



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 227**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/51 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03706754 .3**

96 Fecha de presentación : **04.03.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1480674**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2004**

54

Título: **Tratamiento de lesión del sistema nervioso central.**

30

Prioridad: **04.03.2002 GB 0205022**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.04.2011

73

Titular/es: **CAMBRIDGE ENTERPRISE LIMITED**
The Old Schools Trinity Lane Cambridge
Cambridgeshire CB2 1TN, GB
KINGS COLLEGE LONDON

72

Inventor/es: **McMahon, S. B.;**
Bradbury, E. J. y
Fawcett, J.

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 357 227 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

Tratamiento de lesión del sistema nervioso central.

Campo de la invención

5 **[0001]** La invención se refiere a materiales y a procedimientos para el tratamiento de lesión al sistema nervioso central (SNC), en particular a procedimientos y a materiales para promover plasticidad neuronal.

Antecedentes

10 **[0002]** La "plasticidad" es un término que se refiere a la capacidad del sistema nervioso para cambiar las conexiones entre neuronas de manera que se altere la función del cerebro o la médula espinal, frecuentemente en respuesta a estímulos sensoriales o de comportamiento o a lesión. El término engloba la activación de sinapsis que estaban estructuralmente presentes, pero inactivas, el fortalecimiento y el debilitamiento de sinapsis y la creación y la rotura de sinapsis. Se forman nuevas sinapsis mediante el brote de terminaciones nerviosas para enviar una nueva rama de la terminación a un nuevo sitio sináptico. Las sinapsis se cancelan por la pérdida de contacto de una terminación con su neurona diana, normalmente seguido de retracción de la rama de la terminación.

15 **[0003]** Después de accidente cerebrovascular, lesión de cabeza, cirugía u otros traumatismos al cerebro hay un periodo durante el cual hay una recuperación parcial de parte de la función neurológica que se ha perdido. Se cree que esto es debido en gran parte a la reorganización de conexiones en la corteza y áreas subcorticales del cerebro. Por tanto, la función que solía ser realizada por la parte del cerebro que se ha perdido puede ser parcialmente asumida por la parte de cerebro superviviente. Esta reorganización de conexiones y funciones es un ejemplo de plasticidad. Un tratamiento que podría potenciar la plasticidad después de lesión cerebral, accidente cerebrovascular, enfermedad neurodegenerativa, esclerosis múltiple o cualquier otra enfermedad que produce pérdida de neuronas o conexiones neuronales probablemente potenciaría la recuperación de función en pacientes, generalmente en asociación con fisioterapia y otras formas de entrenamiento.

20 **[0004]** Los inventores y otros han realizado estudios sobre regeneración axonal tras axotomía en el SNC. Estos estudios, descritos en mayor detalle más adelante, se han centrado principalmente en la médula espinal, pero también se han llevado a cabo en el tracto nigroestriatal del cerebro. Aunque se refieren a la promoción de regeneración axonal y plasticidad no neuronal, estos estudios proporcionan antecedentes útiles para la invención.

25 **[0005]** Una estructura llamada la cicatriz glial se desarrolla en cualquier parte en la que el cerebro o la médula espinal esté dañado. Este proceso cicatricial reactivo implica los tipos de células de la glía astrocitos, microglia, precursores de oligodendrocitos y células meníngeas. Los axones que se cortan como resultado de lesión en el SNC dejar de regenerarse y las puntas del axón que no se regenera se encuentran en la cicatriz glial. Diversos experimentos durante muchos años han demostrado que la cicatriz glial es inhibitoria de la regeneración axonal (Fawcett y Asher, 1999).

30 **[0006]** Se ha llevado a cabo una serie de experimentos *in vitro* para determinar qué moléculas producidas por las células de la glía en la cicatriz glial bloquean la regeneración axonal. Se mostró que las principales moléculas inhibitorias son los proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG) (Smith-Thomas y col., 1994; Fawcett y Asher, 1999).

35 **[0007]** Los proteoglicanos de sulfato de condroitina son moléculas compuestas por un núcleo de proteína al que están unidas una o más cadenas de azúcar sulfatada largas. Las cadenas de azúcar, conocidas como cadenas de glicosaminoglicanos, están compuestas por disacáridos de repetición que consisten principalmente en N-acetilgalactosamina y ácido glucurónico. Están sulfatados en una variedad de posiciones.

40 **[0008]** En experimentos de cultivo de tejido se ha mostrado que la condroitinasa (que digiere las cadenas de azúcar), el clorato de sodio (que inhibe la sulfatación de las cadenas de azúcar) y los beta-D-xilósidos (que evitan que las cadenas de azúcar se unan al núcleo de proteína) hacen todos que la glía del SNC sea menos inhibitoria (Smith-Thomas y col., 1995 y otros).

45 **[0009]** También se ha mostrado que los proteoglicanos de sulfato de condroitina están regulados por incremento en sitios de lesión del SNC (DeWitt y col., 1994). Desde entonces se han identificado muchos de los tipos individuales de proteoglicano y los tipos de células que los producen: NG2, versicano, neurocano, brevicano, fosfacano y agrecano son proteoglicanos de sulfato de condroitina inhibitorios encontrados en lesiones del SNC (Fawcett y Asher, 1999; Fidler y col., 1999; Asher y col., 1999; Asher y col., 2000).

50 **[0010]** Basándose en los indicios en cultivo de tejido de que la eliminación de cadenas de glicosaminoglicanos con condroitinasa puede hacer que los proteoglicanos de sulfato de condroitina sean menos inhibidores y en el hecho de que los proteoglicanos estén presentes en alta concentración en la cicatriz glial alrededor de lesiones del SNC, la condroitinasa se aplicó a una lesión cerebral que corta los axones del tracto nigroestriatal. El tratamiento con

condroitinasa permitió que una proporción de los axones de corte se regeneraran de nuevo a su diana (Moon y col., 2001). Similarmente, el agotamiento de precursores de oligodendritas que producen CSPG usando citosina arabinósido (un agente antimitótico) también promovió la regeneración axonal (Rhodes y col., 2000). El documento WO 91/06303 describe el uso de inhibidores de CSPG para promover el crecimiento de nervios o la migración de células de la glía.

5 **[0011]** Usando condroitinasa, la regeneración axonal también se ha mostrado *in vivo* en animales después de lesión de médula espinal experimentalmente inducida (Bradbury y col., 2000a, 2002). Se observó la recuperación del comportamiento en pruebas de la función de las extremidades anteriores en estos animales tratados con condroitinasa (Bradbury y col., 2001). Tras la satisfactoria promoción de la regeneración axonal en el cerebro se realizó un experimento *in vivo* (informado en los ejemplos en este documento) en el que se administró condroitinasa a lesiones de la médula espinal usando el mismo protocolo que se había usado para los experimentos del tracto nigroestriatal. El tratamiento promovió la regeneración de axones tanto sensitivos como motores y produjo la recuperación de la función del comportamiento en pruebas sensitivomotoras de la función de las extremidades anteriores (Bradbury y col., 2002). Estas pruebas de comportamiento de las extremidades anteriores se recuperan muy lentamente en ratas sin tratar.

15 **[0012]** Sin embargo, los inventores plantearon como hipótesis que la recuperación del comportamiento en animales tratados con condroitinasa era tan rápida y tan completa que la recuperación podría atribuirse al menos en parte a la reorganización de las conexiones de los axones sin lesionar en la médula, es decir, la plasticidad neuronal.

20 **[0013]** En particular, los inventores plantearon como hipótesis que la gran recuperación del comportamiento observado en las tareas de caminar en barra y caminar en rejilla tras el tratamiento con condroitinasa de la médula espinal después de lesiones en la columna vertebral C4 era debida a un aumento de la plasticidad tanto como para la regeneración axonal. Las bases para esta hipótesis fueron: (1) que la cantidad de regeneración axonal tras el tratamiento con condroitinasa pareció insuficiente por sí mismo para mediar en un retorno importante de la función; (2) las mejoras del comportamiento se producen espontáneamente hasta cierto grado (es decir, sin tratamiento con condroitinasa), pero durante una escala de tiempo mucho más larga que en animales tratados con condroitinasa; y (3) la sustancia gris de la médula espinal está particularmente llena de CSPG y neuronas motoras, y otras neuronas están rodeadas de redes perineuronales (concentraciones de CSPG y tenascina alrededor del soma y dendritas de neuronas).

25 **[0014]** Con el fin de probar adicionalmente la hipótesis, los inventores acordaron una colaboración (también informada en los ejemplos) para determinar el efecto del tratamiento con condroitinasa en un modelo animal conocido por plasticidad neuronal, el modelo de desplazamiento de la dominancia ocular. Este modelo se refiere a plasticidad en las conexiones de los ojos con la corteza visual.

30 **[0015]** Normalmente, las neuronas en una parte de la corteza visual de la rata reciben conexiones de ambos ojos. La mayoría de las neuronas son accionadas igualmente de fuerte por (es decir, tienen conexiones sinápticas igualmente de fuertes a) ambos ojos. Sin embargo, en un animal de menos de 35 días, si un párpado se cierra por sutura para privarlo de experiencia visual, las neuronas en esta región de la corteza cesan de ser tan fuertemente accionadas por el ojo privado y se accionan mucho más fuertemente por el ojo no privado. Es decir, se debilitan las conexiones sinápticas para el ojo suturado y se refuerzan aquellas para el ojo no suturado. Este efecto se conoce como desplazamiento de la dominancia ocular y es un ejemplo de plasticidad en la corteza (Lodovichi y col., 2000). Después de 50 días en ratas, el desplazamiento de la dominancia ocular ya no se produce después de la sutura del párpado: esto se conoce como el final del periodo crítico (Maffei y col., 1992).

40 **[0016]** Los inventores propusieron que la digestión de las cadenas de glicosaminoglicanos del proteoglicano de sulfato de condroitina en la corteza visual de la rata con condroitinasa restauraría la plasticidad de la dominancia ocular en animales adultos, es decir, más allá del final del periodo crítico, a una edad a la que tal plasticidad no se observa en animales sin tratar. La enzima se administró a la corteza visual de ratas adultas usando el mismo protocolo usado en los experimentos del tracto nigroestriatal de Moon y col., 2001.

45 **[0017]** Se encontró que el tratamiento con condroitinasa a la corteza visual en ratas adultas permite un desplazamiento de la dominancia ocular de una magnitud similar a la observada en animales jóvenes durante el periodo crítico.

50 **[0018]** Los inventores llegan a la conclusión de que agentes tales como la condroitinasa que eliminan, digieren, se unen a y bloquean, o evitan la síntesis de proteoglicanos de sulfato de condroitina (especialmente las cadenas de glicosaminoglicanos de CSPG) no sólo promoverán la regeneración axonal (como se ha propuesto previamente), sino que promoverán en general la plasticidad neuronal tras la lesión del SNC. Se espera que la administración de tales agentes permita la mejora funcional después de la lesión al SNC. Esto tiene amplias implicaciones para los tipos de lesión del SNC que pueden ser tratadas por tales agentes.

55 **[0019]** No cabría esperar que la regeneración axonal sola condujera a una recuperación funcional significativa después de la mayoría de las formas de lesión del SNC. Por el contrario, la enseñanza de la presente invención de que los mismos agentes promueven la plasticidad neuronal conduce a la expectativa de que estos agentes pueden usarse en general para tratar lesión del SNC.

[0020] Un efecto tal sobre la plasticidad no habría podido predecirse a partir del efecto previamente conocido sobre la regeneración axonal ya que otros factores conocidos por promover la regeneración axonal todavía inhiben la plasticidad. Maffei y col., 1992, muestran que el factor de crecimiento nervioso que estimula la regeneración axonal en muchas rutas evita el desplazamiento de la dominancia ocular en la corteza visual de la rata en el modelo de plasticidad neuronal descrito anteriormente. Similarmente, el factor neurotrófico derivado del cerebro que produce un fin temprano del periodo crítico (Lodovichi y col., 2000) todavía puede promover la regeneración axonal. Sin embargo, en vista de la invención, algunas observaciones experimentales previas pueden interpretarse en apoyo de esta función de CSPG en la inhibición de la plasticidad neuronal.

[0021] Los CSPG en el SNC maduro se encuentran en gran parte de la matriz extracelular, y también condensan en redes perineuronales. Las redes perineuronales son densas vainas de matriz extracelular (principalmente tenascina-R y los CSPG neurocano y agrecano) que rodean el soma y las dendritas de muchas neuronas por todo el SNC, y casi todas las neuronas en la médula espinal (Koppe y col., 1997). Las redes perineuronales no aparecen hasta el desarrollo tardío, y el tiempo de su deposición establece una correlación con la disminución de la plasticidad en muchos sistemas.

[0022] En la corteza visual del gato, la sincronización de la aparición de redes perineuronales establece precisamente una correlación con el final del periodo crítico, y tratamientos que alteran la sincronización del periodo crítico alteran el tiempo de deposición de redes perineuronales (Lander y col., 1997). Por ejemplo, criar animales en completa oscuridad retrasa el final del periodo crítico y también retrasa la incorporación de neurocano y agrecano (ambos CSPG) en redes perineuronales.

[0023] Por tanto, parece probable que los CSPG en redes perineuronales sean responsables de restringir la plasticidad en el SNC adulto, aunque también podrían participar los CSPG difusamente distribuidos.

[0024] Las redes perineuronales pueden visualizarse con lectina de *Wisteria floribunda* que se une a cadenas de glicosaminoglicanos de sulfato de condroitina.

