



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 333**

51 Int. Cl.:
C12P 21/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03788682 .7**

96 Fecha de presentación : **14.08.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1530643**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.05.2005**

54 Título: **Proteína quimérica.**

30 Prioridad: **15.08.2002 US 403839 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.10.2011

73 Titular/es: **ACORDA THERAPEUTICS, Inc.**
15 Skyline Drive
Hawthorne, New York 10532, US

72 Inventor/es: **Gruskin, Elliott, A.;**
Gargi, Roy y
Chojnicki, Eric, Theodore

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 366 333 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).

DESCRIPCION

Proteína quimérica

ANTECEDENTES

Campo Técnico

5 La presente publicación se refiere a una proteína quimérica que contiene al menos dos dominios funcionales. La proteína se codifica por un gen recombinante que contiene, al menos, un dominio que codifica un primer polipéptido que posee actividad de modificación de matriz por separación de componentes de la matriz extracelular que inhiben el crecimiento y desarrollo neuronal y que se selecciona de enzimas de digestión de la matriz, y al menos otro dominio que codifica un segundo polipéptido que posee actividad de factor neurotrófico en células neuronales. Los compuestos de esta publicación se pueden usar para favorecer la reparación de daño neuronal causado por enfermedad o trauma físico.

Descripción de la Técnica Relacionada

15 La capacidad de las neuronas para extender las neuritas es de importancia fundamental en el establecimiento de conexiones neuronales durante el desarrollo. Se requiere también durante la regeneración para restablecer conexiones destruidas como resultado de una lesión.

20 Un área que se ha determinado que es de importancia en la reparación y regeneración de tejido celular, incluyendo tejido neural, es la matriz extracelular. Durante aproximadamente las dos últimas décadas, el conocimiento básico de la adhesión y migración celular en matrices extracelulares (ECMs) a nivel molecular se ha extendido rápidamente. La acción de enzimas y otros polipéptidos que degradan componentes de la matriz extracelular y membranas basales puede facilitar los casos de reparación neural por una variedad de mecanismos que incluyen la liberación de citoquinas unidas y aumentando la permeabilidad de la matriz, aumentando con ello la movilidad de moléculas mediadoras, factores de crecimiento y agentes quimiotácticos, así como las células implicadas en el proceso de curación. Por ejemplo, la patente de U.S. No. 5.997.863 describe el uso de glicosaminoglicanos para manipular la proliferación celular y estimular la cicatrización de heridas.

25 Aunque se pueden usar proteínas, especialmente enzimas, para separar los componentes de la matriz extracelular inhibidores de la regeneración, su uso solamente puede no ser suficiente para llevar a cabo la reparación de un sistema nervioso dañado.

30 Un número de moléculas y de regiones específicas de ellas se han implicado en la capacidad para favorecer el brote de neuritas de una célula neuronal, un proceso llamado también brote neurítico. Este proceso es fundamental en el desarrollo y regeneración neural, especialmente después de que el daño físico o enfermedad ha dañado las células neuronales. Las neuritas se alargan profusamente durante el desarrollo del sistema nervioso central y periférico de todas las especies animales (Cajal, Degeneración y regeneración en el sistema nervioso, Oxford University Press, London (1928)). Este fenómeno corresponde a los axones y dendritas. Sin embargo, en adultos, el rebrote de axones y dendritas en el sistema nervioso central se pierde cada vez más con el progreso evolutivo.

35 Se sabe que diversos polipéptidos, especialmente moléculas de adhesión celular (CAMs), favorecen el crecimiento de células neurales. Aunque los primeros esfuerzos en este área de investigación se concentraron sobre la fibronectina (FN), proteína de matriz extracelular favorecedora de la adhesión, se ha descubierto también que otros péptidos favorecen el crecimiento neural. Por ejemplo, la patente de U.S. No. 5.792.743 describe nuevos polipéptidos y métodos para favorecer el crecimiento neural en el sistema nervioso central de un mamífero administrando una molécula soluble de adhesión celular neural, un fragmento suyo, o un producto de fusión-Fc suyo. La patente de U.S. No. 6.313.265 describe polipéptidos sintéticos que contienen las regiones farmacológicamente activas de CAMs que se pueden usar para favorecer la reparación y regeneración nerviosa tanto en daños de nervios periféricos como lesiones del sistema nervioso central (CNS).

45 Aunque útiles, el uso de proteínas regeneradoras solamente puede no ser suficiente para llevar a cabo la reparación de un sistema nervioso dañado.

