



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 180 175**

51 Int. Cl.:
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

86 Número de solicitud europea: **98924307 .6**
86 Fecha de presentación : **13.05.1998**
87 Número de publicación de la solicitud: **0981549**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2000**

54 Título: **Uso de una sustancia inhibidora para la mejora de la regeneración neuronal.**

30 Prioridad: **14.05.1997 EP 97107846**

73 Titular/es: **Neuraxo Biopharmaceuticals GmbH**
Max-Planck-Strasse 15a
40699 Erkrath, DE

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.02.2003**

72 Inventor/es: **Müller, H.W. y**
Stichel-Gunkel, Christine

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **01.02.2008**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **01.02.2008**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 180 175 T5

DESCRIPCIÓN

Uso de una sustancia inhibidora para la mejora de la regeneración neuronal.

5 La presente invención se refiere al uso de una sustancia inhibitoria para la mejora de la regeneración neuronal y a un medicamento para la mejora de la regeneración neuronal.

10 Los daños a tractos de fibras del SNC de mamíferos adultos conduce a la formación de una cicatriz de la lesión consistente en una franja enroscada de procesos astrogiales revestidos por una membrana basal (BM). Esta cicatriz de la lesión está implicada como una limitación extrínseca principal para la regeneración efectiva del axón en el cerebro y la médula espinal (1 - 4). Aunque la red densa de astrocitos es un sustrato permisivo para el crecimiento del axón (5, 6), ha sido establecida la hipótesis de que la presencia de BM es un impedimento crucial para la regeneración (7). Sin embargo, no se mostró evidencia experimental. Por el contrario, cuando la BM formada después de una lesión del tejido neuronal fue retirada (24), no pudo ser monitorizada de forma reproducible una regeneración mejorada (25).
15 Por tanto, es todavía de gran importancia tener un método para mejorar la regeneración de neuronas dañadas.

20 El documento WO 93/19783 describe un método para prevenir, suprimir o tratar una patología del SNC caracterizada por una acumulación nociva de matriz extracelular en un tejido al contactar el tejido con un agente que inhibe la actividad de producción de matriz extracelular de TGF- β . Los métodos descritos pueden ser usados para prevenir, suprimir o tratar la formación de cicatriz en el SNC. Como agentes útiles son indicados anticuerpos anti-TGF- β neutralizantes, péptidos que contienen Arg-Gly-Asp, decorina y su equivalencia funcional tal como biglicano o antagonistas TGF- β . TGF- β tiene un amplio espectro de funciones fisiológicas tales como la activación de células del sistema inmune, la inhibición de la proliferación celular, efectos neurotróficos sobre neuronas sensoriales, inhibición de la mielinización de células de Schwann, efectos antiproliferativos sobre células gliales, efectos inmunosupresores, estimulación de deposición de matriz extracelular y quimioatracción de células microgliales. El tratamiento con anti-TGF- β induciría los efectos opuestos. La inhibición de la actividad de TGF- β conduce a numerosas respuestas celulares no específicas, que podrían conducir incluso a efectos secundarios no deseados. Un objeto de la invención es evitar tales efectos secundarios potenciales no deseados.

30 El documento US-A-5.082.926 describe la capacidad de un péptido competidor para favorecer la regeneración nerviosa e indica el uso clínico para favorecer la regeneración de nervios dañados. Se ha especulado que el péptido descrito es importante en muchos procesos diversos y clínicamente relevantes, tales como la fijación y migración de células en el curado de heridas, invasión y metástasis de células tumorales, microangiopatía diabética, hipertrofia vascular debida a hipertensión y varias enfermedades renales tales como nefropatía diabética y síndromes nefríticos de etiología variable.
35

El documento US-A-5.493.008 describe la fijación de alta afinidad del nidogen a la laminina para ser mediado por una repetición γ 1III4 de tipo EGF de la cadena laminina γ 1 del ratón.

40 El documento WO-A-96/00582 describe el uso de dominios aislados de colágeno tipo IV para modificar las interacciones célula y tejido. El dominio 7S del colágeno tipo IV interrumpe la agregación de células y el desarrollo de tejido. Los cambios estructurales en mesoglea, la inhibición de proliferación celular y cambios en los modelos de diferenciación celular acompañan al bloqueo de agregados celulares que indican que el bloqueo puede ser debido a alteraciones en la estructura de mesoglea (matriz extracelular) con efectos asociados sobre el comportamiento celular. El colágeno tipo IV tiene un papel crítico en formación inicial de mesoglea y la perturbación de la formación de mesoglea afecta a la división celular, diferenciación celular y morfogénesis.
45

Sorprendentemente, la mejora de la regeneración de tejido neuronal después de la lesión se consigue mediante el uso de una sustancia inhibidora de la presente invención para la fabricación de un medicamento para la mejora de la regeneración neuronal.
50

Según el método de la invención la regeneración mejorada del tejido neuronal dañado se consigue por prevención o inhibición específica de la formación de membrana basal inducida por una lesión del tejido neuronal aplicando una sustancia inhibidora de la síntesis de elementos de construcción de membrana basal, o el ensamblaje de elementos de construcción de membrana basal, o ambos la síntesis de elementos de construcción de membrana basal y el ensamblaje de elementos de construcción de membrana basal a un cuerpo que lo necesite, en el que la sustancia inhibidora es seleccionada del grupo formado por anticuerpos contra el colágeno IV, laminina, entactina, sustancias auxiliares para la función apropiada o el ensamblaje de la membrana basal; agentes quelantes del hierro; inhibidores de hidroxilasas de aminoácidos, tales como proil-4-hidroxilasa, lisina-hidroxilasa; competidores del 2-oxoglutarato.
55

60 La membrana basal es una estructura que está formada por diferentes elementos. Los elementos de la membrana basal son colágeno IV, laminina, sustancias auxiliares de entactina (Nidogen). El ensamblaje de los elementos a la membrana basal se realiza por medio de enzimas lo que puede ser asistido por cofactores.

