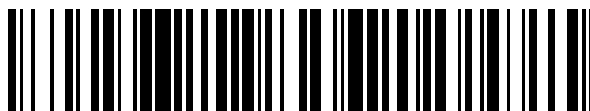


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 522**

51 Int. Cl.:

A61K 38/57 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 41/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06824316 .1**

96 Fecha de presentación: **19.12.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1965831**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.09.2008**

54 Título: **USO DE UN INHIBIDOR C1 PARA LA PREVENCIÓN DE LESIONES POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.**

30 Prioridad:
21.12.2005 EP 05112630
23.01.2006 US 760944 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2011

73 Titular/es:
PHARMING INTELLECTUAL PROPERTY B.V.
DARWINWEG 24
2333 CR LEIDEN, NL

72 Inventor/es:
MANNESSE, Maurice;
NUIJENS, Johannes Henricus;
PIEPER, Frank;
DE SIMONI, Maria Grazia y
ZIERE, Gijsbertus Johannes

74 Agente: **Tomas Gil, Tesifonte Enrique**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 369 522 T3

DESCRIPCIÓN

Uso de un inhibidor C1 para la prevención de lesiones por isquemia-reperfusión

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al uso profiláctico y terapéutico del inhibidor C1 para prevenir, reducir y tratar una lesión por isquemia-reperfusión, en particular una lesión de isquemia-reperfusión cerebral que puede suceder como resultado de un accidente cerebrovascular.

Antecedentes de la invención

[0002] La lesión por isquemia-reperfusión es una condición patológica bien conocida. Puede representar una condición patológica prevista o una condición patológica imprevista. El accidente cerebrovascular es uno de los tipos más comunes de lesión por isquemia-reperfusión imprevista. El accidente cerebrovascular es la tercera causa de muerte y la causa principal de incapacidad a largo plazo en países industrializados. El accidente cerebrovascular es un tipo de enfermedad cardiovascular que afecta a las arterias que se dirigen al cerebro y a las del mismo. Un accidente cerebrovascular ocurre cuando tales arterias se bloquean por un coágulo o se rompen y dan como resultado una isquemia de los tejidos cerebrales que son atendidos por la arteria bloqueada. Se causa un daño directo al cerebro por la interrupción del flujo sanguíneo, principalmente debido a la pérdida de oxigenación al tejido viable, en última instancia conduciendo al infarto si no se invierte. No obstante si se invierte la lesión (bien fisiológicamente o terapéuticamente), entonces la perfusión del tejido isquémico puede paradójicamente causar más daños indirectos. Cuando la isquemia es de larga duración, el daño "directo" que resulta de la hipoxia sola es el mecanismo predominante. Para isquemias de menor duración, el daño indirecto o mediado por perfusión se vuelve cada vez más importante para el resultado final.

[0003] El inhibidor C1 (INH C1), el inhibidor de complemento C1, ha mostrado acción neuroprotectora al reducir la lesión por isquemia-reperfusión en modelos de roedor con isquemia-reperfusión cerebral (De Simoni et al., 2003, J Cereb Blood Flow Metab. 23: 232-9; Akita et al., 2003, Neurosurgery 52: 395-400). La acción neuroprotectora del INH C1 en lesión por isquemia-reperfusión cerebral no requiere C1q (De Simoni et al., 2004, ser J Pathol. 164: 1857-63). Más recientemente Storini et al. (2005, Neurobiol Dis. 19: 10-7) divulgó que el INH C1 ejerce una acción antiapoptótica y antiinflamatoria en lesión por isquemia-reperfusión a través de la inhibición de la inflamación y el reclutamiento de célula de la vasculatura al sitio isquémico. No obstante, el espacio de tiempo en un accidente cerebrovascular en el que la administración de INH C1 es terapéuticamente eficaz es más bien limitado. Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar al INH C1 una ventana de tiempo mayor en cuanto al tiempo de administración.

Descripción de la invención

[0004] La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que cuando el inhibidor C1 (INH C1) derivado de plasma de origen natural, ha perdido la mayor parte de su capacidad para reducir una lesión por isquemia-reperfusión en un modelo de ratón con isquemia cerebral focal transitoria cuando se administra después de la isquemia, una preparación recombinante de INH C1 sigue siendo capaz de ejercer sus efectos neuroprotectores también cuando se inyecta al menos 1 hora después de la isquemia y/o perfusión. Sorprendentemente, un efecto neuroprotector se puede todavía conseguir cuando el INH C1 se inyecta 18 horas después de la isquemia y/o perfusión. La diferencia entre el INH C1 derivado de plasma de origen natural y la preparación recombinante de INH C1 es que el primero tiene una vida media de plasma de al menos 24 horas y es completamente glicoproteína sialilada, y el último tiene una vida media de plasma reducida y tiene una glicosilación diferente en comparación con el producto derivado de plasma.

[0005] Una diferencia conocida entre el INH C1 derivado de plasma de origen natural y la preparación recombinante de INH C1 es la extensión y tipo de glicosilación. La glicoproteína recombinante contiene un amplio conjunto de diferentes N-glicanos, comprendiendo estructuras oligomanosas, híbridas y de tipo complejo, mientras que los N-glicanos de INH C1 derivado de plasma están principalmente compuestos por estructuras de tipo complejo completamente sialiladas. Como resultado de las diferencias en la glicosilación, la glicoproteína derivada de plasma tiene una vida media de plasma de al menos 24 horas y el INH C1 recombinante tiene una vida media de plasma reducida.

[0006] Por lo tanto, en un aspecto la presente invención se refiere a un método para la prevención, reducción o tratamiento de al menos una lesión por isquemia-reperfusión, donde el inhibidor C1 se administra al menos después del periodo de isquemia y/o el inicio de perfusión y donde el inhibidor C1 tiene un nivel reducido de residuos de ácidos siálicos terminales en comparación con el inhibidor C1 humano derivado de plasma. El método comprende preferiblemente el paso de administrar una cantidad eficaz de un INH C1 con una vida media de plasma menor que la vida media de plasma de un INH C1 derivado de plasma. Alternativamente, el método comprende preferiblemente el paso de administrar una cantidad eficaz de un INH C1 que tenga una glicosilación diferente en comparación con el INH C1 derivado de plasma. Este método se refiere a un uso profiláctico y/o terapéutico de un inhibidor C1 para la prevención, reducción y/o tratamiento de cualquier tipo de lesión por isquemia-reperfusión.

[0007] Un inhibidor C1, también referido como inhibidor de C1 esterasa se define aquí, como un inhibidor de complemento C1. El INH C1 pertenece a la superfamilia de inhibidores de proteinasa de serina y es el único

inhibidor de C1r y C1s del sistema de complemento y es el inhibidor mayor de factor XIIa y kalikreína del sistema de contacto. Además el INH C1 también inhibe otras serín proteasas de la coagulación y sistemas fibrinolíticos como el factor XI, activador de plasminógeno de tipo tejido y plasmina (Schapira et al. 1985, Complement 2: 111; Davis, 1988, Ana. Rev. Immunol. 6: 595). El INH C1 humano es una proteína de 500 aminoácidos, incluyendo una secuencia señal de 22 aminoácidos (Carter et al. 1988, Euro. J. Biochem. 173, 163). El INH C1 de plasma es una glicoproteína de aproximadamente 76 kDa y está fuertemente glicosilada, hasta el 26% de su masa molecular es carbohidrato (Perkins et al., 1990, J. Mol. Biol. 214, 751). Un INH C1 para su uso en los métodos de la presente invención es preferiblemente una proteína con una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 65, 67, 68, 69, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos del INH C1 humano maduro como se representa en la SEC ID NO:1.

[0008] Con motivo de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se refiere al porcentaje de aminoácidos que son idénticos en las dos secuencias. Primero, las secuencias polipéptidas homólogas se buscan usando el algoritmo de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), que se describe en Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). El software para realizar los análisis BLAST está públicamente disponible a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los parámetros W, B y E del algoritmo de BLAST determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLAST usa como valores predeterminados una longitud de palabra (W) de 3, el matriz de puntuación BLOSUM62 (ver Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 89: 10915 (1989)) alineamientos (B) de 50, esperanza (E) de 10, M=5; N=-4. Después, el grado de identidad (como se ha definido anteriormente) de secuencias homólogas se determina usando el algoritmo de alineación CLUSTALW (Higgins D. Et al (1994). Nucleic Acids Res. 22:4673-4680) usando los siguientes parámetros; Gap size: 5, Gap open: 11, Gap extension: 1, Mismatch: -15, Word size: 3.

[0009] El INH C1 preferiblemente tiene actividad de INH C1 como se puede, por ej., evaluar tal como es descrito por Drouet et al. (1988, Clin Chim Acta. 174:121-30). Más preferiblemente, el INH C1 es un INH C1 humano (INH C1h) el cual se entiende que significa que un INH C1 tiene una secuencia de aminoácidos que ocurre naturalmente en el hombre (como p. ej. SEC ID NO:1 o CAA30314), pero no significa que el INH C1 se produzca y obtenga de, por ej., plasma humano.

[0010] Según un aspecto de la invención, el INH C1 para su uso en los métodos de la invención tiene preferiblemente una vida media de plasma reducida en comparación con la vida media de plasma de INHC1 derivado, más preferiblemente la vida media de plasma de INH C1 de la invención es inferior a la vida media de plasma de INH C1 derivado de plasma humano. Por "vida media de plasma reducida" se entiende el cambio negativo en la vida media circulante de un INH C1 de la invención en relación a la vida media circulante de un INH C1 derivado de plasma. En este contexto, un INH C1 derivado de plasma se refiere a un INH C1 de origen natural que es típicamente derivado de plasma y que se puede purificar de plasma, pero no se modifica químicamente o enzimáticamente.

[0011] La vida media de plasma se mide tomando muestras de sangre en varios puntos de tiempo después de la administración del INH C1 y la determinación de la concentración del INH C1 en cada muestra. La correlación de la concentración de suero con el tiempo permite calcular la vida media de plasma. La reducción de la vida media de plasma de INH C1 de la invención en relación con la vida media de plasma circulante de un INH C1 derivado de plasma preferiblemente es al menos aproximadamente doble, al menos aproximadamente triple, al menos aproximadamente cuádruple, al menos aproximadamente sextuple, más preferiblemente al menos aproximadamente octuple y de la forma más preferible al menos aproximadamente décuple. En otras palabras, la vida media de plasma de un INH C1 de la invención preferiblemente es inferior a 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 12,5 o 10% de la vida media de plasma de un INH C1 derivado, es decir, su contraparte natural.

[0012] P. ej. la vida media del plasma del INH C1 de la invención que se usa en los ejemplos aquí, que se obtiene de la leche de conejos transgénicos, muestra una vida media de plasma en seres humanos de aproximadamente 3 horas, que es de cuatro a ocho veces menor que la vida media del plasma de un INH C1 derivado de plasma humano. Se entiende que la determinación de la reducción de la vida media de plasma de un INH C1 de la invención en comparación con el INH C1 derivado de plasma se realiza preferiblemente bajo condiciones similares, si no idénticas, es decir, preferiblemente en dosificaciones correspondientes, regímenes de muestreo, en el mismo organismo, que puede ser un animal de laboratorio tal como un ratón o sujetos humanos, y sobre el mismo número de sujetos de prueba. Además, se entiende que la vida media del plasma de ambas preparaciones de INH C1 se comparan como se puede determinar por método estándar de análisis estadístico.

[0013] Un INH C1 con una vida media más corta, puede ser de origen natural o un INH C1 producido de forma recombinante, se puede preparar con cualquier método conveniente. Puede por ejemplo ser preparado *in vivo* en una célula huésped recombinante u organismo que resulta en un INH C1 con una estructura de carbohidrato modificada (como comparada con el INH C1 derivado de plasma) o la estructura de carbohidrato de un INH C1 de origen natural puede ser químicamente o enzimáticamente modificada *in vitro*. Preferiblemente, el INH C1 de la invención se modifica en comparación con el INH C1 derivado de plasma de la siguiente forma: eliminación de una fracción de carbohidrato (de una variante de origen natural o variante expresada recombinantemente de la glicoproteína), preferiblemente la eliminación de ácido siálico y/o galactosa de una cadena de carbohidratos unidos por enlace N-glucosídico y/o la eliminación de una cadena de carbohidrato dando como resultado exposición de manosa, galactosa, N-acetilglucosamina y/o residuos de fucosa.

[0014] Según otro aspecto de la invención, el INH C1 para uso en los métodos de la invención tiene preferiblemente una glicosilación diferente en comparación con el INH C1 derivado de plasma. Modificaciones de la estructura de carbohidrato de un INH C1 de la invención incluyen modificaciones que conducen a infraglicosilación.

[0015] *In vitro*, la infraglicosilación puede ser el resultado de una delección de una fracción de carbohidrato o de una cadena de carbohidrato completa de C1INH. Las modificaciones pueden implicar ambas cadenas de carbohidratos unidos por enlaces N- glucosídicos u O- glucosídicos, o sólo un tipo de cadena. Puede implicar todas las cadenas, o sólo algunas de las cadenas. La sobreglicosilación puede por ejemplo ser el resultado de la adición de una fracción de carbohidrato extra o una cadena de carbohidrato completa a la molécula de INH C1. Una forma asialo de INH C1 o una forma con un nivel reducido de residuos ácidos siálicos terminales pueden típicamente ser obtenidos por eliminación de un grupo de ácido siálico. Es bien conocido que la vida media de una glicoproteína en la sangre es altamente dependiente en la composición y estructura de sus grupos de carbohidratos unidos por enlaces N- y O- glucosídicos. En general, la vida media máxima de una glicoproteína requiere que sus grupos de carbohidratos unidos por enlaces N- y O- glucosídicos tengan un ácido siálico terminal. Si este ácido siálico terminal no está presente, la glicoproteína es rápidamente esclarecida de la sangre debido a la exposición de residuos de galactosa. Está bien establecido que la presencia de residuos de galactosa terminal en fracciones de carbohidrato de glicoproteínas resulta en espacio de plasma mejorado por el receptor de asialoglicoproteína en el hígado. Así, el INH C1 para uso en los métodos de la presente invención tiene un nivel reducido de residuos ácidos siálicos terminales en comparación con el inhibidor C1 derivado de plasma humano. El ácido siálico se puede quitar de diferentes formas. Por ejemplo, se puede quitar químicamente o enzimáticamente, por ejemplo, por tratamiento con sialidasa. Sialidasas adecuadas para este propósito son descritas por Chou et al. (1996, J Biol Chem. 271 (32):19219-24; y 1994, J Biol Chem. 269(29):18821-6) y pueden p. ej. ser obtenidos de V-labs, Inc. (covingtonNPn, Luisiana, USA). En otra forma de realización preferida, INH C1 para uso en los métodos de la presente invención preferiblemente ha expuesto manosa, N-acetilglucosamina fosfomanosa, galactosa y/o residuos de N-acetilgalactosamina. Un residuo de azúcar expuesto usualmente será un residuo de azúcar terminal en una rama de glicano o al menos un residuo de azúcar que es accesible para interacciones con una fracción con afinidad para el residuo (tal como un dominio de unión de carbohidrato). Un INH C1 con galactosa expuesta, N- acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, manosa, fucosa o residuos de fosfomanosa pueden p. ej. ser obtenidas por tratamiento enzimático con uno o más de β -D-N-acetilhexosaminidasa, endo- β -d-galactosidasa, y/o α -D-N-acetilgalactosaminidasa (también obtenible de, p. ej., V-labs, Inc., Covington, Luisiana, EEUU).