Resumen de la invención

[0025] En un primer aspecto, la invención proporciona condroitinasa para uso en un procedimiento de promover plasticidad neuronal en un mamífero.

[0026] En un segundo aspecto, la invención proporciona el uso de condroitinasa en la preparación de un medicamento para promover plasticidad neuronal en un mamífero.

[0027] En líneas generales, la presente invención proporciona en otros aspectos procedimientos que participan en la identificación de agentes adicionales que reducen las propiedades inhibitorias de proteoglicanos de sulfato de condroitina. Tras su identificación, tales agentes pueden usarse según los aspectos precedentes de la invención.

[0028] Las propiedades inhibitorias de proteoglicanos de sulfato de condroitina serán generalmente aquellas propiedades que inhiben la plasticidad neuronal.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

[0029] Como se ha mencionado anteriormente, la promoción de plasticidad neuronal según la invención tiene amplias implicaciones para el tratamiento de lesión del SNC en general. Para evitar dudas, el término "SNC" pretende incluir el cerebro, la médula espinal y las neuronas cuyos somas se encuentran dentro de o tienen una sinapsis primaria en el cerebro o médula espinal. Ejemplos de tales neuronas son neuronas de los nervios craneales (lesión a los cuales puede producir, por ejemplo, parálisis facial) y neuronas motoras que inervan la musculatura y cuyos somas están en el asta anterior de la médula espinal.

[0030] De particular interés es la promoción de plasticidad neuronal en la médula espinal y/o tras la lesión de la médula espinal, especialmente lesión medular incompleta (es decir, lesión medular en la que algunos axones intactos se proyectan por el sitio de lesión). Los estudios informados anteriormente sugieren que la condroitinasa puede promover regeneración axonal tras la lesión de la médula espinal inducida experimentalmente en animales experimentales. Por el contrario, los presentes inventores informan del sorprendente hallazgo que la condroitinasa también promueve plasticidad neuronal. Esto sugiere que las lesiones de la médula espinal que previamente no habrían sido consideradas tratables mediante regeneración axonal sola ahora pueden considerarse tratables mediante la promoción de plasticidad neuronal usando condroitinasa y los otros agentes citados en este documento.

[0031] En particular, el tejido cicatricial se desarrolla progresivamente tras la lesión del SNC (por ejemplo, lesión de la médula espinal) y después de dos semanas puede ser difícil que los axones se regeneren mediante el tejido cicatricial. Por el contrario, debe ser posible tratar lesión de la médula espinal mediante la promoción de plasticidad en cualquier momento después de la lesión. Por consiguiente, la invención es particularmente aplicable para el tratamiento de lesiones de médula espinal que tienen al menos dos semanas, especialmente lesiones que tienen al menos tres

semanas, o al menos cuatro semanas.

[0032] Además, tras la lesión de la médula espinal, las neuronas lesionadas cuyos axones se han cortado se atrofiarán. Cabría esperar que esto, combinado con la presencia de tejido cicatricial denso, evitara la recuperación de la función mediante la promoción de regeneración axonal. Por el contrario, la promoción de plasticidad neuronal deberá conducir a recuperación de la función en cualquier momento después de la lesión de la médula espinal. Por consiguiente, la invención es particularmente aplicable al tratamiento de lesión de la médula espinal que se caracteriza por atrofia de las neuronas cuyos axones se han cortado.

[0033] La promoción de plasticidad neuronal puede ser la promoción de plasticidad neuronal en la médula espinal y/o en el cerebro, especialmente la corteza. Los sitios de administración del agente se tratan más adelante.

[0034] La lesión de la médula espinal puede ser (sin limitación) lesión producida por agresión, accidente, tumor, disco intervertebral o anomalía ósea, o cirugía, por ejemplo, cirugía para problemas medulares y/o cirugía para eliminar tumores.

[0035] La invención también puede aplicarse al tratamiento de lesión del SNC distinta de lesión de la médula espinal, particularmente lesión del SNC de los siguiente tipos: accidente cerebrovascular; lesión cerebral que incluye (sin limitación) lesión producida por agresión, accidente, tumor (por ejemplo, un tumor cerebral o un tumor no cerebral que afecta al cerebro tal como un tumor óseo de la habilidad que afecta al cerebro) o cirugía, por ejemplo cirugía para eliminar tumores o para tratar epilepsia; esclerosis múltiple; y enfermedades neurodegenerativas que afectan la corteza tales como enfermedad de Alzheimer. La invención es más particularmente aplicable a lesión del SNC que afecta a la corteza ya que se cree ampliamente que la promoción de plasticidad conducirá a recuperación funcional tras la lesión a la corteza. Sin embargo, la referencia a la lesión del SNC que afecta a la corteza no pretende implicar la ausencia de lesión a áreas subcorticales del cerebro.

[0036] La esclerosis múltiple conduce a pequeñas lesiones distribuidas aleatoriamente en el cerebro y la médula espinal. Aunque no se cree que la promoción de regeneración axonal sería eficaz en el tratamiento de esclerosis múltiple, se espera que esa promoción de plasticidad conduzca a alguna recuperación de la función.

[0037] En enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas que afectan a la corteza, la lesión tiende a ser difusa por gran parte de la corteza. De nuevo, se cree que es probable que la promoción de plasticidad conduzca a alguna recuperación de la función. El término "enfermedad neurodegenerativa que afecta a la corteza" no pretende implicar la ausencia de lesión a otras estructuras del cerebro.

[0038] La invención pretende excluir el tratamiento de axotomía nigroestriatal como se informa en Moon y col. (2001). Este procedimiento no es representativo de lesiones del SNC no experimentalmente ocasionadas, especialmente del cerebro (por ejemplo, lesiones ocasionadas por accidente, agresión o cirugía). Preferentemente, la invención excluye en general el tratamiento de lesión del SNC experimentalmente ocasionada de mamíferos no humanos, especialmente tal lesión ocasionada con el objetivo de desarrollar tratamientos para la lesión de la médula espinal promoviendo la regeneración axonal.

[0039] El mamífero es lo más preferentemente un ser humano. Otros mamíferos preferidos son mamíferos domesticados, particularmente caballos, vacas, cerdos, cabras, oveja, perros y gatos. Sin embargo, la invención es generalmente aplicable a cualquier mamífero.

[0040] El agente que reduce las propiedades inhibitorias de proteoglicanos de sulfato de condroitina puede ser un agente que reduce las propiedades inhibitorias de la excrecencia de neuritas de proteoglicanos de sulfato de condroitina. Sin embargo, la excrecencia de neuritas no es necesariamente un requisito previo de plasticidad, por lo que el agente puede ser uno que reduce las propiedades inhibitorias de plasticidad de proteoglicanos de sulfato de condroitina sin reducir sus propiedades inhibitorias de excrecencia de neuritas.

[0041] Un agente que reduce las propiedades inhibitorias de proteoglicanos de sulfato de condroitina puede ser un agente que interactúa con uno o más proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG) para inhibir sus propiedades inhibitorias, o puede ser un agente que elimina (parcialmente o completamente) uno o más CSPG, o puede ser un agente que reduce la producción de uno o más CSPG.

[0042] Preferentemente, el agente que reduce las propiedades inhibitorias de proteoglicanos de sulfato de condroitina es un agente que elimina, digiere, se une a y bloquea o evita la síntesis de uno o más proteoglicanos de sulfato de condroitina.

[0043] Más preferentemente, el agente que reduce las propiedades inhibitorias de proteoglicanos de sulfato de condroitina es un agente que elimina, digiere, se une a y bloquea o evita la síntesis de las cadenas de glicosaminoglicanos de uno o más proteoglicanos de sulfato de condroitina. Como las cadenas de glicosaminoglicanos son comunes a todos los CSPG (aunque se diferencian hasta cierto punto entre diferentes CSPG) y parece que son

necesarias para sus efectos inhibidores, son una diana particularmente preferida para agentes que reducen las propiedades inhibitorias de CSPG ya que se espera actividad de agentes a través de todos los CSPG inhibitorios diferentes.

- 5 **[0044]** Un agente que interactúa con uno o más proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG) para inhibir sus propiedades inhibitorias puede ser un anticuerpo que puede unirse a uno o más CSPG, especialmente mediante las cadenas de glicosaminoglicanos de los CSPG. NogoA es una molécula presente en mielina que inhibe la regeneración axonal tras la lesión de la médula espinal. Se han mostrado anticuerpos dirigidos contra NogoA en Bandtlow y Schwab, 2000, para bloquear esta propiedad inhibitoria de NogoA, permitiendo una recuperación funcional significativa en ratas. Se espera un efecto similar para bloquear anticuerpos para CSPG.
- 10 **[0045]** Se conocen anticuerpos contra diferentes CSPG y/o componentes de sus cadenas de glicosaminoglicanos. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CS56 (Sigma) se une a un motivo en las cadenas de glicosaminoglicanos de CSPG que está regulado por incremento tras la lesión del SNC y se cree que los anticuerpos CAT301, 315 y 316 se unen a agrecano (Lander y col., 1997). Además, es una cuestión de rutina preparar otros anticuerpos (especialmente anticuerpos monoclonales) contra CSPG y/o componentes de sus cadenas de glicosaminoglicanos laterales. Tales anticuerpos conocidos o nuevos pueden probarse para su capacidad para reducir las propiedades inhibitorias de CSPG, por ejemplo, usando las técnicas, particularmente las técnicas del comportamiento, descritas en los ejemplos (especialmente las pruebas de caminar en barra y en rejilla y el análisis de huellas), y/o la capacidad para promover plasticidad neuronal, por ejemplo, en un modelo de desplazamiento de la dominancia ocular tal como el descrito en los ejemplos.
- 20 **[0046]** Los CSPG purificados están disponibles como una mezcla de Sigma Chemicals y Chemicon. El agrecano purificado también está disponible. Además, los CSPG individuales o las mezclas de CSPG pueden purificarse a partir de cerebro o médula espinal usando técnicas muy establecidas. Todas serían adecuadas para la preparación de anticuerpos.
- 25 **[0047]** El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio e incluye tanto anticuerpos monoclonales como anticuerpos policlonales, además de fragmentos de anticuerpos o porciones tales como fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂. Los anticuerpos pueden ser quiméricos y/o humanizados.
- 30 **[0048]** Los procedimientos para preparar anticuerpos policlonales a partir de un agente inmunizante (por ejemplo, en este caso un CSPG) son muy conocidos. Esto puede implicar conjugar el agente inmunizante con un polipéptido inmunogénico tal como hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de soja, y/o administrarlo con un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético).
- 35 **[0049]** Similarmente, los procedimientos para producir anticuerpos monoclonales son muy conocidos. Véanse, por ejemplo, Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986, pág. 59-103, y Kozbor, J Immunol, 133:3001 (1984); Brodeur y col., Monoclonal Antibodies Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987, pág. 51-63. Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante tales como aquellos descritos en la patente de EE.UU. nº 4.816.567, que también puede usarse para producir anticuerpos quiméricos y/o humanizados. Véanse, por ejemplo, Jones y col., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature. 332:323-327 (1988); Verhoeven y col., Science. 239:1534-1536 (1988).
- 40 **[0050]** Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica que incluyen bibliotecas de expresión en fago. Véanse, por ejemplo, Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol, 227:381 (1991); Marks y col., J Mol Biol 222:581 (1991). Las técnicas de Cole y col. y Boerner y col. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss, pág. 77, 1985 y Boerner y col. J. Immunol. 147(1):86-95 (1991)). Similarmente, los anticuerpos humanos pueden prepararse introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016, y Marks y col., Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg y col., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-13 (1994); Fishwild y col., Nature Biotechnology 14:845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern Rev Immunol 13:65-93 (1995).
- 45 **[0051]** Alternativamente, un agente que interactúa con uno o más proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG) para inhibir sus propiedades inhibitorias puede ser una lectina que puede unirse a uno o más CSPG, especialmente mediante la(s) cadena(s) de glicosaminoglicanos. Las lectinas son glicoproteínas normalmente encontradas en plantas que unen o aglutinan proteínas específicas y carbohidratos. Las lectinas se han usado *in vivo*. Un ejemplo de una lectina que puede unirse a uno o más CSPG es lectina de *Wisteria floribunda*. La lectina de cacahuete se une a algunos CSPG.
- 50 **[0052]** Un agente que elimina uno o más CSPG puede ser, por ejemplo, una enzima que puede digerir CSPG, especialmente una enzima que puede digerir las cadenas de glicosaminoglicanos de CSPG, por ejemplo condroitinasa,
- 55

especialmente condroitinasa ABC (EC 4.2.2.4). La condroitinasa ABC es una mezcla de tres enzimas con actividad contra las tres formas principales de las cadenas de glicosaminoglicanos de CSPG y está comercialmente disponible, por ejemplo, de Seikagaku, Japón, ya que son otras formas de condroitinasa. Moon y col. (2001) y Bradbury y col. (2002) proporcionan la prueba del principio de que puede administrarse *in vivo* al SNC de mamíferos.

5 **[0053]** Otras enzimas de condroitinasa incluyen componentes aislados de condroitinasa ABC que incluyen los tipos I y II de condroitinasa ABC. Su separación se desvela en, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5498536. Todavía otras enzimas de condroitinasa son condroitinasa AC (EC 4.2.2.5), que está comercialmente disponible de Seikagaku e Ibex Technologies Inc. (Montreal, Quebec, Canadá) y condroitinasa B, que también está comercialmente disponible de Seikagaku.

