

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 297**

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

A61P 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2005 PCT/IL2005/000928**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2006 WO06025057**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2005 E 05777754 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 1786457**

54 Título: **Uso de IL-6 en complicaciones vasculares**

30 Prioridad:

01.09.2004 IL 16385604

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

22.11.2017

73 Titular/es:

**MERCK SERONO SA (100.0%)
Centre Industriel
1267 Coinsins, Vaud, CH**

72 Inventor/es:

**DREANO, MICHEL;
VITTE, PIERRE-ALAIN;
CAMERON, NORMAN y
COTTER, MARY**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 643 297 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 complicaciones vasculares

Campo de la invención

5 La presente invención se encuentra en el campo de las complicaciones microvasculares. En particular, se refiere al uso de IL-6 o una proteína de fusión o una sal de la misma en complicaciones microvasculares.

Antecedentes de la invención

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

10 La clasificación de la diabetes mellitus se basa en la adoptada por el National Diabetes Data Group y la Organización Mundial de la Salud (OMS). Anteriormente, la clasificación se basaba en la edad de aparición, la duración y las complicaciones de la enfermedad. La diabetes mellitus gestacional es la intolerancia a los carbohidratos, de gravedad variable que hace su aparición o se reconoce por primera vez durante el curso del embarazo. Los pacientes con diabetes mellitus (DM) de tipo I, también conocida como DM insulino dependiente (DMID) o diabetes de aparición juvenil, pueden desarrollar cetoacidosis diabética (CAD). Los pacientes con DM de tipo II, también conocida como DM no insulino dependiente (DMNID) pueden desarrollar como hiperglucémico hiperosmolar no cetósico (CHHNC). Entre las complicaciones microvasculares tardías comunes se incluyen la retinopatía, la nefropatía y neuropatías periféricas y autonómicas. La secuela clínica más importante de la pérdida sensorial es la ulceración de un pie, la causa más frecuente de ingreso hospitalario en pacientes diabéticos y la principal causa de amputaciones no traumáticas de miembros inferiores (Boulton 1997, Jude 1999 y Cameron 2001). Las complicaciones macrovasculares incluyen la enfermedad coronaria aterosclerótica y periférica arterial.

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

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

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

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

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

(abdominal), hipertensión, hiperlipidemia y enfermedad arterial coronaria (el síndrome de resistencia a la insulina).

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

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

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

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

Las insulinopatías son casos raros de DM, con las características clínicas de la DM de tipo II, que son el resultado de una herencia heterocigótica de un gen defectuoso, lo que conduce a la secreción de insulina que no se une de manera normal al receptor de la insulina. Estos pacientes tienen niveles muy elevados de insulina inmunorreactiva en plasma, asociados con respuestas normales de glucosa en plasma frente a la insulina exógena.

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

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

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

40 La hiperglucemia está correlacionada con la mayoría de las complicaciones microvasculares de la diabetes. Esto demuestra una relación lineal entre los niveles de Hb A_{1c} (véase más adelante) y la tasa a la cual se desarrollan las complicaciones. Otros estudios han sugerido que una Hb A_{1c} < 8% es un umbral por debajo del cual se pueden evitar la mayoría de las complicaciones. De esta forma, la terapia de la DM de tipo I debería intentar intensificar el control metabólico para disminuir la Hb A_{1c} evitando a la vez los episodios de hipoglucemia. Sin embargo, el tratamiento debe ser individualizado y debería modificarse cuando las circunstancias hacen inaceptable cualquier riesgo de hipoglucemia (por ejemplo en pacientes con una esperanza de vida corta o en aquéllos con enfermedades cardíacas o cerebrovasculares) o cuando aumenta el riesgo de hipoglucemia de los pacientes (por ejemplo, en pacientes que son poco estables o que tienen neuropatía autonómica).

En pacientes con DM de tipo II con sobrepeso, es muy importante la dieta para conseguir una reducción del peso. Si no se mejora la hiperglucemia con la dieta, debe comenzarse el proceso de tratamiento con un fármaco por vía oral.

50 Se debería evaluar de forma sistemática al paciente para detectar síntomas o signos de complicaciones, incluyendo inspecciones de los pies y de las pulsaciones y sensibilidad en los pies y en las piernas y prueba de albúmina en orina. Una evaluación periódica de laboratorio incluye: perfil de grasas, BUN (nitrógeno ureico en sangre) y niveles de creatinina en suero, ECG y una evaluación oftalmológica completa anual.

55 La hipercolesterolemia o la hipertensión aumentan los riesgos de complicaciones posteriores específicas y necesitan una atención especial y un tratamiento adecuado. Aunque en la mayoría de los diabéticos se pueden usar con seguridad los agentes β -bloqueantes que bloquean los receptores beta-adrenérgicos (como el propanolol), pueden enmascarar los síntomas β -adrenérgicos de la hipoglucemia inducida por la insulina y pueden alterar la respuesta

contrarreguladora normal. En consecuencia, los inhibidores ACE y los antagonistas del calcio se emplean frecuentemente.

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

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

15 Otro ensayo determina el nivel de fructosamina. La fructosamina se forma mediante una reacción química de la glucosa con proteínas del plasma y refleja el control de la glucosa en las 1 a 3 semanas previas. Por lo tanto, este ensayo puede mostrar cambios en el control antes que la Hb A_{1c} y es útil con frecuencia cuando se aplica un tratamiento intensivo y en ensayos clínicos a corto plazo.

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

25 De manera habitual, la insulina se proporciona en preparaciones que contienen 100 U/ml (insulina U-100) y se inyecta por vía subcutánea con jeringas de insulina desechables. Los pacientes que se inyectan rutinariamente dosis ≤ 50 U, prefieren generalmente las jeringas de ½ ml, porque se pueden leer más fácilmente y facilitan la medición precisa de dosis más bajas. Se ha diseñado un dispositivo de inyección de insulina de múltiples dosis (NovolinPen), normalmente denominado pluma de insulina, para utilizar un cartucho que contiene la dosificación de varios días.

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

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

40 Los adultos con diabetes tienen una mortalidad anual de aproximadamente el 5,4% (el doble de la tasa de adultos no diabéticos), y su esperanza de vida se reduce en un promedio de 5-10 años. Aunque la tasa de mortalidad aumentada se debe principalmente a las enfermedades cardiovasculares, también se incrementan las muertes por causas no cardiovasculares. Un diagnóstico de diabetes aumenta inmediatamente el riesgo de desarrollar diversas complicaciones clínicas que son en gran medida irreversibles y se deben a enfermedades microvasculares o macrovasculares. La duración de la diabetes es un factor importante en la patogénesis de complicaciones, pero otros factores de riesgo, por ejemplo, hipertensión, tabaquismo e hipercolesterolemia interactúan con la diabetes afectando el curso clínico de la microangiopatía y macroangiopatía.

45 Una de las complicaciones microvasculares de la diabetes es la retinopatía. La retinopatía diabética es un trastorno progresivo clasificado de acuerdo con la presencia de diversas anomalías clínicas. Es la causa más frecuente de ceguera en personas con una edad de 30-69 años. El daño en la retina surge de una combinación de fuga microvascular y oclusión microvascular; estos cambios se pueden visualizar en detalle mediante una angiografía con fluoresceína. Una quinta parte de los pacientes con diabetes de tipo 2 recién descubierta tiene retinopatía en el momento del diagnóstico. En la diabetes de tipo 1, la retinopatía que amenaza la visión casi nunca se produce en los primeros cinco años después del diagnóstico o antes de la pubertad. Después de 15 años, sin embargo, casi todos los pacientes con diabetes de tipo 1 y dos tercios de los que tienen diabetes de tipo 2, tienen retinopatía de fondo.

50 Otra complicación microvascular de la diabetes es la nefropatía. La nefropatía diabética se caracteriza por proteinuria >300 mg/24 h, aumento de la presión arterial y una disminución progresiva de la función renal. En su forma más grave, la nefropatía diabética produce enfermedad renal en fase final que requiere diálisis o trasplante, pero en las primeras etapas la enfermedad manifiesta está precedida por una fase conocida como nefropatía incipiente (o microalbuminuria), en la que la orina contiene cantidades mínimas de proteína (no detectable mediante

una tira reactiva tradicional). La microalbuminuria se define como una tasa de excreción de albúmina de 20-300 mg/24 h o 20-200 µg/min en una recogida programada y es altamente predictiva de una nefropatía diabética manifiesta, sobre todo en la diabetes de tipo 1.

5 La tasa de disminución en la tasa de filtración glomerular varía ampliamente entre los individuos, pero el tratamiento antihipertensivo ralentiza en gran medida la disminución de la función renal y mejora la supervivencia en pacientes con nefropatía diabética.

10 En pacientes con diabetes de tipo 1 complicada por nefropatía diabética, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina tienen efectos renoprotectores superiores a los que se pueden atribuir a una presión arterial reducida; son beneficiosos incluso en pacientes normotensos y mejoran otras complicaciones microvasculares asociadas tales como la retinopatía. En pacientes con diabetes de tipo 2, el logro de un buen control de la presión arterial (que a menudo requiere una terapia de combinación) es más importante que la elección del fármaco antihipertensor, aunque se utilizan inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina como tratamiento de primera línea.

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

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

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

35 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 o gp80 y la otra gp130 (revisión de Hirano et al., 1994). La gp130 es una glicoproteína transmembranal con una longitud de 918 aminoácidos, incluyendo un dominio intracelular de 277 aminoácidos, es una subunidad constituyente de varios receptores de citocinas, incluyendo los de IL-6, IL-11, LIF, oncostatina M, CNTF (factor neurotrófico ciliar, por sus siglas en inglés), CT-1. Puesto que la IL-6 es el prototipo de las citocinas que actúan a través de la gp130, esta familia de citocinas se denomina también
40 "citocinas de tipo IL-6".

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

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

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

Se ha mostrado que otros anticuerpos monoclonales dirigidos contra la gp130 inhiben las funciones mediadas por la IL-6. En el suero humano se han encontrado formas solubles de la gp130 (sgp130) con masas moleculares de 90 y

130 KDa. Pueden inhibir funciones biológicas de esas citocinas, utilizando sistemas receptores que tienen gp130 como un componente.

