

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 056**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/06** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2013 PCT/US2013/028350**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2013 WO13130826**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2013 E 13709675 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 2820042**

54 Título: **Remielinización estimulada por IgG de nervios periféricos**

30 Prioridad:

**29.02.2012 US 201261605117 P**

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

**21.04.2020**

73 Titular/es:

**BAXALTA GMBH (50.0%)  
Thurgauerstrasse 130  
8152 Glattpark (Opfikon), CH y  
BAXALTA INCORPORATED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KUERY, PATRICK;  
TZEKOVA, NEVENA;  
HARTUNG, HANS-PETER;  
HERMANN, CORINNA;  
REIPERT, BIRGIT MARIA;  
SCHWARZ, HANS-PETER;  
EHRlich, HARTMUT y  
BUNK, SEBASTIAN**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN BADAJOZ, Irene**

ES 2 755 056 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Remielinización estimulada por IgG de nervios periféricos

5 **Referencias cruzadas a solicitudes**

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente estadounidense provisional con n.º de serie 61/605.117 presentada el 29 de febrero de 2012.

10 **Antecedentes de la invención**

La neuropatía periférica es una manifestación de trastornos que causan daño al sistema nervioso periférico (SNP), una red de ganglios y neuronas que transmiten señales entre el sistema nervioso central (SNC), es decir el cerebro y la médula espinal, y todas las demás partes del organismo. Las neuronas del SNP se basan en células de Schwann, por ejemplo, para la mielinización, conducción nerviosa acelerada, desarrollo y regeneración de nervios, soporte trófico, producción de matriz extracelular nerviosa y modulación de la actividad sináptica neuromuscular. Estas células de Schwann proporcionan aislamiento eléctrico envolviendo una vaina de mielina rica en lípidos y proteínas alrededor de axones de neuronas motoras y sensitivas. Dada la función crítica de la mielina, no es sorprendente que la desmielinización de axones periféricos sea una característica de neuropatías periféricas agudas y crónicas tales como síndrome de Guillain-Barré (SGB), polineuropatía desmielinizante crónica (PDIC) y neuropatía motora multifocal (NMM) así como otras patologías de nervios periféricos inducidas por toxinas, fármacos o enfermedades sistémicas, por ejemplo, diabetes.

Las neuropatías periféricas pueden distorsionar la transmisión de señales, provocando síntomas que varían con el origen de la neuropatía y el tipo o número de nervios afectados. Por ejemplo, los síntomas pueden depender de si el trastorno afecta a fibras nerviosas sensitivas, que transmiten información sensitiva desde la zona afectada hasta el SNC, o fibras nerviosas motoras, que transmiten impulsos y coordinan la actividad motora desde el SNC hasta un músculo, o ambas. Las neuropatías periféricas pueden clasificarse como mononeuropatías, que implican daño a un nervio, o polineuropatías, que implican daño de múltiples nervios; agudas, cuando los síntomas aparecen de manera repentina, progresan rápidamente y se resuelven lentamente, o crónicas, cuando los síntomas comienzan de manera sutil y progresan lentamente. Hasta la fecha se han identificado más de 100 tipos diferentes de neuropatía periférica. Pueden realizarse diagnósticos clínicos de neuropatía periférica basándose en la historia clínica del sujeto, una exploración física, el uso de electromiografía (EMG) y estudios de conducción nerviosa (NCS), pruebas autonómicas y biopsias de nervios, etc.

Los tratamientos actuales para neuropatías periféricas se dirigen al estado subyacente, cuando es posible, y con frecuencia se usan junto con tratamientos sintomáticos, tales como agentes antiinflamatorios, tratamiento del dolor, ayudas mecánicas y/o intervención quirúrgica, etc. El organismo también presenta su propia capacidad regenerativa en respuesta a lesiones o daños del SNP. Tras la lesión del SNP, se produce degeneración walleriana de muñones de nervios distales, seguido por degradación por células de Schwann de mielina, fagocitosis de mielina extracelular y reclutamiento de macrófagos para un aclaramiento adicional de mielina. Las células de Schwann pueden adaptarse adicionalmente a situaciones patológicas mediante su capacidad para desdiferenciarse, proliferar, fomentar la regeneración axonal y volver a diferenciarse, y producir mielina. Véase Bhatheja *et al.* (2006) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38(12):1995-9. En el transcurso de la reparación, las células de Schwann estimulan, guían la regeneración axonal y dirigen la reinervación, formando un tubo de regeneración del axón, conocido como banda de Bungner, proliferando rápidamente y proporcionando al axón un trayecto a lo largo del cual crecer. Véase Burstyn-Cohen *et al.* (1998) *J. Neurosci* 18(21): 8875-8885. Aunque generalmente puede observarse regeneración de nervios funcional en el SNP (a diferencia del SNC, que carece de un mecanismo de regeneración para el aclaramiento de mielina y la regeneración de axones), con frecuencia es limitada o está afectada de manera crónica. Por tanto, se necesitan nuevos enfoques de fomento de la reparación para el SNP.

Recientes estudios sobre el SNC han proporcionado evidencias del efecto directo de la IgM sobre los oligodendrocitos, las células mielinizantes de la glía del sistema nervioso central. Por ejemplo, se encontró que el direccionamiento de anticuerpos de IgMκ reactivos frente a oligodendrocitos fomentaba la remielinización del SNC (Asakura *et al.*, 1998). Otros estudios mostraron que el tratamiento de un modelo no inmunitario, no inducido por toxina, de enfermedad desmielinizante con moléculas de IgM humanas combinadas da como resultado una diferenciación de oligodendrocitos significativamente potenciada en el SNC (Bieber *et al.*, 2000; Bieber *et al.*, 2002; Warrington *et al.*, 2007). El descubrimiento de receptores de Fc para IgM en oligodendrocitos, sus células precursoras y mielina en el SNC, ofrece pistas adicionales de una posible interacción ligando-receptor (Nakahara *et al.*, 2003).

El conocimiento obtenido a partir de estos estudios de IgM de oligodendrocitos, aunque significativo para la reparación del SNC, no logra aprovechar la capacidad regenerativa del SNP (que no contiene oligodendrocitos). En estudios más relevantes, se encontró que la administración de IVIG humana reducía la duración de la enfermedad en un modelo de rata de EAN (neuritis autoinmunitaria), que simula el síndrome de Guillain-Barré (SGB) desmielinizante y específico del SNP (Lin *et al.*, 2007). Se postuló que los efectos eran atribuibles a la función

5 inmunomoduladora de la IVIG y posible capacidad de reducción de pérdida axonal inespecífica secundaria y antiinflamatoria. En un estudio independiente del sistema inmunitario humoral, ratones JHD deficientes en células B mostraron un retraso significativo en el flujo de macrófagos, aclaramiento de mielina y regeneración de axones tras lesión del SNP. Se restauró un rápido aclaramiento de residuos de mielina mediante transferencia pasiva de anticuerpos a partir de ratones WT no sometidos a tratamiento o anticuerpo anti-mielina de SNP, confirmando así la función de anticuerpos endógenos en el fomento de la entrada de macrófagos y la actividad fagocítica (Vargas *et al.*, 2010). Ensayos clínicos con administración de inmunoglobulinas intravenosa (IVIG) han mostrado efectos positivos para SGB, polineuropatía desmielinizante crónica (PDIC) y neuropatía motora multifocal (NMM), con la suposición de que el tratamiento en cada una de estas neuropatías mediadas por el sistema inmunitario o autoinmunitarias se logró mediante la función inmunomoduladora de la IVIG. Van den Bergh *et al.*, European Journal of Neurology 2010, 17:356-363, describe directrices sobre el tratamiento de una neuropatía inflamatoria crónica.

15 El efecto de IgG policlonal sobre células de Schwann, si lo hay, no se conocía hasta ahora. Por tanto, seguía existiendo una cuestión sobre cómo podía aprovecharse la función regenerativa de las células de Schwann para propósitos terapéuticos en neuropatías periféricas desmielinizantes. El presente descubrimiento de la capacidad de la IgG policlonal exógena para inducir la maduración, diferenciación y producción de mielina de células de Schwann es una aclaración importante del mecanismo que proporciona nuevos enfoques para el tratamiento de todas las neuropatías periféricas desmielinizantes.

## 20 Sumario de la invención

La presente invención proporciona la IgG policlonal para su uso tal como se define en la reivindicación 1.

25 En un aspecto de la divulgación, se proporcionan métodos de tratamiento de una neuropatía periférica desmielinizante en mamíferos, en los que la neuropatía no está mediada por el sistema inmunitario o mediada por infección, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de IgG policlonal a un mamífero al que se le ha diagnosticado dicha neuropatía. En algunas realizaciones de la divulgación, la neuropatía periférica desmielinizante que está tratándose no es síndrome de Guillain-Barré, polineuropatía desmielinizante crónica o neuropatía motora multifocal. En otras realizaciones de la divulgación, la neuropatía periférica desmielinizante es una neuropatía no idiopática. La neuropatía periférica desmielinizante que puede tratarse mediante la presente divulgación puede seleccionarse de una neuropatía inducida por traumatismo, una neuropatía inducida por toxina, una neuropatía heredada y una neuropatía inducida por una enfermedad metabólica, por ejemplo, neuropatía diabética.

35 En otro aspecto de la divulgación, se proporcionan métodos de tratamiento de traumatismo de nervio periférico mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de IgG policlonal a un mamífero con traumatismo de nervio periférico.

40 En aún otro aspecto de la divulgación, se proporcionan métodos de tratamiento de neuropatía inducida por toxina periférica, en los que la neuropatía no está mediada por infección, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de IgG policlonal a un mamífero al que se le ha diagnosticado dicha neuropatía.

45 Para el tratamiento de una neuropatía periférica desmielinizante descrito en el presente documento, puede administrarse IgG policlonal por vía local o sistémica. La administración local de la IgG policlonal puede producirse por vía intramuscular o intradérmica. La administración sistémica de la IgG policlonal puede producirse por vía intranasal, subcutánea, oral, intraarterial o intravenosa. En algunas realizaciones de la invención tal como se define en las reivindicaciones, se administra un agente antiinflamatorio conjuntamente con la IgG policlonal al mamífero. El agente antiinflamatorio puede seleccionarse de una hormona adrenocorticotrópica, un corticosteroide, un interferón, acetato de glatirámico o un fármaco antiinflamatorio no esteroideo.

50 La IgG policlonal de la invención tal como se define en las reivindicaciones puede administrarse cada semana, cada dos semanas o cada mes a una dosis de aproximadamente 0,05 a 5 g por kg de peso corporal del paciente o de aproximadamente 0,5 a 2 g por kg de peso corporal del paciente.

55 En un aspecto adicional de la divulgación, se proporcionan métodos de fomento de la mielinización de una célula de nervio periférico mediante una célula de Schwann mediante la puesta en contacto de la célula de Schwann con una cantidad de IgG policlonal suficiente para fomentar la mielinización de dicha célula de nervio periférico mediante la célula de Schwann.

60 En otro aspecto de la divulgación, se proporcionan métodos de fomento de la diferenciación de una célula de Schwann inmadura en un estado mielinizante mediante la puesta en contacto de dicha célula de Schwann con IgG policlonal en una cantidad suficiente para inducir la diferenciación de célula de Schwann.

65 En aún otro aspecto, se divulgan métodos de fomento de la producción de mielina mediante una célula de Schwann que comprenden poner en contacto dicha célula de Schwann con una cantidad de IgG policlonal suficiente para regular por incremento el gen de MBP.

En un aspecto adicional de la divulgación, se proporcionan métodos de cultivo de tejido nervioso de mamífero que comprende axones mediante la puesta en contacto del tejido en cultivo con una cantidad eficaz de células de Schwann y una cantidad eficaz de IgG policlonal, mediante lo cual la puesta en contacto de células de Schwann con IgG policlonal induce la regulación por incremento del gen de MBP.

En aún otro aspecto de la divulgación, se proporcionan métodos de tratamiento de una lesión de nervio periférico en un mamífero mediante: trasplante de células nerviosas a un sitio de la lesión de nervio periférico; y puesta en contacto de las células nerviosas con una composición que comprende células de Schwann e IgG policlonal.

En los métodos descritos en el presente documento, la IgG policlonal puede administrarse a través de una o más vías de administración, tales como por vía intramuscular, intradérmica, subcutánea, bucal, oral, intranasal o intraarterial o intravenosa a un individuo que necesita tal terapia. El individuo puede ser un humano o animal domesticado. En algunas realizaciones, la IgG policlonal deriva a partir de suero humano combinado.

En algunas realizaciones, la IgG policlonal se administra conjuntamente con un agente antiinflamatorio a un mamífero que necesita tal terapia. El agente antiinflamatorio puede seleccionarse de una hormona adrenocorticotrópica, un corticosteroide, un interferón, acetato de glatirámico o un fármaco antiinflamatorio no esteroideo.

En aún otro aspecto de la divulgación, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz de IgG policlonal para tratar una neuropatía periférica desmielinizante no idiopática.

#### Breve descripción de los dibujos

Se realizan descripciones más particulares de la invención con referencia a determinadas realizaciones a modo de ejemplo de la misma que se ilustran en las figuras adjuntas. Estas figuras forman parte de la memoria descriptiva. Sin embargo, debe observarse que las figuras adjuntas ilustran realizaciones a modo de ejemplo de la invención y por tanto no deben considerarse como limitativas en cuanto a su alcance.

La figura 1 muestra las tasas de proliferación relativas de células de Schwann inmaduras que se expusieron a formulaciones de IVIG/tampón no dializadas (figura 1A) y dializadas (figura 1B) tras 2 días tal como se mide mediante ensayos de incorporación de BrdU. Estas tasas de proliferación relativas se generaron basándose en el número de células positivas para de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) incorporada en ADN celular durante la proliferación celular.

La figura 2 muestra las tasas de proliferación relativas de células de Schwann inmaduras que se expusieron a formulaciones de IVIG/tampón no dializadas (figura 2A) y dializadas (figura 2B) tras 2 días tal como se mide usando ensayos de Ki-67. Estas tasas de proliferación relativas se generaron basándose en el número de células positivas para expresión de Ki-67 durante la proliferación celular.

La figura 3 muestra los niveles de expresión génica de P0 (figura 3A) y MBP (figura 3B) en células de Schwann inmaduras que se expusieron a formulaciones de IVIG/tampón dializadas en los puntos de tiempo de 1 día y 3 días.

La figura 4 muestra los niveles de expresión génica de P0 (figura 4A) y MBP (figura 4B) en células de Schwann con supresión de p57kip2 que se expusieron a formulaciones de IVIG/tampón dializadas en el punto de tiempo de 7 días (supresión de 9 días).

La figura 5 muestra los niveles de expresión de receptor de Fc, CD64, en células de Schwann con supresión de p57kip2 en comparación con células de Schwann transfectadas de control (sin supresión de p57kip2). Ningún grupo de células de Schwann se expuso a formulaciones de IVIG/tampón.

La figura 6 muestra imágenes fluorescentes de células de Schwann con supresión de p57kip2 (figura 6B) y células transfectadas de control (figura 6A) tras la estimulación con 20 mg de formulaciones de IVIG/tampón dializadas. La ubicación y longitud de procesos celulares se indican mediante las flechas superpuestas sobre las imágenes fluorescentes.

La figura 7 muestra un gráfico de la longitud de excrecencia celular para células de Schwann con supresión de p57kip2 y células transfectadas de control (figura 7A) tras 3 días de estimulación con formulaciones de IVIG/tampón dializadas (supresión de 5 días) junto con las imágenes fluorescentes respectivas de las células de Schwann con supresión de p57kip2 estimuladas con 20 mg de IVIG (figura 7B), células de Schwann con supresión de p57kip2 estimuladas con tampón (figura 7C), células transfectadas de control tratadas con 20 mg de IVIG (figura 7D), y células transfectadas de control tratadas con tampón (figura 7E).

La figura 8 muestra un gráfico de la longitud de excrecencia celular para células de Schwann con supresión de

p57kip2 y células transfectadas de control (figura 8A) tras 7 días de estimulación con formulaciones de IVIG/tampón dializadas (supresión de 9 días) junto con las imágenes fluorescentes respectivas de las células de Schwann con supresión de p57kip2 estimuladas con 20 mg de IVIG (figura 8B), células de Schwann con supresión de p57kip2 estimuladas con tampón (figura 8C), células transfectadas de control tratadas con 20 mg de IVIG (figura 8D), y células transfectadas de control tratadas con tampón (figura 8E).

La figura 9 es un diagrama de flujo del procedimiento para establecer un cultivo conjunto de neuronas del SNP (ganglio de la raíz dorsal de rata) y células de Schwann mielinizantes.

## Descripción detallada de la invención

El descubrimiento de la capacidad de la IgG policlonal para fomentar la homeostasis, maduración, diferenciación y producción de mielina de células de Schwann puede aplicarse para el tratamiento de neuropatías periféricas desmielinizantes de orígenes variables, por ejemplo, neuropatías inducidas por toxina, neuropatía diabética, neuropatía inducida por traumatismo, fomentando la capacidad regenerativa de células de Schwann nativas. Se contempla la administración de IgG policlonal como complemento o sustitución de regímenes terapéuticos o tratamientos sintomáticos existentes para neuropatías periféricas desmielinizantes. Además, la presente divulgación puede usarse en el entorno de laboratorio para realizar la remielinización de nervio periférico. Basándose en los hallazgos descritos en el presente documento, pueden aplicarse IgG policlonales en el trasplante de nervios, cultivo celular, por ejemplo, inducción de diferenciación de células de Schwann, determinación de destino de células precursoras, regulación del gen de mielina o expresión de proteína, y como tratamiento previo a, o régimen de cuidado posoperatorio para, técnicas quirúrgicas que amenazan o afectan a nervios periféricos. La presente invención se define mediante las reivindicaciones.

### I. DEFINICIONES

El término “no idiopático” se refiere a un trastorno en el que se conoce la causa subyacente.

El término “neuropatía periférica”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un trastorno que afecta al sistema nervioso periférico, lo cual excluye ganglio y nervios del cerebro y la médula espinal. La “neuropatía periférica” puede manifestarse como una o una combinación de disfunción neuronal motora, sensitiva, sensorimotora o autonómica. La variedad de morfologías presentadas por las neuropatías periféricas puede atribuirse a varias causas diferentes. Por ejemplo, las neuropatías periféricas pueden adquirirse genéticamente, pueden resultar de una enfermedad sistémica, o pueden inducirse mediante un agente tóxico. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, neuropatía diabética periférica, neuropatía sensorimotora distal o neuropatías autonómicas tales como motilidad reducida del tracto gastrointestinal o atonía de la vejiga urinaria. Los ejemplos de neuropatías periféricas asociadas con enfermedad sistémica incluyen síndrome pospoliomielítico o neuropatía asociada con SIDA; los ejemplos de neuropatías periféricas hereditarias incluyen enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, abetalipoproteinemia, enfermedad de Tangier, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Fabry y síndrome de Dejerine-Sottas; y los ejemplos de neuropatías periféricas provocadas por un agente tóxico incluyen las provocadas por el tratamiento con un agente quimioterápico tales como vincristina, cisplatino, metotrexato o 3'-azido-3'-desoxitimidina.

Una variedad de neuropatía periférica es la “neuropatía periférica desmielinizante”. Tal como se usa en el presente documento, una “neuropatía periférica desmielinizante” describe una amplia clase de neuropatías periféricas que están asociadas con la destrucción o retirada de mielina, la vaina rica en lípidos que rodea y aísla las fibras nerviosas, de los nervios. Los ejemplos no limitativos de enfermedades de neuropatía periférica desmielinizante incluyen neuropatía diabética periférica, neuropatía sensorimotora distal o neuropatías autonómicas tales como motilidad reducida del tracto gastrointestinal o atonía de la vejiga urinaria. Pueden encontrarse ejemplos y descripciones adicionales de neuropatía periférica desmielinizante en la sección II de la descripción detallada.

Un trastorno “mediado por el sistema inmunitario”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un estado que resulta de la actividad anómala del sistema inmunitario del organismo. Los subconjuntos de trastorno “mediado por el sistema inmunitario” incluyen, sin limitación, enfermedad autoinmunitaria, en la que el sistema inmunitario ataca al organismo, trastornos de complejo inmunitario, trastornos que implican rechazo tras el trasplante, enfermedad inflamatoria y alergias.

Una neuropatía periférica “mediada por infección” se refiere a una disfunción del sistema nervioso periférico experimentada como resultado de infecciones virales, bacterianas o fúngicas.

Una “neuropatía periférica inducida por traumatismo” o “neuropatía periférica por traumatismo” se refiere a una disfunción del sistema nervioso periférico provocada por un choque corporal, lesión o “traumatismo físico”. El traumatismo físico, por ejemplo, debido a combate, accidentes de vehículos, caídas y actividades relacionadas con los deportes, puede provocar que los nervios se corten, aplasten, compriman o estiren parcial o completamente, algunas veces de una manera tan forzada que se desprenden parcial o completamente de los ganglios o de la médula espinal y dan como resultado la desmielinización. Las neuropatías periféricas inducidas por traumatismo también pueden experimentarse como resultado, por ejemplo, de descarga eléctrica, hipotermia, etc.