50 Las proteínas quiméricas se conocen en la técnica como proteínas derivadas de fuentes genéticamente diferentes. Se sintetizan normalmente usando técnicas de DNA recombinante. Por ejemplo, la patente de U.S. No. 6.326.166 describe proteínas quiméricas de unión a DNA y métodos para su fabricación y uso, y la patente de U.S. No. 6.248.562 describe proteínas quiméricas que contienen polipéptidos antigénicos derivados de cepas de Borrelia que causan la enfermedad de Lyme.

El documento WO 95/13091 describe una proteína quimérica que comprende actividad enzimática que altera la ECM y un resto de unión a la ECM.

El documento EP 0704532 describe una proteína quimérica que tiene un polipéptido modificador de la matriz y un factor regulador celular glicoproteico.

SUMARIO

De acuerdo con la presente publicación, se describe una proteína quimérica que contiene al menos dos dominios funcionales. Los dominios funcionales codifican polipéptidos que no se encuentran conjuntamente en la naturaleza, pero ambos favorecen la regeneración y reparación de tejido neural dañado.

- 5 En una realización, el primer dominio funcional es para un polipéptido, que es una enzima de digestión de la matriz, que posee actividad de modificación de la matriz por separación de componentes de la matriz extracelular que inhiben el crecimiento y desarrollo neural. El segundo dominio funcional es para un polipéptido que se sabe que posee actividad de factor neurotrófico para las células.

- 10 La publicación se extiende a métodos de favorecer y aumentar la regeneración neural in vivo utilizando proteínas quiméricas que combinan dos o más dominios que codifican para dos o más polipéptidos terapéuticos, y a composiciones farmacéuticas que se pueden usar para alcanzar los objetivos de tales métodos. Más específicamente, las proteínas quiméricas de la presente publicación se pueden formular en una composición que se puede liberar en un sitio neural, como por administración parenteral.

El término "Chasa" o "CHasa" cuando se usa en el presente documento es una abreviatura de "condroitinasa".

15 BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Fig. 1 es un gel de agarosa que representa el fragmento clonado de Chasa AC de *Flavobacterium Heparinum*.

La Fig. 2 muestra la expresión de condroitinasa AC en el vector Pet 15b.

La Fig. 3 muestra la expresión proteica de Chasa AC.

La Fig. 4 es un gel zimográfico que muestra la actividad de Chasa AC recombinante.

- 20 La Fig. 5 es un gel de agarosa que representa el fragmento clonado de Chasa B de *Flavobacterium Heparinum*.

La Fig. 6 muestra la expresión de condroitinasa B en el vector Pet 15b.

La Fig. 7 muestra la purificación de Chasa B usando columna de Ni-NTA y pasada sobre gel de SDS-PAGE al 10%.

La Fig. 8 es un gel zimográfico que muestra la actividad de Chasa B recombinante.

La Fig. 9 es un gel de agarosa que representa el fragmento clonado de Chasa ABC de *Proteus Vulgaris*.

- 25 La Fig. 10 es un gel de agarosa que representa la expresión de condroitinasa AC en PCDNA4HisMax, un vector de expresión en mamíferos.

La Fig. 11 indica la técnica de transferencia de Western que muestra extractos de células transfectadas CHO-K con Chasa AC.

- 30 La Fig. 12 es un gel de agarosa que representa la expresión de condroitinasa B en PCDNA4HisMax, un vector de expresión en mamíferos.

La Fig. 13 indica la técnica de transferencia de Western que muestra extractos de células transfectadas CHO-K con Chasa B.

La Fig. 14 representa un gel proteico de proteína L1-Fc humana purificada.

- 35 La Fig. 15 indica los resultados de un ensayo de brote que muestra actividad de L1-Fc humana favoreciendo brote neurítico.

DESCRIPCION DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

- 40 La presente publicación se refiere a proteínas quiméricas que combinan polipéptidos que no se encuentran conjuntamente en la naturaleza. Las proteínas quiméricas son una combinación de uno o más polipéptidos capaces de modificar la matriz extracelular como se ha descrito anteriormente, con al menos otro polipéptido que posee actividad de factor neurotrófico para células neurales.

Cuando se usan en el presente documento, los términos "proteína", "polipéptido", y "péptido" se usan de modo intercambiable aquí para designar una serie de residuos aminoacídicos unidos uno a otro por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carboxilo de residuos adyacentes.

- 45 La expresión "proteína quimérica" describe una proteína que comprende dos o más polipéptidos que se derivan de especies diferentes. Un polipéptido "derivado de" una especie es un polipéptido que tiene una secuencia aminoacídica igual que una secuencia aminoacídica presente en la especie, una secuencia aminoacídica

equivalente a la secuencia aminoacídica de una proteína presente de forma natural en una especie, o una secuencia aminoacídica sustancialmente similar a la secuencia aminoacídica de una proteína presente de forma natural en una especie (que difieren, por ejemplo, en varios aminoácidos) tal como cuando un ácido nucleico que codifica una proteína se somete a mutagénesis dirigida.