10 **[0054]** Otra enzima que puede digerir las cadenas de glicosaminoglicanos de CSPG es hialuronidasa (EC 3.2.1.35), que está comercialmente disponible de Seikagaku y, en forma farmacéuticamente aceptable, de Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, NJ, EE.UU.) o Wyeth-Ayerst (Filadelfia, Pa, EE.UU.). Otras hialuronidasas también pueden ser adecuadas para uso en la invención tales como PH 20, hialuronidasa 1 e hialuronidasa 4, ejemplos que se desvelan en, por ejemplo, los números de registro S40465 (gi 631383), NP_009296 (gi 6224976) y XP_231540 (gi 27709188), respectivamente.

15 **[0055]** Las patentes de EE.UU. 5741692, 5498536, 5763205, 5773277, 5496718, 6093563, 6054569 y 5997863 describen la purificación y la clonación de numerosas enzimas que tienen actividad de condroitinasa. Véanse también los números de registro de GenBank / EMBL: AAC83383.1 (gi 1002525) y AAC83384.1 (gi 1002527) y el documento relacionado Tkalec y col. (2000) Appl. Environ. Microbiol. 66 (1), 29-35; y Q59288 (gi 3913237), y los números de registro de Brookhaven Protein Data Bank 1CB8 y 1DBG.

20 **[0056]** La capacidad de una enzima para digerir las cadenas de glicosaminoglicanos de CSPG puede evaluarse ensayando la capacidad de la enzima cuando se incuba con un CSPG para reducir su peso molecular (por ejemplo, como se determina por SDS-PAGE), generalmente al peso molecular esperado para la proteína de núcleo sola. Puede evaluarse (adicionalmente o alternativamente) ensayando la capacidad de la enzima para liberar disacáridos de CSPG. Para el uso en la invención también son adecuadas enzimas que pueden eliminar los grupos sulfato de CSPG, por ejemplo, enzimas que tienen actividad de sulfatasa. Se han identificado numerosas enzimas que tienen esta capacidad tales como EC 3.1.6.4, EC 3.1.6.12, EC 3.1.6.9, EC 3.1.6.10, EC 3.1.6.13, EC 3.1.6.14, EC 3.1.6.15 y EC 3.1.6.18. La condro-4-sulfatasa (EC 3.1.6.9) y la condro-6-sulfatasa (EC 3.1.6.10) están comercialmente disponibles de Seikagaku.

25 **[0057]** Otras enzimas que pueden digerir las cadenas de GAG de CSPG, que también pueden ser adecuadas para uso en la invención, son enzimas que tienen las siguientes actividades: sulfatasas (por ejemplo, como se mencionan anteriormente), endoglicosidasas, exoglicosidasas, hexosaminidasas, galactosidasas (por ejemplo, endo-beta-N-galactosidasa comercialmente disponible de Seikagaku), glucuronidasas, iduronidasas, xilosidasas y enzimas lisosómicas.

30 **[0058]** Todavía otras enzimas que pueden digerir CSPG son enzimas de las siguientes familias de enzimas, cada una de las cuales tiene varios miembros:

agrecanasas,

ADAM (una disintegrina y metaloproteasa),

ADAMT (una disintegrina y metaloproteasa con motivos de trombospondina), por ejemplo:

ADAMTS 1 (número de registro NP_008919, gi 11038654),

40 ADAMTS 4 (número de registro 075173, gi 12643637),

también conocida como agrecanasa-1, y

ADAMTS 5 (número de registro NP_008969, gi 5901888), escindiendo todas agrecano,

catepsinas, por ejemplo

catepsina D (número de registro BAC57431, gi 28436104),

45 catepsina L (número de registro AAO33585, gi 28194647), y

catepsina B (número de registro NP_776456, gi 27806671),

MMP (metaloproteasas de la matriz), por ejemplo:

MMP1 (número de registro P21692, gi 116854),

MMP2 (número de registro P08253, gi 116856),

MMP3 (número de registro P08254, gi 116857),

MMP7 (número de registro P09237, gi 116861),

MMP8 (número de registro P22894, gi 116862),

5 MMP9 (número de registro P14780, gi 116863),

MMP10 (número de registro 055123, gi 13124340),

MMP13 (número de registro 062806, gi 5921829), y keratanasas (por ejemplo, la keratanasa que está comercialmente disponible de Seikagaku).

10 **[0059]** Un agente que reduce la producción de uno o más CSPG pueden ser un inhibidor de una o más de las etapas que participan en la síntesis de CSPG, por ejemplo, un inhibidor de una o más de las enzimas responsables de la síntesis de CSPG, preferentemente una o más de las enzimas que participan en la producción de las cadenas de glicosaminoglicanos de CSPG y/o su unión al resto de proteína de CSPG, por ejemplo, una o más sulfotransferasas de condroitina.

15 **[0060]** Las enzimas que participan en la síntesis de CSPG son muy conocidas de libros de texto bioquímicos. Las enzimas xilosiltransferasa, galactosiltransferasa I y II y glucuronosiltransferasa I participan en la unión de una rama adaptadora de cuatro azúcares a la proteína del núcleo; N-acetilgalactosaminiltransferasas y glucuronosiltransferasa II participan en el alargamiento de la cadena de azúcar mediante la adición de unidades de disacáridos de repetición; luego la cadena se modifica por O- y N-sulfatación mediante una variedad de sulfotransferasas de sulfato de condroitina, de las que hay al menos cinco, sulfatándose en diferentes posiciones. La cadena también se modifica por
20 epimerización (conversión de glucuronato en iduronato en una etapa de epimerización de uronosilo por uronosil epimerasa C5) y fosforilación (supuestamente por xilósido cinasa).

25 **[0061]** Se han aislado y/o clonado varias sulfotransferasas de condroitina, por ejemplo, 6-O-sulfotransferasa-1 de condroitina, 6-O-sulfotransferasa-2 de condroitina, 4-O-sulfotransferasa de condroitina, una uronil-2-sulfotransferasa humana que sulfata residuos de glucuronilo de condroitina, N-acetilglucosamina-6-O-sulfotransferasa y GalNAc 4-sulfotransferasa (véanse, por ejemplo Kitagawa y col. (2000) J Biol Chem 275(28): 21075-80; Yamauchi y col. (2000) J Biol Chem 275(12): 8975-81; Li y col. (1999) Genomics 55(3): 345-7; Kobayashi y col. (1999) J Biol Chem 274(15): 10474-80; Nastuk y col. (1998) J Neurosci 18(18): 7167-77; Uchimura y col. (1998) J Biol Chem 273(35): 22577-83; Fukuta y col. (1998) Biochim Biophys Acta 1399(1): 57-61; Uchimura y col. (1998) Glycobiology 8(5) 489-96; Mazany y col. (1998) Biochim Biophys Acta 1407(1): 92-7; Tsutsumi y col. (1998) FEBS Lett 441(2): 235-41; Fukuta y col. (1997) J Biol Chem 272(51): 32321-8; Fukuta y col. (1995) J Biol Chem 270(31): 18575-80; Okuda y col. (2000) J Biochem (Tokio) 128(5): 763-70; Okuda y col. (2000) J Biol Chem 275(51): 40605-13). Especialmente se prefieren las 6-O-sulfotransferasas de condroitina (es decir, 6-O-sulfotransferasa-1 de condroitina y 6-O-sulfotransferasa-2 de condroitina), que parecen regularse por incremento tras la lesión del SNC. También se prefiere uronil-2-sulfotransferasa (Kobayashi y col. (1999) J Biol Chem 274(15):10474-80), que sulfata las cadenas de sulfato de condroitina en una
35 segunda posición después de la 6-sulfatación previa. Este sulfato de condroitina doblemente sulfatado (conocido como sulfato de condroitina D) puede ser particularmente inhibitorio, y aumenta específicamente en el SNC adulto en comparación con el SNC inmaduro. También hay pruebas de que la enzima está regulada por incremento después de la lesión.

40 **[0062]** La inhibición de la sulfatación puede evaluarse incubando células productoras de CSPG (tales como precursores de oligodendrocitos) con sulfato radiactivo en condiciones adecuadas para la producción de CSPG y ensayando la incorporación de sulfato radiactivo en una fracción de CSPG obtenida a partir de las células (por ejemplo, una fracción que contiene CSPG separada bioquímicamente en una columna de intercambio iónico o inmunológicamente en una columna de afinidad, por ejemplo, usando anticuerpos para la proteína del núcleo).

45 **[0063]** Se han aislado varias enzimas de unión al adaptador de cuatro azúcares posiblemente relevantes y enzimas de alargamiento de la cadena de azúcar y/o sus ARNm se han identificado y depositado. Véase la Tabla 1.

[0064] También se ha identificado ARNm para una uronosil epimerasa C5 putativa y se ha depositado bajo el número de registro XM 035390 (número gi 14749930).

[0065] Todos los números de registro y gi usados en este documento se refieren a las bases de datos GenBank / EMBL.

Tabla 1

Enzima	Número de registro de la secuencia de ARNm	Número de registro de la secuencia de proteínas	Número gi
(unión del adaptador de cuatro azúcares a la proteína del núcleo)			
Xilosiltransferasa I	XM 085432		18585499
Xilosiltransferasa II	XM 037916 AJ 277442		14773240 11322267
Galactosiltransferasa I	AB 028600 BC 007317 NM 007255		5738914 13938367 6005951
Galactosiltransferasa II	NM 080605 AY 050570		18079318 16024927
Glucuronosiltransferasa I	NM 012200 XM 071531 BC 007906		12408653 18605106 14043939
(Alargamiento de la cadena de azúcar)			
N-acetilgalactosaminiltransferasa	XM 006665		13649549
N-acetilgalactosaminiltransferasa 1	XM 041524		14762496
N-acetilgalactosaminiltransferasa 2	XM 001319		18545231
N-acetilgalactosaminiltransferasa 3	XM 002282		18552455
N-acetilgalactosaminiltransferasa 4	NM 003774		13124892
N-acetilgalactosaminiltransferasa 5	XM 050509		18599704
N-acetilgalactosaminiltransferasa 6	NM 007210		13124893
N-acetilgalactosaminiltransferasa 7	XM 003527 XM 084139 NM 054110 AY 035399		12230727 18555932 16905368 16756124
N-acetilgalactosaminiltransferasa 8	NM 017417		8393411
N-acetilgalactosaminiltransferasa 9	XM 039991		18560247
Glucuronosiltransferasa II		Q9NPZ5	14285363

[0066] Un inhibidor de una o más de las enzimas responsables de la síntesis de CSPG puede ser, por ejemplo, un anticuerpo bloqueante contra una de las enzimas sintéticas anteriormente identificadas o un anticuerpo bloqueante contra el sustrato de una enzima tal. Otros agentes incluyen agentes modelados sobre los sustratos de las enzimas sintéticas de CSPG que pueden bloquear la síntesis de CSPG. Tales agentes incluyen β -D-xilósidos, que evitan la unión de cadenas de glicosaminoglicanos a los restos de proteína de CSPG, y que pueden administrarse *in vivo* (Zuo y col., 1998).

[0067] Un agente que reduce la producción de uno o más CSPG pueden ser una molécula de ácido nucleico no codificante que puede bloquear la traducción de una proteína del núcleo de CSPG, o una molécula de ARNb o ARNip

que puede suprimir la expresión de una proteína del núcleo de CSPG por RNAi. Se conocen secuencias de ácidos nucleicos para varias proteínas del núcleo de CSPG. Véanse, por ejemplo, los números de registro XM 009327 y NM 004386 (números gi 14766861 y 4758083) para neurocano, números de registro XM 031288 y NM 013227 (números gi 14753428 y 6695993) para agrecano, números de registro BC 022938 y XM 044090 (números gi 18605563 y 18549315) para brevicano y números de registro NM 004385 y X 15998 (números gi 4758081 y 37662) para versicano.

[0068] La tecnología no codificante ha alcanzado un estado avanzado y la administración a las células puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante incorporación en un vector vírico, enlace con un resto permeante a células, por ejemplo, péptido, o mediante el uso de una molécula no codificante de morfolino.

[0069] Los oligonucleótidos no codificantes cortos pueden importarse a células en las que actúan de inhibidores, a pesar de sus bajas concentraciones intracelulares producidas por su captación restringida por la membrana celular (Zamecnik y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4143-4146 [1986]). Los oligonucleótidos pueden modificarse para potenciar su captación, por ejemplo, sustituyendo sus grupos fosfodiéster negativamente cargados por grupos sin cargar. Las técnicas de transferencia *in vivo* de genes incluyen transfección con vectores víricos (normalmente retrovíricos) y transfección mediada por la proteína-liposoma de la envuelta viral (Dzau y col., Trends in Biotechnology 11, 205-210 [1993]). En algunas situaciones se desea proporcionar la fuente de ácido nucleico con un agente que elige como diana las células diana tal como un anticuerpo específico para una proteína de la membrana de la superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor sobre la célula diana, etc. Si se emplean liposomas pueden usarse proteínas que se unen a una proteína de la membrana de la superficie celular asociadas a endocitosis para elegir como diana y/o para facilitar la captación, por ejemplo, proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas trópicos para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que se someten a internalización en ciclado, proteínas que eligen como diana localización intracelular y potencian la semivida intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptores se describe, por ejemplo, por Wu y col., J Biol Chem 262, 4429-4432 (1987); y Wagner y col., Proc. Natl Acad. Sci USA 87, 3410-3414 (1990). Para una revisión de los protocolos de marcado génico y de terapia génica véase Anderson y col., Science 256 808-813 (1992).