[0016] *In vivo*, modificaciones de cadenas de carbohidratos de INH C1 se pueden introducir usando sistemas de producción recombinantes. Ambos cultivos de células eucariotas y procariotas pueden ser utilizados, tal como células de levadura, células micóticas, células de insecto y células mamíferas. Por ejemplo, células COS y células CHO son sistemas adecuados de producción mamíferos. Aunque los sistemas de cultivo celular mamíferos tienen la capacidad para producir glicoproteínas con grupos sialilados de carbohidratos, glicosilación completa u óptima natural es frecuentemente difícil de conseguir y en consecuencia, las glicoproteínas producidas de recombinación en general tienen un modelo de glicosilación diferente a sus duplicados naturales. Normalmente este modelo de glicosilación diferente es incompleto (en comparación con los duplicados naturales) teniendo galactosa expuesta, N-acetilglucosamina y/o residuos de manosa. Asimismo, la producción de INH C1 en microorganismos eucarióticos como levaduras u hongos resultará en INH C1 con residuos de manosa expuestos.

[0017] El INH C1 con estructuras de carbohidratos modificadas puede también ser preparado en animales transgénicos, preferiblemente en animales no humanos, tal como en conejos, bovino, ratones, ratas, cabras y ovejas transgénicos. Preferiblemente, tales glicoproteínas se expresan en las glándulas mamarias de estos animales no-humanos transgénicos de manera que las glicoproteínas se pueden obtener de la leche del animal. El experto en la materia entenderá que éste dependerá de la glicoproteína específica a ser producida y en la cantidad que tiene para ser producida, qué animal transgénico es mejor usar para la producción. Un INH C1 particularmente preferido para uso en la presente invención es un INH C1 que se obtiene de la leche de un bovino transgénico o un animal del orden Lagomorfa, preferiblemente de la familia *Leporidae*, más preferiblemente del género *Oryctolagus* y de la forma más preferible un conejo de las especies *Oryctolagus cuniculus*.

[0018] Diferentes tipos de modificaciones a la estructura de la cadena de carbohidrato de la proteína de INH C1 en comparación con su duplicado natural derivado del plasma se pueden obtener de sistemas de producción recombinantes, tal como glicosilación diferente, infraglicosilación se puede introducir separadamente o en combinación, simultáneamente o consecutivamente, algunos tipos se pueden introducir a una parte de la molécula, mientras otros se introducen para otra parte de la molécula. Combinaciones preferidas de modificaciones que contribuyen a la eficacia terapéutica de la proteína incluyen galactosa expuesta, N- acetilgalactosamina, M-acetilglucosamina, manosa, fucosa y/o residuos de fosfomanosa en el INH C1 de la invención. El INH C1 de la invención puede p. ej. tener glicanos del tipo oligomanosa o del tipo altamanosa. Preferiblemente al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 40 o 60% de los residuos terminales en los glicanos en el INH C1 se seleccionan de galactosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, manosa, fucosa y residuos de fosfomanosa. P. ej., un INH C1 preferido para su uso en la presente invención contiene aproximadamente hasta 2, 4, 5, 6 veces menos ácido siálico en comparación con su duplicado natural y/o al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 40 o 60% de sus glicanos unidos por enlaces N-glucosídicos son hexosas de terminal de soporte neutral con grupos ecuatoriales de 3 y 4-OH, tal como manosa y N-acetilglucosamina. En cambio, el INH C1 derivado de plasma no tiene oligomanosa de tipo glicosilación. Un INH C1 preferido para su uso en la presente invención, p. ej., es un INH C1 humano

recombinante producido en las glándulas mamarias de conejos que tienen 5-6 veces menos ácido siálico en comparación con su duplicado natural y aproximadamente 15% de sus glicanos unidos por enlace N-glucosídico son residuos de manosa de terminal de soporte neutral.

[0019] En una forma de realización preferida, la glicosilación diferente del INH C1 para uso en la presente invención resulta en una afinidad más alta para una proteína de enlace de manosa en comparación con su duplicado derivado de plasma. La proteína de enlace de manosa (MBP) es también referida como proteína de unión de manano, lectina de unión de manosa (MBL), lectina de unión de manano, o bactericida Ra-reactivo factor. MBP es una colección que pertenece a un grupo de Ca^{2+} -dependiente (tipo-C) lectinas solubles. MBP es un activador de complemento via la vía de lectina (que difiere de las vías alternativas y tradicionales de activación de complemento). El sistema de complemento es un componente importante de la defensa innata inmunológica y se activa por tres vías: la vía clásica, la vía alternativa, y la vía de lectina recientemente descubierta o lectina de unión de manosa (MBL).

[0020] La activación de la vía clásica se inicia cuando los dominios catalíticos C1r y C1s se enlazan con complejos inmunológicos mediante la proteína de reconocimiento C1q (ver Figura 11).

[0021] La vía alternativa está continuamente rotando a un índice lento en una manera independiente de anticuerpo y atacará partículas que no están protegidas específicamente contra el complemento.

[0022] La lectina o vía MBL se activa o inicia tras la unión de MBL a estructuras de carbohidratos presentes en varios patógenos u otras estructuras celulares. Dos serín proteasas: proteasa de serina asociada de lectina de unión de manano (MASP)-1 y -2 (ver Figura 11) se asocian con MBL y muestran similitudes de choque con las serina proteasas C1s y C1r. El complejo tiene capacidades de activación C4- y C3- tras la unión a manano. El complejo contiene dos serina proteasas MASP-1 y MASP-2 unidas por un enlace de disulfuro. En esta forma, MASP es capaz de quebrar C4 y C3 dando como resultado su activación. El INH C1 de la invención tiene preferiblemente una afinidad más alta para un MBP humano en comparación con su duplicado derivado de plasma.

[0023] MBP reconoce hexosas expuestas con grupos ecuatoriales de 3 y 4-OH, tal como manosa y N-acetilglucosamina y/o N-acetil-hexosaminas. Un INH C1 preferido de la invención por lo tanto lleva tales hexosas terminales. La afinidad más alta para MBP, preferiblemente MBP humano del INH C1 de la invención es preferiblemente de manera que éste permite un objetivo, unión y/o inhibición más eficaz de MBP en comparación con su duplicado derivado de plasma natural al cual le falta manosa expuesta y residuos de N-acetilglucosamina. MBP humano es aquí entendido para referirse a la proteína caracterizada por el hecho de que Kawasaki et al. (1983, J. Biochem 94:937-47), con una secuencia de aminoácidos como se describe por Taylor et al. (1989, Biochem. J. 262 (3), 763-771; NCBI adquisición n° CAA34079). La estructura de rata MBP complejo con an.oligosacarido es descrita por Weis et al. (1992, Nature. 360:127-34). Para otra descripción de MBP humano ver p. ej US 6,846,649 y referencias citadas ahí.

[0024] Todas estas vías (clásica, alternativa y lectina o MBL) generan una actividad enzimática crucial que finalmente conduce al ensamblaje del complejo de incursión de membrana (MAC o C5b-C9) (ver Figura 11). Bajo condiciones fisiológicas, la activación del sistema de complemento es eficazmente controlada por la acción coordinada de proteínas reguladoras asociadas a la membrana y solubles. Una de estas proteínas es el inhibidor C1 (INH C1), un inhibidor de serina proteasa que enlaza a C1s y C1r y habitualmente el único inhibidor fisiológico conocido de la vía clásica. Además, INH C1 es capaz de inactivar el complemento de activación de MBL-mediado por unión e inhibición de MASP-1 y MASP-2.

[0025] La activación de las diferentes vías de complemento es preferiblemente medida en sueros humanos por el kit Wielisa (producto n°COMPL 300, Wieslab, Sweeden). Este es un inmuno ensayo de enzima disponible comercialmente, específico para la detección de cada una de las tres vías de complemento con deposición de CSb-C9 como una lectura común. Brevemente, pocillos de las tiras de microtitulación se revisten con activadores específicos de cada una de las tres vías de complemento. Suero humano se diluye en diluyente conteniendo bloqueador específico para asegurar que sólo la vía respectiva se activa. El INH C1 de la invención o su duplicado derivado de plasma se añade posteriormente a una concentración dispuesta entre 0 y 75 μmol , incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente y añadida a los pocillos. Durante una incubación posterior del suero humano diluido en el pocillo durante 60 minutos a 37°C, el complemento se activa por el recubrimiento específico. Los pocillos se lavan luego y C5b-C9 formados se detectan con una fosfatasa alcalina específica marcada anti C5b-C9 anticuerpo. Después de otro paso de lavado, la detección de anticuerpos específicos se obtiene por incubación con solución de sustrato de fosfatasa alcalina. La cantidad de activación de complemento correlaciona con la intensidad de color y se mide en cuanto a absorbencia (densidad óptica DO). Usando este equipo, ambos INH C1 recombinante humano (rhC1-INH) de la invención y INH C1 derivado de plasma (PdC1-INH) demostraron tener capacidades de inhibición similares para la vía clásica. No obstante, el INH C1 de la invención demostró tener aproximadamente un 20% más de capacidad de inhibición para la vía MBL que el INH C1 derivado de plasma (véase ejemplo 3).

[0026] Por lo tanto, en esta forma de realización preferida, la glicosilación diferente del INH C1 para uso en la presente invención resulta en una afinidad más alta para un MBP en comparación con su duplicado derivado de plasma, que resulta en una inhibición más eficaz de MBP, conduciendo a una inhibición más eficaz de la vía de lectina. La inhibición más eficaz de la vía de lectina preferiblemente incluye al menos 5% más inhibición, incluso más preferiblemente al menos 10% más inhibición, incluso más preferiblemente al menos 15% más inhibición incluso más preferiblemente al menos 20% incluso más preferiblemente al menos 25% incluso más preferiblemente al

menos 30% incluso más preferiblemente al menos 35% incluso más preferiblemente al menos 40% incluso más preferiblemente al menos 45% incluso más preferiblemente al menos 50% incluso más preferiblemente al menos 55% incluso más preferiblemente al menos 60% incluso más preferiblemente al menos 65% incluso más preferiblemente al menos 70% incluso más preferiblemente al menos 75% incluso más preferiblemente al menos 80% incluso más preferiblemente al menos 85% incluso más preferiblemente al menos 90% incluso más preferiblemente al menos 95% y de la forma más preferible al menos 98% más de inhibición. La activación de la vía de lectina es preferiblemente medida con el kit Wielisa como se ha descrito anteriormente.

[0027] El método de la invención se puede aplicar para prevenir, reducir o tratar cualquier tipo de isquemia y lesión por reperfusión. Preferiblemente, el método de la invención se aplica donde la isquemia y herida por reperfusión se sabe que surge al menos en parte, más preferiblemente principalmente mediante la vía de lectina. Para isquemia de miocardio y lesión por reperfusión (J Immunology 2005, 175: 541-546), lesión por reperfusión de isquemia renal (Sen J Pathol. 2004 165(5):1677-88), lesión por reperfusión de isquemia gastrointestinal (J Immunol. 2005 15:174(10):6373-80), y para accidente cerebrovascular (deSimoni et al, 2004 Ser J. Pathol. 164:1857-63) ha demostrado que la lesión por reperfusión surge principalmente mediante la vía de lectina y difícilmente mediante la vía clásica. Por lo tanto, un INH C1 de la invención es preferiblemente un inhibidor más potente de la vía de lectina en comparación con su duplicado derivado de plasma natural. Preferiblemente un INH C1 de la invención es un inhibidor *in vivo* más potente de la vía de lectina en hombre en comparación con su duplicado derivado de plasma natural.

[0028] A diferencia del modelo experimental usado en los ejemplos aquí, la incidencia de isquemia en la vida real es frecuentemente un evento imprevisto. Por lo tanto la administración de INH C1 antes de la incidencia de isquemia y/o reperfusión posterior no es generalmente una opción realizable e inevitablemente en la práctica INH C1 tendrá que ser administrado algún tiempo sino varias horas después de la isquemia y/o reperfusión posterior. Esto, no obstante, limita seriamente la utilidad terapéutica del INH C1 derivado de plasma convencional porque es principalmente inefectivo cuando se administra después de la reperfusión isquémica y sólo tiene una franja de tiempo muy pequeña para la eficacia terapéutica (ver Figura 2 y deSimoni et al, 2004 Ser J. Pathol. 164:1857-63). En cambio, un INH C1 para uso en la presente invención tal como se ha definido anteriormente, sigue siendo capaz de ejercer sus efectos neuroprotectores también cuando se inyecta al menos 1 hora después de la isquemia o después de la aparición de la isquemia y/o 30 minutos después del inicio de la reperfusión. Por lo tanto, el INH C1 de la invención se administra al menos al final o después del periodo isquémico, es decir cuando el tejido isquémico sufre la reperfusión. Más preferiblemente, el INH C1 de la invención se administra al menos 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 o 120 minutos después del periodo isquémico o después del inicio de la reperfusión. Preferiblemente, el INH C1 de la invención se administra no más de 24, 12, 6, 4 o 3 horas después de la isquemia o después de la aparición de la isquemia y/o reperfusión. En otra forma de realización preferida, el inhibidor C1 se administra al menos 3 horas después de la isquemia o después de la aparición de la isquemia y/o reperfusión, preferiblemente al menos 6 horas, más preferiblemente al menos 9 horas, incluso más preferiblemente al menos 18 horas.

