

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 816**

51 Int. Cl.:

A61K 38/57 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 41/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2006 E 11172880 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2380587**

54 Título: **Uso del inhibidor C1 para la prevención de lesión de reperfusión de isquemia**

30 Prioridad:

23.01.2006 US 760944 P

21.12.2005 EP 05112630

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

15.02.2018

73 Titular/es:

PHARMING INTELLECTUAL PROPERTY B.V.

(100.0%)

Darwinweg 24

2333 CR Leiden, NL

72 Inventor/es:

MANNESSE, MAURICE;

NUIJENS, JOHANNES HENRICUS;

PIEPER, FRANK;

DE SIMONI, MARIA GRAZIA y

ZIERE, GIJSBERTUS JOHANNES

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 654 816 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 del inhibidor C1 para la prevención de lesión de reperfusión de isquemia

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al uso terapéutico y profiláctico del inhibidor C1 para prevenir, reducir y tratar una lesión de reperfusión de isquemia.

10 Antecedentes de la invención

[0002] La lesión de reperfusión de isquemia es una condición patológica recurrente muy conocida. Puede bien representar una condición patológica prevista o una condición patológica imprevista. El derrame cerebral es uno de los tipos más comunes de lesión de reperfusión de isquemia imprevista. El derrame cerebral es la tercera causa de muerte y la principal causa de incapacidad a largo plazo en países industrializados. El derrame cerebral es un tipo de enfermedad cardiovascular que afecta a las arterias que van al cerebro y de su interior. Un derrame cerebral ocurre cuando tales arterias se bloquean por un coágulo o estallan y producen isquemia de los tejidos cerebrales a los que sirve la arteria bloqueada. Se causa daño directo al cerebro por la interrupción del flujo sanguíneo, principalmente debido a la pérdida de oxigenación del tejido viable, lo que conduce en última instancia a un infarto si no se revierte. Sin embargo si el insulto se revierte (bien fisiológicamente o terapéuticamente) entonces la reperfusión del tejido isquémico puede paradójicamente causar además daño indirecto. Cuando hay una duración larga de isquemia, el daño "directo" resultante de hipoxia solo es el mecanismo predominante. Para una duración más corta de isquemia, el daño indirecto o daño mediado de reperfusión se vuelve cada vez más importante para el resultado final.

[0003] Informes indican que el inhibidor C1 (INHC1), el inhibidor del complemento C1, muestra acción neuroprotectora al reducir la lesión de reperfusión de isquemia en los modelos de roedor para la reperfusión de isquemia cerebral. (De Simoni et al., 2003, J Cereb Blood Flow Metab. 23: 232-9; Akita et al., 2003, Neurosurgery 52: 395-400). La acción neuroprotectora del INHC1 en la lesión de reperfusión de isquemia cerebral no requiere C1q (De Simoni et al., 2004, Am J Pathol. 164: 1857-63). Más recientemente Storini et al. (2005, Neurobiol Dis. 19: 10-7) informó que el INHC1 ejerce una acción antiinflamatoria y antiapoptótica en la lesión de reperfusión de isquemia a través de la inhibición de inflamación y el reclutamiento celular desde la vasculatura al sitio isquémico. Sin embargo, la ventana de tiempo alrededor del derrame cerebral durante la que la administración de INHC1 es eficaz terapéuticamente es más bien reducida. WO 2004/100982 se refiere a la producción de un recombinante inhibidor C1 obtenido a partir de la leche de conejos transgénicos; no ha explorado las propiedades específicas del inhibidor C1 y tampoco ha explorado el marco temporal de administración del inhibidor C1. Es por lo tanto un objeto de la presente invención proveer al INHC1 con una ventana más amplia en cuanto al tiempo de administración.

40 Descripción de la invención

[0004] La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que donde el inhibidor C1 derivado de plasma de origen natural (INHC1) ha perdido la mayor parte de su capacidad para reducir la lesión de reperfusión de isquemia en un modelo de ratón para isquemia focal cerebral transitoria cuando se administra después de la isquemia, una preparación recombinante de INHC1 sigue siendo capaz de ejercer sus efectos neuroprotectores también cuando se inyecta al menos 1 hora después de la isquemia y/o la reperfusión. Sorprendentemente, un efecto neuroprotector puede todavía alcanzarse cuando el INHC1 se inyecta 18 horas después de la isquemia y/o la reperfusión. La diferencia entre el INHC1 derivado de plasma de origen natural y la preparación recombinante de INHC1 es que el primero tiene una vida media del plasma de al menos 24 horas y es glicoproteína completamente sialilada y el último tiene una vida media del plasma reducida y tiene una glicosilación diferente en comparación con el producto derivado de plasma.

[0005] Una diferencia conocida entre el INHC1 derivado de plasma de origen natural y la preparación recombinante de INHC1 es la extensión y el tipo de glicosilación. La glicoproteína recombinante contiene una matriz amplia de diferentes N-glicanos, que comprende estructuras de oligomanosa, híbridas y de tipo complejo, mientras que los N-glicanos de INHC1 derivado de plasma están principalmente compuestos de estructuras de tipo complejo completamente sialiladas. Como resultado de las diferencias en la glicosilación, la glicoproteína derivada de plasma tiene una vida media del plasma de al menos 24 horas y el recombinante INHC1 tiene una vida media del plasma reducida.

[0006] Se describe un método para la prevención, reducción o tratamiento de al menos una lesión de isquemia y reperfusión, en el que se administra el inhibidor C1 después de la isquemia y/o después de la reperfusión. El método preferiblemente comprende la etapa de administración de una cantidad eficaz de un INHC1 con una vida media del plasma que es inferior que la vida media del plasma de un INHC1 derivado de plasma. Alternativamente, el método preferiblemente comprende la etapa de administración de una cantidad eficaz de un INHC1 que tiene una glicosilación diferente en comparación con el INHC1 derivado de plasma. Este método se

refiere a un uso terapéutico y/o profiláctico del inhibidor C1 para prevenir, reducir y/o tratar cualquier tipo de lesión de reperfusión de isquemia.

5 [0007] Un inhibidor C1, también referido como inhibidor de esterasa C1, se define aquí como un inhibidor del complemento C1. El INHC1 pertenece a la superfamilia de inhibidores de serina proteinasa y es el único inhibidor de C1r y C1s del sistema del complemento y es el inhibidor principal de factor XIIa y calicreína del sistema de contacto. Además, el INHC1 también inhibe otras serina proteasas de la coagulación y sistemas fibrinolíticos como el factor XI, activador plasminógeno de tipo tejido y plasmina (Schapira et al. 1985, Complement 2: 111; Davis, 1988, Ann. Rev. Immunol. 6: 595). El INHC1 humano es una proteína de 500 aminoácidos, con una
10 secuencia señal de 22 aminoácidos (Carter et al. 1988, Euro. J. Biochem. 173,163). El INHC1 de plasma es una glicoproteína de aproximadamente 76 kDa y está fuertemente glicosilado, hasta un 26 % de su masa molecular consiste en carbohidrato (Perkins et al., 1990, J. Mol. Biol. 214, 751). Un INHC1 para usar en los métodos de la presente invención es preferiblemente una proteína con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un
15 65, 67, 68, 69, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos del INHC1 de humano maduro como se representa en la SEQ ID N°: 1.

[0008] Para el fin de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se refiere al porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las dos secuencias. Primero, se buscan secuencias polipeptídicas homólogas utilizando el algoritmo de Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico (BLAST), que se describe en Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los parámetros del algoritmo BLAST W, B, y E determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLAST usa como valores predeterminados una longitud de palabra (W) de 3, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 10915 (1989)) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4. A continuación, el grado de identidad (como se ha definido anteriormente) de secuencias homólogas se determina utilizando el algoritmo de alineamiento CLUSTALW (Higgins D. et al (1994). Nucleic Acids Res. 22:4673-4680) utilizando los siguientes parámetros: tamaño de espacio: 5, apertura de espacio: 11, extensión de espacio: 1, desajuste: -15, tamaño de palabra: 3.

30 [0009] El INHC1 preferiblemente tiene actividad de INHC1 como puede por ejemplo ser ensayado como lo describe Drouet et al. (1988, Clin Chim Acta. 174:121-30). Más preferiblemente, el INHC1 es un INHC1 humano (INHC1h) que se entiende que significa que el INHC1 tiene una secuencia de aminoácidos que ocurre naturalmente en el hombre (como por ejemplo la SEQ ID N°: 1 o CAA30314) pero no significa que el INHC1 se produce y se obtiene de por ejemplo plasma humano.

35 [0010] Según un aspecto de la invención, el INHC1 para usar en los métodos de la invención tiene preferiblemente una vida media del plasma reducida en comparación con la vida media del INHC1 derivado de plasma, más preferiblemente la vida media del plasma del INHC1 de la invención es inferior a la vida media del plasma del INHC1 derivado de plasma humano. Por "una vida media del plasma reducida" se entiende el cambio negativo en la vida media circulante de un INHC1 de la invención relativamente a la vida media circulante de un INHC1 derivado de plasma. En este contexto, un INHC1 derivado de plasma se refiere a un INHC1 de origen natural que se deriva típicamente de plasma y que se puede purificar de plasma pero que no se modifica químicamente o enzimáticamente.

45 [0011] La vida media del plasma se mide tomando muestras de sangre en varios puntos temporales después de la administración del INHC1, y determinando la concentración de INHC1 en cada muestra. La correlación de la concentración de suero con el tiempo permite el cálculo de la vida media del plasma. La reducción de vida media del plasma de un INHC1 de la invención relativa a la vida media circulante de un INHC1 derivado de plasma es preferiblemente al menos aproximadamente el doble, al menos aproximadamente el triple, al menos
50 aproximadamente cuatro veces, al menos aproximadamente seis veces, más preferiblemente al menos aproximadamente ocho veces, y de la forma más preferible al menos aproximadamente diez veces. En otras palabras, la vida media del plasma de un INHC1 de la invención preferiblemente es inferior al 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 12,5 o 10 % de la vida media del plasma de un INHC1 derivado de plasma, es decir su homólogo de origen natural.

55 [0012] Por ejemplo la vida media del plasma del INHC1 de la invención que se usa en los ejemplos de este documento se obtiene de la leche de conejos transgénicos, muestra una vida media del plasma en seres humanos de aproximadamente 3 horas, que es aproximadamente de cuatro a ocho veces inferior que la vida media del plasma normal de un INHC1 derivado de plasma en el hombre. Se entiende que la determinación de la reducción de vida media del plasma de un INHC1 de la invención en comparación con la de un INHC1 derivado de plasma se realiza preferiblemente bajo condiciones similares si no idénticas, es decir preferiblemente en dosificaciones correspondientes, regímenes de muestreo, en el mismo organismo, que puede ser un animal de laboratorio tal como un ratón o sujetos humanos, y en aproximadamente el mismo número de sujetos de prueba. Además, se entiende que las vidas medias de plasma normal de ambas preparaciones de INHC1 se comparan
60 como se puede determinar por un método estándar de análisis estadístico.
65

[0013] Un INHC1 con vida media más corta, sea este de origen natural o un INHC1 producido recombinantemente, se puede preparar por cualquier método conveniente. Puede por ejemplo prepararse *in vivo* en una célula u organismo huésped recombinante que produce un INHC1 con una estructura de carbohidrato modificada (en comparación con el INHC1 derivado de plasma) o la estructura de carbohidrato de un INHC1 de origen natural puede ser modificada *in vitro* químicamente o enzimáticamente. Preferiblemente, el INHC1 de la invención se modifica en comparación con el INHC1 derivado de plasma de la manera siguiente: eliminación de una fracción de carbohidrato (a partir de una variante de origen natural o variante expresada recombinantemente de la glicoproteína), preferiblemente la eliminación de ácido siálico y/o galactosa a partir de una cadena de carbohidrato N-enlazada y/o la eliminación de una cadena de carbohidrato dando como resultado una exposición de residuos de manosa, galactosa, N-acetilglucosamina y/o fucosa.

[0014] Según otro aspecto de la invención, el INHC1 para usar en los métodos de la invención tiene preferiblemente una glicosilación diferente en comparación con el INHC1 derivado de plasma. Las modificaciones de la estructura de carbohidrato de un INHC1 de la invención incluyen modificaciones que conducen a infraglicosilación, a sobreglicosilación, a la forma asialo de INHC1, o a cualquier otra modificación que conduzca a un modelo de glicosilación diferente.

[0015] *In vitro*, la infraglicosilación puede ser el resultado de una deleción de una fracción de carbohidrato o de una cadena de carbohidrato completa de INHC1. Las modificaciones pueden implicar tanto cadenas de carbohidrato N-enlazadas como cadenas O-enlazadas, o solo un tipo de cadena. Puede implicar todas las cadenas, o solo algunas de las cadenas. La sobreglicosilación puede por ejemplo ser el resultado de la adición de una fracción de carbohidrato extra o una cadena de carbohidrato completa a la molécula de INHC1. Una forma asialo de INHC1 o una forma con un nivel reducido de residuos de ácido siálico terminal puede obtenerse típicamente por eliminación de un grupo de ácido siálico. Es bien conocido que la vida media de una glicoproteína en la sangre es altamente dependiente de la composición y la estructura de sus grupos de carbohidrato N-enlazados y O-enlazados. En general, la vida media máxima de una glicoproteína requiere que sus grupos de hidrocarbohidrato N-enlazados y O-enlazados tengan un ácido siálico terminal. Si este ácido siálico terminal no está presente, la glicoproteína se elimina rápidamente de la sangre debido a la exposición de los residuos de galactosa. Está bien establecido que la presencia de residuos de galactosa terminal en las fracciones de carbohidrato de glicoproteínas produce una mejor eliminación del plasma por el receptor de asialoglicoproteína en el hígado. Así, el INHC1 para usar en los métodos de la presente invención tiene un nivel reducido de residuos de ácido siálico terminal en comparación con el inhibidor C1 humano derivado de plasma. El ácido siálico se puede eliminar de diversas maneras. Por ejemplo, se puede quitar químicamente o enzimáticamente, por ejemplo, por tratamiento con sialidasa. Se describen sialidasas adecuadas para este propósito por Chou et al. (1996, J Biol Chem. 271(32):19219-24; y 1994, J Biol Chem. 269(29):18821-6) y pueden por ejemplo obtenerse de V-labs, Inc. (Covington, Luisiana, EE.UU.). En otra forma de realización preferida, el INHC1 para usar en los métodos de la presente invención preferiblemente tiene residuos expuestos de manosa, N-acetilglucosamina, fosfomanosa, galactosa y/o N-acetilgalactosamina. Un residuo de azúcar expuesto será usualmente un residuo de azúcar terminal en una derivación de glicano o al menos un residuo de azúcar que es accesible para interacciones con una fracción con afinidad para el residuo (tal como un dominio de unión de carbohidratos). Un INHC1 con residuos expuestos de galactosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, manosa, fucosa o fosfomanosa pueden por ejemplo ser obtenido por tratamiento enzimático con una o más β -D-N-acetilhexosaminidasa, endo- β -D-galactosidasa, y/o α -D-N-acetilgalactosaminidasa (también obtenible de por ejemplo V-labs, Inc., Covington, Luisiana, EE.UU.).

