

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 863**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/57** (2006.01)

**A61P 7/10** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012 PCT/EP2012/076691**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13093027**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012 E 12808401 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2793935**

54 Título: **Uso de un inhibidor de C1 para el tratamiento de un edema secundario del sistema nervioso central**

30 Prioridad:

**22.12.2011 EP 11195254**

**17.01.2012 US 201261587371 P**

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

**27.10.2016**

73 Titular/es:

**CSL BEHRING GMBH (100.0%)  
Emil-von-Behring-Strasse 76  
35041 Marburg, DE**

72 Inventor/es:

**KLEINSCHNITZ, CHRISTOPH;  
NOLTE, MARC;  
STOLL, GUIDO;  
DICKNEITE, GERHARD;  
SCHULTE, STEFAN;  
NIESWANDT, BERNHARD y  
PRAGST, INGO**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 587 863 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Uso de un inhibidor de C1 para el tratamiento de un edema secundario del sistema nervioso central

El objeto de la presente invención es, en el aspecto más general, la prevención y/o el tratamiento de un edema secundario. En particular, la presente invención se refiere a un inhibidor de C1 para uso en un método para prevenir la formación y/o reducir el tamaño de un edema secundario del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto, en donde el sujeto tiene o ha tenido al menos un trastorno seleccionado a partir del grupo que consiste en ictus, ictus isquémico, ictus hemorrágico, ictus perinatal, lesión cerebral traumática y lesión de la médula espinal. Preferiblemente, el edema secundario del SNC es un edema cerebral secundario. Otro objeto de la presente invención es el tratamiento de trastornos asociados con un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica o la barrera hemato-medular. Y un tercer objeto es un inhibidor de C1 obtenido a partir del plasma para uso en un método de prevención, reducción o tratamiento de una lesión cerebral por isquemia-reperusión.

En esta memoria descriptiva se citan una serie de documentos.

La patología de la isquemia cerebral y la posterior lesión debida a reperusión (lesión cerebral por isquemia-reperusión) es compleja e implica un gran número de rutas moleculares y celulares diferentes. Entre ellas, una característica de la persistencia de isquemia es la desintegración estructural de la barrera hematoencefálica que, en consecuencia, conduce a la formación de edema cerebral. Un edema excesivo puede dañar regiones del cerebro que por lo demás están sanas, simplemente mediante una compresión mecánica y es una causa frecuente de empeoramiento de los síntomas neurológicos en pacientes con ictus. Hasta la fecha, no hay estrategias convincentes con una base farmacológica, para combatir la formación de edema en el ictus isquémico agudo.

El edema cerebral se define como un aumento del volumen del cerebro que es el resultado de una acumulación anormal, localizada o difusa de líquido dentro del parénquima cerebral. En general, el edema cerebral se clasifica en 4 grupos diferentes: edema vasogénico, citotóxico, hidrocefálico (o intersticial) y osmótico (o hipostático). A pesar de esta clasificación de formas distintas de edema, en la mayoría de las situaciones clínicas existe una combinación de diferentes tipos de edema, en función de la evolución temporal de la enfermedad. En cuanto a la formación de un edema posterior a un flujo sanguíneo cerebral perturbado y sangrado cerebral, el edema cerebral citotóxico y/o el edema vasogénico parece tener funciones importantes. Además, de cara a los mediadores implicados en la formación de un edema cerebral, se pueden mencionar muchos mediadores (por ejemplo, bradicinina), que tienen muchas propiedades además de sus efectos sobre la formación de un edema cerebral (Nag et al. (2009) *Acta Neuropathol.*; 118:197-217).

Inicialmente, en el edema cerebral, los cambios en el volumen del cerebro están compensados por una disminución en el volumen de líquido cefalorraquídeo y sangre, por lo que el edema cerebral primario es principalmente un edema citotóxico. En las lesiones hemisféricas grandes, una inflamación progresiva supera estos mecanismos de compensación y un incremento de la presión intracraneal (es decir, formación de edema cerebral secundario o maligno) produce herniaciones en el tejido cerebral que conducen a la muerte. Por lo tanto, el edema cerebral vasogénico, maligno continúa siendo una causa principal de mortalidad, después de diversos tipos de patologías cerebrales, tales como infartos cerebrales graves, hemorragias, traumatismos, infecciones y tumores cerebrales. La falta de un tratamiento eficaz contra el edema cerebral sigue siendo un estímulo para un interés e investigación constantes.

En cuanto al ictus isquémico, el edema cerebral secundario es una causa frecuente de crecimiento del infarto secundario y posterior deterioro de los síntomas neurológicos en el curso de un ictus isquémico (Ayata y Ropper (2002) *J Clin Neurosci.*; 9:113-124; Bardutzky y Schwab (2007) *Stroke*; 38:3084-3094). En el ictus isquémico, un infarto maligno de la arteria cerebral media (ACM) es un término usado para describir un infarto del territorio completo de la ACM con un efecto que ocupa un espacio significativo y herniación del tejido cerebral. La incidencia del infarto maligno de la ACM se estima en menos del 1% de los ictus. La mortalidad con formas conservadoras de tratamiento médico es de aproximadamente el 80% y el coma termina en muerte cerebral 2-5 días después del inicio. La muerte generalmente se produce por una inflamación progresiva del tejido cerebral isquémico, cambios del tejido cerebral, incremento focal de la presión intracraneal y la extensión de la isquemia a territorios vasculares adyacentes. Los supervivientes de este tipo de ictus están inválidos, con mala calidad de vida. Hasta la fecha, ningún medicamento ha mostrado poder reducir el edema cerebral de forma persistente en la isquemia cerebral y, muchas veces la última metodología de tratamiento como procedimiento para salvar vidas es la hemicraniectomía descompresiva. Además, los mecanismos moleculares subyacentes a la formación de edema y la posterior degeneración neuronal en el ictus isquémico, son en gran parte desconocidos.

El sistema de calicreína-cinina (KKS) se inicia con el factor XII de la coagulación de la sangre (FXII, factor de Hageman) y tiene un papel importante en la regulación de la permeabilidad vascular y la formación de edema (Leeb-Lundberg et al. (2005) *Pharmacol. Rev.*; 571:27-77). La activación del KKS se ha mostrado recientemente también en pacientes con ictus (Wagner et al. (2002) *J. Neurol. Sci.*; 202:75-76). Las cininas (por ejemplo, bradicinina, calidina) constituyen los productos finales del KKS. Las cininas son hormonas peptídicas proinflamatorias muy activas que son liberadas por las calicreínas desde sus precursores, cininógenos, durante diversos tipos de lesión tisular, incluyendo la isquemia cerebral. Los efectos celulares de las cininas están mediados por dos receptores de bradicinina diferentes, B1R y B2R. La activación de estos receptores desencadena procesos inflamatorios en el órgano

diana, tales como la liberación de citocinas proinflamatorias o la atracción de células inmunes, así como un aumento de la permeabilidad vascular.

Recientemente, el bloqueo de B1R, pero no B2R, reducía la lesión de la barrera hematoencefálica y la formación de edema en modelos experimentales de isquemia cerebral focal (Austinat et al. (2009) *Stroke*; 40:285-293) y de lesión cerebral traumática (Raslan et al. (2010) *J. Cereb. Blood Flow Metab.*; 30:1477-1486) en ratones, lo que sugiere una relevancia funcional del KKS sobre la formación de edema cerebral en la fase aguda del ictus isquémico y la lesión cerebral traumática.

En estudios de prevención de la activación del KKS a través de la inhibición de FXII, que se activa fisiológicamente después de entrar en contacto con superficies cargadas negativamente (activación por contacto), se investigó el resultado neuropatológico después de un ictus experimental agudo (Hagedorn et al. (2010) *Circulation*; 121:1510-1517; Kleinschnitz et al. (2006) *JEM*; 203(3):513).

El inhibidor de la C1 esterasa (C1-INH) es una glicoproteína de 478 aminoácidos que pertenece a la superfamilia de inhibidores de la proteasa de serina, denominados serpinas. Su designación tiene origen en la descripción inicial como el único inhibidor fisiológico conocido de la vía clásica del complemento en la sangre y el tejido. Sin embargo, C1-INH es también un importante regulador del KKS mediante el bloqueo de FXII activado y la calicreína plasmática. Además de muchas otras funciones (por ejemplo, inhibición de FXIa), es el único inhibidor fisiológico conocido de C1s y C1r, las proteasas de serina homólogas activadas del primer componente del sistema del complemento.

Estudios previos han demostrado un papel beneficioso de las formulaciones de C1-INH en modelos animales de ictus isquémico en sí mismo (De Simoni et al. (2004) *Am. J. Pathol.*; 164:1857-1863; Gesuete et al. (2009) *Ann. Neurol.*; 66:332-342), así como de la lesión cerebral traumática (Longhi et al. (2009) *Crit. Care Med.*; 37:659-665) y de la lesión traumática de la médula espinal (Tei et al. (2008) *Neurol. Res.*; 30:761-767), pero los mecanismos moleculares subyacentes se desconocen en gran parte. Por otra parte, estos estudios se centran en los resultados neuropatológicos agudos mientras que los efectos sobre el edema cerebral (secundario), es decir, la prevención de su formación y/o la reducción de su tamaño, no se han descrito. Además, de Simoni et al. (2004; *Am. J. Pathol.*; 164:1857-1863) dan a conocer que el inhibidor de C1 obtenido a partir de plasma (15 U/ratón) solo era eficaz en el modelo murino de lesión por isquemia/reperfusión cuando se administraba al inicio de la reperfusión, pero perdía completamente la eficacia cuando se administraba 30 minutos después del inicio de la reperfusión.

Por lo tanto, es evidente que todavía existe una necesidad de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de un edema cerebral secundario que se produce después de una oclusión de un vaso sanguíneo en el cerebro. Por lo tanto, un objeto de la presente invención es satisfacer tal necesidad.

Por lo tanto, el problema técnico subyacente de la presente invención era proporcionar medios y métodos alternativos y/o mejorados que se dirijan con éxito al edema cerebral secundario, que formen la base o puedan permitir el desarrollo de medicamentos más satisfactorios para el tratamiento y/o la prevención del edema cerebral secundario.

La solución de este problema técnico se consigue proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

Sorprendentemente, el solicitante ha descubierto que un edema cerebral secundario que se produce con posterioridad a una lesión inicial, se podría prevenir o reducir mediante la administración de inhibidor de C1. Una lesión inicial o un trastorno primario de este tipo podría ser una oclusión de un vaso sanguíneo en el cerebro, por ejemplo, un ictus isquémico o una hemorragia en el cerebro, por ejemplo, un ictus hemorrágico.

Por consiguiente, en general, la presente invención se refiere a un inhibidor de C1 para uso en un método para prevenir la formación y/o reducir el tamaño de un edema secundario del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto, en donde el sujeto tiene o ha tenido al menos un trastorno seleccionado a partir del grupo que consiste en ictus, ictus isquémico, ictus hemorrágico, ictus perinatal, lesión cerebral traumática y lesión de la médula espinal. En particular, el ictus hemorrágico es una hemorragia cerebral o una hemorragia subaracnoidea.

En una realización preferida de la invención, el edema secundario del sistema nervioso central (SNC) es un edema cerebral secundario o un edema secundario de la médula espinal.

De acuerdo con la presente invención, las expresiones "inhibidor de C1", "inhibidor de la C1 esterasa" y "C1-INH" se refieren a las proteínas o fragmentos de las mismas que actúan como inhibidores de la proteasa de serina para inhibir proteasas asociadas con el sistema del complemento, preferiblemente las proteasas C1r y C1s, así como MASP-1 y MASP-2, con el sistema de calicreína-cinina, preferiblemente calicreína plasmática y factor XIIa, y con el sistema de coagulación, preferiblemente el factor XIa. Además, C1-INH puede servir como una molécula antiinflamatoria que reduce la adhesión de leucocitos mediada por selectinas, a las células endoteliales. C1-INH tal como se utiliza en esta memoria puede ser un inhibidor de la proteasa de serina natural o un fragmento activo del mismo, o puede comprender un péptido recombinante, un péptido sintético, un mimético de péptido o un fragmento peptídico que proporcione propiedades funcionales similares - por ejemplo, la inhibición de las proteasas C1 y C1s, y/o MASP-1 y MASP-2 y/o el factor XIIa y/o el factor XIa. Para una descripción adicional en relación con la estructura y la función del inhibidor de C1, véanse los documentos de patente de EE.UU. 4.915.945; patente de EE.UU. 5.939.389;

patente de EE.UU. 6.248.365; patente de EE.UU. 7.053.176; y WO 2007/073186.