5 Proteínas "correspondientes" son proteínas equivalentes de diferentes especies.

Las proteínas quiméricas contienen un primer polipéptido y un segundo polipéptido como se ha descrito anteriormente. Los polipéptidos relevantes se combinan en una sola proteína quimérica.

10 Las quimeras descritas en el presente documento se pueden producir de manera que son muy solubles, hiperproducidas en *E. coli*, y no lipidadas. Además, las proteínas quiméricas se pueden diseñar para finalizar en una etiqueta de afinidad (etiqueta o cola de poli(histidina)) para facilitar la purificación.

15 Las proteínas quiméricas descritas en este documento se pueden producir por técnicas conocidas, tales como por metodología recombinante, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o mutagénesis. Se pueden formar también proteínas quiméricas por entrecruzamiento químico de la primera proteína al segundo péptido o proteína para formar una proteína quimérica. Se conocen en la técnica numerosos agentes químicos de entrecruzamiento (disponibles comercialmente, por ejemplo de Pierce, Rockford Ill.). Se puede elegir un agente de entrecruzamiento que permite acoplamiento de alto rendimiento del modulador al segundo péptido o proteína y subsiguiente escisión del enlazador para liberar el modulador bioactivo. Por ejemplo, se puede usar un sistema enlazador a base de biotina-avidina.

20 En una realización, los dos polipéptidos de la proteína quimérica están enlazados conjuntamente por un péptido, tal como un fragmento de una molécula de inmunoglobulina. Así, por ejemplo, la ligadura peptídica entre los dos polipéptidos puede ser un fragmento Fc, que se ha descubierto que aumenta la actividad del componente polipeptídico factor neurotrófico. En ciertas realizaciones, el fragmento Fc contiene regiones necesarias para formar dímeros enlazados por disulfuro, pero no incluye segmentos que acercan los carboxilos terminales que tienden a inducir fagocitosis macrofágica.

25 Cuando se usan técnicas recombinantes para preparar una proteína quimérica de acuerdo con esta publicación, se usan preferiblemente moléculas o segmentos de ácido nucleico (por ejemplo, DNA). Las moléculas de DNA por tanto se unen (se enlazan covalentemente) a un vector que se expresa posteriormente en un huésped adecuado.

30 Cuando se usa una molécula de RNA que codifica uno de los polipéptidos de la presente publicación, la molécula de RNA que incluye la molécula que codifica el polipéptido se transcribe en DNA complementario (cDNA) por medio de una transcriptasa inversa. La molécula de cDNA se puede usar entonces como se describe en este documento para generar el polipéptido en cuestión.

En una realización particularmente útil, una secuencia nucleotídica (molécula) de DNA que codifica al menos una de las secuencias de residuos aminoacídicos del polipéptido modificador de la matriz o factor neurotrófico como se describe en este documento está operativamente unida a una molécula más grande de DNA. La molécula de DNA resultante se transforma o transfecta por tanto a un huésped y se expresa en él.

35 Los segmentos de DNA (es decir, oligonucleótidos sintéticos) que codifican los componentes polipeptídicos de la presente publicación se pueden sintetizar por técnicas químicas estándar, por ejemplo el método de fosfotriésteres de Matteucci, et al., (*J. Am. Chem. Soc.*, 103:3185-3191, 1981) o por medio de métodos de síntesis automatizados. Además, se pueden preparar fácilmente segmentos de DNA mayores por métodos muy conocidos, tales como la síntesis de un grupo de oligonucleótidos que definen el segmento de DNA, seguido por hibridación y enlace de oligonucleótidos para formar el segmento completo del polipéptido de interés.

40 Por supuesto que sintetizando químicamente la secuencia codificadora se pueden hacer modificaciones deseadas cualesquiera simplemente sustituyendo las bases que codifican la secuencia nativa de residuos aminoacídicos por las bases apropiadas. Además, los segmentos de DNA que consisten esencialmente en genes estructurales que codifican el polipéptido de interés se pueden obtener a partir de moléculas de DNA recombinante que contienen un gen que define un péptido descrito regenerador o modificador de la matriz, y se pueden modificar posteriormente, como por mutagénesis dirigida, para introducir las sustituciones deseadas.

