

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 363 358**

21 Número de solicitud: 200900928

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **03.04.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2011**

Fecha de la concesión: **11.06.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **21.06.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
21.06.2012

73 Titular/es:

FUNDACIÓ INSTITUT DE RECERCA HOSPITAL

UNIVERSITARI VALL D'HEBRON (Titular al 23.65%)

PASSEIG VALL D'HEBRON, 119-129

08035 BARCELONA, ES

FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUCIÓ CATALANA DE

RECERCA I ESTUDIS AVANÇATS (Titular al 21.35%) **y**

FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT D'INVESTIGACIÓ

ONCOLÓGICA VALL D'HEBRON (Titular al 55%)

72 Inventor/es:

SEOANE SUAREZ, JOAN y

PEÑUELAS PRIETO, SILVIA

74 Agente/Representante:

Arias Sanz, Juan

54 Título: **AGENTES TERAPÉUTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES ASOCIADAS CON UNA PROLIFERACIÓN CELULAR INDESEABLE.**

57 Resumen:

La invención se basa en la observación de que LIF es capaz de activar la auto-renovación de células troncales tumorales en gliomas, lo que indica que la inhibición de LIF y, en general, de citoquinas de tipo IL-6, puede ser usada en composiciones terapéuticas para el tratamiento de enfermedades asociadas con una proliferación indeseable. La invención también se relaciona con un método para la identificación de compuestos capaces de bloquear/inhibir la proliferación de células troncales así como con un método in vitro para el diagnóstico de enfermedades asociadas con una proliferación celular indeseable en un sujeto o para determinar la predisposición de un sujeto a padecer dicha enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable.

ES 2 363 358 B1

DESCRIPCIÓN

Agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades asociadas con una proliferación celular indeseable.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona, en general, con inhibidores de la expresión y/o actividad de una citoquina de tipo IL-6 para el tratamiento de enfermedades asociadas con una proliferación celular no deseada, más en particular, para el cáncer y las células madre tumorales. Asimismo, también se describe un método para el diagnóstico de dichas enfermedades.

Estado de la técnica

Recientemente, una subpoblación de células tumorales con propiedades similares a las células madre se ha identificado en cáncer. Se considera que esta población celular, denominada células madre de cáncer (*cancer stem cells*) son responsables del inicio, propagación y recurrencia de los tumores, indicando que las terapias más efectivas procederán de terapias dirigidas al compartimento de células madre tumorales. Todavía se conoce poco respecto a las características moleculares y mecanismos reguladores que controlan la biología de las células madre tumorales. Uno de los tumores en donde las células madre tumorales tienen un papel destacado es el glioma, las llamadas *glioma stem cells* o *glioma initiating cells* (GICs).

GICs se caracterizan por su alto potencial oncogénico, su capacidad de autorrenovación y su capacidad de diferenciarse en múltiples líneas celulares. El número de células similares a células madre en un tumor está regulado por su capacidad de autoregeneración. GICs y, en general, células madre de cáncer sufren divisiones simétricas y asimétricas por las cuales una célula progenitora genera dos idénticas copias de ella misma o una copia de la célula progenitora y una célula más diferenciada (división asimétrica). La capacidad de autoregeneración de la célula madre de cáncer está regulada por el balance entre las divisiones simétricas y asimétricas y, la desregulación de los mecanismos que controlan dicha autorrenovación está muy probablemente implicada en la iniciación del tumor.

El glioma es el tumor primario más frecuente del cerebro y puede clasificarse en cuatro grados clínicos dependiendo de su histología y pronóstico. Los gliomas de grado IV (glioblastoma multiforme) son altamente agresivos y resistentes tanto a la radio como la quimioterapia. A pesar del progreso en la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la génesis y progresión del glioma, el pronóstico y el tratamiento de este tipo de tumor continúa siendo inefectivo. El tratamiento de elección para el glioma es la intervención quirúrgica. No obstante, el tratamiento quirúrgico suele ir acompañado de un tratamiento adyuvante farmacológico o mediante radioterapia. Los fármacos de elección para el tratamiento de glioma incluyen la combinación denominada PCV que comprende procarbazine, CCNU (lomustine) y vincristina, temozolomida en combinación con radioterapia.

Se considera que las GICs son las responsables del inicio, propagación y recurrencia de los tumores, indicando que las terapias más efectivas procederán de terapias dirigidas a compartimentos de células madre de gliomas. Un tumor no se erradicará si no se eliminan las GICs.

Por tanto, es necesario el disponer de tratamientos alternativos que eviten las desventajas de los tratamientos conocidos en el estado de la técnica y que puedan eliminar de manera eficiente las GICs.

Compendio de la invención

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un agente inhibidor de la expresión y/o la actividad de una citoquina de tipo IL-6 para tratamiento de enfermedades asociadas con una proliferación celular indeseable.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de acuerdo a la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable para el tratamiento de enfermedades asociadas con una proliferación celular indeseable.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la identificación de compuestos capaces de bloquear/inhibir la proliferación celular de células tumorales inducida por una citoquina de tipo IL-6 o una variante funcionalmente equivalente del mismo que comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto una célula que exprese el receptor para una citoquina de tipo IL-6 con una citoquina de tipo IL-6 y un compuesto candidato, e
- (ii) identificar aquellos compuestos que bloquean la proliferación celular de dicha célula.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para el diagnóstico de enfermedades asociadas con una proliferación celular indeseable en un sujeto o para determinar la predisposición de un sujeto a padecer

dicha enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable, o para determinar el estadio o severidad de dicha enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable en un sujeto, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto con dicha enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable, que comprende cuantificar los niveles de expresión del gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 o de la proteína codificada por dicho gen o variante funcionalmente equivalente de dicha proteína en una muestra biológica procedente de dicho sujeto, en donde un aumento de la expresión del gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 o de la proteína codificada por dicho gen o variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, con respecto a la expresión del gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 o de la proteína codificada por dicho gen o variante funcionalmente equivalente de dicha proteína en una muestra control, es indicativa de una enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable, o de mayor predisposición de dicho sujeto a padecer una enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable o de la no respuesta a la terapia administrada a dicho sujeto.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit que comprende reactivos para la cuantificación de los niveles de expresión del gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 o de la proteína codificada por dicho gen o variante funcionalmente equivalente de dicha proteína para el diagnóstico de cáncer en un sujeto o para determinar la predisposición de un sujeto a padecer dicho cáncer, o para determinar el estadio o severidad de dicho cáncer en un sujeto, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto con dicho cáncer, en donde, si los reactivos detectan un aumento en la expresión de dicho gen o dicha proteína o variante funcionalmente de la misma respecto a una muestra control, entonces dicho sujeto puede padecer una enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable, o presenta mayor predisposición a padecer dicha enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable, o presenta mayor severidad de dicha enfermedad, o la terapia administrada no está siendo efectiva.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Efecto del TGF β sobre la auto-renovación de G1C derivadas de pacientes. (A) imágenes representativas de PCTCs y neuroesferas de GBM generadas de muestras de 3 pacientes diferentes de GBM (GBM1, GBM2, GBM3). (B) Se determinaron *Musashi-1* (*Msi-1*), *Sox2*, *Nestina* y β -actina mediante análisis de RT-PCR de PCTCs y neuroesferas de 3 muestras de GBM humanas. (C) Se inocularon intracranealmente 100.000 células de PCTCs o neuroesferas (*nsph.*) obtenidas de muestras de tumores de GBM1, GBM2 y GBM3 en tres ratones Balbc *nu/nu* en cada caso. Se realizaron estudios de imágenes por resonancia magnética (MRI) en los días 30-40 en cada ratón. Las imágenes representan un ejemplo de ratones inoculados con células de PCTCs o neuroesferas obtenidas a partir de GBM1. Los ratones se pesaron dos veces por semana. El gráfico representa ratones inoculados con células derivadas de GBM1. (D y E) Se incubaron células de neuroesferas de los GBM indicados en ausencia de factores de crecimiento con TGF β 1 100 pM y/o inhibidor de T β R1 2 μ M durante 7 días y se determinaron el número de neuroesferas nuevamente formadas (D) y el número total de células (E). (F) Imágenes representativas de neuroesferas de GBM1 tratadas como se indica en D y E.

Figura 2. Inmunocitoquímica de los marcadores indicados en neuroesferas derivadas de GBM1, y neuroesferas diferenciadas en suero derivadas de GBM1.

Figura 3. TGF β induce la expresión de LIF en PCTCs y neuroesferas de GBM. (A) Se trataron o se dejaron sin tratar células de PCTCs de las 11 muestras de GBM humanos indicados (GBM1-11) con TGF β 1 100 pM durante 3 horas en medio sin suero, y se determinaron los niveles de expresión de LIF mediante qRT-PCR. Se determinó la β -actina como un control interno de normalización. (B) Se trataron células de neuroesferas de GBM como en A y se determinaron los niveles de expresión de LIF mediante qRT-PCR como en A. (C) Se incubaron neuroesferas de GBM con TGF β 1 100 pM y/o inhibidor de T β R1 2 μ M durante 3 horas en medio sin suero y se determinaron los niveles del ARNm de LIF mediante qRT-PCR como en A. (D) Se incubaron neuroesferas de GBM1 con TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3 100 pM durante 3 horas en medio sin suero y se determinaron los niveles del ARNm de LIF mediante qRT-PCR como en A. (E) Se determinaron los niveles de proteína LIF secretada mediante ELISA en neuroesferas de GBM1 tras 48 horas de tratamiento con TGF β 1 100 pM.

Figura 4. TGF β induce la transcripción de LIF a través de un complejo Smad activado. (A) Esquemas de las construcciones indicadoras LIF luciferasa. (B) Se transfectaron células A172 de glioma con las construcciones indicadoras de LIF luciferasa (-634/+32), (-276/+32), (-276/+32) mutSBE o (-73/+32). 16 horas después de la transfección, las células se trataron con TGF β 1 100 pM durante 20 horas y se analizaron para la actividad luciferasa. (C) Se trataron células U373MG con TGF β 1 100 pM durante 3 horas, y se realizaron ensayos de ChIP con los anticuerpos indicados y los cebadores de PCR indicados. (D, E) Se determinaron los niveles de LIF mediante análisis de qRT-PCR en U373MG (D) o neuroesferas de GBM (E) tratadas con TGF β 1 100 pM durante 3 horas tras silenciamiento mediado por ARNip de los miembros de la familia Smad indicados. Se realizó inmunotransferencia usando anticuerpos específicos contra Smads o qRT-PCR de *Smad4*. Se determinó la β -actina como un control interno de normalización.

Figura 5. TGF β induce la vía LIF-JAK.-STAT en neuroesferas de GBM derivadas de pacientes. (A) Se determinaron los niveles de p-STAT3 y STAT3 mediante inmunotransferencia de neuroesferas de la muestra de GBM1 tratadas con LIF 20 ng/ml durante los períodos de tiempo indicados. (B) Se trataron las neuroesferas de la muestra de GBM1 con LIF 20 ng/ml y/o P6 0,5 μ M durante 15 minutos y se determinaron los niveles de p-STAT3 y STAT3 total mediante inmunotransferencia. (C) Se trataron las neuroesferas de la muestra de GBM1 con TGF β 1 100 pM o el inhibidor de T β R1 2 μ M durante 4 horas en ausencia de EFG y FGF y se determinaron los niveles de p-STAT3, STAT3, p-

Smad2, Smad2 y α -tubulina mediante inmunotransferencia. (D) Se trataron las neuroesferas de la muestra de GBM1 con TGF β 1 100 pM, P6 0,5 μ M o el anticuerpo bloqueante contra LIF durante 4 horas en ausencia de EGF y FGF y se determinaron los niveles de p-STAT3 y STAT3 total mediante inmunotransferencia.

Figura 6. LIF media el aumento de auto-renovación de GIC por TGF β . (A, B) Se trataron células de neuroesferas de GBM1, GBM2 y GBM3 con TGF β 1 100 pM, LIF 20 ng/ml y/o anticuerpo neutralizante anti-LIF y P6 0,5 μ M en ausencia de EGF y FGF y se determinó el número de neuroesferas nuevamente formadas (A) o el número total de células (B). (C) Imágenes representativas de neuroesferas de GBM1 tratadas como se indica en A y B.

Figura 7. TGF β y LIF previenen la diferenciación de neuroesferas de GBM. (A) Se realizó inmunocitoquímica de las proteínas indicadas en neuroesferas derivadas de GBM1 tratadas con TGF β 1 100 pM ó LIF 20 ng/ml durante 7 días en ausencia de factores de crecimiento y los 3 últimos días sobre cubreobjetos recubiertos de poli-L-lisina. (B) Se determinaron los niveles de ARNm de *Musashi-1* (*Msi-1*), *Sox2* y *Nestina* en neuroesferas de GBM1 después de 7 días de los tratamientos indicados sin factores de crecimiento. Los niveles del ARN de *18S* se usaron como un control interno de normalización.

Figura 8. Efecto de TGF β sobre la capacidad de auto-renovación de neuroprogenitores humanos normales. (A) Se realizó inmunocitoquímica de los marcadores indicados en neuroesferas de neuroprogenitores humanos. (B) Se incubaron neuroesferas de la muestra de GBM1 y de neuroprogenitores humanos con los miembros de la familia de TGF β indicados 100 pM durante 3 horas y se determinaron los niveles del ARNm de *LIF*. (C, D) Se incubaron células de neuroesferas de neuroprogenitores humanos normales en las mismas condiciones que se han descrito previamente en la Figura ID en presencia de TGF β 1 100 pM o LIF 20 ng/ml durante 7 días y se determinaron el número de neuroesferas nuevamente formadas (C) y el número total de células (D).

Figura 9. Expresión de LIF en tumores de glioma humano. (A) Se determinaron los de transcritos de *LIF*, *TGF β 2*, *Musashi-1* (*Msi-1*), *Sox2* y *Nestina* mediante análisis de qRT-PCR en 39 muestras derivadas de pacientes de gliomas humanos. (B) Correlaciones entre *LIF* y *TGF β 2*, *Musashi-1* (*Msi-1*), *Sox2* o *Nestina*. Coeficiente de correlación de Spearman (*Rho*), significancia de dos colas. (C) El TGF β fomenta la auto-renovación de GSC mediante la inducción de LIF aumentando la cantidad del conjunto de células similares a células troncales dentro de la masa tumoral.

Descripción detallada de la invención

Métodos terapéuticos de la invención

Los autores de la presente invención han encontrado que, sorprendentemente, una citoquina de tipo IL-6, más concretamente LIF, está implicada en la activación de la cascada JAK-STAT mediada por TGF β induciendo de este modo el proceso de proliferación celular y el aumento de células madre tumorales (*cancer stem cells*). En base a este hecho, los inventores han abierto una nueva ventana terapéutica para el tratamiento de enfermedades asociadas con una proliferación celular indeseable como por ejemplo, cáncer y, especialmente, para el tratamiento del cáncer causado por una actividad elevada de la vía de señalización JAK-STAT, estando dicha terapia basada en el uso de inhibidores de citoquinas de tipo IL-6. Adicionalmente, la identificación de LIF como elemento “down-stream” a TGF β en la activación de JAK-STAT permite una inhibición más eficiente de dicha cascada JAK-STAT puesto que impide su activación no sólo cuando ésta se activa por TGF β , sino por cualquier otro estímulo tal como interleuquinas, eritropoietina, hormona del crecimiento, prolactina y similares.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un agente inhibidor de la expresión y/o la actividad de una citoquina de tipo IL-6 para tratamiento de enfermedad asociadas con una proliferación celular indeseable.

Sin querer estar vinculado a ninguna teoría, se piensa que el efecto de LIF y de sus inhibidores sobre la proliferación de tumorales radica en la capacidad de LIF de promover la proliferación de células madre tumorales. De esta forma, el tratamiento con inhibidores de LIF estaría especialmente indicado en aquellos tumores en los que existe una expresión elevada de la citoquina de tipo IL-6 y, más concretamente, en LIF. También sería de interés para el tratamiento de tumores resistentes a quimioterapia dado la conocida capacidad de las células madre tumorales de ser resistentes a la quimioterapia. Por último, dado que las células madre tumorales parecen ser las responsables de las recidivas, el uso de inhibidores de LIF para el tratamiento de enfermedades asociadas con una proliferación celular indeseable sería particularmente adecuado para impedir la aparición de recidivas.

Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un agente inhibidor de la expresión y/o la actividad de una citoquina de tipo IL-6 para el tratamiento de enfermedad asociadas con una proliferación celular indeseable.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para el tratamiento de enfermedades asociadas con una proliferación celular indeseable que comprende la administración de un agente inhibidor de la expresión y/o la actividad de una citoquina de tipo IL-6.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un agente inhibidor de la expresión y/o la actividad de una citoquina de tipo IL-6 para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedad asociadas con una proliferación celular indeseable.

En el contexto de la presente invención, se entiende por “citoquina de tipo IL-6” a una citoquina miembro de la familia de la IL-6, que comprende IL-6, IL-11, factor inhibidor de la leucemia (LIF), oncostatina M (OSM), cardiotrofina-1 (CT-1), el factor neurotrófico ciliar (CNTF) y la citoquina similar a la cardiotrofina (CLC) y que activa la vía de señalización de Jak-STAT. Estas citoquinas comparten el mismo complejo receptor en la que la subunidad del receptor glicoproteína-130 (gp-130) es un constituyente común.

Por tanto, en una realización particular de la invención, la citoquina de tipo IL-6 se selecciona entre LIF, IL-6, IL-11, oncostatina M, cardiotrofina-1, CNTF y CLC. En otra realización todavía más particular, la citoquinas de tipo IL-6 es LIF.

En el contexto de la presente invención se entiende por “agente inhibidor”, cualquier sustancia o compuesto que sea capaz de impedir o bloquear la transcripción y la traducción de un gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 (es decir, impedir o bloquear la expresión de dicho gen), o que sea capaz de impedir que la proteína codificada por dicho gen realice su función (actividad), es decir, impedir que una citoquina de tipo IL-6 pueda inducir la activación de la vía de señalización de JAK-STAT. Ensayos para determinar si un compuesto es un agente inhibidor de una citoquina de tipo IL-6 son ampliamente conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, Mezt S. *et al.* (J. Biol. Chem, 2007, vol. 282:1238-1248) describen un ensayo basado en la capacidad del inhibidor de bloquear la expresión de un gen reportero que se encuentra bajo el control de un promotor sensible a una citoquina de IL-6. En el caso específico de LIF, ensayos para la identificación de agente inhibidores incluyen la inhibición de la diferenciación de células de leucemia mieloide murinas M1 en ausencia de LIF (WO2005/30803), inhibición de la estimulación de la liberación de calcio de células Jurkat (US5980894), medida de la fosforilación de STAT-3 por citoquina de tipo IL-6 (ver Ejemplo 2, apartado 2.4 de los ejemplos de la presente memoria), etc.

A modo ilustrativo, agentes inhibidores de la expresión de LIF adecuados para su uso en la presente invención son, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, ARNs de interferencia (ARNiPs), ARNs catalíticos o ribozimas específicos, ARN con actividad “*decoy*”, es decir, con capacidad para unirse específicamente a un factor (proteico generalmente) importante para la expresión del gen, etc. Asimismo, agentes inhibidores capaces de impedir que la proteína codificada por dicho gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 realice su función son, por ejemplo, péptidos inhibidores de la proteína, anticuerpos dirigidos específicamente contra epítomos de la proteína esenciales para desempeñar su función, o contra los receptores de las citoquinas de tipo IL-6, etc.

Por tanto, en una realización particular de la invención, el agente inhibidor se selecciona del grupo formado por ARNiPs, oligonucleótidos antisentido, ribozimas específicos, anticuerpos, polipéptidos e inhibidores del receptor de la citoquina de tipo IL-6.

ARNip

Los ARN de interferencia pequeños o ARNip (siRNA en su denominación en inglés) son agentes que son capaces de inhibir la expresión de un gen diana mediante interferencia de ARN. Un ARNip se puede sintetizar químicamente, se puede obtener mediante transcripción *in vitro* o se puede sintetizar *in vivo* en la célula diana. Típicamente, los ARNip consisten en una cadena doble de ARN de entre 15 y 40 nucleótidos de longitud y que puede contener una región protuberante 3' y/o 5' de 1 a 6 nucleótidos. La longitud de la región protuberante es independiente de la longitud total de la molécula de ARNip. Los ARNip actúan mediante la degradación o el silenciamiento post-transcripcional del mensajero diana.

Los ARNip pueden ser los llamados shRNA (short hairpin RNA) caracterizados por que las cadenas antiparalelas que forman el ARNip están conectadas por una región bucle u horquilla. Estos ARNip están compuestos de una secuencia antisentido corta (de 19 a 25 nucleótidos), seguida de un bucle de entre 5 y 9 nucleótidos a la que sigue la cadena sentido. Los shRNAs pueden estar codificados por plásmidos o virus, particularmente retrovirus y, más particularmente, retrovirus y estar bajo el control de promotores tales como el promotor U6 de la ARN polimerasa III.

Los ARNip de la invención son sustancialmente homólogos al ARNm del gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 o a la secuencia genómica que codifica dicha proteína. Por “sustancialmente homólogos” se entiende que tienen una secuencia que es suficientemente complementaria o similar al ARNm diana de forma que el ARNip sea capaz de provocar la degradación de éste por interferencia de ARN. Los ARNip adecuados para provocar dicha interferencia incluyen ARNip formados por ARN, así como ARNip que contienen distintas modificaciones químicamente tales como:

- ARNip en los que los enlaces entre los nucleótidos son distintos a los que aparecen en la naturaleza, tales como enlaces fosforotioato.
- conjugados de la cadena de ARN con un reactivo funcional, tal como un fluoróforo.
- Modificaciones de los extremos de las cadenas de ARN, en particular el extremo 3' mediante la modificación con distintos grupos funcionales del hidroxilo en posición 2'.