[0070] Una alternativa a la no codificante es usar una copia de todo o parte del gen diana insertado de forma codificante, es decir, la misma orientación que el gen diana, para lograr la reducción en la expresión del gen diana mediante cosupresión; Angell & Baulcombe (1997) The EMBO Journal 16,12:3675-3684; y Voinnet & Baulcombe (1997) Nature 389: pág. 553). Se ha encontrado que el ARN bicatenario (ARNb) es incluso más eficaz en el silenciamiento de genes que tanto las hebras codificantes como no codificantes solas (Fire A. y col. Nature, vol 391, (1998)). El silenciamiento mediado por ARNb es específico para genes y se llama frecuentemente interferencia por ARN (ARNi).

[0071] La interferencia por ARN es un procedimiento de dos etapas. Primero, el ARNb se escinde dentro de la célula para dar ARN interferentes cortos (ARNip) de aproximadamente 21-23 nt de longitud con fosfato en el extremo 5' y nucleótidos protuberantes cortos en 3' (~ 2 nt). El ARNip elige como diana la secuencia de ARNm correspondiente específicamente para la destrucción (Zamore P.D. Nature Structural Biology, 8, 9, 746-750, (2001).

[0072] El ARNi también puede inducirse eficazmente usando dúplex de ARNip químicamente sintetizados de la misma estructura con extremos de nucleótidos protuberantes en 3' (Zamore PD y col. Cell, 101, 25-33, (2000)). Se ha mostrado que los dúplex de ARNip sintético suprimen específicamente la expresión de genes endógenos y heterólogos en una amplia gama de líneas celulares de mamíferos (Elbashir SM. y col. Nature, 411, 494-498, (2001)).

[0073] Véanse también Fire (1999) Trends Genet. 15: 358-363, Sharp (2001) Genes Dev. 15: 485-490, Hammond y col. (2001) Nature Rev. Genes 2: 1110-1119 y Tuschl (2001) Chem. Biochem. 2: 239-245.

[0074] Tal inhibición no codificante o de ARNi también puede dirigirse contra las enzimas que participan en la síntesis de cadenas de glicosaminoglicanos de CSPG.

[0075] Un agente que reduce la producción de uno o más CSPG pueden ser un agente que destruye uno o más de los tipos de células no neuronales que producen CSPG tales como precursores de oligodendrocitos. Esto se ha realizado para precursores de oligodendrocitos usando citosina arabinósido (Rhodes y col., 2000), un agente antimetabólico.

[0076] Los proteoglicanos en el cerebro y la médula espinal, que incluyen CSPG, se mantienen en su lugar por sus interacciones con otras moléculas de la matriz, particularmente hialuronano. Por tanto, el bloqueo, la eliminación o la reducción de la producción de hialuronano eliminará la unión de CSPG al tejido, permitiéndoles que difundan, eliminando su efecto inhibitorio.

[0077] Por consiguiente, un agente que reduce las propiedades inhibitorias de proteoglicanos de sulfato de condroitina puede ser un agente que interactúa con hialuronano para inhibir su capacidad para unirse a CSPG, o puede ser un agente que elimina (parcialmente o completamente) hialuronano, o puede ser un agente que reduce la producción de hialuronano, o puede ser un agente que bloquea, destruye o reduce la síntesis de un receptor por el que el hialuronano (y de ahí los CSPG) está anclado a la superficie de células en el SNC.

- 5 **[0078]** La descripción anterior del bloqueo, la eliminación y la reducción de la producción de CSPG se aplica cambiando lo que se deba cambiar al bloqueo, la eliminación y la reducción de la producción de hialuronano y al bloqueo, la eliminación y la reducción de la producción de receptores de hialuronano. En este contexto, la hialuronidasa (que digiere hialuronano) puede usarse para eliminar hialuronano; las hialuronano sintetasas 1, 2 y 3 (que participan en la síntesis de hialuronano) pueden ser dianas para reducir la producción de hialuronano; y los receptores de hialuronano CD44 (Bosworth y col. (1991) *Mol Immunol* 28(10):1131-5), Lyve 1 (Banerji y col. (1999) *J Cell Biol* 144(4):789-801), RHAMM (Wang y col. (1996) *Gene* 174(2):299-306; Spicer y col. (1995) *Genomics* 30(1) 115-7), layilina (Bono y col. (2001) *Mol Biol Cell* 12(4):891-900) e ICAM-1 pueden ser dianas para reducir la capacidad del hialuronano para anclar CSPG a las células del SNC.
- 10 **[0079]** También se cree que las proteínas de unión (tales como proteína de unión de cartílago (Dudhia y col. (1994) *Biochem J* 303(Pt 1):329-33) y BRAL-1 (Hirakawa y col. (2000) *Biochem Biophys Rec Commun* 276(3):982-9)) pueden participar en la unión de CSPG a la superficie celular. La descripción anterior del bloqueo, la eliminación y la reducción de la producción de CSPG se aplica cambiando lo que se deba cambiar al bloqueo, la eliminación y la reducción de la producción de proteínas de unión.
- 15 **[0080]** Un agente que reduce las propiedades inhibitorias de CSPG puede ser una molécula de azúcar que se une a las cadenas de GAG de uno o más CSPG o más preferentemente una molécula de azúcar que imita las cadenas de GAG de uno o más CSPG y/o hialuronano y así actúa de antagonista competitivo. Las estructuras de las cadenas de GAG de CSPG y de hialuronano son muy conocidas. Moléculas de azúcar particularmente preferidas comprenden disacáridos de repetición sulfatados de ácido glucurónico y N-acetilgalactosamina.
- 20 **[0081]** Además, los CSPG, las cadenas de glicosaminoglicanos de los mismos, las enzimas sintéticas de CSPG y/o los sustratos de aquellas enzimas (es decir, productos intermedios en la síntesis de CSPG) pueden usarse para identificar conductores para el desarrollo de otros agentes que reducen las propiedades inhibitorias de proteoglicanos de sulfato de condroitina. En particular, un compuesto de partida candidato puede probarse para unirse a un CSPG, enzima sintética de CSPG o sustrato de enzima sintético de CSPG usando técnicas convencionales. Los compuestos que se unen pueden probarse para la propiedad de reducir las propiedades inhibitorias de CSPG y/o promover plasticidad neuronal, por ejemplo, usando las técnicas descritas en los ejemplos (especialmente las técnicas de comportamiento y/o el modelo de desplazamiento de la dominancia ocular).
- 25 **[0082]** Especialmente antes de la prueba *in vivo*, un compuesto que se une pueden probarse para la propiedad de reducir la inhibición de excrecencias de neuritas tras la lesión del SNC, por ejemplo, en los modelos *in vitro* usados en los trabajos citados anteriormente y en los ejemplos en relación con el trabajo sobre la lesión de la médula espinal.
- 30 **[0083]** Tras la identificación de un compuesto de partida que tiene la propiedad de reducir la inhibición de excrecencias de neuritas tras la lesión del SNC, el compuesto de partida puede someterse a optimización de las propiedades farmacéuticas deseables, por ejemplo, mediante la producción y el cribado de miméticos del compuesto de partida.
- 35 **[0084]** El diseño de miméticos para un compuesto farmacéuticamente activo es un planteamiento conocido para el desarrollo de productos farmacéuticos basados en un compuesto "de partida". Esto podría desearse cuando el compuesto activo fuera difícil o caro de sintetizar o cuando no fuera adecuado para un procedimiento de administración particular, por ejemplo, los péptidos no son agentes activos adecuados para composiciones orales ya que tienden a ser rápidamente degradados por proteasas en el tubo digestivo. El diseño, la síntesis y la prueba de miméticos se usa generalmente para evitar el cribado aleatorio de grandes números de moléculas para una propiedad diana.
- 40 **[0085]** Hay varias etapas comúnmente realizadas en el diseño de un mimético a partir de un compuesto que tiene una propiedad diana dada. En primer lugar se determinan las partes particulares del compuesto que son críticas y/o importantes en la determinación de la propiedad diana. En el caso de un péptido, esto puede hacerse sistemáticamente variando los residuos de aminoácidos en el péptido, por ejemplo, sustituyendo cada residuo sucesivamente. Estas partes o residuos que constituyen la región activa del compuesto se conocen como su "farmacóforo".
- 45 **[0086]** Una vez se ha encontrado el farmacóforo, su estructura puede modelarse según sus propiedades físicas, por ejemplo, estereoquímica, enlace, tamaño y/o carga usando los datos de una serie de fuentes, por ejemplo, técnicas espectroscópicas, datos de difracción de rayos X y RMN. En este procedimiento de modelado puede usarse análisis computacional, el mapeo de similitud (que modela la carga y/o el volumen de un farmacóforo en vez del enlace entre átomos) y otras técnicas.
- 50 **[0087]** En una variante de este planteamiento se modelan la estructura tridimensional del ligando y su componente de unión. Esto puede ser especialmente útil cuando el ligando y/o componente de unión cambien la conformación con la unión, permitiendo que el modelo tenga en cuenta esto en el diseño del mimético.
- 55 **[0088]** Entonces se selecciona una molécula plantilla sobre la que pueden injertarse grupos químicos que imitan

al farmacóforo. La molécula plantilla y los grupos químicos injertados sobre ella pueden seleccionarse convenientemente de manera que el mimético sea fácil de sintetizar, sea probable que sea farmacológicamente aceptable y que no se degrade *in vivo*, a la vez que conserve la actividad biológica del compuesto de partida. Entonces, el mimético o los miméticos encontrados por este planteamiento pueden cribarse para ver si tienen la propiedad diana, o a qué grado la presentan. Entonces puede llevarse a cabo otra optimización o modificación para llegar a uno o más miméticos finales para el ensayo *in vivo* o clínico.

[0089] Por consiguiente, la presente invención proporciona en otro aspecto un procedimiento de identificación de un agente útil en la promoción de la plasticidad neuronal y/o para el tratamiento de lesión del SNC distinta de lesión de la médula espinal, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

(a) poner en contacto (i) un agente candidato y (ii) un CSPG, una cadena de glicosaminoglicano de CSPG, una enzima sintética de CSPG o un sustrato de enzima sintética de CSPG;

(b) determinar la unión entre (i) y (ii); y

(c) tras una determinación positiva de unión, ensayar el agente candidato para la capacidad para promover la plasticidad neuronal y/o para promover la recuperación funcional tras la lesión del SNC; y opcionalmente

(d) optimizar el agente candidato para uso *in vivo* mediante otras etapas que incluyen generar miméticos del agente candidato y repetir las etapas (a) y (b) y/o repetir la etapa (c).

[0090] La invención proporciona además un procedimiento de identificación de un agente útil en la promoción de plasticidad neuronal, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

(a) poner en contacto (i) un agente candidato y (ii) CSPG o una cadena de glicosaminoglicano de CSPG;

(b) determinar la capacidad de (i) para digerir (ii); y

(c) tras una determinación positiva de digestión, ensayar el agente candidato para la capacidad para promover la plasticidad neuronal y/o para promover la recuperación funcional tras la lesión del SNC; y opcionalmente

(d) optimizar el agente candidato para uso *in vivo* mediante otras etapas que incluyen generar miméticos del agente candidato y repetir las etapas (a) y (b) y/o repetir la etapa (c) con el mimético como agente candidato.

[0091] Las características preferidas de estos procedimientos son como se definen anteriormente.

[0092] Los procedimientos pueden incluir una etapa que precede a la etapa (c) de ensayar el agente candidato para la capacidad para reducir las propiedades inhibitorias de excrecencia de neuritas y/o regeneración axonal de CSPG tras la lesión del SNC.

[0093] En todavía otro aspecto, la invención proporciona el uso de un CSPG, una cadena de glicosaminoglicano de CSPG, una enzima sintética de CSPG o un sustrato de enzima sintética de CSPG en la identificación de un agente útil en la promoción de plasticidad neuronal.

[0094] En una realización preferida, el agente candidato puede ser un mimético de un β -D-xilósido. Los β -D-xilósidos son conocidos por prevenir la síntesis de CSPG, por competir con la proteína de CSPG por la unión de la cadena de glicosaminoglicano, por lo que son un punto de partida particularmente adecuado para la identificación de otros agentes.

[0095] Tras la identificación de un agente útil en la promoción de plasticidad neuronal, el agente puede formularse con uno o más excipientes convencionales aceptables para uso farmacéutico o veterinario. Una formulación tal puede administrarse para promover plasticidad neuronal en un mamífero.

[0096] La administración puede ser por cualquier vía convencional, en particular cualquier vía que pueda administrar el agente al SNC, a través de la barrera hematoencefálica. La vía de administración preferida será por administración directa al SNC, por ejemplo, infusión mediante cánula o inyección. Tal administración puede ser directamente en el sitio de lesión, en tejidos vecinos o en el líquido cefalorraquídeo. Véase, por ejemplo, la administración de condroitinasa ABC a cerebro de rata como se describe en Moon y col. (2001) y Bradbury y col. (2002).

[0097] Es de particular interés la administración a la médula espinal en un sitio por encima y/o por debajo del sitio de una lesión de la médula espinal. Dos tercios de las lesiones de médula espinal implican secciones transversales incompletas de la médula, sobreviviendo algunos axones a la lesión. En la mitad de estos casos incompletos hay función neurológica útil por debajo de la lesión. La potenciación de la plasticidad por debajo de la lesión debería permitir que los axones supervivientes inervaran neuronas en la médula más ampliamente y, por tanto, debería conducir al regreso de la función. Similarmente, se propone que la potenciación de la plasticidad por encima del nivel de la lesión permitirá cortar axones para hacer nuevas conexiones con neuronas cuyos axones todavía sobreviven y se proyectan

por debajo de la lesión, llevando así algo de función a la médula por debajo de la lesión.