65 Los inhibidores del TGF- β no están implicados en una prevención específica o inhibición específica de la formación de membrana basal inducida por la lesión del tejido neuronal. Según la presente invención se consigue de forma ventajosa que se proporcione una interacción específica por el uso según la invención.

ES 2 180 175 T5

Preferiblemente, la formación de la membrana basal es prevenida o inhibida por la aplicación de una sustancia específica inhibidora de la síntesis de elementos de construcción de membrana basal, o el ensamblaje de elementos de construcción de membrana basal o ambos la síntesis de elementos de construcción de membrana basal y el ensamblaje de elementos de construcción de membrana basal a un cuerpo que lo necesite. Los elementos de construcción de membrana basal son en particular aquellos que están implicados en la formación de la membrana basal, por ejemplo estructuras moleculares que constituyen la membrana basal, tales como compuestos monoméricos, sustancias auxiliares, sustancias para el ensamblaje de los componentes de la membrana basal y similares.

En particular, los elementos de construcción de la membrana basal son seleccionados del grupo consistente en colágeno IV, laminina, entactina, sustancias auxiliares para la función apropiada o el ensamblaje de la membrana basal, o ambos la función apropiada y el ensamblaje de la membrana basal.

Una sustancia inhibidora específica de la invención es capaz de prevenir o inhibir la formación de la membrana basal y/o está interfiriendo específicamente con el proceso de ensamblaje de la membrana basal. La sustancia inhibidora específica de la invención es seleccionada del grupo consistente en anticuerpos contra el colágeno IV, laminina, entactina, sustancias auxiliares para la función apropiada, o el ensamblaje de la membrana basal; agentes quelantes del Fe; inhibidores de hidroxilasas de aminoácidos, tales como prolil-4-hidroxilasa, lisina-hidroxilasa; competidores del 2-oxoglutarato; siendo dicha sustancia inhibidora capaz de prevenir o inhibir la expresión de los elementos de construcción de la membrana basal y similares.

Según la invención, son preferidas aquellas sustancia inhibidoras seleccionadas del grupo consistente en N-oxaloglicina; sales de Zn; derivados de piridina, tales como derivados del 5-arilcarboniamino o 5-arilcarbamoilo, 2-carboxilato, 2,5-dicarboxilato, sus ésteres etílicos o etil-amidas ó -5-acilsulfonamidas, 2,4-dicarboxilato, sus ésteres etílicos o etil-amidas, o dimetoxietilamidas; 3,4-bipiridina, tal como 5-amino-6-(1H)-ona, 1,6-dihidro-2-metil-6-oxo-5-carbonitrilo; 2,2'-bipiridina, tal como ácido 5,5'-dicarboxílico o sus sales farmacéuticamente aceptables, éster etílico o etil-amida de ácido 4,4'-dicarboxílico; 3,4'-dihidroxibenzoato, tal como el éster dietílico; prolina y sus análogos estructurales y funcionales; β -aminopropionitrilo; deferroxamina, antraciclina; 2,7,8-trihidroxiantraquinonas, fibrostatina-C; ácido cumálico o sus sales farmacéuticamente aceptables; antibióticos 5-oxaprolina, β -lactama.

En una realización preferida de la presente invención la(s) sustancia(s) inhibidora(s) específica(s) son aplicadas en combinación con una o más sustancias que sean capaces de estimular el crecimiento neuronal o inducir la expresión de proteínas que favorecen el crecimiento. Tales sustancias que estimulan el crecimiento neuronal son factores de crecimiento neurotrófico de la familia de la neurotrofina y otras familias de factores de crecimiento tales como factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento como insulina y similares a la insulina, así como factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento neurotrófico ciliar (CNTF), factor de crecimiento derivado de células gliales (GDNF), citoquinas, proteoglicanos neurotróficos y glucosaminoglicanos, moléculas de adhesión de células neurales como I1 (NILE), proteínas asociadas al crecimiento como GAP43 y proteínas anti-apoptóticas como bcl-2.

Según la invención es preferido aplicar localmente las sustancias inhibidoras específicas en el tejido neuronal, intraventricularmente, o sistémicamente, en particular oral o intravenosamente.

La concentración de la sustancia inhibidora específica varía en virtud de la naturaleza química. Por ejemplo, sustancias inhibidoras antisentido pueden tener más efectos específicos por lo que pueden ser aplicadas cantidades menores.

Típicamente, la sustancia inhibidora específica es aplicada en cantidades terapéuticamente efectivas, tales como 1 ng/kg a 1 mg/kg de peso del cuerpo, cuando son aplicados compuestos moleculares bajos tales como derivados del bipiridil.

La invención también proporciona un medicamento para la mejora de la regeneración neuronal que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una sustancia inhibidora específica que puede prevenir o inhibir la formación de membrana basal inducida por una lesión del tejido neuronal. De acuerdo con la invención, las sustancias inhibidoras son las reivindicadas en la reivindicación 5. El medicamento puede comprender además sustancias portadoras o adyuvantes para facilitar una aplicación apropiada. El medicamento comprende, además, sustancias que puedan estimular el crecimiento neuronal según se reivindica en la reivindicación 5.

Fig. 1

Expresión de colágeno IV y brote axonal después de la transección del fórnix postcomisural en animales no tratados (b-d) y después de la inyección de anti-col IV (e) o DPY (f) dos semanas después de la operación; a) vista sagital del cerebro de una rata adulta que muestra el curso del fórnix y la localización del lugar de la transección. Deposición marcada de colágeno IV en el lugar de la lesión (flecha) y muñón proximal (P) de un animal no tratado con bajo aumento (b) o alto aumento (c). Obsérvese la estructura fina y la orientación espacial de los depósitos de colágeno VI perpendicular a la trayectoria del tracto; d) en animales no tratados el recrecimiento de los axones del fórnix se detiene bruscamente en el lugar de la lesión (flecha). La deposición de colágeno IV se reduce notoriamente en el lugar de la lesión después de la inyección de anti-col IV (e) o DPY (f). Barras de escala, 100 μ m.

