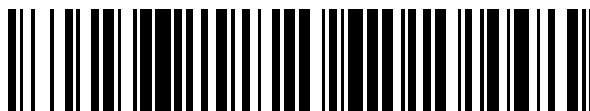


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 569**

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2005** **E 05735913 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014** **EP 1740199**

54 Título: **Quimera IL-6R/IL-6 para terapia de neuropatía periférica inducida por quimioterapia**

30 Prioridad:

29.04.2004 IL 16167204

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2014

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,
LTD. (100.0%)
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.
BOX 95
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:

**REVEL, MICHEL;
CHEBAT, JUDITH y
KRUG, HAGIT**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 444 569 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

Quimera IL-6R/IL-6 para terapia de neuropatía periférica inducida por quimioterapia

Campo de la invención

- 5 La presente invención está en el campo de la neuropatía inducida por quimioterapia. En particular, se refiere al uso de una quimera IL-6R/IL-6 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de neuropatía inducida por quimioterapia, en el que el agente de quimioterapia es un alcaloide de la vinca.

Antecedentes de la invención

La neuropatía periférica es un complejo de trastornos del sistema nervioso periférico resultante de lesión al nervio o a la vaina de mielina. La lesión es de larga duración, normalmente sobreviviendo a la lesión que la inicia.

- 10 La neuropatía periférica inducida por quimioterapia (NPIQ) es un efecto secundario común y posiblemente inhabilitante de muchos fármacos citotóxicos. La neuropatía inducida por quimioterapia está relacionada con dosis acumulada o intensidades de dosis (Verstappen y col., 2003 Drugs 63:1549-63).

- 15 Los alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina y vinblastina), compuestos basados en platino (por ejemplo, cisplatino) y taxanos (paclitaxel y docetaxel) están entre los fármacos más importantes que inducen neurotoxicidad periférica (Visovsky C. Cancer Invest. 2003 Jun; 21(3): 439-51), Quasthoff S, Hartung HP J Neurol. 2002 Jan; 249(1): 9-17. Revisión). Estos fármacos se usan ampliamente para el tratamiento de diversos tumores malignos tales como cánceres de ovario, mama y cánceres hematológicos (Verstappen y col., 2003 Drugs 63(15): 1549).

- 20 La neuropatía accionada por vincristina se caracteriza principalmente por insuficiencia motora y sensorial (tipo mixto de neuropatía). Mientras que el mecanismo subyacente no se entiende completamente hasta ahora, se ha descrito que implica una alteración del transporte axonal anterógrado, que conduce por último lugar a degeneración axonal. Hasta ahora, el tratamiento de neuropatía accionada por vincristina era solo paliativo, ya que hasta la fecha no se había desarrollado ninguna terapia eficiente.

- 25 Actualmente, la NPIQ se alivia por reducción de dosis, que puede comprometer la eficacia del tratamiento de quimioterapia. Se cree que los pacientes que ya tienen síntomas neuropáticos debido a diabetes mellitus, neuropatías hereditarias o tratamiento temprano con quimioterapia neurotóxica son más vulnerables al desarrollo de NPIQ.

- 30 En general, el tratamiento de neuropatía periférica es sintomático y no tiene efecto beneficioso que subyazca a la lesión a los nervios (Peltier AC, Russell JW. Recent advances in drug-induced neuropathies. Curr Opin Neurol. 2002 Oct; 15(5): 633-8). Por ejemplo, la piridoxina (vitamina B6) se usa como procedimiento de soporte nutritivo tras la lesión nerviosa periférica, antioxidantes (por ejemplo ácido gamma-linoleico, ácido alfalipoico e inhibidores de PKC e inhibidores de aldosis reductasa) se usan para eliminar toxinas que pueden contribuir a la neuropatía periférica, se usan anticonvulsivos para suprimir los síntomas de dolor. Los intentos por prevenir la neuropatía por vincristina usando agentes neuroprotectores putativos tales como vitamina B1, vitamina B12, glutamato (Boyle y col., J Pharmacol Exp Ther. 1996 Oct; 279(1): 410-5.), isoaxonina (Le Quesne y col., J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1985 Sep; 48(9): 933-5.), gangliósidos o factor de crecimiento nervioso (Hayakawa y col., Life Sci. 1994; 55(7): 519-25. 4; Lewis y col., Exp Neurol. 1993 Nov; 124(1): 73-88.) mostraron éxito limitado.

- 40 La interleucina (IL)-6 es una citocina pleiotrópica que no solo afecta el sistema inmunitario, sino que también actúa en otros sistemas biológicos y muchos eventos fisiológicos en diversos órganos. En una célula diana, la IL-6 puede generar simultáneamente señales funcionalmente distintas o algunas veces contradictorias mediante su complejo receptor, IL-6R α y gp130. La salida fisiológica final puede entenderse como consecuencia de la orquestación de las diversas rutas de señalización generadas por un ligando dado. Este concepto, el modelo de orquestación de señales, puede explicar cómo IL-6 puede provocar efectos proinflamatorios o antiinflamatorios, dependiendo de las circunstancias medioambientales *in vivo*. La elucidación de los mecanismos moleculares que subyacen esta cuestión es un objeto desafiante para la futura investigación (Jones y col., 2001, Heinrich y col., 2003 Biochem Journal 374, 1-20). Las propiedades funcionales de IL-6 son extremadamente variadas y esto se refleja por la terminología originalmente usada para describir esta citocina (Horst Ibelgauffs' COPE: Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia).

- 45 Las actividades biológicas de IL-6 están mediadas por un sistema de receptor de membrana que comprende dos proteínas diferentes, una llamada el receptor de IL-6 (IL-6R o gp80, revisado por Jones y col., FASEB J. 2001 Jan; 15(1): 43-58. Revisión) y la otra gp130 (revisado por Hirano y col., Stem Cells. 1994 May; 12(3):262-77. Revisión). Formas solubles de IL-6R (sIL-6R), correspondientes al dominio extracelular de gp80, son productos naturales del cuerpo humano encontrados como glucoproteínas en sangre y en orina (Novick y col., J Chromatogr. 1990 Jun 27;510:331-7, y Cytokine. 1992 Jan;4(1):6-11). Una propiedad excepcional de moléculas de sIL-6R es que actúan de potentes agonistas de IL-6 en muchos tipos de células que incluyen células humanas (Taga y col., Cell. 1989 Aug 11;58(3):573-81. Novick y col., 1992 Jan;4(1):6-11). Incluso sin el dominio intracitoplásmico de gp80, sIL-6R es todavía capaz de desencadenar la dimerización de gp130 en respuesta a IL-6, que a su vez media en la

transducción de señales específica de IL-6 posterior y efectos biológicos (Murakami Science. 1993 Jun 18;260(5115):1808-10). sIL-6R tiene dos tipos de interacción con gp130, ambas de las cuales son esenciales para las actividades biológicas específicas de IL-6 (Halimi y col., Eur Cytokine Netw. 1995 May-Jun;6(3):135-43), y se propuso que el complejo de receptor de IL-6 activo era una estructura hexámera formada por dos cadenas de gp130, dos IL-6R y dos ligandos de IL-6 (Ward y col., 1994; Paonessa y col., EMBO J. 1995 May 1;14(9):1942-51).

A diferencia de la expresión del IL-6R relacionado que tiene una distribución celular limitada (revisado por Jones y col., 2001), la expresión de gp130 que atraviesa trans-membrana se encuentra en casi todos los órganos, que incluyen corazón, riñón, bazo, hígado, pulmón, placenta y cerebro (Saito y col., J Immunol. 1992 Jun 15;148(12):4066-71).

