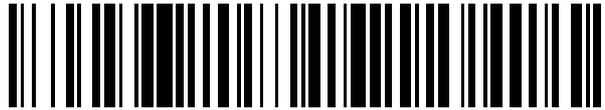


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 156**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/20** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61K 35/30** (2015.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**A61P 25/16** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.12.2002 E 02796952 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 1461066**

54 Título: **Uso de quimera IL6R/IL6 en la regeneración de células nerviosas**

30 Prioridad:

**31.12.2001 IL 14741201**

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

**05.05.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**REVEL, MICHEL;  
CHEBATH, JUDITH;  
LEVY, ALON;  
ZHANG, PEILIN y  
HAGGIAG, SHALOM**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 535 156 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 quimera IL6R/IL6 en la regeneración de células nerviosas

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a métodos para la preparación de células nerviosas y células gliales diferenciadas para trasplante en pacientes para tratar lesiones del SNC.

**Antecedentes de la invención**

10 El sistema nervioso consiste en dos partes principales: el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP). El SNC incluye el cerebro y la médula espinal, y el SNP consiste en todo el tejido nervioso que está fuera del SNC. El cerebro consiste en el tejido nervioso que está dentro del cráneo. El SNP está organizado en nervios, haces de tejidos nerviosos que emanan desde el SNC y se extienden a lo largo del cuerpo, donde proporcionan caminos para que viajen las señales a las partes del SNC (Encyclopaedia of human biology, vol. 5 Ed Dulbecco).

15 El sistema nervioso autónomo es aquella parte del SNP que regula las actividades involuntarias inconscientes, tales como el control del latido cardíaco, movimientos del aparato digestivo o actividades glandulares. Consiste principalmente en neuronas eferentes viscerales que llevan impulsos motores al músculo cardíaco, ciertas glándulas, y músculos lisos en vasos sanguíneos y órganos de las cavidades torácica y abdominal.

20 El sistema nervioso autónomo tiene dos subdivisiones, anatómica y funcional, diferenciadas: simpática y parasimpática. Las neuronas simpáticas emergen desde las regiones torácica y lumbar de la médula espinal e inervan músculos lisos de las arterias. Al igual que las arterias, las fibras simpáticas penetran en todas las partes del cuerpo. El efecto general del sistema nervioso simpático es preparar el cuerpo para la acción en situaciones estresantes.

25 La otra división, el sistema parasimpático, o cráneo-sacral, funciona como principal suministro nervioso a ciertas estructuras en la cabeza. El sistema parasimpático estimula actividades de los órganos y glándulas digestivos y disminuye el ritmo cardíaco y respiratorio. Tiende a calmar el cuerpo después de una experiencia que ha producido estrés, y promueve actividades que mantienen el sistema de soporte de vida.

30 El término "regeneración" generalmente representa la capacidad de un organismo para reemplazar el tejido perdido. Por ejemplo después de una extirpación quirúrgica de un lóbulo hepático, se produce un nuevo tejido hepático que funciona. Por el contrario, el sistema nervioso usualmente no forma nuevas células nerviosas (neuronas) después de una lesión y, por lo tanto, no reemplaza el tejido perdido. La recuperación de la función perdida del sistema nervioso, cuando esto ocurre, está mediada por el proceso regenerativo limitado. Después de seccionar un haz de fibras nerviosas, los axones pueden volver a crecer desde cuerpos celulares neuronales supervivientes, finalmente se volverán a formar conexiones apropiadas con otras neuronas. Generalmente se encuentra una regeneración exitosa si el haz nervioso cortado es en el SNP. Este es un claro contraste con el curso de los acontecimientos después de lesiones dentro del SNC. En daños en el cerebro o médula espinal de vertebrados de sangre caliente, la recuperación de la función está extremadamente limitada.

40 El factor de crecimiento nervioso (FCN) es una proteína neurotrófica, es decir, una proteína especial que controla el mantenimiento, tamaño, extensión de procesos y síntesis de transmisores en neuronas seleccionadas del SNP y SNC. Desde el descubrimiento del FCN, hace unos 40 años, se proporcionó la primera prueba de que las células nerviosas dependen de factores extrínsecos específicos para su supervivencia y función. Déficits de FCN endógeno u otros factores neurotróficos pueden subyacer o agravar determinados trastornos neurodegenerativos humanos, así como de la incapacidad aparente de regenerar las neuronas adultas lesionadas del SNC. Nuevas técnicas hicieron posible el descubrimiento de otros factores tróficos relacionados con el FCN, estos factores denominados neurotrofinas (NTFs) incluyen el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofinas-3 (NT-3), neurotrofina 4/5 (NT-4/5) y neurotrofina-6 (NT-6). También se descubrieron otros factores neurotróficos no relacionados con NTFs: tales como factores de crecimiento de tipo insulina 1 y 2 (IGF-1, IGF-2), factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) y otra familia de factores neurotróficos, que incluye el factor neurotrófico ciliar (CNTF) factor de inhibidor de la leucemia (LIF), interleucina-6 (IL-6), oncostatina M y Cardiotrofina-1 (CT-1), (revisada en *Elsvier's Encyclopedia of neuroscience* eds Adelman et al. 1999).

50 LIF, CNTF, CT-1, OSM, IL-6 e IL-11 son citoquinas que usan gp 130 en sus respectivos complejos del receptor como componente de la transducción de la señal (Taga et al. 1989, Kishimoto et al. 1994, Sthl et al. 1994 y Taga et al. 1997). LIF, CNTF, CT-1 y OSM soportan la supervivencia de varios tipos de neuronas in vitro (Emsberger et al. 1989, Martinou et al. 1992, Taga 1996 y Horton et al. 1998). Inducen las propiedades colinérgicas de neuronas autónomas cultivadas (Yamamori et al. 1989, Patterson 1994). La CNTF introduce la diferenciación de las neuronas autónomas (Emsberger et al. 1989).

55 Se ha sugerido que la IL-6 actúa como un factor de supervivencia nervioso. Hama et al. (1989) informaron de que la IL-6 puede actuar como un agente neurotrófico, independiente de la acción del FCN, apoyando la supervivencia

neuronal de neuronas colinérgicas cultivadas de septo de rata postnatal. Se demostró, que la IL-6 al contrario que el FCN, no afecta a la diferenciación de neuronas colinérgicas cultivadas de septo de rata embrionaria. Horton et al. (1998) mostraron pruebas de que la diferenciación de neuronas sensoriales a partir de células progenitoras de origen de la cresta neural son promovidas por la LIF y que sólo en una etapa posterior del desarrollo, la IL-6 promueve la supervivencia de neuronas cultivadas. Kushima et al. (1992) informaron que la IL-6 apoyaba la supervivencia de neuronas colinérgicas septales obtenidas a partir de ratas de 10 días de vida. La IL-6, sin embargo, a diferencia de FCN, no indujo la diferenciación de neuronas colinérgicas septales de rata embrionaria.

Una revisión de los efectos de la IL-6 en células sobre el sistema nervioso central y periférico indica que la citoquina puede tener efectos protectores sobre células neuronales así como participar en procesos inflamatorios neurodegenerativos (Gadient y Otten, 1996, Mendel et al., 1998). En células gliales, CNTF y LIF son mucho más activas que IL-6 para estimular la diferenciación de astrocitos y no hay efecto sobre las células que producen la proteína de mielina (Kahn y De Vellis, 1994). Se descubrió que la IL-6 prevenía la muerte de células inducida por glutamato en neuronas hipocámpales (Yamada et al. 1994) así como estriadas (Toulmond et al. 1992). Todavía se desconoce el mecanismo de neuroprotección de la IL-6 en contra de la toxicidad provocada por la N-metil-D-aspartato (NMDA), el agonista selectivo para el subtipo NMDA de receptores de glutamato. De hecho se descubrió que la IL-6 mejoraba el aumento de calcio intracelular mediado por NMDA. En ratones transgénicos que expresan altos niveles tanto de IL-6 como de la IL-6R soluble (sIL-6R), se observó una aceleración de la regeneración nerviosa después de la lesión del nervio hipogloso como se demuestra por el marcado retrógrado de los núcleos hipoglosos del cerebro (Hirota et al. 1996). En este trabajo, la adición de IL-6 y de sIL-6R a cultivos de células de los ganglios de la raíz dorsal (GRD) demostró un incremento de la extensión de la neurita en neuronas, pero no se informó de un efecto en células mielinizantes o en la generación nerviosa a partir de células madre.

Marz et al. (1998) demostraron que en la línea celular PC-12 (Greene et al. 1976), que es una línea derivada de tumor de un feocromocitoma trasplantable de rata (tumor vascular de tejido cromafínico de la médula adrenal o paraganglio simpático), sólo la combinación de IL-6R e IL-6 pero no IL-6 en solitario, induce la diferenciación de neurona específica. Este resultado no está en línea con el hecho de que estas células expresen el receptor IL-6.

Como se menciona anteriormente, CNTF y LIF son citoquinas que actúan a través de un sistema receptor común que comprende el receptor LIF (LIFR) y la cadena de gp130, siendo también esta última, parte del complejo receptor de la Interleucina-6 (IL-6) (Ip et al., 1992). Por lo tanto, el CNTF y LIF son parte de la familia IL-6 de citoquinas. En el caso de CNTF y LIF, la transducción de señal opera a través de la dimerización de LIFR con gp130, mientras que en el caso de IL-6 la señal se genera por la dimerización de dos cadenas de gp130 (Murakami et al., 1993). Para unirse a la gp130, los complejos de IL-6 con una cadena del Receptor de IL-6, que existe en determinadas células como una proteína transmembrana gp80, pero cuya forma soluble puede también funcionar como un agonista de IL-6R cuando se suministra del exterior de la célula (Taga et al., 1989, Novick et al., 1992). Por fusión de regiones codificadoras completas de los cADNs que codifican el receptor de la IL-6 soluble (sIL-6R) e IL-6, se puede producir una quimera recombinante IL6R/IL6 en células CHO (Chebath et al., 1997, WO99/02552). Esta quimera IL6R/IL6 ha mejorado las actividades biológicas de tipo IL-6 y se une con mucha mayor eficiencia a la cadena in vitro de gp130 que la mezcla de IL-6 con sIL-6R (Kollet et al., 1999).

