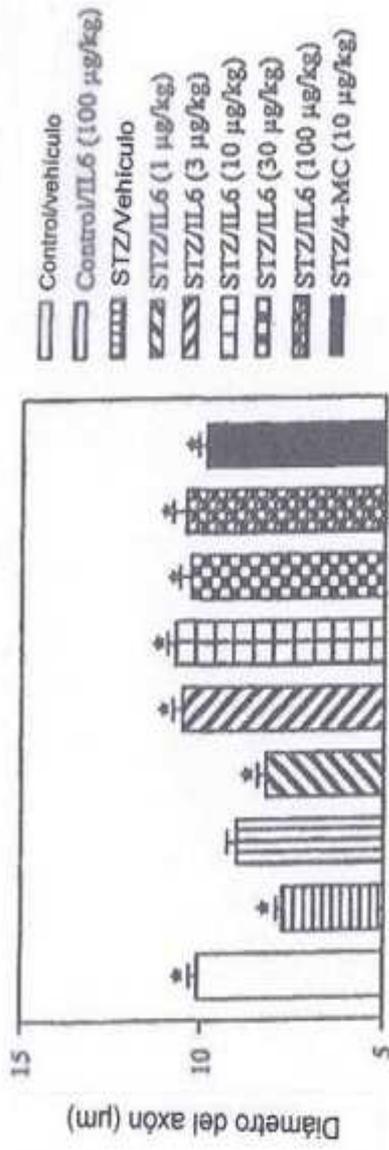


Fig. 6

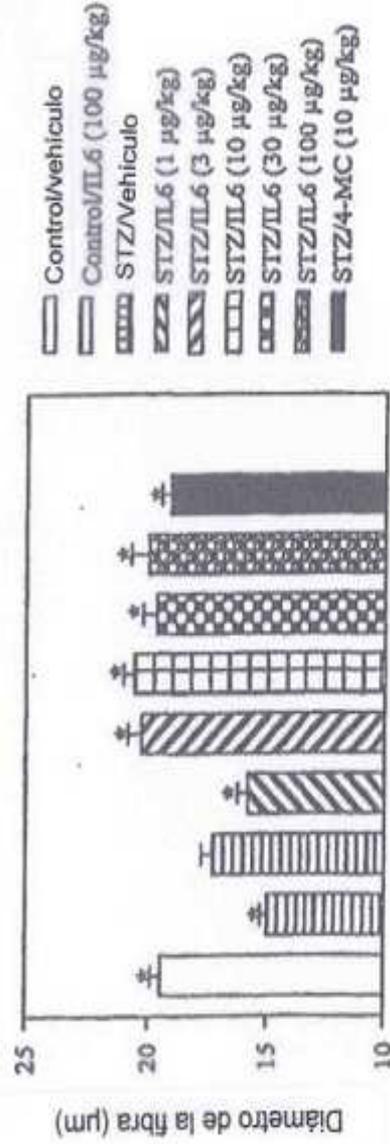


Fig. 7

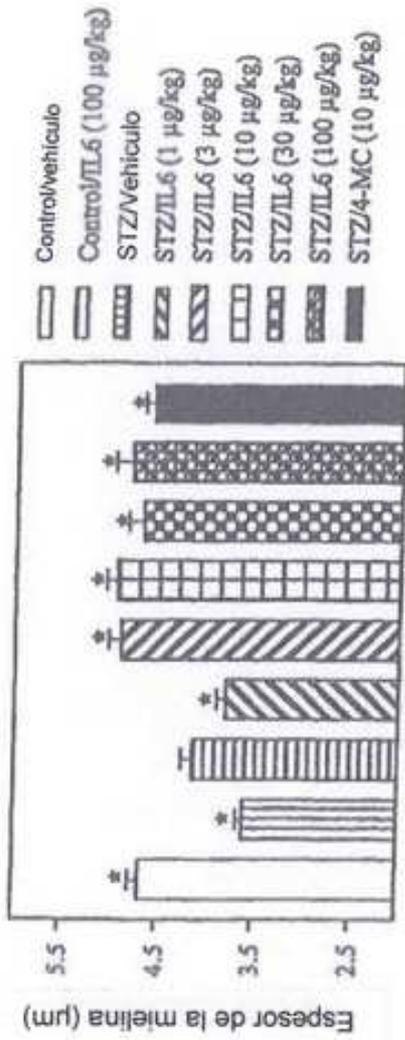


Fig. 8

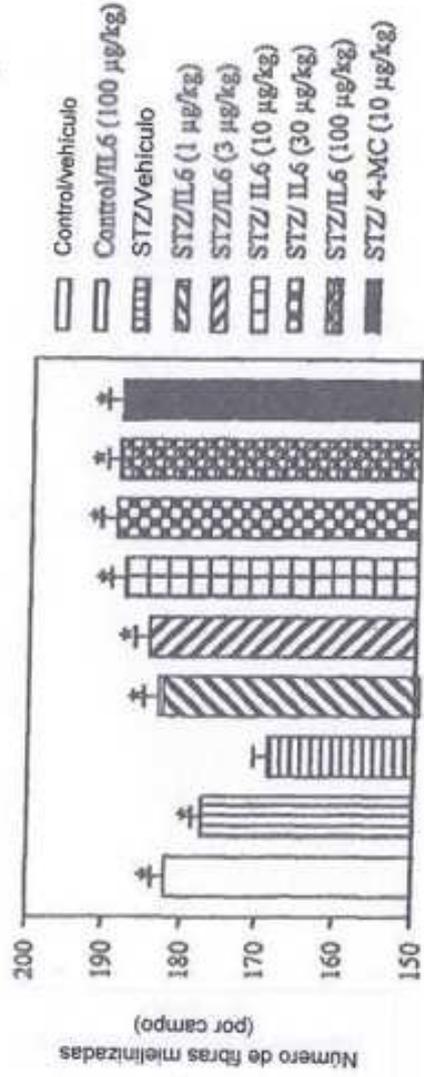


Fig. 9

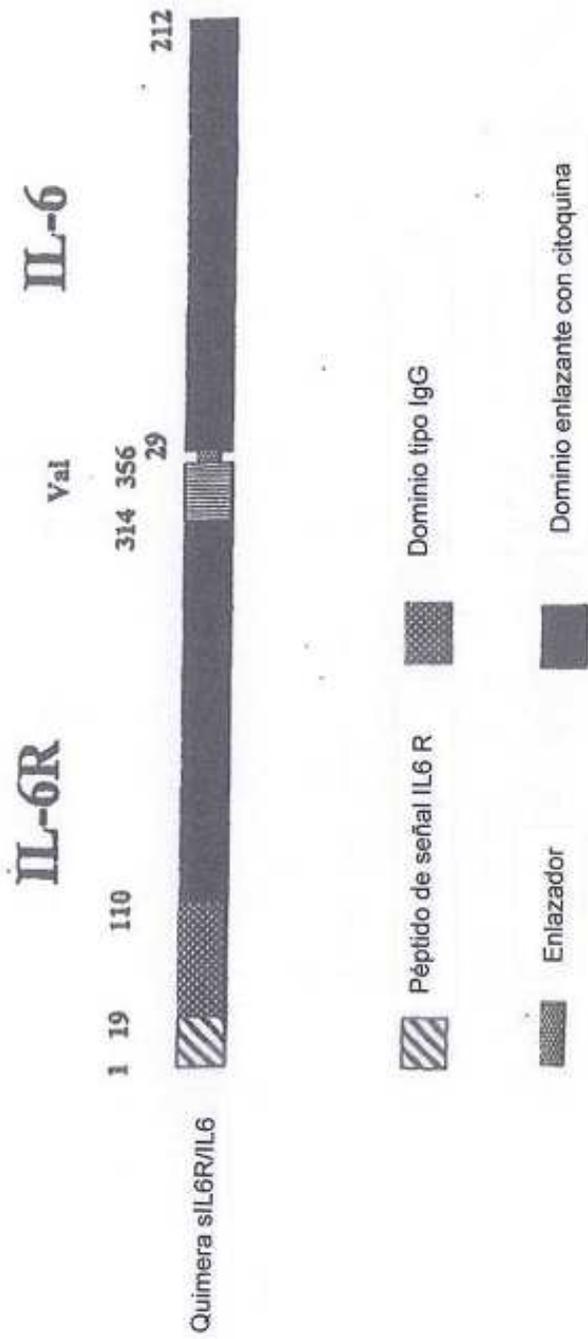


Fig. 10

(Ejemplo para comparación)