[0029] En una forma de realización preferida, el método se aplica para prevenir, reducir o tratar una incidencia imprevista, repentina o aguda de reperfusión isquémica. Condiciones y trastornos asociados a una incidencia imprevista, repentina o aguda de reperfusión isquémica incluyen pero de forma no limitativa lesión por reperfusión isquémica tras un infarto de miocardio agudo (IMA), tras un accidente cerebrovascular, incluyendo accidente cerebrovascular perinatal, tras un shock hemorrágico, tras una isquemia intestinal, tras una cirugía coronaria de emergencia por angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP), después de cualquier cirugía vascular con pinzamiento transversal de vaso sanguíneo (p. ej. de aorta, conduciendo a isquemia de músculo esquelético), o después de pancreatitis tras la manipulación del conducto pancreático o biliar (ERCP). En tales ejemplos el INH C1 de la invención se administra preferiblemente al menos 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 o 120 minutos después del infarto de miocardio agudo (IMA), después de un accidente cerebrovascular, incluyendo accidente cerebrovascular perinatal, después de un shock hemorrágico, después de isquemia intestinal, después de cirugía coronaria de emergencia por angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP), después de cualquier cirugía vascular con pinzamiento transversal de vaso sanguíneo (p. ej. de aorta, conduciendo a isquemia de músculo esquelético), o después de pancreatitis tras la manipulación del conducto pancreático o biliar (ERCP). Alternativamente, el tiempo de administrar el INH C1 de la invención se puede definir como preferiblemente al menos 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 o 120 minutos después del inicio de la reperfusión.

[0030] Además, la lesión por reperfusión imprevista isquémica es preferiblemente definida como un lesión por reperfusión isquémica donde una terapia o cirugía inducen a una reperfusión pero no a una isquemia. Tal terapia o cirugía incluye pero no se limitan a:

- trombolisis farmacológica, incluyendo terapias endovasculares e intravenosas por accidente cerebrovascular, síndromes coronarios agudos, oclusión periférica arterial, émbolo pulmonar, oclusión de arteria renal,
- trombolisis mecánica, por ejemplo, intervención coronaria percutánea, angioplastia arterial periférica, angioplastia arterial visceral,
- injerto de bypass aortocoronario,
- endarterectomía carotídea,
- isquemia mesentérica,

- shock incluyendo el de tipo hemorrágico, cardiogénico, neurogénico, anafiláctico,
- fallo de colgajo, por ejemplo cirugía plástica,
- reimplantación de dedos y brazos,
- intestino estrangulado.

5 [0031] Alternativamente, en otra forma de realización preferida, el método se aplica para prevenir, reducir o tratar una incidencia prevista de reperfusión isquémica. Una incidencia prevista de lesión por reperfusión de isquemia incluye preferiblemente un ajuste en el que una terapia o cirugía inducen a una isquemia y posteriormente una reperfusión. Una lista no limitativa se da a continuación de terapia o cirugía en donde hay un periodo inducido temporal de flujo sanguíneo bajo o nulo, es decir, isquemia o hipoxia, seguido de reperfusión:

- 10 - bypass cardiopulmonar,
- reparación de aneurisma, incluyendo aórtico o cerebral,
- endarterectomía carotídea en la que una grapa se usa durante la cirugía,
- parada circulatoria con hipotermia profunda,
- uso de torniquete, es decir, en ajustes de traumatismo,
- 15 - transplante de órgano sólido,
- cualquier otra rotura yatrogénica de flujo sanguíneo.

[0032] Además, condiciones y trastornos asociados a una incidencia prevista de lesión por reperfusión isquémica incluyen, pero de forma no limitativa, lesión por reperfusión isquémica después de un transplante de órgano (pulmón, hígado, riñón, corazón), después de cualquier cirugía vascular con pinzamiento transversal de vaso sanguíneo (p. ej. de aorta, conduciendo a isquemia de músculo esquelético), o después de pancreatitis después de manipulación de un conducto pancreático o biliar (ERCP), después o durante la circulación extra corporal (ECC).

[0033] En una forma de realización preferida del método para la prevención, reducción o tratamiento de al menos una incidencia prevista de isquemia y lesión por reperfusión, el INH C1 de la invención se administra al menos al final o después del periodo isquémico, es decir cuando el tejido isquémico sufre reperfusión. Más preferiblemente, el INH C1 de la invención se administra al menos 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 o 120 minutos después del periodo isquémico o después del inicio de reperfusión. Preferiblemente, el INH C1 de la invención se administra no más de 24, 12, 6, 4 o 3 horas después de la isquemia o después de la aparición de la isquemia y/o reperfusión. En otra forma de realización preferida, el inhibidor C1 se administra al menos una hora después de la isquemia o después de la aparición de la isquemia y/o reperfusión, 3 horas después de la isquemia o después de la aparición de la isquemia y/o reperfusión, preferiblemente al menos 6 horas, más preferiblemente al menos 9 horas, incluso más preferiblemente al menos 18 horas.

[0034] Según una forma de realización preferida, el INH C1 de la invención se administra continuamente a un sujeto en su necesidad y/o en caso de un transplante de órgano al órgano a ser transplantado. El órgano a ser transplantado es preferiblemente conservado en una composición con un medio adecuado y cantidad adecuada de INH C1.

[0035] En una forma de realización más preferida, el método se aplica en una incidencia imprevista de reperfusión isquémica. Incluso más preferiblemente, una incidencia de lesión por reperfusión isquémica después de un accidente cerebrovascular o un accidente cerebrovascular perinatal. En estos tipos de incidencia imprevista de reperfusión isquémica, demostramos que el inhibidor C1 de la invención ejerce un efecto neuroprotector en la penumbra isquémica. La penumbra isquémica hace referencia preferiblemente al hipocampo y/o córtex. Un efecto neuroprotector preferiblemente significa que la neurodegeneración se contrarresta en el hipocampo y/o córtex después del tratamiento con el inhibidor C1 de la invención hasta 3 horas después de la aparición de isquemia en el hipocampo y hasta 9 horas después de la aparición de isquemia en el córtex. Más preferiblemente, la neurodegeneración se contrarresta hasta 4, 5, 6 horas o más en el hipocampo y hasta 10, 11, 12 horas o más en la isquemia. La neurodegeneración se evalúa preferiblemente como en el ejemplo 2: secciones de cerebro se tincen con un marcador específico para degeneración neuronal, preferiblemente Jade (Schmued LC, et al, referencia 4) y se analizan con microscopia fluorescente. Usando este método, el contrarresto de neurodegeneración supone que al menos 2% menos de células coloreadas se visualizan en la muestra tratada en comparación con la muestra no tratada. Preferiblemente, el contrarresto neurodegeneración supone al menos 5% menos de células coloreadas, al menos 7%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40% o más.

[0036] Alternativamente o en combinación con la forma de realización anterior mencionada, el uso del inhibidor C1 ejerce una reducción de la lesión inducida por la isquemia y/o reperfusión. Más preferiblemente, cuando la lesión por reperfusión isquémica ocurrida después de un accidente cerebrovascular o un accidente cerebrovascular perinatal, el uso del inhibidor C1 de la invención ejerce una reducción del tamaño del infarto. Incluso más preferiblemente, el tamaño del infarto se cuantifica como se presenta en el ejemplo 2. Incluso más preferiblemente, usando este método de cuantificación, al menos 3 horas después de la aparición de la isquemia, una reducción de al

menos 10% del tamaño del infarto se alcanza, incluso más preferiblemente al menos 20%, incluso más preferiblemente al menos 40%, incluso más preferiblemente al menos 60%, incluso más preferiblemente al menos 70%, incluso más preferiblemente al menos 80%, y de la forma más preferible al menos 90%.

[0037] Un INH C1 para uso en los métodos de la invención puede ser parte de composiciones farmacéuticas del estado de la técnica. Estas composiciones farmacéuticas típicamente comprenden el INH C1 y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar de varias formas dependiendo de si el tratamiento sistémico o local es deseado, el área a ser tratada y la estabilidad del compuesto activo. Formulaciones adecuadas dependerán del método de administración. La composición farmacéutica se administra preferiblemente por administración parenteral, tal como por ejemplo por intravenosa, intra-arterial, inyección intramuscular o subcutánea intraperitoneal o infusión; o por administración intracraneal o intratecal. En una forma de realización preferida se administra por infusión intravenosa. Formulaciones adecuadas para la administración parenteral se conocen en la técnica y son formulaciones típicamente líquidas. Las preparaciones de INH C1 para administración parental deben ser estériles. La esterilización se realiza por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes de o siguiendo la liofilización y reconstitución. Las preparaciones de INH C1 se pueden administrar continuamente por infusión o por inyección en bolo. Las formulaciones líquidas de INH C1 pueden por ejemplo ser administradas por una bomba de infusión. Una composición típica para infusión intravenosa podría contener de 100 a 500 ml de NaCl 0,9% estéril o 5% de glucosa opcionalmente suplementada con un 20% de solución de albúmina y 100 a 500 mg del INH C1. Una composición típica farmacéutica para la inyección intramuscular contendría, por ejemplo, 1 - 10 ml de agua tamponada estéril y 1 a 250 mg del INH C1 de la presente invención. Métodos para preparar composiciones parenteralmente administrables se conocen bien en la técnica y son descritas en más detalle en varias fuentes, incluyendo, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15ª ed., Mack Publishing, Easton, PA, 1980) (incorporada por referencia en su totalidad para todos los objetivos).

[0038] La dosis efectiva, es decir concentración eficaz y frecuencia, del INH C1 cuando se usa en los métodos de la invención dependerá de la composición específica farmacéutica que se usa, la gravedad de la enfermedad y el estado general de la salud del paciente. En general, la dosis efectiva de una composición farmacéutica que se basa en un INH C1 para uso en los métodos de la invención se pueden encontrar por optimización de rutina. Un punto de partida adecuado es la dosis que se usa para la composición equivalente farmacéutica que se basa en el INH C1 derivado de plasma. Una gran ventaja de una composición farmacéutica de la invención es que una alta dosis inicial se puede utilizar en el tratamiento, lo que realza la probabilidad de tratamiento exitoso. Esta alta dosis inicial es posible debido a que el INH C1 en la composición farmacéutica de la invención muestra un espacio más rápido que su duplicado natural. En particular para el tratamiento de casos agudos, puede ser ventajoso una alta dosis inicial del INH C1 de la invención. Esta alta dosis inicial puede ser al menos 1,5, al menos 2, 3 o 4 veces la dosis del duplicado natural que sería administrado.

[0039] En una forma de realización preferida, el INH C1 de la invención se administra por vía intravenosa a una dosis superior a 50, 100, 200, 400, 600, 800, o 1000 U /kg masa corporal del individuo, preferiblemente en el intervalo de 50 - 2000, 100 - 1000, 200 - 800, 400-700 o 500-700 U/kg masa corporal del individuo. Una unidad (U) de INH C1 es la cantidad de INH C1 presente en 1 mililitro de sangre humana. Una unidad corresponde a aproximadamente 275 microgramos de INH C1 derivado de plasma. Asumiendo un peso molecular de 110,000 dalton, la concentración en plasma humano de INH C1 es de 2,5 micromoles por litro (Nuijens et al. (1989), J. Clin. Invest. 84:443).

[0040] En otra forma de realización preferida del método de la invención la composición farmacéutica contiene un agente trombolítico o es para uso en combinación con un agente trombolítico o después del tratamiento posterior con tal agente. Un agente trombolítico se entiende aquí como un agente (fármaco) que es capaz de disolver un coágulo de sangre (trombo) y reabre una arteria o vena. Los agentes trombolíticos son normalmente serina proteasas y convierten plasminógeno en plasmina que rompe el fibrinógeno y fibrina y disuelve el coágulo. Agentes trombolíticos preferidos incluyen reteplasa (r-PA o Retavasa), alteplasa (t-PA o Activasa), uroquinasa (Abboquinasa), prouroquinasa, complejo activador de estreptoquinasa purificada anisóilada (APSAC), y estreptoquinasa.

[0041] En otro aspecto, la invención pertenece al uso de un INH C1 de la invención tal y como se define anteriormente para la producción de un medicamento para la prevención, reducción o tratamiento de lesión por reperfusión conforme a cualquiera de los métodos definidos anteriormente.

[0042] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que unidades que siguen al verbo se incluyen, pero unidades no específicamente mencionadas no se excluyen. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad que más de un elemento se presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" significa normalmente "al menos uno".

Descripción de las figuras

[0043]

Figura 1 Evaluación de tamaño de infarto cuarenta y ocho horas después de la isquemia en ratones tratados con solución salina o con 15U RhC1-INH (INH C1 humano recombinante, véase ejemplo 1.2) por ratón antes y después de una hora de la isquemia.

Figura 2 Evaluación de tamaño de infarto veinticuatro horas después de isquemia en ratones tratados con solución salina o con 15U de INH C1 derivado de plasma por ratón 1 hora antes y después de la isquemia.

Figura 3 Volumen de infarto evaluado 48h después de isquemia en ratones recibiendo solución salina o 15U/ratón de RhC1-INH de conejo en puntos de tiempo diferentes del principio de isquemia. Los datos se expresan de la siguiente manera $\pm$ SEM (n=6 ratones por grupo). *P<0.05; **P<0.01 contra solución salina, ANOVA de sentido único y Dunnett como prueba post-hoc.

Figura 4 Evaluación Semi-cuantitativa de tinción Fluoro-Jade.- = no positividad, + = baja positividad, ++ = positividad intermedia, +++ = alta positividad.

Figura 5 Imágenes representativas de neurodegeneración por tinción Fluoro-Jade en el estriatum de ratones isquémicos recibiendo solución salina o 15U/ratón de RhC1-INH de conejo en puntos de tiempo diferentes de la aparición de isquemia. Barra: 100 μ m.