La implicación de IL6R/IL6 en la diferenciación de células mielinizantes se observó y estudió por primera vez en una línea celular de melanoma F10.9, donde el tratamiento con la quimera IL6R/IL6 causó la transdiferenciación de células Schwann mielinizantes (Chebath et al. 1997). Este proceso implicó detención del crecimiento, pérdida de la síntesis de melanina e incremento de marcadores en células gliales. Se ha demostrado recientemente que la quimera IL6R/IL6 induce a la mielinización de genes, por ejemplo MBP y PO, en precursores de células Schwann (SC) embrionarias y en varias células tumorales de origen de cresta neural (Chebath et al. 1997, Haggiag, et al. 1999, Haggiag et al., J.Neurosci. Res. 2001).

Se ha observado que explantes de GRD de rata embrionaria cultivadas en presencia de la quimera IL6R/IL6 forma focos de células con extensiones dendríticas multipolar (estelar) características, como se ve en células Schwann u oligodendrocitos. Estas células similares a las células Schwann se aislaron y se descubrió que su crecimiento era dependiente de IL6R/IL6. Se prepararon subclones de estas células y se las llamó células CH (Haggiag et al. 1999). Las células CH son precursores de poblaciones de células Schwann, que se pueden diferenciar en dos direcciones: células Schwann mielinizantes o células de la musculatura lisa. Cuando las células CH se mantuvieron sin IL6R/IL6, las células CH clon 1D11 tienen una morfología lisa y un crecimiento lento, y tienen la actina del músculo liso (SMA). Al contrario, cuando las células CH se trataron con IL6R/IL6, más células se diferencian en el fenotipo de célula Schwann y la actina de la musculatura lisa no se expresa más. Durante el tratamiento de células CH con IL6R/IL6, la expresión del gen de mielina P0 y MBP es inducida, y la expresión de Pax-3 es reprimida, indicando diferenciación hacia células mielinizantes SC. Cuando las células CH o SC se co-cultivaron con neuronas de ratón purificadas de GRDs, IL6R/IL6 estimula la conexión de estas células a lo largo de los axones, y la síntesis de proteína de mielina P0 (Haggiag et al, J. Neurosci. Res. 2001).

La solicitud PCT/IL00/00363 se refiere al uso de la quimera IL6R/IL6 para la fabricación de un medicamento que regenera o estimula las células mielinizantes, aumenta o acelera las células mielinizantes e induce, aumenta, prolonga o acelera la neuroprotección y reduce o desacelera la muerte neuronal.

Células aisladas a partir de tubos neurales de rata embrionaria E10.5 han demostrado experimentar rondas múltiples de divisiones de autorrenovación en el cultivo, y diferenciación en neuronas, células Schwann, y miofibroblastos de músculo similar al liso. (Shah et al. 1996). Estas células se han denominado células madre de la cresta neural (NCSCs). Células con propiedades similares se aislaron a partir del nervio ciático de rata fetal E14.5, utilizando anticuerpos de superficie celular específicos (Morrison et al. 1999). Tales NCSCs derivadas del nervio ciático (sNCSCs) son multipotentes y se autorrenuevan tanto in vivo como in vitro. Ellas responden adecuadamente a señales de diferenciación instructivas tales como la proteína morfogénica ósea 2 (BMP2) y el factor de crecimiento glial 2 (GGF2)/neuregulina 1 (Nrg1) (Shah et al. 1994, 1996, 1997 y Morrison et al. 1999). Estos datos sugieren que las células madre multipotentes que se autorrenuevan migran desde la cresta neural de los tubos neurales a los tejidos periféricos y continúan autorrenovándose después en los tejidos periféricos en la gestación.

El potencial de las sNCSCs postmigratorias aisladas de nervio ciático de rata fetal se estudió por trasplante directo in vivo en embriones de pollo (White et al. 2001). La proteína morfogénica ósea 2 (BMP2) induce diferenciación de sNCSCs en células nerviosas y sugiere que la elección de la diferenciación de estas células a cualquiera de los destinos simpático o parasimpático, puede estar determinado por la concentración local de este factor.

Las células autónomas, las células Schwann (glial) y músculo liso se desarrollan a partir de células de la cresta neural (Stemple et al. 1992). Se conocen tres factores de crecimiento que promueven la diferenciación a lo largo de cada una de estos tres linajes, respectivamente: proteína morfogénica ósea 2 (BMP2), factor de crecimiento glial 2 [GGF2, una neuregulina] y factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) (Shah et al. 1994 y 1996). El análisis clonal y la observación secuencial de las células identificadas ha sugerido que cada uno de estos factores actúa instructivamente en lugar de selectivamente sobre NCSCs [aunque algunos de los factores pueden realizar ambos (Dong et al. 1995)] por ejemplo GGF2, BMP2, y TGF- $\beta$ 1 individualmente dirigen la diferenciación en lugar de la supervivencia o proliferación de la mayoría de las NCSCs identificadas individuales cultivadas a densidad clonal. Así, la cresta neural representa uno de los pocos sistemas en los que se han identificado señales de determinación de linaje instructivo para las células madre multipotentes (Morrison et al. 1997).

Se han realizado experimentos en los que se han expuesto las NCSCs a diferentes combinaciones de señales instructivas. Según la combinación y concentración específica de las señales probadas, los experimentos mostraron que (i) la influencia de una señal podía dominar sobre otras o (ii) las señales podían ejercer influencias equivalentes, produciendo una mezcla de una progenie comprometida con linaje. Por lo tanto, estos datos sugieren que el destino de la célula madre está no sólo determinado por los factores que estén presentes en el medio sino que también está influenciado por las diferencias intrínsecas de las células en lo relativo a la sensibilidad y sincronización de respuesta a diferentes señales medioambientales (Shah et al. 1997).

Las células madre neurales no sólo existen en el desarrollo del sistema nervioso de mamíferos (embrionario) sino que también están en el sistema nervioso adulto de todos los organismos mamíferos, incluyendo los seres humanos. Las células en división en la zona subventricular de ratón (SVZ) continuamente se auto-renuevan y dan lugar a progenies que emigran al córtex olfatorio, donde se diferencian en astrocitos, oligodendrocitos y neuronas (Altman et al. 1996 y Lois et al. 1994).

La función de estas células madre en el sistema nervioso adulto es incierta. Una posibilidad es que sean vestigios de la evolución desde organismos más primitivos o un punto de vista alternativo es que el sistema nervioso del adulto mamífero retiene una capacidad ilimitada para auto-renovarse que es importante para sus funciones normales, como el aprendizaje y la memoria. Es posible que la generación local de nuevas neuronas en estructuras pudieran participar en la formación o integración de nuevas memorias. La capacidad de neurogénesis del adulto para ser regulado por cambios en el medioambiente además apoya el modelo en un comportamiento normal. Las implicaciones harían que el cerebro controlase el comportamiento y que el comportamiento pueda cambiar la estructura del cerebro (Gage et al. 2000).

La solicitud de Patente WO0066188 describe el xenotrasplante de células del plexo coroideo de un mamífero neonatal para proporcionar un suministro en estado estacionario de factores tróficos para administración a un sistema nervioso central en necesidad de tratamiento para una enfermedad neurológica. El plexo coroideo es un tejido vascular bien inervado (más correctamente un órgano) cubierto con una membrana base que comprende las variantes habituales del colágeno, uno o más tipos de proteoglicanos de laminina y otras moléculas matriz extracelulares, que está cubierto a su vez por una capa similar a un epitelio unicelular y que ocurre en varios sitios compatibles dentro de los 230 ventrículos cerebrales. Éste parece actuar como el origen de la mayor parte del fluido cerebroespinal.

WO0066188 describe una composición farmacéutica, que comprende un implante para implantación en el cerebro de un mamífero receptor que padece una enfermedad neurológica, en donde el implante comprende células vivas, derivadas de células epiteliales del plexo coroideo de otro mamífero, y las células vivas son capaces de expresar al menos un producto que tiene un efecto beneficioso sobre la enfermedad neurológica en el cerebro del mamífero receptor. La memoria de esta patente describe el suministro de factores neurotróficos del implante para prevenir déficits de FCN endógenos o de otros factores neurotróficos, que pueden subyacer o agravar ciertos trastornos neurodegenerativos humanos, así como la aparente incapacidad de regeneración de las neuronas del SNC de un adulto lesionado.

Por ello existe una necesidad de proporcionar una composición terapéutica que permita el reemplazo del nervio en pacientes que padecen una enfermedad neurológica.

**Compendio de la invención**

La presente invención se refiere a los siguientes aspectos:

- 5 1. Método para la preparación de células nerviosas y células gliales diferenciadas para el trasplante en pacientes para tratar lesiones del SNC comprendiendo dicho método la etapa de estimular células progenitoras neurales con una composición que comprende una quimera IL6R/IL6, ex vivo, en donde las células progenitoras neurales no son de origen embrionario humano.
- 2. El método del aspecto 1, en donde las células progenitoras neurales son de origen embrionario no humano.
- 10 3. El método del aspecto 1, en donde las células progenitoras neurales son de origen adulto.

**Breve descripción de las figuras**

La figura 1 muestra cultivos GRD de embriones de rata E14 tratados con quimera IL6R/IL6.

