

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 493 391**

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2004 E 04806689 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 1744777**

54 Título: **Uso de IL-6 en la preparación de composiciones farmacéuticas para tratar y prevenir lesiones hepáticas**

30 Prioridad:

24.12.2003 IL 15955803

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

11.09.2014

73 Titular/es:

**MERCK SERONO SA (100.0%)
CENTRE INDUSTRIEL
1267 COINSINS, VAUD, CH**

72 Inventor/es:

**SCHIAFFONATI, LUISA;
TIBERIO, GUIDO A. M.;
GAROTTA, GIANNI y
DREANO, MICHEL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 493 391 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 IL-6 en la preparación de composiciones farmacéuticas para tratar y prevenir lesiones hepáticas

Campo de la invención

5 La presente invención está en el campo del uso de IL-6 en una lesión hepática. En particular, se refiere al uso IL-6 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cirrosis, tratada mediante resección hepática o tratada mediante injerto del hígado en el intervalo de 0,1 a 10 µg/kg.

Antecedentes de la invención

10 La mayoría de las causas comunes de la lesión hepática da lugar a cirrosis. La cirrosis implica la destrucción del tejido hepático normal que deja un tejido de cicatriz sin funcionamiento que rodea zonas del tejido hepático en funcionamiento, acompañado de la formación de nódulos hepáticos regenerativos.

El daño o lesión del hígado puede tener diversas causas. Puede ser debido a infecciones virales o bacterianas, abuso del alcohol, trastornos inmunológicos o cáncer, por ejemplo.

15 La hepatitis viral, debida al virus de la hepatitis B y hepatitis C, por ejemplo, son enfermedades escasamente abordadas que afectan a un gran número de personas en todo el mundo. El número de especies de virus de la hepatitis conocido está creciendo constantemente. Aparte del virus de la hepatitis B y C, han sido descubiertos al menos otros cuatro virus que provocan hepatitis asociada a virus hasta ahora denominados virus de la hepatitis A, D, E y G.

A veces, las sustancias que normalmente son no tóxicas pueden resultar hepatotóxicas cuando se abusa de ellas como las sobredosis de acetaminofeno (APAP) y el etanol.

20 La enfermedad hepática alcohólica es otra enfermedad ampliamente extendida asociada con el consumo crónico de alcohol. La hepatitis inmune es una enfermedad autoinmune rara que está escasamente abordada. La lesión hepática incluye también daños de los conductos biliares. La cirrosis biliar primaria (PBC) es una enfermedad hepática autoinmune caracterizada por la destrucción de los conductos biliares intrahepáticos.

25 Recientemente se encontró que la lesión hepática era un efecto secundario de la terapia génica, por ejemplo, la lesión hepatocelular aguda caracterizada por una necrosis de hepatocitos centrilobulares es un efecto secundario principal de terapias génicas de base viral dirigidas a diana al hígado (Nielsen et al., 1998; Bao et al., 1996).

30 Diversos estudios han demostrado que el daño al hígado en enfermedades como hepatitis alcohólicas, cirrosis hepáticas, hepatitis viral y cirrosis biliar primaria está asociado con las respuestas de células 1 T-helper (Th1) (Nishimura and Ohta, 1999) (Okamoto et al., 1998) (Harada et al., 1997) (Lee et al., 1999) (Baroni et al., 1999). Los niveles elevados del ligando FAS y su receptor (CD95) fueron descritos en el hígado de pacientes de hepatitis B y C (Luo et al., 1997) (Hiramatsu et al, 1994; Okazaki et al., 1996) por tanto, el ligando FAS se considera que es uno de los agentes citotóxicos principales que conducen a la apoptosis de hepatocitos.

35 El ligando FAS y su receptor están también elevados en enfermedades alcohólicas, sugiriendo una vez más que las citoquinas Th1 están implicadas en procedimientos autoinmunes inducidos en hepatitis alcohólica (Galle et al., 1995; Taieb et al., 1998; Fiore et al., 1999).

El tratamiento de la cirrosis incluye retirar agentes tóxicos como el alcohol, recibir una nutrición apropiada que incluye complementos de vitaminas y tratar las complicaciones a medida que surgen. El trasplante de hígado es actualmente la única cura y puede ayudar a una persona con cirrosis avanzada.

40 En las fases tempranas de la cirrosis, los pacientes son clasificados como compensados, queriendo indicar que aunque se haya producido un daño del tejido hepático, el hígado del paciente todavía es capaz de toxicar metabolitos en la corriente sanguínea. Además, muchos pacientes con enfermedad hepática compensada no presentan síntomas. En las fases tardías de la cirrosis, los pacientes se clasifican como descompensados, queriendo indicar que su capacidad para detoxificar metabolitos en la corriente sanguínea está disminuida y esta

fase es en la que pueden estar presentes las siguientes características clínicas: varices esofágicas, ascitis, ictericia y encefalopatía (Zakim D, Boyer T D. *Hepatology: A Textbook of Liver Disease, Second Edition, Volume 1, 1990*, W. B. Saunders Company, Philadelphia).

5 El hígado es también único en cuanto es el único órgano de mamíferos que puede regenerar su masa parenquimal funcional biológicamente a continuación de una resección o lesión en lugar de curar con tejido de cicatriz biológicamente no funcional.

10 La capacidad de un paciente para restaurar la masa hepática pre-operatoria a continuación de una resección hepática principal es bien conocida (Hadjis, 1990). Por lo tanto, la capacidad para inducir la regeneración de una masa hepática funcional adecuada sería un avance significativo que podría prevenir muchas muertes por fallo hepático. La capacidad para inducir o mejorar la proliferación hepato-celular permitiría que las enfermedades malignas hepáticas fueran reseccionadas y facilitarían el aumento de tejido hepático sano. Esto prevendría la muerte post-operatoria del paciente a partir de un fallo hepático debido a una masa hepática funcional restante demasiado pequeña. Lo mismo se puede decir, por ejemplo, de pacientes que sufren un fallo hepático fulminante a partir de causas tóxicas metabólicas o virales si se pudiera inducir que el hígado nativo se regenerara a una velocidad que restaurara una función hepática adecuada.

20 Kokudo et al. (1992) establecieron un modelo de animal para investigar la respuesta regenerativa del hígado cirrótico después de una hepatectomía, por ejemplo, mediante factores añadidos exógenos y, particularmente, mediante el factor de crecimiento transformador α (TGF- α). En este modelo, la cirrosis micronodular fue establecida mediante la administración simultánea de CCL4 y fenobarbital. La síntesis de DNA hepático (incorporación de 3H timidina en DNA) fue ensayada 24 horas después de una hepatectomía parcial en ratas cirróticas en presencia o en ausencia de tratamiento de TGF- α (a las 0 y 12 h después de la hepatectomía).

25 La IL-6 actúa no solamente como un pro-contra sino también como una citoquina inflamatoria (Jones et al., 2001). Las propiedades funcionales de la IL-6 son extremadamente variadas y esto se refleja mediante la terminología originalmente usada para describir esta citoquina (Horst Ibelgaufts' COPE: Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia).

30 Las actividades biológicas de la IL-6 están mediadas por un sistema receptor de membrana que comprende dos proteínas diferentes, una denominada receptor de IL-6 (IL-6R o gp80 examinadas por Jones et al., 2001) y otra gp130 (examinada por Hirano et al., 1994). Algunas formas de IL-6R (sIL-6R), correspondientes al dominio extracelular de gp80, son productos naturales del cuerpo humano que se encuentran como glicoproteínas en la sangre y la orina (Novick et al., 1990, 1992). Una propiedad excepcional de las moléculas de sIL-6R es que actúan como potentes agonistas de IL-6 en muchos tipos de células que incluyen células humanas (Taga et al., 1989; Novick et al., 1992). Incluso sin el dominio intracitoplásmico de gp80, la sIL-6R es capaz todavía de provocar la dimerización de gp130 en respuesta de IL-6 que su a su vez media la posterior transducción de señales específicas de IL-6 y efectos biológicos (Murakami et al., 1993). La sIL-6R tiene dos tipos de interacción gp130, los cuales son ambos esenciales para las actividades biológicas específicas de IL-6 (Halimi et al., 1995), y el complejo de receptor de IL-6 activo se propuso que era una estructura hexámera por dos cadenas gp130, dos IL-6R y dos ligandos de IL-6 (Ward et al., 1994; Paonessa et al., 1995).

40 En contraste con la expresión de la IL-6R afín celular que tiene una distribución celular limitada (examinada por Jones et al., 2001), la expresión de gp130 de expansión trans-membrana se encuentra en casi todos los órganos, incluidos el corazón, riñón, bazo, hígado, pulmón, placenta y cerebro (Saito et al., 1992).

45 Hay muchos ejemplos diferentes que muestran que la IL-6 sola no introduce una actividad específica a menos que se administre IL-6R soluble. Por ejemplo, la IL-6 induce la formación de osteoclastos en co-cultivos de médula ósea de ratón y células osteoblásticas, solamente cuando se combina con sIL-6R (examinado por Jones et al., 2001). También, aunque muchas células neuronales son capaces de producir IL-6, permanecen insensibles a la estimulación por la propia IL-6. La diferenciación y supervivencia de células neuronales, sin embargo, pueden ser mediada a través de la acción de sIL-6R (Hirota, 1996; Martz, 1998).

50 Han sido descritas moléculas quiméricas que conectan el receptor de IL-6 soluble y el IL-6 conjuntamente (Chebath et al., 1997). Han sido denominadas quimera de IL-6R/ IL-6. Las moléculas quiméricas de IL-6R/ IL-6 fueron generadas fusionando las regiones codificadoras completas de cDNAs que codifican el receptor de IL-6 soluble (sIL-6R) y de IL-6. La quimera de IL-6R/ IL-6 recombinante se produjo en células de CHO Chebath et al., 1997, documento WO99/02552). La IL-6R/ IL-6 se une a la cadena de gp130 con una mayor eficacia in vitro de lo que lo hace una mezcla de IL6 con sIL-6R (Kollet et al., 1999).

5 Como se mencionó anteriormente, la señalización de interleucina-6 es facilitada a través de la homodimerización de gp130 al complejo de ligante-receptor. La señalización intracelular es posteriormente provocada a través de la activación de tirosina quinasas citoplásmicas asociadas a gp130 (JAK1, JAK2 y TYK2) y la fosforilación de STAT1 y STAT3 (Murakami et al., 1993; Gerhartz et al., 1996). Por el contrario, los receptores de afinidad elevada de LIF, OSM y CNTF activan células mediante una heterodimerización entre gp130 y proteína relacionada con gp130 (el receptor LIF) (Davis et al., 1993). Estos homo- o hetero-dímeros activan modelos distintos pero superpuestos de fosforilación de tirosina a través de la familia Jak-Tyk de tirosina quinasas citoplásmicas (Boulton et al., 1994). Esto puede contribuir a las diferentes respuestas celulares asociadas con esta familia de proteínas.

10 Aunque se reconoce que la señalización de IL-6 es necesaria para la inducción de factores de transcripción implicados en la regeneración hepática, parece que hay controversia en la técnica con respecto a la administración de IL-6 para la protección/ regeneración hepática. Por una parte, los ratones deficientes en IL-6 se ha mostrado que tienen una regeneración hepática dificultada a continuación de una hepatectomía parcial y la regeneración hepática podría ser reconstituida mediante la administración de IL-6 (Cressman et al., 1996). Los efectos beneficios de la administración de IL-6 fueron descritos también en estados patológicos graves del hígado, por ejemplo, en un modelo de isquemia seguido de resección y en un modelo de hepática aguda inducida por CCL4 solamente (Selzner, 1999; and Kovalovich, 2000, respectivamente). También, la proteína de fusión de IL-6 y el IL-6R soluble se mostraron que eran también beneficiosas para el tratamiento de lesión hepática (documento WO99/02552). Sin embargo, las dosis elevadas de IL-6 que se describió que tenía un efecto beneficioso sobre la protección/ regeneración hepática (por ejemplo, en el intervalo de 500 a 1.000 mcg de IL-6/ kg) no pueden ser consideradas factibles con respecto a la previsión de efectos secundarios no deseados que son de esperar usando estas dosis grandes. Por otra parte, se informó en un modelo de animal de regeneración después de una hepatectomía parcial en ratón que solamente la IL-6 se fusionó al IL-6R (Hyper-IL6), pero la IL-6 sola no pudo inducir la reconstitución acelerada del hígado (Peters et al., 2000).

25 Por tanto, son necesarias nuevas estrategias para tratar el daño hepático provocado por una amplia gama de agentes hepatotóxicos y vectores de terapia génica, particularmente los que favorecen una rápida proliferación de hepatocitos.

Sumario de la invención

30 La presente invención se refiere al uso de una dosis de IL-6 en el intervalo de 0,1 a 10 mcg/kg, o una muteína isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma (es decir, la sustancia según la invención), para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención del daño hepático y, preferentemente, para el tratamiento de cirrosis hepática, que puede ser cirrosis compensada o cirrosis descompensada y, más preferentemente, para cirrosis tratada mediante resección hepática. La sustancia según la invención puede estar glicosilada en uno o más sitios y/o no glicosilada.

35 En una realización, la invención proporciona el uso de la IL-6 fusionada a una inmunoglobulina (Ig), mientras que en otra realización, la invención proporciona el uso de IL-6 fusionada a su receptor soluble, la parte extracelular de gp80.

La invención proporciona también el uso de dosis bajas de una sustancia según la invención en la que el derivado funcional comprende al menos un resto polietileno, unido a uno o más grupos funcionales que se producen como una o más cadenas laterales de los residuos de aminoácidos.

40 En un aspecto, el medicamento según la invención puede comprender una célula que expresa IL-6 o una muteína isoforma, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma.

En otro aspecto, el medicamento según la invención puede comprender un vector de expresión, preferentemente un vector lentiviral que comprende la secuencia codificadora de una IL-6, o una muteína isoforma, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma.