[0098] Por tanto, es de interés la administración al cerebro (especialmente la corteza) en el caso de lesión de la médula espinal. Se propone que potenciar la plasticidad en el cerebro permitiría que los pacientes hicieran un mejor uso de sus conexiones supervivientes en la médula, de hecho, la plasticidad en la corteza puede inducirse temporalmente mediante promoción magnética repetitiva, y hay pruebas de que esto puede ser útil para pacientes con lesiones incompletas.

[0099] Los CSPG preferidos en relación con todos los aspectos de la invención son NG2, versicano (formas V0, V1 y V2), neurocano, brevicano, fosfacano y agrecano, estando todos presentes a altos niveles tras la lesión del SNC, y siendo todos conocidos por ser inhibidores de la regeneración axonal. Se ha informado de neurocano, agrecano, brevicano y fosfacano en redes perineuronales y son dianas preferidas para la inhibición para promover plasticidad neuronal.

[0100] La anterior descripción de la identificación de agentes se aplica cambiando lo que se deba cambiar a hialuronano y sus receptores y a proteínas de unión.

Ejemplo 1 – La condroitinasa ABC promueve la regeneración axonal y la recuperación funcional tras la lesión de la médula espinal.

Resumen

[0101] La incapacidad de los axones de regenerarse en el sistema nervioso central de mamíferos puede conducir a parálisis permanente después de una lesión de la médula espinal. En los sitios de lesión del SNC se desarrolla una cicatriz glial que contiene una variedad de moléculas de la matriz extracelular que incluyen proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG) (Fawcett y Asher, 1999). La regeneración de axones se detiene en estas regiones ricas en CSPG (Davies y col., 1999) y se ha mostrado que muchos CSPG son inhibitorios para el crecimiento de axones *in vitro* (McKeon y col., 1991; Fidler y col., 1999; Niederost y col., 1999). La eliminación de cadenas de glicosaminoglicanos (GAG) de CSPG atenúa la actividad inhibitoria de CSPG *in vitro* (Smith-Thomas y col., 1994; McKeon y col., 1995; Zuo y col., 1998) e *in vivo* (Moon y col., 2001). Para probar los efectos funcionales de la degradación de los GAG de sulfato de condroitina (GAG-CS) después de la lesión de la médula espinal se administró condroitinasa ABC (ChABC) a las columnas vertebrales lesionadas de ratas adultas. El tratamiento intratecal con ChABC degradó cadenas de GAG-CS en el sitio de lesión, reguló en exceso una proteína asociada a la regeneración en neuronas lesionadas y promovió la regeneración de tanto las proyecciones sensitivas ascendentes como los axones de la vía corticoespinal descendente.

[0102] El tratamiento con ChABC también restauró la actividad postsináptica por debajo de la lesión tras la estimulación eléctrica de neuronas corticoespinales. Finalmente, el tratamiento con ChABC promovió la recuperación funcional de algunos comportamientos locomotores y propioceptores.

Resultados y discusión

[0103] Ratas adultas recibieron una lesión por choque de la columna vertebral en el nivel 4 cervical (C4) e infusiones intratecales en bolo de ChABC libre de proteasa o una disolución de control durante 10 días.

[0104] Primero se investigó la eficacia de este tratamiento en la degradación de cadenas de GAG-CS en un sitio de lesión de la médula espinal usando el anticuerpo 2B6. Éste identifica un epítoto creado en las proteínas del núcleo de CSPG después de la digestión de ChABC y no reconoce GAG-CS intactos (Moon y col., 2001). En controles sin lesionar y animales lesionados que recibieron infusiones de control no fue evidente la inmunotinción con 2B6. Sin embargo, la incubación *in vitro* de secciones de tejido lesionadas adyacentes con ChABC reveló una abundancia de inmunorreactividad con 2B6 por toda la sección entera de la médula, confirmando que los CSPG están presentes en y alrededor del sitio de lesión tras una lesión de la columna vertebral. En ratas lesionadas tratadas *in vivo* con ChABC hubo una intensa inmunorreactividad para 2B6 alrededor del sitio de lesión y en vías de la sustancia blanca que se extendían al menos 4 mm rostral y caudalmente. Por tanto, la administración *in vivo* de ChABC eliminó satisfactoriamente cadenas de GAG-CS de CSPG en y alrededor del sitio de una lesión de la médula espinal y en vías de la sustancia blanca en las que se proyectan los axones de la columna vertebral.

[0105] Se evaluaron los efectos del tratamiento con ChABC usando la expresión de la proteína GAP-43 asociada al crecimiento de axones en neuronas sensitivas. La GAP-43 está regulada por incremento en esta población tras la lesión del nervio periférico en el que se produce la regeneración, pero no tras la lesión central (Chong y col., 1994), en la que normalmente no se produce la regeneración (Bradbury y col. 2000b), y por tanto, está asociada a un estado regenerativo. La expresión de GAP-43 se evaluó en los ganglios de la raíz posterior C5 y C6 (DRG). En controles con operación de referencia, la proteína GAP-43 estaba presente en aproximadamente el 25% de las neuronas de diámetro pequeño (< 40 µm) y el 6% de grande (> 40 µm), y los niveles no cambiaron 8 semanas después de las lesiones de la columna vertebral con infusiones de control. Sin embargo, en comparación con controles, la expresión de GAP-43 en animales lesionados tratados con ChABC aumentó notablemente en células de diámetro grande (del 5,9 ± 1,4% al 22,4 ± 2,3%, los datos son media ± eem, p<0,001, ANOVA univoca), que tenían axones que se proyectaban por el sitio de

lesión. Por tanto, la degradación de los componentes de GAG-CS de CSPG inhibitorios en el sitio de lesión permite la regulación por incremento de GAP-43 en neuronas axotomizadas que indica una propensión de estas células a regenerarse.

5 **[0106]** Para determinar si ChABC promovió la regeneración de axones de la columna vertebral ascendentes lesionados 8 semanas después de la lesión, la proyección de la columna vertebral de las extremidades anteriores se marcó usando trazado con subunidades de la toxina del cólera beta (CTB). Tras la lesión y la infusión de control se produjo la retracción del haz de fibras marcado con CTB, aproximándose pocas fibras al sitio de lesión y no entrando ninguna en tejido lesionado. A diferencia, en todos los animales lesionados que recibieron infusiones de ChABC hubo menos retracción de fibras, observándose gruesos haces de fibras que se aproximaban al sitio de lesión. Sorprendentemente, muchos axones atravesaron el tejido lesionado en ratas tratadas con ChABC, observándose haces de axones de regeneración que crecían alrededor de las cavidades y dentro del epicentro de la lesión. Las terminaciones similares a conos de crecimiento fueron evidentes en las puntas de axones en ratas infundidas con ChABC, que indica que de hecho estaban regenerándose. Se observó que los haces de axones crecieron hasta 2 mm a través del tejido lesionado y muchas fibras individuales fueron evidentes pasados 4 mm del sitio de lesión, que indica una regeneración robusta de axones de la columna vertebral ascendente lesionada.

20 **[0107]** También se investigó la regeneración de la vía corticoespinal (CST), la principal ruta descendente que entra en las columnas vertebrales. Para confirmar la lesión completa de la CST se realizó inmunotinción con PKC- γ (un marcador del sistema de CST, Mori y col., 1990) en la médula lumbar. En médula sin lesionar, la inmunorreactividad de PKC- γ se observó en la lámina II del asta dorsal y en la CST que entra en la parte ventral de las columnas vertebrales. Sin embargo, en todos los animales lesionados no se observó inmunorreactividad de PKC- γ en la CST a niveles lumbares, confirmando la sección transversal completa de esta vía. Para evaluar la regeneración axonal, axones de CST se marcaron usando el trazador anterógrado dextranamina biotinilada (BDA) inyectada en la corteza motora. En animales sin lesionar se observó un grueso haz de fibras en la médula espinal cervical. Diez semanas después de la lesión, los axones de CST en ratas lesionadas tratadas con vehículo no se aproximaron a la lesión, que indica retracción de CST tras la lesión de la columna vertebral (Hill y col., 2001), y no se observaron fibras más allá del sitio de lesión. Sin embargo, el tratamiento con ChABC previno la retracción de CST y promovió la regeneración, observándose significativamente más fibras por encima y por debajo de la lesión que en los animales tratados con vehículo ($P < 0,001$, ANOVA biunívoca). Los datos fueron recuentos de fibras por encima y por debajo de la lesión expresados como porcentajes (\pm eem) de axones contados 4 mm por encima de la lesión. Algunas fibras de regeneración en animales tratados con ChABC enviaron axones colindantes de la sustancia blanca a la sustancia gris, que indica la arborización terminal y posibles interacciones sinápticas de axones en regeneración.

35 **[0108]** Entonces se realizaron experimentos electrofisiológicos terminales para determinar si los axones de CST regenerados establecieron alguna conexión funcional. En animales de control anestesiados, los estímulos eléctricos de resistencia de las fibras A (100 μ A, 200 μ s) aplicados a la corteza motora provocaron grandes potenciales del dorso de la médula como se describe previamente (Wall y Lidieth, 1997), con una latencia promedio de $3,9 \pm 0,4$ ms en C4. Las lesiones agudas de la columna vertebral suprimieron en buen parte estos potenciales registrados incluso 1 mm por debajo de la lesión. La pequeña respuesta residual representa supuestamente actividad postsináptica inducida por las vías motoras descendentes que no entran en las columnas vertebrales. En animales tratados con vehículo estudiados 13-17 días después de las lesiones de la columna vertebral, los potenciales provocados corticales estuvieron presentes por encima de la lesión pero, al igual que con las lesiones agudas, se suprimieron ampliamente por debajo de la lesión ($P < 0,05$, ANOVA biunívoca). A diferencia, los animales tratados con ChABC mostraron claras respuestas provocadas registradas hasta 7 mm por debajo de la lesión, promediando aproximadamente el 40% del tamaño registrado por encima de la lesión, que no fueron significativamente diferentes de las respuestas en las preparaciones de referencia ($p > 0,1$, ANOVA biunívoca). Estas respuestas tuvieron una configuración normal, pero se retrasaron en comparación con controles (latencia media de $18,2 \pm 2,6$ ms, $p < 0,005$, ANOVA unívoca), de acuerdo con una escasa remielinización de axones en regeneración (Ramer y col., 2000). Se observaron respuestas similares en todos los animales tratados con ChABC, y se suprimieron por la resección aguda de las columnas vertebrales, un indicio muy fuerte de que representan conexiones recientemente formadas de axones de CST regenerados.

50 **[0109]** Las proyecciones de la columna vertebral son importantes para el toque discriminatorio fino y propiocepción y, junto con reflejos espinales locales, para la locomoción y la función motora experta. Por tanto, se evaluaron ratas en varias tareas de comportamiento de la función de las extremidades anteriores que requerían la integración de habilidades sensitivomotoras. Una tarea de quitar cinta adhesiva evaluó tanto la función sensitiva (conciencia de la cinta) como la motora (capacidad para quitar la cinta). Los controles de referencia sin lesionar sintieron rápidamente la presencia de la cinta y la quitaron. Las ratas lesionadas tratadas con tanto vehículo como ChABC estaban gravemente alteradas en ambos aspectos de la tarea en comparación con los controles de referencia (a latencias después de la lesión de 6 semanas [s] fueron $7,4 \pm 1,4$ y $3,8 \pm 0,5$ [de referencia], $54,9 \pm 3,1$ y $48,0 \pm 4,4$ [lesión más vehículo], $41,7 \pm 8,3$ y $40,5 \pm 11,1$ [lesión más ChABC] para sentir y quitar, respectivamente, $p < 0,001$, ANOVA biunívoca). Estas alteraciones persistieron durante las seis semanas completas de la prueba. El fracaso del tratamiento con ChABC para promover la recuperación en esta tarea está de acuerdo con el hecho de que los axones sensitivos no se degeneraron en la medida que los núcleos sensitivos del rombencéfalo.

[0110] En las dos tareas locomotoras se registró el número de caídas de las patas de las extremidades anteriores cuando las ratas cruzaron una estrecha barra o rejilla. En ambas tareas, los controles de referencia sin lesionar hicieron algunas, si es que las hicieron, caídas de las patas. Todas las ratas lesionadas tratadas con vehículo estuvieron gravemente y significativamente afectadas en ambas tareas durante todo el periodo de prueba, a pesar de alguna recuperación espontánea con el tiempo (Murray 1997) ($p < 0,001$, ANOVA biunívoca; las caídas de las patas aumentaron 6 semanas después de la lesión en comparación con los controles de referencia, de $0,0 \pm 0,0$ a $21,1 \pm 4,2$ y $0,8 \pm 0,5$ a $8,8 \pm 1,9$ en la barra y la rejilla, respectivamente). El tratamiento con ChABC produjo una sorprendente recuperación de la función en ambas tareas con mejoras observadas 2 semanas después de la lesión en la barra y 1 semana después de la lesión en la rejilla, durando el periodo de prueba completo (no significativamente diferentes de los controles de referencia, $p > 0,1$, ANOVA biunívoca; las caídas de las patas 6 semanas después de la lesión fueron $2,6 \pm 0,8$ y $1,6 \pm 0,7$ en la barra y la rejilla, respectivamente).