15 Se cultivaron primero células GRD disociadas durante 4 días en un cubreobjetos de vidrio recubierto (cubierta de polifibronectina DL-lisina) en un medio que comprende DMEM/F12 (1:1) un 1% de extracto de embrión de pollo, bFGF 20 ng/ml, 1% de suplemento N2 (Gibco), 2% de suplemento B27 (Gibco), mercaptoetanol 50 µM, 35 mg/ml (110 nM) de ácido retinoico (Morrison et al., 1997). En este momento, algunos cultivos se enriquecieron con quimera pura rhIL6R/IL6 producida en células CHO (200 ng/ml; 2.3 nM), otras no se tratan (NT), o se enriquecen con BMP-2 (2nM). Después de 9 días ( día 13 desde el comienzo del cultivo) las células GRD se fijaron y se sometieron a inmunotinción fluorescente para buscar el marcador de beta tubulina III específico de neurona y se fotografió bajo luz UV. En la fila superior, de izquierda a derecha: sin tratar (NT), con IL-6RIL-6, con BMP-2. Aumento 50 x. En la fila inferior, de izquierda a derecha: todo con IL-6RIL-6, el panel medio muestra la fase de microscopía de las células. Aumento 100 x.

25 La figura 2 muestra cultivos GRD de embriones de rata E14 preparados y mantenidos como en la figura 1. Los cultivos se enriquecieron desde el día 1 con IL6R/IL6 (200 ng/ml, 2.3 nM), o BMP-2 (2 nM) o Heregulina (300 ng/ml), o se dejaron sin tratar (NT). Al día 12, las células adheridas al cubreobjetos se fijaron y sometieron a inmunotinción fluorescente para buscar el marcador celular de la cresta neural p75 LNGFR (Receptor del FCN de baja afinidad). En la parte superior izquierda: no tratadas. En la parte superior derecha: con IL6RIL-6. En la parte inferior izquierda: BMP-2. En la parte inferior derecha: Heregulina. Se observa el alargamiento de la célula en el cultivo con IL6RIL6. Aumento 100 x.

30 La figura 3 muestra una población enriquecida de células progenitoras derivadas de la cresta neural después de su cultivo durante 12 días en presencia de (+IL6RIL6) o ausencia (NT) de la quimera IL6R/IL6. La población enriquecida de células de la cresta neural se aisló por clasificación de células GRD de rata E14 para células p75 LNGFR-positivo (un marcador temprano específicamente presente en células progenitoras derivadas de la cresta neural). Estas células se cultivaron luego como en la figura 1, enriqueciendo los cultivos en el día 1 con o sin adición de IL6RIL-6 (200 ng/ml). Las células adheridas al cubreobjetos se sometieron a inmunotinción para buscar un marcador de neuronas y axones (beta tubulina III específica de neurona). Aumento 100 x.

40 La figura 4 muestra una población enriquecida de células progenitoras derivadas de la cresta neural (preparada como se describe en la figura 3), cultivada durante 12 días con IL6RIL6 (como en la figura 1) y sometida a inmunotinción por fluorescencia bien para buscar un marcador de neuronas y axones (beta tubulina III específica de neurona) o bien para buscar el marcador de células progenitoras derivadas de la cresta neural (p75LNGFR). Las células se observaron por microscopio UV en condiciones donde solo las células inmunotefidas son visibles: fila superior, izquierda: teñido por LNGFR (Aumento 100x); mitad: teñido por tubulina neurona-específica (diferente campo, 100x); derecha: LNGFR (Aumento 300x). En la fila inferior los mismos campos (como en el fila superior respectivamente) se observaron bajo la fase de contraste para visualizar todas las células.

45 La figura 5 muestra las células gliales en una población enriquecida de células progenitoras derivadas de la cresta neural (preparado como se describió en la figura 3) cultivadas durante 8 días con IL6RIL6, o con BMP-2, o sin adición (como se describió en la figura 1). Los cultivos fijados se sometieron a inmunotinción fluorescente para buscar el marcador de la célula glial GFAP, y se observó por microscopio UV. En paneles superiores: se observaron colonias compactas de células gliales pequeñas GFAP-positivo bien sin tratamiento (izquierda) o bien con BMP-2 (derecha). En paneles inferiores: cultivos de células tratadas con IL6RIL6 mostraron un cambio drástico, alargándose las células gliales y formando haces de células alineadas.

55 La figura 6 muestra células gliales que tuvieron diferenciación en células Schwann mielinizantes a partir de una población enriquecida de células progenitoras derivadas de la cresta neural (preparada como se describió en la figura 3) cultivadas durante 11 días con IL6RIL6 (200ng/ml) bajo las condiciones descritas en la Fig. 1. Los cultivos fijados se sometieron a inmunotinción fluorescente para buscar el factor de transcripción Krox-20, específico para

5 células Schwann mielinizantes. Panel inferior: las células observadas mediante microscopía de contraste de fase muestran un flujo de células alargadas (del tipo que se muestra en la Fig.4 para contener fibras de axones). En los paneles superiores: células observadas mediante microscopio UV muestran que el núcleo de muchas de las células en el flujo es positivo para Krox-20, indicando su diferenciación en células Schwann mielinizantes, mientras que pocas de las células indiferenciadas redondas fuera del flujo son positivas.

La figura 7 muestra mediciones de inducción de mRNA para Krox-20, así como para componentes de mielina MBP y Po, en cultivos de 6 días de células GRD clasificadas por LNGFR en presencia o ausencia de la quimera IL6R/IL6 por transcripción inversa y reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR).

### Descripción detallada de la invención

10 La invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden quimera IL6/IL6R para la regeneración de células neurales del sistema nervioso central (SNC) lesionado. Una composición farmacéutica que comprende la quimera IL6/IL6R puede ser también utilizada como un tratamiento de rejuvenecimiento.

15 La invención está basada en el descubrimiento de que la administración de una quimera IL6R/IL6 a células de un sistema neural normal, especialmente a células de la cresta neural, conduce a generación nerviosa. Tratar el SNC lesionado con IL6R/IL6 tiene dos ventajas importantes: primero, de manera concomitante con la generación de células nerviosas, también induce la generación de células Schwann. Las células de Schwann se necesitan para la mielinización tanto de las nuevas células nerviosas generadas, como de células nerviosas dañadas en adultos. Segundo, a diferencia de IL-6, la quimera IL6R/IL6 actúa en células que carecen del receptor IL-6 (gp-80) pero que tienen el receptor GP130.

20 Las lesiones en el SNC se pueden producir por enfermedades neurológicas.

Una "enfermedad neurológica" está relacionada con trastornos del sistema nervioso central. Puede ser por ejemplo una enfermedad neurodegenerativa general, tal como el envejecimiento, una enfermedad vascular, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, o una enfermedad autoinmune, esclerosis múltiple (MS), puede ser el resultado de una lesión, tal como un ictus, anoxia/asfisia, o una lesión física, tal como un golpe en la cabeza, puede ser resultado de una exposición a toxinas locales (por ejemplo meningitis) o sistémicas, y puede ser neoplásica. Puede tener base genética, tal como la enfermedad de Huntington, o un trastorno del metabolismo tal como una enfermedad de almacenamiento lisosomal. Hay un grupo de "enfermedades generales neurodegenerativas" que incluyen Alzheimer y otras, que afectan a las personas ancianas, el patrón usual de respuesta a una lesión aguda (tal como isquemia) afecta a cualquier grupo de edad incluyendo a las víctimas de un ictus y víctimas de accidente de coche, enfermedades autoinmunes tales como MS, PD, y ciertas enfermedades, incluyendo deficiencias del metabolismo, de recién nacidos y fetos.

Un "Efecto reconstituyente" se entiende que incluye alguna modificación beneficiosa en el proceso de la enfermedad, incluyendo efectos paliativos, reconstituyentes o proliferativos en funciones del tejido neural.

35 El "rejuvenecimiento" se entiende que incluye esfuerzos para invertir los cambios en el cerebro causados comúnmente por el envejecimiento, tales como la pérdida de volumen, pérdida o atrofia de neuronas, pérdida de memoria, y pérdida de la capacidad para afrontar estímulos sensoriales complejos.

El rejuvenecimiento también comprende efectos reconstituyentes en neuronas existentes.

40 Un aspecto descrito en este documento describe un método para el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central; comprendiendo el método el paso de la administración de una composición farmacéutica que comprende quimera IL6R/IL6 a sujetos que lo necesitan. Opcionalmente, la composición farmacéutica puede también comprender células vivas.

45 Otro aspecto descrito es un método para causar al menos un rejuvenecimiento parcial del cerebro de un mamífero por tratamiento con quimera IL6R/IL6 con o sin células madre nerviosas como se describe debajo, en donde el método puede emplear implantación en el cerebro de un implante de células derivadas de células madre neurales de un adulto, recién nacido o embrión de un mamífero.

El término "regeneración" generalmente significa la capacidad de un organismo para reemplazar el tejido perdido. Por ejemplo después de una extirpación quirúrgica de un lóbulo hepático, se produce el funcionamiento de un nuevo tejido hepático.

50 Como se describe en este documento, las células del ganglio de la raíz dorsal (GRD) se extrajeron de embriones de rata Lewis E14 esencialmente como se describió previamente (Kleitman et al.1991 y Haggiag et al. 1999) y se cultivaron 4 días en matraces a 37°, 5% de CO<sub>2</sub> en un medio que comprende DMEM/F12 (1:1) con un 1% de extracto de embrión de pollo, bFGF 20 ng/ml, 1% de suplemento N2 (Gibco), 2% de suplemento B27 (Gibco), 50 µM de mercaptoetanol, 35 mg/ml (110 nM) de ácido retinoico (Morrison et al, 1997). En este punto, algunos cultivos se enriquecieron con quimera pura rIL6R/IL6 producida en células CHO (200 ng/ml; 2,3 nM), otras no se trataron (NT) o se enriquecieron con factor morfogénico óseo (BMP-2, 2nM) o permanecen sin tratar. Después de 9 días (día 13

del comienzo del cultivo) las células cultivadas mostraron una red axonal densa desarrollada sólo después del tratamiento con IL6R/IL6 sugiriendo que la IL6R/IL6 induce la diferenciación de células GRD en células neurales. Estos resultados se confirmaron utilizando una población celular más homogénea, desprovista de células nerviosas, comprendiendo principalmente células progenitoras de la cresta neural. La quimera IL6R/IL6 actuó como un factor generativo nervioso, y no como un factor de supervivencia, como se evidenció por el hecho de que la red neuronal se puede observar incluso en estas poblaciones homogéneas de la cresta neural que están desprovistas de células nerviosas. También se ha mostrado que además de células nerviosas, las células gliales se generaron por tratamiento de poblaciones enriquecidas de la cresta neural con la quimera IL6R/IL6 y que estas células gliales están asociadas con las células nerviosas recién generadas presentes en el cultivo.

