

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 056**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2007** **E 13181901 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015** **EP 2698166**

54 Título: **Inhibición del complemento para una mejor regeneración de los nervios**

30 Prioridad:

10.10.2006 US 850277 P

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

21.01.2016

73 Titular/es:

REGENESANCE B.V. (100.0%)
Meibergdreef 9, D3307
1105 AZ Amsterdam Zuidoost, NL

72 Inventor/es:

BAAS, FRANK y
RAMAGLIA, VALERIA

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 557 056 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibición del complemento para una mejor regeneración de los nervios

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos y medicamentos utilizados para el tratamiento de condiciones que requieren la regeneración de los axones, por ejemplo, en los mamíferos afectados por una lesión o enfermedad del sistema nervioso central o periférico. Los medicamentos utilizados en estos métodos promueven la regeneración de los axones mediante la inhibición del sistema de complemento.

Antecedentes de la invención

La degeneración de los axones se produce con frecuencia en muchos tipos de enfermedades neurodegenerativas crónicas y en las lesiones de los axones causadas por ataque tóxico, lesiones isquémicas o traumáticas. Todo ello puede conducir a la separación de la neurona de sus objetivos, resultando en pérdida de la función neuronal. Un modelo de degeneración del axón es el proceso de autodestrucción observado en la parte distal de un axón seccionado a lo largo después de una lesión, denominada degeneración Walleriana (WD) como lo describió por primera vez Waller (1850). En el proceso de WD, si se corta o aplasta una fibra nerviosa, la parte distal a la lesión (es decir, la parte del axón separada del núcleo de la célula de la neurona) se degenerará. Ya que la mayoría de las proteínas neuronales se sintetizan en el soma y se transportan al axón mediante sistemas especializados de transporte en el axón, la degeneración de los axones seccionados a lo largo hace mucho tiempo se ha pensado que es el resultado de la ausencia de las proteínas necesarias y de otros materiales. Sin embargo, el descubrimiento de una cepa de ratón mutante surgida espontáneamente, C57BL/Wld^s, cuyos axones sobrevivieron durante un tiempo tan prolongado como semanas después de la transección, sugiere que la degeneración Walleriana implica un programa de autodestrucción activa y regulada.

De hecho una de las respuestas celulares más llamativas durante WD en el sistema nervioso periférico (SNP) es la proliferación e infiltración de macrófagos (Bruck, 1997). Los macrófagos participan en una amplia variedad de respuestas celulares durante WD. Una vez activados, liberan factores que son mitogénicos para células de Schwann (Baichwal y colaboradores, 1988). La finalización de WD se basa en la capacidad fagocítica de los macrófagos para degradar los residuos de mielina y del axón (Griffin y colaboradores, 1992). Además, los macrófagos pueden degradar moléculas inhibitorias para la regeneración de los axones (Bedi y colaboradores, 1992), así como los factores de liberación, tales como la interleuquina 1 (IL-1), que pueden promover el crecimiento del axón a través de la inducción de factores neurotróficos tales como el factor de crecimiento de nervios (FCN) (Lindholm y colaboradores, 1987).

Los mecanismos precisos responsables del reclutamiento de macrófagos durante la WD no se entienden completamente. Un grupo de factores que pueden desempeñar un papel en el reclutamiento y activación de macrófagos son las proteínas del complemento en suero. La importancia de las proteínas del complemento en una lesión del nervio periférico mediada por el sistema inmunológico, ha sido investigada con anterioridad.

Mead y colaboradores (2002) demostraron que las ratas PVG/c deficientes en C6, incapaces de formar el complejo de ataque a la membrana (CAM), no exhibieron desmielinización ni daño del axón y se redujo significativamente la puntuación clínica en el modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) mediada por anticuerpos para la esclerosis múltiple cuando se compara con ratas equivalentes con suficiente C6. Sin embargo, los niveles de infiltración de células mononucleares fueron equivalentes a aquellos observados en ratas con suficiente C6. Mead y colaboradores (2002) concluyeron que se presenta desmielinización y daño del axón en presencia de Ab y se requiere la activación de toda la cascada del complemento, incluyendo la deposición del CAM.

Jung y colaboradores (1995) divulgaron que el tratamiento con el receptor del complemento soluble humano recombinante tipo 1 (sCR1) suprimió marcadamente los signos clínicos suprimidos de la neuritis autoinmune experimental inducida por mielina (NAE) en ratas Lewis (un modelo animal del síndrome de Guillain-Barré humano). Se evitaron también la desmielinización y degeneración extendida de los axones. Estos hallazgos subrayan la importancia funcional del complemento durante la desmielinización inflamatoria en el sistema nervioso periférico.

En realidad, en NAE, el agotamiento del complemento disminuyó la descomposición de la mielina y el reclutamiento de macrófagos in vivo (Feasby y colaboradores, 1987; Vriesendorp y colaboradores, 1995). Otros grupos han sugerido que la inhibición de la cascada del complemento reduce el daño en la enfermedad neurodegenerativa del sistema nervioso central (CNS) (por ejemplo, Woodruff y colaboradores 2006; Leinhase y colaboradores, 2006).

Daily y colaboradores (1998) divulgan una reducción significativa en el reclutamiento de macrófagos en el nervio de degeneración distal en animales con el complemento reducido. La reducción del complemento también disminuyó la activación de macrófagos, como se indica por su fracaso en volverse mayor y con múltiples vacuolas y su capacidad reducida para eliminar la mielina. En situación normal, se elimina la mielina, la parte proximal del nervio forma brotes que crecen lentamente a lo largo de la trayectoria del nervio degenerado. Sin embargo, la regeneración es lenta (2-

- 2,5 mm / día) y el entorno de un nervio degenerado está lleno de factores que inhiben el crecimiento del axón y los factores de crecimiento necesarios puede ser limitados o incluso estar ausentes. La mielina misma ha sido propuesta como un factor inhibitorio importante. Por lo tanto, la rápida eliminación de la mielina se considera una condición esencial para la regeneración del axón. Por lo tanto, se espera que la eliminación lenta de la mielina en animales con complemento reducido de cómo resultado una regeneración débil del axón. Estos hallazgos indican un papel del complemento en suero, tanto en el reclutamiento como en la activación de macrófagos durante la degeneración de los nervios periféricos, así como un papel activo de los macrófagos en la promoción de la regeneración de axones.
- De hecho, la patente de los Estados Unidos No. 6.267.955 divulga los métodos por medio de los cuales se administran los fagocitos mononucleares en o cerca de un sitio de la lesión o enfermedad del sistema nervioso central o periférico de un mamífero con el fin de efectuar la eliminación de los restos de mielina que según se reporta, inhiben la regeneración de los axones, y para liberación de las citoquinas derivadas de macrófagos que promueven la modulación de astrocitos y oligodendrocitos con el fin de apoyar la regeneración de los axones.
- La degeneración de los axones es la principal causa de discapacidad tanto en neuropatías desmielinizantes heredadas como adquiridas. Aunque la mayor parte de la investigación terapéutica actual tiene por objeto la restauración de la mielinización, los presentes inventores se centran en la consecuencia de la desmielinización: degeneración secundaria de los axones. Como modelo, se han utilizado desmielinización aguda y la degeneración de los axones después de la lesión por aplastamiento y la posterior regeneración del nervio. Un objetivo de la presente invención es proporcionar medios y métodos que promueven y mejoren la regeneración de los nervios.
- Descripción de la invención
- La invención proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que bloquea un componente del complemento para uso el tratamiento de una enfermedad o lesión del SNP o del SNC facilitando la regeneración de los axones en un sujeto. Proporciona además el uso de acuerdo con la invención, en donde la condición que requiere la regeneración de los axones es una lesión física de un nervio periférico. En una realización, la condición que requiere la regeneración de los axones es un trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso periférico o central.
- Además se proporciona un uso de acuerdo con la invención, en donde el anticuerpo inhibe la formación del complejo de ataque de la membrana.
- La invención también proporciona un uso de acuerdo con la invención, en donde el inhibidor bloquea la activación de la ruta clásica de activación del complemento. También se proporciona un uso de acuerdo con la invención, en donde el inhibidor bloquea la activación tanto de la ruta clásica como la alternativa de activación del complemento.
- Además se proporciona un uso de acuerdo con la invención, en donde el inhibidor es un anticuerpo que bloquea uno o más de la convertasa C3, C5, C6, C7, C8, C9 y el montaje de CAM. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado.
- También se proporciona un uso de acuerdo con la invención, en donde el inhibidor se administra en o cerca del sitio de la lesión.
- En los ejemplos en el presente documento se ha observado la activación del sistema de complemento (C) en la rata durante la WD y en las biopsias de nervios humanos de neuropatías desmielinizantes crónicas. La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que la regeneración de los axones se mejora en ratas que son deficientes en el factor C6 del complemento. Este sorprendente hallazgo abre nuevas formas de promover la regeneración de los axones mediante la manipulación del sistema de complemento y/o activación de los macrófagos.
- En un primer aspecto, por lo tanto, la invención se refiere a un método para tratar una condición que requiere la regeneración de los axones. El método comprende la administración de un inhibidor de un sistema de complemento de mamífero, o la administración de un medicamento (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende al inhibidor. Preferiblemente, se administra una cantidad eficaz del inhibidor. Por lo tanto, en este aspecto, la invención se refiere a un inhibidor de un sistema de complemento de mamífero, o un medicamento que comprende al inhibidor, para uso en un método para tratar una condición que requiere la regeneración de los axones. Del mismo modo, en este aspecto, la invención se refiere al uso de un inhibidor de un sistema de complemento de mamífero para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una condición que requiere la regeneración de los axones.
- En el contexto de la presente invención "facilitar la regeneración de los axones" se distingue de la reducción o prevención de la degeneración de los axones. La facilitación (o promoción) de la regeneración de los axones en el presente documento se entiende que significa que la regeneración de un axón se mejora en los sujetos que son tratados en comparación con sujetos no tratados. La regeneración mejorada de un axón preferiblemente es la regeneración que se produce en un punto anterior en el tiempo (después de la lesión del axón o después del inicio

del tratamiento) en sujetos tratados en comparación con los sujetos no tratados. La regeneración mejorada de un axón puede comprender también la regeneración que se produce a una velocidad mayor y/o en mayor medida en un sujeto tratado en comparación con sujetos no tratados. Un medicamento de acuerdo con la invención produce por lo tanto preferiblemente una ganancia de función sensorial o motora.

5 La mejora de la regeneración de los axones se determina preferiblemente mediante pruebas funcionales que se llevan a cabo con relativa facilidad en sujetos humanos, por ejemplo, la recuperación de la función sensorial o motora se determina preferiblemente en una prueba estandarizada como la que se encuentra disponible en el estado del arte (véase, por ejemplo, Wong y colaboradores, 2006; Jerosch-Herold, 2005). Las pruebas adecuadas
10 preferiblemente son cuantitativas y estandarizadas y más preferiblemente, han tenido sus propiedades psicométricas evaluadas y cuantificadas. Tales pruebas incluyen, por ejemplo, la prueba sensorial mejorada de Weinstein (WEST) o la prueba del monofilamento de Semmes-Weinstein (SWMT) y la prueba de identificación de la forma de la textura (STI) para la gnosis táctil. La regeneración mejorada de los axones puede ser determinada experimentalmente en animales de laboratorio mediante pruebas funcionales para la recuperación de la función sensorial o motora según lo descrito por Hare y colaboradores (1992) y De Koning y colaboradores (1986). Un medicamento de acuerdo con la
15 invención produce por lo tanto preferiblemente una ganancia de función sensorial o motora, como se puede determinar, por ejemplo, en una prueba indicada anteriormente.

20 Se puede determinar también experimentalmente una regeneración mejora de los axones en animales de prueba mediante examen histológico. Por ejemplo, se puede determinar la remielinización mejorada mediante la comparación de las mediciones de las envolturas de mielina alrededor de los axones en los animales tratados versus los animales no tratados, mediante la cual, una envoltura de mielina más gruesa es indicativa de una remielinización mejorada. La regeneración más eficiente de los axones se puede determinar como la producción de brotes de axones individuales, de gran diámetro, en animales tratados en comparación con los grupos de axones
25 más pequeños en animales no tratados.

La dosis apropiada del inhibidor es aquella cantidad efectiva para promover la regeneración de los axones, como puede observarse por la mejora de la función sensorial o motora, como se describió anteriormente. Por "cantidad efectiva", "cantidad terapéutica", o "dosis efectiva" se entiende aquella cantidad suficiente para provocar los efectos farmacológicos o terapéuticos deseados, que dan como resultado un tratamiento efectivo de la lesión o el trastorno.

30 Con el fin de minimizar la lesión del nervio y/o facilitar la regeneración de los axones tan pronto como sea posible, en los métodos de la invención, el medicamento se administra preferiblemente poco después de la aparición de la lesión del nervio, es decir, en el lapso de 24, 12, 6, 3, 2, o 1 hora, más preferiblemente en el lapso de 45, 30, 20 o 10 minutos después de la ocurrencia de la lesión en los nervios. En una realización de la invención, el medicamento se puede administrar (por ejemplo, como medida de precaución) antes de la cirugía con un riesgo de lesión del nervio (véase más abajo), a fin de minimizar la lesión del nervio y/o para facilitar la regeneración de los axones
35 inmediatamente después de la lesión quirúrgica del nervio.

40 Condiciones que requieren la regeneración de los axones

Una variedad de condiciones que requieren la regeneración de los axones pueden ser tratadas con los métodos y/o los medicamentos de la invención. Las condiciones incluyen lesiones del SNP, así como lesiones del SNC. Las condiciones incluyen trauma del nervio como resultado de lesiones físicas, así como el resultado de una enfermedad. Tales enfermedades incluyen trastornos o lesiones inflamatorias mediadas por el sistema inmunológico
45 y/o trastornos neurodegenerativos progresivos que pueden ser adquiridos y/o heredados.

Las lesiones físicas del SNP y del SNC pueden ser lesiones traumáticas, incluyendo lesiones quirúrgicas o lesiones no traumáticas. Las lesiones traumáticas del SNP y del SNC que pueden ser tratadas con los métodos y/o los medicamentos de la invención incluyen las lesiones de la médula espinal, así como heridas traumáticas de nervios periféricos, incluyendo lesiones por colisiones, accidentes automovilísticos, heridas de bala, fracturas, luxaciones, laceraciones, o algunas otras a partir de traumas penetrantes. Los nervios periféricos lesionados por un trauma que se pueden tratar incluyen a los nervios digital, mediano, cubital, radial, facial, accesorio espinal y del plexo braquial.

50 Las lesiones quirúrgicas del SNP en el presente documento se entienden como las lesiones a los nervios periféricos que surgen cuando se vuelve clínicamente necesarias para remover o diseccionar un nervio durante un procedimiento quirúrgico. Esto ocurre en miles de procedimientos quirúrgicos cada año. Un ejemplo de los nervios periféricos lesionados quirúrgicamente que se pueden tratar con los métodos y/o medicamentos de la invención incluyen, por ejemplo los nervios cavernosos que ayudan a la función eréctil y el control de la vejiga; estos nervios
55 son a menudo dañados durante la extirpación quirúrgica de un tumor de la próstata y el tejido circundante. Otro ejemplo de un nervio periférico lesionado quirúrgicamente que puede ser tratado de acuerdo con la invención es el nervio frénico después de una cirugía de revascularización coronaria (CABG).

60 Lesiones físicas no traumáticas del SNP que se pueden tratar con los métodos y/o los medicamentos de la invención incluyen la compresión y/o adhesión de los nervios periféricos, también conocidos como síndromes de atrapamiento. El síndrome de atrapamiento más frecuente es el síndrome del túnel carpiano.

Además, se pueden tratar los trastornos o lesiones inflamatorias mediadas por el sistema inmunológico con los métodos y/o los medicamentos de la invención. Estos incluyen enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico que se cree que tienen una base autoinmune y dar lugar a la desmielinización del nervio como resultado del daño causado a los oligodendrocitos o directamente a la mielina. Tales enfermedades desmielinizantes incluyen, por ejemplo, el síndrome de Guillain-Barré (SGB, también conocido como polineuropatía desmielinizante inflamatoria, polirradiculoneuritis idiopática aguda, polineuritis idiopática aguda, polio francesa y parálisis ascendente de Landry). Preferiblemente, los métodos y/o los medicamentos de la invención se aplican para promover la regeneración de los axones después de la fase aguda en el SGB. Del mismo modo, la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC), considerada la contraparte crónica del SGB, se puede tratar con los métodos y/o los medicamentos de la invención.

La esclerosis múltiple (EM) es otra enfermedad desmielinizante que puede ser tratada con los métodos y/o los medicamentos de la invención.

Otros trastornos neurodegenerativos del SNC y/o del SNP con un componente genético que pueden ser tratados con los métodos y/o los medicamentos de la invención incluyen la esclerosis lateral amiotrófica (ELA, a veces llamada enfermedad de Lou Gehrig), la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (neuropatía motora y sensorial hereditaria, NMSH) y la enfermedad de Huntington (EH).