45 Además, la invención proporciona un método para tratar cirrosis hepática que comprende administrar a un paciente que lo necesita una dosis baja de IL-6, o una muteína isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente permutado o una sal de la misma en el intervalo de 0,1 a 10 mcg/kg de peso, opcionalmente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las dosis son de 0,1 mcg/kg, 1 mcg/kg y/o 10 mcg/kg. Las dosis bajas de la sustancia según la invención pueden ser administradas diariamente, tres veces por semana o una vez a la semana.

El método de tratamiento según la invención está destinado al tratamiento de cirrosis hepática tratada mediante resección hepática o tratada mediante injerto de hígado, que puede ser cirrosis compensada o cirrosis descompensada. La sustancia administrada según el método de la invención puede estar glicosilada en uno o más sitio y/o no glicosilada.

- 5 También, la proteína fusionada administrada según el método de la invención puede comprender una fusión de inmunoglobulina (Ig) o un fragmento (gp80) de la misma.

En una realización, el derivado funcional según la invención puede comprender al menos un resto polietileno, unido a uno o más grupos funcionales que se producen como una o más cadenas laterales de los residuos de aminoácidos.

- 10 También, el método según la invención comprende la administración de una célula que expresa una IL-6 o una muteína isoforma, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma o un vector, preferentemente un vector lentiviral, que comprende la secuencia codificadora de una IL-6 o una muteína isoforma, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma.

- 15 Además, la invención proporciona un método para ser usado en el tratamiento de cirrosis hepática tratada mediante resección hepática, como cirrosis grave o cirrosis aguda, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una dosis baja eficaz de IL-6, una muteína, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma, o que comprende administrar a un paciente que lo necesita un vector de expresión que comprende la secuencia codificadora de IL-6, una muteína, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma. El método puede ser para el tratamiento de un paciente que lo necesita, que padece una insuficiencia hepática en fase final, por ejemplo, después de una cirugía hepática resectiva, insuficiencia hepática aguda, lesión que es provocada mediante tratamiento de resección hepática. El método puede ser usado también en una lesión provocada por un rechazo de hígado en un donante de trasplante. Más específicamente, la administración de la sustancia de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo antes, durante y/o después de la resección hepática. La dosis baja de la sustancia está en el intervalo de 0,1 a 10 mcg/kg de peso y es administrada diariamente, preferentemente tres veces por semana y, más preferentemente, una vez a la semana. Además, la dosis baja eficaz de la sustancia puede ser administrada a un paciente que lo necesita con la administración con un vector de expresión que comprende la secuencia codificadora de IL-6, una muteína, proteína fusionada, fracción activa, o derivado circularmente permutado de la misma.

- 20 La invención proporciona también un método para ser usado en el tratamiento de cirrosis hepática a continuación de un injerto, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una dosis baja eficaz de IL-6, una muteína, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma o que comprende administrar a un paciente que lo necesita un vector de expresión que comprende la secuencia codificadora de IL-6, una muteína, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma.

Breve descripción de los dibujos

- 35 La Fig. 1 muestra la mortalidad operativa en ratas tratadas con IL-6 (dosis altas y bajas de IL-6) frente a testigos no tratados.

La Fig. 2 muestra el % de generación de hígado a continuación de un tratamiento de IL-6 después de una resección hepática tratada con IL-6 a las dosis indicadas frente a testigo sin tratar.

La Fig. 3 muestra el % de absorción de BrdU a continuación de un tratamiento de IL-6 como en 2.

- 40 La Fig. 4 muestra la expresión de factores de transcripción después de una inyección de IL-6 en un hígado cirrótico.

La Fig. 5 muestra la expresión de factores de transcripción después de una resección en hígado cirrótico en ratas tratadas con IL-6 o testigos cirróticos sin tratar.

La Fig. 6 muestra la expresión de gp80 y gp130 de receptores de IL-6 en ratas normales y cirróticas sobre el hígado total o hepatocitos purificados.

- 45 La Fig. 7 muestra la relación de [hígado reseccionado (g)/ peso de rata (g)] x 100 en ratas tratadas con IL-6, a las dosis indicadas, frente a ratas cirróticas testigos sin tratar funcionalmente descompensadas.

La Fig. 8 muestra el % de absorción de BrdU en los lóbulos reseccionados de ratas tratadas con IL-6 frente a testigos cirróticos sin tratar funcionalmente descompensados.

La Fig. 9 muestra el % de regeneración de hígado después de una resección hepática en ratas tratadas con IL-6, a las dosis indicadas, frente a testigos cirróticos sin tratar funcionalmente descompensados.

5 Descripción detallada de la invención

La invención se basa en el descubrimiento de que un tratamiento con una dosis baja de IL-6 es eficaz en un modelo de resección hepática de hígado cirrótico. Los resultados beneficiosos obtenidos con una dosis baja de IL-6, que varía en el intervalo de 0,1 a 10 mcg/kg bajo estas condiciones cirróticas hepáticas graves fueron inesperados.

10 Por lo tanto, la invención se refiere al uso de una dosis baja de IL-6, en el intervalo de 0,1 a 10 mcg/kg, o de una muteína isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activada, derivado circularmente permutado o sal de la misma, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cirrosis hepática tratada mediante resección.

15 El término "tratamiento", como se usa en la presente memoria descriptiva, debe entenderse como evitar, inhibir, atenuar, mejorar o invertir cualquiera o la totalidad de los síntomas o causa(s) de la cirrosis hepática, así como los síntomas de enfermedades que acompañan la cirrosis hepáticas y, en particular, los cambios neuroanatómicos y de comportamiento asociados con la enfermedad.

La expresión "cirrosis hepática", como se usa en la presente memoria descriptiva, se denomina también lesión hepática. La enfermedad, así como sus causas, han sido descritas en detalle en el apartado de "Antecedentes de la invención".

20 El término "dosis" se refiere a la cantidad que va a ser administrada en un tiempo como una cantidad especificada de medicación.

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

25 La invención proporciona una nueva posibilidad de tratamiento de la cirrosis hepática, tratada mediante resección. En la actualidad, el tratamiento de la cirrosis incluye la retirada de agentes tóxicos como el alcohol, recibir una nutrición apropiada que incluye complementos vitamínicos y tratar las complicaciones a medida que surgen. El trasplante de hígado es actualmente la única cura y puede ayudar a una persona con cirrosis avanzada. Por tanto, la presente invención presenta un progreso sustancial, a saber, una dosis baja de IL-6, en el intervalo de 0,1 a 10 mcg/kg, que exhibe un efecto beneficioso significativo en la cirrosis hepática experimental. Como se muestra en los ejemplos siguientes, una dosis baja de IL-6, en el intervalo de 0,1 a 10 mcg/kg, exhibió un efecto que fue significativo con respecto a la mejora de las anomalías tratadas en un modelo de animal establecido de cirrosis hepática.

El término "resección" se refiere a la extirpación una parte o la totalidad de un órgano u otra estructura.

La invención se refiere al tratamiento del daño hepático provocado por una amplia gama de agentes hepatotóxicos y vectores de terapia génica mediante la administración de una dosis baja de IL-6 que permite una rápida proliferación de hepatocitos.

35 Los resultados obtenidos muestran claramente que en presencia de una cirrosis funcionalmente compensada y resección, la inyección intraperitoneal de IL-6 no aumenta la mortalidad post-operatoria después de resecciones hepáticas principales y mejora la respuesta fisiológica a una pérdida parenquimal principal induciendo una proliferación masiva de hepatocitos maduros cuando se usan dosis tanto elevadas como bajas.

40 Los resultados obtenidos demostraron también que la IL-6 indujo la activación de STAT-3 y la AP-1 desempeña una función en la mejora de la proliferación hepatocelular en el hígado cirrótico, apoyando adicionalmente el "efecto biológico final" descrito de IL-6.

Se demostró también en una realización que el tratamiento con IL-6 antes de la resección del hígado restaura la activación de NF-κB, normalmente presente en un hígado no cirrótico (Streetz, 2003), pero que está disminuida en un hígado cirrótico.

Además de STAT-3 y AP-1 se encontró que en NF- κ B tiene una función en la disminución de la apoptosis en células hepáticas a continuación de un tratamiento con IL-6, sugiriendo que la expansión de masa hepática inducida por IL-6 en un hígado cirrótico puede estar mediada por un efecto anti-apoptótico de IL-6.

5 En otra realización de la presente invención se encontró que en animales cirróticos, la expresión gp80 aumentó significativamente en células tanto del hígado total como de hepatocitos aislados en comparación con testigos normales (Fig. 6). Mientras que en animales cirróticos la expresión de gp130 disminuyó significativamente en el hígado total en comparación con testigos normales, en animales cirróticos la expresión gp130 aumentó significativamente en células de hepatocitos purificados en comparación con testigos normales (Fig. 6). Por lo tanto, los resultados obtenidos muestran que los hepatocitos de hígado cirrótico sobre-expresan la sub-unidad gp80 y
10 gp130 de receptor de IL-6 y sugieren que los hepatocitos del hígado cirrótico, especialmente después de la resección, son altamente sensibles al tratamiento con IL-6 y, por lo tanto, una dosis baja de IL-6 es análogamente eficaz como una dosis elevada en la inducción de la regeneración hepática.

Los resultados obtenidos no indican un riesgo aumentado de aparición de neoplasma en las ratas tratadas con IL-6 frente a ratas testigo no tratadas cirróticas. En particular, la incidencia de displasia grave o carcinoma hepatocelular (HCC) fue de 8% en animales testigo (2/25) y 3,3 con IL-6 (1/30).
15

Entre los animales tratados, el estudio de angiogénesis en parénquima cirrótico regenerante no mostró un aumento anormal de densidad de micro-vasos en el interior de los nódulos cirróticos, arteriolas asociadas o endotelios no diferenciados, datos correlacionados con HCC.

20 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "muteínas" se refiere a análogos de una IL-6, en los que uno o más residuos de aminoácidos de los componentes que se producen de forma natural de IL-6 están sustituidos por residuos de aminoácidos diferentes, o son suprimidos, o uno o más residuos de aminoácidos son añadidos a la secuencia original de una IL-6, sin cambiar considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con la IL-6 original. Estas muteínas son preparadas mediante síntesis conocidas y/o mediante técnicas de mutagénesis dirigidas al sitio o cualquier otra técnica conocida adecuada para las mismas.

25 Las muteínas de acuerdo con la presente invención incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, como DNA o RNA, que hibrida a DNA o RNA, que codifica una IL-6 de acuerdo con la presente invención, bajo condiciones rigurosas. La expresión "condiciones rigurosas" se refiere a las condiciones de hibridación y posterior lavado, que los expertos en la técnica denominan convencionalmente "rigurosas". Véanse las publicaciones Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, supra, Interscience, N. Y. , 6,3 and 6,4 (1987, 1992) y Sambrook et al. (Sambrook, J. C. , Fritsch, E. F., and Maniatis, T.) (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).
30

Sin limitaciones, ejemplos de condiciones rigurosas incluyen condiciones de lavado a 12-20 °C por debajo de la T_m calculada del híbrido sometido a estudio, 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 seguidamente, 0,1 x SSC y 0,5% SDS a 68 °C durante 30-60 minutos. Los expertos en esta técnica comprenden que las condiciones rigurosas dependen también de la longitud de las secuencias de DNA, sondas de oligonucleótidos (como 10-40 bases) o sondas de oligonucleótidos mixtos. Si se usan sondas mixtas, es preferible usar cloruro de tetrametil-amonio (TMAC) en lugar de SSC. Véase la publicación de Ausubel, anterior.
35

40 Como estas muteínas tienen preferentemente una secuencia de aminoácidos suficientemente repetitiva respecto a una IL-6, de forma que tenga una actividad sustancialmente similar o incluso mejor que la IL-6.

45 La actividad característica de IL-6 es la capacidad de unión a la parte gp80 del receptor de IL-6 y/o la capacidad de inducir la proliferación de hepatocitos. En la medida en que la muteína tiene una capacidad de unión sustancial a la parte gp80 del receptor de IL-6 y/o una capacidad de inducir la proliferación de hepatocitos se puede considerar que tiene una actividad sustancialmente similar a IL-6. Por tanto, puede ser determinado si cualquier muteína dada tiene al menos sustancialmente la misma actividad que IL-6 por medio de una experimentación rutinaria que comprende someter los hepatocitos a esta muteína y determinar si induce o no la proliferación de hepatocitos, por ejemplo, midiendo la absorción de BrdU o metionina marcada o sólo haciendo un recuento de las células con respecto a células testigo no tratadas y células tratadas con WT IL-6. Un ensayo de tipo ELISA para medir la unión de quimeras de IL-6R/IL-6 a gp130 ha sido descrito en detalle en el ejemplo 7 en la página 39 del documento WO99/02552, que se incorpora completamente como referencia a la presente memoria descriptiva. El experto en la técnica apreciará
50 que puede ser desarrollado un ensayo de tipo ELISA similar para la unión de IL-6 a gp80.

En la medida en que el mutante tenga una actividad de unión sustancial a su región de unión de gp80, se puede considerar que tiene una actividad sustancialmente similar a IL-6.

5 Por tanto, se puede determinar si cualquier mutante dado tiene al menos sustancialmente la misma actividad que IL-6 por medio de una experimentación rutinaria que comprende someter este mutante, por ejemplo, a un ensayo de unión en emparedado simple para determinar si se une o no a un gp80 inmovilizado o gp80 soluble (fragmento extracelular de gp80) como se describe en el ejemplo 7 del documento WO99/02552.

En una realización preferida, cualquiera de estas muteínas tiene una identidad u homología de al menos 40% con respecto a la secuencia de IL-6 madura. Más preferentemente, tiene una identidad u homología de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o, más preferentemente al menos 90% respecto a la misma.