45 Las secuencias polinucleotídicas que codifican los polipéptidos formadas de acuerdo con la presente publicación se pueden producir también por técnicas enzimáticas. Así, se pueden usar enzimas de restricción que escinden moléculas de ácidos nucleicos en secuencias de reconocimiento predefinidas para aislar fragmentos de ácidos nucleicos a partir de moléculas de ácidos nucleico más grandes que contienen las moléculas de ácido nucleico deseadas tales como el DNA (o RNA) que codifica uno de los dos componentes de la proteína quimérica. Típicamente, los fragmentos de DNA producidos de esta manera tendrán finales "salientes" cohesivos, en los que secuencias de ácido nucleico monocatenario se extienden más allá de la parte bicatenaria de la molécula. Se prefiere generalmente la presencia de tales finales cohesivos a moléculas de DNA romo. Los fragmentos aislados que contienen la secuencia codificadora deseada se pueden unir (clonar) en un vector adecuado para amplificación y expresión.

Se puede usar también PCR para sintetizar las secuencias polinucleotídicas codificadoras de los polipéptidos que después se pueden enlazar operativamente a un vector y usar para transformar o transfectar una célula apropiada y expresarse en ella. Los métodos particularmente preferidos para producir cantidades grandes de polipéptidos y proteínas recombinantes de la presente invención se basan en el uso de oligonucleótidos preseleccionados como cebadores en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para formar productos de reacción PCR para usar en la preparación de vectores de expresión.

La expresión de polipéptidos y proteínas recombinantes de acuerdo con esta publicación se realiza mediante el uso de vectores de expresión en los que se han insertado las secuencias nucleotídicas que codifican los polipéptidos en cuestión. Los vectores de expresión se pueden construir utilizando cualquiera de las técnicas muy conocidas de construcción de vectores.

La elección del vector al que un segmento nucleotídico está operativamente enlazado depende directamente, como se sabe muy bien en la técnica, de las propiedades funcionales deseadas, por ejemplo, la expresión proteica, y la célula huésped a transformar o transfectar, siendo éstas limitaciones inherentes a la técnica de construir moléculas de DNA recombinante. Sin embargo, un vector contemplado aquí es al menos capaz de dirigir la replicación, y preferiblemente también la expresión, del gen de la proteína quimérica beneficiosa incluido en segmentos de DNA a los que está operativamente enlazado.

Por tanto la presente publicación contempla un vector que puede estar operativamente enlazado a una molécula de ácido nucleico que codifica los componentes polipeptídicos de la proteína quimérica para proporcionar una molécula de DNA recombinante que codifica y expresa la secuencia polipeptídica deseada. Se puede usar la molécula recombinante para transformar o transfectar células huésped adecuadas de manera que las células huésped expresan la proteína quimérica deseada.

En diversas realizaciones, la secuencia nucleotídica traducible se puede incorporar a un plásmido con un apropiado promotor controlable de transcripción, secuencias controladoras de traducción, y un sitio de clonación múltiple para simplificar la inserción de la secuencia nucleotídica traducible en la orientación correcta, y se puede expresar en las células huésped. Las células huésped útiles incluyen células eucarióticas de insecto tales como *Spodoptera frugiperda*, o células procarióticas tales como *Escherichia coli* o células de mamífero, tales como células Chinese Hamster Ovary (CHO, ovario de hámster chino). Preferiblemente, hay secuencias control 5' que definen un promotor para iniciar la transcripción y un sitio de unión al ribosoma operativamente enlazado al extremo 5' de la secuencia hacia arriba de DNA traducible. Los ejemplos de vectores de expresión útiles que incluyen promotores tales como tac, trc, o PL, incluyen por ejemplo pTrc99A (Pharmacia, Piscataway, N.J.), pKK223-3 (Clontech), y PET 3d (Novagen).

La transformación o transfección de células huésped apropiadas con una molécula de DNA recombinante se realiza por métodos muy conocidos que dependen típicamente del tipo de vector usado. Respecto a la transformación de células huésped procarióticas, ver por ejemplo Maniatis et al., *Clonación Molecular, Un Manual de Laboratorio*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982).

Por técnicas muy conocidas se pueden identificar células transformadas o transfectadas satisfactoriamente, es decir, las que contienen una molécula de DNA recombinante de acuerdo con la presente publicación. Por ejemplo, se pueden clonar células transformadas o transfectadas para producir colonias monoclonales. Las células de esas colonias se pueden recoger, lisar y examinar su contenido en DNA con relación a la presencia de la molécula de DNA deseada usando un método tal como el descrito por Southern, *J. Mol. Biol.*, 98:503 (1975).