Figura 6 Imágenes representativas de neurodegeneración por tinción Fluoro-Jade en el giro dentado de ratones isquémicos recibiendo solución salina o 15U/ratón de INH C1 de conejo en puntos de tiempo diferentes de la aparición de isquemia. Barra: 100 μ m.

Figura 7 Imágenes representativas de neurodegeneración por tinción Fluoro-Jade en el córtex de ratones isquémicos recibiendo solución salina o 15U/ratón de INH C1 de conejo en puntos de tiempo diferentes de la aparición de isquemia. Barra: 100 μ m.

Figura 8 Volumen de infarto evaluado 48h después de la isquemia en ratones recibiendo solución salina o 5, 10, 15U/ratón de RhC1-INH de conejo 3 horas después de la aparición de isquemia. Los datos se expresan de la siguiente manera $\pm$ SEM (n=6 ratones por grupo). **P<0.01 contra solución salina, ANOVA de sentido único y Dunnett como prueba post-hoc.

Figura 9 Volumen de infarto evaluado 48h después de la isquemia en ratones recibiendo solución salina o 15U/ratón de PdC1-INH o INH C1 de vaca o conejo tres horas después de la aparición de la isquemia. Los datos se expresan de la siguiente forma $\pm$ SEM (n=6 ratones por grupo). *P<0.05; **P<0.01 contra solución salina, ANOVA de sentido único y Dunnett como prueba post-hoc.

Figura 10 Déficits generales (superiores al panel 10a) y focales (inferiores al panel 10b) evaluados 48h después de la isquemia en ratones recibiendo solución salina o 15U/ratón de PdC1-INH o INH C1 de vaca o conejo tres horas después de la aparición de la isquemia. (n=6 ratones por grupo). **P<0.01 contra solución salina, ANOVA de sentido único y Kruskal-Wallis como prueba post-hoc.

Figura 11 Visión general de las diferentes vías de activación de complemento.

Figuras 12, 13 Efecto de RhC1-INH y PdC1-INH al activar la vía de complemento tradicional. Dosis en aumento de RhC1-INH o PdC1-INH (eje x) se añadió a dos muestras diferentes de suero normal de humano (muestra 1 panel superior. muestra 2 panel inferior). Como control, el tampón en el que RhC1-INH es disuelto (20 mM citrato, 0.19 M sacarosa pH 6.8, 0.22 μ m filtrada) fue tomado a lo largo de las mismas diluciones como INH C1hr. La lectura fue deposición de CSb-9, el control de suero normal en el ensayo definiendo 100% (eje y). Los datos son la media y SD (n = 3).

Figuras 14, 15 Efecto de RhC1-INH y PdC1-INH al activar la vía de complemento MBL. Dosis en aumento de RhC1-INH o PdC1-INH (eje x) se añadieron a dos muestras diferentes de suero normal de humano (muestra 1 panel superior. muestra 2 panel inferior). Como control, el tampón en el que RhC1-INH es disuelto (20 mM citrato, 0.19 M sacarosa pH 6.8, 0.22 μ m filtrada) fue tomado a lo largo de las mismas diluciones como INH C1hr. La lectura fue deposición de C5b-9, el control de suero normal en el ensayo definiendo 100% (eje y). Los datos son la media y SD (n = 3).

Figura 16 Efecto de INH rhc y PdC1-INH al activar la vía clásica y MBL de complemento de activación. Dosis en aumento de RhC1-INH o PdC1-INH se añadieron a dos muestras diferentes de suero de humano normal. Como control, el tampón en el que RhC1-INH se disuelve (20 mM citrato, 0.19 M sacarosa pH 6.8, 0.22 μ m filtrada) fue tomado a lo largo de las mismas diluciones como INH C1hr. La lectura fue deposición de CSb-9 y la activación de complemento de porcentaje fue calculada por medición con esta fórmula: (Muestra-NC)/(PC-NC')x100. PC se fija en 100%. Los resultados mostrados son la media SD de 3 diluciones independientes en cada concentración evaluada.

Ejemplos

Ejemplo 1

[0044] Experimentos precedentes mostraron que una única dosis de RhC1-INH (15U/ratón) administrada al principio del periodo isquémico, reduce significativamente el volumen isquémico, según la evaluación 48 horas después de la isquemia en nuestro modelo de ratón con isquemia cerebral focal de una manera muy similar al INH C1 derivado de plasma. En este ejemplo hemos explorado la franja de tiempo de eficacia para la actividad neuroprotectora de RhC1-INH en el volumen isquémico y déficits funcionales. También hemos estudiado el efecto de RhC1-INH en resultado de 7 días por evaluación de la respuesta glial y de neurodegeneración.

1. Métodos

1.1 Isquemia cerebral focal transitoria

[0045] La isquemia ocurrió por oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) tal y como se describe anteriormente (De Simoni et al., 2003 y 2004, supra). La anestesia fue inducida por 5% isoflurano en N₂O/O₂ (70/30%) mezclada y mantenida por 1.5 2% isoflurano en la misma mezcla. Para confirmar la adecuación de la oclusión vascular en cada animal, el flujo sanguíneo fue medido con láser doppler de flujometría (Transonic BLF-21) usando una sonda de fibra óptica flexible de 0,5 mm (Transonic, tipo M, 0,5 mm diámetro) situada en la superficie de cerebro y fijada con material de impresión en el cráneo en las siguientes coordenadas: AP = -1mm; L = -3,5mm. Brevemente, la arteria carótida adecuada común fue expuesta y un filamento siliconizado (7-0), fue introducido en la arteria carótida interna a través de una incisión realizada en la arteria carótida común y avanzada a la arteria anterior cerebral para bloquear su bifurcación en la arteria anterior cerebral y el anticuerpo monoclonal. El filamento fue avanzado hasta que una reducción del flujo sanguíneo de >70%, en comparación con la línea base preisquémica, fue observada. Después de 30 min de isquemia, el flujo sanguíneo fue restaurado eliminando cuidadosamente el filamento de nilón.

1.2 Tratamiento con medicamentos

[0046] Los ratones recibieron una única inyección iv de RhC1-INH a la dosis de 15U/ratón en 150 µl o el mismo volumen de solución salina en tiempos diferentes de la isquemia:

- al principio del periodo isquémico (pre RhC1-INH).

- al final del periodo isquémico (post RhC1-INH).

- una hora después del principio del periodo isquémico (1h-post RhC1-INH). RhC1-INH usado en este estudio fue producido en conejos transgénicos que expresaron INH C1 humano en sus glándulas mamarias y purificaron la leche obtenida de estos animales como se describe en WO 01/57079.

1.3 Evaluación de déficits neurológicos

[0047] Cuarenta y ocho horas después de la isquemia, cada ratón fue estimado en dos escalas de función neurológicas únicas al ratón, por un investigador entrenado unido a las condiciones experimentales. Para ratones de déficits generales fueron marcados de 0 a 28 en cada una de las siguientes categorías: pelo, orejas, ojos, actividad espontánea, comportamiento epiléptico. Para ratones de déficits focales fueron marcados de 0 a 28 en cada una de las siguientes categorías: simetría del cuerpo, ascenso, simetría de brazo anterior, giro obligatorio, respuesta sensorial. Los datos se expresan como media y percentiles del 25° al 75°.

1.4 Cuantificación del tamaño de infarto

[0048] Cuarenta y ocho horas después de la isquemia, los ratones fueron profundamente anestesiados con Equitensin (120 µl/ratones, ip) y transcardialmente perfundidos con 30ml de PBS 0.1mol/l, pH 7.4, seguidos de 60ml de paraformaldehído enfriado (4%) en PBS. Después de eliminar cuidadosamente los cerebros del cráneo, fueron transferidos a 30% de sacarosa en PBS a 4°C durante toda la noche para crioprotección. Los cerebros fueron luego rápidamente congelados por inmersión en isopentano a - 45°C durante 3 min siendo sellados antes en viales y almacenados a -70°C hasta su uso. Para determinar el tamaño de lesión, secciones de corona de cerebro de 20 µm fueron cortadas en serie a intervalos de 240 µm y tintados con rojo neutral (Neutral Red Gurr Certistain, BDH, Inglaterra). En cada estrato, las áreas de infarto fueron evaluados ciegamente y delineadas por la palidez relativa de coloración histológica. El área de infarto fue determinada al substrar el área del tejido saludable en el hemisferio ipsilateral del área del hemisferio contralateral en cada sección. Los volúmenes de infarto fueron calculados por la integración de áreas de infarto en cada estrato de cerebro como cuantificado con analizador de imagen asistida de ordenador y calculado por sistema de imagen analítica.

1.5 Prueba a campo abierto

[0049] Siete días después el comportamiento del ratón con isquemia fue evaluado por la prueba a campo abierto. Esta prueba puede ser útil para detectar la ansiedad y explorar el comportamiento y la actividad locomotora en ratones isquémicos a largo plazo. El campo abierto consistía de una caja de plástico (41 x 41 x 41cm) conteniendo 4 objetos diferentes. El área del campo abierto fue dividida en una zona central de 28 x 28cm y la zona de confin circundante. Los ratones fueron individualmente colocados en el centro del campo abierto y su comportamiento fue observado durante 5 minutos por unos expertos ajenos a las condiciones experimentales. El número de cruces internos (principalmente relacionados con comportamiento de ansiedad), cruces exteriores (principalmente relacionados con actividad de motor), traseros (principalmente relacionados con comportamiento explorador) y contactos con objetos (principalmente relacionados con actividad sensorial/motor) se contó.

1.6 Cuenta Neuronal

[0050] Siete días después de la isquemia, los ratones fueron perfundidos transcardialmente tal y como se describe anteriormente. Para determinar la cuenta neuronal, secciones coronarias de cerebro de 20µm fueron cortadas en serie a 640 µm intervalos y tintadas con cresil violeta (Cresyl Violet acetate, Sigma, St. Luis, MO). Tres secciones de ipsi- y hemisferios colaterales de 20 µm fueron seleccionadas para la cuenta neuronal. La primera sección fue en las coordenadas estereotóxicas anteroposterior a +0.86 de bregma. La cantidad de pérdida neuronal fue calculada

combinando el número de neuronas viables en tres secciones de ambos hemisferios y expresado como porcentaje de hemisferio controlateral. Un microscopio Olympus BX61, lindado con cámara de vídeo con Soft Imaging System Colorview y software AnalySIS fue usada. El análisis cuantitativo fue realizado en una ampliación de 40X por unos investigadores ajenos al tratamiento.

5 1.7 Inmunohistoquímica para astrocitos y microglia

[0051] Siete días después de la isquemia secciones cerebrales coronarias de 20µm de grosor de ratones isquémicos fueron preparadas y usadas para evaluar la inmunocoloración de los astrocitos y microglia/macrófagos. Brevemente, las secciones fueron enjuagadas durante 30 minutos en 0.4% Tritón 100 X-100 en 0.1 mol/L PBS seguido de 15 minutos en 0.1% Tritón X-100 y 3% de suero de cabra normal (NGS) en PBS. Las secciones fueron luego incubadas durante toda la noche con anticuerpos para astrocitos y microglia (anti- GFAP 1:1500, Chemicon; anti-CD11b 1:250, gentilmente donado por Dr. A. Doni, Mario Negri institute). El día siguiente, las secciones fueron lavadas en PBS e incubadas con anticuerpos secundarios biotinilados durante 1 hora, lavadas e incubadas con avidin-biotin-peroxidasa. Después de reaccionar con 3 -3-diaminobenzidina tetrahidrocloreto las secciones fueron lavadas, secadas, deshidratadas a través de alcoholes clasificados, fijados en xileno y cubiertos usando DPX montante antes del análisis de microscopía óptica.

2. Resultados

2.1 Ventana de tiempo de eficacia

2.1.1 Evaluación de déficits neurológicos

[0052] Déficits neurológicos fueron evaluados en ratones isquémicos recibiendo RhC1-INH o solución salina 48h después de la isquemia. Una ligera, aunque no significativa, reducción en cada grupo de ratones tratados con RhC1-INH fue observada en comparación con los ratones isquémicos tratados en solución salina (pre RhC1-INH: 9 y 12 post RhC1-INH: 7 y 11; post-1h RhC1-INH: 9 y 13, solución salina: 10 y 12.5, media de déficits focales y generales, respectivamente) (datos no mostrados).

2.1.2 Evaluación del tamaño de infarto

[0053] Cuarenta y ocho horas después de la isquemia los ratones tratados con RhC1-INH mostraron una reducción notable del volumen isquémico, a 15U/ratón pre, post y 1 hora post dosis ($13.67 \pm 2.59\text{mm}^3$, $9.06 \pm 0.77\text{mm}^3$ y $8.24 \pm 1.00\text{mm}^3$, respectivamente), en comparación con ratones tratados con solución salina ($41.51 \pm 7.01\text{mm}^3$) (Figura 1, los datos se expresan como media $\pm$ SEM).

2.2 Resultados tras siete días

2.2.1 Prueba a campo abierto

[0054] La isquemia indujo una reducción significativa en el número de crías en comparación con animales no tratados mientras en el grupo tratado con RhC1-INH este parámetro no era diferente de los ratones no isquémicos. Los otros parámetros evaluados no mostraron ninguna diferencia entre los tres grupos.

2.2.2 Cuenta Neuronal

[0055] Para evaluar si el efecto de protección de RhC1-INH es de larga duración, evaluamos la pérdida de neuronas siete días después de la inducción de isquemia y el tratamiento con el fármaco. Los resultados muestran que el efecto de protección de INH C1 sigue estando presente en ese momento: $14\% \pm 2.18\%$ contra $4\% \pm 1.24\%$ media de solución salina y ratones tratados con RhC1-INH, respectivamente (datos no mostrados).

2.2.3 Inmunohistoquímica para microglía/macrófagos y astrocitos

[0056] Siete días después de la isquemia una gran cantidad de microglía activada y macrófagos infiltrados fueron observados en el hipocampo lesionado y estriado de ratones isquémicos recibiendo solución salina (datos no mostrados). Quince unidades de pre-RhC1-INH fueron capaces de contrarrestar esta activación e infiltración en las áreas consideradas (datos no mostrados). El hipocampo ipsilateral de ratones isquémicos tratados con solución salina mostraron una ligera astrocitosis que no fue diferente de la observada en ratones isquémicos RhC1-INH (datos no mostrados). Otras áreas del cerebro no mostraron ninguna activación de astrocitosis relevante en ningún grupo.

