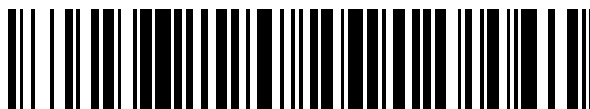


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 131**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2005** **E 16188978 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020** **EP 3124040**

54 Título: **IL-6 para la terapia de neuropatías inducidas por quimioterapia**

30 Prioridad:

29.04.2004 IL 16167304

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

20.10.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DREANO, MICHEL y
VITTE, PIERRE-ALAIN

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 2 788 131 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

IL-6 para la terapia de neuropatías inducidas por quimioterapia

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de IL-6 en neuropatías inducidas por quimioterapia (CIPN). Más específicamente, la invención se refiere al uso de una dosis baja de IL-6 para el tratamiento y/o la prevención de neuropatías inducidas por quimioterapia.

Antecedentes de la invención

La neuropatía periférica es una mezcla de trastornos del sistema nervioso periférico que resulta del daño a los nervios o a las vainas de mielina. El daño es duradero, generalmente dura más que la lesión que lo inicia.

La neuropatía periférica inducida por quimioterapia (CIPN) es un efecto secundario incapacitante común y potencial de muchos fármacos citotóxicos. La neuropatía inducida por quimioterapia se relaciona con dosis acumuladas o intensidades de dosis (Verstappen et al., 2003 Drugs 63: 1549-63).

Actualmente, la CIPN se alivia solo mediante la reducción de la dosis, lo que puede comprometer la eficacia del tratamiento de quimioterapia. Se cree que los pacientes que ya tienen síntomas neuropáticos debido a diabetes mellitus, neuropatías hereditarias o tratamiento precoz con quimioterapia neurotóxica son más vulnerables para el desarrollo de la CIPN.

Los alcaloides de vinca (por ejemplo, vincristina y vinblastina), compuestos basados en platino (por ejemplo, cisplatino) y taxanos (paclitaxel y docetaxel) se encuentran entre los fármacos más importantes que inducen neurotoxicidad periférica (Visovsky C. Cancer Invest. 2003 Jun; 21 (3): 439-51), Quasthoff S, Hartung HP J Neurol. 2002 Ene; 249 (1): 17. Revisión). Estos medicamentos son ampliamente utilizados para el tratamiento de diversas enfermedades malignas tales como el cáncer de ovario, cáncer de mama y cánceres hematológicos (Verstappen et al., 2003 Drugs 63 (15): 1549).

La neuropatía conducida por vincristina se caracteriza principalmente por insuficiencia motora y sensorial (tipo mixto de neuropatía). Mientras que el mecanismo subyacente no está completamente entendido hasta el momento, se ha descrito que implica una alteración del transporte axonal anterógrado, que en última instancia conduce a la degeneración axonal. Hasta ahora, el tratamiento de la neuropatía conducida por vincristina es solo paliativo, ya que hasta ahora no se ha desarrollado una terapia eficiente.

Cis-diclorodiamina platino (cisplatino) es el fármaco de elección para el tratamiento de cánceres de células germinales. También se usa de manera adyuvante para otros tumores sólidos, pero la dosis total que puede administrarse está limitada por efectos adversos graves que incluyen toxicidad renal y neurotoxicidad periférica. La incidencia de nefropatía, que era limitante de la dosis, se ha reducido significativamente por la diuresis del cloruro. Los problemas de neuropatía periférica aparecen poco después de la introducción del medicamento. La neuropatía está limitada por la dosis y está estrechamente relacionada con la dosis acumulada total del fármaco. La neurotoxicidad periférica significativa es evidente en la mayoría de los pacientes adultos que reciben > 400-500 mg/m² de cisplatino. La neuropatía es predominantemente sensorial con síntomas iniciales de parestesia (sensación anormal como ardor, hormigueos, formicaciones) en las extremidades distales, lo que puede progresar a una ataxia sensorial grave. Los estudios neuropatológicos han demostrado la pérdida de grandes fibras mielinizadas y evidencias de degeneración axonal. La neuropatía puede continuar progresando durante varios meses después del cese de cisplatino y los síntomas pueden aparecer de 3 a 8 semanas después de la última dosis de quimioterapia (Thompson et al., (1984) Cancer. 54 (7): Los estudios de ensayos de platino en tejidos, que controlan los tejidos en los que se acumula platino, revelaron la mayor concentración de platino en el tejido tumoral, pero se encontraron concentraciones similares altas en el tejido nervioso periférico. Esto en comparación con concentraciones mucho más bajas en el cerebro. Los estudios electrofisiológicos en pacientes con cáncer tratados con cisplatino confirman que los axones sensoriales de gran diámetro están involucrados.

El Taxol es un agente quimioterapéutico eficaz ampliamente utilizado en el tratamiento de tumores sólidos tales como el melanoma maligno y el carcinoma de ovario. Sin embargo, la neuropatía periférica causada por el taxol se está convirtiendo cada vez más en un problema limitante de la dosis en el tratamiento del cáncer (Rowinsky E. K., Chaudhry V., Cornblath D. R, Donehower R. C. Neurotoxicity of taxol (1993). Monogr. Natl. Cancer Inst. 107-115.). El Taxol es un alcaloide vegetal que suprime la dinámica de los microtúbulos a través de la unión a las subunidades de tubulina, causando la detención mitótica en las células en división (Derry WB, Wilson L., Jordan MA; Substoichiometric binding of taxol suppresses microtubule dynamics (1995) Biochemistry 34: 2203-2211) y la degeneración axonal en el nervio periférico debido a la interferencia con transporte axonal (Rowinsky et al., 1993). La neuropatía resultante afecta predominantemente a las fibras sensoriales pequeñas, pero a dosis más altas se produce una disfunción sensitiva motora y grande de las fibras (Freilich R. I., Balmaceda C., Seidman A. D., Rubin M., DeAngelis L. M. Motor neuropathy due to docetaxel and paclitaxel (1996). Nutr. Rev. 47: 115-118).

En general, el tratamiento de la neuropatía periférica es sintomático y no tiene ningún efecto beneficioso subyacente

- al daño a los nervios (Peltier AC, Russell JW. Recent advances in drug-induced neuropathies. *Curr Opin Neurol.* 2002 Oct; 15 (5): 633-8. Por ejemplo, se usa la piridoxina (vitamina B6) como un método de soporte nutricional después del daño del nervio periférico, se utilizan antioxidantes (por ejemplo, ácido gamma-linoleico, ácido alfa lipoico e inhibidores de la PKC e inhibidores de la aldosa reductasa) para eliminar toxinas que pueden contribuir a la neuropatía periférica, se usan los anticonvulsivos para suprimir los síntomas del dolor. Intentos de prevenir la neuropatía por vincristina utilizando supuestos agentes neuroprotectores tales como la vitamina B1, vitamina B12, glutamato (Boyle et al., *J Pharmacol Exp Ther.* 1996 Oct; 279 (1): 410-5), isoaxonina (Le Quesne et al., *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1985 Sep; 48 (9): 933-5), gangliósidos o factor de crecimiento nervioso (Hayakawa et al., *Life Sci.* 1994; 55 (7): 519-25. 4 Lewis et al. *Exp Neurol.* 1993 Nov; 124 (1): 73-88.) mostró un éxito limitado.
- En particular, los enfoques comunes para el tratamiento de la neuropatía inducida por quimioterapia incluyen los siguientes: dosis y limitación de la duración de los agentes quimioterapéuticos y el uso del factor de crecimiento nervioso (NGF) y la glutamina (Peltier AC, Russell JW. Recent advances in drug-induced neuropathies. *Curr Opin Neurol.* 2002 Oct; 15 (5): 633-8).
- El 4-metilcatecol (4-MC) es un derivado del catecol que tiene efectos beneficiosos en la regeneración del nervio ciático y en dos modelos experimentales de neuropatía diabética [Hanaokoa y Ohi J. *Neurolog.* 1994 122, 28 - 32, y Saita et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996, 276, 231-237]. Los derivados del catecol, tales como el 4-metilcatecol (4-MC), estimulan la producción de factor de crecimiento nervioso (NGF) a partir de astrocitos cultivados in vitro e in vivo [Takeuchi et al. *FEBS Lett* 1990, 261, 63-66] e inducen el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el cerebro de rata [Nitta et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999, 291, 1276-83]. Sin embargo, la utilidad terapéutica de los catecoles no está clara, ya que son productos químicos reactivos y pueden producir numerosos efectos secundarios o interacción fármaco-fármaco a concentraciones terapéuticas (Schweigert et al. 2001 *Environmental Microbiology* Volume 3 Issue 2, página 81).
- La IL-6 actúa no solo como una citoquina proinflamatoria sino también como antiinflamatoria (Jones et al., *FASEB J.* 2001 Jan; 15 (1): 43-58. Revisión). Las propiedades funcionales de IL-6 son extremadamente variadas y esto se refleja en la terminología utilizada originalmente para describir esta citoquina (Horst Ibelgauf's 'COPE: Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia).
- Dos proteínas se unen a IL-6, el receptor de IL-6 (IL-6R) y gp130 (revisado por Hirano et al, *Stem Cells.* 1994 Mayo; 12 (3): Revisión). Las formas solubles de IL-6R (sIL-6R), que corresponden al dominio extracelular de gp80, son productos naturales del cuerpo humano que se encuentran como glicoproteínas en la sangre y en la orina (Novick et al., *J Chromatogr.* 1990, 27; 510: 331-7, y *Cytokine*, 1992 Ene; 4 (1): 6-11). Una propiedad excepcional de las moléculas de sIL-6R es que actúan como agonistas potentes de IL-6 en muchos tipos de células, incluidas las células humanas (Taga et al., *Cell.* 1989, 11; 58 (3): 573-81, Novick et al. 1992 4 (1): 6-11). Incluso sin el dominio intracitoplásmico de gp80, sIL-6R todavía es capaz de desencadenar la dimerización de gp130 en respuesta a IL-6, que a su vez media la posterior transducción de señal específica de IL-6 y los efectos biológicos (Murakami, *Science*, 1993, 18 de junio; 260 (5115): 1808-10). sIL-6R tiene dos tipos de interacción con gp130, ambos esenciales para las actividades biológicas específicas de IL-6 (Halimi et al., *Eur Cytokine Netw.* 1995 Mayo-junio; 6 (3): 135-43), y se propuso que el complejo receptor de IL-6 activo era una estructura hexamérica formada por dos cadenas gp130, dos IL-6R y dos ligandos de IL-6 (Ward et al., 1994; Paonessa et al., *EMBO J.* 1995, 1 de mayo; 14 (9): 1942 - 51).
- En contraste con la expresión del IL-6R afín que tiene una distribución celular limitada (Jones et al., 2001), la expresión de la gp 130 que se expande en la membrana se encuentra en casi todos los órganos, incluidos corazón, riñón, bazo, hígado, pulmón, placenta y cerebro (Saito et al., *J. Immunol.* 1992, 15 de junio; 148 (12): 5066-71).
- Hay muchos ejemplos diferentes, que muestran que la IL-6 sola no induce una actividad específica a menos que se administre la IL-6R soluble. Por ejemplo, IL-6 induce la formación de osteoclastos en cocultivos de médula ósea de ratón y células osteoblásticas, solo cuando se combina con el sIL-6R (Jones et al., 2001). Además, aunque muchas células neuronales son capaces de producir IL-6, no responden a la estimulación por la propia IL-6. Sin embargo, la diferenciación y la supervivencia de las células neuronales pueden estar mediadas por la acción de sIL-6R (Hirota *J Exp Med.* 1996, 1 de junio; 183 (6): Martz Cheng, J.-G., Gadiant, R.A., Patterson, P.H., Stoyan, T., Otten, U., Rose-John, S. (1998) Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3251-3256).
- Las concentraciones circulantes de sIL-6R (agonista) en sujetos normales son relativamente altas y comparables a las de gp130 soluble (un antagonista natural de 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): Por el contrario, las concentraciones circulantes de IL-6 son aproximadamente o inferiores a 10 pg/ml (Kado et al., 1999 *Acta Diabetol.* Jun 36 (1-2) 67-72, Corbi et al, 2000. Por lo tanto, el efecto de la administración de IL-6 in vivo, solo, sin la administración conjunta con sIL-6R en la enfermedad puede o no ser efectivo y depende de la concentración del agonista/antagonista soluble en una enfermedad particular y en un lugar particular en el cuerpo.
- Se han descrito moléculas quiméricas que unen el receptor de IL-6 soluble y la IL-6 (Chebath et al., *Eur Cytokine Netw.* 1997 Dec; 8 (4): Han sido designados como quimera IL-6R/IL-6. Las moléculas de IL-6R/IL-6 quiméricas se generaron fusionando las regiones de codificación completas de los ADNc que codifican el receptor de IL-6 soluble

(sIL-6R) e IL-6. Se produjo la quimera de IL-6R/IL-6 recombinante en células CHO (Chebath et al., Eur Cytokine Netw. 1997, documento W099/02552). El IL-6R/IL-6 se une con una mayor eficacia a la cadena gp130 in vitro que IL-6 con sIL-6R (Kollet et al, Blood. 1999, 1 de agosto; 94(3): 923-31).

Como se mencionó anteriormente, la señalización de interleuquina-6 se facilita a través de la homodimerización de gp130 al complejo ligando-receptor. La señalización intracelular se desencadena a continuación mediante la activación de las tirosina quinasas citoplásmicas asociadas a gp130 (JAK1, JAK2 y TYK2) y la fosforilación de STAT1 y STAT3 (Murakami et al., Science. 1993, 18 de junio; 260 (5115): 1805-8). Por el contrario, los receptores de alta afinidad de LIF, OSM y CNTF activan las células mediante una heterodimerización entre gp130 y una proteína relacionada con gp130 (el receptor LIF) (Davis et al., Science. 1993, 18 de junio; 260 (5115): 1805-8). Dichos homodímeros o heterodímeros activan patrones distintos pero solapantes de fosforilación de tirosina a través de la familia Jak-Tyk de tirosina quinasas citoplásmicas (Boulton et al., J. Biol Chem. 1994, 15 de abril; 269 (15): 10066-72). Esto puede contribuir a las diferentes respuestas celulares asociadas con esta familia de proteínas.

El efecto terapéutico de la IL-6 recombinante sola sin la IL-6R soluble en un modelo animal de neuropatía inducida por diabetes se ha descrito en la solicitud de patente WO03033015. Sin embargo, no está claro si en un tipo diferente de neuropatía periférica, tal como la neuropatía periférica inducida por quimioterapia (CIPN), la IL-6, administrada sola sin la IL-6R soluble, puede tener un efecto terapéutico y/o preventivo.

En la fase I de ensayos clínicos de hIL-6 en pacientes con síndromes mielodisplásicos y trombocitopenia, se encontró que la dosis máxima tolerada era de 3,75 µg/kg/d (Gordon et al., Blood, 1995, 85 (11): 3066-76).

No está claro si una dosis baja de IL-6, que puede evitar la toxicidad, es eficaz para prevenir y/o curar y/o mejorar la neuropatía inducida por la quimioterapia.

El factor inhibidor de la leucemia recombinante (LIF), otro activador de gp130, se evaluó en ensayos clínicos para prevenir la CIPN causada por carboplatino/paclitaxel evaluada por electrofisiología del nervio periférico compuesto (CPNE), basándose en la velocidad nerviosa, amplitud y latencia del reflejo H, puntajes de umbral de percepción de vibración y síntomas (2003, reunión anual de ASCO, Número de resumen 2976). En estos estudios se administraron diariamente 2 ó 4 µg/kg de LIF por vía subóptica durante 7 días comenzando el día anterior al carboplatino/paclitaxel. Los resultados de los ensayos clínicos indicaron que LIF fue ineficaz para prevenir CIPN en las dosis y el régimen probado.

Por lo tanto, se necesitan nuevos fármacos/estrategias para prevenir/tratar la neuropatía periférica causada por una amplia gama de agentes quimioterapéuticos.

Sumario de la invención

La presente invención, según se define en las reivindicaciones anejas, se refiere al uso de una dosis baja de IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la neuropatía periférica inducida por quimioterapia.

En una realización, la neuropatía periférica inducida por quimioterapia está causada por al menos un agente quimioterapéutico tal como vincristina, cisplatino, carboplatino o taxol.

En una realización adicional, el agente quimioterapéutico consiste en una mezcla de carboplatino y taxol.

En una realización adicional, la dosis de IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma, está en el intervalo de 4 a 210 µg, preferiblemente, de 7 a 140 µg, o aproximadamente 4, 7, 14, 28, 70 ó 140 µg.

En una realización, la IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma está glicosilada en uno o más sitios, mientras que en otra realización de la invención, la IL-6 no está glicosilada.

En una realización adicional, el derivado funcional de IL-6 comprende al menos un resto químico, tal como polietilenglicol, unido a uno o más grupos funcionales, que se producen en una o más cadenas laterales en los restos de aminoácidos.

En un aspecto, la invención, según se define por las reivindicaciones anejas, proporciona el uso de una célula recombinante que produce una dosis baja de IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la neuropatía periférica inducida por quimioterapia.

En otro aspecto, la invención, según se define en las reivindicaciones anejas, proporciona el uso de un vector, tal como un vector lentiviral, que comprende la secuencia codificante de una IL-6 y que es capaz de expresar una dosis baja de IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado de la

misma, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la neuropatía periférica inducida por quimioterapia.

5 Un aspecto adicional proporciona el uso de una combinación de IL-6, o una isoforma, muteína, proteína fusionada, derivado funcional o fragmento de la misma, con al menos un agente quimioterapéutico, tal como vincristina, cisplatino, carboplatino, taxol o una mezcla de agentes quimioterapéuticos, preferiblemente una mezcla de carboplatino y taxol, para la fabricación de un medicamento.

En una realización, la IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma, en dicha combinación está glicosilada en uno o más sitios.

10 En otra realización, la IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma, en dicha combinación, no está glucosilada.

En una realización adicional, el derivado funcional de IL-6, en dicha combinación no glicosilada comprende al menos un resto químico, tal como un resto de polietilenglicol, unido a uno o más grupos funcionales, que se producen en una o más cadenas laterales en los restos de aminoácidos.

15 La presente descripción proporciona un método para tratar y/o prevenir la neuropatía periférica inducida por quimioterapia, que comprende administrar a un paciente en tratamiento, o antes del tratamiento, al menos un agente quimioterapéutico, una dosis baja de IL-6 o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente permutado o una sal del mismo.

20 En una realización adicional del método de tratamiento y/o prevención, el paciente es un paciente de alto riesgo para sufrir neuropatía periférica inducida por quimioterapia o el paciente muestra altos niveles del receptor de IL-6 en la circulación.

En una realización adicional del método, la IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma, se administra diariamente o tres veces por semana durante al menos dos semanas.

25 En una realización adicional más del método, la IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma, se administra por vía subcutánea.

En una realización adicional del método, la administración de IL-6 de dosis bajas de IL-6 se efectúa mediante activación génica endógena (EGA), mediante la administración de una célula recombinante que produce IL-6 o por un vector, tal como un lentivirus, capaz de expresar IL-6.

30 En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para aumentar la dosis y/o prolongar la administración de al menos un agente quimioterapéutico a un paciente bajo tratamiento o antes del tratamiento con dicho agente quimioterapéutico, que comprende administrar una dosis baja de IL-6 o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente permutado o una sal de la misma, para prevenir la neuropatía inducida por quimioterapia en dicho paciente.

35 En una realización adicional de dicho método, la IL-6 se administra antes, durante y/o después del agente quimioterapéutico.

40 En una realización adicional del método, la dosis de IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma, está en el intervalo de 0,06 a 3 µg/kg de peso corporal, preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 2 µg/kg de peso corporal o aproximadamente 0,2, 0,3, 1, 2 ó 3 µg/kg de peso corporal.

En una realización adicional del método, la dosis de IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma, está en el intervalo de 4 a 210 µg, preferiblemente en el intervalo de 7 a 140 µg o aproximadamente 4, 7, 14, 28, 70 ó 140 µg.

45 La invención, según se define en las reivindicaciones anejas, proporciona también una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una combinación de IL-6, o una isoforma, muteína, proteína fusionada, derivado funcional o fragmento de la misma, con al menos un agente quimioterapéutico tal como vincristina, cisplatino, carboplatino o taxol o una mezcla de los mismos, tal como la mezcla de carboplatino y taxol.

50 En realizaciones adicionales, la IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma, en la composición farmacéutica está glicosilada en uno o más sitios, o la IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma, en la composición farmacéutica, no está glicosilada.

En una realización adicional, el derivado funcional de IL-6 en la composición farmacéutica comprende al menos un resto químico unido a uno o más grupos funcionales, tal como un resto de polietilenglicol, que se produce en una o

más cadenas laterales en los restos de aminoácidos.

En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende además un fármaco neuroprotector, tal como el factor de crecimiento nervioso (NGF) o la glutamina.

5 Más específicamente, en una realización, la cantidad de IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma, en la composición farmacéutica, está en el intervalo de 4 a 210 µg, preferiblemente en el intervalo de 7 a 140 µg, o aproximadamente 4, 7, 14, 28, 70 ó 140 µg.

10 En un aspecto, la presente descripción proporciona un kit que comprende: uno o más recipientes que comprenden cada uno un agente quimioterapéutico; un recipiente que comprende IL-6 o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal del mismo; e instrucciones para la administración de dicho agente quimioterapéutico y dicha IL-6 para la prevención y/o el tratamiento de la neuropatía periférica inducida por quimioterapia.

En una realización, el kit contiene dos recipientes que comprenden cada uno un agente quimioterapéutico, un recipiente que comprende carboplatino y otro recipiente que comprende taxol.

15 En una realización adicional del kit, la cantidad de IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma, en cada contenedor está en el intervalo de 4 a 210 mg, preferiblemente en el intervalo de 7 a 140 µg, o aproximadamente 4, 7, 14, 28, 70 ó 140 µg.

En una realización adicional más, el kit comprende además un recipiente que comprende un fármaco neuroprotector tal como el factor de crecimiento neuronal (NGF) o la glutamina.

20 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra el efecto de la co-administración de vincristina, vincristina-IL-6 a las dosis indicadas o la administración conjunta de vincristina-4-MC sobre el peso corporal de las ratas.

25 La Figura 2 muestra el efecto profiláctico de IL-6 sobre la neuropatía mediada por vincristina manifestada por la prevención de la pérdida de coordinación motora inducida por vincristina. La Figura muestra los resultados de las pruebas de caminar en ratas tratadas con vincristina versus vincristina-IL-6 coadministrada en las dosis indicadas, o vincristina-4-MC co-administradas.

* p <0,05 Media ± s.e.m (versus control/vehículo; prueba de Dunnett).

30 La Figura 3 muestra el efecto profiláctico de IL-6 sobre la neuropatía mediada por vincristina manifestada por la prevención de la pérdida de nocicepción inducida por vincristina. La figura muestra los resultados de las pruebas de placa caliente en ratas tratadas con vincristina versus vincristina-IL-6 coadministrada a las dosis indicadas, o vincristina-4-MC co-administrada.

* p <0,05 Media ± s.e.m (versus control/vehículo; prueba de Dunnett).

35 La Figura 4 muestra el efecto profiláctico de IL-6 sobre la neuropatía mediada por vincristina manifestada por la prevención del deterioro inducido por vincristina de la función fibra/nervio. La figura muestra las amplitudes del potencial de acción muscular compuesto (CAMP) en ratas tratadas con vincristina versus vincristina-IL-6 coadministrada en las dosis indicadas, o vincristina - 4-MC coadministrada.

* p <0,05 Media ± s.e.m (versus control/vehículo; prueba de Dunnett).

40 La Figura 5 muestra el efecto profiláctico de IL-6 sobre la neuropatía mediada por vincristina manifestada por la prevención del deterioro inducido por vincristina de la función fibra/nervio. La figura muestra la latencia de CAMP en ratas tratadas con vincristina frente a vincristina-IL-6 coadministrada en las dosis indicadas, o vincristina-4 MC co-administrada.

* p <0,05 Media ± s.e.m (versus control/vehículo; prueba de Dunnett).

45 La Figura 6 muestra el efecto profiláctico de IL-6 sobre la neuropatía mediada por vincristina manifestada por la prevención del deterioro mediado por vincristina de la función fibra/nervio. La figura muestra la velocidad de conducción nerviosa sensible (SNCV) en ratas tratadas con vincristina versus vincristina-IL-6 coadministrada en las dosis indicadas, o vincristina-4-MC co-administrada.

* p <0,05 Media ± s.e.m (versus control/vehículo; prueba de Dunnett).

50 La Figura 7 muestra el efecto profiláctico de IL-6 sobre la neuropatía mediada por vincristina manifestada por la prevención del deterioro mediado por vincristina de la morfología de la fibra/nervio. La figura muestra el diámetro de fibra de los nervios ciáticos recogidos de ratas tratadas con vincristina versus vincristina-IL-6 coadministrada a las

dosis indicadas, o vincristina-4-MC coadministrada.

* $p < 0,05$ Media $\pm$ s.e.m (versus control/vehículo; prueba de Dunnett).

5 La Figura 8 muestra el efecto profiláctico de IL-6 sobre la neuropatía mediada por vincristina manifestada por la prevención del deterioro mediado por vincristina de la morfología de fibra/nervio. La figura muestra el diámetro axónico de los nervios ciáticos recogidos de ratas tratadas con vincristina versus vincristina-IL-6 coadministrada en las dosis indicadas, o vincristina-4-MC coadministrada.

* $p < 0,05$ Media $\pm$ s.e.m (versus control/vehículo; prueba de Dunnett).

10 La Figura 9 muestra el efecto profiláctico de IL-6 sobre la neuropatía mediada por vincristina manifestada por la prevención de la pérdida de mielina mediada por vincristina. La figura muestra el grosor de mielina de los nervios ciáticos recogidos de ratas tratadas con vincristina frente a vincristina-IL-6 coadministrada en las dosis indicadas, o vincristina-4 MC coadministrada.

* $p < 0,05$ Media $\pm$ s.e.m (versus control/vehículo; prueba de Dunnett).

15 La Figura 10 muestra el efecto profiláctico de IL-6 sobre la neuropatía mediada por vincristina manifestada por la prevención de la degeneración de fibra mediada por vincristina. La figura muestra porcentajes de fibras degeneradas en muestras recogidas de ratas tratadas con vincristina versus vincristina-IL-6 coadministrada a las dosis indicadas, o vincristina-4-MC co-administrada.

* $p < 0,05$ Media $\pm$ s.e.m (versus control/vehículo; prueba de Dunnett).

La Figura 11 muestra el efecto de cisplatino, la administración conjunta de cisplatino-IL-6 a las dosis indicadas o la coadministración de cisplatino-4-MC en el peso corporal de ratas.

20 Media + s.e.m.

La Figura 12 muestra el efecto profiláctico de IL-6 sobre la neuropatía mediada por cisplatino manifestada por la prevención de la pérdida de nocicepción mediada por cisplatino. La figura muestra los resultados de las pruebas de placa caliente de ratas tratadas con cisplatino frente a cisplatino-IL-6 co-administrado en las dosis indicadas, o cisplatino - 4-MC co-administrado.

25 * $p < 0,05$ (versus cisplatino/vehículo).

La Figura 13 muestra el efecto profiláctico de IL-6 sobre la neuropatía mediada por cisplatino manifestada por la prevención del deterioro mediado por cisplatino de la función fibra/nervio. La figura muestra la amplitud de la onda H en ratas tratadas con cisplatino frente a cisplatino IL-6 coadministrado en las dosis indicadas, o cisplatino - 4-MC coadministrado. * $p < 0,05$ (versus cisplatino/vehículo).

30 La Figura 14 muestra el efecto profiláctico de IL-6 sobre la neuropatía mediada por cisplatino manifestada por la prevención del deterioro mediado por cisplatino de la función fibra/nervio. La figura muestra SNCV en ratas tratadas con cisplatino versus cisplatino-IL-6 coadministrado en las dosis indicadas, o cisplatino-4-MC co-administrado. Media $\pm$ s.e.m * $p < 0,05$ (frente a cisplatino/vehículo).

35 La Figura 15 muestra el efecto profiláctico de IL-6 sobre la neuropatía mediada por cisplatino manifestada por la prevención del deterioro mediado por cisplatino de la morfología de la fibra. La figura muestra el diámetro de fibra de los nervios ciáticos recogidos de ratas tratadas con cisplatino versus cisplatino-IL-6 coadministrado a las dosis indicadas, o cisplatino - 4-MC coadministrado.