Fig. 2

Regeneración de fibras de fórnix transeccionadas a través del lugar de lesión en ratas tratadas con anti-Col IV (a, c, e) o DPY (b, d, f) a las 6 semanas de la operación. Secciones sagitales en serie sometidas a reacción por inmunohistoquímica NF muestran que en ambos grupos experimentales las fibras atraviesan el lugar de lesión anterior (flechas) (c, d) y se extienden dentro del muñón distal (e, f) hasta el cuerpo mamilar (MB). Barras de escala, 100 μm .

Fig. 3

Recuperación de las características estructurales del tracto de fórnix en regeneración; a), b) el trazado anterógrado con biocitina de un animal tratado con anti-col IV a las seis semanas de la operación revela el gran número de axones en regeneración (a), su prolongación dentro de la trayectoria anterior (a) y su morfología varicosa fina (b); c) axón grande lleno de WGA-HRP (cabeza de la flecha) en el cuerpo mamilar rodeado por mielina compacta (flechas); d), e) micrográficas electrónicas de terminales presinápticos marcados con WGA-HRP anterógradamente (cabezas de las flechas) en el cuerpo mamilar a las 6 semanas de tratamiento con anti-col IV. Barras de escala, 100 μm (a), 50 μm (b), 0,1 μm (c), 0,5 μm (d), 1 μm (e).

Fig. 4

Propiedades electrofisiológicas de las fibras de fórnix en ratas no lesionadas y animales lesionados/inyectados con regeneración; a), ilustración esquemática que muestra la localización del electrodo de estimulación (S) y registro (R) en diversos estados; b) registros característicos de potenciales de acción extracelular en un corte sagital preparado a partir de un animal con regeneración. Los registros fueron obtenidos bajo las condiciones ilustradas en a). La aplicación de tetrodotoxina (TTX) bloquea la respuesta provocada por el estímulo. El potencial de acción puro se muestra en el trazado 5; c) y d), distribución de la velocidad de conducción y amplitud de respuesta del potencial de acción en animales no lesionados y lesionados/inyectados con regeneración.

El fórnix postcomisural transeccionado mecánicamente de la rata adulta, un tracto de fibras unidireccional y bien caracterizado (8, 9) fue usado para determinar si la modulación bioquímica específica o inmunoquímica de la formación de BM proporcionaría medios para estimular la regeneración del axón. Aquí se da cuenta de que la deposición de BM inducida por la lesión puede ser reducida significativamente por inyección local de anticuerpos anti-colágeno IV o α,α dipiridil, un inhibidor de la formación y síntesis de la triple hélice del colágeno. La reducción de la red de colágeno permitió el alargamiento masivo del axón a través del lugar de la lesión. Las fibras de fórnix regeneradas siguieron la trayectoria original, reinervaron su objetivo apropiado, el cuerpo mamilar, fueron remielinizadas y consiguieron propiedades de conducción casi normales. En el fallo de los axones del SNC de mamíferos adultos fue examinado su modelo de distribución espacio-temporal después de la lesión penetrante del SNC y se determinó si su remodelación permite la regeneración estructural y funcional de un tracto de fibras del SNC transeccionado.

El fórnix postcomisural izquierdo fue transeccionado estereotácticamente en ratas Wistar adultas (Fig. 1a) y la deposición después de la lesión de la BM fue analizada usando anticuerpos contra el colágeno IV (Col IV) y laminina (LN), los principales y únicos componentes de la BM (10, 11). Al final de la segunda semana después de la lesión, el centro de la herida se llenó de BM rica en Col IV y en LN (Fig. 1b, c). Estas BM recién formadas fueron dispuestas en largas capas continuas o asociadas a numerosos vasos sanguíneos. Dentro del centro de la herida las capas de BM formaban una matriz paralela alineada perpendicular al curso del tracto de fibras (Fig. 1b, c). En la vecindad de los muñones transeccionados, sin embargo, las capas de BM fueron depositadas como vueltas de tipo gancho extendiéndose a lo largo del eje longitudinal del tracto a través de aproximadamente 200 μm dentro de los muñones de fórnix (Fig. 1c). En paralelo con la deposición de la BM, los axones que brotan en el muñón proximal alcanzaron el sitio de la lesión. Fracasaron en cruzarlo o bifurcarlo pero detuvieron el crecimiento en el borde de la herida aproximadamente 2 semanas después de la lesión (Fig. 1d). La coincidencia espaciotemporal de la formación de BM con la detección abrupta del crecimiento axonal en el borde de la lesión del tracto sugiere fuertemente que las capas perpendiculares recién formadas de BM podrían ser un impedimento físico para la regeneración de los axones.

En un esfuerzo para modular la deposición de BM después de la lesión, anticuerpos policlonales contra el colágeno IV (anti-col IV; n = 14) o el quelante del hierro α,α -dipiridilo (DPY; n = 9) fueron inyectados localmente dentro del centro de la lesión inmediatamente después de la transección. DPY es un inhibidor competitivo de la prolil 4-hidroxilasa (12) y se ha mostrado que previene la formación de la triple hélice del colágeno (12), que tiene como resultado la inhibición de retroalimentación de la síntesis de procolágeno (13) y una degradación mejorada del procolágeno (14). Los animales de control recibieron una inyección PBS (n = 9) o fueron operados simuladamente. La formación de membrana basal fue estudiada en respuesta al tratamiento con anticuerpos y drogas usando métodos inmunohistoquímicos. Los animales que recibieron una inyección única de anti-col IV (80 -160 ng) o DPY (1,6 -16 μmol) mostraron una reducción masiva y específica en las láminas col-inmunopositivas y vasos sanguíneos en el centro de la lesión y los muñones de fórnix en todos los tiempos de supervivencia examinados. Dos semanas después de lesión + inyección sólo se había desarrollado un número muy pequeño de estructuras col-inmunorreactivas perpendiculares al curso del tracto (Fig. 1e, f). Los animales de control, sin embargo, mostraban deposición de BM densa como se describió anteriormente sólo para animales lesionados. Las sustancias aplicadas redujeron la deposición de BM en el lugar de lesión pero no afectaron al número o a la distribución de BM vascular en el neuropilo circundante. Por tanto, se concluye que la formación de BM inducida por la lesión puede ser reducida específicamente por aplicación inmediata de anticuerpos anti-col IV o DPY.

