

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 999**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/55 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2012 PCT/EP2012/068643**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13041677**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2012 E 12761739 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 2758076**

54 Título: **Terapia de combinación que usa inmunoglobulina e inhibidor de C1**

30 Prioridad:

24.09.2011 US 201161538832 P

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

31.05.2019

73 Titular/es:

**CSL BEHRING GMBH (50.0%)
Emil-von-Behring-Strasse 76**

**35041 Marburg, DE y
THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF
AMERICA AS REPRESENTED BY THE
SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH
AND HUMAN SERVICES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BASTA, MILAN;
CHEN, XINZHI y
MATTSON, MARK**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 714 999 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

Terapia de combinación que usa inmunoglobulina e inhibidor de C1

5 Esta invención se realizó en parte con el apoyo del gobierno bajo el acuerdo de colaboración n.º 29466-09, concedido por El Instituto Nacional sobre el Envejecimiento, Institutos Nacionales de la Salud. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

10 La presente divulgación se refiere en general al uso de inhibidor de C1 (inhibidor de C1 esterasa o C1-INH) e inmunoglobulina, tal como inmunoglobulina G derivada de plasma (IVIG), en el tratamiento de isquemia cerebral.

15 El accidente cerebrovascular isquémico agudo (AIS, *acute ischemic stroke*) es un problema de salud pública significativo, que provoca una alta tasa de mortalidad y déficits neurológicos permanentes en los supervivientes. El tratamiento intervencionista actual, en forma de trombólisis enzimática, beneficia solo a un pequeño porcentaje de pacientes. Menos del 6% de todos los pacientes con AIS en los EE. UU. son elegibles para los tratamientos del estándar de atención actuales, tal como trombólisis enzimática mediante activador de plasminógeno tisular recombinante rtPA, principalmente debido a la corta ventana terapéutica (por ejemplo, de manera habitual aproximadamente 1 hora tras un accidente cerebrovascular). Adeoye O, Hornung R, Khatri P, Kleindorfer D. *Stroke* 42(7):1952-1955 (2011). Tratamientos tales como rtPA también pueden aumentar el riesgo de inducir una hemorragia cerebral en un paciente. Por tanto, existe una necesidad de tratamientos mejorados para el AIS, y particularmente de tratamientos que sean eficaces cuando se administren en momentos posteriores tras el accidente cerebrovascular.

25 El sistema del complemento es una cascada proteolítica de aproximadamente 30 proteínas plasmáticas circulantes y proteínas de la membrana celular asociadas. Las proteínas plasmáticas se sintetizan generalmente en el hígado y normalmente circulan como precursores inactivos. La escisión de precursores mediante proteasas del complemento inicia las cascadas de señalización de citocina responsables de diversas respuestas inmunitarias innatas, incluyendo inflamación. La activación del complemento está implicada en una variedad de respuestas inmunoinflamatorias, incluyendo inflamación asociada con isquemia cerebral.

30 Durante la reperfusión tras isquemia cerebral, la restauración de circulación puede conducir a un daño inflamatorio y oxidativo en el tejido cerebral. Los glóbulos blancos que entran en el tejido tras reperfusión liberan un huésped de factores inflamatorios, incluyendo interleucinas y radicales libres. La reintroducción de oxígeno con la sangre que retorna también puede dañar células y membranas plasmáticas. El sistema del complemento se ha implicado en el inicio de la cascada isquémica en el cerebro que da como resultado lesión por reperfusión. Por tanto, técnicas para inhibir o modular el sistema del complemento pueden ofrecer oportunidades para tratar o prevenir una lesión por reperfusión.

40 Las inmunoglobulinas derivadas de plasma, tal como inmunoglobulina G intravenosa (IVIG), son productos sanguíneos administrados por vía intravenosa que contienen inmunoglobulinas combinadas extraídas de múltiples donantes de sangre. La IVIG está indicada para su uso en diversas enfermedades inflamatorias y de deficiencia inmunitaria. Se ha mostrado que la IVIG elimina fragmentos del complemento activos en el cerebro y protege frente al daño asociado con isquemia cerebral y reperfusión. Arumugam *et al.*, *PNAS* 104(35): 14104-14109 (2007).

45 El inhibidor de C1 (C1-INH) es un inhibidor de serina proteasa que impide la activación espontánea de proteasas circulantes asociadas con el sistema del complemento, en particular C1r y C1s, así como MASP-1 y MASP-2. Dado el papel central de C1-INH en la regulación de la ruta clásica del complemento y la implicación de la inflamación mediada por el complemento en la lesión por reperfusión, se ha investigado la administración de C1-INH para sus efectos sobre el déficit neurológico y el tamaño del infarto tras el accidente cerebrovascular. De Simoni *et al.*, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23(2): 232-239 (2003); véase también Longhi *et al.*, *Crit. Care Med.* 37(2): 659-665 (2009). Una investigación previa ha mostrado que C1-INH tiene propiedades neuroprotectoras potentes en modelos de ratón de isquemia cerebral. Los mecanismos sugeridos asociados con la neuroprotección de C1-INH incluyen 1) inhibición del complemento, 2) atenuación de la respuesta inflamatoria a una lesión, 3) atenuación de la apoptosis, y 4) disminución de la adhesión de leucocitos-células endoteliales. Se ha mostrado que la inhibición de la activación del complemento mediante C1-INH derivado de plasma es beneficiosa en el ratón así como la rata. De Simoni *et al.*, *Am J Pathol* 164: 1857-1863 (2004); Akita *et al.*, *No To Shinkei* 53: 641-644 (2001). Sin embargo, la ventana terapéutica observada en estos estudios era de menos de una hora tras isquemia. *Id.* Esto contrasta con un hallazgo reciente de que el C1-INH recombinante es capaz de reducir el tamaño del infarto cerebral en puntos de tiempo posteriores (por ejemplo, cuando se administra hasta 18 horas tras MCAO). Gesuete *et al.*, *Ann Neurol* 66:332-342 (2009). La noción general hasta ahora era que el C1-INH derivado de plasma, debido a su corta ventana terapéutica, no es tan prometedor como el C1-INH recombinante para tratar el accidente cerebrovascular en seres humanos. El documento WO 2007/073186 A1 de la técnica anterior se refiere al uso de C1-INH para la prevención de lesión por reperfusión isquémica.

65 Aunque experimentos en animales han sugerido que C1-INH y IVIG pueden ser eficaces individualmente en la modulación de los efectos de lesión por reperfusión en el cerebro, sigue habiendo una necesidad de desarrollar

métodos más eficaces, de menor dosis y económicos para tratar la lesión por reperfusión asociada con isquemia cerebral. Por consiguiente, en el presente documento se da a conocer una terapia de combinación que emplea C1-INH e inmunoglobulinas, tal como IVIG, para tratar, reducir o prevenir la lesión por reperfusión y el daño inflamatorio asociado con isquemia cerebral, ya sea mediante administración profiláctica o administración en puntos de tiempo tras isquemia. En algunas realizaciones, puede usarse el uso de una combinación de C1-INH e inmunoglobulinas, tal como IVIG, para tratar o prevenir la lesión por reperfusión y el daño por inflamación en puntos de tiempo posteriores, proporcionando cualquier componente solo menos efectos terapéuticos. En algunas realizaciones, la combinación se administró hasta aproximadamente 6 horas tras isquemia cerebral o a dosis inferiores a las máximas de cualquier componente, al tiempo que proporciona efectos beneficiosos. En algunas realizaciones, la combinación puede administrarse más de 6 horas tras isquemia cerebral. Por tanto, emplear la combinación de C1-INH e inmunoglobulinas, tal como IVIG, puede conducir a resultados terapéuticos potenciados, al tiempo que permite dosificaciones de tratamiento reducidas, de ese modo reduciendo el coste así como reduciendo el riesgo de una reacción adversa a los compuestos de tratamiento.

15 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Curva de dosis-respuesta de C1-INH. Se trataron grupos de ratones (n=12-21) 1 hora tras el final del periodo isquémico (I) con dosis decrecientes de C1-INH a 300 U/kg (7,6 U por animal), 150 U/kg (3,8 U por animal) y 75 U/kg (1,9 U por animal). La concentración de C1-INH (U/kg) se representa gráficamente en el eje horizontal frente a la reducción del volumen de infarto (%) en el eje vertical.

Figura 2. La curva de dosis-respuesta de IVIG. Se trataron grupos de animales (12-22) 1 hora tras isquemia con dosis decrecientes de IVIG, empezando con 1 g/kg de peso corporal y continuando con mitades de dosis decrecientes - 0,5 g/kg y 0,25 g/kg (o mg/g considerando que el peso corporal promedio de un ratón adulto es de 25-30 g). Las dosis de IVIG (g/kg) se representan gráficamente en el eje horizontal frente a la reducción del volumen de infarto (%) en el eje vertical.