10 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 un nucleótido exacto o nucleótido o aminoácido o correspondencia de aminoácidos de los dos polinucleótidos o dos secuencias polipéptidos, respectivamente, sobre la longitud de las secuencias que están siendo comparadas.

15 Para secuencias en las que no hay una correspondencia exacta, puede ser determinado un “% de identidad”. En general, las dos secuencias que van a ser comparadas están alineadas para una proporcionar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir insertar “separaciones” en cualquiera o en ambas secuencias para mejorar el grado de alineación. Un % de identidad puede ser determinado sobre la longitud completa de cada una de las secuencias que está siendo comparada (denominada alineación global), que es particularmente adecuada para secuencias de longitud igual o muy similar, o sobre longitudes más cortas definidas (denominada alineación local),
20 que es más adecuada para secuencias de longitud desigual.

Los métodos para comparar la identidad y la homología de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. Así, por ejemplo, los programas disponibles en el Wisconsin Sequence Analysis Package, version 9.1 (Devereux J et al. 1984), por ejemplo los programas BESTFIT y GAP, pueden ser usados para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad y el % de homología entre dos secuencias de polipéptidos. El BESTFIT usa el algoritmo de “homología local” de Smith y Waterman (1981) y encuentra la mejor región única de analogía entre dos secuencias. Otros programas para determinar la identidad y/o analogía entre secuencias son conocidos también la técnica, por ejemplo, el grupo de BLAST de programas (Altschul S F et al., 1990, Altschul S F et al, 1997, accesible a través de la página de internet de la identidad NBCI en www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson W R, 1990; Pearson, 1988).
25

30 Las muteínas de IL-6 que pueden ser usadas de acuerdo con la presente invención, o el ácido nucleico que las codifica, incluyen un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos o polinucleótidos de sustitución que pueden ser rutinariamente obtenidos por un experto en la técnica, sin experimentación excesiva, basándose en las enseñanzas y normas presentadas en la presente memoria descriptiva.

35 Los cambios preferidos para las muteínas de acuerdo con la presente invención son lo que se denominan sustituciones “conservadoras”. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras de IL-6 pueden incluir aminoácidos sinónimos en un grupo que tengan propiedades fisicoquímicas suficientemente análogas para que la sustitución entre los miembros del grupo conserve la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Está claro que se pueden hacer inserciones y supresiones de aminoácidos en las secuencias anteriormente definidas sin alterar su función, particularmente si las inserciones o supresiones sólo implican unos pocos aminoácidos, por ejemplo, por debajo de trece y preferentemente bajo diez y no supriman ni desplacen aminoácidos que sean críticos para una conformación funcional, por ejemplo, residuos de cisteína. El uso de proteínas y muteínas producidas mediante estas supresiones y/o inserciones entran dentro de las previsiones de la presente invención.
40

Preferentemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla A. Más preferentemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla B y, lo más preferentemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla C.
45

TABLA A

Grupos preferidos de aminoácidos sinónimos

ES 2 493 391 T3

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

Grupos los 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 pueden ser usadas para obtener muteínas de polipéptidos IL-6 para ser usadas en la presente invención, incluyen muchas etapas de métodos conocidos, como se presenta en las patentes de EE.UU. 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, de Mark et al.; 5.116.943 de Koths et al.; 4.965.195 de Namen et al.; 4.879.111 de Chong et al.; and 5.017.691 de Lee et al.; y proteínas sustituidas de lisina presentadas en la patente de EE.UU N° 4.904.584 (Shaw et al.).

Las muteínas específicas de IL-6 que son útiles en relación con la presente invención han sido descritas (documento WO9403492A1). Además, el documento EP667872B1 describe IL-6 mutante con actividad biológica mejorada sobre IL-6. Además de esto, el documento EP656711B1 describe métodos aislar superagonistas de IL-6. Los mutantes o superagonistas pueden ser usados según la invención.

10 La expresión "proteína fusionada" se refiere a un polipéptido que comprende IL-6, o una muteína o fragmento de la misma fusionada con otra proteína que, por ejemplo, tiene un tiempo de residencia prolongado en fluidos corporales. Por tanto, una IL-6 puede estar fusionada a otra proteína, polipéptido o similar, por ejemplo, una inmunoglobulina o fragmento de la misma.

15 "Derivados funcionales", como se usa en la presente memoria descriptiva, abarca derivados de IL-6 y sus muteínas y proteínas fusionadas, que pueden ser preparadas a partir de grupos funcionales que se producen como cadenas secundarias en los residuos en los grupos N- o C- terminales por medios conocidos en la técnica y están incluidos en la invención en la medida en que permanezcan farmacéuticamente aceptables, es decir, no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de IL-6 y no confieran propiedades tóxicas en las composiciones que los contienen.

20 Estos derivados, por ejemplo, pueden incluir cadenas laterales de polietilenglicol, que pueden enmascarar sitios antigénicos y prolongar la residencia de una IL-6 en fluidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilos, amidas de los grupos carboxilos mediante reacción con amoniaco o con aminas primarias o secundarias, derivados de N-acilo de grupos aminos libres de los residuos de aminoácidos formados con restos acilos (por ejemplo, grupos alcanoido o aroilocarbocíclicos) o derivados O-acilo de los grupos hidroxilos libres (por
25 ejemplo, de residuos serilo o treonilo) formados con restos acilos.

Una "fracción activa" según la presente invención puede ser, por ejemplo, un fragmento de IL-6. El término fragmento se refiere a cualquier subconjunto de la molécula, es decir, un péptido más corto que retiene la actividad biológica deseada. Los fragmentos pueden ser fácilmente preparados separando aminoácidos de la molécula de IL-

6 y ensayando el fragmento resultante en cuanto a sus propiedades para unirse gp80 o inducir la proliferación de hepatocitos. Las proteasas para separar un aminoácido en un tiempo del N-terminal o C-terminal de un polipéptido son conocidas y, por tanto, la determinación de los fragmentos que retienen la actividad biológica deseada implica solamente una experimentación rutinaria.

- 5 Como fracciones activas de una IL-6, las muteínas y proteínas fusionadas de la misma, la presente invención abarca adicionalmente el uso de cualquier fragmento o precursores de la cadena de polipéptidos de la molécula de proteína sola o conjuntamente con moléculas o residuos asociados conectados a la misma, por ejemplo, residuos de azúcares, fosfatos, o agregados de la molécula de proteína o los residuos de azúcares por sí mismos, con la condición de que dicha fracción tenga una actividad sustancialmente similar a IL-6, por ejemplo, que se unan al sitio de unión de IL-6 de gp80 y/o induzcan la proliferación de hepatocitos.

15 El término "sales" en la presente memoria descriptiva se refiere tanto a sales de grupos carboxilos como a sales por adición de ácidos de grupos aminos de la molécula IL-6 o análogos de la misma. Las sales de un grupo carboxilo se pueden formar por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas, de zinc y similares y sales con bases orgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminos como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales por adición de ácidos incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico y sales con ácidos orgánicos como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Naturalmente, cualquiera de estas sales debe retener la actividad biológica de IL-6, por ejemplo, la capacidad para inducir la proliferación de hepatocitos y/o la capacidad de unirse al sitio de unión IL-6 de gp80.

- 20 Las "isoformas" de IL-6 son proteínas capaces de unir gp80 o un fragmento del mismo que puede ser producido mediante empalme alternativo.

25 La expresión "derivados circularmente permutados", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a una molécula lineal en las terminaciones han sido conjuntamente unidas, directamente o a través de un conector, para producir una molécula circular y seguidamente la molécula circular es abierta en otra ubicación para producir una nueva molécula lineal con terminaciones diferentes de las terminaciones en la molécula original.

Las permutaciones circulares incluyen las moléculas cuya estructura es equivalente a una molécula que ha sido circularizada y seguidamente abierta. Por tanto, una molécula circularmente permutada puede ser sintetizada de nuevo como una molécula lineal y nunca puede proceder a través de una etapa circularización y apertura. La preparación de derivados circularmente permutados se describe en el documento WO95/27732.

- 30 En una realización preferida de la invención, la sustancia para ser usada está glicosilada en uno o más sitios.

35 Una forma glicosilada de una quimera de IL-6R/IL-6 ha sido descrita en el documento WO99/02552 (PCT/IL98/00321), que es la molécula quimérica altamente preferida según la invención. La quimera de IL-6R/IL-6 descrita en la presente memoria descriptiva es una glicoproteína recombinante, que se obtuvo fusionando la secuencia codificadora completa del receptor de IL-6 soluble que se produce de forma natural δ -Val (Novick et al., 1990) a la secuencia codificadora completa de IL-6 madura que se produce de forma natural, ambas de origen humano. El experto en la técnica apreciará que la IL-6 glicosilada puede ser producida por medios recombinantes también, es decir, mediante expresión en sistemas de expresión eucarióticos.

40 La IL-6 para ser usada según la invención puede ser producida en cualquier tipo de célula eucariótica o procariótica adecuada como células de levaduras, células de insectos, bacterias y similares. Es producida preferentemente en células de mamíferos, lo más preferentemente en células de CHO tratadas por ingeniería genética como se describe en el documento WO99/02552.

45 En una realización adicional de la invención, la sustancia para ser usada no está glicosilada. Ventajosamente, la molécula puede ser entonces producida en células bacterianas que no son capaces de sintetizar residuos de glicosilo, pero habitualmente tienen un rendimiento elevado de proteína recombinante producida. La producción de IL-6 no glicosilada ha sido descrita en detalle en el documento EP504751B1, por ejemplo.

Todavía, en una realización adicional, la sustancia para ser usada según la invención comprende una fusión de inmunoglobulinas, es decir, las moléculas según la invención están fusionadas a la totalidad o una parte de una inmunoglobulina. Los métodos para preparar proteínas de fusión de inmunoglobulinas son bien conocidos en la técnica, como los descritos en el documento WO01/03737, por ejemplo. El experto en la técnica comprenderá que

proteína de fusión resultante retiene la actividad biológica de la IL-6. La proteína de fusión resultante idealmente tiene propiedades mejoradas, como un tiempo de residencia prolongado en fluidos corporales (semi-vida), actividad específica aumentada, nivel de expresión aumentado o purificación facilitada de la proteína de fusión.

5 Preferentemente, la sustancia para ser usada según la invención está fusionada a la región constante de una molécula de Ig. Puede estar fusionada a regiones de cadenas pesadas como los dominios CH₂ y CH₃ de IgG1 humana, por ejemplo. Otras isoformas de moléculas de Ig son también adecuadas para la generación de proteínas de fusión según la presente invención, como isoformas de IgG₂ o IgG₄ u otras clases de Ig, como IgM o IgA, por ejemplo. Las proteínas de fusión pueden ser monómeras o multiméricas, hetero- u homo-multiméricas.

10 Los derivados funcionales de la sustancia para ser usados según la invención pueden estar conjugados a polímeros con el fin de mejorar las propiedades de la proteína, como la estabilidad, semi-vida, biodisponibilidad, tolerancia al cuerpo humano o inmunogenicidad.

Por lo tanto, una realización preferida de la invención se refiere a un derivado funcional de la sustancia para ser usada 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 en los residuos de aminoácidos.

15 Una realización altamente preferida se refiere a una sustancia conectada a polietilenglicol (PEG). La PEGilación se puede llevar a cabo mediante métodos conocidos, como los descritos en el documento WO92/13095, por ejemplo.

20 La sustancia se usa en una cantidad que varía en el intervalo que varía en el intervalo de 0,1 a 10 mcg/kg. En una realización preferida, la sustancia es administrada de forma diaria. En una realización preferida adicional, la sustancia es administrada tres veces por semana. Todavía en una realización preferida adicional, la sustancia es administrada una vez a la semana.

Puede ser usada una dosis baja de IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente permutado o sal de la misma según la invención, en una lesión hepática como:

A - insuficiencia hepática en fase final para una enfermedad hepática crónica que puede ser debida a una cirrosis hepática descompensada de etiología viral (HBV, HCV, otras hepatitis) o de etiología exotóxica,

25 B - insuficiencia hepática después de cirugía resectiva del hígado provocada, por ejemplo, después de una resección hepática o carcinoma hepatocelular con hígado restante,

C - insuficiencia hepática aguda debida a infección viral (HCV), etiología tóxica (alcohol, paracetamol, abuso, intoxicación por setas) y etiología traumática.

30 El tratamiento con una dosis baja de IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente permutado o sal de la misma, de acuerdo con la invención, puede ser beneficioso en pacientes que muestran un fallo hepático post-operatorio inesperado o en pacientes que exhiben insuficiencias hepáticas post-operatorias. Por ejemplo, en pacientes en los que el hígado ha sido reseccionado debido neoplasmas secundarios.

35 El tratamiento con una dosis baja de IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente permutado o sal de la misma, de acuerdo con la invención, podría ayudar a la regeneración del hígado cirrótico y a la prevención de la cirugía.

40 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que comprende de IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente permutado o sal de la misma, opcionalmente junto a uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de cirrosis hepática.

La definición de "farmacéuticamente aceptable" está previsto que abarque cualquier vehículo que no interfiera con la eficacia o actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el hospedante al que es administrado. Por ejemplo, para una administración parenteral, la IL-6 puede ser formulada en una forma de dosificación unitaria para inyección en vehículos como solución salina, solución de dextrosa, albúmina de suero y solución de Ringer.

45 La IL-6 puede ser administrada a un paciente que necesita la administración en una diversidad de formas. Las vías

5 de administración incluyen las vías intrahepática, intradermal, trasdermal (en formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, epidural, tópica e intranasal. Puede ser usada cualquier otra vía eficaz de administración, por ejemplo, absorción a través de tejidos epiteliales o endoteliales o mediante terapia génica en la que una molécula de DNA que codifica la IL-6 es administrada al paciente (por ejemplo, a través de un vector) que provoca que la IL-6 sea expresada y secretada in vivo. Además, la IL-6 puede ser administrada junto con otros componentes de agentes biológicamente activos como tensioactivos, excipientes, vehículos, diluyentes y portadores farmacéuticamente aceptables.