Por lo tanto, en una realización preferida de la presente invención, el inhibidor es un inhibidor de C1 obtenido a partir del plasma o recombinante. En una realización preferida adicional, dicho inhibidor es idéntico a la proteína humana de origen natural o a una variante de la misma. El C1-INH incluirá todos los alelos de origen natural que tienen la misma función que el inhibidor de C1. En la realización más preferida, dicho inhibidor es el inhibidor de la C1 esterase humana.

En otra realización preferida, el inhibidor de C1 de acuerdo con la presente invención, se modifica para mejorar la biodisponibilidad y/o la semivida, para mejorar la eficacia y/o para reducir los efectos secundarios potenciales. La modificación se puede realizar mediante etapas recombinantes o de otro tipo. Ejemplos de tal modificación podría ser una glicosilación o una fusión de albúmina del inhibidor de C1 descrito. Para una descripción adicional con respecto a la glicosilación y la fusión de albúmina de proteínas, véase el documento WO 01/79271, que se incorpora en esta memoria en su totalidad.

En diversas realizaciones, el inhibidor de C1 se puede producir de acuerdo con métodos conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, el C1-INH obtenido a partir de plasma se puede preparar recogiendo plasma sanguíneo de varios donantes. Los donantes de plasma deben estar sanos tal y como se define en la técnica. Preferiblemente, el plasma de varios (1000 o más) donantes sanos se agrupa y opcionalmente se procesa adicionalmente. Un procedimiento ejemplar para la preparación del inhibidor de C1 con fines terapéuticos, se describe en el documento de patente de EE.UU. 4.915.945, cuya descripción se incorpora en esta memoria en su totalidad. Alternativamente, en algunas realizaciones, C1-INH se puede recoger y concentrar a partir de fuentes de tejidos naturales, utilizando métodos conocidos en la técnica. Los productos disponibles comercialmente que comprenden inhibidor de C1 se obtienen, por ejemplo, a partir del plasma, Cinryze® (ViroPharma), recombinantes, Ruconest® o Rhucin® (ambos Pharming), y a partir del plasma, Berinert® (CSL Behring). Berinert® está indicado para el tratamiento de angioedema hereditario y deficiencias congénitas. C1-INH recombinante se puede preparar por métodos conocidos.

La expresión "edema del sistema nervioso central" o "edema del SNC" se refiere a una acumulación excesiva de líquido en los espacios intracelulares y/o extracelulares del sistema nervioso central (SNC). El término "edema del cerebro" o "edema cerebral" se refiere a una acumulación excesiva de líquido en los espacios intracelulares y/o extracelulares del cerebro. La fisiopatología, incluso de un edema agudo o primario del SNC, preferiblemente la formación de un edema cerebral primario, y en particular la aparición de un edema maligno o secundario, retardado temporalmente (es decir, horas o días después del inicio del ictus) del SNC, preferiblemente un edema cerebral secundario, y sus mecanismos patológicos (moleculares) implicados se desconocen en gran parte y parecen ser bastante complejos. En cuanto a la formación de un edema posterior a un flujo sanguíneo cerebral perturbado y un sangrado cerebral, el edema cerebral vasogénico y/o citotóxico parece tener un papel importante.

El edema primario del SNC, preferiblemente el edema cerebral primario, es un edema que se produce durante la lesión inicial, o poco o inmediatamente después (es decir, en cuestión de minutos) de la lesión. Es principalmente un edema citotóxico que se produce por una absorción anormal de líquido en las células cerebrales lesionadas.

En contraste, el edema secundario del SNC, preferiblemente, el edema cerebral secundario, se produce más tarde, es decir, horas o incluso días después de la lesión, y es principalmente un edema vasogénico. Por ejemplo, en una lesión cerebral traumática (LCT), el edema cerebral maligno es una complicación rara (<10%), pero frecuentemente fatal (~100%). Se diagnostica mediante un rápido aumento de la presión intracraneal (PIC) horas después de la lesión que es refractaria al tratamiento médico.

Por lo tanto, tal y como se usa en el presente documento, las expresiones "edema secundario del cerebro" o "edema cerebral secundario" o "edema maligno del cerebro" o "edema cerebral maligno" se refieren a cualquier inflamación retardada del cerebro después de la lesión, es decir, la inflamación tardía se produce en cuestión de horas o días después de la lesión inicial. En particular, el edema cerebral secundario de acuerdo con la invención es sustancialmente un edema vasogénico. En este tipo de edema, debido a la ruptura de la barrera hematoencefálica, las proteínas intravasculares que normalmente están excluidas y el fluido penetran en el espacio extracelular del parénquima cerebral. Una vez que los componentes del plasma atraviesan la barrera hematoencefálica, el edema se expande y esto puede ser muy rápido y generalizado.

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "edema secundario de la médula espinal" se refiere a cualquier inflamación retardada posterior a una lesión de la médula espinal, es decir, la inflamación tardía se produce en cuestión de horas o días después de la lesión inicial. En particular, el edema secundario de la médula espinal de acuerdo con la invención es sustancialmente un edema vasogénico. En este tipo de edema, las proteínas intravasculares que normalmente están excluidas y el fluido penetran en el espacio extracelular del parénquima cerebral. Una vez que los componentes del plasma cruzan la barrera hematomedular, el edema se expande y esto puede ser muy rápido y generalizado.

Preferiblemente, el edema secundario se produce de 1 a 10 días, más preferiblemente de 2 a 5 días después de la lesión inicial, lo que conduce a al menos un trastorno que está relacionado con el edema cerebral secundario. En algunas realizaciones, el edema secundario aparece 2, 3, 4 o 5 días después de la lesión inicial o en cualquier mo-

mento entre tanto.

La expresión "prevención de la formación de un edema secundario" se refiere a métodos de uso del inhibidor de C1 en donde se previene la formación de un edema secundario de forma total o parcial. La prevención de la formación de un edema secundario significa en su conjunto que un edema secundario no se produce en absoluto si se administra el inhibidor de C1 antes de la formación. La prevención de la formación de un edema secundario significa en parte reducir el tamaño de un edema secundario en un escenario en el que se administra el inhibidor de C1 en un momento anterior a cuando el edema secundario haya comenzado a producirse y el tamaño del edema que se produce más tarde será menor que el tamaño de un edema en un paciente no tratado. En una realización preferida de la invención, el tamaño del edema secundario, es decir, el volumen del edema secundario, se evita por lo menos en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% (o en cualquier porcentaje intermedio), en comparación con el tamaño de un edema secundario sin tratar.

Tal como se utiliza en este documento, el término "reducir" comprende disminuir la probabilidad de un edema secundario en un individuo o en un animal, disminuyendo la gravedad de cualquier síntoma, y/o disminuyendo la proporción de pacientes en una población con riesgo de edema secundario, después de una lesión inicial. Por lo tanto, "reducir" se refiere a la disminución, reducción, declinación, limitación, corrección o mejora de una afección de edema secundario. La reducción del tamaño de un edema secundario puede incluir, por ejemplo, la protección frente a la aparición de un edema secundario; la reducción del riesgo de un edema secundario, la reducción de la gravedad de un edema secundario a medida que se desarrolla, o una vez que se ha desarrollado; limitar la lesión de un edema secundario; reducir la extensión de un edema secundario, por ejemplo, limitar el volumen del edema desarrollado después de una lesión inicial; o mejorar las afecciones en el cerebro o la médula espinal asociadas con un edema secundario.

La expresión "reducir el tamaño de un edema secundario" se refiere a métodos de uso del inhibidor de C1 en donde el tamaño de un edema secundario se reduce de forma independiente de si la formación del edema secundario se ha iniciado en el momento de la administración o no. Por lo tanto, reducir el tamaño de un edema secundario significa reducir el volumen de un edema secundario en un escenario en el que el inhibidor de C1 se administra para reducir el tamaño de un edema secundario ya existente, lo que se producirá después de la administración, así como en un escenario en el que el C1-INH se administra para reducir el tamaño de un edema secundario que ya se ha producido, pero que sigue creciendo. En una realización preferida de la invención, reducir el tamaño de un edema secundario significa que el tamaño del edema secundario se reduce en al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% (o en cualquier porcentaje intermedio), en comparación con el tamaño o el volumen del edema secundario sin tratar, es decir, en ausencia de terapia.

Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, el tamaño del edema secundario se reduce en al menos un 10%, preferiblemente en al menos un 20%, más preferiblemente en al menos un 30%, más preferiblemente en al menos un 40%, más preferiblemente en al menos un 50%, más preferiblemente en al menos un 60%, más preferiblemente en al menos un 70%, más preferiblemente en al menos un 80%, más preferiblemente en al menos un 90%, en comparación con el volumen del edema secundario sin tratar.

En ciertas realizaciones de la invención, dicho tratamiento de un edema secundario en un sujeto es profiláctico y/o terapéutico. El uso del inhibidor de C1 de acuerdo con la invención se puede emplear de forma profiláctica y/o terapéutica para prevenir la formación de un edema secundario y/o para reducir el tamaño de un edema secundario.

El trastorno que se relaciona con el edema secundario es inducido por un daño inicial, que en el presente documento se utiliza como alternativa a la expresión "lesión inicial", es decir, la lesión inicial conduce a al menos un trastorno que se relaciona con el edema secundario. Un ejemplo de una lesión inicial de acuerdo con la presente invención, es una isquemia cerebral. Preferiblemente, esta lesión inicial podría ser una oclusión de un vaso sanguíneo, por ejemplo, un ictus isquémico, o una hemorragia, por ejemplo, un ictus hemorrágico. Más preferiblemente, la lesión inicial es una oclusión de un vaso sanguíneo en el cerebro o una hemorragia en el cerebro.

El al menos un trastorno, que está relacionado con el edema secundario, se selecciona a partir del grupo que consiste en ictus, ictus isquémico, ictus hemorrágico, ictus perinatal, lesión cerebral traumática y lesión de la médula espinal.

El término "ictus", tal y como se usa en la presente invención es bien conocido en la técnica y en ocasiones también se hace referencia al mismo como accidente cerebrovascular (ACV) o infarto cerebral. Un ictus es una afección médica que se define médicamente por una reducción del suministro de sangre al cerebro, dando como resultado una pérdida de la función cerebral, entre otras cosas debido a isquemia. Dicha reducción en el suministro sanguíneo puede ser debida, por ejemplo, a una trombosis o embolia. Además el ictus puede estar causado por procesos hemorrágicos. Por lo tanto, los ictus se clasifican generalmente en dos categorías principales, a saber, i) ictus isquémico e ii) ictus hemorrágico. La isquemia es debida a una interrupción de la circulación sanguínea y la hemorragia se debe a una ruptura de un vaso sanguíneo o una estructura vascular anormal, conduciendo ambos escenarios en última instancia a una lesión del tejido cerebral. Alrededor del 87% de los ictus están causados por isquemia, y el resto por hemorragia. Algunos desarrollan hemorragias dentro de la zona de la isquemia ("transformación hemorrágica"). Se desconoce el número de hemorragias que en realidad comienzan como un ictus isquémico.

De acuerdo con la presente invención, dicho ictus, es por lo tanto preferiblemente un ictus isquémico o un ictus hemorrágico.

5 En un ictus isquémico, el suministro de sangre a una parte del cerebro disminuye, lo que lleva a una disfunción y necrosis del tejido cerebral en esa zona. Existen principalmente tres razones causales: trombosis (obstrucción de un vaso sanguíneo por un coágulo sanguíneo que se forma localmente), embolia (ídem, debido a un coágulo de sangre/émbolo procedente de otra parte del cuerpo) e hipoperfusión sistémica (disminución general del suministro de sangre, por ejemplo, en choque). De acuerdo con la invención, la trombosis se puede producir preferiblemente en arterias, venas, arteriolas, vénulas y capilares mientras que la embolia puede ocurrir preferentemente en las arterias, arteriolas y capilares.

10 Un ictus hemorrágico, es decir, una hemorragia intracraneal, es una acumulación de sangre en cualquier lugar dentro de la bóveda craneal. Se hace una distinción entre hemorragia intra-axial (sangre dentro del cerebro) y hemorragia extra-axial (sangre dentro del cráneo pero fuera del cerebro).

En una realización particularmente preferida de la invención, dicho ictus hemorrágico es una hemorragia cerebral o una hemorragia subaracnoidea.