[0111] También se evaluaron los patrones de caminar de ratas analizando la separación de las huellas durante la locomoción continua. Se encontró que ratas lesionadas tratadas con vehículo daban pasos significativamente más cortos y más anchos que los de los controles de referencia (6 semanas después de la lesión la longitud disminuyó en comparación con los controles de $148,9 \pm 4,8$ a $118,1 \pm 6,3$ mm y el ancho aumentó de $12,5 \pm 1,9$ a $25,2 \pm 3,7$ mm, $P < 0,02$, ANOVA unívoca). Sin embargo, estos cambios se evitaron en gran medida en animales tratados con ChABC, en los que la longitud de los pasos y el ancho no se diferenciaron significativamente de los de los controles de referencia (la longitud y el ancho fueron $137,1 \pm 11,0$ y $15,4 \pm 3,6$ mm, respectivamente, $P > 0,1$, ANOVA unívoca).

[0112] Estos resultados demuestran que ChABC promueve la regeneración y la restauración de la función tras la lesión de la médula espinal. Estos efectos fueron evidentes usando criterios de valoración anatómicos, electrofisiológicos y de comportamiento. Una variedad de CSPG inhibitorios, que incluyen neurocano, fosfacano, brevicano y NG2, están regulados por incremento en los sitios de lesión del SNC (Levine, 1994; Yamada y col., 1997; McKeon y col., 1999; Asher y col., 2000) y los inventores han demostrado que las cadenas de GAG-CS son responsables de una parte significativa de sus propiedades inhibitorias.

[0113] Sólo se indujo regeneración parcial de axones lesionados, supuestamente debido a la presencia de otros mecanismos inhibitorios en el entorno de la médula espinal lesionada (Bregman y col., 1995; Pasterkamp y col., 2001). Sin embargo, incluso con regeneración limitada de los axones de la columna vertebral, los inventores han observado una recuperación muy clara de la función tras el tratamiento con ChABC, para el que hay varios sustratos anatómicos posibles. Primero, el recrecimiento limitado de axones sensitivos y motores de CST observado aquí podría explicar mediante nuevas conexiones segmentarias locales la recuperación del comportamiento. Segundo, los CSPG pueden funcionar en el adulto para inhibir que broten las rutas intactas, y la eliminación de esta inhibición por ChABC puede producir mecanismos de brote compensatorios beneficiosos o plasticidad similar a la observada después del tratamiento con IN-1 (Thallmair y col., 1998).

Procedimientos

35 Lesión de la médula espinal y tratamiento con ChABC:

[0114] Ratas Wistar macho adultas recibieron una lesión bilateral en las columnas vertebrales como se ha descrito previamente (Bradbury y col., 1999) realizada en el nivel espinal C4. Simultáneamente, un tubo silástico se insertó intratecalmente mediante la membrana atlanto-occipital para situarse justo rostral al sitio de lesión. El otro extremo del catéter se exteriorizó con el fin de administrar inyecciones en bolo de condroitinasa ABC libre de proteasas de alta pureza (ChABC, Seikagaku Corporation). Inmediatamente después de la lesión se inyectaron 6 μ l de ChABC (0,1 U/ml) seguido de 6 μ l de lavado de solución salina (Les + ChABC, $n=17$). Otro grupo (Les + vehículo, $n=21$) recibió la lesión de la médula espinal y se trataron tanto con solución salina como con una enzima de control, penicilinas (Sigma, los mismos μ g de proteína administrada). ChABC o la disolución de control se administraron en días alternos durante 10 días después de la lesión. Los animales de control ($n=20$) recibieron cirugía de referencia.

[0115] Las ratas tanto se perfundieron 2 semanas después de la lesión para comprobar la eficacia del tratamiento en la eliminación de GAG-CS ($n=4$ por grupo) como se probaron para su comportamiento durante 6 semanas ($n= 5, 9, 8$, ChABC, vehículo, referencia, respectivamente), luego se perfundieron 8 semanas después de la lesión para el análisis anatómico de sistemas ascendentes ($n=4$ por grupo). Otras ratas se perfundieron 10 semanas después de la lesión para el análisis de la regeneración de CST ($n=4$ por grupo) o se usaron para experimentos de electrofisiología terminales 14-17 días después de la lesión ($n=4$ por grupo).

Inmunotinción con 2B6 para confirmar la digestión de GAG-CS:

[0116] El procesamiento de tejido fue como se ha descrito previamente (Bradbury y col., 1999). Para determinar la eficacia de la administración de ChABC, secciones parasagitales (20 μ m) de médula espinal cervical se inmunotificaron usando anticuerpo monoclonal 2B6 (Seikagaku Corporation, 1:1000) con amplificación de la señal de tiramida (NEN). Como control de la digestión en exceso, secciones de tejido de médulas lesionadas tratadas con vehículo *in vivo* se incubaron *in vitro* con ChABC (1:50, 2 h, 37°C) antes de la inmunotinción. Esto dio una indicación de los efectos máximos sobre la digestión de la cadena de GAG-CS (y la inmunotinción con 2B6 resultante) que podrían

lograrse con el tratamiento con ChABC. El tejido de todas las condiciones experimentales se procesó en paralelo.

Análisis de GAP-43 en neuronas del ganglio de la raíz dorsal:

[0117] Se inmunotñieron doblemente secciones del DRG C5 y C6 (10 μ m) para β III tubulina (Promega, 1:1000) para identificar todas las neuronas y para la proteína GAP-43 asociada al crecimiento (donación de G. Wilkin, 1:2000) usando anticuerpos secundarios conjugados con AMCA y TRITC. Para cada grupo se capturaron imágenes de inmunotñición para 4 secciones/animal y el porcentaje de células positivas para GAP-43 se determinó para células inferiores y superiores a 40 μ m de diámetro.

Trazado de vías axonales en la médula espinal:

[0118] Los axones ascendentes que se proyectan en las columnas vertebrales se marcaron usando el trazador con subunidades de la toxina del cólera β (CTB) como se ha descrito previamente (Bradbury y col., 1999) inyectado en el nervio mediano izquierdo para marcar aferentes sensitivos de las extremidades anteriores. Se inmunotñieron secciones longitudinales (20 μ m) para la proteína ácida fibrilar de la glía con el fin de identificar el sitio de lesión, y para cm, para identificar los axones marcados de la columna vertebral (Bradbury y col., 1999).

[0119] Para el análisis de axones de CST descendentes las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/kg) y se colocaron en un aparato estereotáxico. Se quitó una parte del cráneo sobre la corteza motora primaria izquierda, se practicó una incisión en la duramadre y se inyectó dextranamina biotinilada (BDA, Molecular Probes Inc.) en la corteza motora primaria izquierda. Cada animal recibió 4 inyecciones de BDA (10% en solución salina) de 1 μ l uniformemente separadas 1 mm por debajo de la superficie dorsal del cerebro mediante una jeringuilla Hamilton. Entonces se colocó Gelfoam sobre el cerebro expuesto y el cuero cabelludo se cerró con sutura. Las ratas se dejaron durante otras 2 semanas antes de perfundirse. Las fibras marcadas con BDA se visualizaron en secciones de médula espinal parasagital (20 μ m) con avidina adicional conjugada con FITC. Todas las fibras marcadas con BDA observadas dentro de una rejilla de 1 mm cuadrado a intervalos medidos de 4 mm por encima a 5 mm por debajo del sitio de lesión fueron contadas por un investigador cegado al tratamiento. Debido a la variabilidad en el marcado, los números de axones en los diferentes puntos se calcularon como porcentaje de las fibras observadas 4 mm por encima de la lesión, en la que CST estaba intacta.

[0120] Con el fin de verificar un lesión de CST completa, secciones transversales de la médula espinal lumbar (20 μ m) se inmunotñieron con un anticuerpo contra la subunidad γ de proteína cinasa-C (PKC γ , Santa Cruz, 1:1000) visualizada con TRITC. La PKC γ se expresa por terminales aferentes y somas dentro del interior de la lámina II del asta dorsal y por la CST que se proyecta en las columnas vertebrales (Mori y col., 1990). Por tanto, la expresión de PKC γ en el asta dorsal lumbar no debería afectarse por la lesión de la columna vertebral cervical, mientras que la inmunoreactividad de CST debería estar ausente tras la sección transversal de CST.

Electrofisiología:

[0121] En experimentos electrofisiológicos terminales, la corteza sensitivomotora y la médula espinal cervical se expusieron en ratas anestesiadas con uretano (1,5 g/kg) que habían sido sometidas a cirugía de referencia o de lesión de la columna vertebral (tratadas con tanto vehículo como ChABC) 13-17 días previamente. Los potenciales provocados corticales se provocaron por estimulación eléctrica (5 pulsos de ondas cuadradas a 400 Hz, 100 μ A, 200 μ s, administrados cada 2 segundos) de la corteza sensitivomotora izquierda usando un electrodo de aguja concéntrica de 0,5 mm rebajado 1 mm en la corteza. Al principio de cada experimento se mapeó el sitio de estimulación óptima, estando localizado 1-2 mm lateral y 1 mm rostro-caudal del bregma. Los potenciales postsinápticos provocados por los estímulos corticales se registraron con un electrodo de bola de plata situado medialmente en la superficie de la médula contra-lateral. En cada sitio de registro (1 segmento por arriba y 1-7 mm por debajo de la lesión en C4) se promediaron 64 respuestas y se almacenaron para el análisis fuera de línea de la magnitud de respuesta (área bajo la curva) y latencia. Los datos se normalizaron al tamaño del registro rostral.

Evaluación del comportamiento:

[0122] Antes de cualquier cirugía, las ratas se manipularon exhaustivamente y se habituaron a las diversas tareas. Entonces, los animales se probaron en cada tarea en dos momentos de tiempo antes de la cirugía para obtener puntuaciones iniciales y una vez a la semana durante 6 semanas después de la lesión. No se observaron diferencias entre las puntuaciones de la pata delantera derecha e izquierda, por lo que se promediaron las dos. Los investigadores fueron ciegos al tratamiento.

[0123] Una prueba de quitar cinta adhesiva (adaptada de Thallmair y col., 1998) produjo puntuaciones separadas para comportamiento sensitivo y motor. Se colocó un rectángulo de cinta adhesiva (0,3" x 1") sobre la pata delantera y se determinó el tiempo necesario para notar la presencia de la cinta (indicado por la agitación de la pata). Para animales que notaron la cinta antes de 60 s de corte también se puntuó el tiempo necesario para quitar la cinta. En cada momento de tiempo después de la lesión se promediaron las puntuaciones para dos ensayos.

[0124] Se probaron ratas en dos tareas locomotoras que requieren integración sensitivomotora (retroalimentación sensitiva y coordinación motora) para el rendimiento exacto (adaptado de Kunkel-Bagden y col., 1993). Se entrenaron ratas para cruzar una estrecha barra de metal (1¼" x 36") y una rejilla de alambre (12" x 36" con cuadrado de la rejilla de 1" x 1") colocando una caja de escape oscura en un extremo. Se registró el número de caídas de las patas delanteras a la vez que navegaban a lo largo de la barra (determinado por la colocación errónea de la pata en la barra produciendo un desplazamiento hacia el lado) y la rejilla (determinado por el fallo al agarrar un travesaño produciendo una caída de la pata por debajo del plano de la rejilla). Se calcularon las puntuaciones totales para dos tandas en cada momento de tiempo.

[0125] En un análisis de huellas (también adaptado de Kunkel-Bagden y col., 1993), las patas delanteras de las ratas se impregnaron de tinta para registrar los patrones de marcha cuando las ratas cruzaban una pasarela de madera (4" x 36") cubierta de papel blanco.

[0126] El entrenamiento previo de las ratas usando la caja de escape oscura permitió la evaluación de huellas hechas durante la locomoción continua. Para cada rata se calcularon mediciones de longitudes de paso de las patas delanteras y el ancho de paso de 6 pasos (3 izquierdos y 3 derechos) en cada momento de tiempo después de la lesión.

Ejemplo 2 – El tratamiento con condroitinasa ABC conduce al desplazamiento de la dominancia ocular en ratas adultas.

[0127] En colaboración con trabajadores en Pisa se han realizado experimentos para probar si el tratamiento con condroitinasa desarrollado por Moon y col. podría restaurar la plasticidad de la dominancia ocular a la corteza adulta.

[0128] En el área binocular de la corteza visual de la rata, la mayoría de las neuronas están igualmente estimuladas por ambos ojos. Desde el nacimiento hasta el día 35, el cierre de un ojo por sutura conduce a que la mayoría de las neuronas corticales reciban su entrada más fuerte del ojo abierto, con pocas neuronas accionadas por el ojo cerrado. Este cambio se conoce como desplazamiento de la dominancia ocular. Después del día 35, el efecto del cierre del ojo sobre la dominancia ocular disminuye gradualmente sin efecto del cierre del ojo después del día 50.

[0129] Los investigadores examinaron la distribución de CSPG y tenascina-R durante este procedimiento. La condensación de neurocano y tenascina-R en redes perineuronales empieza cuando el periodo crítico empieza a terminar, y la formación de redes perineuronales visualizadas con lectina de *Wisteria* también se produce en este momento. Diversas investigaciones previas han mostrado la formación de redes perineuronales en diversas partes del cerebro en este momento, y en particular esos tres anticuerpos que probablemente se unen a agrecano (CAT301, 315, 316: Lander y col. 1997) revelan redes perineuronales en la corteza visual de gato coincidentes con el fin del periodo crítico.