Además de probar directamente la presencia de la molécula de DNA deseada, la transformación o transfección satisfactoria se puede confirmar por métodos muy conocidos para la detección de los polipéptidos expresados. Por ejemplo, las células transformadas o transfectadas con un vector de expresión producen proteínas que se pueden recoger y probar respecto a la presencia de la función de la proteína expresada.

Los métodos para recuperar de un cultivo una proteína expresada son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar filtración en gel, cromatografía en gel, ultrafiltración, electroforesis, intercambio iónico, cromatografía de afinidad y técnicas relacionadas para aislar las proteínas expresadas encontradas en el cultivo. Además, se pueden realizar métodos inmunoquímicos tales como inmunoadfinidad, inmunoadsorción, y similares, usando métodos muy conocidos.

El uso de múltiples agentes terapéuticos es un procedimiento que se puede utilizar, en el que el beneficio de la separación por el primer polipéptido de los componentes inhibidores de la matriz se puede aumentar mediante el uso de un segundo polipéptido que estimula la reparación y regeneración neural. Los polipéptidos de la presente publicación se seleccionan preferiblemente de un grupo de enzimas de digestión de la matriz y un segundo grupo de moléculas de adhesión celular que tienen propiedades regenerativas para el tejido del SNC. Los genes que codifican estas proteínas se pueden combinar mediante ingeniería genética para producir un gen quimérico capaz de producir una proteína quimérica que posee el enzima de digestión de la matriz y la molécula de adhesión celular.

Como se ha descrito anteriormente, el primer componente de la proteína quimérica es un polipéptido que posee la capacidad para modificar la matriz extracelular como se ha descrito, y es una enzima capaz de digerir componentes

de la matriz extracelular que inhiben el crecimiento celular. Tales enzimas incluyen, pero no están limitados a, condroitinasa, hialuronidasa, y otras proteinasas, tales como metaloproteinasas de matriz (MMP's), MMP-9, MMP-2, pepsina, catepsina D, y la familia ADMAT de proteínas, etc.

- 5 En una realización, el compuesto enzimático es una enzima condroitinasa producida por bacterias. Las condroitinasas funcionan degradando cadenas laterales de polisacáridos en complejos de proteína-polisacárido, sin degradar el núcleo proteico. La enzima degrada selectivamente los glicosaminoglicanos condroitín-4-sulfato, dermatán sulfato y condroitin-6-sulfato (también llamados condroitín sulfatos A, B y C, respectivamente) a pH 8 a mayores velocidades que el ácido condroitínico o hialurónico. Sin embargo, la enzima no ataca al queratán sulfato, sulfato de heparina o de heparitina.
- 10 La evidencia reciente sugiere que el proteoglicano de condroitin sulfato (CSPG) juega un importante papel en la inhibición de la regeneración de un sistema nervioso central (SNC) dañado. Se ha descubierto que CSPG está sobre-regulado en SNC dañado, exacerbando además su efecto inhibitorio. La evidencia reciente sugiere también que el tratamiento con condroitinasa ABC de lesiones del SNC puede mejorar la reparación y regeneración de un SNC dañado.
- 15 En particular, la condroitinasa ABC producida por *Proteus vulgaris* se considera que es apropiada para aplicaciones médicas y comerciales por su capacidad de separar selectivamente del proteoglicano la cadena lateral de condroitin sulfato o dermatán sulfato, su inactividad frente al queratán sulfato, heparina y heparán sulfato, y su abundante productividad. A causa de ello, las preparaciones de enzimas que tienen actividad de condroitinasa se preparan a partir de productos de cultivo de *Proteus vulgaris* por procedimientos conocidos por los profesionales.
- 20 Otros componentes de la matriz del SNC tales como el ácido hialurónico y otras proteínas pueden jugar también un papel en la inhibición de la regeneración neural. En consecuencia, la hialuronidasa, una enzima bacteriana que se sabe que degrada el ácido hialurónico, y las metaloproteinasas de matriz, se pueden usar también como componente enzimático de la proteína quimérica para separar compuestos de la matriz extracelular que impiden la reparación y regeneración celular.
- 25 Con respecto al segundo componente de la proteína quimérica descrita, se usan miembros de la familia neurotrófica de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotrophina-3 (NT-3) y el factor neurotrófico derivado de cerebro entre otros. Estas moléculas proporcionan supervivencia neuronal durante el desarrollo previniendo la muerte celular y favoreciendo el brote neuronal de una manera dirigida porque se segregan por algunas de las dianas naturales de la neurona en desarrollo. Además, se han usado factores neurotróficos para
- 30 aumentar la escasa capacidad regenerativa intrínseca del sistema nervioso central de diversas maneras (Priestley et al., *J. Physiol. Paris*, 96:123-33 (2002)).