[0016] *In vivo*, modificaciones de cadenas de carbohidrato de INHC1 se pueden introducir usando sistemas de producción recombinantes. Cultivos de células tanto procariontas como eucariotas se pueden utilizar, tales como células de levadura, células fúngicas, células de insecto y células de mamíferos. Por ejemplo, células COS y células CHO son sistemas de producción mamíferos adecuados. Aunque los sistemas de cultivo de células de mamíferos tienen la capacidad para producir glicoproteínas con grupos de carbohidrato sialilado, la glicosilación óptima, natural o completa es frecuentemente difícil de conseguir y en consecuencia, las glicoproteínas recombinantemente producidas en general tienen un modelo de glicosilación diferente de sus homólogos naturales. Normalmente este modelo de glicosilación diferente es incompleto (en comparación con los homólogos naturales) con residuos expuestos de galactosa, N-acetilglucosamina y/o manosa. Asimismo, la producción de INHC1 en microorganismos eucarióticos como levaduras u hongos dará lugar a INHC1 con residuos expuestos de manosa.

[0017] El INHC1 con estructuras de carbohidrato modificadas también se puede preparar en animales transgénicos, preferiblemente en animales no humanos, tales como en conejos, animales bovinos, ratones, ratas, cabras y ovejas transgénicos. Preferiblemente, tales glicoproteínas se expresan en las glándulas mamarias de estos animales transgénicos no humanos de manera que las glicoproteínas se pueden obtener de la leche del animal. La persona experta entenderá que dependerá de la glicoproteína específica que haya que producir y de la cantidad que tenga que ser producida, qué animal transgénico es mejor usar para la producción. Un INHC1 preferido particularmente para usar en la presente invención es un INHC1 que se obtiene de la leche de un animal bovino transgénico o un animal del orden *Lagomorpha*, preferiblemente de la familia *Leporidae*, más

preferiblemente del género *Oryctolagus* y de la forma más preferible un conejo de la especie *Oryctolagus cuniculus*.

[0018] Diferentes tipos de modificaciones de la estructura de la cadena de carbohidrato de la proteína INHC1 en comparación con su homólogo derivado de plasma natural pueden ser obtenidos de sistemas de producción recombinantes, tales como glicosilación diferente, la infraglicosilación o la sobreglicosilación pueden ser introducidas separadamente o en combinación, simultáneamente o consecutivamente, algunos tipos se pueden introducir en una parte de la molécula, mientras que otros se introducen en otra parte de la molécula. Combinaciones preferidas de modificaciones que contribuyen a la eficacia terapéutica de la proteína incluyen residuos expuestos de galactosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, manosa, fucosa y/o fosfomanosa en el INHC1 de la invención. El INHC1 de la invención puede por ejemplo tener glicanos del tipo oligomanosa o del tipo de alta manosa. Preferiblemente al menos aproximadamente el 5, 10, 15, 20, 40 o 60 % de los residuos terminales en los glicanos del INHC1 se seleccionan de residuos de galactosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, manosa, fucosa y fosfomanosa. Por ejemplo un INHC1 preferido para usar en la presente invención contiene aproximadamente 2, 4, 5, 6 veces menos de ácido siálico en comparación con su homólogo natural y/o al menos aproximadamente el 5, 10, 15, 20, 40 o 60 % de sus glicanos N-enlazados son neutrales con hexosas terminales con grupos ecuatoriales 3- y 4-OH, tales como manosa y N-acetilglucosamina. En cambio, el INHC1 derivado de plasma no tiene glicosilación de tipo oligomanosa. Un INHC1 preferido para usar en la presente invención por ejemplo es un INHC1 humano recombinante producido en las glándulas mamarias de conejos que tiene 5-6 veces menos de ácido siálico en comparación con su homólogo natural y aproximadamente un 15 % de sus glicanos N-enlazados son neutrales con residuos de manosa terminal.

[0019] En una forma de realización preferida, la glicosilación diferente del INHC1 para usar en la presente invención produce una afinidad más alta para una proteína de unión de manosa en comparación con su homólogo derivado de plasma. La proteína de unión de manosa (MBP) es también referida como proteína de unión de manano, lectina de unión de manosa (MBL), lectina de unión de manano, o factor reactivo Ra bactericida. La MBP es una colectina que pertenece a un grupo de lectinas Ca^{2+} dependientes (tipo C) solubles. La MBP es un activador del complemento mediante la vía lectina (que difiere de las vías clásicas y alternativas de activación del complemento). El sistema del complemento es un componente importante de la defensa inmunitaria innata y se activa por tres vías: la vía clásica, la vía alternativa, y la recientemente descubierta vía lectina o lectina de unión de manosa (MBL). La activación de la vía clásica empieza cuando los dominios catalíticos C1r y C1s enlazan con complejos inmunitarios vía la proteína de reconocimiento C1q (véase la figura 11).

La vía alternativa está continuamente en rotación a un ritmo lento en una manera independiente de anticuerpos y atacará las partículas que no estén protegidas específicamente contra el complemento.

La vía lectina o MBL se inicia o activa tras la unión de MBL a estructuras de carbohidrato presentes en varios patógenos u otras estructuras celulares. Dos serina proteasas: serina proteasa asociada a lectina de unión de manano (MASP) -1 y -2 (véase la figura 11) se asocian con MBL y muestran similitudes sorprendentes con las serina proteasas C1s y C1r. El complejo tiene capacidades de activación C4 y C3 tras la unión a manano. El complejo contiene dos serina proteasas MASP-1 y MASP-2 enlazadas por un enlace de disulfuro. De esta forma, la MASP es capaz de adherir C4 y C3 dando como resultado su activación. El INHC1 de la invención tiene preferiblemente una afinidad más alta para una MBP humana en comparación con su homólogo derivado de plasma.

[0020] MBP reconoce hexosas expuestas con grupos ecuatoriales 3- y 4-OH, tales como manosa y N-acetilglucosamina y/o N-acetilhexosaminas. Un INHC1 preferido de la invención por lo tanto lleva tales hexosas terminales. La afinidad más alta para MBP, preferiblemente para MBP humana del INHC1 de la invención es preferiblemente tal que permita una focalización, unión y/o inhibición más eficaz de MBP en comparación con su homólogo derivado de plasma natural que carece de residuos expuestos de manosa y N-acetilglucosamina. La MBP humana se entiende aquí como referida a la proteína caracterizada por Kawasaki et al. (1983, J. Biochem 94:937-47), que tiene una secuencia de aminoácidos como se describe por Taylor et al. (1989, Biochem. J. 262 (3), 763-771; NCBI acceso nº CAA34079). La estructura de MBP de rata en un complejo con un oligosacárido se describe por Weis et al. (1992, Nature. 360:127-34). Para una mayor descripción de MBP humana véase por ejemplo US 6,846,649 y las referencias citadas en la misma.

[0021] Todas estas vías, (clásica, alternativa y lectina o MBL) generan una actividad enzimática crucial que finalmente lleva al ensamblaje del complejo de ataque de membrana (MAC o C5b-C9) (véase la figura 11). Bajo condiciones fisiológicas, la activación del sistema del complemento se controla eficazmente por la acción coordinada de proteínas reguladoras solubles y asociadas a la membrana. Una de estas proteínas es el inhibidor C1 (INHC1), un inhibidor de serina proteasa que enlaza C1s y C1r y actualmente el único inhibidor fisiológico conocido de la vía clásica. Además, el INHC1 es capaz de desactivar la activación del complemento mediada por MBL uniendo e inhibiendo MASP-1 y MASP-2.

[0022] La activación de las diferentes vías del complemento se mide preferiblemente en sueros humanos con el equipo Wielisa (producto nº. COMPL 300, Wieslab, Suecia). Este es un ensayo inmunoenzimático disponible comercialmente, específico para la detección de cada una de las tres vías del complemento con deposición de C5b-C9 como una lectura común. Brevemente, pocillos de placas de microtitulación se recubren con activadores específicos de cada una de las tres vías del complemento. Suero humano se diluye en diluyente que contiene bloqueador específico para asegurar que solo se activa la vía respectiva. El INHC1 de la invención o su homólogo derivado de plasma se adiciona posteriormente en una concentración que oscila entre 0 y 75 µmol, incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente y añadida a los pocillos. Durante una incubación posterior del suero humano diluido en el pozillo durante 60 minutos a 37°C, se activa el complemento por el recubrimiento específico. Los pocillos se lavan entonces y el C5b-C9 formado se detecta con una fosfatasa alcalina específica marcada como anticuerpo anti C5b-C9. Después de otro paso de lavado, se obtiene la detección de anticuerpos específicos por incubación con solución de sustrato de fosfatasa alcalina. La cantidad de activación del complemento correlaciona con la intensidad de color y se mide en términos de absorbancia (densidad óptica DO). Usando este equipo, se descubrió que tanto el INHC1 humano recombinante (INHC1hr) de la invención como el INHC1 derivado de plasma (INHC1dp) tienen capacidades inhibitoras similares para la vía clásica. Sin embargo, se descubrió que el INHC1 de la invención tiene aproximadamente un 20 % más de capacidad de inhibición para la vía MBL que el INHC1 derivado de plasma (véase el ejemplo 3). Por lo tanto, por consiguiente, en esta forma de realización preferida, la glicosilación diferente del INHC1 para usar en la presente invención produce una afinidad más alta para una MBP en comparación con su homólogo derivado de plasma, que resulta en una inhibición más eficaz de MBP, conduciendo a una inhibición más eficaz de la vía lectina. Una inhibición más eficaz de la vía lectina significa preferiblemente al menos un 5 % más de inhibición, aún más preferiblemente al menos un 10 % más de inhibición, aún más preferiblemente al menos un 15 % más de inhibición, aún más preferiblemente al menos un 20 %, aún más preferiblemente al menos un 25 %, aún más preferiblemente al menos un 30 %, aún más preferiblemente al menos un 35 %, aún más preferiblemente al menos un 40 %, aún más preferiblemente al menos un 45 %, aún más preferiblemente al menos un 50 %, aún más preferiblemente al menos un 55 %, aún más preferiblemente al menos un 60 %, aún más preferiblemente al menos un 65 %, aún más preferiblemente al menos un 70 %, aún más preferiblemente al menos un 75 %, aún más preferiblemente al menos un 80 %, aún más preferiblemente al menos un 85 %, aún más preferiblemente al menos un 90 %, aún más preferiblemente al menos un 95 % y de la forma más preferible al menos un 98 % más de inhibición. La activación de la vía lectina se mide preferiblemente con el equipo Wielisa como se ha descrito anteriormente.

[0023] El método de la invención se puede aplicar para prevenir, reducir o tratar cualquier tipo de lesión de isquemia y reperfusión. Preferiblemente, el método de la invención se aplica donde la lesión de isquemia y reperfusión se conoce por surgir al menos en parte, más preferiblemente en su mayoría, vía la vía lectina. Para lesión de isquemia miocárdica y reperfusión (J Immunology 2005,175: 541-546), lesión de reperfusión de isquemia renal (Am J Pathol. 2004 165(5):1677-88), lesión de reperfusión de isquemia gastrointestinal (J Immunol. 2005 15:174(10):6373-80), y para derrame cerebral (deSimoni et al, 2004 Am J. Pathol. 164:1857-63) se ha demostrado que la lesión de reperfusión surge principalmente mediante la vía lectina y a penas mediante la vía clásica. Por lo tanto, un INHC1 de la invención es preferiblemente un inhibidor más potente de la vía lectina en comparación con su homólogo de plasma natural. Preferiblemente un INHC1 de la invención es un inhibidor *in vivo* más potente de la vía lectina en el hombre en comparación con su homólogo derivado de plasma natural.

A diferencia del modelo experimental usado en los ejemplos de este documento, la ocurrencia de isquemia en la vida real es frecuentemente un evento imprevisto. Por lo tanto, la administración del INHC1 antes de la ocurrencia de isquemia y/o reperfusión posterior no es generalmente una opción realizable e inevitablemente en la práctica el INHC1 tendrá que administrarse algún tiempo si no varias horas después de la isquemia y/o reperfusión posterior. Esto, sin embargo, limita seriamente la utilidad terapéutica del INHC1 derivado de plasma convencional porque es principalmente inefectivo cuando se administra después de la reperfusión de isquemia y solo tiene una ventana de tiempo muy pequeña de eficacia terapéutica (véase la figura 2 y deSimoni et al, 2004 Am J. Pathol. 164:1857-63). En cambio, un INHC1 para usar en la presente invención tal como se ha definido anteriormente, sigue siendo capaz de ejercer sus efectos neuroprotectores también cuando se inyecta al menos 1 hora después de la isquemia o después de la aparición de la isquemia y/o 30 minutos después del inicio de la reperfusión. Por lo tanto, en una divulgación del método para la prevención, la reducción o el tratamiento de al menos una ocurrencia imprevista o prevista de lesión de isquemia y reperfusión, el INHC1 se administra al menos al final o después del periodo isquémico, es decir cuando el tejido isquémico es reperfundido. Más preferiblemente, el INHC1 se administra al menos 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 o 120 minutos después del periodo isquémico o después del inicio de la reperfusión. Preferiblemente, el INHC1 se administra no más de 24, 12, 6, 4 o 3 horas después de la isquemia o después de la aparición de la isquemia y/o la reperfusión. En una divulgación, el inhibidor C1 se administra al menos 3 horas después de la isquemia o después de la aparición de isquemia y/o reperfusión, preferiblemente al menos 6 horas, más preferiblemente al menos 9 horas, aún más preferiblemente al menos 18 horas.

[0024] En una divulgación, el método se aplica para prevenir, reducir o tratar una ocurrencia imprevista repentina o aguda de reperfusión de isquemia. Las condiciones y los trastornos asociados a una ocurrencia imprevista, repentina o aguda de lesión de reperfusión de isquemia incluyen pero de forma no limitativa lesión de reperfusión

de isquemia después de infarto de miocardio agudo (IMA), después de derrame cerebral, con derrame cerebral perinatal, después de choque hemorrágico, después de isquemia intestinal, después de cirugía coronaria de emergencia por fallo de angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP), después de cualquier cirugía vascular con pinzamiento de vaso sanguíneo (por ejemplo de aorta, conduciendo a isquemia de músculo esquelético), o después de pancreatitis después de manipulación de conducto biliar o pancreático (CPRE). En tales casos el INHC1 es preferiblemente administrado al menos 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 o 120 minutos después del infarto de miocardio agudo (IMA), después del derrame cerebral, con derrame cerebral perinatal, después del choque hemorrágico, después de la isquemia intestinal, después de la cirugía coronaria de emergencia por fallo de angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP), después de cualquier cirugía vascular con pinzamiento de vaso sanguíneo (por ejemplo de aorta, conduciendo a isquemia de músculo esquelético), o después de pancreatitis después de manipulación de conducto biliar o pancreático (CPRE). Alternativamente, el tiempo de administración del INHC1 se puede definir como preferiblemente al menos 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 o 120 minutos después del inicio de la reperfusión. Además, la lesión de reperfusión de isquemia imprevista se define preferiblemente como una lesión de reperfusión de isquemia donde una terapia o cirugía induce una reperfusión pero no una isquemia. Tal terapia o cirugía incluye pero no se limita a:

- trombolisis farmacológica, con terapias intravenosas y endovasculares para derrame cerebral, síndromes coronarios agudos, oclusión arterial periférica, émbolo pulmonar, oclusión de arteria renal,
- trombolisis mecánica, por ejemplo intervención coronaria percutánea, angioplastia arterial periférica, angioplastia arterial visceral,
- injerto de baipás de arteria coronaria,
- endarterectomía carótida,
- isquemia mesentérica,
- choque incluidos hemorrágico, cardiogénico, neurogénico, anafiláctico,
- fallo de colgajo, por ejemplo cirugía plástica,
- reimplantación de dígitos y extremidades,
- intestino estrangulado.