- Nucleótidos con azúcares modificados tales como restos O-alkilados en posición 2' tales como 2'-O-metilribosa p 2'-O-fluorosibosa.
- Nucleótidos con bases modificadas tales como bases halogenadas (por ejemplo 5-bromouracilo y 5-iodouracilo), bases alquiladas (por ejemplo 7-metilguanósina).

Los ARNip y ARNsh de la invención se pueden obtener usando una serie de técnicas conocidas para el experto en la materia. Por ejemplo, el ARNip puede ser sintetizado químicamente a partir de ribonucleósidos protegidos con forsforamiditas en un sintetizador de ADN/ARN convencional. Alternativamente, los ARNip pueden ser producidos de forma recombinante a partir de vectores plasmídicos y virales en cuyo caso la región que codifica la cadena o cadenas que forman los ARNip se encuentran bajo control operativo de promotores de ARN polimerasa III. En las células, la ARNase Dicer procesa los ARNsh en ARNip funcionales.

La región de la secuencia de nucleótidos que se toma como base para diseñar los ARNip no es limitante y puede contener una región de la secuencia codificante (entre el codón de iniciación y el codón de terminación) o, alternativamente, puede contener secuencias de la región no traducida 5' o 3' es, preferentemente de entre 25 y 50 nucleótidos de longitud y en cualquier posición en posición 3' con respecto al codón de iniciación. Una forma de diseñar un ARNip implica la identificación de los motivos AA(N₁₉)TT en donde N puede ser cualquier nucleótido en la secuencia que codifica una citoquina de tipo IL-6 y seleccionando aquellos que presenten un alto contenido en G/C. Si no se encuentra dicho motivo, es posible identificar el motivo NA(N₂₁), en donde N puede ser cualquier nucleótido.

Oligonucleótidos antisentido

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de ácidos nucleicos "antisentido" aislados para inhibir la expresión, por ejemplo inhibiendo la transcripción y/o traducción de un ácido nucleico que codifica la citoquina de tipo IL-6 cuya actividad se desea inhibir. Los ácidos nucleicos antisentido se pueden unir a la diana potencial de la droga mediante complementariedad de bases convencional, o, por ejemplo, en el caso de unirse a ADN bicatenario, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. En general, estos métodos se refieren al rango de técnicas generalmente empleados en la técnica, e incluyen cualquier método que se basa en la unión específica a secuencias de oligonucleótidos.

Una construcción antisentido de la presente invención se puede distribuir, por ejemplo, como un plásmido de expresión que, cuando se transcribe en la célula, produce ARN que es complementario a al menos una parte única del ARNm celular que codifica una citoquina de tipo IL-6. De forma alternativa, la construcción antisentido es una sonda de oligonucleótidos, que se genera *ex vivo* y que, cuando se introduce en la célula produce inhibición de la expresión hibridando con el ARNm y/o secuencias genómicas de un ácido nucleico diana. Tales sondas de oligonucleótidos son preferiblemente oligonucleótidos modificados, que son resistentes a las nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas, y que son por lo tanto estables *in vivo*. Moléculas de ácidos nucleicos ejemplares para su uso como oligonucleótidos antisentido son análogos de ADN de fosforamidato, fosfotionato y metilfosfonato (ver también las patentes de EE.UU. Nos. 5176996; 5264564; y 5256775). Adicionalmente, se han revisado las aproximaciones generales para construir oligómeros útiles en la terapia antisentido, por ejemplo, en Van der Krol *et al.*, BioTechniques 6: 958-976, 1988; y Stein *et al.*, Cancer Res 48: 2659-2668, 1988.

Respecto al ADN antisentido, son preferidas las regiones de oligodesoxirribonucleótidos derivadas del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre -10 y +10 del gen diana. Las aproximaciones antisentido implican el diseño de oligonucleótidos (bien ADN bien ARN) que son complementarios al ARNm que codifica el polipéptido diana. Los oligonucleótidos antisentido se unirán a los transcritos de ARNm y prevendrán la traducción. La complementariedad absoluta, aunque preferida, no se requiere. En el caso de ácidos nucleicos antisentido de cadena doble, se puede ensayar así un cadena sencilla del ADN bicatenarios, o se puede ensayar la formación de tricatenarios. La capacidad de hibridar dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, cuanto más largo sea el ácido nucleico que hibrida, más errores de emparejamiento con un ARN puede contener y todavía forma un dúplex estable (o triplex, como puede ser el caso). El experto en la materia puede determinar un grado tolerable de errores de emparejamiento mediante el uso de procedimientos estándar para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

Los oligonucleótidos que son complementarios al extremo 5' del ARNm, por ejemplo la secuencia 5' no traducida hasta e incluyendo el codón de iniciación AUG, deberían funcionar de la forma más eficaz para inhibir la traducción. Sin embargo, se ha mostrado recientemente que las secuencias complementarias a las secuencias 3' no traducidas de los ARNm también son eficaces para inhibir la traducción de los ARNms (Wagner, Nature 372: 333, 1994). Por lo tanto, se podrían usar oligonucleótidos complementarios bien a las regiones 5' ó 3' no traducidas, no codificantes de un gen en una aproximación antisentido para inhibir la traducción de ese ARNm. Los oligonucleótidos complementarios a la región 5' no traducida del ARNm deberían incluir el complemento del codón de iniciación AUG. Los oligonucleótidos complementarios a las regiones codificantes del ARNm son inhibidores de la traducción menos eficaces pero también se podrían usar según la invención. Si diseñado para hibridar con la región 5', 3' o codificante del ARNm, los ácidos nucleicos antisentido deberían tener al menos seis nucleótidos de longitud, y tener preferiblemente menos de alrededor de 100 y más preferiblemente menos de alrededor de 50, 25, 17 ó 10 nucleótidos de longitud.

Se prefiere que se realicen primero estudios *in vitro* para cuantificar la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de inhibir la expresión génica. Se prefiere que estos estudios utilicen controles que distinguen entre inhibición génica antisentido y efectos biológicos no específicos de los oligonucleótidos. También se prefiere que esos estudios comparen los niveles del ARN o proteína diana con el de un control interno de ARN o proteína. Los resultados obtenidos usando los oligonucleótidos antisentido se pueden comparar con los obtenidos usando un oligonucleótido control. Se prefiere que el oligonucleótido control sea aproximadamente de la misma longitud que el oligonucleótido a ensayar y que la secuencia del oligonucleótido difiera de la secuencia antisentido no más de lo que sea necesario para prevenir la hibridación específica al secuencia diana.

Los oligonucleótidos antisentido pueden ser de ADN ó ARN o mezclas químicas o derivados o versiones modificadas de los mismos, de cadena sencilla o de cadena doble. El oligonucleótido se puede modificar en el grupo de la base, el grupo del azúcar, o el esqueleto de fosfato, por ejemplo para mejorar la estabilidad de la molécula, hibridación etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos unidos tal como péptidos (por ejemplo, para dirigirlos a receptores de células huésped), o agentes para facilitar el transporte a través de la membrana celular (ver, por ejemplo, Letsinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556, 1989; Lemaitre *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652, 1987; Publicación de PCT No. WO88/09810) o la barrera hematoencefálica (ver, por ejemplo, publicación de PCT No. WO89/10134), agentes de corte desencadenado por hibridación (ver, por ejemplo, Krol *et al.*, BioTechniques 6: 958-976, 1988) agentes intercalantes (ver, por ejemplo, Zon, Pharm. Res. 5: 539-549, 1988). Para este fin, el oligonucleótido puede estar conjugado a otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente de entrecruzamiento desencadenado por hibridación, un agente transportador, agente de corte desencadenado por hibridación, etc.

Los oligonucleótidos antisentido pueden comprender al menos un grupo de base modificada que se selecciona del grupo que incluye pero no está limitado a 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxietil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina.

El oligonucleótido antisentido también puede comprender al menos un grupo azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye pero no está limitado a arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y hexosa. El oligonucleótido antisentido también puede contener un esqueleto semejante a péptido neutro. Tales moléculas se denominan oligómeros ácido nucleico peptídico (ANP) y se describen, por ejemplo, en Perry-O'Keefe *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 14670, 1996, y en Eglom *et al.*, Nature 365: 566, 1993. Una ventaja de los oligómeros ANP es su capacidad para unirse al ADN complementario esencialmente de forma independiente de la fuerza iónica del medio debido al esqueleto neutro del ADN. En aún otra forma de realización, el oligonucleótido antisentido comprende al menos un esqueleto de fosfato modificado seleccionado del grupo que consiste en un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforamidotioato, un fosforamidato, un fosfordiamidato, un metilfosfonato, un fosfotriéster de alquilo, y un formacetal o análogo de los mismos.

En todavía una forma de realización más, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido alfa-anomérico. Un oligonucleótido alfa-anomérico forma híbridos de cadena doble específicos con ARN complementario en los que, al contrario de la orientación antiparalela habitual, las hebras corren paralelas entre sí (Gautier *et al.*, Nucl. Acids Res. 15: 6625-6641, 1987). El oligonucleótido es un 2'-O-metilribonucleótido (Inoue *et al.*, Nucl. Acids Res. 15: 6131-6148, 1987), o un análogo químico ARN-ADN (Inoue *et al.*, FEBS Lett. 215: 327-330, 1987).

Mientras que se pueden usar oligonucleótidos antisentido complementarios a la región codificante de la secuencia diana de ARNm, también se pueden usar aquellos complementarios a la región transcrita no traducida.

En algunos casos, puede ser difícil alcanzar las concentraciones intracelulares del antisentido suficientes para suprimir la traducción de los ARNs endógenos. Por lo tanto una aproximación preferida usa una construcción de ADN recombinante en la que se coloca el oligonucleótido antisentido bajo el control de un promotor fuerte de pol III o pol II. El uso de tal construcción para transfectar células diana dará como resultado la transcripción de suficientes cantidades de ARNs de cadena sencilla que formarán pares de bases complementarias con los transcritos endógenos potenciales dianas de drogas y por lo tanto prevendrán la traducción. Por ejemplo, se puede introducir un vector de modo que se captado por una célula y dirija la transcripción de un ARN antisentido. Tal vector puede permanecer episomal o integrarse en el cromosoma, mientras se pueda transcribir para producir el ARN antisentido deseado. Tales vectores se pueden construir mediante métodos de tecnología de ADN recombinante estándar en la técnica. Los vectores pueden ser plásmidos, virales, u otros conocidos en la técnica, usados para la replicación y expresión en células de mamífero. La expresión de las secuencias que codifican para el ARN antisentido puede ser mediante cualquier promotor conocido en la técnica que actúe en células de mamífero, preferiblemente células humanas. Tales promotores pueden ser inducibles o constitutivos. Tales promotores incluyen pero no están limitados a: promotor de la región temprana del SV40 (Bernoist y Chambón, Nature 290: 304-310, 1981), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma Rous (Yamamoto *et al.*, Cell 22: 787-797, 1980), el promotor de la timidina quinasa de herpes (Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1441-1445, 1981), las secuencias reguladoras

del gen de la metalotioneína (Brinster *et al.*, Nature 296: 39-42, 1982), etc. Se puede usar cualquier tipo de plásmido, cósmido, YAC o vector viral para preparar la construcción de ADN recombinante, que se puede introducir directamente en el sitio del tejido.

De forma alternativa se puede reducir la expresión del gen diana dirigiendo secuencias de desoxirribonucleótidos complementarias a la región reguladora del gen (es decir, el promotor y/o potenciadores) para formar estructuras de triple hélice que previenen la transcripción del gen en las células diana en el cuerpo (ver en general, Helene, Anticancer Drug Des. 6(6): 569-84, 1991; Helene *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 660: 27-36, 1992; y Maher, Bioassays 14(12): 807-15, 1992).

Las moléculas de ácidos nucleicos que se van a usar en la formación de hélices triples para la inhibición de la transcripción son preferiblemente de cadena sencilla y compuestas de desoxirribonucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos debería fomentar la formación de hélices triples a través de las reglas de emparejamiento de bases de Hoogsteen, que generalmente requiere que estén presentes tramos bastante grandes de purinas o pirimidinas en una hebra de un dúplex. Las secuencias de nucleótidos pueden estar basadas en pirimidinas, que dará como resultado tripletes TAT y CGC a través de las tres hebras asociadas de la hélice triple resultante. Las moléculas ricas en pirimidina proporcionan complementariedad de bases a una región rica en purinas de una cadena sencilla del dúplex en una orientación paralela a dicha hebra. Además, se pueden elegir moléculas de ácido nucleico que sean ricas en purinas, por ejemplo, que contengan un tramo de residuos de G. Estas moléculas formarán una hélice triple con un ADN bicatenario que es rico en pares GC, en la que la mayoría de los residuos de purina están localizados en una cadena sencilla del dúplex diana, dando como resultado tripletes CGC a través de las tres hebras en el triples.

De forma alternativa, se pueden aumentar las secuencias diana potenciales que se pueden seleccionar para la formación de hélices triples, creando una molécula de ácido nucleico llamada "horquillada". Las moléculas horquilladas se sintetizan en un forma alternante 5'-3', 3'-5', de modo que forman par de bases primero con una hebra de un dúplex y luego con la otra, eliminando la necesidad de que esté presente un tramo bastante grande de purinas o pirimidinas en una hebra de un dúplex.

En ciertas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido son morfolinis antisentido. Los morfolinis son moléculas sintéticas que son el producto de un rediseño de una estructura natural de ácido nucleico. Normalmente de 25 bases de longitud, se unen a secuencias complementarias de ARN mediante emparejamiento de bases estándar de ácidos nucleicos. Estructuralmente, la diferencia entre los morfolinis y el ADN es que aunque los morfolinis tienen bases de ácidos nucleico estándar, esas bases se unen a anillos de morfolina en lugar de anillos de desoxirribosa, y se unen mediante grupos de fosforodiamidato en lugar de fosfatos. El cambio de fosfatos aniónicos por los grupos fosforodiamidato neutros elimina la ionización en el intervalo de pH fisiológico normal, de modo que los morfolinis en células u organismos son moléculas no cargadas. Los morfolinis no son oligos quiméricos; el esqueleto entero de un morfolino está hecho de estas subunidades modificadas. Los morfolinis se usan de forma más común como oligos de cadena sencilla, aunque se pueden usar heteroduplex de una hebra de morfolino y una hebra de ADN complementario en combinación con reactivos catiónicos de distribución citosólica.

A diferencia de muchos tipos estructurales de antisentido (por ejemplo fosforotioatos), los morfolinis no degradan sus moléculas diana de ARN. En cambio, los morfolinis actúan mediante "bloqueo estérico", uniéndose a una secuencia diana en un ARN y simplemente poniéndose en el camino de moléculas que podrían interaccionar de otro modo con el ARN. Los oligos de morfolinis se usan con frecuencia para investigar el papel de un transcrito específico de ARNm en un embrión, tal como huevos, o embriones de pez cebra, rana africana con garras (*Xenopus*), pollo, y erizo de mar, produciendo embriones "*morphant*". Con sistemas de distribución citosólica adecuados, los morfolinis son eficaces en cultivo celular.

Los morfolinis se han desarrollado como fármacos bajo el nombre de "NeuGenes" por AVI BioPharma Inc. Se han usado en mamíferos que van desde ratones a seres humanos y algunos se están ensayando actualmente en ensayos clínicos.

Unidos a la región 5' no traducida de un ARN mensajero (ARNm), los morfolinis pueden interferir con la progresión del complejo de iniciación ribosómico de la caperuza en 5' hasta el codón de iniciación. Esto previene la traducción de la región codificante del transcrito diana (llamado "silenciar" la expresión génica). Los morfolinis proporcionan un medio conveniente para silenciar la expresión de la proteína y aprender como esa disminución cambia las células u organismos. Algunos morfolinis silencian la expresión de forma tan eficaz que después de la degradación de las proteínas preexistentes las proteínas diana se vuelven indetectables por inmunotransferencia.

Los morfolinis también pueden interferir con los pasos de procesamiento del preARNm, normalmente previniendo que los complejos RNP que dirigen el ajuste se unan a sus dianas en los límites de los intrones en una hélice de preARN. Prevenir la unión de U1 (en el lado del donante) o U2/U5 (en el grupo polipirimidina y sitio aceptor) puede producir ajuste modificado, llevando normalmente a la exclusión de exones del ARNm maduro. El dirigirse a algunas dianas de ajuste produce la inclusión de intrones, mientras que la activación de sitios de ajuste críticos puede llevar a inclusiones o exclusiones parciales. También se pueden bloquear las dianas de RNP U11/U12. La modificación del ajuste se puede ensayar de forma conveniente mediante transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y se ve como una migración en la banda después de la electroforesis en gel de los productos de la RT-PCR.

Los morfolinos también se han usado para bloquear la actividad de miARN, actividad de ribozimas, silenciadores de ajuste de intrones, y potenciadores de ajuste. Se han inhibido las funciones de las RNPp U2 y U12 con morfolinos. Los morfolinos dirigidos a secuencias de ARN “resbaladizas” dentro de las regiones codificantes de proteínas pueden inducir cambios en el marco de lectura de la traducción. Las actividades de los morfolinos contra esta variedad de dianas sugiere que se pueden usar los morfolinos como una herramienta de propósito general para bloquear interacciones de proteínas o ácidos nucleicos con ARNm.

Ejemplos de oligonucleótidos antisentido específicos de LIF se describen en Kamohara *et al.* (Int J Oncol, 2007, 30:977-983) y Cheng *et al.* (Biol Reprod, 2004, 70:1270-1276).

Enzimas de ADN

Un aspecto más de la invención se refiere a use de enzimas de ADN para inhibir la expresión de los genes que codifican la citoquina de tipo IL-6 de la invención. Las enzimas de ADN incorporan algunas de las características mecánicas tanto de las tecnologías de antisentido como de las de ribozimas. Las enzimas de ADN se diseñan de modo que reconozcan una secuencia diana de ácido nucleico particular, parecido al oligonucleótido antisentido, sin embargo parecido a la ribozima son catalíticas y cortan específicamente el ácido nucleico diana.

Actualmente hay dos tipos de enzimas de ADN, y ambas fueron identificadas por Santoro y Joyce (ver, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 6110462). La enzima de ADN 10-23 comprende una estructura en bucle que conecta dos brazos. Los dos brazos proporcionan especificidad reconociendo una secuencia diana de ácido nucleico particular mientras que la estructura en bucle proporciona la función catalítica en condiciones fisiológicas.

Brevemente, para diseñar una enzima de ADN ideal que reconozca y corte específicamente un ácido nucleico diana, el experto en la materia debe identificar primero la secuencia diana única. Esto se puede hacer usando la misma aproximación que se ha descrito para los oligonucleótidos antisentido. Preferiblemente, la secuencia única o sustancialmente es una rica en G/C de aproximadamente 18 a 22 nucleótidos. El alto contenido en G/C ayuda a asegurar una interacción más fuerte entre la enzima de ADN y la secuencia diana.

Cuando se sintetiza la enzima de ADN, la secuencia de reconocimiento antisentido específica que dirigirá la enzima al mensajero se divide de modo que comprenda los dos brazos de la enzima de ADN, y el bucle de la enzima de ADN se sitúa entre los dos brazos específicos.

Se pueden encontrar métodos para hacer y administrar enzimas de ADN, por ejemplo en la patente de EE.UU. No. 6110462. De forma similar, los métodos de distribución de ribozimas de ADN *in vitro* o *in vivo* incluyen los métodos de distribución de las ribozimas de ARN, como se ha explicado en detalle anteriormente. Adicionalmente, el experto en la materia reconocerá que, como el nucleótido antisentido, las enzimas de ADN se pueden modificar opcionalmente para mejorar la estabilidad y mejorar la resistencia a degradación.

Se pueden preparar ARN y ADN antisentido, ribozimas, ARNi y moléculas de hélice triple de la invención mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de moléculas de ADN y ARN. Estos incluyen métodos para sintetizar de forma química oligodesoxirribonucleótidos y oligorribonucleótidos bien conocidas en la técnica tal como por ejemplo síntesis química de fosforamidita en fase sólida. De forma alternativa, las moléculas de ARN se pueden generar mediante transcripción *in vitro* e *in vivo* de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN antisentido. Tales secuencias de ADN se pueden incorporar en una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados tal como los promotores de la polimerasa de T7 o SP6. De forma alternativa, las construcciones de ADNc antisentido que sintetizan el ARN antisentido de forma constitutiva o inducible, dependiendo del promotor usado, se pueden introducir establemente en líneas celulares. Además, se pueden introducir varias modificaciones bien conocidas en las moléculas de ácido nucleico como medio para aumentar la estabilidad intracelular y vida media. Las posibles modificaciones incluyen pero no están limitadas a la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula o al uso de enlaces fosforotioato o 2'-O-metil más que fosfodiesterasa en el esqueleto del oligodesoxirribonucleótido.

Ribozimas

También se pueden usar moléculas de ribozimas diseñadas para cortar de forma catalítica transcritos de un ARNm diana para prevenir la traducción de los ARNms que codifican la citoquina de tipo IL-6 cuya actividad se desea inhibir. Las ribozimas son moléculas enzimáticas de ARN capaces de catalizar el corte específico de ARN. (Para una revisión, ver, Rossi, Current Biology 4: 469-471, 1994). El mecanismo de acción de la ribozima implica hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima a un ARN diana complementario, seguido por un suceso de corte endonucleolítico. La composición de las moléculas de ribozima preferiblemente incluye una o más secuencias complementarias al ARNm diana, y la bien conocida secuencia responsable del corte del ARNm o una secuencia funcionalmente equivalente (ver, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5093246, incorporada aquí por referencia en su totalidad).