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

Las concentraciones circulantes de sIL-6R (agonista) en sujetos normales son relativamente altas y comparables a las de gp130 soluble (un antagonista natural de la IL-6) de más de 10 ng/ml (Corbi et al., 2000 Eur J Cardiotherac Surg. 18 (1): 98-103, Disthabanchong et al., Clin Nephrol. 2002 Oct; 58(4): 289-95). En contraste, las concentraciones circulantes de IL-6 son bajas de aproximadamente 10 pg/ml o inferiores (Kado et al., 1999 Acta Diabetol. Jun. 36 (1-2) 67-72, Corbi et al., 2000). De este modo, el efecto de la administración de IL-6 *in vivo*, sola, sin una coadministración de sIL-6R en la enfermedad, puede ser o no eficaz y depende de la concentración del agonista/antagonista soluble en una enfermedad en particular y en una ubicación particular en el cuerpo.

Se han desarrollado moléculas quiméricas que enlazan entre sí el receptor de la IL-6 soluble y la IL-6 (Chebath et al., Eur Cytokine Netw. 1997 Dic; 8(4): 359-65). Han sido denominadas IL-6R/IL-6. Las moléculas quiméricas IL-6R/IL-6 fueron generadas fusionando las regiones de codificación completas de los ADNs que codificaban el receptor de la IL-6 soluble (sIL-6R) y la IL-6 (véase, la Figura 4). IL6R/IL-6 recombinante se produjo en células CHO (Chebath et al., Eur Cytokine Netw. 1997, documento WO99/02552). IL-6R/IL-6 se une con mayor eficacia a la cadena de la gp130 *in vitro*, que la mezcla de IL-6 con sIL-6R (Kollet et al., Blood. 1999 Ago 1; 94(3): 923-31).

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

Experimentos recientes sobre los efectos de la IL-6 sobre células del sistema nervioso central y periférico, indican que la IL-6 puede tener efectos protectores sobre las células neuronales, así como algún impacto sobre los procesos neurodegenerativos inflamatorios (Gadient y Otten, 1997; Mendel et al., 1998). Se ha encontrado que la IL-6 evitaba la muerte celular inducida por glutamato en neuronas del hipocampo (Yamada et al., 1994) así como en neuronas estriatales (Toulmond et al., 1992). En ratones transgénicos que expresaban niveles altos tanto de IL-6 humana como de IL-6R soluble (sIL-6-R) humano, se observó una aceleración en la regeneración de los nervios después de dañar el nervio hipogloso, como se mostraba marcando de forma retrógrada los núcleos hipoglosales en el cerebro (Hirota et al., 1996). Además, ha habido alguna evidencia de que la IL-6 está implicada en una enfermedad neurológica, el trastorno desmielinizante esclerosis múltiple (MS, por sus siglas en inglés) (Mendel et al., 1998). Los ratones que no tenían el gen de la IL-6 eran resistentes a la inducción experimental de MS. Por otra parte, ha habido informes que indican que la IL-6 tiene un efecto negativo sobre la supervivencia neuronal durante la fase postraumática temprana después de lesiones en los nervios (Fischer et al., 2001).

El documento WO03033015 describe el uso de sustancias que señalizan a través de p130, tales como IL-6, o una quimera IL-6R/IL-6, para el tratamiento y/o la prevención de un tipo específico de neuropatía, la neuropatía diabética. En el documento WO03033015 se observó que el tratamiento con la IL-6 evitaba que las fibras neurales perdieran la vaina de mielina y la degeneración.

Como se ha mencionado, está bien establecido que la diabetes provoca un deterioro de la función nerviosa. Existen evidencias de que la alteración de la función nerviosa es debida a una reducción de la perfusión del nervio en pacientes diabéticos. Esto último es importante para la etiología de la neuropatía diabética; diversos estudios han mostrado que los déficits en la velocidad de conducción nerviosa se pueden prevenir o corregir mediante el tratamiento con una variedad de vasodilatadores, incluyendo antagonistas de α 1-adrenoreceptores, antagonistas de la angiotensina AT1 e inhibidores de la enzima convertidora, antagonistas de endotelina ETA, bloqueadores de canales de calcio y nitrovasodilatadores [revisado en Cameron et al., 2001].

Se han publicado resultados contradictorios sobre las acciones vasomoduladoras de IL-6, por ejemplo, en estudios *in vivo* descritos por Baudry et al. (1996), la exposición a IL-6 inducía una vasoconstricción significativa dependiente de la dosis, mientras que Minghini et al. (1998) informaban sobre una vasodilatación inducida por IL-6.

Como se ha mencionado, los pacientes con diabetes tienen gran reducción de la esperanza de vida y la calidad de vida debido a complicaciones microvasculares específicas de la diabetes en la retina, glomérulo renal y nervio periférico. La diabetes es la causa principal de ceguera, enfermedad renal en etapa terminal y una variedad de neuropatías debilitantes. Los diabéticos son el grupo de crecimiento más rápido de diálisis renal y receptores de

trasplante renal. Más del 60% de los pacientes diabéticos padecen neuropatía, lo que representa el 50% de todas las amputaciones no traumáticas en los EE.UU.

5 La hiperglucemia sola no puede explicar completamente la aparición de complicaciones microvasculares de la diabetes, ya que un control intenso de la glucosa en sangre reduce drásticamente las complicaciones microvasculares, pero no las evita por completo (Effect of intensive diabetes treatment on nerve conduction in the Diabetes Control and Complications Trial. Ann Neurol. 1995 Dic; 38(6): 869-80 y Lancet 352: 837-853, 1998). El control actual óptimo de las complicaciones microvasculares en la diabetes solo puede intentar un control mediante una regulación de la glucemia y después afrontar las complicaciones cuando se producen. En consecuencia, los pacientes continúan siendo ciegos, desarrollando insuficiencia renal y sometiéndose a amputaciones de las extremidades inferiores, haciendo que sea urgente una mayor comprensión de la patogénesis de la enfermedad microvascular para mejorar el desarrollo de terapias racionales (Cameron et al 2001).

El documento WO 03/033015 describe el uso de IL-6 o IL-6R para el tratamiento de la neuropatía diabética.

Compendio de la invención

15 De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado que la administración de IL-6 tiene un efecto beneficioso en un modelo animal de complicación microvascular, tal como se indica por la corrección mediada por IL-6 de la sangre endoneural ciática.

Las realizaciones de la invención son:

1. Uso de
 - a) IL-6 o
 - 20 b) una proteína de fusión de IL-6 y una inmunoglobulina (Ig);
o una sal respectiva de la misma en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una complicación microvascular seleccionada a partir del grupo que consiste en retinopatía diabética, nefropatía diabética y neuropatía periférica independiente de la diabetes.
- 25 2. Uso de acuerdo con la realización 1, en donde las complicaciones microvasculares se seleccionan a partir de retinopatía diabética y neuropatía periférica independiente de la diabetes.
3. Uso de acuerdo con la realización 2, en donde la complicación microvascular es retinopatía diabética.
4. Uso de acuerdo con la realización 2, en donde la complicación microvascular es nefropatía diabética.
5. Uso de acuerdo con la realización 2, en donde la neuropatía periférica independiente de la diabetes es debida a hipoxia crónica.
- 30 6. Uso de acuerdo con la realización 2, en donde la neuropatía periférica independiente de la diabetes es debida a una enfermedad vascular estructural.
7. Uso de acuerdo con la realización 1, en donde la complicación microvascular está acompañada de hipertensión.
8. Uso de acuerdo con la realización 1, en donde la complicación microvascular está acompañada de úlcera.
- 35 9. Uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde IL-6 es recombinante.
10. Uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde IL-6 está glicosilada en uno o varios sitios.
11. Uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en donde IL-6 no está glicosilada.
- 40 12. Uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 8, en donde la proteína de fusión comprende una fusión de inmunoglobulina (Ig).
13. Uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde IL-6 comprende al menos un resto fijado a uno o varios grupos funcionales, lo que tiene lugar en una o varias cadenas laterales sobre los residuos de aminoácidos, en donde el resto es un resto polietileno.
14. Uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el medicamento comprende IL-6 en dosis en el intervalo de 140 a 210, 70 a 210 y 14 a 42 mcg.
- 45 15. Uso de un vector dirigido que tiene secuencias reguladoras de ADN funcionales en células para permitir una activación génica endógena de IL-6, en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de

complicaciones microvasculares seleccionadas entre el grupo que consiste en retinopatía, nefropatía y neuropatía periférica independiente de la diabetes.