Para determinar si la reducción de la deposición de BM permitiría la regeneración de los axones transeccionados a través del lugar de lesión se estudió la elongación de los axones del fórnix tras el tratamiento con anti-col IV o DPY usando tinción inmunocitoquímica. Aunque el brote de fibras de fórnix en animales de control cesó de crecer en la interfaz muñón proximal - lesión (Fig. 1d) un gran número de axones entró y atravesó el centro de la lesión entre 2 y 4 semanas después de lesión + inyección en aquellos animales que recibieron tratamiento anti-col IV (n = 11) (Fig. 2 a, c, e) o DPY (n = 6) (Fig. 2 b, d, f). La mayoría de los axones en regeneración formaron un bucle sobre el lugar de la lesión, entraron en el muñón distal y continuaron en un haz paralelo de axones finos y en forma de cuenta dentro de su trayectoria anterior (Fig. 3 a, b). Alcanzaron su objetivo apropiado, el cuerpo mamilar, aproximadamente 4-6 semanas después de la operación. El trazado anterógrado con WGA-HRP dentro del subículo, el origen del fórnix (no mostrado), o la aplicación de biocitina dentro del muñón proximal del fórnix (Fig. 3a) proporcionaron la prueba de que la amplia mayoría de las fibras surgen del tracto de fórnix transeccionado anteriormente. Todos los axones del fórnix en regeneración permanecieron dentro de su trayectoria original y no invadieron el neuropilo circundante. Los resultados presentes demuestran que el fallo de la regeneración del fórnix postcomisural en el cerebro de la rata, en efecto, depende de la formación de una BM que inhibe el crecimiento del axón en el lugar de lesión que está orientado perpendicular al curso del tracto. La reducción de la deposición de BM parece ser un prerrequisito, así como una condición suficiente para que se regeneren los axones transeccionados a través del lugar de la lesión.

Otras realizaciones preferidas para la restitución de los circuitos funcionales después de una lesión traumática del SNC son la remielinización de las fibras regeneradas, el restablecimiento de conexiones sinápticas con el objetivo apropiado y la restauración de las propiedades de conducción normales. Las propiedades estructurales y funcionales de los axones en regeneración fueron investigadas usando métodos inmunohistoquímicos, morfológicos y electrofisiológicos. La inmunohistoquímica con un anticuerpo contra la proteína básica mielina demostró la remielinización de los axones del fórnix regenerados a lo largo de toda su longitud tan sólo 4 semanas después de la operación (no se muestran los datos). Esta observación fue confirmada mediante el análisis extraestructural de los axones marcados con WGA-HRP anterógradamente en el muñón distal que mostró evidencia clara de formación de vaina de mielina compacta (Fig. 3c). Además, los estudios ultraestructurales proporcionaron evidencia del restablecimiento de las conexiones sinápticas de los axones en regeneración dentro del cuerpo mamilar. El producto de reacción del trazador fue identificado en perfiles presinápticos con vesículas redondeadas que formaban uniones sinápticas asimétricas en dendritas no marcadas (Fig. 3d, e). Las características ultraestructurales de los perfiles presinápticos marcados se corresponden con las descritas para el tipo RA (redondo, asimétrico) de terminal sináptico que es considerado de origen subicular (8). Las propiedades electrofisiológicas de las fibras regeneradas fueron estudiadas usando técnicas de registro extracelular *in vitro* aplicadas a cortes sagitales de cerebro (400 μ m) de 8 ratas no lesionadas y 4 animales tratados que mostraban trectos de fibras regenerados. En los animales no lesionados, la estimulación eléctrica de las fibras de fórnix provocó un potencial de acción extracelular con una amplitud de $1,02 \pm 0,14$ mV y una velocidad de conducción de $0,48 \pm 0,05$ m/s (media \pm SEM, n = 16, Fig. 4b-d). Esta velocidad de conducción axonal corresponde bien a las medidas indicadas anteriormente (aproximadamente 0,5 m/s para colaterales de Schaffer de hipocampo) (15). Valores similares para la amplitud de potencial de acción y velocidad de conducción ($1,12 \pm 0,21$ mV, $0,46 \pm 0,1$ m/s, n = 5) fueron obtenidos en animales en regeneración cuando los electrodos de estimulación (S) y registro (R) fueron posicionados próximamente al lugar de la lesión (véase S1 y R1 en la Fig. 4a). En estos últimos animales, fibras funcionalmente intactas que mostraban amplitud de potencial de acción extracelular y velocidad de conducción normales podrían también ser demostradas a través del lugar de la lesión (S3 y R3 en la Fig. 4a; $0,8 \pm 0,29$ mV, $0,54 \pm 0,14$ m/s, n = 3) y distalmente al lugar de la lesión (S2 y R2 en la Fig. 4a; $0,91 \pm 0,24$ mV, $0,43 \pm 0,06$ m/s, n = 4) (Fig. 4c, d). En todos los animales, las respuestas extracelulares provocadas por el estímulo fueron bloqueadas mediante tetrodotoxina, confirmando su naturaleza como potenciales de acción + - dependientes de Na (Fig. 4b). A partir de estos datos se concluye que la reorganización del tracto del fórnix está acompañado por recuperación estructural y funcional de los axones regenerados.

Estos resultados demuestran que la restauración estructural y funcional de la trayectoria del fórnix maduro lesionado puede conseguirse por reducción de formación de BM en el lugar de la lesión. Los datos aquí descritos subrayan la importancia de determinantes extrínsecos en la regeneración axonal, pero también demuestran que una vez que los axones han atravesado la cicatriz de la lesión otras limitaciones extrínsecas potenciales para la regeneración, como mielina y oligodendrocitos del SNC (9, 16-18), astrogliosis densa (6) y proteoglicanos sulfatados (19, 20) no impiden su progreso. Los resultados indican además que de forma similar a otros circuitos del SNC (21, 22), los axones del fórnix tienen un potencial innato para regeneración y autoorganización. Estos resultados dan lugar a conceptos nuevos y prometedores para estrategias terapéuticas que podrían contribuir a la reducción de los déficits neurológicos después de las lesiones del SNC.