El efecto de la quimera IL6R/IL6 sobre una población enriquecida con células progenitoras de la cresta neural, se sometió a ensayo en paralelo al efecto del factor BMP2, que es conocido por promover la diferenciación nerviosa. Los resultados muestran que el efecto en la diferenciación nerviosa promovido por la quimera IL6R/IL6 es superior a el de BMP2, y que sólo el primero induce, además de células nerviosas, la generación de células Schwann. Las células no tratadas (que se quedaron sin citoquinas) muestran sólo unas pocas neuronas deficientemente desarrolladas vistas tras 12 días y estas neuronas no están asociadas con células gliales.

La población homogénea utilizada para demostrar las propiedades de generación de nervios de la quimera IL6R/IL6 se obtiene por clasificación de células GRD embrionarias, por citometría fluorescente para determinar células LNGFR positivas. Estas células se cultivaron luego en un medio definido exento de suero. La presencia del nervio o de células nerviosas o gliales se estimó por técnicas de inmunotinción específica como se describe en este documento.

Estos resultados demuestran que la quimera IL6R/IL6 se puede utilizar como un agente terapéutico para inducir el reemplazo nervioso en un daño del SNC. La quimera IL6R/IL6 se puede administrar localmente, por ejemplo por inyección directa en el área dañada en el SNC. La quimera puede inducir la regeneración nerviosa de células madre localizadas en el SNC.

Se ha propuesto el neurotrasplante como un tratamiento potencial para los trastornos neurodegenerativos, que no tienen una terapia efectiva (Gage et al. 1998 y Philpott LM et al. 1997). Por lo tanto precursores de células neurales, tales como células progenitoras de la cresta neural, se pueden co-implantar con quimera IL6R/IL6 o pre-tratar con quimera IL6R/IL6 antes de la implantación para regenerar neuronas en SNC dañado. Las células implantadas pueden ser derivadas bien de otro mamífero, del mismo mamífero, de un donante compatible relacionado o del mismo organismo. Las células progenitoras neurales pueden derivarse del sistema nervioso (embrionario) de mamíferos en desarrollo, del sistema nervioso de recién nacidos o del sistema nervioso adulto de organismos mamíferos. En la presente memoria las expresiones de células progenitoras neurales y células madre neurales son intercambiables.

El implante puede comprender además de las células madre neurales, otras células, por ejemplo células gliales, conocidas por apoyar la mielinización y células del plexo coroideo, conocidas por secretar factores neurotróficos.

La composición farmacéutica puede comprender además de la quimera IL6R/IL6 otros factores neurotróficos y citoquinas tales como NGF, NTFs, BDNF, IGFs, FGFs, CNTF, LIF, G-CSF, OSM, IL-11, BMP-2, GGF-2, Nrg1 y TGF.

Por tanto, la invención describe el uso de una quimera IL6R/IL6, una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado permutado circularmente o una sal de la misma para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de lesiones del SNC.

Una "quimera IL6R/IL6" (llamada también "IL6R/IL6" o "quimera IL-6"), como se utiliza aquí, es una molécula quimérica que comprende una parte soluble del receptor de Interleucina-6 fusionada a toda o a una fracción biológicamente activa de Interleucina-6. Los restos de la proteína quimérica se pueden fusionar directamente, o se pueden ligar mediante cualquier ligante adecuado, tal como un puente disulfuro o un ligante polipeptídico. El ligante puede ser un péptido ligante corto que puede ser tan corto como de uno a tres residuos de aminoácidos de longitud o más largo, por ejemplo, 13 ó 18 residuos de aminoácidos de longitud. Dicho ligante puede ser un tripéptido de la secuencia E-F-M (Glu-Phe-Met), por ejemplo, o una secuencia ligante de 13 aminoácidos que comprende Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met introducida entre la secuencia de aminoácidos del receptor de IL-6 y la secuencia de IL-6. Los ejemplos de moléculas quiméricas IL6R/IL6 son conocidos en la técnica y han sido descritos en detalle, por ejemplo, en los documentos WO 99/02552 o WO 97/32891.

Los términos "tratar" y "prevenir" como se usan aquí se deben entender como prevenir, inhibir, atenuar, mejorar o invertir alguno o todos los síntomas de enfermedades neurodegenerativas o de envejecimiento.

La invención describe una nueva posibilidad de tratar lesiones del SNC ya que la quimera IL6R/IL6 muestra un efecto beneficioso pronunciado sobre el BMP-2 en términos de neurogeneración y tiene también la capacidad de inducir células mielinizantes y es capaz de actuar en ausencia del receptor de IL-6.

Como se utiliza aquí el término "muteínas" se refiere a análogos de una quimera IL6R/IL6, en los que uno o más de los residuos de aminoácidos de los componentes naturales de IL6R/IL6 están reemplazados por diferentes residuos

de aminoácidos, o están deletados, o se añaden uno o más residuos de aminoácidos a la secuencia original de una IL6R/IL6, sin cambiar considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con la IL6R/IL6 original. Estas muteínas se preparan por síntesis conocidas y/o por técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, o cualquier otra técnica conocida adecuada para ello.

5 Las muteínas de acuerdo con la presente invención incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, tal como DNA o RNA, que se hibrida con DNA o RNA, que codifica la IL6R/IL6, en condiciones rigurosas. El término "condiciones rigurosas" se refiere a las condiciones de hibridación y subsiguiente lavado, que los expertos en la técnica convencionalmente denominan como "rigurosas". Véase Ausubel et al; Current Protocols in Molecular Biology, cita anterior, Interscience, N.Y., 6,3 y 6,4 (1987, 1992), y Sambrook et al. (Sambrook, J.C., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

10 Sin limitación, los ejemplos de condiciones rigurosas incluyen condiciones de lavado a 12-20°C por debajo de la T<sub>m</sub> calculada del híbrido en estudio, por ejemplo, en 2 x SSC y SDS al 0,5% durante 5 minutos, 2 x SSC y SDS al 0,1% durante 15 minutos; 0,1 x SSC y SDS al 0,5% a 37°C durante 30-60 minutos y después, 0,1 x SSC y SDS al 0,5% a 68°C durante 30-60 minutos. Los expertos ordinarios en esta técnica entienden que las condiciones rigurosas dependen también de la longitud de las secuencias del DNA, de las sondas de oligonucleótidos (tales como de 10-40 bases) o de las sondas mixtas de oligonucleótidos. Si se utilizan sondas mixtas es preferible utilizar cloruro de tetrametilamonio en lugar de SSC. Véase Ausubel, cita anterior.

20 Cualquiera de tales muteínas preferiblemente tiene una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativa de la de una IL6R/IL6, de tal forma que tiene una actividad para la IL6R/IL6 sustancialmente similar, o incluso mejor.

25 Una actividad característica de la IL6R/IL6 es su capacidad de unión a gp130. Un ensayo tipo ELISA para medir la unión de IL6R/IL6 a gp130 está escrito en detalle en el ejemplo 7 de la página 39 del documento WO 99/02552, siempre y cuando la muteína tenga una sustancial actividad de unión a gp130, se puede considerar que tiene una actividad sustancialmente similar a IL6R/IL6. Por tanto, se puede determinar si cualquier muteína dada tiene al menos sustancialmente la misma actividad que la IL6R/IL6 por medio de experimentación rutinaria que comprende someter tal muteína, por ejemplo a un simple ensayo de unión en sándwich para determinar si se une o no a una gp130 inmovilizada, como se describe en el ejemplo 7 del documento WO 99/02552.

30 En una realización preferida, cualquiera de tales muteínas tiene al menos el 40% de la identidad u homología con la secuencia de IL6R/IL6 incluida en el documento WO 99/02552. Más preferiblemente, tiene al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o, lo más preferiblemente, al menos 90% de identidad u homología con ella.

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

40 Para las secuencias en las que no hay una correspondencia exacta, se puede determinar un "% de identidad". En general, las dos secuencias a ser comparadas se alinean para dar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir insertar "huecos" en una cualquiera o en ambas secuencias, para mejorar el grado de alineamiento. Se puede determinar el % de identidad sobre toda la longitud de cada una de las secuencias a ser comparada (llamado también alineamiento global), que es particularmente adecuado para las secuencias de la misma longitud o muy similar, o sobre longitudes más cortas, definidas (llamado también alineamiento local), que es más adecuado para secuencias de longitud desigual.

45 Los métodos para comparar la identidad y homología de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. Así por ejemplo, para determinar el % de identidad entre dos secuencias polinucleotídicas y el % de identidad y el % de homología entre dos secuencias polipeptídicas, se pueden utilizar programas disponibles en el Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 9.1 (Deberaux J et al., 1984), por ejemplo los programas BESTFIT y GAP. El programa BESTFIT utiliza el algoritmo "homología local" de Smith y Waterman (1981) y encuentra la mejor región simple de similitud entre dos secuencias. En la técnica son conocidos también otros programas para determinar la identidad y/o similitud entre secuencias, por ejemplo la familia de programas BLAST (Altschul S F et al., 1990, Altschul S F et al., 1997, accesibles a través de la página de la NCBI en [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) y FASTA (Pearson W R, 1990., Pearson 1988).

55 Las muteínas de IL6R/IL6, que se pueden usar 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 puede ser obtenido rutinariamente por un experto en la técnica, sin experimentación no justificada, basándose en las enseñanzas y guías presentadas aquí.