10 Para una administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular) la IL-6 puede ser formulada como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, agua, solución salina o solución de dextrosa) y aditivos que mantengan la isotonicidad (por ejemplo, manitol) o la estabilidad química (por ejemplo, conservantes y tampones). La formulación es esterilizada mediante técnicas comúnmente usadas.

15 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un método para ser usado en el tratamiento de cirrosis hepática, tratada mediante resección o injerto, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad/ dosis eficaz de de IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente permutado o sal de la misma, opcionalmente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad del ingrediente activo que es suficiente para afectar el curso y la gravedad de las enfermedades anteriormente descritas, conduciendo a la reducción o remisión de esta patología. La cantidad eficaz dependerá de la vía de administración y del estado del paciente.

25 La dosificación administrada, en forma de dosis únicas o múltiples, a un individuo, variará dependiendo de una diversidad de factores que incluyen las propiedades farmacocinéticas de la IL-6, la vía de administración, estados y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), alcance de los síntomas, tratamientos concurrentes, frecuencia de administración y el efecto deseado. El ajuste y la manipulación de los intervalos de dosificaciones establecidos están dentro de la capacidad de los expertos.

La invención se refiere al uso de una dosis baja de IL-6 o una muteína, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de hígado aguda y gravemente lesionado (como en necrosis submasiva con hepatitis).

30 La invención se refiere también al uso de una dosis baja de IL-6 o una muteína, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma, o que comprende administrar a un paciente que lo necesita un vector de expresión que comprende la secuencia codificadora de IL-6, una muteína, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de estados graves del hígado, por ejemplo, para el tratamiento de hígado cirrótico que incluye un tratamiento de y/o injerto.

35 Un método para tratar una lesión hepática como cirrosis, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una dosis/ cantidad baja eficaz de IL-6, una muteína, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma, o que comprende administrar a un paciente que lo necesita un vector de expresión que comprende la secuencia codificadora de IL-6, una muteína, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma, son objetos adicionales de la presente invención.

40 En una realización preferida de la invención, la cantidad de IL-6 administrada está en el intervalo de 0,1 a 10 mcg/kg.

45 Un método para tratar una lesión del hígado como, por ejemplo cirrosis hepática y que incluye un tratamiento de resección y/o injerto que comprende administrar a un paciente que lo necesita una dosis baja eficaz de de IL-6, una muteína, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma, o que comprende administrar a un paciente que lo necesita un vector de expresión que comprende la secuencia codificadora de IL-6, una muteína, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma, son objetos adicionales de la presente invención.

La dosis baja de IL-6 puede ser administrada antes, durante y/o después del trasplante. La dosis baja de IL-6 puede ser administrada antes, durante y/o después del tratamiento de resección en el receptor y/o donante del tejido hepático.

La administración de una dosis baja de IL-6 en el trasplante llevado a cabo con hígado total, hígado parcial, tejido hepático, hepatocitos o células madre está contemplada de acuerdo con la presente invención.

El término "trasplante" es citado en la presente memoria descriptiva como el injerto de tejidos o células tomados del propio cuerpo de los pacientes o de otro (donante).

- 5 En una realización preferida de la invención, la cantidad de IL-6 administrada está en el intervalo de 0,1 a 10 mcg/kg.

La presente invención se describirá seguidamente más en detalle en los siguientes ejemplos no limitativos y los dibujos que se acompañan.

Ejemplos

Ejemplo 1:

- 10 Protocolo de inducción de cirrosis hepática en rata y administración de IL-6

Se estructuraron experimentos con el fin de evaluar el efecto biológico principal del tratamiento de IL-6 en la expansión de la masa de hígado en funcionamiento en hígado cirrótico "basal" antes de cualquier tensión quirúrgica aguda, y en la respuesta regenerativa aumentada del hígado cirrótico después de una resección quirúrgica principal.

- 15 En particular, el trabajo se enfocó como un modelo de "cirrosis compensada" que emula la cirrosis compensada (infantil A) de seres humanos que experimentan un tratamiento de resección hepática.

El estudio se llevó a cabo en ratas Sprague Dowley que pesaban 150-175 g. Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz/ oscuridad de 12 horas con acceso libre a alimentación y agua estándar para ratas.

- 20 La cirrosis centro-lobular experimental fue inducida mediante tetracloruro de carbono (CCl₄) y fenobarbital. Las ratas recibieron crónicamente fenobarbital (0,35 g/L) en el agua de bebida desde el comienzo hasta el final del 10^o tratamiento de CCl₄ con el fin de aumentar el efecto hepato-tóxico de CCl₄. El CCl₄ (diluido 1:9 en aceite de oliva) fue administrado una vez a la semana durante 10 semanas por vía intragástrica (por sonda). La dosis de partida de 0,2 ml/kg varió ± 0,2 ml/kg según el cambio de peso diario de cada animal observado durante los siete días a continuación de cada aplicación por sonda. Se administró la mitad de dosis teórica de CCl₄ en la sonda n^o 9 y n^o 10. Cualquier tratamiento se interrumpió después de la 10^a sonda y las ratas tuvieron un periodo de descanso de 5 días.

- 25 Los efectos de la inyección de IL-6 se evaluaron como efectos sobre hígado cirrótico y como efectos sobre parénquima hepaticocigótico regenerante después de una resección hepática.

Este estudio se llevó a cabo sobre 39 animales testigo y 80 de IL-6 que presentaban los criterios inclusivos en el momento de actuación.

- 30 Se proporcionó anestesia mediante inhalación de éter y se realizó el procedimiento quirúrgico a través de una laparotomía de línea media. Se seccionaron ligamentos hepáticos teniendo cuidado de la hemostasis de círculos colaterales de vida a una hipertensión portal. Se preparó el pedículo hepático y se seccionó entre ligaduras. Seguidamente, se reseccionaron los lóbulos hepáticos lateral y mediano izquierdo después de una ligadura separada de las venas hepáticas. Se realizó un cierre de paredes mediante una sutura continua no resorbible.

La función hepática se valoró según los parámetros clínicos "infantiles":

- 35 a. Presencia o ausencia de deterioro neurológico debido a encefalopatía porto-sistémica;
b. presencia o ausencia de ascitis.

- 40 Estos parámetros fueron considerados en el momento de actuación y de sacrificio y permitieron clasificar cada animal como portador de cirrosis funcionalmente compensada o descompensada. En el siguiente experimento solamente los animales que portaban una cirrosis compensada en el momento de actuación, que mostraban "cirrosis difusa" o "cirrosis incompleta con fibrosis porto-portal" (respectivamente, alteraciones cirróticas que implicaban 80-100% y 50-79% de lóbulos hepáticos asociados a fibrosis porto-portal en parénquima cirrótico) fueron considerados,

excluyéndose sistémicamente los que mostraban solamente modificaciones cirróticas menores.

Todas las evaluaciones histológicas se llevaron a cabo sobre muestras teñidas con hematoxilina-eosina de los lóbulos reseccionados mediano y lateral izquierdo.

5 La proliferación hepato-celular se midió mediante absorción de BrdU. La absorción de BrdU se detectó mediante anticuerpos anti-BrdU y el porcentaje de hepatocitos teñidos de BrdU se evaluó en 20 campos de potencia elevada (40x).

La estimación de BrdU de los animales se controló mediante el análisis de incorporación de BrdU en células de mucosa colónica.

10 Cuando la proliferación hepatocelular iba a ser evaluada mediante absorción de BrdU, las ratas recibieron BrdU en el agua de bebida (1 g/L) a partir de la primera inyección de IL-6 hasta la resección hepática (efectos de IL-6 sobre el hígado cirrótico "basal") o partir del tiempo de actuación hasta el sacrificio (efectos de IL-6 sobre el hígado cirrótico regenerante).

Las ratas cirróticas como se mencionó anteriormente formaron el grupo testigo.

15 Las ratas cirróticas que recibieron IL-6 a dosis de 500, 100, 10, 1 ó 0,1 mcg/kg formaron los grupos tratados. IL-6, IL-6 100, IL-6 10, IL-6 1 y IL-6 0,1 indicarán, respectivamente: animales tratados con IL-6, ratas tratadas con 100 mcg/kg, 10 mcg/kg, 1 mcg/kg y 0,1 mcg/kg de IL-6. Las dosis de 500 mcg/kg y 100 mcg/kg fueron consideradas dosis elevadas mientras que las dosis que variaban en el intervalo de 10 mcg/kg hasta 0,1 mcg/kg fueron consideradas dosis bajas.

20 Seis y 5 días antes de la cirugía se administró IL-6 por vía intraperitoneal a una dosis de 500, 100, 10, 1 y 0,1 mcg/kg; se realizó una tercera inyección de IL-6 justo antes del cierre de la laparotomía después de la resección hepática (mismas dosis).

Los efectos de la inyección de IL-6 se evaluaron como efectos sobre el hígado cirrótico y como efectos sobre parénquima hepatocirrótico regenerante después de la resección de hepática.

Evaluaciones de los efectos de IL-6 sobre hígado cirrótico, considerada:

25 1. la mortalidad operativa.

Evaluaciones de los efectos de IL-6 sobre parénquima hepatocirrótico regenerante después de una resección hepática, considerada:

1. la mortalidad post-operatoria;

2. la función hepática en el sacrificio;

30 3. la regeneración hepática determinada como el porcentaje de masa hepática regenerada y calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Velocidad de regeneración hepática (\%)} = 100 \times [C - (A - B)] / A$$

en la cual: A es el peso de hígado estimado en el momento de la resección hepática [este dato se comprobó y validó sobre 15 testigos y 24 animales tratados con IL-6 (datos no mostrados)]

35 B es el peso de hígado reseccionado

C es el peso de hígado reseccionado en el sacrificio:

4. absorción de BrdU en muestras de hígado en el sacrificio;

Los valores se proporcionaron como media \pm SD. Se realizó un análisis estadístico mediante el ensayo ANOVA de

vía de única seguido de ensayo Dunnett comparando los diferentes subgrupos.

Después de la inducción de la cirrosis, se reseccionaron los lóbulos hepáticos lateral izquierdo y mediano y se exploraron los efectos farmacológicos de IL-6 sobre parénquima hepatocirrótico regenerante después de la resección hepática. Se verificaron los siguientes parámetros: 1. Mortalidad post-operatoria, 2. valoración de función hepática en el momento de sacrificio, 3. regeneración hepática y 4. absorción de BrdU en el sacrificio.

5

Ejemplo 2

Efectos farmacológicos de IL-6 sobre parénquima hepatocirrótico regenerante después de resección hepática

Después de la inducción de la inducción de la cirrosis, se reseccionaron los lóbulos hepáticos lateral izquierdo y mediano.

10 Los resultados obtenidos señalan que en presencia de una cirrosis funcionalmente compensada, la inyección intraperitoneal de IL-6 no aumenta la mortalidad operativa de las resecciones hepáticas mayores.

Se exploraron los efectos farmacológicos de IL-6 sobre parénquima hepatocirrótico regenerante después de una resección hepática. Se verificaron los siguientes parámetros: 1. mortalidad post-operatoria, 2. valoración de función hepática en el momento del sacrificio, 3. regeneración hepática y 4. absorción de BrdU en el sacrificio.

15 Se observó un 7,1% de mortalidad en animales testigo (2/28) frente a un 2,8 % (2/70) en ratas tratadas con IL-6. Un testigo y una rata tratada murieron por insuficiencia hepática, los otros dos por razones que no estaban claras. Debe apreciarse que en el grupo tratado todas muertes se produjeron en los grupos de dosis elevadas.

La valoración de la función hepática, de acuerdo con los parámetros clínicos anteriormente mencionados, se llevó a cabo sobre 94 ratas:

20 a. el deterioro neurológico debido a encefalopatía porto-sistémica no se observó nunca;

b. se observaron ascitis en 4 ratas: 1/26 testigos (4,1%) y 3/26 animales de dosis elevadas de IL-6 (11,5%).

La velocidad de regeneración hepática media se calculó a partir de 24 testigos, 12 IL-6 0,1, 12 IL-6 1, 16 IL-6 10; 15 IL-6 100 y 11 IL-6 500 como sigue (Fig. 2):

a. entre testigos una media de $16,5 \pm 10,1$, mediana 16,3;

25 b. entre animales de IL-6 0,1 una media de $25,5 \pm 15,7$, mediana 27,5;

c. entre animales de IL-6 1 una media de $38,4 \pm 10,8$, mediana 40,4;

d. entre animales de IL-6 10 una media de $29,0 \pm 13,4$, mediana 25,9;

e. entre animales de IL-6 100 una media de $40,2 \pm 9,9$, mediana 42,1;

f. entre animales de IL-6 500 una media de $32,2 \pm 12,1$, mediana 31,3.

30 Las diferencias entre las medias fueron estadísticamente significativas (t Dunnett <0,05).

4. absorción de BrdU en el sacrificio

Siete animales testigos, 9 IL-6 0,1, 8 IL-6 1, 7 IL-6 10, 9 IL-6 100 y 7 IL-6 500 recibieron BrdU después de la resección hepática. El recuento de hepatocitos teñidos con BrdU mostró (Fig. 3):

a. entre testigos una media de $52,2 \pm 14,9$, mediana 53;

35 b. entre animales de IL-6 0,1 una media de $65,3 \pm 8,2$, mediana 65,3;

- c. entre animales de IL-6 1 una media de $68,4 \pm 11,9$, mediana 65,5;
- d. entre animales de IL-6 10 una media de $60,8 \pm 10,0$, mediana 60,0;
- e. entre animales de IL-6 100 una media de $79,4 \pm 8,1$, mediana 78,4;
- f. entre animales de IL-6 500 una media de $80,9 \pm 10,7$, mediana 83,7.