3. Conclusiones

[0057] Los presentes datos muestran que RhC1-INH en la dosis de 15U/ratón es de forma similar eficaz al reducir el volumen isquémico cuando se administra al principio (pre) o al final del periodo isquémico (es decir, después de la perfusión). Más importante, el inhibidor es capaz de ejercer sus efectos neuroprotectores también cuando se inyecta 1 hora después de la aparición de la isquemia (post 1h). Además, la acción de protección de RhC1-INH sigue estando presente 7 días después de la isquemia. Estos resultados están en contraste con INH C1h derivado de plasma que cuando se inyecta 1 hora después de la isquemia ha perdido prácticamente la capacidad para ejercer efectos neuroprotectores (ver Figura 2).

[0058] Los resultados principales de este estudio son los siguientes:

1. la vida media de RhC1-INH en plasma de ratón es de aproximadamente 3 horas (a una dosis de 15U/ratón). La buena correlación entre antígeno y actividad funcional indica que la proteína recombinante circula en plasma en su forma activa sólo; es posible que la distribución de tejido contribuya a la reducción de niveles de plasma.

2. RhC1-INH, en la dosis de 15U/ratón -pre es muy eficaz en reducir el volumen isquémico (reducción del 69%).

3. RhC1-INH en la dosis de 15U/ratón es capaz de reducir claramente el número de neuronas de degeneración en el hipocampo como se ha evaluado por tinción Fluoro-Jade indicando así que la reducción en volumen isquémico se debe a la preservación de las neuronas.

4. RhC1-INH es de forma similar eficaz al reducir el volumen isquémico cuando se administra al principio (pre), al final del periodo isquémico (es decir, post reperusión) o 1 hora después de la aparición de la isquemia (post 1h, es decir 30 min del principio de reperusión). Así RhC1-INH tiene una ventana de tiempo más amplia de eficacia que PdC1-INH (que es no más eficaz cuando se administra 1h después de la isquemia).

5. el efecto neuroprotector de la dosis pre-RhC1-INH es de larga duración, como se mostró en la cuenta neuronal realizada 7 días después del principio de isquemia.

6. RhC1-INH, indujo una ligera mejora de déficits focales y generales evaluados 48 horas después de la isquemia. Este hallazgo es similar al observado con PdC1-INH. Para evaluar el efecto de RhC1-INH en resultados de conducta a largo plazo, analizamos el comportamiento de ratón con pruebas a campo abierto. Siete días después de la isquemia el comportamiento de las crías muestra una puntuación significativamente inferior en los isquémicos en comparación con ratones no tratados. Esta reducción no está presente en ratones tratados con RhC1-INH cuya puntuación no es diferente de los ratones de control.

7. RhC1-INH es capaz de contrarrestar la activación/reclutamiento de microglía/macrófagos en el cerebro de ratones isquémicos como se ha evaluado a ambos en puntos de tiempo tempranos (48h) y tardíos (7 días). Estas células son un índice de la respuesta inflamatoria del tejido cerebral.

8. La fuerte respuesta astrocítica suscitada por la isquemia a las 48h se humedece con RhC1-INH. La activación astrocítica disminuye notablemente a los 7 días en ambos grupos experimentales y ninguna diferencia entre los ratones tratados con solución salina y los tratados con RhC1-INH se puede observar.

Ejemplo 2: estudio en la acción neuroprotectora de RhC1-INH en modelos de ratón con isquemia cerebral focal

[0059] Hemos demostrado previamente que 15U de RhC1-INH tienen una acción neuroprotectora marcada en un modelo de isquemia/reperusión cerebral de murina también cuando se administra 1 hora después de la aparición de isquemia/reperusión, en variación con PdC1-INH que, en ese momento de post-tratamiento, ya no es eficaz. Esta neuroprotección es de larga duración, de hecho siete días después de la isquemia y el tratamiento, cerebros isquémicos de ratones tratados con RhC1-INH todavía muestran un tamaño disminuido de infarto. En los siguientes experimentos hemos determinado la ventana de tiempo de eficacia (más allá de 1 hora después) y la respuesta de dosis de la actividad neuroprotectora de RhC1-INH en el volumen isquémico. Además hemos realizado una comparación directa entre PdC1-INH, y RhC1-INH de conejo y vaca (en la dosis y puntos más efectivos para RhC1-INH de conejo) usando el mismo protocolo.

MÉTODOS

Animales

[0060] Los procedimientos implicando animales y su cuidado fueron llevados a cabo conforme a las pautas institucionales de acuerdo con las leyes nacionales (D.L. n.116, G.U. suppl. 40, 18 Febrero 1992) y leyes internacionales y pólizas (EEC Consejo Directivo 86/609, OJ L 358,1 Dec.12,1987; NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, U.S. National Research Council EEUU 1996). Ratones macho C57B1/6 (26-28 g, Charles River, Calco, Italia) fueron alojados en jaulas, 5 en cada una, y mantenidos a temperatura constante (21±1°C) y humedad relativa (60 %) con horario regular ligero/oscuras (7 am-7 pm). Alimentos (gránulos de Altromin para ratones) y agua disponible ad libitum.

Isquemia cerebral focal transitoria

[0061] Isquemia fue conseguida por oclusión de la arterial cerebral media (MCAO) como previamente se describió en ¹⁻³. Anestesia fue inducida por 5% isoflurano en NaO/O₂ (70/30%) mezcla y mantenida por 1.5-2% isoflurano en la misma mezcla. Para confirmar la adecuación de la oclusión vascular en cada animal, el flujo sanguíneo fue medido por láser doppler flujométrico (Transonic BLF-21) usando una sonda de fibra óptica de 0.5mm, (tipo Transonic M, 0,5 mm diámetro) situado en la superficie del cerebro y fijado con material de impresión en el cráneo en las siguientes coordenadas: AP = -1mm; L= -3,5mm. Brevemente, la arteria carótida adecuada común fue expuesta y un filamento silicizado (7-0) fue introducido en la arteria carótida interna a través de una incisión realizada en la arteria carótida común y avanzada a la arteria anterior cerebral para bloquear su bifurcación en la arteria anterior cerebral y el MCA. El filamento fue avanzado hasta que una reducción de >70% del flujo sanguíneo, En comparación con línea base preisquémica, fue observada. Después de 30 min de isquemia, el flujo sanguíneo fue restaurado al eliminar cuidadosamente el filamento de nilón.

Tratamiento con medicamentos

[0062] Ratones recibidos una única inyección iv de INH C1(RhC1-INH de conejo, RhC1-INH de vaca o PdC1-INH) en dosis diferentes en tiempos diferentes de isquemia. Ratones de control recibieron el mismo volumen de solución salina.

5 Evaluación de déficits neurológicos.

[0063] Cuarenta y ocho horas después de la isquemia, cada ratón fue estimado en dos escalas de función neurológicas únicas al ratón, por unos investigadores expertos ajenos a las condiciones experimentales. Para déficits generales los ratones fueron marcados de 0 a 28 en cada una de las siguientes categorías: pelo, orejas, ojos, actividad espontánea, comportamiento epiléptico. Para déficits focales los ratones fueron marcados de 0 a 28 en cada una de las siguientes categorías: simetría del cuerpo, movimiento, escalada, simetría de brazo anterior, giro obligatorio, respuesta sensorial. Los datos se expresan en media y percentiles.

Cuantificación del tamaño de infarto

[0064] Cuarenta y ocho horas después de la isquemia, los ratones fueron profundamente anestesiados con Equitensin (120µl/ratones, ip) y perfundidos transcárdialmente con 30ml de PBS 0.1mol/l, pH 7.4, seguidos de 60ml de enfriado paraformaldehído (4%) en PBS. Después de quitar cuidadosamente los cerebros del cráneo, fueron transferidos a 30% sacarosa en PBS a 4°C durante toda la noche para crioprotección. Los cerebros fueron luego rápidamente congelados por inmersión en isopentano a -45°C durante 3 min siendo sellado antes en viales y almacenado a -70°C hasta su uso. Para determinación el tamaño de la lesión, 20µm secciones de cerebro coronarias fueron cortadas en serie a 240µm intervalos y tintadas con rojo neutral (Neutral Red Gurr Certistain, BDH, Inglaterra). En cada sección, las áreas afectadas fueron evaluadas ciegamente y delineadas por la palidez relativa de la coloración histológica. El área afectada fue determinada por substraer el área del tejido saludable en el hemisferio ipsilateral del área del hemisferio contralateral en cada sección. Los volúmenes de infarto fueron calculados por la integración de áreas afectadas en cada sección de cerebro como se cuantificó con analizador de imagen asistida de ordenador y se calculó por sistema de imagen analítica.

25 Evaluación de neurodegeneración

[0065] La presencia de neurodegeneración fue evaluada en 20 secciones gruesas de obstrucción por coloración con Fluoro-Jade⁴, una etiqueta para la degeneración neuronal. Brevemente, las secciones fueron secadas y rehidratadas en etanol (100% - 75%) y agua destilada. Luego, ellos fueron incubados en 0.06% permanganato de potasio durante 15 minutos, lavadas en agua destilada y transferidas a 0.001% Solución de tinción de Fluoro-Jade durante 30 minutos. Después de la coloración, las secciones fueron enjuagadas en agua destilada, secadas, sumergidas en xileno y cubiertas usando DPX mountant (BDH, Poole, UK) antes análisis de microscopía fluorescente.

RESULTADOS

VENTANA DE TIEMPO DE EFICACIA EN ISQUEMIA TRANSITORIA

[0066] Para evaluar la ventana de tiempo de eficacia, 15U de RhC1-INH de conejo o solución salina fueron dadas a 3, 6, 9, 18 y 24 horas del principio de isquemia. Cuarenta y ocho horas más tarde, ratones isquémicos tratados con RhC1-INH de conejo 3 y 6 horas después de la aparición de isquemia mostraron una reducción marcada de volumen isquémico ($11,71 \pm 0,63 \text{ mm}^3$ y $20,38 \pm 2,37 \text{ mm}^3$, respectivamente) en comparación con los ratones isquémicos tratados en solución salina ($44,43 \pm 5,94 \text{ mm}^3$). También cuando se administra 9 y 18 horas después de la isquemia, el RhC1-INH fue todavía eficaz, aunque a una extensión menor ($23,63 \pm 4,11 \text{ mm}^3$ y $27,13 \pm 2,58 \text{ mm}^3$ respectivamente). Veinticuatro horas después de la isquemia el inhibidor perdió su acción beneficiosa ($41,92 \pm 2,76 \text{ mm}^3$). (Fig.3). En ratones tratados en solución salina, la tinción Fluoro-Jade mostró que, la neurodegeneración estaba presente en córtex estriado e hipocampo. Cuando administrado en puntos de tiempo tempranos, RhC1-INH fue capaz de contrarrestar la neurodegeneración en hipocampo (hasta 3 horas) y en córtex (hasta a 9 horas). Cuando los ratones fueron tratados con este inhibidor 6 y 9 horas después de la isquemia, algunas neuronas de degeneración fueron observadas en hipocampo. En puntos de tratamiento más tardíos (18 y 24 horas), cuando el volumen isquémico fue más grande, la tinción Fluoro-Jade mostró la presencia de neurodegeneración en el córtex. En todos los puntos de tiempo considerados, el estriatum mostró una neurodegeneración intensiva, tanto en los tratados con solución salina como con los animales tratados con RhC1-INH (Fig.5, 6, 7). Una evaluación semi-cuantitativa de tinción de Fluoro-Jade para cada animal fue realizada por unos investigadores ajenos a las condiciones experimentales (Figura 4).

50 RESPUESTA DE DOSIS EN ISQUEMIA TRANSITORIA

[0067] Ya que la dosis de INH C1 usada en seres humanos para angioedema hereditario es inferior a la usada en ratones para el tratamiento de accidente cerebrovascular, dosis inferiores fueron usadas en nuestro modelo isquémico. Basados en los resultados del experimento previo nosotros elegimos tratamiento post 3 horas para experimentar la respuesta a la dosis. Diferentes dosis de RhC1-INH de conejo (5 y 10 unidades) fueron administradas 3 horas después de la aparición de isquemia y reperusión. La dosis de IOU/ratón fue todavía eficaz al reducir el volumen isquémico ($22,10 \pm 3,65 \text{ mm}^3$), mientras que 5U de INH C1 de conejo no modificó la extensión del daño de cerebro ($47,39 \pm 4,08 \text{ mm}^3$). Estos datos muestran que INH C1 de conejo es capaz de modificar la lesión isquémica en una manera dependiente de la dosis (Fig.8).

[0068] En ratones tratados con 10U de RhC1-INH algunas neuronas neurodegenerativas, como resalta la tinción de Fluoro-Jade, fueron observadas en striatum pero no en hipocampo y córtex, mientras 5U de ratones isquémicos tratados mostraron una neurodegeneración en el striatum córtex (no mostrado).

[0069] Déficits neurológicos focales y generales no mostraron ninguna variación significativa ni en ventana de tiempo de eficacia ni en experimento de respuesta de dosis (no mostradas).

[0070] Comparación entre el efecto de PdC1-INH y RhC1-INH (de conejos y vacas). Nuestros datos precedentes en PdC1-INH fueron obtenidos con un modelo diferente de isquemia cerebral transitoria. Para directamente comparar PdC1-INH, RhC1-INH de vaca y RhC1-INH de conejo, estos compuestos fueron dados a ratones en los que la isquemia se indujo con el mismo protocolo experimental (filamento revestido de silicona). Los inhibidores fueron administrados a la dosis de 15U/ratón 3 horas después de la aparición de la isquemia.

[0071] Como estaba previsto, el PdC1-INH no fue capaz de ejercer una acción neuroprotectora en ese punto en el tiempo ($47.39 \pm 4.08 \text{ mm}^3$ à). En cambio, los ratones isquémicos tratados con RhC1-INH de vaca mostraron una reducción significativa del volumen isquémico en comparación con los ratones tratados en solución salina, aunque a una extensión inferior de los ratones tratados con RhC1-INH (Fig.9). Sorprendentemente ambos déficits focales y generales fueron significativamente mejorados por RhC1-INH de vaca (Fig. 10).