15 Una hemorragia cerebral o una hemorragia intracerebral es un subtipo de hemorragia intracraneal que se produce dentro del propio tejido cerebral. La hemorragia cerebral puede ser debida a hipertensión crónica o a traumatismo cerebral, o puede estar inducida por fármacos, por ejemplo, por un tratamiento antiplaquetario (por ejemplo, ácido acetilsalicílico) o por un tratamiento anticoagulador (por ejemplo, antagonistas de la vitamina K como fenprocumón), o puede ocurrir de forma espontánea en un ictus hemorrágico. Una hemorragia intracerebral no traumática es una  
20 hemorragia espontánea en el tejido cerebral. Una hemorragia cerebral es una hemorragia intra-axial; es decir, que se produce en el tejido cerebral más que en un lugar fuera del mismo. Hay dos tipos principales de hemorragias intra-axiales: la hemorragia intraparenquimatosa y la hemorragia intraventricular (sangre en el sistema ventricular). La otra categoría de hemorragia intracraneal es la hemorragia extra-axial, tal como hematoma epidural, subdural, subaracnoidea, todas las cuales se producen dentro del cráneo pero fuera del tejido cerebral.

25 Una hemorragia subaracnoidea es un sangrado en el espacio subaracnoideo - el área entre la membrana aracnoidea y la piamadre que rodea el cerebro. Esto puede ocurrir espontáneamente, por lo general a causa de un aneurisma cerebral roto, o puede ser el resultado de una lesión en la cabeza.

30 Un ictus perinatal, tal y como se emplea en la presente invención, es una enfermedad focal de los vasos sanguíneos cerebrales que conduce a una lesión en el cerebro durante el periodo fetal o de recién nacido. Perinatal se refiere al período de tiempo que se extiende desde la mitad del embarazo (vida fetal) hasta el nacimiento y el primer mes de vida. Por lo tanto, un ictus perinatal significa un ictus que se produce en un bebé en cualquier momento después de 28 semanas de embarazo hasta 28 días después del nacimiento. En algunos casos, esto puede conducir a una epilepsia infantil.

35 Una lesión cerebral traumática (LCT), también conocida como lesión intracraneal, de acuerdo con la presente invención, se produce cuando una fuerza externa lesiona traumáticamente el cerebro. La LCT se puede clasificar en función de la gravedad, el mecanismo (lesión en la cabeza cerrada o penetrante) u otras características (por ejemplo, tiene lugar en un lugar específico o sobre un área extendida) y puede causar una serie de efectos físicos, cognitivos, sociales, emocionales y de comportamiento, y el resultado puede variar desde una recuperación completa hasta una incapacidad permanente o la muerte. La lesión cerebral traumática se define como una lesión en el cerebro como  
40 resultado de una fuerza mecánica externa, tal como una aceleración o desaceleración rápidas, un impacto, ondas de choque o la penetración de un proyectil. La función del cerebro se ve afectada de forma temporal o permanente y el daño estructural puede ser detectable o no con la tecnología actual.

45 La expresión "lesión de la médula espinal" (LME) tal y como se emplea en este documento, se refiere a cualquier lesión de la médula espinal que es debida a un traumatismo en lugar de una enfermedad. Dependiendo de donde se lesione la médula espinal y las raíces nerviosas, los síntomas pueden variar ampliamente, desde dolor a parálisis, hasta incontinencia. Las lesiones de la médula espinal se describen a distintos niveles como "incompletas", que pueden variar desde no tener ningún efecto sobre el paciente hasta una lesión "completa", que significa una pérdida total de la función: las lesiones de la médula espinal tienen muchas causas, pero por lo general se asocian a traumas graves debidos, p. ej., a accidentes de vehículos de motor, caídas, lesiones deportivas y violencia.

50 En ciertas realizaciones de la invención, el sujeto que tiene la lesión inicial es un sujeto que no carece congénitamente del inhibidor de C1, es decir, el inhibidor de C1 no se administra a un sujeto que tiene una carencia congénita de inhibidor de la esterasa de C1.

55 En una realización preferida de la invención, el inhibidor de C1 se usa para prevenir la formación y/o para reducir el tamaño de un edema secundario en un ser humano, es decir, un objeto preferido de la invención es un ser humano. Pero de acuerdo con la invención, el inhibidor de C1 también se puede administrar a un sujeto que es un animal, preferiblemente un animal doméstico, más preferiblemente un perro, un gato o un caballo.

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende C1-INH se prepara para uso en el tratamien-

to de edema secundario del SNC. Los métodos para la formulación de composiciones farmacéuticas que comprenden C1-INH son conocidos en la técnica. Por ejemplo, si se proporciona una forma en polvo o liofilizada de C1-INH (por ejemplo, mediante liofilización) y se desea un producto farmacéutico acuoso, el polvo se puede disolver mezclando con componentes acuosos de la formulación farmacéutica y agitando, usando técnicas adecuadas, tales como agitación con formación de vórtice o agitación suave. En otras realizaciones, C1-INH se proporciona en forma liofilizada y se combina con componentes farmacéuticos acuosos (por ejemplo, componentes activos adicionales o componentes inactivos tales como cargas, estabilizadores, disolventes o vehículos) antes de la administración.

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica puede comprender al menos un aditivo tal como una carga, agente de carga, tampón, estabilizador o excipiente. Las técnicas de formulación farmacéutica convencionales son bien conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, 2005 Physicians' Desk Reference®, Thomson Healthcare: Montvale, NJ, 2004; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª ed., Gennado et al., compiladores, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000). Los aditivos farmacéuticos adecuados incluyen, por ejemplo, manitol, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas también pueden contener reactivos tamponadores del pH y agentes humectantes o emulsionantes. En realizaciones adicionales, las composiciones pueden contener conservantes o estabilizantes.

La formulación de composiciones farmacéuticas puede variar dependiendo de la vía de administración deseada y otros parámetros (véase, por ejemplo, Rowe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4ª ed., APhA Publications, 2003). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede ser una torta liofilizada o polvo. La composición liofilizada se puede reconstituir para una administración mediante inyección intravenosa, por ejemplo, con agua estéril para inyección, USP. En otras realizaciones, la composición puede ser una solución estéril, no pirógena. En todavía otras realizaciones, la composición se suministra en forma de polvo en una píldora o comprimido.

Las composiciones farmacéuticas descritas pueden comprender C1-INH como únicos compuestos activos o se pueden administrar en combinación con al menos otro compuesto, composición o material biológico. Ejemplos de tales compuestos incluyen vitaminas, antibióticos o compuestos destinados a eliminar o inhibir la formación de coágulos de sangre en el cerebro (por ejemplo, activador tisular del plasminógeno, ácido acetilsalicílico, clopidogrel o dipiridamol).

También se describen kits para el tratamiento del edema secundario en el SNC. En ciertas realizaciones, los kits comprenden (a) C1-INH, (b) instrucciones para uso en el tratamiento de un edema secundario del SNC o una lesión cerebral por isquemia-reperusión o para uso en el tratamiento de un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica o la barrera hematomedular y, opcionalmente, (c) al menos un compuesto adicional terapéuticamente activo o un fármaco. El componente C1-INH puede estar en forma líquida o sólida (por ejemplo, después de la liofilización). Si está en forma líquida, el C1-INH puede comprender aditivos tales como estabilizadores y/o conservantes tales como prolina, glicina o sacarosa, u otros aditivos que mejoran la vida útil.

En ciertas realizaciones, el kit puede contener compuestos adicionales, tales como compuestos terapéuticamente activos o fármacos que han de administrarse antes, al mismo tiempo o después de la administración del C1-INH. Ejemplos de tales compuestos incluyen vitaminas, antibióticos, agentes antivirales, etc. En otras realizaciones, los compuestos destinados a eliminar o inhibir la formación de coágulos de sangre en el cerebro (por ejemplo, activador tisular del plasminógeno, ácido acetilsalicílico, clopidogrel o dipiridamol) pueden estar incluidos en el kit.

En diversas realizaciones, las instrucciones para el uso de los kits incluirán indicaciones para usar los componentes del kit en el tratamiento de un edema secundario del SNC. Las instrucciones pueden contener, además, información sobre cómo preparar (por ejemplo, diluir o reconstituir, en el caso de una proteína liofilizada) el inhibidor de C1. Las instrucciones pueden incluir, además, una orientación con respecto a la dosificación y la frecuencia de la administración.

Una formulación del inhibidor de C1 se puede administrar al individuo por cualquier medio de administración farmacéuticamente adecuado. Se conocen varios sistemas de entrega y se pueden emplear para administrar la composición por cualquier vía conveniente. En una realización preferida, la formulación del inhibidor de C1 se administra sistémicamente. Para el uso sistémico, la proteína terapéutica se formula para administración parenteral o enteral (por ejemplo, oral, vaginal o rectal) de acuerdo con métodos convencionales. Una administración parenteral puede incluir, sin limitación, una inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, subdural, intratecal o una inyección directamente en el cerebro, administración intrapulmonar, transdérmica o intranasal. La vía de administración más preferida es la administración intravenosa. Las formulaciones se pueden administrar continuamente mediante infusión o mediante inyección de bolo. Algunas formulaciones incluyen sistemas de liberación lenta.

En ciertas realizaciones en relación con el tratamiento de un edema secundario, el C1-INH se administra 5, 10, 20, 30, 40 o 50 minutos, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 36, 48, 72, 96, 120 o 240 horas (o en cualquier momento intermedio) después de que haya comenzado la lesión inicial. En una realización preferida, la administración se lleva a cabo en un plazo máximo de 10 días después de la lesión inicial,

preferentemente en un plazo máximo de 5 días, más preferiblemente en un plazo máximo de 3 días, más preferentemente, en un plazo máximo de 1 día, más preferiblemente en un plazo máximo de 12 horas, más preferentemente en un plazo máximo de 6 horas, más preferiblemente en un plazo máximo de 3 horas, más preferentemente, en un plazo máximo de 1 hora, más preferiblemente en un plazo máximo de 30 minutos e incluso más preferiblemente directamente después de la lesión inicial (o en cualquier momento intermedio).

Con respecto a la semivida larga del inhibidor de la esterasa de C1 humano y/o el tratamiento profiláctico, la administración preferida debería realizarse lo antes posible después de la aparición de la lesión inicial.

En otras realizaciones preferidas, el tratamiento con C1-INH se puede iniciar inmediatamente o hasta diez días después del inicio de la reperfusión después de la oclusión, que fue causada por la lesión inicial. Preferiblemente, tal tratamiento se produce lo antes posible, después del inicio de la reperfusión. En ciertas realizaciones, el tratamiento se produce 5, 10, 20, 30, 40 o 50 minutos o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 36, 48, 72, 96, 120 o 240 horas (o en cualquier momento intermedio) tras el inicio de la reperfusión, después de la lesión inicial (o en cualquier momento intermedio). En una realización preferida, la administración tiene lugar en un plazo máximo de 10 días tras el inicio de la reperfusión después de la lesión inicial, preferiblemente en un plazo máximo de 5 días, más preferiblemente en un plazo máximo de 3 días, más preferiblemente en un plazo máximo de 1 día, más preferiblemente en un plazo máximo de 12 horas, más preferiblemente en un plazo máximo de 6 horas, más preferiblemente en un plazo máximo de 3 horas, más preferiblemente en un plazo máximo de 1 hora, más preferiblemente en un plazo máximo de 30 minutos y aún más preferiblemente directamente tras el inicio de la reperfusión después de la lesión inicial.

En ciertas realizaciones en relación con el tratamiento de la lesión cerebral por isquemia-reperfusión con el inhibidor de C1 obtenido a partir de plasma, el tratamiento se puede iniciar desde 30 minutos hasta diez días después del inicio de la reperfusión. En realizaciones preferidas, el tratamiento se produce 30, 40 o 50 minutos o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 36, 48, 72, 96, 120 o 240 horas después del inicio de la reperfusión (o en cualquier momento intermedio). En otras realizaciones, la administración tiene lugar en un plazo máximo de 10 días después del inicio de la reperfusión, preferiblemente en un plazo máximo de 5 días, más preferiblemente en un plazo máximo de 3 días, más preferiblemente en un plazo máximo de 1 día, más preferiblemente en un plazo máximo de 12 horas, más preferiblemente en un plazo máximo de 6 horas, más preferiblemente en un plazo máximo de 3 horas, más preferiblemente en un plazo máximo de 1 hora, más preferiblemente en un plazo máximo de 45 minutos y aún más preferiblemente en un plazo máximo de 30 minutos después del inicio de la reperfusión (o en cualquier momento intermedio). Preferiblemente, tal tratamiento se produce entre 30 minutos y 10 días después del inicio de la reperfusión, más preferiblemente entre 30 minutos y 5 días, más preferiblemente entre 30 minutos y 3 días y más preferiblemente entre 30 minutos y 1 día después del inicio de la reperfusión (o en cualquier momento intermedio).