40 La Figura 16 muestra el efecto profiláctico de la IL-6 sobre la neuropatía mediada por cisplatino manifestada por la prevención de la alteración de la morfología nerviosa mediada por cisplatino. La figura muestra el diámetro axónico de los nervios ciáticos recogidos de ratas tratadas con cisplatino versus cisplatino-IL-6 coadministrado a las dosis indicadas, o cisplatino-4-MC coadministrado.

45 La figura 17 muestra el efecto profiláctico de IL-6 sobre la neuropatía mediada por cisplatino manifestada por la prevención de la pérdida de mielina mediada por cisplatino. La figura muestra los porcentajes de fibras mielinizadas en muestras recolectadas de ratas tratadas con cisplatino versus cisplatino-IL-6 coadministrado a las dosis indicadas, o cisplatino-4-MC coadministrado.

La Figura 18 muestra el efecto profiláctico de la IL-6 sobre la neuropatía mediada por cisplatino manifestada por la prevención de la degeneración de fibras mediada por cisplatino. La figura muestra los porcentajes de fibras degeneradas recogidas de ratas tratadas con cisplatino versus cisplatino IL-6 coadministrado a las dosis indicadas, o cisplatino- 4-MC coadministrado.

50 La Figura 19 muestra el efecto terapéutico de IL-6 sobre la neuropatía mediada por cisplatino manifestada por la mejora de la inducción mediada por cisplatino de la pérdida de nocicepción. La figura muestra los resultados de las

pruebas de placa caliente en ratas tratadas con cisplatino versus cisplatino-IL-6 coadministrado a las dosis indicadas, o cisplatino-4-MC co-administrado.

5 La Figura 20 muestra el efecto terapéutico de IL-6 sobre la neuropatía mediada por cisplatino manifestada por la mejora del deterioro mediado por cisplatino de la función fibra/nervio. La figura muestra la amplitud de la onda H en ratas tratadas con cisplatino frente a cisplatino-IL-6 coadministrado a las dosis indicadas, o cisplatino-4-MC co-administrado.

La Figura 21 muestra el efecto terapéutico de IL-6 sobre la neuropatía mediada por cisplatino manifestada por la mejora del deterioro mediado por cisplatino de la función fibra/nervio. La figura muestra SNCV en ratas tratadas con cisplatino versus cisplatino-IL-6 co-administrado en las dosis indicadas, o cisplatino-4-MC co-administrado.

10 La Figura 22 muestra cambios en el área de mielina en muestras recogidas del grupo de ratas tratadas con cisplatino.

La Figura 23 A muestra cambios en fibras degeneradas en muestras recogidas del grupo de ratas tratadas con cisplatino.

La Figura 23 B muestra cambios en fibras no degeneradas en muestras recogidas del grupo de ratas tratadas con cisplatino.

15 La Figura 24 muestra el efecto terapéutico de IL-6 sobre la neuropatía mediada por cisplatino manifestada por la mejora de la pérdida de mielina mediada por cisplatino. Los resultados muestran el área de mielina en muestras recolectadas de ratas tratadas con cisplatino y ratas tratadas con cisplatino administradas con IL-6 o 4-MC.

La Figura 25 muestra el efecto terapéutico de la IL-6 sobre la neuropatía mediada por cisplatino manifestada por la mejora de los cambios mediados por cisplatino de la relación de fibras grande/pequeña en muestras recogidas de ratas tratadas con cisplatino y ratas tratadas con cisplatino administradas con IL-6 o 4-MC.

20 La Figura 26 muestra el efecto terapéutico de la IL-6 sobre la neuropatía mediada por cisplatino manifestada por la mejora de la degeneración de las fibras mediada por cisplatino. Las figuras muestran cambios en fibras degeneradas en muestras recogidas del grupo de ratas tratadas con cisplatino y ratas tratadas con cisplatino administradas con IL-6 o 4-MC.

25 La Figura 26 B muestra el efecto terapéutico de la IL-6 sobre la neuropatía mediada por cisplatino manifestada por la mejora de la degeneración de la fibra mediada por cisplatino. La figura muestra los cambios en fibras no degeneradas en muestras recolectadas del grupo de ratas tratadas con cisplatino y ratas tratadas con cisplatino tratadas con IL-6 o 4-MC.

La Figura 27 muestra el efecto terapéutico de IL-6 sobre la neuropatía mediada por taxol manifestada por la mejora de la degeneración de fibra mediada por taxol. La figura muestra la latencia de onda H en un grupo de ratas tratadas con taxol y ratas tratadas con taxol administradas con IL-6 o 4-MC.

30 La Figura 28 muestra el efecto profiláctico de IL-6 sobre la neuropatía mediada por taxol manifestada por la prevención de la disminución de la amplitud de la onda H. La figura muestra las amplitudes de onda H en un grupo de ratas tratadas con taxol y cisplatino-taxol administradas con IL-6 o 4-MC.

35 La Figura 29 muestra el efecto profiláctico de IL-6 sobre la neuropatía mediada por taxol manifestada por la prevención de la disminución de la SNCV mediada por taxol. La figura muestra SNCV en un grupo de ratas tratadas con Taxol y cisplatino-taxol administradas con IL-6 o 4-MC.

La Figura 30 muestra los efectos de IL-6 sobre los efectos antiproliferativos de vincristina, cisplatino, carboplatino y taxol en células MCF-7 o SK-MES1. A-MCF7- vincristina, B-SK-MES-1-vincristina, C-MCF-7 cisplatino, D- SK-MES1- cisplatino, E-MCF-7-taxol, F-SK-MES1-taxol, G-MCF7-taxol + carboplatino, H-SK-MES- taxol + carboplatino, I-MCF7- carboplatino y J-SK-MES1-carboplatino.

40 La Figura 31 muestra el efecto del cis-platino en el crecimiento tumoral de carcinoma de colon WiDr humano en ratones atímicos.

La Figura 32 muestra el efecto de IL-6 (atexakin alfa) sobre el crecimiento tumoral de carcinoma de colon WiDr humano en ratones desnudos.

45 La Figura 33 muestra el efecto de IL-6 (atexakin alfa) en combinación con cisplatino en el crecimiento tumoral de carcinoma de colon WiDr humano en ratones desnudos.

Descripción detallada de la invención

50 La presente invención, según se define en las reivindicaciones anejas, se refiere al uso de una dosis baja de IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la neuropatía periférica inducida por quimioterapia (CIPN).

Actualmente, el tratamiento de la neuropatía periférica es sintomático y no tiene ningún efecto beneficioso subyacente al daño a los nervios. Típicamente, CIPN se alivia mediante la reducción de la dosis, lo que puede comprometer la eficacia del tratamiento.

Por tanto, la presente descripción presenta un progreso sustancial, a saber, el uso de una baja dosis de IL-6, para evitar el desarrollo de CIPN y/o una vez que se establece CIPN, para tratar y/o mejorar CIPN sin alterar la actividad quimioterapéutica de los fármacos. Además, por consiguiente, la administración de bajas dosis de IL-6, permitirá aumentar la dosis de quimioterapia y/o prolongar la quimioterapia cuando sea necesario. Por ejemplo, la administración de una mayor concentración de quimioterapia y/o más ciclos de quimioterapia que la concentración y el número de ciclos utilizados actualmente cuando son necesarios; por ejemplo, para combatir tumores más resistentes y/o agresivos.

Por lo tanto, la presente descripción se refiere al tratamiento y/o la prevención de CIPN por una amplia gama de agentes quimioterapéuticos seleccionados entre vinca-alcaloides (por ejemplo, vincristina y vinblastina), compuestos basados en platino (por ejemplo, cisplatino) y taxanos (paclitaxel y docetaxel), carboplatino o una combinación de más de un agente de los mismos, tal como carboplatino y platicitaxel, mediante la administración de dosis bajas de IL-6.

La presente descripción se basa en los hallazgos de que la administración de dosis bajas de IL-6 en modelos animales confiables es eficaz para prevenir CIPN así como para tratar y/o mejorar CIPN una vez que se establece la neuropatía.

Por ejemplo, los experimentos llevados a cabo en modelos animales de CIPN mostraron que la administración conjunta de IL-6 con el agente quimioterapéutico evitaba los defectos motores/sensoriales inducidos por la quimioterapia y la degeneración nerviosa. Los protocolos utilizados muestran que la administración de IL-6 protege contra la neuropatía inducida por quimioterapia independientemente del programa de administración, es decir, una dosificación caracterizada por una administración de IL-6 de tres veces por semana, frente a la administración diaria, no condujo a una disminución del efecto neuroprotector del compuesto.

Además, los experimentos llevados a cabo en modelos animales en los que la neuropatía ya está establecida, mostraron que IL-6 trató eficazmente y/o mejoró los defectos sensoriales inducidos por la quimioterapia, la pérdida de fibra/función nerviosa, el adelgazamiento de la vaina de mielina inversa, aumentó la proporción fibras grandes/pequeñas, y redujo la proporción de fibras degeneradas inducidas por el tratamiento de quimioterapia.

Cabe señalar que la dosis activa de IL-6 humana como factor trombopoyético en roedores es superior a 500 µg/kg, frente a 10 µg/kg en monos (Herodin et al., 1992 Blood 80 (3) 688). Por lo tanto, la IL-6 humana parece ser 50 veces más efectiva en primates que en roedores. Por lo tanto, se espera que la IL-6 humana recombinante (hr IL-6) sea 50 veces mayor, o un orden de magnitud más efectiva o al menos 5 veces más efectiva en seres humanos que en roedores. Como en las presentes realizaciones, los resultados positivos en CIPN se encontraron en roedores a dosis en el intervalo de 0,3 a 10 µg/kg, y se encontraron resultados muy efectivos a dosis de 3 y 10 µg/kg; por lo tanto, se espera que una dosis de 50, 10 y/o 5 veces menos de IL-6 humana recombinante sea efectiva para prevenir/tratar CIPN en el hombre. Las dosis preferidas en seres humanos están en el intervalo de aproximadamente 0,06 hasta 3 µg/kg, más preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 2 µg/kg y más preferibles en dosis de aproximadamente 0,2, 0,3, 1, 2 y hasta 3 µg/kg.

Alternativamente, se puede administrar una baja dosis fija de IL-6 independientemente del peso del paciente, tal como bajas dosis en el intervalo de 4 a 210 µg por paciente, y preferiblemente en el intervalo de 7 a 140 µg y más preferible de aproximadamente 4, 7, 14, 28, 70 ó 140 µg de IL-6 por paciente.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran inequívocamente el valor preventivo o profiláctico y/o terapéutico de una dosis baja de IL-6 en CIPN. Los resultados obtenidos también mostraron que una dosis baja de IL-6 protegía más eficazmente que 4-MC de la neuropatía inducida por quimioterapia.

Los términos "tratar/mejorar", usados en la presente memoria, deben entenderse como prevenir, inhibir, atenuar, mejorar o revertir uno o más síntomas o causa(s) de la neuropatía por quimioterapia, así como síntomas, enfermedades o complicaciones que acompañan a la neuropatía inducida por quimioterapia. Cuando se "trata/mejora" la neuropatía inducida por quimioterapia, las presentes sustancias se administran después del inicio de la enfermedad, "prevención" se refiere a la administración de las sustancias antes de que pueda notarse cualquier signo de enfermedad en el paciente.

La administración preventiva es especialmente útil en pacientes que tienen alto riesgo de estar enfermos o sufren CIPN, tales como aquellos pacientes que ya han padecido diabetes mellitus durante un período prolongado, pacientes que ya tienen síntomas neuropáticos debido al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y, pacientes con neuropatías hereditarias o sometidos a un tratamiento temprano con quimioterapia neurotóxica, etc.

La administración de IL-6 es especialmente útil en un paciente que presenta altos niveles del receptor de IL-6 en la circulación.

El término "quimioterapia" se refiere al tratamiento con medicamentos que eliminan las células cancerosas o las

hacen menos activas.

La expresión "neuropatía inducida por la quimioterapia" se relaciona con cualquier forma de quimioterapia inducida, o con uno o más síntoma(s) o trastorno(s) acompañantes o causados por la quimioterapia, o complicaciones de la quimioterapia que afectan los nervios, como se describe en detalle en la introducción anterior.

- 5 La IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma (la "sustancia"), puede usarse o administrarse en neuropatía periférica causada por una variedad de agentes quimioterapéuticos tales como cisplatino, dicarbazina, estreptozocina, ciclofosfamida, carmustina, lomustina, procarbazona, mitomicina, citarabina, metotrexato, 5-fluorouracilo, vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel, asparaginasa, busulfano, carboplatino, dacarbazona, fludarabina, hidroxiurea, ifosfamida, mercaptopurina, mitotano, estreptozocina, taxol y/o una mezcla de dos o más agentes del mismo.

- 10 En una realización, IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal del mismo, se usa para tratar y/o proteger de CIPN cuando el agente quimioterapéutico es taxol, cisplatino y vincristina y/o una combinación tal como una mezcla de carboplatino y paclitaxel.

- 15 Taxol puede administrarse, por ejemplo, en un intervalo de aproximadamente 20-250 mg/m², cisplatino en un intervalo de aproximadamente 30-100 mg/m², vincristina en un intervalo de aproximadamente 0,5-2 mg/m² y puede usarse carboplatino/paclitaxel en el intervalo de 100 a 200 g/m² y preferiblemente a aproximadamente 175 g/m². La quimioterapia puede administrarse en ciclos de 1 y hasta aproximadamente 6 ciclos, que pueden separarse por 3-4 semanas sin administración de quimioterapia. Los regímenes de quimioterapia se pueden encontrar en WWW.ohaci.com/palm/chemopage.htm Oncology/hematology associates of central-Illinois.

- 20 La presente sustancia puede administrarse en un intervalo de dosis de aproximadamente 0,06 hasta 3 µg/kg, más preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 2 µg/kg y más preferiblemente en dosis de aproximadamente 0,2, 0,3, 1, 2 y hasta 3 µg/kg.

- 25 Alternativamente, se pueden administrar dosis bajas de IL-6 independientemente del peso, por ejemplo, se administran dosis bajas en el intervalo de 7 a 140 µg por paciente, y preferiblemente de aproximadamente 7, 28, 70 ó 140 µg de IL-6 por paciente.

La sustancia puede estar glicosilada en uno o más sitios, o no glicosilada.

- 30 La sustancia puede ser un derivado funcional que comprende al menos un resto químico unido a uno o más grupos funcionales, que aparecen como una o más cadenas laterales en los restos de aminoácidos, y más preferiblemente el resto es un resto de polietilenglicol.

La sustancia se puede administrar como una célula que expresa la sustancia y/o como un vector, preferiblemente un vector lentiviral, que comprende la secuencia codificante de la sustancia.

- 35 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 que expresa cantidades de IL-6 que no son suficientes, también se contempla de acuerdo con la invención. El vector puede comprender secuencias reguladoras funcionales en las células deseadas para expresar IL-6. Dichas secuencias reguladoras comprenden promotores o potenciadores. La secuencia reguladora luego se introduce en el lugar correcto del genoma mediante recombinación homóloga, uniendo así operativamente la secuencia reguladora con el gen, cuya expresión se requiere para ser inducida o potenciada. La tecnología se denomina usualmente "activación génica endógena" (EGA), y se describe, p.ej. en el documento WO 91/09955.

- 40 La presente descripción se refiere también a métodos para tratar y/o prevenir CIPN, que comprenden administrar a un paciente que lo necesita una dosis baja de IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente permutado o una sal del mismo, opcionalmente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 45 La presente descripción también proporciona un método para tratar pacientes de alto riesgo CIPN, tales como pacientes que han padecido diabetes mellitus ya por un período prolongado, pacientes que ya tienen síntomas neuropáticos debido a diabetes mellitus, pacientes que ya tienen síntomas neuropáticos por SIDA y pacientes con neuropatías hereditarias o sometidos a un tratamiento temprano con quimioterapia neurotóxica, etc.

- 50 La presente descripción también proporciona un método para tratar y/o prevenir CIPN en pacientes con cáncer, tales como pacientes que padecen leucemia, cáncer de ovario o cáncer de mama, que tienen un nivel elevado de IL-6R en la circulación.

La dosis de la sustancia se puede administrar diariamente y preferiblemente tres veces por semana durante al menos dos semanas.

El término "dosis" se refiere a la cantidad a administrar de una vez, tal como una cantidad específica de medicamento.

Como se usa en este documento, el término "muteínas" se refiere a análogos de una IL-6, en la que uno o más de los restos de aminoácidos de los componentes naturales de IL-6 se reemplazan por diferentes restos de aminoácidos, o se eliminan, o se añaden uno o más restos de aminoácidos a la secuencia original de una IL-6, sin cambiar considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con la IL-6 original. Estas muteínas se preparan por síntesis conocida y/o por técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, o por cualquier otra técnica conocida adecuada por lo tanto.

Las muteínas usadas aquí incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, que se hibrida con ADN o ARN, que codifica una IL-6, en condiciones rigurosas. La expresión "condiciones rigurosas" se refiere a la hibridación y las condiciones de lavado posteriores, que los expertos en la técnica denominan convencionalmente "rigurosas". Véase Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, supra, Interscience, N.Y., 6.3 y 6.4 (1987, 1992), y Sambrook et al. (Sambrook, J. C., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Sin limitación, ejemplos de condiciones rigurosas incluyen condiciones de lavado 12-20°C por debajo de la T_m calculada del híbrido en estudio en, por ejemplo, 2 x SSC y 0,5% SDS durante 5 minutos, 2 x SSC y 0,1% SDS durante 15 minutos; 0,1 x SSC y 0,5% SDS a 37°C durante 30-60 minutos y luego, un 0,1 x SSC y 0,5% SDS a 68°C durante 30-60 minutos. Los expertos habituales en esta técnica entienden que las condiciones de rigurosidad también dependen de la longitud de las secuencias de ADN, las sondas de oligonucleótidos (tales como 10-40 bases) o las sondas de oligonucleótidos mixtas. Si se usan sondas mixtas, es preferible usar cloruro de tetrametil amonio (TMAC) en lugar de SSC. Ver Ausubel, supra.

Cualquiera de tales muteínas preferiblemente tiene una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicada de la de una IL-6, tal como para tener una actividad sustancialmente similar, o incluso mejor, a IL-6.

La actividad característica de IL-6 es la capacidad de unirse a la porción de gp80 del receptor de IL-6 y/o la capacidad de inducir la proliferación de hepatocitos. Siempre que la muteína tenga una capacidad sustancial de unirse a la porción de gp80 del receptor de IL-6 y/o la capacidad de inducir la proliferación de hepatocitos, se puede considerar que tiene una actividad sustancialmente similar a IL-6. Por lo tanto, se puede determinar si una muteína dada tiene al menos sustancialmente la misma actividad que IL-6 por medio de experimentación rutinaria que comprende someter hepatocitos a dicha muteína, y determinar si induce o no la proliferación de hepatocitos, por ejemplo, midiendo la captación de metionina marcada con BrdU o marcada o simplemente contando las células frente a las células de control no tratadas y las células tratadas con WT IL-6. En el ejemplo 7 de la página 39 del documento WO 99/02552, se ha descrito un ensayo del tipo ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para medir la unión de la quimera IL-6R/IL-6 a gp130.

Siempre que el mutante tenga actividad de unión sustancial a su región de unión de GP80, se puede considerar que tiene una actividad sustancialmente similar a IL-6.

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

Por lo tanto, se puede determinar si un mutante dado tiene al menos sustancialmente la misma actividad que IL-6 por medio de experimentación rutinaria que comprende someter dicho mutante, por ejemplo, a un simple ensayo de unión en sándwich para determinar si se une o no a una gp80 inmovilizada o a una gp80 soluble (fragmento extracelular de gp80) como se describe en el ejemplo 7 del documento WO 99/02552.

En una realización preferida, cualquier muteína de este tipo tiene al menos un 40% de identidad u homología con la secuencia de IL-6 madura. Más preferiblemente, tiene al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o, lo más preferiblemente, al menos 90% de identidad u homología con la misma.

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

Para secuencias donde no hay una correspondencia exacta, se puede determinar un "% de identidad". En general, las dos secuencias que se van a comparar están alineadas para proporcionar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir la inserción de "huecos" en una o ambas secuencias, para mejorar el grado de alineación. Se puede determinar un % de identidad en toda la longitud de cada una de las secuencias que se comparan (denominada alineación global), que es particularmente adecuada para secuencias de la misma longitud o muy similar, o en longitudes más cortas y definidas (el denominado alineamiento local), que es más adecuado 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 Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 9.1 (Devereux J et al. 1984), por ejemplo los programas BESTFIT y GAP, pueden usarse para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad y el % de homología entre dos secuencias polipeptídicas. BESTFIT utiliza el algoritmo de "homología local" de Smith y Waterman (1981) y encuentra la mejor región única de similitud entre dos secuencias. También se conocen en la técnica otros programas para determinar la identidad y/o similitud entre secuencias, por ejemplo, la familia de programas BLAST (Altschul SF et al., 1990, Altschul SF et al., 1997, accesibles a través de la página de inicio del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson WR, 1990; Pearson 1988).

Las muteínas de IL-6, que pueden usarse aquí o el ácido nucleico que las codifica, incluyen un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos o polinucleótidos de sustitución que pueden obtenerse rutinariamente por cualquier experto en la técnica, sin excesiva experimentación, basado en las enseñanzas y la orientación presentada en este documento.

Los cambios preferidos para las muteínas son lo que se conoce como sustituciones "conservadoras". Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de IL-6 pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tienen propiedades fisicoquímicas suficientemente similares que la sustitución entre los miembros del grupo preservará la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Está claro que las inserciones y deleciones de aminoácidos también pueden realizarse en las secuencias definidas anteriormente sin alterar su función, particularmente si las inserciones o deleciones solo implican algunos aminoácidos, por ejemplo, menos de treinta, y preferiblemente menos de diez, y no eliminan ni desplazan los aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, por ejemplo, restos de cisteína. Las proteínas y muteínas producidas por tales deleciones y/o inserciones entran dentro del alcance de la presente invención.

Preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla A. Más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla B; y, lo más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla C.

Tabla A Grupos preferidos de aminoácidos sinónimos

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

Tabla B

Grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

	<u>Aminoácido</u>	<u>Grupo sinónimo</u>
5	Ser	Ser
	Arg	His, Lys, Arg
	Leu	Leu, Ile, Phe, Met
	Pro	Ala, Pro
	Thr	Thr
10	Ala	Pro, Ala
	Val	Val, Met, Ile
	Gly	Gly
	Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
	Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
15	Tyr	Phe, Tyr
	Cys	Cys, Ser
	His	His, Gln, Arg
	Gln	Glu, Gln, His
	Asn	Asp, Asn
20	Lys	Lys, Arg
	Asp	Asp, Asn
	Glu	Glu, Gln
	Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
	Trp	Trp

Tabla C

Grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

	<u>Aminoácido</u>	<u>Grupo Sinónimo</u>
25	Ser	Ser
	Arg	Arg
	Leu	Leu, Ile, Met
	Pro	Pro
	Thr	Thr
30	Ala	Ala
	Val	Val
	Gly	Gly
	Ile	Ile, Met, Leu
	Phe	Phe
35	Tyr	Tyr
	Cys	Cys, Ser
	His	His
	Gln	Gln
	Asn	Asn
40	Lys	Lys
	Asp	Asp
	Glu	Glu
	Met	Met, Ile, Leu
	Trp	Met

Los ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que pueden usarse para obtener muteínas de polipéptidos IL-6, para su uso aquí, incluyen cualquier etapa de método conocida, tales como las presentadas en las patentes estadounidenses 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 proteínas sustituidas con lisina presentadas en la patente de Estados Unidos N° 4.904.584 (Shaw et al).

Se han descrito muteínas específicas de IL-6, que son útiles aquí (documento WO944092A1). Además, el documento EP667872BI describe IL-6 mutante con actividad biológica mejorada sobre IL-6 de tipo salvaje. Además de esto, el documento EP0656117 describe métodos para aislar superagonistas de IL-6. Los mutantes o superagonistas pueden usarse aquí.

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

"Derivados funcionales", como se usan en la presente memoria, cubren derivados de IL-6 y sus muteínas y proteínas fusionadas, que pueden prepararse a partir de los grupos funcionales que se producen como cadenas laterales en los restos o los grupos N o C terminales, por medios conocidos en la técnica, y están incluidos en la invención siempre que permanezcan farmacéuticamente aceptables, es decir, no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de IL-6 y no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen.

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

Una "fracción activa" puede, por ejemplo, ser un fragmento de IL-6. El término fragmento se refiere a cualquier subconjunto de la molécula, es decir, un péptido más corto que retiene la actividad biológica deseada. Los fragmentos pueden prepararse fácilmente eliminando aminoácidos de cualquier extremo de la molécula de IL-6 y probando el fragmento resultante por sus propiedades de unión a gp80 y/o gp 130. Se conocen proteasas para eliminar un aminoácido a la vez del terminal N o del terminal C de un polipéptido y, por lo tanto, la determinación de fragmentos, que retienen la actividad biológica deseada, implica solo experimentación rutinaria.

Como fracciones activas de una IL-6, muteínas y proteínas fusionadas de las mismas, la presente descripción cubre adicionalmente cualquier fragmento o precursores de la cadena polipeptídica de la molécula de proteína sola o junto con moléculas asociadas o restos unidos a la misma, p. ej., restos de azúcar o fosfato, o agregados de la molécula de proteína o los restos de azúcar por sí mismos, con la condición de que dicha fracción tenga una actividad sustancialmente similar a IL-6; por ejemplo, unirse al sitio de unión de IL-6 de gp80 y/o a gp130.

El término "sales" en este documento se refiere tanto a sales de grupos carboxilo como a sales de adición de ácidos de grupos amino de la molécula de IL-6 o análogos de los mismos. 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, férrico o 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 ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cualquiera de tales sales debe retener la actividad biológica de IL-6, por ejemplo, la capacidad de unir el sitio de unión a IL-6 de gp80 y/o gp130.

Las "isoformas" de IL-6 son proteínas capaces de unirse a gp80 y/o gp130 o a un fragmento del mismo, que pueden producirse por corte y empalme alternativo.

La expresión "derivados permutados circularmente", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula lineal en la que los extremos se han unido, directamente o a través de un enlazador, para producir una molécula circular, y luego se abre la molécula circular en otra ubicación para producir una nueva molécula lineal con términos diferentes de los términos en la molécula original. Las permutaciones circulares incluyen aquellas moléculas cuya estructura es equivalente a una molécula que se ha circulado y luego se ha abierto. Por lo tanto, una molécula permutada circularmente se puede sintetizar de novo como una molécula lineal y nunca pasar por una etapa de circularización y apertura. La preparación de derivados circularmente permutados se describe en el documento WO95/27732.

En una realización, la sustancia está glicosilada en uno o más sitios.

La IL-6 se puede producir en cualquier tipo de célula eucariótica o procariota adecuada, como células de levadura, células de insectos, bacterias y similares. En una realización, IL-6 se produce en células de mamífero, tal como en

células CHO genéticamente modificadas como se describe en el documento WO 99/02552.

En una realización adicional, la sustancia de la invención no está glicosilada. Ventajosamente, la molécula se puede producir luego en células bacterianas, que no son capaces de sintetizar restos de glucosilo, pero habitualmente tienen un alto rendimiento de proteína recombinante producida. La producción de IL-6 no glicosilada se ha descrito en detalle en el documento EP504751B1, por ejemplo.

En otra realización más, la sustancia comprende una fusión de inmunoglobulina, es decir, las moléculas de acuerdo con la invención están fusionadas con la totalidad o una porción 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 materia entenderá que la proteína de fusión resultante conserva la actividad biológica de IL-6. La proteína de fusión resultante tiene idealmente propiedades mejoradas, tales como un tiempo de residencia prolongado en fluidos corporales (semivida), actividad específica aumentada, nivel de expresión aumentado o purificación facilitada de la proteína de fusión.

Preferiblemente, la sustancia se fusiona a la región constante de una molécula de Ig. Puede fusionarse a regiones de cadena pesada, como los dominios CH2 y 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 monoméricas o multiméricas, heteroméricas o homomultiméricas.

Los derivados funcionales de la sustancia pueden conjugarse con polímeros para mejorar las propiedades de la proteína, tales como la estabilidad, vida media, biodisponibilidad, tolerancia del cuerpo humano o inmunogenicidad.

Por lo tanto, una realización preferida se refiere a un derivado funcional de la sustancia que comprende al menos un resto unido a uno o más grupos funcionales, que se producen como una o más cadenas laterales en los restos de aminoácidos.