[0025] Según la invención, el método se aplica para prevenir, reducir o tratar una ocurrencia prevista de reperfusión de isquemia. Una ocurrencia prevista de lesión de reperfusión de isquemia incluye preferiblemente un escenario donde una terapia o cirugía inducen tanto una isquemia como una reperfusión posterior. Una lista no limitativa se da a continuación de terapia o cirugía donde hay un periodo temporal inducido sin flujo sanguíneo o con flujo reducido, es decir isquemia o hipoxia, seguido de reperfusión:

- baipás cardiopulmonar,
- reparación de aneurisma, incluida aórtica, cerebral,
- endarterectomía carótida donde una grapa se usa durante la cirugía,
- detención circulatoria hipotérmica profunda,
- uso de torniquete, es decir en escenarios de traumatismo,
- trasplante de órganos sólidos,
- cualquier otra interrupción iatrogénica de flujo sanguíneo.

Además, condiciones y trastornos asociados a una ocurrencia prevista de lesión de reperfusión de isquemia incluyen pero de forma no limitativa lesión de reperfusión de isquemia después de trasplante de órgano (pulmón, hígado, riñón, corazón), después de cualquier cirugía vascular con pinzamiento de vaso sanguíneo (por ejemplo de aorta, conduciendo a isquemia de músculo esquelético), o después de pancreatitis después de manipulación de conducto biliar o pancreático (CPRE), después o durante la circulación extracorporeal (CEC). En una divulgación, la reducción o el tratamiento de al menos una ocurrencia prevista de isquemia y lesión de reperfusión, el INHC1 de la invención se administra al menos al final o después del periodo isquémico, es decir cuando el tejido isquémico es reperfundido.

En una divulgación, el INHC1 se administra al menos 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 o 120 minutos después del periodo isquémico o después del inicio de la reperfusión. Preferiblemente, el INHC1 se administra no más de 24, 12, 6, 4 o 3 horas después de la isquemia o después de la aparición de la isquemia y/o reperfusión. En una divulgación, el inhibidor C1 se administra al menos una hora después de la isquemia o después de la aparición de la isquemia y/o reperfusión, 3 horas después de la isquemia o después de la aparición de la isquemia y/o reperfusión, preferiblemente al menos 6 horas, más preferiblemente al menos 9 horas, aún más preferiblemente al menos 18 horas.

[0026] Un método se proporciona para la prevención, reducción o tratamiento de al menos una ocurrencia prevista de isquemia y lesión de reperfusión, donde el INHC1 de la invención se administra antes o durante la isquemia y la reperfusión. La persona experta entenderá que dependiendo de la vida media del plasma del INHC1 de la invención, el punto temporal posible más temprano donde el INHC1 de la invención se puede administrar se puede ajustar para obtener el mejor resultado posible.

Según una forma de realización preferida, el INHC1 de la invención se administra continuamente a un sujeto que lo necesite y/o en caso de un trasplante de órgano al órgano que se va a trasplantar. El órgano que se va a

trasplantar se conserva preferiblemente en una composición con un medio adecuado y cantidad adecuada de INHC1.

Según la invención, antes de la ocurrencia de un tipo previsto de lesión de isquemia y reperfusión significa que la administración se realiza a lo sumo 3 horas antes al menos de una ocurrencia prevista de lesión de isquemia y reperfusión, preferiblemente a lo sumo 2 horas, más preferiblemente a lo sumo una hora, y de la forma más preferible a lo sumo 30 minutos. Un sujeto que lo necesite es un sujeto donde una ocurrencia prevista de lesión de isquemia y reperfusión puede ocurrir. Una ocurrencia prevista de lesiones de isquemia y reperfusión ya ha sido descrita en este documento. La administración del INHC1 antes de la ocurrencia prevista de la lesión de isquemia y reperfusión es atractiva ya que puede prevenir la ocurrencia de la mayoría si no de todos los daños asociados con la lesión de isquemia y reperfusión de la misma manera que se presenta cuando el INHC1 se administra después de la ocurrencia de la lesión de isquemia y reperfusión, si no mejor.

[0027] En una divulgación, el método se aplica a una ocurrencia imprevista de reperfusión de isquemia, tal como una lesión de reperfusión de isquemia que ocurre después de un derrame cerebral o un derrame cerebral perinatal. En estos tipos de ocurrencia imprevista de reperfusión de isquemia, demostramos que el inhibidor C1 de la invención ejerce un efecto neuroprotector en la penumbra isquémica. La penumbra isquémica significa preferiblemente el hipocampo y/o el córtex. Un efecto neuroprotector preferiblemente significa que la neurodegeneración se contrarresta en el hipocampo y/o el córtex después del tratamiento con el inhibidor C1 de la invención hasta 3 horas después de la aparición de la isquemia en el hipocampo y hasta 9 horas después de la aparición de la isquemia en el córtex. Más preferiblemente, la neurodegeneración se contrarresta hasta 4, 5, 6 horas o más en el hipocampo y hasta 10, 11, 12 horas o más en la isquemia. La neurodegeneración se evalúa preferiblemente como en el ejemplo 2: secciones cerebrales se colorean con un marcador específico para degeneración neuronal, preferiblemente Jade (Schmued LC, et al, referencia 4) y se analizan por microscopía fluorescente. Usando este método, el contrarresto de la neurodegeneración significa que se visualiza al menos un 2 % menos de células coloreadas en la muestra tratada en comparación con la muestra sin tratar. Preferiblemente, el contrarresto de la neurodegeneración significa al menos un 5 % menos de células coloreadas, al menos un 7 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 % o más.

[0028] En una divulgación, el uso del inhibidor C1 ejerce una reducción de la lesión inducida por la isquemia y/o reperfusión. Más preferiblemente, cuando la lesión de reperfusión de isquemia ocurrió después de un derrame cerebral o un derrame cerebral perinatal, el uso del inhibidor C1 de la invención ejerce una reducción del tamaño de infarto. Aún más preferiblemente, el tamaño de infarto se cuantifica como se presenta en el ejemplo 2. Aún más preferiblemente, usando este método de cuantificación, al menos 3 horas después de la aparición de la isquemia, se alcanza una reducción de al menos un 10 % del tamaño de infarto, aún más preferiblemente al menos un 20 %, aún más preferiblemente al menos un 40 %, aún más preferiblemente al menos un 60 %, aún más preferiblemente al menos un 70 %, aún más preferiblemente al menos un 80 %, y de la forma más preferible al menos un 90 %.

[0029] Un INHC1 para usar en los métodos de la invención puede ser parte de o estar combinado con composiciones farmacéuticas del estado de la técnica. Estas composiciones farmacéuticas típicamente comprenden el INHC1 y un portador farmacéuticamente aceptable o excipiente. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar de varias formas dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico, el área que se va a tratar y la estabilidad del compuesto activo. Las formulaciones adecuadas dependerán del método de administración. La composición farmacéutica se administra preferiblemente por administración parenteral, tal como por ejemplo por inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o por administración intratecal o intracraneal. En una forma de realización preferida se administra por infusión intravenosa. Se conocen formulaciones adecuadas para administración parenteral en la técnica y son formulaciones líquidas típicamente. Las preparaciones de INHC1 para administración parental deben ser estériles. La esterilización se realiza fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes de o después de liofilización y reconstitución. Las preparaciones de INHC1 se pueden administrar continuamente por infusión o por inyección en bolo. Las formulaciones de INHC1 líquidas pueden por ejemplo ser administradas por una bomba de infusión. Una composición típica para infusión intravenosa podría elaborarse para contener de 100 a 500 ml de NaCl 0,9 % estéril o 5 % de glucosa opcionalmente suplementada con un 20 % de solución de albúmina y de 100 a 500 mg de INHC1. Una composición farmacéutica típica para inyección intramuscular estaría hecha para contener, por ejemplo, 1 - 10 ml de agua tamponada estéril y de 1 a 250 mg de INHC1 de la presente invención. Se conocen bien métodos para la preparación de composiciones administrables parenteralmente en la técnica y se describen con más detalle en varias fuentes, entre las que se incluyen, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15a ed., Mack Publishing, Easton, PA, 1980).

[0030] La dosis efectiva, es decir, la concentración y frecuencia eficaces del INHC1 cuando se usa en los métodos de la invención, dependerá de la composición farmacéutica específica que se use, la gravedad de la enfermedad y el estado general de la salud del paciente. En general, la dosis efectiva de una composición farmacéutica que se basa en un INHC1 para usar en los métodos de la invención puede descubrirse mediante optimización rutinaria. Un punto de partida adecuado es la dosis que se usa para la composición farmacéutica

equivalente que se basa en INHC1 derivado de plasma. Un gran ventaja de una composición farmacéutica de la invención es que una alta dosis inicial se puede utilizar en el tratamiento, lo que realza la probabilidad de tratamiento exitoso. Esta alta dosis inicial es posible debido a que el INHC1 en la composición farmacéutica de la invención muestra una eliminación más rápida que su homólogo natural. En particular para el tratamiento de casos agudos, una alta dosis inicial del INHC1 de la invención puede ser ventajosa. Esta alta dosis inicial puede ser al menos 1,5, al menos 2, 3 o 4 veces la dosis del homólogo de origen natural que sería administrado.

[0031] En una forma de realización preferida, el INHC1 de la invención se administra por vía intravenosa con una dosis superior a 50, 100, 200, 400, 600, 800, o 1000 U/kg de peso corporal del individuo, preferiblemente en el rango de 50 - 2000, 100 - 1000, 200 - 800, 400 - 700 o 500 - 700 U/kg de peso corporal del individuo. Una unidad (U) de INHC1 es la cantidad de INHC1 presente en 1 mililitro de sangre humana. Una tal unidad corresponde a aproximadamente 275 microgramos de INHC1 derivado de plasma. Asumiendo un peso molecular de 110.000 dalton, la concentración en el plasma humano de INHC1 es de 2,5 micromoles por litro (Nuijens et al. (1989), J. Clin. Invert. 84:443).

[0032] En otra forma de realización preferida del método de la invención, la composición farmacéutica contiene además un agente trombolítico o es para usar en combinación con un agente trombolítico o después de un tratamiento posterior con tal agente. Un agente trombolítico se entiende aquí que significa un agente (fármaco) que es capaz de disolver un coágulo sanguíneo (trombo) y reabrir una arteria o vena. Los agentes trombolíticos son normalmente serina proteasas y convierten el plasminógeno en plasmina que rompe el fibrinógeno y la fibrina y disuelve el coágulo. Agentes trombolíticos preferidos incluyen reteplasa (r-PA o Retavase), alteplasa (t-PA o Activase), uroquinasa (Abbokinase), prourocinasa, complejo activador de estreptoquinasa purificada anisoiada (APSAC), y estreptoquinasa.

[0033] En otro aspecto, particularmente para jurisdicciones diferentes de la de EE.UU., la invención se refiere al uso de un INHC1 de la invención tal y como se define aquí arriba para la producción de un medicamento para la prevención, reducción o tratamiento de lesión de reperfusión conforme a cualquiera de los métodos definidos aquí arriba.

[0034] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que los artículos después de la palabra se incluyen, pero los artículos no mencionados específicamente no se excluyen. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de una unidad del elemento estén presentes, a menos que el contexto requiera claramente que allí sea una unidad y solo una de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" por tanto normalmente significa "al menos un/una".

Divulgaciones

[0035]

1. Uso de un inhibidor C1 con una vida media del plasma inferior a 6 horas en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, reducción o tratamiento de al menos una lesión de isquemia y reperfusión, en el cual el inhibidor C1 se administra después de la isquemia y la reperfusión.

2. El uso según la forma de realización 1, donde el inhibidor C1 tiene un nivel reducido de residuos de ácido siálico terminal en comparación con el inhibidor C1 humano derivado de plasma.

3. El uso según la forma de realización 1 o 2, donde el inhibidor C1 comprende un glicano que tiene un residuo terminal seleccionado de galactosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, manosa y fucosa.

4. El uso según cualquiera de las formas de realización 1 a 3, donde el inhibidor C1 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 65 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1.

5. El uso según cualquiera de las formas de realización 1 a 4, donde el inhibidor C1 se obtiene de una célula u organismo genéticamente modificado.

6. El uso según la forma de realización 5, donde el inhibidor C1 se obtiene a partir de un animal no humano transgénico.

7. El uso según la forma de realización 6, donde el inhibidor C1 se obtiene de la leche de un animal no humano transgénico.

8. El uso según la forma de realización 6 o 7, donde el animal no humano transgénico es un animal bovino o un animal del orden *Lagomorpha*, preferiblemente un conejo.

9. El uso según cualquiera de las formas de realización 1 a 8, donde el inhibidor C1 se usa en una cantidad en el rango de 50 - 2000 unidades por kg de peso corporal.

5 10. El uso según cualquiera de las formas de realización 1 a 9, donde el inhibidor C1 se administra al menos una hora después de la isquemia y/o reperfusión, preferiblemente al menos 3 horas, más preferiblemente al menos 6 horas, más preferiblemente al menos 9 horas, aún más preferiblemente al menos 18 horas.

10 11. El uso según cualquiera de las formas de realización 1 a 10, donde la composición farmacéutica también contiene un agente trombolítico o es para usar en combinación con un agente trombolítico o después de un tratamiento posterior con tal agente.

15 12. El uso según cualquiera de las formas de realización 1 a 11, donde la composición farmacéutica es para la prevención, reducción o tratamiento de al menos una ocurrencia repentina imprevista o aguda de lesión de isquemia y reperfusión.

20 13. El uso según la forma de realización 12, donde la composición farmacéutica es para la prevención, reducción o tratamiento de al menos una lesión de isquemia y reperfusión después de un derrame cerebral o derrame cerebral perinatal.

25 14. El uso según cualquiera de las formas de realización 1 a 11, donde la composición farmacéutica es para la prevención, reducción o tratamiento de al menos una ocurrencia prevista de lesión de isquemia y reperfusión, preferiblemente después de un trasplante de órgano.

30 15. Uso de un inhibidor C1, donde dicho inhibidor C1 es tal y como se define en cualquiera de las formas de realización 1 a 9, en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, reducción o tratamiento de al menos una lesión de isquemia y lesión de reperfusión, en el cual el inhibidor C1 se administra antes o durante al menos una ocurrencia prevista de lesión de isquemia y reperfusión.

35 16. El uso según la forma de realización 15, donde el inhibidor C1 se administra a lo sumo 3 horas antes al menos de una ocurrencia prevista de lesión de isquemia y reperfusión, preferiblemente a lo sumo 2 horas, más preferiblemente a lo sumo una hora, y de la forma más preferible a lo sumo 30 minutos y/o donde el inhibidor C1 de la invención se administra continuamente a un sujeto que lo necesita y/o en caso de un trasplante de órgano al órgano que se va a trasplantar.

40 17. El uso según la forma de realización 15 o 16, donde la ocurrencia prevista de la lesión de isquemia y reperfusión es un trasplante de órgano.

45 18. El uso según cualquiera de las formas de realización 1 a 17, donde la composición farmacéutica es para la prevención, reducción o tratamiento de al menos una lesión de isquemia y reperfusión conocida por surgir mediante la vía lectina, preferiblemente lesión de isquemia o reperfusión de miocardio, renal, gastrointestinal o derrame cerebral.

50 19. El uso según la forma de realización 13, donde el inhibidor C1 ejerce un efecto neuroprotector preferiblemente en el hipocampo y/o el córtex.

55 20. El uso según cualquiera de las formas de realización 1 a 19, donde el inhibidor C1 ejerce una reducción de una lesión inducida por la isquemia y/o la reperfusión.