La administración a un paciente puede tener lugar en forma de una dosis única o en administraciones repetidas, y con cualquiera entre una variedad de formas de sales fisiológicamente aceptables, y/o con un vehículo y/o aditivo farmacéuticamente aceptable como parte de una composición farmacéutica. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el inhibidor de C1 se administra (i) en una dosis única como inyección o infusión, o (ii) en dosis múltiples, preferiblemente en dos dosis, cada una como inyección o infusión, o (iii) como una infusión o aplicación a largo plazo. La infusión o aplicación a largo plazo se administra durante un período de tiempo, preferiblemente durante un período de 30 minutos a 2 semanas, más preferiblemente de 30 minutos a 1 semana, más preferiblemente de 30 minutos a 6 días, más preferiblemente de 30 minutos a 5 días, más preferiblemente de 30 minutos a 4 días, más preferiblemente de 30 minutos a 3 días, más preferiblemente de 30 minutos a 2 días, más preferiblemente de 30 minutos a 1 día, más preferiblemente de 30 minutos a 12 horas, más preferiblemente de 30 minutos a 6 horas (o en cualquier momento intermedio).

En una realización preferida, la administración a un paciente se produce en una dosis doble, una vez después de la lesión inicial y antes del inicio de la reperfusión y una vez tras el inicio de la reperfusión después de la lesión inicial.

La composición que comprende C1-INH se puede administrar a un paciente en cantidades terapéuticamente eficaces. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar con la edad del sujeto, el estado general y el género, así como la gravedad de la afección médica en el sujeto. La dosificación la puede determinar un médico y ajustarla, según sea necesario, para que se adapte a los efectos observados del tratamiento. En ciertas realizaciones, la dosis de C1-INH puede variar desde aproximadamente 1 U/kg hasta 5000 U/kg de peso corporal. En diversas realizaciones, la dosis de C1-INH es 1, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 450, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000 o 4500 U/kg de peso corporal (o cualquier valor intermedio). También se describen intervalos terapéuticos ejemplares para la administración de C1-INH en el documento de patente de EE.UU. 5.939.389, cuya descripción se incorpora en su totalidad. Preferiblemente, el inhibidor de C1 se administra en una dosis de 1 a 1000 unidades por kg de peso corporal, más preferiblemente de 5 a 500 unidades por kg de peso corporal, más preferiblemente de 10 a 200 unidades por kg de peso corporal y lo más preferiblemente en una dosis de 20 a 100 unidades por kg de peso corporal.

Las composiciones farmacéuticas administradas pueden comprender C1-INH como único compuesto activo o se pueden administrar en combinación con al menos otro compuesto, composición o material biológico. Ejemplos de

tales compuestos incluyen vitaminas, antibióticos o compuestos destinados a eliminar o inhibir la formación de coágulos de sangre en el cerebro (por ejemplo, activador tisular del plasminógeno, ácido acetilsalicílico, clopidogrel o dipiridamol).

Las Figuras muestran:

5 **Figura 1:** C1-INH reduce la mortalidad y mejora el resultado funcional después de un ictus isquémico agudo en ratones. **(a)** Mortalidad en los ratones tratados con C1-INH (7,5 U o 15,0 U, respectivamente) y los controles hasta el día 7 después de tMCAO (n = 10/grupo); \*\*p = 0,0087, \*p = 0,0215, prueba de rango logarítmico en comparación con ratones de control. **(b)** Resultado funcional a largo plazo (puntuación de Bederson) el día 5 después de tMCAO (n = 3-9/grupo); \*\*p <0,01, prueba de Kruskal-Wallis seguida por prueba de comparación múltiple de Dunn.

10 **Figura 2:** C1-INH muestra una profunda estabilización de la barrera hematoencefálica y efectos anti-edematosos en el ictus isquémico. **(a)** Panel superior: Secciones cerebrales coronales correspondientes representativas de ratones de control (Ctrl) y de ratones tratados 1 h después de la lesión inicial con 7,5 U de C1-INH o 15,0 U de C1-INH el día 1 después de tMCAO (24 h después de la lesión inicial) después de la inyección del trazador vascular azul de Evans. La fuga vascular se redujo significativamente después del tratamiento con C1-INH. Se debe tener en cuenta que la extravasación de azul de Evans era casi nula en las zonas en donde estaba presente el infarto también en los ratones que recibieron C1-INH (ganglios basales, flecha roja). Panel inferior: Volumen de la extravasación de azul de Evans determinado mediante planimetría en el hemisferio isquémico de ratones tratados y sin tratar, 24 horas después de tMCAO (n = 7-10/grupo); \*p <0,05, ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc de Bonferroni en comparación con ratones de control sin tratar. **(b)** Formación de edema, medida por el contenido de líquido cerebral en el hemisferio isquémico de los ratones de control (Ctrl) y los ratones tratados 1 h después de la lesión con 7,5 U de C1-INH o 15,0 U de C1-INH el día 1 después de tMCAO (24 h después de la lesión inicial) (n = 5/grupo); \*\*\*p <0,0001, ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc de Bonferroni en comparación con ratones de control sin tratar. **(c)** Expresión génica relativa de endotelina-1 en la corteza y los ganglios basales de ratones con operación simulada, controles (Ctrl) y ratones tratados 1 h después de la lesión inicial con 7,5 U de C1-INH o 15,0 U de C1-INH (n = 6-14/grupo) 24 horas después de tMCAO. Téngase en cuenta que 15,0 U de C1-INH impedía la inducción de la endotelina-1 en ambas regiones del cerebro; \*\*\*p <0,0001, ####p <0,0001, ANOVA de 2 vías, prueba post hoc de Bonferroni en comparación con los ratones con operación simulada (corteza (\*) o ganglios basales (#), respectivamente). **(d)** Análisis de transferencia Western de la expresión de ocludina en los ganglios basales isquémicos el día 1 después de tMCAO (24 h después de la lesión inicial) en ratones de control o ratones que recibieron 7,5 U de C1-INH o 15,0 U de C1-INH, respectivamente (tratamiento 1 h después de la lesión inicial) (n = 4/grupo), \*p <0,05, ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc de Bonferroni en comparación con los ratones sin tratar.

15 **Figura 3:** El tratamiento con C1-INH reduce la formación de edema cerebral después del ictus en las ratas. Las ratas se sometieron a 90 min de tMCAO y se trataron con 20 U/kg de C1-INH inmediatamente después de la reperusión. El grado de edema cerebral se calculó por planimetría de secciones cerebrales teñidas con TTC el día 1 (24 h después de la lesión inicial) (n = 15/grupo); \*\*\*p <0,0001, prueba t de Student de dos colas en comparación con los controles tratados con vehículo.

20 **Figura 4:** El tratamiento con C1-INH reduce la formación de trombos intracerebrales después del ictus. **(a)** Panel superior: Acumulación de fibrina (fibrinógeno) en la corteza infartada (i) y contralateral (c) y los ganglios basales de ratones de control (Ctrl) y ratones tratados con 7,5 U de C1-INH o 15,0 U de C1-INH, como se determinó por inmunotransferencia 24 horas después de tMCAO. Se muestran dos inmunotransferencias representativas de cada grupo. Panel inferior: cuantificación densitométrica de la formación de trombos en los grupos de ratones y las regiones cerebrales indicadas anteriormente (n = 3-5/grupo); \*\*\*p <0,0001, ##p <0,01, ANOVA de 2 vías, prueba post hoc de Bonferroni en comparación con los controles (corteza (\*) o ganglios basales (#), respectivamente). **(b)** Panel superior: Tinción H&E representativa de los ganglios basales infartados de ratones de control (Ctrl) y ratones tratados con 15,0 U de C1-INH el día 1 después de tMCAO. Los vasos trombóticos eran abundantes en los ratones de control (puntas de flecha), mientras que la permeabilidad microvascular era significativamente mayor en los ratones que recibieron 15,0 U de C1-INH (flecha) y esto se confirmó mediante el cálculo del índice de trombosis (n = 5/grupo) (panel inferior); \*p <0,05, ANOVA de 1 vía, prueba post hoc de Bonferroni, en comparación con los controles. Barra a escala: 100 µm.

25 **Figura 5:** Un tratamiento retrasado con C1-INH reduce la formación de trombos intracerebrales. Panel superior: Acumulación de fibrina (fibrinógeno) en las cortezas y los ganglios basales infartados de los ratones de control (Ctrl) y los ratones tratados con 7,5 U de C1-INH o 15,0 U de C1-INH, 6 h después del ictus, tal y como se determinó por inmunotransferencia 24 horas después de tMCAO. Panel inferior: Cuantificación densitométrica de la formación de trombos en los grupos de ratones y las regiones del cerebro indicadas anteriormente (n = 4/grupo); \*p <0,05, \*\*p <0,01, ####p <0,0001, ANOVA de 2 vías, prueba post hoc de Bonferroni, en comparación con los controles (corteza (\*) o ganglios basales (#), respectivamente).

30 **Figura 6:** C1-INH sigue siendo eficaz cuando se aplica en un entorno retardado después de tMCAO. **(a)** Puntuación neurológica de Bederson (panel superior) y puntuación de la prueba de agarre (panel inferior) el día 1

después de tMCAO (24 h después de la lesión inicial) en los grupos de ratones indicados anteriormente (n = 8-16/grupo). Los ratones que recibieron 6 h después de la lesión inicial 15,0 U de C1-INH se desarrollaban significativamente mejor en comparación con los controles o con los ratones que recibieron la dosis más baja (7,5 U) de C1-INH; \*p <0,05, prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de comparación múltiple de Dunn.

5 Los ejemplos ilustran la presente invención, y no la limitan de ningún modo.

**Modelo de isquemia.** Ratones C57Bl/6 y ratas CD se incluyeron en el estudio que se llevó a cabo de conformidad con las directrices institucionales para el uso de animales de experimentación, y los protocolos fueron aprobados por las autoridades gubernamentales (Regierung von Unterfranken, Würzburg, Alemania; Regierungspräsidium Giessen, Alemania). Se indujo una isquemia cerebral focal durante 60 min (ratones C57Bl/6 de 6-8 semanas o 20 semanas de edad) o 90 min (ratas CD de 7-9 semanas de edad) mediante oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO), utilizando la técnica de filamento intraluminal (Longa, E.Z., Weinstein, P.R., Carlson, S., & Cummins, R., Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20 (1):84-91; Kleinschnitz et al *Stroke* 2011). En los animales se controlaron los parámetros fisiológicos decisivos que pueden afectar al resultado del ictus (por ejemplo, flujo sanguíneo cerebral). Todos los experimentos de ictus se realizaron de acuerdo con las directrices ARRIVE, publicadas recientemente (<http://www.nc3rs.org/ARRIVE>). Los animales fueron asignados al azar a los operarios a través de una persona independiente que no participaba en la adquisición y el análisis de los datos. Se realizó la cirugía y la evaluación de todos los parámetros de lectura a la vez que se desconocían los grupos experimentales. El diseño detallado del estudio, incluyendo los criterios de exclusión, se proporciona a continuación.

20 **Inducción de isquemia cerebral en ratones.** La isquemia cerebral focal se indujo en ratones de 6-8 semanas o 20 semanas de edad mediante oclusión transitoria durante 60 min de la arteria cerebral media (tMCAO) como se ha descrito (Kleinschnitz et al., *J Exp Med* 2006; *PLoS Biol* 2010). Los ratones fueron anestesiados con 2,5% de isoflurano (Abbott, Wiesbaden, Alemania) en una mezcla de N<sub>2</sub>O al 70% / O<sub>2</sub> al 30%. La temperatura corporal interna se mantuvo a 37°C durante toda la operación mediante el uso de un dispositivo de calentamiento con retroalimentación controlada. Después de una incisión en la piel en la línea media del cuello, la arteria carótida común proximal y la arteria carótida externa se ligaron y se insertó un monofilamento de nailon 6.0 homologado, recubierto con silicona (6021; Docol Corp., Redlands, CA, EE.UU.) y se hizo avanzar a través de la arteria carótida interna derecha para ocluir el origen de la ACM derecha. La sutura intraluminal se dejó *in situ* durante 60 minutos. A continuación, los animales se volvieron a anestesiarse y el monofilamento de la oclusión se retiró para permitir la reperusión.

30 **Evaluación de los resultados funcionales en ratones.** El día 1 (24 h después de la lesión inicial) y el día 5 después de tMCAO, se puntuaron los déficits neurológicos y se cuantificaron según Bederson (Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986;173:472-476): 0, sin déficit; 1, flexión de la extremidad anterior; 2, como en 1, además de una disminución de la resistencia al empuje lateral; 3, caminar en círculos unidireccionales; 4, girar de forma longitudinal; 5, sin movimiento. Para la prueba de agarre (Moran PM, Higgins LS, Cordell B, Moser PC. Age-related learning deficits in transgenic mice expressing the 751-amino acid isoform of human beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92:5341-5345), el ratón se colocó a mitad de camino en una cuerda entre dos soportes y se puntuó de la siguiente manera: 0, se cae; 1, se aferra a la cuerda con una o dos de las patas delanteras; 2, como en 1 más intentos de subir a la cuerda; 3, se aferra a la cuerda con una o ambas patas delanteras más una o ambas patas traseras; 4, se aferra a la cuerda con las patas delanteras y traseras, además de la cola enrollada en la cuerda; 5, escape (a los soportes).