5 En este caso, las diferencias entre las medias tenían una significación estadística al comparar los testigos con animales de IL-6 0,1, 1, 100 y 500 (t Dunnett <0,05). No fue evidente una significación estadística al considerar el subgrupo de animales tratados con la dosis de 10 mcg/kg.

Estos datos muestran claramente que en presencia de una cirrosis funcionalmente compensada, la inyección intraperitoneal de IL-6:

- 10 • no aumenta la mortalidad post-operatoria después de resecciones hepáticas mayores;
- aumenta la respuesta fisiológica a una pérdida parenquimal mayor induciendo una proliferación masiva de hepatocitos maduros cuando se emplean con dosis tanto elevadas como bajas (excepto para 10 mcg/kg)

Ejemplo 3

Factores de transcripción implicados en la acción de IL-6 sobre la regeneración hepatocelular en hígado cirrótico

15 Se exploró la implicación de factores transcripcionales, que son directamente activados por IL-6, como STAT-3 y AP-1, sobre la acción de IL-6 sobre la regeneración hepatocelular en un hígado cirrótico. Se exploró también la posible implicación de la activación de NF-κB sobre la respuesta hepatocelular proliferativa observada después de un tratamiento de IL-6 en condiciones de hepatocirrosis funcionalmente compensada.

20 Se llevaron a cabo experimento en ratas Sprague Dowley como se describió en el ejemplo 1. En particular, se prestó gran atención a valorar que los animales presentaban todos los criterios inclusivos ya descritos.

En primer lugar, se examinaron fragmentos de hígado obtenidos a partir de ratas cirróticas sacrificadas en diferentes valores de tiempo después de la inyección de IL-6. Las ratas fueron tratadas con una dosis de 100 mcg/kg de IL-6 de forma congruente con el protocolo de inyección ya descrito.

25 En segundo lugar, se examinaron fragmentos de hígado obtenidos a partir de ratas testigo o tratadas con IL-6 a diferentes valores de tiempo después de la resección hepática (realizada como se describió previamente).

Efecto de IL-6 sobre la activación de factores transcripcionales en hígado cirrótico:

Se demostró mediante un ensayo de desplazamiento (véanse los detalles en el ejemplo 4) que la inyección intraperitoneal de IL-6 provocó una activación clara de STAT-3 en un hígado cirrótico detectable 1 y 2 horas después de la inyección, disminuyendo ligeramente después de 4 horas (Fig. 4).

30 Se observó también que la inyección intraperitoneal de IL-6 provocó una activación clara de AP-1 en un hígado cirrótico, detectable después de 1 y 2 horas, más evidente 4 horas después de la inyección (Fig. 4).

Además se observó mediante un ensayo de desplazamiento que una inyección intraperitoneal de IL-6 provocó una activación transitoria de NF-κB, detectable después de 1 y 4 horas, que mostró un pico después de 2 horas (Fig. 4).

35 Se obtuvo una respuesta idéntica cuando se inyectó una segunda dosis de IL-6 24 horas después de la primera (no mostrada).

Se exploró también el efecto de IL-6 sobre la activación del factor transcripcional en un hígado cirrótico después de una resección hepática y observó lo siguiente:

1 - En animales testigo, la resección hepática indujo una activación escasa de STAT-3 que fue evidente en 1 hora y aumentó a adicionalmente 2 horas después del procedimiento quirúrgico. La inyección intraperitoneal de IL-6 al final

del procedimiento quirúrgico indujo una activación más temprana y aumentada de STAT-3 (Fig. 5). De hecho, la actividad de unión de STAT-3 estaba presente a un nivel elevado a los 30 minutos, durando al menos 4 horas después de la cirugía. Un análisis de super-desplazamiento (usando anticuerpos específicos), confirmó la especificidad de STAT-3 de la señal.

5 2 - En animales testigo, la resección hepática indujo una activación escasa de AP-1 por encima de niveles basales que se observó a las 2 horas después de la cirugía. La inyección intraperitoneal de IL-6 al final del procedimiento quirúrgico indujo una activación más temprana y aumentada de AP-1 (Fig. 5). De hecho, la actividad de unión de AP-1 estaba presente a un nivel elevado a los 30 minutos, durando al menos 4 horas después de la cirugía.

10 3 - En animales testigo, la resección hepática no indujo una activación significativa de NF-κB por encima de niveles basales. Por el contrario, la inyección intraperitoneal de IL-6 al final del procedimiento quirúrgico indujo la activación de NF-κB (Fig. 5). De hecho, la actividad de unión de NF-κB estaba presente a los 30 y 60 minutos después de la cirugía, disminuyendo hasta niveles basales con posterioridad.

15 Estos resultados indican que la activación inducida por IL-6 de STAT-3 y AP-1 desempeña una función en el aumento de la proliferación hepatocelular en un hígado cirrótico, apoyando adicionalmente el "efecto biológico final" informado de IL-6.

El estudio de NF-κB muestra que el tratamiento con IL-6 antes de la resección hepática restaura la activación de NF-κB, normalmente presente en un hígado no cirrótico (Streetz et al., 2003), pero amortiguada en el hígado cirrótico.

La función informada de NF-κB para disminuir la apoptosis en el células hepáticas indica que la expansión de masa hepática inducida en hígado cirrótico puede estar mediada también por un efecto anti-apoptótico de IL-6.

20 Ejemplo 4:

Ensayos de desplazamiento de electro-movilidad

25 Se homogeneizaron 500 mg de hígado en un tampón de homogeneización (Hepes/KOH 10 mM, pH 7,6, KCl 25 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 2 M, glicerol al 10%) que contenía una combinación de inhibidor de proteasa (Sigma) y se centrifugó a 100.000 g durante 5 minutos para obtener un sedimento nuclear. Los núcleos fueron lisados en un tampón de lisis (Hepes-KOH 20 mM, pH 7,9, glicerol al 25%, NaCl 420 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, combinación de inhibidores de ditirotreitol y proteasa 0,5) y se almacenó a -80 °C. Se incubaron ocho microgramos de extractos con oligonucleótido de cadena doble radiomarcado (5 ng) durante 20 minutos a 25 °C en tampón de unión (Tris 10 mM, pH 7,8, glicerol al 5%, EDTA 1 mM, ditirotreitol 0,5 mM, 0,5 µg de poli dI-dC) y se sometieron a electroforesis en gel de poli(acrilamida al 5% no desnaturante en TBE 1x. Los geles se secaron y se expusieron a una película de radiología. Las sondas usadas fueron oligonucleótidos purificados por cromatografía líquida de alto rendimiento de las siguientes secuencias de base:

1. Sitio de STAT-3 de elemento de unión de factor inducible de suero en el promotor c-fos 5'-GATCCTCCAGCATTCCCGTAAATCCTCCAG-3';

2. Sitio de AP-1: 5'-CTAGTGATGAGTCAGCCGGATC-3';

35 3. Sitio de NF-κB: 5'-GGATCCTCAACAGAGGGGACTTTCCGAGGCCA-3'.

40 Cada sonda fue marcada en el extremo con T4 polinucleótido quinasa y g-32P-ATP. Para los experimentos de competición, se incubó un exceso de 100 veces de una sonda no marcada específica con extractos durante 20 minutos de la adición además de la sonda radiomarcada. Se realizaron ensayos super-desplazamiento incubando 30 minutos los extractos nucleares con 1 µg de un anticuerpo anti-Stat3 (Santa Cruz Biotech). Para realizar controles del contenido, los extractos nucleares fueron analizados también en cuanto a la actividad de unión DNA frente octámero-1 cuyo sitio está presente en muchos genes domésticos, usando la siguiente sonda: 5'-GATCGAATGCAAATCACTAGCT-3'.

Ejemplo 5

Expresión de receptores de IL-6 en condiciones de cirrosis crónica

Se ha informado que las condiciones fisiopatológicas diferentes pueden modificar la expresión de receptores de IL-6, modulando así la sensibilidad celular a IL-6. La bibliografía informa como fisiológica una cantidad aumentada de IL-6 en el hígado, en condiciones de cirrosis crónica. Por tanto, se investigó si este aumento de IL-6 está asociado también a una expresión aumentada de los receptores de membrana específicos.

- 5 Se llevaron a cabo experimentos con ratas Sprague Dowley tratadas como se describió en el ejemplo 1. En particular, se prestó gran atención a valorar que los animales presentaran todos los criterios inclusivos ya descritos.

Las ratas fueron tratadas con una dosis de 100 mcg/kg de IL-6 de forma congruente con los protocolos de inyección ya descritos.

- 10 Los experimentos se llevaron a cabo con fragmentos de hígado obtenidos en la resección hepática. Se puso como testigo hígado de animales normales no cirróticos.

Como en el hígado cirrótico hay un aumento de células de linaje diferente de los hepatocitos (Ito, miofibroblastos, células ovales y células inflamatorias), se analizaron tanto homogenato de hígado total como hepatocitos purificados de hígado cirrótico. Se realizó un procedimiento análogo sobre hígado normal.

- 15 Los hepatocitos se obtuvieron mediante un procedimiento innovativo que usa la disociación de tejido mecánico que evita un tratamiento enzimático, como colagenasa, que puede destruir estructuras de membrana, particularmente receptores (Dr Giovanna Mazzoleni, Dept Biomedical Sciences and Biotechnology, Viale Europa 11, 25100 Brescia, procedimiento metodológico en prensa).

- 20 Se homogeneizaron 100 mg de hígado o 16 mg de hepatocitos en 1 ml de tampón de lisis (NaCl₂ 150 mM, Tris/ HCl 100 mM, pH 7,4, Igepal al 1%, desoxicolato al 1%, SDS al 0,1%, Na₃VO₄ 1 mM) que contenía una combinación de inhibidor de proteasa (Sigma) incubado a 4 °C durante 20 minutos y centrifugado a 12.000 g durante 30 minutos. Se introdujeron cuarenta microgramos en un SDS-PAGE al 10%, se transfirieron a una membrana PVDF, se trataron con sondas con anticuerpos policlonales frente a gp80 y gp130 (Santa Cruz) y se revelaron con ECL.

En animales cirróticos, la expresión de gp80 aumentó significativamente en extractos celulares tanto de hígado total como de hepatocitos aislados, en comparación con testigos normales (Fig. 6).

- 25 En animales cirróticos, la expresión de gp130 disminuyó significativamente en extractos celulares a partir de hígado total en comparación con testigos normales. Al contrario que en animales cirróticos, la expresión de gp130 aumentó significativamente en extractos celulares totales a partir de hepatocitos purificados en comparación con testigos normales (Fig. 6).

- 30 Los datos de la bibliografía indican que en células hepáticas la sensibilidad a IL-6 depende de la presencia de la subunidad de gp80 específica del complejo receptor de IL-6. Además, se ha demostrado que un aumento de gp80 en ambas subunidades gp80 y gp130 induce un aumento de la sensibilidad celular a IL-6.

Estos resultados que muestran que los hepatocitos de hígado cirrótico sobreexpresan la subunidad tanto gp80 como gp130 del receptor de IL-6, sugieren que los hepatocitos del hígado cirrótico son altamente sensibles al tratamiento con IL-6.

- 35 Ejemplo 6

Evaluación de si la IL-6 induce efectos carcinogénicos en el hígado de ratas cirróticas.

- 40 Se investigó adicionalmente si la proliferación hepatocelular inducida por IL-6 está asociada con una incidencia aumentada de carcinoma hepatocelular en ratas cirróticas tratadas frente a otras sin tratar. Consecuentemente, el hígado regenerante de ratas hepatocirróticas fue sometido a investigaciones histológicas e inmunohistoquímicas, bajo condiciones ciegas, con el fin de poner en evidencia directamente la presencia de neoplasia o displasia, pero también las alteraciones de vascularización parenquimal considerada como marcadores de un riesgo aumentado de desarrollo de carcinoma hepatocelular. Esta evaluación morfológica se completó finalmente mediante una evaluación inmunohistoquímica de diferentes oncogenes.

Este estudio se llevó a cabo en muestras obtenidas al final del experimento (sacrificio de animales, ejemplo 2).

Los experimentos se llevaron a cabo con ratas testigo como con ratas tratadas con una dosis de 500 y 100 mcg/kg de IL-6, de forma congruente con el protocolo de inyección ya descrito (ejemplo 2).

Todas las evaluaciones histológicas se llevaron a cabo en un mínimo de 2 muestras teñidas con hematoxilina-eosina por animal. En particular, se investigó cuidadosamente la presencia de neoplasia y displasia.

- 5 Se realizaron varias evaluaciones inmunohistoquímicas sobre un mínimo de 2 muestras por animal por reacción inmunohistoquímica:

Se investigó la angiogénesis en el parénquima cirrótico regenerante. Esto incluyó el estudio de la capilarización sinusoidal expresada en forma de densidad de micro-vasos en el lóbulo hepatocirrótico, el estudio de arteriolas no asociadas a estructuras biliares (arteriolas no asociadas) y la evaluación de la diferenciación endotelial.

- 10 Este estudio se llevó a cabo por medio de:

- anticuerpos anti-factor VIII para la demostración de vasos de capilaridad;
- anticuerpos de actina específicos para músculos lisos para la demostración de arteriolas;
- lectina ULEX para la investigación de la diferenciación endotelial.

- 15 El estudio de la expresión de oncogenes en el parénquima cirrótico regenerante se investigó evaluando la expresión de:

- P 53;
- MIBI 1;
- Bcl-2.

Se verificaron muestras de 55 ratas (22 testigos, 21 de IL-6 100 y 9 de IL-6 500).

- 20 Dos testigos (8%) y 1 IL-6 100 (4,8%) presentaron displasia grave o carcinoma hepatocelular (HCC). Todas las muestras restantes mostraron un grado diferente de cirrosis y fibrosis hepática pero no displasia celular o HCC.