Mientras que se pueden usar ribozimas que cortan ARNm en secuencias de reconocimiento específicas de sitio para destruir ARNm dianas, se prefiere el uso de ribozimas de cabeza de martillo. Las ribozimas de cabeza de martillo cortan el ARNm en localizaciones dictadas por las regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarias con la del ARNm diana. Preferiblemente, el ARNm diana tiene la siguiente secuencia de dos bases 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribozimas de cabeza de martillo es bien conocida en la técnica y se describe completamente en Haseloff y Gerlach, *Nature* 334: 585-591, 1988; y ver la solicitud de PCT No. WO89/05852, el contenido de las cuales se incorpora aquí por referencia. Las secuencias de la ribozima de cabeza de martillo se pueden embeber en un ARN estable tal como un ARN de transferencia (ARNt) para aumentar la eficacia del corte *in vivo* (Perriman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 6175-79, 1995; de Feyter, y Gaudron, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 74, Capítulo 43, "Expressing Ribozymes in Plants", Editado por Turner, P. C, Humana Press Inc., Totowa, N.J.). En particular, la expresión de ribozimas de fusión con ARNt mediada por ARN polimerasa III es bien conocida en la técnica (ver, Kawasaki *et al.*, *Nature* 393: 284-9, 1998; Kuwabara *et al.*, *Nature Biotechnol.* 16: 961-5, 1998; y Kuwabara *et al.*, *Mol. Cell.* 2: 617-27, 1998; Koseki *et al.*, *J Virol* 73: 1868-77, 1999; Kuwabara *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1886-91, 1999; Tanabe *et al.*, *Nature* 406: 473-4, 2000). Típicamente hay un número de sitios de corte potenciales de ribozimas de cabeza de martillo en una secuencia de ADNc diana. Preferiblemente la ribozima se manipula de modo que el sitio de reconocimiento de corte esté situado cerca del extremo 5' del ARNm diana - para aumentar la eficacia y minimizar la acumulación intracelular de transcritos no funcionales de ARNm. Además, el uso de cualquier sitio de reconocimiento de corte situado en la secuencia diana que codifica diferentes partes de los dominios de aminoácidos C-terminales de, por ejemplo, formas cortas y largas de la diana permitiría dirigir selectivamente a una u otra forma de la diana, y de esta manera, tener un efecto selectivo sobre una forma del producto génico diana.

Las ribozimas dirigidas a genes necesariamente contienen una región de hibridación complementaria a dos regiones, cada una de al menos 5 y preferiblemente cada una de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 nucleótidos contiguos de longitud de un ARNm diana, tal como un ARNm de una secuencia representada en cualquiera de las proteínas RAP80 humanas. Además, las ribozimas poseen actividad endonucleasa muy específica, que corta autocatalíticamente el ARNm diana codificante. La presente invención se extiende a ribozimas que hibridan con un ARNm codificante que codifica un gen diana tal como un gen candidato a diana de una droga terapéutica, hibridando por lo tanto con el ARNm codificante y cortándolo, de modo que ya no es capaz de ser traducido para sintetizar un producto polipeptídico funcional.

Las ribozimas usadas en las composiciones de la presente invención también incluyen ARN endorribonucleasa (de aquí en adelante "ribozimas de tipo Cech") tal como la se da de forma natural en *Tetrahymena thermophila* (conocida como la IVS, o ARN L-19 IVS) y que ha sido descrita extensivamente por Thomas Cech y colaboradores (Zaug *et al.*, *Science* 224:574-578, 1984; Zaug *et al.*, *Science* 231: 470-475, 1986; Zaug *et al.*, *Nature* 324: 429-433, 1986; solicitud internacional de patente publicada No. WO88/04300 de University Patents Inc.; Been, *et al.*, *Cell* 47: 207-216, 1986). Las ribozimas de tipo Cech tienen un sitio activo de ocho pares de bases que hibrida con una secuencia de ARN diana donde después tiene lugar el corte del ARN diana. La invención abarca aquellas ribozimas de tipo Cech que tienen como diana secuencias de sitio activo de ocho pares de bases que están presentes en un gen o secuencia de ácido nucleico diana.

Las ribozimas pueden estar compuestas de oligonucleótidos modificados (por ejemplo para mejorar la estabilidad, direccionamiento, etc.) y se deberían distribuir a células que expresan el gen diana *in vivo*. Un método preferido de distribución implica usar una construcción de ADN que "codifica" la ribozima bajo el control de un promotor constitutivo fuerte de pol III ó pol II, de modo que las células transfectadas producirán cantidades suficientes de la ribozima para destruir los mensajeros diana endógenos e inhibir la traducción. Puesto que las ribozimas, contrariamente a otras moléculas antisentido, son catalíticas, se requiere una concentración intracelular menor para su eficacia.

En ciertas formas de realización, se puede diseñar una ribozima identificando primero una parte de una secuencia suficiente para producir una disminución eficaz mediante ARNi. La misma parte de la secuencia se puede incorporar después en una ribozima. En este aspecto de la invención, las partes de la ribozima o ARNi que se dirigen a los genes son sustancialmente la misma secuencia de al menos 5 y preferiblemente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 o más nucleótidos contiguos de un ácido nucleico diana, tal como el ácido nucleico de cualquiera de las secuencias de RAP80 humanas. En una cadena larga de ARN diana, un número significativo de sitios diana no es accesible a la ribozima porque están escondidos dentro de las estructuras secundaria o terciaria (Birikh *et al.*, *Eur J Biochem* 245: 1-16, 1997). Para salvar el problema de la accesibilidad del ARN diana, típicamente se usan predicciones de estructura secundaria generadas por ordenador para identificar las dianas que más probablemente serán de cadena sencilla o tendrán una configuración "abierta" (ver Jaeger *et al.*, *Methods Enzymol* 183: 281-306, 1989). Otras aproximaciones utilizan una aproximación sistemática para predecir estructura secundaria que implican evaluar un gran número de moléculas de oligonucleótidos candidatos a hibridar (ver Milner *et al.*, *Nat Biotechnol* 15: 537-41, 1997; y Patzel y Sczakiel, *Nat Biotechnol* 16: 64-8, 1998). Adicionalmente, la patente de EE.UU. No. 6251588, el contenido de la cual se incorpora aquí por referencia, describe métodos para evaluar secuencias de oligonucleótidos sonda para predecir el potencial para hibridar a una secuencia diana de ácido nucleico. El método de la invención proporciona el uso de tales métodos para seleccionar segmentos preferidos de una secuencia de ARNm diana que se predice que sean de cadena sencilla y, además, para la utilización oportunística de la misma o sustancialmente una secuencia de ARNm diana idéntica, que comprende preferiblemente alrededor de 10-20 nucleótidos consecutivos del ARNm diana, en el diseño tanto de oligonucleótidos de ARNi como de ribozimas de la invención.

Péptidos inhibidores

El término “péptido inhibidor”, tal como aquí se utiliza, hace referencia a aquellos péptidos capaces de unirse a una citoquina de tipo IL-6 e inhibir su actividad según se ha explicado anteriormente, es decir, impedir que la citoquina de tipo IL-6 pueda inducir la activación de la vía de señalización de JAK-STAT.

Un ejemplo de péptido inhibidor son variantes pegiladas de LIF descritas en White *et al.* (J. Biol. Chem., 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104:19357-19362).

Inhibidores de la unión de la citoquina a su receptor

La expresión “Inhibidores de la unión de la citoquina a su receptor”, según se usa aquí, indica cualquier compuesto que muestra afinidad por la citoquina de tipo IL-6 y que, por tanto, es capaz de secuestrar a la citoquina e impedir la unión de ésta a su receptores fisiológicos. Preferiblemente, el polipéptido inhibidor es una forma soluble del receptor de la citoquina de tipo IL-6 (los denominados receptores señuelo). En el caso particular de LIF, es posible utilizar una variante soluble del receptor de LIF o la proteína de unión a LIF (LBP), una forma soluble del receptor de LIF alfa que aparece de forma natural y que se ha visto que es capaz de impedir efectivamente los efectos de LIF sobre el metabolismo de proteoglicanos en explantes de cartílago articular (Bell *et al.*, 1997, J. Rheumatol. 24:2394).

Anticuerpos inhibidores

Por “anticuerpo inhibidor” se entiende en el contexto de la presente invención todo aquel anticuerpo que es capaz de unirse a una citoquina de tipo IL-6 o a los receptores de dichas citoquinas de tipo IL-6, impidiendo que dicha citoquina de tipo IL-6 pueda inducir la activación de la vía de señalización de JAK-STAT. Los anticuerpos pueden ser preparados usando cualquiera de los métodos que son conocidos para el experto en la materia. Así, los anticuerpos policlonales se preparan mediante inmunización de un animal con la proteína que se desea inhibir. Los anticuerpos monoclonales se preparan usando el método descrito por Kohler, Milstein y col. (Nature, 1975, 256: 495). Una vez identificados anticuerpos con capacidad de unión a una citoquina de tipo IL-6 o a los receptores de dichas citoquinas, se seleccionarán aquellos que son capaces de inhibir la actividad de ésta proteína usando el ensayo de identificación de agentes inhibidores anteriormente descrito (Metz, 2007 citado *at supra*).

Por lo tanto, en otra realización todavía más particular, los anticuerpos son anticuerpos inhibidores específicos de dichas citoquinas de tipo IL-6 o anticuerpos que bloquean los receptores de las citoquinas de tipo IL-6.

Anticuerpos específicos de LIF se describen en US5654157A, Kim *et al.*, (J. Immunol. Meth., 156: 9-17, 1992), Alphonso *et al.*, (J. Leukocyte Biology (Abstracts of the 28th National Meeting of the Society for Leukocyte Biology, vol. 0, no. SP.2 (1991) (NY, N.Y., p. 49) (Mabs D4.16.9, D25.1.4, and D62.3.2).

En la presente invención, el término “anticuerpo” ha de ser interpretado de forma amplia e incluye anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos y fragmentos de los mismos (F(ab')₂, Fab), etc. siempre que sean capaces de reconocer específicamente el antígeno de interés, que en el contexto de la presente invención es una citoquina de tipo IL-6 o los receptores de dichas citoquinas de tipo IL-6. Ejemplos de anticuerpos que pueden emplearse en el contexto de la presente invención son, por ejemplo y sin limitación, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos totalmente humanos, etc.

Los anticuerpos policlonales son originalmente mezclas heterogéneas de moléculas de anticuerpos producidas en el suero de animales que han sido inmunizados con un antígeno. Incluyen también anticuerpos policlonales mono-específicos obtenidos a partir de las mezclas heterogéneas, por ejemplo, mediante cromatografía en una columna con péptidos de un único epítipo del antígeno de interés.

Un anticuerpo monoclonal es una población homogénea de anticuerpos específicos para un único epítipo del antígeno. Estos anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante técnicas convencionales ya descritas, por ejemplo en Kohler and Milstein [Nature, 1975; 256:495-397] o Harlow and Lañe [“Using Antibodies. A Laboratory Manual” de E. Harlow y D. Lañe, Editor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; 1998 (ISBN 978-0879695439)].

Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo monoclonal construido mediante clonación o recombinación de anticuerpos procedentes de distintas especies animales. En una configuración típica pero no limitativa de la invención, el anticuerpo quimérico incluye una parte de un anticuerpo monoclonal, generalmente la región variable (Fv) que incluye los sitios para reconocimiento y unión al antígeno, y la otra parte correspondiente a un anticuerpo humano, generalmente la parte que incluye la región constante y la constante adyacente.

Un anticuerpo totalmente humano es un anticuerpo o anticuerpos que han sido producidos en animales transgénicos con sistema inmune humano o por inmunización *in vitro* de células inmunes humanas (incluyendo tanto inmunización genética como tradicional con o sin adyuvantes y antígeno puro o no; o mediante cualquier método de exposición del antígeno al sistema inmune) o mediante bibliotecas nativas/sintéticas producidas desde células inmunes humanas.

Estos anticuerpos pueden obtenerse y seleccionarse desde animales transgénicos (por ejemplo ratones) en los que se han clonado genes de las inmunoglobulinas humanas y que son inmunizados con el antígeno objetivo (en la presente invención dicho antígeno es una citoquina de tipo IL-6 o los receptores de dichas citoquinas de tipo IL-6). Estos anticuerpos pueden obtenerse por selección de regiones variables de cadena simple (scFv) o de unión al antígeno (Fab) humanas presentadas en bibliotecas de fagos (*phage display*) y posterior clonación e injerto en un anticuerpo humano o mediante cualquier otro método de producción y presentación (*display*) conocido por el experto en la materia, de las librerías generadas por clonación de las regiones variables de ambas cadenas y posterior combinación/mutación de éstas para generar librerías de anticuerpos.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo monoclonal construido mediante clonación e injerto de las regiones hipervariables determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo monoclonal murino en un anticuerpo humano en sustitución de sus propias regiones hipervariables CDR.

Por otro lado, en el contexto de la presente invención, dentro del término “anticuerpo” también se incluyen variantes con un patrón de glucosilación alterado, así como fragmentos de anticuerpos, obtenidos a partir de la proteína o mediante tecnología recombinante, glicosilados o no glicosilados, que pueden consistir (i) en zonas variables de los anticuerpos unidas entre sí por un péptido de unión (scFv), (ii) en la zona variable junto a la constante CH1 de la cadena pesada (Fd) unida a la cadena ligera mediante cisteínas o mediante péptidos de unión y puente disulfuro (scFab), (iii) nuevas variantes, como cadenas pesadas solas, o (iv) cualquier modificación que se haga de los fragmentos de anticuerpo con el fin de hacerlos más afines, menos inmunogénicos (humanizados) o más estables en fluidos biológicos y que en el contexto de la presente invención, tengan capacidad de impedir que las citoquinas de tipo IL-6 realicen su función (actividad), es decir, inducir la activación de la vía de señalización de JAK-STAT.

Como entiende el experto en la materia, los anticuerpos pueden obtenerse por medio de técnicas convencionales de ingeniería genética o recombinante, de producción de anticuerpos, de extracción y purificación a partir de fluidos o tejidos biológicos, o por cualquier otra técnica convencional para la obtención de proteínas y anticuerpos las cuales, son ampliamente conocidas por el experto en la materia. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de técnicas para la producción de anticuerpos son: técnicas de inmunización en animales, incluidos animales transgénicos para genes de inmunoglobulinas humanas, producción de monoclonales mediante hibridomas, producción mediante librerías de anticuerpos, que pueden ser nativas, sintéticas o derivadas de organismos inmunizados frente al antígeno de interés y que podrían ser seleccionadas mediante muy diferentes métodos de presentación o “*display*” (*phage display*, *ribosome display*, etc.) y posteriormente, mediante técnicas de ingeniería genética podrían ser rediseñadas y expresadas en vectores diseñados para la producción de anticuerpos recombinantes de diferentes tamaños, composición y estructura. Una revisión de los principales métodos para la producción y purificación de los anticuerpos puede encontrarse, por ejemplo, en:

- “Handbook of Therapeutic Antibodies”, de S. Dübel. Editor: Wiley-VCH, 2007, Vol: I a III (ISBN 978-3527314539);
- “Antibodies: Volume 1: Production and Purification” de G. Subramanian Ed., Editor: Springer, 1 st Ed, 2004 (ISBN 978-0306482458);
- “Antibodies: Volume 2: Novel Technologies and Therapeutic Use”, de G. Subramanian Ed., Editor: Springer, primera edición, 2004 (ISBN 978-0306483158);
- “Molecular Cloning: a Laboratory manual”, de J. Sambrook y D.W. Russel Eds., Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press, tercera edición, 2001 (ISBN 978-0879695774).

Otros compuestos inhibidores de la actividad de una citoquina de tipo IL-6

Otros compuestos con capacidad de inhibición de la expresión de una citoquina de tipo IL-6 incluyen aptámeros y espiegelmeros, que son ácidos nucleicos D o L de cadena sencilla o doble que se unen específicamente a la proteína lo que resulta en una modificación de la actividad biológica de ésta. Los aptámeros y espiegelmeros tienen una longitud de entre 15 y 80 nucleótidos y, preferiblemente, entre 20 y 50 nucleótidos.

Polipéptidos con actividad inhibidora de citoquinas de tipo IL-6

De forma específica, antagonistas de LIF (una citoquina de tipo IL-6) que podrían ser de utilidad en el contexto de la presente invención son:

- Variantes de LIF que presentan mutaciones en sitios de unión al receptor mostrando una afinidad reducida por el mismo o que son capaces de unirse únicamente a una de las cadenas del receptor. Ejemplos de dichos mutantes incluyen:
 - o los mutantes descritos por Hudson *et al* (J. Biol. Chem., 1996, 271:11971-11978),

- las variantes de LIF descritas en WO05030803 que presentan una o más mutaciones seleccionadas del grupo del grupo de Q29A, G124R y N128A y que muestran una afinidad reducida por el receptor de LIF y por gp130. Un antagonista de alta potencia de LIF es la variante que comprende MH35-BD/Q29A+G124R descrito por Fairlie, W.D. *et al.* (J. Biol. Chem., 2004, 279:2125-2134).

- Los mutantes descritos en WO9601319 caracterizados por presentar una o más sustituciones en las regiones de unión al receptor y, en concreto, en posiciones 25-38, 150 a 160 o 161 a 180 con respecto a la numeración de LIF humano.

- Variantes solubles del receptor de LIF basadas en la estructura primaria y con la capacidad de unir LIF e impedir que este interaccione con su receptor nativo en la superficie de la célula tales como las proteínas de fusión que comprenden parte de la región extracelular del receptor de LIF y el dominio de unión a ligando de gp130, tal y como ha sido descrito por Metz; S. *et al.* (J. Biol. Chem., 2008, 283:5985-5995).

Tal como se ha expresado al comienzo de la descripción, los inventores con la invención aquí descrita han abierto una nueva ventana terapéutica en el tratamiento de enfermedades asociadas con una proliferación celular indeseable, tal como el cáncer, especialmente para el tratamiento del cáncer causado por una actividad elevada de la vía de señalización JAK-STAT.

En el contexto de la presente invención, una “enfermedad asociada a una proliferación celular indeseada” incluye el crecimiento, progresión y la metástasis de cáncer y tumores. Ejemplos de enfermedades asociadas a una proliferación celular indeseada y que pueden ser tratados de acuerdo con los métodos descritos en la presente invención son cáncer, restinosis, arterioesclerosis, enfermedades angiogénicas, fibrosis, enfermedades dermatológicas y enfermedades inflamatorias.

En una realización particular de la invención, la enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable es cáncer.

Los términos “cáncer” y “tumor” se refieren a la condición fisiológica en mamíferos caracterizada por el crecimiento celular desregulado. Los compuestos de la presente invención tienen utilidad para el tratamiento de tumores de mama, corazón, pulmón, intestino delgado, colon, bazo, riñón, vejiga, cabeza, cuello, ovario, próstata, cerebro, páncreas, piel, hueso, médula ósea, sangre, timo, útero, testículos e hígado. En particular, tumores que pueden ser tratados con los compuestos de la invención incluyen adenoma, angiosarcoma, astrocitoma, carcinoma epitelial, germinoma, glioblastoma, glioma, hemangioendotelioma, hemangiosarcoma, hematoma, hepatoblastoma, leucemia, linfoma, meduloblastoma, melanoma, neuroblastoma, osteosarcoma, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, sarcoma y teratoma. En particular, el tumor/cáncer se selecciona del grupo de melanoma acral lentiginoso, queratosis actínica adenocarcinoma, carcinoma adenoidal cística, adenomas, adenosarcoma, carcinoma adenoescamoso, tumores astrocíticos, carcinoma de la glándula de Bartolino, carcinoma de células basales, carcinoma de glándulas branquiales, carcinoide capilar, carcinoma, carcinosarcoma, colangiocarcinoma, cistadenoma, tumor del seno endodermal, hiperplasia endometrial, sarcoma del estroma endometrial, adenocarcinoma endometroide, sarcoma endometrial, sarcoma de Swing, hiperplasia nodular focal, gastrinoma, tumores de la línea germinal, glioblastoma, glucagonoma, hemangioblastoma, hemangioendotelioma, hemangioma, adenoma hepático, adenomastosis hepática, carcinoma hepatocelular, insulinita, neoplasia intraepitelial, neoplasia de células escamosas interepiteliales, carcinoma de células escamosas invasivas, carcinoma de células grandes, leiomiomasarcoma, melanoma, melanoma maligno, tumor mesotelial maligno, meduloblastoma, meduloblastoma, carcinoma mucoepidermoide, neuroblastoma, adenocarcinoma neuroepitelial, melanoma nodular, osteosarcoma, adenocarcinoma seroso papilar, tumores pituitarios, plasmacitoma, pseudosarcoma, blastoma pulmonar, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, sarcoma, carcinoma seroso, carcinoma de células pequeñas, carcinoma de tejidos blandos, tumor secretor de somatostatina, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma no diferenciado, melanoma uveal, carcinoma verrugoso, vipoma, tumor de Wilm. Aún más preferiblemente, el tumor/cáncer a ser tratado con los compuestos de la invención incluye cáncer intracerebral, cáncer de cabeza y cuello, cáncer rectal, astrocitoma, preferiblemente astrocitoma de grado II, III o IV, glioblastoma, preferiblemente glioblastoma multiforme, cáncer de células pequeñas, y cáncer de células no pequeñas, preferiblemente cáncer de pulmón de células no pequeñas, melanoma metastático, cáncer de próstata metastático independiente de andrógenos, cáncer de próstata metastático dependiente de andrógenos y cáncer de mama.