45 **Inducción de isquemia cerebral en ratas.** Ratas de 7-9 semanas de edad fueron sometidas a 90 minutos de tMCAO utilizando una técnica de filamento intraluminal (Longa, E.Z., Weinstein, P.R., Carlson, S., & Cummins, R., Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20 (1):84-91). En detalle, se indujo la anestesia en los animales con respiración espontánea en una cámara de isoflurano con isoflurano al 5% (CP Pharma, Burgdorf, Alemania) y se mantuvo a continuación con isoflurano al 2,5% a través de una máscara facial. Durante la cirugía, los animales se colocaron sobre un dispositivo de calentamiento para garantizar la normotermia (37°C). Después de una incisión en la piel en la línea media del cuello, la arteria carótida común izquierda y la arteria carótida externa se aislaron y se ligaron. Después de la arteriotomía, un monofilamento de nailon 4.0 homologado, recubierto con silicona (Ethilon®; Johnson & Johnson, St-Stevens-Woluwe, Bélgica) con su punta roma mediante calentamiento, se insertó en la arteria carótida interna y se hizo avanzar cranealmente hacia el origen de la arteria cerebral media hasta que se notó una resistencia suave. El filamento de la oclusión se dejó *in situ* durante 90 minutos. A continuación, los animales se volvieron a anestesiarse y el monofilamento de la oclusión fue retirado para permitir la reperusión.

55 **Tratamiento con C1-INH.** De 1 h o 6 h después de la inducción de tMCAO (lesión inicial), los ratones recibieron una única inyección intravenosa de C1-INH plasmático humano (Berninert® P, CSL Behring GmbH, Marburg, Alemania) con una dosis de 7,5 unidades (U) o 15,0 U diluidas en 150 µl de solución de vehículo (solución salina isotónica). Las dosis respectivas se eligieron basándose en trabajos publicados anteriormente en modelos de roedores con isquemia cerebral y 15,0 U se corresponde a la cantidad de C1-INH requerida para obtener una inhibición del 90% al 95% de la actividad hemolítica del complemento en ratones (Longhi L et al., *Crit Care Med* 2009; Storini C et al., *Neurobiol Dis*, 2005). C1-INH se inyectó en las ratas por vía intravenosa, 90 min después de la inducción de tMCAO

(inmediatamente después de la inducción de la reperfusión) con una dosis de 20 U/kg de peso corporal. Los ratones y las ratas de control recibieron volúmenes iguales de solución salina isotónica (vehículo).

**Diseño del estudio de ictus.** Ratones o ratas tratados con vehículo o ratones o ratas que recibieron C1-INH fueron asignados al azar a los operarios a través de una persona independiente que no participaba en la adquisición y análisis de los datos. Se realizó la cirugía y la evaluación de todos los parámetros de lectura, a la vez que se desconocían los grupos experimentales. Las siguientes condiciones excluían los animales de análisis de criterios de valoración (criterios de exclusión):

1. Muerte 24 horas después de MCAO
2. Hemorragia subaracnoidea (HSA) (como se determinó macroscópicamente durante el muestreo del cerebro o por IRM)
3. Puntuación de Bederson = 0 (24 horas después de tMCAO, solamente ratones)

Las tasas de abandono se distribuyeron de manera uniforme entre los grupos.

**Determinación de fugas en la barrera hematoencefálica y edema cerebral.** Para determinar fugas en la barrera hematoencefálica, 100 µl de trazador azul de Evans al 2% (Sigma Aldrich, Alemania) diluidos en NaCl al 0,9% se inyectaron por vía i.v. 1 h después de la inducción de tMCAO (Austinat et al., Stroke 2011). Después de 24 h, los ratones tratados con C1-INH y los controles se perfundieron transcardialmente con paraformaldehído (PFA) al 4% y los cerebros se extirparon rápidamente y se cortaron en secciones coronales de 2 mm de espesor, utilizando una matriz para cortes de cerebro de ratón (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EE.UU.). Se realizaron mediciones planimétricas (programa informático ImageJ, National Institutes of Health, EE.UU.) del parénquima cerebral teñido con azul de Evans para estimar la lesión en la barrera hematoencefálica.

Para evaluar la extensión del edema cerebral secundario, los ratones tratados con C1-INH y los controles fueron sacrificados 24 horas después de tMCAO. Se extrajeron los cerebros, se separaron los hemisferios y se pesaron para determinar el peso húmedo (PH). Después de ello, se secaron los hemisferios durante 72 h a 60°C y se determinó el peso seco (PS). El contenido en agua hemisférica (%) se calculó utilizando la siguiente fórmula:  $((PH-PS)/PH) \times 100$  (Austinat et al., Stroke 2009).

En las ratas, la extensión del edema cerebral secundario se calculó mediante planimetría de secciones cerebrales teñidas con TTC, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Área del edema cerebral (\%)} = [AL+AI+AC] \times 100 / (AC \times 2) - 100,$$

mientras que AL representa el área total del tejido cerebral negativo para TTC (isquémico), AI representa el área total de tejido viable del hemisferio ipsilateral (con ictus), y AC representa el área total del hemisferio contralateral (sano).

La tinción con TTC (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio), necesaria para el cálculo del edema cerebral en ratas, se realizó usando el siguiente protocolo: Las ratas se sacrificaron 24 horas después de tMCAO. Los cerebros se extirparon rápidamente y se cortaron en seis secciones coronales de 2 mm de espesor utilizando una hoja de afeitar (VWR International GmbH, Darmstadt, Alemania). Los cortes se tiñeron durante 15 minutos a 37°C con TTC al 2% (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Alemania) en PBS para visualizar los infartos (Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. Stroke. 1986; 176:1304-1308).

**Histología e inmunohistoquímica.** Cerebros crioincluidos se cortaron en secciones de 10 µm de espesor y se fijaron en acetona para la tinción de granulocitos neutrófilos o en PFA al 4% en PBS para la tinción de microglía/macrófagos y ocludina. El bloqueo de los epítomos se logró mediante un tratamiento previo con albúmina de suero bovino (BSA) en PBS durante 45 min, para evitar la unión no específica. Para la tinción de células inmunes invasoras (Austinat et al., 2009), aloantígeno Ly-6B.2 de rata anti-ratón (granulocitos neutrófilos; MCA771GA, AbD Serotec, Alemania) con una dilución de 1:1000 y CD11b de rata anti-ratón (microglía/macrófagos; MCA711, Serotec AbD, Alemania) con una dilución de 1:100 en PBS que contenía BSA al 1%, se añadieron durante la noche a 4°C. Después, los portaobjetos se incubaron con una IgG anti-rata biotinilada (BA-4001, Vector Laboratories, EE.UU.) diluida 1:100 en PBS que contenía BSA al 1% durante 45 min a temperatura ambiente. Después del tratamiento con una solución de bloqueo de avidina/biotina (kit de bloqueo con avidina/biotina, Sp-2001, Vector Laboratories, Inc., California, EE.UU.) para inhibir la actividad peroxidasa endógena, el anticuerpo secundario se unía a través de estreptavidina a una peroxidasa biotinilada (POD), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Vectorstain ABC Kit, peroxidasa estándar PK-4000, Vector Laboratories, Inc., California, EE.UU.). Los antígenos se visualizaron a través de POD utilizando el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB) (Kem-En-Tec Diagnostics, Dinamarca). Para la cuantificación de células inmunes, secciones de cerebro idénticas (10 µm de espesor) a nivel de los ganglios basales (0,5 mm anterior del bregma) procedentes de ratones tratados con C1-INH y controles, se seleccionaron y el recuento de células se realizó a partir de 5 cortes consecutivos (distancia de 10 µm) de 4 animales diferentes, bajo un microscopio Nikon Eclipse 50i (Nikon, Alemania) (Austinat et al., 2009).

Para la tinción inmunofluorescente frente a ocludina, se aplicó un anticuerpo de conejo anti-ratón (ab 31721, Abcam, GB) durante la noche (4°C) con una dilución de 1:100 en PBS que contenía BSA al 1%. Las proteínas se detectaron con anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo marcados con Cy3, con una dilución de 1:300 en BSA al 1% en PBS. Para la tinción del ADN, un colorante fluorescente de Hoechst (Hoechst 33342, Sigma-Aldrich, Alemania) se añadió durante 30 minutos a una concentración de 0,4 mg/ml. Las secciones se analizaron bajo un microscopio Axiophot 2 (Zeiss, Alemania).

Para el cálculo del índice de trombosis, todo el cerebro se cortó en secciones, 24 h después de tMCAO. Se realizó una tinción con H&E de acuerdo con procedimientos convencionales. Para la cuantificación, se examinaron las tinciones de forma ciega con un microscopio (Axiophot2, Carl Zeiss AG) equipado con una cámara CCD (Visitron Systems). El número de vasos sanguíneos ocluidos dentro de los ganglios basales isquémicos se contó cada diez cortes en los ratones de control o los ratones tratados con 7,5 U de C1-INH o 15,0 U de C1-INH, respectivamente, utilizando 40 aumentos.

Los controles negativos para todos los experimentos histológicos incluían una omisión del anticuerpo primario o secundario y no producían una señal detectable (no mostrado).

**Estudios de PCR.** La homogeneización del tejido, el aislamiento de ARN y la RT-PCR en tiempo real se llevaron a cabo como se ha descrito (Austinat et al., *Stroke* 2009). El ARN total se preparó con un homogeneizador de potencia Micra D-8 (ART, Alemania) utilizando el reactivo TRIzol® (Invitrogen, Alemania) y se cuantificó espectrofotométricamente. A continuación, 1 µg de ARN total se transcribió de forma inversa con los reactivos de transcripción inversa TaqMan® (Applied Biosystems, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante, usando hexámeros aleatorios. Los niveles de expresión génica relativa de endotelina-1 (ID del ensayo: Mm 00438656\_m1, Applied Biosystems, Alemania) se cuantificaron con la tecnología fluorescente TaqMan®. GAPDH (Reactivos del ensayo TaqMan® Pre-developed para expresión génica, referencia: 4352339E, Applied Biosystems, Alemania) se utilizó como control endógeno para normalizar la cantidad de ARN en la muestra. La PCR se realizó con cantidades iguales de ADNc en el sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus® (Applied Biosystems, Alemania) utilizando la mezcla de TaqMan® Universal 2x PCR Master Mix (Applied Biosystems, Alemania). Las reacciones (volumen total de 12,5 µl) se incubaron a 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. Se incluyeron controles de agua para asegurar la especificidad. Cada muestra se midió por triplicado y los puntos de datos se examinaron en busca de integridad mediante un análisis de la gráfica de amplificación. El método comparativo Ct se utilizó para la cuantificación relativa de la expresión génica como se ha descrito (Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25:402-408).

**Transferencia Western.** Cortezas cerebrales o ganglios basales se disecaron a partir de cerebros naturales y se homogeneizaron en tampón RIPA (Tris 25 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, 1% de NP-40) que contenía 0,1% de SDS y 4% de inhibidor de proteinasa (mezcla de inhibidor de proteasa completa, Roche). Las muestras se trataron con ultrasonidos durante 10 s. Después, los lisados de tejidos se centrifugaron a 15.000 x g durante 30 min a 4°C y el material sobrenadante se utilizó para el ensayo de proteínas BCA y el análisis de transferencia Western posterior. Los lisados totales se trataron con tampón de carga 4x SDS-PAGE (conc. final Tris 62,5 mM pH 6,8, 3% de beta-mercaptoetanol, 8% de SDS, 15% de glicerol) a 95°C durante 5 min. Se sometieron a electroforesis 20 µg de proteína total y se transfirieron a una membrana de PVDF. Después de bloquear durante 30 min con tampón de bloqueo (leche en polvo desnatada al 5%, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 0,05% de Tween-20), las membranas se incubaron con el anticuerpo primario a 4°C durante una noche con las siguientes diluciones: pAb anti-fibrinógeno 1:500 (Acris Antibodies), pAb anti-occludina 1:1000 (Abcam, GB) y AcMo anti-actina 1:75.000 (Dianova). Después de una etapa de lavado con TBS-T (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 0,05% de Tween-20), las membranas se incubaron durante 1 h con IgG de burro anti-conejo conjugada con HRP (para fibrinógeno y ocludina) (Dianova, Alemania) o IgG de burro anti-ratón (para actina) (Dianova, Alemania) con una dilución de 1:5000 y se desarrollaron finalmente utilizando ECLplus (GE Healthcare) (Kraft et al., Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) deficient mice are susceptible to intracerebral thrombosis and ischemic stroke. *PLoS One* 2010).