Al seleccionar una concreta proteína quimérica en cuestión, cualquiera de los polipéptidos descritos en este documento se puede utilizar para formar la proteína quimérica y favorecer la reparación, independientemente de la especie de célula neuronal y de la especie de proteína de la que se deriva un polipéptido en cuestión.

- 35 Las proteínas quiméricas de la presente publicación se pueden usar para mejorar la regeneración nerviosa o favorecer la reparación y supervivencia nerviosa, y pueden usarse también para tratar lesiones en nervios periféricos y lesiones en la médula espinal, y en la estimulación del crecimiento de tejido del SNC endógeno, implantado o trasplantado. Las proteínas quiméricas de la presente invención son particularmente convenientes cuando se usan con lesiones en el sistema nervioso central porque el componente peptídico regenerativo retiene su afinidad por el
- 40 SNC y así imparte una función objetivo dirigiendo el componente enzimático al SNC. La co-localización de los dos componentes aumenta sus eficacias en comparación con el uso independiente.

- Por tanto, la presente publicación proporciona también proteínas quiméricas como se ha descrito anteriormente para favorecer la regeneración de un nervio o tejido nervioso dañado o cortado, o favorecer brote neurítico en células neuronales bajo una variedad de condiciones neurológicas que requieren el brote de células neuronales. Por tanto la
- 45 presente publicación contempla la activación de la regeneración y reparación nerviosa en un sujeto donde una composición farmacéutica fisiológicamente tolerable que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína quimérica de acuerdo con la presente publicación se administra al sujeto o tejido.

- Las presentes proteínas terapéuticas son útiles para tratar el daño en nervios periféricos asociado con trauma físico o quirúrgico, infarto, infección vírica o bacteriana, exposición a toxinas, enfermedad degenerativa, enfermedad
- 50 maligna que afecta a neuronas periféricas o centrales, o en métodos quirúrgicos o de trasplante en los que se introducen nuevas células neuronales de cerebro, ganglios de la médula espinal o de la raíz dorsal y requieren estimulación de brote neurítico del implante e inervación en el tejido receptor. Tales enfermedades incluyen además, pero no están limitadas a, lesiones del SNC, gliosis, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, degeneración neuronal, y similares.

- 55 En una realización relacionada, un polipéptido de la invención puede impregnar un dispositivo de liberación implantable tal como un puente de celulosa, sutura, prótesis de cabestrillo o aparato de liberación relacionado. Tal dispositivo puede opcionalmente cubrirse con glía, como se ha descrito por Silver et al., *Science* 220:1067-1069 (1983).

La composición que contiene la proteína quimérica se puede incorporar también o impregnar en una matriz bioabsorbible, siendo administrada la matriz en forma de una suspensión de matriz, un gel o un soporte sólido. Además, la matriz puede estar compuesta por un biopolímero.

5 Al construir la matriz puede ser útil para la matriz que incluya además una subestructura con fines de administración y/o estabilidad. Las subestructuras adecuadas incluyen esponja liofilizada, polvos, películas, películas en escamas o rotas, agregados, microesferas, fibras, haces de fibras, o una combinación de ellos.

Además, la matriz se puede incorporar a un soporte sólido para fines de administración. Los soportes adecuados dependen del uso específico y pueden incluir un dispositivo protésico, un accesorio de inserción de cultivo de tejido poroso, un implante, una sutura, y similares.

10 Las composiciones terapéuticas de la presente publicación pueden incluir un vehículo fisiológicamente tolerable junto con al menos una proteína quimérica de esta invención como se ha descrito aquí, dispersa en ello como un ingrediente activo. En una realización preferida, la composición terapéutica no es inmunogénica cuando se administra a un paciente humano para fines terapéuticos.

15 Cuando se usa en el presente documento, las expresiones “farmacéuticamente aceptable”, “fisiológicamente tolerable” y sus variaciones gramaticales, cuando se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y sustancias reaccionantes, se usan indistintamente e indican que los materiales son capaces de administración a un mamífero o humano sin la producción de efectos fisiológicos no deseados tales como náusea, mareo, trastorno gástrico y similares.

20 Se conoce bien en la técnica la preparación de una composición farmacológica que contiene ingredientes activos dispersos en ella. Típicamente tales composiciones se preparan como composiciones estériles, bien como disoluciones líquidas o suspensiones, sin embargo se pueden preparar también suspensiones acuosas o no acuosas en líquido antes de usar.