En una realización particular de la invención, el cáncer o las células que forman el tumor que aparece en el cáncer se caracteriza por presentar niveles elevados de la citoquina de tipo IL-6. Por “niveles elevados” de una citoquina de tipo IL-6 se entiende, en el contexto de la presente invención, que las concentraciones de la citoquina son superiores a las que aparecen en una muestra control en al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 100%, al menos un 110%, al menos un 120%, al menos un 130%, al menos un 140%, al menos un 150% o más.

Por muestra control se entiende una muestra cuyos niveles de citoquina tipo IL-6 se usa como referencia para la determinación de los niveles relativos de dicha citoquina en una muestra problema. Típicamente, las muestras de referencia se obtienen a partir de pacientes que se encuentran bien documentados desde el punto de vista clínico y

que no presentan ninguna enfermedad. En dichas muestras, se puede determinar la concentración de biomarcador, por ejemplo, mediante la determinación de la concentración media en una población de referencia. En la determinación de la concentración de referencia para un marcador determinado, es necesario tener en consideración algunas características del tipo de muestra, tales como la edad, el sexo, la condición física y similares del paciente. Por ejemplo, la muestra de referencia se puede obtener a partir de cantidades idénticas de un grupo de al menos 2, al menos 10, al menos 100 a más de 1000 individuos, de forma que la población sea estadísticamente significativa.

La concentración de citoquina del tipo IL-6 puede ser determinada intracelularmente, en el espacio intersticial o en extractos en los que se incluyen tanto la proteína intracelular como la que aparece en el espacio intersticial. Los niveles de citoquina IL-6 pueden ser determinados bien mediante la medida de la actividad de dicha citoquina usando ensayos adecuados para ello, bien mediante la medida de la cantidad de proteína usando métodos inmunológicos o bien mediante la medida del ARNm correspondiente a la citoquina de tipo IL6.

En otra realización particular, el cáncer está causado por una actividad elevada de la vía de señalización JAK-STAT que, en otra realización todavía más particular, es un glioma, preferentemente, un glioma de tipo IV.

Tal y como se mencionó anteriormente, el agente inhibidor de la invención es capaz de inhibir la proliferación de células madre tumorales, de forma que su uso es particularmente útil para el tratamiento de enfermedades que puedan verse beneficiadas de una inhibición de la proliferación de células troncales. Así, en una forma preferida de realización, los agentes inhibidores actúan a través de la autoregeneración de células madre tumorales.

El término “arterioesclerosis” se refiere al ensanchamiento y endurecimiento de la pared arterial. Un tipo concreto de arterioesclerosis es la aterosclerosis que es la causa de la mayoría de las enfermedades de la arteria coronaria, de neurisma aórtico y de enfermedad arterial de las extremidades inferiores, y contribuye además a la enfermedad cerebrovascular. Una arteria normal presenta típicamente una parte interna (intima) constituida por una única capa de células endoteliales. Superpuesta a esta capa se encuentra la denominada capa media que contiene únicamente células de músculo blando. La capa externa, por su parte, es la adventicia. Con el envejecimiento, se produce un continuo aumento en la anchura de la intima, resultado en parte de la migración y proliferación de las células del músculo blando. Un aumento similar en la anchura de la intima ocurre también como resultado de varios episodios traumáticos o intervenciones, tales como los que ocurren cuando un proceso de dilatación provoca el daño en la pared de los vasos. Los compuestos empleados en la presente invención son potencialmente útiles para inhibir la proliferación de células endoteliales, células del músculo blando y fibroblastos. En consecuencia, los compuestos diterpenoides de tipo labdano descritos en la invención también pueden emplearse para el tratamiento de condiciones arterioescleróticas. Se entiende por “condiciones arterioescleróticas” aterosclerosis clásica, aterosclerosis acelerada y cualquier otra condición arterioesclerótica caracterizada por una indeseable proliferación de células endoteliales y/o del músculo blando vascular, incluyendo complicaciones vasculares de la diabetes y glomeruloesclerosis diabética.

Por el término “restenosis” se entiende aquella enfermedad que cursa con una proliferación y migración excesiva de células como resultado de la liberación de factores de crecimiento producidos por un daño mecánico de las células endoteliales que constituyen las arterias coronarias.

Por “enfermedad angiogénica” se entiende una enfermedad o condición médica que cursa con una neovascularización anormal. Tales enfermedades o condiciones incluyen retinopatía diabética, glaucoma neovascular, artritis reumatoide y algunos cánceres, tales como hemangioendoteliomas, hemangiomas y sarcoma de Kaposi. La proliferación de células endoteliales y de células del músculo blando vascular es la principal característica de la neovascularización. Los compuestos descritos en la presente invención son útiles para inhibir dicha proliferación y, en consecuencia, para inhibir la progresión de la condición angiogénica que depende totalmente o en parte de dicha neovascularización.

El término “fibrosis” se refiere a una formación o desarrollo excesivo de tejido fibroso conectivo en un órgano o tejido. Fibrosis incluye por ejemplo fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar idiopática, enfisema, fibrosis pulmonar (que conduce a una enfermedad pulmonar obstructiva crónica), enfermedad de Peyronie, escleroderma, enfermedad pulmonar parenquimal difusa, queloides, fibrosis mediastinal, fibrosis masiva progresiva, fibrosis proliferativa, fibrosis neoplásica, fibrosis renal intersticial, fibrosis hepática, cicatrices quirúrgicas o quemaduras.

Por el término “enfermedades dermatológicas” se entiende enfermedades de la piel que cursan con proliferación celular asociada con cualquier disfunción proliferativa. Entre éstas se incluye, por ejemplo, queloides, escaras hipertróficas, queratosis seborreica, infección por el virus de papiloma, queratosis actínica y eczema.

Por el término “enfermedades inflamatorias” se entiende enfermedades que provocan inflamación como consecuencia de una proliferación celular asociada con cualquier disfunción proliferativa. Entre éstas se incluye, por ejemplo, glomerulonefritis proliferativa, lupus eritematoso, escleroderma, artritis temporal, tromboangitis y síndrome del nódulo linfático mucocutáneo.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor según la presente invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable para el tratamiento de enfermedades asociadas con una proliferación celular indeseable. Ejemplos de enfermedades asociadas con una proliferación celular indeseable han sido citadas previamente en la presente memoria.

En el contexto de la presente invención se entiende por “cantidad terapéuticamente eficaz” la cantidad de agente inhibidor de la expresión y/o la actividad de una citoquina de tipo IL-6 que necesaria para conseguir el efecto deseado que, en este caso concreto, es el tratamiento de enfermedades asociadas con una proliferación celular indeseable. En general, la cantidad terapéuticamente efectiva del agente inhibidor según la presente invención a administrar dependerá, entre otros factores, del individuo que vaya a ser tratado, de la severidad de la enfermedad que padezca dicho individuo, de la forma de administración elegida, etc. Por este motivo, las dosis mencionadas en esta invención deben ser consideradas tan solo como guías para el experto en la materia, y éste debe ajustar las dosis en función de las variables citadas anteriormente. No obstante, se puede administrar un agente inhibidor según la presente invención, una o más veces al día, por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 veces al día, en una cantidad típica total diaria comprendida entre 0,1 y 1000 mg/kg masa corporal/día, preferentemente 10 mg/kg masa corporal/día.

El término “tratamiento” o “tratar” en el contexto de esta especificación significa administración de un agente inhibidor según la invención para prevenir, aliviar o eliminar la enfermedad o uno o más síntomas asociados a dicha enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable. “Tratamiento” también abarca prevenir, aliviar o eliminar las secuelas fisiológicas de la enfermedad. El término “aliviar” en el contexto de esta invención se entiende como significando cualquier mejora de la situación del paciente tratado- tanto subjetivamente/sentimiento del o sobre el paciente) como objetivamente (parámetros medidos).

El término “transportador, adyuvante y/o vehículo” se refiere a entidades moleculares o sustancias con las que se administra el ingrediente activo. Tales transportadores, adyuvantes o vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como aguas y aceites, incluyendo aquellas de petróleo o de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, excipientes, disgregantes, agentes humectantes o diluyentes. Se describen transportadores farmacéuticos adecuados en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” de E.W. Martin.

En el contexto de la presente invención, el término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que son tolerables fisiológicamente y no producen típicamente una reacción alérgica o una reacción desfavorable similar, tal como trastorno gástrico, mareo y similares, cuando se administran a un humano. Preferiblemente, el término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora de un gobierno federal o estatal o recogido en la farmacopea estadounidense u otra farmacopea reconocida generalmente para uso en animales, y más particularmente en humanos.

El agente inhibidor de la expresión y/o la actividad de una citoquina de tipo IL-6 así como las composiciones farmacéuticas que los contienen, pueden ser utilizados junto con otros fármacos adicionales útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas a una proliferación celular indeseada. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende dicho agente inhibidor de la expresión y/o la actividad de una citoquina de tipo IL-6.

Ejemplos de otros fármacos adicionales útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas a una proliferación celular indeseada son, pero no se limitan a, agentes alquilantes tales como, por ejemplo, ciclofosfamida, carmustina, daunorubicina, mecloretamina, clorambucilo, nimustina, melfalán y similares; antraciclinas, tales como, por ejemplo, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrona, valrubicina y similares; compuestos de taxano, tales como, por ejemplo, paclitaxel, docetaxel y similares; inhibidores de la topoisomerasa tales como, por ejemplo, etopóxido, tenipóxido, tulipóxido, irinotecán y similares; análogos de nucleótidos tales como, por ejemplo, azacitidina, azatioprina, capecitabina, citarabina, doxifluridina, fluorouracilo, gemcitabina, mercaptopurina, metotrexato, tioguanina, florafur y similares; agentes a base de platino tales como, por ejemplo, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino y similares; agentes antineoplásicos tales como, por ejemplo, vincristina, leucovorina, lomustina, procarbazona y similares; moduladores hormonales tales como, por ejemplo, tamoxifeno, finasterida, inhibidores de la 5- α -reductasa y similares; alcaloides de la vinca tales como, por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina y similares. Los agentes quimioterápicos adecuados se describen con más detalle en la bibliografía, tal como en The Merck Index en CD-ROM, 13ª edición.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar por cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, oral, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, etc.), rectal, etc., típicamente, por vía oral debido al carácter crónico de la enfermedad a tratar.

Ejemplos ilustrativos de formas farmacéuticas de administración por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, granulados, soluciones, suspensiones, etc., y pueden contener los excipientes convencionales, tales como aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, humectantes, etc., y pueden ser preparadas por métodos convencionales. Las composiciones farmacéuticas también pueden ser adaptadas para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán los excipientes adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc. En cualquier caso, los excipientes se elegirán en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada.

Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación puede encontrarse en el libro “*Tratado de Farmacia Galénica*”, de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

Como entiende el experto en la materia, cuando el agente inhibidor de la expresión y/o la actividad de una citoquina de tipo IL-6 según la invención comprende una secuencia de nucleótidos, como por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, ARNs de interferencia (ARNi), ARNs catalíticos o ribozimas específicos, ARN con actividad “*decoy*”, etc., la composición farmacéutica de la invención puede formularse en forma de una composición destinada para su empleo en terapia génica; a modo ilustrativo, no limitativo, en este caso, la composición farmacéutica de la invención puede contener un vector, viral o no viral, que comprende dicha secuencia de nucleótidos o una construcción génica que comprende la citada secuencia. A modo ilustrativo, no limitativo, dichos vectores pueden ser vectores virales, por ejemplo, basados en retrovirus, adenovirus, etc., o no virales tales como los complejos ADN-liposoma, ADN-polímero, ADN-polímero-liposoma, etc. [véase “Nonviral Vectors for Gene Therapy”, editado por Huang, Hung y Wagner, Academic Press (1999)]. Dichos vectores, pueden ser administrados directamente al cuerpo humano o animal por métodos convencionales y alternativamente, pueden ser utilizados para transformar, transfectar o infectar células, por ejemplo, células de mamíferos, incluido el hombre, *ex vivo*, y, posteriormente implantarlas en el cuerpo humano o animal para obtener el efecto terapéutico deseado. Para su administración al cuerpo humano o animal dichas células se formularán en un medio adecuado que no afecte adversamente a la viabilidad de dichas células.

Métodos de *screening* de la invención

El hallazgo realizado por los autores de la presente invención y descrito en la presente memoria no sólo presenta aplicación en el tratamiento de enfermedades asociadas con una proliferación celular indeseable o el diagnóstico de dichas enfermedades, sino que la implicación de LIF en la activación de la cascada JAK/STAT también puede emplearse en el desarrollo de un método de *screening* para la identificación de compuestos capaces de bloquear/inhibir la proliferación celular de células tumorales inducida por una citoquina de tipo IL-6 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la identificación de compuestos capaces de bloquear/inhibir la proliferación celular de células tumorales inducida por una citoquina de tipo IL-6 o una variante funcionalmente equivalente de la misma que comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto una célula que exprese el receptor para una citoquina de tipo IL-6 con una citoquina de tipo IL-6 y un compuesto candidato, e
- (ii) identificar aquellos compuestos que bloquean la proliferación celular de dicha célula.

En una primera etapa, el método de la invención implica poner en contacto una célula que exprese el receptor para una citoquina de tipo IL-6 con una citoquina de tipo IL-6 con presencia de un compuesto candidato en cualquier grado de pureza.

Por “célula” se entiende, en el contexto de la presente invención, cualquier célula que exprese un receptor para una citoquina de tipo IL-6. Células en las que se expresan receptores de citoquinas de tipo IL-6 y que pueden ser usadas en los métodos de la presente invención incluyen células derivadas de tumores sólidos tales como células de cáncer de mama, células de melanoma, células de cáncer de ovario, células de cáncer de páncreas, células de cáncer de próstata, células de cáncer de colon, células de cáncer de pulmón y similares, así como células derivadas de tumores líquidos, tales como células de leucemia y de linfomas. En una realización particular, la célula que expresa el receptor para una citoquina de tipo IL-6 es una célula de glioma, preferentemente, una célula iniciadora de glioma (CIG).

Ejemplos de receptores para citoquinas de tipo IL-6 pueden encontrarse en Auernhammer and Melmed, 2000 (Endocrine reviews, vol. 21(3): 313-345) tales como el receptor de LIF (LIFR), receptor de Oncostatina M (OMSR) etc. Así, las células objeto de estudio incluyen células eucariotas superiores, preferentemente células de mamíferos. Preferiblemente, las células que se usan en la presente invención son aquellas en las que los receptores para citoquinas de tipo IL-6 se expresan de forma constitutiva. Alternativamente, también se pueden usar líneas celulares convencionales bien directamente si se comprueba que expresan adecuadamente los receptores para citoquinas de tipo IL-6 o bien tras la transfección previa de construcciones de ADN que permiten la expresión de dichos receptores. Células adecuadas para este propósito incluyen células de las líneas CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK 293, 3T3, WI38 y similares. En una forma preferida de realización, la célula que se usa en el método de la invención es una célula de glioma, preferentemente, de glioma de tipo IV.

El experto en la materia apreciará que, dependiendo del tipo de receptores que se expresen en la célula usada en el método de *screening* de la invención, será necesario utilizar la citoquina correspondiente. Preferiblemente, la citoquina se selecciona del grupo de LIF, IL-6, IL-11, oncostatina M, cardiotrofina-1, CNTF y CLC.

La puesta en contacto de la célula con el compuesto candidato puede llevarse a cabo usando cualquier método conocido para el experto en la materia, incluyendo la puesta en contacto directa de la célula que expresa el receptor para una citoquina de tipo IL-6, estando dicha célula en cultivo, con la citoquina de tipo IL-6 y el compuesto candidato en un solvente adecuado su interacción, tales como DMSO y similares.

Por “poner en contacto” una célula con el compuesto candidato se incluye, según la presente invención, cualquier posible forma de llevar el compuesto candidato hasta la proximidad de su diana celular, bien sea en la superficie de la célula o al interior ésta. Así, en caso de que el compuesto candidato sea una molécula de bajo peso molecular, es suficiente con añadir dicha molécula al medio de cultivo. En caso de que el compuesto candidato sea una molécula de alto peso molecular (por ejemplo, polímeros biológicos tales como un ácido nucleico o una proteína, anticuerpos o polipéptidos), es necesario aportar los medios para que esa molécula pueda acceder al interior celular. En caso de que la molécula candidata sea un ácido nucleico (por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, ARNs de interferencia (ARNi), ARNs catalíticos o ribozimas específicos, ARN con actividad “*decoy*”, pueden usarse métodos convencionales para transfección para la introducción de la construcción de ADN. En caso de que el compuesto candidato sea una proteína, la célula puede ponerse en contacto tanto con la proteína directamente como con el ácido nucleico que la codifica acoplado a elementos que permitan su transcripción/traducción una vez que se encuentren en el interior celular. Para ello, se pueden usar cualquiera de los métodos mencionados anteriormente para permitir su entrada al interior celular. Alternativamente, es posible poner en contacto la célula con una variante de la proteína que se desea estudiar que ha sido modificada con un péptido que sea capaz de promover la translocación de la proteína al interior celular, tales como el péptido Tat derivado de la proteína TAT de HIV-1, la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia de *D. melanogaster*, la proteína VP22 del virus del herpes simplex y oligómeros de arginina (Lindgren, A. *et al.*, 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:99-103, Schwarze, S.R. *et al.*, 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:45-48, Lundberg, M *et al.*, 2003, *Mol. Therapy* 8:143-150 y Snyder, E.L. y Dowdy, S.F., 2004, *Pharm. Res.* 21:389-393).

Preferiblemente, el compuesto candidato no se encuentra aislado sino que se encuentra formando parte de una mezcla más o menos compleja bien derivada de una fuente natural o bien formando parte de una biblioteca de compuestos. Ejemplos de bibliotecas de compuestos que pueden ser ensayadas según el método de la presente invención incluyen, sin limitación, bibliotecas de péptidos incluyendo tanto péptidos como análogos peptídicos que comprenden D-amino ácidos o péptidos que comprenden enlaces no peptídicos, bibliotecas de ácidos nucleicos incluyendo ácidos nucleicos con enlaces no fosfodiéster del tipo de fosforotioato o ácidos nucleicos peptídicos, bibliotecas de anticuerpos, de carbohidratos, de compuestos de bajo peso molecular, preferiblemente moléculas orgánicas, de peptidomiméticos, y similares. En el caso de que se use una biblioteca de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, la biblioteca puede haber sido preseleccionada para que contengan compuestos que puedan acceder al interior celular con mayor facilidad. Así, los compuestos de pueden seleccionar en base a determinados parámetros tales como tamaño, lipofilicidad, hidrofilicidad, capacidad de formar puentes de hidrógeno.

Alternativamente, los compuestos candidatos pueden estar formando parte de un extracto obtenido de una fuente natural. La fuente natural puede ser animal, vegetal obtenido de cualquier entorno, incluyendo, sin limitación, extractos de organismos terrestres, aéreos, marinos y similares.

En una segunda etapa, la invención comprende, la identificación de aquellos compuestos que bloquean la proliferación celular de la célula que expresa un receptor para una citoquina de tipo IL-6. Ejemplos de métodos adecuados para detectar si la proliferación celular ha sido bloqueada incluyen, sin limitación:

• *Determinación de la actividad telomerasa*

La actividad enzimática de la telomerasa se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la actividad telomerasa se puede determinar mediante la determinación de la tasa de elongación de una determinada secuencia repetitiva que contiene 2, 3 o más repeticiones de la secuencia unitaria telomérica (Yegorov, Y.E. *et al.*, 1997, *Mol. Biol.*, 31:130-136). Para la medida de dicha actividad se pueden usar extractos citoplásmicos, extractos nucleares, lisados celulares o células intactas. Por “aumento” en la actividad telomerasa se entiende que el nivel absoluto de actividad telomerasa en una célula particular está aumentado comparado con las células normales en el mismo individuo o comparada con células normales en sujetos que no sufren la condición.

• *Determinación de la longitud de los telómeros*

Métodos para la determinación de la longitud de los telómeros han sido ampliamente descritos en la técnica por Harley, C. B., *et al.* (Nature, 1990, 345:458-460); Levy, M. Z. *et al.*, (J. Mol. Biol., 1992, 225:951 -960); Lindsey, J. *et al.*, (Mutat. Res., 1991, 256:45-48) y Allsopp, R. C. *et al.*, (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89:10114-10118), entre otros. Convencionalmente, se utilizan endonucleasas de restricción que no fragmentan el ADN telomérico para después separar los fragmentos obtenidos por su peso molecular y detección de los telómeros mediante hibridación usando sondas específicas para la secuencia de los telómeros.

• *Determinación de la proliferación celular*

La determinación de la proliferación celular se puede llevar a cabo mediante métodos ampliamente conocidos para el experto en la materia incluyendo la determinación del tiempo de duplicación celular tal y como ha sido descrito por Harley *et al.* (Nature, 1990, 345:458-460). La tasa de proliferación celular se puede determinar mediante la determinación de la incorporación de uridina tritiada en la célula o ensayos colorimétricos empleando BrdU.

En la presente invención se entiende por “variante funcionalmente equivalente de una citoquina de tipo IL-6”, una proteína cuya secuencia de aminoácidos (i) es sustancialmente homologa a la secuencia de aminoácidos de una citoquina de tipo IL-6 y (ii) realiza las mismas funciones que dicha citoquina de tipo IL-6. La similitud funcional de una proteína con otra concreta puede determinarse mediante ensayos de interferencia con la expresión del gen que codifica la proteína concreta que, al reducir la expresión, reducirían la actividad de esa proteína, y la posterior recuperación de la actividad mediante expresión de la secuencia de la otra proteína. Estos experimentos se realizan utilizando secuencias de ARNs de interferencia específicas y complementarias para la secuencia de la proteína concreta y vectores de expresión que incorporen la secuencia específica de la otra proteína regulada por un promotor inducible o no.