In vitro, hay muchos ejemplos diferentes que muestran que IL-6 sola no induce una actividad específica a menos que se administre IL-6R soluble. Por ejemplo, IL-6 induce la formación de osteoclastos en co-cultivos de médula ósea de ratón y células osteoblásticas, solo cuando se combina con sIL-6R (revisado por Jones y col., 2001). Por tanto, aunque muchas células neuronales pueden producir IL-6, siguen siendo insensibles a la estimulación por la propia IL-6. La diferenciación y supervivencia de células neuronales puede, sin embargo, medirse por la acción de sIL-6R (Hirota J Exp Med. 1996 Jun 1;183(6):2627-34., Martz 1998).

Las concentraciones circulantes de sIL-6R (agonista) en sujetos normales son relativamente altas y comparables a las de gp130 soluble de por encima de 10 ng/ml, un antagonista natural de IL-6 (Corbi y col., 2000 Eur J Cardiotherac Surg. 18 (1):98-103, Disthabanchong y col., Clin Nephrol. 2002 Oct;58(4):289-95). A diferencia, las concentraciones circulantes de IL-6 son aproximadamente o por debajo de 10 pg/ml (Kado y col., 1999 Acta Diabetol. Jun 36 (1-2):67-72, Corbi y col., 2000). Así, el efecto de administración de IL-6 *in vivo*, sola, sin co-administración con sIL-6R en enfermedad puede o puede no ser eficaz y depende de la concentración del agonista/antagonista soluble en una enfermedad particular y en una localización particular en el cuerpo.

Se han descrito moléculas quiméricas que enlazan el receptor de IL-6 soluble y IL-6 juntos (Chebath y col., Eur Cytokine Netw. 1997 Dec;8(4):359-65). Se han designado quimera IL-6R/IL-6. Las moléculas de IL-6R/IL-6 quiméricas se generaron fusionando las regiones codificantes enteras de ADNc que codifican el receptor de IL-6 soluble (sIL-6R) y IL-6. La quimera IL-6R/IL-6 recombinante se produjo en células CHO (Chebath y col., Eur Cytokine Netw. 1997, documento WO99/02552). IL-6R/IL-6 se une con una mayor eficiencia a la cadena de gp130 *in vitro* que la mezcla de IL-6 con sIL-6R (Kollet y col., Blood. 1999 Aug 1;94(3):923-31).

Las proteínas MBP y P0 se inducen normalmente durante la maduración posnatal final de células de Schwann, y se re-inducen durante la regeneración nerviosa. Se ha mostrado que la quimera IL-6R/IL-6 induce la expresión de proteína básica de mielina (MBP) y los productos génicos de P0 MBP y ARN de P0 y proteínas en cultivos de ganglios de la raíz dorsal (GRD) de embriones de ratón de 14 días de edad (FEBS Lett. 1999 Aug 27;457(2):200-4 y col., 1999). Además, se encontró que la expresión de MBP y P0 se inducía por la quimera IL6R/IL6 también en células tumorales cultivadas de origen de la cresta neural. En ambos casos, la inducción de genes MBP y P0 por la quimera IL6R/IL6 en precursores de células de Schwann embrionarias normales y en células tumorales de origen de la cresta neural está asociada con una regulación por disminución de Pax-3 (Kamaraju y col., JBC 2002 277 15132, Slutsky y col., J Biol Chem. 2003 Mar 14;278(11):8960-8, Haggiag y col., J. Neurosci. Res. 2001).

El efecto estimulante del activador de gp130 IL6R/IL6 sobre la mielinación *in vivo* se demostró en un modelo de rata de transección del nervio ciático. Inyecciones de IL6R/IL6 condujeron a un aumento de 7 veces en el número de fibras mielinadas en el nervio en regeneración (Haggiag y col., J. Neurosci. Res. 2001).

El efecto terapéutico de IL-6 recombinante sola sin el IL-6R soluble en un modelo animal de neuropatía periférica inducida por diabetes se ha desvelado en la solicitud de patente WO03033015. Sin embargo, es incierto si la quimera IL6R/IL-6 sola o IL-6 sola o junto con sIL-6R son capaces o no de un efecto beneficioso en neuropatía periférica producida por quimioterapia. En realidad, el factor inhibidor de leucemia recombinante (FIL), otro activador de gp130, se probó en ensayos clínicos que prevenía neuropatía periférica producida por carboplatino/paclitaxel (Davis y col., Proc Am Soc Clin Oncol 22: página 740, 2003, resumen 2976) y los resultados indicaron que FIL fue ineficaz en prevenir NPIQ a las dosis y pauta probadas.

HAYAKAWA y col. (1994, LIFE SCIENCES, vol. 55, n° 7, 519-525) desvelan el uso de NGF para el tratamiento de neuropatía periférica inducida por quimioterapia.

Por tanto, así se necesitan nuevos fármacos/estrategias para prevenir/tratar neuropatía periférica producida por agentes de quimioterapia.

Descripción resumida de la invención

La presente invención se refiere a los siguientes puntos:

1. Uso de una quimera IL6R/IL6, o una muteína de la misma, en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de neuropatía periférica inducida por quimioterapia (NPIQ), en el que el agente de quimioterapia es un alcaloide de la vinca, y adicionalmente en el que la muteína tiene una secuencia de

aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la quimera IL6R/IL6 por delección o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de los componentes que se producen naturalmente de la quimera IL6R/IL6 o mediante la adición de uno o más residuos de aminoácidos a la secuencia original de la quimera IL6R/IL6 y es capaz de unirse a gp130.

- 5 2. El uso según el punto 1, en el que la neuropatía periférica se produce por vinblastina, vincristina o una mezcla de las mismas.
3. El uso según el punto 1 ó 2, en el que la quimera IL6R/IL6 o muteína de la misma está glucosilada en uno o más sitios.
4. El uso según los puntos 1 ó 2, en el que la quimera IL6R/IL6 o muteína de la misma no está glucosilada.
- 10 5. El uso según cualquiera de los puntos precedentes, en el que la muteína comprende al menos un resto unido a uno o más grupos funcionales.
6. El uso según el punto 5, en el que el resto es un resto de polietileno.
7. El uso según uno cualquiera de los puntos 1 a 6, en el que el medicamento comprende una célula que expresa una quimera IL6R/IL6 o una muteína de la misma.
- 15 8. El uso según uno cualquiera de los puntos 1 a 7, en el que el medicamento comprende un vector de expresión que comprende la secuencia codificante de una quimera IL6R/IL6 o muteína de la misma.
9. El uso según el punto 8, en el que el vector es un vector lentiviral.
10. El uso de cualquiera de los puntos 1 a 9, en el que el medicamento comprende opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 11. El uso del punto 10, en el que el paciente es un paciente de alto riesgo.
12. El uso del punto 11, en el que el paciente de alto riesgo está seleccionado de pacientes que padecen diabetes, SIDA, neuropatías hereditarias y pacientes sometidos a tratamiento temprano con fármacos neurotóxicos.
13. El uso de cualquiera de los puntos 10 a 12, en el que la vía de administración del medicamento está seleccionada de intrahepática, intradérmica, intraplantar, transdérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, epidural, tópica e intranasal.
- 25 14. Uso de una quimera IL6R/IL6 o una muteína de la misma, opcionalmente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la fabricación de un medicamento para aumentar la dosis de un agente quimioterapéutico en un paciente, en el que el agente de quimioterapia es un alcaloide de la vinca, y adicionalmente en el que la muteína tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la quimera IL6R/IL6 por delección o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de los componentes que se producen naturalmente de la quimera IL6R/IL6 o mediante la adición de uno o más residuos de aminoácidos a la secuencia original de la quimera IL6R/IL6 y es capaz de unirse a gp130.
- 30 15. El uso según el punto 14, en el que el medicamento se administra tanto durante, durante como después del agente de quimioterapia.
- 35 16. Una composición farmacéutica que comprende una combinación de una quimera IL6R/IL6 o una muteína de la misma y un agente quimioterapéutico en el que el agente de quimioterapia es un alcaloide de la vinca, y adicionalmente en el que la muteína tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la quimera IL6R/IL6 por delección o sustitución de componentes que se producen naturalmente de la quimera IL6R/IL6 o mediante la adición de uno o más residuos de aminoácidos a la secuencia original de la quimera IL6R/IL6 y es capaz de unirse a gp130.
- 40 17. La composición farmacéutica según el punto 16, en la que el alcaloide de la vinca está seleccionado de vinblastina, vincristina o una mezcla de las mismas.
18. La composición farmacéutica según el punto 16 ó 17, que comprende además un fármaco adicional seleccionado de antioxidantes, inhibidores de PKC y agentes neuroprotectores.
- 45 19. La composición farmacéutica según el punto 18, en la que el fármaco adicional está seleccionado de glutamato, piridoxina, ácido gamma-linololeico, vitamina B1, vitamina B2, isoaxonina, gangliósido y NGF.
20. Una quimera IL6R/IL6, o una muteína de la misma, para su uso en la prevención y/o tratamiento de neuropatía periférica inducida por quimioterapia (NPIQ), en la que el agente de quimioterapia es un alcaloide de la vinca, y adicionalmente en la que la muteína tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la quimera IL6R/IL6 por delección o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de los
- 50