25 El ingrediente activo se puede mezclar con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo y en cantidades adecuadas para usar en los métodos terapéuticos descritos en este documento. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, disolución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y sus combinaciones. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH y similares que aumentan la eficacia del ingrediente activo.

30 Una composición terapéutica de la presente invención puede incluir sales farmacéuticamente aceptables de los componentes de ella. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición ácida (formadas con los grupos amino libres de la proteína quimérica) que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres pueden también derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxido sódico, potásico, amónico, cálcico, o férrico, y de bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína y similares.

35 Se conocen bien en la técnica vehículos fisiológicamente tolerables. Ejemplos de vehículos líquidos son disoluciones acuosas estériles que no contienen materiales además de los ingredientes activos y agua, o contienen un tampón tal como fosfato sódico a pH fisiológico, disolución salina fisiológica o ambos tales como disolución salina tamponada con fosfato. Más aún, los vehículos acuosos pueden contener más de una sal de tampón, así como sales tales como cloruro sódico y cloruro potásico, dextrosa, propilenglicol, poli(etilenglicol) y otros solutos.

Las composiciones líquidas pueden contener también fases líquidas además del, y con la exclusión del, agua. Ejemplos de tales fases líquidas adicionales son la glicerina, aceites vegetales tales como aceite de semilla de algodón, ésteres orgánicos tales como oleato de etilo, y emulsiones de agua-aceite.

45 Se pueden medir cantidades eficaces por mejoras en la supervivencia de células neuronales o ganglionares, rebrote axonal, y conectividad usando métodos muy conocidos. Ver, por ejemplo, Bray, et al., “Influencias Neuronales y no Neuronales en Células Ganglionares de la Retina, Supervivencia, Rebrote Axonal, y Conectividad tras Axotomía”, Ann. N.Y. Acad. Sci., pp. 214-228 (1991). Las mejoras en la regeneración neuronal en el SNC y SNP son también indicadores de la eficacia del tratamiento con los compuestos y composiciones descritos, como son las mejoras en la regeneración de fibras nerviosas tras lesiones traumáticas. (Ver, por ejemplo, Cadelli, et al., Exp. Neurol. 115: 189-192 (1992), y Schwab, Phil. Trans. R. Soc. Lond. 331: 303-306 (1991).)

50 Así, los intervalos de dosificación para la administración de una proteína quimérica de la invención son los suficientemente grandes para producir el efecto deseado en los que mejora la enfermedad a tratar. La dosificación no debe ser tan grande como para causar efectos secundarios adversos. Generalmente, la dosificación variará con la edad, enfermedad, y sexo del paciente, y el grado de la enfermedad en el paciente, y se puede determinar por un profesional. La dosificación se puede ajustar por el médico individual en el caso de cualquier complicación.

Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéutica de una proteína quimérica de esta invención es una cantidad suficiente para producir el resultado deseado, y puede variar ampliamente dependiendo del estado de la enfermedad y de la potencia del compuesto terapéutico. La cantidad a administrar depende del sujeto a tratar, de la capacidad del cuerpo del sujeto para utilizar el ingrediente activo, y del grado de efecto terapéutico deseado. Las cantidades exactas de ingrediente activo requeridas para administrar dependen del criterio del médico y son propias de cada individuo. Sin embargo, los intervalos adecuados de dosificación para aplicación sistémica se describen en el presente documento y dependen de las condiciones de administración. Los regímenes adecuados para administración son también variables, pero están tipificados por una administración inicial seguida por dosis repetidas a intervalos de una o más horas por una administración posterior.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína quimérica es típicamente una cantidad tal que, cuando se administra en una composición fisiológicamente tolerable, es suficiente para lograr una concentración en plasma o local de desde aproximadamente 0,1 a 1.000 micromolar (μM), preferiblemente desde aproximadamente 1 a 100 μM .

Alternativamente, la dosificación se puede medir en términos del peso corporal del paciente a tratar. En este caso, una dosificación típica que se formula de una composición terapéutica para liberar un polipéptido farmacológicamente activo es la cantidad de aproximadamente 0,1 microgramos (μg) a 100 μg por kilogramo (kg) de peso corporal, o más preferiblemente aproximadamente 1 a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Una proteína quimérica se puede administrar por vía parenteral por inyección o por infusión gradual a lo largo del tiempo. Por ejemplo, un polipéptido de la invención se puede administrar por vía tópica, local, perilesional, perineuronal, intracraneal, intravenosa, intratecal, intramuscular, subcutánea, intracavitatoria, transdérmica, dérmica, o por medio de un dispositivo implantado, y se pueden liberar también por medios peristálticos. En general se prefiere administración local, perilesional, intratecal, perineuronal, o intra-SNC.