Una secuencia de aminoácidos es sustancialmente homologa a una secuencia de aminoácidos determinada cuando presenta un grado de identidad de, al menos, un 70%, ventajosamente de, al menos, un 75%, típicamente de, al menos, un 80%, preferentemente de, al menos, un 85%, más preferentemente de, al menos, un 90%, aún más preferentemente de, al menos, un 95%, 97%, 98% ó 99%, respecto a dicha secuencia de aminoácidos determinada. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo BLAST [Altschul S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10].

El experto en la materia entiende que, las mutaciones en la secuencia de nucleótidos del gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 que dan lugar a sustituciones conservativas de aminoácidos en posiciones no críticas para la funcionalidad de la proteína, son mutaciones evolutivamente neutras que no afectan a su estructura global ni a su funcionalidad. Dichas variantes caen dentro del ámbito de la presente invención. Están incluidas también dentro del ámbito de la invención aquellas variantes funcionalmente equivalentes de una citoquina de tipo IL-6 que presenten inserciones, deleciones o modificaciones de uno o más aminoácidos respecto a dicha citoquina de tipo IL-6 y conserven, además, las mismas funciones que dicha citoquina.

Por tanto, tal como aquí se utiliza, el término “variante funcionalmente equivalente” también incluye cualquier fragmento funcionalmente equivalente de una citoquina de tipo IL-6. El término “fragmento” se refiere a un péptido que comprende una porción de una proteína. En este caso, un fragmento funcionalmente equivalente de una citoquina de tipo IL-6 es un péptido o proteína que comprende una porción de una citoquina de tipo IL-6 y las mismas funciones que dicha citoquina.

Métodos diagnósticos de la invención

Los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que una citoquina de tipo IL-6, más concretamente LIF, está implicada en la activación de la cascada JAK-STAT, induciendo de este modo el proceso de proliferación celular y el aumento de células madre tumorales (*cancer stem cells*). Este hallazgo permite el desarrollo de métodos diagnósticos de enfermedades asociadas a una proliferación celular indeseable basados en la determinación de los niveles de citoquina de tipo IL-6.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para el diagnóstico de enfermedades asociadas con una proliferación celular indeseable en un sujeto o para determinar la predisposición de un sujeto a padecer dicha enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable, o para determinar el estadio o severidad de dicha enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable en un sujeto, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto con dicha enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable, que comprende cuantificar los niveles de expresión del gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 o de la proteína codificada por dicho gen o variante funcionalmente equivalente de dicha proteína en una muestra biológica procedente de dicho sujeto, en donde un aumento de la expresión del gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 o de la proteína codificada por dicho gen o variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, con respecto a la expresión del gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 o de la proteína codificada por dicho gen o variante funcionalmente equivalente de dicha proteína en una muestra control, es indicativa de una enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable, o de mayor predisposición de dicho sujeto a padecer una enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable o de la no respuesta a la terapia administrada a dicho sujeto.

Diagnosticar como se usa aquí se refiere a evaluar la probabilidad según la cual un sujeto padece una enfermedad. Como entenderán los expertos en la materia, tal evaluación, aunque se prefiere que sea, normalmente puede no ser correcta para el 100% de los sujetos a diagnosticar. El término, sin embargo, requiere que se pueda identificar una parte estadísticamente significativa de los sujetos como que padece la enfermedad o que tiene una predisposición a la misma. El experto en la materia puede determinar si una parte es estadísticamente significativa sin más dilación usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de p, prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los detalles se encuentran en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% al menos el 95%. Los valores de p son, preferiblemente, 0,2, 0,1, 0,05.

El término “predisposición” como se usa aquí significa que un sujeto no ha desarrollado todavía la enfermedad o cualquiera de los síntomas de la enfermedad mencionados anteriormente u otros criterios de diagnóstico pero, sin embargo, desarrollará la enfermedad en el futuro con una cierta probabilidad. Dicha probabilidad será significativa-

mente diferente de la probabilidad de aparición estadística de una enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable. Preferiblemente, se diagnostica que la probabilidad de desarrollar una enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable es al menos del 30%, al menos del 40%, al menos del 50%, al menos del 60%, al menos del 70%, al menos del 80%, al menos del 90% o del 100% de una predisposición. Se puede hacer referencia al diagnóstico de una predisposición algunas veces como pronóstico o predicción de la probabilidad de que un sujeto desarrolle la enfermedad.

Por "muestra control" se entiende, en el contexto de la presente invención, la muestra de referencia que se usa para determinar la variación de los niveles de expresión de los genes y proteínas usadas en la presente invención. En una forma de realización, el valor de referencia se obtiene a partir de la señal proporcionada usando una muestra de tejido obtenida de un individuo sano. Preferiblemente, se toman muestras del mismo tejido de varios individuos sanos y se juntan, de forma que la cantidad de ARNm o de polipéptidos en la muestra refleje el valor medio de dichas moléculas en la población.

La cuantificación de los niveles de expresión de un gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 puede realizarse a partir del ARN resultante de la transcripción de dicho gen (ARNm) o, alternativamente, a partir del ADN complementario (ADNc) de dicho gen. Adicionalmente, el método de la invención puede incluir la realización de una etapa de extracción con el fin de obtener el ARN total, lo que puede realizarse mediante técnicas convencionales (Chomczynski y cois., Anal. Biochem., 1987, 162:156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15:532).

Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la invención para detectar y cuantificar los niveles de ARNm codificados por un gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 o de su ADNc correspondiente. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de ARNm codificado por dicho gen pueden ser cuantificados mediante el empleo de métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden la amplificación del ARNm y la cuantificación del producto de la amplificación de dicho ARNm, tales como electroforesis y tinción, o alternativamente, mediante northern blot y empleo de sondas específicas del ARNm de los genes de interés o de su ADNc. 1. correspondiente, mapeo con la nucleasa SI, RT-LCR, hibridación, microarrays, etc., preferentemente, mediante PCR cuantitativa a tiempo real usando juegos de sondas y cebadores apropiados. Análogamente, los niveles del ADNc correspondiente a dicho ARNm codificado por el gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 también puede ser cuantificado mediante el empleo de técnicas convencionales; en este caso, el método de la invención incluye una etapa de síntesis del correspondiente ADNc mediante transcripción inversa (RT) del ARNm correspondiente seguida de amplificación y cuantificación del producto de la amplificación de dicho ADNc. Métodos convencionales de cuantificar los niveles de expresión pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook y cois., 2001. "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3.

Así, en una realización particular del método de la invención, la cuantificación de los niveles de expresión del gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 comprende la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de dicho gen, un fragmento de dicho ARNm, ADN complementario (ADNc) de dicho gen, un fragmento de dicho ADNc, o sus mezclas.

En otra realización particular, la cuantificación de los niveles de expresión del gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa.

Por otro lado, para la puesta en práctica del método de la invención, también se pueden cuantificar los niveles de expresión de la proteína codificada por dicho gen que codifica una citoquina de tipo IL-6, es decir, un gen que codifica IL-6, IL-11, factor inhibidor de la leucemia (LIF), oncostatina M (OSM), cardiotrofina-1 (CT-I), el factor neurotrófico ciliar (CNTF) o la citoquina similar a la cardiotrofina (CLC).

Como entiende el experto en la materia, el nivel de expresión de una proteína puede cuantificarse mediante cualquier método convencional. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de proteína pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con capacidad de unirse a dichas proteínas (o a fragmentos de las mismas que contenga un determinante antigénico) y la posterior cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no. Ejemplos ilustrativos de marcadores que se pueden utilizar incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Existe una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sándwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como dipsticks. Otras maneras para detectar y cuantificar proteínas, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc. En otra realización particular, la cuantificación de los niveles de proteína se realiza mediante Western blot, inmunohistoquímica o ELISA.

En otra forma preferida de realización, la determinación de los niveles de expresión de la citoquina de tipo IL-6 puede llevarse a cabo mediante la determinación de la actividad de dicha proteína, puesto que niveles de expresión elevados resultan, en general, en una mayor actividad específica de dicha proteína en una muestra. Ensayos para determinar la actividad de las citoquinas de tipo IL-6 han sido descritos previamente en el contexto de los métodos terapéuticos de la invención.

Las citoquinas de tipo IL-6 cuyos niveles se pueden usar como marcadores de una proliferación celular indeseable han sido previamente descritas en la presente descripción y son aplicables al método de la invención. Asimismo, el método diagnóstico de la invención se puede aplicar a cualquiera de las enfermedades asociadas a una proliferación celular indeseada definidas anteriormente. En una forma preferida de realización, la enfermedad asociada a una proliferación celular indeseada es un cáncer, preferiblemente un cáncer que presenta niveles elevados de una citoquina de tipo IL-6 o una actividad elevada de la vía de señalización JAK-STAT.

La puesta en práctica del método de la invención comprende la obtención de una muestra biológica del sujeto a estudiar. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas muestras incluyen distintos tipos de fluidos biológicos, tales como sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, heces, orina y saliva, así como muestras de tejidos. Las muestras de fluidos biológicos pueden ser obtenidas por cualquier método convencional al igual que las muestras de tejidos; a modo ilustrativo dichas muestras de tejidos pueden ser muestras de biopsias obtenidas por resección quirúrgica.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit que comprende reactivos para la cuantificación de los niveles de expresión del gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 o de la proteína codificada por dicho gen o variante funcionalmente equivalente de dicha proteína para el diagnóstico de cáncer en un sujeto o para determinar la predisposición de un sujeto a padecer dicho cáncer, o para determinar el estadio o severidad de dicho cáncer en un sujeto, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto con dicho cáncer, en donde, si los reactivos detectan un aumento en la expresión de dicho gen o dicha proteína o variante funcionalmente de la misma respecto a una muestra control, entonces dicho sujeto puede padecer una enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable, o presenta mayor predisposición a padecer dicha enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable, o presenta mayor severidad de dicha enfermedad, o la terapia administrada no está siendo efectiva.

Todos los términos y expresiones empleados en la definición del uso del kit han sido descritos y explicados previamente para otros aspectos inventivos y realizaciones particulares de la presente invención, y son igualmente aplicables al uso del kit aquí descrito.

Métodos para el diseño de terapias personalizadas y para la selección de pacientes que se pueden beneficiar de la terapia basada en inhibidores de IL-6

Los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que los inhibidores de citoquinas de la familia IL-6 y, más en particular, de LIF, provocan una inhibición de la proliferación de células tumorales. Asimismo, han observado que existen tumores que presentan niveles muy elevados de dichas citoquinas, por lo que proponen que la terapia basada en el uso de inhibidores de IL-6 puede ser particularmente beneficiosa para el tratamiento de pacientes en los que aparecen altos niveles de citoquina de tipo IL-6.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada a un paciente que sufre una enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable que comprende:

- (a) cuantificar los niveles de expresión de la citoquina de tipo IL-6 en dicho paciente, y
 - (b) comparar dichos niveles de expresión con niveles control,
- en donde si los niveles de expresión de una citoquina de tipo IL-6 en dicho paciente son mayores que los valores control, entonces se administra a dicho paciente un agente inhibidor de una citoquina de tipo IL-6.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la selección de pacientes que sufren una enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable, para ser tratados con un agente inhibidor de una citoquina de tipo IL-6 que comprende

- a) cuantificar los niveles de expresión de la citoquina de tipo IL-6 en dicho paciente, y
 - b) comparar dichos niveles de expresión con niveles control,
- en donde si los niveles de expresión de una citoquina de tipo IL-6 en dicho paciente son mayores que los valores control, entonces dicho paciente es seleccionado para recibir un tratamiento con un agente inhibidor de una citoquina de tipo IL-6.

En ambos aspectos, una forma de realización preferida es aquella en la que la enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable está asociada con la proliferación indeseable de células madre.

En una forma preferida de realización, el agente inhibidor de una citoquina de tipo IL-6 se selecciona del grupo formado por ARNips, oligonucleótidos antisentido, ribozimas específicos, anticuerpos y polipéptidos. Preferiblemente, los agentes inhibidores son anticuerpos y, más preferiblemente, anticuerpos inhibidores específicos de dicha citoquina de tipo IL-6 o anticuerpos que bloquean los receptores de las citoquinas de tipo IL-6.

Las citoquinas de tipo IL-6 que pueden ser usadas como marcadores para la selección de pacientes o para el diseño de terapias personalizadas han sido descritas con detalle anteriormente y se seleccionan entre LIF, IL-6, IL-11, oncostatina M, cardiotrofina-1, CNTF y CLC.

5 Las enfermedades que cursan con proliferación celular indeseable son las descritas anteriormente. En una forma preferida de realización, dicha enfermedad que cursa con proliferación celular indeseable es cáncer. Aún más preferiblemente, dicho cáncer está causado por una actividad elevada de la vía de señalización de JAK-STAT.

10 En otra forma preferida de realización, dicho cáncer es un glioma y, aún más preferiblemente, dicho glioma es un glioma de tipo IV.

La invención se describe a continuación mediante los siguientes ejemplos que deben ser considerados como meramente ilustrativos y no limitativos de la misma.

15 Ejemplo 1

1. Materiales y Métodos

20 1.1 Líneas celulares y cultivos de células primarias

Las células U373MG y A172 fueron un generoso regalo de J. Rich y D. Bigner y se cultivaron en DMEM con suero bovino fetal (SBF) al 10%. Las células tumorales primarias cultivadas (PCTC) y las neuroesferas de GBM se generaron como está descrito (Bruna *et al.*, (2007) Cancer Cell 11, 147-160; Gunther *et al.*, (2008) Oncogene. May 25 1; 27(20):2897-909). Brevemente, las muestras de tumores se procesaron en los 30 minutos siguientes a la resección quirúrgica. Los trozos triturados de las muestras de gliomas humanos se digirieron con 200 U/ml de colagenasa I (Sigma) y 500 U/ml de Dnasa I (Sigma) en PBS durante 2 horas a 37°C y con agitación vigorosa constante. La suspensión de células individuales se filtró a través de un filtro para células de 70 µm (BD Falcon) y se lavaron con PBS. Por último, las células se resuspendieron y posteriormente se cultivaron en DMEM con SBF al 10%, para el cultivo 30 de PCTC, o en medio de neuroesferas en el caso de las neuroesferas de GBM. Las neuroesferas de neuroprogenitores humanos normales se generaron a partir de tejido de corteza cerebral embrionaria humana (12-16 semanas tras la concepción) recogidas tras interrupciones voluntarias de embarazos. Las muestras se procesaron y cultivaron como se ha descrito (Poltavtseva *et al.* (2002) Brain Res Dev Brain Res 134, 149-154). El medio de neuroesferas consiste en medio neurobasal (Gibco) suplementado con B27 (Gibco), L-glutamina (Gibco), penicilina/estreptomina, y factores 35 de crecimiento (EGF 20 ng/mL y FGF-2 20 ng/mL (Peprotech)).

Las muestras de gliomas humanos y tejidos embrionarios humanos se obtuvieron del Hospital Vall d'Hebron. El protocolo clínico se aprobó por el comité de ética (CEIC) de Vall d'Hebron con el consentimiento informado obtenido de todos los sujetos.

40

1.2 Plásmidos y reactivos

Se usó ADN genómico de U373MG para amplificar la región -634/+32 del promotor humano de *LIF* que se clonó 45 en el vector de luciferasa pGL2-básico. Las construcciones de delección (-267/+32), y (-73/+32) se generaron mediante digestión de la construcción (-634/+32). Se introdujeron dos mutaciones puntuales en las posiciones -183 bp y -184 bp en la construcción (-267/+32) para interrumpir el elemento de unión a Smad (SBE) y generar la construcción (-267/+32) mutSBE. TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3 (R&D Systems), inhibidor de TβR1 (SB431542, Tocris), LIF (Chemicon), los anticuerpos neutralizantes contra LIF (R&D), inhibidor de JAK (piridona tetracíclica 6 (P6) Calbiochem), el conjunto de ARNip SMART dirigidas a Smad2, Smad3 y Smad4 (Dharmacon), y el ARNip control siGlo (Dharmacon) 50 se usaron a las concentraciones indicadas. Se usaron los anticuerpos específicos contra p-Smad2, Smad2, p-STAT3 (p-Tyr705) y STAT3 total (Cell Signalling) y contra Smad2, Smad3 y Smad4 (Hata *et al.*, (2000) Cell 100, 229-240) para inmunotransferencia.

55

1.3 Inmunocitoquímica, ELISA e inmunoprecipitación de cromatina

La inmunocitoquímica de neuroesferas y neuroesferas diferenciadas se realizó como está descrito (Geshwind *et al.*, 2001) usando los siguientes anticuerpos: anti-nestina (Chemicon), anti-GFAP (Dako), anti-TuJ1 (Chemicon), anti- 60 O4 (Chemicon), anti-Sox2 (Chemicon), anti-α-tubulina (Sigma). Los núcleos se contratiñeron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI).

Para la determinación cuantitativa de los niveles de proteína LIF secretada al medio, se usó el kit ELISA para LIF humano (R&D Systems) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se recogió el sobrenadante de células 65 U373MG o neuroesferas de GBM previamente ayunadas de suero después de 48 horas del tratamiento indicado. Las células que flotaban se desecharon y se concentraron 5 mL de los sobrenadantes usando membranas Amicon Ultra-4 PLCC Ultracel-PL 5 kDa (Millipore) hasta un volumen final de 200 µL.

La inmunoprecipitación de eromatina se realizó como está descrito (Bruna *et al.*, citado *supra*). Las series de cebadores proximales y distales del promotor de LIF abarcan las regiones (-410/-165) y (-4534/-4293), respectivamente.

1.4 Ensayos de auto-renovación

La auto-renovación de las neuroesferas se evaluó sembrando un número igual de células a una densidad de células muy baja en pocillos de una placa de 96 pocillos. Las células se trataron, en ausencia de factores de crecimiento, con los compuestos indicados y se contó el número total de neuroesferas nuevas formadas después de 7 días en cultivo (Lee *et al.* (2008) *Cancer Cell* 13, 69-80; Reynolds y Weiss, (1996) *Dev Biol* 175, 1-13; Seaberg y van der Kooy, (2002) *J Neurosci* 22, 1784-1793).

1.5 PCR cuantitativa a tiempo real

Se realizó qRT-PCR usando sondas Taqman de Applied Biosystems, según las recomendaciones del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en un detector de secuencia ABI 7000 (Perkin Elmer) y los resultados se expresaron como el cambio en veces calculado mediante el método DDCT relativo a la muestra control o la primera muestra cuantificada. Se usaron la subunidad ribosómica de *18S* o la *β -actina* como controles internos de normalización.

1.6 Ensayos de luciferasa

Las células A172 se transfectaron de forma transitoria con las diferentes construcciones indicadoras del promotor de LIF y el plásmido pRL-TK de la luciferasa de renilla (Promega) como un control de normalización usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen).

1.7 Ensayos tumorales intracraneales

Se inocularon de forma estereotáctica las cantidades indicadas de células en el cuerpo estriado del hemisferio derecho del cerebro (1 mm anterior, 1,8 mm lateral respecto a la bregma, y 3,0 mm intraparenquimal) de ratones hembras Balbc nu/nu de siete semanas de edad (Charles River Laboratories). Los ratones se sacrificaron cuando presentaron síntomas neurales o una pérdida significativa de peso. Se realizaron estudios por imágenes por resonancia magnética (MRI) en un imán vertical 9.4T en interfaz con un sistema AVANCE 400 (Bruker). Bajo anestesia con xilacina/ketamina, a los ratones se les dio una inyección intravenosa de un agente de contraste de MRI, ácido gadolinio dietilentriamina pentaacético a una dosis de 0,25 mmol Gd/kg de peso y se colocaron en una hélice de frecuencia de radio 18 (diámetro interno, 35 mm). Después de que el localizador tomara imágenes sobre tres ejes ortogonales, se adquirieron las imágenes de todo el cerebro del ratón.

1.8 Análisis estadísticos

Se usó una prueba de correlación de Spearman para analizar las relaciones entre *LIF* y *TGF β 2*, *Musashi-1*, *Sox2* y *Nestina*. Los datos en los gráficos se presentan como la media \pm d.e.

Ejemplo 1

TGF β induce la auto-renovación de GIC derivadas de paciente

Para estudiar el efecto del TGF β sobre la capacidad de auto-renovación de las GICs (células iniciadoras de glioma, *glioma initiating cells*), se obtuvieron células a partir de muestras de GBM (glioblastoma multiforme) humanos eliminados de forma quirúrgica. De la misma muestra de tumor, se generaron por una parte, cultivos primarios de células tumorales (PCTCs) en presencia de suero y, en paralelo, se cultivaron células tumorales en medio sin suero en presencia de EGF y FGF. Las células cultivadas en medio sin suero suplementado con EGF y FGF generaron rápidamente esferas multicelulares no adherentes (neuroesferas) como se ha descrito (Galli *et al.* (2004) *Cancer Res* 64, 7011-7021; Gunther *et al.*, citado *supra*; Lee *et al.*, (2006) *Cancer Cell* 9, 391-403; Singh *et al.* (2003) *Cancer Res* 63, 5821-5828) (Figura 1A). Las neuroesferas originadas a partir de las muestras de tumor expresaban niveles altos de los marcadores de células neuroprogenitoras *Musashi-1*, *Sox2* y *Nestina* (Figura 1B), y sufrieron diferenciación multilínea adquiriendo la expresión de GFAP (marcador de astrocitos), Tuj-1 (marcador neuronal), y O4 (marcador de oligodendrocitos) cuando se cultivaron en presencia de suero (Figura 2). Además, las neuroesferas derivadas de tumores eran muy oncogénicas comparadas con las PCTCs. Las células de las neuroesferas y las PCTCs se implantaron de forma ortotópica en el cerebro de ratones inmunodeprimidos. El crecimiento tumoral se evaluó mediante imágenes de resonancia magnética (MRI) y se siguió el peso de los ratones. Las células de las neuroesferas generaron tumores 30-60 días después de la inoculación lo que produjo una pérdida intensa de peso, mientras que las PCTCs no crecieron en tumores durante el mismo intervalo de tiempo en todos los casos (Figura 1C). De esta manera, las

neuroesferas generadas a partir de muestras de GBM humanos expresaban marcadores de células neuroprogenitoras, mostraban potencial de diferenciación multilínea, y eran muy oncogénicas. Todas estas características indicaban que las neuroesferas obtenidas de GBMs derivados de pacientes estaban enriquecidas en GICs.