componentes que se producen naturalmente de la quimera IL6R/IL6 o mediante la adición de uno o más residuos de aminoácidos a la secuencia original de la quimera IL6R/IL6 y es capaz de unirse a gp130.

21. Una quimera IL6R/IL6, o una muteína de la misma, para su uso en aumentar la dosis de un agente quimioterapéutico en un paciente, en la que el agente de quimioterapia es un alcaloide de la vinca, y adicionalmente en la que la muteína tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la quimera IL6R/IL6 a modo de delección, inserción, adición de aminoácidos o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de los componentes que se producen naturalmente de la quimera IL6R/IL6 o mediante la adición de uno o más residuos de aminoácidos a la secuencia original de la quimera IL6R/IL6 y es capaz de unirse a gp130

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra neuroprotección *in vitro* contra vincristina por la activación de la señalización de IL-6. (A) Excrecencia de red axonal teñida para β III-tubulina en cultivos de GRD después de 7 días en medio que contiene NGF. (B) Cultivo similar tratado durante los 2 últimos días con vincristina 10 nM. Obsérvese la amplia neurodegeneración. (C) Cultivo similar tratado durante los 2 últimos días con vincristina y 200 ng/ml de IL-6R/IL-6. Se observa protección significativa de la red axonal. Los paneles A-C son a los mismos aumentos; barra de tamaño: 100 μ m. (D) Excrecencia de GRD cultivados en medio que contiene NGF durante 10 días, con vincristina 10 nM añadida durante los 5 últimos días. Las células que experimentan apoptosis se visualizan por tinción con anticuerpos contra caspasa-3 activada. (E) Cultivo similar en el que 200 ng/ml de IL-6R/IL-6 se añadieron junto con vincristina. No se observa apoptosis. (D', E') mismos campos que D, E bajo contraste de fase de luz. Los paneles D-E' a los mismos aumentos; barra de tamaño: 100 μ m.

La Figura 2 muestra la estimulación de la regeneración tras la intoxicación por vincristina. (A) Excrecencia de red axonal teñida para β III-tubulina en cultivos de GRD después de 16 días en medio que contiene NGF. (B) Cultivo similar complementado con 200 ng/ml de IL-6R/IL-6 del día 5 al 16. (C) Cultivo como en A, tratado con vincristina 5 nM del día 5 a 10. Después de eliminar el fármaco, el cultivo continuó durante 6 días más. (D) Cultivo como en A, tratado con vincristina 5 nM del día 5 a 10, y luego con IL-6R/IL-6 durante 6 días más tras la eliminación del fármaco. (E) Cultivo de GRD como en C, con vincristina del día 5 a 10, y adicionalmente cultivo 6 días sin el fármaco. Excrecencia teñida para GFAP. (F) Cultivo como en D, con vincristina del día 5 a 10, y adicionalmente cultivo 6 días con IL-6R/IL-6. Obsérvese el recrecimiento de células positivas para GFAP. Los paneles A-D y E-F son a los mismos aumentos, respectivamente; barra de tamaño: 100 μ m.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere al uso de una quimera IL6R/IL6, o una muteína de la misma, para la fabricación de un medicamento para la prevención de neuropatía periférica inducida por quimioterapia (NPIQ), en la que el agente de quimioterapia es un alcaloide de la vinca, y adicionalmente en la que la muteína tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la quimera IL6R/IL6 por delección o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de los componentes que se producen naturalmente de la quimera IL6R/IL6 o mediante la adición de uno o más residuos de aminoácidos a la secuencia original de la quimera IL6R/IL6 y puede unirse a gp 130.

Actualmente, el tratamiento de neuropatía periférica es sintomático y no tiene efecto beneficioso subyacente a la lesión a los nervios. Normalmente, la NPIQ se alivia por reducción de dosis, que puede comprometer la eficacia del tratamiento.

Así, la presente invención presenta un progreso sustancial, concretamente, la quimera IL6R/IL6 puede usarse junto con el agente quimioterapéutico para prevenir el desarrollo de lesión inducida por quimioterapia. Además, se mostró que la quimera IL6R/IL6 administrada *in vitro* después del desarrollo de lesión inducida por quimioterapia pudo restaurar tejido neural.

Por tanto, el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de NPIQ producida por una amplia variedad de agentes de quimioterapia seleccionados de alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

La invención se basa en los hallazgos de que la co-administración de la quimera IL6R/IL6 con vincristina fue muy eficaz en prevenir la inducción de la degeneración axonal por vincristina *in vitro*.

Por ejemplo, la excrecencia neuronal se estimuló en cultivos de ganglios de la raíz dorsal (GRD) de embriones de ratón (día E17) mediante la adición de factor de crecimiento nervioso (NGF). Posteriormente, los cultivos se expusieron a vincristina, que induce un proceso de degeneración axonal progresiva debido a la activación de caspasa-3. Después de 2 días de tratamiento con vincristina se observaron activación de caspasa-3 y una pérdida considerable de axones en la excrecencia neuronal de GRD (Fig. 1, paneles B frente a A y D). Sin embargo, inesperadamente, cuando IL-6R/IL-6 estuvo presente durante el tratamiento con vincristina, prácticamente no hubo activación de caspasa-3 (Fig. 1, paneles E frente a D). También se observó que IL-6R/IL-6 previno la degeneración axonal (Fig. 1, paneles C frente a B).

La invención se basa también en los hallazgos de que el tratamiento con la quimera IL6R/IL6 restauró eficazmente el tejido neural incluso si se añadió después de que la lesión neural por vincristina ya estuviera establecida.

Por ejemplo, cultivos de GRD de embriones E18,5 de ratones deficientes en IL-6 (IL-6^{-/-}) en los que la red axonal se formó en presencia de NGF durante 5 días tanto continuaron durante otros 11 días sin o con IL-6R/IL-6 (Figura 2, panel A y B, respectivamente) como se trataron durante 5 días por vincristina, momento en el que la vincristina se eliminó y el cultivo continuó durante 6 más días (Figura 2, paneles C-F). Se observó que la amplia degeneración de la red axonal estaba todavía presente 6 días después de eliminar la vincristina (Figura 2, panel C), pero cuando IL-6R/IL-6 se añadió después de la eliminación de la vincristina se observó un re-crecimiento significativo de los axones (Figura 2, panel D). En cultivos en paralelo inmunoteñidos para proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) se observó que la adición de IL-6R/IL-6 produjo un marcado re-crecimiento de células de la glía (Figura 2, panel F) con respecto a los cultivos de control 6 días después de la eliminación de la vincristina (Figura 2, panel E).