Descripción de las figuras

[0036]

55 Figura 1 Evaluación del tamaño de infarto cuarenta y ocho horas después de la isquemia en ratones tratados con solución salina o con 15 U de INHC1hr (INHC1 humano recombinante, véase el ejemplo 1,2) por ratón pre, post y 1 h post isquemia.

60 Figura 2 Evaluación del tamaño de infarto veinticuatro horas después de la isquemia en ratones tratados con solución salina o con 15 U de INHC1h derivado de plasma por ratón pre, post y 1 h post isquemia.

65 Figura 3 Volumen de infarto evaluado 48 h después de la isquemia en ratones que reciben la solución salina o 15 U/ratón de INHC1hr de conejo en puntos temporales diferentes del principio de la isquemia. Los datos se expresan como media ± SEM (n=6 ratones por grupo). *P<0,05; **P<0,01 frente a solución salina, ANOVA de sentido único y Dunnett como prueba post-hoc.

Figura 4 Evaluación semicuantitativa de coloración de Fluoro-Jade.- = ninguna positividad, + = positividad baja, ++ = positividad intermedia, +++ = positividad alta.

5 Figura 5 Imágenes representativas de neurodegeneración por coloración de Fluoro-Jade en el cuerpo estriado de ratones que reciben solución salina o 15 U/ratón de INHC1hr de conejo en puntos de tiempo diferentes de la aparición de la isquemia. Barra: 100 µm.

10 Figura 6 Imágenes representativas de neurodegeneración por coloración de Fluoro-Jade en el giro dentado de ratones isquémicos que reciben solución salina o 15 U/ratón de INHC1hr de conejo en puntos temporales diferentes de la aparición de la isquemia. Barra: 100 µm.

15 Figura 7 Imágenes representativas de neurodegeneración por coloración de Fluoro-Jade en el córtex de ratones isquémicos que reciben solución salina o 15 U/ratón de INHC1hr de conejo en puntos temporales diferentes de la aparición de la isquemia. Barra: 100 µm.

20 Figura 8 Volumen de infarto evaluado 48 h después de la isquemia en ratones que reciben la solución salina o 5, 10, 15 U/ratón de INHC1hr de conejo 3 horas después de la aparición de la isquemia. Los datos se expresan como media ± SEM (n=6 ratones por grupo). **P<0,01 frente a solución salina, ANOVA de sentido único y Dunnett como prueba post-hoc.

25 Figura 9 Volumen de infarto evaluado 48 h después de la isquemia en ratones que reciben la solución salina o 15 U/ratón de INHC1dp o INHC1hr de vaca o conejo 3 horas después de la aparición de la isquemia. Los datos se expresan como media ± SEM (n=6 ratones por grupo). *P<0,05; **P<0,01 frente a solución salina, ANOVA de sentido único y Dunnett como prueba post-hoc.

30 Figura 10 Déficit generales (panel superior 10a) y focales (panel inferior 10b) evaluados 48h después de la isquemia en ratones que reciben la solución salina o 15 U/ratón de INHC1dp o INHC1hr de vaca o conejo 3 horas después de la aparición de la isquemia. (n=6 Ratones por grupo). **P<0,01 frente a solución salina, ANOVA de sentido único y Kruskal-Wallis como prueba post-hoc.

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

35 Figuras 12, 13 Efecto del INHC1hr y INHC1dp en la activación de la vía del complemento clásica. Aumentos de dosis de INHC1hr y INHC1dp (eje x) se añadieron a dos muestras diferentes de suero humano normal (panel superior de la muestra 1. panel inferior de la muestra 2). Como un control, el tampón donde se disuelve el INHC1hr (20 mM de citrato, 0,19 M de sacarosa pH 6,8, filtrado 0,22 µm) fue tomado en las mismas diluciones que el INHC1hr. La lectura fue de deposición de C5b-9, el control de suero normal en el ensayo define el 100 % (eje y). Los datos son media y DT (n = 3).

40 Figuras 14, 15 Efecto del INHC1hr y INHC1dp en la activación de la vía del complemento MBL. Aumentos de dosis de INHC1hr y INHC1dp (eje x) se añadieron a dos muestras diferentes de suero humano normal (panel superior de la muestra 1. panel inferior de la muestra 2). Como un control, el tampón donde se disuelve el INHC1hr (20 mM de citrato, 0,19 M de sacarosa pH 6,8, filtrado 0,22 µm) fue tomado en las mismas diluciones que el INHC1hr. La lectura fue de deposición de C5b-9, el control de suero normal en el ensayo define el 100 % (eje y). Los datos son media y DT (n = 3).

45 Figura 16 Efecto del INHC1hr y INHC1dp en la activación de tanto la vía clásica como la vía MBL de activación del complemento. Aumentos de dosis de INH C1hr o INHC1dp se añadieron a dos muestras diferentes de suero humano normal. Como un control, el tampón donde se disuelve el INHC1hr (20 mM de citrato, 0,19 M de sacarosa pH 6,8, filtrado 0,22 µm) fue tomado en las mismas diluciones que el INHC1hr. La lectura fue de deposición de C5b-9 y el porcentaje de activación del complemento se calculó por medición con esta fórmula: (Muestra-NC)/(PC-NC)x100. PC se fija en 100 %. Los resultados mostrados son DT media de 3 diluciones independientes en cada concentración evaluada.

55 **Ejemplos**

Ejemplo 1

60 [0037] Experimentos precedentes mostraron que una dosis individual de INHC1hr (15 U/ratón) administrada a principios del periodo isquémico reduce significativamente el volumen isquémico, como se ha evaluado 48 horas después de la isquemia en nuestro modelo de ratón de isquemia focal cerebral de una manera muy similar al INH derivado de plasma. En este ejemplo hemos explorado la ventana de tiempo de eficacia para la actividad neuroprotectora del INHC1hr en el volumen isquémico y los déficits funcionales. También hemos estudiado el efecto del INHC1hr en resultados de siete días evaluando la neurodegeneración y la respuesta glial.

1. Métodos

1.1 Isquemia cerebral focal transitoria

5 [0038] La isquemia se consiguió mediante oclusión de arteria cerebral mediana (OACM) tal y como se ha descrito anteriormente (De Simoni et al., 2003 y 2004, *supra*). Se indujo anestesia por 5 % de isoflurano en
 10 mezcla de N₂O/O₂ (70/30 %) y se mantuvo por 1,5-2 % de isoflurano en la misma mezcla. Para confirmar la adecuación de la oclusión vascular en cada animal, se midió el flujo sanguíneo por flujometría por láser Doppler (Transonic BLF-21) utilizando una sonda flexible de 0,5 mm de fibra óptica, (Transonic, tipo M, 0,5 mm de
 15 diámetro) posicionada en la superficie cerebral y fijada con material de impresión en el cráneo en las coordenadas siguientes: AP = - 1 mm L= -3,5 mm. Brevemente, la arteria carótida común adecuada fue expuesta y un filamento siliconado (7-0) fue introducido en la arteria carótida interna a través de una incisión realizada en la arteria carótida común y avanzada a la arteria cerebral anterior para bloquear su bifurcación en la arteria cerebral anterior y la ACM. El filamento fue avanzado hasta que se observó una reducción > 70 % del flujo sanguíneo, en comparación con el punto de partida preisquémico. Después de 30 min de isquemia, el flujo sanguíneo fue restaurado extrayendo cuidadosamente el filamento de nilón.

1.2 Tratamiento con fármacos

20 [0039] Los ratones recibieron una única inyección iv de INHC1hr con la dosis de 15 U/ratón en 150 µl o el mismo volumen de solución salina en un tiempo diferente de la isquemia:

- a principios del periodo isquémico (pre INHC1hr).
- al final del periodo isquémico (post INHC1hr).
- 25 - una hora después del principio del periodo isquémico (1h post INHC1hr). El INHC1hr usado en este estudio fue producido en conejos transgénicos que expresan INHC1 humano en sus glándulas mamarias y purificado de la leche obtenida de estos animales como se describe en WO 01/57079.

1.3 Evaluación de déficits neurológicos

30 [0040] Cuarenta y ocho horas después de la isquemia, cada ratón fue valorado en dos balanzas de función neurológica únicas para el ratón, por un investigador preparado cegado a las condiciones experimentales. Para déficits generales los ratones fueron puntuados de 0 a 28 en cada una de las categorías siguientes: pelo, orejas, ojos, postura, actividad espontánea, comportamiento epiléptico. Para déficits focales los ratones fueron
 35 puntuados de 0 a 28 en cada una de las categorías siguientes: simetría del cuerpo, paso, escalada, comportamiento repetitivo, simetría de extremidades delanteras, repetición obligatoria, respuesta sensorial. Los datos se expresan como media y 25^o a 75^o percentiles.

1.4 Cuantificación de tamaño de infarto

40 [0041] Cuarenta y ocho horas después de la isquemia, los ratones fueron profundamente anestesiados con Equitensin (120 µl/ratones, ip) y perfundidos transcárdialmente con 30 ml de PBS 0,1 mol/l, pH 7,4, seguido de 60 ml de paraformaldehído enfriados (4%) en PBS. Después de extraer cuidadosamente los cerebros del cráneo, fueron transferidos a 30 % de sacarosa en PBS a 4°C durante toda la noche para crioprotección. Los cerebros
 45 fueron entonces rápidamente congelados por inmersión en isopentano a -45°C durante 3 min antes sellarlos en viales y almacenarlos a -70°C hasta su uso. Para la determinación del tamaño de lesión, se cortaron en serie secciones coronales de 20 µm de cerebro a intervalos de 240 µm y se colorearon con rojo neutral (rojo neutral Gurr Certistain, BDH, Inglaterra). En cada porción, las áreas infartadas fueron evaluadas ciegamente y delineadas por la palidez relativa de coloración histológica. El área infartada fue determinada sustrayendo del área el tejido sano en el hemisferio ipsilateral del área del hemisferio contralateral en cada sección. Los volúmenes de infarto fueron calculados por la integración de áreas infartadas en cada porción cerebral como se cuantificaba con un analizador de imagen asistida por ordenador y calculado por un sistema de imagen analítica.

1.5 Prueba en campo abierto

55 [0042] Siete días después de la isquemia se evaluó el comportamiento del ratón mediante la prueba en campo abierto. Esta prueba puede ser útil para detectar ansiedad y comportamiento explorador, y actividad locomotora en ratones isquémicos a largo plazo. El campo abierto consistió en una caja de plástico (41 x 41 x 41 cm) que contenía 4 objetos diferentes. El área del campo abierto fue dividida en una zona central de 28 x 28 cm y la zona
 60 de borde circundante. Los ratones fueron individualmente colocados en el centro del campo abierto y su comportamiento se observó durante 5 minutos por un investigador cegado a las condiciones experimentales. Se contó el número de cruces internos (principalmente relacionados con comportamiento de ansiedad), cruces externos (principalmente relacionados con actividad motora), retrocesos (principalmente relacionados con comportamiento explorador) y contactos con objetos (principalmente relacionados con actividad sensorial/motora).
 65

1.6 Recuento neuronal

[0043] Siete días después de la isquemia, los ratones fueron perfundidos transcárdialmente tal y como se ha descrito anteriormente. Para determinar el recuento neuronal, secciones coronales de 20 μm de cerebro se cortaron en serie a intervalos de 640 μm y se colorearon con violeta de cresilo (acetato de violeta de cresilo, Sigma, St. Louis, MO). Tres secciones de 20 μm de los hemisferios ipsilateral y contralateral fueron seleccionadas para el recuento neuronal. La primera sección estaba en coordenadas estereotáxicas anteroposteriores +0.86 de bregma. La cantidad de pérdida neuronal fue calculada reuniendo el número de neuronas viables en las tres secciones de ambos hemisferios y expresadas como porcentaje de hemisferio contralateral. Se usó un microscopio Olympus BX61, interconectado con una videocámara de sistema de imagen blanda Colorview y software de análisis. El análisis cuantitativo fue realizado con una ampliación 40X por un investigador cegado al tratamiento.

1.7 Inmunohistoquímica para astrocitos y microglía

[0044] Siete días después de la isquemia, secciones coronales de veinte μm de grosor de ratones isquémicos perfundidos transcárdialmente fueron preparadas y usadas para la evaluación de astrocitos e inmunocoloración de microglía/macrófagos. Brevemente, las secciones fueron enjuagadas durante 30 minutos en 0,4 % de Tritón X-100 en 0,1 mol/L de PBS seguido de 15 minutos en 0,1 % de Tritón X-100 y 3 % de suero de cabra normal (NGS) en PBS. Las secciones fueron incubadas luego durante toda la noche con anticuerpo para astrocitos y microglía (anti-GFAP 1:1500, Chemicon; anti-CD11b 1:250, gentilmente regalado por Dr. A. Doni, Mario Negri Institute). El día siguiente, las secciones fueron lavadas en PBS e incubadas con anticuerpo secundario biotinilado durante 1 h, lavadas e incubadas con avidin-biotin-peroxidasa. Después de reaccionar con 3'-3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro las secciones fueron lavadas, secadas, deshidratadas mediante alcoholes graduados, fijados en xileno y tapado con cubreobjetos utilizando DPX Mountant antes del análisis de microscopía óptica.

2. Resultados

2.1 Ventana de tiempo de eficacia

2.1.1 Evaluación de déficits neurológicos

[0045] Se evaluaron los déficits neurológicos en ratones isquémicos que reciben INHC1hr o solución salina 48 h después de la isquemia. Se observó una ligera, aunque no significativa, reducción en cada grupo de ratones tratados con INHC1hr en comparación con los ratones isquémicos tratados con solución salina (pre INHC1hr: 9 y 12; post INHC1hr: 7 y 11; 1h post INHC1hr: 9 y 13, solución salina: 10 y 12,5, media de déficits generales y focales, respectivamente) (datos no mostrados).

2.1.2 Evaluación del tamaño de infarto

[0046] Cuarenta y ocho horas después de la isquemia los ratones tratados con INHC1hr mostraron una reducción marcada del volumen isquémico, pre, post y 1h-post dosis de 15 U/ratón ($13,67 \pm 2,59 \text{ mm}^3$, $9,06 \pm 0,77 \text{ mm}^3$ y $8,24 \pm 1,00 \text{ mm}^3$, respectivamente), en comparación con ratones tratados con solución salina ($41,51 \pm 7,01 \text{ mm}^3$) (Figura 1, los datos se expresan como media \pm SEM).

2.2 Resultados de siete días

2.2.1 Prueba en campo abierto

[0047] La isquemia indujo una reducción significativa en el número de retrocesos en comparación con animales primitivos mientras que en el grupo tratado con INHC1hr este parámetro no era diferente de los ratones no isquémicos. Los otros parámetros evaluados no mostraron ninguna diferencia entre los tres grupos.

2.2.2 Recuento neuronal

[0048] Para evaluar si el efecto protector del INHC1hr es de larga duración, evaluamos la pérdida neuronal 7 días después de la inducción de la isquemia y del tratamiento con el fármaco. Los resultados muestran que el efecto protector del INHC1hr sigue estando presente en ese momento: $14 \% \pm 2,18 \%$ contra $4 \% \pm 1,24 \%$ media de ratones tratados con solución salina y INHC1hr, respectivamente (datos no mostrados).

2.2.3 Inmunohistoquímica para microglía/macrófagos y astrocitos

[0049] Siete días después de la isquemia una gran cantidad de microglía activada y macrófagos infiltrados fueron observados en el hipocampo y el cuerpo estriado lesionados de los ratones isquémicos que reciben solución

salina (datos no mostrados). Quince unidades de INHC1hr pre fueron capaces de contrarrestar esta activación e infiltración en las dos áreas consideradas (datos no mostrados).