Los cambios preferidos para las muteínas de acuerdo con la presente invención son los conocidos como sustituciones "conservadoras". Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de IL6R/IL6 pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tienen propiedades fisicoquímicas suficientemente similares de

forma que la sustitución entre miembros del grupo preservará la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Es evidente que también se pueden hacer sustituciones y deleciones de aminoácidos en las secuencias anteriormente definidas sin alterar sus funciones, particularmente si las inserciones o deleciones implican solamente algunos aminoácidos como por ejemplo, menos de treinta, y preferiblemente menos de diez, y no eliminan ni desplazan aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, por ejemplo, restos de cisteína.

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

TABLA 1

10 Grupos preferidos de aminoácidos sinónimos

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

TABLA 2

Grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

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

TABLA 3

Los grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

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

5 Los ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que se pueden utilizar para obtener muteínas de los polipéptidos IL6R/IL6, incluyen todas las etapas de métodos conocidos, tales como los presentados en las patentes de los Estados Unidos 4,959,314, 4,588,585 y 4,737,462, (Mark et al), 5,116,943 (Koths et al), 4,965,195 (Namen et al), 4,879,111 (Chong et al), y 5,017,691 (Le et al); y las proteínas sustituidas con lisina presentadas en la patente de Estados Unidos No. 4,904,584 (Shaw et al).

10 El término "proteína fusionada" se refiere a un polipéptido que comprende una IL6R/IL6, o una muteína o fragmento de la misma, fusionada con otra proteína, que, por ejemplo, tiene un extenso tiempo de permanencia en los fluidos corporales. Una IL6R/IL6 puede por tanto estar fusionada con otra proteína, polipéptido o similares, por ejemplo, una inmunoglobulina o uno de sus fragmentos.

15 "Derivados funcionales" como se usan aquí cubren los derivados de IL6R/IL6, y sus muteínas y proteínas fusionadas, que se pueden preparar a partir de grupos funcionales que se presentan como cadenas laterales sobre los restos o los grupos terminales N- o C-, por medios conocidos en la técnica, y se incluyen en la invención siempre que permanezcan farmacéuticamente aceptables, esto es que no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de la IL6R/IL6, y que no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen.

20 Estos derivados pueden incluir, por ejemplo, cadenas laterales de polietilenglicol, que pueden enmascarar los sitios antigénicos y extender la permanencia de una IL6R/IL6 en los fluidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo por reacción con amoniaco o con aminas primarias o secundarias, N-acil-derivados de grupos amino libres de los restos de aminoácidos formados con restos acilo (por ejemplo grupos alcanilo o grupos aroil-carboxílico) o O-acil-derivados de grupos hidroxilos libres (por ejemplo los de restos serilo o treonilo) formados con restos acilo.

25 Una "fracción activa" puede ser por ejemplo un fragmento de IL6R/IL6. El término fragmento se refiere a cualquier subconjunto de la molécula, esto es, un péptido más corto que retiene la actividad biológica deseada. Se pueden preparar fácilmente los fragmentos separando los aminoácidos de cualquier extremo de la molécula IL6R/IL6 y ensayando el fragmento resultante en cuanto a sus propiedades para unirse a gp130. Las proteasas para separar un aminoácido a un tiempo desde cualquiera de los extremos N-terminal o C-terminal de un polipéptido son conocidas, y así la determinación de los fragmentos que retienen la actividad biológica deseada, implica solamente experimentación rutinaria.

35 Como fracciones activas de una IL6R/IL6, las muteínas y proteínas fusionadas de la misma, la presente invención describe además cualquier fragmento o precursor de la cadena polipeptídica de la molécula de proteína en solitario o junto con moléculas asociadas o restos ligados al mismo, por ejemplo, restos de azúcar o fosfato, o agregados de la molécula de proteína o los propios restos de azúcar, siempre que dicha fracción tenga actividad sustancialmente similar para gp130.

El término "sales" se refiere aquí tanto a las sales de grupos carboxilo como a las sales de adición de ácido de grupos amino de la molécula IL6R/IL6 o sus análogos. 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, hierro o zinc, y similares, y sales con bases orgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminos tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cualquiera de tales sales debe retener la actividad biológica de la IL6R/IL6, esto es la capacidad de unirse a gp130.

En una realización preferida de la invención, la quimera IL6R/IL6 está glucosilada en uno o más sitios.

10 Una forma glucosilada de una quimera IL6R/IL6 se ha descrito en el documento WO 99/02552 (PCT/IL98/00321), la cual es la molécula quimérica altamente preferida. La quimera IL6R/IL6 descrita aquí es una glucoproteína recombinante que se obtuvo fusionando la secuencia codificadora entera del receptor de la IL-6 soluble presente en la naturaleza  $\delta$ -Val (Novick et al., 1990) con la secuencia codificadora entera de la IL-6 madura presente en la naturaleza, ambas de origen humano.

15 La quimera IL6R/IL6 se puede producir en cualquier tipo de célula adecuada eucariota o procariota, como las células de levadura, células de insectos, bacterias y similares. Se produce preferiblemente en células de mamíferos, lo más preferible en células CHO por ingeniería genética como se describe en el documento WO 99/0252. Aunque se prefiere la proteína de origen humano, se podrá apreciar por la persona experta en la técnica que se puede utilizar según la invención una proteína de fusión similar de cualquier otro origen, siempre que retenga la actividad biológica descrita aquí.

La molécula quimérica puede luego producirse en células bacterianas, que no son capaces de sintetizar restos de glucosilo, pero que usualmente tienen un alto rendimiento de producción de la proteína recombinante.

25 La quimera IL6R/IL6 puede comprender además una fusión con inmunoglobulina, esto es la IL6R/IL6 según la invención se fusiona a toda o una porción de una inmunoglobulina. Los métodos para preparar las proteínas de fusión con inmunoglobulina son bien conocidos en la técnica, tales como los descritos en el documento WO 01/03737, por ejemplo. Los expertos en la técnica entenderán que la proteína de fusión resultante de la invención retiene la actividad biológica de la quimera IL6R/IL6. La proteína de fusión resultante idealmente tiene mejores propiedades, tales como mayor tiempo de permanencia en los fluidos corporales (semi-vida), incremento de la actividad específica, incremento del nivel de expresión, o facilidad de purificación de la proteína de fusión.

30 La quimera IL6R/IL6 se puede fusionar con la región constante de una molécula de Ig. Preferiblemente, se fusiona con las regiones de la cadena pesada, como los dominios CH2 y CH3 de la IgG1 humana, por ejemplo. También son adecuadas para la generación de proteínas de fusión según la presente invención, otras isoformas de moléculas Ig tales como las isoformas IgG<sub>2</sub> o IgG<sub>4</sub>, u otras clases de Ig, como IgM o IgA, por ejemplo. Las proteínas de fusión pueden ser monoméricas o multiméricas, heteromultiméricas u homomultiméricas.

35 Los derivados funcionales de la quimera IL6R/IL6 se pueden conjugar con polímeros con el fin de mejorar las propiedades de la proteína, tales como la estabilidad, semi-vida, biodisponibilidad, tolerancia por el cuerpo humano, o inmunogenicidad.

40 Por tanto, una realización preferida de la invención se refiere a un derivado funcional de la quimera IL6R/IL6 que comprende al menos un resto unido a uno o más grupos funcionales, que se presentan como una o más cadenas laterales sobre los restos de aminoácidos.

Una realización altamente preferida se refiere a una IL6R/IL6 ligada a polietilenglicol (PEG). La PEGilación se puede llevar a cabo por métodos conocidos, tales como los descritos en el documento WO 92/13095, por ejemplo.

45 La quimera IL6R/IL6 se puede administrar al cerebro en cualquier formulación adecuada. Preferiblemente, se puede administrar en forma de células que expresan y /o segregan una quimera IL6R/IL6, una muteína, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma.

50 La invención, por tanto, describe además el uso de células madre neurales y de quimera IL6R/IL6, una muteína, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de lesiones del SNC. Las células se pueden administrar en cualquier forma adecuada. Sin embargo, es altamente preferido un modo de administración de una célula encapsulada en un polímero. El procedimiento de encapsulación está descrito en detalle por ejemplo por Emerich et al (1994) o en la patente de Estados Unidos No. 5,853,385. Las líneas celulares adecuadas y los sistemas de expresión estables son bien conocidos en la técnica.

55 La administración de la quimera IL6R/IL6 en el cerebro puede también llevarse a cabo utilizando un vector que comprende la secuencia codificadora o una quimera IL6R/IL6, una muteína, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma. El vector comprende todas las secuencias reguladoras que se necesitan para la expresión de la proteína deseada en el cuerpo humano, preferiblemente en el cerebro, y más

preferiblemente en el cuerpo estriado. Las secuencias reguladoras para los vectores de expresión son bien conocidas por los expertos de la técnica. La invención por tanto describe el uso de un vector que comprende la secuencia codificadora de la quimera IL6R/IL6 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de lesiones del SNC.

- 5 Se puede utilizar cualquier vector de expresión conocido en la técnica. Sin embargo, un vector derivado lentiviralmente puede ser particularmente útil para la administración de la quimera IL6R/IL6 directamente en el cuerpo estriado. Tales vectores lentivirales son conocidos en la técnica. Ellos están específicamente descritos por ejemplo en Kordower et al. (1999) o Déglon et al. (2000).

- 10 Es así mismo objeto de la presente invención descrita aquí proporcionar una composición farmacéutica que comprenda la quimera IL6R/IL6, una muteína, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente permutado o sal de la misma, opcionalmente junto a uno a o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento de lesiones del SNC. La quimera IL6R/IL6 utilizada puede ser bien de origen eucariótico (glicosilado) o de origen bacteriano (no-glicosilado).