- 5 16. Uso de una célula que se ha modificado genéticamente para producir IL-6 o una proteína de fusión de IL-6 y una inmunoglobulina (Ig); o una sal de la misma en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una complicación microvascular seleccionada a partir del grupo que consiste en retinopatía diabética, nefropatía diabética y neuropatía periférica independiente de la diabetes.
- 10 17. Uso de un vector de expresión que comprende la secuencia que codifica IL-6 o una proteína de fusión de IL-6 y una inmunoglobulina (Ig); o una sal de la misma en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una complicación microvascular seleccionada a partir del grupo que consiste en retinopatía diabética, nefropatía diabética y neuropatía periférica independiente de la diabetes.
18. Un compuesto que es
- a) IL-6 o
- b) una proteína de fusión de IL-6 y una inmunoglobulina (Ig);
- o una sal respectiva de la misma
- 15 para uso en el tratamiento de una complicación microvascular seleccionada a partir del grupo que consiste en retinopatía diabética, nefropatía diabética y neuropatía periférica independiente de la diabetes.
19. El compuesto para uso de acuerdo con la realización 18, que es IL-6 y que es para administrar por vía subcutánea.
- 20 20. El compuesto para uso de acuerdo con la realización 18, en donde la complicación microvascular es retinopatía diabética.
21. El compuesto para uso de acuerdo con la realización 18, en donde la complicación microvascular es nefropatía diabética.
22. El compuesto para uso de acuerdo con la realización 18, en donde la complicación microvascular es neuropatía periférica independiente de la diabetes y es debida a hipoxia crónica.
- 25 23. El compuesto para uso de acuerdo con la realización 18, en donde la complicación microvascular es neuropatía periférica independiente de la diabetes y es debida a una enfermedad vascular estructural.
24. El compuesto para uso de acuerdo con la realización 18, en donde la complicación microvascular está acompañada de hipertensión.
- 30 25. El compuesto para uso de acuerdo con la realización 18, en donde la complicación microvascular está acompañada de úlcera.
26. El compuesto para uso de acuerdo con la realización 18, que es IL-6 recombinante.
27. El compuesto para uso de acuerdo con la realización 18, que es IL-6 la cual está glicosilada en uno o varios sitios.
28. El compuesto para uso de acuerdo con la realización 18, que es IL-6 la cual no está glicosilada.
- 35 29. El compuesto para uso de acuerdo con la realización 18, que es una proteína de fusión que comprende IL-6 y una inmunoglobulina.
30. El compuesto para uso de acuerdo con la realización 18, que comprende un resto polietileno fijado a uno o varios grupos funcionales, lo que tiene lugar como una de las realizaciones sobre los residuos de aminoácidos.
- 40 31. El compuesto para uso de acuerdo con la realización 18, en una cantidad eficaz de aproximadamente 2 a 3 mcg/kg y 0,2 a 0,6 mcg/kg.
32. El compuesto para uso de acuerdo con la realización 18, en una cantidad eficaz seleccionada a partir de 3 mcg/kg, 2 mcg/kg, 1 mcg/kg, 0,6 mcg/kg y 0,2 mcg/kg.
33. El compuesto para uso de acuerdo con la realización 18, en una cantidad eficaz de 140 a 210, 70 a 210 y 14 a 42 mcg.
- 45 34. El compuesto para uso de acuerdo con la realización 18, que es IL-6, la cual se administra tres veces por semana.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra mediciones de la velocidad de conducción motora ciática (A) y sensorial safena. Estadísticas: ANOVA de una vía + prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls; *** p <0,001 en comparación con un grupo de control (C); ††† p <0,001 efectos del tratamiento con IL-6 en comparación con un grupo diabético (D). Control no diabético (C; n = 10), 4 semanas de diabetes (1D; n = 8-10), 8 semanas de diabetes (2D, n = 10), 4 semanas de diabetes + 4 semanas con 10 mcg/kg de IL6 (D10; n = 10), 4 semanas de diabetes + 4 semanas con 30 mcg/kg de IL6 (D30; n = 8).

La Fig. 2 muestra los umbrales del análisis sensorial; latencia de la retirada de la pata frente a una estimulación térmica (nociva) (A), alodinia (dolor resultante de un estímulo no nocivo en la piel normal) prueba (B) y presión mecánica (C). Estadísticas: ANOVA de una vía + prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls; ** p <0,01, *** p <0,001 en comparación con un grupo de control (C); ††† p <0,001 efectos del tratamiento de IL-6 en comparación con un grupo diabético (D).

La Fig. 3 muestra el flujo de sangre endoneural (A) nutritivo ciático (capilar), la presión sanguínea media sistémica (B) y la conductancia vascular endoneural (C). Estadísticas: ANOVA de una vía + prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls; *** p <0,001 en comparación con un grupo de control (C); ††† p <0,001 efectos del tratamiento de IL-6 en comparación con un grupo diabético (D).

La Fig.4 es una representación esquemática de una quimera IL6R/IL6.

Descripción detallada de la invención

La invención se basa en el hallazgo de que la administración de IL-6 era capaz de reducir una complicación microvascular en un modelo animal de diabetes. Por lo tanto, la invención se refiere al uso de IL-6 o una proteína de fusión o una sal de la misma ("la sustancia") para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una complicación microvascular, como se define en la reivindicación 1.

Los términos "tratar" o "prevenir", tal como se usan en este documento, deben entenderse como: prevenir, inhibir, atenuar, mejorar o revertir uno o más síntomas o causas de complicaciones microvasculares. Cuando se "tratan" las complicaciones microvasculares, las sustancias de acuerdo con la invención se administran después de la aparición de las complicaciones microvasculares; "prevención" se refiere a la administración de las sustancias antes de que se observe en el paciente cualquier signo de complicaciones microvasculares.

El término "vascular" se refiere a los vasos sanguíneos.

El término "microvascular", perteneciente a la microvasculatura, se refiere a la porción de vasculatura del cuerpo que comprende los vasos más finos, que se describe a veces como que incluyera todos los vasos con un diámetro interno de 100 micras o menos, tales como arteriolas, ramificaciones arteriales diminutas, capilares, precapilares, arteriolas precapilares, metarteriolas y vénulas de los túbulos renales. La microvasculatura puede irrigar diferentes órganos, por ejemplo, los túbulos renales irrigan los riñones, la arteriola irriga la retina, los capilares se encuentran en el músculo, la piel, el sistema nervioso central, la mucosa intestinal, los glomérulos renales, el páncreas, las glándulas endocrinas.

El término "complicación" se refiere a una enfermedad o enfermedades, concurrentes con otra enfermedad o a la coincidencia de dos o más enfermedades en el mismo paciente.

Por lo tanto, la invención se refiere a complicaciones microvasculares en cualquier enfermedad, tal como por ejemplo, diabetes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, una enfermedad vascular estructural, hipertensión y en una úlcera.

En los resultados encontrados en el modelo de animal diabético de la presente invención, se ha demostrado que el deterioro del flujo sanguíneo (y por lo tanto la hipoxia) tiene un papel central en la disfunción del nervio, y que la IL-6 mejora el flujo sanguíneo. Dado que la neuropatía periférica se puede desarrollar también en sujetos no diabéticos que padecen hipoxia crónica, por ejemplo, en un sujeto que padece una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Masson 1988 y Cameron 2001), entonces, la administración de la sustancia de acuerdo con la invención es útil también en la neuropatía periférica no diabética.

Además, la administración de la sustancia de acuerdo con la invención también es útil en la enfermedad neurológica inducida por enfermedad vascular estructural.

En una realización preferida de la invención, las complicaciones microvasculares son la retinopatía y la nefropatía.

La administración de IL-6 es especialmente útil en un paciente que tiene complicaciones microvasculares que muestran niveles elevados de receptor de IL-6 en la circulación.

Se ha implicado la hipertensión en pacientes diabéticos como un factor de riesgo importante para las complicaciones microvasculares y, por lo tanto, la administración de la sustancia de acuerdo con la invención es especialmente útil

en pacientes diabéticos y no diabéticos que padecen hipertensión.

La proteína de fusión que se va a utilizar de acuerdo con la invención, puede ser preferiblemente una IL-6R/IL-6. Una "IL-6R/IL-6" (también denominada "IL-6R/IL-6" o "quimera de IL-6"), tal y como se usa en el presente documento, es una molécula quimérica que comprende una parte soluble de gp80 fusionada con la totalidad o una fracción biológicamente activa de la interleucina-6. Los restos de la proteína quimérica se pueden fusionar directamente entre sí, o pueden estar unidos a través de cualquier enlazador adecuado, tal como un puente disulfuro o un enlazador polipeptídico. El enlazador puede ser un péptido enlazador corto que puede ser tan corto como de 1 a 3 residuos de aminoácidos de longitud o más largo, por ejemplo, 13 o 18 residuos de aminoácidos de longitud. Dicho enlazador puede ser un tripéptido con la secuencia E-F-M (Glu-Phe-Met), por ejemplo, o una secuencia enlazadora 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 soluble de IL-6 y la secuencia de IL-6. Ejemplos de la quimera de IL-6 son conocidos en la técnica y se han descrito en detalle, por ejemplo, en el documento WO 99/02552 o WO 97/32891. Un ejemplo de una molécula quimérica IL-6R/IL-6, que se puede utilizar de acuerdo con la invención, se representa esquemáticamente en la Fig. 4.

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

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

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

Cualquier variante de este tipo puede tener una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativa de la de IL-6 o una IL-6R/IL-6, de forma que tiene una actividad sustancialmente similar o incluso mejor, en comparación con la de IL-6 o IL-6R/IL-6.

Una actividad característica de IL-6 es su capacidad para unirse a la porción gp80 del receptor de IL-6, y una actividad característica de IL-6R/IL-6 es su capacidad para unirse a gp130. Un ensayo de tipo ELISA para medir la unión de IL-6R/IL-6 a gp130 se ha descrito en detalle en el ejemplo 7, en la página 39 del documento WO 99/02552, que se incorpora completamente en esta memoria por referencia. La persona experta en la técnica apreciará que un ensayo de tipo ELISA similar se puede desarrollar para la unión de IL-6 a gp80. Siempre que la variante tenga una actividad de unión sustancial a su respectiva región de unión de gp80 o de gp130, se puede considerar que tiene una actividad sustancialmente similar a IL-6 o IL-6R/IL-6. Por lo tanto, se puede determinar si cualquier variante dada tiene al menos sustancialmente la misma actividad que IL-6 o IL-6R/IL-6, por medio de una experimentación rutinaria que comprende someter dicha variante, por ejemplo, a un ensayo de tipo sándwich simple para determinar si se une o no a gp80 o gp130 inmovilizada, como se describe en el ejemplo 7 del documento WO 99/02552.

Por ejemplo, una placa de microtitulación de 96 pocillos (Nunc) se recubre con un anticuerpo monoclonal anti-gp80 humana y se añaden 50 ng/ml de gp80 (ambos de R&D Systems, Minneapolis). Después del lavado en solución salina tamponada con fosfato, se añade la IL-6 en diferentes pocillos a diferentes concentraciones que oscilan desde 0,1 a 50 ng/ml. Después de una incubación durante la noche a 40°C, se añade un anticuerpo policlonal de conejo anti-IL-6, seguido de Ig anti-conejo de cabra, conjugada con peroxidasa de rábano picante, que se detecta mediante una reacción de color (Sigma, St. Louis).

Se ilustran variantes que tienen una identidad o una homología de al menos el 40% con la secuencia de IL-6 madura o la molécula quimérica IL-6R/IL-6 comprendida en el documento WO 99/02552, al menos 50%, al menos 60%, al

menos 70%, al menos 80% o, lo más preferiblemente, al menos 90% de identidad u homología con la misma.