5 [0050] El hipocampo ipsilateral de ratones isquémicos tratados con solución salina mostró una astrocitosis ligera que no fue diferente de las que se observaron en ratones isquémicos con INHC1hr (datos no mostrados). Otras áreas cerebrales no mostraron ninguna activación astrocítica pertinente en ningún grupo.

3. Conclusiones

10 [0051] Los presentes datos muestran que el INHC1hr en la dosis de 15 U/ratón es de forma similar eficaz en la reducción del volumen isquémico cuando se da en el principio (pre) o al final del periodo isquémico (post, es decir, en reperfusión). De manera más importante, el inhibidor es capaz de ejercer sus efectos neuroprotectores también cuando se inyecta 1 hora después de la aparición de la isquemia (1h post). Además, la acción protectora del INHC1hr sigue estando presente 7 días después de la isquemia. Estos resultados contrastan fuertemente con el INHC1h derivado de plasma que cuando se inyecta 1 hora después de la isquemia ha perdido casi
15 completamente la capacidad para ejercer efectos neuroprotectores (véase la figura 2).

[0052] Los resultados principales de este estudio son los siguientes:

- 20 1. La vida media del INHC1hr en el plasma de ratón es aproximadamente de 3 horas (en una dosis de 15 U/ratón). La buena correlación entre antígeno y actividad funcional indica que la proteína recombinante circula en el plasma únicamente en su forma activa; es posible que la distribución del tejido contribuyera a la reducción de los niveles de plasma.
- 25 2. El INHC1hr, en la dosis de 15 U/ratón pre es muy eficaz para reducir el volumen isquémico (reducción del 69 %).
3. El INHC1hr en la dosis de 15 U/ratón es capaz de reducir claramente el número de neuronas que se degeneran en el hipocampo como se evalúa mediante coloración por Fluoro-Jade indicando así que la reducción en el volumen isquémico se debe a la reposición de neuronas.
- 30 4. El INHC1hr es de forma similar eficaz para reducir el volumen isquémico cuando se da en el principio (pre), al final del periodo isquémico (post, es decir, en reperfusión) o 1 hora después de la aparición de la isquemia (1h post, es decir, 30 min desde el principio de reperfusión). Así el INHC1hr tiene una ventana de tiempo de eficacia mas amplia que el INHC1dp (que ya no es eficaz cuando se da 1 h después de la isquemia).
- 35 5. El efecto neuroprotector de la dosis de pre INHC1hr es de larga duración, como se mostró mediante recuento neuronal realizado 7 días después del principio de la isquemia.
6. El INHC1hr indujo una ligera mejora de déficits generales y focales evaluado 48 horas después de la isquemia. Este hallazgo es similar a lo que se observó con el INHC1dp. Para evaluar el efecto del INHC1hr en resultados de comportamiento a largo plazo, analizamos el comportamiento del ratón con prueba en campo abierto. Siete días después de la isquemia el comportamiento de retrocesos muestra
40 una puntuación inferior significativamente en la isquemia en comparación con los ratones primitivos. Esta reducción no está presente en ratones tratados con INHC1hr cuya puntuación no es diferente de la de los ratones de control.
7. El INHC1hr es capaz de contrarrestar la activación/reclutamiento de microglía/macrófagos en el cerebro de ratones isquémicos como se evalúa en puntos temporales tanto tempranos (48 h) como tardíos (7 días). Estas células son un índice de la respuesta inflamatoria del tejido cerebral.
- 45 8. La fuerte respuesta astrocítica suscitada por la isquemia a 48 h se mitiga por el INHC1hr. La activación astrocítica se reduce marcadamente a 7 días en ambos grupos experimentales y no pudo observarse ninguna diferencia entre ratones tratados con solución salina y con INHC1hr.

50 **Ejemplo 2:** estudio en la acción neuroprotectora del INH-C1hr en los modelos de ratón de isquemia cerebral focal

[0053] Hemos demostrado previamente que 15 U de INH-C1hr tienen una acción neuroprotectora marcada en un modelo de isquemia/reperfusión cerebral murina también cuando se administran 1 hora después de la aparición de la isquemia/reperfusión, a diferencia del INH-C1dp que, en ese momento de postratamiento, ya no es eficaz. Esta neuroprotección es de larga duración, de hecho siete días después de la isquemia y el tratamiento, los cerebros isquémicos de ratones tratados con INH-C1hr todavía muestran un tamaño de infarto disminuido. En los siguientes experimentos hemos determinado la ventana de tiempo de eficacia (más allá de 1 hora post) y la respuesta a la dosis de la actividad neuroprotectora del INH-C1hr en el volumen isquémico. Además hemos
60 realizado una comparación directa entre INH-C1dp, INH-C1hr de conejo y vaca (en la dosis y puntos temporales más efectivos para INH-C1hr de conejo) usando el mismo protocolo.

Métodos

65 Animales

[0054] Los procedimientos que implicaban animales y su cuidado fueron conducidos de conformidad con las pautas institucionales que cumplen las leyes y políticas nacionales (D.L. N.116, G.U. Suppl. 40, 18 de febrero de 1992) e internacionales (Directiva del Consejo 86/609/CEE, OJ L 358,1; 12 dic.,1987; IH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, U.S. National Research Council, 1996). Ratones macho C57B1/6 (26-28 g, Charles River, Calco, Italia) fueron alojados 5 por jaula y mantenidos a temperatura constante ($21 \pm 14^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa (60 %) con programa regular de luz/oscuridad (7 am - 7 pm). Comida (gránulos para ratones de Altromin) y agua disponible *ad libitum*.

Isquemia cerebral focal transitoria

[0055] La isquemia se consiguió por oclusión de arteria cerebral mediana (OACM) como se ha descrito previamente^{1,3}. Se indujo anestesia por 5 % de isoflurano en mezcla de NaO/Oa (70/30 %) y se mantuvo por 1,5-2 % de isoflurano en la misma mezcla. Para confirmar la adecuación de la oclusión vascular en cada animal, se midió el flujo sanguíneo por flujometría por láser Doppler (Transonic BLF-21) utilizando una sonda flexible de 0,5 mm de fibra óptica (Transonic, tipo M, 0,5 mm de diámetro) posicionada en la superficie cerebral y fijada con material de impresión en el cráneo en las coordenadas siguientes: AP = -1 mm; L= -3,5 mm. Brevemente, la arteria carótida común adecuada fue expuesta y un filamento siliconado (7-0) se introdujo en la arteria carótida interna a través de una incisión realizada en la arteria carótida común y avanzado a la arteria cerebral anterior para bloquear su bifurcación en la arteria cerebral anterior y la ACM. El filamento fue avanzado hasta que se observó una reducción > 70 % del flujo sanguíneo, en comparación con el punto de partida preisquémico. Después de 30 min de isquemia, se restauró el flujo sanguíneo extrayendo cuidadosamente el filamento de nilón.

Tratamiento con fármaco

[0056] Los ratones recibieron una inyección iv única de INH-C1 (INH-C1hr de conejo, INH-C1hr de vaca o INH-C1dp) con diferentes dosis en tiempos diferentes de la isquemia. Los ratones de control recibieron el mismo volumen de solución salina.

Evaluación de déficits neurológicos

[0057] Cuarenta y ocho horas después de la isquemia, cada ratón fue valorado en dos balanzas de función neurológica únicas al ratón, por un investigador preparado cegado a las condiciones experimentales. Para déficits generales, los ratones fueron puntuados de 0 a 28 en cada una de las categorías siguientes: pelo, orejas, ojos, postura, actividad espontánea, comportamiento epiléptico. Para déficits focales, los ratones fueron puntuados de 0 a 28 en cada una de las categorías siguientes: simetría del cuerpo, paso, escalada, comportamiento repetitivo, simetría de extremidades delanteras, repetición obligatoria, respuesta sensorial. Los datos se expresan como media y percentiles.

Cuantificación del tamaño de infarto

[0058] Cuarenta y ocho horas después de la isquemia, los ratones fueron profundamente anestesiados con Equitensin (120 μl /ratón, ip) y perfundidos transcardialmente con 30 ml de PBS 0,1 mol/l, pH 7,4, seguido de 60 ml de paraformaldehído enfriados (4 %) en PBS. Después de extraer cuidadosamente los cerebros del cráneo, se transfirieron a 30 % de sacarosa en PBS a 4°C durante toda la noche para crioprotección. Los cerebros fueron entonces rápidamente congelados por inmersión en isopentano a -45°C durante 3 min antes de ser sellados en viales y almacenados a -70°C hasta su uso. Para la determinación del tamaño de lesión, se cortaron secciones de cerebro coronales de 20 μm en serie a intervalos de 240 μm y se colorearon con rojo neutral (rojo neutral Gurr Certistain, BDH, Inglaterra). En cada porción, las áreas infartadas fueron evaluadas ciegamente y delineadas por la palidez relativa de coloración histológica. El área infartada se determinó por la sustracción del área del tejido sano en el hemisferio ipsilateral del área del hemisferio contralateral en cada sección. Los volúmenes de infarto se calcularon por la integración de áreas infartadas en cada porción cerebral como se cuantifica con analizador de imagen asistida por ordenador y calculado por sistema de imagen analítica.

Evaluación de neurodegeneración

[0059] La presencia de neurodegeneración fue evaluada en secciones de 20 μm de grosor por coloración de Fluoro-Jade⁴, un marcador para degeneración neuronal. Brevemente, las secciones fueron secadas y rehidratadas en etanol (100 % - 75 %) y agua destilada. Luego, fueron incubadas en 0,06 % de permanganato de potasio durante 15 minutos, lavadas en agua destilada y transferidas a 0,001 % de solución de coloración de Fluoro-Jade durante 30 minutos. Después de la coloración, las secciones fueron enjuagadas en agua destilada, secadas, sumergidas en xileno y tapadas con cubreobjetos utilizando DPX Mountant (BDH, Poole, Reino Unido) antes del análisis de microscopía fluorescente.

Resultados

Ventana de tiempo de eficacia en isquemia transitoria

[0060] Para evaluar la ventana de tiempo de eficacia, 15 U de INH-C1hr de conejo o solución salina fueron dados a 3, 6, 9, 18 y 24 horas del principio de la isquemia. Cuarenta y ocho horas más tarde, los ratones isquémicos tratados con INH-C1hr de conejo 3 y 6 horas después de la aparición de la isquemia mostraron una reducción marcada de volumen isquémico ($11,71 \pm 0,63 \text{ mm}^3$ y $20,38 \pm 2,37 \text{ mm}^3$, respectivamente) en comparación con los ratones isquémicos tratados con solución salina ($44,43 \pm 5,94 \text{ mm}^3$). También cuando se administró 9 y 18 horas después de la isquemia, el INH-C1hr de conejo era todavía eficaz, aunque en menor medida ($23,63 \pm 4,11 \text{ mm}^3$ y $27,13 \pm 2,58 \text{ mm}^3$ respectivamente). Veinticuatro horas después de la isquemia el inhibidor perdió su acción beneficiosa ($41,92 \pm 2,76 \text{ mm}^3$). (Fig. 3). En ratones tratados con solución salina, la coloración de Fluoro-Jade mostró que había neurodegeneración presente en el córtex e hipocampo del cuerpo estriado. Cuando se administró en puntos temporales tempranos, el INH-C1hr fue capaz de contrarrestar la neurodegeneración en el hipocampo (hasta 3 horas) y en el córtex (hasta 9 horas). Cuando los ratones fueron tratados con este inhibidor 6 y 9 horas después de la isquemia, se observaron algunas neuronas en degeneración en el hipocampo. En puntos temporales más tardíos del tratamiento (18 y 24 horas), cuando el volumen isquémico era mayor, la coloración de Fluoro-Jade mostró la presencia de neuronas con neurodegeneración en el córtex. En todos los puntos temporales considerados, el cuerpo estriado mostró una neurodegeneración extensa, en animales tratados tanto con solución salina como con INH-C1hr (Fig. 5, 6, 7). Una evaluación semicuantitativa de coloración de Fluoro-Jade para cada animal fue realizada por un investigador cegado a las condiciones experimentales (figura 4).

Respuesta a la dosis en isquemia transitoria

[0061] Ya que la dosis de INH-C1 usada en seres humanos para angioedema hereditario es inferior a la que usamos en ratones para tratamiento de derrame cerebral, se usaron dosis inferiores en nuestro modelo isquémico. Basándonos en los resultados del experimento precedente, elegimos posttratamiento 3 h para experimento de respuesta a la dosis. Dosis diferentes de INH-C1hr de conejo (5 y 10 unidades) fueron dadas 3 horas después de la aparición de la isquemia y reperusión. La dosis de 10 U/ratón era todavía eficaz para reducir el volumen isquémico ($22,10 \pm 3,65 \text{ mm}^3$), mientras que 5 U de INH-C1hr de conejo no modificaron la extensión del daño cerebral ($47,39 \pm 4,08 \text{ mm}^3$). Estos datos muestran que el INH-C1hr de conejo es capaz de modificar la lesión isquémica de una manera dependiente de la dosis (fig. 8). En ratones tratados con 10 U de INH-C1hr algunas neuronas con neurodegeneración, como demostrado por coloración de Fluoro-Jade, fueron observadas en el cuerpo estriado pero no en el hipocampo y el córtex, mientras que ratones isquémicos tratados con 5 U mostraron una mayor neurodegeneración en el córtex del cuerpo estriado (no mostrado).

[0062] Los déficits neurológicos generales y focales no mostraron ninguna variación significativa ni en la ventana de tiempo de eficacia ni en el experimento de respuesta a la dosis (no mostrado).

[0063] Comparación entre el efecto de INH-C1dp y INH-C1hr (de conejos y vacas) Nuestros datos precedentes en INH-C1dp fueron obtenidos con un modelo diferente de isquemia cerebral transitoria. Para comparar directamente INH-C1dp, INH-C1hr de vaca y INH-C1hr de conejo, estos compuestos fueron dados a ratones donde se indujo isquemia con el mismo protocolo experimental (filamento recubierto de silicona). Los inhibidores fueron administrados en la dosis de 15 U/ratón 3 horas después de la aparición de la isquemia. Como previsto, el INH-C1-dp no era capaz de ejercer una acción neuroprotectora en este punto temporal ($47,39 \pm 4,08 \text{ mm}^3$). En cambio, los ratones isquémicos tratados con INH-C1hr de vaca mostraron un volumen isquémico reducido significativamente en comparación con los ratones tratados con solución salina, aunque en menor medida que la de los ratones tratados con INH-C1hr de conejo (Fig. 9). Sorprendentemente tanto los déficits generales como focales fueron mejorados significativamente por INH-C1hr de vaca (Fig. 10). La coloración de Fluoro-Jade mostró una gran neurodegeneración en el cerebro de ratones isquémicos tratados con INH-C1dp en todas las áreas consideradas (córtex, cuerpo estriado e hipocampo). La coloración del cerebro de ratones tratados con INH-C1hr de vaca mostró un grado variable de neurodegeneración en el córtex y el hipocampo ya que en 3 de 6 ratones una marcada neurodegeneración fue observada en ambas de estas áreas, mientras que en los otros 3 ratones la neurodegeneración estaba presente en muy pequeña cantidad. El cuerpo estriado mostró una extensa coloración de Fluoro-Jade en 6 de los 6 ratones.