Figura 3. Tratamiento de combinación de C1-INH/IVIG. Se administró una única dosis de IVIG de 0,50 mg/g de peso corporal a ratones 1 h tras isquemia, seguida de una única inyección i.v. de C1-INH a 75 U/kg 30 minutos después (n=19). El volumen de infarto cerebral se determinó tras un periodo de reperfusión de 72 horas y se comparó la inhibición en porcentaje del volumen de infarto con la inhibición en porcentaje de C1-INH solo o IVIG sola.

Figuras 4a-b. Se trataron ratones con IVIG a 1 g/kg (n=11), C1-INH a 300 U/kg (n=9) o la combinación (n=10) seis horas tras el inicio de isquemia y se determinaron el área de infarto (Fig. 4a) y la puntuación de déficit neurológico (Fig. 4b) 72 horas tras isquemia (*P<0,001).

Descripción de realizaciones ilustrativas

Ahora se hará referencia en detalle a ciertas realizaciones a modo de ejemplo según la presente divulgación, ciertos ejemplos de las cuales se ilustran en los dibujos adjuntos.

En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se establezca específicamente lo contrario. Además, en esta solicitud, el uso de “o” significa “y/o” a menos que se establezca lo contrario. Además, el uso del término “que incluye,” así como otras formas, tales como “incluye” e “incluido”, no son limitativos. Se entenderá que cualquier intervalo descrito en el presente documento incluye los valores de extremo y todos los valores entre los valores de extremo.

Se dan a conocer inmunoglobulinas e inhibidores de la proteasa C1 del complemento. La combinación de inhibidores C1, tal como C1-INH, e inmunoglobulinas, tal como inmunoglobulina G intravenosa (IVIG) combinada, puede usarse para tratar, prevenir o reducir el daño por inflamación y la lesión por reperfusión asociados con isquemia cerebral. En algunas realizaciones, el uso de una combinación de C1-INH e inmunoglobulinas, tal como IVIG, puede usarse para tratar o prevenir la lesión por reperfusión y el daño por inflamación en puntos de tiempo posteriores, proporcionando cualquier componente solo menos u otros efectos beneficiosos. En algunas realizaciones, la combinación puede administrarse hasta aproximadamente 6 horas o más tras isquemia cerebral o a dosis inferiores a las máximas de cualquier componente, al tiempo que proporciona efectos beneficiosos. La combinación puede usarse sola o también pueden administrarse compuestos terapéuticos adicionales, tal como compuestos destinados a eliminar o inhibir la formación de coágulos sanguíneos en el cerebro.

Inmunoglobulina

Tal como se usan en el presente documento, los términos “inmunoglobulina” y “anticuerpo” se refieren a cualquier inmunoglobulina (también conocida como anticuerpo) o fragmentos de la misma que se une a fragmentos del complemento activos en el cerebro y/o elimina fragmentos del complemento activos en el cerebro. Los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina” en este contexto también comprenden derivados o fragmentos de los mismos que todavía conservan algo de unión a fragmentos del complemento. Tales fragmentos comprenden, entre otros, fragmentos Fab, F(ab')₂ o fragmentos Fc. Los anticuerpos pueden derivarse de plasma de donante o pueden

prepararse usando métodos alternativos (comentados más adelante), siempre que compartan con los anticuerpos derivados de plasma una afinidad de unión similar para fragmentos del complemento activos.

5 El término “fragmentos del complemento” se refiere a cualquier molécula pequeña, proteína o enzima circulante asociada con las cascadas de señalización implicadas en la inmunidad del complemento. Estas cascadas incluyen la señalización de citocina inflamatoria y otras cascadas del complemento conocidas en la técnica.

10 El término “inmunoglobulina derivada de plasma” pretende significar cualquier fracción de anticuerpo policlonal derivada de plasma de mamífero, preferiblemente ser humano. A este respecto, el término “anticuerpo” puede usarse de manera intercambiable con el término “inmunoglobulina”. En determinadas realizaciones, se combina el plasma de múltiples (generalmente 1000 o más) donantes sanos y opcionalmente se procesa adicionalmente. En algunas realizaciones, la fracción de inmunoglobulina está enriquecida a partir del plasma combinado. Preferiblemente, la inmunoglobulina se purifica a partir del plasma combinado. Más preferiblemente, la
 15 inmunoglobulina se purifica y se concentra. En diversas realizaciones, se usa inmunoglobulina G (IgG) purificada y concentrada. Las inmunoglobulinas derivadas de plasma en este contexto también comprenden derivados o fragmentos de las mismas que todavía conservan unión a fragmentos del complemento. Tales fragmentos comprenden, entre otros, fragmentos Fab, F(ab')₂ o fragmentos Fc. Además, las composiciones que comprenden inmunoglobulina derivada de plasma también pueden incluir la adición de anticuerpos no derivados de plasma a la inmunoglobulina derivada de plasma. El término “inmunoglobulina intravenosa” se refiere a la administración
 20 intravenosa de una composición que comprende inmunoglobulina. Preferiblemente, la inmunoglobulina administrada por vía intravenosa es inmunoglobulina G (IgG), más preferiblemente IgG derivada de plasma, incluso más preferiblemente inmunoglobulina G intravenosa (IVIG) derivada de ser humano. La IVIG es una preparación terapéutica de inmunoglobulina G poliespecífica combinada obtenida del plasma de un gran número de individuos sanos. El término “individuo sano” significa un individuo que cumple los criterios de elegibilidad convencionales
 25 actuales (en el momento de donación) para donar sangre, teniendo en cuenta que tales criterios de elegibilidad están sujetos a una mejora y un cambio continuos.

30 En determinadas realizaciones, la IVIG puede contener trazas de inmunoglobulinas de diferentes clases de Ig tales como IgA o IgM (preferiblemente menos del 2% de IgM o IgA, más preferiblemente menos del 1%). En diversas realizaciones, la inmunoglobulina será >90% IgG, más preferiblemente >95% IgG, incluso más preferiblemente >98% IgG.

35 En otras realizaciones, la inmunoglobulina administrada por vía intravenosa es inmunoglobulina A (IgA) o inmunoglobulina M (IgM), más preferiblemente IgA o IgM derivada de plasma, incluso más preferiblemente IgA intravenosa (IVIA) o IgM intravenosa (IVIM) derivada de ser humano. La IVIA y la IVIM son preparaciones terapéuticas de inmunoglobulina A o inmunoglobulina M poliespecífica combinada obtenida del plasma de un gran número de individuos sanos, preferiblemente al menos 1000 individuos. En determinadas realizaciones, la IVIA o la IVIM puede contener trazas de inmunoglobulinas de diferentes clases de Ig (preferiblemente menos del 2% de las
 40 otras clases de inmunoglobulina, más preferiblemente menos del 1%). En diversas realizaciones, la inmunoglobulina será >90% IgA o IgM, más preferiblemente >95% IgA o IgM, incluso más preferiblemente >98% IgA o IgM. En otras realizaciones, la inmunoglobulina administrada por vía intravenosa es una combinación de IgG, IgM y/o IgA derivada de plasma. En determinadas realizaciones, la inmunoglobulina intravenosa de combinación es al menos el 50% IgG, preferiblemente al menos el 70% IgG y más preferiblemente al menos el 90% IgG.

45 IVIG designa un producto, así como la vía de administración preferida (administración intravenosa). En una realización preferida, la IVIG se proporciona como disolución que contiene al menos el 5% (p/v) de inmunoglobulina en una disolución total adecuada para administración intravenosa. En otras realizaciones, la IVIG se proporciona como disolución que contiene al menos aproximadamente el 6% inmunoglobulina, más preferiblemente al menos
 50 aproximadamente el 8%, el 10%, el 15%, el 20% o el 25% de inmunoglobulina (o cualquier porcentaje entremedias). La disolución puede contener componentes adicionales tales como estabilizadores, por ejemplo, aminoácidos tales como prolina o glicina, o sacarosa, maltosa, sorbitol, albúmina, nicotinamida, PEG u otros.

55 En determinadas realizaciones, la IVIG es PRIVIGEN® (CSL Behring) o SANDOGLOBULIN®/CARIMUNE® (CSL Behring). PRIVIGEN® está indicada como terapia de sustitución para pacientes con inmunodeficiencia primaria asociada con defectos en la inmunidad humoral.