Una neuropatía periférica “inducida por toxina” o “inducida por producto químico” se refiere a una disfunción del sistema nervioso periférico provocada por toxinas (por ejemplo, agentes químicos). Las toxinas que producen neuropatía periférica pueden dividirse generalmente en tres grupos: fármacos y medicamentos; productos químicos industriales; y toxinas medioambientales. A continuación, se describen ejemplos no limitativos de toxinas que pueden provocar neuropatía periférica en la sección II de la descripción detallada.

Un “agente antiinflamatorio” tal como se usa en el presente documento incluye cualquier agente que reduce la inflamación de un vaso sanguíneo afectado y/o tejido adyacente. Ejemplos no limitativos de agentes antiinflamatorios son esteroides (por ejemplo, glucocorticoides y corticosteroides), derivados antiinflamatorios selectivos inmunitarios (ImSAID), agentes refrescantes, suplementos con plantas medicinales (por ejemplo, garra del diablo, hisopo, jengibre, cúrcuma, árnica de montaña y corteza de sauce (que contiene ácido alicílico), y alimentos con efectos antiinflamatorios (por ejemplo, granada, té verde, verduras, alimentos que contienen ácidos grasos omega-3), frutos secos, semillas y aceite de oliva virgen extra). Específicamente, la prostaglandina 2 (PGE2) es un compuesto proinflamatorio y PGE1 y PGE3 son compuestos antiinflamatorios. Por consiguiente, los agentes que disminuyen PGE2 o aumentan PGE1 y PGE3 también pueden actuar como agentes antiinflamatorios. Pueden encontrarse ejemplos no limitativos adicionales de agentes antiinflamatorios en la sección VI, “terapia de combinación”, a continuación.

Una “célula de Schwann inmadura”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un estadio específico en el linaje de célula de Schwann. La primera etapa a lo largo del linaje de célula de Schwann proporciona el precursor de célula de Schwann, una célula proliferativa que se asocia con muchos axones y expresa el receptor de factor de crecimiento nervioso (NGF-R), proteína asociada con el crecimiento 43 (GAP-32), y las moléculas de adhesión a células neuronales N-CAM y L1. La célula de Schwann “comprometida” posterior se conoce como célula de Schwann inmadura; se asocia cada vez con menos axones y expresa, además de los marcadores anteriormente indicados, proteína S-100 (a partir de este estadio en adelante, todas las células de Schwann expresan S-100). Las células de Schwann comprometidas se desarrollan para dar o bien células de Schwann no mielinizantes, que permanecen asociadas con varios axones y expresan galactocerebrósido (GalC) además de los marcadores anteriores, o bien células de Schwann mielinizantes. Las células de Schwann mielinizantes avanzan a través de un estadio “premielinizante” proliferativo, caracterizado por la expresión transitoria de factor de transcripción de dominio Pou inducible por cAMP suprimido (SCIP), seguido por un estadio positivo para GalC “promielinizante”, que se asocia con un único axón en el avance. La diferenciación final para dar una célula de Schwann mielinizante madura implica la regulación por disminución de la expresión de NGF-R, GAP-43, N-CAM y L1, con una regulación por incremento de la expresión de GalC y proteínas de mielina, e, *in vivo*, la síntesis y elaboración de mielina.

El término “IgG”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una composición de inmunoglobulinas IgG. La clase de IgG de inmunoglobulinas, como lo sugiere su nombre, se caracteriza por la presencia de una cadena pesada  $\gamma$  (gamma). Una estructura de inmunoglobulina IgG completa a modo de ejemplo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena “ligera” (de aproximadamente 25 kDa) y una “pesada” (de aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. Los términos cadena ligera variable ( $V_L$ ) y cadena pesada variable ( $V_H$ ) se refieren a esas cadenas ligera y pesada, respectivamente.

Una “inmunoglobulina” o “anticuerpo” es un polipéptido que es inmunológicamente reactivo con un antígeno particular. El término “inmunoglobulina”, tal como se usa en el presente documento, abarca moléculas intactas de diversos isotipos así como fragmentos con capacidad de unión a antígeno, por ejemplo, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv y rIgG. Véase, por ejemplo, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Kubly, J., Immunology, 3ª Ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York (1998). El término también abarca fragmentos Fv de cadena sencilla recombinantes (scFv). El término abarca además moléculas bivalentes o biespecíficas, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. Las moléculas bivalentes y biespecíficas se describen, por ejemplo, en Kostelny *et al.* (1992) J. Immunol. 148:1547, Pack y Pluckthun (1992) Biochemistry 31:1579, Hollinger *et al.*, 1993, citado anteriormente, Gruber *et al.* (1994) J. Immunol.: 5368, Zhu *et al.* (1997) Protein Sci 6:781, Hu *et al.* (1996) Cancer Res. 56:3055, Adams *et al.* (1993) Cancer Res. 53:4026, y McCartney, *et al.* (1995) Protein Eng. 8:301.

El término “IgG policlonal”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una colección heterogénea de inmunoglobulinas IgG derivadas de múltiples células B y que tienen diferentes especificidades y afinidades de epitopos. El experto en la técnica conoce métodos de preparación de anticuerpos policlonales (por ejemplo, Harlow & Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. (Cold Spring Harbor Press)). Las IgG policlonales de la invención pueden extraerse a partir de plasma combinado a partir de diferentes individuos mamíferos que se han examinado previamente para detectar trastornos patógenos. En algunas realizaciones, las IgG policlonales de la presente invención son representativas de más de 100 individuos, más de 200 individuos, más de 300 individuos, más de 400 individuos, más de 500 individuos, más de 600 individuos, más de 700 individuos, más de 800 individuos, más de 900 individuos, más de 1000 individuos, más de 1100 individuos, más de 1200 individuos, más de 1300 individuos, más de 1400 individuos, más de 1500 individuos, más de 1600 individuos, más de 1700 individuos, más de 1800 individuos, más de 1900 individuos, o más de 2000 individuos.

La frase “se une de manera específica (o de manera selectiva)” a un anticuerpo o “inmunorreactivo de manera específica (o selectiva) con”, cuando se hace referencia a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinativa de la presencia de la proteína, en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Por tanto, en condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados se unen a secuencias de proteína particulares al menos dos veces el fondo y más normalmente más de 10 a 100 veces el fondo. Un ligando (por ejemplo, un anticuerpo) que se une de manera específica a una proteína tiene generalmente una constante de asociación de al menos  $10^3 \text{ M}^{-1}$  o  $10^4 \text{ M}^{-1}$ , algunas veces  $10^5 \text{ M}^{-1}$  o  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , en otros casos  $10^6 \text{ M}^{-1}$  o  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , preferiblemente de  $10^8 \text{ M}^{-1}$  a  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , y más preferiblemente, de aproximadamente  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  a  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  o superior. Puede usarse una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos inmunorreactivos de manera específica con una proteína particular. Por ejemplo, se usan inmunoensayos ELISA en fase sólida de manera rutinaria para seleccionar anticuerpos monoclonales inmunorreactivos de manera específica con una proteína. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que pueden usarse para determinar la inmunoreactividad específica.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan de manera intercambiable en el presente documento para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácido son un compuesto mimético químico artificial de un aminoácido que se produce de manera natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos que se producen de manera natural y polímeros de aminoácidos que no se producen de manera natural.

El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos que se producen de manera natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y compuestos miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos que se producen de manera natural. Los aminoácidos que se producen de manera natural son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce de manera natural, es decir, un carbono a que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil-sulfonio de metionina. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras principales de péptido modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce de manera natural. Los compuestos miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de una manera similar a un aminoácido que se produce de manera natural.

En el presente documento puede hacerse referencia a los aminoácidos o bien mediante sus símbolos de tres letras habitualmente conocidos o bien mediante los símbolos de una letra recomendados por la comisión de nomenclatura bioquímica de la IUPAC-IUB. Asimismo, puede hacerse referencia a nucleótidos mediante sus códigos de una única letra habitualmente aceptados.

La “proteína básica de mielina” (MBP), tal como se usa en el presente documento, se refiere al gen así como a la proteína codificada por el mismo, que es un componente proteico principal de mielina, que comprende aproximadamente el 30% del contenido en proteína total de la vaina de mielina. Se ha mostrado que MBP es un autoantígeno diana principal en MS, y las células T reactivas con MBP desempeñan un papel clave en su patogénesis (véase, por ejemplo, Schwartz, R S, “Autoimmunity and Autoimmune Diseases” en Paul, *Fundamental Immunology*, 3ª ed. Raven Press, Nueva York, 1993, págs. 1033 1097; Brown y McFarlin 1981. *Lab Invest* 45, págs. 278 284; Lehmann *et al.* 1992. *Nature* 358, págs. 155 157; Martin *et al.* 1992. *Ann Rev Immunol* 10, págs. 153 187; Sprent 1994. *Cell* 76, págs. 315 322; Su y Sriram. 1991. *J of Neuroimmunol* 34, págs. 181 190; y Weimbs y Stoffel. 1992. *Biochemistry* 31, págs. 12289 12296).

El término “axón” se refiere a una fibra alargada de una célula nerviosa responsable de conducir señales en el organismo.

Los términos “individuo”, “sujeto” y “paciente”, usados de manera intercambiable en el presente documento, se refieren a un mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, animales murinos, simios, humanos, animales de granja mamíferos, animales mamíferos para deportes y mascotas mamíferas. En realizaciones preferidas, el individuo es un humano.

Los términos “dosis” y “dosificación” se usan de manera intercambiable en el presente documento. Una dosis se refiere a la cantidad de principio activo administrada a un individuo en cada administración. La dosis variará dependiendo de varios factores, incluyendo la frecuencia de administración; el tamaño y la tolerancia del individuo; la gravedad del estado; el riesgo de efectos secundarios; y la vía de administración. Un experto en la técnica reconocerá que la dosis puede modificarse dependiendo de los factores anteriores o basándose en el progreso terapéutico. El término “forma de dosificación” se refiere al formato particular del producto farmacéutico, y depende de la vía de administración. Por ejemplo, una forma de dosificación puede estar en un líquido, por ejemplo, una

solución salina para inyección.

Una cantidad o dosis “terapéuticamente eficaz” o cantidad o dosis “suficiente/eficaz”, es una dosis que produce efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y podrá determinarse por un experto en la técnica usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Pickar, Dosage Calculations (1999); y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

El término “tratamiento” o “terapia” significa generalmente obtener un efecto fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en cuanto a prevenir completa o parcialmente una enfermedad o estado o síntoma del mismo y/o puede ser terapéutico en cuanto a una cura parcial o completa para una lesión, enfermedad o estado y/o mejora de un efecto adverso atribuible a la lesión, enfermedad o estado e incluye detener el desarrollo o provocar la regresión de una enfermedad o estado. El tratamiento también puede incluir el uso profiláctico para mitigar los efectos de la lesión, si se produce. Por ejemplo, en un aspecto, la presente divulgación incluye la administración previa para mitigar un daño antes de una cirugía que implica al sistema nervioso periférico. El tratamiento también puede referirse a cualquier retraso de la aparición, mejora de síntomas, mejora de la supervivencia del paciente, aumento de la tasa o el tiempo de supervivencia, etc. El efecto del tratamiento puede compararse con un individuo o combinación de individuos que no reciben el tratamiento.

En el presente documento se usa un “control”, se refiere a una referencia, habitualmente una referencia conocida, para su comparación con un grupo de experimentación. Un experto en la técnica entenderá qué controles son valiosos en una situación dada y será capaz de analizar datos basándose en comparaciones con valores de control. Los controles también son valiosos para determinar la significación de datos. Por ejemplo, si los valores para un parámetro dado varían ampliamente en los controles, la variación en muestras de prueba no se considerará significativa.

Antes de describir la presente invención en más detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a realizaciones particulares descritas, ya que, evidentemente, éstas pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es únicamente para el propósito de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitativa, dado que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor mencionado o intermedio en ese intervalo mencionado, queda abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y también están abarcados dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo mencionado. Cuando el intervalo mencionado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de esos límites incluidos también están incluidos en la invención.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o pruebas de la presente invención también puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, ahora se describen métodos y materiales ilustrativos representativos.

Todas las publicaciones y patentes citadas en esta memoria descriptiva describen los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones. La cita de cualquier publicación es por su divulgación antes de la fecha de presentación y no debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tenga derecho a anteceder a tal publicación debido a una invención previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden tener que confirmarse de manera independiente.

Se observa que, tal como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, se pretende que esta declaración sirva como base de antecedentes para el uso de terminología excluyente tal como “únicamente”, “sólo” en relación con la mención de los elementos de reivindicación, o el uso de una limitación “negativa”.

## II. NEUROPATÍAS PERIFÉRICAS DESMIELINIZANTES

La presente invención se define por las reivindicaciones.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que IgG policlonal puede aprovechar la capacidad regenerativa de las células de Schwann mediante estimulación de la maduración, diferenciación y producción de mielina de células de Schwann. De esta manera, la invención se dirige a un mecanismo de unificación de neuropatías periféricas desmielinizantes para proporcionar un tratamiento de amplio espectro para tales trastornos. Esta invención se dirige a neuropatías periféricas desmielinizantes provocadas por traumatismo físico.

Los trastornos desmielinizantes que pueden tratarse mediante la composición de IgG policlonal descrita en el presente documento incluyen, por ejemplo, neuropatías periféricas que se adquieren genéticamente, resultan a partir de una enfermedad sistémica o se inducen por una toxina o por traumatismo.

Las neuropatías desmielinizantes genéticas (también conocidas como neuropatías hereditarias) son una de las enfermedades neurológicas heredadas más comunes. Las neuropatías desmielinizantes genéticas se dividen en cuatro subcategorías principales: 1) neuropatía motora y sensitiva, 2) neuropatía sensitiva, 3) neuropatía motora, y 4) neuropatía sensitiva y autonómica. Específicamente, las neuropatías hereditarias desmielinizantes son con frecuencia neuropatías progresivas con una velocidad y conducción nerviosa notablemente disminuidas y desmielinización segmentaria crónica del nervio periférico. Gabreels-Festen *et al.*, "Hereditary demyelinating motor and sensory neuropathy", *Brain Pathol.* 3(2):135-146 (1993). Los ejemplos de clases generales de neuropatías desmielinizantes genéticas incluyen, pero no se limitan a, neuropatía diabética periférica, neuropatía sensorimotora distal o neuropatías autonómicas tales como motilidad reducida del tracto gastrointestinal o atonía de la vejiga urinaria. Los ejemplos de neuropatías periféricas hereditarias incluyen enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, abetalipoproteinemia, enfermedad de Tangier, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Fabry y síndrome de Dejerine-Sottas.

Las neuropatías periféricas desmielinizantes sistémicas surgen como efectos secundarios de una enfermedad sistémica. Los ejemplos no limitativos de neuropatías periféricas asociadas con enfermedad sistémica incluyen síndrome pospoliomielítico y neuropatía asociada con SIDA. Además, las siguientes enfermedades sistémicas no limitativas pueden tener síntomas de neuropatía periférica: cáncer, malnutrición, alcoholismo, diabetes, SIDA, enfermedad de Lyme, artritis reumatoide, insuficiencia renal crónica, trastornos autoinmunitarios, hipotiroidismo e infecciones virales (por ejemplo, hepatitis).

Las neuropatías periféricas desmielinizantes inducidas por toxina se provocan por exposición a agentes neurotóxicos tales como agentes farmacéuticos, agentes biológicos y exposición a productos químicos. Los ejemplos de toxinas que provocan neuropatías periféricas incluyen, pero no se limitan a, agentes quimioterápicos (por ejemplo, vincristina, paclitaxel, cisplatino, metotrexato o 3'-azido-3'-desoxitimidina), plomo, mercurio, talio, disolventes orgánicos, pesticidas, disulfuro de carbono, arsénico, acrilamida, toxina diftérica, alcohol, medicamentos anti-VIH (por ejemplo, didanosina y zalcitabina), medicamentos anti-tuberculosis (por ejemplo, isoniazida y etambutol), fármacos antimicrobianos (por ejemplo, dapsona, metronidazol, cloroquina y cloranfenicol), medicamentos psiquiátricos (por ejemplo, litio), radiación y medicamentos tales como amiodarona, aurotioglucosa, fenitoína, talidomida, colchicina, cimetidina, disulfiram, hidralazina y altos niveles de vitamina B6. Más adelante se indican agentes tóxicos adicionales que pueden provocar neuropatía periférica.

Las neuropatías periféricas desmielinizantes inducidas por traumatismo, tal como se describió anteriormente, están provocadas por choque corporal, lesión o traumatismo físico.

Por consiguiente, las causas de la neuropatía periférica varían ampliamente, por ejemplo, desde complicaciones diabéticas; traumatismo; toxinas incluyendo, sin limitación, fármacos y medicamentos, productos químicos industriales y toxinas medioambientales; respuesta autoinmunitaria; carencias nutricionales; hasta trastornos vasculares y metabólicos. Por ejemplo, pueden producirse neuropatías periféricas desmielinizantes como resultado de mieloma osteoesclerótico, neuropatía periférica asociada con proteína monoclonal, neuropatías periféricas motoras y sensitivas hereditarias tipos 1 y 3, y propensión hereditaria a parálisis por presión.

De manera similar, los síntomas de una neuropatía periférica desmielinizante también varían, por ejemplo, con el tipo de nervios afectados. Por ejemplo, un paciente humano que tiene un trastorno desmielinizante puede tener uno o más síntomas de un trastorno desmielinizante tales como, pero sin limitarse a, alteración de la visión, entumecimiento, debilidad en las extremidades, temblores o espasticidad, intolerancia al calor, alteración del habla, incontinencia, mareo o alteración de la propiocepción (por ejemplo, equilibrio, coordinación, sentido de posición de las extremidades). Un humano (por ejemplo, un paciente humano) con una historia familiar de un trastorno desmielinizante (por ejemplo, una predisposición genética para un trastorno desmielinizante), o que presenta síntomas leves o infrecuentes de un trastorno desmielinizante descritos anteriormente, puede considerarse, para los propósitos del método, en riesgo de desarrollar un trastorno desmielinizante.

Específicamente, el daño de nervios sensitivos provocado por una neuropatía periférica desmielinizante puede provocar una gama más compleja de síntomas porque los nervios sensitivos tienen una gama de funciones más amplia y más altamente especializada. Las fibras sensitivas más grandes encerradas en mielina (pliegues de membrana rica en lípidos que están enrollados en espiral y aíslan muchos nervios) perciben las vibraciones, el tacto ligero y el sentido de la posición. El daño a fibras sensitivas grandes reduce la capacidad para sentir vibraciones y

tacto, dando como resultado un sentido general de entumecimiento, especialmente en las manos y los pies. Muchos pacientes no pueden reconocer, sólo por el tacto, las formas de pequeños objetos o distinguir entre diferentes formas. Este daño de las fibras sensitivas puede contribuir a la pérdida de reflejos (como lo puede el daño de nervios motores). La pérdida de sentido de la posición hace con frecuencia que los individuos sean incapaces de coordinar movimientos complejos tales como andar o abrochar botones, o mantener su equilibrio cuando tienen los ojos cerrados. El dolor neuropático es difícil de controlar y puede afectar gravemente al bienestar emocional y a la calidad de vida global.

Las fibras sensitivas más pequeñas sin vainas de mielina transmiten sensaciones de dolor y temperatura. El daño a estas fibras puede interferir con la capacidad para sentir dolor o cambios de temperatura. Los individuos pueden no lograr sentir que se han lesionado por un corte o que una herida está infectándose. Otros pueden no detectar dolores que les alertan de un ataque cardíaco inminente u otros estados agudos. (La pérdida de sensación de dolor es un problema particularmente grave para individuos con diabetes, que contribuye a la alta tasa de amputaciones de extremidades inferiores entre esta población). Los receptores del dolor en la piel también pueden sensibilizarse en exceso, de modo que se percibe dolor intenso (alodinia) a partir de estímulos que normalmente son indoloros.

Los síntomas de daño de nervios autonómicos son diversos y dependen de qué órganos o glándulas se ven afectados. La disfunción de nervios autonómicos puede volverse potencialmente mortal y puede requerir atención médica de urgencias en casos en los que la respiración se ve afectada o cuando el corazón comienza a latir de manera irregular. Los síntomas habituales de daño de nervios autonómicos incluyen una incapacidad para sudar normalmente, lo cual puede conducir a intolerancia al calor; una pérdida de control de la vejiga, que puede provocar infección o incontinencia; y una incapacidad para controlar músculos que expanden o contraen vasos sanguíneos para mantener niveles de tensión arterial seguros. Una pérdida de control sobre la tensión arterial puede provocar mareo, aturdimiento o incluso desmayo cuando un individuo se mueve repentinamente de una posición sentada a una levantada (un estado conocido como hipotensión postural u ortostática).

Síntomas gastrointestinales acompañan con frecuencia a la neuropatía autonómica. Los nervios que controlan las contracciones de músculos intestinales con frecuencia funcionan mal, conduciendo a diarrea, estreñimiento o incontinencia. Los individuos también pueden experimentar dificultad para comer o tragar si determinados nervios autonómicos se ven afectados.