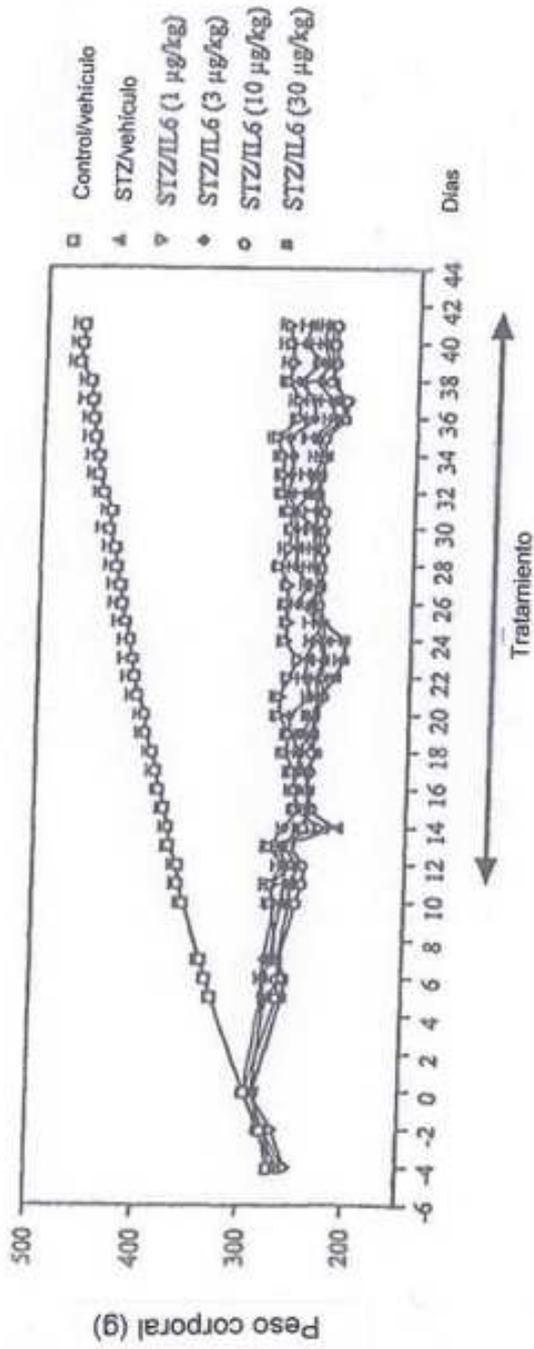


Fig. 11

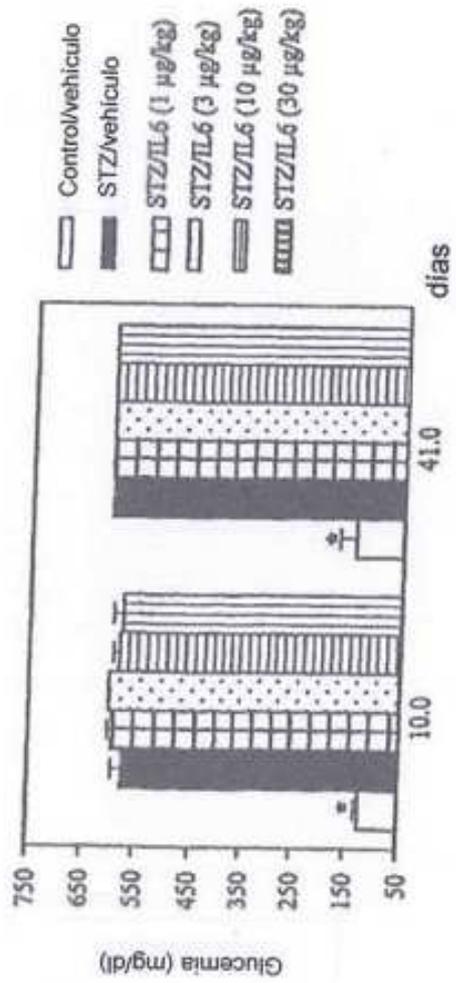


Fig. 12

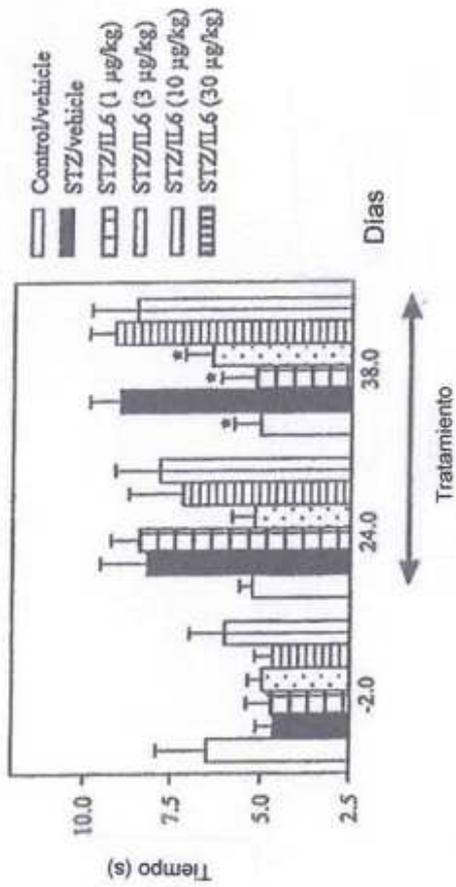


Fig. 13

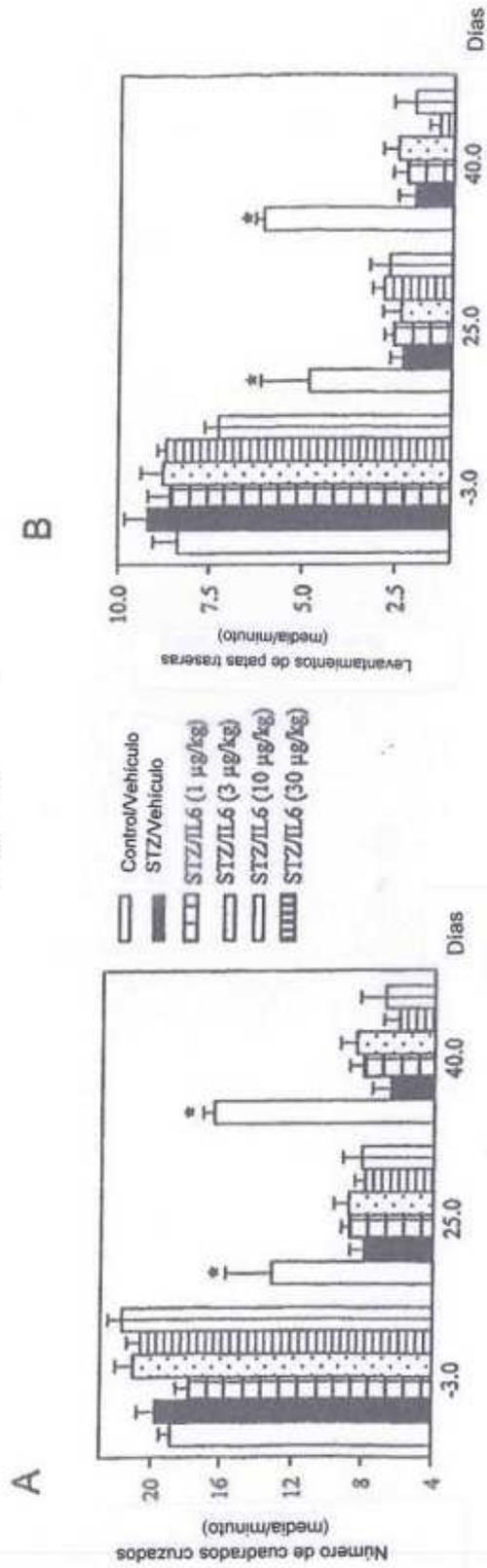
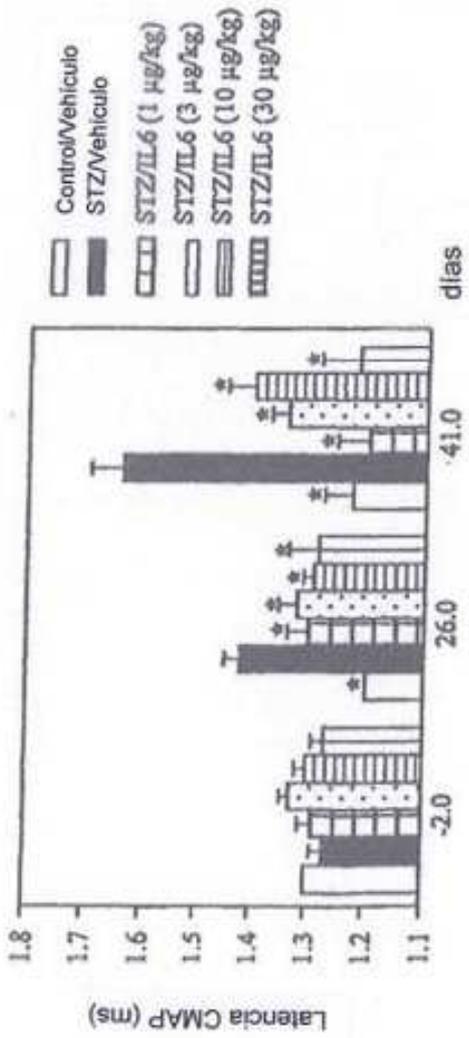
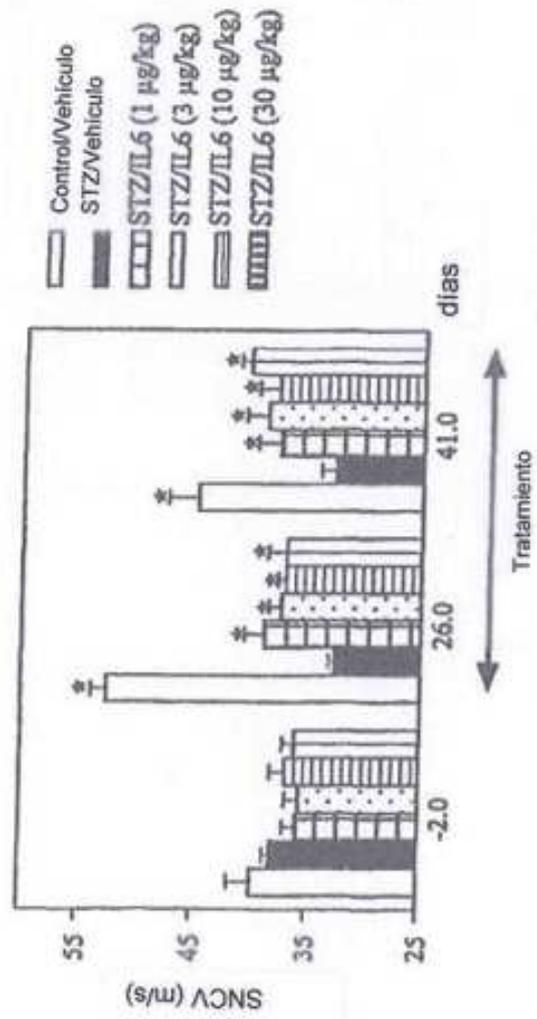