Los 3 animales que mostraban displasia o HCC en el análisis histológico fueron también positivos en la investigación de arteriolas no asociadas; adicionalmente los dos testigos fueron también positivos al estudio de densidad de micro-vasos y 1 a la evaluación de diferenciación endotelial.

- 25 Todas las muestras restantes mostraron claramente que la capilarización sinusoidal estaba directamente relacionada a la gravedad de la cirrosis y la difusión y no se observaron diferencias en la densidad de micro-vasos entre animales testigos y tratados con IL-6. Además, en estos casos, no se observaron arteriolas no asociadas a estructuras biliares en animales testigo o tratados con IL-6, y en todos los casos la lecitina ULEX mostró una diferenciación normal de los endotelios regenerantes.

- 30 El estudio de P 53 y MIBI 1 fue siempre negativo. En contraste con esto, en 4 casos (1 testigo, 1 IL-6 500 y 2 IL-6 100) el Bcl-2 fue focalmente positivo. Debe apreciarse que en estos animales el análisis histológico y el estudio de la angiogénesis fueron absolutamente negativo, y los 3 animales que mostraban displasia o HCC en el análisis histológico no presentaron una sobreexpresión de los oncogenes estudiados.

- 35 Los datos directos e indirectos obtenidos no indicaron un riesgo aumentado de aparición de neoplasma. En particular:

La incidencia de displasia grave o carcinoma hepatocelular fue de 8% en los animales testigos (2/25) y 3,3 en animales de IL-6 (1/30).

Entre los animales tratados, el estudio de angiogénesis en parénquima cirrótica regenerante no mostró un aumento anormal de la densidad de micro-vasos en el interior de nódulos cirróticos, arteriolas no asociadas o endotelios no

diferenciados, datos correlacionados con la aparición de HCC.

La expresión de oncogenes era casi completamente negativa. Solamente el Bcl-2 mostró una velocidad positivamente focal a 4% y 13,3%, respectivamente, en animales testigo y de IL-6.

5 Estos resultados indican que las dosis elevadas de IL-6 no indujeron acontecimientos significativos relacionados con la aparición de carcinoma hepatocelular.

Ejemplo 7

Efectos farmacológicos de IL-6 sobre el hígado cirrótico funcionalmente descompensado

10 El objetivo de los experimentos fue verificar si los efectos inducidos por IL-6 sobre el hígado de ratas cirróticas funcionalmente descompensadas se observan también en el caso de una cirrosis más grave, asociada a un deterioro claro de la función hepática.

15 El objeto de los experimentos son las ratas que, a partir de experimentos del ejemplo 1 que desarrollaban una cirrosis funcionalmente descompensada con evidencia de ascitis en el momento de una laparotomía o inyección de IL-6, junto con un pequeño número de animales sometidos a un tratamiento más largo con CCl₄ con el fin de conseguir deliberadamente una función hepática descompensada. En el experimento se incluyeron 32 ratas, 13 testigos y 19 de IL-6. Entre el grupo de IL-6, 11 animales recibieron una dosis de 100 mcg/kg, 3 una dosis de 500 mcg/kg, 2 una dosis de 10 mcg/kg, 2 una dosis de 1 mcg/kg y 1 una dosis de 0,1 mcg/kg.

Se observó un 46,2% de mortalidad entre los testigos (6/13) frente a un 10,5% (2/19) entre las ratas de IL-6. En un caso, la mortalidad estuvo relacionada con una hemorragia intraoperatoria aguda, 7 ratas (5 testigos y 2 de IL-6) murieron de fallo cardio-respiratorio.

20 La relación: (hígado reseccionado/peso de la rata) x 100, extrapolada de 13 animales testigos y 19 ratas de IL-6 mostró (Fig. 7):

entre los testigos una media de $19,44 \pm 5,19$, mediana 18,7;

entre animales de IL-6 una media de $23,6 \pm 7,1$, mediana 23,8.

Las diferencias entre las medias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,077$).

25 Considerando las 14 ratas tratadas con dosis elevadas (H.D.) de IL-6 (500 y 100 mcg/kg) el resultado fue:

H.D. de IL-6: media de $23,6 \pm 5,0$, mediana 24,4.

En este caso, la diferencia fue estadísticamente significativa ($p = 0,044$). El mismo resultado ($p = 0,034$) se obtuvo cuando se consideraron solamente las 11 ratas tratadas con 100 mcg/kg de IL-6:

IL-6 100: media de $24,27 \pm 5,3$, mediana 25,1.

30 La relación (hígado reseccionado/peso de la rata) x100 fue de 17,5 y 15 para las ratas tratadas con 10 mcg/kg, 43,5 y 27,3 para las ratas tratadas con 1 mcg/kg y 15,8 para el animal tratado con 0,1 mcg/kg de IL-6.

Cinco testigos y 5 ratas de IL-6 (3 IL-6 100) recibieron BrdU antes de la resección hepática. El recuento de hepatocitos teñidos con BrdU mostró (Fig. 8):

entre los animales testigo una media de $16,4 \pm 8,6$, mediana 17,2;

35 entre animales de IL-6 una media de $34,3 \pm 14,8$, mediana 42,1.

La diferencia no fue significativa, con $p = 0,058$.

Efectos farmacológicos de IL-6 sobre el parénquima hepatocirrótico regenerante después la resección hepática

1. Mortalidad post-operatoria

Se observó una mortalidad de 42,8% en ratas testigo (3/7) frente a 53% (9/17) en las tratadas con IL-6. En todos los casos excepto en uno los animales murieron de insuficiencia hepática (1 animal de IL-6 murió de evisceración).

5 2. Valoración de la función hepática en el momento del sacrificio

Todos los animales presentaban una ascitis grave en el momento del sacrificio (día post-operatorio 7).

3. Regeneración hepática

La velocidad media de regeneración hepática se calculó a partir de 4 animales testigo y 8 de IL-6 (6 IL-6 100, 1 IL-6 500 y 1 IL-6 10). Se observó (Fig. 9):

10 a. entre los testigos una media de $8,6 \pm 9,8$, mediana 7,1;

b. entre los animales de IL-6 una media de $22,5 \pm 11,4$, mediana 22,3.

Las diferencias entre las medias no fueron estadísticas significativas ($p= 0,069$).

Se calculó una velocidad de regeneración de $23,5 \pm 12,8$, $13,6$ y $23,2$, respectivamente, para el uso de 6 animales y IL-6 100 y para las ratas de IL-6 500 y IL-6 10.

15 4. Absorción de BrdU en el sacrificio

Una rata testigo y 4 de IL-6 (3 IL-6 100 y 1 IL-6 10) recibieron BrdU después de la resección hepática. El recuento de hepatocitos teñidos con BrdU mostró:

g. un 12,9% de hepatocitos con BrdU en la rata testigo;

h. un 89,1%, 87,6%, 33,9% y 61,4%, respectivamente, en las ratas 3 IL-6 100 y de IL-6 10.

20 Estos datos sugieren que en presencia de cirrosis funcionalmente descompensada, la inyección intraperitoneal de IL-6 provoca los mismos efectos biológicos detectados en presencia de una cirrosis funcionalmente compensada conduciendo a una clara reducción de la mortalidad operativa entre los animales de IL-6.

Referencias

25 Baroni, G. S., et al., Hepatic stellate cell activation and liver fibrosis are associated with necroinflammatory injury and Th1-like response in chronic hepatitis C. *Liver*, 1999. 19(3): p. 212-9.

Hiramatsu, N., et al., Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 1994. 19(6): p. 1354-9.

Maniatis, T., in "Cell Biology: A Comprehensive Treatise, Vol. 3: Gene Expression", Academic Press, NY, pp. 563-608 (1980).

30 Altschul S F et al., *J Mol Biol*, 215,403-410, 1990, Altschul S F et al., *Nucleic Acids Res.*, 25: 389-3402,1997.

Anderson KD, Panayotatos N, Corcoran TL, Lindsay RM, Wiegand SJ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jul 9; 93(14): 7346-51

Bao JJ, Zhang WW, Kuo MT. Adenoviral delivery of recombinant DNA into transgenic mice bearing hepatocellular carcinomas. *Hum Gene Ther*. 1996 Feb 10; 7(3): 355-65.

- Beal MF, Ferrante RJ, Swartz KJ, Kowall NW: *J Neurosci.* 1991 Jun; 11(6): 1649-59.
- Bemelmans AP, Horellou P, Pradier L, Brunet I, Colin P, Mallet J *Hum Gene Ther.* 1999 Dec 10; 10(18): 2987-97.
- Bensadoun JC, Deglon N, Tseng JL, Ridet JL, Zurn AD, Aebischer P *Exp Neurol.* 2000 Jul ; 164 (1) : 15-24
- 5 Borlongan, C. V. , Randall, T. S. , Cahill, D. W. , and Sanberg, P. R. (1995). Asymmetrical motor behavior in rats with unilateral striatal excitotoxic lesions as revealed by the elevated body swing test. *Brain Res.* , 676,231-4.
- Boulton, T. G. , Stahl, N. , Yancopoulos, G. D. (1994) Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin-6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors. *J. Biol. Chem.* 269, 11648-11655
- Brighton, B and Hayden, MR: *S Afr Med J.* 1981 Feb 21; 59(8): 250.
- 10 Chebath, J., Fischer, D., Kumar, A., Oh, J. W., Kollet, O., Lapidot, T., Fischer, M., Rose-John, S., Nagler, A., Slavin, S. and Revel, M. *Eur. Cytokine Netw.* 1997 8, 359-365.
- Choi, DW: *Neuron.* 1988 Oct; 1(8): 623-34. Review.
- Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R. Related Articles, failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science.* 1996 Nov 22; 274 (5291): 1379-83.
- 15 Davis, S. , Aldrich, T. H. , Stahl, N. , Taga, T. , Kishimoto, T., Ip, N. Y. , Yancopoulos, G. D. (1993) LIFR-B and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* 260.1805-1808
- Deglon N, Tseng JL, Bensadoun JC, Zurn AD, Arsenijevic Y, Pereira de Almeida L, Zufferey R, Trono D, Aebischer P *Hum Gene Ther.* 2000 Jan I; 11 (1) : 179-90.
- Devereux J et al, *Nucleic Acids Res*, 12,387-395, 1984.
- 20 Ellison DW, Kowall NW, Martin JB *J Comp Neurol.* 1987 Jun 8; 260 (2): 233-45
- Emerich DF, Cain CK, Greco C, Saydoff JA, Hu ZY, Liu H, Lindner MD *Cell Transplant.* 1997 May-Jun; 6 (3): 249-66.
- Emerich DF, Hammang JP, Baetge EE, Winn SR *Exp Neurol.* 1994 Nov; 130 (1): 141-50.
- 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.
- 25 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.
- FASEB J. 2001 Jan; 15 (1): 43-58. Review.
- Fiore, G., et al., Liver tissue expression of CD80 and CD95 antigens in chronic hepatitis C: relationship with biological and histological disease activities. *Microbios*, 1999. 97 (386): p. 29-38
- 30 Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, Brakenhoff JP, Kallen KJ, Wollmer A, Grotzinger J, Rose-John S. *Nat Biotechnol.* 1997 Feb; 15 (2): 142-5.
- Gadient, R. A. and Otten, U. H. *Prog. Neurobiol.* 1997, 52, 379-390.
- Galle, P. R., et al., Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med*, 1995. 182 (5): p. 1223-30.
- 35 *Gastroenterology.* 2003 Aug; 125 (2): 532-43.

- Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Hemmann, U., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., Horn, F., Heinrich, P. C., Graeve, L. (1996) Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the IL-6 signal transducer gp130. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J. Biol. Chem.* 271,12991-12998
- 5 Greenamyre JT, Penney JB, Young AB, D'Amato CJ, Hicks SP, Shoulson I: *Science*. 1985 Mar 22; 227 (4693): 1496-9.
- Hadjis NS, Blenkharn JI, Alexander N, Benjamin IS, Blumgart LH Outcome of radical surgery in hilar cholangiocarcinoma. *Surgery*. 1990 Jun; 107 (6): 597-604.
- Haggiag S, Chebath J, Revel M *FEBS Lett.* 1999 Aug 27; 457 (2): 200-4.
- 10 Halimi H, Eisenstein M, Oh J, Revel M and Chebath J. *Eur. Cytokine Netw.* 1995;6: 135-143.
- Harada, K. , et al., In situ nucleic acid hybridization of cytokines in primary biliary cirrhosis: predominance of the Th1 subset. *Hepatology*, 1997.25 (4): p. 791-6.
- Hepatology*. 1999 Aug; 30 (2): 469-75.
- Hepatology*. 2000 Jan; 31 (1): 149-59.
- 15 Hirano T, Matsuda T and Nakajima K: *Stem cells* 1994,12: 262-277.
- Hirota H, Kiyama H, Kishimoto T, Taga T *J Exp Med*. 1996 Jun 1; 183 (6): 2627-34.
- Hirota, H. , Kiyama, H., Kishimoto, T. , Taga, T. (1996) Accelerated nerve regeneration in mice by upregulated expression of interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor after trauma. *J. Exp. Med.* 183,2627-2634
- 20 Hottinger, A. F., Azzouz, M., Deglon, N., Aebischer, P., and Zurn, A. D. (2000). *J. Neurosci.*, 20,5587-93. *J Surg Res*. 1992 Jun; 52 (6): 648-55.
- Jones SA, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, Fuller GM. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease.
- Katz, A. , Chebath, J., Friedman, J. , and Revel, M. (1998). Increased sensitivity of IL-6- deficient mice to carbon tetrachloride hepatotoxicity and protection with an IL-6 receptor-IL-6 chimera. *Cytokines Cell Mol. Ther.*, 4, 221-7.
- 25 Klimatcheva E, Rosenblatt JD, Planelles V *Front Biosci.* 1999 Jun 1; 4: D481-96. Review.
- Kokudo N, Kothary PC, Eckhauser FE, Raper SE. Transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) improves hepatic DNA synthesis after hepatectomy in cirrhotic rats.
- Kordower JH, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Palfi S, Roitberg BZ, Emborg M, Hantraye P, Deglon N, Aebischer P *Exp Neurol*. 1999 Nov; 160 (1) : 1-16
- 30 Kordower JH, Chen EY, Winkler C, Fricker R, Charles V, Messing A, Mufson EJ, Wong SC, Rosenstein JM, Bjorklund A, Emerich DF, Hammang J, Carpenter MK *J Comp Neurol*. 1997 Oct 13; 387 (1) : 96-113.
- Kovalovich K, DeAngelis RA, Li W, Furth EE, Ciliberto G, Taub R. Increased toxin- induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice.
- 35 Kremer B, Goldberg P, Andrew SE, Theilmann J, Telenius H, Zeisler J, Squitieri F, Lin B, Bassett A, Almqvist E, et al.: *N Engl J Med*. 1994 May 19; 330 (20): 1401-6.
- Lee, M. , et al. , Expression of Th1 and Th2 type cytokines responding to HBsAg and HBxAg in chronic hepatitis B patients. *J Korean Med Sci*, 1999. 14 (2): p. 175-81.