La composición de IgG policlonal de la divulgación también puede usarse para tratar neuropatía periférica desmielinizante que se desarrolla como complicación de la diabetes, es decir tipo I, tipo II. La neuropatía periférica es una de las principales complicaciones de la diabetes. Tanto una disminución de la velocidad de conducción nerviosa como un aumento de la resistencia al fallo de conducción provocado por isquemia se encuentran entre los cambios más tempranos detectados en pacientes diabéticos y modelos de animales de la enfermedad. Estudios ultraestructurales han demostrado cambios tanto en axones como en células de Schwann (SC) (por ejemplo, disminución del calibre de axón y desmielinización segmentaria) así como en la microvasculatura, todo lo cual parece desarrollarse de manera independiente. Algunos estudios concluyeron que la pérdida progresiva de fibras en nervios periféricos observada en la neuropatía diabética humana puede deberse, al menos en parte, a una degeneración de nervios retrasada y regeneración de nervios afectada. Las anomalías metabólicas y microvasculares, así como una carencia de neurotrofinas, se han considerado responsables de la patogénesis de la neuropatía diabética. Las alteraciones vasculares en la diabetes consisten principalmente en isquemia e hipoxia endoneural. Los mecanismos subyacentes a estas anomalías vasculares incluyen cambios degenerativos en las terminaciones de nervios simpáticos de vasos de los nervios, con la consiguiente alteración del control neuronal del torrente sanguíneo de nervios y una producción reducida de prostaciclina y óxido nítrico en los nervios.

Dos manifestaciones clínicas diferenciadas de neuropatía diabética son las representadas por pacientes que padecen polineuropatía simétrica dolorosa, y por pacientes con pies indoloros e insensibles. La neuropatía indolora es el trastorno prevalente y, según varios estudios, es probable que refleje el grado de degeneración de nervios. El síndrome doloroso, por otro lado, está asociado con menos anomalías morfológicas. Aunque también se ha propuesto que el síndrome doloroso puede reflejar la regeneración de nervios, en contraposición a la degeneración, varios informes sugieren que la regeneración de nervios se ve afectada en la diabetes. El análisis de varios índices funcionales en nervios sensitivos periféricos de roedores diabéticos sugiere una función deprimida, en vez de aumentada. Por ejemplo, la diabetes experimental induce varias respuestas nociceptivas incluyendo hiperalgesia térmica temprana que con el tiempo se convierte en hipoalgesia, hiperalgesia mecánica, alodinia térmica y táctil, actividad de fibras C aumentada y sensibilidad reducida a opioides. En este contexto, la hiperalgesia mecánica puede resultar de una activación aumentada tras una estimulación mecánica superior al umbral sostenida de fibras C.

Aunque terapias con antioxidantes, vasodilatadores y neurotrofinas pueden invertir algunas anomalías funcionales y metabólicas en nervios con diabetes, sólo dan como resultado una mejora parcial de la percepción del dolor anómala, lo que sugiere que intervienen otras rutas. La presente divulgación es capaz de fomentar la capacidad de cicatrización de las células de Schwann hacia el tratamiento de neuropatía diabética.

La composición de IgG policlonal de la divulgación también puede usarse para tratar neuropatía periférica

desmielinizante resultante de traumatismo. Una neuropatía “inducida por traumatismo” se refiere a daño en el sistema nervioso a partir de lesión física externa. La lesión o el traumatismo repentino, por ejemplo, en guerra, accidentes automovilísticos, caídas y actividades relacionadas con los deportes, pueden provocar que los nervios se corten, aplasten, compriman o estiren parcial o completamente, algunas veces de una manera tan forzada que se desprenden parcial o completamente de la médula espinal y dan como resultado la desmielinización. Traumatismos menos drásticos también pueden provocar grave daño nervioso.

La composición de IgG policlonal de la divulgación también puede usarse para tratar neuropatía periférica provocada por un agente tóxico. Las toxinas que producen neuropatía periférica pueden dividirse generalmente en tres grupos: fármacos y medicamentos; productos químicos industriales; y toxinas medioambientales. Tal como se usa en el presente documento, el término “agente tóxico” se define como cualquier sustancia que, mediante su acción química, altera la función normal de uno o más componentes del sistema nervioso periférico. La definición incluye agentes que se transportan por el aire, se ingieren como contaminante de alimentos o fármacos, o se toman deliberadamente como parte de un régimen terapéutico.

La lista de agentes tóxicos que pueden provocar neuropatía periférica incluye, pero no se limita a, 3'-azido-3'-desoxitimidina, acetazolamida, acrilamida, adriamicina, alcohol, cloruro de alilo, almitrina, amitriptilina, amiodarona, anfotericina, arsénico, aurotioglucosa, carbamatos, disulfuro de carbono, monóxido de carbono, carboplatino, cloranfenicol, cloroquina, colestiramina, cimetidina, cisplatino, cis-platino, cloquinol, colestipol, colchicina, colistina, cicloserina, citarabina, dapsona, ácido diclorofenoxiacético, didanosina; didesoxicitidina, didesoxiinosina, didesoxitimidina, dimetilaminopropionitrilo, disulfiram, docetaxel, doxorubicina, etambutol, etionamida, óxido de etileno, FK506 (tacrolimus), glutetimida, oro, hexacarbonos, hexano, anticonceptivos hormonales, hexametilolmelamina, hidralazina, hidroxicloraquina, imipramina, indometacina, plomo inorgánico, mercurio inorgánico, isoniazida, litio, metilmercurio, metformina, metotrexato, bromuro de metilo, metilhidrazina, metronidazol, misonidazol, metil N-butil cetona, nitrofurantoina, mostaza de nitrógeno, óxido nitroso, organofosfatos, ospolot, paclitaxel, penicilina, perhexilina, maleato de perhexilina, fenitoína, platino, bifenilos policlorados, primidona, procainamida, procarbazina, piridoxina, simvastatina, cianato de sodio, estreptomycin, sulfonamidas, suramina, tamoxifeno, talidomida, talio, tolueno, triamtereno, trimetilestaño, fosfato de triortocresilo, L-triptófano, vacor, alcaloides de la vinca, vincristina, vindesina, megadosis de vitamina A, megadosis de vitamina D, zalcitamina, zimeldina; agentes industriales, especialmente disolventes; metales pesados; y esnifar pegamento u otros compuestos tóxicos.

La composición de IgG policlonal de la divulgación también puede usarse para tratar neuropatía periférica desmielinizante resultante de la administración de quimioterapias para terapia contra el cáncer. Entre las quimioterapias que se sabe que provocan neuropatía periférica se encuentran vincristina, vinblastina, cisplatino, paclitaxel, procarbazina, didesoxiinosina, citarabina, interferón alfa y 5-fluorouracilo (véase Macdonald, Neurologic Clinics 9: 955-967 (1991)).

### III. DIAGNÓSTICO Y MONITORIZACIÓN DE NEUROPATÍAS PERIFÉRICAS DESMIELINIZANTES

El diagnóstico de la neuropatía periférica desmielinizante puede realizarse por un médico o clínico usando uno o más métodos conocidos en la técnica. Normalmente se requiere una exploración neurológica e implica recopilar una historia del paciente (incluyendo los síntomas del paciente, entorno de trabajo, hábitos sociales, exposición a cualquier toxina, historia de alcoholismo, riesgo de VIH u otra enfermedad infecciosa, e historia familiar de enfermedad neurológica), realizar pruebas que pueden identificar la causa del trastorno neuropático, y llevar a cabo pruebas para determinar el alcance, sitio y tipo de daño nervioso.

Una exploración física general y pruebas relacionadas pueden revelar la presencia de una enfermedad sistémica que provoca daño nervioso. Análisis de sangre pueden detectar diabetes, carencias de vitaminas, disfunción hepática o renal, otros trastornos metabólicos, y signos de actividad anómala del sistema inmunitario. Una exploración de líquido cefalorraquídeo que rodea al cerebro y a la médula espinal puede revelar anticuerpos anómalos asociados con neuropatía. Pruebas más especializadas pueden revelar otras enfermedades de la sangre o cardiovasculares, trastornos del tejido conjuntivo o tumores malignos. Pruebas de la fuerza muscular, así como evidencias de calambres o fasciculaciones, indican implicación de fibra motora. La evaluación de la capacidad de un paciente para percibir vibraciones, tacto ligero, posición corporal, temperatura y dolor revela daño de nervios sensitivos y puede indicar si están afectadas fibras de nervios sensitivos pequeñas o grandes.

Basándose en los resultados de la exploración neurológica, exploración física, historia del paciente y cualquier examen o prueba anterior, pueden pedirse pruebas adicionales para ayudar a determinar la naturaleza y el alcance de la neuropatía. Las tecnologías a modo de ejemplo para ayudar en el diagnóstico de neuropatías periféricas incluyen: exploración por tomografía computerizada, obtención de imágenes por resonancia magnética, electromiografía, velocidad de conducción nerviosa, biopsia de nervios o biopsia de piel. Los aparatos útiles en el diagnóstico de neuropatías periféricas incluyen, sin limitación, la patente estadounidense n.º 7.854.703.

La tomografía computerizada, o exploración TC, es un procedimiento indoloro, no invasivo, usado para producir imágenes bidimensionales, claras y rápidas de órganos, huesos y tejidos. Se hacen pasar rayos X a través del

organismo a diversos ángulos y se detectan mediante un escáner computerizado. Los datos se procesan y se visualizan como imágenes en sección transversal, o “cortes”, de la estructura interna del organismo u órgano. Las exploraciones por TC neurológicas pueden detectar irregularidades óseas y vasculares, determinados quistes y tumores cerebrales, hernias discales, encefalitis, estenosis espinal (estrechamiento del canal espinal) y otros trastornos.

La obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) puede examinar la calidad y el tamaño de los músculos, detectar cualquier sustitución grasa de tejido muscular y determinar si una fibra nerviosa ha experimentado daño por compresión. Los equipos de IRM crean un fuerte campo magnético alrededor del organismo. Después se hacen pasar ondas de radio a través del organismo para provocar una señal de resonancia que puede detectarse a diferentes ángulos dentro del organismo. Un ordenador procesa esta resonancia para dar o bien una imagen tridimensional o bien un “corte” bidimensional de la zona explorada.

La electromiografía (EMG) implica insertar una aguja fina en un músculo para comparar la cantidad de actividad eléctrica presente cuando los músculos están en reposo y cuando se contraen. Las pruebas de EMG pueden ayudar a distinguir entre trastornos musculares y nerviosos.

Las pruebas de velocidad de conducción nerviosa (VCN) pueden medir con precisión el grado de daño en fibras nerviosas más grandes, revelando si los síntomas están provocándose por degeneración de la vaina de mielina o del axón. Durante esta prueba, una sonda estimula eléctricamente una fibra nerviosa, que responde generando su propio impulso eléctrico. Un electrodo colocado a mayor distancia a lo largo de la ruta del nervio mide la velocidad de la transmisión de impulso a lo largo del axón. Tasas de transmisión lentas y bloqueo de impulsos tienden a indicar daño en la vaina de mielina, mientras que una reducción de la intensidad de impulsos es un signo de degeneración axonal.

La biopsia de nervios implica extirpar y examinar una muestra de tejido nervioso, lo más habitualmente de la pierna. Aunque esta prueba puede proporcionar información valiosa sobre el grado de daño nervioso, es un procedimiento invasivo que es difícil de realizar y puede provocar en sí mismo efectos secundarios neuropáticos.

La biopsia de piel es una prueba en la que los médicos extirpan una muestra de piel delgada y examinan las terminaciones de fibras nerviosas. A diferencia de la VCN, puede revelar daño presente en fibras más pequeñas; a diferencia de la biopsia de nervios convencional, la biopsia de piel es menos invasiva, tiene menos efectos secundarios y es más fácil de realizar.

En la técnica se conocen métodos de monitorización de un individuo para detectar desmielinización o remielinización. Monitorizar a un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) para detectar remielinización, tal como se define en el presente documento, significa evaluar al sujeto para detectar un cambio, por ejemplo, una mejora de uno o más parámetros que son indicativos de remielinización, por ejemplo, puede monitorizarse la mejora de uno o más síntomas de un trastorno desmielinizante. Tales síntomas incluyen cualquiera de los síntomas de un trastorno desmielinizante descrito en el presente documento. La remielinización también puede monitorizarse mediante métodos que incluyen la determinación directa del estado de mielina en el sujeto, por ejemplo, puede medirse la masa de sustancia blanca usando obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) o medirse el grosor de fibras de mielina usando una exploración cerebral por espectroscopía de resonancia magnética (ERM).

En algunas realizaciones, la evaluación se realiza al menos 1 hora, por ejemplo, al menos 2, 4, 6, 8, 12, 24 ó 48 horas, o al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11, días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días o 20 días o más, o al menos 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 12 semanas, 13 semanas, 14 semanas, 15 semanas, 16 semanas, 17 semanas, 18 semanas, 19 semanas, 20 semanas o más, o cualquier combinación de los mismos, tras una administración, preferiblemente la primera administración, de la IgG policlonal. Puede evaluarse al sujeto en uno o más de los siguientes periodos: antes del comienzo del tratamiento; durante el tratamiento; o tras haberse administrado uno o más elementos del tratamiento. La evaluación puede incluir evaluar la necesidad de tratamiento adicional, por ejemplo, evaluar si debe alterarse una dosificación, frecuencia de administración o duración de tratamiento. También puede incluir evaluar la necesidad de añadir o abandonar una modalidad terapéutica seleccionada, por ejemplo, añadir o abandonar cualquiera de los tratamientos para trastornos desmielinizantes descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede continuarse la administración de la IgG policlonal con uno o más agentes terapéuticos adicionales cuando sea necesario. En una realización preferida, si se obtiene un desenlace previamente seleccionado de la evaluación, se toma una medida adicional, por ejemplo, se administra al sujeto otro tratamiento o se realiza otra evaluación o prueba. Puede usarse el nivel de remielinización para realizar una determinación sobre el cuidado de un paciente, por ejemplo, una selección o modificación de un ciclo de tratamiento o la decisión de un tercero de reembolsar el tratamiento.

En algunas realizaciones, monitorizar a un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) para detectar remielinización también puede incluir monitorizar para detectar una reducción del tamaño o número de lesiones inflamatorias (es decir, esclerosis) usando, por ejemplo, exploraciones de obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM), exploraciones de tomografía por emisión de positrones (TEP), obtención de imágenes ponderada por difusión (I-PD,

o IRM-PD), obtención de imágenes de tensor de difusión, mielografía, transferencia de magnetización. En algunas realizaciones, monitorizar a un sujeto para detectar remielinización puede incluir la detección, por ejemplo, de (i) proteínas anómalas tales como fragmentos diminutos de mielina, (ii) niveles elevados o tipos específicos de linfocitos, y/o (iii) niveles anómalos de moléculas de inmunoglobulina (IgG). En otras realizaciones, monitorizar a un sujeto para detectar remielinización puede incluir la evaluación de un cambio en la neuropsicología del sujeto (por ejemplo, el estado de diversas capacidades tales como memoria, aritmética, atención, criterio y razonamiento). En algunas realizaciones, la monitorización de un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) para detectar remielinización puede implicar analizar la orina de un paciente para detectar una disminución de niveles de material de tipo proteína básica de mielina (material de tipo MBP), sustancia que se eleva a medida que se produce daño axonal durante la progresión de la enfermedad. En algunas realizaciones, en las que el trastorno desmielinizante afecta a los ojos o la visión de un sujeto, la monitorización de un sujeto para detectar remielinización puede implicar realizar pruebas para detectar mejoras, por ejemplo, en el daltonismo.

En el presente documento se proporcionan métodos de evaluación de un sujeto, para determinar, por ejemplo, si un sujeto está respondiendo o no está respondiendo a un tratamiento para un trastorno desmielinizante, por ejemplo, una terapia que aumenta la remielinización en un sujeto tal como administrar una IgG policlonal. El método incluye proporcionar un valor de referencia (por ejemplo, un valor previo a la administración) para el nivel o estado de mielina en el sujeto, y opcionalmente, administrar al sujeto un medicamento que aumenta la remielinización (por ejemplo, una IgG policlonal). En realizaciones en las que se administra un medicamento, el método también incluye proporcionar un valor tras la administración para el nivel o estado de mielina en el sujeto (por ejemplo, el nivel o estado de mielina tras la administración de una terapia de remielinización) y comparar el valor tras la administración con el valor de referencia, evaluando así al sujeto, por ejemplo, determinando si el sujeto está respondiendo o no está respondiendo a la terapia. El valor tras la administración (es decir, el valor correspondiente al estado o nivel de mielina en un sujeto tras una terapia de remielinización) puede determinarse, por ejemplo, mediante cualquiera de los métodos de evaluación descritos en el presente documento. El valor de referencia (es decir, el estado o nivel de mielina en un sujeto antes del tratamiento con una terapia de remielinización) también puede determinarse, por ejemplo, mediante cualquiera de los métodos de evaluación descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, una determinación de que un sujeto está respondiendo indica que puede/debe administrarse/se administrará/se administra una duración de tratamiento más corta al sujeto (por ejemplo, más corta que el tratamiento que se recomienda para un sujeto que no está respondiendo a una terapia, o una duración más corta que la actualmente usada con terapias existentes para trastornos desmielinizantes), y opcionalmente, se introduce esa indicación en un registro.

En algunas realizaciones, una determinación de que un sujeto está respondiendo indica que una duración de tratamiento más corta está contraindicada para el sujeto (por ejemplo, una duración más corta que la actualmente usada con tratamientos existentes para trastornos desmielinizantes, por ejemplo, cualquiera de los tratamientos para trastornos desmielinizantes descritos en el presente documento), y opcionalmente, se introduce esa indicación en un registro.

En algunas realizaciones, proporcionar una comparación del valor tras la administración con un valor de referencia incluye: proporcionar una determinación de un nivel de mielina tras la administración en un sujeto en un primer punto de tiempo (por ejemplo, en el que el primer punto de tiempo es de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más días (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 8 o más semanas (por ejemplo, 3, 4, 6, 12 o más meses))) tras el comienzo de administración de la terapia de remielinización (por ejemplo, IgG policlonal); proporcionar una determinación de un valor de referencia del estado o nivel de mielina en el sujeto en un segundo punto de tiempo que es previo al primer punto de tiempo (por ejemplo, en el que el segundo punto de tiempo es previo a, o está dentro del plazo de aproximadamente 1, 2, 3, 4 ó 5 días desde el comienzo de, la administración de una terapia de remielinización (por ejemplo, IgG policlonal); y proporcionar una comparación del nivel tras la administración y el valor de referencia de la mielina de un sujeto, en el que niveles aumentados de mielina en un sujeto (por ejemplo, los niveles difieren en no más de aproximadamente el 60%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 2% o aproximadamente el 1%) entre el nivel tras la administración y el valor de referencia indica que el sujeto está respondiendo.

En algunas realizaciones, la determinación de si un paciente está respondiendo a una terapia se realiza evaluando al sujeto para detectar un cambio, una mejora, de uno o más parámetros que son indicativos de remielinización, por ejemplo, puede monitorizarse una mejora de uno o más síntomas de un trastorno desmielinizante. Tales síntomas incluyen cualquiera de los síntomas de un trastorno desmielinizante descritos en el presente documento. También puede monitorizarse la remielinización mediante métodos que incluyen la determinación directa del estado de mielina en el sujeto, por ejemplo, puede medirse la masa de sustancia blanca usando obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM), medirse el grosor de fibras de mielina usando una exploración cerebral por espectroscopía de resonancia magnética (ERM) o cualquier otra medición directa descrita en el presente documento.

En otra realización, la determinación de si un paciente está respondiendo a una terapia también puede evaluarse mediante cualquier otra evaluación o indicios descritos en el presente documento, incluyendo, pero sin limitarse a,

monitorizar a un paciente para detectar una reducción del tamaño o número de lesiones inflamatorias (es decir, esclerosis) presentes en el paciente; monitorizar el líquido endoneural de un paciente para detectar una reducción de la presencia o cantidad, por ejemplo, de (i) niveles elevados o tipos específicos de linfocitos, y/o (ii) niveles anómalos de moléculas de inmunoglobulina (IgG); monitorizar a un paciente para detectar un cambio positivo en la neuropsicología (por ejemplo, el estado de diversas capacidades tales como memoria, aritmética, atención, criterio y razonamiento); y/o monitorizar la orina de un paciente para detectar una disminución de los niveles de material de tipo proteína básica de mielina (material de tipo MBP).

En algunas realizaciones, una mejora de al menos el 5% (por ejemplo, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%) en uno o más síntomas de un trastorno desmielinizante u otros indicios anteriormente descritos tras una terapia de remielinización (por ejemplo, una terapia que induce remielinización en un sujeto, por ejemplo, una terapia tal como una IgG policlonal) es suficiente para clasificar al paciente como que responde a una terapia.