Fig. 14



Tratamiento

Fig. 15



Tratamiento

Fig. 16

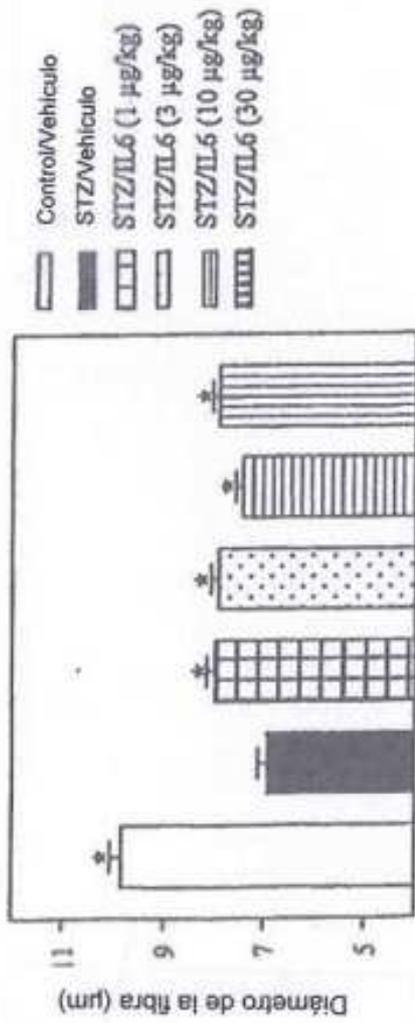


Fig. 17

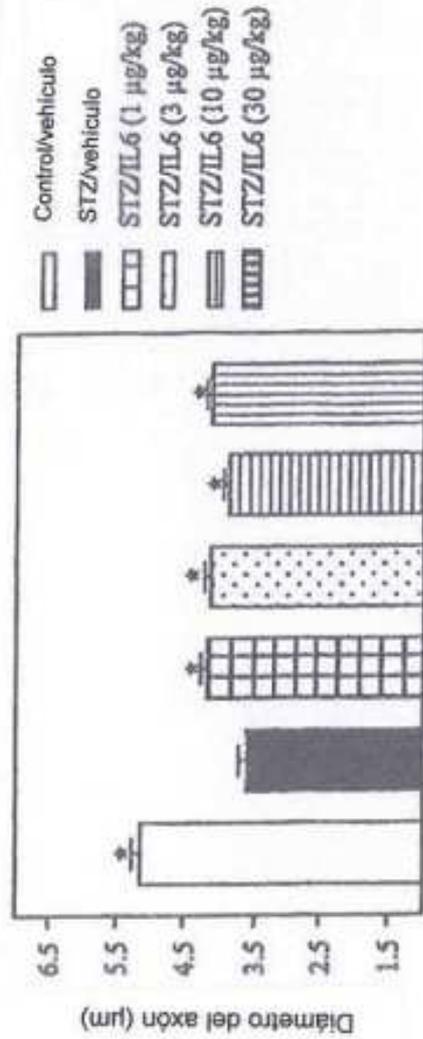


Fig. 18

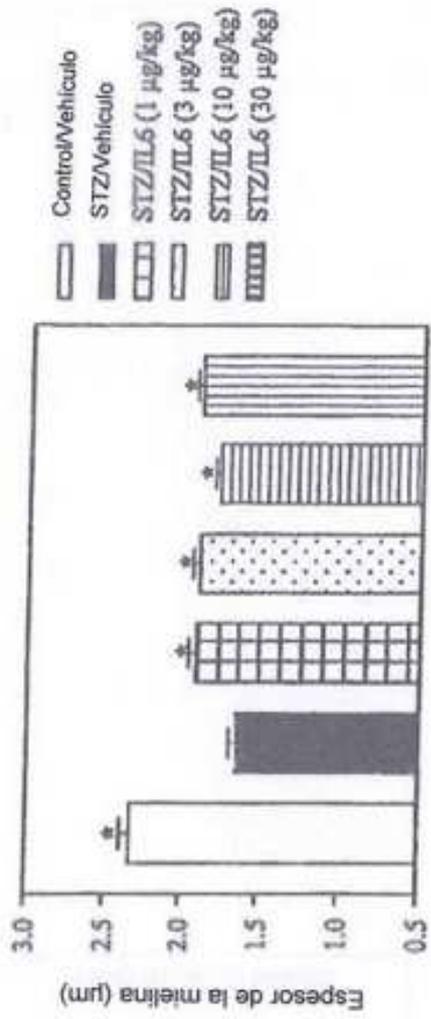


Fig. 19

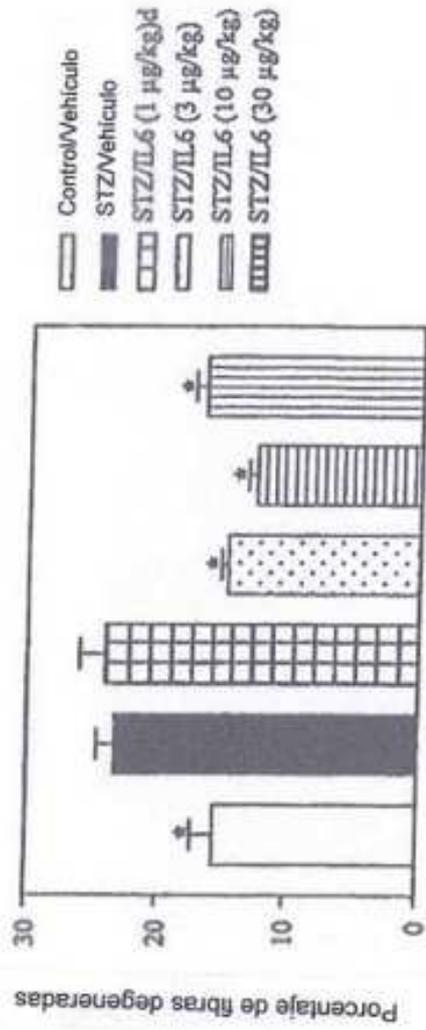