[0072] La tinción con Fluoro-Jade mostró una gran neurodegeneración en el cerebro de ratones isquémicos tratados con PdC1-INH en todas las áreas consideradas (córtex, estriatum e hipocampo). La tinción del cerebro de ratones tratados con RhC1-INH de vaca mostró un grado variable de neurodegeneración en córtex e hipocampo ya que en 3 de cada 6 ratones se observó una marcada neurodegeneración en ambas áreas, mientras que en los otros tres ratones la neurodegeneración estaba presente en una pequeña cantidad. El estriatum mostró una coloración de Fluoro-Jade extensiva en 6 de cada 6 ratones.

OBSERVACIONES

[0073] El dato más relevante de este trabajo es la ventana de tiempo de eficacia de RhC1-INH de conejo. La dosis de 15U/ratón de RhC1-INH de conejo fue capaz de reducir significativamente el volumen isquémico hasta 18 horas después de la aparición de la isquemia al contrario que con PdC1-INH que 3 horas después de la isquemia ya ha perdido su efecto neuroprotector. Esta característica sorprendente hace de RhC1-INH un candidato posible como terapia de accidente cerebrovascular en seres humanos. La eficacia diferente de RhC1-INH y PdC1-INH, podría ser debida a la glicosilación diferente de las dos moléculas dando como resultado una afinidad más alta para una proteína de enlace de manosa (MBP) de RhC1-INH en comparación con el derivado de plasma. Uniendo MBP, RhC1-INH causa la inhibición de la vía de lectina de complemento, implicada en la patogénesis del daño por isquemia/reperfusión en corazón, riñón y gastrointestinal⁷⁹. La función de esta vía mal caracterizada sigue siendo desconocida en la isquemia cerebral y se requieren más experimentos para la claridad del mecanismo de neuroprotección de RhC1-INH.

[0074] El efecto superior neuroprotector de RhC1-INH sobre PdC1-INH en la ventana de tiempo después de la aparición de isquemia puede ser además explicada por un objetivo más eficaz de la molécula recombinante al sitio de daño de tejido bien a través de unión a antígenos de superficie de célula y/o una penetración de tejido más eficaz. Es necesario llevar a cabo más investigaciones para dilucidar completamente el mecanismo exacto molecular destacando la observación descrita en esta invención.

[0075] La tinción con Fluoro-Jade da evidencia indirecta de cómo la lesión evoluciona en el tiempo. El tratamiento temprano con RhC1-INH proporciona un rescate completo de la penumbra isquémica (hipocampo y córtex). Cuanto más tarde se administre el tratamiento, más neuronas se degeneran en la penumbra. Estas conclusiones confirman que RhC1-INH ejerce su acción neuroprotectora en la penumbra isquémica. RhC1-INH de conejo es capaz de reducir el volumen isquémico en una dosis de manera dependiente. La dosis más efectiva de RhC1-INH (15U/ratón, correspondiente aproximadamente a 600U/kg), usada para el experimento de ventana de tiempo de eficacia, es muy superior a la usada en seres humanos para angioedema hereditario (aproximadamente 25-100U/kg). Para verificar si una dosis inferior fue todavía eficaz en la reducción de infarto isquémico y neurodegeneración, un experimento de respuesta de dosis se llevó a cabo. Los resultados mostraron que 400U/kg (10 U/ratón) de RhC1-INH fueron todavía capaces de contrarrestar significativamente el ataque isquémico, aunque a una extensión inferior. Una dosis de 8 pliegues superior a la usada para HAE (5U/ratón; 200U/kg) no fue eficaz. Estas conclusiones están en línea con la evidencia que muestra que se requieren grandes dosis de INH C1 para uso terapéutico en varios ajustes de inflamación⁵. En particular tales dosis son necesarias para alcanzar un efecto inhibitor importante en la adhesión de moléculas endotiales⁶, un mecanismo implicado en la patogénesis de daño de cerebro de isquemia/reperfusión. Finalmente, el RhC1-INH de vaca proporcionó neuroprotección, cuando se administró 3 horas después de la isquemia a la dosis de 15U/ratón, aunque menos marcadamente que RhC1-INH de conejo. El inhibidor de vaca fue también capaz de mejorar déficits neurológicos en comparación con ratones tratados con solución salina. Estas conclusiones indican que esta molécula es capaz de mejorar las condiciones generales de los ratones isquémicos.

Ejemplo 3: Comparación de la capacidad de RhC1-INH y INH C1 derivado de plasma para inhibir la activación de las vías clásicas y MBL.

Materiales y métodos

[0076] El efecto de RhC1-INH y PdC1-INH (Cetor, Sanquin, Amsterdam, Países Bajos) en la función de la vía de lectina y tradicional fue examinada en el Wieslab pantalla de sistema de complemento TM (Euro-Diagnostica, Malmö, Suecia) usando dos fuentes diferentes de suero. Una fuente de suero se incluye en el equipo, donde éste se usa como un control positivo (de aquí en adelante referido como muestra de suero 1). La otra muestra de suero se obtuvo de una agrupación disponible comercialmente de suero humano (agrupación de 25 donantes diferentes; Kordia, Leiden, Países Bajos), de aquí en adelante referido como muestra de suero 2. Ambas muestras de suero fueron incubadas en triples independientes con 0, 15, 30 y 75 μmol de RhC1-INH o PdC1-INH durante 30 min a temperatura ambiente. Por lo tanto, soluciones madre de PdC1-INH y RhC1-INH fueron diluidas en agua a concentraciones apropiadas. Volúmenes correspondientes con 15, 30 y 75 μmol de RhC1-INH o PdC1-INH fueron tomados y ajustados a 15 μl con agua. El tampón en el que RhC1-INH es disuelto (20 mM citrato, 0.19 M sacarosa pH 6.8, 0.22 μm filtrada) fue tomado a lo largo de en las mismas diluciones que RhC1-INH para controlar por interferencia con el Wieslab sistema de complemento. Los controles positivos (PC) y negativos (NP) de la vía tradicional y MBL (provista con el equipo), y ambas muestras de suero fueron diluidas 1/101 en diluyente CP para la vía clásica y diluyente MP para la vía MBL según instrucciones del fabricante. De estos sueros diluidos, 127.5 μl fue suplementado con 22.5 μl agua, PdC1-INH, RhC1-INH o tampón e incubado durante 30 minutos a RT. Después, 100 μl /pocillo de PC, NC, diluyente CP o MP (formas preliminares) y muestras fueron pipetadas en la placa apropiada e incubadas durante 1 hora a 37 °C. Después de la incubación los pocillos fueron lavados 3 veces con 300 μl /pocillo solución de agua y posteriormente incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente con 100 μl /pocillo de conjugado. Después de otro lavado, los pocillos fueron incubados con 100 μl /pocillo de sustrato y nuevamente incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue detenida por la adición de 100 μl /pocillo 5 mM EDTA y la absorbencia fue detectada a 405 nm.

[0077] Para el cálculo de los resultados, la absorbencia de las formas preliminares (diluyente CP o MP) fue sustraída del PC, NC y muestras. La activación de complemento de porcentaje fue calculado por medición con esta fórmula: $(\text{Muestra-NC})/(\text{PC-NC}) \times 100$. Esto significa que el PC se establece siempre a 100%. Para cada condición la desviación típica, media y CV% fue calculada.

Resultados

Efecto de RhC1-INH y PdC1-INH en la vía clásica examinado por Wielisa.

[0078] Las propiedades inhibitoras de ambos RhC1-INH y PdC1-INH en activación de vía clásica fueron analizadas en dos muestras de suero diferentes. Como se muestra en las Figuras 12, 13 y 16, ambas dosis de RhC1-INH y PdC1-INH dependientemente redujeron la vía clásica deposición mediada C5b-9 en ambas muestras de sueros. Mientras que RhC1-INH - a una concentración de 75 μM - parece inhibir la activación de la vía tradicional en suero 1 ligeramente más fuerte que PdC1-INH, tal efecto no fue visto en muestra de suero 2. En las otras concentraciones evaluadas ninguna diferencia en propiedades inhibitorias fue observada entre RhC1-INH y PdC1-INH. Por lo tanto, fue concluido que ambos RhC1-INH y PdC1-INH son igualmente eficaces en la activación de la vía clásica de inhibición en sueros humanos.

Efecto de RhC1-INH y PdC1-INH en la vía MBL examinado por Wielisa.

[0079] En el mismo conjunto de experimentos, también las propiedades inhibitorias de ambos RhC1-INH y PdC1-INH en la activación de la vía MBL fueron analizadas. Como se muestra en las Figuras 14, 15 y 16, ambos RhC1-INH y PdC1-INH también en dosis dependientes redujeron la activación de la vía MBL. No obstante, a diferencia de la vía clásica donde ninguna de las diferencias fueron vistas, RhC1-INH resultó ser un inhibidor más potente de la vía MBL cuando se compara con PdC1-INH. En todas las 3 concentraciones evaluadas y en ambas muestras de suero, la inhibición RhC1-INH mediada de la vía MBL es - 20% más alta en comparación con PdC1-INH. Por lo tanto, fue concluido que RhC1-INH es un inhibidor más eficaz de la vía MBL que PdC1-INH.

Conclusión

[0080] Los resultados muestran que ambos RhC1-INH y PdC1-INH son igualmente eficaces en la inhibición de la vía clásica, pero RhC1-INH es un inhibidor más potente de la vía MBL. En todas las concentraciones evaluadas, la inhibición de la vía MBL mediante RhC1-INH ~20% más fuerte en comparación con PdC1-INH.

REFERENCIAS

1. De Simoni, M. G. et al. Neuroprotection by complement (C1) inhibitor in mouse transient brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 232-239 (2003).
2. De Simoni, M. G. et al. The powerful neuroprotective action of C1-inhibitor on brain ischemia-reperfusion injury does not require C1q. *Am J Pathol* 164, 1857-63 (2004).
3. Storini, C. et al. C1 inhibitor protects against brain ischemia-reperfusion injury via inhibition of cell recruitment and inflammation. *Neurobiol Disease* 19, 10-17 (2005).
4. Schmued, L. C. & Hopkins, K. J. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 874, 123-30. (2000).

5. Caliezi, C. et al. C1 esterase inhibitor: an anti-inflammatory agent and its potential use in the treatment of diseases other than hereditary angioedema. *Pharmacol Rev* 52,91-112 (2000).
6. Cai, S. et al. A direct role for C1 inhibitor in regulation of leukocyte adhesion. *J Immunol* 174, 6462-6 (2005).
7. Walsh, M. C. et al. Mannose-binding lectin is a regulator of inflammation that accompanies myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Immunol* 175, 541-6 (2005).
8. Moller-Kristensen, M. et al. Mannan-binding lectin recognizes structures on ischaemic reperfused mouse kidneys and is implicated in tissue injury. *Scand J Immunol* 61,426-34 (2005).
9. Hart, M. L. et al. Gastrointestinal ischemia-reperfusion injury is lectin complement pathway dependent without involving C1q. *J Immunol* 174, 6373-80 (2005).

LISTA DE SECUENCIAS

[0082]

<110> Pharming Intellectual Property B.V.

<120> Uso de inhibidor C1 para la prevención de lesiones por isquemia reperfusión

<130> P6005723PCT

<140> P6005723PCT<141> 2006-12-19

<150> 05112630.8<151> 2005-12-21

<150> 60/760,944<151> 2006-01-23

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 478

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

ES 2 369 522 T3

Asn Pro Asn Ala Thr Ser Ser Ser Ser Gln Asp Pro Glu Ser Leu Gln
 1 5 10 15
 Asp Arg Gly Glu Gly Lys Val Ala Thr Thr Val Ile Ser Lys Met Leu
 20 25 30
 Phe Val Glu Pro Ile Leu Glu Val Ser Ser Leu Pro Thr Thr Asn Ser
 35 40 45
 Thr Thr Asn Ser Ala Thr Lys Ile Thr Ala Asn Thr Thr Asp Glu Pro
 50 55 60
 Thr Thr Gln Pro Thr Thr Glu Pro Thr Thr Gln Pro Thr Ile Gln Pro
 65 70 75 80
 Thr Gln Pro Thr Thr Gln Leu Pro Thr Asp Ser Pro Thr Gln Pro Thr
 85 90 95
 Thr Gly Ser Phe Cys Pro Gly Pro Val Thr Leu Cys Ser Asp Leu Glu
 100 105 110
 Ser His Ser Thr Glu Ala Val Leu Gly Asp Ala Leu Val Asp Phe Ser
 115 120 125
 Leu Lys Leu Tyr His Ala Phe Ser Ala Met Lys Lys Val Glu Thr Asn
 130 135 140
 Met Ala Phe Ser Pro Phe Ser Ile Ala Ser Leu Leu Thr Gln Val Leu
 145 150 155 160

Leu Gly Ala Gly Glu Asn Thr Lys Thr Asn Leu Glu Ser Ile Leu Ser
 165 170 175
 Tyr Pro Lys Asp Phe Thr Cys Val His Gln Ala Leu Lys Gly Phe Thr
 180 185 190
 Thr Lys Gly Val Thr Ser Val Ser Gln Ile Phe His Ser Pro Asp Leu
 195 200 205
 Ala Ile Arg Asp Thr Phe Val Asn Ala Ser Arg Thr Leu Tyr Ser Ser
 210 215 220
 Ser Pro Arg Val Leu Ser Asn Asn Ser Asp Ala Asn Leu Glu Leu Ile
 225 230 235 240
 Asn Thr Trp Val Ala Lys Asn Thr Asn Asn Lys Ile Ser Arg Leu Leu
 245 250 255
 Asp Ser Leu Pro Ser Asp Thr Arg Leu Val Leu Leu Asn Ala Ile Tyr
 260 265 270
 Leu Ser Ala Lys Trp Lys Thr Thr Phe Asp Pro Lys Lys Thr Arg Met
 275 280 285
 Glu Pro Phe His Phe Lys Asn Ser Val Ile Lys Val Pro Met Met Asn
 290 295 300
 Ser Lys Lys Tyr Pro Val Ala His Phe Ile Asp Gln Thr Leu Lys Ala
 305 310 315 320
 Lys Val Gly Gln Leu Gln Leu Ser His Asn Leu Ser Leu Val Ile Leu
 325 330 335
 Val Pro Gln Asn Leu Lys His Arg Leu Glu Asp Met Glu Gln Ala Leu
 340 345 350
 Ser Pro Ser Val Phe Lys Ala Ile Met Glu Lys Leu Glu Met Ser Lys
 355 360 365
 Phe Gln Pro Thr Leu Leu Thr Leu Pro Arg Ile Lys Val Thr Thr Ser
 370 375 380
 Gln Asp Met Leu Ser Ile Met Glu Lys Leu Glu Phe Phe Asp Phe Ser
 385 390 395 400
 Tyr Asp Leu Asn Leu Cys Gly Leu Thr Glu Asp Pro Asp Leu Gln Val
 405 410 415
 Ser Ala Met Gln His Gln Thr Val Leu Glu Leu Thr Glu Thr Gly Val
 420 425 430
 Glu Ala Ala Ala Ala Ser Ala Ile Ser Val Ala Arg Thr Leu Leu Val