Los siguientes ejemplos están pensados para ilustrar más la invención pero no son limitativos.

Cirugía

El fórnix postcomisural izquierdo de 42 ratas Wistar (180-210 g) fue transeccionado estereotácticamente a una distancia de aproximadamente 1 mm proximal al objetivo, el cuerpo mamilar, usando una cuchilla metálica Scouten como se describió anteriormente (9). La integridad de la transección fue confirmada por la reconstrucción en serie del lugar de la lesión para cada uno de los animales. Inmediatamente después de la transección los animales recibieron una aplicación tópica (1,6 μ l) de anticuerpos policlonales contra el colágeno IV (anti-col IV, Biogenex 50-100 μ g/ml, n = 14) o el quelante del hierro a, a'-dipiridilo (DPY, 1-10 mM, n = 9). Las sustancias fueron inyectadas a presión (tiempo

ES 2 180 175 T5

de inyección 10 min) directamente sobre el lugar de la lesión vía una micropipeta acoplada a una microjeringuilla. Los controles recibieron cantidades iguales de salino con tampón de fosfato (n = 9) o operación simulada (n = 3).

El trazado anterógrado fue realizado para el análisis del curso de la fibra, morfología ultraestructural y reinervación del objetivo. Después de un tiempo de supervivencia de 6 semanas, los animales tratados con anti-col IV (n = 4) recibieron dos inyecciones de una solución al 2% (w/v) HPR de aglutinina de germen de trigo (WGA-HRP) dentro del complejo subicular izquierdo (polo dorsal y caudal). A las ratas se les aplicó por perfusión 3 días después paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 2% en un tampón de fosfato de 0,1 M. Secciones de vibratomo fueron sometidas a reacción por WGA-HRP usando tetrametilbencidina como sustrato (23).

Microscopio electrónico

Para el análisis estructural las secciones de vibratomo de los animales tratados con anti-col IV fueron sometidas a reacción por WGA-HRP, inmersas durante 12 horas en tetróxido de osmio al 1% e incluidas en epon. Las secciones ultrafinas fueron examinadas usando un microscópico electrónico Hitachi H600.

Tinción inmunohistoquímica

Tras un tiempo de supervivencia de 4 días (d), 6d, 2 semanas (s), 4s y 6s después de la operación los cerebros fueron retirados, congelados en isopentano (-50/-60°) y cortados en secciones sagitales en serie de 10 µm de espesor. Las secciones fueron fijadas con acetona (-20°C), preincubadas en H₂O₂ al 3% (v/v) en metanol para bloquear la peroxidasa endógena, seguido por PBS conteniendo 3% (v/v) de suero de caballo normal o cabra normal para reducir la tinción no específica y luego incubadas con uno de los siguientes anticuerpos primarios: anti-colágeno IV policlonales (anti-col IV, Biogenex, 1:3), anti-laminina policlonal (anti-LN, Biogenex, 1:5) o cóctel monoclonal contra neurofilamentos fosforilados (anti-NF, afinidad, 1:800). A continuación, se realizó tinción compleja con avidina-biotina-peroxidasa (Vector Labs) usando procedimientos estándar. Para la evaluación de la remielinización, los cerebros fueron fijados con paraformaldehído al 4%, paraafinados, cortados en secciones sagitales en serie de 3 µm de espesor, desparaafinados e incubados como se describió antes con proteína básica anti-mielina policlonal (anti-MBP, Biogenex, 1:2) o anti-NF como anticuerpos primarios. La especificidad de las tinciones fue confirmada por omisión del anticuerpo primario.

Electrofisiología e inyecciones de biocitina.

Las secciones sagitales de 400 µm de espesor fueron cortadas sobre un vibratomo y mantenidas a 34-35° en una cámara de registro de tipo interfaz. Fluido cerebro-espinal artificial (ACSF) formado por (en mM) 124 NaCl, 3 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 1,8 MgSO₄, 1,6 CaCl₂, 26 NaHCO₃ y 10 glucosa con un pH de 7,4 al ser saturado con 95% de O₂ -5% de CO₂. Estímulos: 100 µs, 5-20 V fueron suministrados vía un electrodo de tungsteno bipolar. Los potenciales de acción extracelular fueron registrados con un electrodo de registro (3-5 MW) localizado en el medio del fórnix postcomisural. Fue aplicada tetrodotoxina (TTX, Sigma) localmente en una concentración de 10 µM (disuelta en ACSF) con una micropipeta partida colocada sobre la superficie de la sección cerca del lugar de registro. Inyecciones de un pequeño cristal de biocitina (Sigma) dentro del fórnix fueron realizadas con una aguja miniatura. Tras un período de incubación de 8-10 h en la cámara de interfaz, las secciones fueron fijadas en paraformaldehído al 4%, reseccionadas y sometidas a reacción con reagente ABC peroxidasa (Vector Labs).

1. Reier, P.J., Stensaas, L. J. & Guth, L. *Spinal cord reconstruction* (eds Kao, C.C., Bunge, R.P. & Reiter, P.J.) 163-196 (Raven Press, Nueva York, 1983).

2. Clemente, C. D. *Regeneration in the nervous system* (ed Windle, W.F.) 147-161 (Charles C. Thomas, Springfield, IL, 1955).