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

Para secuencias en las que no existe una correspondencia exacta, se puede determinar un "% de identidad". En general, las dos secuencias que se van a comparar se alinean para proporcionar una correlación máxima entre las secuencias. Esta puede incluir insertar "huecos" en una o ambas secuencias, para mejorar el grado de alineación. Un % de identidad se puede determinar sobre toda la longitud de cada una de las secuencias que se van a comparar (la denominada alineación global), que es particularmente adecuada para secuencias de la misma longitud o con una longitud muy similar, o para longitudes definidas más cortas (la denominada alineación local), 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, versión 9.1 (Devereux J et al. 1984), por ejemplo, los programas BESTFIT y GAP, se pueden emplear para determinar el % de identidad entre dos nucleótidos y el % de identidad y el % de homología entre dos secuencias de polipéptidos. BESTFIT utiliza el algoritmo de "homología local" de Smith y Waterman (1981) y encuentra la mejor región única de similitud entre dos secuencias. Otros programas para determinar la identidad y/o la similitud entre secuencias también son conocidos en la técnica, por ejemplo, la familia de programas BLAST (Altschul S F et al., 1990, Altschul S F et al., 1997, accesible a través de la página de inicio del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson W R, 1990; Pearson 1988).

Las variantes de IL-6 o IL-6R/IL-6 o el ácido nucleico que las codifica, incluyen por lo tanto, un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos o nucleótidos de sustitución que puede obtener rutinariamente un experto ordinario en la técnica, sin experimentación excesiva, basándose en las enseñanzas y las orientaciones presentadas en este documento.

Los cambios para las variantes ilustradas en la presente invención se conocen como sustituciones "conservadoras". Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de IL-6 o IL-6R/IL-6 pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tiene propiedades fisicoquímicas suficientemente similares, de modo que una sustitución entre miembros del grupo conservará la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Está claro que las inserciones y deleciones de aminoácidos también se pueden realizar en las secuencias definidas anteriormente, sin alterar su función, particularmente si las inserciones o deleciones solo implican unos pocos aminoácidos, por ejemplo, menos de treinta o menos de diez, y no eliminan o desplazan aminoácidos que son decisivos para una conformación funcional, por ejemplo, residuos de cisteína. Las proteínas y las variantes de las mismas se pueden producir mediante tales deleciones y/o inserciones.

Los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla 1, en la Tabla 2 o en la Tabla 3.

Tabla 1: Grupos de aminoácidos sinónimos - 1 -

Aminoácido	Grupo de sinónimos
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
5	Asp	Glu, Asn, Asp
	Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
	Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
	Trp	Trp

Tabla 2: Grupos de aminoácidos sinónimos - 2 -

10	Aminoácido	Grupo de sinónimos
	Ser	Ser
	Arg	His, Lys, Arg
	Leu	Leu, Ile, Phe, Met
	Pro	Ala, Pro
15	Thr	Thr
	Ala	Pro, Ala
	Val	Val, Met, Ile
	Gly	Gly
	Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
20	Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
	Tyr	Phe, Tyr
	Cys	Cys, Ser
	His	His, Gln, Arg
	Gln	Glu, Gln, His
25	Asn	Asp, Asn
	Lys	Lys, Arg
	Asp	Asp, Asn
	Glu	Glu, Gln
	Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
30	Trp	Trp

Tabla 3: Grupos de aminoácidos sinónimos - 3 -

	Aminoácido	Grupo de sinónimos
	Ser	Ser
	Arg	Arg
35	Leu	Leu, Ile, Met
	Pro	Pro
	Thr	Thr

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

20 Ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que se pueden utilizar para obtener muteínas de IL-6 o IL-6R/IL-6, para uso en la presente invención, incluyen cualquier etapa de métodos conocidos, tales como los presentados en los documentos de 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; y 5.017.691 de Lee et al.; y las proteínas sustituidas con lisina presentadas en el documento de patente de EE.UU. nº 4.904.584 (Shaw et al.).

Variantes específicas de IL-6, que se ilustran en conexión con la presente invención, se han descrito (documento WO9403492A1). Además, el documento EP667872B1 describe una IL-6 mutante con una mejor actividad biológica sobre la IL-6 de tipo silvestre. Además de esto, el documento EP656117B1 describe métodos para aislar superagonistas de IL-6. Los mutantes o superagonistas se pueden usar de acuerdo con la invención.

25 La expresión "proteína fusionada" se refiere a un polipéptido que comprende IL-6 o una IL-6R/IL-6, fusionada con otra proteína que, por ejemplo, tiene un tiempo de residencia prolongado en fluidos corporales. IL-6 o una IL-6R/IL-6, se pueden fusionar de este modo con otra proteína, polipéptido o similar, por ejemplo, una inmunoglobulina o un fragmento de la misma.

30 "Derivados funcionales" tal y como se emplea en este documento, incluye derivados de IL-6 o IL-6R/IL-6, y sus variantes y proteínas fusionadas, que se pueden preparar a partir de grupos funcionales que aparecen como cadenas laterales en los residuos o los grupos N-terminales o C-terminales, por medios conocidos en la técnica, y se incluyen en la invención siempre que sigan siendo farmacéuticamente aceptables, es decir, que no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de IL-6 o IL-6R/IL-6, y no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen.

35 Estos derivados, por ejemplo, pueden incluir cadenas laterales de polietilenglicol, que pueden enmascarar sitios antigénicos y extender la residencia de una IL-6R/IL-6 en los líquidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo mediante una reacción con amoniaco o con aminas primarias o secundarias, derivados de N-acilo de grupos amino libres de los residuos de aminoácidos formados con restos acilo (por ejemplo, grupos alcanóilo o aroilo carbocíclicos) o derivados O-acilo de grupos hidroxilo libres (por ejemplo, el de los residuos serilo o treonilo) formados con restos acilo.

45 Un "fragmento" puede ser, por ejemplo, una fracción activa de IL-6 o IL-6R/IL-6. El término fragmento se refiere a cualquier subconjunto de la molécula, es decir, un péptido más corto, que conserva la actividad biológica deseada, es decir, que tiene actividad agonista de gp130. Los fragmentos se pueden preparar fácilmente mediante la eliminación de aminoácidos de cualquier extremo de la molécula de IL-6 o IL-6R/IL-6 y sometiendo a ensayo en el fragmento resultante sus propiedades para unirse a gp80 o gp130, respectivamente. Las proteasas para eliminar un aminoácido a la vez, ya sea del extremo N-terminal o C-terminal de un polipéptido, se conocen en la técnica, y los fragmentos determinados de ese modo, que conservan la actividad biológica deseada, implican una experimentación puramente de rutina.

Como fragmentos de IL-6 o IL-6R/IL-6, variantes y proteínas fusionadas de las mismas, la presente invención ilustra

adicionalmente cualquier fragmento o precursores de la cadena polipeptídica de la molécula de proteína sola o junto con moléculas o residuos asociados, unidos a los mismos, por ejemplo, residuos de azúcar o fosfato, o agregados de la molécula de proteína o los residuos de azúcar por sí mismos, siempre que dicha fracción tenga una actividad agonista sobre gp130, y en particular sobre gp130.

5 El término "sales" en la presente memoria se refiere tanto a sales de grupos carboxilo como a sales de adición de ácido de grupos amino de la IL-6 o una molécula de IL-6R/IL-6 o análogos de las mismas. 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 o de zinc y similares, y sales con bases orgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de adición de
10 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, cualquier sal de este tipo debe conservar la actividad biológica de IL-6 o IL-6R/IL-6, es decir, la capacidad de activar la señalización a través de gp130.

15 En una realización preferida de la invención, IL-6 o una proteína de fusión o una sal de la misma de la invención está glicosilada en uno o varios sitios.

Una forma glicosilada de una IL-6R/IL-6 tal como se ilustra en esta memoria, se ha descrito en el documento WO 99/02552 (PCT/IL98/00321), que es la molécula quimérica muy preferida de acuerdo con la invención. La IL-6R/IL-6 descrita en la misma es una glicoproteína recombinante, que se obtuvo fusionando la secuencia codificante completa del receptor de IL-6 de origen natural soluble, δ -Val (Novick et al., 1990) con la secuencia codificante
20 completa de IL-6 madura de origen natural, ambas de origen humano. La persona experta en la técnica apreciará que la IL-6 glicosilada se puede producir también por medios recombinantes, es decir, mediante la expresión en sistemas de expresión eucariotas.

De acuerdo con la presente invención, el agonista se puede producir en cualquier tipo de célula eucariota o procariota adecuada, tales como células de levadura, células de insecto, bacterias y similares. Se produce preferiblemente en células de mamífero, más preferiblemente en células CHO modificadas genéticamente tal y como se describe para IL-6R/IL-6 en el documento WO 99/02552. Aunque se prefiere la proteína de origen humano, la persona experta en la técnica apreciará que una proteína de fusión similar de cualquier otro origen, se puede utilizar de acuerdo con la invención, con tal de que conserve la actividad biológica descrita en el presente documento.

25 En una realización adicional de la invención, la IL-6 o una proteína de fusión o una sal de la misma de la invención, no está glicosilada. Ventajosamente, la molécula quimérica se puede producir entonces en células bacterianas, que no son capaces de sintetizar residuos de glicosilo, pero que generalmente tienen un alto rendimiento en proteína recombinante producida. La producción de IL-6 no glicosilada se ha descrito en detalle en el documento EP504751B1, por ejemplo.

35 En aún una realización adicional, la IL-6 o una proteína de fusión o una sal de la misma de la invención comprende una proteína de fusión de inmunoglobulina, es decir, las moléculas de acuerdo con la invención se fusionan con toda o una porción de una inmunoglobulina, y en particular con un fragmento Fc de una inmunoglobulina. Los métodos para preparar proteínas de fusión de inmunoglobulina son bien conocidos en la técnica, tales como los descritos en el documento WO 01/03737, por ejemplo. El experto en la técnica entenderá que la proteína de fusión resultante de la invención conserva la actividad biológica de IL-6 o IL-6R/IL-6, es decir, la estimulación de la señalización de
40 gp130. La proteína de fusión resultante tiene idealmente unas propiedades mejoradas, tales como un tiempo de residencia prolongado en fluidos corporales (semivida), mayor actividad específica, mayor nivel de expresión o una purificación más fácil de la proteína de fusión.