#### IV. PREPARACIÓN DE IgG POLICLONAL

Las preparaciones de inmunoglobulina según la presente invención tal como se definen en reivindicación 1 pueden prepararse a partir de cualquier material de partida adecuado. Por ejemplo, pueden prepararse preparaciones de inmunoglobulina a partir de suero de donante o inmunoglobulinas monoclonales o recombinantes. En un ejemplo típico, se extrae sangre de donantes sanos. Habitualmente, la sangre se extrae de la misma especie de animal que el sujeto al que se le va a administrar la preparación de inmunoglobulina (denominadas normalmente inmunoglobulinas "homólogas"). Las inmunoglobulinas se aíslan de la sangre y se purifican mediante uno o más procedimientos adecuados, tales como, por ejemplo, fraccionamiento de Cohn, ultracentrifugación, preparación electroforética, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmutafinidad, fraccionamiento con polietilenglicol, fraccionamiento con alcohol, nanofiltración, ultrafiltración/diafiltración o similares. (Véase, por ejemplo, Cohn *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 68:459-75 (1946); Oncley *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 71:541-50 (1949); Barundem *et al.*, Vox Sang. 7:157-74 (1962); Koblet *et al.*, Vox Sang. 13:93-102 (1967); Teschner *et al.* Vox Sang (92):42-55 (2007); Hoppe *et al.* Munch Med Wochenschr (34): 1749-1752 (1967), Falksveden (patente sueca n.º 348942); Tanaka *et al.*, Braz J Med Biol Res (33)37-30 (2000); Lebing *et al.*, Vox Sang (84):193-201 (2003); patentes estadounidenses n.ºs 5.122.373 y 5.177.194; documento PCT/US2010/036470; y documento PCT/US2011/038247).

Para inactivar diversos contaminantes virales presentes en productos derivados de plasma, puede someterse el filtrado de PptG aclarado a un tratamiento con disolvente/detergente (S/D). En la técnica se conocen bien métodos para el tratamiento con detergente de fracciones derivadas de plasma (para una revisión, véase Pelletier JP *et al.*, Best Pract Res Clin Haematol. 2006; 19(1):205-42). Generalmente, puede usarse cualquier tratamiento con S/D convencional junto con los métodos proporcionados en el presente documento.

Para purificar y concentrar adicionalmente IgG, puede emplearse cromatografía de intercambio catiónico y/o de intercambio aniónico. En la técnica se conocen bien métodos para purificar y concentrar IgG usando cromatografía de intercambio iónico. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.886.154 describe un método en el que se extrae un precipitado de fracción II+III a pH bajo (entre aproximadamente 3,8 y 4,5), seguido por precipitación de IgG usando ácido caprílico, y finalmente implementación de dos etapas de cromatografía de intercambio aniónico. La patente estadounidense n.º 6.069.236 describe un esquema de purificación de IgG por cromatografía que no se basa en precipitación con alcohol en absoluto. La publicación PCT n.º WO 2005/073252 describe un método de purificación de IgG que implica la extracción de un precipitado de fracción II+III, tratamiento con ácido caprílico, tratamiento con PEG y una única etapa de cromatografía de intercambio aniónico. La patente estadounidense n.º 7.186.410 describe un método de purificación de IgG que implica la extracción de un precipitado de fracción I+II+III o fracción II seguido por una única etapa de intercambio aniónico realizada a un pH alcalino. La patente estadounidense n.º 7.553.938 describe un método que implica la extracción de un precipitado de fracción I+II+III o fracción II+III, tratamiento con caprilato y o bien una o bien dos etapas de cromatografía de intercambio aniónico. La patente estadounidense n.º 6.093.324 describe un método de purificación que comprende el uso de una resina de intercambio aniónico macroporosa realizado a un pH de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 6,6. La patente estadounidense n.º 6.835.379 describe un método de purificación que se basa en cromatografía de intercambio catiónico en ausencia de fraccionamiento con alcohol.

Para reducir la carga viral de una composición de IgG proporcionada en el presente documento, la composición puede someterse a nanofiltración usando un dispositivo de nanofiltración adecuado. En determinadas realizaciones, el dispositivo de nanofiltración tendrá un tamaño de poro medio de entre aproximadamente 15 nm y aproximadamente 200 nm. Los ejemplos de nanofiltros adecuados para este uso incluyen, sin limitación, DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP, Viresolve NFR (Millipore), Planova 15N, 20N, 35N y 75N (Planova). En una realización específica, el nanofiltro puede tener un tamaño de poro medio de entre aproximadamente 15 nm y aproximadamente 72 nm, o entre aproximadamente 19 nm y aproximadamente 35 nm, o de aproximadamente 15 nm, 19 nm, 35 nm o 72 nm. En una realización preferida, el nanofiltro tendrá un tamaño de poro medio de aproximadamente 35 nm, tal como un filtro Asahi PLANOVA 35N o equivalente del mismo. En una realización particular, la composición de IgG recuperada a partir de la etapa de intercambio aniónico se somete a nanofiltración

usando un nanofiltro que tiene un tamaño de poro de entre 30 nm y 40 nm, preferiblemente de 35±2 nm. En otra realización preferida, el nanofiltro tendrá un tamaño de poro medio de aproximadamente 19 ó 20 nm, tal como un filtro Asahi PLANOVA 20N (19±2 nm) o equivalente del mismo. En una realización particular, la composición de IgG recuperada a partir de la etapa de intercambio aniónico se somete a nanofiltración usando un nanofiltro que tiene un tamaño de poro de entre 15 nm y 25 nm, preferiblemente de 19±2 nm.

En determinadas realizaciones, se prepara inmunoglobulina a partir de productos que contienen gamma globulina producidos mediante los métodos de fraccionamiento con alcohol y/o cromatografía de afinidad e intercambio iónico bien conocidos por los expertos en la técnica. Habitualmente se usa fracción II de Cohn purificada. La pasta de fracción II de Cohn de partida es normalmente IgG a aproximadamente el 95 por ciento y está compuesta por los cuatro subtipos de IgG. Los diferentes subtipos están presentes en la fracción II aproximadamente en la misma proporción que en la que se encuentran en el plasma humano combinado a partir del cual se obtienen. La fracción II se purifica adicionalmente antes de la formulación para dar un producto administrable. Por ejemplo, la pasta de fracción II puede disolverse en una disolución alcohólica acuosa purificada en frío y retirarse impurezas mediante precipitación y filtración. Tras la filtración final, puede dializarse o diafiltrarse la suspensión de inmunoglobulina (por ejemplo, usando membranas de ultrafiltración que tienen un límite de peso molecular nominal de menos de o igual a 100.000 Dalton) para eliminar el alcohol. La disolución puede concentrarse o diluirse para obtener la concentración de proteína deseada y puede purificarse adicionalmente mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica.

Pueden usarse etapas preparativas para enriquecer un isotipo o subtipo particular de inmunoglobulina. Por ejemplo, puede usarse cromatografía con Sepharose de proteína A, proteína G o proteína H para enriquecer una mezcla de inmunoglobulinas para IgG, o para subtipos de IgG específicos. (Véase generalmente Harlow y Lane, *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999); Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); patente estadounidense n.º 5.180.810).

También pueden usarse fuentes comerciales de inmunoglobulinas policlonales. Tales fuentes incluyen, pero no se limitan a: Kiovig® IVIG al 10% (Baxter Healthcare); Gammagard Liquid® IVIG al 10% (Baxter Healthcare); Gammagard S/D® (Baxter Healthcare); Gammagard S/D® con menos de 1 mg/ml de IgA en una disolución al 5% (Baxter Healthcare); Gamunex®-C, al 10% (Grifols USA); Flebogamma®, DIF al 5% y al 10% (Grifols USA); Privigen® disolución al 10% (CSL Behring); Carimune® NF o Sandoglobulin® (CSL Behring); y Hizentra® líquido al 20% (CSL Behring); Octagam®, IVIG al 5% y al 10% (Octapharma AG); Gammanorm® SCIG al 16,5% (Octapharma AG). La fuente comercial de preparación de inmunoglobulina para su uso en los métodos de la presente divulgación no es crítica.

Un enfoque alternativo es usar fragmentos de anticuerpos con capacidad de unión a antígeno, por ejemplo, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv y rIgG. Véase, por ejemplo, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Kuby, J., *Immunology*, 3ª ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York (1998). La composición de IgG policlonal de la divulgación puede incluir fragmentos de un isotipo de inmunoglobulina, es decir IgG, o puede contener una mezcla de fragmentos de inmunoglobulina de diferentes isotipos (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG y/o IgM). La preparación de Fc también puede contener predominantemente (al menos el 60%, al menos el 75%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99%) fragmentos a partir del isotipo de inmunoglobulina IgG, y puede contener cantidades menores de los otros subtipos. Por ejemplo, una preparación de Fc puede contener al menos fragmentos de IgG a al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95% o al menos aproximadamente el 99%. Además, la preparación de IgG policlonal puede comprender un único subtipo de IgG o una mezcla de dos o más de los subtipos de IgG. Los subtipos de IgG adecuados incluyen IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En una realización específica, la preparación de IgG policlonal comprende fragmentos de IgG1.

Pueden escindirse inmunoglobulinas en cualquier momento adecuado durante la preparación para proporcionar fragmentos Fab, F(ab') y/o F(ab')<sub>2</sub>, según sea aplicable. Una enzima adecuada para la escisión es, por ejemplo, papaína, pepsina o plasmina. (Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999); Plan y Makula, *Vox Sanguinis* 28:157-75 (1975)). Tras la escisión, las porciones de Fc pueden separarse de los fragmentos Fab, F(ab') y/o F(ab')<sub>2</sub>, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel o similares. En un ejemplo específico, se digieren inmunoglobulinas con papaína para separar el fragmento Fc de los fragmentos Fab. Después se somete la mezcla de digestión a cromatografía de intercambio catiónico para separar los fragmentos Fc de los fragmentos Fab.

También pueden prepararse fragmentos de inmunoglobulina a partir de hibridomas u otro sistema de cultivo que expresan anticuerpo monoclonal. (Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-97 (1975); Hagiwara y Yuasa, *Hum. Antibodies Hybridomas* 4:15-19 (1993); Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4:72 (1983); Cole *et al.*, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96 (1985)). Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, a partir de hibridomas humanos (véase, por ejemplo, Cote *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-30 (1983)) o transformando células B humanas con virus VEB *in vitro* (véase, por ejemplo, Cole *et al.*, citado anteriormente). Pueden purificarse anticuerpos monoclonales producidos a partir de hibridomas y separarse los fragmentos Fc a partir de los fragmentos Fab, F(ab') y/o F(ab')<sub>2</sub> tal como se describe en el presente

documento o tal como conoce el experto en la técnica.

También pueden producirse fragmentos IgG de manera recombinante, tal como a partir de sistemas de cultivo de células eucariotas. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) de manera recombinante mediante células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con un vector que contiene una secuencia de ADN que codifica para los fragmentos Fv. Se describen métodos para crear tales células de mamífero recombinantes, por ejemplo, en Sambrook y Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press (Nueva York) 2001) y Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology*, 4ª ed. (John Wiley & Sons, Inc. (Nueva York) 1999) y los conoce el experto en la técnica. También pueden producirse fragmentos de inmunoglobulina recombinantes en otras líneas celulares de mamífero, tales como células de riñón de cría de hámster (BHK). En la técnica también se conocen métodos de cultivo de células recombinantes para producir proteínas recombinantes.

Puede usarse una variedad de otros sistemas de expresión para expresar fragmentos de inmunoglobulinas IgG recombinantes. Estos incluyen, pero no se limitan a, sistemas de células de insecto y microorganismos tales como levaduras o bacterias que se han transfectado o transformado con un casete de expresión que codifica para el fragmento de IgG deseado. En determinadas realizaciones, el microorganismo puede modificarse opcionalmente por ingeniería para reproducir patrones de glicosilación de fragmentos de IgG de mamífero o humana.

En determinadas realizaciones, pueden usarse etapas preparativas adicionales con el fin de hacer que una preparación de inmunoglobulina sea segura para su uso en los métodos según la presente divulgación. Tales etapas pueden incluir, por ejemplo, tratamiento con disolvente/detergente, pasteurización y esterilización. Pueden usarse etapas preparativas adicionales con el fin de garantizar la seguridad de una preparación de IgG policlonal. Tales etapas preparativas pueden incluir, por ejemplo, hidrólisis enzimática, modificación química mediante reducción y alquilación, sulfonación, tratamiento con B-propiolactona, tratamiento a pH bajo, o similares. También pueden encontrarse descripciones de métodos adecuados, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 4.608.254; 4.687.664; 4.640.834; 4.814.277; 5.864.016; 5.639.730 y 5.770.199; Romer *et al.*, *Vox Sang.* 42:62-73 (1982); Romer *et al.*, *Vox Sang.* 42:74-80 (1990); y Rutter, *J. Neurosurg. Psychiat.* 57 (Sup.): 2-5 (1994).

#### V. Composiciones farmacéuticas y dosificaciones

Un individuo en el que la administración de la IgG policlonal tal como se expone en el presente documento es un régimen terapéutico eficaz para neuropatía periférica desmielinizante, es preferiblemente un humano, pero puede ser cualquier mamífero. Por tanto, tal como puede apreciar fácilmente un experto habitual en la técnica, los métodos y las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación son particularmente adecuados para la administración a cualquier mamífero, e incluyendo, pero sin limitarse de ningún modo a, animales domésticos, tales como sujetos felinos o caninos, animales de granja, tales como, pero sin limitarse a, sujetos bovinos, equinos, caprinos, ovinos y porcinos, animales salvajes (ya sea en la naturaleza o en un zoológico), animales para investigación, tales como ratones, ratas, conejos, cabras, ovejas, cerdos, perros, gatos, etc., es decir, para uso médico veterinario.

Se contempla que una composición farmacéutica que comprende IgG policlonal puede administrarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. La vía y/o el modo de administración varían dependiendo de los resultados deseados, pero normalmente será intravenosa, intramuscular, intranasal, intraperitoneal, intraarterial o subcutánea. La composición farmacéutica puede incluir un portador aceptable adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión).

La IgG policlonal de esta invención tal como se define en las reivindicaciones es útil para administración local o sistémica para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Los modos de administración a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, administración transdérmica, subcutánea, intraarterial, intravenosa, intranasal, intramuscular, rectal, bucal y oral. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una variedad de formas de dosificación unitarias dependiendo del método de administración. Por ejemplo, las formas de dosificación unitarias incluyen polvo, comprimidos, pastillas, cápsulas, supositorios, ampollas y pastillas para chupar. Sólo es necesario que el principio activo constituya una cantidad eficaz, es decir, de tal manera que una dosificación eficaz adecuada será compatible con la forma de dosificación empleada en dosis unitarias individuales o múltiples. Las dosificaciones individuales exactas, así como dosificaciones diarias, se determinarán, evidentemente, según principios médicos convencionales bajo la dirección de un médico o veterinario. Las composiciones farmacéuticas de inmunoglobulina IgG policlonal, cuando se administran por vía oral, se protegen preferiblemente frente a la digestión. Esto se logra normalmente o bien complejando los anticuerpos con una composición para volverlos resistentes a hidrólisis ácida y enzimática o bien empaquetando los anticuerpos en un portador resistente de manera apropiada tal como una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat *et al.*, en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, en la misma referencia, págs. 317-327; véase generalmente la misma referencia). En la técnica se conocen bien medios de protección de proteínas frente a la digestión.

Las composiciones farmacéuticas de esta divulgación son particularmente útiles para administración parenteral, tal

como administración intravenosa o administración en una cavidad corporal o luz de un órgano. Las composiciones para la administración comprenderán habitualmente una composición de IgG policlonal con un portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un portador acuoso. Puede usarse una variedad de portadores acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada.

5 Los diluyentes que pueden usarse en composiciones farmacéuticas (por ejemplo, granulados) que contienen el compuesto activo adaptadas para formarse en comprimidos, grageas, cápsulas y patillas incluyen los siguientes: (a) cargas y extendedores, por ejemplo, almidón, azúcares, manitol y ácido silícico; (b) agentes aglutinantes, por ejemplo, carboximetilcelulosa y otros derivados de celulosa, alginatos, gelatina y polivinilpirrolidona; (c) agentes humectantes, por ejemplo, glicerol; (d) agentes disgregantes, por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio y bicarbonato de sodio; (e) agentes para retardar la disolución, por ejemplo, parafina; (f) aceleradores de la resorción, por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario; (g) agentes tensioactivos, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerol; (g) portadores de adsorción, por ejemplo, caolín y bentonita; (i) lubricantes, por ejemplo, talco, calcio y estearato de magnesio y polietilenglicoles sólidos. Los diluyentes que van a usarse en composiciones farmacéuticas adaptadas para formarse en supositorios pueden ser, por ejemplo, los diluyentes solubles en agua habituales, tales como polietilenglicoles y grasas (por ejemplo, manteca de cacao y ésteres superiores, [por ejemplo, alcohol C<sub>14</sub> con ácido graso C<sub>16</sub>]) o mezclas de estos diluyentes.

20 Las composiciones farmacéuticas de la divulgación son estériles y generalmente están libres de materia no deseable. Para administración parental, las disoluciones y suspensiones deben ser estériles, por ejemplo, agua o aceite de cacahuete contenido en ampollas y, si es apropiado, isotónicas con la sangre. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes de tamponamiento y ajuste del pH, agentes de ajuste de la toxicidad, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio. La concentración de la IgG policlonal en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente basándose en volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal del paciente según el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente.

30 Puede mantenerse una fluidez apropiada de la composición, por ejemplo, mediante el uso de recubrimiento tal como lecitina, mediante mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En algunos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares tales como sacarosa, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. También pueden emplearse estabilizadores tales como nicotinamida, L-prolina, L-glicina o L-isoleucina. La absorción a largo plazo de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

40 Las composiciones farmacéuticas que son suspensiones pueden contener los diluyentes habituales, tales como diluyentes líquidos, por ejemplo, agua, alcohol etílico, propilenglicol, agentes tensioactivos (por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitoles y ésteres de sorbitano), celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y goma tragacanto, o mezclas de los mismos.

45 Las composiciones farmacéuticas también pueden contener agentes colorantes y conservantes, así como perfumes y adiciones aromatizantes (por ejemplo, aceite de menta y aceite de eucalipto), y agentes edulcorantes (por ejemplo, sacarina y aspartamo).

Las composiciones farmacéuticas contendrán generalmente desde el 0,5 hasta el 90% del principio activo en peso de la composición total.

50 Además de los anticuerpos monoclonales, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos también pueden contener otros compuestos farmacéuticamente activos, por ejemplo, esteroides, agentes antiinflamatorios o similares.

55 Cualquier diluyente en los medicamentos de la presente divulgación puede ser cualquiera de los mencionados anteriormente en relación con las composiciones farmacéuticas. Tales medicamentos pueden incluir disolventes de peso molecular inferior a 200 como único diluyente.

60 Pueden prepararse composiciones farmacéuticas de la divulgación según métodos bien conocidos y puestos en práctica de manera rutinaria en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20<sup>a</sup> ed., 2000; y Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978. Las composiciones farmacéuticas se fabrican preferiblemente en condiciones de BPF. Normalmente, en las composiciones farmacéuticas de la divulgación se emplea una dosis eficaz o dosis terapéuticamente eficaz de la preparación de inmunoglobulina. La composición farmacéutica puede formularse para dar formas de dosificación mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas

a lo largo del tiempo o puede reducirse o aumentarse proporcionalmente la dosis según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Puede resultar ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. Forma unitaria de dosificación tal como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que van a tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido.

Los niveles de dosificación reales pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular sin ser tóxica para el paciente. Un médico puede iniciar dosis de la composición farmacéutica a niveles inferiores al requerido para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logra el efecto deseado. En general, las dosis eficaces varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo la enfermedad o el estado específico que va a tratarse, su gravedad, estado fisiológico del paciente, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico.

La composición de IgG policlonal puede administrarse en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser cada día, cada semana, cada dos semanas, cada 3 semanas, cada 4 semanas, cada mes o cada año. Los intervalos también pueden ser irregulares, según se indique midiendo el progreso terapéutico en el paciente. La dosificación y frecuencia pueden variar dependiendo de la semivida de los anticuerpos en el paciente.

Alternativamente, la IgG policlonal puede administrarse en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, las inmunoglobulinas policlonales pueden administrarse usando infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En una realización, puede usarse una bomba (véase Langer, citado anteriormente; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald *et al.*, *Surgery* 88:507 (1980); Saudek *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos (véase *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983); véase también Levy *et al.*, *Science* 228:190 (1985); Durante *et al.*, *Ann. Neurol.* 25:351 (1989); Howard *et al.*, *J. Neurosurg.* 71:105 (1989)). En aún otra realización, puede colocarse un sistema de liberación controlada en proximidad de la diana terapéutica, es decir, un sitio de lesión en el sistema nervioso periférico, requiriendo por tanto únicamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, citado anteriormente, vol. 2, págs. 115-138 (1984)). Otros sistemas de liberación controlada se comentan en la revisión de Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).