En varios experimentos similares, los efectos curativos de IL-6R/IL-6 se observaron en cultivos de GRD de ratones IL-6^{+/+}, y ya fueron evidentes dos días después de la adición de IL-6R/IL-6 (no mostrado).

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran inequívocamente el valor terapéutico preventivo y/o curativo de IL6R/IL6 en NPIQ.

La quimera IL6R/IL6, o muteína de la misma, según la invención, puede estar, por ejemplo, no glucosilada o puede estar glucosilada en uno o más sitios.

En una realización preferida, la muteína puede comprender al menos un resto, tal como un resto de polietileno, unido a uno o más grupos funcionales, que se producen como una o más cadenas laterales en los residuos de aminoácidos.

En otra realización, la quimera IL-6R/IL6 o muteína de la misma según la invención puede expresarse por una célula, o por un vector de expresión que comprende la secuencia codificante de una quimera IL6R/IL6 o una muteína de la misma. En una realización preferida, el vector es un vector lentiviral.

La invención también se refiere a una quimera IL6R/IL6 o una muteína de la misma, opcionalmente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la fabricación de un medicamento para aumentar la dosis de un agente quimioterapéutico en un paciente, en la que el agente de quimioterapia es un alcaloide de la vinca, y adicionalmente en la que la muteína tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la quimera IL6R/IL6 por delección o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de los componentes que se producen naturalmente de la quimera IL6R/IL6 o mediante la adición de uno o más residuos de aminoácidos a la secuencia original de la quimera IL6R/IL6 y es capaz de unirse a gp130.

En una realización preferida, el paciente en necesidad es un paciente de alto riesgo, tal como aquellos pacientes que ya han sufrido diabetes mellitus un periodo prolongado de tiempo, pacientes que ya tienen síntomas neuropáticos debidos a SIDA y pacientes con neuropatías hereditarias o sometidos a tratamiento temprano con quimioterapia neurotóxica, etc.

Además, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una combinación de la quimera IL6R/IL6 o muteína de la misma, y un agente quimioterapéutico, en la que el agente de quimioterapia es un alcaloide de la vinca. En una realización, un agente quimioterapéutico preferido fue vincristina.

En una realización más preferida, la composición farmacéutica comprende además un fármaco adicional tal como, por ejemplo, piridoxina (vitamina B6), antioxidantes (por ejemplo, ácido gamma-linoleico, ácido alfalipoico, inhibidores de PKC e inhibidores de la aldosis reductasa, se usan anticonvulsivos para suprimir los síntomas de dolor, agentes neuroprotectores tales como vitamina B1, vitamina B12, glutamato (Boyle y col., 1996), isoaxonina (Le Quesne y col., 1985), gangliósidos o factor de crecimiento nervioso.

Una "quimera IL-6R/IL-6" (también llamada "IL-6R/IL-6" o "quimera IL-6"), como se usa en la presente memoria, es una molécula química que comprende una parte soluble de gp130 fusionada con toda o una fracción biológicamente activa de interleucina-6. Los restos de la proteína química pueden fusionarse directamente entre sí, o pueden ligarse por cualquier ligador adecuado, tal como un puente de disulfuro o un ligador de polipéptido. El ligador puede ser un péptido ligador corto que puede ser tan corto como 1 a 3 residuos de aminoácidos de longitud o más, por ejemplo, 13 ó 18 residuos de aminoácidos de longitud. Dicho ligador puede ser un tripéptido de la secuencia E-F-M (Glu-Phe-Met), por ejemplo, o una secuencia de ligador de 13 aminoácidos que comprende Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met introducida entre la secuencia de aminoácidos del receptor de IL-6 soluble gp 130 y la secuencia de IL-6. Ejemplos de quimera IL-6R/IL-6 se conocen en la técnica y se han descrito en detalle, por ejemplo, en los documentos WO 99/02552 o WO 97/32891.

Los términos "tratar/curar y prevenir" como se usan en la presente memoria deben entenderse como prevenir, inhibir, atenuar, mejorar o invertir uno o más síntomas o causas de neuropatía por quimioterapia, además de síntomas, enfermedades o complicaciones que acompañan a la neuropatía por quimioterapia. Cuando se "trata/cura" neuropatía por quimioterapia, las sustancias según la invención se administran después de la aparición de la

enfermedad, "prevención" se refiere a la administración de las sustancias antes de que pueda observarse cualquier signo de enfermedad en el paciente.

El término "neuropatía por quimioterapia" se refiere a cualquier forma de neuropatía por quimioterapia, o a uno o más síntomas o trastornos acompañantes o producidos por neuropatía por quimioterapia, o complicaciones de quimioterapia que afectan a los nervios como se describe en detalle en la introducción anterior.

El término "dosis" se refiere a la cantidad que va a administrarse de una vez, tal como una cantidad especificada de medicación.

El término "dosificación" se refiere a la determinación y regulación del tamaño, frecuencia y número de dosis.

Como se usa en la presente memoria, el término "muteínas" se refiere a análogos de una quimera IL6R/IL6, en los que uno o más de los residuos de aminoácidos de los componentes que se producen naturalmente de la quimera IL6R/IL6 están sustituidos con diferentes residuos de aminoácidos, o están delecionados, o uno o más residuos de aminoácidos se añaden a la secuencia original de una quimera IL6R/IL6, sin cambiar considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con la quimera IL6R/IL6 original. Estas muteínas se preparan por síntesis conocida y/o por técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, o cualquier otra técnica conocida adecuada para ello.

Las muteínas según la presente invención incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, tales como ADN o ARN, que se hibridan con ADN o ARN, que codifican una quimera IL6R/IL6, según la presente invención, bajo condiciones rigurosas. El término "condiciones rigurosas" se refiere a la hibridación y posteriores condiciones de lavado, a las que aquellos expertos habituales en la materia se refieren convencionalmente como "rigurosas". Véanse Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, arriba, Interscience, N.Y., §§6.3 y 6.4 (1987, 1992) y Sambrook y col., (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 12-20 °C por debajo de la T_m calculada del híbrido en estudio en, por ejemplo, 2 x SSC y 0,5 % de 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, a 0,1 x SSC y 0,5 % de SDS a 68 °C durante 30-60 minutos. Aquellos expertos habituales en esta materia entienden que las condiciones de rigurosidad también dependen de la longitud de las secuencias de ADN, sondas de oligonucleótidos (tales como 10-40 bases) o sondas de oligonucleótidos mixtas. Si se usan sondas mixtas, es preferible usar cloruro de tetrametilamonio (TMAC) en lugar de SSC. Véase Ausubel, arriba.

Cualquier muteína tal tiene preferentemente una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativa de la de una quimera IL6R/IL6, de forma que tenga actividad sustancialmente similar, o incluso mejor, para la quimera IL6R/IL6.

La actividad característica de la quimera IL6R/IL6 es la capacidad de unirse a gp130. Mientras que la muteína tenga capacidad sustancial de unión a gp 130 puede considerarse que tiene actividad sustancialmente similar a la quimera IL6R/IL6. Así, puede determinarse si cualquier muteína dada tiene o no al menos sustancialmente la misma actividad que la quimera IL6R/IL6 por medio de experimentación rutinaria que comprende someter hepatocitos a tal muteína, y determinar si induce o no la proliferación de hepatocitos, por ejemplo, midiendo BrdU o la captación de metionina marcada o solo contando las células con respecto a células de control no tratadas y células tratadas con quimera IL6R/IL6 WT. Se ha descrito en detalle un ensayo tipo ELISA para medir la unión de quimera IL-6R/IL-6 a gp130 en el Ejemplo 7 en la página 39 del documento WO 99/02552.