Preferiblemente, la IL-6 o una proteína de fusión o una sal de la misma de la invención se fusiona con la región constante de una molécula de Ig. Se puede fusionar con regiones de la cadena pesada, como los dominios CH2 y
45 CH3 de IgG1 humana, por ejemplo. Otras isoformas de moléculas de Ig también son adecuadas para la generación de proteínas de fusión de acuerdo con la presente invención, tales como las isoformas IgG₂ o IgG₄, u otras clases de Ig, como IgM o IgA, por ejemplo. Las proteínas de fusión pueden ser por tanto monoméricas o multiméricas, heteromultiméricas u homomultiméricas.

Los derivados funcionales de la IL-6 o una proteína de fusión o una sal de la misma de la invención se pueden
50 conjugar con polímeros con el fin de mejorar las propiedades de la proteína, tales como la estabilidad, la semivida, la biodisponibilidad, la tolerancia en el humano cuerpo o la inmunogenicidad.

Por lo tanto, una realización preferida de la invención se refiere a un derivado funcional de la IL-6 o una proteína de fusión o una sal de la misma de la invención que comprende al menos un resto fijado a uno o varios grupos funcionales, lo que se produce como una o varias cadenas laterales sobre los residuos de aminoácidos.

55 Una realización muy preferida se refiere a IL-6 o a una proteína de fusión o una sal de la misma de la invención 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.

El uso de un vector para inducir y/o potenciar la producción endógena de IL-6, en una célula normalmente silenciosa para la expresión de una IL-6, o expresar cantidades de IL-6 que no son suficientes, también se contempla de acuerdo con el invención. El vector puede comprender secuencias reguladoras funcionales en las células deseadas para expresar la IL-6. Tales secuencias reguladoras comprenden promotores o potenciadores. La secuencia reguladora se introduce entonces en el locus correcto del genoma mediante recombinación homóloga, ligando funcionalmente de este modo la secuencia reguladora con el gen cuya expresión se requiere para ser inducido o mejorado. A esta tecnología se hace referencia generalmente como "activación de gen endógeno" (EGA), y se describe, por ejemplo, en el documento WO 91/09955.

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

La sustancia de la invención se puede entregar en su sitio de acción en cualquier formulación adecuada. Preferiblemente, se puede entregar en forma de células que expresan y/o secretan la IL-6 o una proteína de fusión de la misma. Como se ilustra en los ejemplos a continuación, las células que expresan y secretan IL-6R/IL-6 en cantidades suficientes, han sido generadas mediante transfección en las células utilizando un vector de expresión adecuado.

La invención se refiere por lo tanto además al uso de una célula que expresa la IL-6 o una proteína de fusión o una sal de la misma de la invención de acuerdo con la invención, para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones microvasculares, tal y como se define en la reivindicación 1. Las células se pueden administrar en cualquier forma adecuada. Sin embargo, una célula que expresa y preferentemente secreta IL-6 o una IL-6R/IL-6 encapsulada en polímero, es un modo de entrega ilustrado de IL-6R/IL-6. El procedimiento de encapsulación se describe en detalle, por ejemplo, en Emerich et al., (1994) o el documento US 5.853.385. Líneas celulares adecuadas y sistemas de expresión estables son bien conocidos en la técnica.

La entrega de la sustancia de acuerdo con la invención también se puede llevar a cabo utilizando un vector, tal como un vector de expresión, que comprende la secuencia que codifica IL-6, una IL-6R/IL-6, una variante, una proteína fusionada o un fragmento de la misma. El vector comprende todas las secuencias reguladoras necesarias para la expresión de la proteína deseada en el cuerpo humano, y preferiblemente en las células nerviosas periféricas. Las secuencias reguladoras para los vectores de expresión son conocidas por la persona experta en la técnica. La invención por lo tanto, también se refiere al uso de un vector que comprende la secuencia codificadora de IL-6 o una proteína de fusión o una sal de la misma de acuerdo con la invención, para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones microvasculares, tal como se define en la reivindicación 15.

Cualquier vector de expresión conocido en la técnica se puede emplear de acuerdo con la invención. Sin embargo, el uso de un vector de terapia génica obtenido a partir de virus es altamente preferido. El uso de vectores virales para la expresión de IL-6 se describe en Bensadoun et al., 2001.

La sustancia de la invención se administra preferiblemente en el cuerpo humano como una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede comprender la IL-6 o un derivado funcional, una proteína de fusión o una sal de la misma de la invención como tal, o una célula que expresa dicho polipéptido, o un vector de expresión, en particular un vector de terapia génica lentiviral que comprende la secuencia que codifica IL-6 o una proteína fusionada de la misma, opcionalmente junto con uno o varios vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones microvasculares.

La definición de "farmacéuticamente aceptable" se entiende que incluye cualquier vehículo que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no es tóxico para el hospedador al que se administra. Por ejemplo, para la administración parenteral, el componente activo se puede formular en una forma de dosificación unitaria para inyección en vehículos tales como solución salina, solución de dextrosa, albúmina de suero y solución de Ringer.

El componente activo se puede administrar a un paciente en una variedad de maneras. Las rutas de administración incluyen la ruta intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, epidural, tópica e intranasal. Cualquier otra vía de administración terapéuticamente eficaz se puede utilizar, por ejemplo, la absorción a través de tejidos epiteliales o endoteliales o mediante terapia génica, en donde una molécula de ADN se administra al paciente (por ejemplo, a través de un vector), lo que causa que el polipéptido activo se exprese y secrete *in vivo*. Además, la molécula activa se puede administrar junto con otros componentes de agentes biológicamente activos, tales como tensioactivos, excipientes, soportes, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

Para la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular), el componente activo 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 técnicas comúnmente usadas.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un tratamiento y/o una prevención de complicaciones microvasculares, que comprende administrar a un paciente que lo requiere, una cantidad eficaz de la IL-6 o una proteína de fusión o una sal de la misma de la invención, opcionalmente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de ingredientes activos que es suficiente para afectar el curso y la gravedad de las enfermedades descritas anteriormente, lo que conduce a la reducción o remisión de tal patología. La cantidad eficaz dependerá de la vía de administración y del estado del paciente.

10 La dosificación administrada, como dosis únicas o múltiples, a un individuo, variará dependiendo de una variedad de factores, incluyendo las propiedades farmacocinéticas, la vía de administración, el estado y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), el grado de los síntomas, tratamientos concurrentes, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado. El ajuste y la manipulación de intervalos de dosificación establecidos están bien dentro de la capacidad de los expertos.

15 Cabe señalar que la dosis activa de IL-6 como factor trombopoyético en roedores es superior a 500 mcg/kg, frente a 10 mcg/kg en monos (Herodin et al. 1992 Blood 80 (3) 688). Por lo tanto, IL-6 parece ser 50 veces más eficaz en primates que en roedores. Por lo tanto, se espera que hrIL-6 sea 50 veces, o un orden de magnitud más eficaz o al menos 5 veces más eficaz en los seres humanos que en los roedores. Puesto que en las presentes realizaciones, los resultados positivos en una complicación microvascular se encontraron en roedores con dosis en el intervalo de 10 a 30 mcg/kg, por tanto, se espera que una dosis de 50, 10 y/o 5 veces menor de IL-6 recombinante humana sea efectiva para la prevención/tratamiento de las complicaciones microvasculares en el hombre. Preferiblemente, IL-6 o un fragmento, una variante, una proteína de fusión o una sal de la misma de la invención, se emplea con dosis de aproximadamente 2 a 3 mcg/kg, 1 a 3 mcg/kg y 0,2 a 0,6 mcg/kg.

20 Alternativamente, se puede administrar una dosis baja fija de IL-6 tal como en el intervalo de 140 a 210, de 70 a 210, y 14 a 42 mcg por paciente.

25 En una realización preferida de la invención, la IL-6 o un fragmento, una variante, un derivado funcional, una proteína de fusión o una sal de la misma de la invención, se administra tres veces por semana.

30 Un método para el tratamiento de complicaciones microvasculares, que comprende administrar a un paciente que lo requiere una cantidad eficaz de una célula que expresa IL-6 o una IL-6R/IL-6, o una variante, una proteína fusionada, una fracción activa de la misma, también se considera de acuerdo con la presente invención. Un método para el tratamiento de las complicaciones microvasculares que comprende administrar a un paciente que lo requiere un vector de expresión que comprende la secuencia que codifica IL-6 o una proteína fusionada de la misma, es un objeto adicional de la invención.

En una realización preferida de la invención, el vector de expresión es un vector de terapia génica. El uso de un vector viral, en particular un vector lentiviral, es altamente preferido.

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

Habiendo descrito ahora completamente esta invención, los expertos en la técnica apreciarán que la misma se puede realizar dentro de un amplio intervalo de parámetros, concentraciones y condiciones equivalentes sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención y sin una experimentación indebida.

40 Aunque esta invención se ha descrito en conexión con unas realizaciones específicas de la misma, se entenderá que se pueden realizar modificaciones adicionales. Esta solicitud se entiende que incluye cualquier variación, uso o adaptación de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo tales desviaciones de la presente descripción, tal como se realiza dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la que pertenece la invención y como se puede aplicar a las características esenciales en este documento, establecidas en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

45 La referencia a etapas de métodos conocidos, etapas de métodos convencionales, métodos conocidos o métodos convencionales no es de ninguna manera una admisión de que cualquier aspecto, descripción o realización de la presente invención, se describa, se ilustre o se sugiera en la técnica relevante.

50 La descripción anterior de las realizaciones específicas revelará de este modo completamente la naturaleza general de la invención que otros, aplicando el conocimiento dentro de la experiencia de la técnica (incluyendo los contenidos de las referencias citadas en este documento), pueden modificar y/o adaptar fácilmente para diversas aplicaciones de tales realizaciones específicas, sin una experimentación indebida, sin apartarse del concepto general de la presente invención. Por lo tanto, tales adaptaciones y modificaciones se entienden que tienen el sentido de una variedad de equivalentes de las realizaciones descritas, basándose en la enseñanza y la orientación presentadas en este documento. Se entiende que la fraseología o terminología en este documento tiene el propósito de una descripción y no de una limitación, de modo que la terminología o fraseología de la presente memoria descriptiva debe ser interpretada por el experto en la materia en función de las enseñanzas y orientaciones

presentadas en este documento, en combinación con el conocimiento de un experto normal en la técnica.