Fig. 20

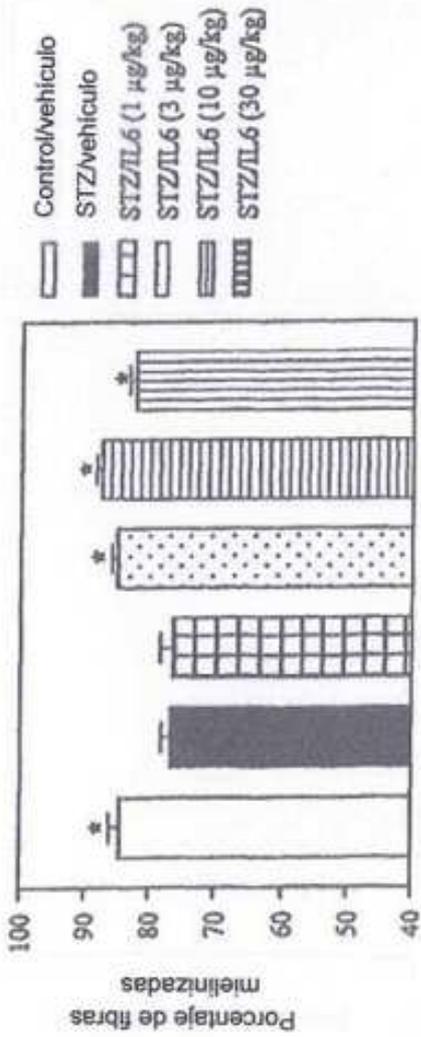


Fig. 21

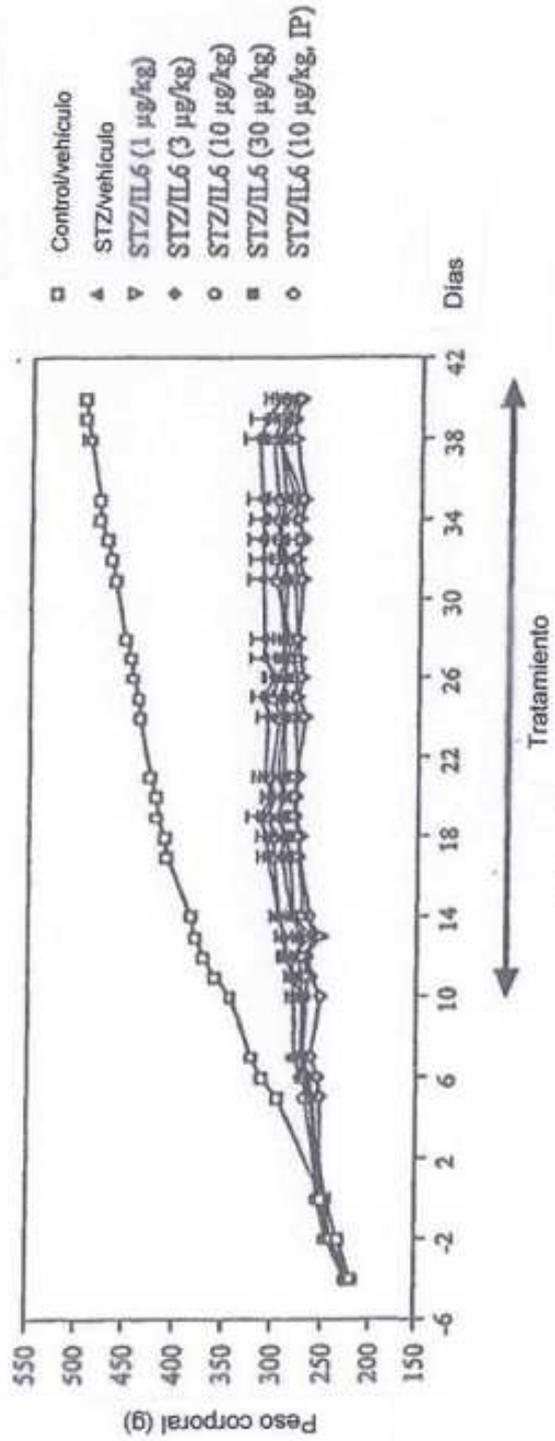


Fig. 22

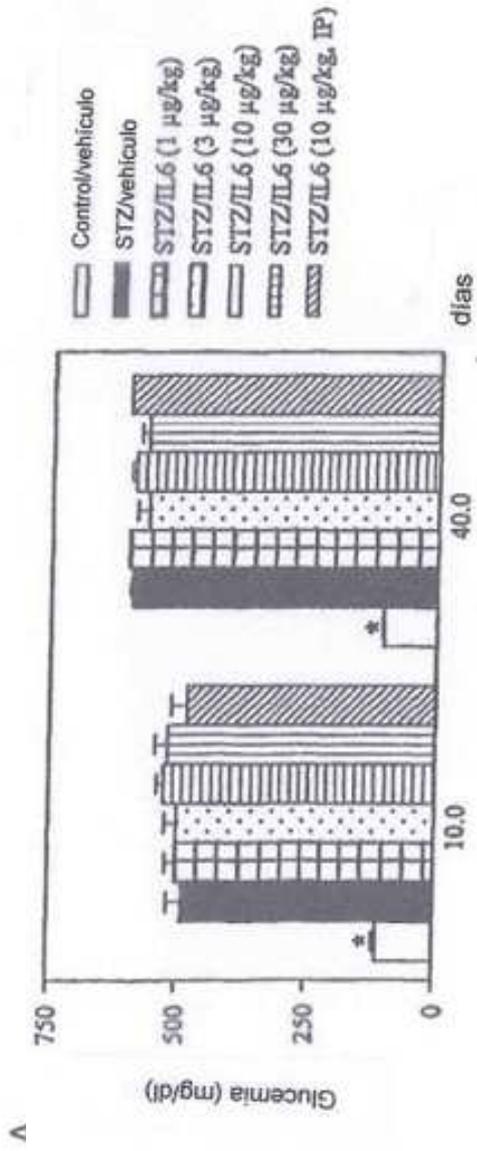


Fig. 23

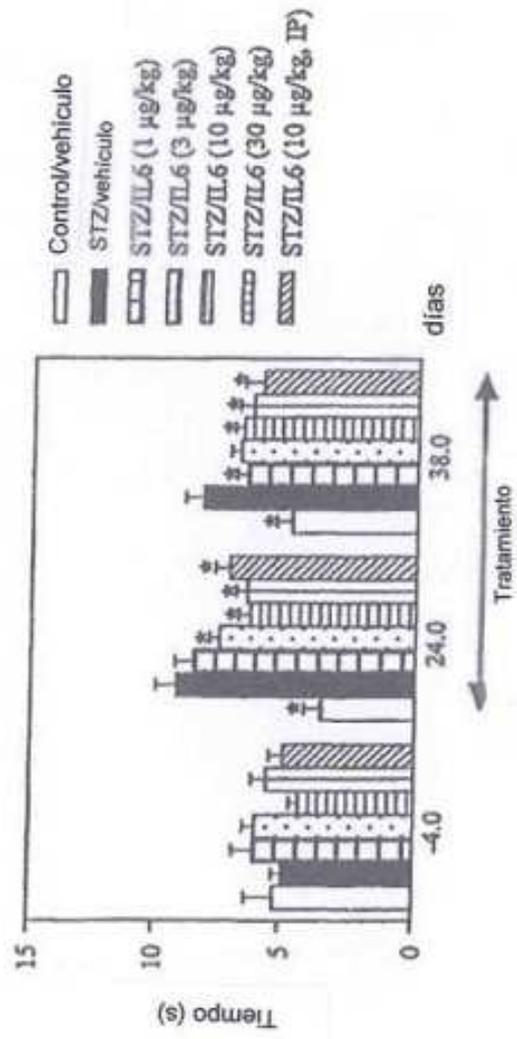


Fig. 24