60 En otras realizaciones no según la invención, la inmunoglobulina es inmunoglobulina G subcutánea (SCIG). El término “inmunoglobulina G subcutánea”, abreviado como SCIG, significa una preparación terapéutica de inmunoglobulina G combinada, similar a IVIG, pero formulada para administración subcutánea. SCIG también designa un producto así como una vía de administración (administración subcutánea, no según la invención). En determinadas realizaciones no según la invención, la SCIG se proporciona como disolución que contiene al menos el
 65 10% (p/v) de inmunoglobulina, más preferiblemente al menos el 15% de inmunoglobulina, lo más preferiblemente aproximadamente el 20% de inmunoglobulina. La disolución puede contener componentes adicionales tales como estabilizadores, por ejemplo, aminoácidos tales como prolina o glicina, o sacarosa, maltosa, sorbitol, albúmina nicotinamida, PEG, polisorbato 80 u otros. En determinadas realizaciones no según la invención, la SCIG es VIVAGLOBIN® o HIZENTRA® (ambas CSL Behring).

En realizaciones alternativas, la presente divulgación contempla el uso de anticuerpos no derivados de plasma que comparten con los anticuerpos derivados de plasma similar unión para fragmentos del complemento activos (por ejemplo, anticuerpos que actúan como eliminadores de fragmentos del complemento activos). Los anticuerpos pueden usarse o bien independientemente o bien como aditivo a la inmunoglobulina derivada de plasma comentada anteriormente. Estos anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Los anticuerpos que pueden emplearse en el presente documento incluyen aquellos de las clases de IgM, IgG y IgA (preferiblemente IgG). El término "anticuerpo" también comprende derivados o fragmentos del mismo que todavía conservan unión. Tales fragmentos comprenden, entre otros, fragmentos Fab, F(ab')₂, fragmentos Fv, derivados de scFv o fragmentos Fc. Los anticuerpos añadidos también incluyen realizaciones tales como anticuerpos y fragmentos recombinantes, quiméricos, humanizados, optimizados con respecto a la estructura de carbohidrato y completamente humanos. Los anticuerpos recombinantes también pueden modificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante el cambio de isotipo, técnicas de maduración por afinidad, modificaciones para alterar funciones efectoras, modificaciones para alterar la glicosilación, etc.

Inhibidor de C1

Los términos "inhibidor de C1", "inhibidor de C1 esterasa" y "C1-INH" se refieren a las proteínas o fragmentos de las mismas que funcionan como inhibidores de serina proteasa para impedir la activación espontánea de proteasas circulantes asociadas con el sistema del complemento, preferiblemente proteasas C1r y C1s, así como MASP-1 y MASP-2. Además, C1-INH puede servir como molécula antiinflamatoria que reduce la adhesión de leucocitos mediada por selectina a células endoteliales. C1-INH, tal como se usa en el presente documento, puede ser un inhibidor de serina proteasa nativo o un fragmento activo del mismo, o puede comprender un péptido recombinante, un péptido sintético, un mimético peptídico o un fragmento de péptido que proporciona propiedades funcionales similares - por ejemplo, la inhibición de proteasas C1r y C1s, y/o MASP-1 y MASP-2. Para una divulgación adicional con respecto a la estructura y la función del inhibidor de C1, véanse la patente estadounidense 4.915.945; patente estadounidense 5.939.389; patente estadounidense 6.248.365; patente estadounidense 7.053.176; y el documento WO 2007/073186. Productos disponibles comercialmente que comprenden inhibidor de C1 son, por ejemplo, CINRYZE® derivado de plasma (Viropharma), RUCONEST® o RHUCIN® recombinante (ambos Pharming), y BERINERT® derivado de plasma (CSL Behring). BERINERT® está indicado para el tratamiento de angioedema hereditario y deficiencias congénitas.

Producción de Inmunoglobulina e inhibidor de C1

En diversas realizaciones, pueden producirse inmunoglobulina e inhibidor de C1 según métodos conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse inmunoglobulina derivada de plasma así como C1-INH recogiendo plasma sanguíneo de varios donantes. Los donantes de plasma deben estar sanos, tal como se define en la técnica. Preferiblemente, se combina y opcionalmente se procesa adicionalmente el plasma de varios (1000 o más) donantes sanos. Un proceso a modo de ejemplo para preparar inmunoglobulina derivada de plasma (en este caso, IVIG) puede encontrarse en la solicitud estadounidense 2010/0330071 A1. Ejemplos de productos de IVIG comerciales son PRIVIGEN® (CSL Behring) y SANDOGLOBULIN®/CARIMUNE®.

Técnicas para la producción de anticuerpos no derivados de plasma y fragmentos que se unen a fragmentos del complemento activos se conocen ampliamente en la técnica y se describen en, por ejemplo Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 y Harlow y Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998. Además, pueden usarse animales transgénicos para expresar anticuerpos completamente humanos o fragmentos de los mismos. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos mediante cultivos de líneas celulares continuos. Los ejemplos de tales técnicas incluyen la técnica del hibridoma descrita originariamente por Köhler y Milstein, Nature 256: 495-497 (1975) desarrollada adicionalmente en la técnica para producir anticuerpos humanos. Además, se incluyen la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor, Immunology Today 4: 72 (1983)) y la técnica del hibridoma de EBV para producir anticuerpos humanos monoclonales (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96). Los anticuerpos no derivados de plasma pueden expresarse en células, por ejemplo, constructos de anticuerpo-ácido nucleico pueden transfectarse y/o transducirse a través de, entre otros, virus o vectores de plásmido. También pueden usarse otras técnicas recombinantes para producción a pequeña o gran escala.

Métodos para preparar C1-INH se conocen en la técnica. Por ejemplo, un proceso para producir inhibidor de C1 con propósitos terapéuticos se da a conocer en la patente estadounidense 4.915.945. Alternativamente, en algunas realizaciones C1-INH puede recogerse y concentrarse a partir de fuentes de tejido naturales usando técnicas conocidas en la técnica. Productos disponibles comercialmente que comprenden inhibidor de C1 son, por ejemplo, Cinryze® derivado de plasma (Viropharma), Ruconest® o Rhucin® recombinante (ambos Pharming) y BERINERT® derivado de plasma (CSL Behring) Puede prepararse C1-INH recombinante mediante métodos conocidos.

Composiciones farmacéuticas

En determinadas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende C1-INH y una composición farmacéutica que comprende inmunoglobulina derivada de plasma y/o no derivada de plasma se preparan para su uso en el tratamiento de isquemia cerebral. Métodos de formulación de composiciones farmacéuticas que comprenden C1-INH y composiciones farmacéuticas que comprenden inmunoglobulina se conocen en la técnica. Por ejemplo, si se proporciona un polvo o forma liofilizada de C1-INH o inmunoglobulina (por ejemplo, mediante criodesecación) y se desea un fármaco acuoso, el polvo puede disolverse mezclando con componentes acuosos de la formulación farmacéutica y agitarse usando técnicas adecuadas, tales como creación de remolino o agitación suave. Alternativamente, si se desea un fármaco acuoso y el C1-INH o inmunoglobulina está ya en forma acuosa, los componentes pueden combinarse directamente antes de la administración. En determinadas realizaciones, se proporciona C1-INH en forma liofilizada y se combina con una composición de inmunoglobulina acuosa antes de la administración a un paciente. En otras realizaciones, se proporciona inmunoglobulina en forma liofilizada y combinada con una composición de C1-INH acuosa antes de la administración. Todavía en otras realizaciones, ambos C1-INH se proporcionan en forma liofilizada y combinan con componentes farmacéuticos acuosos (por ejemplo, componentes activos adicionales o componentes inactivos, tales como cargas, estabilizadores, disolventes, o portadores) antes de la administración. En aún otras realizaciones, tanto el C1-INH como la inmunoglobulina se proporcionan en una disolución acuosa y pueden administrarse por separado o pueden combinarse antes de la administración a un paciente.

En determinadas realizaciones, una composición farmacéutica puede comprender al menos un aditivo, tal como una carga, agente de carga, tampón, estabilizador o excipiente. Los expertos en la técnica conocen ampliamente técnicas de formulación farmacéutica convencionales (véanse, por ejemplo, *2005 Physicians' Desk Reference*®, Thomson Healthcare: Montvale, NJ, 2004; Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª ed., Gennado *et al.*, Eds. Lippincott Williams & Wilkins: Filadelfia, PA, 2000). Los aditivos farmacéuticos adecuados incluyen, por ejemplo, manitol, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas también pueden contener reactivos de tamponamiento del pH y agentes humectantes o emulsionantes. En realizaciones adicionales, las composiciones pueden contener conservantes o estabilizadores.