El sistema de complemento

El sistema de complemento (véase McAleer y Sim, 1993; Reid y Law, 1988) se relaciona con la defensa del huésped contra una infección. Tras la activación del sistema, ocurre un conjunto catalítico de reacciones y de interacciones destinadas a la activación de la célula, organismo o partícula para su destrucción. El sistema de complemento se compone de un conjunto de más de 30 proteínas plasmáticas y de membrana que actúan en forma conjunta en un sistema regulado de cascada para atacar formas extracelulares de patógenos (por ejemplo, una bacteria). El sistema de complemento incluye dos cascadas distintas activación enzimática, las rutas clásica y alternativa que convergen en una ruta no enzimática terminal común, conocida como la ruta de ataque de la membrana.

La primera cascada enzimáticamente activada, conocida como la ruta clásica, comprende varios componentes, C1, C4, C2, C3 y C5 (enumerados por orden en la ruta). La iniciación de la ruta clásica del sistema de complemento se produce después del enlazamiento y activación del primer componente del complemento (C1) tanto por el activador inmune como por el no inmune. C1 comprende un complejo que depende del calcio de los componentes C1q, C1r y C1s, y se activa mediante el enlazamiento del componente C1q. C1q contiene seis subunidades idénticas y cada subunidad comprende tres cadenas (las cadenas A, B y C). Cada cadena tiene una región de cabeza globular que está conectada a una cola de tipo colágeno. El enlazamiento y la activación de C1q por complejos antígeno-anticuerpo se produce a través de la región del grupo de cabeza de C1q. Numerosos activadores de C1q que no son anticuerpos, incluyendo proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, se unen y activan C1q a través de un sitio distinto en la región del tallo de tipo colágeno. Los complejos de C1qs catalizan entonces la activación de los componentes del complemento C4 y C2, formando el complejo C4b2a que actúa como una convertasa C3.

La segunda cascada enzimáticamente activada, conocida como la ruta alternativa, es una ruta rápida, independiente del anticuerpo para la activación y amplificación del sistema de complemento. La ruta alternativa comprende varios componentes, C3, el Factor B, y el Factor D (enumerados por orden en la ruta). La activación de la ruta alternativa se produce cuando C3b, una forma proteolíticamente escindida de C3, se enlaza a un agente de superficie de activación tal como una bacteria. El Factor B se enlaza luego a C3b, y es escindido por el Factor D para producir la enzima activa, Ba. La enzima Ba escinde luego más C3 para generar más C3b, produciendo una extensa deposición de complejos C3b-Ba en la superficie de activación.

De este modo, tanto las rutas clásica como alterna del complemento producen convertasas C3 que dividen el factor C3 en C3a y C3b. En este punto, ambas convertasas C3 se ensamblan además en convertasas C5 (C4b2a3b y C3b3bBb). Estos complejos escinden posteriormente al componente C5 del complemento en dos componentes: el polipéptido C5a (9 kDa) y el polipéptido C5b (170 kDa). El polipéptido C5a se une a un receptor transmembrana 7 acoplado a proteína G, que se asoció originalmente con leucocitos y ahora se sabe que se expresa en una variedad de tejidos, incluyendo hepatocitos y neuronas. La molécula C5a es el componente quimiotáctico primario del sistema de complemento humano y puede desencadenar una variedad de respuestas biológicas, incluyendo quimiotaxis de leucocitos, contracción del músculo liso, activación de rutas de transducción de señales intracelulares, adhesión endotelial de neutrófilos, liberación del mediador de citoquinas y de lípidos y la formación de oxidante.

El fragmento C5b más grande se une secuencialmente a los componentes posteriores de la cascada del complemento, C6, C7, C8 y C9 para formar el complejo de ataque de la membrana C5b-9 ("CAM"). El CAM lipofílico C5b-9 puede lisar directamente los eritrocitos, y en mayores cantidades es lítico para los leucocitos y perjudicial para tejidos tales como células musculares, epiteliales y endoteliales. En cantidades inferiores a las líticas, el CAM C5b-9 puede estimular la sobrerregulación positiva de moléculas de adhesión, el aumento de calcio intracelular y la liberación de citoquina. Además, en concentraciones por debajo de las líticas, el CAM C5b-9 puede estimular células

tales como las células endoteliales y las plaquetas sin causar lisis celular. Los efectos no líticos de C5a y del CAM C5b-9 son comparables e intercambiables.

5 Aunque el sistema de complemento tiene un papel importante en el mantenimiento de la salud, tiene el potencial de causar o contribuir a la enfermedad.

Inhibidores del sistema de complemento

10 Un inhibidor de un sistema de complemento de mamífero para uso en los métodos y/o medicamentos de la presente divulgación puede ser un antagonista, polipéptido, péptido, anticuerpo, oligonucleótido antisentido, aptámero, ARNm, ribozima, ARNpi, o molécula pequeña. El inhibidor preferiblemente inhibe o bloquea la formación del complejo de ataque de la membrana. El inhibidor preferiblemente bloquea la activación del sistema de complemento a través tanto de la ruta clásica como la alternativa del complemento. Un inhibidor preferido es un inhibidor que bloquea la convertasa C3 y montaje del CAM. Un inhibidor más preferido es un inhibidor que bloquea uno o más de C5, C6, C7, C8 y C9. Los siguientes compuestos pueden por lo tanto ser utilizados en los métodos y/o medicamentos de la invención.

20 Un inhibidor preferido del complemento para uso en la presente divulgación es un regulador del complemento, receptor del complemento o sus derivados. Estos incluyen todos los reguladores naturales del sistema de complemento, tales como el inhibidor de C1, CR1, DAF, MCP y CD59. Se incluyen además derivados de los reguladores naturales del sistema de complemento que contiene unidades estructurales comunes (UEC). CR1, MCP, DAF, C4bp, fH, todos contienen repeticiones de consenso cortas (RCC). La RCC es un motivo estructural de 60-70 aminoácidos que se repite en tándem 30 veces en el alotipo F de CR1; el número de repeticiones puede variar entre alotipos. La secuencia de consenso de la RCC incluye 4 cisteínas, una glicina y un triptófano que son invariables entre todas las RCC. Otras dieciséis posiciones se conservan, con el mismo aminoácido o se encuentra un reemplazo conservador en más de la mitad de las 30 RCC (Klickstein, y colaboradores, 1987, 1988; Hourcade, y colaboradores, 1988). Preferiblemente, el regulador del complemento que contiene las RCC, comprende al menos 3, 6, 12, 25 o 30 RCC. Preferiblemente, el regulador del complemento que contiene RCC es un derivado soluble de un receptor del complemento. Los ejemplos adecuados de los mismos incluyen, por ejemplo, sCR1 (TP10), que contiene 30 RCC, sMCP, sDAF, y CAB-2, que es un híbrido de DAF/MCP. Las modificaciones de estas moléculas permiten direccionarlas a las membranas.

35 CR1 soluble es un inhibidor preferido de la activación del complemento ya que solo CR1 combina la especificidad tanto para C3b como para C4b con capacidades para disociar las convertasas C3 de ambas rutas y para la actividad del cofactor en la inactivación proteolítica de C3b y C4b por el factor I. Además, estas funciones de CR1 no están restringidas por funciones de activación de la ruta alternativa, haciendo que el receptor sea adecuado para la supresión de la activación mediante estímulos no inmunológicos y la inhibición de la activación del complemento tanto en la ruta clásica como la alternativa. Los fragmentos CR1 solubles (sCR1) han sido preparados por técnicas de ADN recombinante, utilizando ADNc que carece de dominios transmembrana y citoplasmáticos (WO 89/09220; WO 91/05047). Las moléculas preferidas de sCR1 para uso en los métodos y/o medicamentos de la invención son 1) una proteína CR1 soluble que tiene las características de la proteína expresada por una célula de ovario de hámster chino DUX B11 que porta al plásmido pBSCR1/pTCSgpt como la depositada en la ATCC y que se le asignó el número de acceso CRL 10052; o 2) el receptor 1 soluble del complemento TP10 (Avant Immunotherapeutics, Inc.).

45 Un regulador adicional del complemento para uso en los métodos y/o medicamentos de la divulgación es inhibidor de C1 (C1INH). C1INH es un miembro de la familia de inhibidores de la serina proteasa (serpinas) y se une al sitio activo tanto en C1r como en C1s inhibiendo la formación del complejo C1. Una ventaja de C1INH derivado de plasma es su larga vida media en suero (70 horas) en humanos. Alternativamente se puede utilizar C1INH humano transgénico (WO 01/57079).

50 Incluso otro receptor del complemento unido a la membrana para uso en los métodos y/o medicamentos de la divulgación es Crry-Ig (Quigg y colaboradores, 1998). Crry es un inhibidor del complemento de la membrana con actividad de aceleración del decaimiento al nivel 3 de la convertasa, que inhibe tanto la ruta clásica como la alternativa del complemento. También posee actividad de cofactor comparable a la de CR1 para la escisión mediada por el factor I de C3b y C4b. Crry-Ig es una proteína soluble recombinante con mayor vida media (40 horas) debido a la fusión de Crry con la porción Fc de un compañero de IgG1 de ratón que no activa al complemento. En general, Crry-Ig es un potente inhibidor del complemento.

60 Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contra componentes del complemento son la clase de compuestos que se usan en los métodos y/o medicamentos de la invención. En principio, los anticuerpos contra cualquier factor del complemento pueden ser de utilidad. Sin embargo, los anticuerpos preferidos son anticuerpos que bloquean la convertasa C3 y/o el montaje del CAM. Un anticuerpo preferido adicional es un anticuerpo que bloquea uno o más de C5, C6, C7, C8 y C9. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo monoclonal (MAb). Los MAb para los componentes del complemento se pueden preparar usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo el uso de técnicas de hibridoma, recombinantes, y de despliegue en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando técnicas de

hibridoma incluyendo aquellas conocidas en la técnica y las enseñadas (es decir, Harlow y colaboradores, 1998; Hammerling, y colaboradores, 1981).

5 Para el tratamiento de humanos, se usarían preferiblemente los MAb anti-complemento como anticuerpos quiméricos, desimmunizados, humanizados o humanos. Tales anticuerpos pueden reducir la inmunogenicidad y por lo tanto evitar la repuesta del anticuerpo humano antirratón (AHAR). Es preferible que el anticuerpo sea IgG4, IgG2, u otro IgG o IgM genéticamente mutado que no aumente la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (Canfield y Morrison, 1991) y la citólisis mediada por el complemento (Xu y colaboradores, 1994; Pulito y colaboradores, 1996). Los anticuerpos quiméricos son producidos por procesos recombinantes bien conocidos en la técnica, y 10 tienen una región variable animal y una región constante humana. Los anticuerpos humanizados tienen un mayor grado de secuencias peptídicas humanas que los anticuerpos quiméricos. En un anticuerpo humanizado, sólo las regiones determinantes de complementariedad (RDC) que son responsables del enlazamiento y especificidad del antígeno se derivan de animales y tienen una secuencia de aminoácidos que corresponde al anticuerpo del animal, y sustancialmente todas las porciones restantes de la molécula (excepto, en algunos casos, pequeñas porciones de las regiones marco dentro de la región variable) se derivan de humanos y corresponden en secuencia de aminoácidos a un anticuerpo humano. Véase Riechmann y colaboradores, 1988; Winter, patente de los Estados Unidos No. 5.225.539; Queen y colaboradores, patente de los Estados Unidos No. 5.530.101. Anticuerpos desimmunizados son anticuerpos en los que se han eliminado los epítomos de células T y B, como se describe en el documento WO9852976. Ellos tienen inmunogenicidad reducida cuando se aplican in vivo.

20 Los anticuerpos humanos pueden elaborarse de varias maneras diferentes, incluyendo mediante el uso de bibliotecas de expresión de inmunoglobulina humana (Stratagene Corp., La Jolla, California) para producir fragmentos de anticuerpos humanos (VH, VL, Fv, Fd, Fab, o (Fab)₂, y el uso de estos fragmentos para construir anticuerpos humanos completos utilizando técnicas similares a aquellas para producir anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos humanos pueden ser producidos también en ratones transgénicos con un genoma de inmunoglobulina humana. Tales ratones están disponibles a través de Abgenix, Inc., Fremont, California, y Medarex, Inc., Annandale, Nueva Jersey.

25 También se puede crear moléculas de unión de una sola cadena peptídica en las que se conectan las regiones Fv de cadena pesada y ligera. Anticuerpos de cadena sencilla ("ScFv") y el método de su construcción se describen en la patente de los Estados Unidos No. 4.946.778. Alternativamente, se pueden construir Fab y expresarse por medios similares (Evans y colaboradores, 1995).

30 Otra clase de anticuerpos que se pueden utilizar en el contexto de la presente invención son anticuerpos de cadena pesada y derivados de los mismos. Tal anticuerpos monocatenarios de cadena pesada se producen naturalmente, por ejemplo en camélidos y sus dominios variables aislados se denominan generalmente como "dominios VHH" o "nanocuerpos^{MR}". Los métodos para obtener anticuerpos de cadena pesada y los dominios variables se proporcionan, entre otros, en las siguientes referencias: WO 94/04678, WO 95/04079, WO 96/34103, WO 94/25591, WO 99/37681, WO 00/40968, WO 00/43507, WO 00/65057, WO 01/40310, WO 01/44301, EP 1134231, WO 40 02/48193, WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016, WO 03 / 055 527, WO 03/050531, WO 01/90190, WO 03/025020, WO 04/041867, WO 04/041862, WO04 / 041865, WO 04/041863, WO 04/062551.

45 Todos los anticuerpos total y parcialmente humanos son menos inmunogénicos que los MAb totalmente murinos, y los fragmentos y anticuerpos de cadena sencilla son también menos inmunogénicos. Por lo tanto, es menos probable que todos estos tipos de anticuerpos evoquen una respuesta inmune o alérgica. En consecuencia, son más adecuados para administración in vivo en humanos que los anticuerpos totalmente animales, especialmente cuando es necesaria una administración repetida o a largo plazo. Además, el tamaño más pequeño del fragmento de anticuerpo puede ayudar a mejorar la biodisponibilidad en el tejido, lo que puede ser crítico para una mejor acumulación de la dosis en indicaciones de enfermedad aguda, tales como el tratamiento de tumores.

50 Los anticuerpos anti-complemento adecuados ya se encuentran disponibles. Por ejemplo, el MAb anti-C5 producido por el hibridoma 5G1.1 que tiene la designación ATCC HB-11625 (N19-8) como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 6.355.245; MAb anti-C3a de Quidel, San Diego, California [catálogo No. A203]; anticuerpos C3aR anti-humanos hC3aRZ1 y hC3aRz2, como se describe en Kacani y colaboradores, (2001); anticuerpos C5a de ratón anti-humanos de HyCult Biotechnology BV de los Países Bajos [clones 557, 2942 y 2952]; el anticuerpo C5a anti-humano de Tanox, Inc. [137-26], como se describe en Fung y colaboradores (2003); anticuerpos C5a divulgados en la patente de los Estados Unidos No. 5.480.974; MAb C5aR humano anti-EX1 S5/1, como se describe en Oppermann y colaboradores, (1993); MAb anti-C5aR S5/1, como se describe en Kacani y colaboradores, (2001); y MAb anti-C5a como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5.177.190.

60 Otro compuesto que puede ser utilizado en los métodos y/o medicamentos de la divulgación es el factor de veneno de cobra (FVC) o un derivado del mismo que agota C3 mediante la unión del Factor B y la formación de una actividad de convertasa C3 que es resistente a los reguladores naturales en fase fluida. Un derivado preferido del FVC es, por ejemplo, un derivado que puede ser dirigido al sitio de la lesión.

65 Otros compuestos útiles incluyen inhibidores polianiónicos del complemento tales como heparina, heparina N-

acetilada y suramina. La heparina inhibe C mediante la unión a C1, el bloqueo de la convertasa C3 y el montaje del CAM. La heparina N-acetilada tiene una actividad anticoagulante reducida.

5 Además se pueden utilizar una variedad de moléculas pequeñas sintéticas y/o naturales que inhiben el complemento en los métodos y/o medicamentos de la divulgación, por ejemplo, los inhibidores naturales K-76COOH (derivados de *Stachybotrys complementi*), que inhiben C5, y ácido rosmarínico derivado de romero, que se une e inhibe C3b y por lo tanto evita la formación de convertasa, inhibidores sintéticos de la proteasa tales como, por ejemplo, mesilato de nafamostat (FUT-175), que se une a C1r, C1s, al Factor D y la convertasa C3/C5, inhibidores del complejo C1, tales como, por ejemplo, C1s-INH-248 y BCX-1470 (ya probado en seres humanos por seguridad), inhibidores peptídicos, 10 tales como moléculas que contienen partes de o derivadas de moléculas naturales que se enlazan al complemento, tales como, por ejemplo, derivados que contienen la parte del terminal carboxilo de las serpinas, compstatina (una molécula cíclica de 13 a. a. que se une a C3), y los agonistas del receptor C5, PMX53 y PMX205.