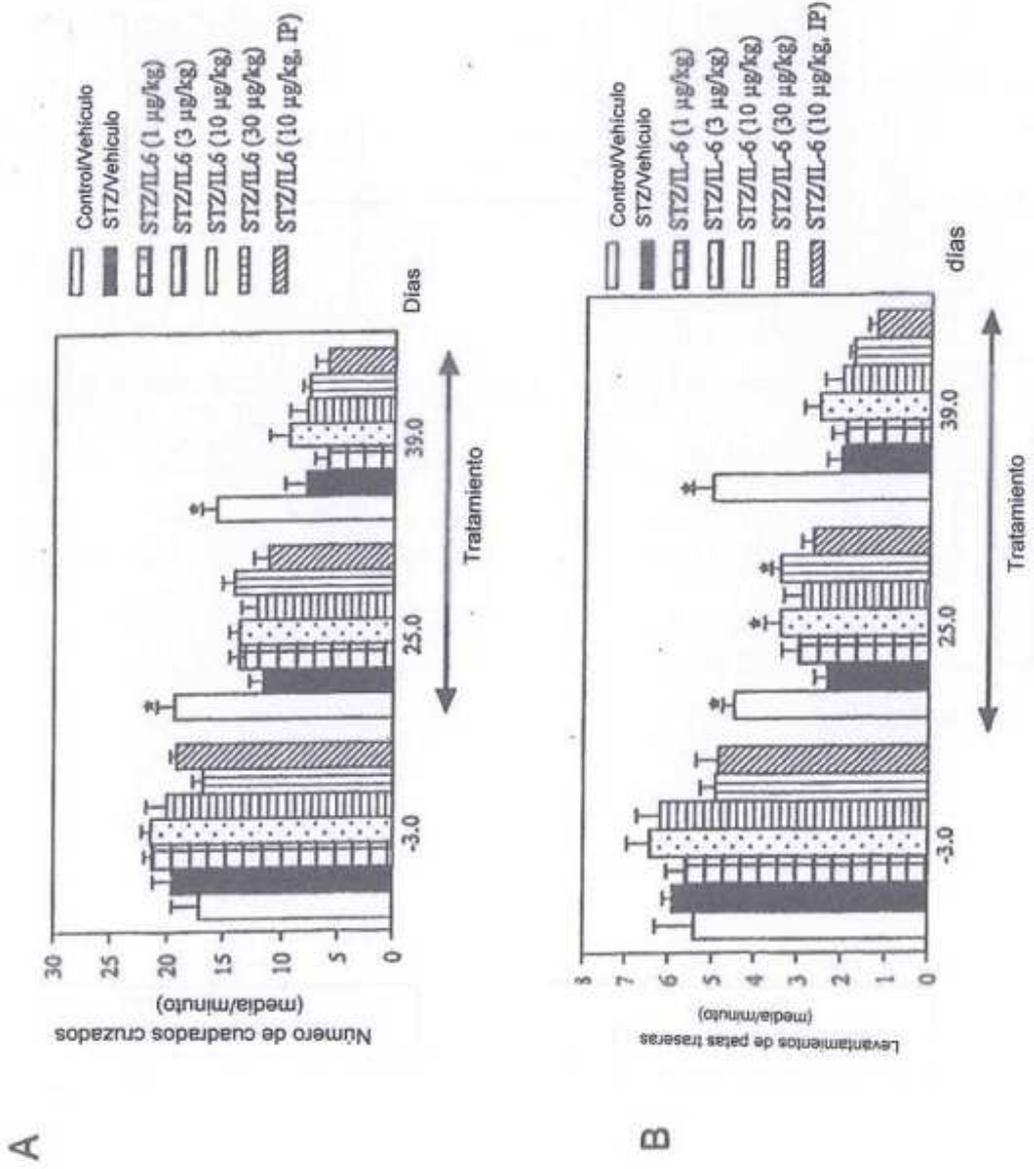


Fig. 25

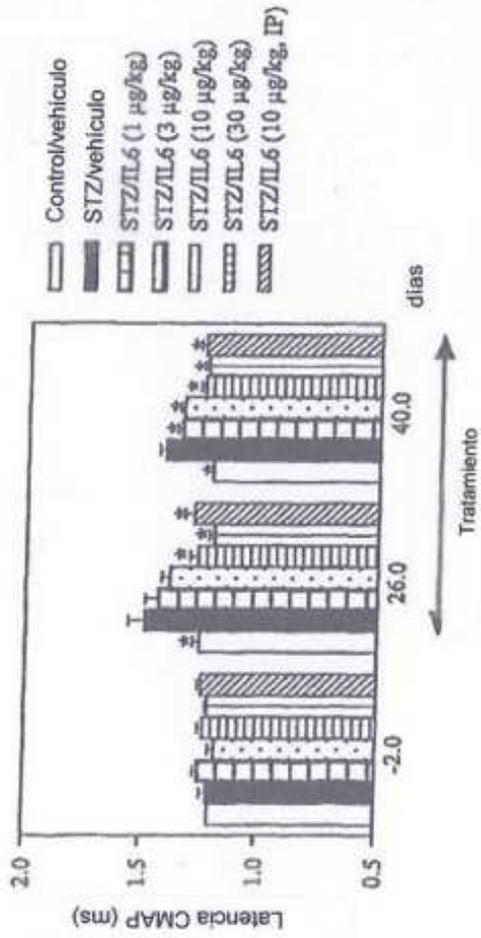


Fig. 26

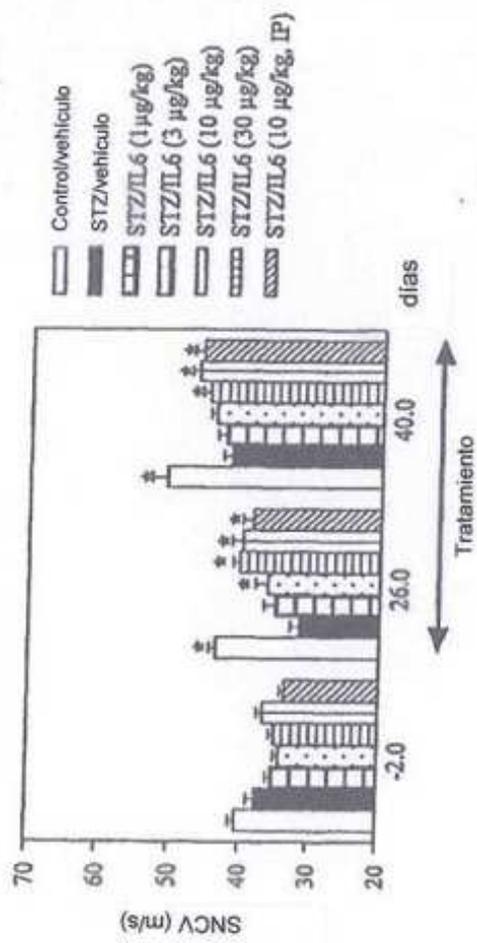


Fig. 27

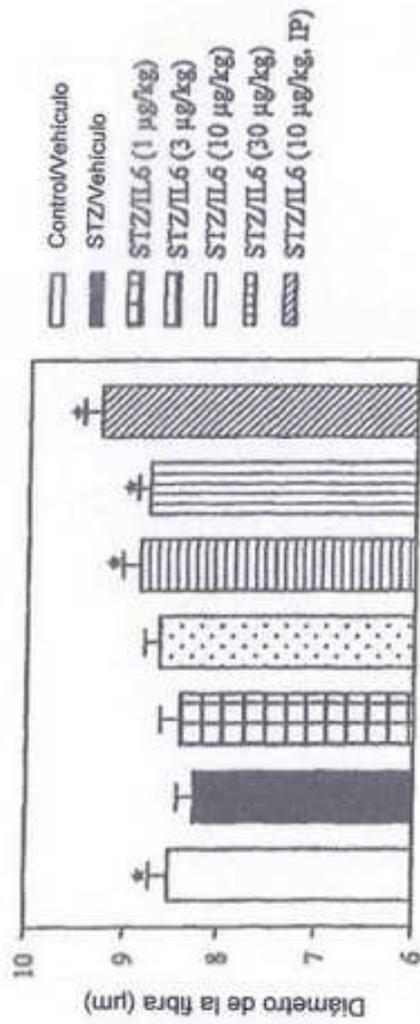


Fig. 28

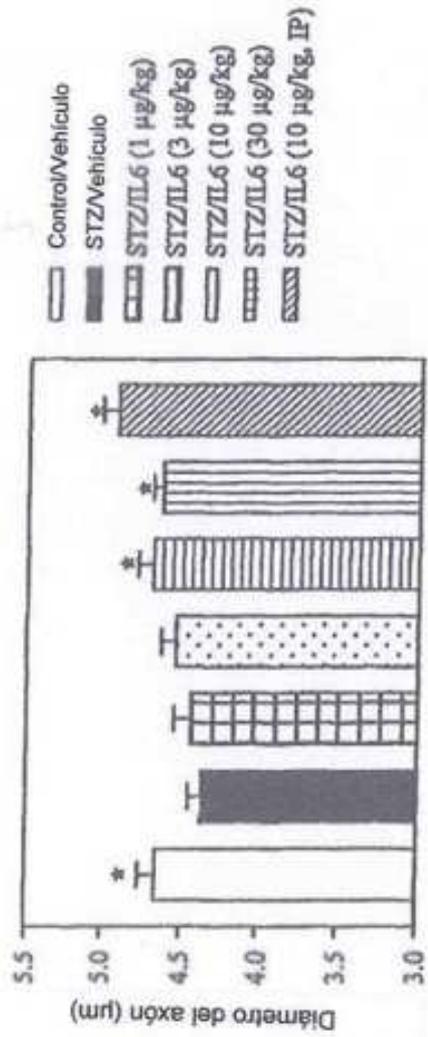


Fig. 29