3. Schnell, L. & Schwab, M. E. *Eur. J. Neurosci* **5**, 1156-1171 (1993).

4. Krüger, S., Sievers, J., Hansen, C., Sadler, M. & Berry, M. *J. Comp. Neurol* **249**, 103-116 (1986).

5. Berry, M., Carlile, J. & Hunter, A. *J. Neurocytol* **25**, 147-170 (1996).

6. Stichel, C. C. & Müller, H. W. *J. Neurocytol* **23**, 615-630 (1994).

7. Feringa, E. R., Kowalski, T. F. & Vahlsing, H. L. *Ann. Neurol* **8**, 148-154 (1980).

8. Allen, G. V. & Hopskins, D. A. *J. Comp Neurol* **275**, 39-64 (1988).

9. Stichel, C. C., Wunderlich, G., Schwab, M. E. & Müller, H. W. *Europ. J. Neurosci* **7**, 401-411 (1995).

10. Yurchenco, P. D. & Schittny, J. C. *FASEB. J* **4**, 1577-1590 (1996).

11. Timpl, R. & Brown, J. *Curr. Opin. Cell. Biol* **8**, 618-624 (1996).

12. Kivirikko, K. L., Myllylä, R. & Pihlajaniemi, T. *FASEB. J* **3**, 1609-1617 (1989).

ES 2 180 175 T5

13. Ikeda, H., Wu, G. Y. & Wu, C. H. *Hepatology* **15**, 282-287 (1992).
14. Bienkowski, R. S. *J. Cell. Physiol* **121**, 152-158 (1984).
- 5 15. Andersen, P., Silfvenius, H., Sundberg, S., Sveen, O. & Wigström, H. *Brain. Res* **144**, 11-18 (1978).
16. McKerracher, L. y otros *Neuron* **13**, 805-811 (1994).
17. Mukhopadhyay, G., Doherty, P., Walsh, F. S., Crocker, P. R. & Filbin, M. T. *Neuron* **13**, 757-767 (1994).
- 10 18. Schwab, M. E. & Caroni, P. *J. Neurosci* **8**, 2381-2393 (1988).
19. Snow, A. D., Lemmon, V., Carrino, D. A., Caplan, A. I. & Silver, J. *Exp. Neurol* **109**, 111-130 (1990).
- 15 20. Lips, K., Stichel, C. C. & Müller, H. W. *J. Neurocytol* **24**, 449-464 (1995).
21. Iwashita, Y., Kawaguchi, S. & Murata, M. *Nature* **367**, 167-170 (1994).
22. Kalderon, N. & Fuks, Z. *Proc. Natl. Acad. Sci* **93**, 11179-11184 (1996).
- 20 23. Olucha, F., Martinez-Garcia, F. & López-Garcia, C. *J. Neurosci. Meth* **13**, 131-138 (1985).
24. Puchala, E. & Windle, W. F., *Exp. Neurol.* **55**, 1-42 (1977).
- 25 25. Guth, L., Albuquerque, E.X., Deshpande, S. S., Barret, C. P., Donati, E. J. & Warnick, J. E., *J. Neurosurg.* **52**, 73-86 (1980).

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de una sustancia inhibidora seleccionada del grupo formado por anticuerpos contra el colágeno IV, laminina, entactina, sustancias accesorias para la función apropiada, o el ensamblaje de la membrana basal; agentes quelantes del Fe; inhibidores de hidroxilasas de aminoácidos, tales como prolil-4-hidroxilasa, lisina-hidroxilasa; competidores de 2-oxoglutarato; siendo dicha sustancia inhibidora capaz de la prevención o inhibición específica de la formación de membrana basal inducida por una lesión del tejido neuronal para la fabricación de un medicamento para la mejora de la regeneración neuronal.

10 2. Uso según la reivindicación 1, en el que la sustancia inhibidora es una sustancia que inhibe la síntesis de los elementos de construcción de la membrana basal, o el ensamblaje de los elementos de construcción de la membrana basal, o ambos, la síntesis de los elementos de construcción de la membrana basal y el ensamblaje de los elementos de construcción de la membrana basal.

15 3. Uso según la reivindicación 2, en el que los elementos de construcción de la membrana basal son seleccionados del grupo formado por colágeno IV, laminina, entactina, sustancias accesorias para la función apropiada, o el ensamblaje de la membrana basal o ambos, la función apropiada y el ensamblaje de la membrana basal.

20 4. Uso según la reivindicación 1, en el que la sustancia inhibidora es seleccionada del grupo formado por N-oxaloglicina; sales de Zn, derivados de la piridina, tales como derivados de 5-arilcarboniamino ó -5-arilcarbamoil, 2-carboxilato, 2,5-dicarboxilato, sus ésteres etílicos o etil-amidas ó 5-acil-sulfonamidas, 2,4-dicarboxilato, sus ésteres etílicos o etil-amidas, o dimetoxietilamidas; 3,4'-bipiridina, tales como 5-amino-6(1H)-ona, 1,6-dihidro-2-metil-6-oxo-5-carbonitrilo; 2-2'-bipiridina, tal como ácido 5,5'-dicarboxílico o sus sales farmacéuticamente aceptables, éster etílico o etil-amida del ácido 4,4'-dicarboxílico; 3,4'-dihidroxibenzoato, tal como el éster dietílico; prolina y sus análogos estructurales y funcionales; β -aminopropionitrilo; deferoxamina; antraciclinas, 2,7,8-trihidroxiantraquinonas, fibrostatina-C, ácido cumálico o sus sales farmacéuticamente aceptables; antibióticos 5-oxaprolina, β lactama.

30 5. Un medicamento para la mejora de la regeneración neuronal que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una sustancia inhibidora que es capaz de la prevención o inhibición específica de la formación de membrana basal inducida por una lesión del tejido neuronal que comprende la(s) sustancia(s) inhibidora(s) seleccionadas del grupo formado por anticuerpos contra el colágeno IV, laminina, entactina, sustancias accesorias para la función apropiada, o el ensamblaje de la membrana basal; agentes quelantes del Fe; seleccionada del grupo formado por derivados de la piridina, tales como derivados de 5-arilcarboniamino o 5-arilcarbamoil, 2-carboxilato, 2,5-dicarboxilato, sus ésteres etílicos o etil-amidas ó -5-acil-sulfonamidas, 2,4-dicarboxilato, sus ésteres etílicos o etil-amidas, o dimetoxietilamidas; 3,4'-bipiridina, tales como 5-amino-6(1H)-ona, 1,6-dihidro-2-metil-6-oxo-5-carbonitrilo; 2-2'-bipiridina, tal como ácido 5,5'-dicarboxílico o sus sales farmacéuticamente aceptables, éster etílico o etil-amida del ácido 4,4'-dicarboxílico; 3,4'-dihidroxibenzoato, tal como el éster dietílico; β -aminopropionitrilo; deferoxamina; antraciclinas, 2,7,8-trihidroxiantraquinonas, ácido cumálico o sus sales farmacéuticamente aceptables; antibióticos β lactama; competidores de 2-oxoglutarato; en combinación con una sustancia capaz de estimular el crecimiento neuronal o inducir la expresión de las proteínas que favorecen el crecimiento, tales como factores de crecimiento de fibroblastos, moléculas de adhesión de células neurales como L1 (NILE), proteínas asociadas al crecimiento como GAP43 y proteínas anti-apoptóticas como bcl-2.