Una placa de 96 pocillos de microtítulo (Nunc) se recubre con anticuerpo monoclonal anti-gp130 humana y se añaden 50 ng/ml de gp130 (ambos de R & D System, Minneapolis). Después de lavar en solución salina tamponada con fosfato, la quimera IL-6R/IL-6 se añade en diferentes pocillos a diferentes concentraciones que oscilan de 0,1 a 50 ng/ml. Después de la incubación durante la noche a 40 °C se añade un policlonal de conejo anti-IL-6R (Oh y col., *Cytokine*, 8,401-409, 1996), seguido de anticuerpo de cabra anti-Ig de conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante, que se detecta por reacción coloreada (Sigma, St. Louis).

Mientras que el mutante tenga actividad de unión sustancial a gp130 puede considerarse que tiene actividad sustancialmente similar a IL-6R/IL-6.

Así puede determinarse si cualquier mutante dado tiene o no al menos sustancialmente la misma actividad que la quimera IL-6R/IL-6 por medio de experimentación rutinaria que comprende someter tal mutante, por ejemplo, a un ensayo de unión de sándwich simple para determinar si se une o no a una gp130 inmovilizada o gp130 soluble (fragmento extracelular de gp130) como se describe en el Ejemplo 7 del documento WO 99/02552.

En una realización preferida, cualquier muteína tal tiene al menos el 40 % de identidad u homología con la secuencia de quimera IL-6R/IL-6 madura. Más preferentemente, tiene al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o, lo más preferentemente, al menos el 90 % de identidad u homología con la misma.

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

- 5 Para secuencias donde no hay una correspondencia exacta puede determinarse un “% de identidad”. En general, las dos secuencias que van a compararse se alinean para dar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir insertar “huecos” en cualquiera o ambas secuencias, para potenciar el grado de alineamiento. Puede determinarse un % de identidad a lo largo de la longitud completa de cada una de las secuencias que se comparan (llamado alineamiento global), que es particularmente adecuado para secuencias de la misma longitud o muy similar, o a lo largo de longitudes definidas más cortas (llamado alineamiento local), que es más adecuado para secuencias de longitud desigual.

- 15 Los procedimientos para comparar la identidad y homología de dos o más secuencias son muy conocidos en la técnica. Así, por ejemplo, programas disponibles en el Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 9.1 (Devereux J y col., 1984), por ejemplo, los programas BESTFIT y GAP, pueden usarse para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos 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 única de similitud entre dos secuencias. Otros programas para determinar la identidad y/o similitud entre secuencias también se conocen en la técnica, por ejemplo, la familia de programas BLAST (Altschul S F y col., 1990, Altschul S F y col., 1997, accesible mediante la página de inicio del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson W R, 1990; Pearson 1988).

Las muteínas de la quimera IL-6R/IL-6, que pueden usarse según la presente invención, o ácido nucleico que codifica las mismas, incluyen un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos o polinucleótidos de sustitución que pueden obtenerse rutinariamente por un experto habitual en la materia, sin excesiva experimentación, basándose en las enseñanzas y orientación presentada en la presente memoria.

- 25 Cambios preferidos para muteínas según la presente invención son lo que se conocen como sustituciones “conservativas”. Las sustituciones de aminoácidos conservativas de la quimera IL-6R/IL-6 pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tiene propiedades fisicoquímicas suficientemente similares de forma que la sustitución entre miembros del grupo preserve la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Es evidente que las inserciones y deleciones de aminoácidos también pueden hacerse en las secuencias anteriormente definidas sin alterar su función, particularmente si las inserciones o deleciones solo implican algunos aminoácidos, por ejemplo, menos de treinta, y preferentemente menos de diez, y no eliminan o desplazan aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, por ejemplo, residuos de cisteína. Las proteínas y muteínas producidas por tales deleciones y/o inserciones están dentro del alcance de la presente invención.

- 35 Preferentemente, grupos de aminoácidos sinónimos son aquellos definidos en la Tabla A. Más preferentemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son aquellos definidos en la Tabla B; y lo más preferentemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son aquellos definidos en la Tabla C.

TABLA A

Grupos preferidos de aminoácidos sinónimos

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

TABLA B

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 C

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, Tie, Leu
Trp	Met

5 Ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que pueden usarse para obtener muteínas de polipéptidos de IL-6, para su uso en la presente invención, incluyen cualquier etapa de procedimiento conocida, tales como las presentadas en las patentes US 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, a Mark y col.; 5.116.943 a Koths y col., 4.965.195 a Namen y col.; 4.879.111 a Chong y col.; y 5.017.691 a Lee y col.; y proteínas sustituidas con lisina presentadas en la patente US 4.904.584 (Shaw y col.).

10 El término "proteína fusionada" se refiere a un polipéptido que comprende una quimera IL-6R/IL-6, o una muteína o fragmento de la misma, fusionado con otra proteína, que, por ejemplo, tiene un tiempo de residencia prolongado en fluidos corporales. Una quimera IL-6R/IL-6 puede así fusionarse con otra proteína, polipéptido o similares, por ejemplo, una inmunoglobulina o un fragmento de la misma.

15 "Derivados funcionales" como se usa en la presente memoria cubre derivados de quimera IL-6R/IL-6, y sus muteínas y proteínas fusionadas, que pueden prepararse a partir de los grupos funcionales que se producen como cadenas laterales sobre los residuos o los grupos del extremo N o C, por medios conocidos en la técnica, y están incluidos en la invención en tanto que sigan siendo farmacéuticamente aceptables, es decir, no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de la quimera IL-6R/IL-6, y no confieran propiedades tóxicas a

composiciones que la contienen.

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

El término "sales" en la presente memoria se refiere a tanto sales de grupos carboxilo como a sales de adición de ácido de grupos amino de la molécula de quimera IL-6R/L-6 o análogos de las mismas. Las sales de un grupo carboxilo pueden formarse por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de cinc, y similares, y sales con bases orgánicas como aquellas formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Sales de adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cualquiera de tales sales debe retener la actividad biológica de la quimera IL-6R/IL-6, por ejemplo, la capacidad para prevenir o mejorar NPIQ y/o la capacidad para unirse a gp130.

Las "isoformas" de la quimera IL-6R/IL-6 son proteínas que pueden unirse a gp130 o fragmento de la misma, que pueden producirse por corte y empalme alternativo.

El término "derivados circularmente permutados" como se usa en la presente memoria se refiere a una molécula lineal en la que los extremos se han unido juntos, tanto directamente como mediante un ligador, para producir una molécula circular, y luego la molécula circular se abre en otra localización para producir una nueva molécula lineal con extremos diferentes de los extremos en la molécula original. Permutaciones circulares incluyen aquellas moléculas cuya estructura es equivalente a una molécula que se ha circularizado y luego se ha abierto. Así, una molécula circularmente permutada puede sintetizarse *de novo* como una molécula lineal y nunca pasa por una etapa de circularización y apertura. La preparación de derivados circularmente permutados se describe en el documento WO95/27732.

La quimera IL-6 puede seleccionarse de la descrita por Chebath y col. (Eur Cytokine Netw. 1997 Dec;8(4):359-65. 1997), hiper-interleucina-6 por Fischer y col. (Fischer y col., Nat Biotechnol. 1997 Feb;15(2):142-5) y la proteína fusionada con enlace directo de receptor de IL-6 a IL-6 por Ekida Teiji, Ide Teruhiko (documento WO0001731).

En una realización preferida de la invención, la quimera IL-6 está glucosilada en uno o más sitios.