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

Las composiciones farmacéuticas descritas pueden comprender C1-INH y/o inmunoglobulina como únicos compuestos activos o pueden administrarse en combinación con al menos otro compuesto, composición o material biológico. Los ejemplos de tales compuestos incluyen vitaminas, antibióticos o compuestos destinados a eliminar o inhibir la formación de coágulos sanguíneos en el cerebro (por ejemplo, aspirina, clopidogrel o dipiridamol). Además, se dan a conocer kits para el tratamiento de isquemia cerebral. En determinadas realizaciones, los kits comprenden (a) una inmunoglobulina, tal como IVIG; (b) C1-INH, (c) instrucciones para su uso en el tratamiento de isquemia cerebral y opcionalmente (d) al menos un fármaco o compuesto terapéuticamente activo adicional.

Los componentes del kit pueden estar contenidos en uno o diferentes recipientes, tales como uno o más viales. Los anticuerpos pueden estar en forma líquida o sólida (por ejemplo, tras la liofilización) para potenciar su vida útil en almacenamiento. Si están en forma líquida, la inmunoglobulina puede comprender aditivos tales como estabilizadores y/o conservantes tales como prolina, glicina o sacarosa u otros aditivos que potencian la vida útil en almacenamiento. Igualmente, el C1-INH puede estar en forma líquida o sólida (por ejemplo, tras la liofilización). Si está en forma líquida, el C1-INH puede comprender aditivos tales como estabilizadores y/o conservantes tales como prolina, glicina o sacarosa u otros aditivos que potencian la vida útil en almacenamiento.

En determinadas realizaciones, el kit puede contener compuestos adicionales tales como compuestos terapéuticamente activos o fármacos que deben administrarse antes, al mismo tiempo o tras la administración de la inmunoglobulina y el C1-INH. Los ejemplos de tales compuestos incluyen vitaminas, antibióticos, agentes antivirales, etc. En otras realizaciones, compuestos destinados a eliminar o inhibir la formación de coágulos sanguíneos en el cerebro (por ejemplo, aspirina, clopidogrel o dipiridamol) pueden incluirse con el kit.

En diversas realizaciones, las instrucciones para el uso de los kits incluirán direcciones para el uso de los componentes del kit en el tratamiento de isquemia cerebral. Las instrucciones pueden contener además información relativa a cómo preparar (por ejemplo, diluir o reconstituir, en el caso de proteína criodesecada) la inmunoglobulina y el inhibidor de C1. Las instrucciones pueden incluir además directrices en cuanto a la dosificación y la frecuencia de administración.

Métodos de tratamiento

En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos de tratamiento, prevención o reducción de los efectos de isquemia cerebral. El término "isquemia cerebral", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier estado en el que hay un flujo sanguíneo insuficiente a al menos una parte del cerebro debido una oclusión de una o más arterias cerebrales. La definición abarca isquemia tanto focal como global. El término abarca todas las causas médicas de flujo sanguíneo insuficiente, por ejemplo, hipoxia cerebral, lesión cerebral traumática y accidente cerebrovascular (incluyendo trombosis, embolia cerebrovascular, accidente cerebrovascular isquémico, accidente cerebrovascular perinatal e infarto cerebral).

Por ejemplo, el tratamiento de isquemia cerebral puede comprender administrar a un paciente C1-INH y una inmunoglobulina que elimina fragmentos del complemento activos en el cerebro. Preferiblemente, la inmunoglobulina es IVIG. En algunas realizaciones, la combinación se administra para prevenir, tratar o reducir los efectos de daño por inflamación o lesión por reperusión tras isquemia cerebral. La inmunoglobulina y el inhibidor de C1 pueden administrarse juntos o por separado. Los compuestos pueden administrarse mediante cualquier vía de administración adecuada y pueden incluir, sin limitación, inyección parenteral, subdural, intramuscular, intratecal o intraperitoneal. En determinadas realizaciones en las que la inmunoglobulina es IVIG, el compuesto se administra por vía intravenosa. En otras realizaciones en las que el compuesto de inmunoglobulina es SCIG, el compuesto se administra por vía subcutánea.

La inmunoglobulina y el C1-INH pueden administrarse juntos o por separado. En determinadas realizaciones, el C1-INH e la inmunoglobulina se administran juntos en una única administración intravenosa. En otras realizaciones, la inmunoglobulina se administra en primer lugar, seguida de la administración del C1-INH. En determinadas realizaciones, el C1-INH se administra aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 o 120 minutos tras la administración de inmunoglobulina (o en cualquier momento entremedias). En otras realizaciones, el C1-INH se administra en primer lugar, seguido de la administración de la inmunoglobulina. En determinadas realizaciones, la inmunoglobulina se administra aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 o 120 minutos tras la administración de C1-INH (o en cualquier momento entremedias).

El tratamiento con C1-INH y una inmunoglobulina tal como IVIG puede producirse inmediatamente o hasta aproximadamente seis horas tras isquemia cerebral. En determinadas realizaciones, el tratamiento se produce aproximadamente 10, 20, 30, 40 o 50 minutos, o 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas tras isquemia cerebral (o en cualquier momento entremedias). El tratamiento incluso tras 6 horas tras el accidente cerebrovascular puede tener beneficios (por ejemplo, aproximadamente 7, 8, 9, 10, 15, 18 o 24 horas tras isquemia cerebral, o en cualquier momento entremedias). En algunas realizaciones, el uso de una combinación de C1-INH e inmunoglobulinas, tal como IVIG, puede usarse para tratar o prevenir una lesión por reperusión y un daño por inflamación en puntos de tiempo posteriores, proporcionando cualquier componente solo efectos beneficiosos menos terapéuticos u otros. En algunas realizaciones, la combinación puede administrarse a dosis inferiores a las máximas de cualquier componente, al tiempo que proporciona efectos beneficiosos. En algunas realizaciones, la administración de terapia de combinación tras aproximadamente 3 horas tras isquemia cerebral (por ejemplo, hasta aproximadamente 6 horas) puede producir efectos beneficiosos que superan los observados cuando se administra o bien inmunoglobulina o bien C1-INH por sí solos en estos puntos de tiempo posteriores.

La administración a un paciente puede producirse en una única dosis o en administraciones repetidas, y en cualquiera de una variedad de formas fisiológicamente aceptable, y/o con un portador y/o aditivo farmacéuticamente aceptable como parte de una composición farmacéutica.

La composición que comprende C1-INH y la composición que comprende una inmunoglobulina, tal como IVIG, puede administrarse a un paciente en cantidades terapéuticamente eficaces. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar con la edad del sujeto, el estado general y el género, así como la gravedad del estado médico en el sujeto. La dosificación puede determinarse por un médico y ajustarse, según sea necesario, para adaptar los efectos observados del tratamiento. En determinadas realizaciones, la dosis de C1-INH es 50 U/kg de peso corporal. También se dan a conocer intervalos terapéuticos a modo de ejemplo para la administración de C1-INH en la patente estadounidense 5.939.389. En algunas realizaciones, la inmunoglobulina es IVIG y la dosis es de 0,5 g/kg de peso corporal. También se dan a conocer intervalos terapéuticos a modo de ejemplo para la administración de IVIG en Arumugam *et al.*, PNAS 104(35): 14104-14109 (2007). Las composiciones farmacéuticas administradas pueden comprender C1-INH y/o inmunoglobulina como los únicos compuestos activos o pueden administrarse en combinación con al menos otro compuesto, composición o material biológico. Los ejemplos de tales compuestos incluyen vitaminas, antibióticos o compuestos destinados a eliminar o inhibir la formación de coágulos sanguíneos en el cerebro (por ejemplo, aspirina, clopidogrel o dipiridamol).

En determinadas realizaciones, el tratamiento de isquemia cerebral que usa una combinación de C1-INH y una inmunoglobulina puede potenciar el efecto terapéutico de terapia o bien con C1-INH o bien con inmunoglobulina de manera aislada. En algunas realizaciones, la terapia de combinación da como resultado un efecto aditivo sobre la reducción en el volumen de infarto o el déficit neurológico tras isquemia cerebral. En realizaciones adicionales, la combinación actúa de manera sinérgica para potenciar el efecto observado con terapia con o bien C1-INH o bien

5 inmunoglobulina de manera aislada. En determinadas realizaciones, la terapia de combinación aumenta la reducción en el volumen de infarto cerebral observada con terapia con C1-INH sola en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o 90% (o cualquier porcentaje entremedias). En algunas realizaciones, la terapia de combinación aumenta la reducción en volumen del infarto cerebral observado con terapia con inmunoglobulina sola en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% (o cualquier porcentaje entremedias), o produce una reducción de volumen de infarto al menos aproximadamente equivalente a la reducción observada cuando se administra una concentración de inmunoglobulina óptima sola tras isquemia cerebral.