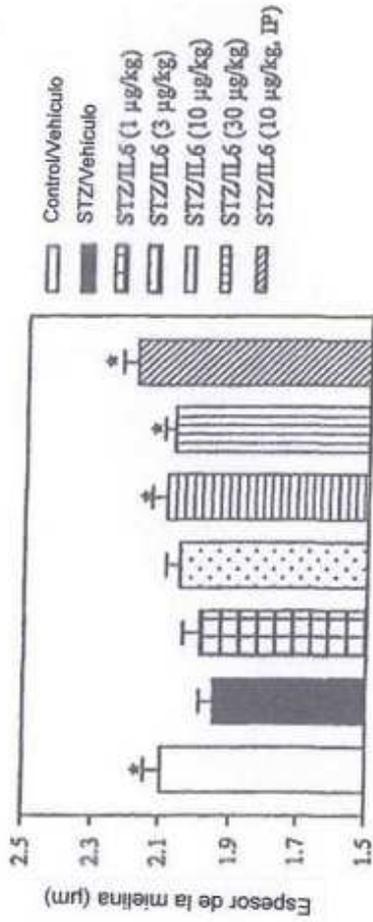


Fig. 30

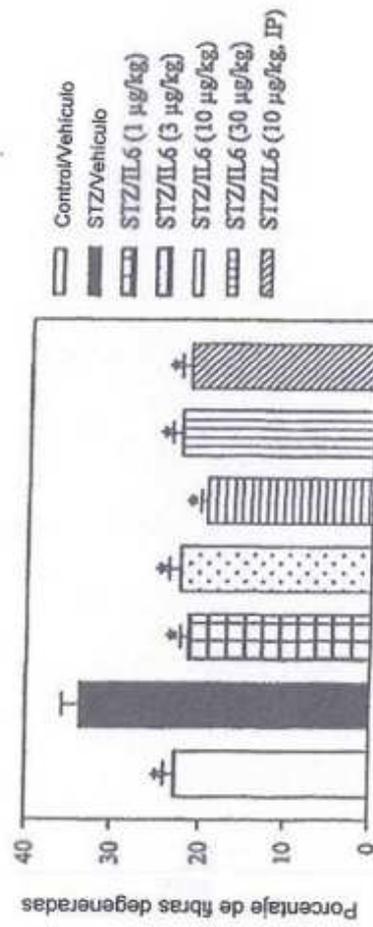


Fig. 31

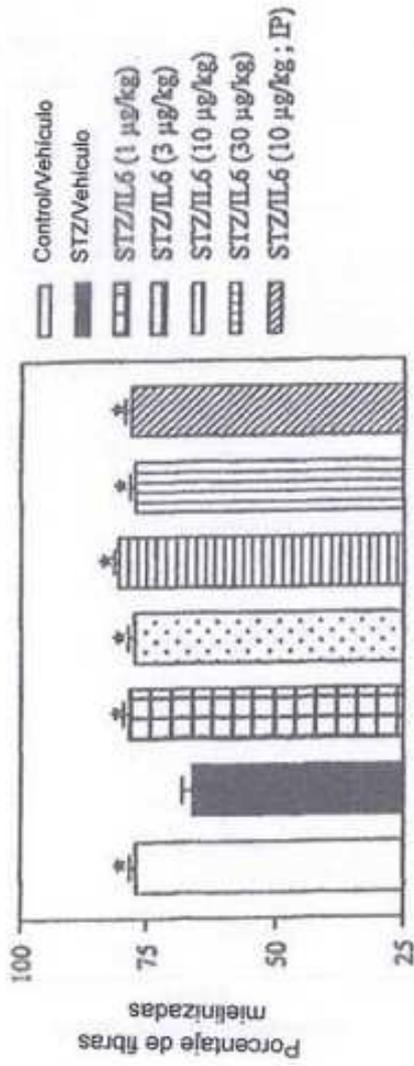


Fig. 32

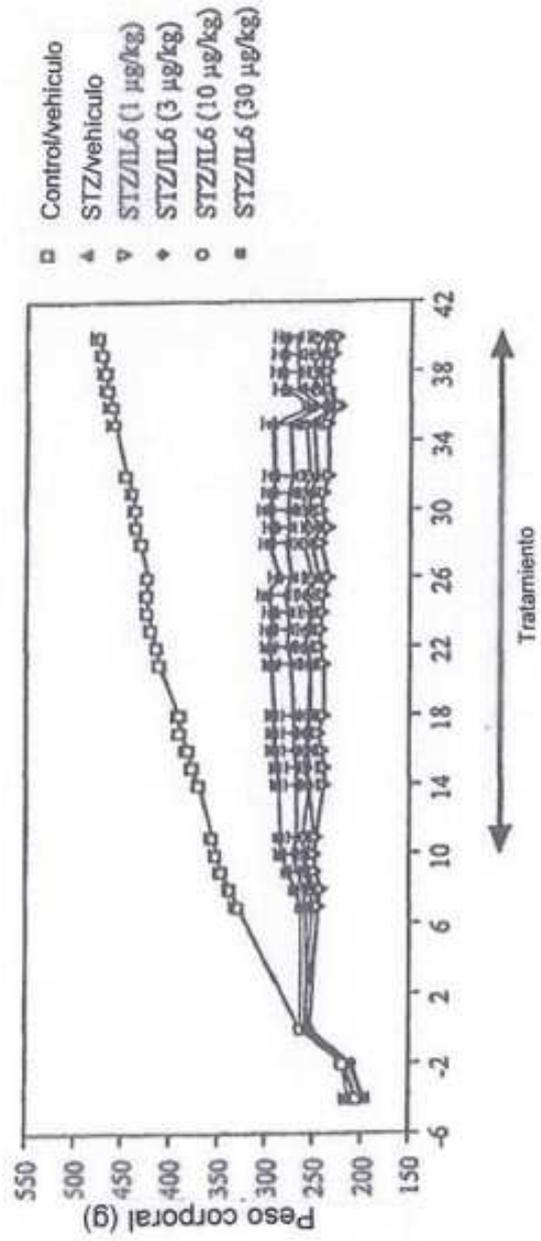


Fig. 33

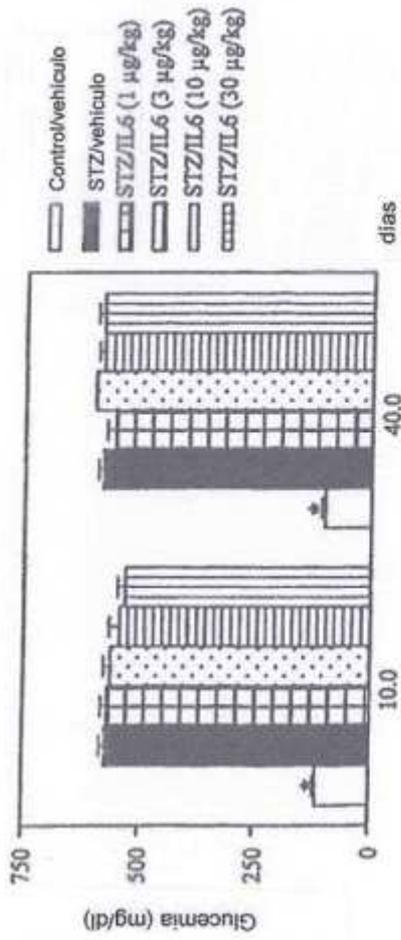