- Lin B, Nasir J, Kalchman MA, McDonald H, Zeisler J, Goldberg YP, Hayden MR *Genomics*. 1995 Feb 10; 25 (3): 707-15.
- Loeb JE, Cordier WS, Harris ME, Weitzman MD, Hope TJ *Hum Gene Ther*. 1999 Sep 20; 10 (14): 2295-305.
- 5 Luo, K. X. , et al., In situ investigation of Fas/FasL expression in chronic hepatitis B infection and related liver diseases. *J Viral Hepat*, 1997. 4 (5): p. 303-7.
- Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- Marz, P. , Cheng, J. -G., Gadiant, R. A., Patterson, P. H., Stoyan, T., Otten, U., Rose-John, S. (1998) Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95,3251-3256
- Mendel, I., Katz, A., Kozak, N. , Ben-Nun, A. and Revel, M. *Eur. J. Immunol*. 1998 28, 1727-1737.
- 10 Murakami M, Hibi M, Nakagawa N, Nakagawa T, Yasukawa K, Yamanishi K, Taga T, Kishimoto T *Science*. 1993 Jun 18; 260 (5115) : 1808-10.
- Murakami, M., Hibi, M., Nakagawa, N., Nakagawa, T., Yasukawa, K., Yamanishi, K., Taga, T., Kishimoto, T. (1993) IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 260. 1808-1810
- Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 15; 93 (21): 11382-8.
- 15 Nielsen LL, Gurnani M, Syed J, Dell J, Hartman B, Cartwright M, Johnson RC. Recombinant E1-deleted adenovirus-mediated gene therapy for cancer: efficacy studies with p53 tumor suppressor gene and liver histology in tumor xenograft models. *Hum Gene Ther*. 1998 Mar 20; 9 (5): 681-94.
- Novick D, Shulman LM, Chen L and Revel M. *Cytokine* 1992, 4: 6-11.
- Novick D. Engelmann H. Wallach D. Leitner O. Revel M. Rubinstein M. *Journal of Chromatography* 1990. 510: 331-7.
- 20 Novick, D., Shulman, L. M., Chen, L. and Revel, M. *Cytokine* 1992 4, 6-11.
- Okamoto, T., et al., Induction of Fas ligand and Fas antigen mRNA expressions in interferon- γ transgenic mouse liver. *Jpn J Pharmacol*, 1998. 78 (2): p. 233-5.
- Okazaki, M., et al., Hepatic Fas antigen expression before and after interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci*, 1996. 41 (12): p. 2453-8.
- 25 Paonessa G, Graziani R, Deserio A, Savino R, Ciapponi L, Lahmm A, Salvati AL, Pearson W R and Lipman D J, *Proc Nat Acad Sci USA*, 85, 2444-2448, 1988
- Pearson W R, *Methods in Enzymology*, 183,63-99, 1990
- Peters M, Blinn G, Jostock T, Schirmacher P, Meyer zum Buschenfelde KH, Galle PR, Rose-John S. Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration. *Gastroenterology*. 2000 Dec; 30 119 (6): 1663-71.
- Roberts RC, Ahn A, Swartz KJ, Beal MF, DiFiglia M *Exp Neurol*. 1993 Dec; 124 (2): 274-82
- Saito, M., Yoshida, K., Hibi, M., Taga, T., Kishimoto, T. (1992) Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer gp130, and its regulated expression in vivo. *J. Immunol*. 148,4066-4071
- 35 Selzner M, Camargo CA, Clavien PA. Ischemia impairs liver regeneration after major tissue loss in rodents: protective effects of interleukin-6.
- Smith and Waterman *J Mol Biol*, 147,195-197, 1981, *Advances in Applied Mathematics*, 2,482-489, 1981.

Streetz KL, Wustefeld T, Klein C, Kallen KJ, Tronche F, Betz UA, Schutz G, Manns MP, Muller W, Trautwein C. Lack of gp130 expression in hepatocytes promotes liver injury.

Strong TV, Tagle DA, Valdes JM, Elmer LW, Boehm K, Swaroop M, Kaatz KW, Collins FS, Albin RL Nat Genet. 1993 Nov; 5 (3): 259-65.

5 Taga, T., Hibin M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T. and Kishimoto, T. Cell 1989 58, 573-581.

Taieb, J., et al., Raised plasma soluble Fas and Fas-ligand in alcoholic liver disease [letter]. Lancet, 1998.351 (9120): p. 1930-1.

Toniatti C and Ciliberto G. EMBO J. 1995; 14: 1942-1951.

10 Toulmond, S., Vige, X., Fage, D., and Benavides, J. Neurosci Lett 1992,144, 49-52.

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.

Yamada, M., and Hatanaka, H.: Brain Res 1994,643, 173-80.

15 Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ J Virol. 1999 Apr; 73 (4): 2886-92.

Kollet O, Aviram R, Chebath J, ben-Hur H, Nagler A, Shultz L, Revel M, Lapidot T. El receptor de interleucina-6 (IL-6) soluble/ proteína de fusión de IL-6 aumenta invitro el mantenimiento y proliferación de células CD34(+)/CD38(-/bajo) humanas de ratones con inmunodeficiencia combinada grave de repoblación.

20 Blood. 1999 Aug 1; 94(3): 923-31.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de IL-6 o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o sal de la misma, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cirrosis hepática tratada mediante resección hepática, comprendiendo opcionalmente dicho medicamento un vehículo farmacéuticamente aceptable, en que el medicamento es para una administración a una dosis que varía en el intervalo de 0,1 a 10 mcg/kg; y en que adicionalmente el derivado funcional comprende al menos un resto de polietileno unido a uno o más grupos funcionales que se producen en forma de una o más cadenas laterales en los residuos de aminoácidos y la muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o sal es capaz de unirse al sitio de unión de IL-6 de gp80.
- 10 2. El uso según la reivindicación 1, en el que la cirrosis hepática es cirrosis compensada o cirrosis descompensada.
3. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la IL-6 está glicosilada en uno o más sitios o está no glicosilada.
4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteína fusionada comprende una fusión de inmunoglobulina (Ig), IL-6 y gp80, o un fragmento de gp80.
- 15 5. El uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento comprende (i) una célula que expresa la IL-6 o una muteína, isoforma, proteína fusionada o fracción activa de la misma, o (ii) un vector de expresión que comprende la secuencia codificadora de la IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o sal de la misma.
6. El uso según la reivindicación 5, en el que el vector es un vector lentiviral.
- 20 7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el medicamento es administrado antes, durante y/o después del tratamiento de resección.
8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el medicamento es para una administración a aproximadamente 0,1 µg/kg, 1 µg/kg ó 10 µg/kg.
- 25 9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la IL-6, o muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o sal de la misma es administrada diariamente, tres veces por semana o una vez a la semana.
- 30 10. Uso de IL-6 o una muteína, proteína fusionada o fracción activa de la misma, en la elaboración de un medicamento para tratar cirrosis hepática seguida de injerto, en que el medicamento es para una administración a una dosis que varía en el intervalo de 0,1 a 10 mcg/kg; y en que adicionalmente la muteína, proteína fusionada o fracción activa es capaz de unirse al sitio de unión de IL-6 de gp80.
11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en que la cirrosis es grave.
12. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en que la cirrosis es aguda.

Fig. 1.

		% mortalidad	anestesia	técnica
	Testigos:	11/39 (28,2)	3	8
	IL-6:	10/80 (12,5)	5	5
L.D. (Dosis bajas)	IL 0,1:	0/12 -	-	-
	IL 1:	2/14 (14,2)	2	-
	IL 10:	2/20 (10,0)	2	-
H.D. (Dosis elevadas)	IL 100:	4/21 (19,0)	1	3
	IL 500:	2/13 (15,4)	0	2
	IL L.D.:	4/46 (8,7)		
	IL H.D.:	6/34 (17,6)		

Fig. 2

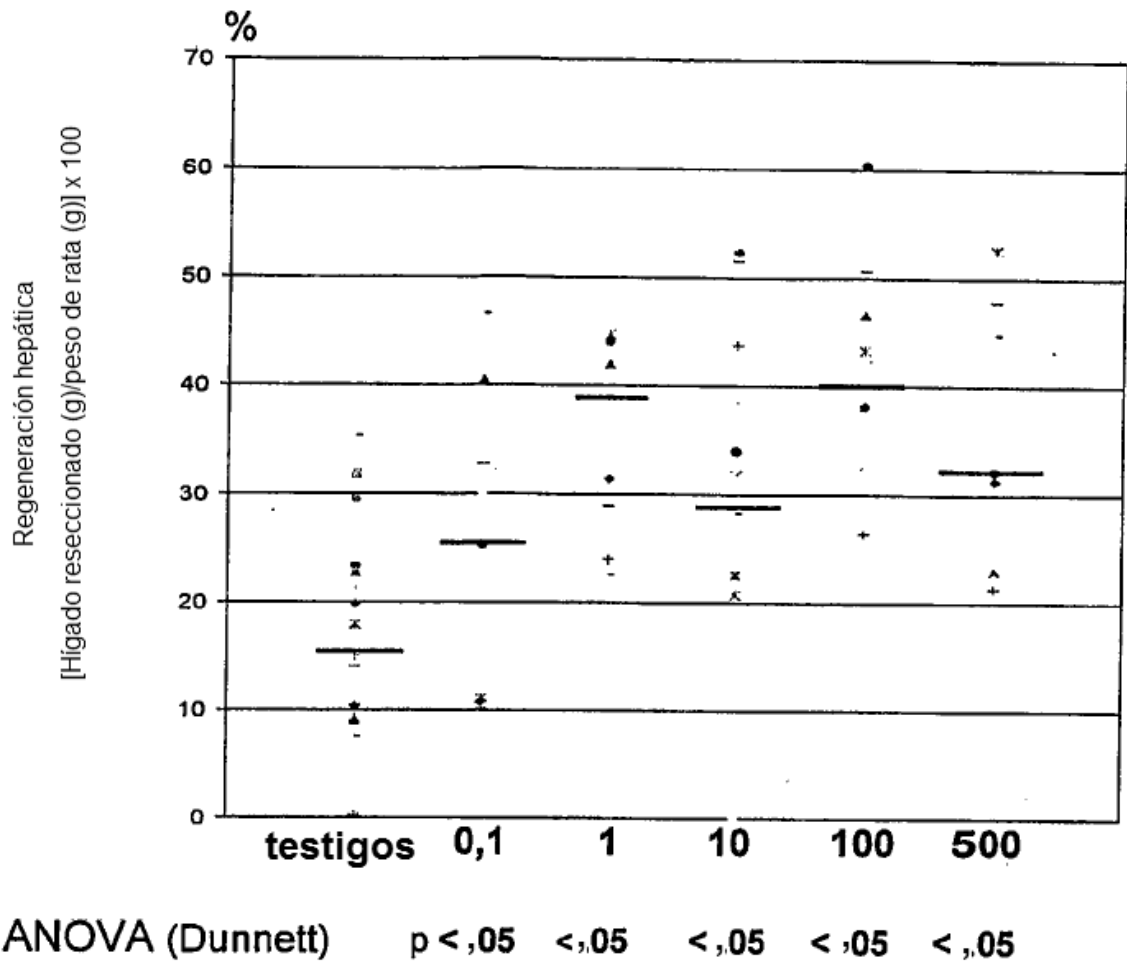
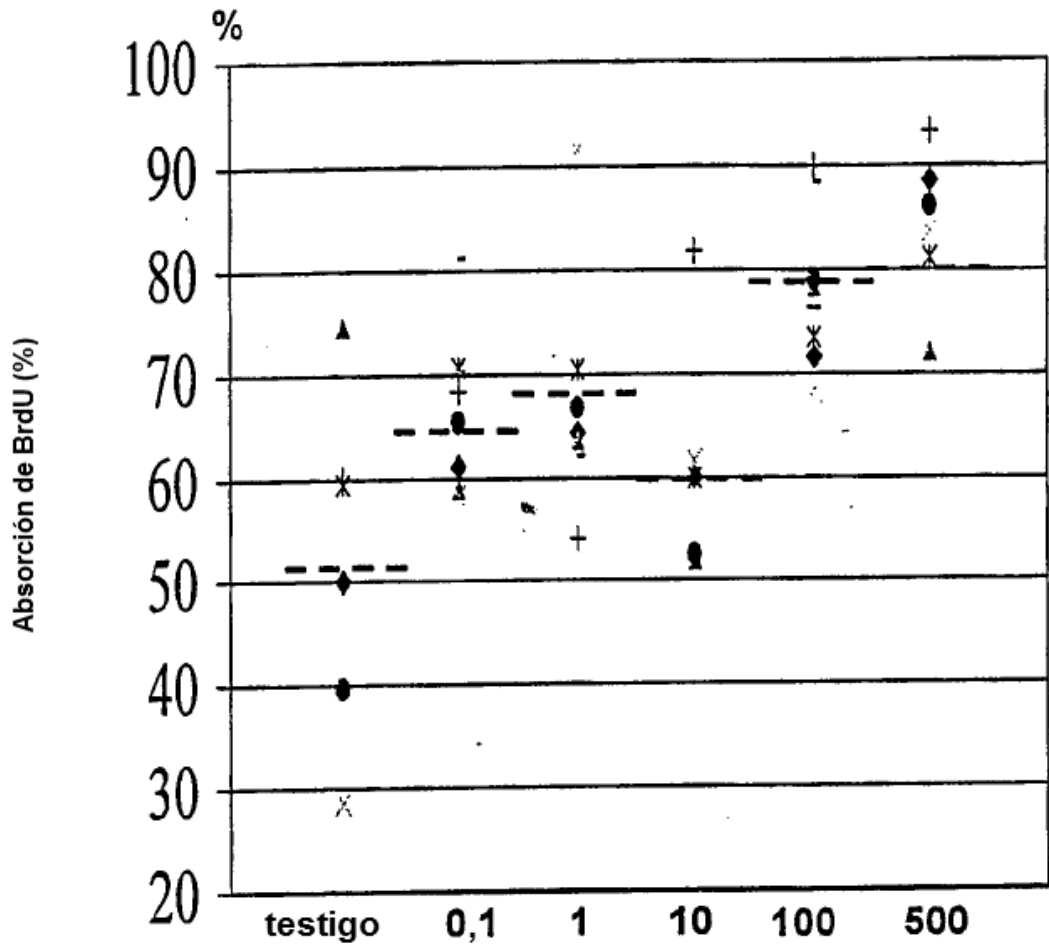