10 En determinadas realizaciones, la administración de C1-INH y IVIG en combinación reduce el volumen de infarto a aproximadamente la mitad o un tercio del observado cuando se administra C1-INH solo tras isquemia cerebral. En algunas realizaciones, la administración de una combinación de C1-INH y IVIG reduce el volumen de infarto a aproximadamente la mitad del observado cuando se administra IVIG sola tras isquemia cerebral, o reduce el volumen de infarto hasta que es al menos aproximadamente equivalente al observado cuando se administra una concentración de IVIG óptima sola tras isquemia cerebral.

15 En determinadas realizaciones de la terapia de combinación, el C1-INH y la IVIG se administran a dosificaciones reducidas, en comparación con la concentración óptima cuando se administran individualmente. En estas realizaciones, la terapia de combinación posibilita el uso de concentraciones reducidas, al tiempo que mantiene efectos beneficiosos terapéuticos u otros, reduciendo de ese modo el coste y el riesgo de reacción adversa a los agentes terapéuticos. Además, en determinadas realizaciones, la administración de terapia de combinación a dosificaciones reducidas puede ayudar a reducir o evitar el riesgo de hemorragia asociada con altas dosis de C1-INH o IVIG. Bundesärztekammer, Dtsch Arztebl 97: B-864 (2000), Stieh *et al.*, Biomed Prog. 9:13-16 (1996), Horstick *et al.*, Circulation 104: 3125-3131 (2001). En determinadas realizaciones, el uso de dosificaciones reducidas también puede conducir a una tolerancia aumentada del paciente. En algunas realizaciones, un régimen de tratamiento eficaz para accidente cerebrovascular isquémico agudo puede consistir en tratamiento con IVIG inicialmente, seguido de la administración de uno o más agentes terapéuticos de acción temprana (por ejemplo, inhibidores de sodio o canales de calcio), y finalmente la administración de la combinación de IVIG/C1-INH.

20 En el tratamiento de víctimas humanas de accidente cerebrovascular, los pacientes deben tratarse según el estándar de atención establecido. En particular, cuando sea posible, el paciente debe examinarse mediante MRI u otros métodos para determinar si la lesión cerebral es isquémica o hemorrágica, dado que la administración de IVIG o C1-INH puede estar contraindicada si la lesión cerebral es hemorrágica.

35 EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar, y no limitan, la presente divulgación.

40 Ejemplo 1: Dosis-respuesta de C1-INH

Se indujo lesión por isquemia cerebral/reperusión (I/R) mediante una oclusión de 1 hora de la arteria cerebral media (MCAO) de ratones seguida de una reperusión de 72 horas. Arumugam *et al.*, PNAS 104: 14104-14109 (2007); Wang *et al.*, Eur. J. Neurosci. 28(1): 51-61 (2008). En ratones no tratados (I/R sola), este procedimiento dio como resultado un infarto cerebral promedio del 36% del hemisferio afectado.

45 Para evaluar el efecto de la concentración de C1-INH, se trataron grupos de ratones (n=12-21) 1 hora tras el final del periodo isquémico con dosis decrecientes de C1-INH (BERINERT®, CSL Behring) a 300 U/kg (7,6 U por animal), 150 U/kg (3,8 U por animal) y 75 U/kg (1,9 U por animal). El efecto máximo sobre la reducción del tamaño del infarto cerebral (50%) alcanzó un pico a 150 U/kg, alcanzándose el efecto CI_{50} (reducción del 25%) con 75 U/kg o 1,9 U/animal. Véase la Fig. 1.

50 Una única dosis de inhibidor de C1 a 300 U/kg, administrada 30 min antes de isquemia y durante la reperusión 1 h, 3 h y 6 h tras isquemia, redujo el tamaño del infarto cerebral en relación con los ratones tratados con vehículo en un 69%, 48%, 50% y 67%, respectivamente. El tratamiento con C1-INH también redujo significativamente el deterioro funcional, tal como se muestra mediante puntuaciones de déficit neurológico reducidas (48 h y 72 h tras MCAO) en comparación con ratones que recibieron vehículo solo. La reducción de la dosis de C1-INH hasta 150 U/kg y 75 U/kg no dio como resultado un empeoramiento incremental correspondiente de los criterios de valoración experimentales de accidente cerebrovascular, tal como se observa en el experimento de dosis-respuesta de IVIG. En su lugar, no hubo una diferencia significativa en el grado de inhibición de infarto cerebral, déficit neurológico 72 horas tras isquemia y la mortalidad entre las tres dosis de C1-INH.

60 Ejemplo 2: Dosis-respuesta de IVIG

65 Se trataron grupos de animales (n = 12-22) 1 hora tras isquemia con dosis decrecientes de IVIG (PRIVIGEN®, CSL Behring), empezando con 1 g/kg de peso corporal y continuando con mitades de dosis decrecientes de manera constante - 0,5 g/kg y 0,25 g/kg (o medidas en mg/g considerando que el peso corporal promedio de un ratón adulto

es de 25-30 g). Había una correlación lineal entre dosis decrecientes de IVIG y la reducción de tamaño del infarto cerebral. El valor de CI_{50} era de aproximadamente 0,5 g/kg (mg/g). Véase la Fig. 2.

- 5 El tratamiento con IVIG (1 g/kg) 30 min antes y 1 h tras MCAO, así como 3 h y 6 h tras isquemia (2 g/kg) redujo el tamaño del infarto en un 56%, 80% 58% y 59%, respectivamente. El tratamiento con reactivos control, L-prolina 250 mM (que sirve como vehículo o estabilizador para moléculas de inmunoglobulina en PRIVIGEN®) o albúmina humana (para uso IV) a 1 g/kg en disolución de vehículo, no tuvo un efecto significativo sobre el tamaño de infarto en comparación con ratones no tratados.
- 10 Para determinar si la reducción marcada de lesión cerebral isquémica observada en ratones tratados con IVIG dio como resultado un deterioro funcional reducido, se evaluaron los déficits neurológicos diariamente 24, 48 y 72 horas tras MCAO en ratones que se sacrificaron finalmente para obtener mediciones de infarto cerebral. Murakami *et al.*, J. Neurosci. 18: 205-213 (1998). Los tratamientos con IVIG redujeron significativamente los déficits neurológicos 48 y 72 horas tras isquemia. La IVIG también ejerció un efecto dependiente de la dosis sobre las consecuencias de lesión cerebral isquémica. Con mitades de dosis decrecientes de PRIVIGEN® (1,0 g/kg, 0,5 g/kg y 0,25 g/kg) se observó un aumento gradual en el tamaño del infarto cerebral, el déficit neurológico a las 72 h y la mortalidad.

Ejemplo 3: Ventana terapéutica de BERINERT®

- 20 Se trataron los ratones sometidos a accidente cerebrovascular experimental con BERINERT® a 150 U/kg (3,8 U por animal) 3 horas tras la finalización de la isquemia. Se midió el tamaño del infarto cerebral y se determinó la reducción del tamaño del infarto. La reducción en el tamaño del infarto que resulta del tratamiento 3 horas tras la finalización de la isquemia no era estadísticamente diferente del efecto de la misma dosis cuando se administra una hora tras isquemia (una reducción de aproximadamente el 50% del infarto cerebral). Este hallazgo contrasta con los resultados publicados anteriormente por De Simoni *et al.*, The Powerful Neuroprotective Action of C1-Inhibitor on Brain Ischemia-Reperfusion Injury Does Not Require C1q, Am. J. Pathol. 164: 1857-63 (2004), que indica que el derivado de plasma C1-INH (Baxter-Immuno, Pisa, Italia) tenía una ventana terapéutica de solo una hora tras isquemia cerebral.