Fig. 34

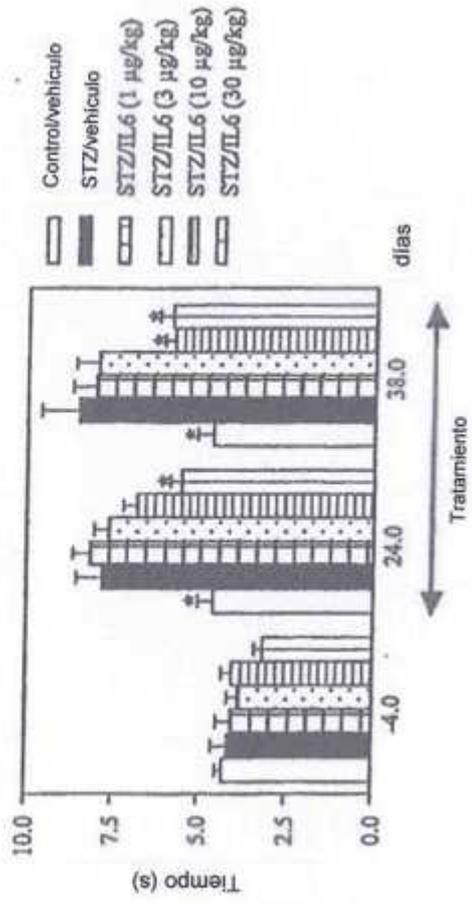


Fig. 35

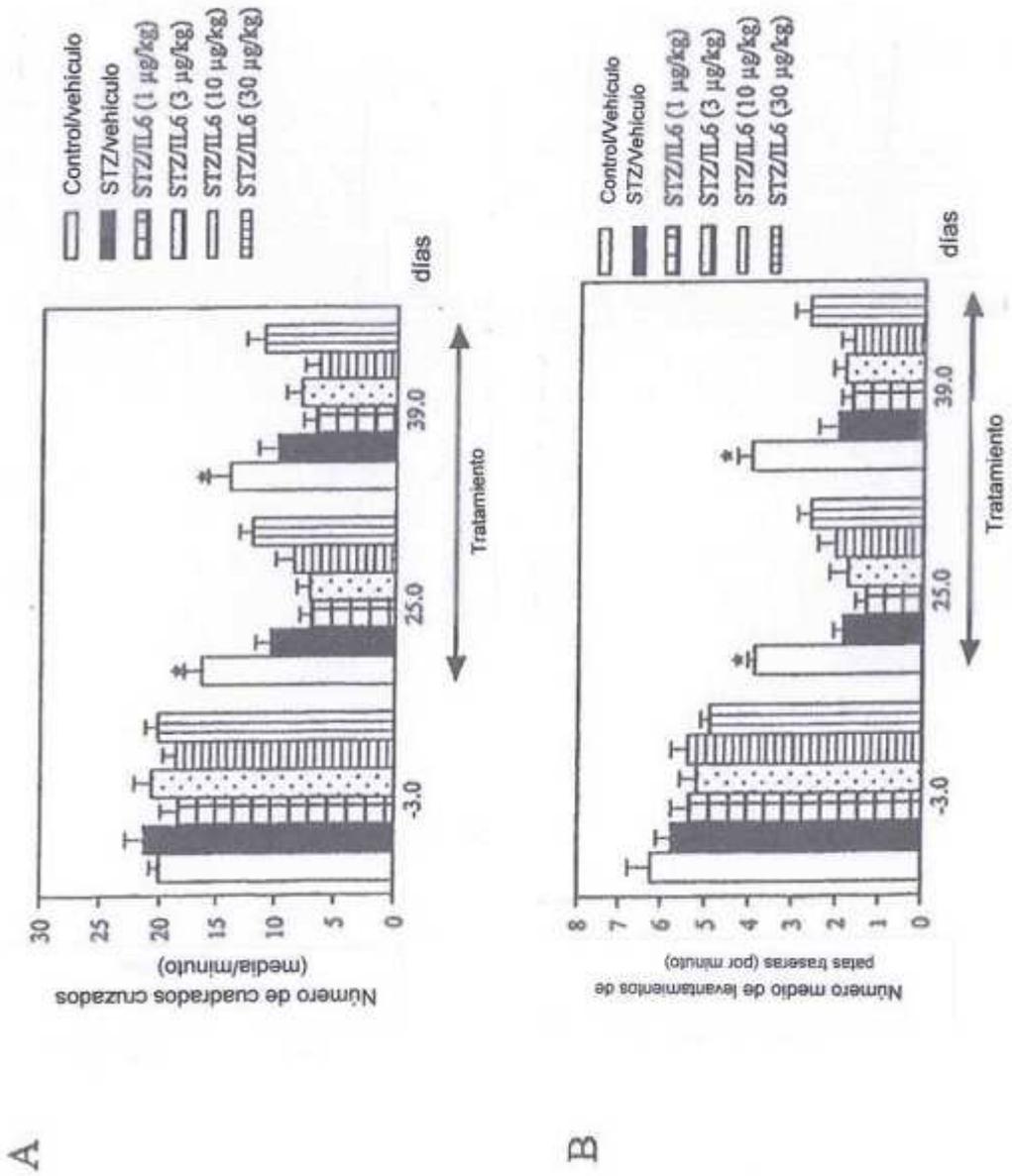


Fig. 36

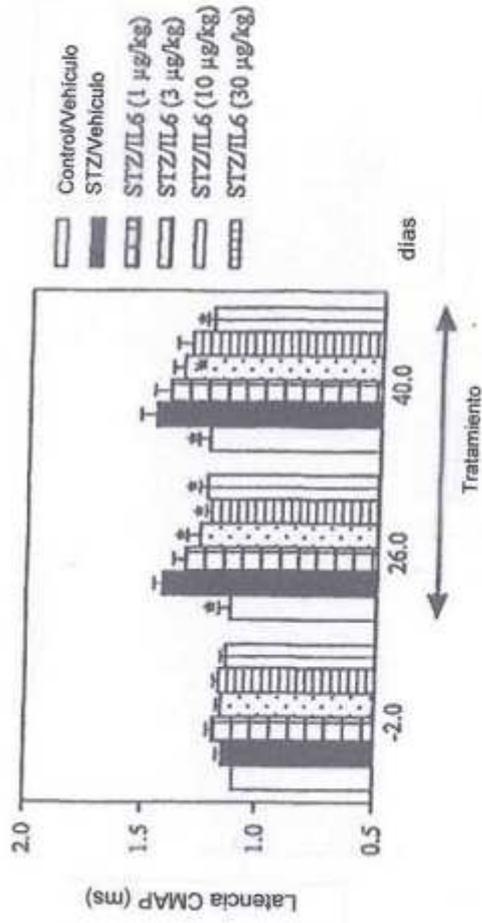


Fig. 37

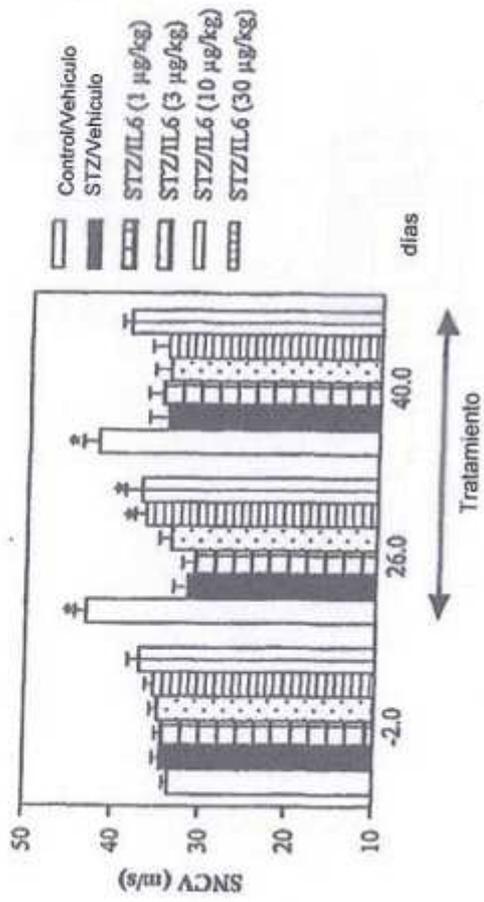


Fig. 38