[0130] Los investigadores plantearon como hipótesis que el establecimiento de CSPG en la corteza, y particularmente su concentración en redes perineuronales, podría contribuir decisivamente a la restricción de plasticidad cortical y prevenir el desplazamiento de la dominancia ocular después del cierre del ojo después del periodo crítico. Por tanto, inyectaron condroitinasa ABC en la corteza visual de ratas adultas, luego cerraron con sutura un ojo. 7 días después registraron la corteza para evaluar la dominancia ocular. Encontraron que la dominancia ocular de neuronas en la corteza visual se había desplazado hacia el ojo no privado, justo como en animales jóvenes sometidos a sutura del ojo durante el periodo crítico. Concluyeron que el establecimiento de proteoglicanos en la corteza es un mecanismo para el final del periodo crítico, y para la restricción de plasticidad cortical.

[0131] Como los proteoglicanos y los proteoglicanos en distribución difusa y en redes perineuronales se encuentran por toda la corteza, y como la plasticidad cortical se restringe en general en comparación con animales recién nacidos, es probable que la restricción de la plasticidad por proteoglicanos sea un mecanismo general en la corteza, otras partes del cerebro y la médula espinal. Por tanto, se propone que los tratamientos que eliminan los efectos inhibidores de proteoglicanos estimularían la plasticidad en todas las partes del sistema nervioso central.

[0132] La dosis y el procedimiento de administración fueron como se describen en Moon y col., 2001. Otros procedimientos para la manipulación de las ratas fueron como se describen en Lodovichi y col., 2000 y Maffei y col., 1992.

Referencias:

[0133]

Asher RA, Fidler PS, Morgenstern DA, Adcock KH, Oohira A, Rogers JH, Fawcett JW (2000) Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes, *J Neurosci* 20: 2427-2438.

Asher RA, Morgenstern DA, Adcock KH, Rogers JH, Fawcett JW (1999) Versican is up-regulated in CNS injury and is a product of O-2A lineage cells. *Soc Neurosci Abstr* 25: 750.

- Bandtlow, CE y Schwab, ME, NI-35/250/nogo-a; a neurite growth inhibitor restricting structural plasticity and regeneration of nerve fibers in the adult vertebrate CNS, *Glia*, 29 (2000) 175-181.
- Bradbury, E. J. y col. NT-3 promotes growth of lesioned adult rat sensory axons ascending in the dorsal columns of the spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 11, 3873-3883 (1999).
- 5 Bradbury, E. J., Bennett, G. S., Moon, L. D. F., Patel, P. N., Fawcett, J. W. y McMahon, S. B. (2000a) Chondroitinase ABC delivered to the site of a spinal cord injury upregulates GAP-43 expression in dorsal root ganglion neurons, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 26: 860.
- Bradbury, E. J., McMahon, S. B. & Ramer, M. S. (2000b) Keeping in touch: sensory neurone regeneration in the CNS. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 389-394.
- 10 Bradbury, E. J., Moon, L. D. F., Popat, R. J., King, V. R., Bennett, G. S., Patel, P. N., Fawcett, J. W. y McMahon, S. B. (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery following spinal cord injury. *Nature*, 416: 636-640.
- Bradbury, E. J. y col. (2001) Society for Neuroscience Abstracts 27: 1835 Abstract No. 698.14.
- Bregman, B. S. y col. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* 378,498-501 (1995).
- 15 Chong, M. S. y col. GAP-43 expression in primary sensory neurons following central axotomy. *J. Neurosci.* 14, 4375-4384 (1994).
- Davies, S. J., Goucher, D. R., Doller, C. & Silver, J. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 19, 5810-5822 (1999).
- 20 DeWitt DA, Richey PL, Praprotnik D, Silver J, Perry G (1994) Chondroitin sulfate proteoglycans are a common component of neuronal inclusions and astrocytic reaction in neurodegenerative diseases. *Brain Res* 656: 205-209.
- Fawcett JW, Asher RA (1999) The glial scar and CNS repair. *Brain Res Bull* 49: 377-391.
- Fidler PS, Schuette K, Asher RA, Dobbertin A, Thornton SR, Calle-Patino Y, Muir E, Levine JM, Geller HM, Rogers JH, Faissner A, Fawcett JW (1999) Comparing astrocytic cell lines that are inhibitory or permissive for axon growth: the major axon-inhibitory proteoglycan is NG2. *J Neurosci* 19: 8778-8788.
- 25 Hill, C. E., Beattie, M. S. & Bresnahan, J. C. Degeneration and sprouting of identified descending supraspinal axons after contusive spinal cord injury in the rat. *Exp. Neurol.* 171, 153-169 (2001).
- Koppe G, Bruckner G, Brauer K, Hartig W y Bigl V (1997) Developmental patterns of proteoglycan-containing extracellular matrix in perineuronal nets and neuropil of the postnatal rat brain, *Cell Tissue Res.*, 288 33-41.
- 30 Kunkel-Bagden, E., Dai, H. N. & Bregman, B. S. Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.* 119, 153-164 (1993).
- Lander, C., Kind, P., Maleski, M. y Hockfield, S., A family of activity-dependent neuronal cell-surface chondroitin sulfate proteoglycans in cat visual cortex, *J. Neurosci.*, 17, 1928-1939 (1997).
- 35 Levine, J. M. Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury. *J. Neurosci.* 14, 4716-4730 (1994).
- Lodovichi C, Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L (2000) Effects of neurotrophins on cortical plasticity: Same or different? *Journal Of Neuroscience* 20: 2155-2165.
- Maffei L, Berardi N, Domenici L, Parisi V, Pizzorusso T (1992) Nerve growth factor (NGF) prevents the shift in ocular dominance distribution of visual cortical neurons in monocularly deprived rats. *J. Neurosci.* 12 (12):4651-4662
- 40 McKeon, R. J., Schreiber, R. C., Rudge, J. S. & Silver, J. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J. Neurosci.* 11, 3398-3411 (1991).
- 45 McKeon, R. J., Hoke, A. & Silver, J. Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp. Neurol.* 136, 32-43 (1995).
- McKeon, R. J., Jurynek, M. J. & Buck, C. R. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J. Neurosci.* 19, 10778-10788 (1999).
- Moon LDF, Asher RA, Rhodes KE, Fawcett JW (2001) Regeneration of CNS axons back to their original target

following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. *Nat Neurosci* 4: 465-466.

Mori, M., Kose, A., Tsujino, T. & Tanaka, C. Immunocytochemical localization of protein kinase C subspecies in the rat spinal cord: light and electron microscopic study. *J. Comp Neurol.* 299, 167-177 (1990).

Murray, M. Strategies and mechanisms of recovery after spinal cord injury. *Adv. Neurol.* 72,219-225 (1997).

5 Niederost, B. P., Zimmermann, D. R., Schwab, M. E. & Bandtlow, C. E. Bovine CNS myelin contains neurite growth-inhibitory activity associated with chondroitin sulfate proteoglycans. *J. Neurosci.* 19,8979-8989 (1999).

Pasterkamp, R. J., Anderson, P. N. & Verhaagen, J. Peripheral nerve injury fails to induce growth of lesioned ascending dorsal column axons into spinal cord scar tissue expressing the axon repellent Semaphorin3A. *Eur. J. Neurosci.* 13, 457-471 (2001).

10 Ramer, M. S., Priestley, J. V. & McMahon, S. B. Functional regeneration of sensory axons into the adult spinal cord. *Nature* 403,312-316 (2000).

Rhodes, K. E., Moon, L. D. F. & Fawcett, J. W. (2000) Inhibiting cell proliferation in glial scar formation: effects on axon regeneration in the CNS. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 26 854.

15 Smith-Thomas L, Fok-Seang J, Stevens J, Du J-S, Muir E, Faissner A, Geller HM, Rogers JH, Fawcett JW (1994) An inhibitor of neurite outgrowth produced by astrocytes. *J Cell Sci* 107: 1687-1695.

Smith-Thomas L, Stevens J, Fok-Seang J, Muir E, Faissner A, Rogers JH, Fawcett JW (1995) Increased axon regeneration in astrocytes grown in the presence of proteoglycan synthesis inhibitors. *J Cell Sci* 108: 1307-1315.

Thallmair, M. & col. Neurite growth inhibitors restrict plasticity and functional recovery following corticospinal tract lesions. *Nat. Neurosci.* 1, 124-131 (1998).

20 Wall, P. D. & Lidierth, M. Five sources of a dorsal root potential: their interactions and origins in the superficial dorsal horn. *J Neurophysiol.* 78,860-871 (1997).

Yamada, H. & col. The brain chondroitin sulfate proteoglycan brevican associates with astrocytes ensheathing cerebellar glomeruli and inhibits neurite outgrowth from granule neurons. *J. Neurosci.* 17,7784-7795 (1997).

25 Zuo, J., Neubauer, D., Dyess, K., Ferguson, T.A. & Muir, D. Degradation of chondroitin sulfate proteoglycan enhances the neurite-promoting potential of spinal cord tissue. *Exp. Neurol.* 154,654-662 (1998).

REIVINDICACIONES

1. Condroitinasa para uso en un procedimiento de promoción de plasticidad neuronal en el SNC de un mamífero.
- 5 2. El uso de condroitinasa para la preparación de un medicamento para promover plasticidad neuronal en un mamífero.
3. La condroitinasa o el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la promoción de plasticidad neuronal es promoción de plasticidad neuronal en la médula espinal o estructura cuyos somas componentes se localizan en o tienen sinapsis primarias en la médula espinal.
- 10 4. La condroitinasa o el uso de cualquier reivindicación precedente, en la que la promoción de plasticidad neuronal es tras la lesión de la médula espinal.
5. La condroitinasa o el uso de la reivindicación 4, en la que la lesión de la médula espinal es una lesión producida por accidente, agresión, tumor, cirugía, o un disco intervertebral o anomalía ósea.
- 15 6. La condroitinasa o el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la promoción de plasticidad neuronal es promoción de plasticidad neuronal en el cerebro o estructura cuyos somas componentes se localizan en o tienen sinapsis primarias en el cerebro.
7. La condroitinasa o el uso de la reivindicación 6, en la que la promoción de plasticidad neuronal es promoción de plasticidad neuronal en la corteza.
- 20 8. La condroitinasa o el uso de la reivindicación 7, en la que la promoción de plasticidad neuronal es tras accidente cerebrovascular, lesión cerebral, esclerosis múltiple o una enfermedad neurodegenerativa que afecta a la corteza.
9. La condroitinasa o el uso de la reivindicación 8, en la que dicha lesión cerebral es lesión producida por agresión, accidente, tumor o cirugía.
10. La condroitinasa o el uso de la reivindicación 9, en la que dicho tumor es un tumor cerebral o un tumor no cerebral que afecta al cerebro.
- 25 11. La condroitinasa o el uso de la reivindicación 8, en la que dicha enfermedad neurodegenerativa que afecta a la corteza es Alzheimer.
12. La condroitinasa o el uso de la reivindicación 1 ó 2, en la que la enzima es condroitinasa ABC, condroitinasa B o condroitinasa AC.
- 30 13. Un procedimiento de identificación de un agente útil en la promoción de plasticidad neuronal, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - 35 (a) poner en contacto (i) un agente candidato y (ii) una sustancia seleccionada del grupo constituido por un proteoglicano de sulfato de condroitina (CSPG), una cadena de glicosaminoglicano de CSPG, una enzima sintética de CSPG, un sustrato de enzima sintética de CSPG, hialuronano, una enzima sintética de hialuronano y un receptor de hialuronano;
 - (b) determinar la unión entre (i) y (ii); y
 - (c) tras una determinación positiva de unión, ensayar el agente candidato para la capacidad para promover la plasticidad neuronal y/o para promover la recuperación funcional tras la lesión del SNC.
- 40 14. Un procedimiento de identificación de un agente útil en la promoción de plasticidad neuronal, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - (a) poner en contacto (i) un agente candidato y (ii) una sustancia seleccionada del grupo constituido por CSPG, una cadena de glicosaminoglicano de CSPG e hialuronano;
 - (b) determinar la capacidad de (i) para digerir (ii); y
 - 45 (c) tras una determinación positiva de la digestión, ensayar el agente candidato para la capacidad para promover la plasticidad neuronal y/o para promover la recuperación funcional tras la lesión del SNC.
15. El procedimiento de la reivindicación 13 o la reivindicación 14 que incluye adicionalmente una etapa que precede a la etapa (c) de ensayar el agente candidato para la capacidad para reducir las propiedades inhibitorias de excrecencia de neuritas y/o regeneración axonal de CSPG tras la lesión del SNC.

16. El uso de un CSPG, una cadena de glicosaminoglicano de CSPG, una enzima sintética de CSPG, un sustrato de enzima sintética de CSPG, hialuronano, una enzima sintética de hialuronano o un receptor de hialuronano en la identificación de un agente útil en la promoción de plasticidad neuronal, en el que la identificación del agente se lleva a cabo según un procedimiento como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15.