En el caso de una preparación de inmunoglobulina IgG policlonal, habitualmente se usa inmunoglobulina intravenosa (IVIG). Las formulaciones de IVIG están diseñadas para su administración mediante inyección. Dado que las preparaciones de IgG policlonal han logrado una concentración de inmunoglobulina excepcionalmente alta concentración (por ejemplo el 10% p/v en algunas realizaciones, el 15% p/v en otras realizaciones, el 20% p/v en todavía otras realizaciones, y hasta el 25% p/v en realizaciones todavía adicionales), lo cual reduce significativamente el volumen para una dosis terapéuticamente eficaz, la composición de la presente divulgación es particularmente ventajosa para administración subcutánea y/o intramuscular a un paciente, así como administración intravenosa.

El término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de preparación de IgG policlonal que da como resultado una mejora o remedio de un estado médico que está tratándose en el sujeto (por ejemplo, para tratar traumatismo de nervio periférico, para tratar neuropatía inducida por toxina periférica, etc.). Una cantidad eficaz que va a administrarse al sujeto puede determinarse por un médico teniendo en cuenta diferencias individuales en cuanto a la edad, peso, gravedad de enfermedad, vía de administración (por ejemplo, intravenosa frente a subcutánea) y respuesta a la terapia.

El calendario de dosificación puede variar dependiendo de la semivida en circulación y la formulación usada. Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación en la cantidad terapéuticamente eficaz. Las cantidades precisas de principio activo que se requiere administrar dependen del criterio del profesional y son peculiares de cada individuo.

Una dosis adecuada de IgG policlonal puede administrarse a un paciente cada semana, cada dos semanas, cada 3 semanas, cada 4 semanas o cada mes a un sujeto, en la que la dosis oscila desde aproximadamente 0,050 hasta 5 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,095 a 4,7 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,140 a 4,4 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,185 a 4,1 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,230 a 3,8 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,275 a 3,5 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,320 a 3,2 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,365 a 2,9 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,410 a 2,6 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,455 a 2,3 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,500 a 2,0 g/kilogramo de peso corporal del paciente.

En realizaciones alternativas, la composición de IgG policlonal se administra cada semana, cada dos semanas, cada 3 semanas, cada 4 semanas o cada mes a un sujeto a una dosis de aproximadamente 0,05 a 4,9 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 4,8 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 4,7 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 4,6 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 4,5 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 4,4 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 4,3 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 4,2 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 4,1 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 4,0 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 3,9 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 3,8 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 3,7 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 3,6 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 3,5 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 3,4 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 3,3 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 3,2 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 3,1 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 3,0 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 2,9 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 2,8 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 2,7 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 2,6 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 2,5 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 2,4 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 2,3 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 2,2 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 2,1 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 2,0 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 1,9 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 1,8 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 1,7 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 1,6 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 1,5 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 1,4 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 1,3 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 1,2 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 1,1 g/kilogramo de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,05 a 1,0 g/kilogramo de peso corporal del paciente. Los médicos familiarizados con las enfermedades tratadas mediante preparaciones de IgG pueden determinar la dosis apropiada para un paciente según criterios conocidos en la técnica.

En otras realizaciones, puede administrarse un producto de IVIG a un sujeto dentro del intervalo de aproximadamente 0,2 g/kilogramo de peso corporal del paciente a aproximadamente 4 g/kilogramo peso corporal del paciente cada vez, y la frecuencia de administración puede oscilar desde dos veces por semana, una vez por semana, dos veces al mes, una vez al mes o una vez cada dos meses. Un intervalo de dosis a modo de ejemplo de IVIG es de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1 o de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,8 g/kg de peso corporal del paciente, administrado normalmente a la frecuencia de dos veces al mes o una vez al mes. Por ejemplo, se administra IVIG a algunos pacientes a la dosis de 0,2, 0,4, 0,6 ó 0,8 g/kg de peso corporal del paciente según un calendario de dos veces al mes. En otros casos, se administra IVIG a la dosis de 0,2, 0,4, 0,6 ó 0,8 g/kg de peso corporal del paciente según un calendario de una vez al mes.

La duración de tratamiento con IVIG para una neuropatía periférica desmielinizante puede variar: puede ser de tan sólo 3 ó 6 meses, o puede ser de hasta 18 meses, 2 años, 5 años o 10 años. En algunos casos, el tratamiento con IVIG puede durar durante el resto de la vida natural de un paciente. La eficacia del tratamiento con IVIG puede evaluarse durante todo el ciclo de administración tras un determinado periodo de tiempo, por ejemplo, cada 3 meses o cada 6 meses durante un plan de tratamiento de 18 meses. En otros casos, la eficacia puede evaluarse cada 9 ó 12 meses durante un ciclo de tratamiento más largo. El calendario de administración (dosis y frecuencia) puede ajustarse en consecuencia para cualquier administración posterior.

Para administración intravenosa, la IgG policlonal se administra a una tasa de infusión inicial a modo de ejemplo de 0,5 ml/kg/h (0,8 mg/kg/min) durante 30 minutos mientras que la tasa de infusión de mantenimiento a modo de ejemplo será aumentar la tasa cada 30 minutos si se tolera hasta 5 ml/kg/h (8 mg/kg/min). Los tiempos de infusión pueden variar dependiendo de la dosis, tasa de infusión y tolerabilidad.

Para la administración subcutánea a individuos de 40 kg de peso corporal del paciente y más, una tasa de infusión inicial a modo de ejemplo es de 30 ml/sitio a 20 ml/h/sitio mientras que una tasa de infusión de mantenimiento a modo de ejemplo es de 30 ml/sitio a 20-30 ml/h/sitio. Para la administración subcutánea a individuos de menos de 40 kg de peso corporal del paciente, una tasa de infusión inicial a modo de ejemplo es de 20-30 ml/sitio a 15 ml/h/sitio mientras que una tasa de infusión de mantenimiento a modo de ejemplo es de 20 ml/sitio a 15-20 ml/h/sitio. Los tiempos de infusión pueden variar dependiendo de la dosis, tasa de infusión y tolerabilidad.

Según la presente divulgación, el tiempo necesario para completar un ciclo del tratamiento puede determinarse por un médico y puede oscilar desde tan poco como un día hasta más de un mes. En determinadas realizaciones, un ciclo de tratamiento puede ser de desde 1 hasta 6 meses.

Métodos para preparar composiciones administrables por vía parenteral los conocerán o resultarán evidentes para los expertos en la técnica y se describen en más detalle en publicaciones tales como Remington's Pharmaceutical Science, 15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980).

## 5 VI. TERAPIA DE COMBINACIÓN

En algunas realizaciones, la IgG policlonal puede administrarse a un sujeto como terapia de combinación con otro tratamiento, por ejemplo, otro tratamiento para un trastorno desmielinizante (por ejemplo, cualquiera de los trastornos desmielinizantes descritos en el presente documento). Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir administrar al sujeto (por ejemplo, un paciente humano) uno o más agentes adicionales que proporcionan un beneficio terapéutico al sujeto que tiene, o corre el riesgo de desarrollar, un trastorno desmielinizante. En algunas realizaciones, la IgG policlonal y el uno o más agentes adicionales se administran al mismo tiempo. En otras realizaciones, la IgG policlonal se administra en primer lugar y el uno o más agentes adicionales se administran en segundo lugar. En algunas realizaciones, el uno o más agentes adicionales se administran en primer lugar y la IgG policlonal se administra en segundo lugar. La IgG policlonal puede sustituir a, o aumentar, una terapia anterior o actualmente administrada. Por ejemplo, tras tratar con IgG policlonal, la administración del uno o más agentes adicionales puede detenerse o disminuir, por ejemplo, administrarse a niveles inferiores. En otras realizaciones, se mantiene la administración de la terapia anterior. En algunas realizaciones, se mantendrá una terapia anterior hasta que el nivel de IgG policlonal alcance un nivel suficiente para proporcionar un efecto terapéutico. Las dos terapias pueden administrarse en combinación.

En algunas realizaciones, al individuo que recibe una primera terapia para un trastorno desmielinizante, por ejemplo, interferón beta 1a (Avonex), interferón beta 1b (Rebif), acetato de glatirámico (Copaxone), mitoxantrona (Novantrone), azatiprina (Imuran), ciclofosfamida (Cytoxan o Neosar), ciclosporina (Sandimmune), metotrexato, cladribina (Leustatin), metilprednisona (Depo-Medrol o Solu-Medrol), prednisona (Deltasone), prednisolona (Delta-Cortef), dexametasona (Medrol o Decadron), hormona adrenocorticotrófica (ACTH) o corticotropina (Acthar), también se le puede administrar IgG policlonal. En algunas realizaciones, cuando al humano se le administra IgG policlonal, se detiene la primera terapia. En otras realizaciones, se monitoriza al humano para detectar un primer resultado previamente seleccionado, por ejemplo, una mejora en uno o más síntomas de un trastorno desmielinizante (tal como remielinización aumentada), por ejemplo, cualquiera de los síntomas de trastornos desmielinizantes descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, cuando se observa el primer resultado previamente seleccionado, se disminuye o se detiene el tratamiento con IgG policlonal. En algunas realizaciones, después se monitoriza al humano para detectar un segundo resultado previamente seleccionado tras detenerse el tratamiento con IgG policlonal, por ejemplo, un empeoramiento de un síntoma de un trastorno desmielinizante. Cuando se observa el segundo resultado previamente seleccionado, se reinicia o aumenta la administración de la IgG policlonal al humano, o se reinicia la administración de la primera terapia, o se administran al humano tanto IgG policlonal, o una cantidad aumentada de IgG policlonal, como el primer régimen terapéutico.

En una realización, un humano que recibe una primera terapia para un trastorno desmielinizante, que después se trata con IgG policlonal, sigue recibiendo la primera terapia a la misma cantidad o a una reducida. En otra realización, el tratamiento con la primera terapia se solapa durante un tiempo con el tratamiento con IgG policlonal, pero posteriormente se detiene el tratamiento con la primera terapia.

En algunas realizaciones de la invención tal como se define en las reivindicaciones, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de IgG policlonal conjuntamente con un agente antiinflamatorio a un paciente que lo necesita. Los agentes antiinflamatorios son una clase bien conocida de agentes farmacéuticos que reducen la inflamación actuando sobre mecanismos corporales (Stedman's Medical Dictionary 26 e., Williams and Wilkins, (1995); Physicians Desk Reference 51 ed, Medical Economics, (1997)).

Los agentes antiinflamatorios útiles con los métodos de la divulgación incluyen agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Los AINE inhiben normalmente la capacidad del organismo para sintetizar prostaglandinas. Las prostaglandinas son una familia de sustancias químicas similares a hormonas, algunos de los cuales se producen en respuesta a lesión celular. Los AINE específicos aprobados para su administración a humanos incluyen naproxeno sódico, diclofenaco, sulindaco, oxaprozina, diflunisal, aspirina, piroxicam, indometacina, etodolaco, ibuprofeno, fenoprofeno, ketoprofeno, ácido mefenámico, nabumetona, tolmetina sódica y ketorolaco trometamina.

Otros agentes antiinflamatorios útiles con los métodos de la divulgación incluyen salicilatos, tales como, por ejemplo, ácido salicílico, ácido acetilosalicílico, salicilato de colina, salicilato de magnesio, salicilato de sodio, olsalazina y salsalato.

Otros agentes antiinflamatorios útiles con los métodos de la divulgación incluyen inhibidores de la ciclooxigenasa (COX). COX cataliza la conversión de araquidonato en prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>); un inhibidor de COX inhibe esta reacción. También se conoce COX como prostaglandina H sintasa, o PGH sintasa. Se han aislado dos genes de Cox, Cox-1 y Cox-2, en varias especies. COX-2 está estrechamente regulado en la mayoría de los tejidos y habitualmente sólo se induce en condiciones anómalas, tales como inflamación, artritis reumática y osteoartritis, enfermedad renal y osteoporosis. Se cree que COX-1 se expresa de manera constitutiva para mantener la función

renal y de plaquetas y la interhomeostasis. Los inhibidores de COX típicos útiles en los métodos de la divulgación incluyen etodolaco, celebrex, meloxicam, piroxicam, nimesulida, nabumetona y rofecoxib.

5 Los agentes antiinflamatorios preferidos que pueden incorporarse en una matriz de polímero para su administración en los métodos de la divulgación incluyen: isonixino, amtolmetina guacilo, proglumetacina, piketoprofeno, difenamizol, epirizol, apazona, feprazona, morazona, fenilbutazona, pipebuzona, propifenazona, ramifenazona, tiazolinobutazona, aspirina, benorilato, acetilsalicilato de calcio, etersalato, salicilato de imidazol, acetilsalicilato de lisina, salicilato de morfolina, salicilato de 1-naftilo, acetilsalicilato de fenilo, ampiroxicam, droxicam, s-adenosilmetionina, amixetina, bencidamina, bucoloma, difenpiramida, emorfazona, guaiazuleno, nabumetona, nimesulida, procuazona, superóxido dismutasa y tenidap.

15 Los agentes antiinflamatorios que pueden añadirse a un polímero para su administración en los métodos de la divulgación incluyen: etofenamato, talniflumato, terofenamato, acemetacina, alclofenaco, bufexamaco, cinmetacina, clopiraco, felbinaco, ácido penclócico, fentiazaco, ibufenaco, indometacina, isofezolaco, isoxepaco, lonazolaco, ácido metiacínico, mofezolaco, oxametacina, pirazolaco, sulindaco, tiaramida, tolmetina, tropesina, zomepiraco, bumadizona, butibufeno, fenbufeno, xenbucín-clidanaco, ketorolaco, tinoridina, benoxaprofeno, bermoprofeno, ácido buclócico, fenoprofeno, flunoxaprofeno, flurbiprofeno, tbutuprofeno, tbutproxam, indoprofeno, ketoprofeno, loxoprofeno, naproxeno, oxaprozina, piroprofeno, pranoprofeno, ácido pródznico, suprofeno, ácido tiaprofénico, zaltoprofeno, benzopiperilona, mofebutazona, oxifenbutazona, suxibuzona, acetaminosalol, parsalmida, salicilato de fenilo, salacetamida, ácido salicilsulfúrico, isoxicam, lomoxicam, piroxicam, tenoxicam, ácido épsilon-acetamidocaproico, bendazaco, alfa-bisabolol, paranilina, perisoxal y zileutón.

25 Los agentes antiinflamatorios que pueden incorporarse en una estructura principal de polímero para su administración en los métodos de la divulgación incluyen: ácido enfenámico, aceclofenaco, glucametacina, alminoprofeno, caiprofeno, xinoprofeno, salsalato, ácido 3-amino-4-hidroxi-butírico, ditazol, fepradinol y oxaceprol.

30 Los agentes antiinflamatorios que presentan funcionalidad orto adecuada para incorporarse en la estructura principal de un polímero de fórmula (I) tal como se describe en el presente documento incluyen: ácido flufenámico, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido niflúmico, ácido tolfenámico, amfenaco, bromfenaco, diclofenaco sódico, etodolaco, bromosaligenina, diflunisal, fendosal, ácido getitísico, salicilato de glicol, ácido salicílico, mesalamina, olsalazina, salicilamida de ácido o-acético, sulfasalazina.

35 Para cualquier agente antiinflamatorio al que se hace referencia en el presente documento mediante su nombre comercial, debe entenderse que puede usarse o bien el producto de nombre comercial o bien el principio activo que presenta actividad antiinflamatoria del producto. Adicionalmente, los agentes preferidos identificados en el presente documento para su incorporación en una estructura principal de polímero también pueden añadirse preferiblemente a un polímero o pueden incorporarse en una matriz de polímero. Los agentes preferidos que pueden añadirse a un polímero también pueden incorporarse preferiblemente en una matriz de polímero.

## 40 Ejemplos

A continuación, se proporcionan ejemplos para ilustrar la presente invención. No se pretende que estos ejemplos limiten la presente invención a ninguna aplicación o teoría de funcionamiento particular.

### 45 EJEMPLO 1: INVESTIGACIÓN DEL EFECTO DE IVIG SOBRE CÉLULAS DE SCHWANN

50 El efecto directo de inmunoglobulinas policlonales derivadas de suero humano sobre la homeostasis, diferenciación y maduración de células de Schwann tal como se demuestra mediante diversas variables moleculares y celulares se investigó usando tres modelos: 1) un modelo de cultivo de células de Schwann de rata primarias; 2) un modelo de células de Schwann con supresión de p57kip2; y 3) un cultivo conjunto de neuronas del SNP y células de Schwann mielinizantes.

55 1.1. PREPARACIÓN DEL MODELO 1 DE CÉLULAS DE SCHWANN DE RATA: En este modelo, se cultivaron células de Schwann (SC) primarias no sometidas a tratamiento aisladas a partir de los nervios ciáticos de ratas recién nacidas. En esta fase, las SC son inmaduras y aún no han iniciado el proceso de diferenciación. En cultivo, no avanzan a lo largo de su programa de diferenciación y permanecen proliferativas pero inmaduras, lo más probablemente debido a la presencia de inhibidores de diferenciación intrínsecos (Heinen *et al.*, 2008a).

60 1.2. PREPARACIÓN DEL MODELO 2 DE CÉLULAS DE SCHWANN CON SUPRESIÓN DE P57KIP2: Los presentes inventores han identificado el gen p57kip2 como un nuevo inhibidor intrínseco de la diferenciación, maduración y mielinización de células mielinizantes de la glía. Se ha demostrado que la supresión dependiente de ARNhc a largo plazo del gen p57kip2 desacopla la diferenciación de SC primarias del contacto axonal. Esto se reveló mediante salida del ciclo celular, morfología de SC alterada así como expresión de mielina inducida (Küry *et al.*, 2002; Heinen *et al.*, 2008a; Heinen *et al.*, 2008b). En este segundo modelo, se usaron SC con supresión de p57kip2 para su comparación con células transfectadas de control, es decir células no en diferenciación. Este sistema de cultivo proporciona la oportunidad única de observar la diferenciación y maduración de SC *in vitro* en ausencia de axones

de una manera cuantitativa.

5 1.3. PREPARACIÓN DE UN CULTIVO CONJUNTO DE NEURONAS DEL SNP Y CÉLULAS DE SCHWANN  
 MIELINIZANTES, MODELO 3: En este modelo, se generaron cultivos conjuntos de neuronas mielinizantes/SC. Se  
 realizaron preparaciones de cultivo a partir de ganglios de la raíz dorsal de ratón C57/BL6 o rata Wistar embrionaria  
 que contenían tanto neuronas sensitivas inmaduras como precursores de células de Schwann del SNP. Este cultivo  
 conjunto simula la situación *in vivo* y ofrece la posibilidad de estudiar el proceso de envuelta/mielinización final y si  
 esta compleja interacción puede verse influida por la administración de inmunoglobulina. La optimización de las  
 condiciones de cultivo conjunto y preparaciones se realizó según protocolos establecidos usados en el laboratorio de  
 10 los inventores o el protocolo publicado en Päiväläinen *et al.*, (2008) con algunas modificaciones. Se realizó la  
 estimulación con IVIG en paralelo con el inicio del proceso de mielinización con preparaciones de IGIV/tampón  
 dializadas. Se realizó la diálisis de IGIV/tampón frente a medio de cultivo celular sin suplementos. Todos los  
 experimentos se realizaron con una concentración de IGIV: 20 mg/ml. La duración de la estimulación se determinó  
 15 analizando la cinética de mielinización (formación de internódulos) tras 3 y 6 días después de la adición de  
 IGIV/tampón dializado.

20 1.4. MORFOLOGÍA CELULAR: Se investigó la morfología celular en el modelo 1 (SC de rata en cultivo) y el modelo  
 2 (SC con supresión de p57kip2) durante hasta 9 días con estimulación mediante 10 mg/ml y 20 mg/ml de IVIG para  
 el modelo 1 (para observar la dependencia de la dosis) y hasta 7 días de estimulación (9 días de transfección) para  
 el modelo 2. Se realizaron experimentos con preparaciones de IGIV y tampón tanto no dializadas como dializadas.  
 Se realizó la diálisis de IVIG y tampón frente a medio de cultivo celular sin suplementos. Todos los experimentos del  
 modelo 2 se realizaron con una concentración de IGIV dializada (20 mg/ml). En el modelo 2, también se determinó la  
 cinética de crecimiento y diferenciación celular midiendo la longitud de protuberancia celular tras 3 y 7 días de  
 estimulación con IVIG dializada.

25 1.5. MUERTE/PROLIFERACIÓN CELULAR: Se investigó la muerte/proliferación celular en el modelo 1 tras 2 días  
 de estimulación con preparaciones de IVIG/tampón no dializadas y dializadas. Se realizó la diálisis de IVIG/tampón  
 frente a medio de cultivo celular sin suplementos. Todos los experimentos se realizaron con una concentración de  
 IVIG (20 mg/ml). Se emplearon dos ensayos para medir la proliferación celular: tinción inmunocitoquímica frente al  
 30 antígeno Ki-67 y tinción inmunocitoquímica frente a BrdU. El antígeno Ki-67 es una proteína nuclear que sirve como  
 marcador celular para la proliferación. BrdU (bromodesoxiuridina) es un análogo nucleotídico de timidina usado para  
 el marcaje de células en proliferación. Se empleó la tinción inmunocitoquímica frente a caspasa 3 como marcador de  
 apoptosis. La caspasa 3 es una proteasa activada en células apoptóticas y, por tanto, se usa como marcador de  
 muerte celular. Se fijaron las células tras dos duraciones de pulso de BrdU diferentes de 8 h y 24 h.