### Estadísticas

Todos los resultados se expresaron como media ± desviación estándar (d.e.) a excepción para escalas de resultados funcionales ordinales que se representaron como gráficos de dispersión incluyendo la mediana con el percentil 25% y el percentil 75% entre paréntesis en el texto. El número de experimentos para detectar un tamaño del efecto estandarizado en volúmenes de infarto  $\geq 0,15$ , se calculó mediante un análisis de potencia a priori con los siguientes supuestos:  $\alpha = 0,05$ ,  $\beta = 0,2$ , media, desviación estándar 10% de la media. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete de programas informáticos GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, EE.UU.). Los datos se analizaron para estudiar la distribución gaussiana con la prueba de normalidad omnibus de D'Agostino y Pearson y luego se analizaron mediante ANOVA de 1 vía o, en el caso de medir los efectos de dos factores de forma simultánea, la ANOVA de 2 vías con ajuste post hoc de Bonferroni para los valores de p. Las puntuaciones de resultados funcionales no paramétricos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis con la prueba de comparación múltiple post hoc de Dunn. Para la comparación de las curvas de supervivencia, se utilizó la prueba Logrank. Los datos de las ratas se compararon mediante la prueba de la t de Student no pareada, de dos colas (tamaño del ictus, edema cerebral) o la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (puntuaciones funcionales). Los valores de P <0,05 fueron considerados

estadísticamente significativos.

## Resultados

Se determinó el resultado funcional y la mortalidad de los ratones tratados con C1-INH y los controles durante un período de tiempo más largo, después del ictus isquémico (Fig. 1a, b). Siete días después de los 60 minutos de tMCAO, 9 de cada 10 ratones de control (90%) habían muerto, lo que estaba en consonancia con los informes anteriores (Kleinschnitz et al., PLoS Biol 2010). En contraste, 7 de cada 10 ratones (70%) tratados con 7,5 U de C1-INH y 9 de cada 10 ratones (90%) tratados con la dosis más alta de 15,0 U de C1-INH, sobrevivieron hasta el día 7 ( $p < 0,05$  o  $p < 0,01$ , respectivamente) (Fig. 1a). De acuerdo con estos hallazgos, los ratones que recibieron 15,0 U de C1-INH mostraban puntuaciones de Bederson significativamente mejores que los controles, también en etapas más avanzadas de desarrollo del infarto, es decir, el día 5 después de tMCAO (puntuación de Bederson: mediana 2,0 [2,0, 3,0] [control] frente a 0,0 [0,0, 1,0] [15,0 U], respectivamente;  $p < 0,01$ ) (Fig. 1 b).

C1-INH tiene un papel importante en la regulación de la permeabilidad vascular y la supresión de la inflamación mediante la inactivación de proteasas claves del sistema de contacto-cinina, como el factor XIIa o la calicreína plasmática (Alvin E. Davis III, Pedro Mejía, Fengxin Lu, Molecular Immunology 2008). En consecuencia, se abordó la magnitud de la lesión de la barrera hematoencefálica y la formación de edema en los hemisferios isquémicos. El día 1 después de tMCAO, la integridad de la barrera hematoencefálica tal y como se había determinado por el volumen de fuga del trazador vascular azul de Evans en el parénquima cerebral, se conservaba en ratones tratados con 15,0 U de C1-INH, 1 h después del ictus y era menos pronunciada también después de una inyección de 7,5 U de C1-INH, en comparación con controles sin tratamiento previo (media  $51,6 \pm 30,6 \text{ mm}^3$  [control] frente a  $33,1 \pm 25,0 \text{ mm}^3$  [7,5 U] o  $13,9 \pm 11,4 \text{ mm}^3$  [15,0 U], respectivamente;  $p < 0,05$  [control frente a 15,0 U]) (Fig. 2a). Este hallazgo se correlaciona con la formación menos drástica de edema cerebral secundario (método de peso húmedo/seco) después de la aplicación terapéutica de C1-INH (media  $4,3 \pm 1,1\%$  [control] frente a  $2,9 \pm 1,0\%$  [7,5 U] o  $0,2 \pm 0,9\%$  [15,0 U], respectivamente;  $p < 0,0001$  [control frente a 15,0 U]) (Fig. 2b), un resultado que también se pudo confirmar en ratas (Fig. 3). Es importante destacar que casi no se encontró ninguna interrupción de la barrera hematoencefálica en las regiones cerebrales (ganglios basales), en donde los infartos estaban presentes de forma regular también en los ratones tratados con C1-INH (Fig. 2a, flecha). Esto indica que el edema menor observado en el grupo C1-INH era un fenómeno específico y relevante de forma mecánica, pero no se debía simplemente a volúmenes menores de infarto en estos animales.

La expresión de endotelina-1 en los cerebros isquémicos de ratones tratados con C1-INH y los controles también se analizó. La endotelina-1 ha mostrado estar involucrada de forma decisiva en la regulación de la integridad vascular y la formación de edema en diversas afecciones fisiopatológicas, incluyendo el ictus isquémico (Matsuo Y, Mihara Si, Ninomiya M, Fujimoto M. Protective effect of endothelin type A receptor antagonist on brain edema and injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. Stroke. 2001; 32:2143-2148; Barone FC, Globus MY, Price WJ, White RF, Storer BL, Feuerstein GZ, Busto R, Ohlstein EH. Endothelin levels increase in rat focal and global ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 1994; 14:337-342). Veinticuatro horas después de tMCAO, los niveles de ARNm de endotelina-1 eran significativamente elevados en las cortezas y los ganglios basales de ratones tratados con vehículo y de ratones que habían recibido 7,5 U de C1-INH, en comparación con los ratones con una operación simulada (expresión génica relativa en la corteza:  $1,0 \pm 0,2$  [simulada] frente a  $16,0 \pm 6,3$  [control] o  $15,6 \pm 6,8$  [7,5 U], respectivamente,  $p < 0,0001$ ; expresión génica relativa en los ganglios basales:  $1,0 \pm 0,2$  [simulada] frente a  $4,3 \pm 1,2$  [control] o  $4,2 \pm 1,5$  [7,5 U], respectivamente,  $p < 0,0001$ ) (Fig. 2c). En contraste, no se observó una inducción significativa de los transcritos de endotelina-1 en ninguna región del cerebro después del tratamiento con 15,0 U de C1-INH ( $p > 0,05$ ). Una vez más, la expresión de endotelina-1 se mantuvo baja también en los ganglios basales después del tratamiento con dosis elevadas de C1-INH (15,0 U) (Fig. 2c), aunque los ganglios basales se incluyeron de manera uniforme en las áreas infartadas en todos los animales

De acuerdo con un efecto estabilizador de la barrera hematoencefálica de C1-INH en la inmunoreactividad del ictus contra la zona de oclusión, la proteína ocludina se conservaba en los vasos de los ganglios basales isquémicos procedentes de ratones tratados con 15,0 U de C1-INH, pero tenía una regulación a la baja en los ratones de control o los ratones que recibieron 7,5 U de C1-INH, tal y como se muestra por inmunohistoquímica. Para cuantificar más detalladamente la expresión de la proteína ocludina, también se ha realizado un análisis de transferencia Western (Fig. 2d). Una vez más, la cantidad de ocludina el día 1 después de tMCAO en los ganglios basales isquémicos de ratones sin tratar, era baja (densidad óptica:  $0,08 \pm 0,10$ ). En contraste, se podía detectar significativamente más proteína ocludina después del tratamiento con 7,5 U (densidad óptica:  $0,6 \pm 0,3$ ,  $p < 0,05$ ) o 15,0 U (densidad óptica:  $0,5 \pm 0,2$ ,  $p < 0,05$ ) de C1-INH, respectivamente.

Se ha mostrado que C1-INH inhibe la migración celular desde el sistema vascular a los sitios de inflamación mediante la unión de moléculas de adhesión celular (Cai S, Davis III, AE, 2004, J Immunol). Por lo tanto, se ha cuantificado el número de células inmunes que invaden el cerebro isquémico mediante inmunocitoquímica. Veinticuatro horas después de la inducción de tMCAO, una cantidad significativamente mayor de granulocitos neutrófilos (media  $299,1 \pm 138,1$  [control] frente a  $107,2 \pm 109,5$  [15,0 U],  $p < 0,05$ ), así como macrófagos/células de microglía (media  $676,3 \pm 150,4$  [control] frente a  $117,1 \pm 64,9$  [15,0 U],  $p < 0,0001$ ) había entrado en los ganglios basales isquémicos de los ratones de control sin tratar, que en los ratones que habían sido tratados con 15,0 U de C1-INH 1 h después del ictus. En contraste, la dosis más baja de 7,5 U de C1-INH era incapaz de reducir el tráfico celular después de la

isquemia cerebral focal ( $p > 0,05$ ).

- 5 C1-INH también actúa sobre FXIIa, el activador principal de la vía intrínseca de la coagulación de la sangre (Alvin E. Davis III, Pedro Mejía, Fengxin Lu, *Molecular Immunology* 2008). Por lo tanto, analizamos el impacto de C1-INH sobre la actividad trombótica después de una lesión cerebral por isquemia/reperfusión. De hecho, la cantidad de fibrina (fibrinógeno) detectada mediante transferencia Western en la corteza isquémica (densidad óptica media  $2,8 \pm 1,1$  [control] frente a  $1,7 \pm 0,8$  [7,5 U] o  $0,03 \pm 0,02$  [15,0 U], respectivamente;  $p < 0,0001$  [control frente a 15,0 U]) y en los ganglios basales (densidad óptica media de  $2,8 \pm 1,0$  [control] frente a  $1,2 \pm 0,7$  [7,5 U] o  $0,3 \pm 0,2$  [15,0 U], respectivamente;  $p < 0,001$  [control frente a 15,0 U]), se redujo significativamente el día 1 tras el ictus después de la aplicación de dosis elevadas (15,0 U) de C1-INH, 1 h después de la inducción de tMCAO (Fig. 4a). De acuerdo con
- 10 ello, la permeabilidad microvascular se incrementaba en los ratones tratados con C1-INH, en comparación con los controles sin tratamiento previo (índice de trombosis:  $15,8 \pm 3,0$  [control] frente a  $12,2 \pm 2,8$  [7,5 U] o  $9,8 \pm 2,4$  [15,0 U], respectivamente;  $p < 0,05$  [control frente a 15,0 U]) (Fig. 4b). Es importante destacar que la actividad trombótica todavía se reducía significativamente en las cortezas y los ganglios basales cuando C1-INH se aplicaba en un marco retardado, es decir, 6 h después de tMCAO (Fig. 5).
- 15 En un intento de ampliar la ventana de tiempo terapéutico de C1-INH aplicado de forma exógena, ratones C57BL/6 recibieron también 7,5 U o 15,0 U de C1-INH en un marco retardado, es decir, 5 h después del inicio de la reperfusión (es decir, 6 h después de la inducción de tMCAO). En particular, la disfunción neurológica todavía era significativamente menor en el grupo de 15,0 U de C1-INH en comparación con el grupo de 7,5 U de C1-INH o los animales de control el día 1 (puntuación de Bederson: mediana 3,0 [3,0, 4,0] [control] frente a 3,0 [2,0, 3,0] [7,5 U] o 3,0 [1,0, 3,0] [15,0 U], respectivamente,  $p < 0,05$ ; puntuación de la prueba de agarre, mediana 3,0 [1,0, 4,0] [control] frente a 4,0 [3,0, 4,0] [7,5 U] o 4,0 [3,0, 5,0] [15,0 U], respectivamente,  $p < 0,05$ ) (Fig. 6)
- 20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un inhibidor de C1 para uso en un método para prevenir la formación y/o reducir el tamaño de un edema secundario del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto en donde el sujeto tiene o ha tenido al menos un trastorno seleccionado a partir del grupo que consiste en ictus, ictus isquémico, ictus hemorrágico, ictus perinatal, lesión cerebral traumática y lesión de la médula espinal.
2. El inhibidor para uso según la reivindicación 1, en donde dicho edema secundario del SNC es un edema cerebral secundario o un edema secundario de la médula espinal.
3. El inhibidor para uso según la reivindicación 1 o 2, en donde dicho edema secundario es sustancialmente un edema vasogénico.
- 10 4. El inhibidor para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho edema secundario se produce 1 a 10 días, preferiblemente 2 a 5 días después de una lesión inicial que conduce a al menos un trastorno según la reivindicación 1.
5. El inhibidor para uso según la reivindicación 4, en donde la lesión inicial es una oclusión de un vaso sanguíneo o una hemorragia en el cerebro.
- 15 6. El inhibidor para uso según la reivindicación 5, en donde dicho sujeto es un ser humano.
7. El inhibidor para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho inhibidor es un inhibidor de C1 obtenido a partir del plasma o recombinante.
8. El inhibidor para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho inhibidor es idéntico a la proteína humana de origen natural o una variante de la misma.
- 20 9. El inhibidor para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho inhibidor es el inhibidor de la C1 esterasa humana.
10. El inhibidor para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el tamaño del edema secundario se reduce al menos un 10%, preferiblemente al menos un 20%, más preferiblemente al menos un 30% en comparación con el tamaño del edema cerebral secundario sin tratar.
- 25 11. El inhibidor para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho inhibidor se administra por vía intravenosa o subcutánea.
12. El inhibidor para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicho inhibidor se administra en una dosis de 1 a 1000 unidades por kg de peso corporal, preferiblemente de 5 a 500 unidades por kg de peso corporal.
- 30 13. El inhibidor para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde dicho inhibidor se administra (i) en una dosis única como una inyección o como una infusión, o (ii) en dosis múltiples, preferiblemente en dos dosis, cada una como una inyección o como una infusión, o (iii) como una infusión o aplicación a largo plazo.
14. El inhibidor para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde dicho inhibidor se administra como máximo 10 días después de la lesión inicial, preferiblemente como máximo 5 días, más preferentemente como máximo 3 días después de la lesión inicial.
- 35 15. El inhibidor para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde dicho inhibidor se administra como máximo 10 días tras el inicio de la reperfusión después de la lesión inicial, preferiblemente como máximo 5 días, más preferiblemente como máximo 3 días tras el inicio de la reperfusión después de la lesión inicial.
- 40 16. El inhibidor para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde dicho inhibidor se administra dos veces, una vez después de la lesión inicial y antes del inicio de la reperfusión y la segunda vez tras el inicio de la reperfusión después de la lesión inicial.