Observaciones

[0064] El dato más pertinente de este trabajo es la ventana de tiempo de eficacia del INH-C1hr de conejo. La dosis de 15 U/ratón de INH-C1hr de conejo fue capaz de reducir significativamente el volumen isquémico hasta 18 horas después de la aparición de la isquemia en contraste con el INH-C1dp que 3 horas después de la isquemia ya ha perdido su efecto neuroprotector. Esta característica sorprendente hace que el INH-C1hr sea un candidato posible para la terapia de derrame cerebral en seres humanos. La diferente eficacia de INH C1 dp y hr podría deberse a la glicosilación diferente de las dos moléculas dando como resultado a su vez una afinidad más alta para una proteína de unión de manosa (MBP) de INH-C1hr en comparación con el de derivado de plasma. Uniendo MBP, el INH-C1hr provoca la inhibición de la vía lectina del complemento, implicada en la patogénesis del daño en la isquemia/reperusión de corazón, riñón y gastrointestinal⁷⁹. El papel de esta vía pobremente caracterizada sigue siendo desconocido en la isquemia cerebral y se requieren experimentos adicionales para

clarificar el mecanismo de neuroprotección de INH-C1hr. El efecto neuroprotector superior de INHC1hr sobre INHC1dp en la ventana de tiempo después de la aparición de la isquemia puede ser además explicado por una selección más eficaz de la molécula recombinante en el sitio del daño de tejido bien a través de unión a superficie de célula de antígenos y/o bien una penetración en el tejido más eficaz. Más investigación necesita ser realizada para dilucidar completamente el mecanismo molecular exacto subyacente a la observación descrita en esta invención. La coloración de Fluoro-Jade da evidencia indirecta de cómo la lesión evoluciona con el tiempo. El tratamiento temprano con INH-C1hr proporciona un rescate completo de la penumbra isquémica (hipocampo y córtex). Cuanto más tarde se administra el tratamiento, más neuronas en la penumbra se degeneran. Estos hallazgos confirman que el INH-C1hr ejerce su acción neuroprotectora en la penumbra isquémica. El INH-C1hr de conejo es capaz de reducir el volumen isquémico en una manera dependiente de la dosis. La dosis más efectiva de INH-C1hr (15 U/ratón, correspondiente a aproximadamente 600 U/kg), usada durante la ventana de tiempo del experimento de eficacia, es mucho superior a la usada en seres humanos para angioedema hereditario (aproximadamente 25-100 U/kg). Para verificar si una dosis inferior era todavía eficaz para reducir la neurodegeneración y el infarto isquémico, se realizó un experimento de respuesta a la dosis. Los resultados mostraron que 400 U/kg (10 u/ratón) de INH-C1hr eran todavía capaces de contrarrestar significativamente el insulto isquémico, aunque en menor medida. Una dosis 8 veces superior a la usada para AEH (5 U/ratón, 200 U/kg) no era eficaz. Estos hallazgos están en línea con la evidencia que muestra que dosis grandes de INH-C1 se requieren para uso terapéutico en varios escenarios de inflamación⁵. En particular tales dosis son necesarias para alcanzar un efecto inhibitorio importante en las moléculas de adhesión endotelial⁶, un mecanismo implicado en la patogénesis de daño cerebral de isquemia/reperfusión. Finalmente, el INH-C1 de vaca proporcionó neuroprotección, cuando se dio 3 horas después de la isquemia en la dosis de 15 U/ratón, aunque menos marcadamente que el INH-C1hr de conejo. El inhibidor de vaca fue también capaz de mejorar los déficits neurológicos en comparación con los ratones tratados con solución salina. Estas conclusiones indican que esta molécula es capaz de mejorar las condiciones generales de ratones isquémicos.

Ejemplo 3: comparación de la capacidad del INHC1hr y del INHC1 derivado de plasma para inhibir la activación de las vías clásica y MBL

Materiales y métodos

[0065] El efecto del INHC1hr y del INHC1dp (Cetor, Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos) en la función de la vía clásica y lectina fue examinado en la pantalla de sistema del complemento Wieslab TM (Euro-Diagnostica, Malmö, Suecia) que usa dos fuentes diferentes de suero. Una fuente de suero se incluye en el equipo, donde se usa como un control positivo (de aquí en adelante referida como muestra de suero 1). La otra muestra de suero se obtuvo a partir de una reserva disponible comercialmente de suero humano (reserva de 25 donantes diferentes; Kordia, Leiden, Países Bajos), de aquí en adelante referida como muestra de suero 2. Ambas muestras de suero fueron incubadas en triplos independientes con 0, 15, 30 y 75 μmol de INHC1hr o INHC1dp durante 30 min a temperatura ambiente. Por lo tanto, soluciones madre de INHC1dp y INHC1hr fueron diluidas en agua en concentraciones apropiadas. Volúmenes correspondientes con 15, 30 y 75 μmol de hINHC1 o INHC1dp fueron tomados y ajustados a 15 μl con agua. El tampón donde el INHC1hr es disuelto (20 mM de citrato, 0,19 M de sacarosa pH 6,8, filtrado 0,22 μm) fue tomado en las mismas diluciones que el INHC1hr para controlar la interferencia con el sistema del complemento Wieslab. Los controles positivos (PC) y los controles negativos (NC) de tanto la vía clásica como la MBL (provistos con el equipo), y ambas muestras de suero fueron diluidos 1/101 en el diluyente CP para la vía clásica y diluyente MP para la vía MBL según las instrucciones del fabricante. De estos sueros diluidos, 127,5 μl fueron suplementados con 22,5 μl de agua, INHC1dp, INHC1hr o tampón e incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, 100 μl /pocillo de PC, NC, diluyente CP o MP (formas preliminares) y muestras fueron pipeteados en la placa apropiada e incubados durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación, los pocillos fueron lavados 3 veces con 300 μl /pocillo de solución de lavado y posteriormente incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente con 100 μl /pocillo de conjugado. Después de otro lavado, los pocillos fueron incubados con 100 μl /pocillo de sustrato y nuevamente incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue detenida por la adición de 100 μl /pocillo 5 mM EDTA y la absorbancia se leyó a 405 nm.

[0066] Para el cálculo de los resultados, la absorbancia de las formas preliminares (diluyente CP o MP) fue sustraída del PC, NC y las muestras. La activación del complemento de porcentaje fue calculada por medición con esta fórmula: $(\text{Muestra-NC})/(\text{PC-NC}) \times 100$. Esto significa que el PC está siempre ajustado al 100 %. Para cada condición, la media, la desviación típica y el % de CV se calculó.

Resultados

Efecto del INHC1hr y INHC1-dp en la vía clásica como examinado por Wielisa.

[0067] Las propiedades inhibitorias de tanto el INHC1hr como del INHC1dp en la activación de la vía clásica fueron analizadas en dos muestras de suero diferentes. Como se muestra en las figuras 12, 13 y 16, tanto el INHC1hr como el INHC1dp redujeron dependientemente de la dosis la vía clásica mediada de deposición C5b-9 en ambas muestras de suero. Mientras que el INHC1hr - en una concentración de 75 μM - parece inhibir la

activación de la vía clásica en el suero 1 ligeramente más fuerte que el INHC1dp, tal efecto no se veía en la muestra de suero 2. En todas las otras concentraciones evaluadas ninguna diferencia en las propiedades inhibitorias fue observada entre el INHC1hr y el INHC1dp. Por lo tanto, se concluyó que tanto el INHC1hr como el INHC1dp son igualmente eficaces en la activación de la vía clásica de inhibición en sueros humanos.

5 El efecto del INHC1hr y el INHC1dp en la vía MBL como examinado por Wielisa.

[0068] En el mismo conjunto de experimentos, también las propiedades inhibitorias de tanto el INHC1hr como el INHC1dp en la activación de la vía MBL fueron analizadas. Como se muestra en las figuras 14, 15 y 16, tanto el INHC1hr como el INHC1dp también redujeron dependientemente de la dosis la activación de la vía MBL. Sin embargo, a diferencia de la vía clásica donde ninguna diferencia fue vista, el INHC1hr pareció ser un inhibidor más potente de la vía MBL en comparación con el INHC1dp. En todas las 3 concentraciones evaluadas y en ambas muestras de suero, la inhibición mediada de INHC1hr de la vía MBL es ~ 20 % más alta en comparación con el INHC1dp. Por lo tanto, se concluyó que el INHC1hr es un inhibidor más eficaz de la vía MBL que el INHC1dp.

Conclusión

[0069] Los resultados muestran que tanto el INHC1hr como el INHC1dp son eficaces igualmente en la inhibición de la vía clásica, pero el INHC1hr es un inhibidor más potente de la vía MBL. En todas las concentraciones evaluadas, la inhibición de la vía MBL mediada de INHC1hr fue ~20 % más fuerte en comparación con el INHC1dp.

Referencias

25 [0070]

1. De Simoni, M. G. et al. Neuroprotección por inhibidor (C1) del complemento en la isquemia cerebral transitoria de ratón. *J Cereb Blood Flow Met* 23, 232-239 (2003).
2. De Simoni, M. G. et al. La potente acción neuroprotectora del inhibidor C1 en la lesión de reperfusión de isquemia cerebral no requiere C1q. *Am J Patol* 164, 1857-63 (2004).
3. Storini, C. et al. El inhibidor C1 protege contra la lesión de reperfusión de isquemia cerebral vía inhibición de reclutamiento de célula e inflamación. *Neurobiol Disease* 19, 10-17 (2005).
4. Schmued, L. C. & Hopkins, K. J. Fluoro-Jade B: un marcador fluorescente de afinidad alta para la localización de degeneración neuronal. *Brain Res* 874, 123-30. (2000).
5. Caliezi, C. et al. Inhibidor de esterasa C1: un agente anti-inflamatorio y su uso potencial en el tratamiento de enfermedades diferentes del angioedema hereditario. *Pharmacol Rev* 52, 91-112 (2000).
6. Cai, S. et al. Un papel directo para el inhibidor C1 en la regulación de adhesión de leucocitos. *J Immunol* 174, 6462-6 (2005).
7. Walsh, M. C. et al. Lectina de unión de manosa es un regulador de inflamación que acompaña lesión de isquemia miocárdica y reperfusión. *J Immunol* 175,541-6 (2005).
8. Moller-Kristensen, M. et al. La lectina de unión de manano reconoce estructuras en los riñones de ratón reperfundidos isquémicos y se implica en lesión de tejido. *Scand J Immunol* 61, 426-34 (2005).
9. Hart, M. L. Et al. La lesión de reperfusión de isquemia gastrointestinal es dependiente de la vía del complemento de lectina sin implicar C1q. *J Immunol* 174,6373-80 (2005).

Listado de secuencias

50 [0071]

- <110> Pharming Intellectual Property B.V.
- <120> Uso de inhibidor C1 para la prevención de lesión de reperfusión de isquemia
- 55 <130> P6005723EP1
- <150> 05112630.8
- <151> 2005-12-21
- 60 <150> 60/760,944
- <151> 2006-01-23
- <160> 1
- 65 <170> Versión de PatentIn 3.3

ES 2 654 816 T3

<210> 1
 <211> 478
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 1

```

Asn Pro Asn Ala Thr Ser Ser Ser Ser Gln Asp Pro Glu Ser Leu Gln
1          5          10          15

Asp Arg Gly Glu Gly Lys Val Ala Thr Thr Val Ile Ser Lys Met Leu
20          25          30

Phe Val Glu Pro Ile Leu Glu Val Ser Ser Leu Pro Thr Thr Asn Ser
35          40          45

Thr Thr Asn Ser Ala Thr Lys Ile Thr Ala Asn Thr Thr Asp Glu Pro
50          55          60

Thr Thr Gln Pro Thr Thr Glu Pro Thr Thr Gln Pro Thr Ile Gln Pro
65          70          75          80

Thr Gln Pro Thr Thr Gln Leu Pro Thr Asp Ser Pro Thr Gln Pro Thr
85          90          95

Thr Gly Ser Phe Cys Pro Gly Pro Val Thr Leu Cys Ser Asp Leu Glu
100         105         110

Ser His Ser Thr Glu Ala Val Leu Gly Asp Ala Leu Val Asp Phe Ser
115         120         125

Leu Lys Leu Tyr His Ala Phe Ser Ala Met Lys Lys Val Glu Thr Asn
130         135         140
    
```

ES 2 654 816 T3

Met Ala Phe Ser Pro Phe Ser Ile Ala Ser Leu Leu Thr Gln Val Leu
145 150 155 160

Leu Gly Ala Gly Glu Asn Thr Lys Thr Asn Leu Glu Ser Ile Leu Ser
165 170 175

Tyr Pro Lys Asp Phe Thr Cys Val His Gln Ala Leu Lys Gly Phe Thr
180 185 190

Thr Lys Gly Val Thr Ser Val Ser Gln Ile Phe His Ser Pro Asp Leu
195 200 205

Ala Ile Arg Asp Thr Phe Val Asn Ala Ser Arg Thr Leu Tyr Ser Ser
210 215 220

Ser Pro Arg Val Leu Ser Asn Asn Ser Asp Ala Asn Leu Glu Leu Ile
225 230 235 240

Asn Thr Trp Val Ala Lys Asn Thr Asn Asn Lys Ile Ser Arg Leu Leu
245 250 255

Asp Ser Leu Pro Ser Asp Thr Arg Leu Val Leu Leu Asn Ala Ile Tyr
260 265 270

Leu Ser Ala Lys Trp Lys Thr Thr Phe Asp Pro Lys Lys Thr Arg Met
275 280 285

Glu Pro Phe His Phe Lys Asn Ser Val Ile Lys Val Pro Met Met Asn
290 295 300

Ser Lys Lys Tyr Pro Val Ala His Phe Ile Asp Gln Thr Leu Lys Ala
305 310 315 320

Lys Val Gly Gln Leu Gln Leu Ser His Asn Leu Ser Leu Val Ile Leu
325 330 335

Val Pro Gln Asn Leu Lys His Arg Leu Glu Asp Met Glu Gln Ala Leu
340 345 350

Ser Pro Ser Val Phe Lys Ala Ile Met Glu Lys Leu Glu Met Ser Lys
355 360 365

Phe Gln Pro Thr Leu Leu Thr Leu Pro Arg Ile Lys Val Thr Thr Ser
370 375 380

ES 2 654 816 T3

Gln Asp Met Leu Ser Ile Met Glu Lys Leu Glu Phe Phe Asp Phe Ser
385 390 395 400

Tyr Asp Leu Asn Leu Cys Gly Leu Thr Glu Asp Pro Asp Leu Gln Val
405 410 415

Ser Ala Met Gln His Gln Thr Val Leu Glu Leu Thr Glu Thr Gly Val
420 425 430

Glu Ala Ala Ala Ala Ser Ala Ile Ser Val Ala Arg Thr Leu Leu Val
435 440 445

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

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un inhibidor C1 que tiene un nivel reducido de residuos de ácido siálico terminal en comparación con el inhibidor C1 derivado de plasma, donde el nivel reducido de residuos de ácido siálico terminal produce una vida media del plasma inferior a 6 horas, en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, reducción o tratamiento de una lesión de isquemia/reperfusión, en la que se administra el inhibidor C1 como mucho 3 horas, 2 horas, 1 hora, o 30 minutos antes de al menos una ocurrencia prevista de lesión de isquemia y reperfusión.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, donde dicha ocurrencia prevista de lesión de isquemia y reperfusión es un trasplante de órgano.
- 15 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde dicho inhibidor C1 se administra continuamente a un sujeto que lo necesite.
4. Uso según la reivindicación 1 o 2, donde dicho inhibidor C1 se administra al órgano que se va a trasplantar.