Una forma glucosilada de una quimera IL6R/IL6 se ha descrito en el documento WO 99/02552 (PCT/IL98/00321), que es la molécula quimérica altamente preferida según la invención. La quimera IL6R/IL6 descrita allí es una glucoproteína recombinante que se obtuvo fusionando la secuencia codificante entera del receptor de IL-6 soluble que se produce naturalmente δ -vial (Novick y col., J Chromatogr. 1990 Jun 27;510:331-7) con la secuencia codificante entera de IL-6 que se produce naturalmente madura, ambas de origen humano.

La quimera IL-6R/IL-6 según la invención puede producirse en cualquier tipo de célula eucariota o procariota adecuada, como células de levadura, células de insecto, bacteria y similares. Se produce preferentemente en células de mamífero, lo más preferentemente en células CHO genéticamente manipuladas como se describe en el documento WO 99/02552.

En otra realización de la invención, la sustancia de la invención no está glucosilada. Ventajosamente, la molécula puede entonces producirse en células bacterianas, que no son capaces de sintetizar residuos de glucosilo, pero normalmente tienen un alto rendimiento de proteína recombinante producida. La producción de quimera IL-6R/IL-6 no glucosilada puede hacerse, por ejemplo, en bacterias como se ha descrito para la producción de IL-6 no glucosilada que se ha descrito en detalle en el documento EP504751B1.

En todavía otra realización, la sustancia según la invención comprende una fusión de inmunoglobulinas, es decir, las moléculas según la invención están fusionadas con toda o una porción de una inmunoglobulina. Los procedimientos para preparar proteínas de fusión de inmunoglobulina son muy conocidos en la técnica, tales como los descritos en, por ejemplo, el documento WO 01/03737. El experto en la materia entenderá que la proteína de fusión resultante de la invención retiene la actividad biológica de la quimera IL-6R/IL-6. La proteína de fusión resultante tiene idealmente propiedades mejoradas, tales como un prolongado tiempo de residencia en fluidos corporales (semivida), elevada actividad específica, elevado nivel de expresión, o purificación facilitada de la proteína de fusión.

Preferentemente, la sustancia según la invención está fusionada con la región constante de una molécula de Ig. Puede fusionarse con regiones de la cadena pesada, por ejemplo, como los dominios CH2 y CH3 de IgG1 humana. Otras isoformas de moléculas de Ig también son adecuadas para la generación de proteínas de fusión según la presente invención tales como, por ejemplo, isoformas IgG2 o IgG4, u otras clases de Ig, como IgM o IgA. Las proteínas de fusión pueden ser monómeras o multímeras, hetero u homomultímeras.

Los derivados funcionales de la sustancia según la invención pueden conjugarse con polímeros con el fin de mejorar las propiedades de la proteína, tales como la estabilidad, semivida, biodisponibilidad, tolerancia por el cuerpo humano o inmunogenicidad.

- 5 Por tanto, una realización preferida de la invención se refiere a un derivado funcional de la sustancia según la invención que comprende al menos un resto unido a uno o más grupos funcionales, que se producen como una o más cadenas laterales sobre los residuos de aminoácidos.

Una realización altamente preferida se refiere a una sustancia de la invención ligada a polietilenglicol (PEG). La PEGilación puede llevarse a cabo mediante procedimientos conocidos tales como, por ejemplo, los descritos en el documento WO 92/13095.

- 10 La definición de "farmacéuticamente aceptable" pretende englobar cualquier vehículo, que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del principio activo y que no es tóxico para el huésped al que se administra. Por ejemplo, para administración parenteral, la quimera IL-6R/IL-6 puede formularse en una forma de dosificación unitaria para inyección en vehículos tales como solución salina, disolución de dextrosa, albúmina de suero y disolución de Ringer.

- 15 El medicamento que comprende la quimera IL-6R/IL-6 puede administrarse a un paciente en necesidad de administración del mismo en una variedad de formas. Las vías de administración pueden ser vías intrahepática, intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, epidural, tópica e intranasal. Puede usarse cualquier otra vía de administración terapéuticamente eficaz, por ejemplo, absorción a través de los tejidos epiteliales o endoteliales o por terapia génica
- 20 en la que una molécula de ADN que codifica la quimera IL-6R/IL-6 se administra al paciente (por ejemplo, mediante un vector), que hace que la quimera IL-6R/IL-6 se exprese y secrete *in vivo*. Además, la quimera IL-6R/IL-6 puede administrarse junto con otros componentes de agentes biológicamente activos tales como tensioactivos, excipientes, soportes, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

- 25 Para administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular), la quimera IL-6R/IL-6 puede formularse como una disolución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, agua, solución salina, disolución de dextrosa) y aditivos que mantienen la isotonicidad (por ejemplo, manitol) o estabilidad química (por ejemplo, conservantes y tampones). La formulación se esteriliza por técnicas comúnmente usadas.

- 30 Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de los principios activos que es suficiente para afectar el transcurso y la gravedad de las enfermedades descritas anteriormente, conduciendo a la reducción o remisión de tal patología. La cantidad eficaz dependerá de la vía de administración y la afección del paciente.

- 35 La dosificación administrada, como dosis única o múltiples dosis, a un individuo variará dependiendo de una variedad de factores, que incluyen propiedades farmacocinéticas de la quimera IL-6R/IL-6, la vía de administración, condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), grado de síntomas, tratamientos concurrentes, frecuencia de tratamiento y el efecto deseado. El ajuste y manipulación de intervalos de dosificación establecidos están perfectamente dentro de la capacidad de aquellos expertos.

La invención se refiere al uso de una quimera IL-6R/IL-6 o una muteína de la misma en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de NPIQ.

- 40 La dosis de quimera IL-6R/IL-6 puede administrarse antes, durante y/o después de la quimioterapia. La dosis de quimera IL-6R/IL-6 puede administrarse profilácticamente antes de establecer NPIQ o para tratar NPIQ establecida.

Habiendo ahora descrito completamente la presente invención, se apreciará por aquellos expertos en la materia que la misma puede realizarse dentro de un amplio intervalo de parámetros, concentraciones y condiciones equivalentes sin apartarse del alcance de la invención y sin excesiva experimentación.

- 45 Aunque la presente invención se ha descrito a propósito de realizaciones específicas de la misma, se entenderá que es capaz de más modificaciones.

Referencia a etapas de procedimiento conocidas, etapas de procedimientos convencionales, procedimientos conocidos o procedimientos convencionales no es de ninguna forma una admisión de que cualquier aspecto, descripción o realización de la presente invención se haya desvelado, enseñado o sugerido en la técnica relevante.

- 50 La presente invención se describirá ahora en más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes y los dibujos adjuntos.

EJEMPLOS**Ejemplo 1: Efectos *in vitro* de la quimera IL-6R/IL-6 sobre células de los ganglios de la raíz dorsal intoxicadas por vincristina.**

La quimera IL-6R/IL-6 (Chebath y col., 1997) se usó para explorar la prevención contra intoxicación por vincristina *in vitro*. Para este fin, cultivos de ganglios de la raíz dorsal (GRD) de embriones de ratón (día E17) en los que la excrecencia neuronal se estimuló por factor de crecimiento nervioso (NGF) se expusieron posteriormente a vincristina 10 nM que induce un proceso de degeneración axonal progresivo (Wang y col., J Neuropathol Exp Neurol. 2000 Jul;59(7):599-606). Después de 2 días, una considerable pérdida de axones en la excrecencia de GRD fue evidente después de la inmunotinción para β III-tubulina (Fig. 1, paneles B frente a A). La adición de IL-6R/IL-6 durante el tratamiento por vincristina previno la degeneración axonal (panel C). La neurodegeneración se examinó adicionalmente monitorizando la activación proteolítica de caspasa-3, que indica las fases tempranas de apoptosis en diversas neuropatías (Russell y col., Neurobiol Dis. 1999 Oct;6(5):347-63). La reacción positiva a anticuerpos contra caspasa-3 activada se observó en los cultivos de GRD tratados durante 5 días con vincristina (panel D). Sin embargo, cuando IL-6R/IL-6 estuvo presente durante el tratamiento con vincristina no hubo prácticamente activación de caspasa-3 (panel E).