15 Los métodos para producir inhibidores de ácido nucleico del complemento tales como oligonucleótidos antisentido, aptámeros, ARNm, ribozima, ARNpi, son ya conocidos por una persona normalmente capacitada en la materia. Preferiblemente dichos inhibidores de ácido nucleico comprenden uno o más nucleótidos modificados, tales como, por ejemplo, ribonucleótidos sustituidos en 2'-O, incluyendo sustituciones de alquilo y metoxi etilo, ácido nucleico peptídico (ANP), ácido nucleico bloqueado (ANB) y oligonucleótidos antisentido de morfolino y nucleótidos con puentes de etileno (ENA) y combinaciones de los mismos.

20 En los métodos anteriores de la invención, los compuestos se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección en bolo. Se conocen varios sistemas de administración y se pueden utilizar para la administración de los compuestos inhibidores. Estos incluyen la encapsulación en liposomas, micropartículas, o microcápsulas. Aunque en los métodos de la invención no se excluye la administración de los compuestos por vía oral y/o de las mucosas (intranasal, inhalación, rectal), por lo general los inhibidores del complemento se administran por vía parenteral, incluyendo, por ejemplo intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea. Los compuestos se pueden administrar sistémicamente o pueden ser utilizados para administración local, tópica o regional en o cerca al sitio de la enfermedad o lesión, por ejemplo, usando una inyección y/o cualquier técnica quirúrgica neuronal adecuada.

25 La invención se refiere además a una preparación farmacéutica que comprende como ingrediente activo un inhibidor del complemento como se definió anteriormente. La composición comprende preferiblemente al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable además del ingrediente activo. El vehículo farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible, no tóxica, adecuada para suministrar los inhibidores al paciente. Agua estéril, alcohol, grasas, ceras y sólidos inertes se puede utilizar como vehículo. También se pueden incorporar adyuvantes farmacéuticamente aceptables, agentes reguladores, agentes dispersantes, y similares, en las composiciones farmacéuticas.

30 Para administración oral, el inhibidor se puede administrar en formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas, tabletas y polvos, o en formas de dosificación líquidas, tales como elixires, jarabes, y suspensiones. El(los) componente(s) activo(s) se puede(n) encapsular en cápsulas de gelatina junto con los ingredientes inactivos y los vehículos en polvo, tales como glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa o derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina sódica, talco, carbonato de magnesio y similares. Tanto las tabletas como las cápsulas pueden fabricarse como productos de liberación continuada para proporcionar una liberación continua del medicamento durante un período de varias horas. Las tabletas comprimidas pueden estar 35 recubiertas de azúcar o recubiertas de una película para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger la tableta de la atmósfera, o con una cubierta entérica para desintegración selectiva en el tracto gastrointestinal. Las formas de dosificación líquidas para administración oral pueden contener colorantes y saborizantes para aumentar la aceptación por parte del paciente.

40 Los inhibidores, sin embargo, se administran preferiblemente en forma parenteral. Los vehículos adecuados para formulaciones parenterales incluyen solución salina, solución salina regulada, dextrosa, y agua. Típicamente, las composiciones para administración parenteral son soluciones en un regulador acuoso isotónico estéril. La esterilización se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril, antes o después de la liofilización y la reconstitución. Una composición típica para infusión intravenosa puede elaborarse para 45 contener 10 a 50 ml de NaCl estéril al 0,9% o glucosa estéril al 5% opcionalmente complementada con un solución de albúmina al 20% y una cantidad apropiada (1 a 1000 µg) del inhibidor. Una composición farmacéutica típica para inyección intramuscular se elaboraría para contener para contener, por ejemplo, 1 - 10 ml de agua regulada estéril y de 1 a 1000 µg del inhibidor. Los métodos para preparar composiciones que pueden ser administradas en forma parenteral son bien conocidos en la técnica y se describen con más detalle en varias fuentes, incluyendo, por 50 ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15a ed., Mack Publishing, Easton, PA, 1980) (incorporado por referencia en su totalidad para todos los propósitos). Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran bien sea por separado o mezclados juntos en una forma de dosificación unitaria, contenida en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o una bolsita que 55 indique la cantidad de agente activo en unidades de actividad. Cuando la composición se va a administrar por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene 'Agua para Inyección' estéril de grado

farmacéutico o una solución salina. Cuando la composición se va a administrar por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes se pueden mezclar antes de la administración.

5 En aquellos métodos en los que el inhibidor es un polipéptido o anticuerpo, puede purificarse a partir de cultivos de células microbianas, de mamíferos, o de insectos, a partir de leche de mamíferos transgénicos u otra fuente y ser administrado en forma purificada junto con un vehículo farmacéutico tal como una composición farmacéutica. Los métodos para producir composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos se describen en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.789.543 y 6.207.718. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y de la aplicación terapéutica. La concentración de los polipéptidos o anticuerpos de la invención en la composición farmacéutica puede variar ampliamente, es decir, desde menos de aproximadamente 0,1% en peso, siendo habitualmente al menos aproximadamente 1% en peso hasta tanto como 20% en peso o más.

15 En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se utiliza en su sentido no limitante para significar que los ítems que van a continuación de la palabra están incluidos, pero los ítems que no se mencionan específicamente no están excluidos. Además, la referencia a un elemento mediante el artículo indefinido "un, uno, una" no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y sólo uno de los elementos. El artículo indefinido "un, uno, una" por lo tanto usualmente significa "al menos uno".

20 Descripción de las figuras

Figura 1. El efecto de la deficiencia de C6 en el complemento sobre la regeneración del nervio tibial. El nervio ciático derecho fue aplastado durante 30 segundos en ratas PVG deficientes en C6 y de tipo silvestre. Se analizó el nervio tibial 1 y 5 semanas después de la lesión. Foto de control: nervio tibial izquierdo de una rata PVG.

Figura 2. La deficiencia de C6 conduce a una afluencia/activación retardada de las células fagocíticas. Se contaron las células inmunorreactivas (-ir) ED1 (CD68) en las secciones no consecutivos de los nervios ciáticos de ratas TS (tipo silvestre), C6^{-/-} (deficientes en C6) y C6⁺ (ratas deficientes en C6 complementadas con C6) a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la lesión. La significancia estadística indicada por el asterisco (*) se refiere a $p < 0,05$.

Figura 3. El efecto de la reconstitución de C6 sobre la regeneración. Análisis de los axones mielinizados durante la regeneración. Análisis mediante microscopio de luz en las secciones semi-delgadas del sitio proximal del nervio tibial de ratas a las 5 semanas después de la lesión. De izquierda a derecha: los nervios no aplastados; nervios de tipo silvestre (WT); nervios deficientes en C6 (C6^{-/-}); y, nervios deficientes en C6 reconstituidos con C6 (C6⁺).

Figura 4. El efecto de la reconstitución de C6 sobre la recuperación funcional. La recuperación de la función sensorial, tal como se mide con el aparato para medir la contracción brusca de la pata con corrientes que van desde 0,1 mA a 0,5 mA. Los valores se normalizan a los niveles de control. La flecha (→) indica el momento en que se realizó la lesión por aplastamiento. TS = ratas de tipo silvestre; C6^{-/-} = ratas deficientes en C6; y, C6⁺ = reconstitución de C6 en animales deficientes en C6. La significancia estadística entre C6^{-/-} y TS (*) o C6⁺ (†) es para $p < 0,05$.

Figura 5. El inhibidor de C1 humana recombinante (rhC1INH) inhibe la activación del complemento después del aplastamiento. Inmuncoloración con C1q, C4c y C3c de nervios ciáticos de ratas tipo silvestre tratados con rhC1INH o vehículo (PBS) solamente.

Figura 6. El efecto de CR1 soluble sobre la regeneración postraumática de los nervios. La recuperación de la función sensorial tal como se mide con el aparato para medir la contracción brusca de la pata con corrientes que van desde 0,1 mA a 0,5 mA. Los valores se normalizan a los niveles de control. La flecha (→) indica el momento en que se realizó la lesión por aplastamiento. PBS = Control con vehículo únicamente; sCR1 = CR1 soluble.

Figura 7. La activación de los macrófagos después del aplastamiento del nervio depende de la activación de un componente más adelante de la cascada del complemento. Se determinaron las células positivas para CD68 mediante inmuncoloración con el anticuerpo ED1. En animales tratados con vehículo (PBS) y de tipo silvestre (TS), el número de células positivas para CD68 en la parte distal del nervio ciático lesionado aumentó 72 horas después del aplastamiento del nervio. El tratamiento con sCR1 bloqueó esta activación a un nivel similar como se observa en ratas deficientes en C6 (C6^{-/-}). La reconstitución de C6 en los animales con deficiencia de C6 (C6⁺) dio como resultado la recuperación casi completa de este bloque en activación.

Figura 8. Recuperación de la función. (a) Índice Funcional del Nervio Ciático (IFNC) y huellas después de la lesión por aplastamiento del nervio ciático (tiempo = 0) en ratas de tipo silvestre (n = 8), C6^{-/-} (n = 8) y C6⁺ (n = 8) que muestran la recuperación de la función motora durante un periodo de 5 semanas después de la lesión. Los niveles de control son cercanos a 0, mientras que valores cercanos a -140 indican la pérdida completa de la función (semana 1). Los asteriscos (*) se refieren a diferencias significativas entre el grupo de ratas de tipo silvestre y C6^{-/-}, mientras que la cruz (†) se refiere a las diferencias significativas entre el grupo de ratas C6^{-/-} y C6⁺ con $p \leq 0,05$

determinadas mediante un análisis ANOVA bidireccional con corrección de Bonferroni. Cuanto más esparcida la punta en la huella de C6^{-/-} (semana 4) en comparación con las huellas de C6⁺ y de tipo silvestre, indica una mayor fuerza muscular. (b) Análisis de contracción brusca de la pata después de lesión por aplastamiento del nervio ciático (tiempo = 0) en ratas de tipo silvestre (n = 8), C6^{-/-} (n = 8) y C6⁺ (n = 8) que muestra la recuperación de la función sensorial en un periodo de 5 semanas después de la lesión. Los valores se expresan como porcentaje de los niveles de control (función al 100%). Los asteriscos (*) se refieren a diferencias significativas entre el grupo de ratas de tipo silvestre y C6^{-/-}, mientras que la cruz (†) se refiere a las diferencias significativas entre el grupo de ratas C6^{-/-} y C6⁺ con p ≤ 0,05 determinadas mediante un análisis ANOVA bidireccional con corrección de Bonferroni.

5
10
15
Figura 9. Recuperación de la función sensorial de ratas inhibidas por C. El análisis de contracción brusca de las patas después de una lesión por aplastamiento del nervio ciático (tiempo = 0) en ratas de tipo silvestre tratada con PBS (n = 6) y con sCR1 (n = 6) que muestran la recuperación de la función sensorial en un periodo de 5 semanas después de la lesión. Los valores se expresan como porcentaje de los niveles de control (función al 100%). Los asteriscos (*) se refieren a p ≤ 0.05 determinado mediante un análisis ANOVA bidireccional con corrección de Bonferroni.

20
Figura 10. Patología. Coloración con tiónina y microscopía electrónica de secciones transversales de los extremos distales de los nervios tibiales de ratas sin lesiones (n = 6), de tipo silvestre (n = 5), C6^{-/-} (n = 5) y tratadas con sCR1 (n = 6) a las 5 semanas después de la lesión por aplastamiento. Obsérvese la presencia de grupos de regeneración de pequeño calibre, axones finamente mielinizados en el nervio de tipo silvestre (flechas →), mientras que axones individuales de gran calibre están presentes en los nervios tratados con C6^{-/-} y los nervios tratados con sCR1, de manera similar al control no lesionado. La barra es de 50 μm (microscopía de luz, paneles de la izquierda) y 10 μm (microscopía electrónica, paneles de la derecha).

25
30
Figura 11a y 11b. Inhibición de sCR1 de activación del complemento (A) los niveles de sCR1 en plasma en ratas tratadas con sCR1, que muestran concentración de sCR1 en el tiempo con el tratamiento diario. (B) la actividad hemolítica en plasma de ratas tratadas con PBS y con sCR1, que muestra disminución de la actividad en las ratas tratadas con sCR1 en comparación con los controles tratados con PBS. (A, B) Día 0 es el día de la lesión por aplastamiento. Las ratas recibieron inyecciones i.p. de sCR1 (15 mg/kg/día) o PBS (igual volumen) los días (-1, 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6). Se recogió sangre inmediatamente antes de cada tratamiento. Los datos representan la media ± DE. La significancia estadística está determinada por ANOVA bidireccional con la corrección de Bonferroni (* es p ≤ 0,001).

35
Figura 12. Inhibición de sCR1 de activación del complemento. La cuantificación de la inmunorreactividad del CAM expresada como el porcentaje determinado de la superficie total. Los datos representan la media ± DE. La significancia estadística está determinada por ANOVA bidireccional con la corrección de Bonferroni (* es p ≤ 0,001).

40
Figura 13. Análisis de los macrófagos. Cuantificación de las células CD68-ir en secciones no consecutivas de los nervios ciáticos, que muestra un alto número de células en los nervios tratados con PBS y un ligero aumento en los nervios tratados con sCR1, en comparación con el nervio no lesionado. Los datos representan la media ± DE. La significancia estadística está determinada por ANOVA bidireccional con la corrección de Bonferroni.

45
Figura 14. Análisis de los macrófagos. Distribución por tamaño de los nervios ciáticos con células CD68-ir de un nervio no lesionado (a), nervios tratados con PBS (b) y tratados con sCR1 (c) nervios 3 días después de la lesión. Nótese el desplazamiento en el pico de distribución de tamaño de células CD68-ir de un tamaño de 0-40 μm² en nervios no lesionados y tratados con sCR1 hasta un tamaño de 40-120 μm² en los nervios tratados con PBS.

50
Figura 15. Análisis de activación de la ruta alternativa. (a) Análisis de la transferencia tipo Western de nervios ciáticos de ratas 2 días después de la lesión, mostrando una mayor cantidad de proteína fBb escindida en los nervios lesionados en comparación con los controles no lesionados. (b) Cuantificación relativa de bandas inmunorreactivas de fBb. La inmunorreactividad de fBb en los controles no lesionados se define como 1,0 veces la expresión relativa. Los valores se normalizan a la carga total de proteínas y representan la media ± DE de tres transferencias. La significancia estadística se determinó mediante la prueba t no pareada.

55 Ejemplos

1. Ejemplo 1: Recuperación postraumática mejorada del nervio en ratas deficientes en el componente C6 del complemento en comparación con ratas de tipo silvestre

60 1.1 Análisis por microscopía electrónica

Se han explorado el papel del sistema de complemento en una lesión aguda y crónica del nervio y durante la regeneración. Como modelo se utilizó la cepa de rata PVG deficiente en C6 del complemento (Bhole y Stahl, 2004) y se comparó esta con ratas PVG de tipo silvestre. Puesto que el sistema de complemento tiene muchas funciones, se elige un modelo animal que solo sea defectuoso en la mayoría de los efectores terminales de la cascada del complemento.

El efecto de inhibición del complemento en la regeneración de los nervios se estudió en el modelo agudo de aplastamiento del nervio (Glass, 2004). Se aplastó el nervio ciático derecho durante 30 segundos en ratas de tipo silvestre, así como en las ratas PVG deficientes en C6. Luego se analizó el nervio tibial 1 y 5 semanas después de la lesión (véase la Figura 1).

En una semana, la microscopía electrónica muestra la degeneración igualmente grave en las ratas de tipo silvestre y deficientes en C6. A las 5 semanas, las ratas deficientes en C6 ya muestran axones mielinizados, mientras que las ratas de tipo silvestre muestran una recuperación incipiente. En los animales con deficiencia de C6, la mayoría de los axones mielinizados muestran la relación normal uno a uno con las células de Schwann (comparar con la imagen de control del nervio tibial izquierdo de una rata PVG). Por el contrario, en las ratas de tipo silvestre hay varias fibras mielinizadas en cada grupo regenerativo.

Se encontraron dos efectos de la deficiencia de C6 en la recuperación postraumática del nervio:

1) La pérdida de mielina durante degeneración Walleriana se retrasó en los animales con deficiencia de C6. Las ratas de tipo silvestre mostraron signos de DW (degeneración de la mielina, activación de macrófagos) ya después de 24 horas. En los animales deficientes en C6 se retrasó este proceso. Sólo después de 72 h fue visible la degeneración de la mielina y no se produjo activación de los macrófagos. Después de una semana, los dos tipos de animales mostraron degeneración severa del nervio.

2) De forma inesperada sin embargo, la recuperación postraumática del nervio fue mucho mejor en ratas deficientes en el componente C6 del complemento en comparación con la rata de tipo silvestre. La remielinización de los axones individuales ocurrió mucho más rápido en los animales con deficiencia de C6 y el proceso de germinación fue más eficiente ya que se produjo un solo brote de axón, de gran diámetro, en lugar de un grupo de axones más pequeños. Véase la Figura 1.