30 Ejemplo 4: Tratamiento de combinación con C1-INH y IVIG

- Para determinar el potencial neuroprotector de IVIG y C1-INH como tratamiento combinado, se administró una única dosis de 0,50 mg/g de IVIG a ratones 1 h tras isquemia, seguida de una única inyección i.v. de C1-INH a 75 U/kg 30 minutos después (n=19). Se determinó el volumen de infarto cerebral tras un periodo de reperfusión de 72 horas. El tratamiento combinado potenció el efecto de la dosis de 75 U/kg de C1-INH casi 3 veces (desde el 26% hasta el 35 76%) y aproximadamente duplicó (desde el 40% hasta el 76%) el efecto de 0,5 mg/g de IVIG sobre la reducción de volumen de infarto cerebral. El tratamiento combinado era más neuroprotector en comparación con la dosis de C1-INH óptima (300 U/kg). El tratamiento combinado redujo tanto la tasa de mortalidad como el tamaño del infarto en aproximadamente un 50% en relación con los animales infundidos con 300 U/kg de C1-INH. El tratamiento combinado era tan eficaz como la dosis óptima de IVIG (1 g/kg) – las tasas de mortalidad y los tamaños de infarto no variaron significativamente entre los dos grupos de animales. Véase la Fig. 3. El déficit neurológico se redujo significativamente en todos los puntos de tiempo (24, 48 y 72 horas tras isquemia) en ratones que recibieron tanto 40 IVIG como C1-INH, en comparación con el grupo de I/R sola y un 17%-24% menor que en ratones tratados con las dosis inferiores a la óptima de IVIG (0,50 mg/g) o C1-INH (75 U/kg) solos.

- 45 La administración combinada era igual de eficaz que la IVIG o el C1-INH solos en términos de reducción del tamaño de infarto cerebral (en un 67% en comparación con los animales no tratados), incluso cuando se aplicó 6 horas tras isquemia. Fig. 4a. Tras el tratamiento combinado 6 h tras isquemia, la puntuación de discapacidades neurológicas mejoró en un 71%. Este efecto era significativamente más pronunciado en comparación con ratones tratados con 50 dosis individuales óptimas de IVIG o C1-INH. Fig. 4b.

Ejemplo 5: La IVIG y el C1-INH protegen a los ratones de mayor edad y los ratones hembra frente a una lesión

- 55 El accidente cerebrovascular humano afecta a ambos sexos por igual y su incidencia aumenta con la edad. Por ese motivo, sometimos a prueba la eficacia del tratamiento con IVIG, con C1-INH y combinado en ratones hembra. También sometimos a prueba los efectos en ratones macho de 13-14 meses de edad (mayores que los sometidos a prueba previamente) 6 horas tras isquemia. Tanto los ratones macho de mayor edad como los ratones hembra presentaron un tamaño de infarto significativamente y un grado de discapacidades neurológicas 72 horas tras 60 isquemia reducidos en comparación con animales no tratados, cuando se infundieron con IVIG sola a 1 g/kg, C1-INH solo a 300 U/kg, así como con concentraciones inhibitoria media (CI_{50}) de ambos administrados sucesivamente. En ratones de mayor edad, la terapia combinada era aproximadamente un 50% y un 70% más eficaz en términos de reducción del tamaño del infarto y de puntuación de déficit neurológico.

65

Ejemplo 6: La IVIG y el C1-INH reducen la acumulación *in situ* de C3b

Se evaluó el efecto del tratamiento con IVIG/C1-INH combinado sobre los niveles de C3b, el fragmento activo del tercer componente del complemento, en muestras de cerebro de ratones sometidos a lesión por I/R. Los niveles basales de C3b observados en cerebros de animales normales y con operación simulada eran similares al nivel de C3b en el hemisferio contralateral (no lesionado) de ratones I/R. Tras la lesión por I/R, el C3b aumentó en el sitio de lesión (en el hemisferio ipsilateral) 5 veces en el córtex y 15 veces en el cuerpo estriado. Tanto la IVIG (a 1,0 g/kg) como el C1-INH (a 300 U/kg), administrados 1 h tras el inicio de la reperfusión, redujeron la expresión de C3b en aproximadamente 3 veces tanto en el córtex como en el cuerpo estriado del hemisferio afectado. Este dato sugiere que el sistema del complemento se activa en respuesta a isquemia cerebral, conduciendo a una deposición *in situ* de fragmentos activos. Tanto la eliminación como la inhibición del complemento parecen ser eficaces a la hora de reducir el daño neuronal desencadenado por la deposición de C3b. Una deposición más pronunciada de C3b en la parte estriada del infarto se correlaciona con hallazgos previos de daño anatómico más extenso en esa área, proporcionando una evidencia adicional de una relación causa-efecto entre la lesión cerebral por I/R y la activación del complemento.

Ejemplo 6: La activación del complemento regular por incremento el TLR2 en accidente cerebrovascular isquémico

El sistema del complemento y los receptores de tipo Toll (TLR) representan la primera línea del sistema de defensa inmunitaria innata del huésped, y reaccionan invadiendo patógenos y autoantígenos alterados por medio de reconocimiento de patrones. Por tanto, se evaluó la posible activación conjunta de rutas de complemento y de TLR durante accidente cerebrovascular isquémico. Se evaluó la atenuación de ambas rutas mediante IVIG y C1-INH realizando una inmunohistoquímica de doble marcado usando anticuerpos frente a C3b y TLR2. En secciones de tejido tomadas de la región de penumbra del cerebro 24 h tras lesión por I/R, más del 90% de las células cerebrales mostraron niveles de expresión de C3 y TLR2 intrínseca que eran 11 (C3) y 28 (TLR2) veces mayores que en las mismas secciones tomadas de animales operados de manera simulada, tal como se determinó cuantificando la intensidad de píxeles de las señales de anticuerpo. En ratones tratados con IVIG (1 g/kg) y C1-INH (300 U/kg) 1 hora tras isquemia, las señales tanto de C3 como de TLR2 se suprimían significativamente. La tinción de inmunofluorescencia de doble marcado para C3 y TLR2 reveló que, en casi todas las células cerebrales, estas dos moléculas se localizan conjuntamente. En secciones de ratones tratados tanto con IVIG como con C1-INH, la señal localizada conjuntamente se suprimió de manera tan eficaz como las señales individuales.

Ejemplo 7: Comparación de la terapia con IVIG, la terapia con C1-INH y la terapia de combinación

Tanto IVIG (PRIVIGEN®, CSL Behring) como C1-INH (BERINERT®, CSL Behring) redujeron significativamente el tamaño del infarto cerebral, la puntuación de déficit neurológico y la deposición de fragmentos C3b en el sitio de lesión de una manera sensible a la dosis cuando se administraron 30 minutos antes o 1 hora tras isquemia. La dosis óptima de IVIG ejerció una neuroprotección mayor que la dosis óptima de C1-INH (una reducción del 85% frente al 48% de volumen de infarto cerebral y una inhibición del 35% frente al 22% de déficit neurológico, respectivamente). El tratamiento con albúmina sérica humana y vehículos (disoluciones estabilizadoras) para IVIG y C1-INH no mejoró la magnitud de la lesión cerebral observada en controles no tratados. Este dato sugiere que la atenuación del complemento puede considerarse una terapia intervencionista novedosa para el accidente cerebrovascular.

El C1-INH inhibe la activación del complemento, pero no neutraliza la activación ya generada de los fragmentos del complemento, mientras que la IVIG no inhibe la nueva activación del complemento, pero sí elimina los fragmentos del complemento activados. En una enfermedad mediada por el complemento, tal como accidente cerebrovascular, se producen esporádicamente nuevos episodios de activación del complemento, generando nuevos productos del complemento patógenos. Una combinación de un inhibidor y un eliminador proporciona una estrategia terapéutica mejorada para eliminar fragmentos activos existentes e impedir la activación adicional del complemento. La combinación de dosis inferiores a la óptima tanto de IVIG como de C1-INH no solo superó los efectos de las concentraciones individuales, sino que también superó la concentración de C1-INH óptima e igualó el potencial terapéutico de la IVIG a 1 g/kg, excepto en ratones de mayor edad en los que el tratamiento combinado mostró una protección cerebral superior en comparación con la IVIG sola.

La terapia de combinación puede proporcionar un beneficio para el tratamiento de accidente cerebrovascular en seres humanos, dado que tanto IVIG como C1-INH ya se usan en el tratamiento de otros trastornos humanos y se ha mostrado que son seguros.

Ejemplo 8: Materiales y métodos

Modelo de isquemia cerebral focal/reperfusión. Todos los protocolos y procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales del Instituto Nacional sobre el Envejecimiento y se llevaron a cabo en cumplimiento con la directriz de los NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Se anestesiaron ratones C57BL/6 macho de tres meses de edad (25-30 g) con isoflurano (inducción del 5,0%, mantenimiento del 1,5-2,0%). Entonces se sometieron los animales a una oclusión de la arteria cerebral media transitoria (TMCAO),

usando el método del filamento intraluminal. Resumiendo, la arteria carótida común izquierda, la arteria carótida externa (ECA) y la arteria carótida interna (CIA) se expusieron por medio de una incisión de la línea media en el cuello. Entonces, se introdujo un monofilamento recubierto con silicio (diámetro con recubrimiento de 0,23 +/- 0,02 mm) en la luz de la ECA a través de una incisión y se hizo avanzar desde la ECA a la luz de la CIA hasta que se percibió una ligera resistencia. Se retiró el monofilamento tras un periodo de 1 h para iniciar la reperfusión durante hasta 72 h. Los ratones operados de manera simulada se trataron idénticamente con la excepción de la inserción del filamento para producir una oclusión.