35 1.6. EXPRESIÓN GÉNICA: Se analizó la expresión génica en el modelo 1 (SC de rata en cultivo, sección 1.1) y el  
 modelo 2 (SC con supresión de p57kip2, sección 1.2) expuestas durante hasta 9 días de estimulación para el  
 modelo 1 y 7 días de estimulación (9 días de transfección) para el modelo 2 usando preparaciones de IVIG/tampón  
 tanto no dializadas como dializadas. Se usaron preparaciones de SYNAGIS dializadas como control de IgG1 con SC  
 40 no sometidas a tratamiento (modelo 1). Se realizó la diálisis de IVIG/tampón/SYNAGIS frente a medio de cultivo  
 celular sin suplementos. Todos los experimentos se realizaron con una concentración de IVIG: 20 mg/ml. Se midió la  
 transcripción de genes de mielina (P<sub>0</sub>, MBP) y receptores de Fc (CD64, CD32 y CD16) usando RT-PCR en tiempo  
 real.

#### 45 **EJEMPLO 2: LAS CÉLULAS DE SCHWANN RESPONDEN A LA INCUBACIÓN CON IVIG**

50 2.1. MORFOLOGÍA: Se observó que el tratamiento con IVIG afectaba a la morfología de células de Schwann. Las  
 SC cultivadas en presencia de IVIG 10 mg/ml, y en mayor medida, en presencia de IVIG 20 mg/ml, parecieron tener  
 núcleos y somas más grandes. Actualmente no queda claro si esto es un impacto directo sobre la forma de SC y el  
 citoesqueleto o las propiedades de adhesión, un resultado a partir de densidades celulares diferentes, o es un reflejo  
 de alteraciones de la superficie celular diferenciada posiblemente relacionada con el/los sitio(s) de unión a IVIG  
 sobre la superficie celular.

55 Se midió un crecimiento significativamente acelerado de protuberancias celulares tras la estimulación con IGIV  
 usando el modelo 2 (supresión de p57kip2). Este efecto sólo se observó en las fases iniciales del proceso de  
 diferenciación, indicando un efecto de IVIG sobre la cinética de diferenciación de las células de Schwann. Para  
 explicarlo, el crecimiento de celular protuberancias es un parámetro de maduración que se encontró que dependía  
 de los niveles de p57kip2 suprimido. Por otro lado, no pudo observarse ningún efecto sobre la estructura y el  
 ensamblaje de filamentos de actina tras la estimulación con IVIG tal como se revela mediante tinciones de faloidina  
 60 conjugada con TRITC.

65 2.2. MUERTE/PROLIFERACIÓN CELULAR (MODELO 1): Tras la estimulación con preparaciones de IVIG no  
 dializadas (20 mg/ml), la tasa de proliferación de SC no sometidas a tratamiento se redujo significativamente, tal  
 como se revela mediante ensayos usando marcadores de proliferación BrdU y Ki-67. Véanse las figuras 1-2. El  
 efecto dependiente de IVIG sobre la tasa de proliferación se disminuyó con la diálisis de IVIG, pero permaneció  
 estadísticamente significativo después de eso. Actualmente no hay evidencias de inducción de apoptosis tras el

tratamiento con IVIG basándose en la tinción negativa para caspasa 3.

2.3. EXPRESIÓN GÉNICA: La estimulación de SC no transfectadas (modelo 1) con preparaciones de IVIG/tampón no dializadas y dializadas condujo a una ligera regulación por incremento de P<sub>0</sub> y una fuerte regulación por incremento de los genes de MBP dentro de los 3 primeros días de tratamiento, pero no tras periodos de incubación más prolongados. La estimulación de células con supresión de p57kip2 (modelo 2) con preparaciones de IVIG/tampón no dializadas y dializadas también condujo a resultados similares con respecto a la expresión de genes de mielina. La expresión y regulación por incremento de ambos genes de mielina fueron significativamente más fuertes en las células con supresión de p57kip2 que en las células transfectadas de control. Observaciones de la regulación génica de receptores de Fc mostraron que las células de Schwann expresan CD64 y CD32 y que la supresión a largo plazo para p57kip2 conduce a una regulación por incremento significativa de estos genes. Hubo un nivel detectable de la expresión de receptor de Fc, CD64, en SC inmaduras. En células de Schwann en diferenciación (tras la supresión del inhibidor intrínseco p57kip2), los niveles de CD64 aumentaron significativamente con la estimulación con IVIG.

De manera importante, los controles de IgG1 monoclonal (Synagis, Avastin y Herceptin) no mostraron ningún efecto significativo sobre la expresión de genes de mielina. La estimulación de células con supresión de p57kip2 (modelo 2) con preparaciones IVIG/tampón no dializadas y dializadas indujo la expresión de genes de mielina hasta un grado similar. Una vez más, la expresión de MBP se indujo fuertemente tras la estimulación con IVIG mientras que la expresión de P<sub>0</sub> se indujo levemente por el tratamiento. Obsérvese que la inducción de genes de mielina pudo observarse durante un periodo de siete días de estimulación y, por tanto, no se limitó a las fases tempranas. Además, se encontró que la expresión del gen de p57kip2 codificaba para un inhibidor intrínseco de la diferenciación de células de Schwann y se redujo significativamente en células transfectadas de control (no en diferenciación).

Observaciones de la regulación génica de todos los receptores de Fc $\gamma$  conocidos mostraron que las células de Schwann expresan el receptor de Fc CD64. En células de Schwann en diferenciación (modelo 2), los niveles de CD64 se aumentaron significativamente en comparación con células transfectadas de control (no en diferenciación). No pudo observarse regulación de la expresión del receptor CD64 en respuesta a la estimulación con IVIG. Obsérvese que los efectos del control de tampón no dializado se observaron en todos los experimentos de expresión génica realizados. Sin embargo, este efecto disminuyó tras la diálisis. Por tanto, se realizaron análisis de expresión génica adicionales únicamente con preparaciones de IVIG dializadas.

2.4. RESUMEN DE LOS HALLAZGOS: En los primeros 18 meses de la investigación, se descubrió que las SC primarias responden a la incubación con IVIG con morfología celular alterada acompañada por un crecimiento acelerado de protuberancias celulares en fases tempranas del proceso de diferenciación. También se encontró que la incubación con IVIG reducía la proliferación de células de Schwann sin afectar a la supervivencia celular. Además, se indujo la expresión de dos genes de mielina principales, P<sub>0</sub> y MBP, en SC inmaduras así como en diferenciación tras la estimulación con IVIG. Los datos muestran que células de Schwann de rata primarias expresaban el receptor de Fc, CD64, y que, en células de Schwann en diferenciación (tras la supresión del inhibidor intrínseco p57kip2), los niveles de CD64 aumentaron significativamente con la exposición a IVIG. La evidencia también proporciona fuertes indicaciones de una regulación por incremento de receptores de Fc (en particular CD64) en SC en diferenciación. Además, se mostró una unión específica de las IVIG humanas sobre la superficie de células de Schwann.

Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que las SC pueden mostrar competencia inmunitaria. La tasa de proliferación reducida sin signos de apoptosis así como la inducción de genes de mielina, en combinación con el crecimiento acelerado de protuberancias celulares, sugieren un fomento del proceso de diferenciación en las SC inmaduras mediante IVIG. Estos son los primeros resultados *in vitro* que demuestran que las células de Schwann no sólo son capaces de responder a, sino también de unirse específicamente a, inmunoglobulinas y que la estimulación con IVIG puede fomentar la maduración de precursores de células de Schwann.

**EJEMPLO 3: EXPRESIÓN GÉNICA**

Para una exploración adicional de los efectos dependientes de IVIG sobre la expresión génica en células de Schwann en diferenciación (células con supresión de p57kip2, modelo 2) y no en diferenciación (células con supresión de control, modelo 2), se recogieron 16 muestras de ARN a partir de 4 experimentos independientes para un análisis de matriz GeneChip (realizado por Miltenyi Biotec, Alemania). Se realizó la validación de muestras mediante determinación de los niveles de expresión de los genes de MBP, P<sub>0</sub>, p57kip2 y CD64.

Se realizó un análisis estadístico y funcional. En las tablas 1 y 2 se proporcionan genes que se identificó que están significativamente regulados por incremento o por disminución tras el tratamiento con IVIG. Objetivos futuros son la identificación de genes adicionales así como la validación de los resultados obtenidos.

Tabla 1. Comparación de células de Schwann no en diferenciación +/- IVIG

Genes regulados por incremento tras el tratamiento (nombre de secuencia de gen)	Genes regulados por disminución tras el tratamiento (nombre de secuencia de gen)
---	--

Tyrp1	RGD1562551
Tyrp1	Ctnna2
Col24a1	Olr832
Fat3	Phgr1
Tmem72	RGD1566220
Tesc	Nedd9
Il18	Slc12a3
Mtla	Arhgef9
Slc40a1	Gckr
Asgr1	TC636329
LOC678704	A_64_P023581
TC609365	Ptprr
Bcl6b	Olr749
A_64_P063062	Nebl
Npas2	RGD1562545
Gpx2	Hes5
Matn1	Mpzl2
A_64_P022503	Ezr
Fbxo32	Cryab
Pls1	Fcgr2b
A_64_P094596	
A_64_P025678	
Olig1	
Sox2	
Plp1	

Tabla 2. Comparación de células de Schwann en diferenciación +/- IVIG

Genes regulados por incremento tras el tratamiento (nombre de secuencia de gen)	Genes regulados por disminución tras el tratamiento (nombre de secuencia de gen)
ENSRNOT00000064975	XM_346212
Zfp334	XR_009266
Mmp25	LOC688695
A_64_P117674	Ak3l1
A_64_P151655	A_64_P163956
A_44_P386999	
Olig1	
Sox10	
Hes5	

5 Con el fin de confirmar la inducción observada de la expresión de genes de mielina (en particular P<sub>0</sub> y MBP) a nivel de proteína, se realizó un análisis de inmunotransferencia de tipo Western con células con supresión de p57kip2 frente a supresión de control (modelo 2) tras el tratamiento con IVIG/tampón dializado. Pudo demostrarse que, en células de Schwann en diferenciación, los niveles de proteína de P<sub>0</sub> y, en menor medida, de MBP se aumentaron tras el tratamiento con IVIG.

10 **EJEMPLO 4: PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL SISTEMA INMUNITARIO**

15 Era importante confirmar la unión directa de IVIG a la superficie de células de Schwann. Aplicando anticuerpos de F(ab)<sub>2</sub> específico anti-Fab humano y de F(ab)<sub>2</sub> específico anti-Fcγ humano, se mostró que las inmunoglobulinas humanas en la IVIG se unen específicamente a la superficie de células de Schwann. Se estimularon células de Schwann vivas en cultivo con IVIG, se lavaron, se fijaron y después se tiñeron por separado frente a fragmentos Fab humanos, fragmentos Fcγ humanos o frente a ambos epítopos en combinación de una doble tinción. Pudo localizarse una unión a superficie específica dentro de la región perinuclear de las células. Estos estudios de unión se realizaron con células de Schwann no sometidas a tratamiento (modelo 1) usando controles de IVIG e IgG1 (Avastin y Herceptin) así como con células de Schwann en diferenciación (modelo 2) usando IVIG. Con el fin de abordar la cuestión de si la proteína de receptor CD64 también se expresa sobre la superficie de células de Schwann, se han iniciado experimentos de tinción dos anticuerpos anti-CD64.

25 Con el fin de determinar si la proteína de receptor CD64 también se expresaba sobre la superficie de células de Schwann, se realizaron experimentos de tinción con dos anticuerpos anti-CD64. Un anticuerpo anti-CD64 pareció unirse específicamente al receptor CD64 de rata sobre las células de Schwann y la tinción de receptor difusa se distribuyó sobre la superficie celular de las células no en diferenciación. En comparación, la tinción de receptor en células en diferenciación se concentró en el soma celular por encima de la región perinuclear. Las señales de CD64

detectadas no coincidieron con las señales de unión a IVIG (comparación de tinciones inmunológicas).

**EJEMPLO 5: FORMACIÓN DE INTERNÓDULOS**

5 Con el fin de mejorar la eficacia y reproducibilidad del modelo de mielinización *in vitro* (modelo 3), se realizaron y se establecieron varias etapas de mejora experimental usando cultivos de DRG derivados de embriones de ratón C57/BL6. Para ello, se modificó el protocolo según Päiväläinen *et al.* (2008) y ahora puede usarse para estudiar los efectos de la aplicación de IVIG sobre las interacciones de axón/célula de Schwann. Se realizó la estimulación con IVIG (20 mg/ml) de manera concomitante con el inicio del proceso de mielinización usando preparaciones de IGIV/tampón dializadas.

15 Tras la determinación del punto de tiempo óptimo para el análisis a los 7 días tras el inicio de la mielinización, se realizó un número estadísticamente significativo de experimentos de estimulación con IVIG (n=9). Con el fin de evaluar la capacidad del tratamiento con inmunoglobulina para modular la generación de vainas de mielina (formación de internódulos), se comparó el número de internódulos (normalizando con respecto al número total de núcleos en el cultivo conjunto) de cultivos tratados con IVIG con el número de internódulos en cultivos conjuntos de control. Aunque pudo observarse una tendencia hacia densidades de internódulos ligeramente aumentadas, no se detectó ninguna diferencia estadísticamente significativa en la formación de segmentos de mielina tras el tratamiento.

20 **EJEMPLO 6: PARADIGMA DE REPARACIÓN DE NERVIOS IN VIVO**

6.1. RESUMEN

25 Con el fin de traducir los hallazgos *in vitro* basados en cultivos de células de Schwann de rata primarias a un paradigma *in vivo*, se indujeron lesiones de nervios periféricos crónicas en ratas adultas tratadas con IVIG o tampón de control durante un denominado “periodo de regeneración de nervios”. Se realizaron secciones transversales de nervios ciáticos y, por medio de religación por sutura de terminaciones nerviosas, se previno la regeneración de nervios durante un periodo de tres meses. Tras este periodo de degeneración, se ligaron los nervios para permitir que tuviera lugar la regeneración y se administró IVIG o tampón (inyecciones i.p.). Se permitió que los nervios se regeneraran durante otros tres meses hasta que se sacrificaron los animales.

35 El enfoque quirúrgico anteriormente descrito sobre células de Schwann se usó para determinar si la estimulación con IVIG puede reparar la actividad de nervios periféricos lesionados. Durante el periodo de regeneración de tres meses (y el tratamiento con IVIG/tampón) se realizaron varias pruebas funcionales con ratas vivas. Después de eso, se sacrificaron los animales y se disecaron los nervios ciáticos, se fijaron y se incrustaron para futuros análisis morfológicos e inmunohistoquímicos con el objetivo de la descripción de reacciones de células de Schwann/mielina y axonales. Se adquirieron resultados preliminares a partir de los análisis funcionales. Estos hallazgos preliminares indican que existen diferencias entre los dos grupos (animales tratados con IVIG frente a tampón). Específicamente, los animales tratados con IVIG presentaron zonas de huella más largas y más anchas (zonas de contacto entre la pezuña y el suelo) en comparación con los animales tratados con tampón. Estas zonas de huella también aumentaron gradualmente durante el periodo de tratamiento y esto fue acompañado por un aumento de la presión de contacto (correspondiente a la fuerza que se usa con la pata para dar un paso o a la presión que ejerce la pezuña sobre la superficie). En conjunto, estos primeros datos preliminares sugieren que los animales tratados con IVIG experimentan una normalización acelerada del comportamiento de andar y una fuerza aumentada en el uso de sus patas.

6.2. MÉTODOS

50 Se investigaron los efectos dependientes de IVIG sobre la supervivencia de células de Schwann. Específicamente, se usó un modelo de denervación de nervios periféricos crónica anteriormente establecido (Fu y Gordon; J Neurosci 1995) para estudiar la proliferación así como la remielinización y regeneración axonal en segmentos de nervios denervados *in vivo*. Este modelo *in vivo* presenta condiciones de nervios similares a las observadas en muchas patologías nerviosas humanas. Este modelo *in vivo* también proporciona la ventaja de centrarse únicamente en acontecimientos regenerativos como procesos de degeneración (es decir, se excluyen temporalmente las reacciones inmunitarias).

60 Con este propósito, se realizaron secciones transversales de nervios ciáticos de 24 ratas Lewis adultas y se previno la regeneración de nervios por medio de religación por sutura de las terminaciones nerviosas. Esta configuración da como resultado segmentos de nervios denervados y con lesión crónica. Se previno la regeneración durante el periodo de tres meses tras la realización de secciones transversales de nervios. Durante este periodo, no se realizó ninguna prueba funcional con los animales.

65 Tras tres meses de degeneración, se expusieron las 24 ratas a una ligación de nervios ciáticos retrasada (anastomosis) dado que los segmentos de nervios proximales se cosieron con sutura a los segmentos de nervios distales permitiendo de ese modo que tuviera lugar la regeneración de nervios. Obsérvese que en esta configuración

crónica, se redujo significativamente la capacidad de regeneración global en comparación con lesiones de nervios agudas. Durante este primer periodo de tres meses, se completó el proceso de degeneración axonal y de mielina.

5 En un primer conjunto de experimentos (estudio 1), se estudió la generación de anticuerpos anti-fármaco (ADA) y niveles en plasma de IgG humana tras la aplicación de IVIG en ratas sanas (nervios no lesionados) usando pruebas de ELISA. Después se monitorizaron los ADA contra IVIG en animales lesionados y tratados como lectura secundaria en el estudio 2 (véase a continuación).

10 En un segundo conjunto de experimentos (estudio 2), se trataron ratas Lewis con lesiones de nervios periféricos crónicas con 1 g de IVIG /kg de peso corporal (tratamiento con alta dosis) tras la ligación de nervios (periodo de regeneración de 3 meses). La aplicación de IVIG se realizó por medio de inyecciones i.p. una vez por semana en el primer mes y después una vez cada dos semanas en los últimos dos meses de la fase de regeneración. Las ratas de control con lesiones de nervios recibieron inyecciones de tampón de formulación de IVIG. Los grupos de animales tratados con tampón de control y tratados con IVIG comprendían 12 ratas hembra adultas cada uno. 15 Durante el periodo de tratamiento con IVIG, se extrajeron muestras de sangre a partir de la vena de la cola con el fin de monitorizar ADA y determinar la semivida de IgG humana (véase el estudio 1). Se extrajeron muestras de plasma sanguíneo cada dos semanas antes del tratamiento.

## 20 6.2. RESULTADOS

Con el fin de someter a prueba el grado de recuperación de la función de los órganos objetivo tras la religación de las terminaciones nerviosas, se realizó un conjunto semanal de pruebas de evaluación funcional. Se evaluó la función sensitiva sometiendo a prueba la respuesta de retirada de los dedos 4 y 5 tras la aplicación de un estímulo doloroso (prueba de pellizco con unas pinzas). Se analizaron la fuerza muscular y la regeneración de fibras musculares usando la prueba de separación de patas. Estas dos pruebas funcionales, además de la monitorización del peso de los animales (parámetro de salud y bienestar), se realizaron cada semana. Los animales se sometieron además a una monitorización semanal de las huellas y pistas de andar (es decir, el "análisis de pasarela") para evaluar la recuperación funcional de los nervios ciáticos.

30 Al final del estudio, quedaban 21 animales: 10 animales que recibieron inyecciones de control de tampón y 11 animales tratados con IVIG. Se sacrificaron todas las ratas y se extirparon los segmentos de nervio periférico en regeneración, así como nervios de control sanos contralaterales, para su análisis adicional. Con este propósito se dividieron los animales en tres grupos:

35 El grupo I consiste en 4 animales tratados con tampón y 4 tratados con IVIG. Los segmentos de nervios ciáticos (sanos y sometidos a sección transversal) de estos animales se procesarán para un análisis de microscopía electrónica (EM). Aparte de determinar la densidad axonal (midiendo por tanto la eficiencia de regeneración), esto también incluirá un cálculo de la proporción g (diámetro axonal dividido entre el diámetro del axón y su vaina de mielina) con el fin de determinar eficiencias de remielinización. Este análisis está actualmente en curso. Se 40 determinaron datos de evaluación funcional de estos animales (datos de pasarela, prueba de pellizco y comportamiento de separación de patas) y a continuación se describen resultados preliminares.

45 El grupo II consiste en 3 animales tratados con tampón y 4 tratados con IVIG. Se usarán segmentos de nervios ciáticos (sanos y sometidos a sección transversal) de estos animales para tinciones inmunohistoquímicas (IHC) frente a marcadores axonales, de mielina y de la glía con el fin de determinar el grado de rediferenciación y regeneración celular. Los nervios están actualmente procesados y este estudio también está en curso. Se determinaron datos de evaluación funcional de estos animales (datos de pasarela, prueba de pellizco y comportamiento de separación de patas) y a continuación se describen resultados preliminares que están disponibles.