Ejemplos

Ejemplo 1: Efecto de la IL-6 en déficits motores y sensoriales en diabetes experimental.

5 El objetivo de los siguientes experimentos era examinar si el tratamiento con IL-6 podría corregir anomalías existentes en poblaciones de fibras nerviosas mielinizadas grandes y pequeñas en el modelo de neuropatía diabética en rata diabética por estreptozotocina.

Diseño experimental: Modelo de rata diabética y régimen de administración de IL-6.

10 La diabetes fue inducida en ratas maduras (19 semanas de edad) macho Sprague-Dawley a través de una sola inyección intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina (40-45 mg/kg). Después de 4 semanas sin tratamiento, durante las cuales los déficits de la velocidad de la conducción nerviosa (NCV) y el flujo sanguíneo se desarrollaban y estabilizaban [Cameron 1991], a las ratas diabéticas se les aplicó un tratamiento durante 4 semanas con IL-6 en 2 dosis de 10 mcg/kg y 30 mcg/kg, respectivamente, por vía subcutánea y 3 veces por semana.

15 Antes del inicio del tratamiento con IL-6 y al final del período de tratamiento, se midieron los umbrales de alodinia táctil (dolor resultante de un estímulo no nocivo en la piel normal) y de estimulación mecánica de la pata, mediante un aparato electrónico de filamentos de von Frey y la prueba de Randall-Sellito [Randall et al. 1957, Chaplan et al. 1994], respectivamente. Las latencias para reflejos de retirada frente a una estimulación térmica nociva de la pata, se estimaron con la prueba plantar de Hargreaves [Hargreaves 1988]. Todas las pruebas se llevaron a cabo utilizando un equipamiento comercialmente disponible (Ugo-Basile, Comerio, Italia). Brevemente, las mediciones se realizaron en una habitación a temperatura constante a la misma hora cada día, y las ratas tenían un período de 2 días para familiarizarse con la manipulación, el entorno, el equipamiento y el procedimiento experimental.

Los grupos experimentales eran los siguientes:

Control no diabético (C; n = 10)

4 sem. de diabetes (1D; n = 8-10)

8 sem. de diabetes (2D; n = 10)

25 4 sem. de diabetes + 4 semanas 10 mcg/kg de IL6 (D10; n = 10)

4 sem. de diabetes + 4 semanas 30 mcg/kg de IL6 (D30; n = 8)

Se estimó la NCV motora del nervio ciático en la rama del músculo tibial anterior y la NCV sensorial del nervio safeno como se ha descrito anteriormente [Cameron 1989].

30 Muestras de sangre para la estimación de la concentración de glucosa en plasma (método de GOD-Perid, Boehringer Mannheim) se tomaron a partir de la cánula de la carótida al final de los experimentos.

Los datos se expresaron como la media del grupo \pm SEM. Se sometieron a la prueba de Bartlett para la igualdad de la varianza y, cuando era necesario, se proporcionó una transformación logarítmica (conductancia vascular) antes de la ANOVA de una vía. Cuando se alcanzó una significación global ($p < 0,05$), se determinaron las diferencias estadísticas entre los grupos mediante la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls.

35 *Resultados experimentales:*

Las ratas diabéticas eran hiperglucémicas y perdieron peso durante el transcurso del experimento, principalmente durante las primeras 4 semanas (Tabla 4). El tratamiento con IL-6 no afectaba al estado glucémico o a la pérdida de peso corporal.

Tabla 4

Grupo	n	Peso corporal (g)		Glucosa en plasma (mM)
		Antes	Después	
Control	10	-	485 \pm 11	6,32 \pm 0,65
4 sem. de diabetes	8	471 \pm 6	360 \pm 3	41,54 \pm 1,61
8 sem. de diabetes	10	465 \pm 10	359 \pm 8	39,32 \pm 2,75
Diabetes + IL-6 10	10	468 \pm 4	359 \pm 18	40,38 \pm 4,04
Diabetes + IL-6 30	8	470 \pm 5	384 \pm 15	46,4 \pm 3,34

La NCV motora ciática era de $22,4 \pm 1,2\%$ (media \pm SEM) y $21,7 \pm 1,0\%$ de reducción ($p < 0,001$) después de 4 y 8 semanas de diabetes, respectivamente (Fig. 1A, barras 1D y 2D respectivamente). La IL-6 corregía este déficit en un $90,9 \pm 3,6\%$ (Fig. 1A, D10, 10 mcg/kg; $p < 0,001$) y $88,4 \pm 6,2\%$ (Fig. 1A, D30, 30 mcg/kg; $p < 0,001$). Del mismo modo, déficits de NCV sensorial safena de $17,1 \pm 1,3\%$ y $17,8 \pm 1,4\%$ después de 4 ($p < 0,001$) y 8 ($p < 0,001$) semanas de diabetes (Fig. 1B), respectivamente, se corrigían completamente ($p < 0,001$) con ambas dosis de IL-6. La latencia para la retirada de la pata frente a un estímulo térmico nocivo se redujo ($p < 0,001$) en un $37,8 \pm 2,1\%$ después de 4 semanas y un $37,0 \pm 5,5\%$ después de 8 semanas de diabetes (Fig. 2A), lo que indicaba una hiperalgesia térmica, que estaba rectificada completamente ($p < 0,001$) con ambas dosis de IL-6. De hecho, para la dosis de 10 mcg/kg, las latencias de la respuesta eran supernormales ($p < 0,01$). Los umbrales para la retirada de la pata frente a una estimulación táctil con un aparato electrónico de filamentos de von Frey, se redujeron en un $49,1 \pm 4,8\%$ ($p < 0,001$) y $58,7 \pm 4,9\%$ ($p < 0,001$) después de 4 y 8 semanas de diabetes, respectivamente (Fig. 2B). El tratamiento con IL-6 corregía esta alodinia táctil en un $83,9 \pm 6,7\%$ (10 mcg/kg; $p < 0,001$) y un $79,3 \pm 10,3\%$ (30 mcg/kg; $p < 0,001$). Como respuesta a un aumento lento de la presión mecánica, las ratas diabéticas mostraron una reducción de aproximadamente el 35% ($p < 0,001$) en los umbrales de retirada de la pata, lo que indica una hiperalgesia mecánica (Fig. 2C). Sin embargo, en contraste con las otras mediciones relacionadas con el dolor, esto parece estar afectado poco o nada por el tratamiento con IL-6.

Los datos muestran claramente que la IL-6 en ambas dosis utilizadas (10 y 30 mcg/kg tres veces por semana) corregía completamente los déficits de NCV motora ciática y sensorial safena en una diabetes experimental.

El tratamiento con IL-6 corregía aspectos de la disfunción de las fibras grandes y pequeñas en ratas diabéticas, incluyendo la velocidad de conducción motora y sensorial, tal como hiperalgesia térmica y alodinia táctil.

Ejemplo 2: Efecto beneficioso de la IL-6 en las complicaciones microvasculares.

Existe una evidencia indirecta de que la neuropatía diabética es el resultado de una hipoxia y reducción del flujo sanguíneo (Cameron 2001). En el modelo animal ilustrado en el Ejemplo 1, se muestra un deterioro en el rendimiento neural en un modelo de diabetes. En el Ejemplo 1 también se muestra que el rendimiento neural se corrige con IL-6.

Los siguientes experimentos se llevaron a cabo para evaluar directamente si la neuropatía en el modelo de diabetes del Ejemplo 1 imita la enfermedad humana en términos de deficiencia del flujo sanguíneo neural, y si los efectos beneficiosos de la IL-6 en este modelo son debidos a la corrección del flujo sanguíneo neural.

Por lo tanto, el flujo sanguíneo en el tejido endoneural y los cambios en la presión sanguínea sistémica se midieron en ratas no tratadas frente a ratas diabéticas, y en ratas diabéticas tratadas con IL-6.

Las ratas del Ejemplo 1 se anestesiaron con tiobutabarbital (50-100 mcg/kg i.p.) y la arteria carótida y la tráquea (macrovasculatura) fueron canuladas para las mediciones de la presión sanguínea y respiración artificial, respectivamente.

El flujo sanguíneo nutritivo endoneural ciático (capilar) se midió mediante polarografía con microelectrodos y aclaramiento de hidrógeno, tal y como se ha descrito anteriormente [Cameron 1991].