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

En una realización, la sustancia se administra en una dosis que varía de 0,06 a 3 µg/kg de peso corporal. En una realización preferida, la sustancia se administra diariamente. En una realización preferida adicional, la sustancia se administra tres veces por semana. En aún otra realización preferida, la sustancia se administra una vez a la semana.

La definición de "farmacéuticamente aceptable" pretende abarcar cualquier vehículo, que no interfiera con la efectividad de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el huésped al que se administra. Por ejemplo, para la administración parenteral, la sustancia se puede formular en una forma de dosificación unitaria para inyección en vehículos tales como solución salina, solución de dextrosa, albúmina sérica y solución de Ringer.

Una realización proporciona una composición farmacéutica que comprende una combinación de IL-6, o una isoforma, muteína, proteína fusionada, derivado funcional o fragmento de la misma, y uno o más agentes quimioterapéuticos.

La sustancia se puede administrar a un paciente que la necesite de diversas maneras. Las vías de administración incluyen rutas intrahepáticas, intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, epidural, tópica e intranasal. Puede usarse cualquier otra vía de administración terapéuticamente eficaz, por ejemplo, absorción a través de tejidos epiteliales o endoteliales o mediante terapia génica en la que se administra una molécula de ADN que codifica la IL-6 al paciente (por ejemplo, a través de un vector), que causa que la IL-6 sea expresada y secretada in vivo. Además, la sustancia se puede administrar junto con otros componentes de agentes biológicamente activos tales como tensioactivos, excipientes, portadores, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

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

Es un objeto adicional proporcionar un método para tratar y/o prevenir CIPN, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una dosis baja de IL-6, una muteína, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, derivado circularmente permutado o sal del mismo opcionalmente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La dosis administrada, como dosis únicas o múltiples, a un individuo variará dependiendo de una variedad de factores, incluidas las propiedades farmacocinéticas de la sustancia, la vía de administración, condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), extensión de los síntomas, tratamientos

concurrentes, frecuencia del tratamiento y el efecto deseado. El ajuste y la manipulación de los intervalos de dosificación establecidos están dentro de la capacidad de los expertos.

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

- 5 La presente descripción se refiere al uso de una dosis baja de IL-6 o una muteína, proteína fusionada, fracción activa o derivado circularmente permutado en la fabricación de un medicamento para el tratamiento/prevención de CIPN.

La dosis baja de la sustancia se puede administrar antes, durante y/o después de la quimioterapia. La dosis baja de la sustancia puede administrarse profilácticamente antes de que se establezca CIPN o para tratar la CIPN establecida.

- 10 La descripción se refiere también a un kit que comprende: uno o más recipientes que comprenden cada uno un agente quimioterapéutico; un contenedor que comprende IL-6 o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado permutado circularmente o una sal del mismo; e instrucciones para la administración de dicho agente quimioterapéutico y dicha IL-6 para la prevención y/o el tratamiento de la neuropatía periférica inducida por quimioterapia.

- 15 Dicho kit puede contener dos recipientes que comprenden cada uno un agente quimioterapéutico, por ejemplo, un recipiente puede comprender carboplatino y otro taxol.

La cantidad de IL-6, o una muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma, en cada recipiente puede estar en el intervalo de 4 a 210 µg, de 7 a 140 µg o aproximadamente 4, 7, 14, 28, 70 ó 140 µg.

- 20 La descripción contempla que dicho kit comprenda además un recipiente con un fármaco neuroprotector tal como el factor de crecimiento neuronal (NGF) y la glutamina.

La referencia a pasos de métodos conocidos, pasos 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 descripción se describa, enseñe o se sugiera en la técnica pertinente.

- 25 La descripción anterior de las realizaciones específicas revelará de forma completa la naturaleza general de esta descripción.

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

Ejemplos

- 30 Ejemplo 1: Neuropatía inducida por vincristina, animales y administración de fármacos.

La neuropatía inducida por vincristina es una neuropatía de tipo mixto (es decir, neuropatía sensorial y motora). Boyle y colaboradores (Boyle et al., J Pharmacol Exp Ther. 1996 Oct; 279 (1): 410-5) han desarrollado un modelo de rata de neuropatía por vincristina, en el que se ha mostrado que los defectos sensoriales y periféricos motores medidos por pruebas conductuales (movimiento de cola y rendimiento de rotarod, respectivamente) se asemejan más a la condición en seres humanos que cualquiera descrito anteriormente. Este modelo de neuropatía inducida por vincristina se empleó para explorar si la IL-6 puede proteger de la neuropatía inducida por vincristina.

- 35 Los experimentos se llevaron a cabo empleando ratas hembra Dark Agouti de 10 semanas de edad (Janvier, Le Genest-St-Isle, Francia). Las ratas fueron distribuidas al azar en 7 grupos experimentales de la siguiente manera: (a) un grupo de vehículo control que recibe una inyección IP de BSA al 0,02% en solución salina (n = 10); (b) un grupo tratado con vincristina (n = 10) administrado diariamente con inyección subcutánea (SC) de BSA al 0,02% en solución salina (véase a continuación); (c) cuatro grupos diferentes de ratas tratadas con vincristina, administradas diariamente con inyecciones SC de IL-6 recombinante humana (Ejemplo 23) a las dosis de 0,3, 1, 3 ó 10 µg/kg (n = 10 para cada grupo) ; y (d) un grupo tratado con vincristina que recibe una inyección intraperitoneal (IP) diaria de 4-metilcatecol (4-MC). El 4-MC es un compuesto estándar con una acción neuroprotectora establecida, que se usa en la dosis de 10 µg/kg (n = 10).

Los animales se alojaron 2 por jaula y se mantuvieron en una habitación con temperatura controlada (21-22°C) y un ciclo de luz y oscuridad invertido (12h/12h) con alimento y agua disponibles a voluntad.

- 40 Se administró vincristina (Tocris, Illkirch, Francia) mediante una inyección de una solución de vincristina desde el día 0 hasta el 5, desde el día 8 hasta el 12 y desde el día 15 hasta el 16 a una dosis de 0,15 mg/kg. Se preparó una solución de vincristina (0,03 mg/ml) en solución salina.

La IL-6 se diluyó en solución salina que contenía 0,02% de BSA y se administró por vía subcutánea todos los días desde el primer día de administración de vincristina hasta el final del experimento.

4-MC (ver página anterior), se diluyó en solución salina y se inyectó diariamente por vía IP desde el primer día de administración de vincristina hasta el final del estudio.

Se exploró el efecto de la vincristina en el peso corporal. La Figura 1 muestra que los animales tratados con vincristina exhiben un peso corporal significativamente más bajo que el grupo control [$F(6,210) = 7,144$ y $p < 0,001$; medidas repetidas ANOVA]. Por ejemplo, los animales intoxicados con vincristina tratados con vehículo perdieron aproximadamente un 10% de su peso al finalizar la administración de vincristina. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos que fueron sometidos a tratamiento con vincristina, independientemente de la administración de IL-6. Una vez que se interrumpió la vincristina, los animales crecieron rápidamente.

Ejemplo 2: Efecto de la administración conjunta de IL-6 en la prevención/reducción del deterioro de la coordinación motora mediada por vincristina.

Con el fin de evaluar el deterioro de la coordinación motora por vincristina y el efecto de la administración conjunta de IL-6, un grupo de control de vehículo de ratas que reciben una inyección IP de BSA al 0,02% en solución salina ($n = 10$); (b) un grupo tratado con vincristina ($n = 10$) tratado diariamente con inyección SC de BSA al 0,02% en solución salina (Ejemplo 1); (c) cuatro grupos diferentes de ratas tratadas con vincristina (ver a continuación) administradas diariamente con inyecciones SC de IL-6 a las dosis de 0,3, 1, 3 ó 10 $\mu\text{g/kg}$ ($n = 10$ para cada grupo); y (d) un grupo tratado con vincristina administrado diariamente con inyección IP de 4-MC, a la dosis de 10 $\mu\text{g/kg}$ ($n = 10$), se controlaron en una prueba de caminar (Ejemplo 16).

La Figura 2 resume los resultados de la prueba de caminar en grupos control, tratados con vincristina y tratados con IL-6. Los resultados muestran el tiempo requerido para que cada grupo experimental de animales atravesase la barra.

Después de 2 y 3 semanas de administración de vincristina, el rendimiento se redujo significativamente, en comparación con las ratas control no tratadas.

Las ratas coadministradas con IL-6 atravesaron la barra más rápido en comparación con las ratas a las que se administró vincristina sola. El efecto beneficioso de IL-6 se observó con todas las dosis de IL-6 probadas, 0,3, 1, 3 ó 10 $\mu\text{g/kg}$, 2 y tres semanas después de la intoxicación.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en las pruebas de caminar demuestran que la administración conjunta de IL-6, en todas las dosis de IL-6 probadas, 0,3, 1, 3 ó 10 $\mu\text{g/kg}$, previene el deterioro de la coordinación motora inducido por la vincristina.

Ejemplo 3: Efecto de IL-6 en la pérdida de nocicepción inducida por vincristina.

Con el fin de evaluar los defectos sensoriales (es decir, la pérdida de nocicepción) inducida por vincristina en ratas y el efecto de la administración conjunta de IL-6, un grupo de control de vehículo de ratas recibiendo inyección IP de BSA al 0,02% en solución salina ($n = 10$); (b) un grupo tratado con vincristina ($n = 10$) tratado diariamente con inyección SC de BSA al 0,02% en solución salina (Ejemplo 1); (c) cuatro grupos diferentes de ratas tratadas con vincristina (ver a continuación) administradas diariamente con inyecciones SC de IL-6 a las dosis de 0,3, 1, 3 ó 10 $\mu\text{g/kg}$ ($n = 10$ para cada grupo); y (d) un grupo tratado con vincristina administrado diariamente con inyección IP de 4-MC, a la dosis de 10 $\mu\text{g/kg}$ ($n = 10$), se controlaron en una prueba de placa caliente como se describe en el Ejemplo 15.

Los resultados de la prueba de placa caliente se resumen en la Figura 3. En el grupo tratado con vincristina se observó una primera reacción retardada al calor en comparación con el grupo control de ratas no tratadas. La primera reacción diferida fue significativa 3 y 5 semanas después del inicio del tratamiento.

La administración concomitante de IL-6, a todas las dosis probadas, previno significativamente la nocicepción 5 semanas después del inicio del tratamiento, mientras que se pudieron observar algunas tendencias preventivas de IL-6 a lo largo del experimento.

4-MC no parece tener ningún efecto preventivo importante sobre la pérdida de nocicepción inducida por vincristina en ratas.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en la placa de prueba caliente demuestran que la administración conjunta con IL-6, en todas las dosis probadas, 0,3, 1, 3 ó 10 $\mu\text{g/kg}$ protegió de la pérdida de nocicepción inducida por vincristina en ratas. La prueba de placa caliente también demostró que IL-6 confiere una mejor protección que 4-MC de la pérdida de nocicepción inducida por vincristina en ratas (Figura 3).

Ejemplo 4: Pruebas electrofisiológicas (electromiografía o EMG) muestran el efecto protector de IL-6 contra la neuropatía inducida por vincristina.

En paralelo a las pruebas de comportamiento, se llevaron a cabo pruebas electrofisiológicas, como se describe en el Ejemplo 17, para evaluar la función fibra/nervio en ratas administradas con vincristina frente a ratas coadministradas con IL-6.

Una reducción significativa en la amplitud de la onda M (ensayada como se describe en el Ejemplo 17) ya podría detectarse 2 semanas después de la administración de vincristina (Figura 4). Los animales perdieron aproximadamente el 20% de la amplitud en comparación con el control de los animales no tratados. La pérdida de amplitud se mantuvo incluso después del cese de la vincristina.

- 5 La administración concomitante con IL-6, en todas las dosis de IL-6 analizadas, evitó la pérdida de amplitud de onda M inducida por vincristina e IL-6 empleó una dosis de 1-10 µg/kg que conservaba completamente la amplitud de la onda H.

Se observó que la administración concomitante con 4-MC protegía la pérdida de la amplitud de la onda M solo transitoriamente, mientras que la protección con 3-10 µg/kg de IL-6 era estable durante todo el experimento.

- 10 Como se muestra en la Figura 5, el primer cambio en la latencia del potencial de acción muscular compuesto (CMAP) se detectó solo después del cese del tratamiento con vincristina.

Se demostró que la latencia de CMAP inducida por vincristina se reducía mediante la administración conjunta de IL-6 ($p < 0,05$, prueba de Dunnett) en todas las concentraciones ensayadas 0,3-10 µg/kg. Las ratas coadministradas con 10 µg/kg de IL-6 conservaron por completo su tiempo de latencia CMAP a lo largo del experimento.

- 15 Se detectó un cambio inicial en la velocidad de conducción nerviosa sensible (SNCV) después del cese de la vincristina (o de 2 semanas después del inicio de la administración de vincristina, Figura 6). En ese momento, se observó una ligera reducción en la SNCV en comparación con la de las ratas de control no tratadas. El efecto de vincristina se volvió significativo 5 semanas después del inicio del tratamiento con vincristina, exhibiendo una pérdida de aproximadamente 10 m/s.

- 20 Se observó una restauración completa de SNCV en grupos de animales tratados con vincristina coadministrados con 1-10 µg/kg de IL-6.

Por lo tanto, los resultados de las pruebas electrofisiológicas demuestran que la coadministración de IL-6, a todas las dosis de IL-6 probadas, 0,3, 1, 3 y 10 µg/kg, protegía contra la pérdida de la fibra/función nerviosa inducida por vincristina. Las pruebas electrofisiológicas también demostraron que IL-6 confiere una mejor protección que 4-MC contra la pérdida de la función fibra/nerviosa inducida por vincristina (Figura 4).

- 25

Ejemplo 5: El análisis morfométrico muestra el efecto protector de IL-6 contra la neuropatía inducida por vincristina.

Se llevaron a cabo análisis histomorfométricos como se describe en el Ejemplo 18 al completar los experimentos, para explorar los cambios morfológicos que ocurren en la fibra y el diámetro del axón y el espesor de mielina en ratas tratadas con vincristina y en ratas coadministradas con IL-6.

- 30 Como se muestra en la Figura 7, los nervios ciáticos recogidos de ratas tratadas con vincristina exhibieron una disminución significativa en el diámetro de la fibra en comparación con las muestras no tratadas de control. La administración concomitante con IL-6 a dosis de 1-10 µg/kg evitó la contracción de la fibra inducida por vincristina. La contracción de la fibra inducida por vincristina también se protegió con el tratamiento de 4-MC.

- 35 El diámetro de los axones disminuye significativamente en las ratas tratadas con vincristina (Figura 8). La administración concomitante de IL-6 a dosis de 0,3-10 µg/kg redujo/evitó significativamente la disminución en el diámetro del axón por la vincristina.

Los tratamientos con 4-MC redujeron/evitaron significativamente la disminución del diámetro del axón por la vincristina.

- 40 El espesor de la mielina se redujo significativamente en los axones de las ratas tratadas con vincristina en comparación con las ratas control no tratadas (Figura 9).

La administración concomitante de IL-6 a dosis de 1-10 µg/kg reduce/previene la pérdida de mielina inducida por vincristina.

- 45 El porcentaje de fibras degeneradas también se controló en muestras recogidas de ratas administradas por control, vincristina y vincristina-IL-6 (Figura 10). El porcentaje de fibras degeneradas recogidas de muestras de ratas tratadas con vincristina fue dos veces mayor que en muestras de ratas de control. Además, el porcentaje de fibras mielinizadas en el grupo tratado con vincristina fue menor que en el grupo control no tratado.

Se descubrió que la administración concomitante con IL-6 (0,3-10 µg/kg) o 4-MC disminuía el porcentaje de fibras degeneradas en ratas tratadas con vincristina.

- 50 Por lo tanto, el análisis morfométrico anterior demuestra que la administración concomitante con IL-6, en todas las dosis probadas, 0,3, 1, 3 y 10 µg/kg, prevenía/reducía eficazmente la degeneración nerviosa inducida por vincristina y evitaba particularmente la reducción de la fibra y el diámetro del axón, reducción del espesor de la mielina y degeneración de las fibras.

Un área de piel de 5-10 mm de diámetro se biopsió por punción en la pata trasera. Las muestras de piel se fijaron inmediatamente durante la noche en paraformaldehído a 4°C, se incubaron (durante la noche) en 30% de sacarosa en 0,1 M de PBS para crioprotección, se incrustaron en OCT y se congelaron a -80°C hasta la crioprotección. Las criosecciones de 50 µm de espesor se cortaron verticalmente con respecto a la superficie de la piel con un criostato. Se incubaron secciones de flotación libre durante 7 días en un baño de producto de gen anti-proteína de conejo 9.5 (1:10000; Ultraclean, Isle of Man, Reino Unido) a 4°C. Las secciones se procesaron entonces para revelar la inmunorreactividad según el método de la peroxidasa ABC. Brevemente, se incubaron durante 1 hora con anticuerpo anti-cabra biotinilado (1:200), luego 30 minutos en el complejo biotinilado con avidina a temperatura ambiente. La actividad de peroxidasa se visualizó usando el sistema DAB. Las secciones se contratiñeron con eosina o hematoxilina. Las secciones se deshidrataron, se limpiaron con bioclear y se montaron en eukitt. El número de nervios dérmicos de 3 campos microscópicos se contabilizó manualmente bajo una vista de aumento de 40. La intoxicación por vincristina indujo una disminución de más del 50% en la densidad de las fibras nerviosas epidérmicas. La biopsia de piel es una de las diversas técnicas para controlar la neuropatía en seres humanos. Los resultados del presente experimento indican que la intoxicación por vincristina se asoció con una gran disminución en la densidad de las fibras dérmicas, que se asemeja a la que se produce en el entorno clínico. El tratamiento con 10 µg/kg de IL-6 impidió completamente este fenómeno de pérdida de fibra dérmica (no se muestra).

Ejemplo 6: Neuropatía inducida por cisplatino, animales y administración de fármacos.

Un modelo animal confiable para la neuropatía inducida por cisplatino, desarrollado por Holmes y colaboradores (Holmes et al., Toxicol Sci. 1998 Dic; 46 (2): 342-51) se empleó para explorar el efecto de la administración conjunta de IL-6 en la neuropatía inducida por cisplatino. Se ha descrito que la neuropatía inducida por cisplatino en ratas refleja las situaciones clínicas. De hecho, el correlato conductual y electrofisiológico de la degeneración axonal (como se ve en seres humanos) se ha mostrado anteriormente en el modelo de rata de neuropatía por cisplatino (Holmes et al., 1998).

Se distribuyeron aleatoriamente ratas hembra Dark Agouti de 10 semanas de edad (Janvier, Le Genest-St-Isle, Francia) en 7 grupos experimentales de la siguiente manera: (a) un grupo de vehículo control (n = 10), inyectado con una solución estéril de solución salina BSA 0,02% (peso/volumen); (b) un grupo intoxicado con cisplatino (n = 10) inyectado con una solución salina-BSA estéril al 0,02%; (c) 4 grupos intoxicados con cisplatino tratado (n = 10) que consisten en animales que reciben inyecciones SC diarias del compuesto de IL-6 en 4 dosis diferentes: 0,3, 1, 3, 10 µg/kg; y (d) un grupo intoxicado con cisplatino tratado con 4-metilcatecol (4-MC) (n = 10) que recibe una inyección IP diaria de 4-MC a 10 µg/kg.

Las ratas se alojaron en grupo (2 animales por jaula) y se mantuvieron en una habitación con temperatura controlada (21-22°C) y un ciclo de luz y oscuridad invertido (12h/12h) con comida y agua disponibles a voluntad. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices institucionales.

La neuropatía se indujo por inyección intraperitoneal de cisplatino (Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, Francia) dos veces a la semana a una dosis de 2 mg/kg durante 4 semanas.

El fármaco se diluyó en solución acuosa estéril al 0,9% de cloruro de sodio.

IL-6 se diluyó en una solución estéril de solución salina-BSA al 0,02% y se administró por vía subcutánea todos los días desde el primer día de administración de cisplatino hasta el final del experimento.

4-MC se diluyó en solución acuosa estéril al 0,9% de cloruro de sodio y se inyectó diariamente por vía IP desde el primer día de la administración de cisplatino.

Se exploró el efecto del cisplatino sobre el peso corporal. La Figura 11 muestra que los animales tratados con cisplatino demostraron un peso corporal significativamente menor que el grupo control [$p < 0,001$]. También se observó que la administración de cisplatino indujo una marcada inhibición del crecimiento animal, independientemente de los tratamientos de IL-6 realizados. Por ejemplo, los animales intoxicados con cisplatino tratados con vehículo perdieron aproximadamente el 10% de su peso al finalizar la administración de cisplatino. Una vez que se retiró el cisplatino, los animales crecieron rápidamente.

Ejemplo 7: Efecto de IL-6 en la pérdida de nocicepción inducida por cisplatino.

Para explorar los defectos sensoriales inducidos por los tratamientos de cisplatino (es decir, la pérdida de nocicepción) y el efecto de la administración conjunta de IL-6, un grupo de control de vehículo que recibe una inyección IP de BSA al 0,02% en solución salina (n = 10); (b) un grupo tratado con cisplatino (n = 10) administrado diariamente con inyección SC de BSA al 0,02% en solución salina (Ejemplo 1); (c) cuatro grupos diferentes de ratas tratadas con cisplatino (ver a continuación) administradas diariamente con inyecciones SC de IL-6 a las dosis de 0,3, 1, 3 ó 10 µg/kg (n = 10 para cada grupo); y (d) un grupo tratado con cisplatino que recibía una inyección IP diaria de 4-MC a la dosis de 10 µg/kg (n = 10), se controlaron usando una prueba de placa caliente como se describe en el Ejemplo 15.

Tres semanas después de la administración de cisplatino, las ratas exhibieron una primera reacción retardada

significativa respecto al calor en comparación con las ratas control no tratadas (Figura 12). La primera reacción retardada al calor en el grupo tratado con cisplatino versus el grupo control fue significativa y continuó incluso después del cese del tratamiento con cisplatino (ó 5 y 6 semanas después del inicio del tratamiento con cisplatino).

- 5 La administración conjunta con IL-6 en todas las dosis probadas, 0,3, 1, 3 ó 10 µg/kg, evitó/redujo el retraso global de la primera reacción con respecto al calor por cisplatino ($p \leq 0,05$).

El retraso de la primera reacción con respecto al calor por el cisplatino se previno completamente mediante la administración conjunta con 10 µg/kg de IL-6.

- 10 El tratamiento con 4-MC produjo una disminución ligera pero no significativa del primer tiempo de reacción en ratas tratadas con cisplatino durante 3 semanas, en comparación con las ratas tratadas con cisplatino solo. La diferencia fue significativa solo 4 y 6 semanas después del inicio del tratamiento con cisplatino.

Los resultados obtenidos en las pruebas de placa caliente demuestran que la administración concomitante de IL-6, con cisplatino evitó los defectos sensoriales mediados por cisplatino en todas las dosis probadas, 0,3, 1, 3 y 10 µg/kg.

Ejemplo 8: Las pruebas electrofisiológicas (Electromiografía o EMG) muestran el efecto protector de IL-6 contra la neuropatía inducida por cisplatino.

- 15 La monitorización electrofisiológica en el modelo de neuropatía inducida por cisplatino se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 17. El objetivo fue evaluar el efecto de la administración conjunta con IL-6 en la pérdida de fibra/función nerviosa inducida por cisplatino.

- 20 El primer cambio en la amplitud de la onda H se observó 3 semanas después de la administración de cisplatino (Figura 13). Se observó una ligera reducción en la amplitud en el grupo tratado con cisplatino en comparación con el grupo control no tratado. De 4 a 6 semanas después del inicio del tratamiento con cisplatino, la amplitud de la onda H se redujo drásticamente en aproximadamente 80%.

Mientras que la administración conjunta de cada uno, 0,3, 1, 3 y 10 µg/kg, se encontró que IL-6 reducía/prevenía la pérdida de la amplitud de la onda H, la administración conjunta con 10 µg/kg de IL-6 previno completamente la pérdida de la amplitud de la onda H durante todo el experimento.

- 25 Por el contrario, la administración simultánea de 4-MC tuvo solo un efecto retardado y transitorio en la prevención de la pérdida de onda H inducida por cisplatino (Figura 13).

La primera alteración en la velocidad de conducción nerviosa sensible (SNCV) se observó 4 semanas después de la administración de cisplatino. En ese momento, la velocidad de la señal fue significativamente más lenta que en el control no tratado correspondiente (Figura 14).

- 30 Se descubrió que la administración concomitante con IL-6 mejoraba la SNCV, especialmente a 3 y 10 µg/kg de IL-6 (Figura 14) después de 5 semanas.

La administración concomitante con 4-MC previno transitoriamente la disminución de SNCV de intoxicación por cisplatino, solo después de 5 semanas de tratamiento (Figura 14).

- 35 Los resultados de las pruebas electrofisiológicas anteriores demuestran que la administración conjunta con IL-6 evita eficazmente la pérdida de fibra/función nerviosa inducida por cisplatino. Los resultados de las pruebas electrofisiológicas también muestran que la IL-6 es más efectiva para prevenir la pérdida de fibra/función nerviosa inducida por cisplatino que la 4-MC (Figuras 13 y 14).

Ejemplo 9: Efecto protector de IL-6 contra la neuropatía inducida por cisplatino, un análisis morfométrico.

- 40 Los análisis histomorfométricos se llevaron a cabo al finalizar el experimento para explorar los cambios morfológicos que ocurren en el diámetro de fibra/axón y el espesor de mielina después de la administración de cisplatino y el efecto de la administración conjunta de IL-6.

La Figura 15 muestra las mediciones del diámetro de la fibra en muestras recogidas a partir de ratas control, con cisplatino y coadministradas con cisplatino IL-6.

- 45 Las mediciones del diámetro resultante demuestran que el cisplatino reduce significativamente el diámetro de las fibras. Los resultados del espécimen de ratas co-administradas con IL-6, en todas las dosis de IL-6 probadas, demuestran que la IL-6 previene/reduce la disminución del diámetro por el cisplatino. Se detectó una diferencia estadísticamente significativa en el intervalo de 1-10 µg/kg de IL-6. De forma similar, la administración simultánea de IL-6 previene/reduce la disminución del diámetro del axón inducido por cisplatino (Figura 16). Se detectó una diferencia estadísticamente significativa en el intervalo de 1-10 µg/kg de IL-6.

- 50 Además, las mediciones del porcentaje de fibras mielinizadas se llevaron a cabo en fibras recogidas a partir de ratas tratadas control no tratadas, ratas tratadas con cisplatino y co-administradas con cisplatino e IL-6 (Figura 17). Se

observó una reducción significativa en el porcentaje de fibras mielinizadas en ratas tratadas con cisplatino en comparación con las ratas control no tratadas.

Se encontró que IL-6 (1, 3, 10 µg/kg) protegía significativamente las fibras contra la pérdida de la pared de mielina.

5 El tratamiento con 4-MC protegió contra la disminución en el diámetro de fibra inducida por cisplatino o axón e indujo una protección significativa contra la pérdida de la pared de mielina.

Además, se controló el porcentaje de fibras degeneradas en muestras recogidas de ratas control, tratadas con cisplatino y ratas coadministradas con IL-6 y cisplatino (Figura 18). Se encontró que el porcentaje de fibras degeneradas en muestras recolectadas de ratas tratadas con cisplatino es dos veces mayor que en muestras recolectadas de ratas control no tratadas. Además de eso, el porcentaje de fibras mielinizadas se redujo en el grupo tratado con cisplatino en comparación con el del grupo control no tratado (Figura 17).

Se descubrió que la administración conjunta con 1, 3, 10 µg/kg de IL-6 reduce el porcentaje de fibras degeneradas por cisplatino (Figura 18). La Figura 17 muestra que, además de reducir el porcentaje de fibras degeneradas, la administración conjunta con IL-6 aumentó las fibras mielinizadas en ratas tratadas con cisplatino (Figura 17).

15 Por lo tanto, el análisis morfométrico anterior demostró que la coadministración de 1, 3 ó 10 µg/kg de IL-6 impedía/reducía de forma eficaz la degeneración nerviosa y evitaba particularmente la reducción del diámetro axonal, la reducción del espesor de mielina o la pérdida de pared de mielina y la degeneración de fibras por cisplatino.

Ejemplo 10: Efecto terapéutico de IL-6 en modelos de animales de neuropatía inducida por cisplatino y administración de fármacos.