Se decidió evaluar el efecto del TGF β sobre la capacidad de auto-renovación de GIC siguiendo un protocolo bien descrito basado en la capacidad de las GICs de generar neuroesferas (Reynolds y Weiss, 1996, Dev Biol. 175:1-13; Seaberg y van der Kooy, 2002, J Neurosci 22:1784-1793). Las neuroesferas derivadas de pacientes se disociaron en células individuales, se trataron con TGF β o se dejaron sin tratar durante 7 días en ausencia de factores de crecimiento y se contaron las neuroesferas nuevamente formadas y el número total de células. Siguiendo este protocolo, se evaluó el efecto del TGF β sobre la capacidad de auto-renovación de las GICs derivadas de tres pacientes diferentes. El tratamiento con TGF β aumentó significativamente el número de neuroesferas y aumentó el número total de células (Figura ID, 1E, 1F). Estos efectos se bloquearon cuando se añadió un inhibidor del receptor de TGF β 1 (T β R1) al mismo tiempo que el TGF β . El inhibidor del T β R1 aislado no tenía ningún efecto significativo (Figura ID, 1E, 1F). Estos resultados mostraban que la vía del TGF β aumentaba la auto-renovación de GIC.

Ejemplo 2

TGF β induce la expresión de LIF en células de GBM humano

Se decidió investigar los mecanismos moleculares responsables del efecto del TGF β sobre GICs. Se miraron respuestas génicas a TGF β en células de GBM que podrían estar implicadas en la regulación de la auto-renovación de GIC. En un trabajo previo (Bruna *et al.*, 2007), se realizaron análisis transcriptómicos en la línea celular de glioma U373MG tratada con TGF β y/o un inhibidor de T β R1. *LIF* estaba entre las 63 respuestas génicas a TGF β en U373MG que eran dependientes de la actividad de T β R1. Se ha implicado la vía de señalización LIF-LIFR/gp130-JAK-STAT en la auto-renovación de células troncales, tanto en células troncales embrionarias (Niwa *et al.*, 1998, Genes Dev, 12: 2048-2060; Williams *et al.*, 1988, Nature, 336:684-687) como en células neuroprogenitoras (Bauer y Paterson, 2006, J Neurosci, 26:12089-12099; Molne *et al.*, 2000, J Neurosci Res, 59:301-311; Wright *et al.*, 2003, J. Neurochem, 86:179-195) y se hipotetizó que LIF podría mediar el efecto de TGF β sobre GICs. Primero se determinó si la inducción del transcrito de *LIF* mediada por TGF β se observaba en células tumorales derivadas de pacientes. Se trataron un panel de PCTCs derivadas de 11 GBMs humanos diferentes con TGF β durante 3 h y se determinaron los niveles del ARNm de *LIF*. El TGF β indujo LIF en todas las PCTCs ensayadas (Figura 3A). Estos resultados indicaban que la inducción de LIF por TGF β es un fenómeno común que tiene lugar en la mayoría de los GBMs humanos. Además, el TGF β era capaz de inducir el transcrito de *LIF* en neuroesferas derivadas de pacientes (Figura 3B) y este efecto era dependiente de la actividad de T β R1 ya que la inducción de LIF por TGF β se bloqueaba en presencia de un inhibidor de T β R1 (Figura 3C). Tres miembros de la familia del TGF β (TGF β 1, TGF β 2, y TGF β 3) fueron capaces de inducir LIF en neuroesferas derivadas de pacientes (Figura 3D) y, como se esperaba, la inducción del transcrito de *LIF* por TGF β dio como resultado un aumento en la secreción de la proteína LIF cuando se medía mediante ELISA en medio condicionado de neuroesferas (Figura 3E).

Ejemplo 3

*TGF β induce la expresión de LIF a través de un complejo Smad activado que se une al promotor de *LIF**

Para estudiar la regulación transcripcional de *LIF* por el TGF β , se clonó el promotor humano de *LIF* en una construcción indicadora pGL2-básico. El TGF β era capaz de transactivar las construcciones indicadoras que contenían las regiones -634/+32 y -276/+32 del promotor de *LIF* en células U373MG. El fragmento -73/+32 del promotor de *LIF* perdió la respuesta transcripcional a TGF β indicando que el elemento de respuesta a TGF β estaba incluido en la región -2161-13 (Figura 4A, 4B). Esta región contiene un único elemento de unión a Smad (SBE, 5'GTCT-3') cerca de un sitio de unión a SP1 (Figura 4A). Se mutó el SBE y se observó que la respuesta a TGF β se eliminaba (Figura 4B) indicando que un complejo Smad activado se une al SBE proximal en el promotor de *LIF* para inducir transcripción. Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y se observó que Smad2 endógena se unía a la región proximal del promotor de *LIF* y no a la región distal 4kb corriente arriba del sitio de iniciación de la transcripción en células tratadas con TGF β (Figura 4C). Para demostrar finalmente que las Smads están implicadas en la inducción de la expresión de LIF por TGF β , se silenciaron Smad2, Smad3, tanto Smad2 como 3, y Smad4 usando ARN de interferencia. La inducción de LIF por TGF β disminuyó cuando Smad2 y Smad3, o Smad4 estaban disminuidas indicando que se requiere un complejo Smad activado para la respuesta transcripcional de *LIF* al TGF β (Figura 4D). Smad2 y Smad3 son redundantes en este proceso ya que el silenciamiento de cada Smad por separado no afectó significativamente a los niveles de LIF inducidos por TGF β (Figura 4D). Como se esperaba, la inducción de LIF por TGF β en neuroesferas derivadas de pacientes también dependía de Smad. El silenciamiento de Smad4 en neuroesferas de GBM humano anuló la respuesta de LIF a TGF β (Figura 4E).

Ejemplo 4

TGFβ induce la vía JK-STAT a través de la inducción de LIF en neuroesferas derivadas de pacientes

5 Para discernir si la vía de señalización de LIF es funcional en neuroesferas de GBM, se trataron las neuroesferas con LIF recombinante y se determinaron los niveles de fosforilación del sustrato posterior al complejo del receptor de LIF, STAT3. LIF recombinante indujo una rápida fosforilación de STAT3 indicando que las neuroesferas derivadas de pacientes expresaban un complejo funcional del receptor de LIF (Figura 5A). Además, la inducción de p-STAT3 se prevenía por la presencia de un inhibidor farmacológico específico de JAK, piridona tetracíclica 6 (P6) (Pedranzini
 10 *et al.*, 2006, Cancer Res, 66: 9714-9721; Thompson *et al.*, 2002, Bioorg. Med. Chem. Lett, 12:1219-1223) (Figura 5B). De forma interesante, TGFβ indujo la fosforilación de STAT3 en neuroesferas de GBM y el inhibidor de TβR1 previno ese efecto (Figura 5C). Se decidió evaluar si LIF estaba mediando la inducción de p-STAT3 por TGFβ. Para este fin, se usó un anticuerpo neutralizante contra LIF para bloquear específicamente el efecto de LIF secretado en células tratadas con TGFβ. La presencia del anticuerpo neutralizante de LIF disminuyó la inducción de p-STAT3 por
 15 TGFβ. Además, los niveles de p-STAT3 en células tratadas con TGFβ se reprimieron mediante el tratamiento con P6 (Figura 5D). Estos resultados indicaban que TGFβ era capaz de activar la vía JAK-STAT en neuroesferas derivadas de pacientes a través de la inducción de la secreción de LIF que actuaba por medio de un circuito autocrino/paracrino.

20 Ejemplo 5

LIF media la inducción de la auto-renovación de GIC por TGFβ

Se decidió evaluar si LIF y la vía JAK-STAT mediaban el aumento de auto-renovación de GIC por TGFβ. Para
 25 este fin, se usó el anticuerpo neutralizante contra LIF y P6 para bloquear específicamente el efecto del LIF secretado en células tratadas con TGFβ. Las neuroesferas se disociaron en células individuales y se trataron con TGFβ, LIF recombinante, anticuerpo anti-LIF y/o P6. Se contaron las neuroesferas nuevamente formadas y el número total de células. El LIF recombinante aumentó la cantidad de neuroesferas nuevamente formadas así como el número total de células indicando que LIF induce la auto-renovación de GIC (Figura 6A, 6B, 6C). El tratamiento con el anticuerpo
 30 neutralizante de LIF disminuyó la inducción de la auto-renovación de GIC por TGFβ. Además, P6 reprimió el efecto de TGFβ sobre la auto-renovación de GIC indicando que el efecto del TGFβ sobre la auto-renovación era dependiente de la actividad de JAK (Figura 6A, 6B, 6C). En conjunto, estos datos mostraban que TGFβ inducía la capacidad de auto-renovación de GICs derivadas de pacientes a través de la vía LIF-JAK-STAT.

35 Ejemplo 6

TGFβ previene la diferenciación de GIC a través de LIF

40 Las neuroesferas derivadas de GBM crecidas en ausencia de factores de crecimiento y sembradas en placas cubiertas con poli-L-lisina tienden a diferenciarse perdiendo la expresión de los marcadores de neuroprogenitores Musashi-1, Sox2 y Nestina, y adhiriéndose a la placa de cultivo. Se decidió evaluar el efecto de TGFβ y LIF sobre este proceso de diferenciación. Las neuroesferas se cultivaron en presencia de TGFβ o LIF sin EGF ni FGF durante 7 días y posteriormente se procesaron para tinción inmunocitoquímica y ensayos de qRT-PCR para determinar los niveles de
 45 los marcadores de neuroprogenitores *Musashi-1*, *Sox2* y *Nestina*. Las neuroesferas tratadas con TGFβ o LIF diferían morfológicamente de las células control en que se adherían menos a la placa de cultivo manteniendo la estructura esférica. Además, las células tratadas con TGFβ o LIF mantenían la expresión de *Musashi-1*, *Sox2* y *Nestina* detectada mediante ensayos inmunocitoquímicos (Figura 7A) y cuantificada mediante qRT-PCR (Figura 7B). Esto indicaba que
 50 TGFβ y LIF son factores que no sólo regulan la auto-renovación de GIC sino que también están implicados en prevenir la diferenciación de GICs.

Ejemplo 7

55 *Efecto de TGFβ y LIF sobre neuroprogenitores humanos normales*

Estos datos indicaban que TGFβ y LIF estaban regulando la auto-renovación y diferenciación de GIC. Sin embargo, se quiso abordar si este efecto era específico de células tumorales o también estaba presente en células neuroprogenitoras normales. Para responder a esta pregunta, se obtuvieron células neuroprogenitoras a partir de muestras de corteza
 60 cerebral humana fetal (de 12 a 16 semanas después de la concepción). Como se ha descrito previamente (Carpenter *et al.*, 1999, Exp Neurol, 158: 265-278; Poltavtseva *et al.*, 2002, Brain Res Dev Brain Res, 134: 149-154; Wright *et al.*, 2003, J Neurochem, 86: 179-195), los neuroprogenitores humanos generaron neuroesferas cuando se hicieron crecer en medio sin suero suplementados con EGF y FGF y estas neuroesferas expresaban Musashi-1, Sox2 y Nestina de forma similar a las neuroesferas de GBM (Figura 8A). Primero, se determinó si TGFβ inducía LIF en neuroprogenitores
 65 humanos normales. Las neuroesferas normales no inducían LIF en respuesta a TGFβ1, TGFβ2 ó TGFβ3 comparado con las neuroesferas de GBM (Figura 8B). Además, TGFβ no inducía LIF en neuroprogenitores de ratón obtenidos de embriones de ratón o a partir de la zona subventricular de ratones adultos (datos no mostrados). Esto indicaba que la inducción de LIF por TGFβ es específica de neuroesferas de GBM. Como se esperaba, puesto que TGFβ no indujo

LIF, TGF β no aumentó la capacidad de auto-renovación de neuroprogenitores normales y el número y tamaño de las neuroesferas neuroprogenitoras no aumentaba por el tratamiento con TGF β . De hecho, las neuroesferas tratadas con TGF β eran más pequeñas y el número total de células había disminuido por la presencia de TGF β (Figura 8C, 8D). LIF, por otra parte, aumentó el número y tamaño de las neuroesferas nuevamente formadas así como el número total de células (Figura 8C, 8D) de acuerdo con artículos anteriores (Bauer y Patterson, 2006; Wright *et al.*, 2003). De esta manera, LIF tiene el mismo efecto sobre la auto-renovación en neuroesferas normales y de GBM. Por el contrario, hay una diferencia en el efecto del TGF β sobre la capacidad de auto-renovación de neuroesferas normales y tumorales debido a la incapacidad del TGF β para inducir LIF en neuroprogenitores normales.

Ejemplo 8

La expresión de LIF en gliomas humanos se correlaciona con TGF β 2 y marcadores de neuroprogenitores

Para evaluar si LIF se expresaba en gliomas humanos, se analizaron los niveles de LIF en un panel de 39 gliomas. Se observó que LIF se expresaba en 17 y se expresaba mucho en 4-6 de los 39 gliomas (Figura 9A) indicando que una gran proporción de gliomas humanos expresa LIF. Puesto que LIF es inducido por TGF β y se encontró en trabajos previos que TGF β 2 es responsable de la alta actividad TGF β observada en gliomas (Bruna *et al.*, 2007, citado *supra*), se evaluó si el TGF β 2 estaba implicado en la expresión de LIF. En efecto, los niveles de LIF se correlacionaban con TGF β 2 en el panel de gliomas apoyando más que TGF β 2 es responsable de la inducción de LIF en gliomas humanos (Figura 9A, B). Si LIF fomenta la auto-renovación de GIC, el conjunto de este tipo de células debería estar enriquecido en tumores que expresan niveles altos de LIF. Para abordar esta hipótesis, se compararon los niveles de LIF con la expresión de marcadores de neuroprogenitores/GIC. Los niveles de LIF se correlacionaban con la expresión de Musashi-1 y Nestina pero no de Sox2 (Figura 9A, B), indicando que LIF fomenta la auto-renovación de GIC y aumenta el conjunto de GICs presentes en la masa tumoral.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un agente inhibidor de la expresión y/o la actividad de una citoquina de tipo IL-6 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades asociadas con una proliferación celular indeseable en donde dicho inhibidor se selecciona del grupo formado por ARNips, oligonucleótidos antisentido, ribozimas específicos y anticuerpos.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, en donde los anticuerpos son anticuerpos inhibidores específicos de dicha citoquina de tipo IL-6 o anticuerpos que bloquean los receptores de las citoquinas de tipo IL-6.
3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, donde dicha citoquina de tipo IL-6 se selecciona entre LIF, IL-6, IL-11, oncostatina M, cardiotrofina-1, CNTF y CLC.
- 15 4. Uso según la reivindicación 3, donde la citoquina de tipo IL-6 es LIF.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha enfermedad que cursa con proliferación celular indeseable es cáncer.
- 20 6. Uso según la reivindicación 5 en donde el cáncer se caracteriza por presentar niveles elevados de la citoquina de tipo IL-6.
7. Uso según la reivindicación 5 ó 6, en donde dicho cáncer es un glioma.
- 25 8. Uso según la reivindicación 7, en donde dicho glioma es un glioma de tipo IV.
9. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de la expresión y/o la actividad de una citoquina de tipo IL-6 junto con vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicho inhibidor se selecciona del grupo formado por ARNips, oligonucleótidos antisentido, ribozimas específicos y anticuerpos.
- 30 10. Composición según la reivindicación 9, en donde los anticuerpos son anticuerpos inhibidores específicos de dicha citoquina de tipo IL-6 o anticuerpos que bloquean los receptores de las citoquinas de tipo IL-6.
- 35 11. Composición según la reivindicación 9 ó 10, donde dicha citoquina de tipo IL-6 se selecciona entre LIF, IL-6, IL-11, oncostatina M, cardiotrofina-1, CNTF y CLC.
12. Composición según la reivindicación 11, donde la citoquina de tipo IL-6 es LIF.
- 40 13. Método *in vitro* para la identificación de compuestos capaces de bloquear/inhibir la proliferación celular de células tumorales inducida por una citoquina de tipo IL-6 o una variante funcionalmente equivalente del mismo que comprende las etapas de:
 - 45 (i) poner en contacto una célula que exprese el receptor para una citoquina de tipo IL-6 con una citoquina de tipo IL-6 y un compuesto candidato, e
 - (ii) identificar aquellos compuestos que bloquean la proliferación celular de dicha célula.
- 50 14. Método según la reivindicación 13, en donde la célula que expresa el receptor para una citoquina de tipo IL-6 es una célula de glioma, preferentemente, una célula iniciadora de glioma (CIG).
15. Método según la reivindicación 13 ó 14, donde dicha citoquina de tipo IL-6 se selecciona entre LIF, IL-6, IL-11, oncostatina M, cardiotrofina-1, CNTF y CLC.
- 55 16. Método según la reivindicación 15, donde la citoquina de tipo IL-6 es LIF.
17. Método *in vitro* para el diagnóstico de enfermedades asociadas con una proliferación celular indeseable en un sujeto o para determinar la predisposición de un sujeto a padecer dicha enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable, o para determinar el estadio o severidad de dicha enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable en un sujeto, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto con dicha enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable, que comprende cuantificar los niveles de expresión del gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 o de la proteína codificada por dicho gen o variante funcionalmente equivalente de dicha proteína en una muestra biológica procedente de dicho sujeto, en donde un aumento de la expresión del gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 o de la proteína codificada por dicho gen o variante funcionalmente equivalente de dicha proteína, con respecto a la expresión del gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 o de la proteína codificada por dicho gen o variante funcionalmente equivalente de dicha proteína en una muestra control, es indicativa de una enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable, o de mayor predisposición de dicho sujeto a padecer

una enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable o de la no respuesta a la terapia administrada a dicho sujeto.

18. Método según la reivindicación 17, donde dicha citoquina de tipo IL-6 se selecciona entre LIF, IL-6, IL-11, oncostatina M, cardiotrofina-1, CNTF y CLC.

19. Método según la reivindicación 18, donde la citoquina de tipo IL-6 es LIF.

20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en donde dicha enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable es cáncer.

21. Método según la reivindicación 20 en donde el cáncer se **caracteriza** por presentar niveles elevados de la citoquina de tipo IL-6.

22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, en donde dicho cáncer es un glioma.

23. Método según la reivindicación 22, en donde dicho glioma es un glioma de tipo IV.

24. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, en donde la cuantificación de los niveles de expresión del gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 comprende la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de dicho gen, un fragmento de dicho ARNm, ADN complementario (ADNc) de dicho gen, un fragmento de dicho ADNc, o sus mezclas.

25. Método según la reivindicación 24, donde la cuantificación de los niveles de expresión del gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa.

26. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, en donde la cuantificación de los niveles de proteína se realiza mediante Western blot, inmunohistoquímica o ELISA.

27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, en donde la cuantificación de los niveles de proteína se realiza mediante la determinación de la actividad dicha proteína.

28. Uso de un kit que comprende reactivos para la cuantificación de los niveles de expresión del gen que codifica una citoquina de tipo IL-6 o de la proteína codificada por dicho gen o variante funcionalmente equivalente de dicha proteína para el diagnóstico de enfermedades asociadas con una proliferación celular indeseable en un sujeto o para determinar la predisposición de un sujeto a padecer dicha enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable, o para determinar el estadio o severidad de dicha enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable en un sujeto, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto con dicha enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable, en donde, si los reactivos detectan un aumento en la expresión de dicho gen o dicha proteína o variante funcionalmente de la misma respecto a una muestra control, entonces dicho sujeto puede padecer una enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable, o presenta mayor predisposición a padecer dicha enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable, o presenta mayor severidad de dicha enfermedad, o la terapia administrada no está siendo efectiva.

29. Uso según la reivindicación 28, en donde dicha enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable es cáncer.

30. Uso según la reivindicación 29, en donde dicho cáncer se **caracteriza** por presentar niveles elevados de una citoquina de tipo IL-6.

31. Uso según la reivindicación 29 ó 30, en donde dicho cáncer es un glioma.

32. Uso según la reivindicación 31, en donde dicho glioma es un glioma de tipo IV.

33. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 32, donde dicha citoquina de tipo IL-6 se selecciona entre LIF, IL-6, IL-11, oncostatina M, cardiotrofina-1, CNTF y CLC.

34. Uso según la reivindicación 33, donde la citoquina de tipo IL-6 es LIF.

35. Método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada a un paciente que sufre una enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable que comprende:

(a) cuantificar los niveles de expresión de la citoquina de tipo IL-6 en dicho paciente, y

(b) comparar dichos niveles de expresión con niveles control,

en donde si los niveles de expresión de una citoquina de tipo IL-6 en dicho paciente son mayores que los valores control, entonces se selecciona para dicho paciente un agente inhibidor de una citoquina de tipo IL-6, en donde el

agente inhibidor se selecciona del grupo formado por ARNips, oligonucleótidos antisentido, ribozimas específicos y anticuerpos.