- 15 La invención describe además una composición farmacéutica que comprende una quimera IL6R/IL6, una composición farmacéutica que comprende un vector de expresión, en particular una terapia génica lentiviral que expresa la quimera IL6R/IL6 y una composición farmacéutica que comprende además de la quimera IL6R/IL6 (en la forma de proteína o células que producen la quimera o un vector de expresión que codifica la quimera) células madre neurales opcionalmente junto con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables para el tratamiento de lesiones del SNC.

- 20 La definición de “farmacéuticamente aceptable” significa abarcar cualquier vehículo, que no interfiera con la efectividad de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el huésped al que se le administra. Por ejemplo, para administración parenteral, la quimera IL6R/IL6 se puede formular en forma de dosis unitaria para inyección en vehículos tales como solución salina, solución de dextrosa, albúmina sérica y solución de Ringer.

- 25 La quimera IL6R/IL6 se puede administrar a un paciente que necesite su administración de diversos modos. Las vías de administración incluyen las vías intracraneal, intradérmica, transdérmica (por ejemplo en formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, epidural, tópica, e intranasal. Se puede utilizar cualquier otra ruta de administración terapéuticamente eficaz, por ejemplo por terapia génica en la que se administra al paciente (por ejemplo mediante un vector) una molécula de DNA que codifica la quimera IL6R/IL6, lo que hace que la quimera IL6R/IL6 sea expresada y segregada in vivo. Además, la quimera IL6R/IL6 se puede administrar junto con otros componentes biológicamente activos tales como tensioactivos, excipientes, portadores, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

- 30 Una “cantidad terapéuticamente eficaz” es aquella que cuando se administra el MIFNAR2, o un derivado funcional, análogo, proteína fusionada o fragmentos de los mismos, da como resultado la modulación de la actividad biológica del IFN- $\beta$ . La dosis administrada, como dosis única o múltiple, a un individuo puede variar dependiendo de una variedad de factores, incluyendo la vía de administración, las condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), la extensión de los síntomas, los tratamientos concurrentes, la frecuencia de tratamiento y el efecto deseado. El ajuste y manipulación de los intervalos de dosis están dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, como también de los métodos in vitro e in vivo para determinar la actividad del MIFNAR2.

- 40 Para administración parenteral (por ejemplo intravenosa, subcutánea, intramuscular), la quimera IL6R/IL6 se puede formular como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable (por ejemplo agua, solución salina, solución de dextrosa) y aditivos que mantienen la isotonicidad (por ejemplo manitol) o la estabilidad química (por ejemplo conservantes y tampones). La formulación se esteriliza por las técnicas utilizadas comúnmente.

- 45 Es así mismo objeto de la presente invención aquí descrita proporcionar un método para tratar lesiones del SNC, que comprende la administración al paciente que la necesita, en una cantidad eficaz de la quimera IL6R/IL6, una muteína, proteína de fusión, derivado de fusión, fracción activa, o derivado permutado circularmente del mismo, opcionalmente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 50 Una “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad de los ingredientes activos que es suficiente para afectar el curso y la severidad de las enfermedades descritas antes, llevando a la reducción o remisión de tal patología. La cantidad eficaz depende de la vía de administración y del estado del paciente.

- 55 La dosis administrada, como dosis única o múltiple, a un individuo variará dependiendo de una variedad de factores, incluyendo las propiedades farmacocinéticas de la quimera IL6R/IL6, la vía de administración, las condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), la extensión de los síntomas, los tratamientos concurrentes, la frecuencia de tratamiento y el efecto deseado. El ajuste y manipulación de los intervalos de dosis están dentro de la capacidad de los expertos.

También se describe un método para tratar lesiones del SNC, que comprende la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de la quimera IL6R/IL6, una muteína, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma, o que comprende la administración a un paciente que lo necesite de un vector de expresión que comprende la secuencia codificante de quimera IL6R/IL6, una muteína, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma.

Es así mismo objeto de la presente invención proporcionar un método para la preparación de un nervio diferenciado y células gliales asociadas para trasplante en pacientes para reparar un daño en los tejidos nerviosos. La quimera IL6R/IL6 se utilizará en este caso ex-vivo para estimular el desarrollo de células neurales a partir de células progenitoras neuro-gliales embrionarias no humanas o de líneas de células madre embrionarias no humanas (células ES). Dicha estimulación puede mejorar enormemente el rendimiento de células nerviosas a partir de cultivos in vitro, facilitando el uso de estos tejidos para el subsecuente trasplante.

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

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

El efecto de quimera IL6RIL6 sobre células del ganglio de la raíz dorsal (GRD) embrionarias de rata.

El efecto de la quimera IL6RIL6 se ensayó sobre células neuro-gliales en desarrollo presentes en GRD a los 14 días de desarrollo embrionario. Las células de GRD se prepararon a partir de embriones de ratas Lewis E14 como se describió previamente (Kleitman et. 1991 y Haggiag et al, 1999). Las células GRD disociadas se cultivaron primero durante 4 días en cubreobjetos de vidrio (revestimiento de fibronectina) en un medio que comprende DMEM/F12 (1:1) con 1% de extracto de embrión de pollo, 20 ng/ml de bFGF, 1% de suplemento N2 (Gibco), 2% de suplemento B27 (Gibco), mercaptoetanol 50 µM, 35 mg/ml (110 nM) de ácido retinoico (Morrison et al, 1997). En este punto, algunos de los cultivos se tiñeron (día 4) y otros se enriquecieron con quimera pura rhIL6/RIL6 (producida en células CHO como se describió en Chebath et al. 1997) y se añadió a 200 ng/ml por ejemplo 2,3 nM. Otros cultivos continuaron sin adición (NT) o con proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2). Después de 9 días (día 13 del comienzo del cultivo) las células GRD se fijaron, se sometieron a inmunotinción fluorescente para buscar el marcador de beta tubulina III neurona-específico y se fotografió en el microscopio bajo luz UV. La figura 1 muestra muy pocas neuronas sin desarrollar en los cultivos sin adición, por ejemplo NT (fila superior izquierda), mientras que en cultivos con IL6RIL6 (fila superior central y fila inferior derecha) se vieron muchos cuerpos neuronales con redes axonales desarrolladas. Fue particularmente interesante ver comenzar y proliferar el desarrollo de axones en presencia de neuronas primitivas (fila inferior, izquierda). Los cultivos que reciben BMP-2 (fila inferior derecha) no fueron diferentes de los cultivos de NT. En los cultivos fijados a los 4 días no había neuronas visibles, demostrando que la IL6RIL6 induce la diferenciación de novo de neuronas.

Cultivos similares se inmunotiñeron para la determinación del receptor NGF de baja-afinidad p75 (LNGFR), que es un marcador de células madre neurales y células precursoras neuro-gliales tempranas. La figura 2 muestra los resultados después de 12 días de cultivo. Sin adición (NT), se tiñeron grupos de células indiferenciadas (superior izquierda), mientras que con quimera IL6RIL6 las células LNGFR-positivas eran alargadas y con redes de forma extendida (superior derecha). Por el contrario, con BMP-2, se vieron grupos de células indiferenciadas. La figura 2 (inferior derecha) también muestra cultivos enriquecidos con otro factor de crecimiento, Heregulina (300 ng/ml): muchas de las células permanecieron indiferenciadas y sólo unas pocas células se vieron alargadas.

Estos resultados muestran que la IL6RIL6 induce una diferenciación pronunciada de las células GRD embrionarias normales en células neurales.

#### Ejemplo 2:

El efecto de quimera IL6RIL6 en poblaciones enriquecidas de células de la cresta neural.

El cultivo de células de GRD preparado y descrito en el ejemplo 1, consiste en una población de células heterogéneas que comprenden, entre otras, células de la cresta neural conocidas por ser las progenitoras de los diferentes linajes celulares tales como neuronas, células gliales y miofibroblastos. Las células de la cresta neural dan lugar a melanocitos en el ectodermo. La quimera IL6RIL6 se ensayó en una subpoblación enriquecida de células progenitoras de la cresta neural indiferenciadas, para verificar si la molécula induce a estas células precursoras a diferenciarse en neuronas maduras. Tal subpoblación enriquecida de células progenitoras de la cresta neural se aisló por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) de células GRD E14 de embrión de rata para buscar células LNGFR-positivas. Este receptor NGF de baja afinidad p75 es un marcador específico de células de la cresta neural y progenitores neuro-gliales tempranos, que es tanto un receptor de neurotrofina como un receptor de NGF (de hecho, cuando las neuronas se diferencian pierden el p75 LNGFR y adquieren el receptor NGF funcional TrkA). Las células LNGFR+ seleccionadas se cultivaron en un cubreobjetos de vidrio como se describió en el ejemplo 1. Algunos cultivos se enriquecieron con 200 ng/ml de IL6RIL6 y otros no se tratan. Después de 12 días, las células teñidas se sometieron a inmunotinción por fluorescencia para buscar beta tubulina III específico de neurona.

La figura 3 muestra que una población enriquecida de progenitores celulares de la cresta neural tratada con IL6RIL6 se diferencia y forma una red neuronal densa. Muchos cuerpos celulares neuronales se vieron a partir de flujos densos de axones desarrollados. Por el contrario, en ausencia de la citoquina se observaron sólo unas pocas neuronas pobremente desarrolladas. Este principio también se observó en cultivos con BMP-2 (no mostradas), en contraste con el intenso desarrollo neuronal en los cultivos tratados con IL6RIL6.