1.2 La deficiencia de C6 conduce a una afluencia/activación retardada de las células fagocíticas

En vista del importante papel de los macrófagos en la pérdida de mielina, a continuación se analizó el número y el estado de activación de los macrófagos después del aplastamiento.

Se contaron las células inmunorreactivas (-ir) ED1 (CD68) en las secciones no consecutivas de los nervios ciáticos aplastados a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la lesión, que se tomaron de ratas de tipo silvestre, ratas deficientes en C6 y ratas deficientes en C6 que recibieron C6, respectivamente.

Tanto en animales de tipo silvestre como deficientes en C6, se acumularon células positivas en CD68 (anticuerpo ED1) en el nervio aplastado. Sin embargo, los animales deficientes en C6 mostraron una aparición retardada de células positivas para CD68 (Figura 2, comparar la línea continua con la punteada). El suministro de C6 restauró la acumulación de células con CD68 (véase el punto de tiempo de 72 horas). En los animales con deficiencia de C6 había una falta de activación de macrófagos, como se analizó mediante coloración inmunohistoquímica con CR3 (anticuerpo ED7) tinción (no mostrado).

Ya que los ganglios linfáticos de estos animales contienen células positivas para CR3 podríamos descartar que los animales deficientes en C6 son defectuosos en la activación misma de los macrófagos. Además, después de la reconstitución de C6, se restableció la acumulación de células positivas para CD68 y la expresión de CR3 en los macrófagos y, posteriormente, se produjo la degeneración de la mielina. Esto vincula directamente las etapas en la ruta del complemento más abajo de C6, es decir, la formación del complejo de ataque de la membrana (CAM) en la DW.

Después de 7 días, se encontraron igual número de células positivas para CD68 en las células de tipo silvestres y deficientes en C6. Estas células no muestran ED7 (CR3) en los animales deficientes en C6 y son más probablemente macrófagos no activados (datos no mostrados).

1.3 Ensayos neuropatológicos y funcionales de la deficiencia y reconstitución de C6

La Figura 3 muestra el análisis a través del microscopio de luz de axones mielinizados durante la regeneración. Las secciones casi delgadas del sitio proximal del nervio tibial de rata se analizaron a las 5 semanas después de la lesión de las ratas de tipo silvestre, ratas deficientes en C6 y ratas deficientes en C6 reconstituidas con C6. Pocos axones mielinizados finamente están presentes en el nervio de tipo silvestre (TS), mientras que muchos axones mielinizados densamente están presentes en el nervio deficiente en C6 (C6-/-). El nervio de la rata que se reconstituyó con C6 (C6+) muestra axones menos mielinizados que el nervio deficiente en C6.

La Figura 4 muestra el efecto de la reconstitución de C6 en la recuperación funcional del nervio. La recuperación de la función sensorial se midió con el aparato de ensayo de contracciones bruscas de la pata con corrientes que van desde 0,1 mA a 0,5 mA. Los valores se normalizaron a los niveles de control. La flecha (→) indica el momento en el que se realizó la lesión por aplastamiento. A las ratas de tipo silvestre les tomó 4 semanas para recuperarse por completo, mientras que las ratas deficientes en C6 ya están recuperadas a las 3 semanas después del

aplastamiento. La reconstitución de C6 en animales con deficiencia de C6 da lugar al fenotipo de regeneración de tipo silvestre (lento) después del aplastamiento. La significancia estadística entre C6^{-/-} y TS (*) o C6⁺ (†) es para $p < 0,05$.ES

5 Se concluye que el efecto observado en la regeneración del SNP después del aplastamiento se debe a la deficiencia de C6 ya que la reconstitución de las ratas deficientes en C6 con C6 humana purificada restaura el fenotipo silvestre en ensayos neuropatológicos y funcionales (Figura 3 y 4).

10 Ejemplo 2: Inhibición de la activación del complemento después del aplastamiento del nervio por el inhibidor de C1 humano

15 Se analizó si el inhibidor de C1 humano recombinante (rhC1INH; obtenido a través de Pharming, Leiden, Países Bajos) es capaz de inhibir la activación rápida del complemento (1 h) después del aplastamiento del nervio. La Figura 5 muestra la inmunocoloración con C1q, C4c y C3c de los nervios ciáticos lesionados de ratas de tipo silvestre tratadas con rhC1INH o vehículo (PBS) solo 1 hora después del aplastamiento del nervio. Está presenta una alta inmunoreactividad para C1q en todos los nervios aplastados, confirmando la sobrerregulación de C1q después de la lesión por aplastamiento. Se detectó la inmunoreactividad de C4c y C3c en los nervios tratados con PBS como se esperaba, pero no se detectó inmunoreactividad de C4c y C3c en los nervios de las ratas tratadas con rhC1INH, sacrificadas 1 hora después de la lesión. Esto demuestra el bloqueo efectivo de la cascada del complemento por rhC1INH después de aplastar y sugerir que la ruta alternativa de activación del complemento no está involucrada en el modelo de lesión por aplastamiento de la degeneración Walleriana. Por lo tanto, la activación de la cascada del complemento después del aplastamiento del nervio se produce a través de la ruta clásica. Hay una advertencia sin embargo: debido a la corta vida media de rhC1INH en ratas, sólo se pudo hacer seguimiento a la escisión de C3 y C4, 1 hora después del aplastamiento. Por lo tanto no se puede excluir que ocurra la activación a través de la ruta alternativa en un instante posterior.

Ejemplo 3: El efecto de CR1 soluble sobre la regeneración postraumática del nervio

30 A continuación, se probó el efecto de CR1 soluble (sCR1) sobre la regeneración postraumática del nervio. sCR1 inhibe la convertasa C3/C5, y por lo tanto afecta tanto a la ruta clásica como alternativa del sistema de complemento.

35 Se trataron las ratas PVG de tipo silvestre con CR1 soluble (TP10 de Avant Immunotherapeutics, Inc.) con una dosis de 15 mg/kg/día (se obtuvo CR1 soluble TP10 a través del Prof. P. Morgan, Cardiff, Reino Unido). Se trataron las ratas de control con el mismo volumen (600 µl) de vehículo solo (PBS). Se suministró CR1 soluble o PBS por vía intraperitoneal 24 horas antes del aplastamiento y cada día para un máximo de 8 inyecciones (hasta 6 días después del aplastamiento). El nervio ciático de la pata derecha fue aplastado y la pata izquierda sirvió como control. Se analizaron tanto la función histología como la sensorial.

40 La Figura 6 muestra que en un análisis funcional con el ensayo de contracción brusca de la pata, se observa una recuperación más rápida de la función sensorial en los animales tratados con sCR1 en comparación con los tratados con PBS. Se realizó el ensayo de contracción brusca de la pata como se describió anteriormente en el Ejemplo 1.3.

45 El análisis histológico de los nervios a las 72 horas después del aplastamiento muestra que sCR1 inhibe fuertemente la afluencia y activación de macrófagos (véase la Figura 7). El tratamiento con sCR1 resultó en niveles similares de inhibición de la activación de los macrófagos, medida por la presencia positiva de CD68 en comparación con la deficiencia de C6.

Ejemplo 4: La inhibición de la activación del complemento facilita la regeneración del axón y la recuperación en un modelo de lesión de lesión periférica del nervio

50 4.1 Métodos

4.1.1 Animales

55 Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Centro Médico Académico de Animales y cumple con las directrices para el cuidado de los animales de experimentación. Se obtuvieron ratas PVG/c macho de 12 semanas de edad (de tipo silvestre) a través de Harlan (Reino Unido) y se criaron las ratas PVG/c- (C6^{-/-}) en nuestras instalaciones. Los animales pesaban entre 200 g y 250 g y se les permitió aclimatarse durante al menos dos semanas antes del comienzo del estudio. Los animales se mantuvieron en las mismas instalaciones para los animales durante todo el curso del experimento y se les hizo seguimiento del estado microbiológico de acuerdo con las recomendaciones de FELASA. Los animales fueron alojados en pares en jaulas de plástico. Se les suministró comida para ratas y agua a voluntad y se mantuvieron a temperatura ambiente de 20°C en un ciclo de luz:oscuridad de 12 horas: 12 horas.

65 4.1.2 Determinación del genotipo de las ratas PVG/c- (C6^{-/-})

Las ratas C6^{-/-} portan una deleción de 31 pares de bases (pb) en el gen C6 (Bhole y Stahl, 2004). La determinación del genotipo se realizó de acuerdo con Ramaglia y colaboradores (2007).

4.1.3 Administración de C6 humano para estudios de reconstitución

Se purificó C6 a partir de suero humano (Mead y colaboradores, 2002). Se administró en forma i.v. en ocho ratas C6^{-/-} con una dosis de 4 mg/kg/día en PBS un día antes de la lesión por aplastamiento (día -1) y cada día después de eso durante 1 semana (días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6). Se trataron ocho ratas de tipo silvestre y ocho C6^{-/-} con un volumen igual de vehículo (PBS) solamente. Las ratas C6^{-/-} reconstituidas con C6 humano purificado se indicarán en el texto como C6⁺.

4.1.4 Administración de sCR1 para estudios de inhibición

El receptor 1 soluble recombinante del complemento (sCR1) se obtuvo como se describió previamente (Piddlesden y colaboradores, 1994). Se administró sCR1 en forma i.p. en seis ratas con una dosis de 15 mg/kg/día. Se trataron seis ratas con volúmenes iguales de vehículo (PBS) únicamente. El tratamiento se administró un día antes de la lesión por aplastamiento (día -1) y cada día después de eso durante 1 semana (días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6).

4.1.5 Ensayo hemolítico y ELISA

Se recolectaron muestras de sangre de las ratas de tipo silvestre tratadas con PBS, tratadas con C6^{-/-} PBS, tratadas con C6⁺ y sCR1 de la vena de la cola un día antes de la lesión por aplastamiento (día -1) y cada siguiente día hasta 1 semana después de la lesión (días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). Todas las muestras se recogieron inmediatamente antes de cada inyección de tratamiento. Se separó el plasma y se almacenó a -80°C hasta su uso para controlar la actividad de C6 y el efecto inhibitor de sCR1 a través del ensayo hemolítico estándar del complemento (Morgan, 2000). Los niveles en plasma de sCR1 se midieron usando un ensayo de ELISA como se describió previamente (Mulligan y colaboradores, 1992) utilizando diluciones seriadas ensayadas por duplicado.

4.1.6 Ensayos motrices y sensorial

Todos los experimentos fueron realizados por el mismo investigador que desconocía el genotipo y los grupos de tratamiento. Tanto los ensayos motrices como sensoriales se realizaron en el mismo momento durante el día, cada semana hasta 5 semanas después de la lesión. La recuperación de la función motora se evaluó mediante un análisis estandarizado de caminata en pista y el índice funcional del nervio ciático (IFNC) derivado de acuerdo con Hare y colaboradores (1992). En resumen, a las ratas se les permitió caminar a través de una plataforma de plexiglás, mientras se registraba su golpeteo al caminar mediante una cámara colocada debajo de la plataforma. Se calculó un índice de la función del nervio ciático a partir de las huellas grabadas utilizando el programa de análisis de ImagePro (Media Cybernatics, Países Bajos). Se registraron la longitud de la impresión (LI), la extensión del dedo del pie (EDP) (1ro a 5to) y la extensión de los dedos intermedios del pie (EDIP) (2do a 4to) a partir del pie normal no lesionado (NPL, NTS, NIT) y el pie contralateral en el lado experimental lesionado (EPL, ETS, EIT). El IFNC se obtiene con la fórmula: $-38,3 * [(EPL-NPL)/NPL] + 109,5 * [(ETS-NTS)/NTS] + 13,3 * [(EIT-NIT)/NIT]$. En caso de no producirse una impresión por parte de los animales, se usaron los valores estándar de EPL = 60 mm, ETS = 6 mm y EIT = 6 mm de acuerdo con De Koning y colaboradores (1986). La recuperación de la función sensorial se evaluó con el ensayo de contracción brusca de la pata de acuerdo con De Koning y colaboradores (1986). En resumen, se usó una fuente de choque con una corriente variable de 0,1-0,5 mA. Los registros se realizaron un día antes de la lesión y cada semana hasta 5 semanas después de la lesión. Se inmovilizaron las ratas y se colocaron dos electrodos de estimulación en el mismo punto en la planta del pie de la rata para cada animal y estimulación. Se registró una respuesta como positiva si la rata retrajo su pata. Se registró la corriente (mA) a la cual se produjo la retracción. Los valores se expresan como porcentaje de la función normal.

4.1.7 Lesión por aplastamiento del nervio

Se realizaron todos los procedimientos quirúrgicos en forma aséptica bajo anestesia profunda con isoflurano (isoflurano al 2,5 % en vol, 1 L/min de O₂ y 1 L/min de N₂O). Se afeitó el muslo izquierdo y se expuso el nervio ciático a través de una incisión en la parte superior del muslo. Se aplastó el nervio durante tres períodos de 10 s a nivel de la escotadura ciática utilizando pinzas lisas y curvas (No. 7). Se marcó el sitio de aplastamiento mediante una sutura que no apretó el nervio. En el lado derecho, se realizó una cirugía simulada que expuso el nervio ciático pero no se lo perturbó. También se colocó una sutura. Se cerraron luego el músculo y la piel con puntos de sutura. La pata derecha sirvió como control. Luego del aplastamiento, se les permitió a las ratas recuperarse durante 1 (de tipo silvestre n = 5; C6^{-/-} n = 5; C6⁺ n = 2), 3 (tipo silvestre n = 6; C6^{-/-} n = 6; C6⁺ n = 3) y 5 (de tipo silvestre n = 5; C6^{-/-} n = 5; C6⁺ n = 3; de tipo silvestre tratadas con sCR1 n = 6; de tipo silvestre tratadas con PBS n = 6) semanas.

4.1.8 Histología del nervio tibial

Todos los animales fueron perfundidos en forma intracardiaca con paraformaldehído al 4% en regulador de piperazina-N-N'-bis(ácido 2-etano sulfónico) (PIPES) (pH 7,6), bajo anestesia profunda con isoflurano. Se

removieron los nervios tibiales izquierdo y derecho de cada animal y se fijaron posteriormente con glutaraldehído al 1%, paraformaldehído al 1% y dextrano al 1% (MW 20.000) en regulador PIPES 0,1 M (pH 7,6). Se dividieron en un segmento proximal y uno distal de 10 mm de longitud. Cada segmento se procesó convencionalmente en resina epóxica. Se tiñeron secciones de resina cuasi delgadas de 0,5 μm con tiónina y acridina naranja y se capturaron las imágenes con un microscopio óptico (Leica DM5000B, Países Bajos) conectado a una cámara digital (Leica DFC500, Países Bajos). Se realizó la microscopía electrónica en secciones ultra finas del nervio tibial de ratas tipo silvestre y C6^{-/-} 5 semanas después de la lesión por aplastamiento. Las secciones se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo como se describió previamente (King, 1999). Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital conectada a un microscopio electrónico (FEO 10, Philips, Países Bajos). El número de grupos de axones que se regeneraron 5 semanas después de la lesión se determinó en secciones cuasi finas de resina. Se le dio puntaje a toda la sección por cada animal en cada grupo. La relación g es la relación numérica del diámetro del axón sin mielina con respecto al diámetro del axón mielinizado y se calculó sobre la sección completa del nervio. Se calculó la frecuencia de las fibras mielinizadas de gran calibre (> 8 μm) sobre la sección completa del nervio.

4.1.9 Análisis estadístico

Se realizaron ANOVA bidireccionales con corrección de Bonferroni para determinar diferencias estadísticamente significativas en el ensayo hemolítico ($p < 0,001$), ensayo de ELISA ($p < 0,001$), IFNC ($p \leq 0,05$), ensayo de contracción brusca de la pata ($p \leq 0,05$).

4.2 Resultados y discusión

Para probar los efectos de la activación de C en la regeneración de los nervios después de un trauma agudo, se determinó el efecto de C en la recuperación de la lesión por aplastamiento del nervio ciático en el modelo de rata de dos maneras complementarias, primero mediante el examen de los efectos de la deficiencia de C6 (C6^{-/-}) y segundo mediante la inhibición de la activación de C.

El estudio se preparó de acuerdo con un esquema que se extiende durante un periodo de 5 semanas. El tiempo 0 es el momento de la lesión por aplastamiento. Cada grupo de animales fue tratado ya sea con un placebo (PBS) o con proteína C6 purificada o sCR1 el día antes de la lesión (día -1) y cada día a partir de entonces hasta 1 semana después de la lesión. Se recolectó sangre de cada animal el día antes de la lesión (día-1) y en los días 0, 1, 2, 3, 5 y 7 después de la lesión para determinar la actividad hemolítica del complemento en suero. El análisis funcional, para determinar la recuperación de la función motora mediante el índice funcional del nervio ciático (IFNC) y la recuperación de la función sensorial mediante el ensayo de contracción brusca de la pata, se llevó a cabo el 1 día antes de la lesión para los valores de línea de base y cada semana a partir de entonces hasta 5 semanas después de la lesión. El análisis patológico de los nervios tibiales distales del sitio de la lesión se llevó a cabo en las semanas 1, 3 y 5 después de la lesión para determinar la regeneración del nervio.