20 En los experimentos anteriores se demostró que la coadministración de IL-6 (0,3, 1, 3, 10 µg/kg) con quimioterapia prevenía/reducía los defectos neuropáticos causados por la quimioterapia en ratas, como lo demuestran las evaluaciones conductuales, electrofisiológicas e histológicas. En tales experimentos, la terapia con IL-6 se inició antes o durante el desarrollo de la neuropatía. Por lo tanto, en los experimentos previos se abordó el efecto profiláctico de la IL-6 sobre el desarrollo de la neuropatía relacionada con la quimioterapia. El siguiente experimento se llevó a cabo para evaluar el efecto de IL-6 después de que la neuropatía ya estuviera establecida en el modelo animal. El potencial efecto terapéutico de IL-6 se investigó mediante evaluaciones conductuales, electrofisiológicas e histológicas.

30 Se distribuyeron aleatoriamente ratas Dark Agouti hembra de 10 semanas de edad (Janvier, Le Genest-St-Isle, Francia) en 5 grupos experimentales de la siguiente manera: (a) un grupo de control de vehículo (n = 10), inyectado con una solución estéril de solución salina BSA al 0,02% (peso/volumen); (b) un grupo intoxicado con cisplatino (n = 10) inyectado con una solución estéril de solución salina-BSA al 0,02%; (c) 2 grupos intoxicados con cisplatino tratados (n = 10) que consisten en animales que recibieron inyecciones diarias de SC de compuesto de IL-6 en 2 dosis diferentes: 3 y 10 µg/kg; y (d) un grupo intoxicado con cisplatino tratado con 4-metilcatecol (4-MC) (n = 10) que recibió una inyección IP diaria de 4-MC a 10 µg/kg.

35 Las ratas se alojaron en grupos (2 animales por jaula) y se mantuvieron en una habitación con temperatura controlada (21-22°C) y un ciclo de luz y oscuridad invertido (12h/12h) con comida y agua disponibles a voluntad.

La neuropatía se indujo por inyección intraperitoneal de cisplatino (Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, Francia) dos veces a la semana a una dosis de 2 mg/kg durante 4 semanas. El fármaco se diluyó en solución acuosa estéril al 0,9% de cloruro de sodio.

40 La IL-6 se diluyó en una solución estéril de solución salina-BSA al 0,02% y se administró por vía subcutánea todos los días desde el día 23 (la última semana de administración de cisplatino) hasta el final del experimento.

Se diluyó 4-MC en solución acuosa estéril al 0,9% de cloruro de sodio y se inyectó diariamente por vía IP desde el día 23 hasta el final del experimento.

El peso corporal y la tasa de supervivencia se registraron todos los días.

45 La placa caliente y la prueba de EMG se realizaron los días 6, 23, 30, 37 y 44.

El primer día de administración de cisplatino se consideró como el día 1.

Ejemplo 11: Efecto terapéutico de IL-6 en la pérdida de nocicepción establecida por cisplatino.

50 Con el fin de verificar si IL-6 puede curar y/o mejorar los defectos sensoriales (o pérdida de nocicepción) inducida por cisplatino, las ratas se trataron con (a) un grupo de control de vehículo (n = 10), inyectado con una solución estéril de solución salina-BSA al 0,02% (peso/volumen); (b) un grupo intoxicado con cisplatino (n = 10) inyectado con una solución estéril de solución salina-BSA al 0,02%; (c) 2 grupos intoxicados con cisplatino tratado (n = 10) que consistían en animales que recibieron inyecciones SC diarias del compuesto de IL-6 (Ejemplo 10) a 2 dosis

diferentes: 3 y 10 $\mu\text{g/kg}$; y (d) un grupo tratado con 4-metilcatecol (4-MC), intoxicado con cisplatino ($n = 10$) que recibió una inyección IP diaria de 4-MC a 10 $\mu\text{g/kg}$, y se ensayó usando una prueba de placa caliente como se describe en el Ejemplo 15.

- 5 Los resultados muestran que desde el día 2 (línea base) hasta el día 23, la puntuación de la placa caliente en los animales de control exhibió una marcada disminución, un fenómeno asociado con la habituación a la prueba. Desde el día 23 en adelante, la puntuación de los animales control fue estable.

Durante la administración de cisplatino y durante las 3 semanas posteriores al tratamiento con cisplatino, el grupo tratado con cisplatino mostró una primera reacción retardada significativa al calor en comparación con las ratas control no tratadas (Figura 19).

- 10 Dos semanas después del inicio del tratamiento con IL-6, se observó una reducción global en el tiempo de la primera reacción en ratas tratadas con IL-6 ($p < 0,05$, prueba de Manova-Dunnett). Se observaron resultados significativos con IL-6 2 semanas después del tratamiento con IL-6 con la dosis de 10 $\mu\text{g/kg}$ ($p < 0,05$, prueba de Anova-Dunnett).

También se observó una reducción del tiempo de la primera reacción al calor en ratas tratadas con 4-MC, después de 2 semanas desde el inicio del tratamiento con 4-MC ($p \leq 0,05$, prueba de Anova-Dunnett).

- 15 Los resultados obtenidos usando la prueba de placa caliente muestran que la IL-6 curó y/o mejoró eficazmente los defectos sensoriales inducidos por cisplatino.

Ejemplo 12: Efecto terapéutico de IL-6 en la neuropatía inducida por cisplatino: mediciones electrofisiológicas.

- 20 Los ensayos electrofisiológicos descritos en el Ejemplo 17 se llevaron a cabo en paralelo a las pruebas de comportamiento (descritas en el ejemplo anterior) en el modelo de neuropatía establecido en cisplatino. El objetivo fue evaluar el efecto terapéutico de IL-6 en la pérdida de fibra/función nerviosa inducida por cisplatino.

En este conjunto de experimentos, el primer cambio en la amplitud de la onda H se detectó 23 días después del inicio del tratamiento con cisplatino (Figura 20). Se observó una pérdida dramática en la amplitud de la señal (aproximadamente 70%) en el grupo tratado con cisplatino. No se observó una recuperación espontánea de la amplitud de la onda H.

- 25 El tratamiento con IL-6 que emplea 3 y 10 $\mu\text{g/kg}$ revirtió la pérdida de la amplitud de la onda H ($p \leq 0,05$, prueba de Manova-Dunnett). Tan pronto como 1 semana después del inicio del tratamiento con IL-6, se recuperó aproximadamente el 50% de la pérdida de amplitud y a las 2 semanas de tratamiento con IL-6 se produjo la recuperación completa (Figura 20).

El tratamiento con 4-MC también revirtió la pérdida de la onda H inducida por cisplatino en amplitud.

- 30 La primera alteración de la velocidad de conducción nerviosa sensible (SNCV) inducida por la administración de cisplatino podría observarse 23 días después del inicio del tratamiento con cisplatino (Figura 21). Se encontró que la SNCV en ratas tratadas con cisplatino era significativamente más lenta que la SNCV en el grupo de control no tratado correspondiente ($p \leq 0,01$, prueba de Manova-Dunnett) (Figura 21).

- 35 Los resultados muestran que la IL-6 a una dosis de 3 $\mu\text{g/kg}$, significativamente ($p \leq 0,01$, prueba de Manova-Dunnett) mejoró la SNCV en animales tratados con cisplatino, después de solo 1 semana de tratamiento.

Por el contrario, el tratamiento con 4-MC pareció mejorar SNCV de ratas tratadas con cisplatino, pero una diferencia estadísticamente significativa solo se detectó 2 semanas después del inicio del tratamiento. ($p \leq 0,05$, prueba de Anova-Dunnett).

- 40 Por lo tanto, los resultados de las pruebas electrofisiológicas demuestran que se observó una mejora significativa en el SNCV en animales tratados con cisplatino después de solo 1 semana de tratamiento con IL-6 y se observó el efecto temprano usando la dosis más baja de IL-6 probada, es decir, 3 $\mu\text{g/kg}$ y se invirtió la pérdida de onda H. Las pruebas electrofisiológicas también demuestran que IL-6 es más eficiente que 4-MC en el curado y/o en la mejora de la pérdida de fibra/función nerviosa inducida por cisplatino (Figura 21).

Ejemplo 13: Efecto terapéutico de la IL-6 en la neuropatía inducida por cisplatino, un análisis morfométrico.

- 45 Se llevaron a cabo análisis histomorfométricos al finalizar el experimento para explorar los cambios morfológicos que ocurrían en el diámetro de la fibra y del axón y el espesor de mielina en el modelo de CIPN inducida por cisplatino y los cambios que ocurrían después de la administración de IL-6 en dicho modelo.

Los resultados muestran que, antes del inicio de la terapia (hasta el día 23), el tamaño total de la mielina en las ratas tratadas con cisplatino se redujo ligeramente en comparación con las ratas control no tratadas, pero la diferencia no fue significativa ($p \geq 0,05$, prueba t de Student) (Figura 22).

- 50 Se observó que las muestras recogidas de ratas tratadas con cisplatino contenían una proporción significativamente

mayor de fibras degeneradas que las ratas control no tratadas (Figura 23A, $p \leq 0,05$, prueba t de Student). Además, la proporción de fibras mielínicas no degeneradas fue menor en el grupo tratado con cisplatino que en el grupo control no tratado (Figura 23B).

5 Se observó una reducción leve, pero no significativa, en el área de mielina 44 días después del inicio del tratamiento con cisplatino ($p \geq 0,05$, Anova de una vía) (Figura 24).

La administración de IL-6 a 10 $\mu\text{g/kg}$ pareció revertir el adelgazamiento de la vaina de mielina inducido por cisplatino.

Por el contrario, el tratamiento con 4-MC no interfirió con el adelgazamiento de la vaina de mielina inducido por cisplatino.

10 Se controlaron fibras pequeñas (diámetro $< 8 \mu\text{m}$) y grandes (diámetro $\geq 8,5 \mu\text{m}$) y se calculó la relación fibra grande/pequeña. Los resultados en la Figura 25 muestran que la proporción de fibra grande/pequeña se redujo marcadamente en muestras recogidas de ratas tratadas con cisplatino. Se observó un ligero aumento en la relación de fibras grandes/pequeñas después del tratamiento con IL-6.

15 Como se ilustra en la Figura 26A, 3 semanas después del cese de la administración de cisplatino, la proporción de fibras degeneradas todavía era significativamente mayor en las muestras tratadas con cisplatino en comparación con las muestras no tratadas ($p \leq 0,05$, prueba de Dunnett). Además, la proporción de fibras mielínicas no degeneradas fue menor en el grupo tratado con cisplatino que en el grupo control (Figura 26B). El tratamiento de las ratas con IL-6 redujo significativamente el porcentaje de fibras degeneradas. Se obtuvo un efecto significativo con 10 $\mu\text{g/kg}$ de IL-6.

20 Por el contrario, una reducción ligera, pero no significativa, en la proporción de fibras degeneradas fue inducida por el tratamiento con 4-MC ($p > 0,05$, prueba de Dunnett).

Los resultados del análisis morfogénico anterior demuestran que la IL-6 a 10 $\mu\text{g/kg}$ revierte el adelgazamiento de la capa de mielina y la degeneración de las fibras. El análisis morfogénico muestra que IL-6 es más eficiente que 4-MC para restaurar la mielina y la degeneración de la fibra mediada por el cisplatino (Figuras 24 y 26).

25 En conjunto, las pruebas de comportamiento en el Ejemplo 11, las pruebas electrofisiológicas en el Ejemplo 12 y el presente análisis morfogénico demuestran inequívocamente el valor terapéutico de bajas dosis de IL-6 en la neuropatía inducida por cisplatino. Las pruebas también muestran que dosis bajas de IL-6 tienen un mejor efecto terapéutico que el 4-MC contra la neuropatía inducida por cisplatino.

Ejemplo 14: Efecto de la administración conjunta de IL-6 en la neuropatía inducida por taxol.

Los ejemplos previos muestran el efecto de IL-6 en neuropatías inducidas por cisplatino o vincristina.

30 El objetivo del siguiente experimento fue investigar el posible efecto neuroprotector de IL6 en un modelo adicional de neuropatía inducida por quimioterapia mediada por Taxol. Se probó el posible efecto preventivo de la administración conjunta de IL-6. La administración de IL-6 se inició junto con la administración de taxol. Las dosis de IL-6 de 3 y 10 $\mu\text{g/kg}$ se administraron diariamente o en el caso de 10 $\mu\text{g/kg}$ también solo 3 veces por semana.

35 Se utilizaron hembras de ratas Dark Agouti de 10 semanas de edad, se incluyeron 12 animales por grupo de la siguiente manera

1. Vehículo diario sc

2. Vehículo con Taxol diariamente sc, del día 1 al día 49

3. Taxol IL-6 3 $\mu\text{g/kg}$ al día, sc día 1 al día 49

4. Taxol IL-6 10 $\mu\text{g/kg}$ al día, sc día 1 al día 49

40 5. Taxol IL-6 10 $\mu\text{g/kg}$, sc 3x/semana (TIW) día 1 al día 49

6. 4-MC 10 $\mu\text{g/kg}$ diario, (intraperitoneal) i.p. día 1 al día 49

El taxol se diluyó en una solución de cremofor/etanol/dextrosa al 5% y se administró dos veces a la semana durante 4 semanas.

45 Se inició el tratamiento con 4-MC y compuestos de prueba el primer día de la intoxicación y se detuvo al final del estudio.

El estudio se realizó en 8 semanas (1 semana para la línea de base, 4 semanas para la intoxicación con taxol y 3 semanas de recuperación).

Se sometieron el grupo de ratas control, administradas con taxol, y coadministradas con taxol-IL-6 a las dosis

indicadas a monitorización electrofisiológica para evaluar el efecto de IL-6 en la pérdida de fibra/función nerviosa inducida por taxol.

La latencia de la onda H se controló en todos los grupos de ratas. Se observó un aumento significativo en la latencia de la onda H 3 semanas después del tratamiento con taxol. El tiempo de latencia aumentó drásticamente 6 semanas después del tratamiento con taxol.

Se descubrió que la coadministración de IL-6, ya sea 3 ó 10 µg/kg al día o 3 veces por semana previene/reduce la latencia de la onda H a lo largo del experimento (Figura 27).

El tratamiento con 4-CM mostró una mejora en la latencia de la onda H en las semanas 3, 5, 6 y 7.

Las amplitudes de onda H se controlaron en muestras del grupo de ratas tratadas con taxol y ratas con taxol administradas con IL-6 o 4-MC. Se encontró que la IL-6 en todas las dosis ensayadas evitaba significativamente la reducción en la inducción de la amplitud de la onda H por taxol a lo largo del experimento. Por el contrario, la prevención de la reducción de la amplitud de la onda H por 4-MC no fue significativa a lo largo del experimento (Figura 28).

La primera alteración en la velocidad de conducción nerviosa sensible (SNCV) inducida por la administración de taxol se observó 3 semanas después de la administración de cisplatino. En ese momento, la velocidad de la señal fue significativamente más lenta que la de la velocidad correspondiente en el control no tratado (Figura 29).

Se descubrió que la coadministración de IL-6, ya sea 3 ó 10 µg/kg al día o 3 veces por semana con taxol previene las alteraciones en la SNCV por el taxol.

Los resultados demuestran que la administración concomitante de IL-6, en todas las dosis, ya sea diariamente o 3 veces por semana, evita eficazmente la pérdida de fibra/función nerviosa inducida por taxol. Los resultados también demuestran que los efectos preventivos beneficiosos de dosis bajas de coadministración de IL-6 son más significativos que los de la administración conjunta de 4-MC (Figura 28).

Ejemplo 15: Prueba de la función sensorial:placa caliente.

La rata se colocó dentro de un cilindro de vidrio de 17 cm de altura y 21 cm de diámetro en una placa de calentamiento mantenida a 52°C (Medite OTS 40, Microm, Francheville, Rhone, Francia). Se observó el comportamiento animal, particularmente el lamido de un pie y el salto ajustado. La latencia antes de lamer un pie o antes de saltar para escapar del calor (salto ajustado) se registró. El tiempo necesario para sentir el dolor térmico está relacionado con la sensibilidad térmica y tiende a aumentar cuando se altera la sensibilidad térmica.

Ejemplo 16: Prueba de coordinación motora.

La coordinación motora se evaluó mediante una prueba de marcha, que consiste en medir el tiempo que tarda una rata colocada en un extremo de una varilla de madera horizontal de 100 cm de longitud y 5,5 cm de diámetro, 40 cm por encima de la mesa, para cubrir una distancia de 1 m en esta varilla. Se realizaron tres pruebas (duración máxima: 60 s cada una), y el valor medio se calculó y se conservó como valor característico. Si el animal se caía, se anotaba con un máximo de 60 s.

Ejemplo 17: Electromiografía (EMG).

Se realizaron registros electrofisiológicos usando un electromiógrafo Neuromatic 2000M (EMG) (Dantec, Les Ulis, Francia). Las ratas se anestesiaron mediante inyección IP de 60 mg/kg de clorhidrato de ketamina (Imalgene 500®, Rhône Merieux, Lyon, Francia). La temperatura corporal normal se mantuvo alrededor de 30°C con una lámpara de calentamiento y se verificó usando un termómetro de contacto (Quick, Bioblock Scientific, Illkirch, Francia) colocado en la superficie de la cola.

El potencial de acción del músculo compuesto (CMAP) de la señal de onda M (o el potencial del músculo evocado eléctricamente) se registró en el músculo gastrocnemio después de la estimulación del nervio ciático. La onda M refleja la corriente desarrollada durante el potencial de tracción de las fibras musculares. Se colocaron un electrodo de referencia y una aguja activa en la pata trasera. Una aguja de tierra se insertó en la parte inferior de la espalda de la rata. El nervio ciático fue estimulado con un solo pulso de 0,2 ms a intensidad supramáxima. La velocidad de la onda motora se registró y expresó en ms.

También se registró la velocidad de conducción nerviosa sensible (SNCV). Los electrodos de la piel de la cola se colocaron de la siguiente manera: una aguja de referencia insertada en la base de la cola y una aguja de ánodo colocada a 30 mm de la aguja de referencia hacia la extremidad de la cola. Se insertó un electrodo de aguja de conexión a tierra entre las agujas del ánodo y de referencia. El nervio caudal se estimuló con una serie de 20 pulsos (durante 0,2 ms) a una intensidad de 12,8 mA. La velocidad se expresó en m/s.

El reflejo de la onda H se registró en el músculo posterior de la almohadilla plantar después de la estimulación del nervio ciático. Se colocaron un electrodo de referencia y una aguja de tierra en la parte inferior de la espalda de la

rata. El nervio ciático se estimuló con un solo pulso de 0,2 ms a intensidad supramáxima. La amplitud (mV) de la onda H y la proporción de animales que carecen de respuesta a la onda H fueron los parámetros estudiados.

Ejemplo 18: Análisis morfométrico.

Con vincristina, el análisis morfométrico se realizó 2 semanas después del final de la administración de vincristina en 3 animales por grupo. Los animales se anestesiaron mediante inyección IP de 100 mg/kg de Imalgène 500®. Se extirpó un segmento de 5 mm del nervio ciático, se fijó durante la noche con glutaraldehído al 4% (Sigma, L'Isle d'Abeau-Chesnes, Francia) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH = 7,4) y se mantuvo en sacarosa al 30% y almacenado a 4°C hasta su posterior procesamiento. En el momento del uso, la muestra nerviosa se fijó posteriormente en tetróxido de osmio al 1% (Sigma, L'Isle d'Abeau-Chesnes, Francia) en PBS durante 2 h, se deshidrató en solución de alcohol en serie y se incrustó en Epon. Los tejidos incrustados se colocaron luego a 70°C durante 3 días para permitir la polimerización de la cera de tejido. Se realizaron secciones transversales de 1,5 µm de espesor y se tiñeron con una solución de azul de toluidina al 1% (Sigma, L'Isle d'Abeau-Chesnes, Francia) durante 2 min, se deshidrataron y se montaron en Eukitt. Se examinaron doce secciones por muestra utilizando un microscopio óptico (Nikon, Tokio, Japón) y se analizaron usando un software de análisis de imagen digital semiautomatizado (Biocom, Francia). El diámetro de la fibra (a), el diámetro del axón (b) y el espesor de la mielina (c) se midieron como se ilustra a continuación.

Para el tratamiento con cisplatino en el Ejemplo 8 se realizó un análisis morfométrico al final del experimento (semana 6) en 3 animales por grupo. El número total de fibras por sección de nervio se obtuvo de 3 cortes aleatorizados de cada muestra. El recuento se realizó en 2 campos seleccionados por porción.

Para cisplatino en el Ejemplo 13, el análisis morfométrico se realizó en los días 23 y 44 en 3 animales por grupo. El número de fibras degeneradas y no degeneradas en toda la superficie de cada sección nerviosa fue contado por un operador de forma ciega. Todos los resultados (excepto los datos expresados como valor de proporción) se informaron como porcentaje de cambios en referencia al valor de control.

Ejemplo 19: Análisis de datos.

Todos los datos se muestran como valores medios $\pm$ SEM. Los análisis estadísticos se realizaron usando Statview para Windows (SAS Institute Inc.). Las comparaciones de los datos de dos grupos de tratamiento (control frente a vehículo) se realizaron mediante el uso de la prueba t de Student no pareada. Los datos de más de dos grupos de tratamiento fueron analizados por Anova, seguido de la prueba de Dunnett para la prueba de comparaciones múltiples. Los datos fueron comparados durante el transcurso del experimento por Manova, que permite el análisis múltiple de varianza de varios grupos con el tiempo (es decir, análisis longitudinal de datos) y la prueba de Dunnett se utilizó para detectar qué grupos difieren de otros grupos. Los puntos temporales individuales de interés se analizaron además utilizando Anova. Para el análisis estadístico de datos que muestran la proporción de animales que presentan la señal de ondas H, se asignó el 0 a animales que demostraban ondas H y el 1 a animales que carecían de ondas H. Para tales datos nominales, se utilizó la prueba χ^2 para realizar el análisis estadístico. Los análisis estadísticos que revelan valores de p menores o iguales a 0,05 se consideraron significativos.

Para simplificar la lectura de los gráficos, solo se muestran los resultados estadísticos para cada punto de tiempo después del análisis de Anova seguido de la prueba de Dunnett. El análisis Manova seguido de la prueba de Dunnett, que compara la información completa a lo largo del tiempo, solo se mencionó en el texto.

Ejemplo 20: Efecto de IL-6 en la actividad antitumoral de diversos fármacos de quimioterapia in vitro.

En los Ejemplos 1-14 se demostró que el tratamiento con IL-6 podría prevenir y retrasar la neuropatía en ratas intoxicadas con tratamiento con vincristina, cisplatino y taxol. Sin embargo, es importante demostrar que la actividad de la IL-6 en la inhibición de la neuropatía por agentes quimioterapéuticos no implica el deterioro de las propiedades quimioterapéuticas de los agentes relacionados con la muerte de células malignas.

Para abordar este problema, los efectos de IL-6 sobre la actividad antitumoral de varios fármacos antitumorales como vincristina, cisplatino, carboplatino, taxol o la combinación carboplatino-taxol se investigaron in vitro utilizando cultivos de dos líneas celulares tumorales, líneas celulares tumorales humanas de pulmón (SK-MES1) y mama (MCF7).

Las líneas celulares tumorales humanas de pulmón (SK-MES1) y de mama (MCF7) se obtuvieron de ATCC. Las líneas celulares se mantuvieron en medio MEM de Dulbecco (Gibco; Invitrogen, Cergy-Pontoise, Francia, ref. 41965039) complementado con solución de mezcla antibiótica/antimicótica al 1% (Gibco, referencia 15240062) y suero bovino fetal inactivado con calor al 10% (Gibco, ref. F7524, lote 92K3387). Las células se amplificaron en matraces de cultivo tisular Nunc (80 cm²) en una incubadora humidificada a 37°C con 5% de CO₂ en 95% de aire. Los cultivos fueron subcultivados dos veces por semana.

Los efectos de IL-6 sobre los efectos antiproliferativos de vincristina, cisplatino, carboplatino y taxol se evaluaron usando el ensayo de actividad de fosfatasa ácida como se describe en el Ejemplo 22. Se ha demostrado que la actividad enzimática es proporcional al número de células vivas (Ueda et al., 1994).

Tres días después de la última replicación, las células tumorales se sembraron en placas de 96 pocillos (TPP, VWR International, Fontenay-sous-bois, Francia) a una densidad de 1.500 células (línea MCE7) o 3.000 células (línea SK-MES) por pocillo, en un volumen total de 100 µl/pocillo y se incubaron durante la noche en una incubadora humidificada a 37°C con 5% de CO₂ en 95% de aire. Los cultivos celulares se intoxicaron luego mediante la adición de vincristina (10 nM), cisplatino (2,5 mM), carboplatino (25 mM), taxol (30 nM para células MCF7 y 50 nM para células SK-MES1) o una mezcla de carboplatino (10 mM) y taxol (10 nM) en el medio de cultivo celular. Se añadió inmediatamente IL-6 (en solución de tampón a 1,8 mg/ml, pH: 7) a concentraciones de 0, 3, 12, 50 ó 200 ng/ml.

Cuatro días después del inicio de la intoxicación, se evaluó la actividad de la fosfatasa ácida (Ejemplo 21) en cada cultivo celular.

Los resultados mostraron que en ambas líneas celulares tumorales, la vincristina (10 nM), el cisplatino (2,5 M) y el carboplatino (25 µM) indujeron una disminución significativa (aproximadamente 50%) en la supervivencia celular en comparación con los cultivos de células control no tratadas ($p \leq 0,001$, prueba de Fisher) (Figura 30 A, B, C, D, I, J respectivamente). En presencia de IL-6, la supervivencia de células MCF7 tratadas con vincristina o cisplatino o carboplatino no cambió significativamente ($p \geq 0,05$, Anova de una vía) la supervivencia de células intoxicadas con vincristina-cisplatino o carboplatino (Figura 30 A, C, I, respectivamente). En presencia de IL-6, la supervivencia de las células SK-MES1 tratadas con vincristina o cisplatino no cambió significativamente ($p > 0,05$, Anova de una vía) (Figura 30 B, D). Por el contrario, las células SK-MES1 intoxicadas con carboplatino mostraron una disminución significativa ($p < 0,05$, Anova de una vía) de la supervivencia en presencia de IL-6 (Figura 30 J).

El taxol (30 nM) indujo una disminución de aproximadamente 55% en la supervivencia de la línea celular MCF7 ($p < 0,001$, prueba de Fisher) (Figura 30 E). La citotoxicidad de esta concentración de taxol apareció ligeramente potenciada en las células SK-MES1, mostrando aproximadamente un 70% de disminución de la supervivencia (Figura 30 F). En ambas células, MCF7 o SK-MES1, el tratamiento con IL-6 no modificó el efecto del taxol sobre la supervivencia celular ($p > 0,05$, Anova de una vía) (Figura 30 E y F, respectivamente).

Con la combinación de 10 µM de carboplatino y 10 nM de taxol, se observó un 40% de disminución en la supervivencia de ambos tipos de líneas celulares tumorales ($p < 0,001$, prueba de Fisher) (Figura 30 G y H). La supervivencia de ambos tipos de líneas celulares tumorales intoxicadas con la combinación de carboplatino y taxol se mantuvo sin cambios ($p > 0,05$, Anova de una vía) en presencia de IL-6.

En los experimentos anteriores, se evaluó la posible interacción del fármaco entre la IL-6 y diversos agentes quimioterapéuticos in vitro. Los resultados in vitro mostraron que la IL-6 no alteraba la actividad antitumoral de los diversos agentes quimioterapéuticos probados.

Ejemplo 21: Efecto de IL-6 en la actividad antitumoral de cisplatino in vivo.

El siguiente experimento se llevó a cabo para verificar la interacción potencial de fármacos entre IL-6 y el agente quimioterapéutico in vivo. Para ese propósito, se evaluó el efecto de IL-6, solo y/o en combinación con cisplatino, sobre el crecimiento de carcinoma de colon WiDr humano en ratones desnudos.

Se usan ratones desnudos Balb/c, ya que han demostrado ser sistemas hospedantes susceptibles para el crecimiento de células tumorales de carcinoma de colon WiDr humanas. Las células WiDr fueron proporcionadas por el banco del Instituto Nacional de Investigación del Cáncer Genova-Italia. Especie de células: mujer humana de 78 años, tejido: colon, tumor: adenocarcinoma de colon, número de acceso: ICLC HTL00003.