435 440 445

Phe Glu Val Gln Gln Pro Phe Leu Phe Val Leu Trp Asp Gln Gln His
450 455 460

Lys Phe Pro Val Phe Met Gly Arg Val Tyr Asp Pro Arg Ala
465 470 475

REIVINDICACIONES

1. Uso de un inhibidor C1 que tiene un nivel reducido de residuos de ácidos siálicos terminales en comparación con el inhibidor C1 humano derivado de plasma, donde el nivel reducido de residuos de ácidos siálicos terminales da como resultado una vida media de plasma inferior a 6 horas, en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, reducción o tratamiento de al menos una lesión de isquemia y reperfusión, donde el inhibidor C1 se administra al menos 10 minutos después del periodo de isquemia y/o el inicio de la reperfusión.
2. Uso según la reivindicación 1, donde el inhibidor C1 es administrado entre al menos 10 minutos y 24 horas después del periodo de isquemia y/o el inicio de reperfusión.
3. Uso según la reivindicación 1 o 2, donde el inhibidor C1 comprende un glicano que tiene un residuo terminal seleccionado de galactosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, manosa y fucosa.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el inhibidor C1 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 65% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el inhibidor C1 se obtiene de una célula u organismo genéticamente modificado.
6. Uso según la reivindicación 5, donde dicho organismo es un animal transgénico no humano.
7. Uso según la reivindicación 6, donde el inhibidor C1 se obtiene de la leche de dicho animal transgénico no humano.
8. Uso según la reivindicación 6 o 7, donde el animal transgénico no humano es un bovino o un animal del orden *Lagomorpha*.
9. Uso según la reivindicación 8, donde el animal transgénico no humano es un conejo.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el inhibidor C1 se usa en una cantidad en el intervalo de 50-2000 unidades por kg de peso corporal.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde la composición farmacéutica también contiene un agente trombolítico, o es para su uso en combinación con un agente trombolítico o es para su uso después del tratamiento con tal agente.
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde la composición farmacéutica es para la prevención, reducción o tratamiento de una aparición imprevista o aguda de lesión por isquemia y reperfusión.
13. Uso según la reivindicación 12, donde la aparición imprevista o aguda de lesión por isquemia y reperfusión ocurre después de un accidente cerebrovascular o accidente cerebrovascular perinatal.
14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde la composición farmacéutica es para la prevención, reducción o tratamiento de una aparición prevista de lesión por isquemia y reperfusión.
15. Uso según la reivindicación 14, donde la aparición prevista de lesión por isquemia y reperfusión ocurre después de un transplante de órgano.

Fig 1

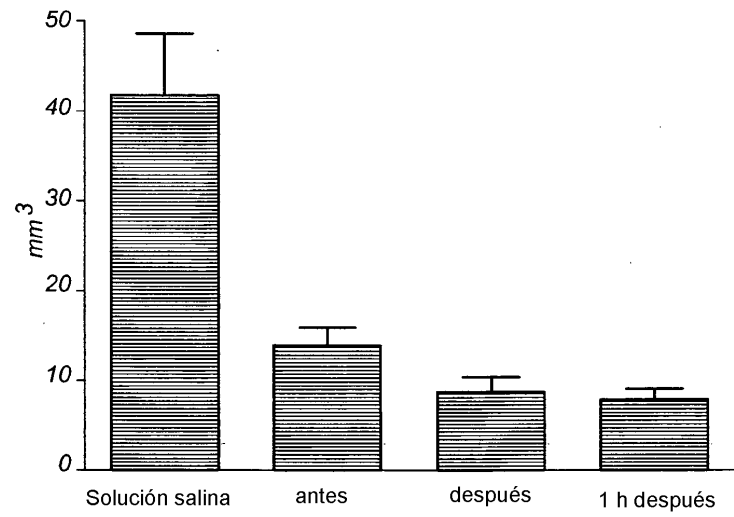


Fig 2

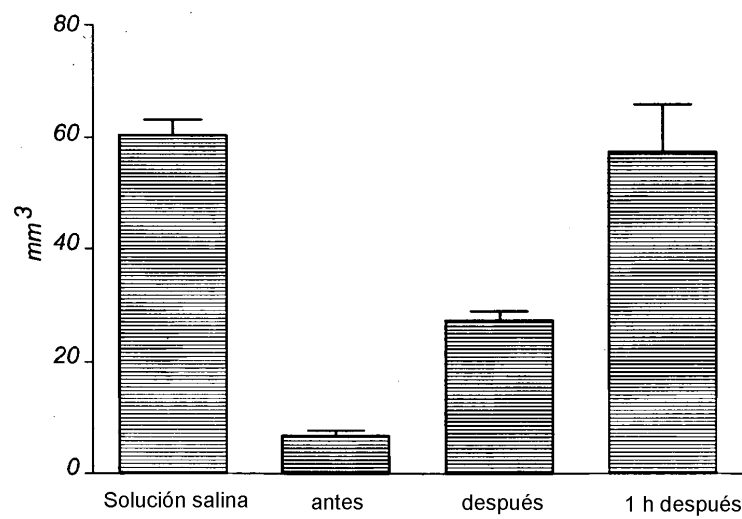


Fig 3

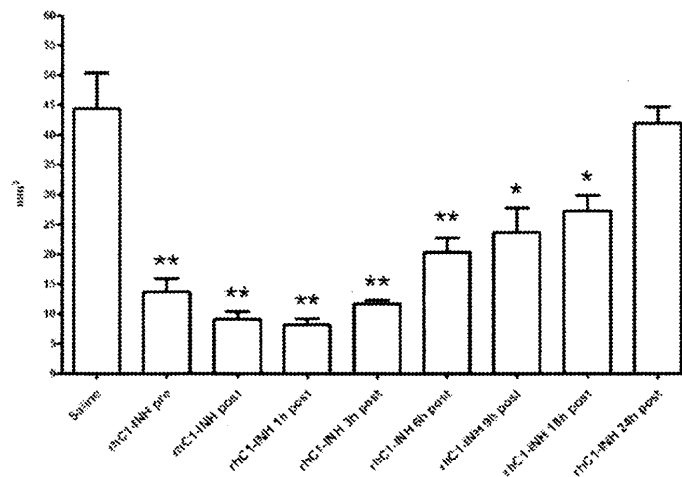


Fig 4

	Solución salina	antes	después	3 h después	6 h después	9 h después	18 h después	24 h después
<i>Estriatum</i>	+++	++	+	++	+++	++	++	+++
	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++
	+++	++	+	++	++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++
	+++	+++	++	+++	++	++	++	+++
	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
<i>Hipocampo</i>	+++	-	-	-	+	-	++	+++
	++	-	-	-	++	++	-	+++
	+	-	-	+	-	++	+	++
	+++	-	-	-	++	+	++	++
	++	-	-	-	+	+++	+++	+++
	+++	-	-	-	+++	+	+++	+
<i>Córtex</i>	+++	-	-	-	-	-	+	+++
	++	-	-	-	-	-	+	++
	+++	-	-	-	-	-	-	++
	++	-	-	-	-	-	+++	+++
	++	-	-	-	-	+	-	+
	+++	-	-	-	+	-	++	+++