Fig 1

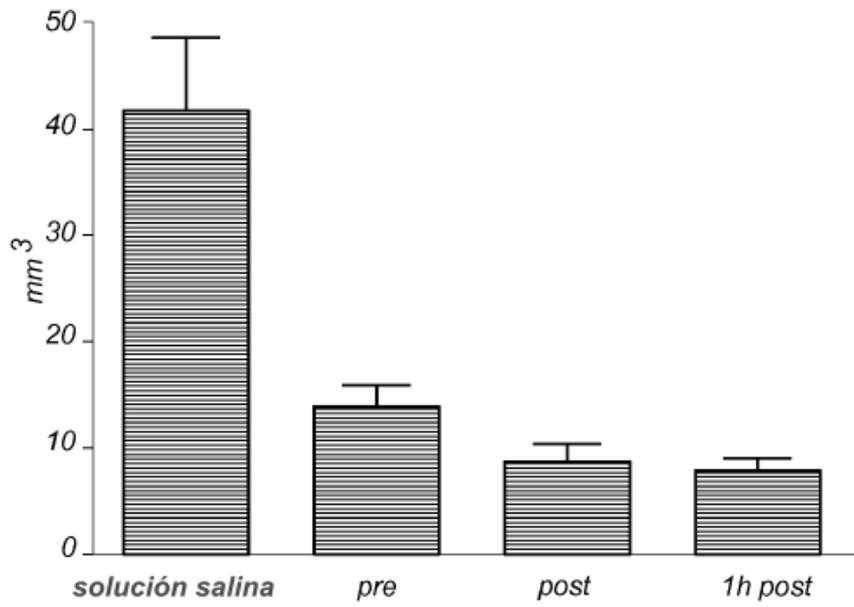


Fig 2

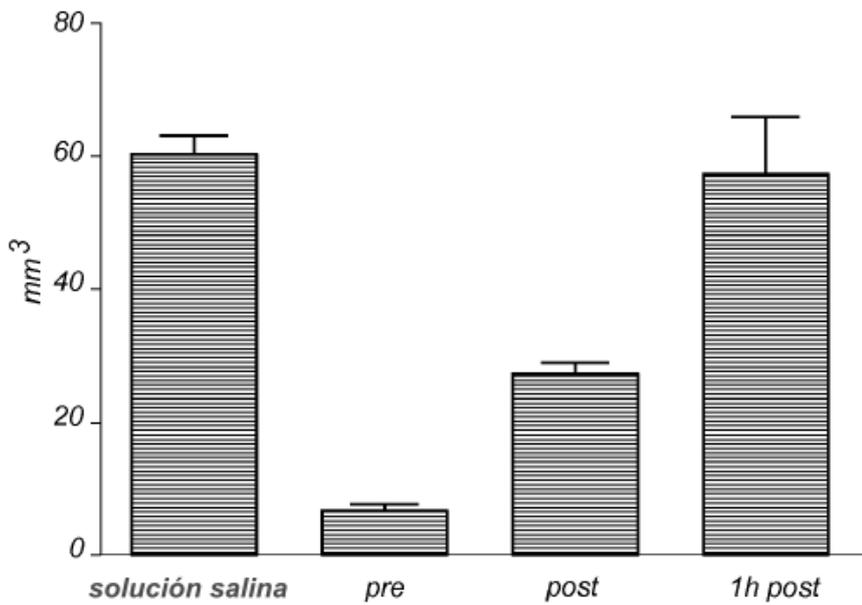


Fig 3

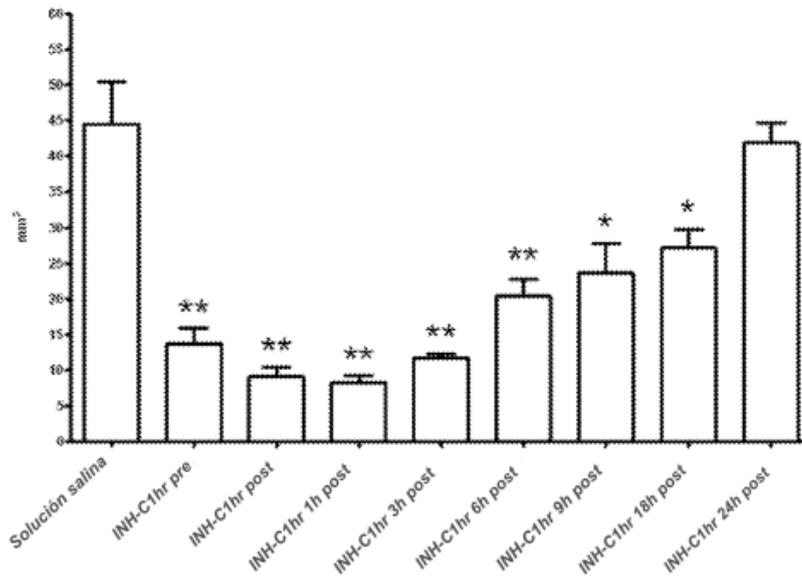


Fig 4

	Solución salina	Pre	Post	3h post	6h post	9h post	18h post	24h post
Cuerpo estriado	+++	++	+	++	+++	++	++	+++
	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++
	+++	++	+	++	++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++
	+++	+++	++	+++	++	++	++	+++
	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
Hipocampo	+++	-	-	-	+	-	++	+++
	++	-	-	-	++	++	-	+++
	+	-	-	+	-	++	+	++
	+++	-	-	-	++	+	++	++
	++	-	-	-	+	+++	+++	+++
	+++	-	-	-	+++	+	+++	+
Córtex	+++	-	-	-	-	-	+	+++
	++	-	-	-	-	-	+	++
	+++	-	-	-	-	-	-	++
	++	-	-	-	-	-	+++	+++
	++	-	-	-	-	+	-	+
	+++	-	-	-	+	-	++	+++