50 El grupo III consiste en 3 animales tratados con tampón y 3 tratados con IVIG. Los segmentos de nervios ciáticos sometidos a sección transversal de estos animales no presentaron ningún signo de regeneración anatómica dado que no tuvo lugar la anastomosis. Los datos de evaluación funcional de estos animales no se incluirán en el análisis global.

55 Una evaluación preliminar de los datos de pasarela indican que existen diferencias entre los dos grupos (animales tratados con IVIG frente a tampón). Los animales tratados con IVIG presentaron zonas de huella más largas y más anchas (zonas de contacto entre la pezuña y el suelo) en comparación con animales tratados con tampón. Estas zonas de huella también aumentaron gradualmente durante el periodo de tratamiento y esto estuvo acompañado por una presión de contacto aumentada (correspondiente a la fuerza que se usa con la pata para dar un paso o a la presión que ejerce la pezuña sobre la superficie). En conjunto, estos datos sugieren que los animales tratados con IVIG experimentan una normalización acelerada del comportamiento de andar y una fuerza aumentada en el uso de sus patas.

65 *EJEMPLO 7: ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS PARA DETERMINAR LOS MECANISMOS SUBYACENTES DE LA ACCIÓN DE IVIG*

Para entender mejor los mecanismos subyacentes de la acción de IVIG y mecanismos mediante los cuales las IVIG fomentan la maduración celular, se realizarán investigaciones moleculares/celulares detalladas sobre células de Schwann estimuladas.

5 Tal como se resumió anteriormente (véase 5.1), se realizó y se analizó un análisis de GeneChip con células de Schwann no en diferenciación y en diferenciación expuestas a tratamiento con IVIG. Basándose en los genes regulados por incremento y regulados por disminución recién descubiertos (tablas 1 y 2), se llevarán a cabo experimentos de validación adicionales usando RT-PCR en tiempo real cuantitativa con genes seleccionados. Si es necesario y aplicable, se realizarán validaciones adicionales usando anticuerpos (inmunotransferencia de tipo Western, tinciones inmunológicas así como ELISA). Esto será particularmente interesante para genes relacionados con la competencia inmunitaria. Obsérvese que este análisis de expresión no sólo se analizará con el fin de entender qué procesos celulares son más sensibles a IVIG, lo más probablemente también servirá para definir genes de marcadores adicionales que pueden usarse para monitorizar y cuantificar reacciones dependientes de IVIG.

Tras el establecimiento de un ensayo de mielinización *in vitro* adecuado (modelo 3), se realizará un número estadísticamente significativo de experimentos de estimulación con IVIG. Se evaluarán los intervalos de tiempo activos y hasta qué punto el tratamiento con inmunoglobulina puede modular la generación de vainas de mielina (formación de internódulos).

Usando un anticuerpo anti-Fab humano conjugado con Cy3, puede demostrarse la unión específica de IVIG a superficies de células de Schwann. Queda por mostrar si esto se debe a la interacción con el receptor de Fc, CD64, o si se reconocen epítopos específicos de células de Schwann mediante unión mediada por Fab. Con este propósito, o bien se pondrán en contacto células de Schwann (modelo 1) con fracciones Fc y F(ab)<sub>2</sub> de IVIG digerida por papaína o bien se digerirán IVIG unidas en células de Schwann con papaína *in situ*. Además, se espera que la aplicación de un anticuerpo anti-Fc humano conjugado con FITC en combinación con anticuerpo anti-Fab humano conjugado con Cy3 de cómo resultado tinciones sensibles a papaína. Se aplicarán dos anticuerpos anti-CD64 en células de Schwann no en diferenciación y en diferenciación (modelo 2) con el fin de determinar si CD64 también se expresa como proteína de receptor sobre la superficie de células de Schwann. En el caso de que la unión a IVIG esté realmente mediada mediante este receptor de Fc, se esperará que las señales de CD64 coincidan con la unión a IVIG (tinciones inmunológicas). Adicionalmente con este fin, se examinará si puede observarse un aumento de los niveles de proteína CD64 como consecuencia del proceso de diferenciación (inmunotransferencia de tipo Western).

Para proporcionar prueba funcional de la implicación de receptor de Fc, se aplicarán inhibidores farmacológicos tales como 3-(1-metil-1H-indol-3-il-metilen)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-5-sulfonamida o Ly294002 que interfieren con tirosina cinasa (Syk) de bazo y fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), respectivamente, antes de la estimulación con IVIG de células de Schwann no sometidas a tratamiento (modelo 1). Esto indicará si estos componentes de señalización dependientes de Fc están implicados en la inducción de MBP (o genes de marcador apropiados identificados en 1). Además, se usarán IVIG digeridas para estimular células de Schwann cultivadas (modelo 1) con el fin de revelar si las fracciones de Fc y/o Fab son responsables de regulaciones de genes específicos por IVIG (MBP y otros genes de marcador identificados en el análisis de expresión génica). Finalmente, puede usarse la supresión mediada por ARNhc de la expresión de CD64 en células de Schwann (modelo 1) para confirmar que la unión a IVIG es dependiente de CD64 así como responsable de la inducción dependiente de IVIG de la expresión de MBP (u otros genes de marcador identificados en el análisis de expresión génica).

Las condiciones convencionales de cultivo de células de Schwann (mantenimiento y diferenciación) presentan altas concentraciones de suero de ternero fetal (hasta el 10% en volumen). Por tanto, puede concebirse que las inmunoglobulinas presentes en el suero están disminuyendo las reacciones de células de Schwann dependientes de IVIG. Para someter esto a prueba, se reducirá la concentración en suero hasta el límite inferior necesario con el fin de garantizar la supervivencia y diferenciación celular, las células de Schwann estimuladas con IVIG y los niveles de expresión de MBP (modelos 1 y 2) así como parámetros morfológicos medidos (modelo 2).

Las recientes investigaciones de los presentes inventores revelaron que la diferenciación de células de Schwann depende de manera crítica de histona metiltransferasa de potenciador de homólogo de Zeste 2 (EZH2; Heinen *et al.*, en revisión). Tras la supresión de la actividad de EZH2, las células de Schwann cultivadas muestran reacciones de desdiferenciación similares a lo que se observa en patologías nerviosas. Como parte de investigaciones futuras, tales células de Schwann en desdiferenciación se estimularán con IVIG para determinar la expresión de genes de marcador y mielina de células de Schwann. Estos últimos se mostró que estaban regulados por disminución por debajo de niveles de control. Resultará interesante observar si el tratamiento con inmunoglobulina no sólo puede fomentar reacciones de diferenciación/maduración (tal como se observa con el modelo 2; es decir tras la supresión del gen inhibidor p57kip2) sino si también puede interferir con procesos de desdiferenciación (tales como normalización de los niveles de expresión de genes de mielina).

65

**Bibliografía**

- Arnson, Y., Shoenfeld, Y., Amital, H. (2009). Intravenous immunoglobulin therapy for autoimmune diseases. *Autoimmunity* 42(6), 553-60.
- 5 Asakura, K., Miller, D.J., Pease, L.R. y Rodriguez, M. (1998). Targeting of IgMkappa antibodies to oligodendrocytes promotes CNS remyelination. *J. Neurosci.* 18, 7700-7708.
- Bhatheja, K. y Field, J. (2006). Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38(12):1995-9.
- 10 Bieber, A., Asakura, K., Warrington, A., Kaveri, S.V., y Rodriguez, M. (2000). Antibody-mediated remyelination: relevance to multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 6 Sup. 2, S1-S5.
- Bieber, A.J., Warrington, A., Asakura, K., Ciric, B., Kaveri, S.V., Pease, L.R., y Rodriguez, M. (2002). Human antibodies accelerate the rate of remyelination following lysolecithin-induced demyelination in mice. *Glia* 37, 241-249.
- 15 Burstyn-Cohen, T., Frumkin, A., Xu, Y. T., Scherer, S. S., y Klar, A. (1998). Accumulation of F-spondin in injured peripheral nerve promotes the outgrowth of sensory axons. *J. Neurosci.*, 18(21), 8875-8885.
- Fu, S.Y. y Gordon, T. (1995a). Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: Prolonged axotomy. *J. Neurosci.*, 15(5), 3876-3885.
- 20 Fu, S.Y. y Gordon, T. (1995b). Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: Prolonged denervation. *J. Neurosci.*, 15(5), 3886-3895.
- Heinen, A., Kremer, D., Hartung, H.P., y Küry P. (2008a). p57(kip2)'s role beyond Schwann cell cycle control. *Cell Cycle* 7, 2781-2786.
- Heinen, A., Kremer, D., Gottle, P., Kruse, F., Hasse, B., Lehmann, H., Hartung, H.P., y Küry, P. (2008b). The cyclin-dependent kinase inhibitor p57kip2 is a negative regulator of Schwann cell differentiation and in vitro myelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 8748-8753.
- 30 Küry, P., Greiner-Petter, R., Comely, C., Jürgens, T. y Müller, H.W. (2002). Mammalian Achaete Scute Homolog 2 Is Expressed in the Adult Sciatic Nerve and Regulates the Expression of Krox24, Mob-1, CXCR4, and p57kip2 in Schwann Cells. *J. Neurosci.* 22, 7586-7595.
- 35 Lin, H.H., Spies, J.M., Lu, J.L. y Pollard, J.D. (2007), Effective treatment of experimental autoimmune neuritis with human immunoglobulin. *J. Neurol Sci.*; 256:61-7.
- Nakahara, J., Seiwa, C., Shibuya, A., Aiso, S. y Asou, H. (2003). Expression of Fc receptor for immunoglobulin M in oligodendrocytes and myelin of mouse central nervous system. *Neurosci. Lett.* 337, 73-76.
- 40 Negi, V. S., Elluru, S., Siberil, S. Graff-Dubois, S., Mouthon, L., Kazatchkine, M.D., Lacroix-Desmazes, S., Bayry, J. y Kaveri, S.V. (2007). Intravenous immunoglobulin: an update on the clinical use and mechanisms of action. *J. Clin. Immunol.* 27:233.
- 45 Päiväläinen, S., Nissinen, M., Honkanen, H., Lahti, O., Kangas, S.M., Peltonen, J., Peltonen, S. y Heapea, A.M. (2008). Myelination in mouse dorsal root ganglion/Schwann cell cocultures. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 568-578
- Handbook of Development Neurotoxicology eds. Slikker *et al.* (1998), Academic Press, San Diego.
- 50 Vargas, M.E., Watanabe, J., Singh, S.J., Robinson, W.H. y Barres, B.A. (2010). Endogenous antibodies promote rapid myelin clearance and effective axon regeneration after nerve injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107 (26), 11993-11998.
- 55 Warrington, A.E., Bieber, A.J., Ciric, B., Pease, L.R., Van, K., V, y Rodriguez, M. (2007). A recombinant human IgM promotes myelin repair after a single, very low dose. *J. Neurosci. Res.* 85, 967-976.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. IgG policlonal para su uso en un método de tratamiento de una neuropatía periférica desmielinizante inducida por traumatismo fomentando la mielinización de una célula de nervio periférico mediante una célula de Schwann, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la IgG policlonal a un mamífero al que se le ha diagnosticado dicha neuropatía.
- 10 2. IgG policlonal según la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en la que el mamífero es humano.
- 15 3. IgG policlonal según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la IgG policlonal se administra por vía local.
- 20 4. IgG policlonal según la reivindicación 3 para el uso según la reivindicación 3, en la que la IgG policlonal se administra por vía intramuscular o intradérmica.
- 25 5. IgG policlonal según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la IgG policlonal se administra por vía sistémica.
- 30 6. IgG policlonal según la reivindicación 5 para el uso según la reivindicación 5, en la que la IgG policlonal se administra por vía intranasal, subcutánea, oral, intraarterial o intravenosa.
- 35 7. IgG policlonal según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que se administra un agente antiinflamatorio conjuntamente con la IgG policlonal al mamífero.
- 40 8. IgG policlonal según la reivindicación 7 para el uso según la reivindicación 7, en la que el agente antiinflamatorio es hormona adrenocorticotrópica, un corticosteroide, un interferón, acetato de glatirámero o un fármaco antiinflamatorio no esteroideo.
- 45 9. IgG policlonal para su uso en un método de tratamiento de una neuropatía periférica desmielinizante inducida por traumatismo fomentando la mielinización de una célula de nervio periférico mediante una célula de Schwann y fomentando la diferenciación de una célula de Schwann inmadura en un estado mielinizante, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la IgG policlonal a un mamífero al que se le ha diagnosticado dicha neuropatía.
- 50 10. IgG policlonal según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la IgG policlonal se administra cada semana.
11. IgG policlonal según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la IgG policlonal se administra cada dos semanas.
12. IgG policlonal según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la IgG policlonal se administra cada mes.
13. IgG policlonal según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que la IgG policlonal se administra al mamífero a una dosis de aproximadamente 0,05 a 5 g por kg de peso corporal del paciente.
14. IgG policlonal según la reivindicación 13 para el uso según la reivindicación 13, en la que la IgG policlonal se administra al mamífero a una dosis de aproximadamente 0,5 a 2 g por kg de peso corporal del paciente.