Fig 5

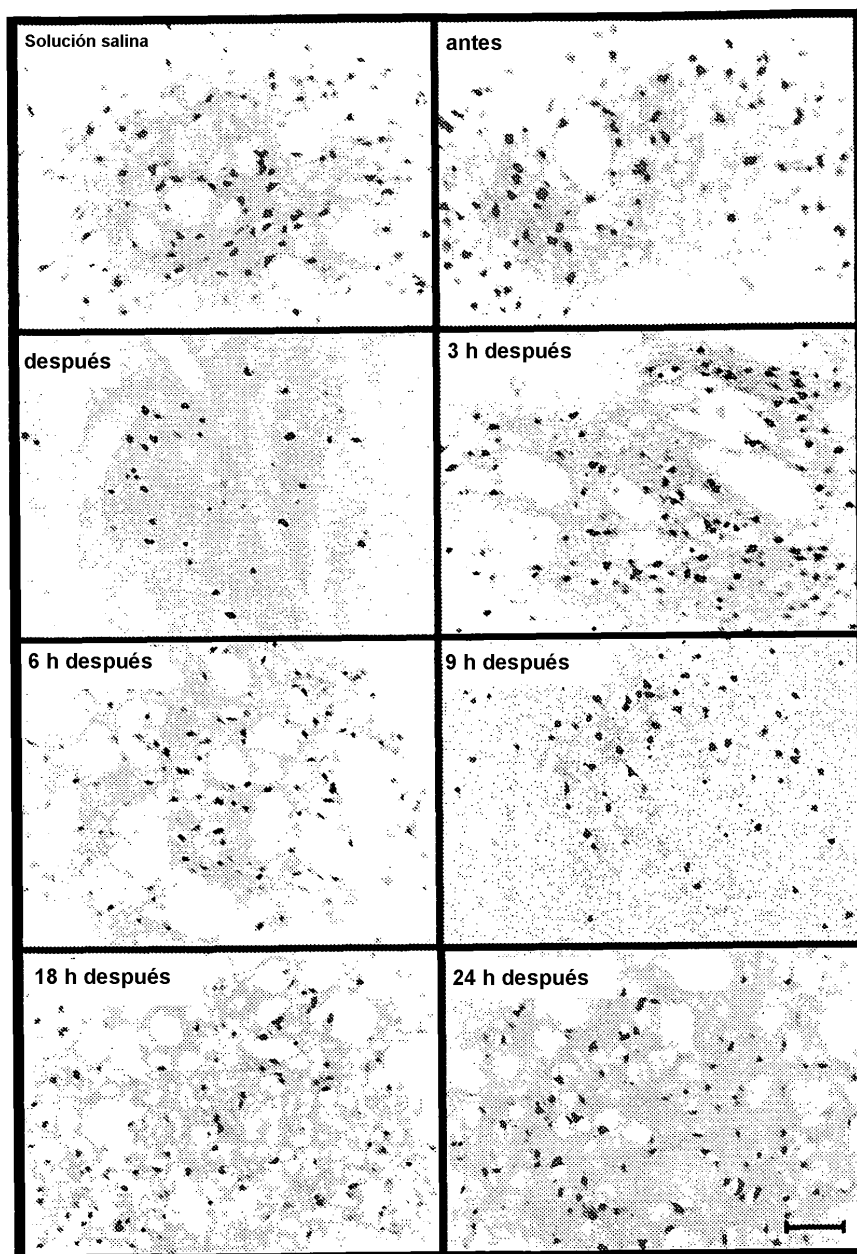


Fig 6

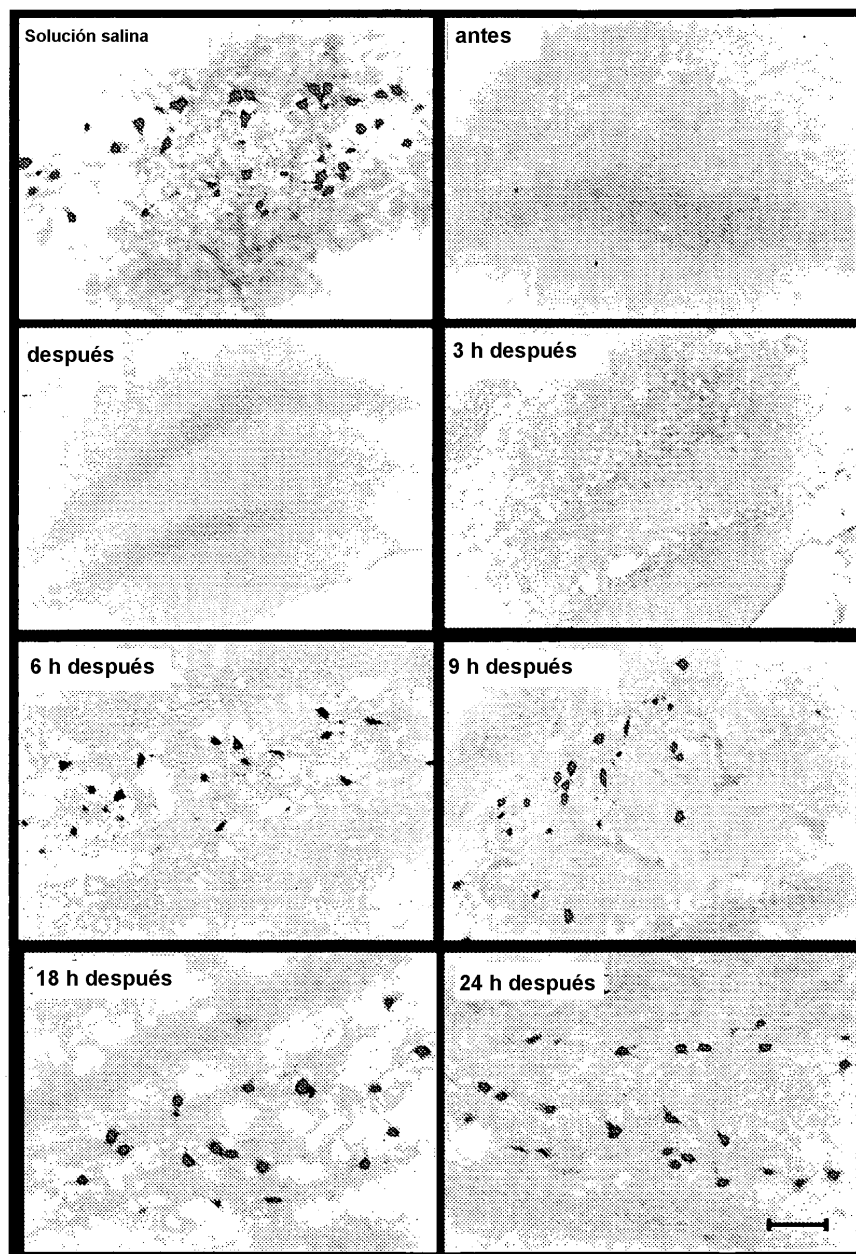


Fig 7

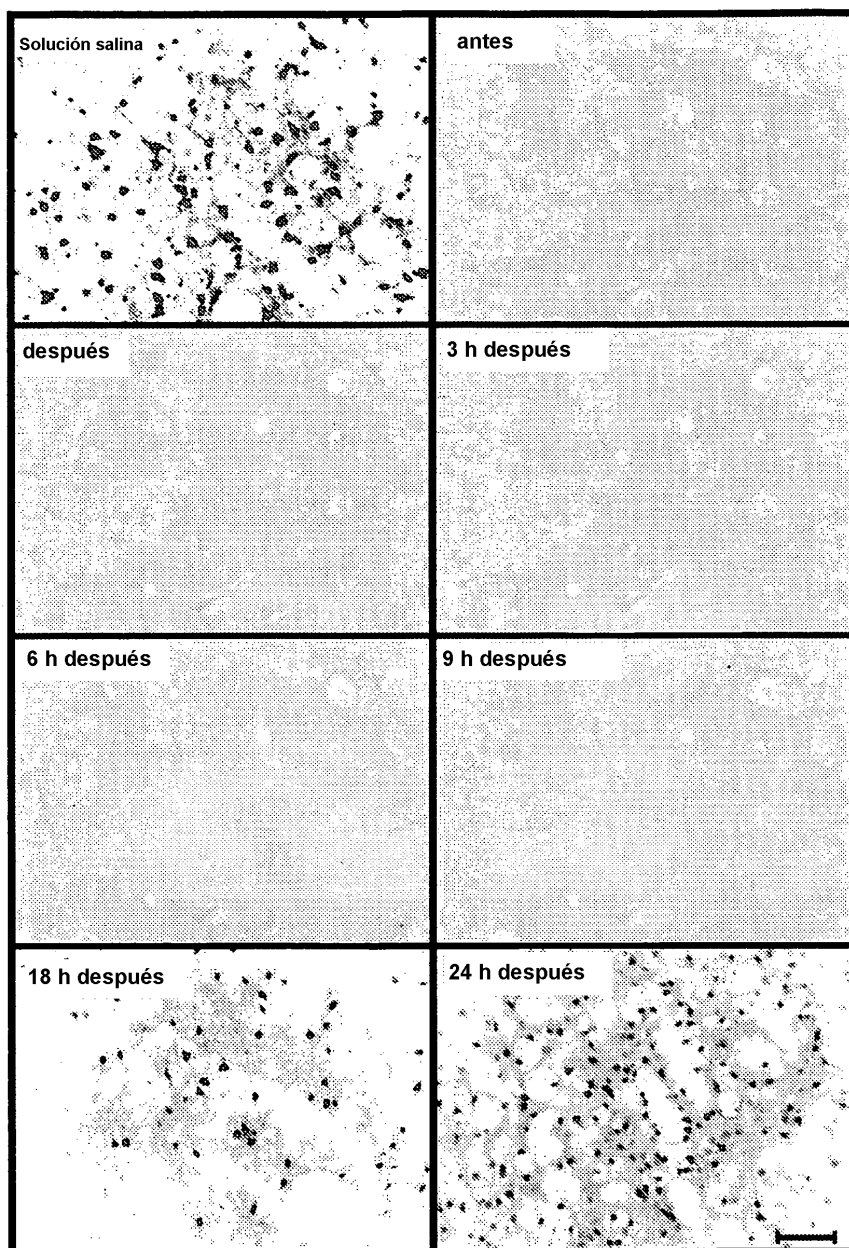


Fig 8

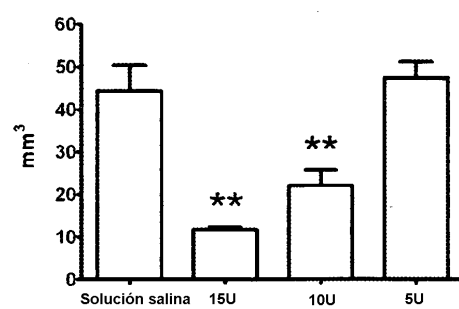


Fig 9

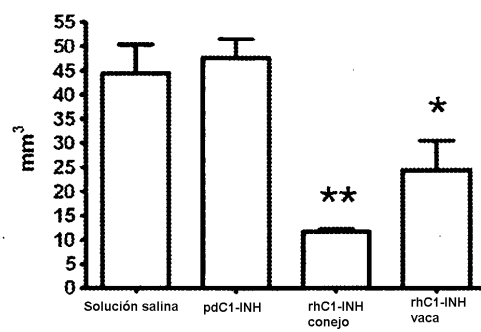


Fig 10a

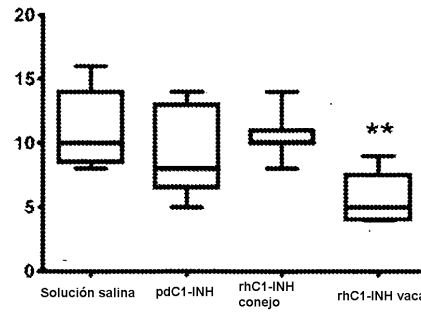


Fig 10b

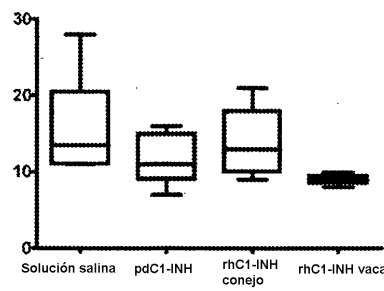


Fig 11

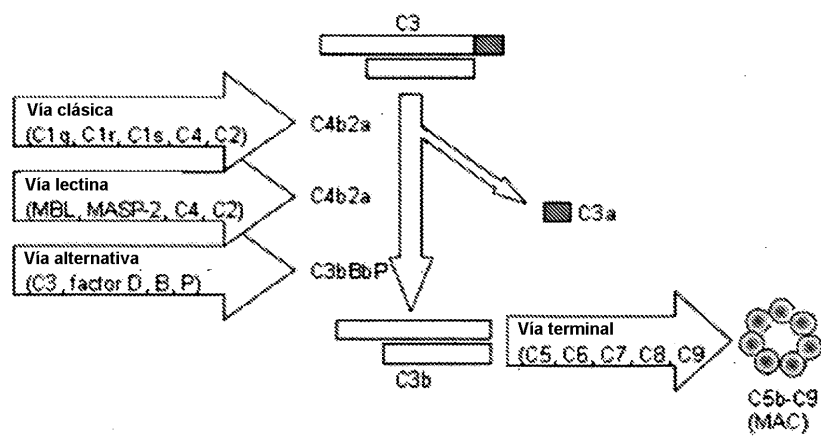


Fig 12

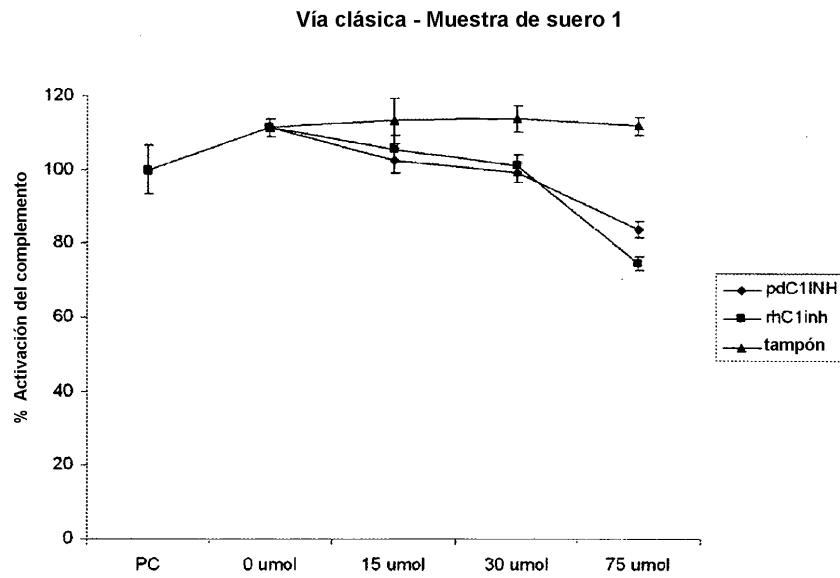


Fig 13

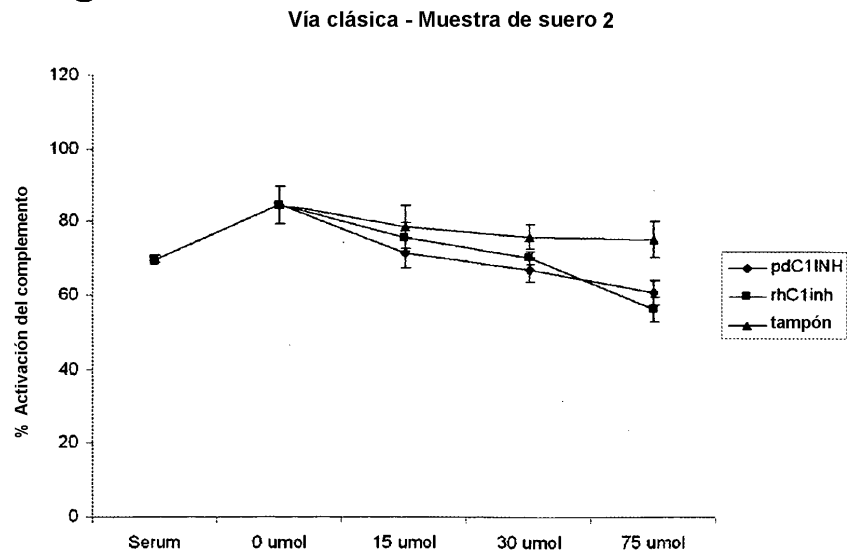


Fig 14

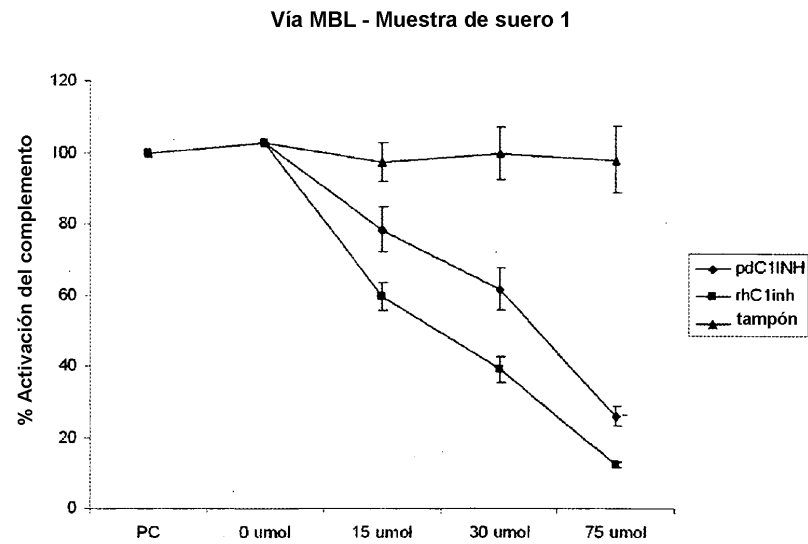


Fig 15

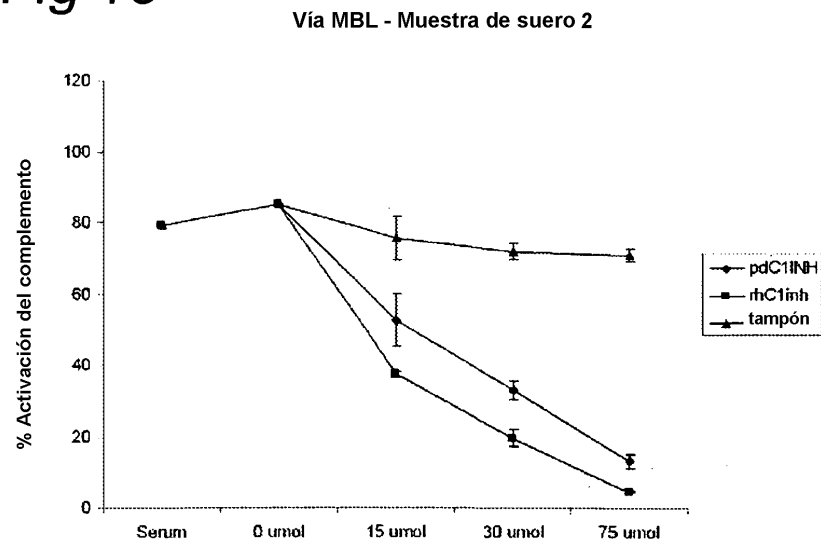


Fig 16

Ensayo de complemento Wieslab					
% Activación del complemento					
		Vía clásica		Vía MBL	
		Media	SD	Media	SD
Muestra de suero 1	PC	100	7	100	16
	pdC1INH 0 umol	111	2	103	10
	15 umol	103	3	78	6
	30 umol	99	3	61	6
	75 umol	84	2	26	3
	rhC1inh 0 umol	111	2	103	10
	15 umol	106	4	59	4
	30 umol	101	3	39	4
	75 umol	74	2	12	1
	tampón 0 umol	111	2	103	10
	15 umol	113	6	97	6
	30 umol	114	3	99	8
	75 umol	112	2	98	9
Muestra de suero 2	pdC1INH 0 umol	85	5	85	7
	15 umol	72	4	52	7
	30 umol	67	4	33	3
	75 umol	61	3	13	2
	rhC1inh 0 umol	85	5	85	7
	15 umol	76	4	37	1
	30 umol	70	2	19	2
	75 umol	56	3	5	0
	tampón 0 umol	85	5	85	7
	15 umol	79	6	75	6
	30 umol	76	3	72	2
	75 umol	75	5	71	2