36. Método *in vitro* para la selección de pacientes que sufren una enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable, para ser tratados con un agente inhibidor de una citoquina de tipo IL-6 que comprende

(a) cuantificar los niveles de expresión de la citoquina de tipo IL-6 en dicho paciente, y

(b) comparar dichos niveles de expresión con niveles control,

en donde si los niveles de expresión de una citoquina de tipo IL-6 en dicho paciente son mayores que los valores control, entonces dicho paciente es seleccionado para recibir un tratamiento con un agente inhibidor de una citoquina de tipo IL-6, en donde el agente inhibidor se selecciona del grupo formado por ARNips, oligonucleótidos antisentido, ribozimas específicos y anticuerpos.

37. Método según la reivindicación 35 ó 36, en donde dicho agente actúa a través de la inhibición de la autoregeneración de las células madre tumorales.

38. Método según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37, en donde los anticuerpos son anticuerpos inhibidores específicos de dicha citoquina de tipo IL-6 o anticuerpos que bloquean los receptores de las citoquinas de tipo IL-6.

39. Método según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 38, donde dicha citoquina de tipo IL-6 se selecciona entre LIF, IL-6, IL-11, oncostatina M, cardiotrofina-1, CNTF y CLC.

40. Método según la reivindicación 39, donde la citoquina de tipo IL-6 es LIF.

41. Método según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 40, en donde dicha enfermedad que cursa con proliferación celular indeseable es cáncer.