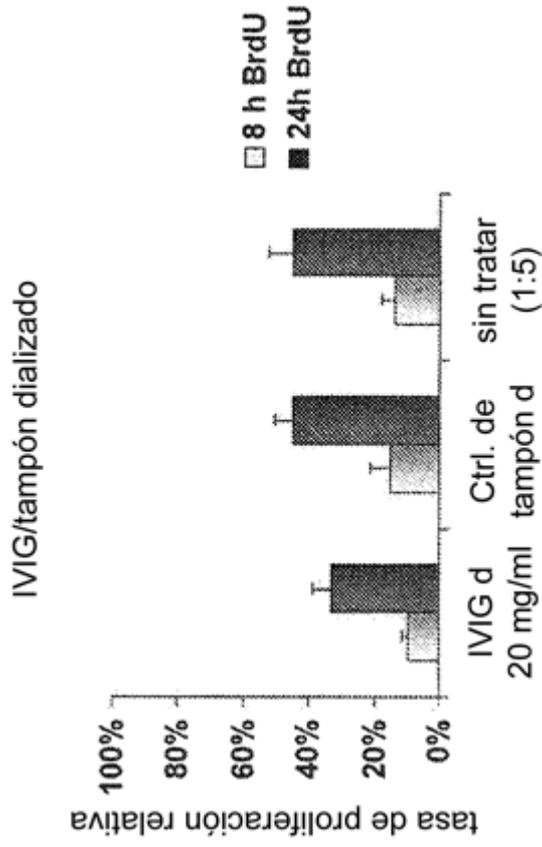


FIG. 1B

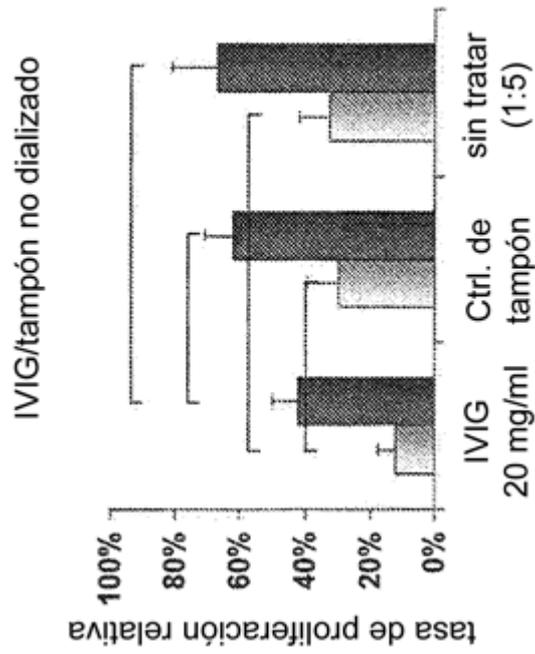


FIG. 1A

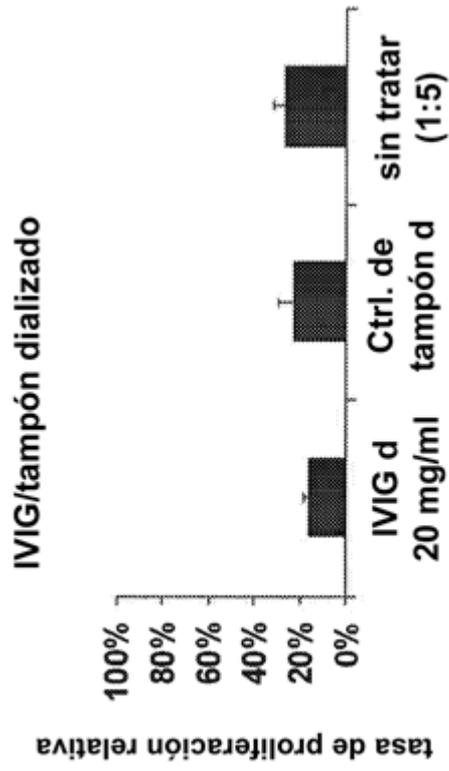


FIG. 2B

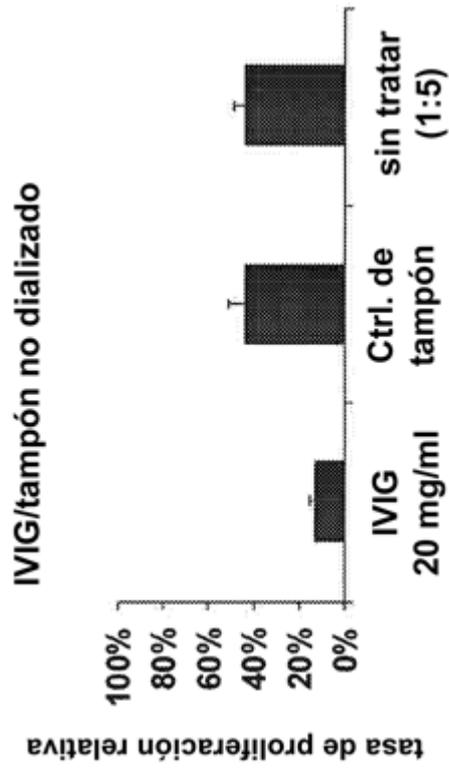


FIG. 2A

FIG. 3B

MBP

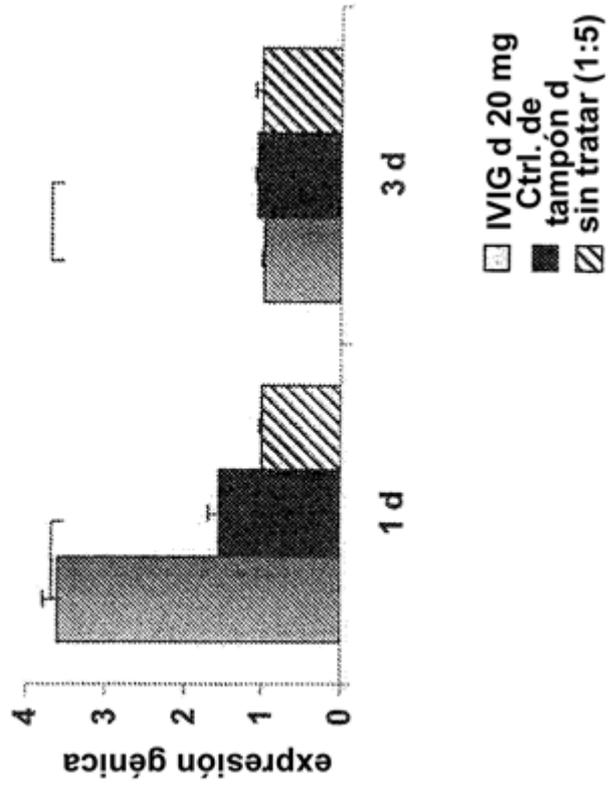


FIG. 3A

P0

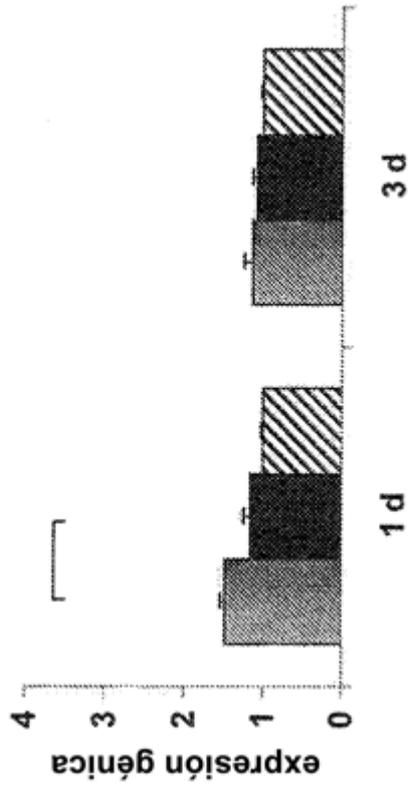


FIG. 4B

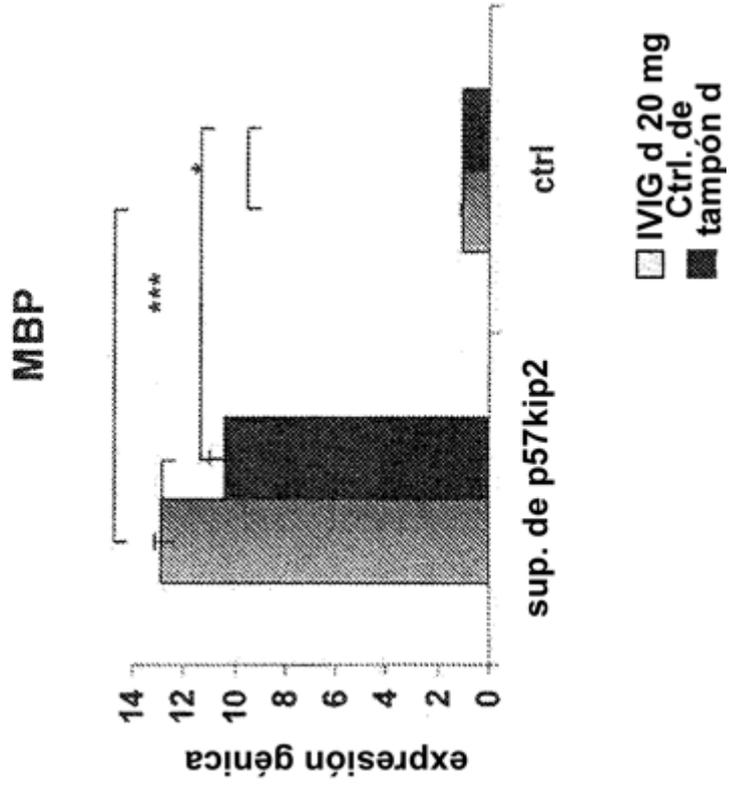


FIG. 4A

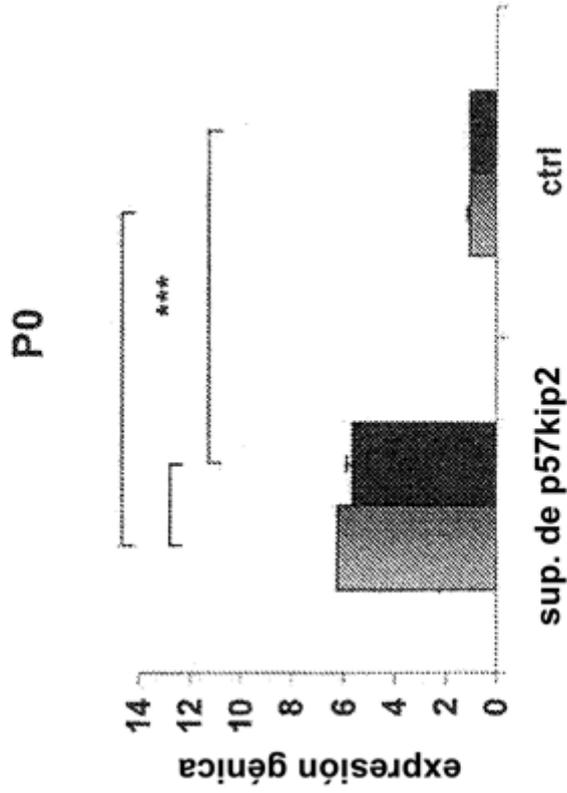
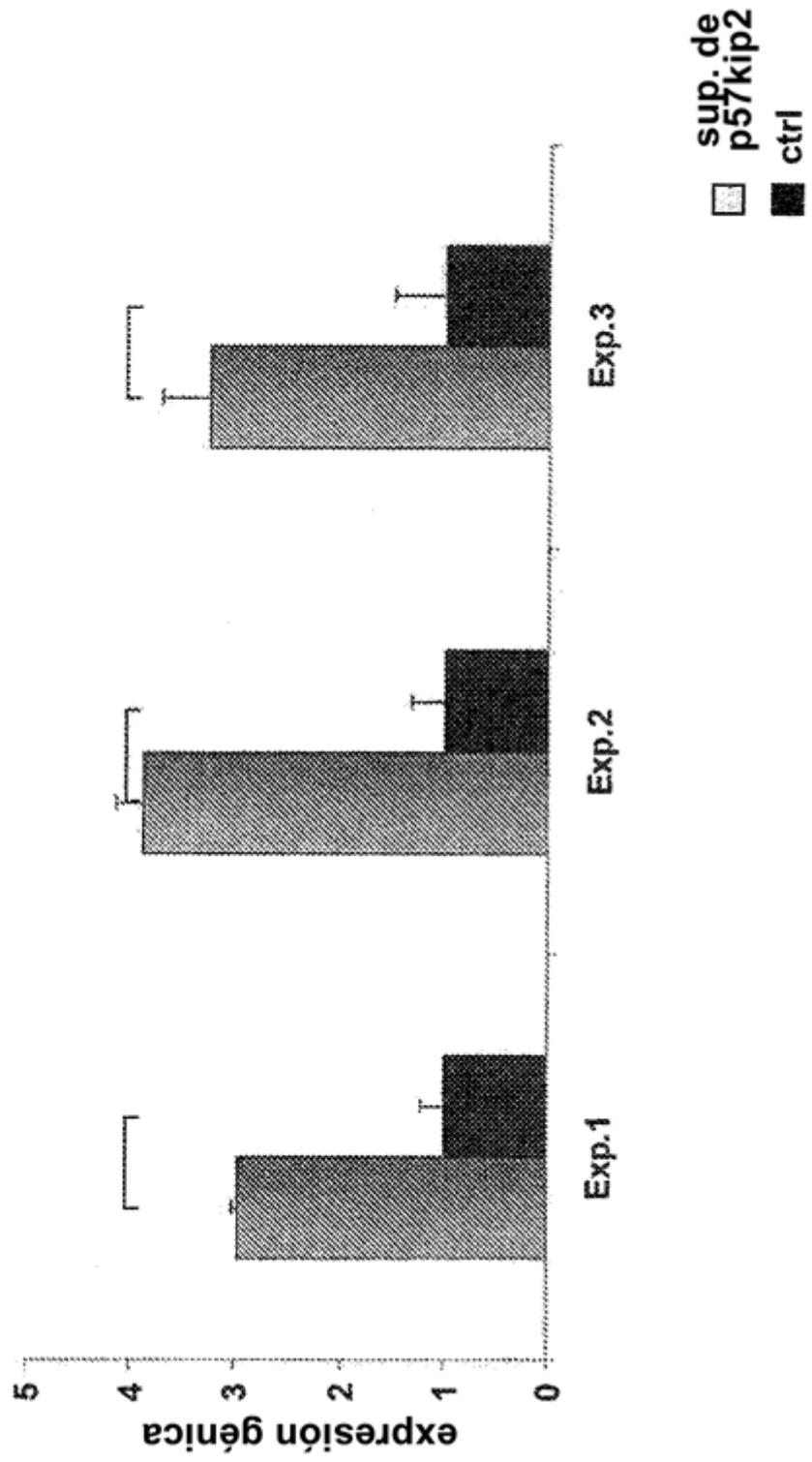


FIG. 5

Receptor de Fc, CD64



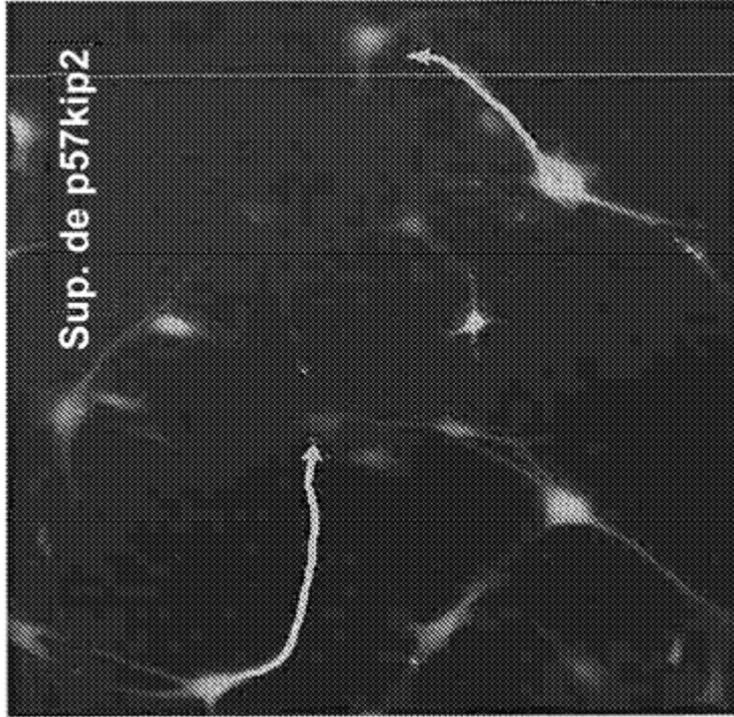


FIG. 6B

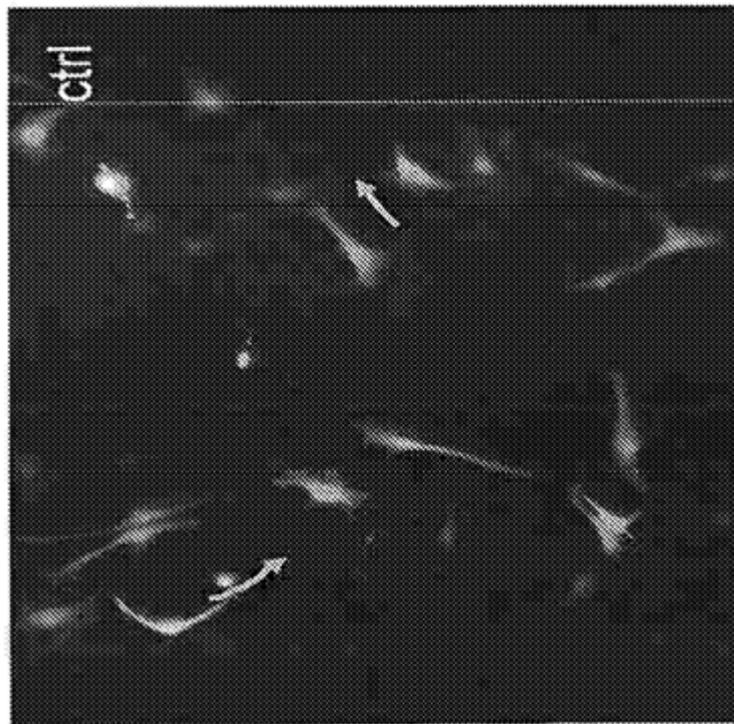


FIG. 6A

FIG. 7A

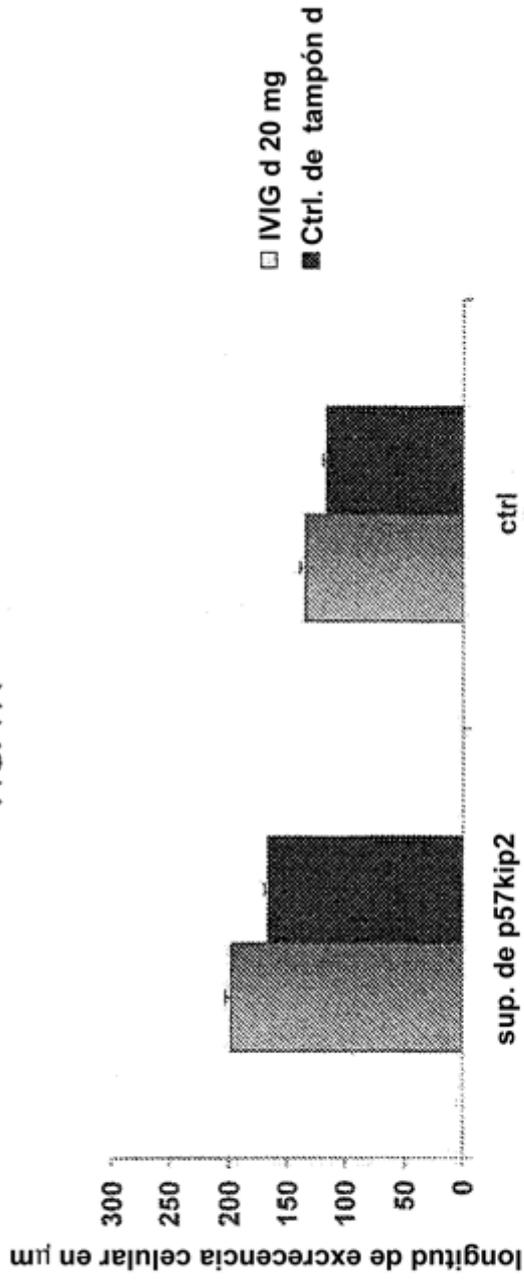


FIG. 7B

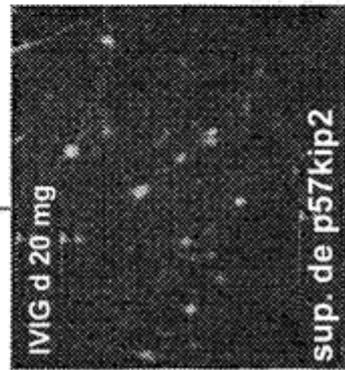


FIG. 7C

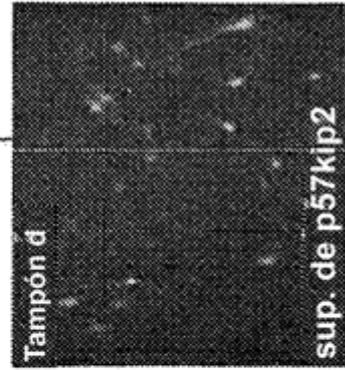


FIG. 7D

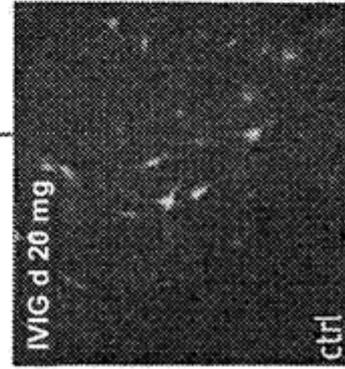


FIG. 7E

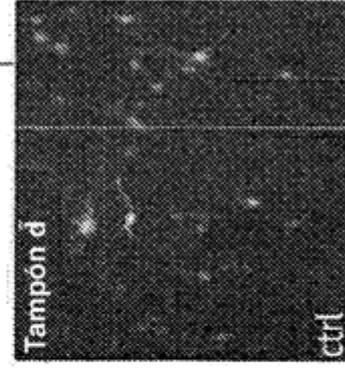


FIG. 8A

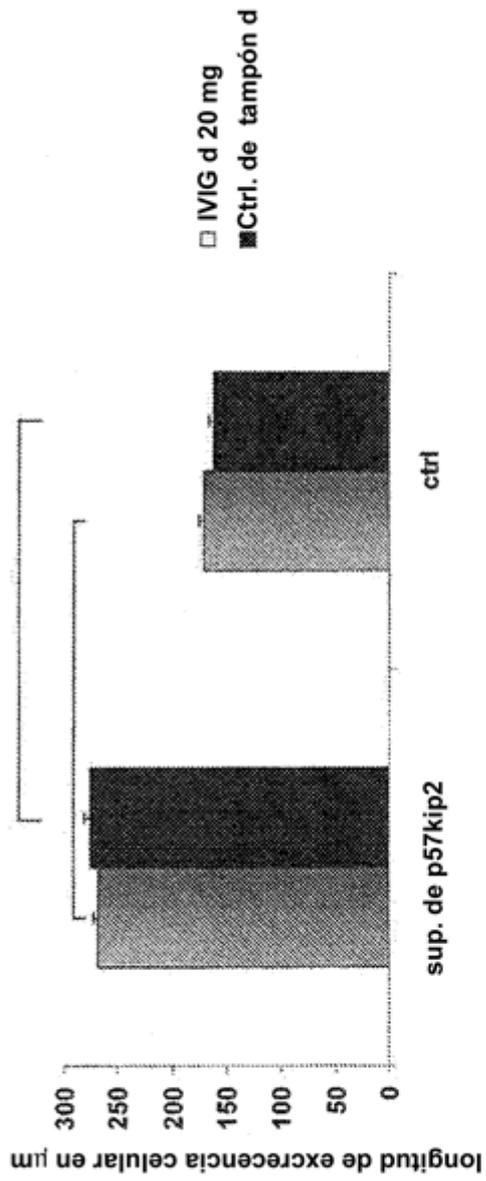


FIG. 8B

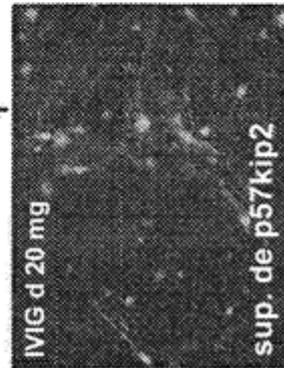


FIG. 8C



FIG. 8D

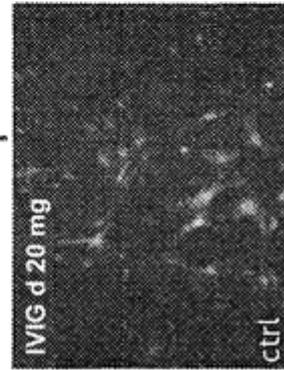
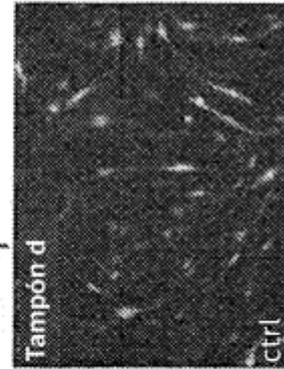


FIG. 8E



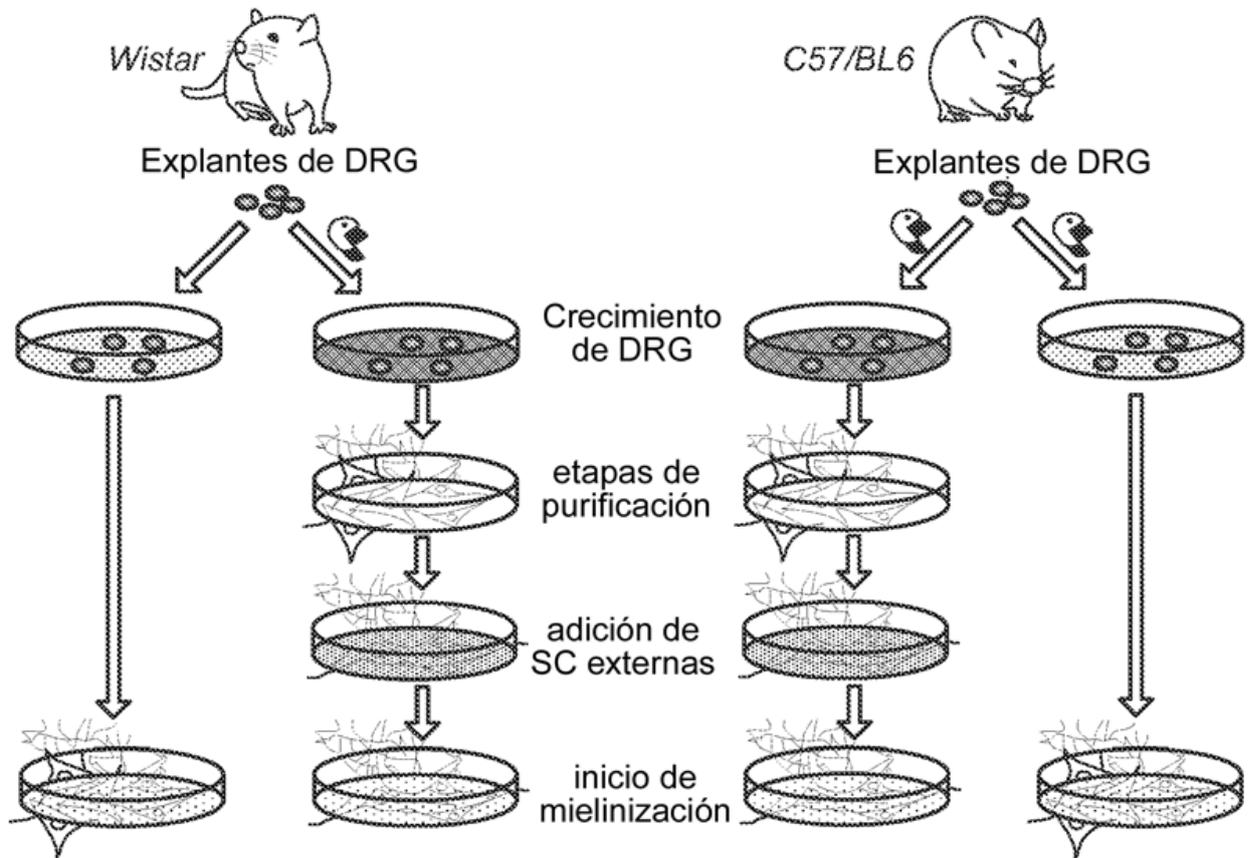


FIG. 9