Se determinaron tanto la recuperación funcional como los efectos sobre la histología. Como controles para la deficiencia de C6 se reconstituyeron ratas C6^{-/-} con proteína C6 purificada (4 mg/kg/día; $n = 8$) (C6⁺), que restauró la actividad hemolítica en plasma (CH_{50}) a niveles de tipo silvestre (> 80%; $p < 0,001$, ANOVA bidireccional) (Tabla 1). La inhibición de la activación de C se logró mediante el tratamiento sistémico con el receptor 1 de C soluble (sCR1) (15 mg/kg/día; $n = 6$), una forma soluble recombinante del regulador C de la membrana humana, CR1, que inhibe todas las tres rutas de activación de C (Weisman y colaboradores, 1990). Este tratamiento redujo la actividad hemolítica de C hasta aproximadamente el 30% del de los controles tratados con vehículo PBS ($n = 6$; $p < 0,001$, ANOVA bidireccional) a lo largo de todo el transcurso del tratamiento (Tabla 1). Se encontró que este nivel de inhibición de C en el plasma anuló completamente la deposición de C activado en el nervio a los 3 días después de la lesión.

La recuperación de la función motora se controló cada semana después de la lesión mediante la medición del índice funcional del nervio ciático (IFNC) calculado a partir del patrón de caminata de las ratas (Hare y colaboradores, 1992). Una semana después de la lesión, ninguno de los animales utilizó la pata de la extremidad lesionada para caminar, no pudiendo producir una huella en la plataforma para caminar, lo que sugiere la pérdida completa de la inervación muscular en la extremidad. Dos semanas después de la lesión y durante todo el estudio, las ratas C6^{-/-} ($n = 16$) produjeron un IFNC significativamente más alto que los animales de tipo silvestre ($n = 16$; $p \leq 0,05$, ANOVA bidireccional) (Figura 8a). Un IFNC mayor es el resultado de un aumento en la longitud de la impresión y los parámetros de extensión del dedo del pie e indica una nueva inervación de los músculos de la pantorrilla y pequeños del pie, respectivamente. La reconstitución de las ratas C6^{-/-} con proteína purificada C6 (C6⁺) redujo significativamente el IFNC ($n = 8$; $p < 0,05$, ANOVA bidireccional) a niveles de tipo silvestre en la semana 4 y 5 después de la lesión. Estos datos demuestran que la deficiencia de C6 en las ratas da lugar a una recuperación más rápida de la función motora en comparación con las de tipo silvestre. La recuperación de la función sensorial se analizó con el ensayo de contracción brusca de la pata. En la primera semana después de la lesión, ninguno de los animales retrae su pata cuando se estimuló la planta de la pata mediante una descarga eléctrica de 0,5 mA, lo que sugiere una pérdida completa de la inervación sensorial. Desde la semana 2 hasta la semana 3 después de la lesión, las ratas C6^{-/-} mostraron un 20-50% de mayor recuperación de la función sensorial en comparación con las ratas de tipo silvestre ($n = 16$) y C6⁺ ($n = 8$) ($p \leq 0,05$, ANOVA bidireccional). La función sensorial no difirió entre los

5 grupos en las semanas 4 y 5 después de la lesión (Figura 8b). Del mismo modo, los animales tratados con sCR1 mostraron una recuperación más rápida (aumento de 10-30%, n = 6; p < 0,05, ANOVA bidireccional) de la función sensorial que las ratas tratadas con PBS (n = 6) entre las semanas 2 y 4 después de la lesión (Figura 9). Estos datos indican que tanto la deficiencia de C como la inhibición de la activación C aceleran y mejoran el retorno de la inervación sensorial a la planta de la pata después de la lesión por aplastamiento ciático.

10 Para seguir la regeneración histológica del nervio dañado, se analizó el nervio tibial en diferentes instantes de tiempo. El proceso de regeneración se caracteriza por la aparición de agrupaciones de axones regenerativos que son brotes del axón lesionado originalmente. Inicialmente, los brotes de axones residen dentro del citoplasma de una sola célula de Schwann pero más tarde se separan mediante un arreglo radial. Una vez se establece la relación 1:1 entre la célula de Schwann y el axón, se inicia la promielinización de las CS para envolver el axón para formar la mielina y el tubo de lámina basal. En esta etapa, aparecen los grupos regenerativos como grupos de pequeño calibre, de axones mielinizados finamente dentro de las células adyacentes de Schwann (Figura 10, flechas). Una vez que un axón ha alcanzado su objetivo, el resto de los brotes de los axones se eliminan mientras que el axón restante aumenta de tamaño. En las secciones histológicas a las 5 semanas después de la lesión, los tipos silvestres no tratados y los controles tratados con vehículo PBS mostraron racimos regenerativos de axones mielinizados finamente de pequeño calibre en contraste con los animales tratados con C6^{-/-} y con sCR1 donde los racimos regenerativos estaban ausentes confirmando una recuperación más rápida cuando se inhibe C o está ausente (Figura 10). La frecuencia de fibras mielinizadas de mayor calibre (> 8 µm) se incrementó en los animales tratados con C6^{-/-} (0,59 ± 0,20%, n = 5) y con sCR1 (0,58 ± 0,11%, n = 6) en comparación con los animales de tipo silvestre no tratados (0,05 ± 0,02; n = 5), los controles tratados con C6⁺ (0,06 ± 0,01; n = 3) y los tratados con vehículo PBS (ninguno; n = 6) a las 5 semanas después de la lesión, mientras que no se encontró ninguna diferencia en la frecuencia de fibras mielinizadas de bajo calibre (<4 µm) y de calibre intermedio (4-8 µm). El grosor de la mielina no se alteró entre los grupos de animales (relación g de 0,69 ± 0,01, n = 5, de tipo silvestre; 0,65 ± 0,02, n = 5, C6^{-/-}; 0,65 ± 0,01, n = 3, C6⁺; 0,70 ± 0,01, n = 6, tratados con sCR1; 0,66 ± 0,003, n = 6, tratados con vehículo PBS) (datos no mostrados).

15 Tomados en conjunto, estos datos muestran que la regeneración de los axones y la recuperación funcional después de una lesión de los nervios periféricos se mejoran en ausencia de C6 o cuando la activación de C es inhibida por sCR1. Por lo tanto, la capacidad de formar CAM es un determinante negativo de la recuperación del nervio.

20 La recuperación funcional después de una lesión por aplastamiento de los axones requiere que los axones entren nuevamente a los tubos de las células de Schwann en el lugar del aplastamiento. Una vez en el cabo distal, los axones necesitan volver a incorporarse por los caminos seguidos antes de la lesión y generar una sinapsis específica con exactamente la misma fibra muscular que habían innervado previamente. En esta tarea, se guían por señales de atracción y repulsión moleculares (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996; Yu y Bargmann, 2001), pero la evidencia reciente mostró que los factores físicos también juegan un papel clave (Nguyen y colaboradores, 2002). Por lo tanto, el mantenimiento de los tubos endoneurales intactos podría ser de gran importancia para la regeneración del nervio periférico adulto.

25 El bloqueo de la activación de C, y en particular la formación de CAM, reduce el daño del tejido durante la degeneración del nervio, parece rescatar la arquitectura necesaria para la guía del axón y da como resultado una regeneración más eficiente y la recuperación de la función. La mejora funcional en ausencia de aumento del grosor de la envoltura de mielina puede ser explicada por el aumento en el número de fibras de gran calibre.

30 Una gran cantidad de evidencia en la última década apunta a un posible papel beneficioso de los macrófagos durante la recuperación (Kiefer y colaboradores, 2001). Un tiempo después de la lesión, los macrófagos secretan citoquinas anti-inflamatorias que están implicadas en la resolución del proceso inflamatorio. Una vez que termina la inflamación, los macrófagos contribuyen a la proliferación y supervivencia de las células de Schwann, la remielinización y recuperación a través de la secreción de factores de crecimiento y diferenciación. Hemos demostrado que, justo después de la lesión, la inhibición de C reduce notablemente la infiltración de los macrófagos endoneurales (aumento de 5 veces, en comparación con 25 veces en ausencia de inhibición de C) (Ramaglia y colaboradores, 2007). Hemos postulado que esto es debido a la proliferación de la población de macrófagos residentes mientras que una pequeña contribución proviene de los macrófagos hematógenos. Es posible que separamos el efecto perjudicial de los macrófagos hematógenos del efecto beneficioso que puede ser ejercido por la población endoneural.

35 Nuestros hallazgos abren la puerta a un nuevo enfoque terapéutico en el que el bloqueo de la cascada de C, o la inhibición selectiva de CAM, favorece la regeneración después de una lesión traumática y en las neuropatías periféricas y enfermedades neurodegenerativas, donde se ha reportado daño a los nervios que depende de C.

Tabla 1. Actividad hemolítica del plasma (%CH50)

	Día -1	Día 0 (aplastamiento)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 7
Tipo silvestre tratado con	91,6±1,0	91,7±1,1	81,2±1,7	89,5±1,5	86,1±1,4	n.d.	82,1±1,7	90,8±4,1

PBS								
Deficiente en C6 tratado con PBS	14,0±0,1	n.d.	n.d.	12,8±0,2	n.d.	13,5±0,3	n.d.	15,7±0,4
Deficiente en C6 tratado con C6 (C6 ⁺)	14,0±0,1	n.d.	n.d.	78,5±0,9*	n.d.	76,9±0,8*	n.d.	78,5±1,6*
Tipo silvestre tratado con sCR1	87,4±0,6	36,8±1,1*	27,2±0,9*	27,2±3,6*	27,9±0,3*	n.d.	29,6±1,7*	33,4±2,9*

Hemólisis dependiente de C en el suero de ratas de tipo silvestre tratadas con PBS, tratadas con C6⁻ PBS y reconstituidas con C6⁻ con C6 (C6⁺) humano purificado y ratas tratadas con sCR1. El tratamiento se inició 1 día (día -1) antes de la lesión (día 0) y se repitió todos los días hasta 1 semana. Se recogió plasma los días -1, 2, 4, y 7 inmediatamente antes del tratamiento. Los valores son la media ± DE de seis a ocho animales por grupo por cada punto de tiempo. La significancia estadística (*) se refiere a $p < 0,001$ determinada por una prueba ANOVA bidireccional con la corrección de Bonferroni. n.d., no determinado.

Ejemplo 5:

5.1 Materiales y métodos

5.1.1 Animales

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Centro Médico Académico de Animales y cumple con las directrices para el cuidado de los animales de experimentación.

Se obtuvieron ratas PVG/c macho de 12 semanas de edad a través de Harlan (Reino Unido). Los animales pesaban entre 200 g y 250 g y se les permitió aclimatarse durante al menos dos semanas antes del comienzo del estudio. Los animales se mantuvieron en las mismas instalaciones para los animales durante todo el curso del experimento y se les hizo seguimiento del estado microbiológico de acuerdo con las recomendaciones de FELASA. Los animales fueron alojados en pares en jaulas de plástico. Se les suministró comida para ratas y agua a voluntad y se mantuvieron a temperatura ambiente de 20°C en un ciclo de luz:oscuridad de 12 horas: 12 horas.

5.1.2 Administración de sCR1 o Cetor para estudios de inhibición

El receptor 1 soluble recombinante del complemento (sCR1) se obtuvo como se describió previamente (Piddlesden y colaboradores, 1994). El inhibidor C1 del complemento (Cetor) fue gentilmente suministrado por Sanquin (Ámsterdam, Países Bajos). Se administró sCR1 en forma i.p. en doce (12) ratas con una dosis de 15 mg/kg/día. Se administró Cetor en forma i.v. en seis (6) ratas con una dosis de 50 U/rata/día. Se trataron doce (12) ratas con volúmenes iguales de vehículo (PBS) únicamente. El tratamiento se administró un día antes de la lesión por aplastamiento (día -1) y cada 24 horas (día 0, 1, 2) hasta que se removieron los nervios 3 días después de la lesión. Se trataron diez (10) ratas ya sea con sCR1 (6) o con PBS (4) hasta seis (6) días después de la lesión (días -1, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6) y se removieron los nervios 1 día después del final del tratamiento (día 7).

5.1.3 Ensayo hemolítico y ELISA

Se recolectaron muestras de sangre de las ratas tratadas con PBS y con sCR1 de la vena de la cola un día antes de la lesión por aplastamiento (día -1) y cada siguiente día hasta (día 0, 1, 2) hasta que se sacrificaron los animales 3 días después de la lesión. En el grupo tratado hasta 6 días, se recolectaron muestras adicionales de sangre los días 3, 5 y 7 después de la lesión. Todas las muestras se recogieron inmediatamente antes de cada inyección de tratamiento. Se separó el plasma y se almacenó a -80°C hasta su uso para controlar la actividad inhibitoria de sCR1 a través del ensayo hemolítico estándar del complemento (Morgan, 2000).

Los niveles en plasma de sCR1 se midieron usando un ensayo de ELISA como se describió previamente (Mulligan y colaboradores, 1992) utilizando diluciones seriadas ensayadas por duplicado.

5.1.4 Lesión de aplastamiento del nervio y procesamiento del tejido

Se realizaron todos los procedimientos quirúrgicos en forma aséptica bajo anestesia profunda con isoflurano (isoflurano al 2,5% en vol, 1 L/min de O₂ y 1 L/min de N₂O). Se afeitó el muslo izquierdo y se expuso el nervio ciático a través de una incisión en la parte superior del muslo. Se aplastó el nervio durante tres períodos de 10 s a nivel de la escotadura ciática utilizando pinzas lisas y curvas (No. 7). Se marcó el sitio de aplastamiento mediante una sutura que no apretó el nervio. En el lado derecho, se realizó una cirugía simulada que expuso el nervio ciático pero no se lo perturbó. También se colocó una sutura. Se cerraron luego el músculo y la piel con puntos de sutura. Luego del aplastamiento, se les permitió a las ratas recuperarse durante 3 días (tratadas con PBS n = 8; tratadas con sCR1 n =

6; tratadas con Cetor n = 6) y 7 días (tratadas con PBS n = 4; tratadas con sCR1 n = 6).

5 Todos los animales fueron perfundidos en forma intracardiaca con paraformaldehído al 4% en regulador de piperazina-N-N'-bis(ácido 2-etano sulfónico) (PIPES) (pH 7,6). Se removieron los nervios ciáticos izquierdo y derecho de cada animal y se recolectó un segmento distal de 5 mm de longitud del sitio del aplastamiento. Cada segmento fue procesado convencionalmente en cera de parafina para inmunohistoquímica.

5.1.5 Inmunohistoquímica

10 Se tiñeron secciones cera de parafina utilizando un método de inmunoperoxidasa de tres etapas. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente (TA). Después de la eliminación de la parafina y rehidratación, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 1% en metanol durante 20 min. En todos los casos, se utilizó la recuperación del antígeno en microondas (800 W durante 3 min seguido por 10 min a 440 W en Tris 10 mM / EDTA 1 mM, pH 6,5). Para bloquear los sitios de unión no específicos, se incubaron los portaobjetos en suero normal de cabra al 10% (SCN) en solución salina regulada con Tris (SSRT) durante 20 min. Después de la
15 incubación en el anticuerpo primario apropiado diluido en BSA al 1% (véase la Tabla 2) durante 90 min, se incubaron las secciones durante 30 min en IgG de cabra biotinilado anticonejo o IgG de cabra antirratón de DakoCytomation (Glostrup, DK) diluido 1:200 en BSA al 1% y 30 min en poliestreptavidina marcada con peroxidasa de rábano (complejo ABC, DAKO). Para visualizar la actividad de la peroxidasa, se incubaron los portaobjetos en 3-amino-9-etilcarbazol al 0,05% en regulador de acetato (pH 5) durante 5 min seguido de una coloración de contraste durante
20 30 s con hematoxilina y se montaron en gelatina. Las secciones inmunoteñidas solo con el conjugado secundario se incluyeron con cada experimento como controles negativos mientras que las secciones de la médula espinal de rata y los ganglios linfáticos sirvieron como controles positivos.

25 Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital (Olympus, DP12, Países Bajos) unida a un microscopio óptico (Olympus, BX41, Países Bajos).

Tabla 2: Anticuerpos, fuente y diluciones para inmunohistoquímica.