Ejemplo 2: Efectos *in vitro* de la quimera IL-6R/IL-6 sobre células de los ganglios de la raíz dorsal intoxicadas por vincristina.

Se investigó adicionalmente si IL-6R/IL-6 podría tener o no efectos regenerativos neurales añadiendo IL-6R/IL-6 después de que hubiera tenido lugar la acción de vincristina. Un experimento tal llevado a cabo con GRD de embriones de E18,5 de ratones deficientes en IL-6 (IL-6 $-/-$) se muestra en la Figura 2. Los cultivos en los que la red axonal se formó en presencia de NGF durante 5 días tanto continuaron durante otros 11 días sin o con IL-6R/IL-6 (panel A y B, respectivamente) como se trataron durante 5 días por vincristina, momento en el que la vincristina se eliminó y el cultivo continuó durante 6 días más (paneles C-F). La amplia degeneración de la red axonal se observó todavía 6 días después de eliminar la vincristina (panel C), pero cuando se añadió IL-6R/IL-6, después de la eliminación de vincristina, se observó un significativo re-crecimiento de los axones (panel D). En paralelo, en cultivos inmunoteñidos para proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), se encontró que la adición de IL-6R/IL-6 produjo un marcado excrecimiento de células de la glía (panel F) con respecto a los cultivos de control 6 días después de la eliminación de la vincristina (panel E). En varios experimentos similares, los efectos regenerativos neurales de IL-6R/IL-6 se observaron en cultivos de GRD de ratones IL-6 $+/+$, y ya fueron evidentes dos días después de la adición de IL-6R/IL-6 (no mostrado). Estos experimentos indican que la quimera IL-6R/IL-6 ha promovido la regeneración de células neurales y de la glía cuando se añade después de la exposición al agente quimioterapéutico.

Ejemplo 3: Cultivos de ganglios de la raíz dorsal (GRD), tratamientos con vincristina e IL-6R/IL-6.

Se prepararon GRD como se ha detallado antes (Haggiag y col., 1999, 2001) a partir de embriones de ratones F1 (C57BL/6x129Sv). En algunos experimentos se usaron ratones mutantes IL-6 $-/-$ correspondientes (Mendel y col., 1998). Los GRD se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio (previamente recubiertos con una disolución de 20 μ g/ml de poli-D-lisina, 250 μ g/ml de fibronectina), que se colocaron en placas Costar de 12 pocillos. El medio de cultivo regular fue 0,5 ml de medio DMEM/F12 con 1 % de suplemento de N₂, 10 % de suero bovino fetal, 2 % de suero de caballo, glutamina 1,4 mM (todos de Gibco/Invitrogen) y 50 ng/ml de NGF (2.5S; Alomone Labs, Jerusalén, Israel). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C, 5 % de CO₂ y el medio se sustituyó cada tres días. En el día 5, algunos de los pocillos se complementaron con sal de sulfato de vincristina 10 nM (Sigma, St Louis, MO), o vincristina junto con 200 ng/ml de IL-6R/IL-6 recombinante pura, preparada como se ha descrito (Chebath y col., 1997). Después de 2-5 días, los cultivos se fijaron en 4 % de paraformaldehído, 10 minutos a temperatura ambiente (TA), se lavaron en PBS, luego se trataron con 0,5 % de Triton X-100 y 10 % de suero de cabra normal en PBS durante 3 minutos a TA y se lavaron 3 veces con 1 % de NGS. Para estudiar los efectos curativos, cultivos celulares de GRD similares tratados en el día 5 con vincristina (5 nM) se lavaron en el día 10 para eliminar la vincristina y se repusieron con el medio regular anterior tanto solo como complementado con 200 ng/ml de IL-6R/IL-6 y el cultivo continuó durante 6 días más antes de la fijación.

Ejemplo 4: Inmunotinción

La inmunotinción fue durante la noche a TA con el anticuerpo monoclonal de ratón TUJ1 anticuerpo anti- β III-tubulina neuronal (Covance, Berkeley, CA; MMS-435P, diluido 1:500) y la forma activada de Ab-4 anti-caspasa-3 (Oncogene Research Products, San Diego, CA; AM65, diluido 1:200). Los segundos anticuerpos fueron anticuerpo de cabra anti-IgG ratón conjugada con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR; A11029, diluido 1:200) para tubulina y fragmento específico F(ab')₂ de cabra anti-IgG de ratón purificada por afinidad conjugada con Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA; diluido 1:600) para caspasa. El anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con anti-GFAP-Cy3 (Sigma-Aldrich; C9205, diluido 1:400) se aplicó 1 hora a TA. Después de lavar en PBS, los cubreobjetos se montaron en Mowiol (Calbiochem, LaJolla, CA) y se fotografiaron en un microscopio Olympus IX-70 FLA con una cámara digital DVC-1310C (DVS, Austin, TX) y las imágenes se procesaron por Photoshop.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una quimera IL6R/IL6, o una muteína de la misma, en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de neuropatía periférica inducida por quimioterapia (NPIQ), en el que el agente de quimioterapia es un alcaloide de la vinca, y adicionalmente en el que la muteína tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la quimera IL6R/IL6 por delección o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de los componentes que se producen naturalmente de la quimera IL6R/IL6 o mediante la adición de uno o más residuos de aminoácidos a la secuencia original de la quimera IL6R/IL6 y es capaz de unirse a gp130.
2. El uso según la reivindicación 1, en el que la neuropatía periférica se produce por vinblastina, vincristina o una mezcla de las mismas.
3. El uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que la quimera IL6R/IL6 o muteína de la misma está glucosilada en uno o más sitios.
4. El uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que la quimera IL6R/IL6 o muteína de la misma no está glucosilada.
5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muteína comprende al menos un resto unido a uno o más grupos funcionales.
6. El uso según la reivindicación 5, en el que el resto es un resto de polietileno.
7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el medicamento comprende una célula que expresa una quimera IL6R/IL6 o una muteína de la misma.
8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el medicamento comprende un vector de expresión que comprende la secuencia codificante de una quimera IL6R/IL6 o muteína de la misma.
9. El uso según la reivindicación 8, en el que el vector es un vector lentiviral.
10. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el medicamento comprende opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. El uso de la reivindicación 10, en el que el paciente es un paciente de alto riesgo seleccionado de pacientes que padecen diabetes, SIDA, neuropatías hereditarias y pacientes sometidos a tratamiento temprano con fármacos neurotóxicos.
12. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en el que la vía de administración del medicamento está seleccionada de intrahepática, intradérmica, intraplantar, transdérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, epidural, tópica e intranasal.
13. Uso de una quimera IL6R/IL6 o una muteína de la misma, opcionalmente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la fabricación de un medicamento para aumentar la dosis de un agente quimioterapéutico en un paciente, en el que el agente de quimioterapia es un alcaloide de la vinca, y adicionalmente en el que la muteína tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la quimera IL6R/IL6 por delección o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de los componentes que se producen naturalmente de la quimera IL6R/IL6 o mediante la adición de uno o más residuos de aminoácidos a la secuencia original de la quimera IL6R/IL6 y es capaz de unirse a gp130.
14. El uso según la reivindicación 13, en el que el medicamento se administra tanto antes, durante como después del agente de quimioterapia.
15. Una composición farmacéutica que comprende una combinación de una quimera IL6R/IL6 o una muteína de la misma y un agente quimioterapéutico en la que el agente de quimioterapia es un alcaloide de la vinca, y adicionalmente en la que la muteína tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la quimera IL6R/IL6 por delección o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de los componentes que se producen naturalmente de la quimera IL6R/IL6 o mediante la adición de uno o más residuos de aminoácidos a la secuencia original de la quimera IL6R/IL6 y es capaz de unirse a gp130.
16. La composición farmacéutica según la reivindicación 15, en la que el alcaloide de la vinca está seleccionado de vinblastina, vincristina o una mezcla de las mismas.
17. La composición farmacéutica según la reivindicación 15 ó 16, que comprende además un fármaco adicional seleccionado de antioxidantes, inhibidores de PKC y agentes neuroprotectores.
18. La composición farmacéutica según la reivindicación 17, en la que el fármaco adicional está seleccionado de glutamato, piridoxina, ácido gamma-linoleico, vitamina B1, vitamina B2, isoaxonina, gangliósido y NGF.