Figura 1a

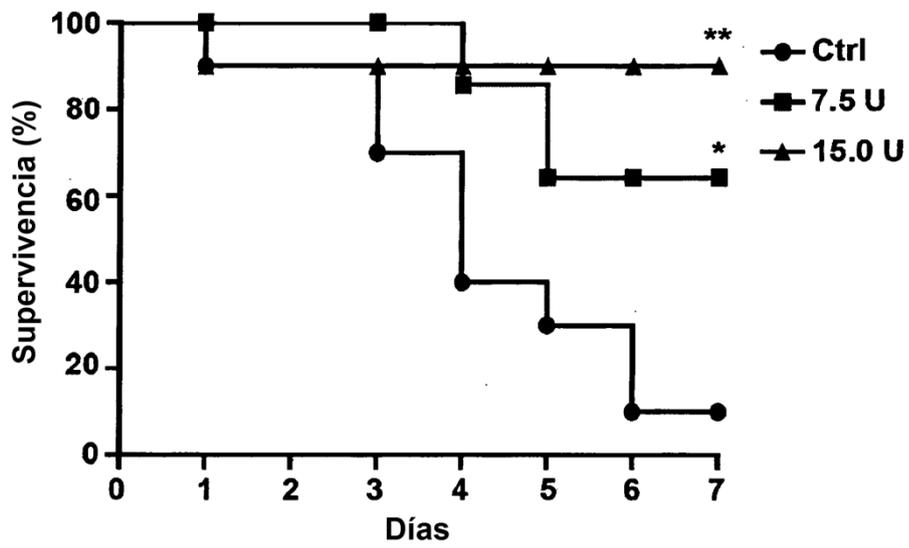


Figura 1b

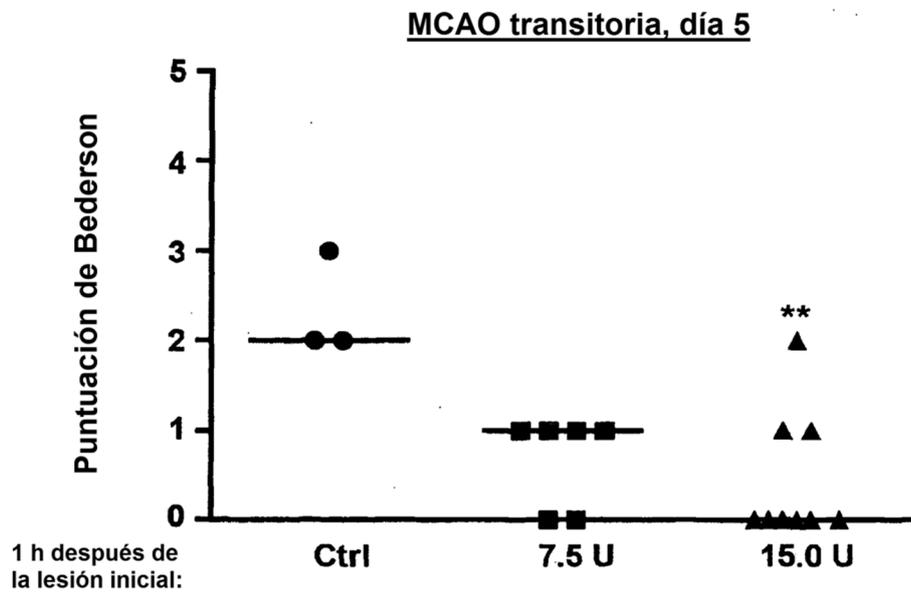


Figura 2a

MCAO transitoria, día 1

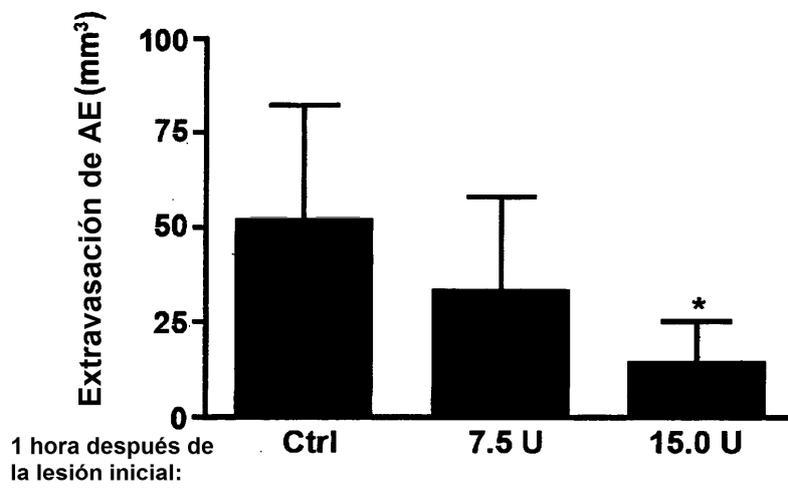
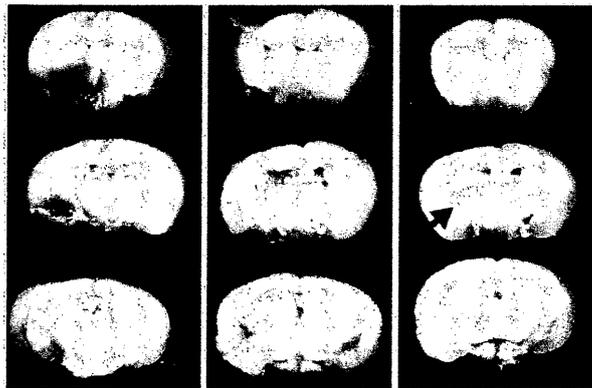


Figura 2b

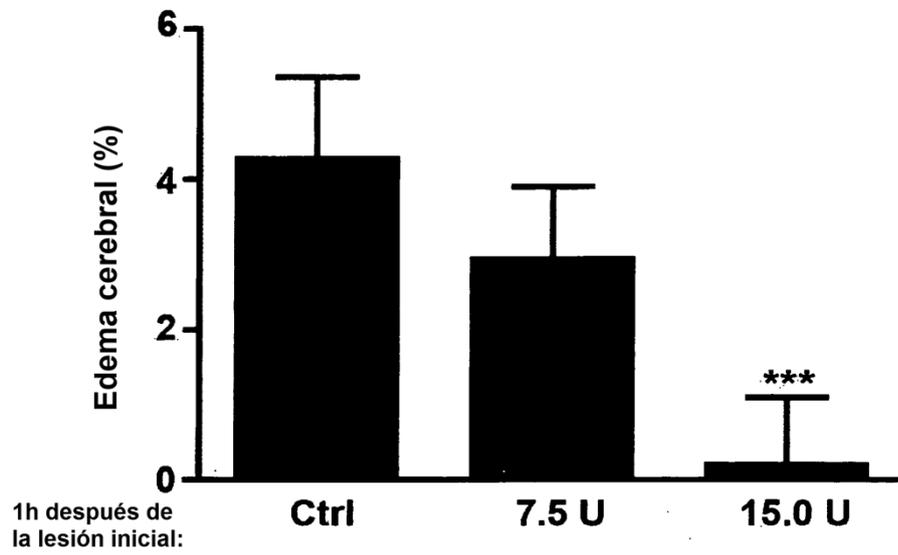


Figura 2c

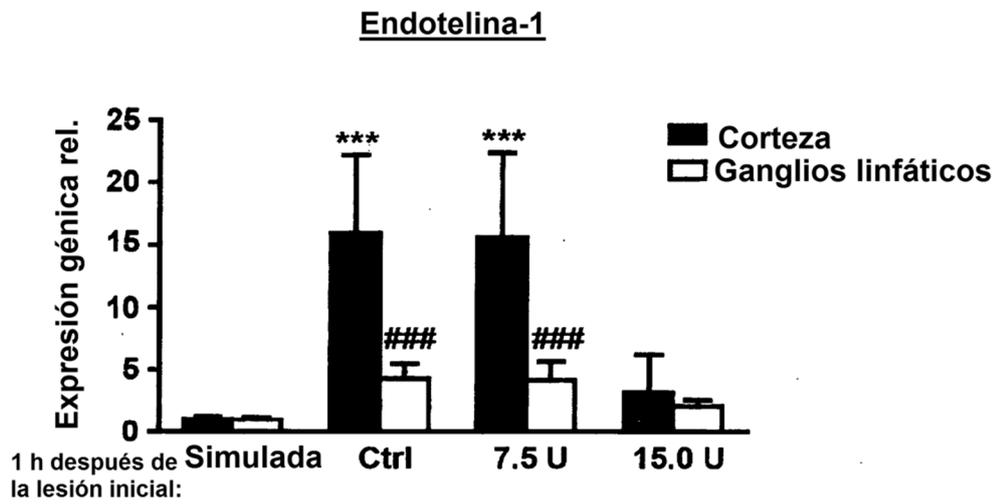


Figura 2d

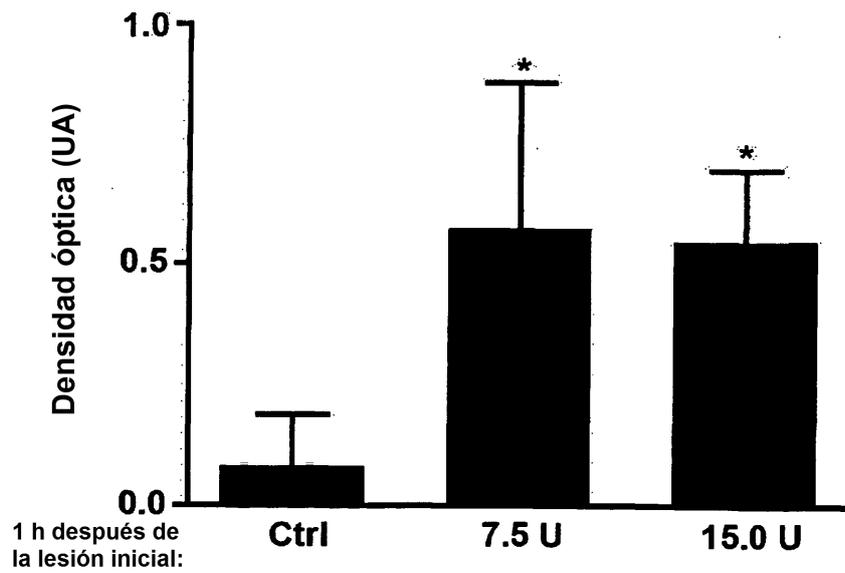
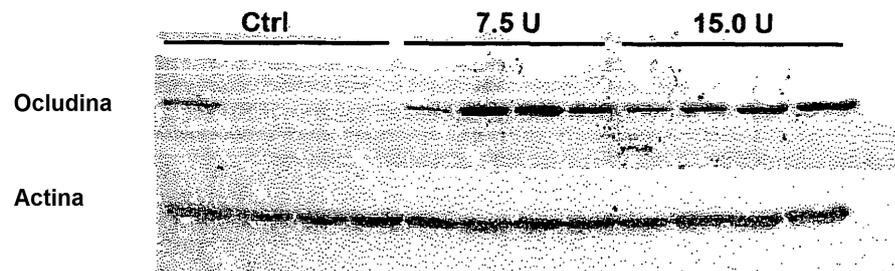