42. Método según la reivindicación 41, en donde dicho cáncer es un glioma.

43. Método según la reivindicación 42, en donde dicho glioma es un glioma de tipo IV.

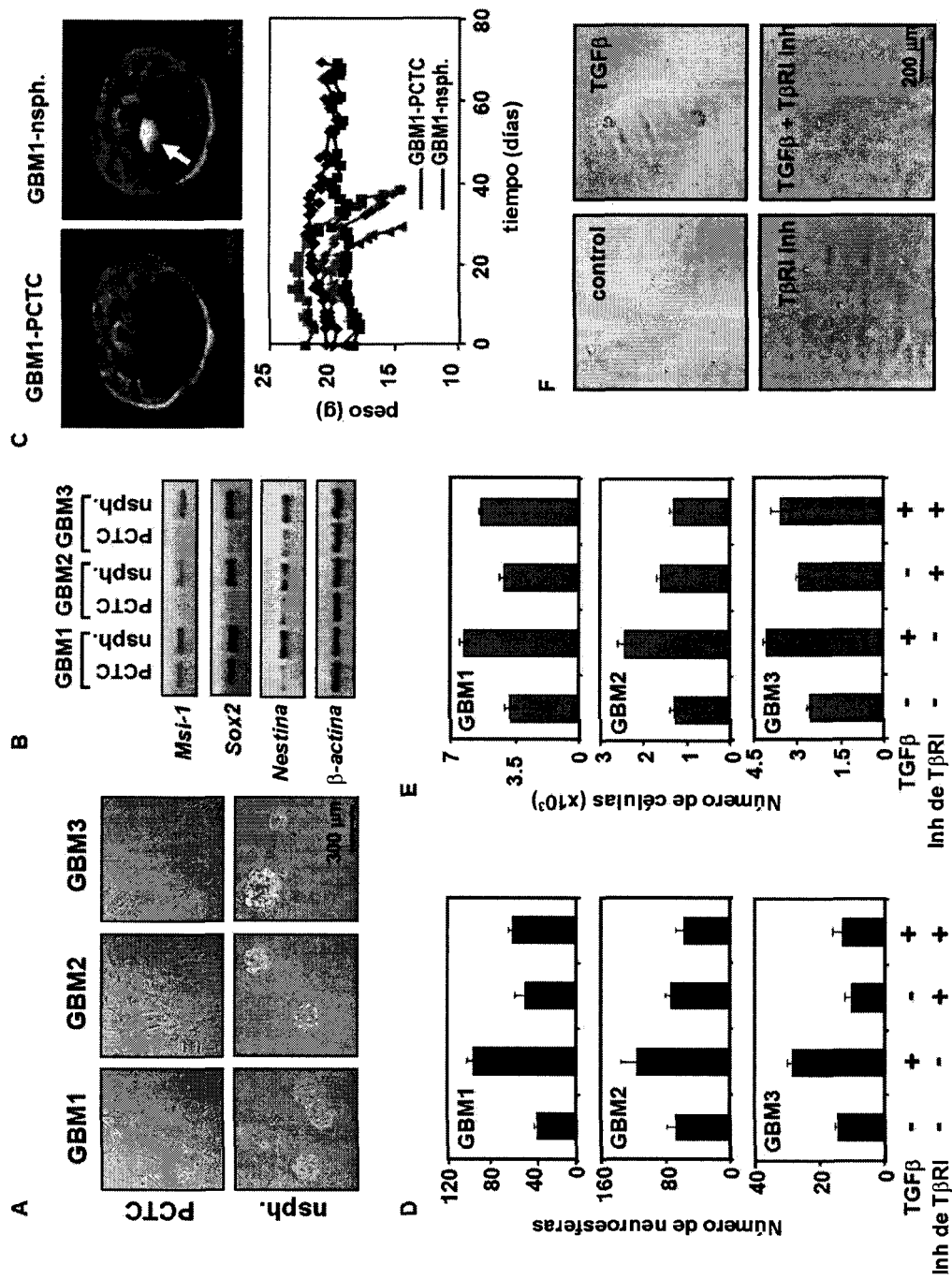


FIGURA 1

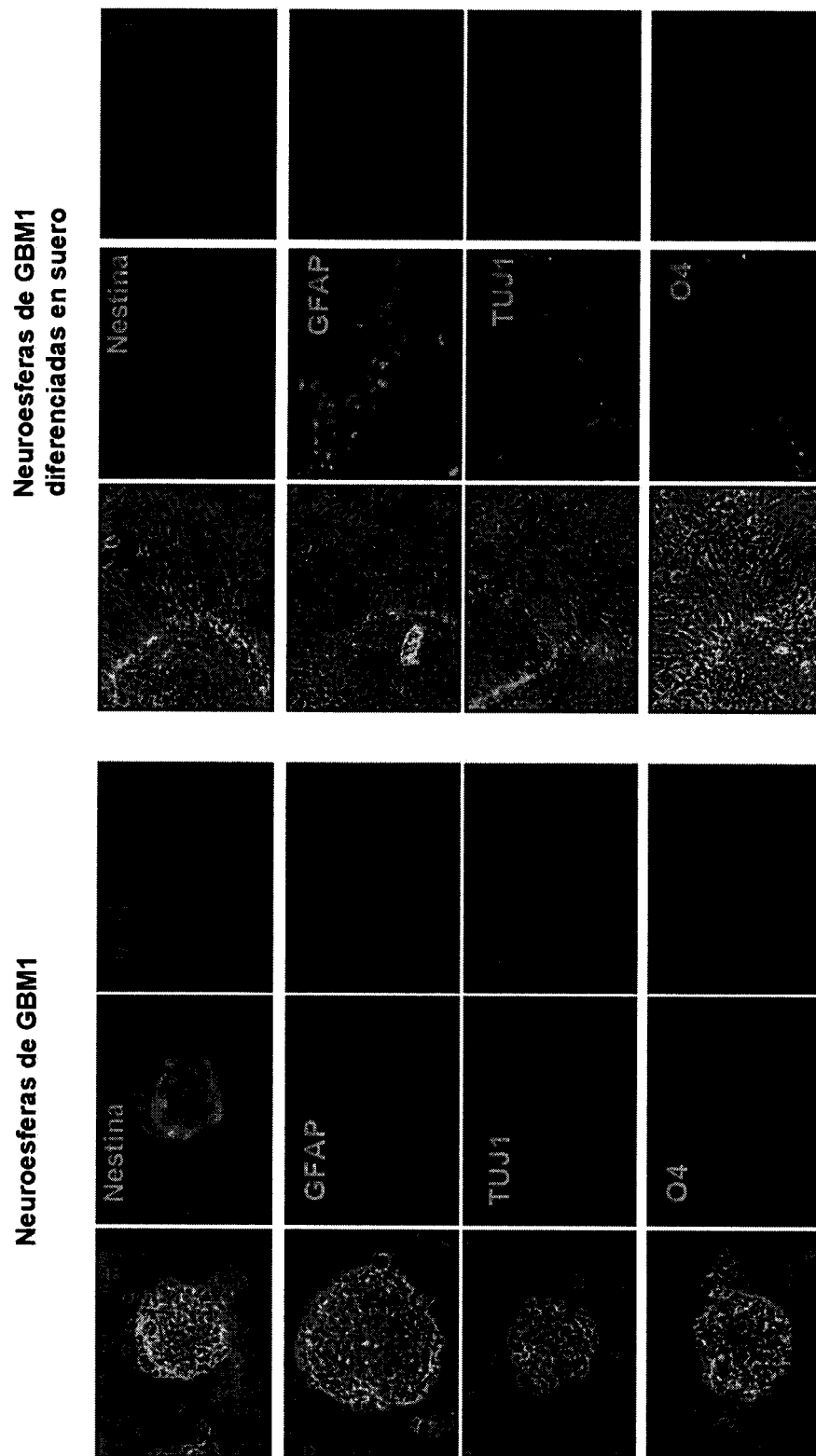


FIGURA 2

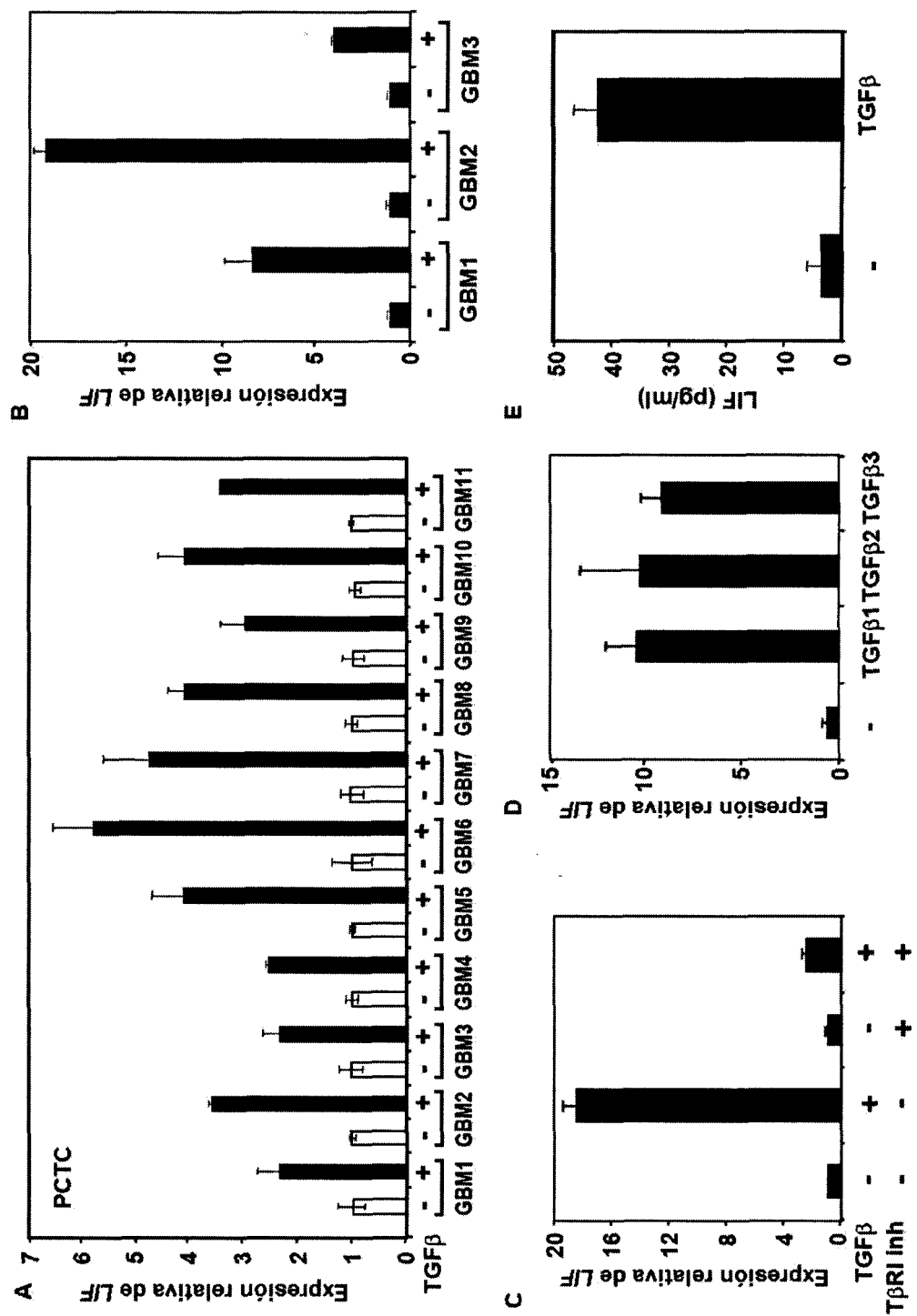


FIGURA 3

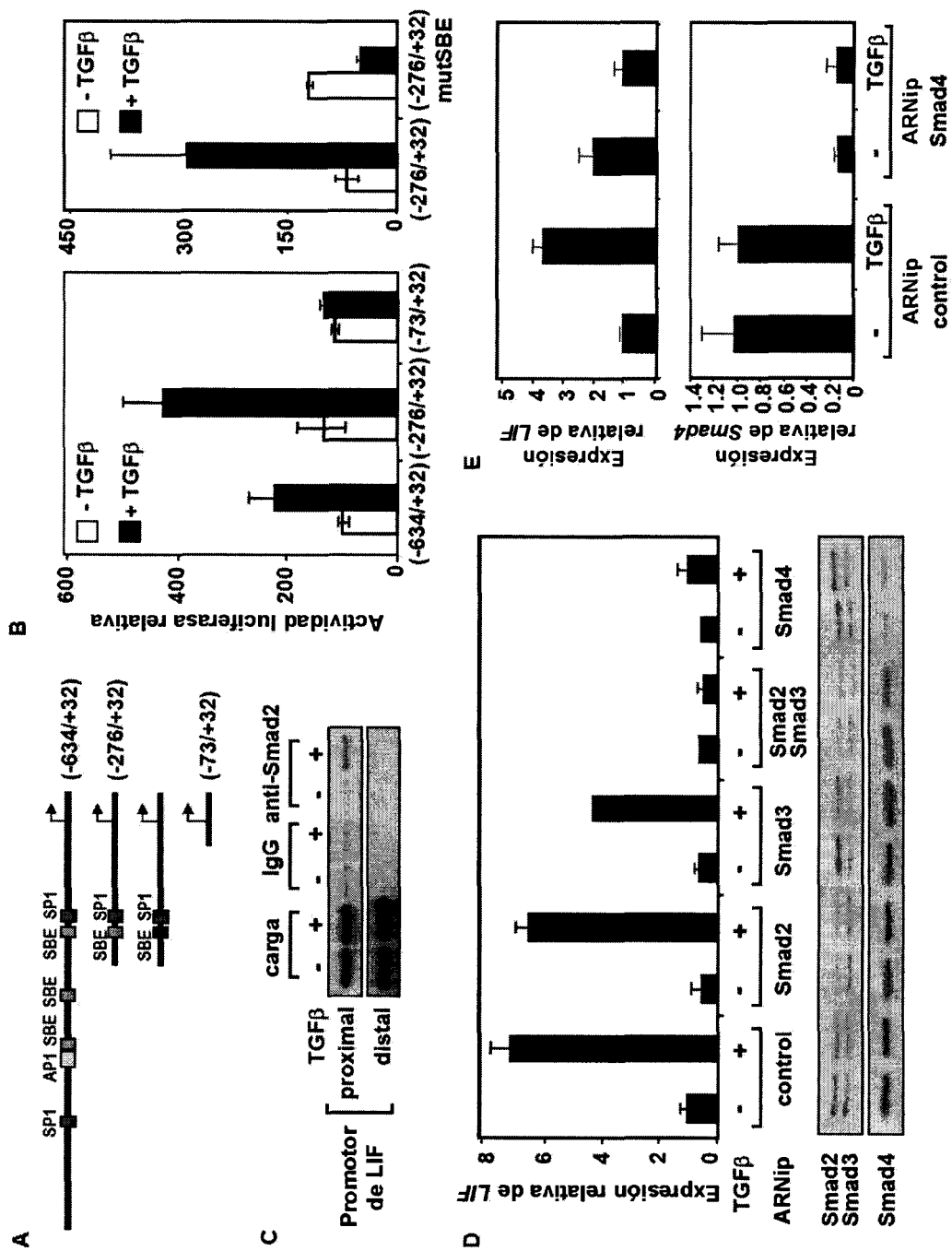


FIGURA 4

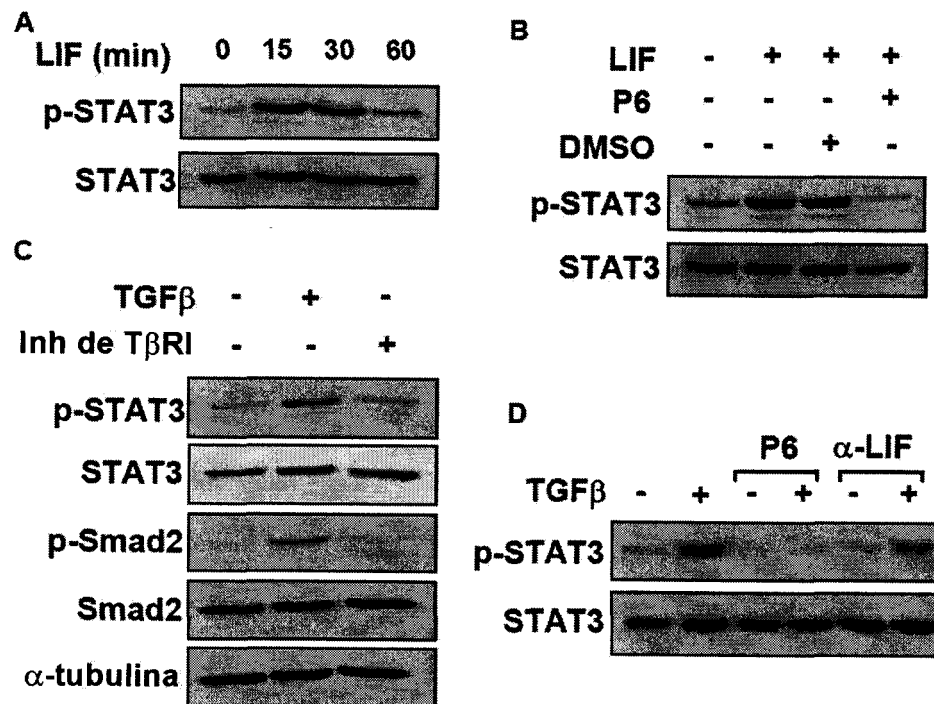


FIGURA 5

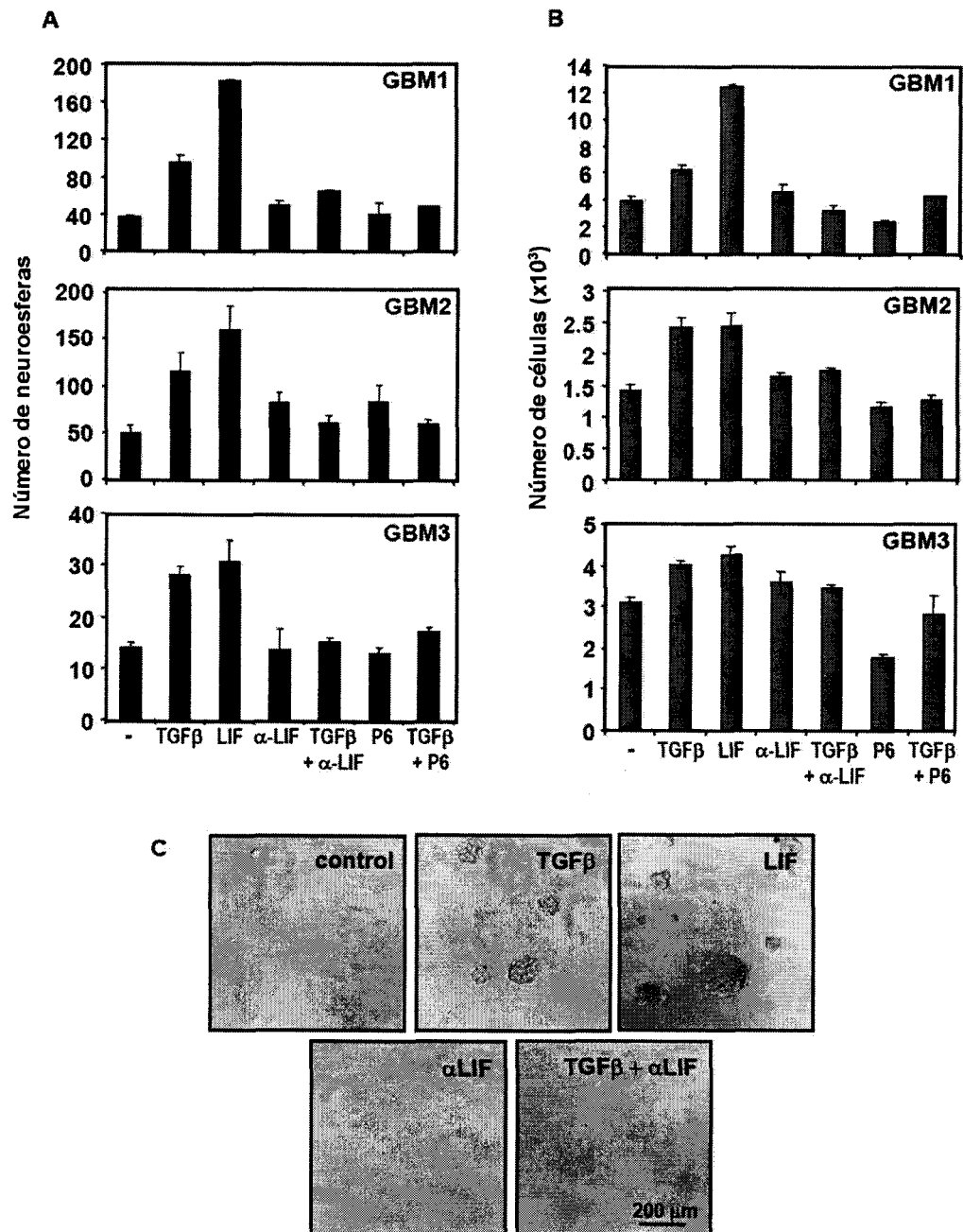


FIGURA 6

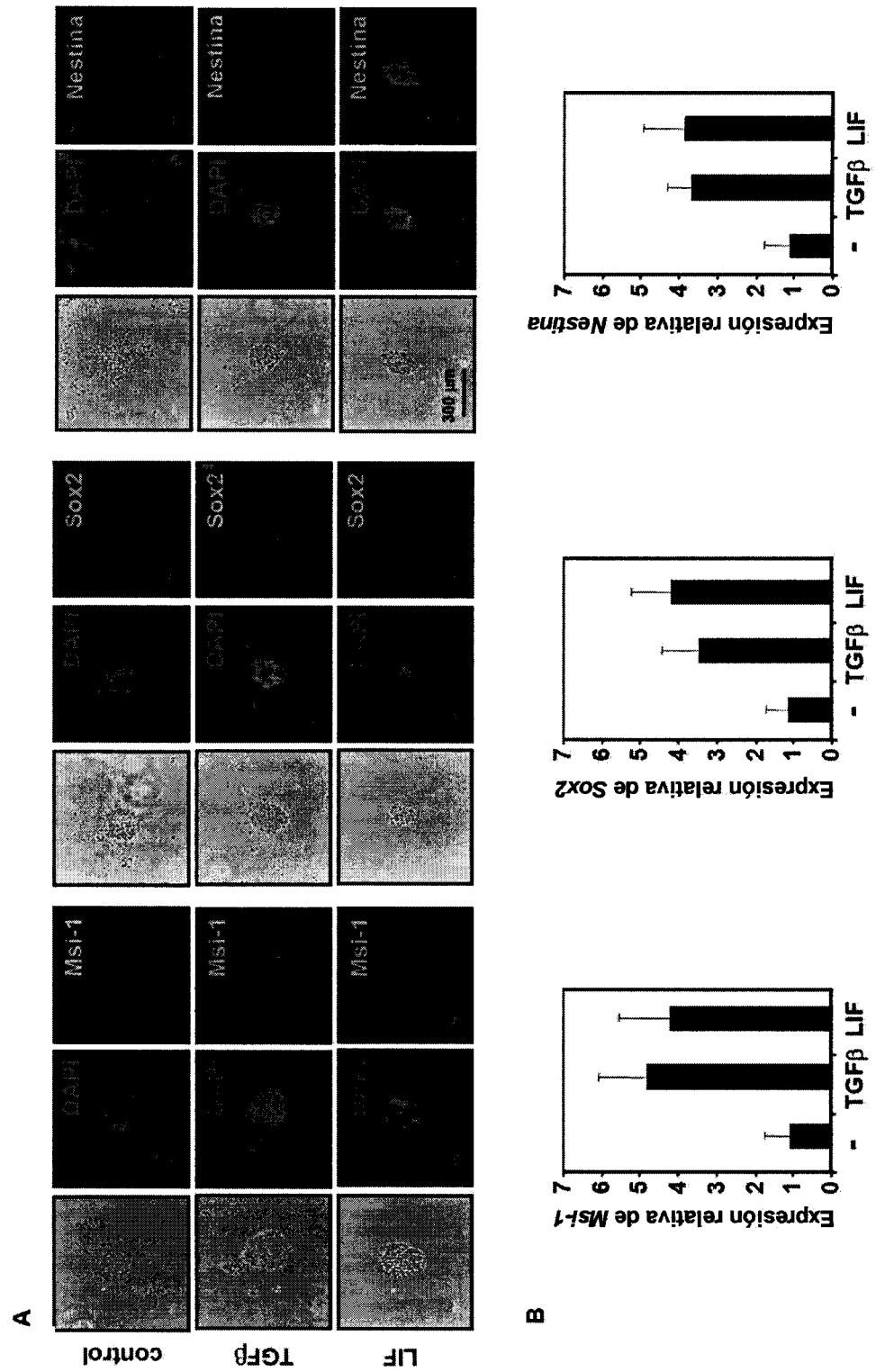


FIGURA 7

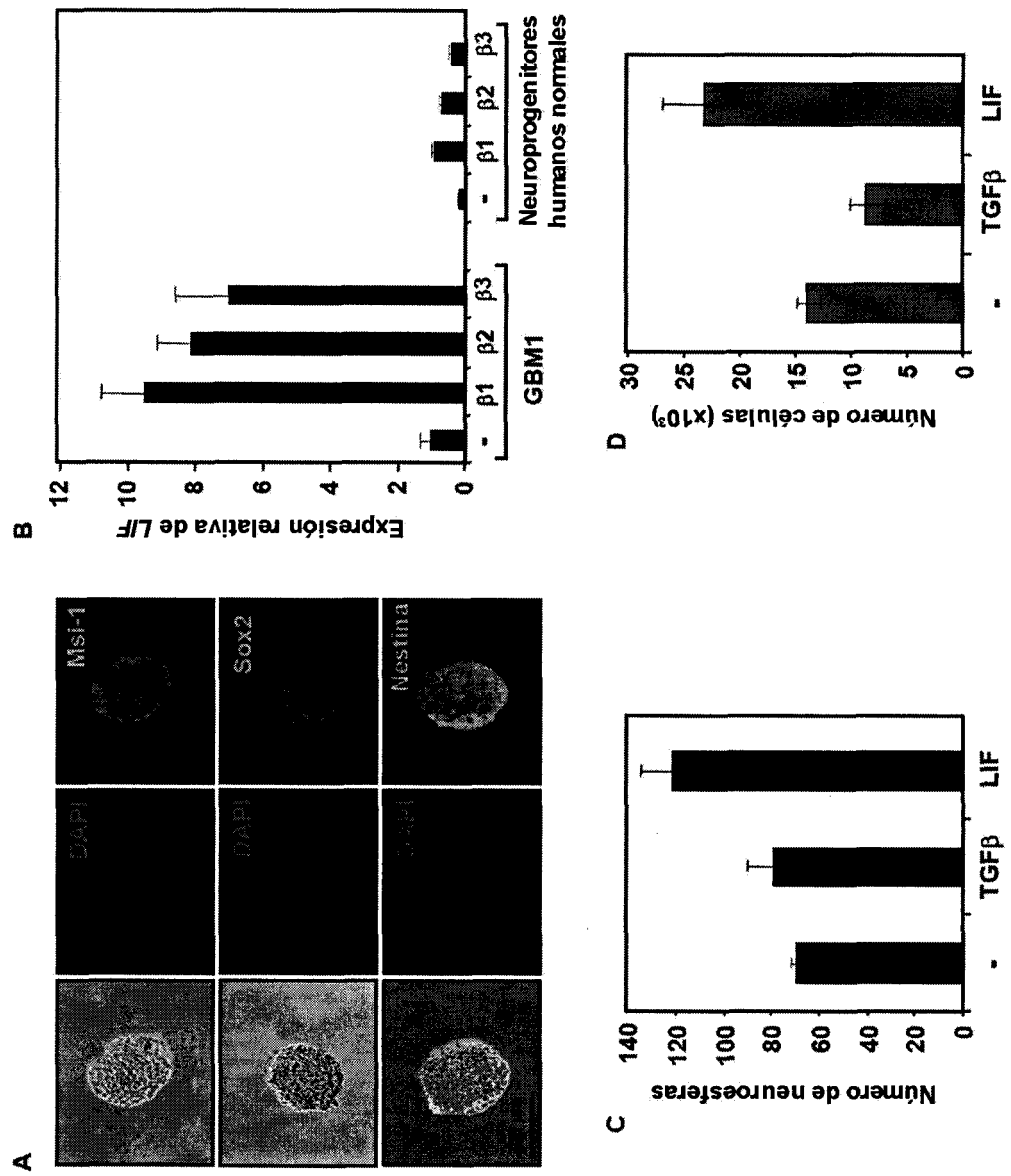


FIGURA 8

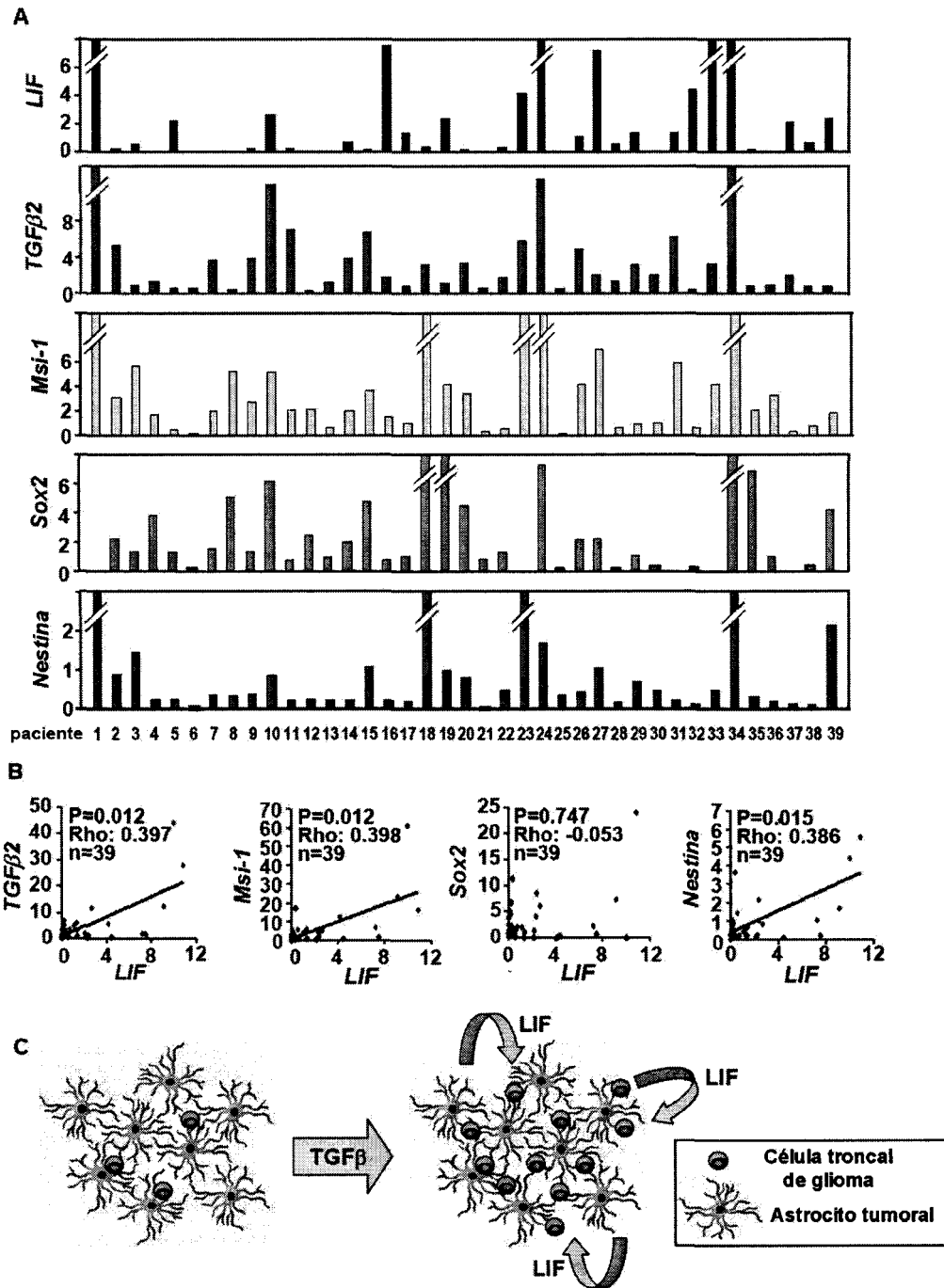


FIGURA 9



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200900928

②② Fecha de presentación de la solicitud: 03.04.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2006121558 A2 (OMOIGUI, O. [US]) 16.11.2006, todo el documento, especialmente resumen; párrafo [00251] ; reivindicaciones 1,16,17,30,31,44,45,58,59,72,73,86,87,96.	1-13,15-36,38-43
Y		14,37
Y	SETOGUCHI, T., <i>et al.</i> Cancer stem cells persist in many cancer cell lines. Cell cycle. Abril 2004. Vol. 3, nº 4, páginas 414-415. ISSN 1538-4101 (Impreso). Ver todo el documento.	14,37
Y	EP 0572118 A1 (TOSOH CORP [JP]; KISHIMOTO, T. [JP]) 01.12.1993, todo el documento, especialmente resumen; columna 2, líneas 13-26; columna 4, líneas 48-55; columna 9, líneas 24-34; ejemplos 5,6; reivindicaciones 1,2,15,16.	1-43
Y	WEISSENBERG, J., <i>et al.</i> IL-6 is required for glioma development in a mouse model. Oncogene. 22.04.2004. Vol. 23, nº 19, páginas 3308-3316. ISSN 0950-9232 (Impreso). doi:10.1038/sj.onc.1207455. Ver resumen, introducción, 5º apartado de resultados, y párrafos 1º y 6º de discusión.	1-43
Y	WO 2005030803 A1 (INST MEDICAL W & E HALL [AU]; BACA, M. [AU]; FAIRLIE, W.D. [AU]; UBOLDI, A.D. [AU]) 07.04.2005, todo el documento, especialmente resumen; página 1, líneas 10-20; página 2, líneas 1-5; página 3, líneas 12-14; página 4, líneas 17-19; página 5, líneas 25-28; páginas 7,8,24; página 25, líneas 20-21; ejemplo 16; reivindicaciones 1,9,10,18,29,49-51.	1-43
Y	READ, T-A, <i>et al.</i> The neurobiology of neurooncology. Annals of neurology. Julio 2006. Vol. 60, nº 1, páginas 3-11. ISSN 0364-5134 (Impreso). doi:10.1002/ana.20912. Ver todo el documento, especialmente los apartados "Histological Classification of Brain Tumors" y "Cellular Origins of Astrocytoma".	1-43
A	LI, G., <i>et al.</i> Autocrine factors sustain glioblastoma stem cell self-renewal. Oncology reports. Febrero 2009. Vol. 21, nº 2, páginas 419-424. ISSN 1021-335X (Impreso). Ver todo el documento.	1-43

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
05.07.2011

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K38/20 (2006.01)

C07K16/24 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C07K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 05.07.2011

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-43
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones
Reivindicaciones 1-43

SI
NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2006/121558 A2 (OMOIGUI, O. [US])	16.11.2006
D02	SETOGUCHI, T., <i>et al.</i> Cell cycle. Abril 2004. Vol. 3, nº 4, páginas 414-415. ISSN 1538-4101 (Impreso).	Abril 2004
D03	EP 0572118 A1 (TOSOH CORP [JP]; KISHIMOTO, T. [JP])	01.12.1993
D04	WEISSENBERG, J., <i>et al.</i> Oncogene. 22.04.2004. Vol. 23, nº 19, páginas 3308-3316. ISSN 0950-9232 (Impreso). doi:10.1038/sj.onc.1207455.	22.04.2004
D05	WO 2005/030803 A1 (INST MEDICAL W & E HALL [AU]; BACA, M. [AU]; FAIRLIE, W.D. [AU]; UBOLDI, A.D. [AU])	07.04.2005
D06	READ, T-A, <i>et al.</i> Annals of neurology. Julio 2006. Vol. 60, nº 1, páginas 3-11. ISSN 0364-5134 (Impreso). oi:10.1002/ana.20912.	Julio 2006
D07	LI, G., <i>et al.</i> Oncology reports. Febrero 2009. Vol. 21, nº 2, páginas 419-424. ISSN 1021-335X (Impreso).	Febrero 2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe y reivindica el uso de agentes inhibidores de una citoquina de tipo interleuquina 6 (IL-6) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades asociadas con una proliferación celular indeseable. En concreto, se refiere al uso de compuestos inhibidores de LIF (leukemia inhibitory factor) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de glioma. La solicitud reivindica también un método para la identificación de compuestos capaces de inhibir la proliferación de células tumorales, así como un método in vitro para el diagnóstico de enfermedades asociadas con una proliferación celular indeseable, un método para diseñar una terapia personalizada para un paciente que sufre una enfermedad asociada con una proliferación celular indeseable, y un método para seleccionar pacientes que sufren este tipo de enfermedad como susceptibles de ser tratados con el agente inhibidor de una citoquina tipo IL-6.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue el uso y los métodos reivindicados, por lo que la solicitud es nueva según el artículo 6 de la Ley 11/1986 de Patentes.

Sí se han encontrado, sin embargo, varios documentos en los que se describe el uso de inhibidores de citoquinas de tipo IL-6, y concretamente de LIF, en el tratamiento de tumores. Como se detalla a continuación, estos documentos, por sí mismos o combinados, afectan la actividad inventiva de las reivindicaciones de la solicitud, por lo que ésta no cumple el requisito del artículo 8 de la Ley de Patentes.

Así, el documento D01 se relaciona con un método para prevención y tratamiento de cáncer (incluidos glioma y glioblastoma) y enfermedades inflamatorias relacionadas con la edad. El método se basa en la inhibición de la ruta de señalización de IL-6 mediante la administración de agentes inhibidores de esta interleuquina o de su receptor (incluyendo oligonucleótidos antisentido y ribozimas), entre otros muchos compuestos. En el documento D01 (ver párrafo [00251]) se hace notar que otras citoquinas de la familia de IL-6 (que se incluyen en las reivindicaciones de la presente solicitud) usan gp130 como molécula transdutora de señales, y que tienen actividades biológicas semejantes a IL-6. Esto indica que se podrían emplear todas estas citoquinas en el método de D01, y, en consecuencia, este documento afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 1-13, 15-36 y 38-43.

La diferencia fundamental entre la solicitud y D01 es que en este documento no se menciona la presencia de células madre tumorales (o células iniciadoras de glioma), incluidas en las reivindicaciones 14 y 37 de la solicitud. Es ampliamente conocido en el estado de la técnica que existen células madre tumorales, y que son las principales responsables de la malignidad de los tumores. Por ejemplo, en el documento D02 se describe la presencia de células madre en varias líneas celulares, incluyendo células de glioma. Por consiguiente, a la luz de lo divulgado en los documentos D01 y D02, sería evidente para el experto en la materia aplicar el uso y los métodos reivindicados en la presente solicitud a las células madre tumorales o células iniciadoras de glioma, que es el objeto de las reivindicaciones 14 y 37 de la solicitud.

Por tanto, la solicitud en su conjunto no cumple el requisito de actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes a la luz de lo divulgado en D01 y D02.

El documento D03 divulga el uso de anticuerpos monoclonales anti-gp130 para inhibir la función fisiológica de IL-6, y, de este modo impedir el crecimiento de células tumorales (concretamente, líneas celulares de mieloma humano). Los autores concluyen que los anticuerpos podrían utilizarse como agentes terapéuticos para el tratamiento de mieloma. Además, estos anticuerpos serían útiles también como inhibidores de otras citoquinas, como LIF (ver columna 9, líneas 24 a 34).

La aplicación del método de D03 para el tratamiento de gliomas sería evidente para el experto en la materia tras combinar este documento con lo divulgado en D04, en el que se describe que IL-6, además de tener su expresión elevada en glioblastoma multiforme (un glioma de grado IV), es esencial para el desarrollo y progreso del tumor, pues la eliminación del gen de IL-6 en ratones transgénicos impide la formación del tumor (ver el 5º apartado de Resultados).

Por tanto, a la luz de lo divulgado en los documentos D03 y D04, las reivindicaciones 1 a 43 de la solicitud no cumplen el requisito de actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

Igualmente, en el documento D05 se describen moduladores de LIF, su intervención en procesos fisiológicos mediados por citoquinas, y su utilidad para tratamiento del cáncer y otras enfermedades y condiciones patológicas. En el documento D06, por otra parte, se divulga la presencia de células madre tumorales en gliomas, y cómo la proliferación del tumor depende de IL-6 y LIF (ver página 7). Para el experto en la materia resultaría evidente la combinación de estos dos documentos y, a partir de la información divulgada en ellos, deducir el uso, composiciones y métodos reivindicados en la presente solicitud. Por tanto, ésta no tiene actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

Por último, se cita el documento D07, que contiene información general del estado de la técnica, y que no afecta la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud. Este documento consiste en un estudio in vitro del efecto de factores autocrinos en la autorenovación de las células madre de glioblastoma multiforme humano. En él se concluye que los factores EGF y bFGF son esenciales para la autorenovación y proliferación de las células madre tumorales.