- 5 19. Una quimera IL6R/IL6, o una muteína de la misma, para su uso en la prevención y/o tratamiento de neuropatía periférica inducida por quimioterapia (NPIQ), en la que el agente de quimioterapia es un alcaloide de la vinca, y adicionalmente en la que la muteína tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la quimera IL6R/IL6 por delección o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de los componentes que se producen naturalmente de la quimera IL6R/IL6 o mediante la adición de uno o más residuos de aminoácidos a la secuencia original de la quimera IL6R/IL6 y es capaz de unirse a gp130.
- 10 20. Una quimera IL6R/IL6, o una muteína de la misma, para su uso en aumentar la dosis de un agente quimioterapéutico en un paciente, en la que el agente de quimioterapia es un alcaloide de la vinca, y adicionalmente en la que la muteína tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la quimera IL6R/IL6 por delección, inserción, adición de aminoácidos o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de los componentes que se producen naturalmente de la quimera IL6R/IL6 o mediante la adición de uno o más residuos de aminoácidos a la secuencia original de la quimera IL6R/IL6 y es capaz de unirse a gp130.

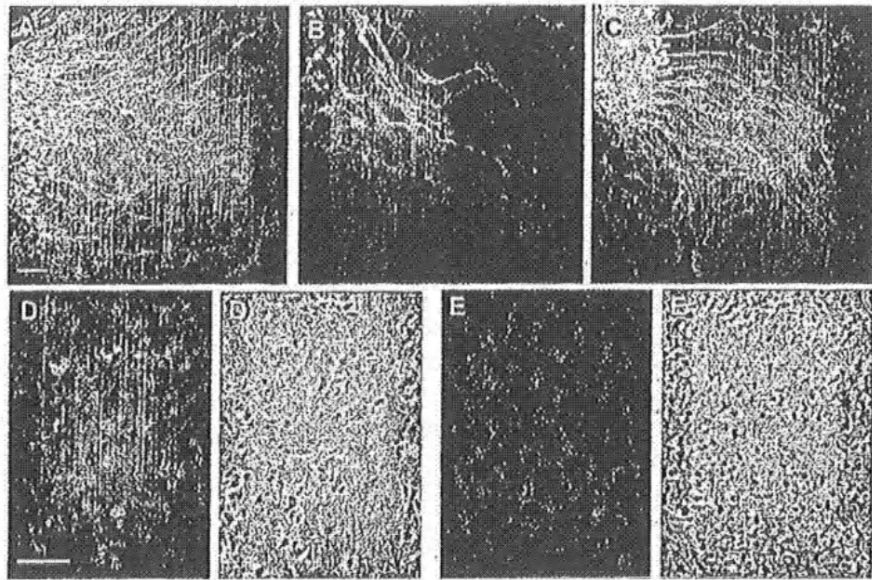


Figura 1

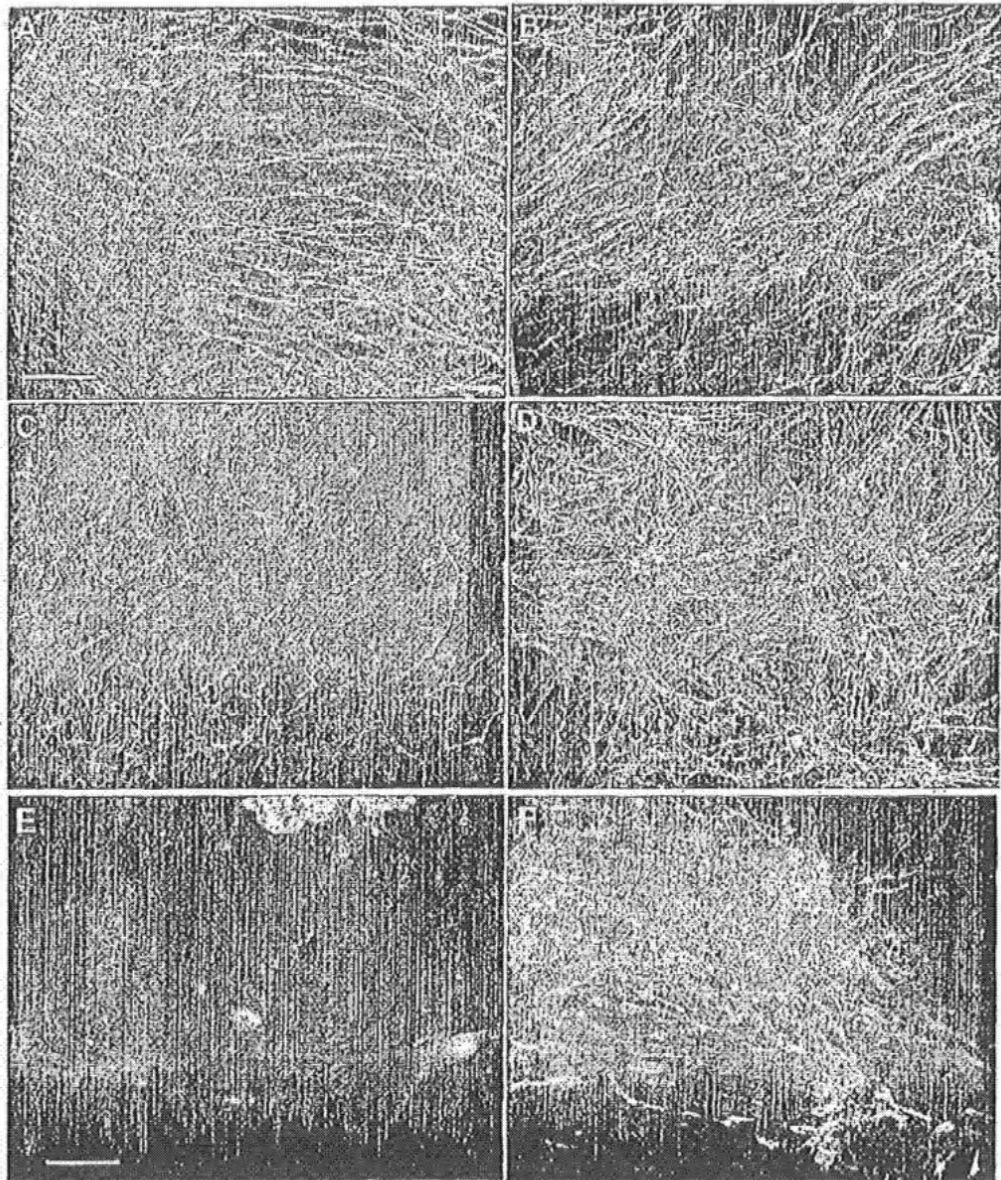


Figura 2