Las células WiDr se cultivaron en medio, DMEM + glutamina 2 mM + FBS al 10% en cultivo continuo y crecieron como monocapa, morfología epitelial.

Se compraron 64 ratones desnudos Balb/c hembra en Charles River Italia S.p.A., Via Indipendenza 11-22050 CALCO (Lecco). Durante el período de aclimatación previo al tratamiento, los animales se observaron clínicamente todos los días.

Los animales se alojaron en un gabinete de flujo laminar ventilado con temperatura y humedad relativa de $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ y $55\% \pm 10$, respectivamente. Hubo aproximadamente 15-20 cambios de aire por hora. La sala se iluminó con iluminación artificial con un ciclo circadiano de 12 horas (7 a.m.-7 p.m.).

No más de 3 ratones fueron alojados en cada jaula. Cada jaula tenía una etiqueta que contenía el número de experimento, el grupo, el número de animal, la fecha de inicio del experimento y la fecha de inoculación. Las jaulas y la cama se cambiaron dos veces por semana. Las jaulas, la cama de aserrín y los biberones se esterilizaron en un autoclave antes de que cada jaula se cambiara.

El peso corporal se registró dos veces por semana durante 4 semanas después de la inyección de las células. El tamaño del tumor se registró dos veces por semana durante 4 semanas comenzando 4 días después de la inoculación de células.

Al final de un período de observación de 4 semanas, los animales fueron sacrificados por una inyección i.p. de una

sobredosis de tiopental de sodio.

Cada ratón desnudo Balb/c (aproximadamente 20-25 g de peso corporal) se inoculó por vía subcutánea (s.c.) con $10^7 \pm 5\%$ de células WiDr/ratón (0,2 ml/ratón de suspensión celular) el día 1.

Los animales se asignaron aleatoriamente a los siguientes grupos experimentales de 8 ratas por grupo:

- 5 Un grupo administrado con albúmina de ratón al 0,02% (Sigma) en tampón de fosfato 40 mM a pH = 7,0, s.c., un grupo administrado con 3,5 mg/kg de cisplatino, i.p. (en solución estéril de NaCl al 0,9% para inyección), tres grupos de ratas, cada uno tratado con IL-6 (en albúmina de ratón al 0,02% en tampón de fosfato 40 mM a pH = 7,0), s.c. a 3, 10 ó 30 µg/kg y tres grupos de ratas tratadas con IL-6 a 3, 10 ó 30 µg/kg de IL-6, s.c. en combinación con cisplatino 3,5 mg/kg, i.p.
- 10 Se administró IL-6 a 3, 10 y 30 mg/kg s.c. diariamente (10 mL/kg) desde el día 4 hasta el día 18. Se administró cisplatino (Sigma) 3,5 mg/kg (10 mL/kg) i.p. solo 4, 8, 12 y 18 días después de la inyección de la célula. El tamaño del tumor se registró dos veces por semana durante 4 semanas comenzando 4 días después de la inoculación de células. El volumen tumoral (en mm³) se estimó de acuerdo con la fórmula (Geran R. I. et al., Cancer Chemotherapy Reports (1972) Parte 3, 3(2): 51): volumen tumoral (en mm³) = (diámetro más largo) x (diámetro más corto)²/2.
- 15 Los resultados obtenidos muestran que el cisplatino administrado a 3,5 mg/kg los días 4, 8, 12 y 18 fue capaz de reducir el crecimiento tumoral y el efecto antiproliferativo (Figura 31). El efecto del cisplatino se mantuvo después de la interrupción del cisplatino. Se obtuvieron inhibiciones tumorales significativas los días 18 (p < 0,05), 22 (p < 0,01) y 25 (p < 0,001; ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey).
- 20 La administración de IL-6 sola, a las dosis de 3, 10 y 30 µg/kg administradas diariamente por vía subcutánea desde el día 4 hasta el día 18, no afectó significativamente el crecimiento del tumor (Figura 32). La combinación de IL-6 con cisplatino dio como resultado un crecimiento tumoral inhibitorio similar al del cisplatino solo (Figura 33).

En conclusión, IL-6, solo o en combinación con cis-platino, no interfirió con el crecimiento del tumor de células WiDr ni con la acción quimioterapéutica del cisplatino.

Ejemplo 22: Ensayo de fosfatasa.

- 25 Después de eliminar el medio de cultivo, las células se enjuagaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Gibco, ref. 14190-094) y se incubaron durante 90 min a 37°C en 100 µl de tampón que contenía 0,1 mol/l de acetato de sodio (pH 5,5), Triton X100 al 0,1% (Sigma, ref. T9284) y 10 mmol/l de p-nitrofenil fosfato (Sigma, ref. N9389). La reacción se detuvo mediante la adición de 10 µl de solución acuosa de hidróxido sódico 1 mol/l (Laboratoire de Produit Chimiques de la Robertsau, Estrasburgo, Francia; ref. 28.252.293). La absorbancia de la solución coloreada se midió a 405 nm en un lector de microplacas (LabSystems Multiskan Bichromatic, EST-LAB, Estrasburgo, Francia).
- 30

Los resultados se expresaron como porcentaje de densidad óptica de los cultivos celulares de control. Las alturas de las columnas representan la media $\pm$ SEM de los porcentajes de 5-6 pozos de dos cultivos independientes.

- 35 Se realizó un análisis global de los datos utilizando un análisis de varianza de una vía (Anova). Cuando correspondía, la prueba PLSD de Fisher se utilizó para la comparación de pares múltiples. El nivel de significancia se estableció en $p \leq 0,05$.

Ejemplo 23: Producción de IL-6 humana recombinante.

- 40 La IL-6 humana recombinante (r-hLL-6) se produce en células de ovario de hámster chino (CHO) modificadas genéticamente. El proceso de producción comienza con el crecimiento y la expansión de las células de un banco de células en funcionamiento (WCB) y continúa en condiciones en las que r-hLL-6 se secreta en el medio de cultivo. El r-hLL-6 se recogió y se purificó a partir del medio de cultivo de las células modificadas genéticamente. La pureza estaba por encima del 99,6% y la potencia de $23,3 \times 10^6$ UI/ml (basada en una actividad del factor de crecimiento de hibridoma (HGF) de IL-6 de Van Damme J, Van Snick J. Dev Biol Stand. 1988; 69:31- 8).

REIVINDICACIONES

1. Uso de una dosis baja de IL-6, o una muteína, isoforma, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de neuropatía periférica inducida por quimioterapia, caracterizado por que la neuropatía periférica inducida por quimioterapia está causada por al menos un agente quimioterapéutico, en el que el medicamento debe administrarse después o durante y después de la quimioterapia, y en el que la dosis de IL-6 o una muteína, isoforma, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma, está en el intervalo de 4 a 210 µg.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el al menos un agente quimioterapéutico es vincristina, cisplatino, carboplatino, taxol o una mezcla de carboplatino y taxol.
3. El uso según la reivindicación 1, en el que la dosis de IL-6, o una muteína, isoforma, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma, está en el intervalo de 7 a 140 µg.
4. El uso según la reivindicación 1, en el que la dosis de IL-6, o una muteína, isoforma, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma es aproximadamente 4, 7, 14, 28, 70 ó 140 µg.
5. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la IL-6, o una muteína, isoforma, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una de sus sales está glicosilada en uno o más sitios o no está glicosilada.
6. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el derivado funcional de IL-6 comprende al menos un resto químico unido a uno o más grupos funcionales, que se producen en una o más cadenas laterales en los restos de aminoácidos.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el resto químico es un resto de polietilenglicol.
8. Uso de una célula recombinante que produce IL-6, o una muteína, isoforma, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la neuropatía periférica inducida por quimioterapia, en la que la neuropatía periférica inducida por quimioterapia está causada por al menos un agente quimioterapéutico, y en el que el medicamento debe administrarse después o durante y después de la quimioterapia.
9. Uso de un vector que comprende la secuencia codificante de una IL-6 y capaz de expresar IL-6, o una muteína, isoforma, fracción activa o derivado circularmente permutado de la misma, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de neuropatía periférica inducida por quimioterapia, en la que la neuropatía periférica inducida por quimioterapia está causada por al menos un agente quimioterapéutico, y en el que el medicamento debe administrarse después o durante y después de la quimioterapia.
10. El uso según la reivindicación 9, en el que el vector es un vector lentiviral.
11. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la neuropatía periférica inducida por quimioterapia después o durante y después de la quimioterapia, en la que la composición farmacéutica comprende (i) un vehículo farmacéuticamente aceptable, y (ii) una combinación de IL-6, o una isoforma, muteína, derivado funcional o fragmento del mismo, y al menos un agente quimioterapéutico.
12. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el al menos un agente quimioterapéutico es vincristina, cisplatino, carboplatino, taxol o una mezcla de carboplatino y taxol.
13. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en la que la IL-6 o una muteína, isoforma, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma, está glicosilada en uno o más sitios o no está glicosilada.
14. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en la que el derivado funcional de IL-6 comprende al menos un resto químico unido a uno o más grupos funcionales, que se producen en una o más cadenas laterales en los restos de aminoácidos.
15. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que el resto químico es un resto de polietilenglicol.
16. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, que comprende además un fármaco neuroprotector
17. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en la que el fármaco neuroprotector es el factor de crecimiento nervioso (NGF) o glutamina.
18. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, en la que la

cantidad de IL-6, o una muteína, isoforma, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma, está en el intervalo de 4 a 210 µg.

- 5 19. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, en la que la cantidad de IL-6, o una muteína, isoforma, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma, está en el intervalo de 7 a 140 µg.

20. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 18, en la que la cantidad de IL-6, o una muteína, isoforma, derivado funcional, fracción activa o derivado circularmente permutado o una sal de la misma, es de aproximadamente 4, 7, 14, 28, 70 ó 140 µg.