5 17. El procedimiento o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 13-16, en el que el agente candidato es un mimético de un β -D-xilósido.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

5 **Documentos de patente citados en la descripción**

- WO 9106303 A [0010]
- US 4816567 A [0049]
- US 5545807 A [0050]
- US 5545806 A [0050]
- US 5569825 A [0050]
- US 5625126 A [0050]
- US 5633425 A [0050]
- US 5661016 A [0050]
- US 5498536 A [0053] [0055]
- US 5741692 A [0055]
- US 5763205 A [0055]
- US 5773277 A [0055]
- US 5496718 A [0055]
- US 6093563 A [0055]
- US 6054569 A [0055]
- US 5997863 A [0055]

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- **Goding**. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press, 1986, 59-103 [0049]
- **Kozbor**. J Immunol, 1984, vol. 133, 3001 [0049]
- **Brodeur et al.** Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. Marcel Dekker, Inc, 1987, 51-63 [0049]
- **Jones et al.** Nature, 1986, vol. 321, 522-525 [0049]
- **Riechmann et al.** Nature, 1988, vol. 332, 323-327 [0049]
- **Verhoeyen et al.** Science, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0049]
- **Hoogenboom ; Winter**. J. Mol. Biol, 1991, vol. 227, 381 [0050]
- **Marks et al.** J Mol Biol, 1991, vol. 222, 581 [0050]
- **Cole et al.** Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. Alan R Liss, 1985, 77 [0050]
- **Boerner et al.** J. Immunol., 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0050]
- **Marks et al.** Bio/Technology, 1992, vol. 10, 779-783 [0050]
- **Lonberg et al.** Nature, 1994, vol. 368, 856-859 [0050]
- **Morrison**. Nature, 1994, vol. 368, 812-13 [0050]
- **Fishwild et al.** Nature Biotechnology, vol. 14, 845-51 [0050]
- **Lonberg ; Huszar**. Intern Rev Immunol, 1995, vol. 13, 65-93 [0050]
- **Tkalec et al.** Appl. Environ. Microbiol., 2000, vol. 66 (1), 29-35 [0055]
- **Kitagawa et al.** J Biol Chem, 2000, vol. 275 (28), 21075-80 [0061]
- **Yamauchi et al.** J Biol Chem, 2000, vol. 275 (12), 8975-81 [0061]
- **Li et al.** Genomics, 1999, vol. 55 (3), 345-7 [0061]
- **Kobayashi et al.** J Biol Chem, 1999, vol. 274 (15), 10474-80 [0061]
- **Nastuk et al.** J Neurosci, 1998, vol. 18 (18), 7167-77 [0061]
- **Uchimura et al.** J Biol Chem, 1998, vol. 273 (35), 22577-83 [0061]
- **Fukuta et al.** Biochim Biophys Acta, 1998, vol. 1399 (1), 57-61 [0061]
- **Uchimura et al.** Glycobiology, 1998, vol. 8 (5), 489-96 [0061]
- **Mazany et al.** Biochim Biophys Acta, 1998, vol. 1407 (1), 92-7 [0061]
- **Tsutsumi et al.** FEBS Lett, 1998, vol. 441 (2), 235-41 [0061]
- **Fukuta et al.** J Biol Chem, 1997, vol. 272 (51), 32321-8 [0061]
- **Fukuta et al.** J Biol Chem, 1995, vol. 270 (31), 18575-80 [0061]

- **Neuberger.** Nature Biotechnology, 1996, vol. 14, 826 [0050]
- **Okuda et al.** J Biochem (Tokyo), 2000, vol. 128 (5), 763-70 [0061]
- **Okuda et al.** J Biol Chem, 2000, vol. 275 (51), 40605-13 [0061]
- **Zamecnik et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, vol. 83, 4143-4146 [0069]
- **Dzau et al.** Trends in Biotechnology, 1993, vol. 11, 205-210 [0069]
- **Wu et al.** J Biol Chem, 1987, vol. 262, 4429-4432 [0069]
- **Wagner et al.** Proc. Natl Acad. Sci USA, 1990, vol. 87, 3410-3414 [0069]
- **Anderson et al.** Science, 1992, vol. 256, 808-813 [0069]
- **Baulcombe.** The EMBO Journal, 1997, vol. 16 (12), 3675-3684 [0070]
- **Voinnet ; Baulcombe.** Nature, 1997, vol. 389, 553 [0070]
- **Fire A. et al.** Nature, 1998, vol. 391 [0070]
- **Zamore P.D.** Nature Structural Biology, 2001, vol. 8 (9), 746-750 [0071]
- **Zamore PD et al.** Cell, 2000, vol. 101, 25-33 [0072]
- **Elbashir SM. et al.** Nature, 2001, vol. 411, 494-498 [0072]
- **Fire.** Trends Genet., 1999, vol. 15, 358-363 [0073]
- **Sharp.** Genes Dev., 2001, vol. 15, 485-490 [0073]
- **Hammond et al.** Nature Rev. Genes, 2001, vol. 2, 1110-1119 [0073]
- **Tuschl.** Chem. Biochem., 2001, vol. 2, 239-245 [0073]
- **Bosworth et al.** Mol Immunol, 1991, vol. 28 (10), 1131-5 [0078]
- **Banerji et al.** J Cell Biol, 1999, vol. 144 (4), 789-801 [0078]
- **Wang et al.** Gene, 1996, vol. 174 (2), 299-306 [0078]
- **Spicer et al.** Genomics, 1995, vol. 30 (1), 115-7 [0078]
- **Bono et al.** Mol Biol Cell, 2001, vol. 12 (4), 891-
- **Asher RA ; Fidler PS ; Morgenstern DA ; Adcock KH ; Oohira A ; Rogers JH ; Fawcett JW.** Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. J Neurosci, 2000, vol. 20, 2427-2438 [0133]
- **Asher RA ; Morgenstern DA ; Adcock KH ; Rogers JH ; Fawcett JW.** Versican is up-regulated in CNS injury and is a product of O-2A lineage cells. Soc Neurosci Abstr, 1999, vol. 25, 750 [0133]
- **Bandtlow, CE ; Schwab, ME.** NI-35/250/nogo-a; a neurite growth inhibitor restricting structural plasticity and regeneration of nerve fibers in the adult vertebrate CNS. Glia, 2000, vol. 29, 175-181 [0133]
- **Bradbury,E.J. et al.** NT-3 promotes growth of lesioned adult rat sensory axons ascending in the dorsal columns of the spinal cord. Eur. J. Neurosci., 1999, vol. 11, 3873-3883 [0133]
- **Bradbury,E.J. ; Bennett,G.S. ; Moon,L.D.F. ; Patel,P.N. ; Fawcett,J.W. ; McMahon,S.B.** Chondroitinase ABC delivered to the site of a spinal cord injury upregulates GAP-43 expression in dorsal root ganglion neurons. Soc. Neurosci. Abstr., 2000, vol. 26, 860 [0133]
- **Bradbury,E.J. ; McMahon,S.B. ; Ramer,M.S.** Keeping in touch: sensory neurone regeneration in the CNS. Trends Pharmacol. Sci., 2000, vol. 21, 389-394 [0133]
- **Bradbury, E. J. ; Moon, L. D. F. ; Popat, R. J. ; King, V. R. ; Bennett, G. S. ; Patel, P. N. ; Fawcett, J. W. ; McMahon, S. B.** Chondroitinase ABC promotes functional recovery following spinal cord injury. Nature, 2002, vol. 416, 636-640 [0133]
- **Bradbury, E.J. et al.** Society for Neuroscience Abstracts, 2001, vol. 27, 1835 [0133]
- **Bregman,B.S. et al.** Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. Nature, 1995, vol. 378, 498-501 [0133]
- **Chong,M.S. et al.** GAP-43 expression in primary sensory neurons following central axotomy. J. Neurosci., 1994, vol. 14, 4375-4384 [0133]
- **Davies,S.J. ; Goucher,D.R. ; Doller,C. ; Silver,J.** Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. J. Neurosci., 1999, vol. 19, 5810-5822 [0133]

900 [0078]

- **Dudhia et al.** Biochem J, 1994, vol. 303, 329-33

[0079]

- **Hirakawa et al.** Biochem Biophys Res Commun, 2000, vol. 276 (3), 982-9 [0079]

- **DeWitt DA ; Richey PL ; Praprotnik D ; Silver J ; Perry G.** Chondroitin sulfate proteoglycans are a common component of neuronal inclusions and astrocytic reaction in neurodegenerative diseases. Brain Res, 1994, vol. 656, 205-209 [0133]

- **Fawcett JW ; Asher RA.** The glial scar and CNS repair. Brain Res Bull, 1999, vol. 49, 377-391 [0133]

- **Fidler PS ; Schuette K ; Asher RA ; Dobbertin A ; Thornton SR ; Calle-Patino Y ; Muir E ; Levine JM ; Geller HM ; Rogers JH.** Comparing astrocytic cell lines that are inhibitory or permissive for axon growth: the major axon-inhibitory proteoglycan is NG2. J Neurosci, 1999, vol. 19, 8778-8788 [0133]

- **Hill, C.E. ; Beattie, M.S. ; Bresnahan, J.C.** Degeneration and sprouting of identified descending supraspinal axons after contusive spinal cord injury in the rat.

Exp. Neurol., 2001, vol. 171, 153-169 [0133]

- **Koppe G ; Bruckner G ; Brauer K ; Hartig W ; Bigl V.** Developmental patterns of proteoglycan-containing extracellular matrix in perineuronal nets and neuropil of the postnatal rat brain. Cell Tissue Res., 1997, vol. 288, 33-41 [0133]

- **Kunkel-Bagden, E. ; Dai, H.N. ; Bregman, B.S.**

Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. Exp. Neurol., 1993, vol. 119, 153-164 [0133]

- **Lander, C. ; Kind, P. ; Maleski, M. ; Hockfield, S.** A family of activity-dependent neuronal cell-surface chondroitin sulfate proteoglycans in cat visual cortex. J. Neurosci., 1997, vol. 17, 1928-1939 [0133]

- **Levine, J.M.** Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury. J. Neurosci., 1994, vol. 14, 4716-4730 [0133]

- **Lodovichi C ; Berardi N ; Pizzorusso T ; Maffei L.** Effects of neurotrophins on cortical plasticity: Same or different?. Journal Of Neuroscience, 2000, vol. 20, 2155-2165 [0133]

- **Maffei L ; Berardi N ; Domenici L ; Parisi V ; Pizzorusso T.** Nerve growth factor (NGF) prevents the shift in ocular dominance distribution of visual cortical neurons in monocularly deprived rats. J. Neurosci., 1992, vol. 12 (12), 4651-4662 [0133]

- **McKeon, R.J. ; Hoke, A. ; Silver, J.** Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. Exp. Neurol., 1995, vol. 136, 32-43 [0133]

- **McKeon, R.J. ; Jurynek, M.J. ; Buck, C.R.** The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in

the chronic CNS glial scar. J. Neurosci., 1999, vol. 19, 10778-10788 [0133]

- **Moon LDF ; Asher RA ; Rhodes KE ; Fawcett JW.** Regeneration of CNS axons back to their original target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. Nat Neurosci, 2001, vol. 4, 465-466 [0133]

- **Mori, M. ; Kose, A. ; Tsujino, T. ; Tanaka, C.** Immunocytochemical localization of protein kinase C subspecies in the rat spinal cord: light and electron microscopic study. J. Comp Neurol., 1990, vol. 299, 167-177 [0133]

- **Murray, M.** Strategies and mechanisms of recovery after spinal cord injury. Adv. Neurol., 1997, vol. 72, 219-225 [0133]

- **Niederost, B.P. ; Zimmermann, D.R. ; Schwab,**

M.E. ; **Bandtlow, C.E.** Bovine CNS myelin contains neurite growth-inhibitory activity associated with chondroitin sulfate proteoglycans. J. Neurosci., 1999, vol. 19, 8979-8989 [0133]

- **Pasterkamp, R.J. ; Anderson, P.N. ; Verhaagen, J.** Peripheral nerve injury fails to induce growth of lesioned ascending dorsal column axons into spinal cord scar tissue expressing the axon repellent Semaphorin3A. Eur. J. Neurosci., 2001, vol. 13, 457-471 [0133]

- **Ramer, M.S. ; Priestley, J.V. ; McMahon, S.B.** Functional regeneration of sensory axons into the adult spinal cord. Nature, 2000, vol. 403, 312-316 [0133]

- **Rhodes, K.E. ; Moon, L.D.F. ; Fawcett, J.W.** Inhibiting cell proliferation in glial scar formation: effects on axon regeneration in the CNS. Soc. Neurosci. Abstr., 2000, vol. 26, 854 [0133]

- **Smith-Thomas L ; Fok-Seang J ; Stevens J ; Du J-S ; Muir E ; Faissner A ; Geller HM ;**

• **McKeon,R.J. ; Schreiber,R.C. ; Rudge,J.S. ; Silver, J.** Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes.

J. Neurosci., 1991, vol. 11, 3398-3411 [0133]

• **Smith-Thomas L ; Stevens J ; Fok-Seang J ; Muir E ; Faissner A ; Rogers JH ; Fawcett JW.** Increased axon regeneration in astrocytes grown in the presence of proteoglycan synthesis inhibitors. J Cell Sci, 1995, vol. 108, 1307-1315 [0133]

• **Thalmair,M. et al.** Neurite growth inhibitors restrict plasticity and functional recovery following corticospinal tract lesions. Nat. Neurosci., 1998, vol. 1, 124-131 [0133]

• **Wall,P.D. ; Lidieth,M.** Five sources of a dorsal root potential: their interactions and origins in the superficial dorsal horn. J Neurophysiol., 1997, vol. 78, 860-871 [0133]

Rogers JH ; Fawcett JW. An inhibitor of neurite outgrowth produced by astrocytes. J Cell Sci, 1994, vol. 107, 1687-1695 [0133]

• **Yamada,H. et al.** The brain chondroitin sulfate proteoglycan brevican associates with astrocytes ensheathing cerebellar glomeruli and inhibits neurite outgrowth from granule neurons. J. Neurosci., 1997, vol. 17, 7784-7795 [0133]

• **Zuo,J. ; Neubauer,D. ; Dyess,K. ; Ferguson, T.A. ; Muir,D.** Degradation of chondroitin sulfate proteoglycan enhances the neurite-promoting potential of spinal cord tissue. Exp. Neurol., 1998, vol. 154, 654-662 [0133]