Régimen de tratamiento. La preparación de IVIG (PRIVIGEN®, CSL Behring AG, Berna, Suiza) usada en estos ejemplos era una disolución de proteína al 10% que contenía >98% de IgG y <0,025 mg/ml de IgA. Las moléculas de IgG en PRIVIGEN® están estabilizadas con 250 mmol/l de L-prolina (vehículo). El inhibidor de C1s esterasa humano derivado de plasma, liofilizado, C1-INH (BERINERT®, CSL Behring GmbH, Marburg, Alemania), se reconstituyó con 10 ml de agua estéril para conseguir una dosis de C1-INH final de 500 U en disolución de vehículo que contiene 10 mg/ml de glicina, 8,5 mg/ml de NaCl y 3 mg/ml de citrato de sodio. El C1-INH reconstituido se mantuvo a +4°C y se usó en el plazo de 14 días. Tanto la IVIG como la C1-INH se administraron mediante infusión lenta en la vena femoral o bien 30 min antes (pretratamiento) o bien en puntos de tiempo designados (1 h y 3 h postratamiento) tras MCAO. Se infundieron disoluciones de vehículo para ambos agentes terapéuticos (tal como se describe en los ejemplos anteriores) en animales control a un volumen igual a aquel en el que se administraron dosis óptimas de IVIG y C1-INH.

Evaluación del déficit neurológico. En puntos de tiempo tras accidente cerebrovascular designados, se evaluaron las consecuencias funcionales de la lesión por I cerebral focal/R usando una puntuación de seis puntos de déficit neurológico (0, sin déficit; 1, fallo al extender la pata derecha; 2, andar en círculos hacia la derecha; 3, caída hacia la derecha; 4, incapacidad para andar de manera espontánea y 5, muerte). Cada ratón se evaluó de manera ciega por al menos dos investigadores.

Cuantificación del infarto cerebral. Se anestesiaron los ratones, se decapitaron y se retiraron sus cerebros. Se prepararon cortes coronales de dos milímetros usando una matriz de cerebro de roedor (Kent Scientific, Torrington, CT) y se tiñeron durante 20 min a 37°C con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio monohidratado al 2% (TTC, Sigma, St Louis, MO) en tampón fosfato. Se hizo un barrido de las secciones y se evaluó el tamaño del infarto usando software de análisis de imágenes de los NIH (ImageJ; Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD).

Electroforesis en gel e inmunotransferencia de tipo Western. Se colocaron muestras corticales y estriadas de cerebro de ratones tratados con IVIG y C1-INH, y ratones control con vehículo apropiado, en tampón de lisis que contenía NaCl 300 mM, MgCl₂ 1,5 mM, HEPES 25 mM, β-glicerofosfato 20 mM, EDTA 0,2 mM, ditiotreitól (DTT) 0,5 mM y Triton-X al 0,1% con inhibidores de proteasa. Se lisaron tejidos mediante sonicación de 30 segundos a 4°C usando un procesador ultrasónico (VC 130 PB, Sonic & Materials Inc., Newtown, CT) y se centrifugaron los extractos celulares durante 5 minutos a 18.000 x g. Entonces se determinó el contenido proteico mediante un kit de ensayo de ácido bicinconínico (BCA) de Bio-Rad (Hercules, CA). Se separaron muestras de sobrenadante sobre geles de SDS al 10% y las proteínas resultas se transfirieron electroforéticamente a una membrana de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) de 0,45 μm (Millipore Corporation, Bedford, MA). Se incubaron las inmunotransferencias con un anticuerpo anti-C3b primario (Cell Sciences, Canton, MA) y un anticuerpo monoclonal anti-β actina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) durante la noche a 4°C. Tras la incubación con IgG secundaria conjugada con peroxidasa del rábano durante 1 hora, se visualizaron productos de reacción usando un ensayo de quimioluminiscencia potenciada (Amersham Corporation, Piscataway, NJ). Se estimaron los cambios relativos en la expresión de proteína a partir de la densidad de píxeles media de cada banda proteica usando el programa Scion Image (Orem, UT).

Evaluación inmunohistoquímica. Los ratones designados para estudios inmunohistoquímicos se anestesiaron de manera profunda tras 24 horas de reperfusión, y se perfundieron transcardialmente con PBS hasta que el flujo saliente salía transparente. Se consiguió la fijación con paraformaldehído al 4% en PBS. Se extrajeron los cerebros por disección y se colocaron en el mismo agente de fijación durante la noche a 4°C. El cerebro frontal se procesó para el seccionamiento con parafina. Se cortaron secciones coronales en serie (5 μm de grosor) y se montaron sobre portaobjetos de vidrio. Se desparafinaron las secciones, se rehidrataron y se sometieron a recuperación de antígeno usando tampón TRIS-EDTA de pH alto. Todos los recuentos celulares se llevaron a cabo en áreas definidas mantenidas por todas las secciones. Tras el bloqueo de la unión de anticuerpo no específica, se incubaron las secciones durante la noche con anticuerpo anti-C3 policlonal de conejo primario (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y anticuerpo anti-TLR2 monoclonal de rata (Biolegend, CA) a 4°C. Tras incubarse con anticuerpos secundarios (Invitrogen, Carlsbad, CA) conjugados con Alexa Fluor 568 (fluorescencia roja) y Alexa Fluor 488 (fluorescencia verde) apropiados durante 45 min y someterse a contratinción con Hoechst 33258, se obtuvieron imágenes con un microscopio de fluorescencia Olympus. Se procesaron las imágenes con Photoshop 7.0 (Adobe Systems, San Jose, CA), ajustándose los niveles de entrada para abarcar el intervalo de las intensidades de señal obtenidas. Se cuantificó la intensidad de píxeles usando el software IP Labs (BD Biosciences, San Diego, CA).

Análisis estadístico. Se realizaron comparaciones estadísticas usando la prueba de la t de Student, la prueba exacta de Fisher, ANOVA y pruebas *post hoc* de Newman-Keuls para comparaciones por pares.

Los ejemplos anteriores pretenden ilustrar y no limitar la presente divulgación. Otras realizaciones de los dispositivos y métodos dados a conocer resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la memoria descriptiva y la puesta en práctica de los dispositivos y métodos dados a conocer en el presente documento.

5

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una composición para su uso en la prevención, el tratamiento o la reducción de los efectos de daño por inflamación o lesión por reperfusión tras isquemia cerebral, que comprende una combinación de inmunoglobulina G intravenosa (IVIG) derivada de plasma humano e inhibidor de C1 (C1-INH), en la que el C1-INH se administra a una concentración de 75 U/kg de peso corporal y en la que la IVIG se administra a una concentración de 0,5 g/kg de peso corporal.
- 10 2.- La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la IVIG y el C1-INH se administran al mismo tiempo.
- 15 3.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que la IVIG y el C1-INH se administran secuencialmente, o bien administrándose la IVIG en primer lugar o bien administrándose el C1-INH en primer lugar.
- 20 4.- La composición para su uso según la reivindicación 3, en la que el C1-INH se administra al menos 10 minutos tras la IVIG.
- 5.- La composición para su uso según la reivindicación 3, en la que la IVIG se administra al menos 10 minutos tras el C1-INH.
- 25 6.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la combinación de IVIG y C1-INH se administra hasta aproximadamente seis horas tras isquemia cerebral.
- 7.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la IVIG y el C1-INH se administran por vía intravenosa.
- 30 8.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la IVIG y el C1-INH se proporcionan en forma acuosa o liofilizada.
- 35 9.- La composición para su uso según la reivindicación 8, en la que los componentes de tratamiento liofilizados se reconstituyen antes de la administración disolviéndolos en un portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente agua estéril para inyección.
- 40 10.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la inmunoglobulina y el C1-INH se administran a concentraciones menores que la concentración óptima para su administración independiente.
- 11.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 7 a 10, en la que la IVIG y el C1-INH se administran hasta aproximadamente 18 horas tras isquemia cerebral.
- 45 12.- Un kit para su uso en el tratamiento de isquemia cerebral, que comprende:
- (a) una IVIG;
- (b) C1-INH; y
- 50 (c) opcionalmente, al menos un fármaco o compuesto terapéuticamente activo adicional, administrándose en el tratamiento de isquemia cerebral el C1-INH a una concentración de 75 U/kg de peso corporal y la IVIG se administra a una concentración de 0,5 g/kg de peso corporal.
- 55 13.- El kit según la reivindicación 12, en el que el al menos un fármaco o compuesto terapéuticamente activo adicional es una vitamina, antibiótico, agente antiviral o un compuesto destinado a eliminar o inhibir la formación de coágulos sanguíneos en el cerebro, preferiblemente aspirina, clopidogrel o dipiridamol.
- 14.- El kit según la reivindicación 11 o 12, en el que la IVIG y el C1-INH se proporcionan en forma acuosa o liofilizada.