Figura 1

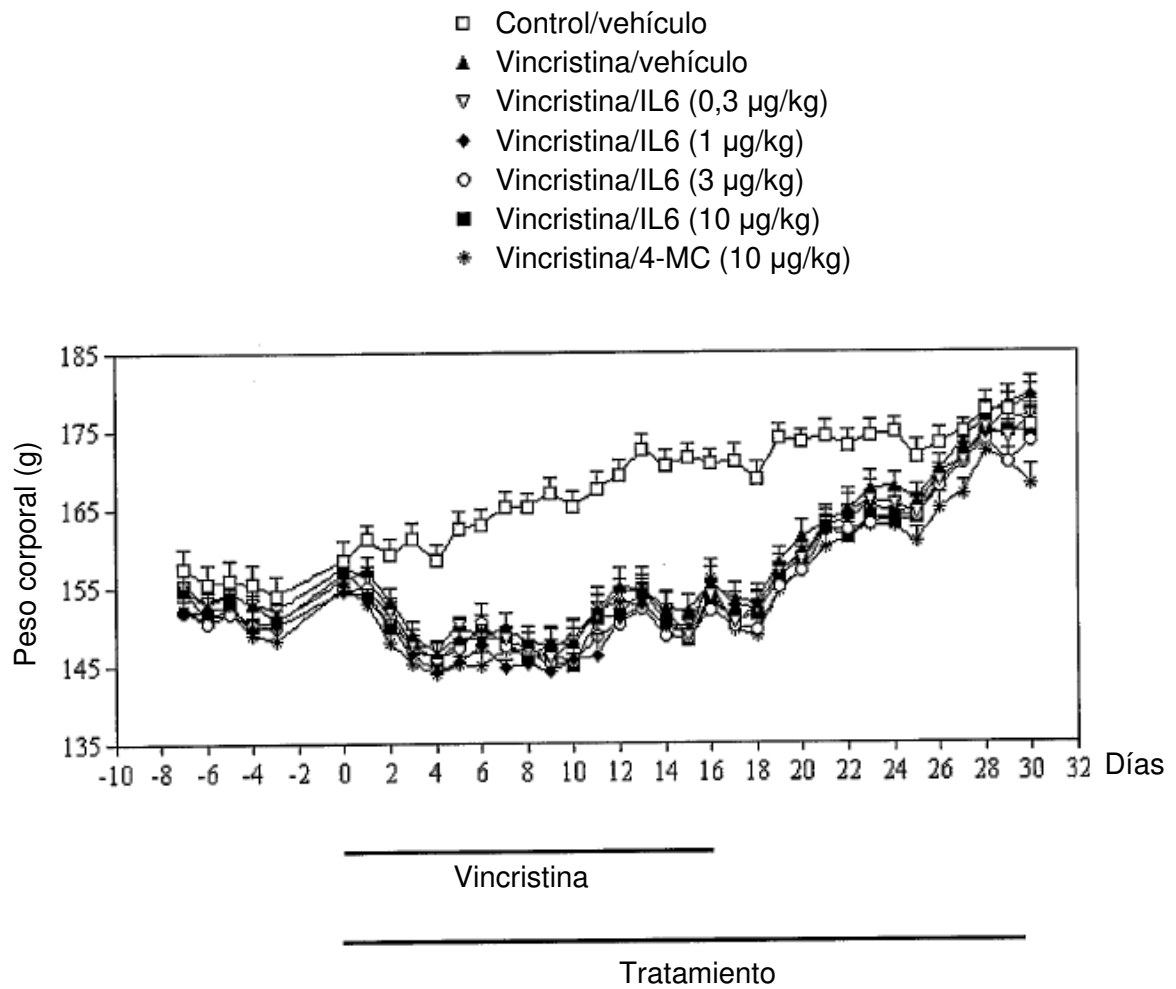


Figura 2

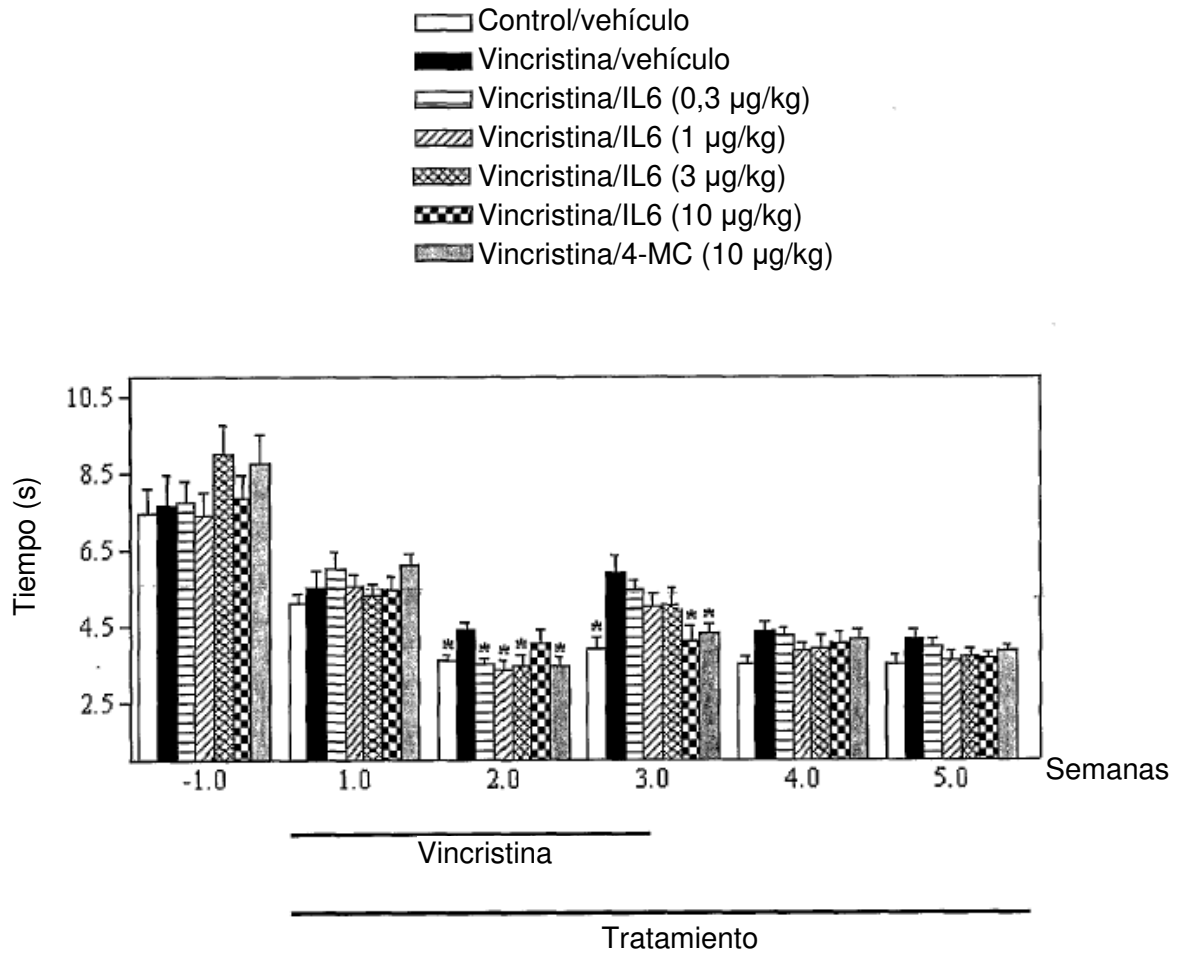


Figura 3

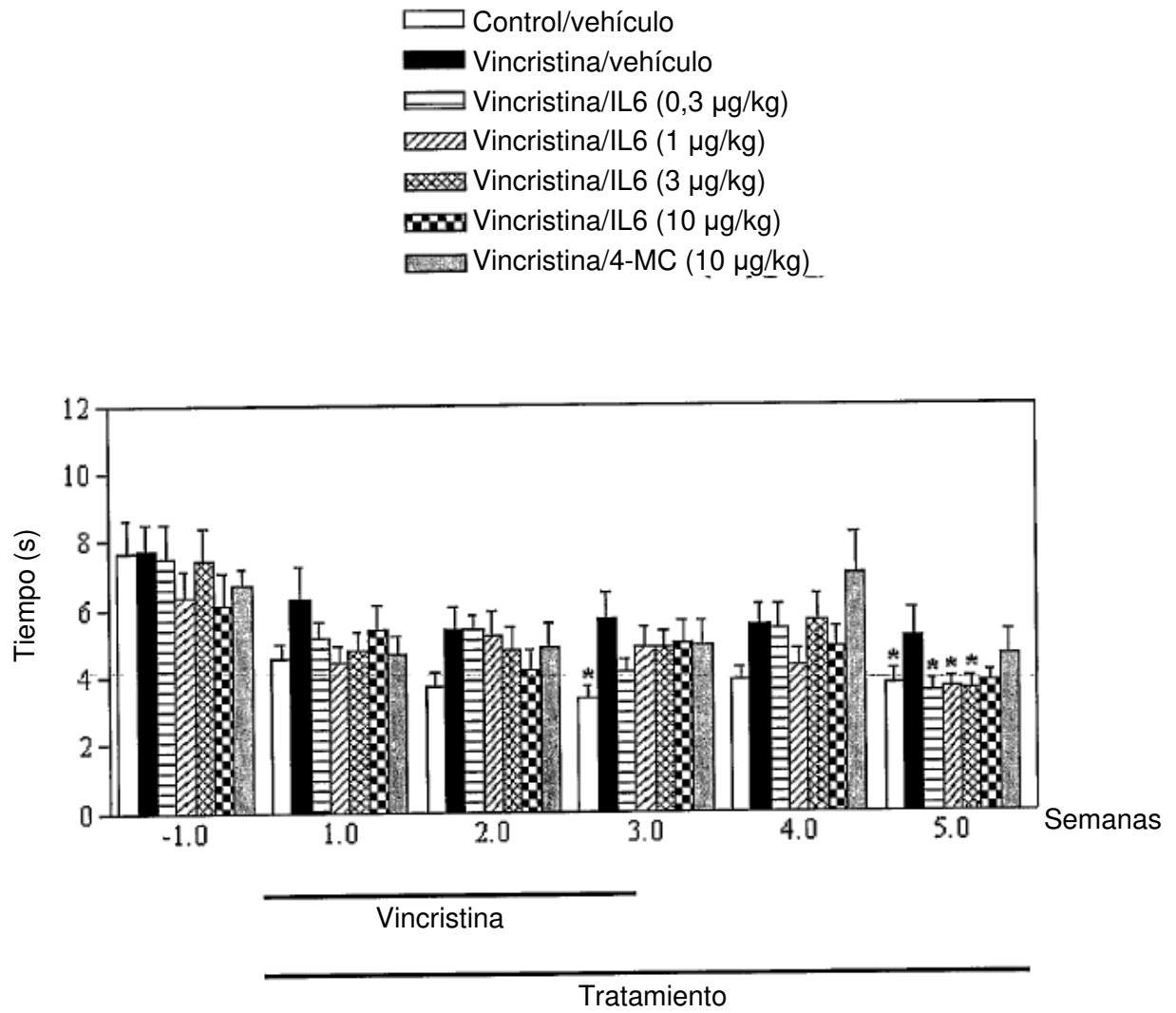


Figura 4

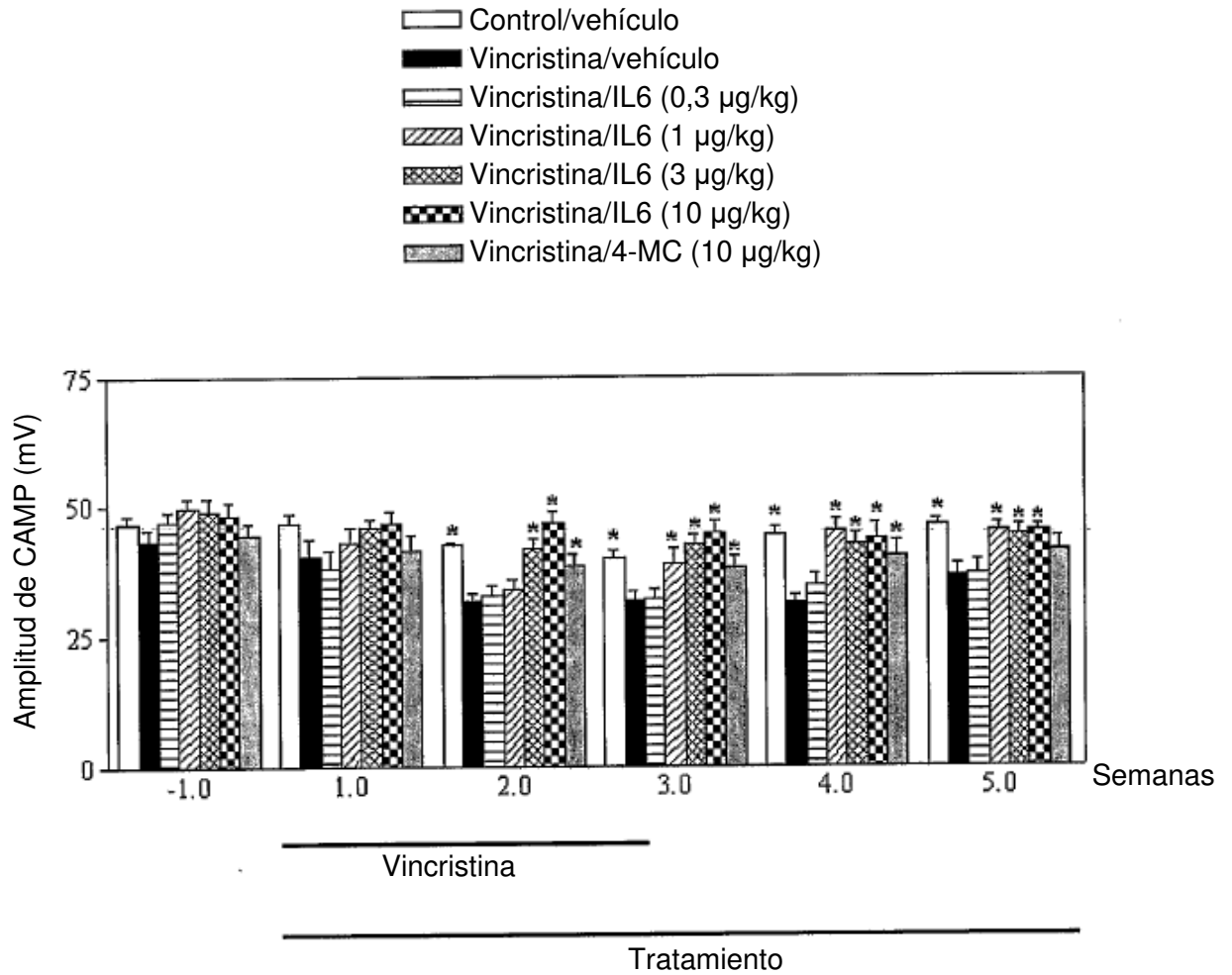


Figura 5

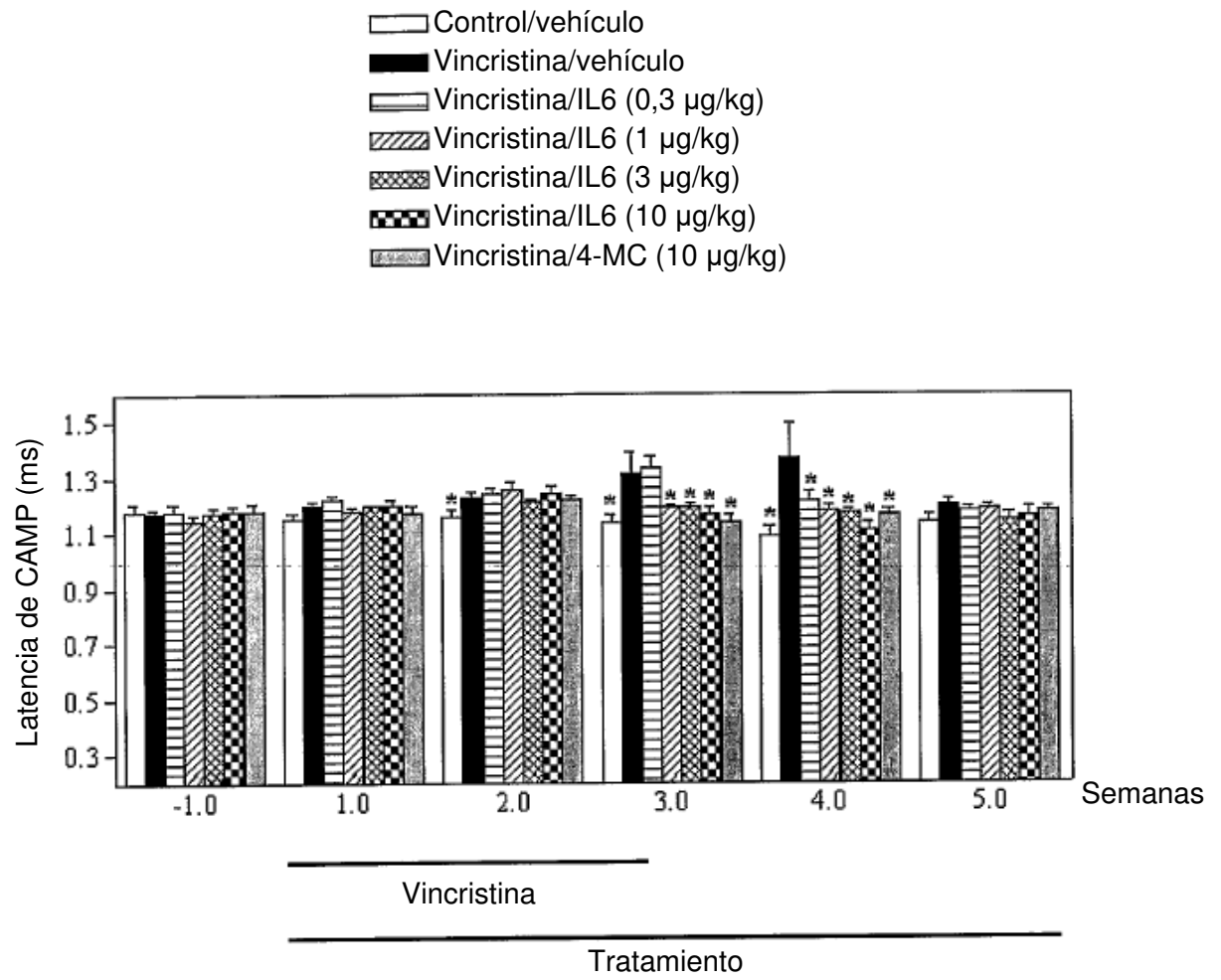


Figura 6

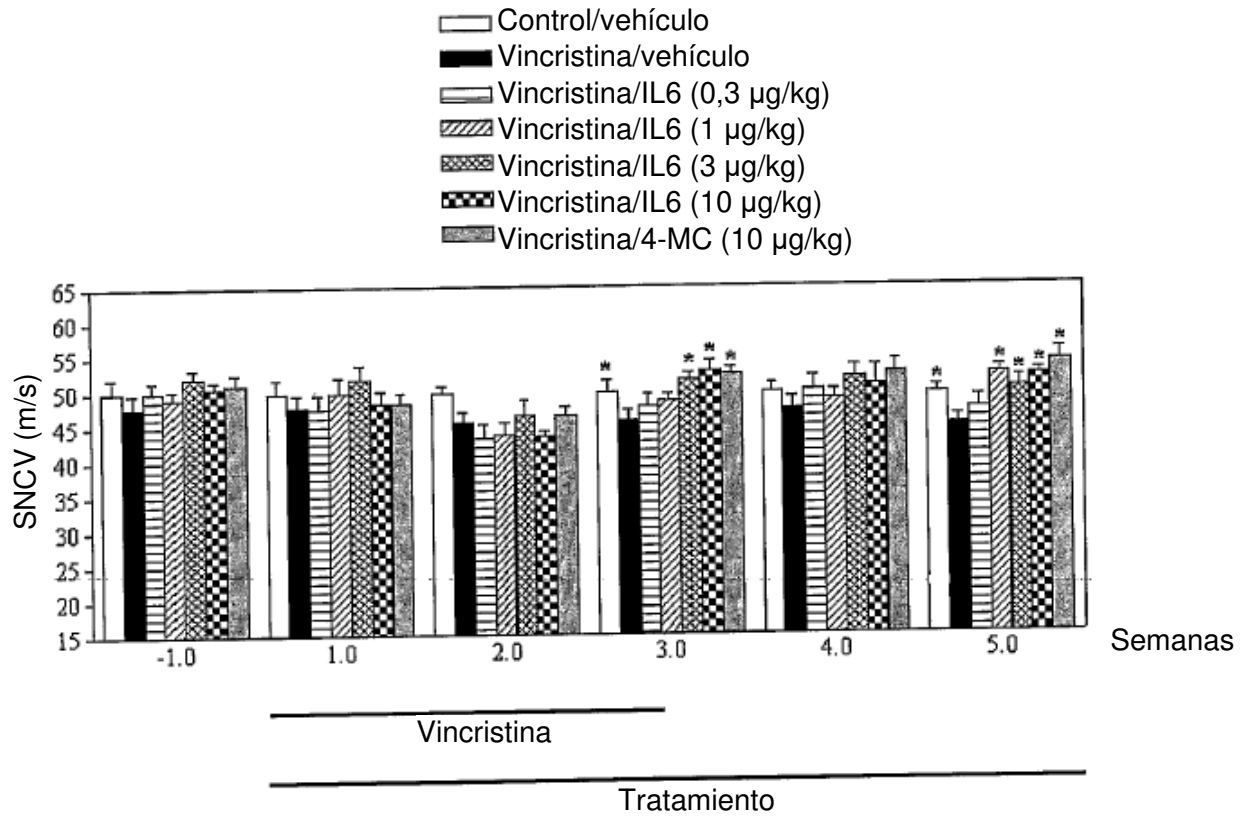


Figura 7

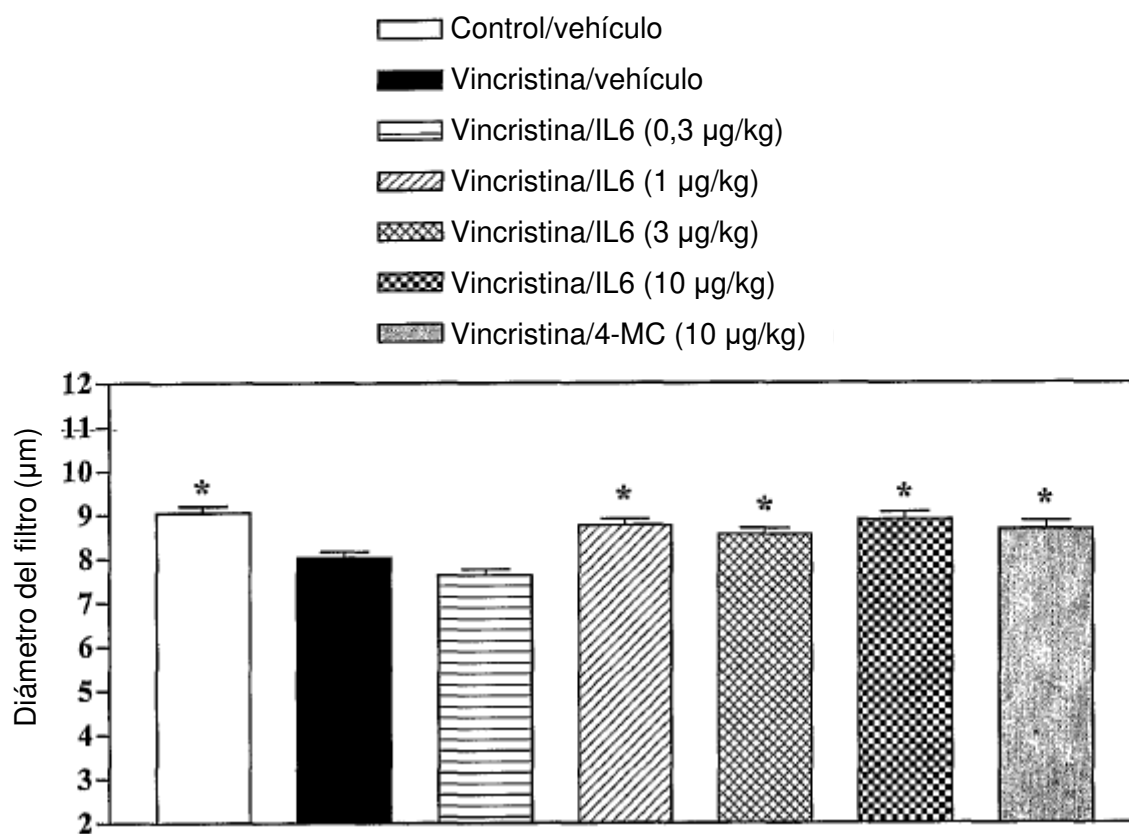


Figura 8

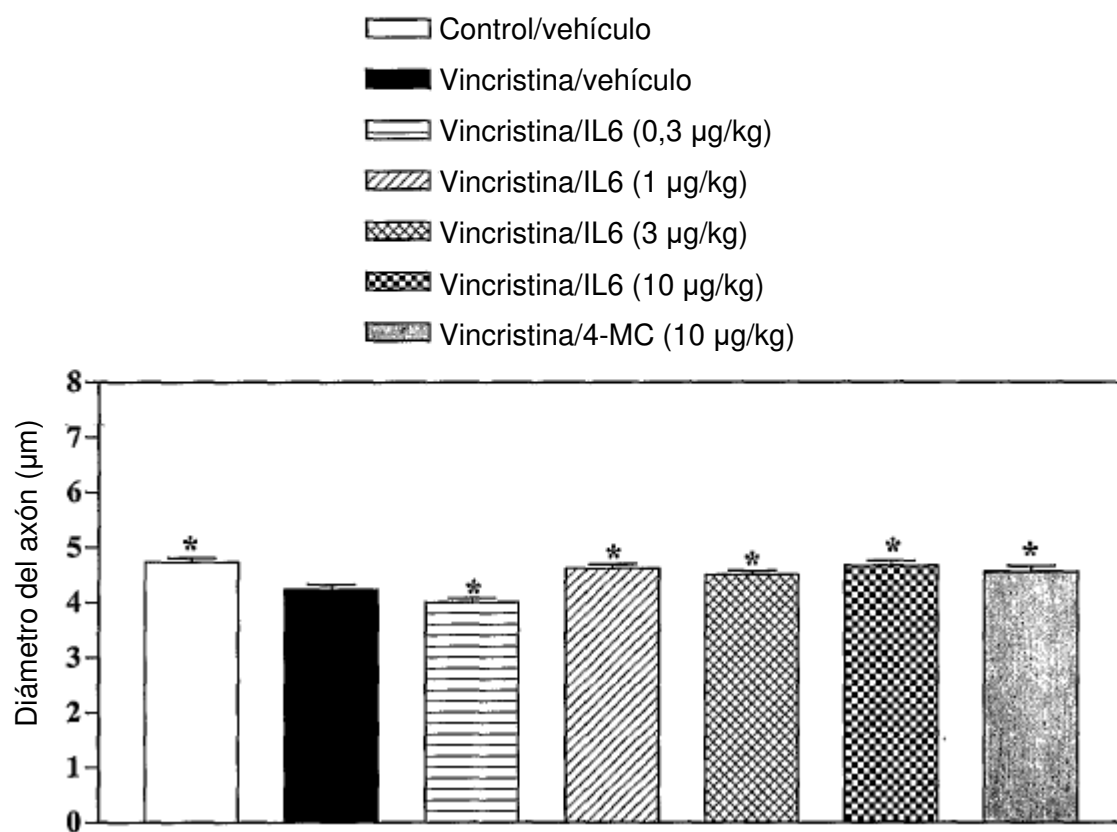


Figura 9

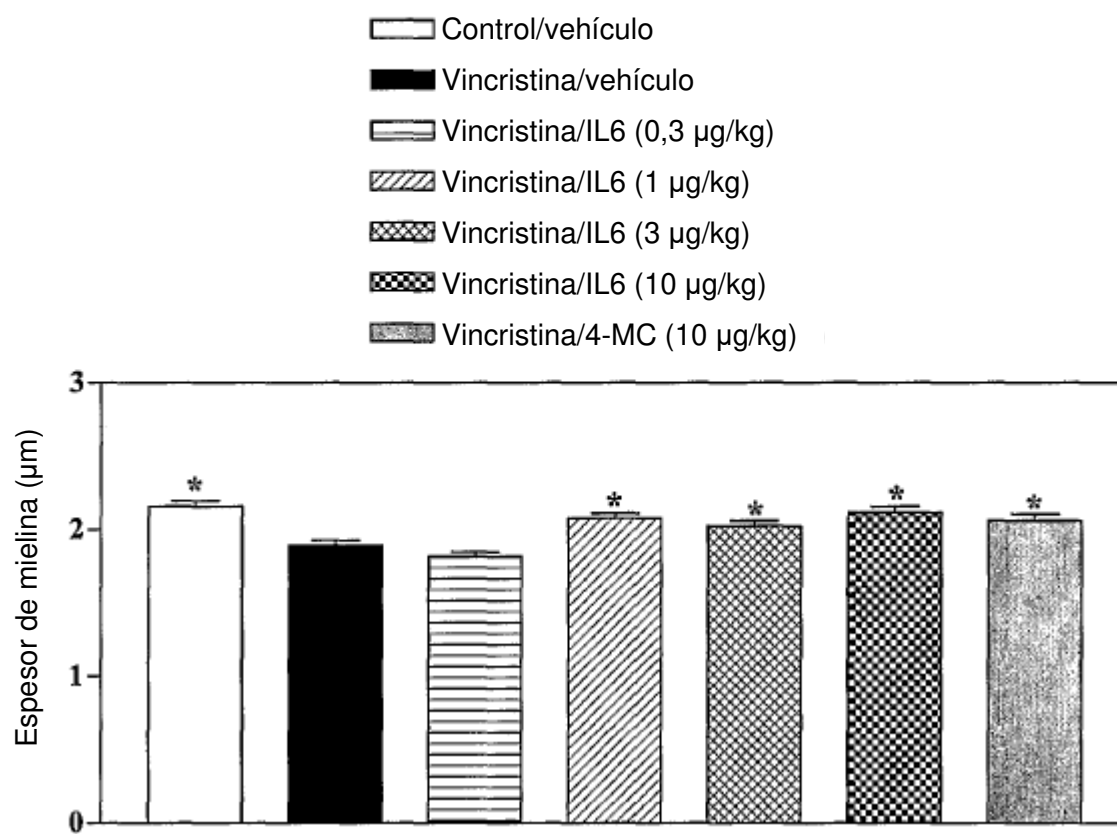


Figura 10

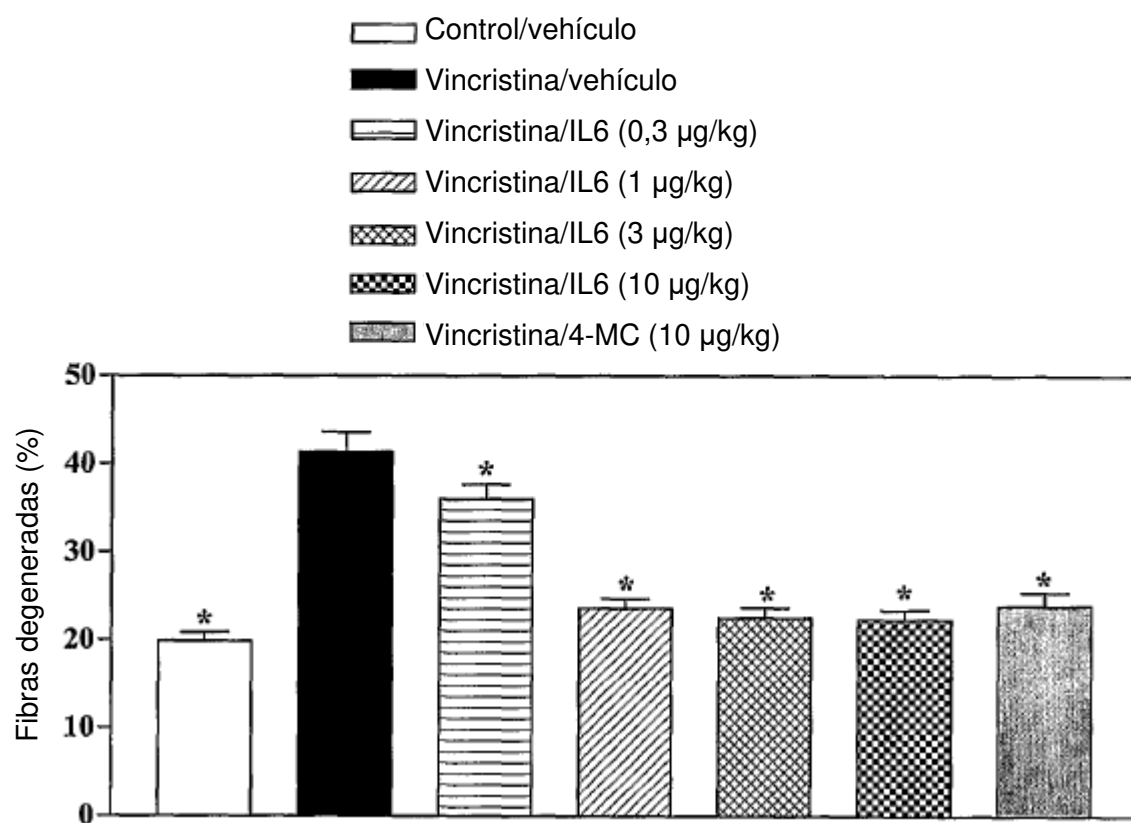


Figura 11

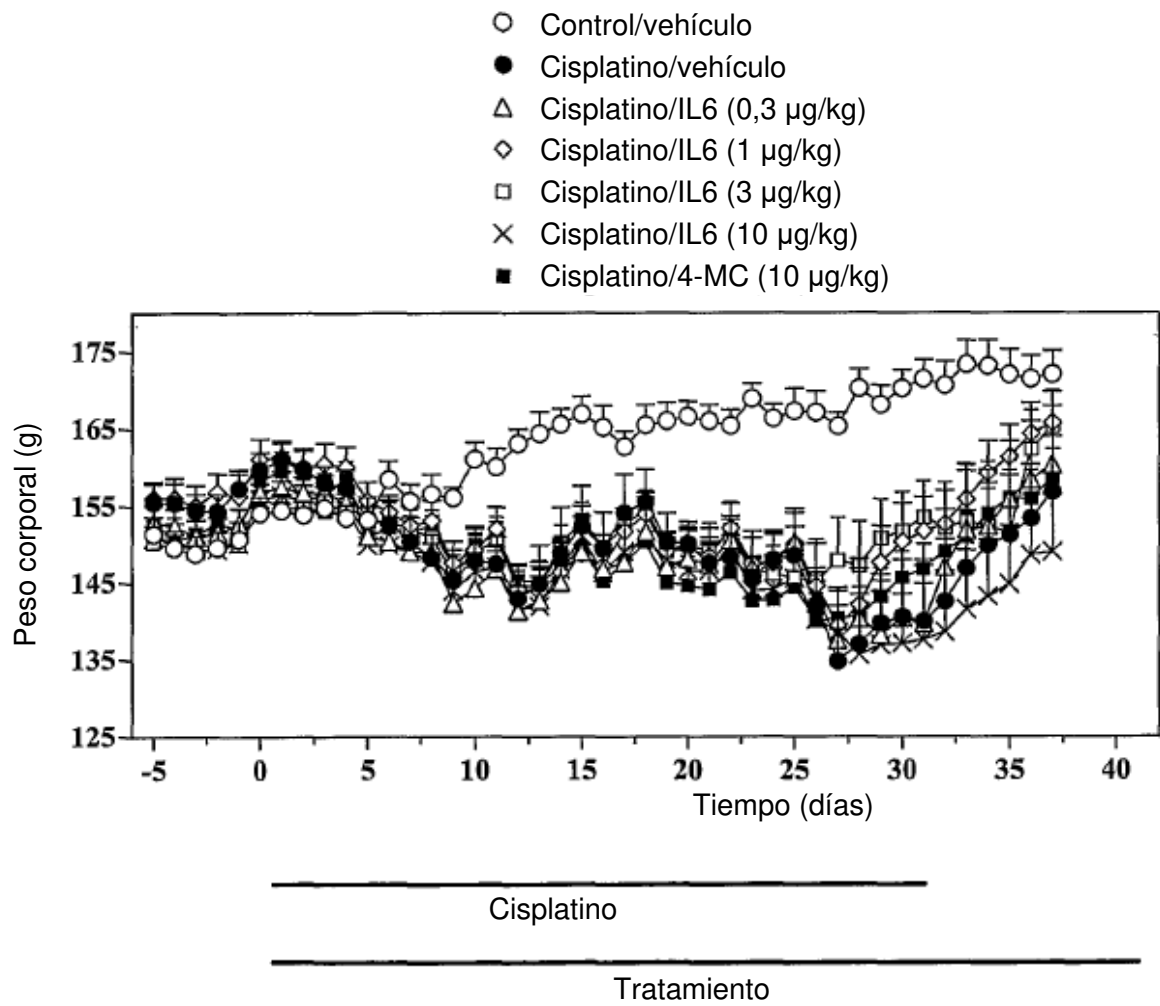


Figura 12