En pocas palabras, el flujo sanguíneo endoneural ciático se estimó en la extremidad contralateral a la de las mediciones de la velocidad de conducción mediante polarografía con microelectrodos y aclaramiento de hidrógeno [Cameron 1991, Chaplan 1994 y Randall 1957]. Las ratas se sometieron a ventilación mecánica. La arteria carótida se canuló para controlar la presión sanguínea, y cuando fue necesario, se proporcionó a las ratas un bloqueante neuromuscular usando d-tubocurarina (2 mg kg^{-1} a través de la cánula de la carótida) para reducir los artefactos de movimientos mecánicos. El nivel de anestesia se controló mediante la observación de cualquier reacción de la presión arterial frente a una manipulación, y se proporcionó un anestésico de tiobutabarbital complementario si era necesario. El nervio ciático se descubrió y la piel alrededor de la incisión se suturó a un anillo de metal para formar una piscina llena de aceite mineral a 37°C . Durante los registros, la temperatura de la piscina se mantuvo a $35\text{-}37^\circ\text{C}$ mediante calor radiante. Un microelectrodo de platino con aislamiento de vidrio, polarizado a 250 mV con respecto a un electrodo de referencia subcutáneo, se insertó en el endoneuro del nervio ciático entre la escotadura ciática y la trifurcación del nervio por encima de la rodilla. Se añadió 10% de H₂ al gas inspirado, las proporciones de O₂ y N₂ se ajustaron a 20% y 70%, respectivamente. Cuando la corriente de H₂ registrada por el electrodo se había estabilizado, indicando un equilibrio con la sangre arterial, el suministro de H₂ se apagó y la entrega N₂ se incrementó apropiadamente. El aclaramiento de H₂ se registró hasta que se alcanzó una línea de base estable, que se definió como una falta de disminución sistemática en la corriente del electrodo durante 5 min. Este procedimiento se repitió después en otro sitio del nervio. Después del experimento, las curvas de aclaramiento se digitalizaron y las curvas monoexponenciales o biexponenciales se ajustaron a los datos por ordenador, utilizando un análisis de regresión no lineal (Prism, Graphpad, San Diego, CA, EE.UU.) y la ecuación biexponencial general:

$$y = a \exp(-bx) + c \exp(-dx) + e$$

5 en donde y es la corriente de hidrógeno en el electrodo (unidades arbitrarias), x es el tiempo (min), a y c son constantes de ponderación para componentes del aclaramiento rápido (no nutritivo) y lento (nutritivo), respectivamente, b es el componente rápido y d es el componente lento ($\text{ml min}^{-1} \text{ ml nervio}^{-1}$), y_e es la corriente del electrodo de referencia (unidades arbitrarias). Suponiendo una densidad de tejido de 1, el flujo sanguíneo nutritivo se calculó como $d \times 100$ ($\text{ml min}^{-1} 100 \text{ g}^{-1}$). La conductancia vascular se calculó dividiendo el flujo sanguíneo por la presión arterial media durante el período de registro para esa curva de aclaramiento particular. Se tomaron los promedios de las dos determinaciones para representar los parámetros de flujo sanguíneo endoneural ciático.

10 Los resultados resumidos en la Figura 3A, muestran que la perfusión (capilar) nutritiva endoneural ciática era de $51,3 \pm 4,2\%$ y disminuía $53,6 \pm 2,7\%$ ($p < 0,001$) a las 4 y 8 semanas de diabetes (Fig. 3A). El tratamiento con IL-6 corregía ese déficit de flujo en un $84,3 \pm 5,2\%$ (10 mcg/kg ; $p < 0,001$) y $90,8 \pm 5,3\%$ (30 mcg/kg ; $p < 0,001$), de modo que los valores de la conductancia vascular estaban en la mitad superior del rango no diabético (Fig. 3C). No había diferencias significativas en la presión sanguínea sistémica media (Fig. 3B) entre los grupos. Los resultados se resumen en la Tabla 5.

15 Por lo tanto, IL-6 tenía unos efectos vasculares marcados en la mejora del flujo nutritivo endoneural ciático. En general, la IL-6 realiza muy bien la reversión de los defectos microvasculares.

Tabla 5

Grupo	MNCV (m/s)	SNCV (m/s)	Flujo (ml/min/100 g)	Presión (mm Hg)	Conductancia (ml/min/100 g/mm Hg)	Térmica (s)	Alodinia (g)	Mecánica (g)
C	$65,13 \pm 0,74$	$60,19 \pm 0,69$	$18,24 \pm 1,19$	$136,1 \pm 5,6$	$0,136 \pm 0,010$	$8,99 \pm 0,40$	$35,78 \pm 1,90$	$172,4 \pm 10,6$
4 sem D1	$50,53 \pm 0,70$	$49,98 \pm 0,80$	$8,89 \pm 0,77$	$124,6 \pm 3,7$	$0,072 \pm 0,007$	$5,59 \pm 0,19$	$18,22 \pm 1,71$	$111,9 \pm 4,8$
8 sem D2	$50,97 \pm 0,62$	$49,45 \pm 0,82$	$8,47 \pm 0,50$	$118,6 \pm 6,4$	$0,073 \pm 0,004$	$5,66 \pm 0,49$	$14,77 \pm 1,75$	$112,7 \pm 5,6$
DL10	$63,80 \pm 0,53$	$61,12 \pm 0,72$	$16,77 \pm 0,49$	$118,0 \pm 2,7$	$0,144 \pm 0,007$	$10,65 \pm 0,33$	$32,96 \pm 1,18$	$123,5 \pm 3,6$
DL30	$63,43 \pm 0,91$	$60,28 \pm 0,58$	$17,38 \pm 0,50$	$122,6 \pm 3,3$	$0,144 \pm 0,007$	$9,82 \pm 0,27$	$32,14 \pm 1,80$	$117,2 \pm 8,5$

Ejemplo 3: Producción de IL-6 e IL-6R/IL-6 en células CHO.

20 La secuencia de ADNc que codifica el receptor soluble de IL-6 (forma natural de sIL-6R encontrada en la orina, Oh et al., 1997) se fusiona con la que codifica la IL-6 madura. Las secuencias de 3 aminoácidos puente (EFM) también estaban presentes. El gen fusionado se inserta en un vector de expresión bajo el control del promotor CMV y se introduce en células CHO. Un proceso de producción se desarrolla y la proteína recombinante resultante se purifica mediante inmunopurificación, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-IL-6R. La Fig. 4 muestra esquemáticamente la composición de la IL-6R/IL-6. La proteína madura comprende 524 aminoácidos. Una proteína producida y purificada como se ha descrito anteriormente, es adecuada para ser administrada de acuerdo con la invención.

25 La IL-6 humana recombinante (r-hIL-6) se produjo en células de ovario de hámster chino (CHO) modificadas por ingeniería genética. El proceso de producción comenzó con el crecimiento y la expansión de las células a partir de un banco de células de trabajo (WCB) y continuó en condiciones bajo las cuales r-hIL-6 se secreta en el medio de cultivo. La r-hIL-6 se recogió y se purificó a partir del medio de cultivo de las células manipuladas genéticamente. La pureza era superior al 99,6% y la potencia era de $23,3 \times 10^6 \text{ UI/ml}$ (basándose en una actividad de factor de crecimiento de hibridoma (HGF) de IL-6 de Van Damme J, Van Snick J. Dev Biol Stand. 1988; 69:31-8).

Referencias

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

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

Baudry et al. Am J Physiol. 1996 271 (3 Pt 2):H1186-92. 1996.

Bensadoun, Almeida, Dreano, Aebischer y Deglon. European Journal of Neuroscience vol. 14 1753-1761. 2001.

Boulton AJM 1997 En:Pickup JU Williams G (compiladores) Textbook of Diabetes. 2ª ed.

Blackwell, Oxford págs. 58.1-58.20.

40 Chebath, J., Fischer, D., Kumar, A., Oh, J. W., Kollet, O., Lapidot, T., Fischer, M., Rose-John, S., Nagler, A., Slavin,

- S. y Revel, M. Eur. Cytokine Netw. 1997 8;359-365.
- Cameron NE, Eaton SEM, Cotter MA, Tesfaye S (2001) Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia* 44:1973-1988.
- 5 Cameron NE, Cotter MA, Robertson S (1989) The effect of aldose reductase inhibition on the pattern of nerve conduction deficits in diabetic rats. *Q J Exp Physiol* 74: 917-926.
- Cameron NE, Cotter MA, Low PA (1991) Nerve blood flow in early experimental diabetes in rats: relation to conduction deficits. *Am J Physiol* 261: E1-E8.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Meth* 53:55-63.
- 10 Chebath et al., Eur Cytokine Netw. (Kollet et al., Blood. 1999 Ago 1; 94(3):923-31).
- Chebath et al., Eur Cytokine Netw. 1997 Dic; 8(4):359-65).
- Corbi et al., 2000 Eur J Cardiotherac Surg. 18 (1):98-103.
- Devereux J et al., *Nucleic Acids Res*, 12, 387-395, 1984.
- Disthabanchong et al. *Clin Nephrol*. 2002 Oct; 58(4):289-95).
- 15 Dyck et al. *PNAS* 82:2513-7 1985.
- Emerich DF, Cain CK, Greco C, Saydoff JA, Hu ZY, Liu H, Lindner MD *Cell Transplant*. 1997 May-Jun; 6(3):249-66.
- Emerich, D.F., Lindner, M.D., Winn, S.R., Chen, E.-Y., Frydel, B.R. y Kordower, J.H. (1996). *J. Neurosci.*, 16, 5168-5181.
- 20 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.
- Emerich DF, Hammang JP, Baetge EE, Winn SR *Exp Neurol*. 1994 Nov; 130(1):141-50.
- Fisher et al., *J. Neuroimmunology* 119 (2001) 1-9.
- Frei et al., *J. Neuroimmunol.*, 31:147 (1991).
- Gadient y Otten, 1997, Mendel et al., 1998.
- 25 Halimi H, Eisenstein M, Oh J, Revel M y Chebath J. *Eur. Cytokine Netw*. 1995, 6: 135-143.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J (1988) A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32:77-88.
- Herodin et al. 1992 *Blood* 80 (3) 688.
- Hirano et al., 1986 *Nature (London)* 234-73 (1986) Hirano T, Matsuda T y Nakajima K: *Stem cells* 1994, 12:262-277.
- 30 Hirota H, Kiyama H, Kishimoto T, Taga T *J Exp Med*. 1996 Jun 1; 183(6):2627-34.
- Jude 1999 *Diabetes Rev* 7:395-410.
- Kado et al. 1999 *Acta Diabetol*. Jun 36 (1-2) 67-72.
- Kollet et al., *Blood*. 1999 Ago 1; 94(3):923-31
- Masson *Diabetologia*. 1988 Oct; 31(10):762-5.
- 35 Minghini et al. *Shock* Mar; 9(3):210-5 1998.
- May et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 83:8957 (1986).
- Mendel, I., Katz, A., Kozak, N., Ben-Nun, A. y Revel, M. *Eur. J. Immunol*. 1998 28, 1727-1737.
- Murakami M, Hibi M, Nakagawa N, Nakagawa T, Yasukawa K, Yamanishi K, Taga T, Kishimoto T *Science*. 1993 Jun 18; 260(5115):1808-10.
- 40 Novick, D., Shulman, L.M., Chen, L. y Revel, M. *Cytokine* 1992 4, 6-11.