Fig. 3



ANOVA (Dunnett) p = <,05 <,05 n.s. <,05 <,05

Fig. 4

Horas después de la inyección (100µg/Kg):

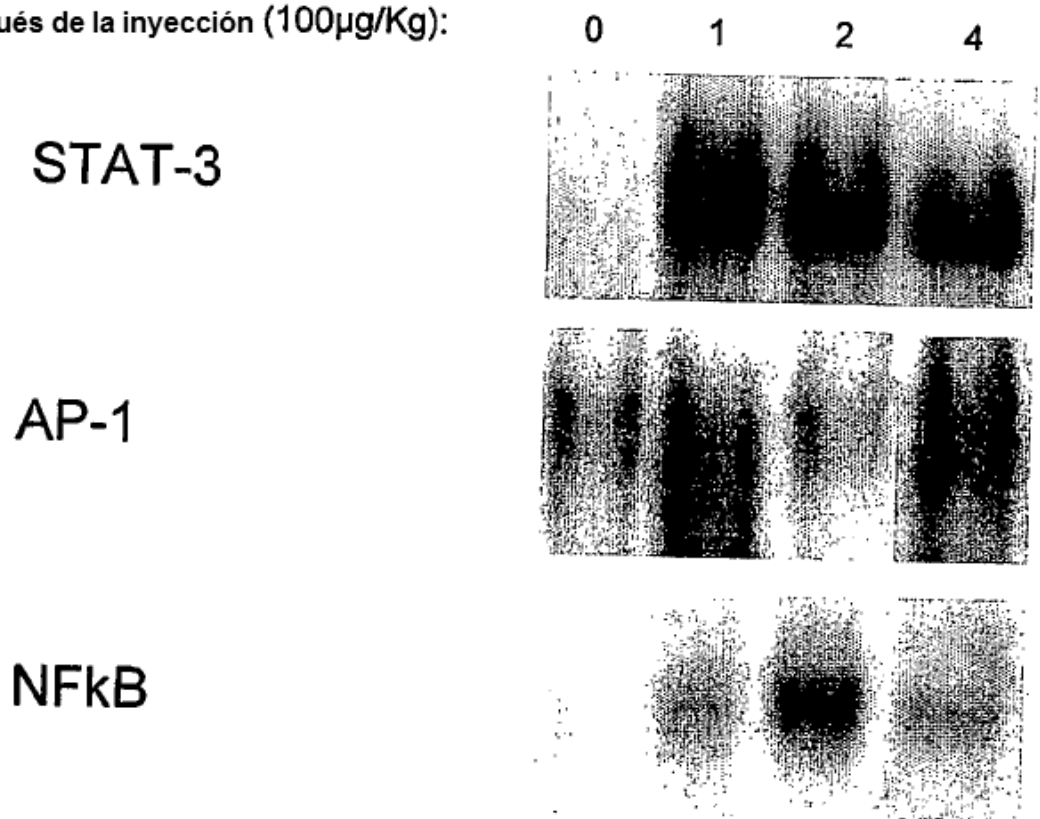


Fig. 5

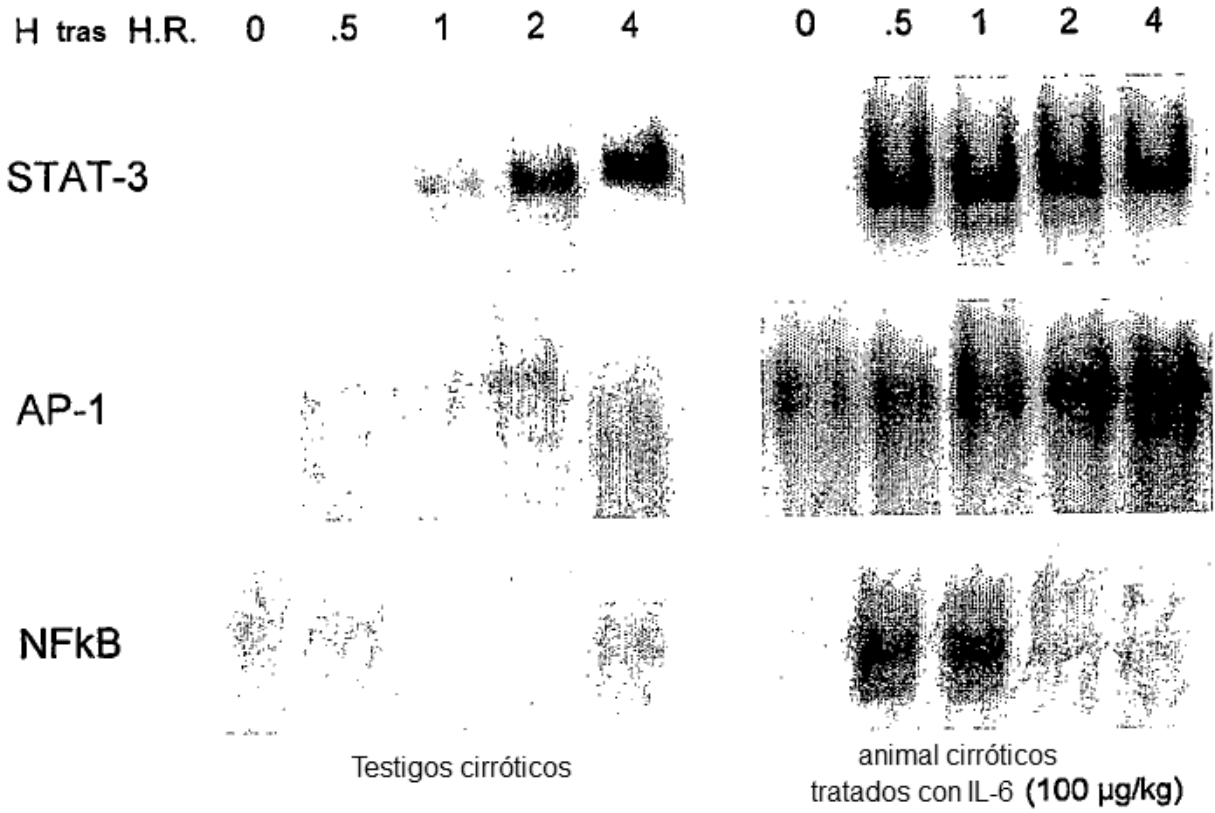


Fig 6

Receptores de IL-6 en ratas normales y cirróticas: gp 130 y gp 80

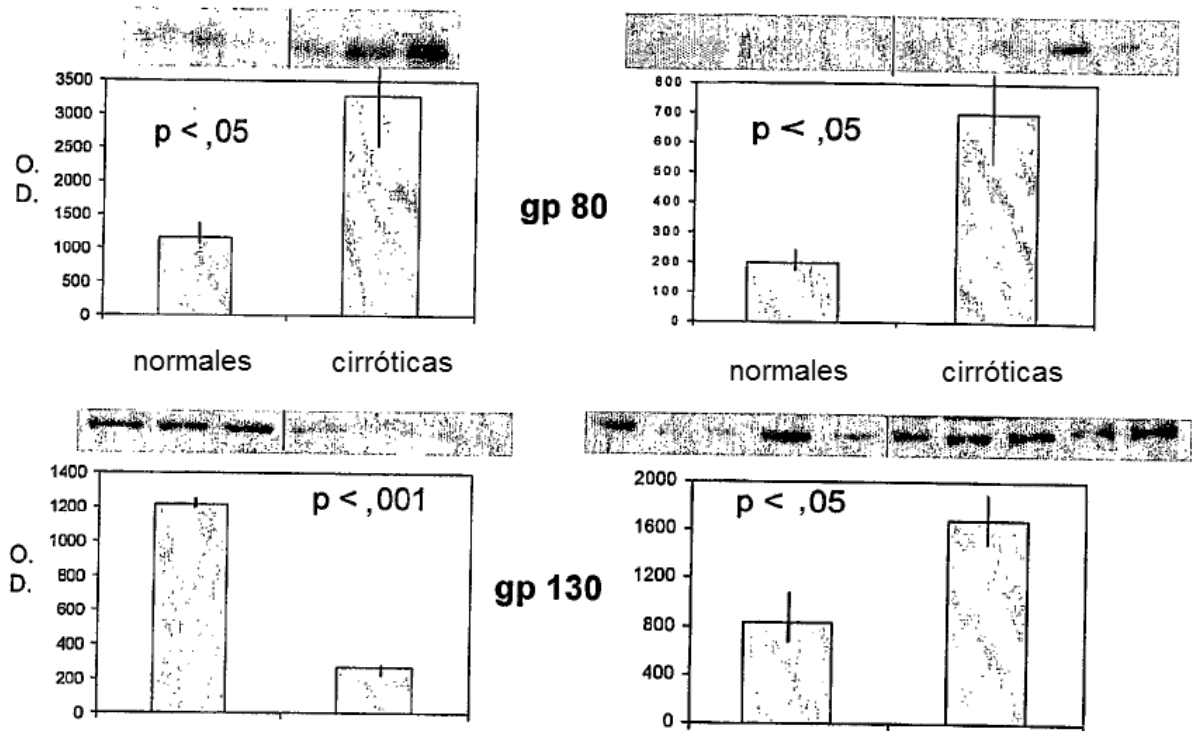


Fig. 8

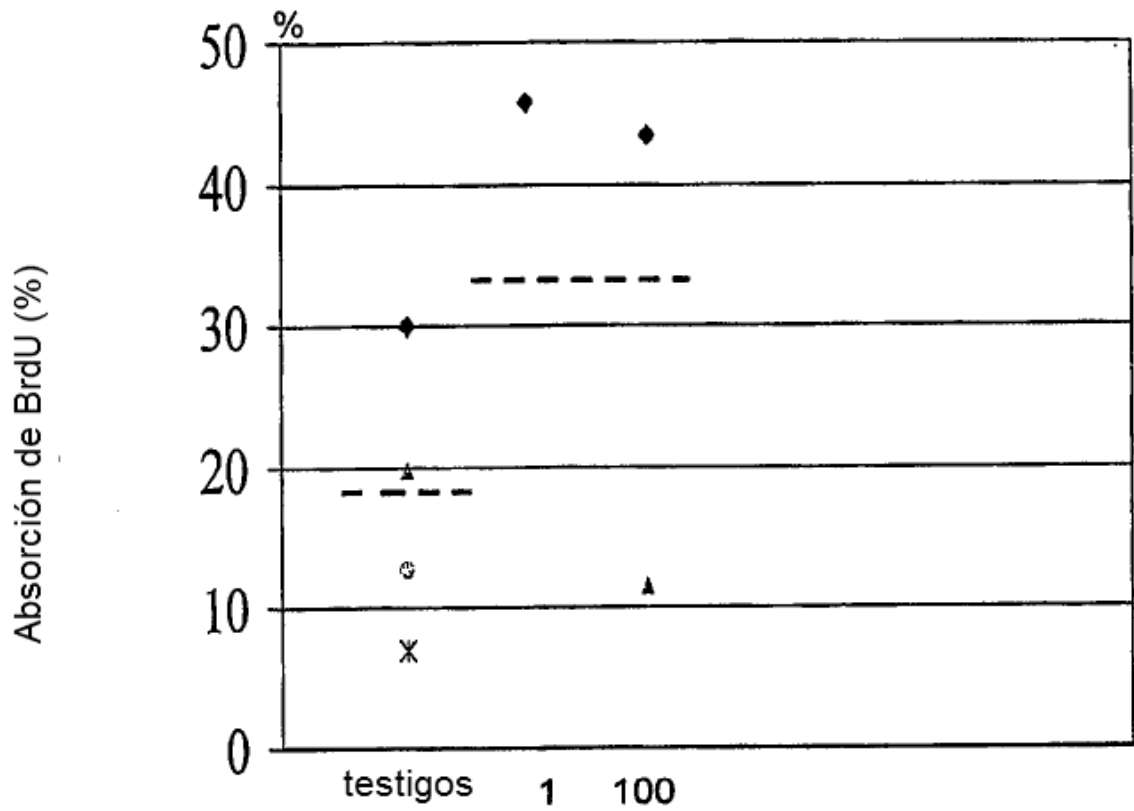


Fig. 9