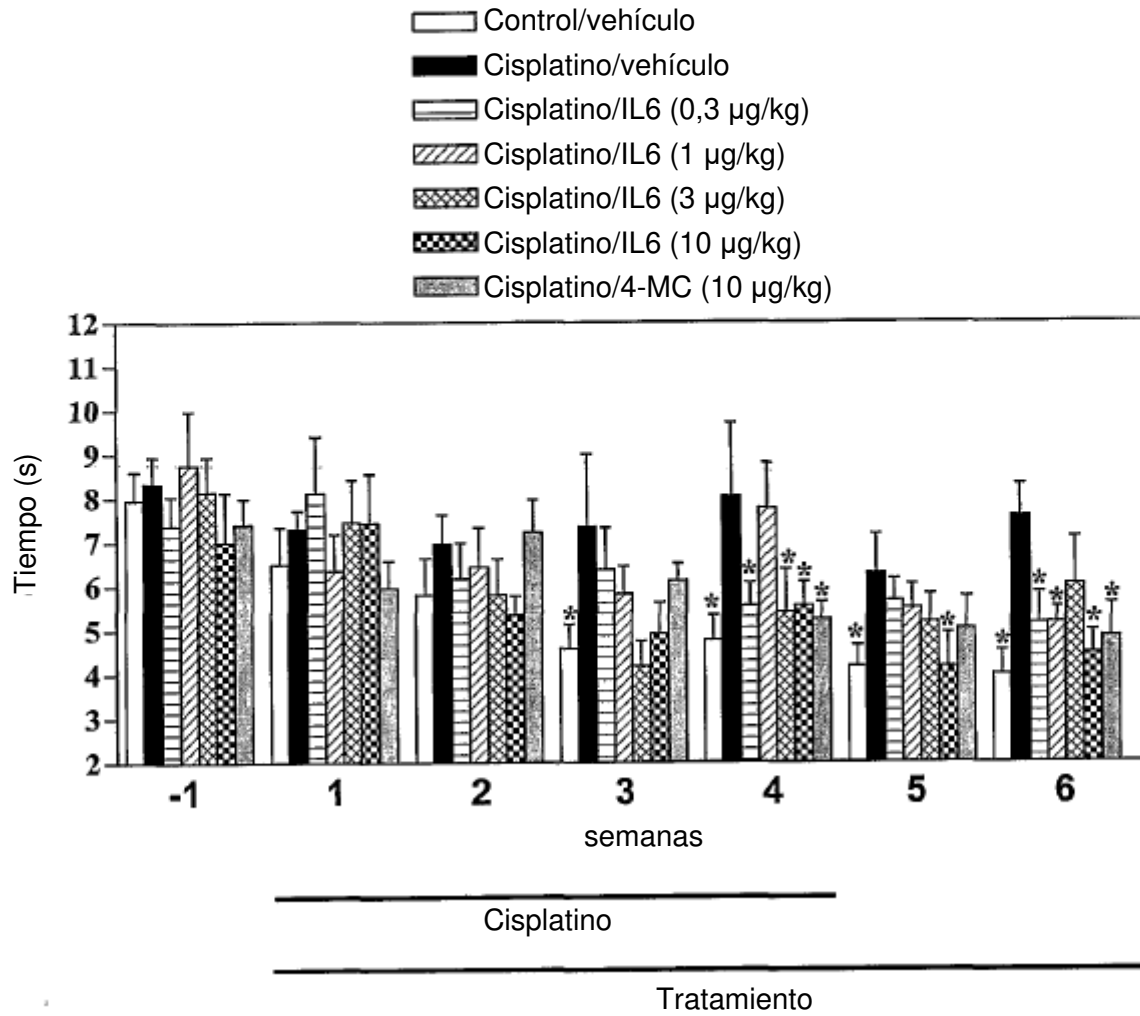


Figura 13

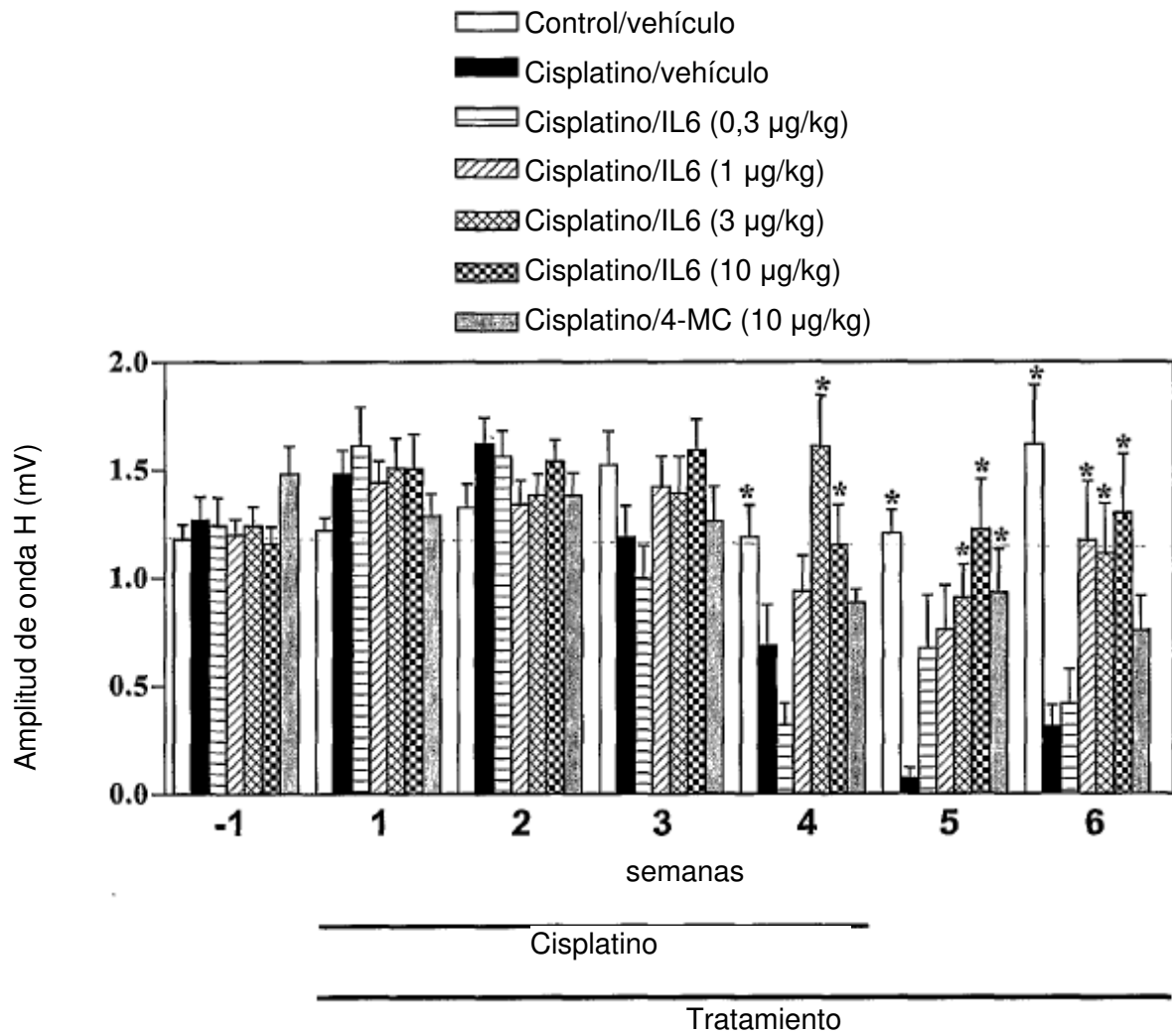


Figura 14

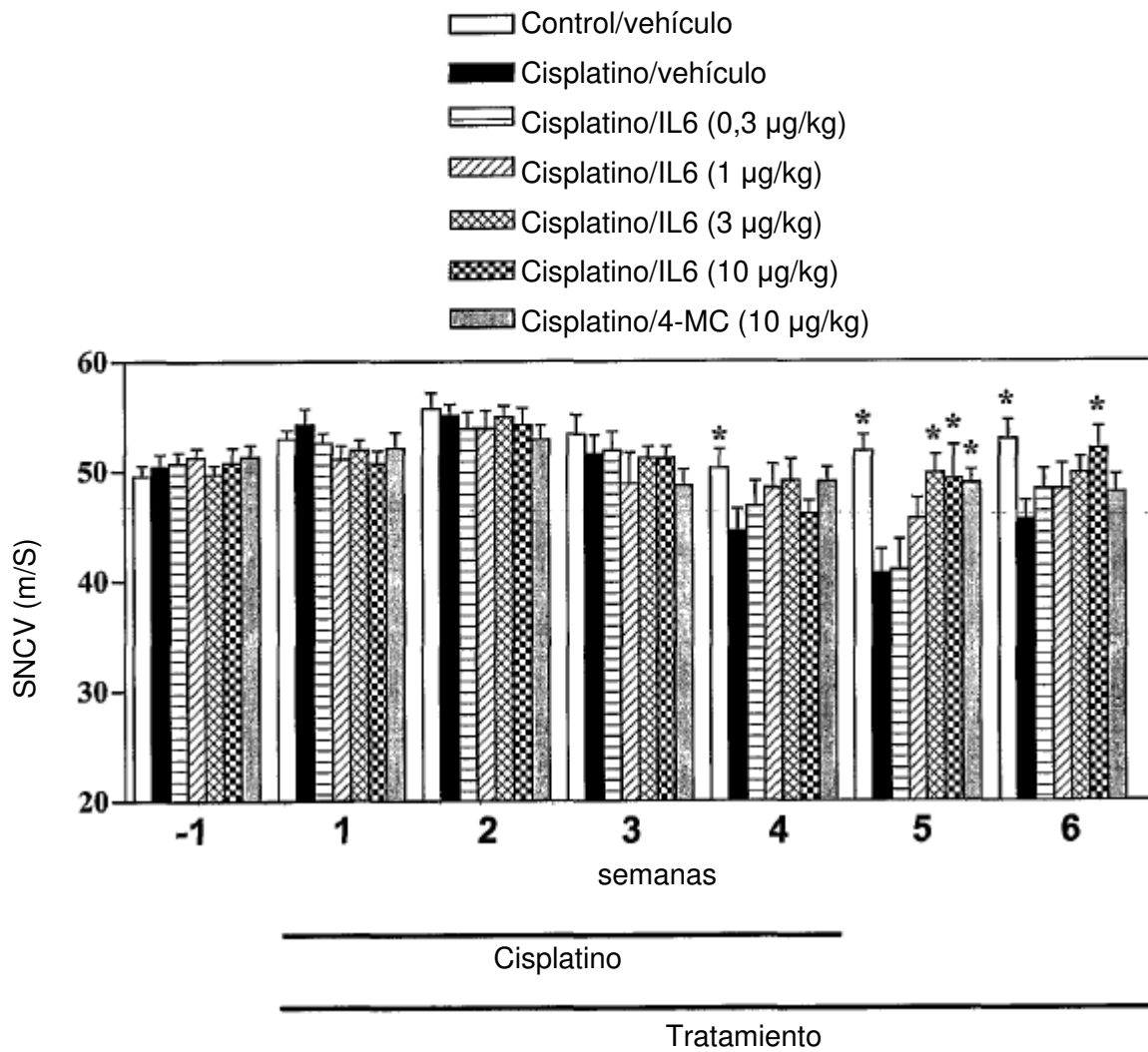


Figura 15

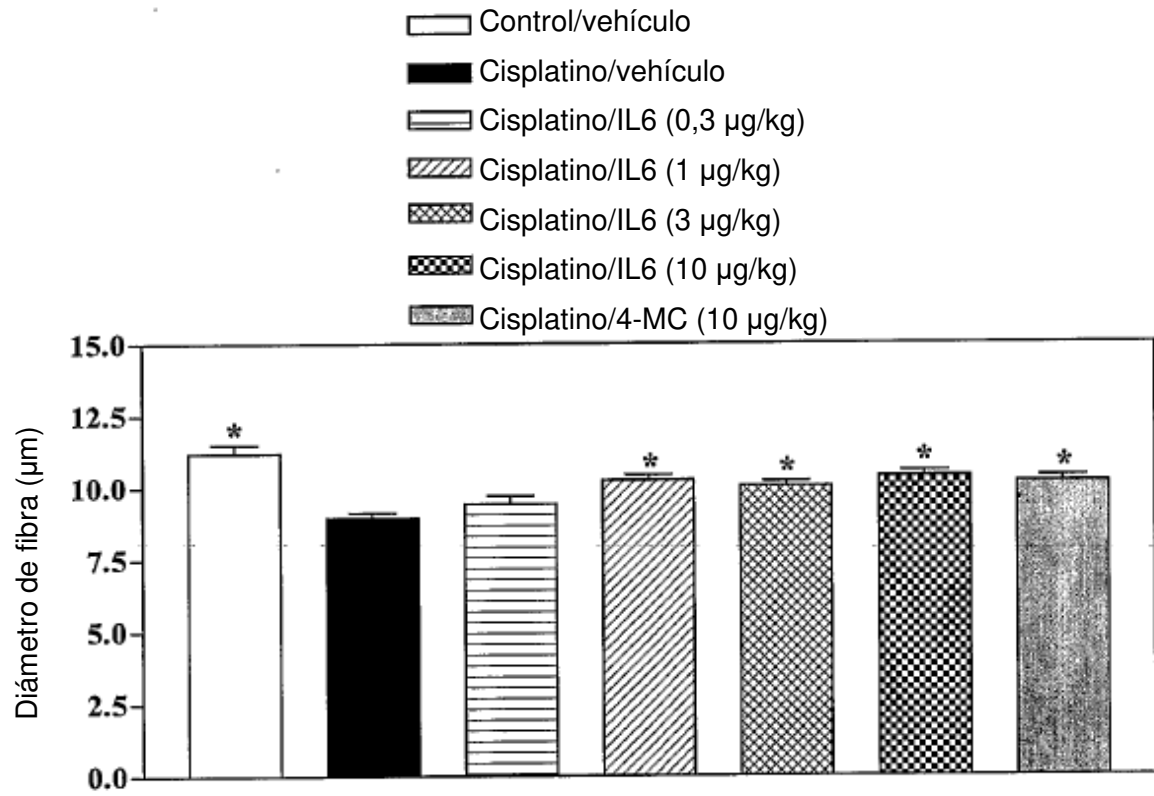


Figura 16

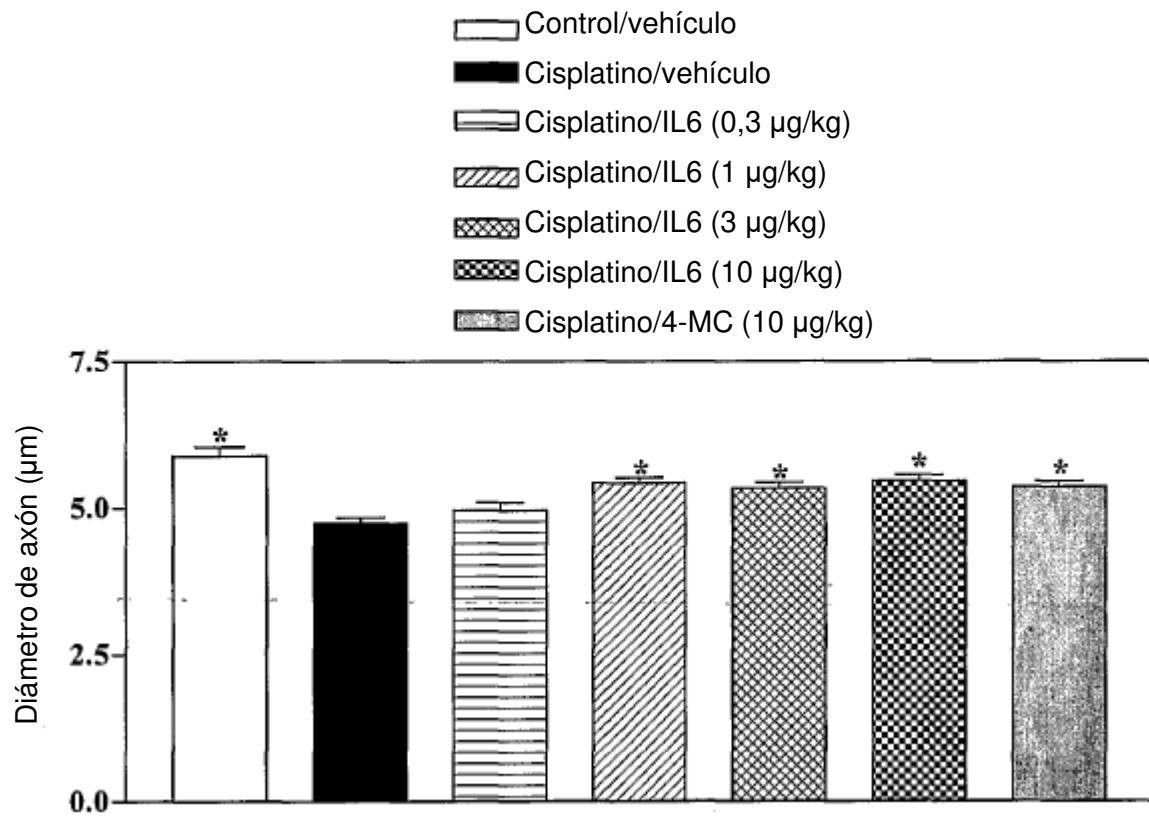


Figura 17

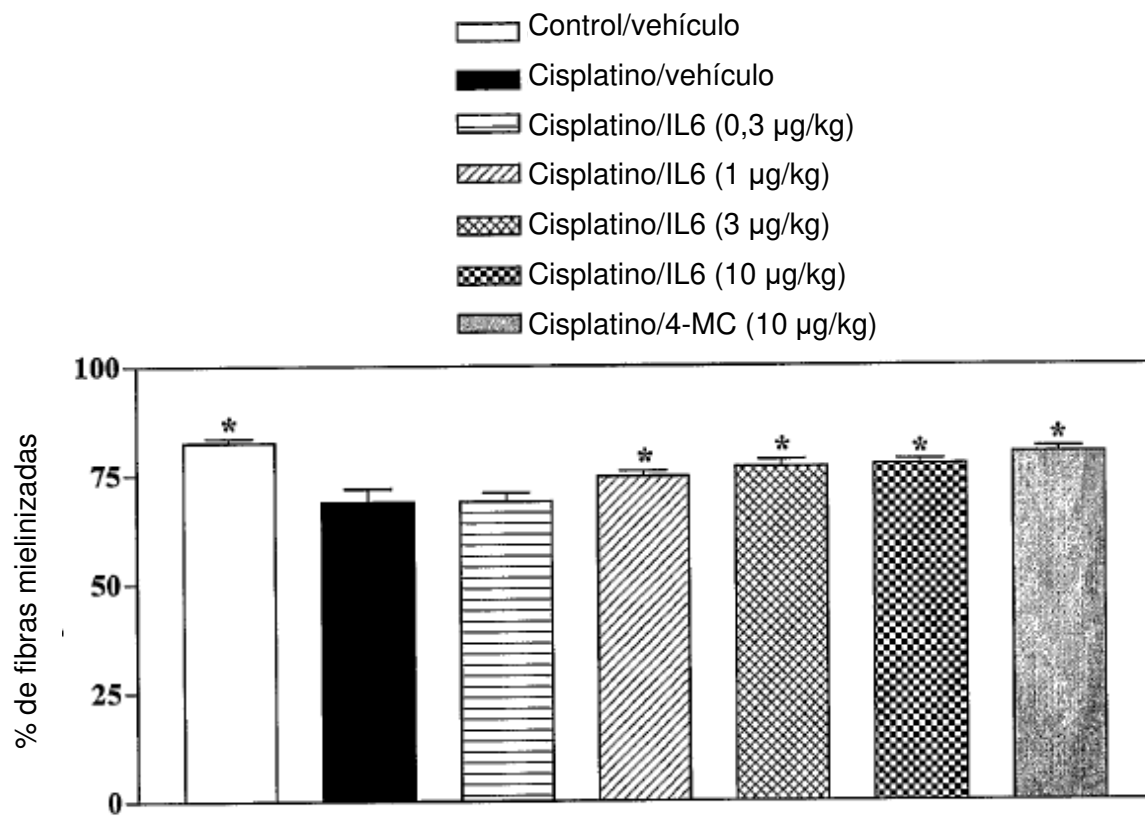


Figura 18

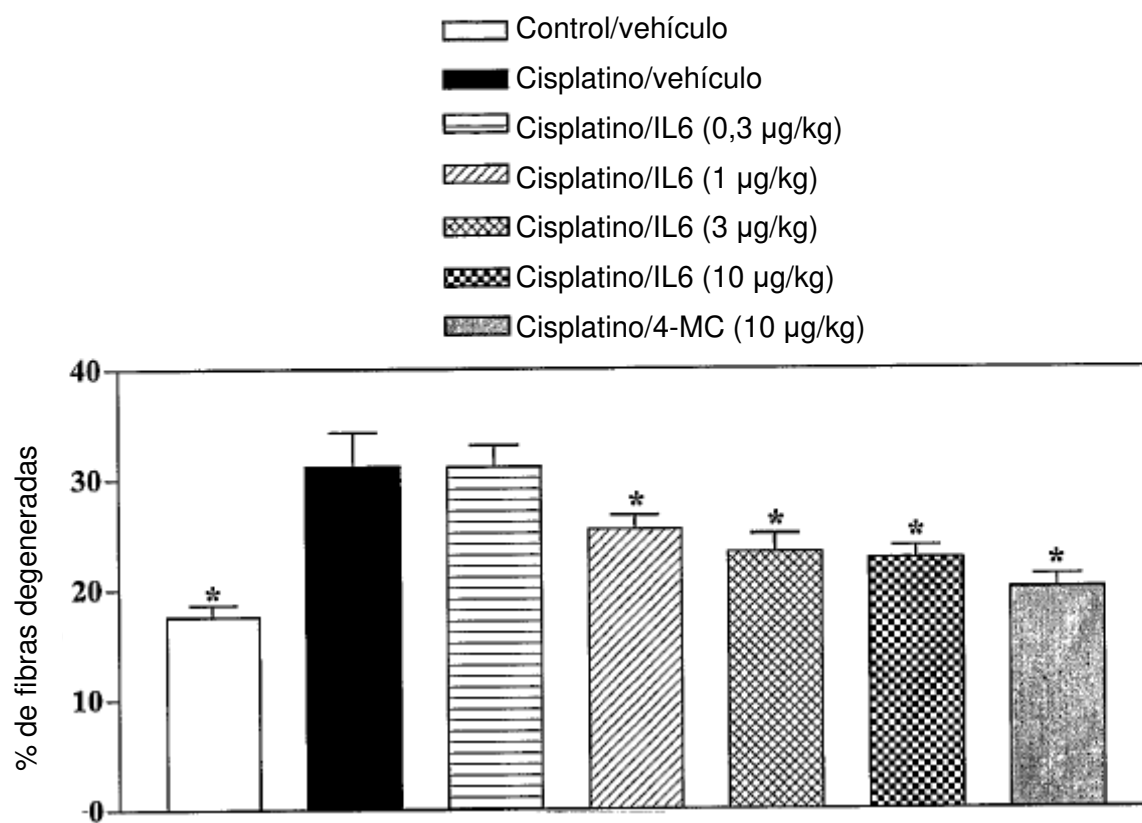


Figura 19

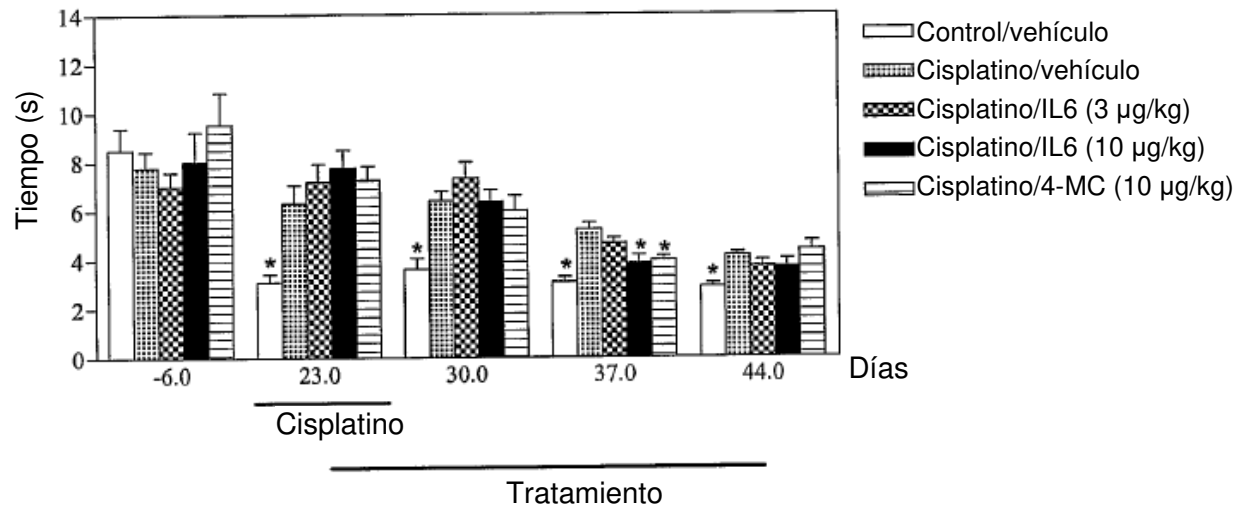


Figura 20

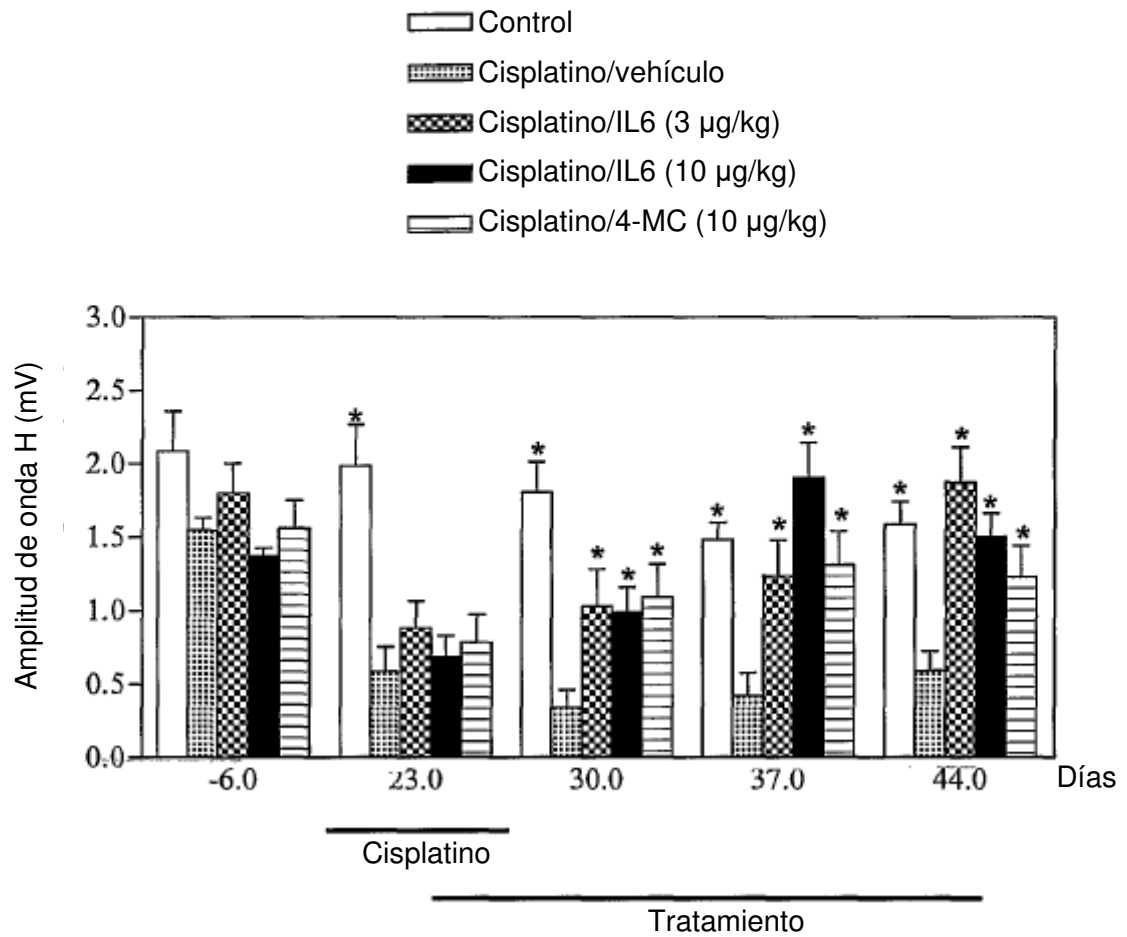


Figura 21

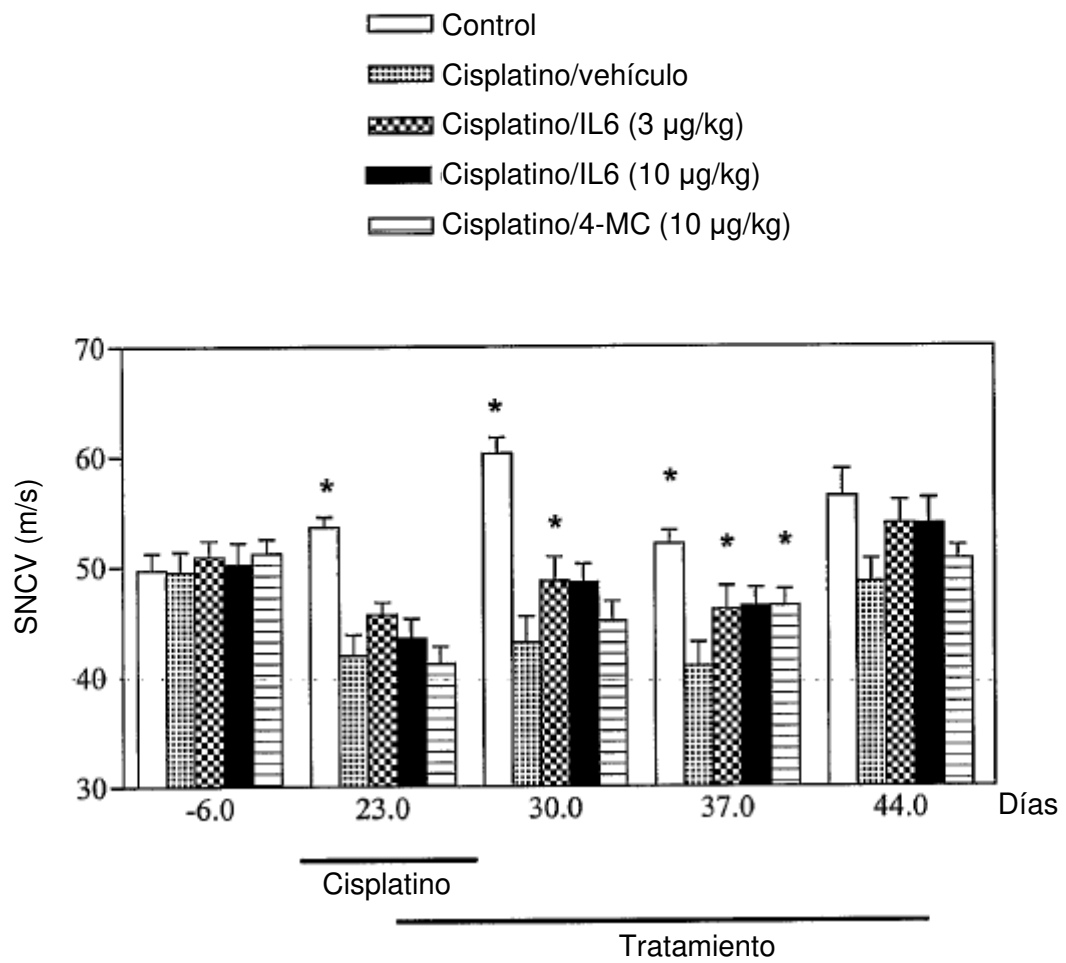


Figura 22

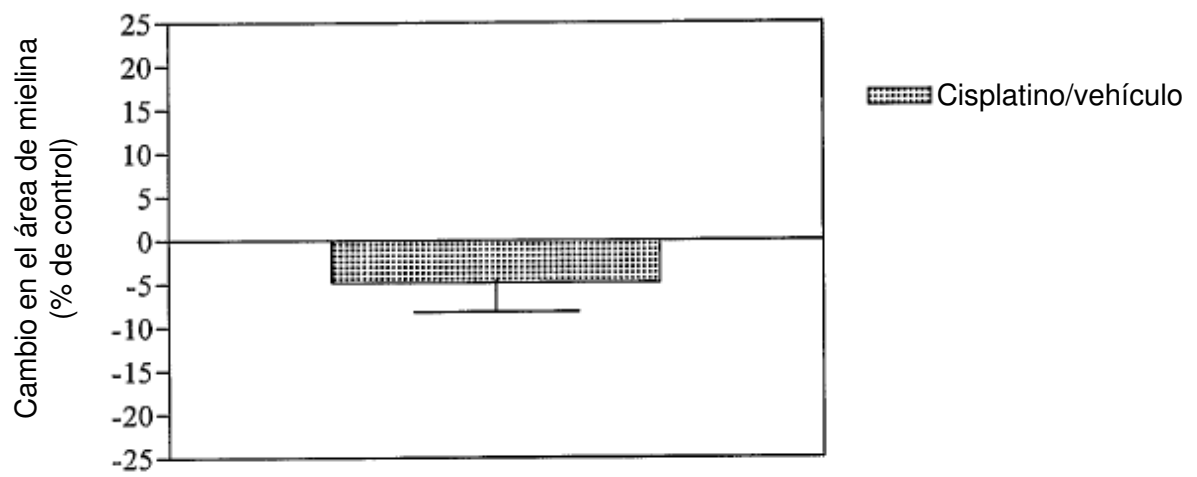


Figura 23

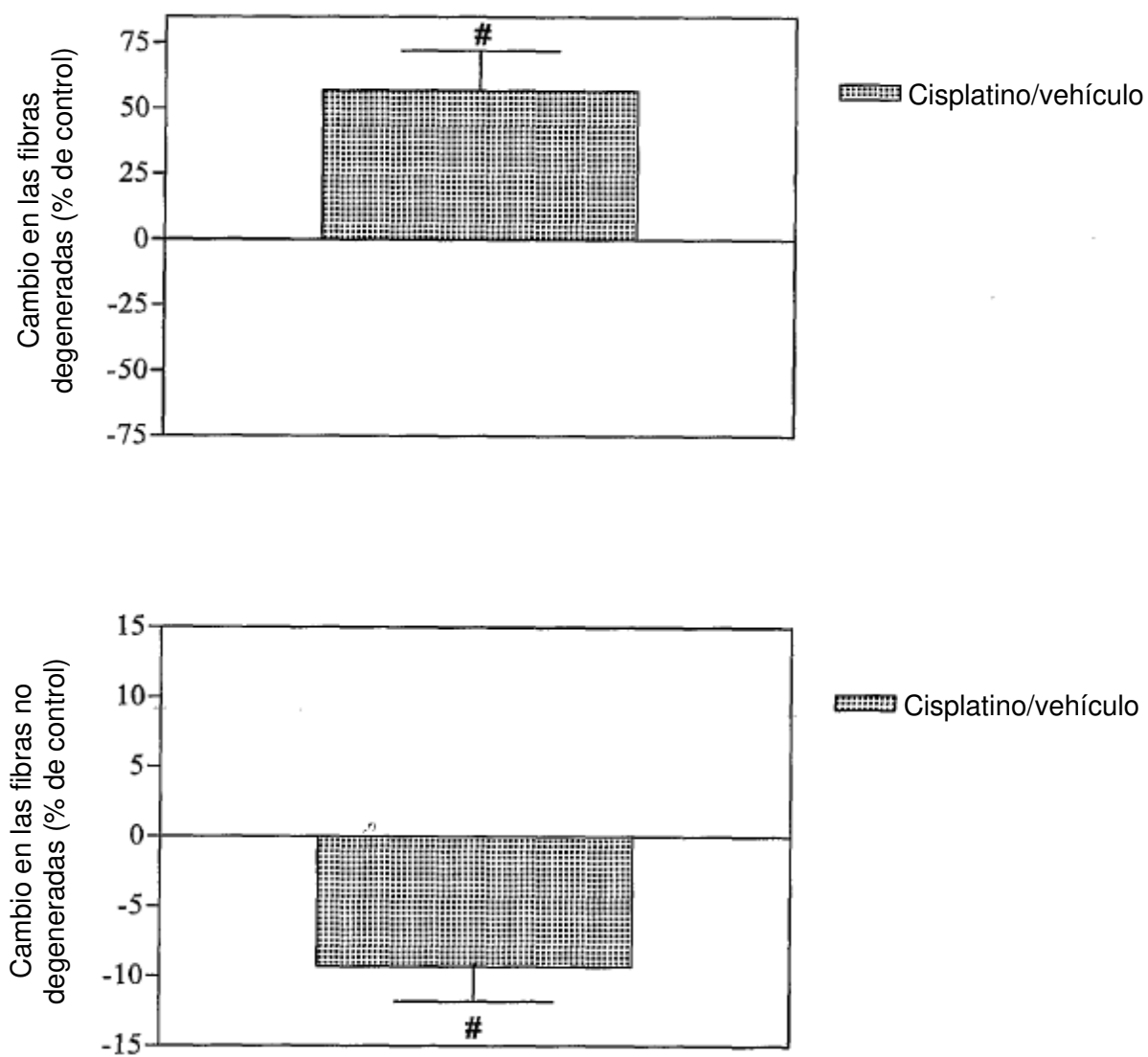