Fig. 1

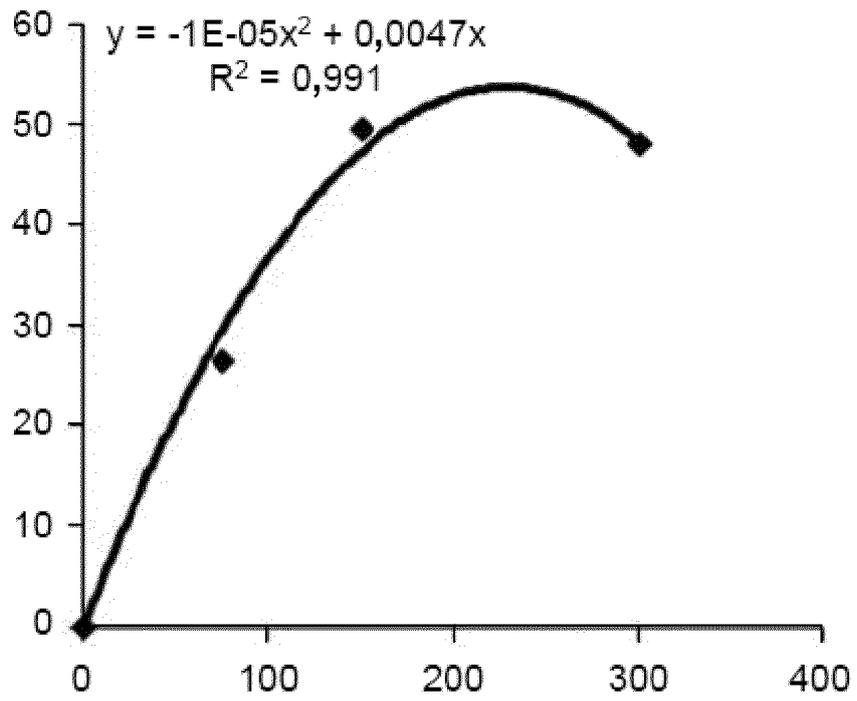


Fig. 2

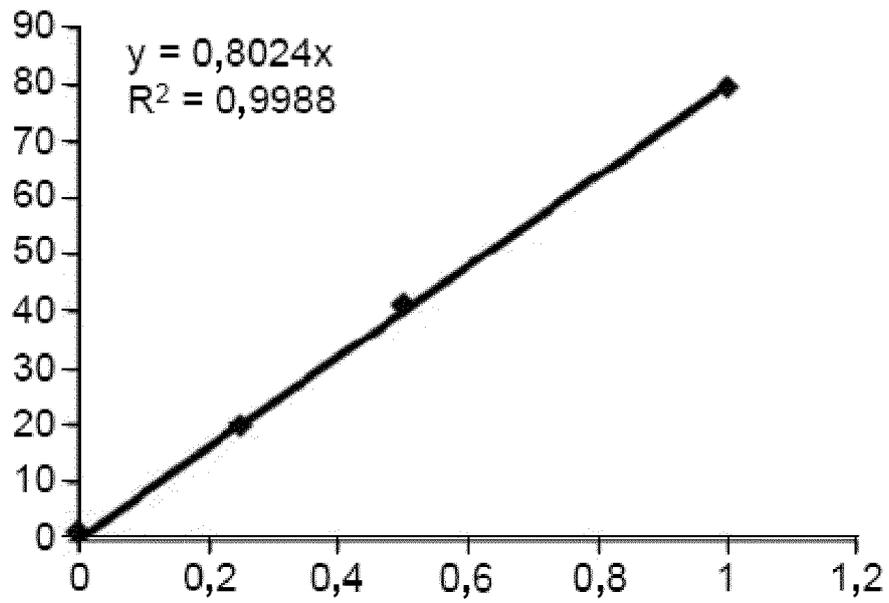


Fig. 3

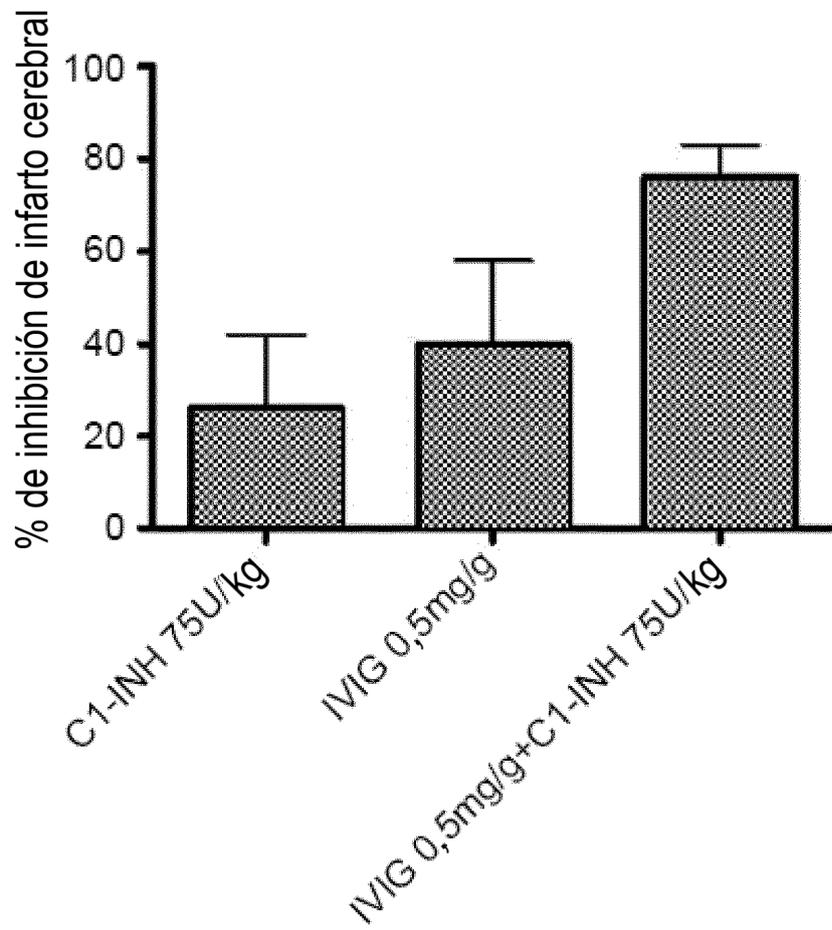


Fig. 4A

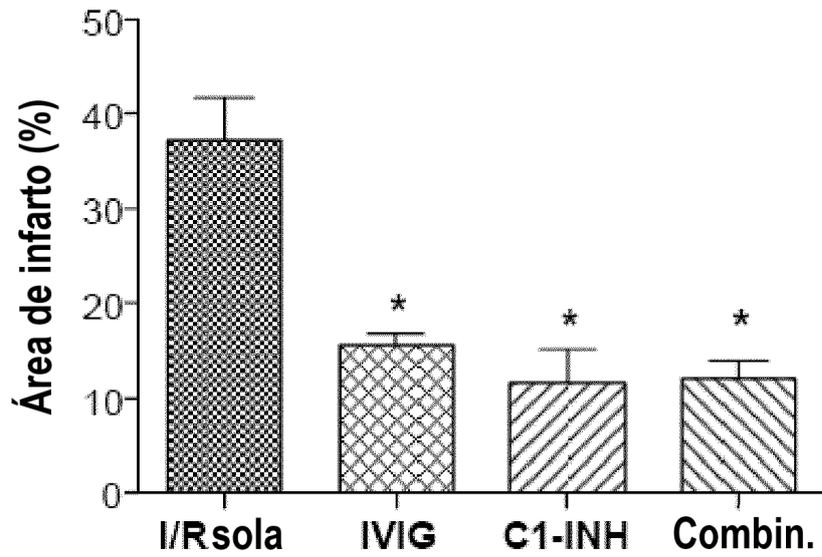


Fig. 4B