45 6. El medicamento según la reivindicación 5, en el que la sustancia inhibidora es aplicada en cantidades terapéuticamente efectivas, tales como 1 ng/kg a 1 mg/kg de peso del cuerpo.

50

55

60

65

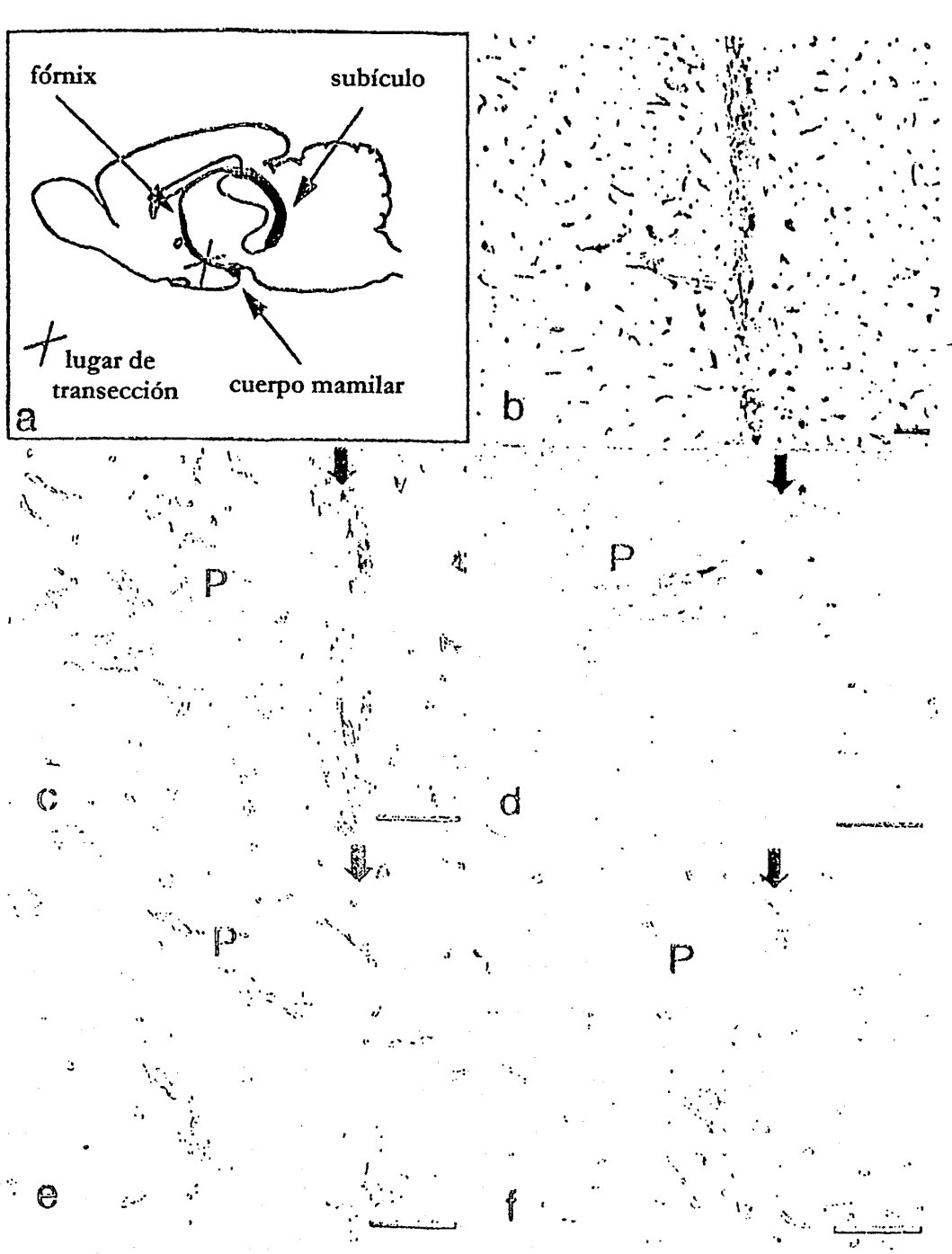


Fig. 1



Fig. 2

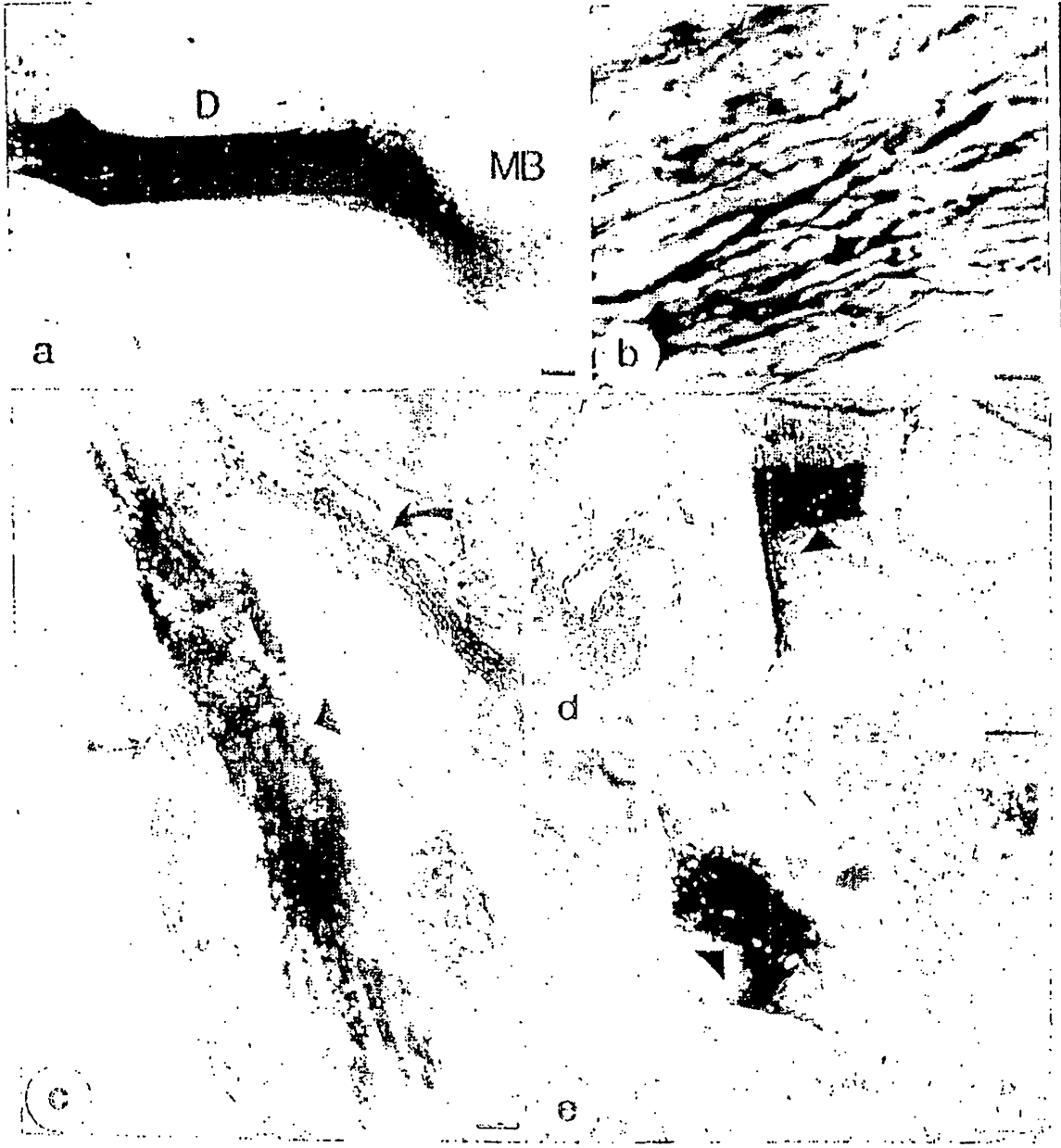


Fig. 3

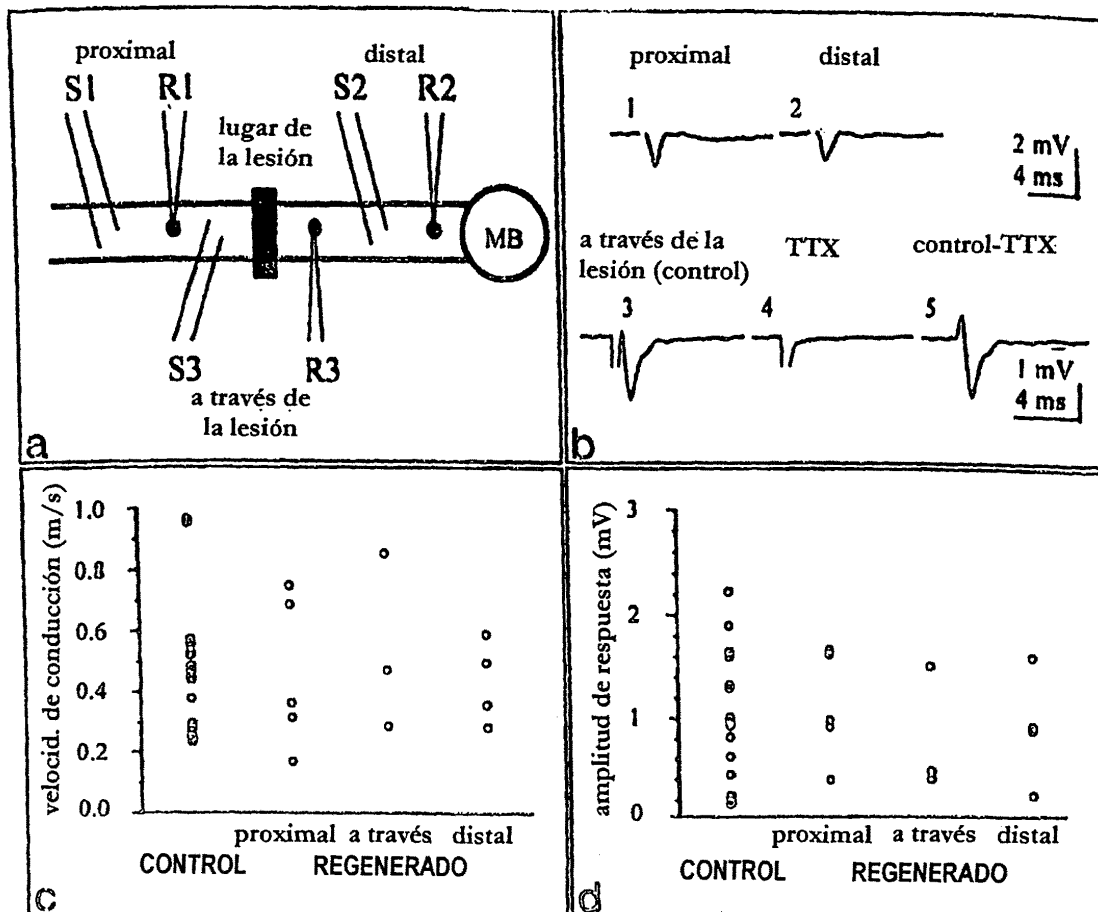


Fig. 4