Anticuerpos	Fuente	Diluciones
Neurofilamento monoclonal fosforilado de ratón antihumano (clon SMI31)	Stemberger (Lutherville, RU)	1:1000
MBP policlonal de conejo antihumano	DakoCytomation (Glostrup, Dina.)	1:100
CD68 monoclonal de ratón antirrata (clon ED1)	Serotec (Oxford, RU)	1:100
C9 policlonal de conejo antirrata	B.P. Morgan	1:300
C3c policlonal de conejo antihumano	DakoCytomation (Glostrup, Dina.)	1:750
C4c policlonal de conejo antihumano	DakoCytomation (Glostrup, Dina.)	1:100

30 5.1.6 Análisis cuantitativo de inmunohistoquímica

Todos los análisis se realizaron con el software Image Pro Plus versión 5.02 (Media Cybernatics, Países Bajos). Las células inmunorreactivas a CD68 (clon ED1) se calificaron como positivas cuando la señal positiva para CD68 se asoció con los núcleos. Se puntuaron treinta secciones no consecutivas de nervio ciático por rata. Se tomaron un promedio de 3 campos de visión no superpuestos incluyendo > 90% de toda el área del nervio para cada sección. La cuantificación de la inmunocoloración de CAM y MBP se realizó a 40 aumentos en dos campos que no se superponen por sección examinada. Se le dio puntaje a diez secciones por rata. El área de superficie teñida se expresa como porcentaje del área total examinada.

40 5.1.7 Extracción de proteína y análisis de transferencia tipo Western

Los nervios ciáticos congelados de 2 ratas no tratadas sacrificadas a los 2 días siguientes a la lesión por aplastamiento, se homogeneizaron usando un mortero y pistilo en nitrógeno líquido en Tris 20 mmol l⁻¹ (pH 7,4), 5 mmol l⁻¹ de 1, 4-ditio-DL-treitol (DTT) y SDS al 0,4% y glicerol al 6%. Los homogeneizados se centrifugaron a 10.000 x g, a 2°C durante 10 min. La fracción sobrenadante se recogió y se utilizó para el análisis de proteínas. Las concentraciones de proteínas se determinaron con un kit de ensayo de proteínas DC (Bio-Rad Laboratories, EE.UU.), utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

50 Los extractos de proteína (20 µg/muestra) se sometieron a ebullición durante 5 min, se separaron mediante SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante la noche a 4°C. Antes de la transferencia, se tiñeron las membranas de nitrocelulosa con Ponceau rojo durante 30 segundos para verificar la carga de proteínas. Se incubaron previamente las membranas en 50 mmol l⁻¹ de Tris-HCl que contiene Tween 20 al 0,5% (TBST) y 5% de leche en polvo desgrasada durante 1 hora a TA. Las transferencias se incubaron durante 2 horas en Bb policlonal de cabra anti-factor (fBb) (Quidel, San Diego, CA) diluido en TBST que contiene 5% de leche en polvo

desgrasada. Tras el lavado en TBST, se incubaron las membranas durante 1 hora en anticuerpo policlonal secundario de conejo anti-cabra conjugado con peroxidasa de rábano diluido 1:2000 en TBST que contiene 5% de leche en polvo desgrasada. Se lavaron las membranas en TBST durante 30 min y se detectaron las bandas inmunorreactivas usando quimioluminiscencia potenciada (ECL, Amersham, Piscataway, NJ, EE.UU.). La cuantificación de las bandas inmunorreactivas se realizó a través del software Advanced Image Data Analyzer v. 3.4 (Raytest, Alemania).

5.1.7 Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA bidireccional con corrección de Bonferroni para determinar diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,001$). El análisis estadístico de la cuantificación de inmunotransferencias se determinó mediante la prueba t no pareada ($p \leq 0,05$).

5.2 Resultados

5.2.1 sCR1 bloquea la activación del complemento después de un trauma nervioso agudo

Para determinar los efectos de la inhibición de todas las rutas de activación del complemento en degeneración Walleriana (DW), se trataron los animales con sCR1. Se inició el tratamiento 1 día antes de una lesión por aplastamiento del nervio ciático. Se midieron los niveles en plasma de sCR1 y CH50 después de inyecciones i.p. diarias ya sea de sCR1 en una dosis de 15 mg/kg/día o un volumen igual de vehículo. Los niveles de sCR1 aumentaron después del primer día de la inyección y la actividad hemolítica del complemento se redujo hasta aproximadamente 30% de los controles (Figura 11).

Los animales tratados con sCR1 mostraron la inhibición de la activación del complemento en el nervio aplastado (Figura 12). Los nervios tratados con sCR1 no mostraron prácticamente depósitos de CAM ($0,8 \pm 0,9\%$), mientras que la inmunorreactividad de CAM cubrió $31,4 \pm 7,8\%$ de la superficie total examinada en los nervios de las ratas tratadas con PBS. La inmunorreactividad de CAM era indetectable en los nervios de control no lesionados. La deposición de C4c y C3c también se impidió en los nervios tratados con sCR1 mientras se detectó una alta cantidad de inmunorreactividad en los nervios tratados con PBS (no mostrado). Estos resultados demuestran que sCR1 es un inhibidor eficaz de la activación del complemento después de un traumatismo agudo del nervio.

5.2.2 sCR1 protege los nervios de la pérdida de los axones a los 3 días después de la lesión

Para determinar los efectos de la inhibición del complemento mediada por sCR1 sobre los cambios morfológicos de DW de los axones y la mielina, se analizaron a los 3 días después de la lesión.

La coloración del neurofilamento (SMI31) mostró que el nervio ciático de ratas tratadas con PBS tenía espacios vacíos y agrandados en los axones, delimitada por un axolema inmunorreactiva delgada y restos dispersos de los axones dentro del nervio que son signos de la hinchazón y degradación de los axones (datos no mostrados). Por el contrario, las ratas tratadas con sCR1 todavía mostraron la apariencia típica de puntos de los axones, de manera similar a la del nervio de control no lesionado, lo que demuestra el rompimiento del axón rescatado a los 3 días después de la lesión. La inmunocoloración de la mielina (MBP) reveló signos de descomposición de la mielina en los nervios de ratas tratadas con PBS a los 3 días después de la lesión, mientras que los nervios de las ratas tratadas con sCR1 mostraron la tinción anular típica de la mielina similar a los nervios de control no lesionados, lo que demuestra la degradación de la mielina rescatada en este momento después de la lesión (datos no mostrados). Estas observaciones demuestran que sCR1 protege los nervios de la degradación de los axones y la mielina a los 3 días después de la lesión.

El análisis de los nervios ciáticos de ratas tratadas tanto con sCR1 como con PBS a los 7 días después de la lesión muestra el rompimiento de los axones y la mielina en ambos grupos de animales, lo que demuestra que la DW se retrasó pero no se evitó en los nervios tratados con sCR1 después de la lesión por aplastamiento (datos no mostrados).

La cuantificación de la tinción MBP mostró una inmunorreactividad significativamente menor en los nervios aplastados en comparación con los nervios no lesionados ($21,7 \pm 3,5\%$). La cantidad de residuos inmunorreactivos de MBP difiere entre los nervios de las ratas tratadas con PBS y las tratadas con sCR1. Los nervios tratados con PBS mostraron un porcentaje significativamente menor del área inmunorreactiva de MBP ($2,1 \pm 1,3\%$) en comparación con los nervios tratados con sCR1 ($7,6 \pm 1,0\%$). Esto demuestra que la pérdida de los residuos de mielina se retrasa en los nervios tratados con sCR1.

5.2.3 sCR1 evita la acumulación de macrófagos y la activación a los 3 días después de la lesión

Se hizo seguimiento a la acumulación y los cambios morfológicos de los macrófagos ya que la activación del complemento media el reclutamiento y activación de los macrófagos. Se utilizó el anticuerpo CD68 (clon ED1), un marcador lisosomal, como marcador para su estado metabólico. Se encontraron una pocas células inmunorreactivas

a CD68 en el nervio de control no lesionado ($5,3 \pm 1,7$ células/mm²). El número aumentó a $261,2 \pm 10,7$ células/mm² en los nervios de las ratas tratadas con PBS a 3 días después de la lesión, mientras que los nervios de las ratas tratadas con sCR1 mostraron un aumento leve ($63,1 \pm 4,7$ células/mm²) (Figura 13).

5 Los nervios de las ratas tratadas con PBS mostraron células grandes y asimétricas inmunorreactivas a CD68 (tamaño promedio de $103,6 \pm 71,8$ μm²) a los 3 días después de la lesión, mientras que se detectaron células pequeñas y redondas (tamaño promedio de $22,8 \pm 14,1$ μm²) en los nervios de las ratas tratadas con sCR1, un tamaño y forma similares a las observadas en los nervios de control no lesionados (tamaño promedio de $18,8 \pm 6,6$ μm²) (datos no mostrados).

10 Determinación de la distribución del tamaño de células inmunorreactivas a CD68 se realizó en 11 células en los nervios no lesionados, 778 células en los nervios tratados con PBS y 294 células en los nervios tratados con sCR1. La distribución por tamaño de las células mostró una alta variabilidad en los nervios tratados con PBS con una dimensión de las células que van desde 20 a más de 400 μm², con una gran población de células de aproximadamente 60 μm². Por el contrario, los nervios tratados con sCR1 mostraron una dimensión de las células que va de 0 a 40 μm², similar al tamaño de las células que se encuentran en los nervios de control no lesionados (Figura 14). La colocalización de MBP y CD68 mostró macrófagos que engullen mielina en los nervios tratados con PBS mientras que los macrófagos pequeños en reposo son visibles entre las envolturas de mielina morfológicamente intactas de los nervios no lesionados y tratados con sCR1 (datos no mostrados). Estos resultados muestran que los macrófagos se activan en los nervios tratados con PBS pero no en aquellos tratados con sCR1.

5.2.4 Activación de la ruta alternativa después de un trauma agudo del nervio

25 Se ha encontrado que la ruta clásica del sistema de complemento se activa después de un traumatismo agudo del nervio. Para determinar si la ruta alternativa también se activa por una lesión por aplastamiento del nervio ciático, se midió el nivel de expresión de Bb, el fragmento de proteína de 60 kD que resulta de la escisión del factor B. Los bajos niveles de inmunoreactividad de Bb fueron detectados en los extractos de proteínas de los nervios no lesionados de rata, mientras que un aumento de cerca de dos veces ($1,8 \pm 0,2$) fue observado a los 2 días siguientes a la lesión por aplastamiento (Figura 15 A, B). Estos resultados indican que el bucle de la ruta alternativa se activa después de un traumatismo nervioso agudo, que genera más fB escindido.

5.2.5 Efectos del inhibidor de C1 de DW

35 Para determinar si la ruta alternativa es suficiente para causar la patología se trataron las ratas con el inhibidor de C1 (Cetor). La inhibición de las rutas clásica y de lectina con el inhibidor de C1 del complemento, Cetor, permitiría determinar la contribución de las diferentes rutas del complemento. La dosis de Cetor se extrapoló a partir del trabajo de Smet y colaboradores. La inmunocoloración de los nervios aplastados tratados con Cetor para los productos de activación de la ruta clásica (C4c) fue negativa y por lo tanto sugiere la inhibición de la ruta clásica.

40 Bajas cantidades de inmunoreactividad del CAM ($7,3 \pm 2,7\%$ de la superficie total examinada) fueron visibles en los nervios de los animales tratados con Cetor a los 3 días después de la lesión y la tinción se localizó principalmente en el compartimento de los axones de algunas fibras (datos no mostrado). La coloración del neurofilamento (clon SMI31) mostró fibras con inmunoreactividad normal de puntos de los axones y fibras con inmunoreactividad anular atípica delineando espacios agrandados de los axones. Esto demuestra la distribución anormal del epítipo del neurofilamento fosforilado, compatible con el rompimiento del neurofilamento (datos no mostrados). Estas observaciones sugieren un vínculo íntimo entre la deposición de CAM y la pérdida del axón. La coloración de la mielina (MBP) mostró una morfología normal anular de la mielina (datos no mostrados) y la tinción de CD68 reveló un número de células ($59,8 \pm 28,3$ células/mm²) similar a la observada en los nervios tratados con sCR1. Además, el tamaño promedio de las células inmunorreactiva a CD68 ($19,1 \pm 10,5$ μm²) y la distribución por tamaño determinada en 218 células no difirió de los nervios tratados con sCR1 o los controles no lesionados (datos no mostrados). La colocalización de MBP y CD68 muestra pequeños macrófagos en descanso entre las envolturas de mielina morfológicamente intactas (datos no mostrados). Estos resultados sugieren un vínculo entre la falta de activación de los macrófagos y la morfología preservada de la mielina a los 3 días después de la lesión.

55 5.3 Discusión

La presente invención demuestra que el tratamiento sistémico con sCR1, un inhibidor de las rutas clásica, de lectina y alternativa de activación del complemento, protege de la pérdida temprana del axón y la descomposición de la mielina después de la lesión del nervio periférico.

60 La administración diaria de sCR1 a ratas lesionadas impidió tanto la activación sistémica como local del complemento, lo que resulta en el bloqueo de la deposición de CAM en el nervio. En los animales no tratados, la lesión por aplastamiento conduce a un rápido aumento de las células positivas para CD68 que aumentan y fagocitan la mielina. En los nervios tratados con inhibidor sólo se pudo detectar un ligero aumento de las células positivas para CD68 pero fracasaron en agrandarlas. Esto parece ser debido a la proliferación y diferenciación de la población de macrófagos endoneurales que se presenta ya a los 2 días después de la lesión (Mueller y colaboradores, 2001).

Tanto los macrófagos residentes a largo plazo como a corto plazo, recién expresan el antígeno ED1 lisosomal y tienen el potencial para fagocitar mielina (Leonhard y colaboradores, 2002). Sin embargo, este es un evento mediado por el complemento (Bruck W y Friede, 1991). Ya que la activación del complemento se inhibe en los nervios tratados con sCR1, las opsoninas del complemento no se depositan sobre el tejido nervioso impidiendo el reconocimiento del objetivo y previniendo la fagocitosis de la mielina. Además, la inhibición del complemento también resulta en una quimiotaxis ineficiente, que previene el reclutamiento de macrófagos derivados de la sangre lo que probablemente explica el aumento adicional observado de 4 veces en el nervio tratado con PBS.

A pesar de la disminución del reclutamiento y activación de los macrófagos, sCR1 no puede proteger el nervio de la degradación de los axones y la descomposición de la mielina a los 7 días después de la lesión, incluso cuando la actividad del complemento hemolítico se mantiene baja. Concluimos, por lo tanto, que la inhibición de la activación del complemento sólo afecta a los primeros eventos de DW. La falta de deposición de C4c en los nervios tratados con sCR1 es un hallazgo notable porque sCR1 inhibe la convertasa C3 que está más adelante de la escisión de C4, por lo tanto se esperaría un pequeño efecto sobre la deposición de C4c. Sin embargo, como también se observa en los estudios previos (Piddlesden y colaboradores, 1994), el bloqueo del daño mediado por C por sCR1 también inhibe toda la deposición de C en el tejido dañado, lo que resulta también en niveles indetectables de C4c.

Hemos demostrado que, además de la ruta clásica, también se activa la ruta alternativa después de una lesión por aplastamiento del nervio periférico. El bloqueo de la ruta clásica (y de lectina) del complemento con inhibidor de C1 (Cetor), un inhibidor de la serina proteasa que bloquea la activación del complejo C1q-C1r-C1s (y MBL-MASP),^{6,10} disminuyó pero no reduce la deposición de CAM en el nervio. Ya que se produce una baja tasa de activación de la ruta alternativa bajo condiciones fisiológicas y está regulada negativamente por inhibidores del complemento, la ruptura de los componentes reguladores del complemento unido a la membrana en el sitio de la lesión podría establecer la ruta alternativa fuera de control, generando más convertasa C3 y conduciendo a la deposición de CAM. Además, no podemos descartar que los bajos niveles de C3b, que se acumularían durante la activación de la ruta clásica, podrían escapar a la inhibición por Cetor formando bajos niveles de convertasa C5 y actuando como sustrato para la ruta alternativa para amplificar aún más la activación. El bloqueo parcial de la activación del complemento da como resultado la deposición reducida de C3 que reduce la acumulación de macrófagos y previene su activación, mientras que aún se depositan bajas cantidades de CAM en el nervio. Curiosamente, esto es suficiente para causar una marcada lesión de los axones (pero no mucha degradación de la mielina), haciendo hincapié en la sensibilidad de los axones al daño inducido por CAM. Esto también sugiere que la pérdida de la mielina es un efecto indirecto de la pérdida de axones y requiere que los macrófagos se dirijan a la superficie opsonizada, se activen, despojen y degraden la mielina.

Nuestros datos muestran que incluso niveles bajos de deposición de CAM, que se producen con el tratamiento inhibidor de C1, son suficientes para causar daño marcado a los axones.

La presente invención demuestra que los inhibidores de C protegen los nervios periféricos de la degradación temprana de los axones y descomposición de la mielina debido a una lesión mecánica. Estudios previos sobre enfermedades desmielinizantes del SNP, tales como el síndrome de Guillan-Barré, han sido realizados en los modelos animales inmunizados con mielina del nervio periférico para inducir el fenotipo de la enfermedad, haciendo que sus hallazgos sean directamente aplicables a las enfermedades en las que es probable que un complejo antígeno-anticuerpo medie la activación del complemento. En la DW del nervio periférico después de una lesión por aplastamiento, se produce la activación del complemento de una forma independiente del anticuerpo, dirigiendo directamente los epítomos sobre los axones y la mielina dañados. Por lo tanto, los datos muestran que los inhibidores de C también son prometedoras herramientas en el tratamiento de enfermedades no autoinmunes, tales como neuropatías periféricas hereditarias, donde ha emergido recientemente un papel secundario del sistema inmune superpuesto al defecto genético primario (revisado en Martini R y Toyka, 2004).