- Novick D, Shulman LM, Chen L y 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.
- Paonessa G, Graziani R, Deserio A, Savino R, Ciapponi L, Lahmm A, Salvati AL, Pearson W R, Methods in Enzymology, 183, 63-99, 1990.
- 5 Pearson W R y Lipman D J, Proc Nat Acad Sci USA, 85, 2444-2448,1988.
- Rudas B. Streptozotocin. Arzneimittel-Forschung, 22, 830-861. (1972).
- Randall LO, Sellito JJ (1957) A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. Arch Int Pharmacodyn Ther 111:409-419.
- 10 Skundric DS, Lisak RP (2003) Role of neuropoietic cytokines in development and progression of diabetic polyneuropathy: from glucose metabolism to neurodegeneration. Exp Diabetes Res 4:303-12.
- Smith y Waterman J Mol Biol, 147,195-197, 1981, Advances in Applied Mathematics, 2, 482-489, 1981.
- Taga, T., Hibin M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T. y Kishimoto, T. Cell 1989 58, 573-581.
- Toulmond, S., Vige, X., Fage, D. y Benavides, J. Neurosci Lett 1992, 144, 49-52.
- 15 Ward LD, Howlett GJ, Discolo G, Yasukawa K, Hammacher A, Moritz RL y 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. y Hatanaka, H.: Brain Res 1994, 643, 173-80.
- Zilberstein et al., EMBO J 5:2529 (1986).

20

REIVINDICACIONES

1. Uso de
 - a) IL-6 o
 - b) una proteína de fusión de IL-6 y una inmunoglobulina (Ig);
- 5 o una sal respectiva de la misma en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una complicación microvascular seleccionada a partir del grupo que consiste en retinopatía diabética, nefropatía diabética y neuropatía periférica independiente de la diabetes.
2. Uso según la reivindicación 1, en donde las complicaciones microvasculares se seleccionan a partir de retinopatía diabética y neuropatía periférica independiente de la diabetes.
- 10 3. Uso según la reivindicación 2, en donde la complicación microvascular es retinopatía diabética.
4. Uso según la reivindicación 2, en donde la complicación microvascular es nefropatía diabética.
5. Uso según la reivindicación 2, en donde la neuropatía periférica independiente de la diabetes es debida a hipoxia crónica.
6. Uso según la reivindicación 2, en donde la neuropatía periférica independiente de la diabetes es debida a una enfermedad vascular estructural.
- 15 7. Uso según la reivindicación 1, en donde la complicación microvascular está acompañada de hipertensión.
8. Uso según la reivindicación 1, en donde la complicación microvascular está acompañada de úlcera.
9. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde IL-6 es recombinante.
10. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde IL-6 está glicosilada en uno o varios sitios.
- 20 11. Uso según una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en donde IL-6 no está glicosilada.
12. Uso según una cualquiera de las realizaciones 1 a 8, en donde la proteína de fusión comprende una fusión de inmunoglobulina (Ig).
13. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde IL-6 comprende al menos un resto fijado a uno o varios grupos funcionales, lo que tiene lugar en una o varias cadenas laterales sobre los residuos de aminoácidos, en donde el resto es un resto polietileno.
- 25 14. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el medicamento comprende IL-6 en dosis en el intervalo de 140 a 210, 70 a 210 y 14 a 42 mcg.
15. Uso de un vector dirigido que tiene secuencias reguladoras de ADN funcionales en las células para permitir una activación génica endógena de IL-6, en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones microvasculares seleccionadas entre el grupo que consiste en retinopatía, nefropatía y neuropatía periférica independiente de la diabetes.
- 30 16. Uso de una célula que se ha modificado genéticamente para producir IL-6 o una proteína de fusión de IL-6 y una inmunoglobulina (Ig); o una sal de la misma en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una complicación microvascular seleccionada a partir del grupo que consiste en retinopatía diabética, nefropatía diabética y neuropatía periférica independiente de la diabetes.
- 35 17. Uso de un vector de expresión que comprende la secuencia que codifica IL-6 o una proteína de fusión de IL-6 y una inmunoglobulina (Ig); o una sal de la misma en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una complicación microvascular seleccionada a partir del grupo que consiste en retinopatía diabética, nefropatía diabética y neuropatía periférica independiente de la diabetes.
- 40 18. Un compuesto que es
 - a) IL-6 o
 - b) una proteína de fusión de IL-6 y una inmunoglobulina (Ig);
 - o una sal respectiva de la misma
- 45 para uso en el tratamiento de una complicación microvascular seleccionada a partir del grupo que consiste

en retinopatía diabética, nefropatía diabética y neuropatía periférica independiente de la diabetes.

19. El compuesto para uso según la reivindicación 18, que es IL-6 y que es para administrar por vía subcutánea.
- 5 20. El compuesto para uso según la reivindicación 18, en donde la complicación microvascular es retinopatía diabética.
21. El compuesto para uso según la reivindicación 18, en donde la complicación microvascular es nefropatía diabética.
22. El compuesto para uso según la reivindicación 18, en donde la complicación microvascular es neuropatía periférica independiente de la diabetes y es debida a hipoxia crónica.
- 10 23. El compuesto para uso según la reivindicación 18, en donde la complicación microvascular es neuropatía periférica independiente de la diabetes y es debida a una enfermedad vascular estructural.
24. El compuesto para uso según la reivindicación 18, en donde la complicación microvascular está acompañada de hipertensión.
- 15 25. El compuesto para uso según la reivindicación 18, en donde la complicación microvascular está acompañada de úlcera.
26. El compuesto para uso según la reivindicación 18, que es IL-6 recombinante.
27. El compuesto para uso según la reivindicación 18, que es IL-6 la cual está glicosilada en uno o varios sitios.
28. El compuesto para uso según la reivindicación 18, que es IL-6 la cual no está glicosilada.
- 20 29. El compuesto para uso según la reivindicación 18, que es una proteína de fusión que comprende IL-6 y una inmunoglobulina.
30. El compuesto para uso según la reivindicación 18, que comprende un resto polietileno fijado a uno o varios grupos funcionales, lo que tiene lugar como en una de las reivindicaciones sobre los residuos de aminoácidos.
31. El compuesto para uso según la reivindicación 18, en una cantidad eficaz de aproximadamente 2 a 3 mcg/kg y 0,2 a 0,6 mcg/kg.
- 25 32. El compuesto para uso según la reivindicación 18, en una cantidad eficaz seleccionada a partir de 3 mcg/kg, 2 mcg/kg, 1 mcg/kg, 0,6 mcg/kg y 0,2 mcg/kg.
33. El compuesto para uso según la reivindicación 18, en una cantidad eficaz de 140 a 210, 70 a 210 y 14 a 42 mcg.
34. El compuesto para uso según la reivindicación 18, que es IL-6, la cual se administra tres veces por semana.

30

FIGURA 1

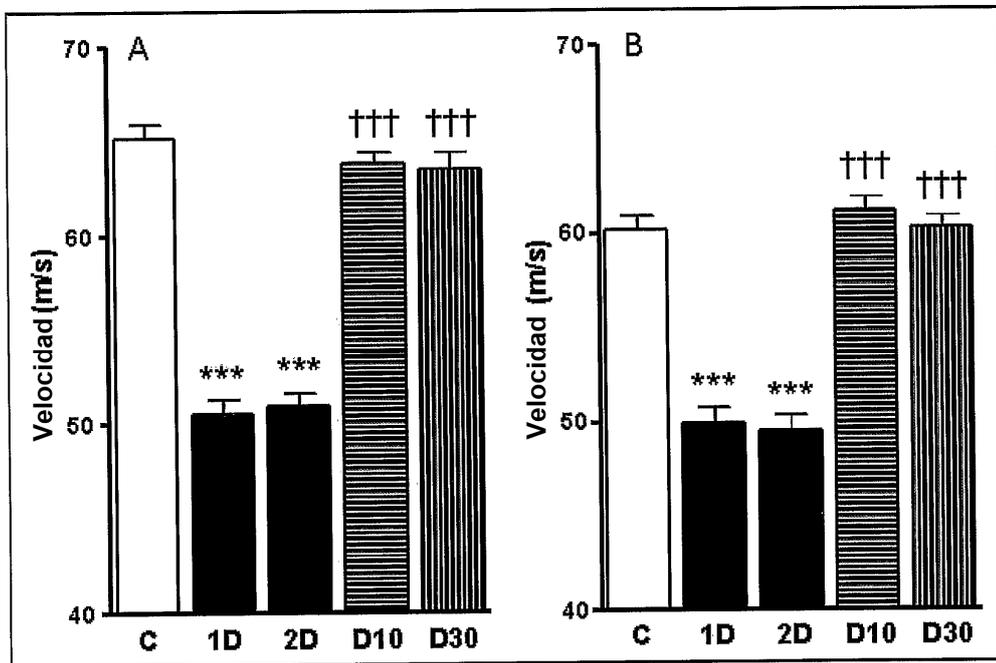


FIGURA 2

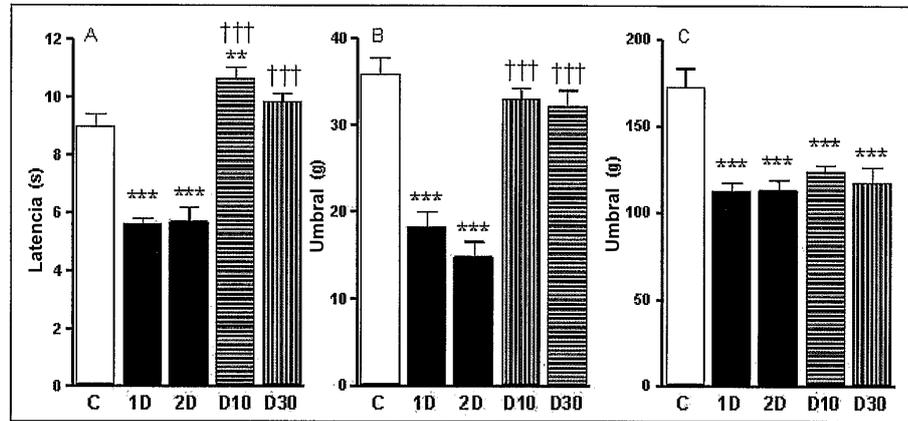


FIGURA 3