Fig 5

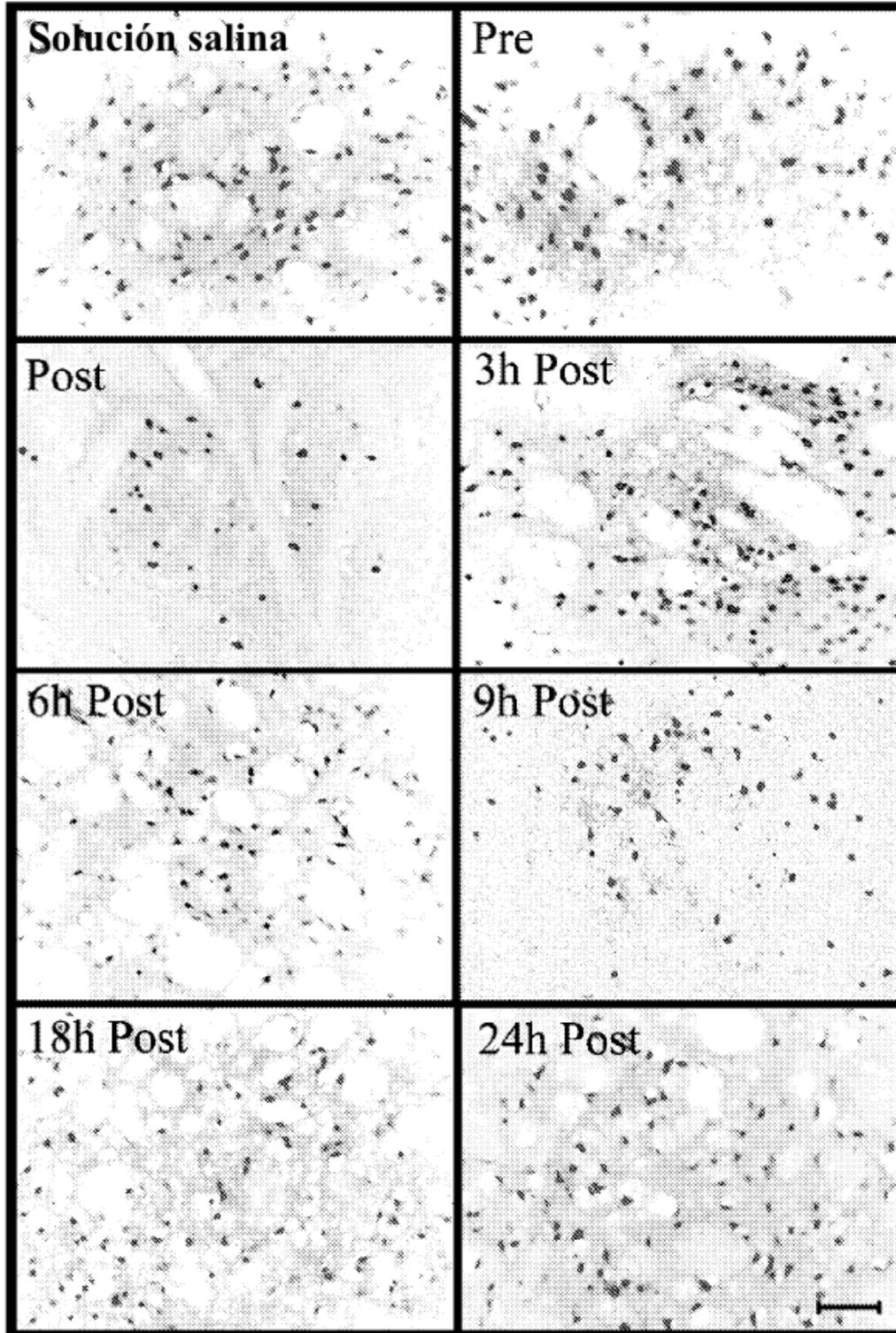


Fig 6

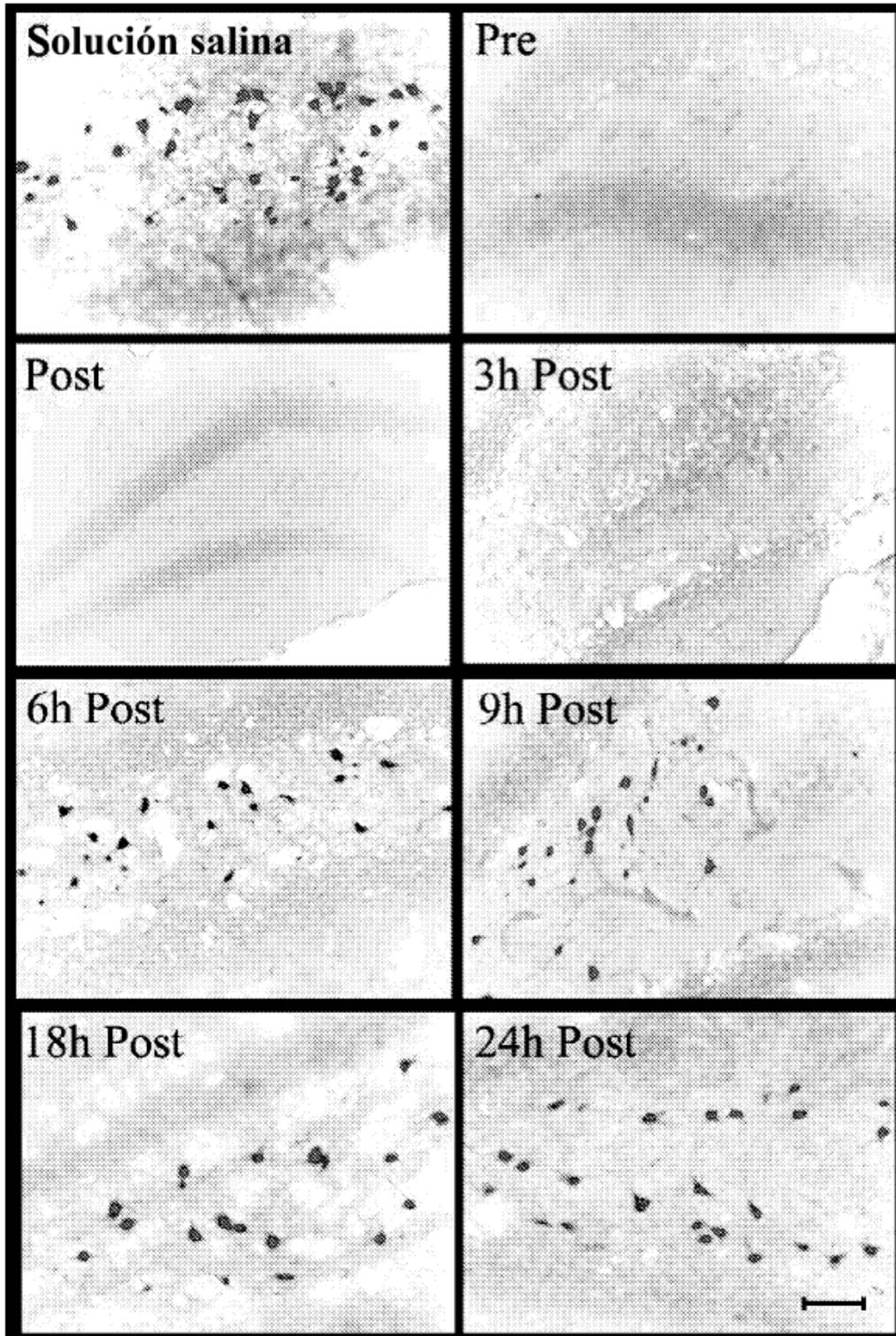


Fig 7

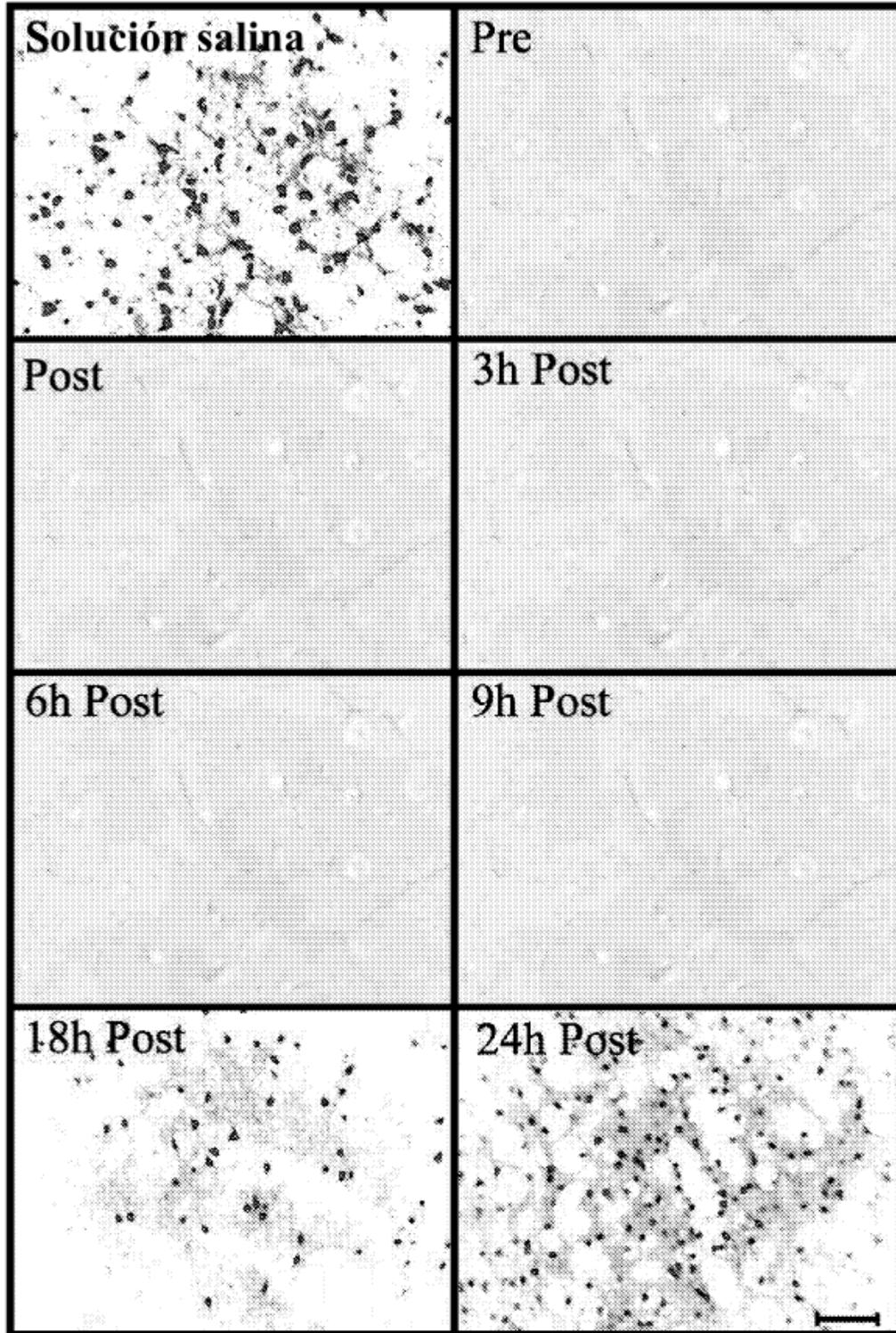


Fig 8

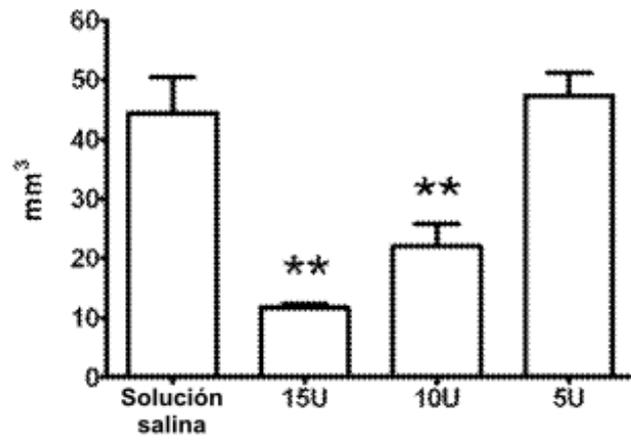


Fig 9

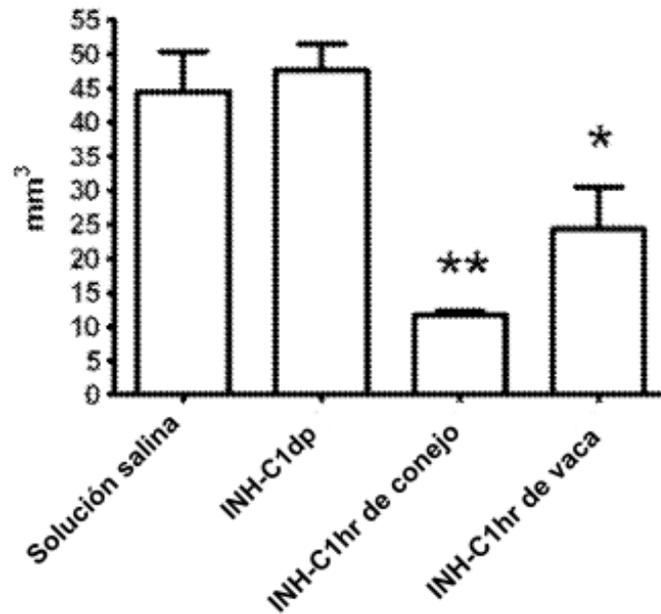


Fig 10a

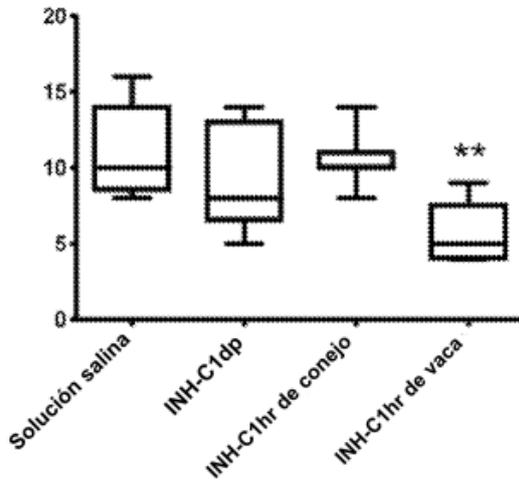


Fig 10b

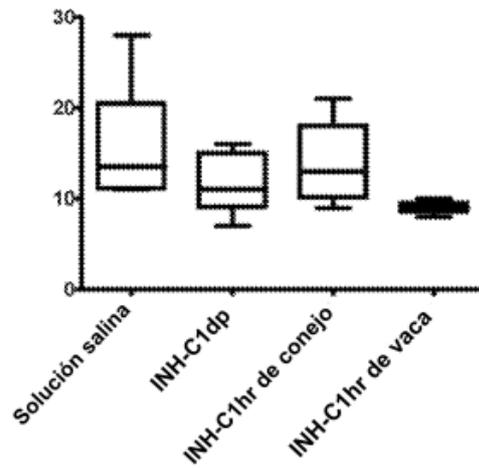


Fig 11

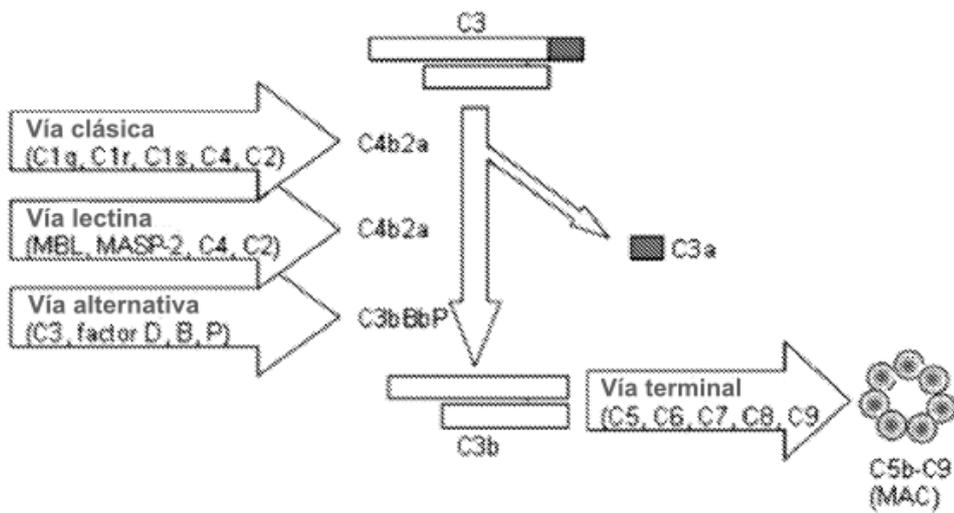


Fig 12

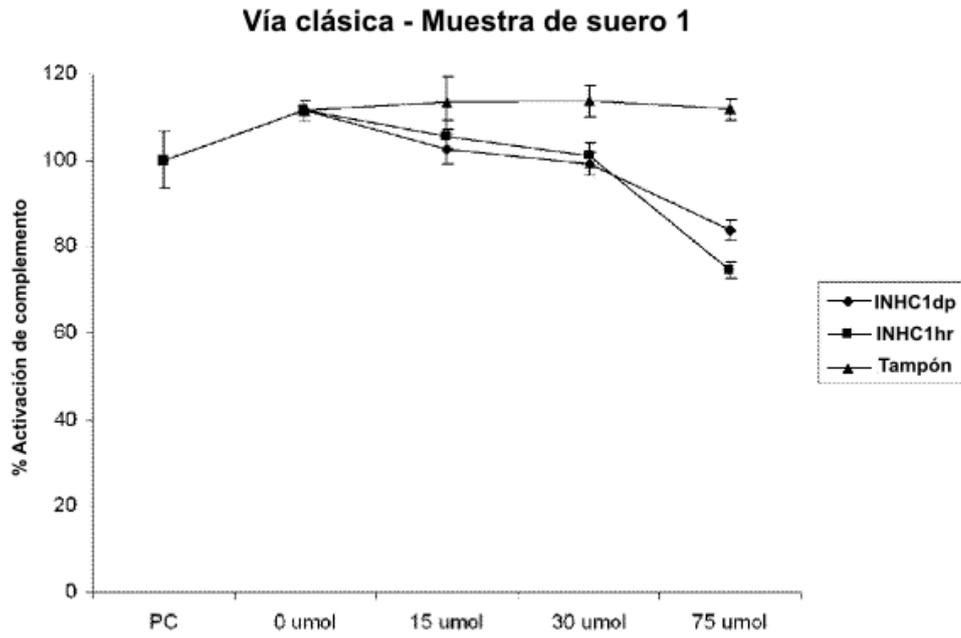


Fig 13

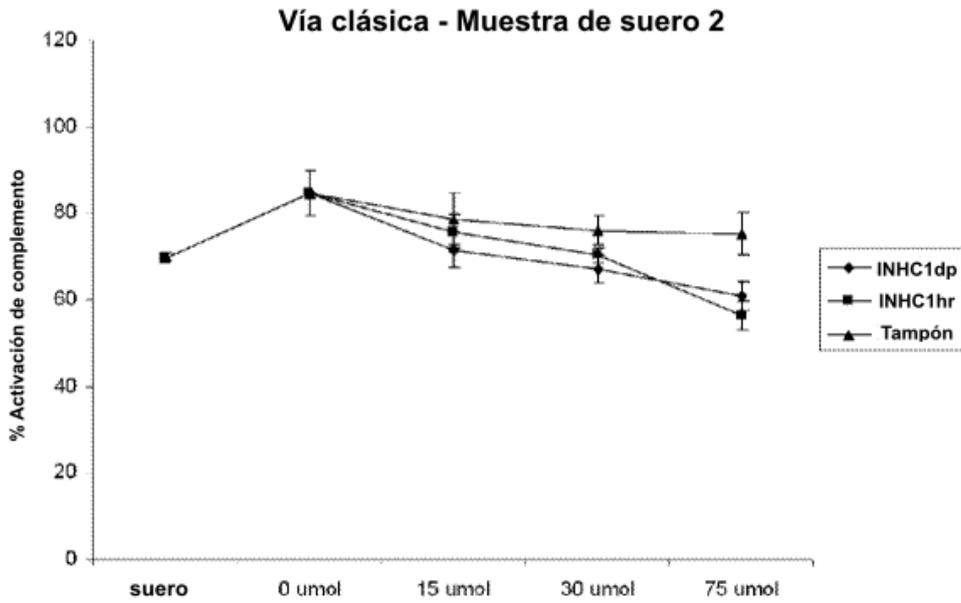


Fig 14

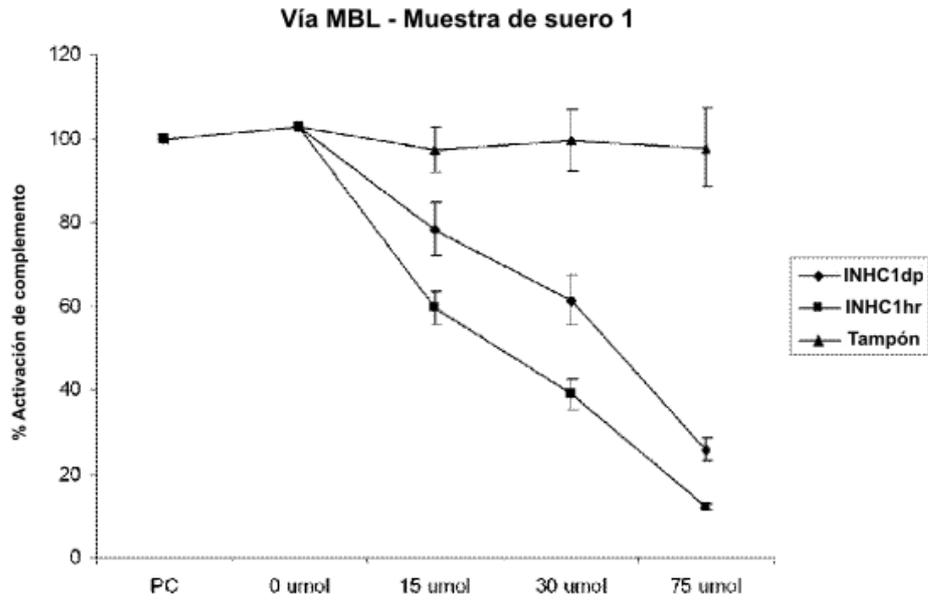


Fig 15

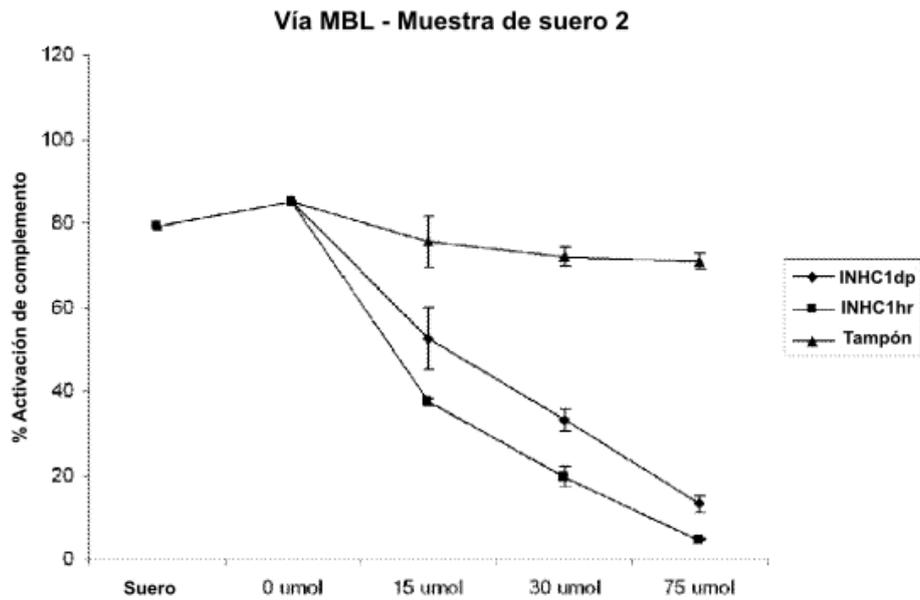


Fig 16

Ensayo de complemento Wieslab							
% Activación de complemento							
		Vía clásica		Vía MBL			
		Media	DT	Media	DT		
Muestra de suero 1	PC	100	7	100	16		
	INHC1dp	0 umol	111	2	103	10	
		15 umol	103	3	78	6	
		30 umol	99	3	61	6	
		75 umol	84	2	26	3	
	INHC1hr	0 umol	111	2	103	10	
		15 umol	106	4	59	4	
		30 umol	101	3	39	4	
		75 umol	74	2	12	1	
	Tampón	0 umol	111	2	103	10	
		15 umol	113	6	97	6	
		30 umol	114	3	99	8	
		75 umol	112	2	98	9	
	Muestra de suero 2	NHC1dp	0 umol	85	5	85	7
			15 umol	72	4	52	7
			30 umol	67	4	33	3
75 umol			61	3	13	2	
INHC1hr		0 umol	85	5	85	7	
		15 umol	76	4	37	1	
		30 umol	70	2	19	2	
		75 umol	56	3	5	0	
Tampón		0 umol	85	5	85	7	
		15 umol	79	6	75	6	
		30 umol	76	3	72	2	
		75 umol	75	5	71	2	