Referencias

- Baichwal RR, Bigbee JW, DeVries GH (1988) Macrophage-mediated myelin-related mitogenic factor for cultured Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 1701-1705.
- Bedi KS, Winter J, Berry M, Cohen J (1992) Adult rat dorsal root ganglion neurons extend neurites on predegenerated but not on normal peripheral nerves in vitro. *Eur J Neurosci* 4: 193-200.
- Bhole D and Stahl GL (2004) Molecular basis for complement component 6 (C6) deficiency in rats and mice. *Immunobiology* 209: 559-68.
- Bruck, W (1997) The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Pathol* 7: 741-752.
- Bruck W and Friede RL (1991) The role of complement in myelin phagocytosis during PNS wallerian degeneration. *J Neurol Sci* 103: 182-187.
- Canfield and Morrison (1991) The binding affinity of human IgG for its high affinity Fc receptor is determined by multiple amino acids in the CH2 domain and is modulated by the hinge region. *J. Exp. Med.* 173: 1483-1491.
- Dailey AT, Avellino AM, Benthem L, Silver J, Kliot M. (1998) Complement depletion reduces macrophage infiltration and activation during Wallerian degeneration and axonal regeneration. *J Neurosci* 18(17): 6713-22.
- De Koning P, Brakkee JH, Gispen WH (1986) Methods for producing a reproducible crush in the sciatic and tibial nerve of the rat and rapid and precise testing of return of sensory function. Beneficial effects of melanocortins.

- Journal of Neurological Sciences 74: 237-246.
- Evans MJ, Hartman SL, Wolff DW, Rollins SA, Squinto SP (1995) Rapid expression of an anti-human C5 chimeric Fab utilizing a vector that replicates in COS and 293 cells. *J. Immunol. Meth* 184: 123-138.
- 5 Feasby TE, Gilbert JJ, Hahn AF, Neilson M (1987) Complement depletion suppresses Lewis rat experimental allergic neuritis. *Brain Res* 419: 97-103.
- Fung M, Lu M, Fure H, Sun W, Sun C, Shi NY, Dou Y, Su J, Swanson X, Mollnes TE (2003) Pre-neutralization of C5a-mediated effects by the monoclonal antibody 137-26 reacting with the C5a moiety of native C5 without preventing C5 cleavage. *Clin Exp Immunol* 133(2): 160-9.
- 10 Glass JD. Wallerian degeneration as a window to peripheral neuropathy (2004) *J Neurol Sci* 220: 123-4.
- Griffin JW, George R, Lobato C, Tyor WR, Yan LC, Glass JD (1992) Macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration: relevance to immune-mediated demyelination. *J Neuroimmunol* 40: 153-166.
- Hammerling (1981) *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*. Elsevier, N.Y. 563-681
- Hare GMT, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JP y Hunter RT (1992). Walking track analysis: a long term assessment of peripheral nerve recovery. *Plastic and Reconstructive Surgery* 89: (2) 251-258.
- 15 Harlow (1998) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.
- Hourcade D, Miesner DR, Atkinson JP, Holers VM (1988) Identification of an alternative polyadenylation site in the human C3b/C4b receptor (complement receptor type 1) transcriptional unit and prediction of a secreted form of complement receptor type 1. *J. Exp. Med.* 168: 1255-1270.
- 20 Jerosch-Herold (2005) Assessment of sensibility after nerve injury and repair: a systematic review of evidence for validity, reliability and responsiveness of tests. *J Hand Surg* 30(3): 252-64.
- Jung S, Toyka KV, Hartung HP (1995) Soluble complement receptor type 1 inhibits experimental autoimmune neuritis in Lewis rats. *Neurosci Lett* 200: 167-70.
- Kacani L, Bánki Z, Zwirner J, Schennach H, Bajtaj Z, Erdei A, Stoiber H, Dierich MP (2001) C5a and C5a(desArg) enhance the susceptibility of monocyte-derived macrophages to HIV infection. *J. Immunol* 166: 3410-3415.
- 25 Kiefer R, Kieseier BC, Stoll G, Hartung HP (2001) The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol.* 64(2): 109-127.
- King RHM. *Atlas of peripheral nerve pathology*. New York: Oxford University Press Inc., 1999.
- Klickstein LB, Wong WW, Smith JA, Weis JH, Wilson JG, Fearon DT (1987) Human C3b/C4b receptor (CR1). Demonstration of long homologous repeating domains that are composed of the short consensus repeats characteristics of C3/C4 binding proteins. *J. Exp. Med.* 165: 1095-1112
- 30 Klickstein LB, Bartow TJ, Miletic V, Rabson LD, Smith JA, Fearon DT. (1988) Identification of distinct C3b and C4b recognition sites in the human C3b/C4b receptor (CR1, CD35) by deletion mutagenesis. *J. Exp. Med.* 168: 1699-1717.
- Leinhase I, Holers VM, Thurman JM, Harhausen D, Schmidt OI, Pietzcker M, Taha ME, Rittirsch D, Huber-Lang M, Smith WR, Ward PA, Stahel PF (2006) Reduced neuronal cell death after experimental brain injury in mice lacking a functional alternative pathway of complement activation. *BMC Neurosci* 14;7(1): 55.
- Leonhard C, Muller M, Hickey WF, Ringelstein EB, y Kiefer R (2002) Lesion response of long-term and recently immigrated resident endoneurial macrophages in peripheral nerve explant cultures from bone marrow chimeric mice. *Eur J Neurosci* 16: 1654-1660.
- 40 Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H (1987) Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature* 330: 658-659.
- Martini R y Toyka KV (2004) Immune-mediated components of hereditary demyelinating neuropathies: lessons from animal models and patients. *Lancet Neurol* 3: 457-465.
- 45 McAleer, MA y Sim, RB (1993) *Activators and Inhibitors of Complement*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, ed RB Sim, p. 1-15.
- Mead RJ, Singhrao SK, Neal JW, Lassmann H, Morgan BP (2002) The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury. *J Immunol* 168: 458-465.
- Morgan BP (2000) Measurement of complement hemolytic activity, generation of complement-depleted sera, and production of hemolytic intermediates. *Methods Mol Biol* 150: 61-71.
- 50 Mueller M, Wacker K, Ringelstein EB, Hickey WF, Imai Y, y Kiefer R (2001) Rapid response of identified resident endoneurial macrophages to nerve injury. *Am J Pathol* 159: 2187-2197.
- Mulligan MS, Yeh CG, Rudolph AR, y Ward PA (1992) Protective effects of soluble CR1 in complement- and neutrophil-mediated tissue injury. *J Immunol* 148: 1479-1485.
- Nguyen QT, Sanes JR, Lichtman JW (2002) Pre-existing pathways promote precise projection patterns. *Nat Neurosci.* 5(9): 861-7.
- 55 Oppermann M, Raedt U, Hebell T, Schmidt B, Zimmermann B, Götze O. (1993) Probing the human receptor for C5a anaphylatoxin with site-directed antibodies. Identification of a potential ligand binding site on the NH2-terminal domain. *J. Immunol* 151(7): 3785-3794.
- Piddlesden SJ, Storch MK, Hibbs M, Freeman AM, Lassmann H, y Morgan BP (1994) Soluble recombinant complement receptor 1 inhibits inflammation and demyelination in antibody-mediated demyelinating experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 152: 5477-5484.
- 60 Pulito VL, Roberts VA, Adair JR, Rothermel AL, Collins AM, Varga SS, Martocello C, Bodmer M, Jolliffe LK, Zivin RA. (1996) Humanization and molecular modeling of the anti-CD4 monoclonal antibody, OKT4A. *J. Immunol* 156: 2840-2850.
- 65 Quigg RJ, Kozono Y, Berthiaume D, Lim A, Salant DJ, Weinfeld A, Griffin P, Kremmer E, Holers VM. (1998) Blockade of antibody-induced glomerulonephritis with Cry-Ig, a soluble murine complement inhibitor. *J. Immunol* 160: 4553-9.

- Ramaglia V, King RH, Nourallah M, Wolterman R, de Jonge R, Ramkema M, Vigar MA, van der Wetering S, Morgan BP, Troost D, Baas F (2007) The membrane attack complex of the complement system is essential for rapid Wallerian degeneration. *J Neurosci* 18; 27(29): 7663-72.
- 5 Reid KBM y Law A (1988) *Complement*. IRL Press, Oxford.
- de Smet BJ, de Boer JP, Agterberg J, Rigter G, Bleeker WK, y Hack CE (1993) Clearance of human native, proteinase-complexed, and proteolytically inactivated C1-inhibitor in rats. *Blood* 81: 56-61.
- Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G (1988) Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332: 323-327.
- 10 Tessier-Lavigne M y Goodman CS (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 15;274(5290): 1123-1133.
- Vriesendorp FJ, Flynn RE, Pappolla MA, Koski CL (1995) Complement depletion affects demyelination and inflammation in experimental allergic neuritis. *J Neuroimmunol* 58: 157-165.
- Waller, A (1850) Experiments on the section of glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog and observations on the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. *Phil Trans R Soc Lond.* 140, 423-429.
- 15 Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, Boyle MP, Marsh HC, Jr., Carson GR, Roux KH, Weisfeldt ML, y Fearon DT (1990) Recombinant soluble CR1 suppressed complement activation, inflammation, and necrosis associated with reperfusion of ischemic myocardium. *Trans Assoc Am Physicians* 103: 64-72.
- 20 Wong KH, Coert JH, Robinson PH, Meek MF (2006) Comparison of assessment tools to score recovery of function after repair of traumatic lesions of the median nerve. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 40: 219-24.
- Woodruff TM, Crane JW, Proctor LM, Buller KM, Shek AB, de Vos K, Pollitt S, Williams HM, Shiels IA, Monk PN, Taylor SM (2006) Therapeutic activity of C5a receptor antagonists in a rat model of neurodegeneration. *FASEB J* 20: 1407-1417.
- 25 Xu Y, Oomen R, Klein MH (1994) Residue at position 331 in the IgG1 and IgG4 CH2 domains contributes to their differential ability to bind and activate complement. *J. Biol. Chem* 269: 3468-3474.
- Yu TW y Bargmann CI (2001) Dynamic regulation of axon guidance. *Nat Neurosci* 4: 1169-1176.

Reivindicaciones

- 5 1. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que bloquea un componente del complemento para uso en el tratamiento de la enfermedad o lesión del SNP o SNC facilitando la regeneración de los axones en un sujeto.
2. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en:
- 10 - un anticuerpo que bloquea uno o más de C6, C5, C7, C8 y C9, y
- un anticuerpo que bloquea la convertasa C3 y/o el montaje de CAM.
3. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho anticuerpo bloquea a C6.
- 15 4. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho anticuerpo bloquea a C5.
- 20 5. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico, desimmunizado, humano o humanizado.
6. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 25 7. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fab, un anticuerpo de cadena pesada, o un dominio VHH.
- 30 8. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo es para uso en la obtención de la función sensorial o motora.
9. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo es para uso en la promoción de la regeneración de los nervios que han sido degenerados debido a un trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso periférico o central.
- 35 10. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo es para uso en la promoción de la regeneración de los nervios después de una lesión física de un nervio periférico.
- 40 11. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo es para uso en la promoción de la regeneración de los nervios después de la lesión del SNC o SNP.
- 45 12. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo es para uso en la promoción de la regeneración de los nervios después de un trauma del nervio como resultado de un trastorno o lesión inflamatoria mediada por el sistema inmunológico y/o un trastorno neurodegenerativo progresivo.
- 50 13. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha lesión incluye lesiones quirúrgicas, lesiones de la médula espinal, lesiones traumáticas de nervios periféricos, incluyendo lesiones por colisiones, accidentes de vehículos de motor, heridas por armas de fuego, fracturas, luxaciones y laceraciones.
- 55 14. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo es para uso dentro de 24, 12, 6, 3, 2, o 1 horas, más preferiblemente dentro de 45, 30, 20 o 10 minutos después de la ocurrencia de una lesión nerviosa.