La técnica de inmunotinción con LNGFR demostró que las células que formaron haces alargados en los cultivos tratados con IL6RIL6 fueron efectivamente células LNGF-positivas, por ejemplo células progenitoras derivadas de la cresta neural. La figura 4 (panel superior izquierda) muestra que en los cultivos tratados con IL6RIL6, estas células LNGF-positivas forman flujos alargados de fibras alineadas, y en contraste de fase (panel inferior izquierda) estos flujos se ven atravesando muchas células no teñidas. Mediante inmunotinción para buscar tubulina específica de neurona se mostró que estos flujos están formados por axones nerviosos, lo que revela muchos haces axonales (Fig. 4, paneles centrales). Se muestra una mayor amplificación de las células LNGFR-positivas en el panel superior derecho. La comparación del contraste de fases del mismo campo (panel inferior derecho), muestra axones que están en contacto con células gliales que tienen también diferenciado las LNGFR-positivas de los progenitores de la cresta neural. En ausencia de IL6RIL6, las células LNGFR-positivas eran más intensamente teñidas y formaban paquetes agregados que en la fase de contraste correspondían a células pequeñas no alargadas (no mostradas).

La inmunotinción para buscar el marcador glial GFAP se llevó a cabo en cultivos similares de células LNGFR-positivas seleccionadas por FACS a partir de GRD E14 cultivadas durante 8 días con IL6RIL6 (200 ng/ml), o con BMP-2 (2 nM), o sin adición (NT). La figura 5 muestra que en cultivos sin tratar (superior izquierda) así como con BMP-2 (superior derecha) las células gliales formaron agregados pequeños de células GFAP-positivas. Los cultivos tratados con IL6RIL6 exhibieron un cambio drástico en la apariencia de las células gliales, que eran alargadas y en haces (los dos paneles inferiores en la figura 5). Utilizando doble tinción (para ambas, células gliales GFAP-positivas y neuronas teñidas de beta tubulina III), se pudo observar que las células gliales se alargaban formando haces a lo largo de los axones (no mostrado) en los cultivos tratados con IL6RIL6. Esto indica que la IL6RIL6 induce la diferenciación de ambas, neuronas y células gliales que se unen a lo largo de las neuronas, y se diferencian en células Schwann.

Se realizó la inmunotinción para buscar el marcador Krox-20 de células Schwann mielinizantes (un factor de transcripción requerido para la síntesis mielínica) en cultivos similares de células LNGFR-positivas seleccionadas por FACS de GRD E14 y cultivadas durante 11 días con IL6RIL6 (200 ng/ml). La figura 6 (panel inferior, fase de contraste) muestra que los flujos de fibras y células alargadas, que como se demostró más arriba estaban compuestas de células gliales y haces de axones diferenciadores, contienen numerosas células Schwann Krox-positivas (panel superior, luz UV). Krox-20 está confinado en el núcleo de células Schwann alargadas a lo largo de los axones. En los cultivos sin tratar, no se observó flujos de axones y células gliales ni la apariencia pronunciada de células Krox-positivas (figura 7). Mediciones por transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en 6 días de cultivo de células GRD y LNGFR- seleccionadas, demostraron que la IL6RIL6 induce los mRNAs para Krox-20, así como para componentes mielínicos MBP y Po (figura 7). La quimera IL6RIL6 causa, además, diferenciación de progenitores de la cresta neural (libre de neuronas diferenciadas pre-existentes) en el protoendoneurio que contiene haces de axones y sus células Schwann asociadas.

Estos resultados indican que la IL6R/IL6 induce la diferenciación en células LNGFR-clasificadas, que se alargan y forman haces, desarrollándose a neuronas y células Schwann. Estos resultados se obtuvieron empleando poblaciones celulares homogéneas, que están desprovistas de células nerviosas, y comprenden principalmente células de la cresta neural y confirman el efecto neurogenerativo de la quimera IL6R/IL6 encontrado en el ejemplo 1. Debido al hecho de que los experimentos se llevaron a cabo en ausencia de células nerviosas preexistentes, se concluyó que la densa red nerviosa encontrada mediante el tratamiento con la quimera IL6R/IL6 es debido a la actividad generativa de nervios, y no a la actividad de supervivencia nerviosa. Los resultados también muestran que además de las células nerviosas, se generan células gliales por tratamiento con quimera IL6R/IL6 y que la célula glial, más probablemente células Schwann mielinizantes, se asocian con células nerviosas generadas y pueden posiblemente mielinizar estas células.

Por tanto, la quimera IL6R/IL6 tiene una actividad dual en células madre nerviosas normales A- promueve la neurogeneración (que es más fuerte que la promovida por BMP-2) y

B- estimula la generación de células Schwann. Esta actividad dual es fundamental para restaurar el tejido nervioso y conferir neuroprotección.

Teniendo ahora por completamente descrita esta invención, será apreciado por aquellos expertos en la técnica que la misma puede ser realizada dentro de un amplio intervalo de parámetros, concentraciones y condiciones equivalentes sin desviarse dentro del alcance de la invención y sin demasiada experimentación. Aunque esta invención se ha descrito en asociación con realizaciones específicas de la misma, se entenderá que es susceptible de posteriores modificaciones.

Las referencias a etapas del método conocidas, etapas de métodos convencionales, métodos conocidos o métodos convencionales no es en ningún caso la admisión de que algún aspecto, descripción o realización de la presente invención es divulgada, enseñada o sugerida en la técnica pertinente.

- 5 La descripción anterior de las realizaciones específicas revelarán tan completamente la naturaleza general de la invención que otros podrán, aplicando el conocimiento del experto de la técnica (incluyendo los contenidos de las referencias citadas aquí), modificar fácilmente y/o adaptar para varias aplicaciones tales realizaciones específicas, sin demasiada experimentación. Será entendido que la fraseología o terminología de la presente memoria se da con la finalidad de describir y no de limitar, de tal modo que la terminología o fraseología de la presente memoria deberá ser interpretada por el artesano experto a la luz de las enseñanzas y guías presentadas aquí, en combinación con el conocimiento de uno de los expertos ordinarios en la técnica.
- 10

**Referencias**

- Altman et al. 1966 J. Comp. Neurol. 126, 337-89.
- Chebath et al. 1997 Eur Cytokine Netw (4):359-65.
- Dong et al. 1995 Neuron 15, 585-96.
- 15 Ernsberger et al. 1989 Neuron 2 :1275-1284.
- Gadient et al. Brain Res. 1996 Jun 10;724(1):41-6.
- Gage F.H. et al. (1998) Curr. Op. Neuro.8,671-676.
- Gage et al. 2000 Science 287,1433-8.
- Greene et al.1976 PNAS 73,2424-8.
- 20 Haggiag et al. 1999 Febs Lett 457:200-204.
- Haggiag et al. 2001 J Neurosci Res.2001 Jun 15;64(6):564-74.
- Hama et al. Neurosci Lett 1989 Oct 9;104(3):340-4.
- Hirota et al. J Exp Med. 1996 Jun 1; 183(6):2627-34.
- Horton et al. 1998 Eur J Neurosci 10 :673-9.
- 25 Kishimoto et al.1994 Cell 76 :253-262.
- Kahn et al. Glia 1994 Oct;12(2):87-98.
- Kleitman et al. 1991 Tissue culture methods for the study of myelination MIT press p 337-377. In: Banker et al Eds.
- Kollet et al. Blood. 1999 Aug 1;94(3):923-31.
- Kushima et al. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 1992 Sep;16(5):617-33.
- 30 Lois et al 1994 Science 264, 1145-8.
- Martinou et al. 1992 Neuron 8 :737-44.
- Marz et al. 1998 European Journal of Neuroscience 10 2765-73.
- Mendel et al. Eur J Immunol. 1998 May;28(5):1727-37.
- Morrison et al. 1997 Cell 88, 287-98.
- 35 Novick et al. Cytokine. 1992 Jan;4(1):6-11.
- Patterson 1994 PNAS 91 :7833-5.
- Shah et al. 1994 Cell 77, 349-360.
- Shah et al. 1996 Cell 85, 331-343.
- Shah et al. 1997 PNAS 94,11369-74.
- 40 Stahl et al. 1994 J Neurobiol 25 :1454-66.

Stemple et al. 1992 Cell 71, 973-85.

Taga et al. 1989 Cell 58 :573-581.

Taga et al 1992 PNAS 89 :10998-11001.

Taga 1996 J Neurochem 67:1-10.

5 Taga et al. 1997 Annu Rev Immunol 15 :797-819.

Toulmond et al. Neurosci Lett. 1992 Sep 14;144(1-2):49-52.

While et al. 2001 Neuron 29,57-71.

Yamada et al. Brain Res. 1994 Apr 18;643(1-2):173-80.

Yamamori et al. 1989 Science 246 :1412-6.

10

**REIVINDICACIONES**

1. Método para la preparación de células nerviosas y células gliales diferenciadas para trasplante en pacientes para tratar lesiones del SNC, cuyo método comprende la etapa de estimular células progenitoras neurales con una composición que comprende una quimera IL6R/IL6, ex vivo, en donde las células progenitoras neurales no son de origen embrionario humano.
2. El método de la reivindicación 1, en donde las células progenitoras neurales son de origen embrionario no humano.
3. El método de la reivindicación 1 en donde las células progenitoras neurales son de origen adulto.