Figura 3

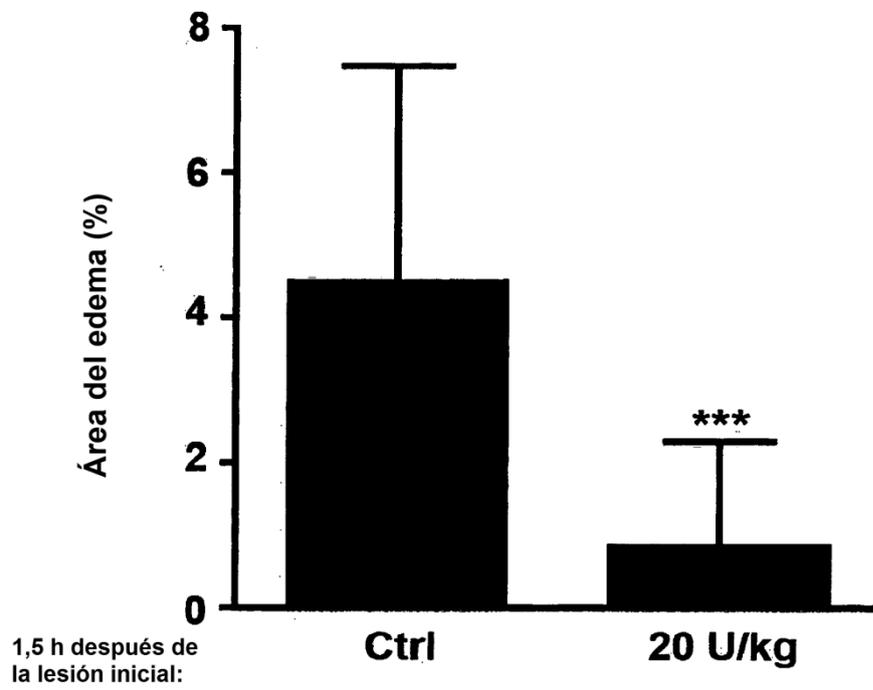


Figura 4a

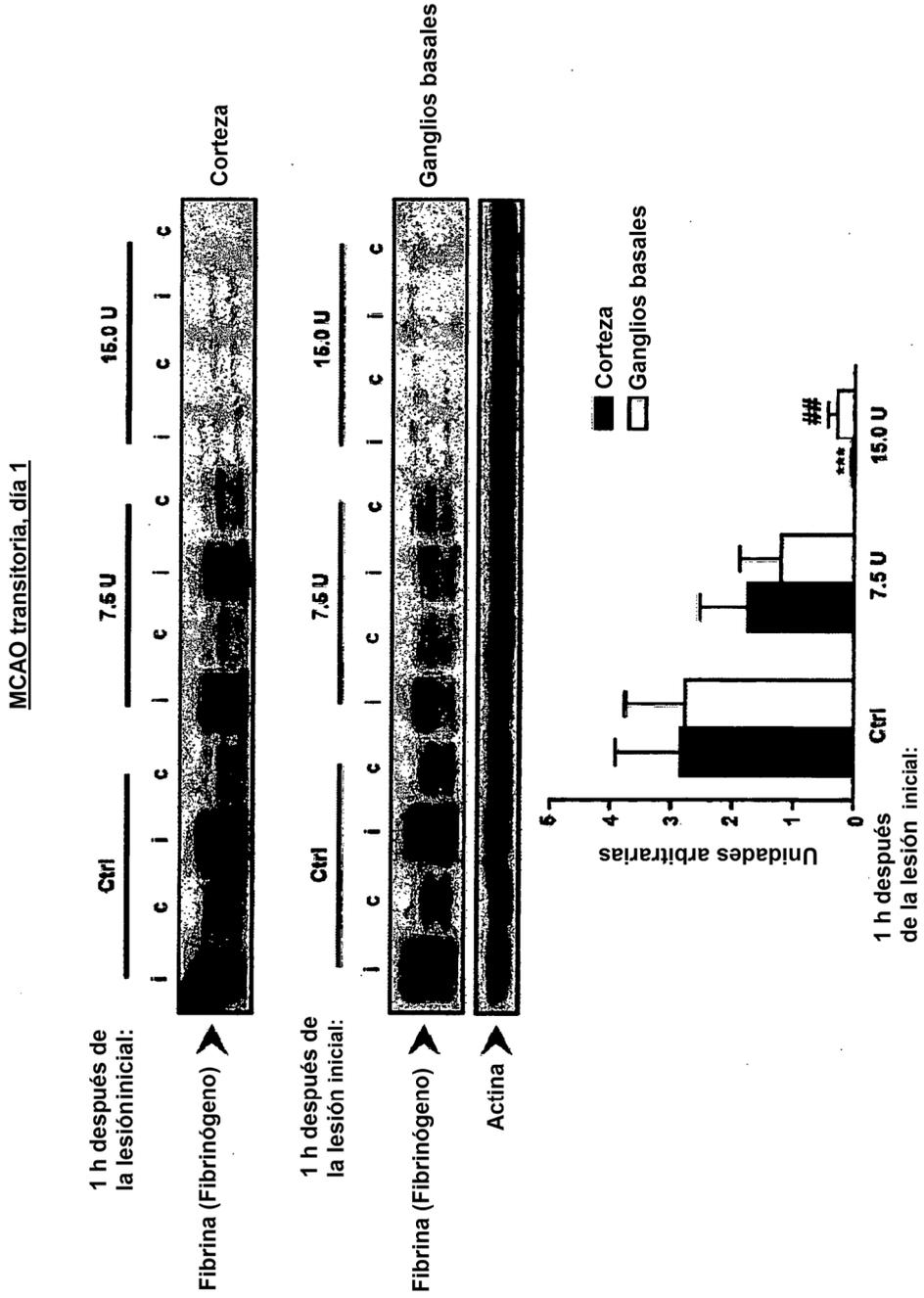


Figura 4b

Ganglios basales, día 1

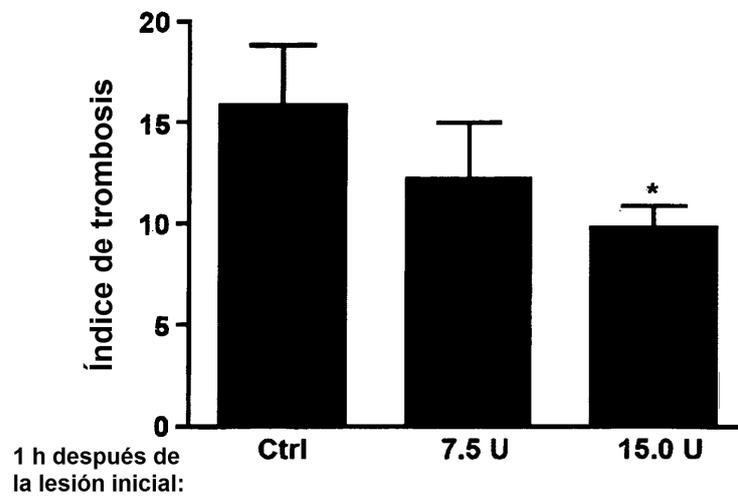
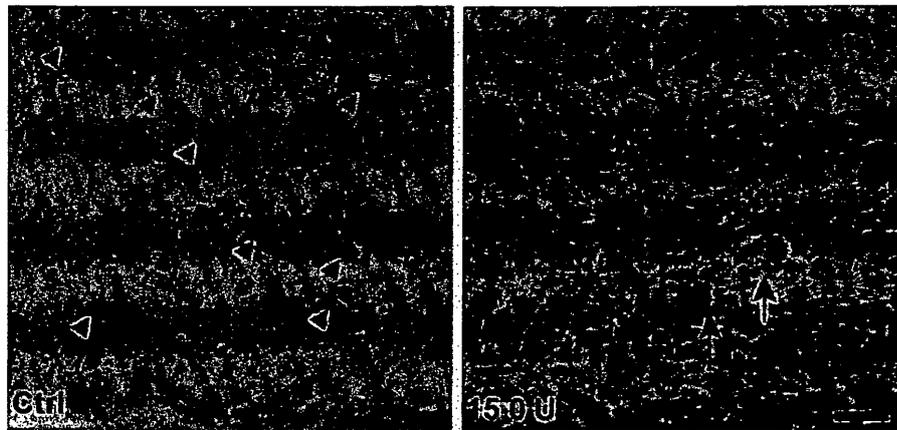


Figura 5

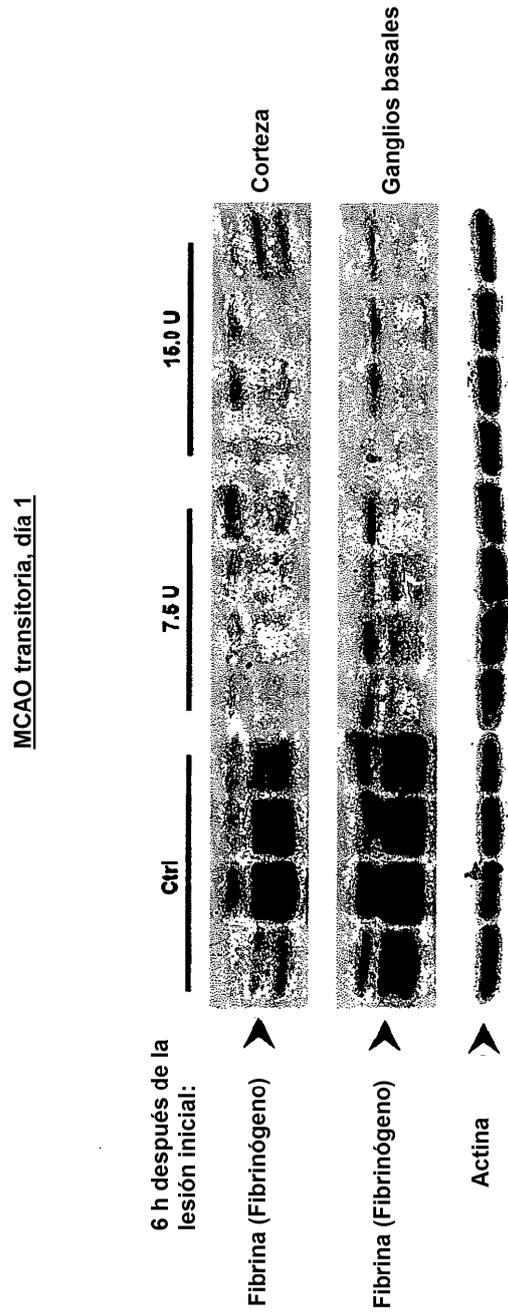


Figura 5 cont.

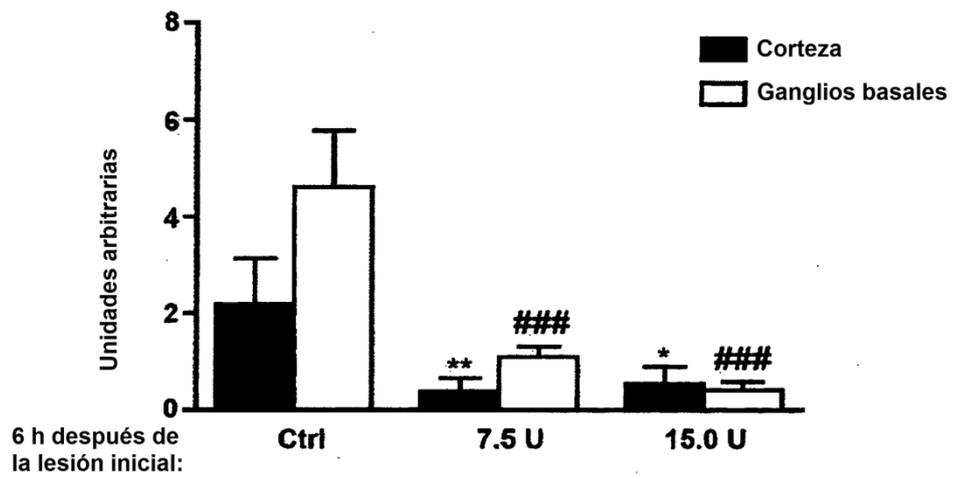


Figura 6