Figura 24

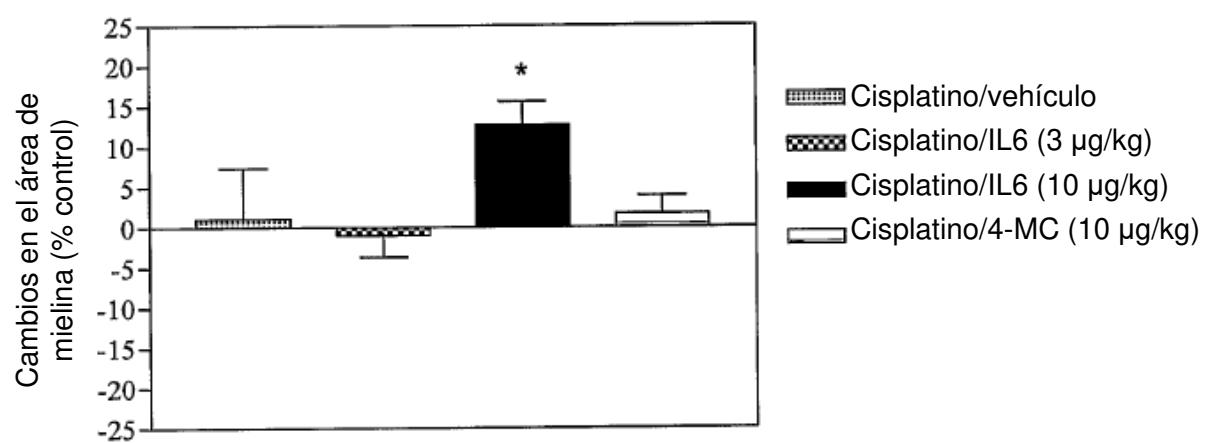


Figura 25

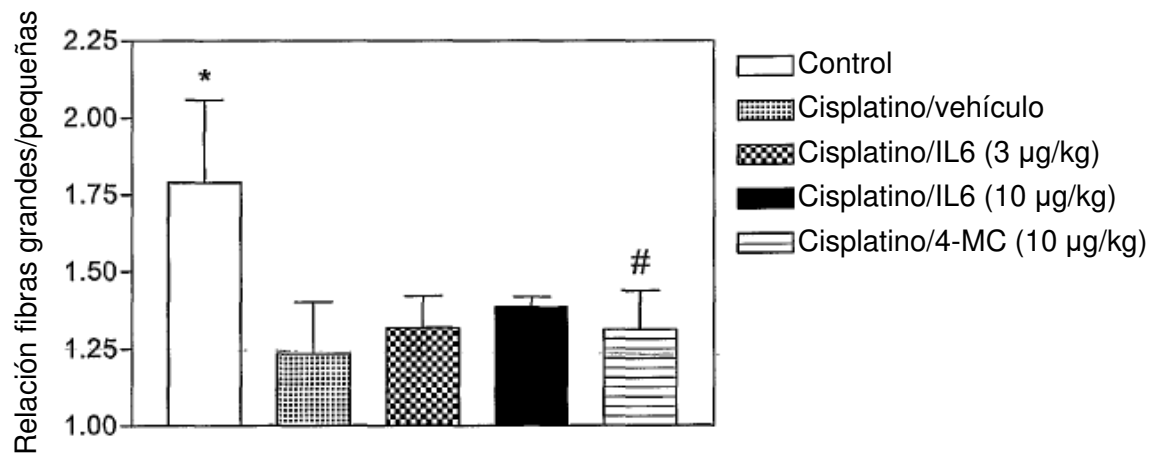
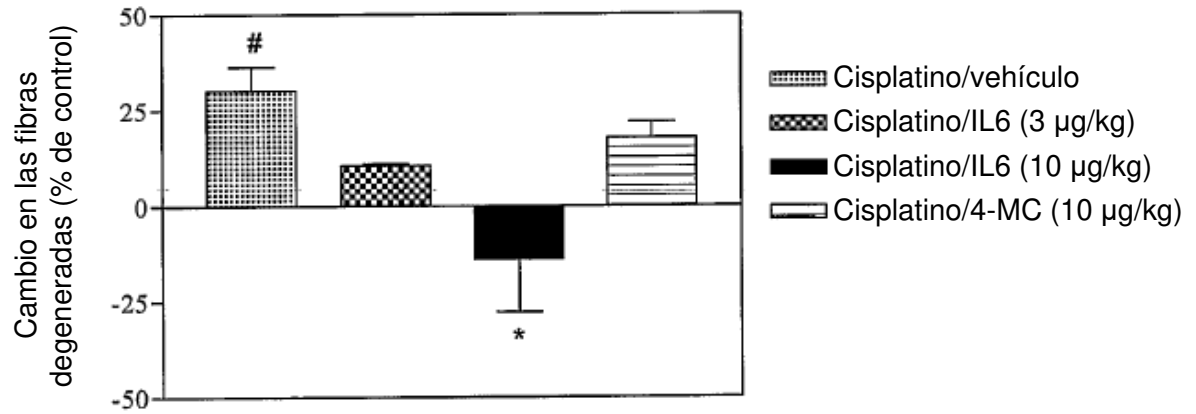


Figura 26

A



B

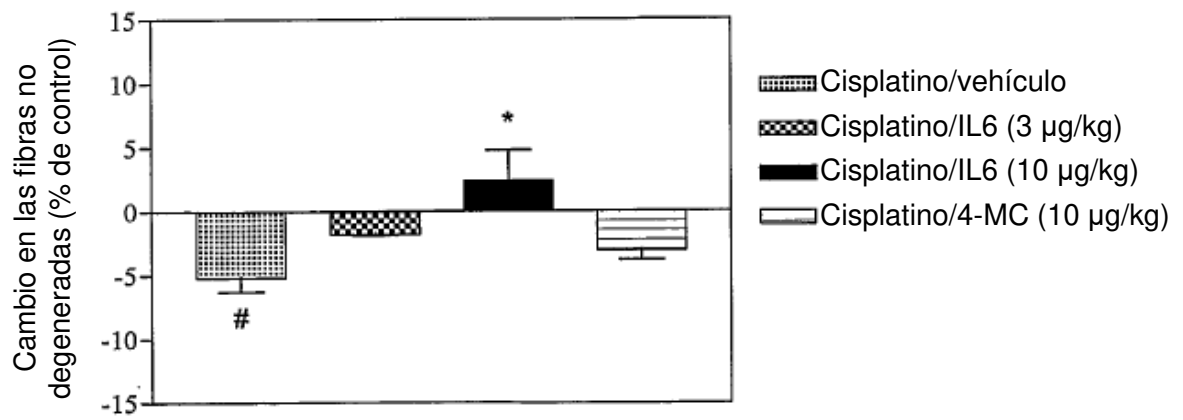


Figura 27

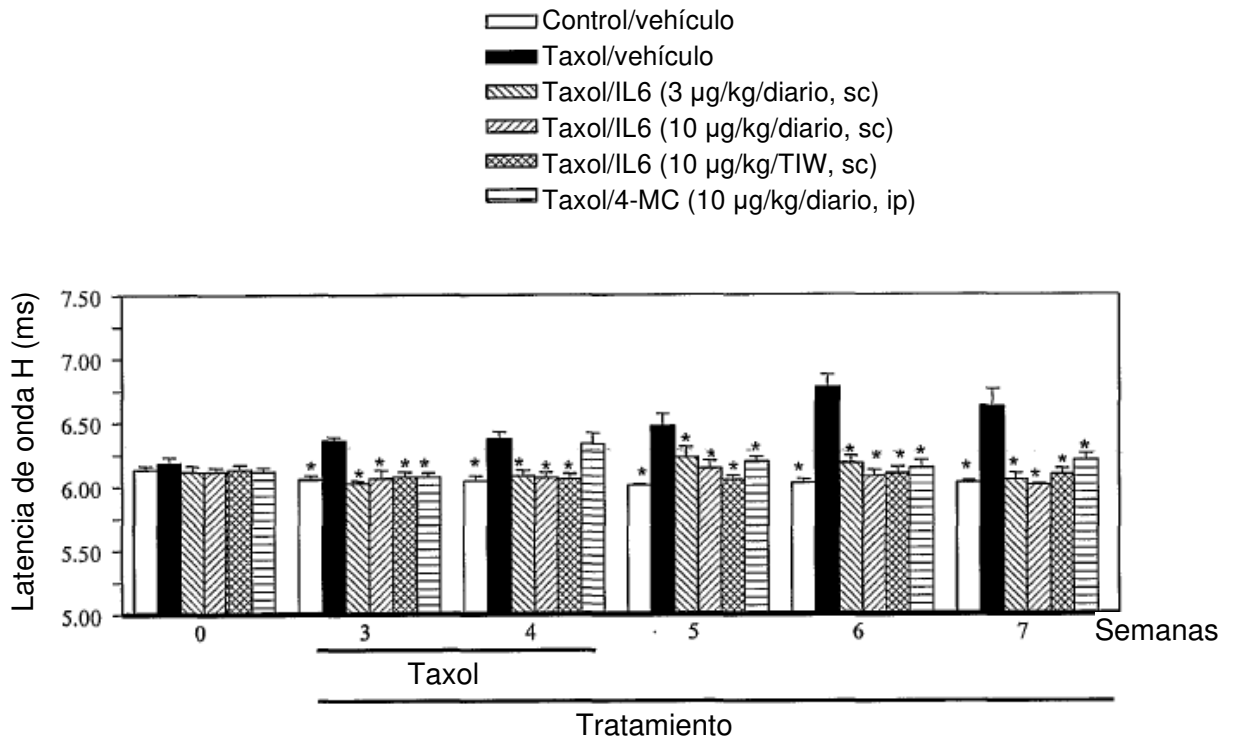


Figura 28

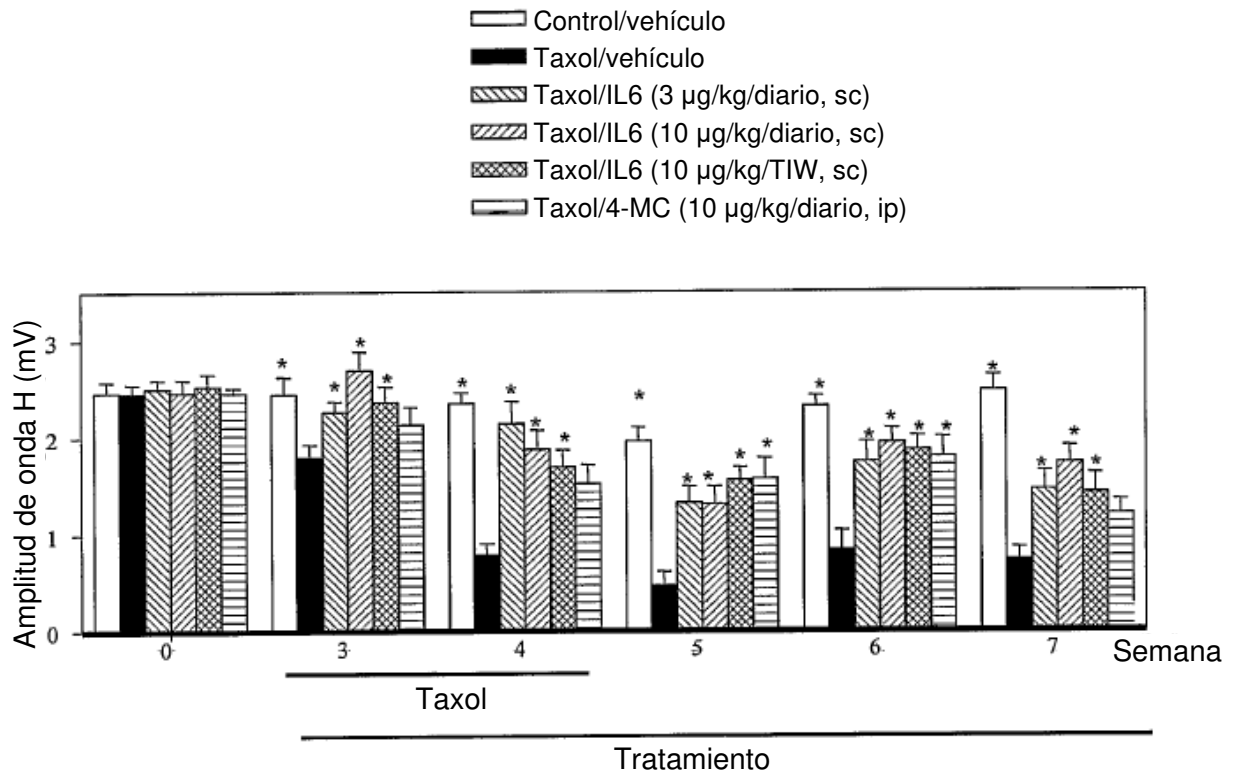


Figura 29

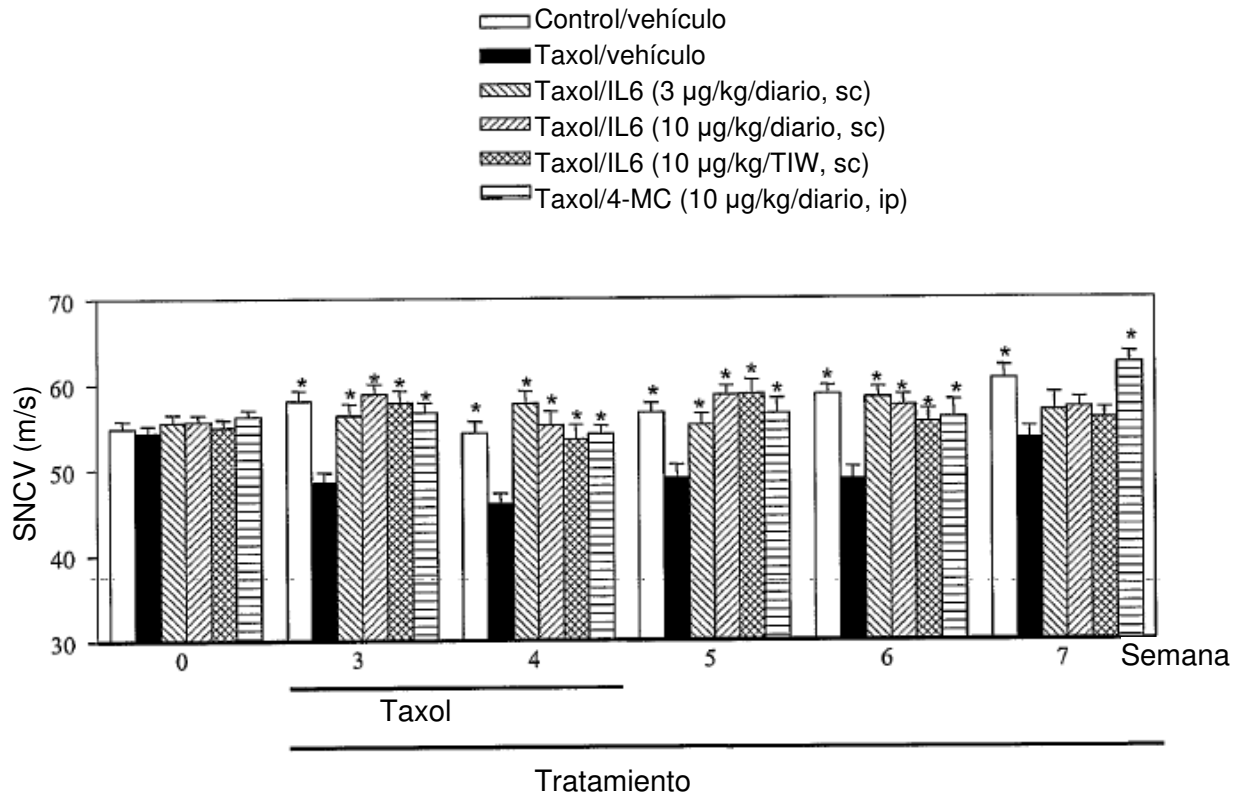


Figura 30

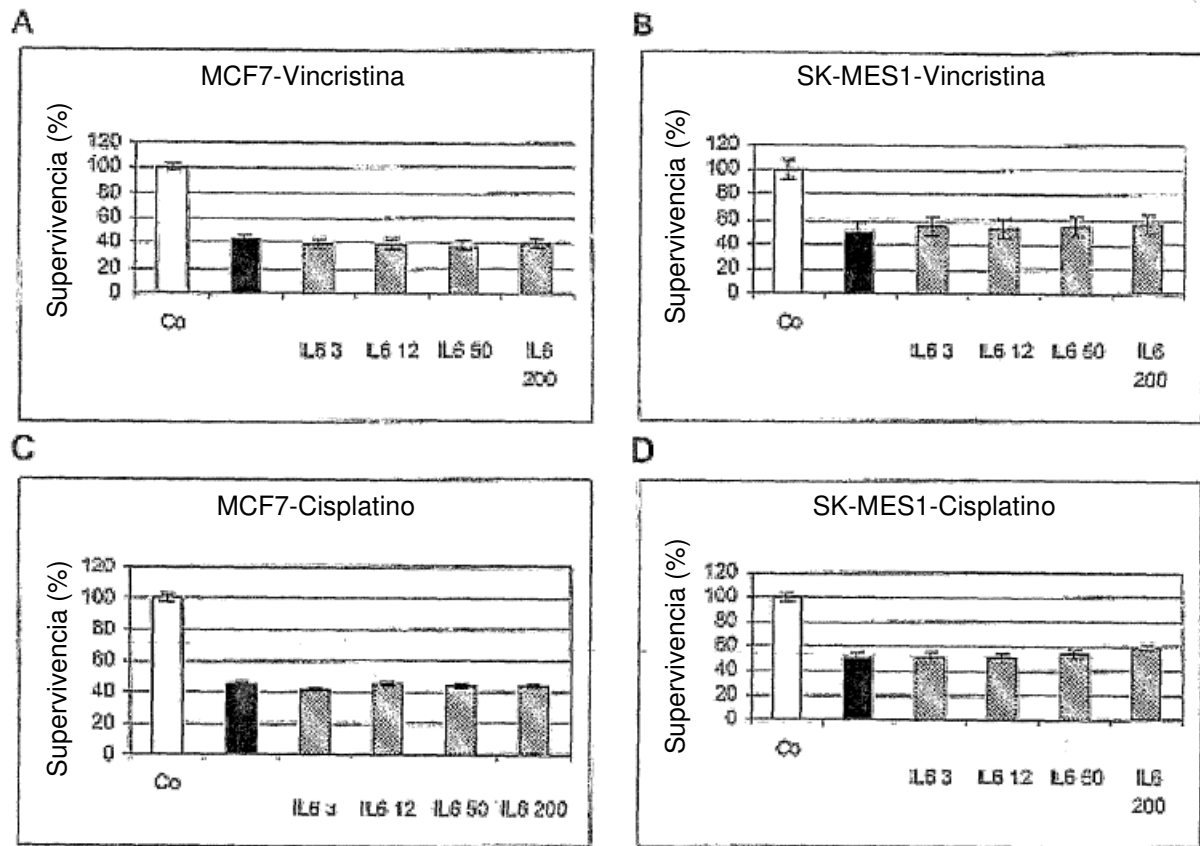


Figura 30 (continuación)

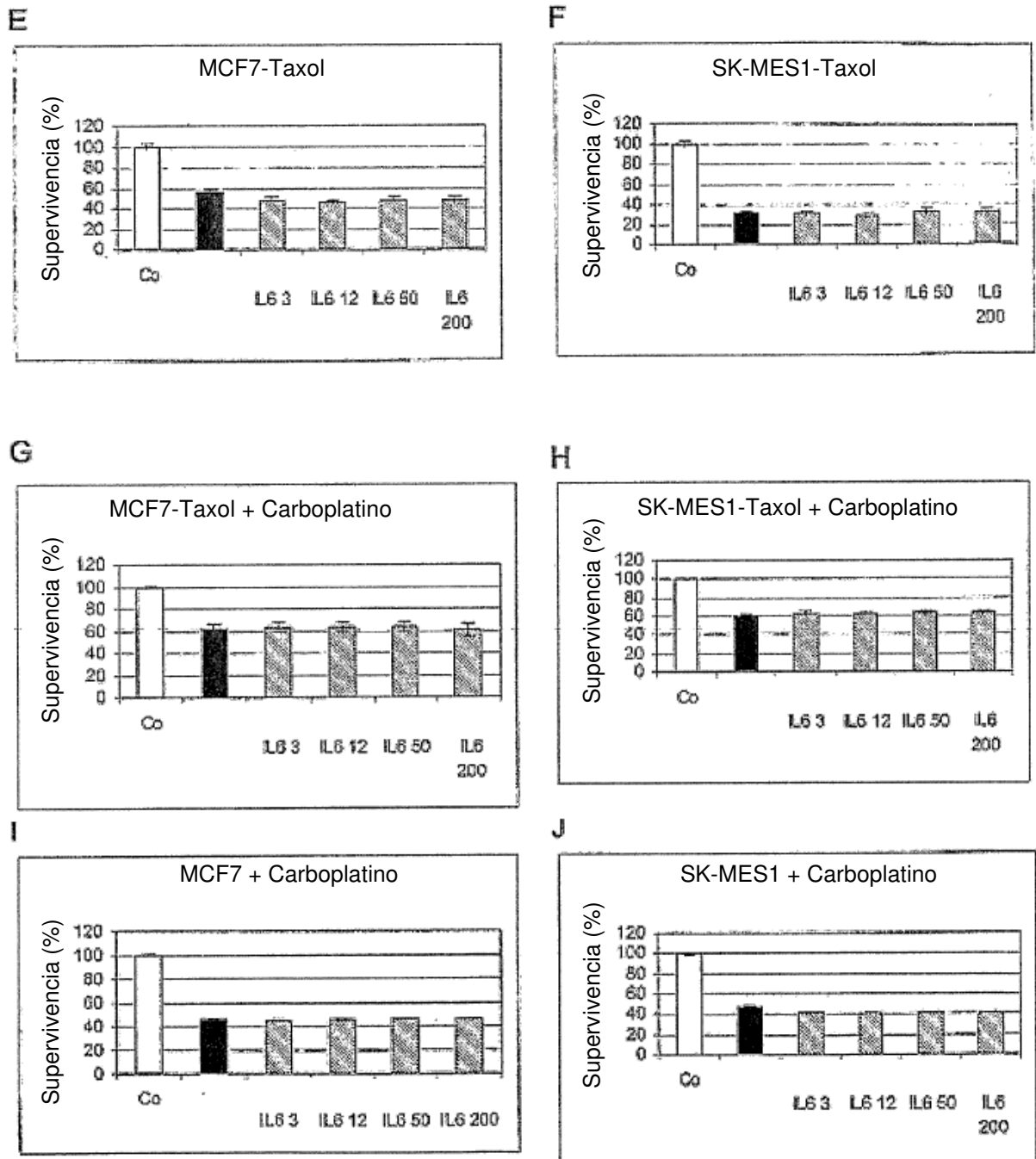


Figura 31

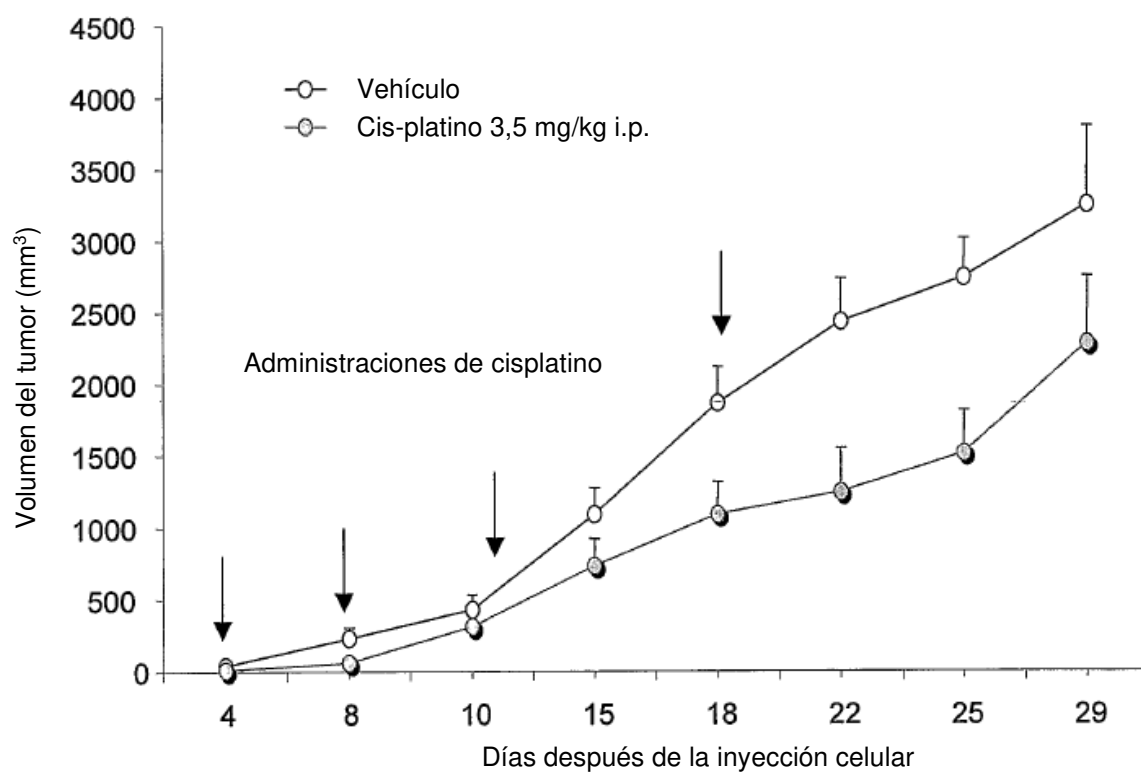


Figura 32

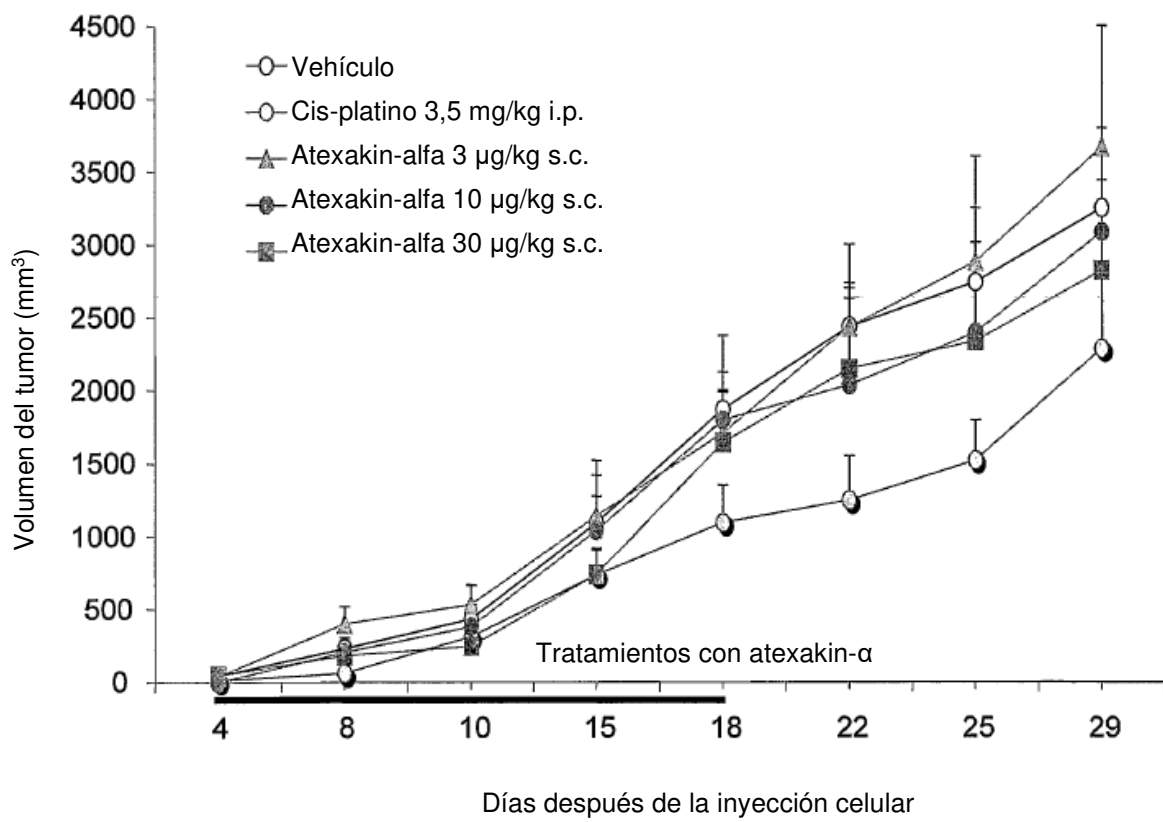


Figura 33