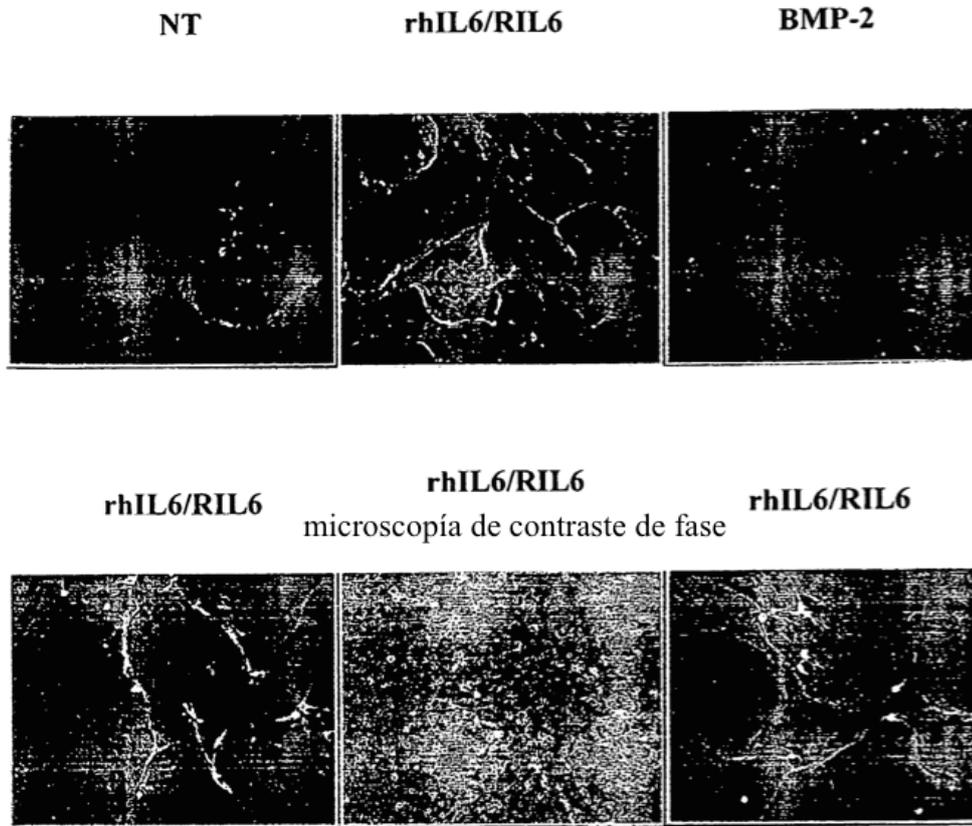
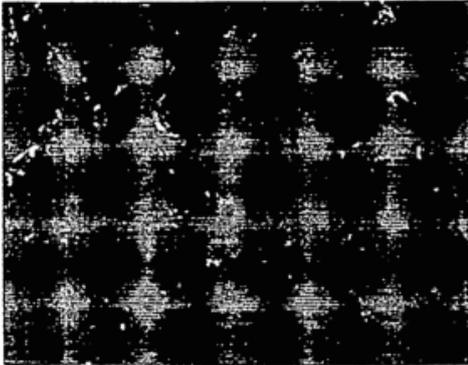
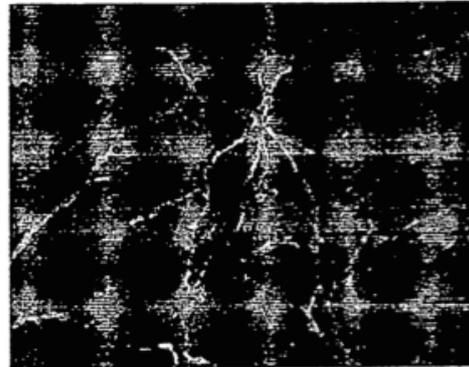


Figura 1

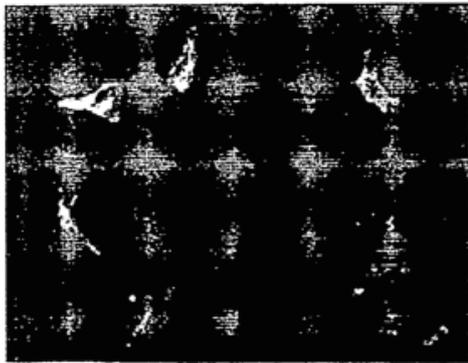
NT



rhIL6/RIL6



BMP-2



Heregulina



Figura 2

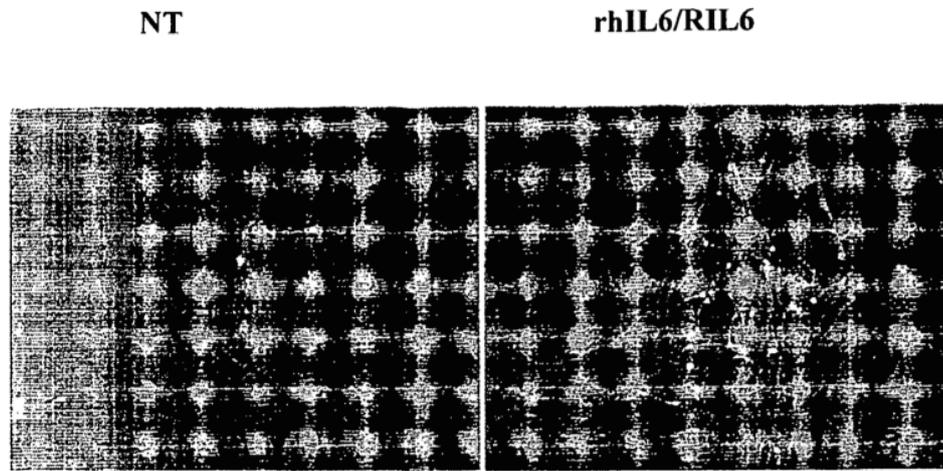
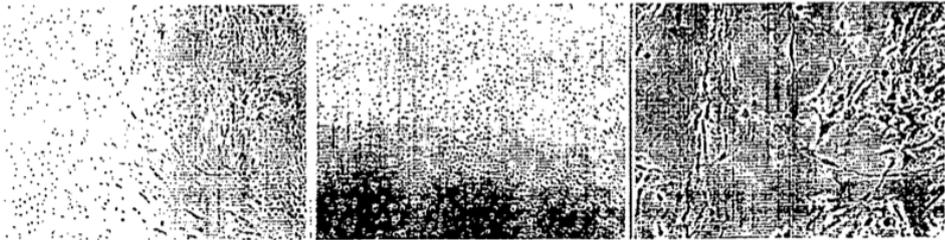


Figura 3

Marcador de neuronas      Marcador de progenitores  
derivados  
de la cresta neural      Marcador de neuronas



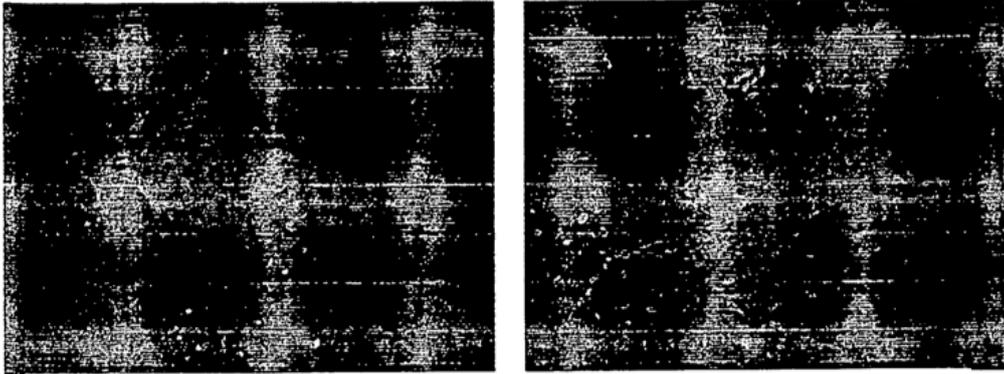
Contraste de fase de los campos superiores



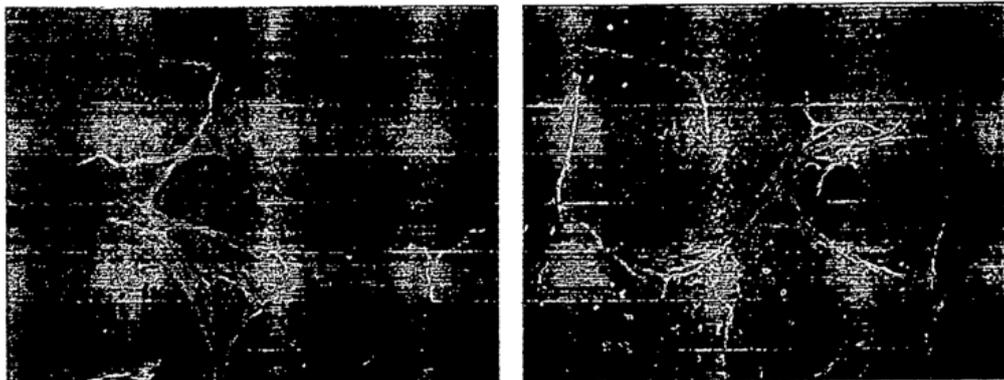
**Figura 4**

**NT**

**BMP-2**



**rhIL6/RIL6**



**Figura 5**

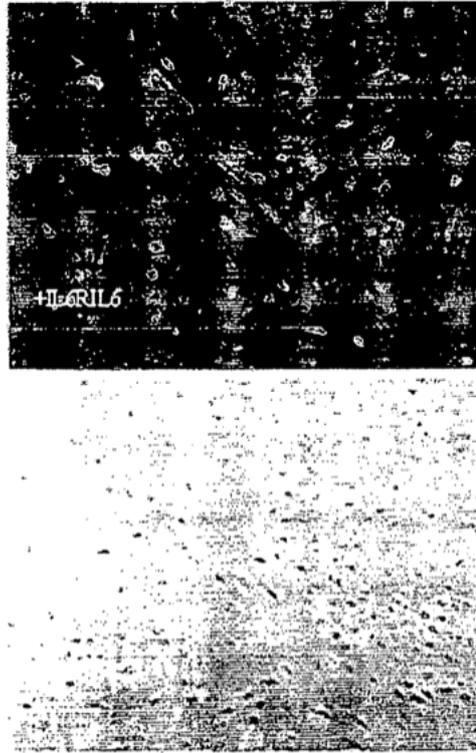


Figura 6

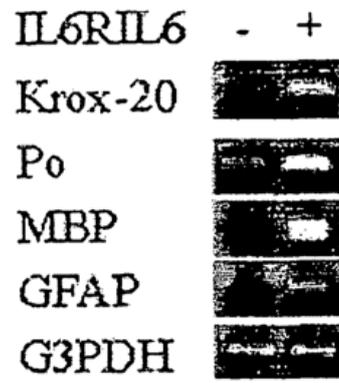


Figura 7