Fig 1

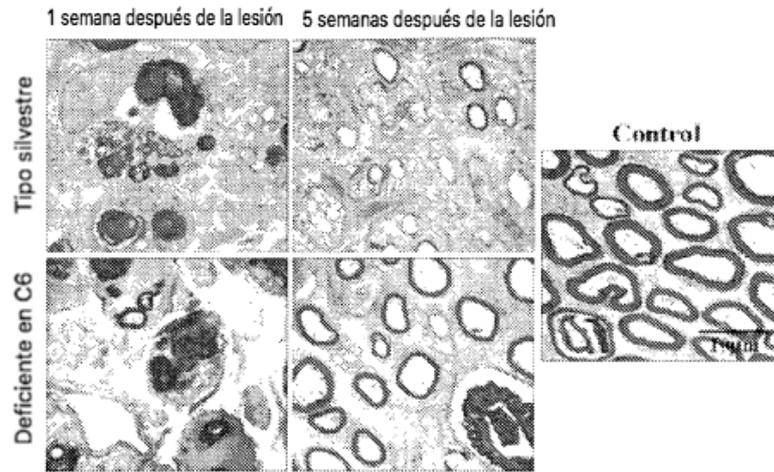


Fig 2

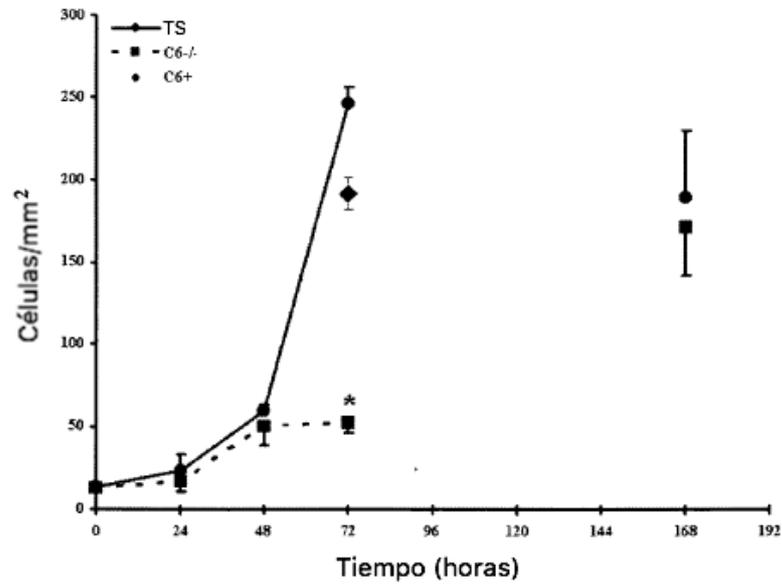


Fig 3

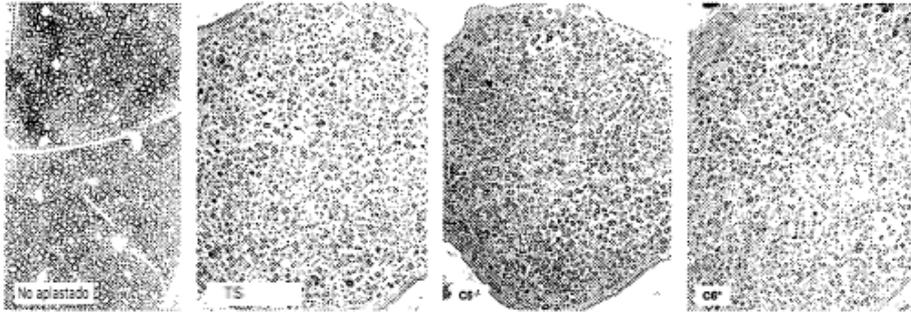


Fig 4

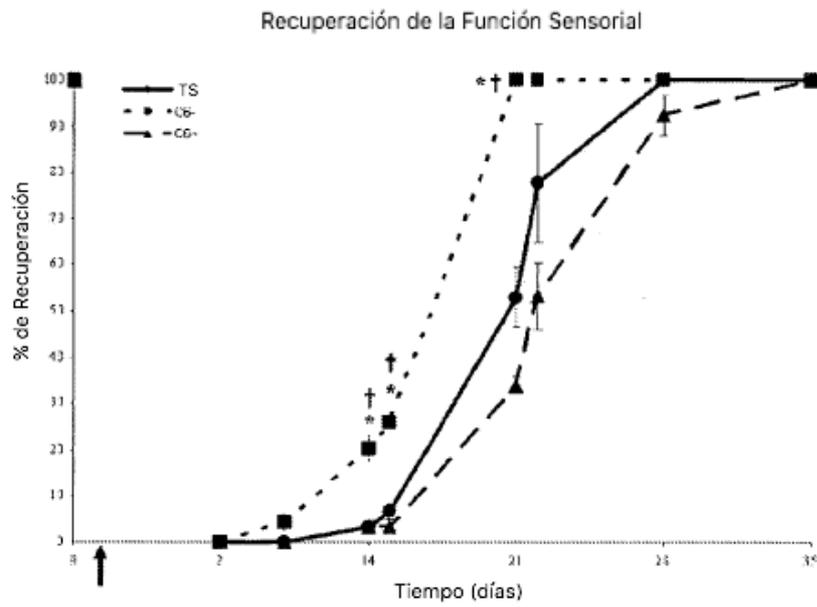


Fig 5

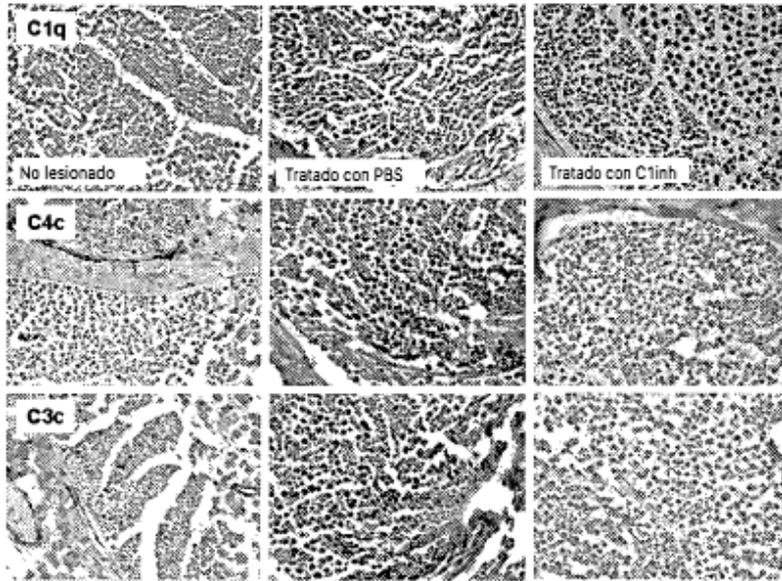


Fig 6

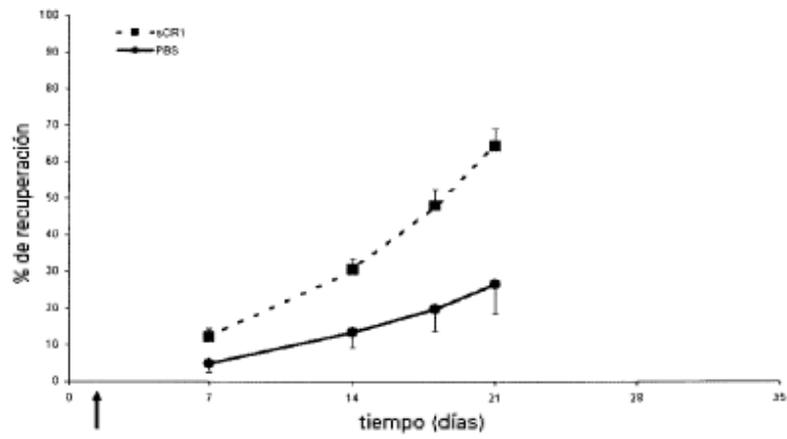


Fig 7

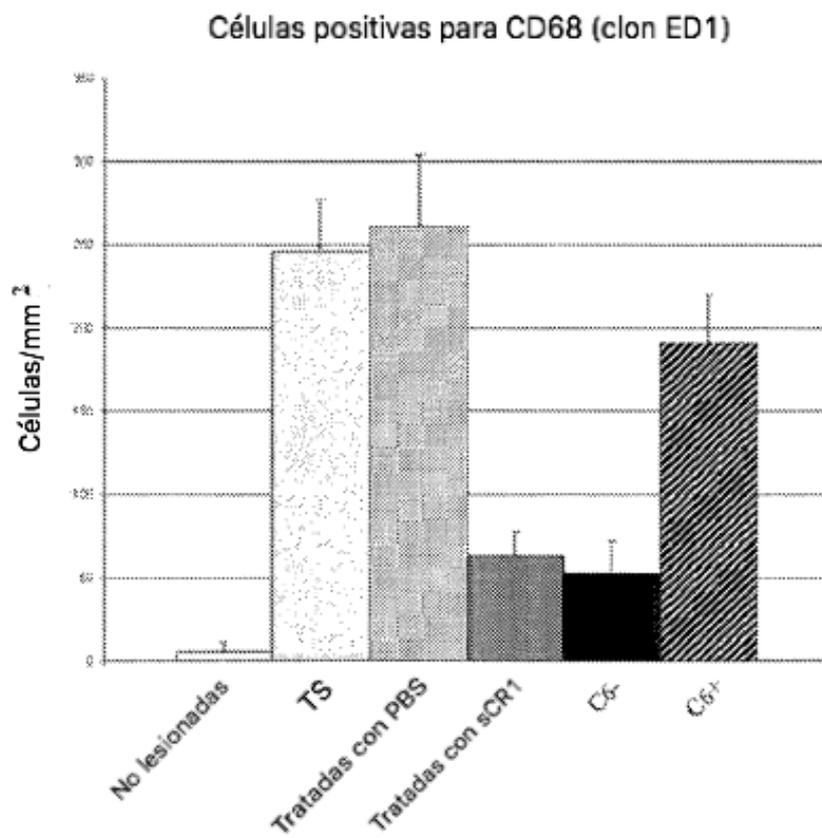


Fig 8a

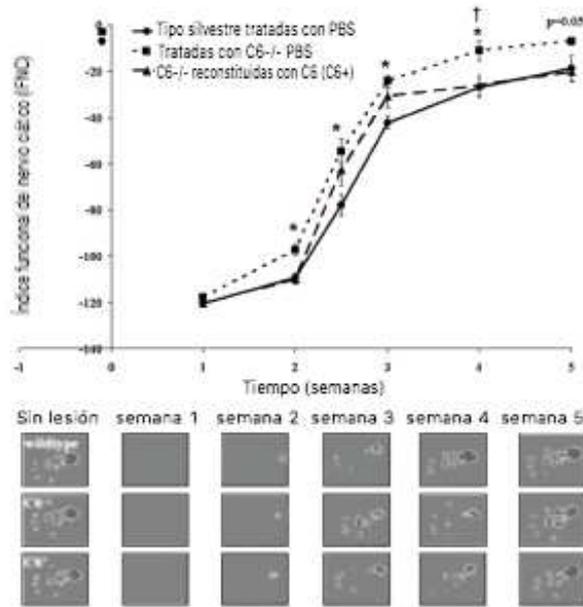


Fig 8b

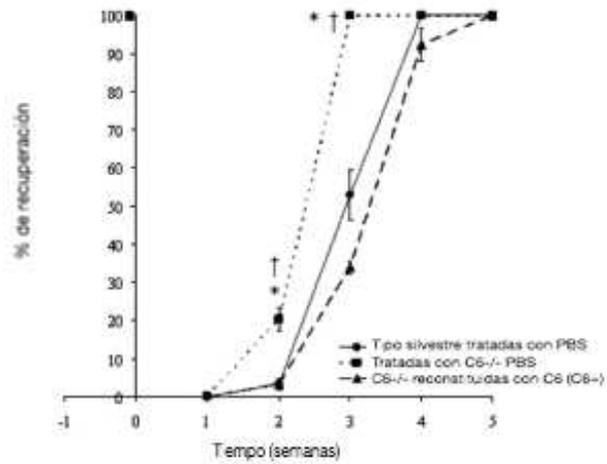


Fig 9

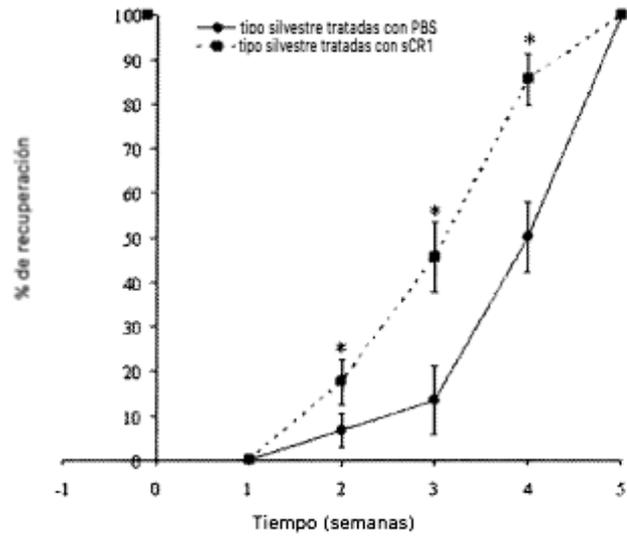


Fig 10

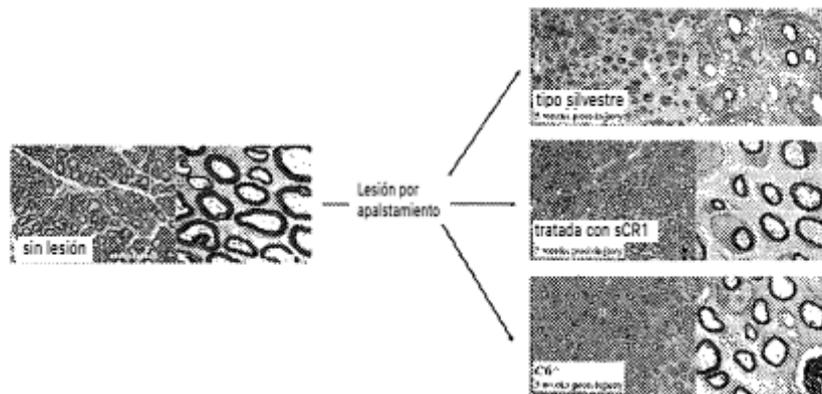


Fig 11a

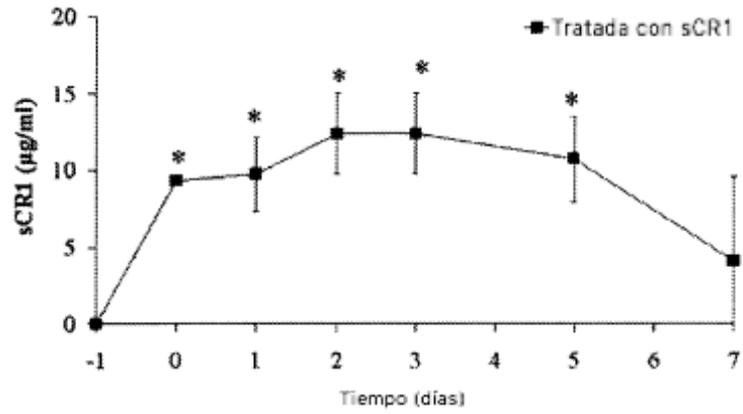


Fig 11b

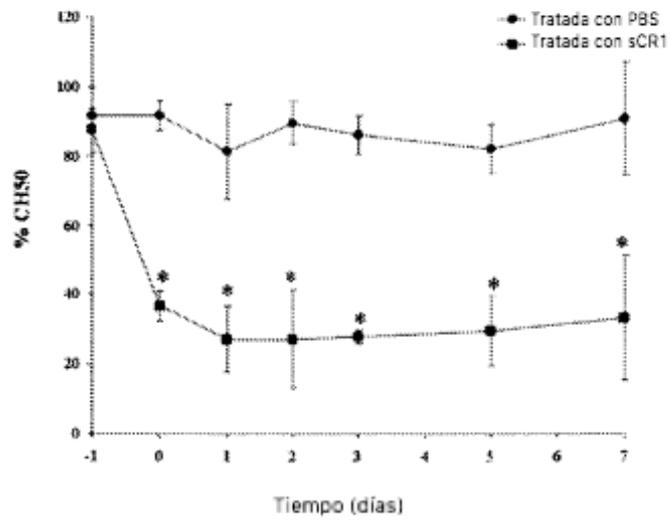


Fig 12

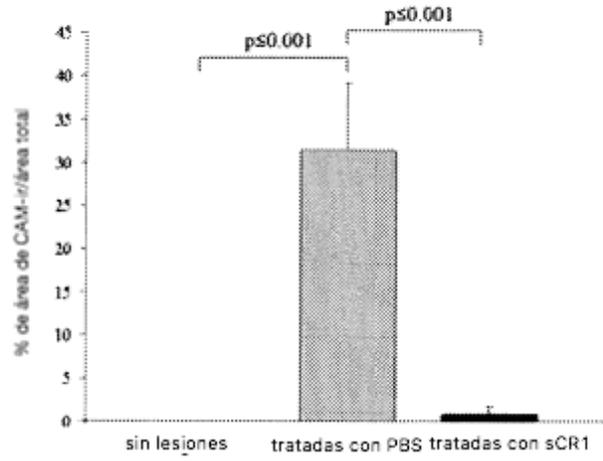


Fig 13

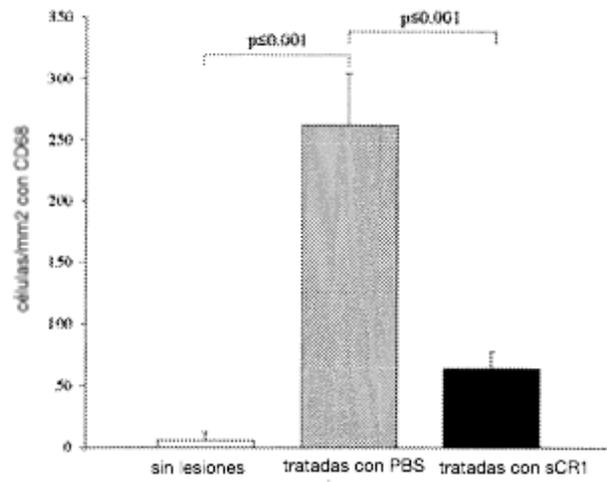


Fig 14a

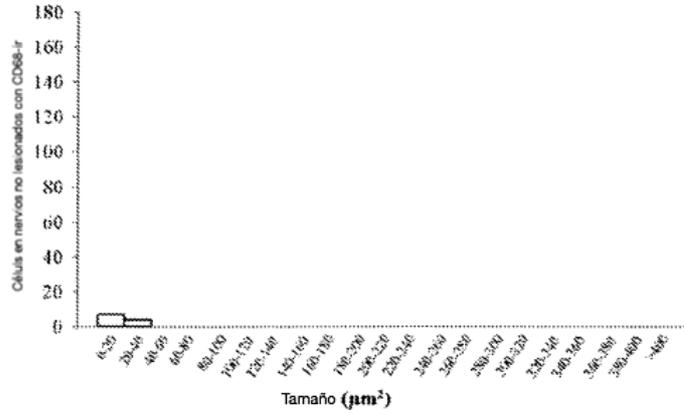


Fig 14b

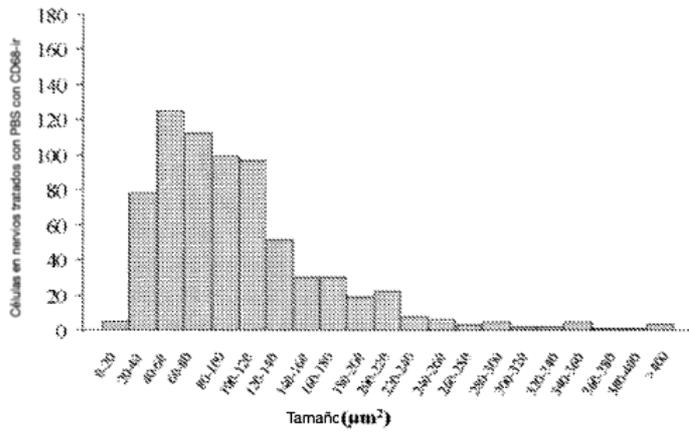


Fig 14c

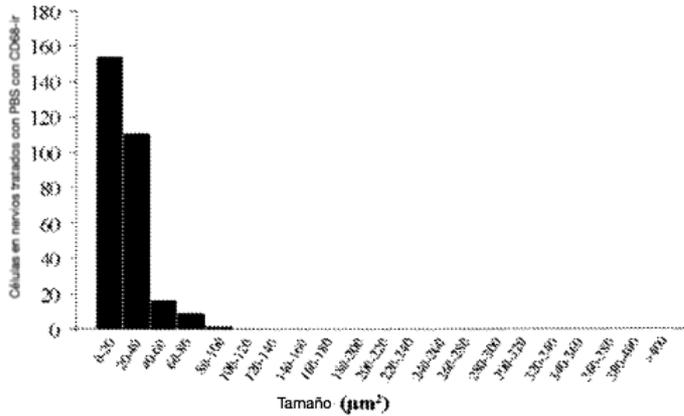


Fig 15a

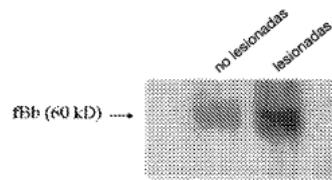


Fig 15b