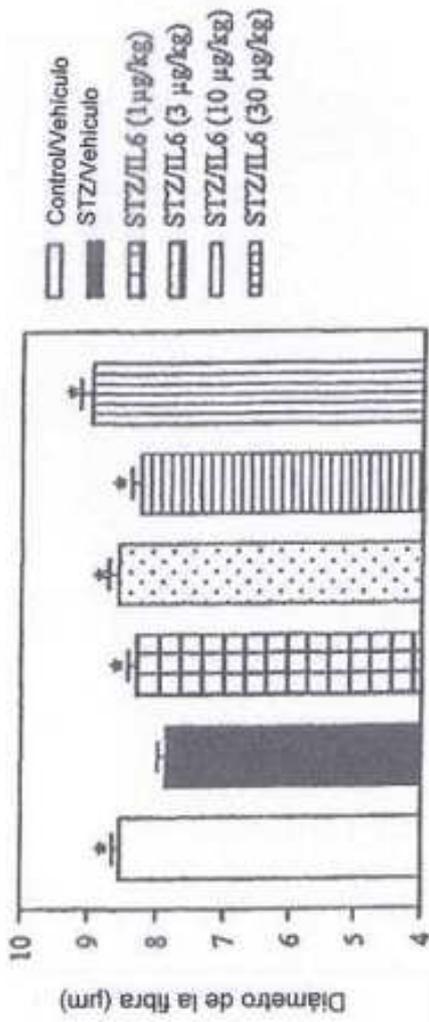


Fig. 39

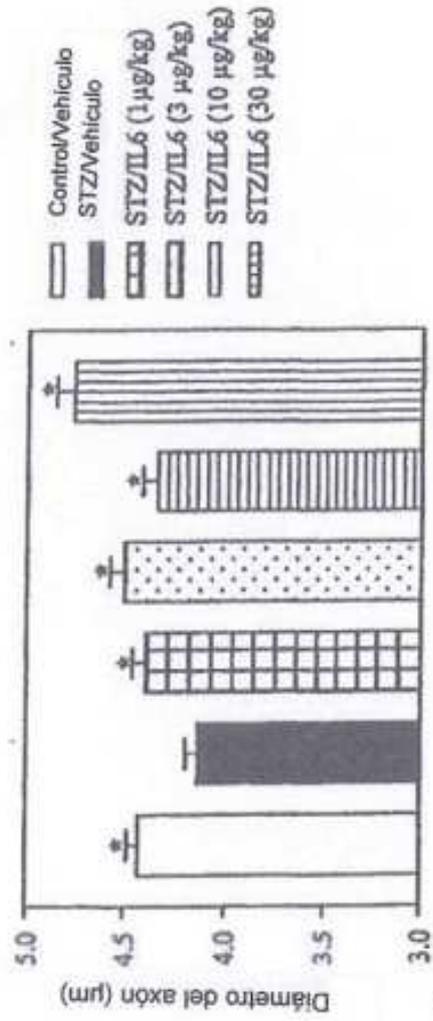


Fig. 40

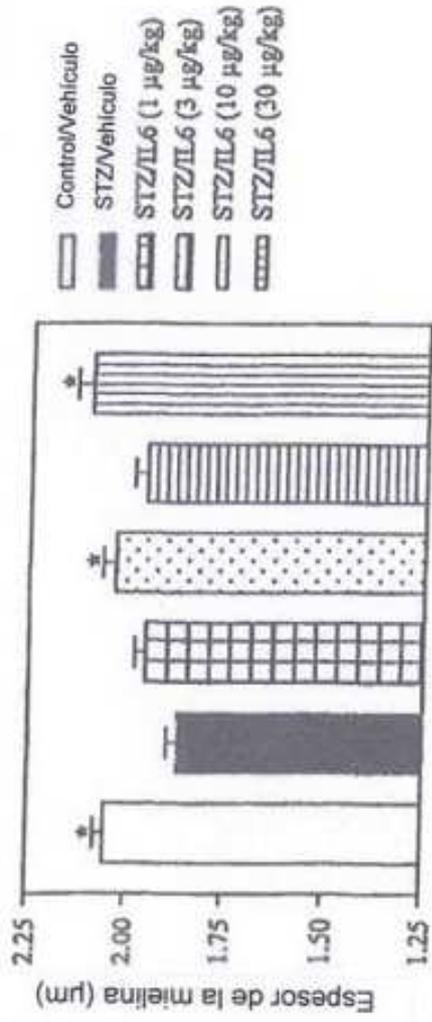


Fig. 41

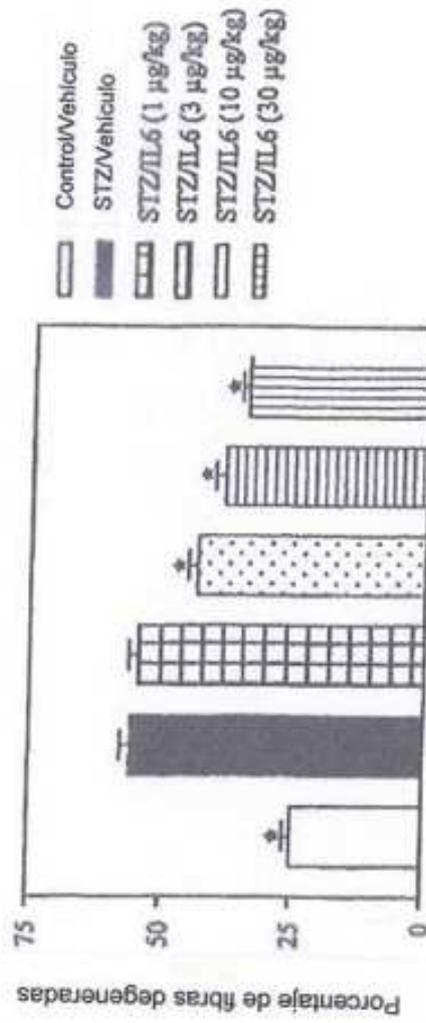


Fig. 42

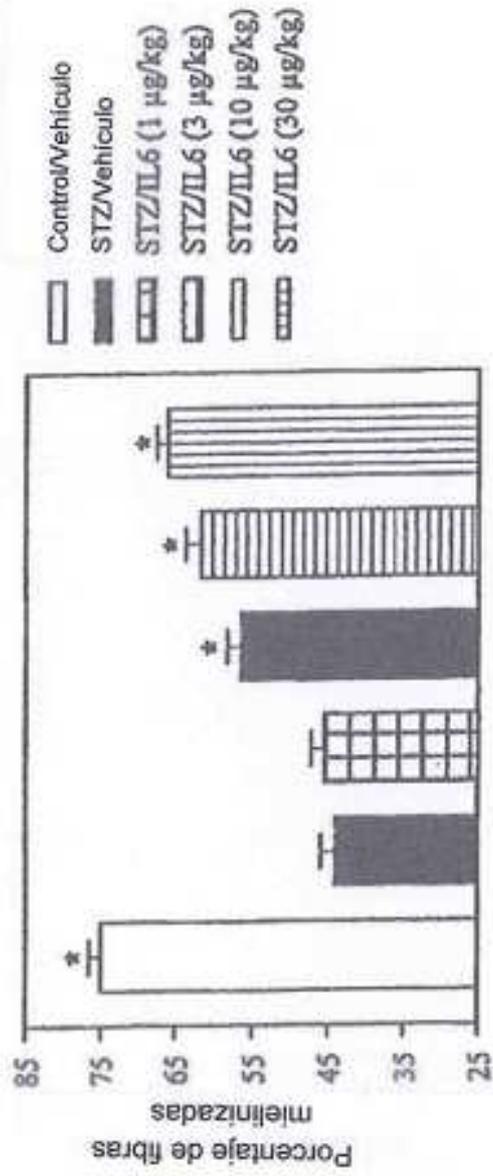


Fig. 43