Las composiciones terapéuticas que contienen una proteína quimérica se administran convencionalmente por vía intravenosa, o por inyección de una dosis unitaria, por ejemplo. La expresión "dosis unitaria", cuando se usa con referencia a una composición terapéutica de la presente invención se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificación unitaria para el sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido; es decir, excipiente, o vehículo.

Alternativamente, se contempla infusión intravenosa continua, suficiente para mantener concentraciones terapéuticamente eficaces en la sangre. Las concentraciones en sangre terapéuticamente eficaces de una proteína quimérica están en el intervalo de aproximadamente 0,01 \square a aproximadamente 100 \square , de manera preferida aproximadamente 1 \square a aproximadamente 10 \square .

Las expresiones "terapéuticamente eficaz" o "eficaz", cuando se usan aquí, se pueden usar indistintamente y se refieren a una cantidad de una composición terapéutica de la presente invención – por ejemplo, una que contiene una proteína quimérica de esta publicación. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que contiene proteína quimérica, o compuesto beneficioso en ella, es una cantidad predeterminada calculada para lograr el efecto deseado, es decir, para favorecer eficazmente la reparación y regeneración neural, incluyendo brote neurítico de neuronas en un individuo al que se le administra la composición.

EJEMPLO 1

40 Clonación de condroitinasa AC de *Flavobacterium heparinum*:

Se cultivó *Flavobacterium heparinum* (ATCC) en LB (medio de cultivo Luria) a 25°C durante 4 días. Las bacterias se sedimentaron por centrifugación y se aisló DNA genómico por medio del estuche DNeasy Tissue (Qiagen). Se sintetizaron cebadores de PCR (Pojasek et al. (2001), Biochem. Biophys. Res. Com, 286, 343-351) con un sitio de restricción NdeI en el extremo 5' y un sitio BamHI en el extremo 3' que tienen la secuencia 5'-CATATGCAGCAGACCGGTACTGCA-3' (Sec. ID No. 1) y 5'-GGATTCTCAGTGCTCTTTATTCT-3' (Sec. ID No. 2) respectivamente para sintetizar la proteína madura. Se usó un microgramo del DNA genómico en una reacción por PCR de 50 μl que contenía cada dNTP a concentración 10 mM (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), 50 pmol de cada cebador directo e inverso, MgSO_4 1 mM y 5 unidades de DNA polimerasa Tfl (Promega). El producto PCR de 2,0 kb se unió en el vector pCR 2.1 (estuche de clonación TOPO, Invitrogen) y se transformó en células competentes OneShot (Invitrogen). El DNA plasmídico se aisló de un número de clones seleccionados por digestión con enzima de restricción EcoRI y teniendo los clones positivos seleccionados el inserto de 2,0 kb. Los genes se clonaron además en pET 15b (Novagen) en los sitios NdeI y BamHI y se confirmaron por secuenciación de DNA.

Expresión y purificación de condroitinasa AC

El DNA plasmídico que contenía la condroitinasa AC en pET15b se transformó en BL21(DE3) para expresión. Se desarrollaron cultivos bacterianos en medio LB hasta una D.O. (densidad óptica) de 0,6 y se indujeron con IPTG 1 $\square\text{M}$, y la inducción continuó durante una noche a 22°C. Las células se recogieron a 5000 rpm durante 15 min y se

resuspendieron en tampón A (1/20 del volumen de cultivo inicial) que contenía Tris 20 mM (pH 7,9), NaCl 500 mM, imidazol 5 mM. Las células resuspendidas se lisaron por sonicación sobre hielo. La proteína soluble se aisló por centrifugación a 13.000 rpm durante 20 min a 4°C. Una columna Ni-NTA (Qiagen) (2-ml) se equilibró con tampón A y el sobrenadante se cargó en ella. La columna se lavó completamente con al menos 30-50 volúmenes de columna de tampón A, hasta que la absorbancia A280 llegó a un valor de 0,002 o más bajo. La proteína unida se eluyó con tampón A que contenía imidazol 250 mM. Las fracciones que contenían la ChasaAC se analizaron sobre geles de SDS-PAGE al 10% y se reunieron. La actividad funcional se probó por zimografía usando agrecano como sustrato.

Se hizo pasar Chasa AC sobre un gel de SDS-PAGE no desnaturante al 10% seguido por 16 h de renaturalización a 370°C. El gel se tiñó con azul Alcian que tiñe carbohidratos, la actividad enzimática se observó como una falta de tinción con azul Alcian (representado en la Fig. 3 como bandas grises oscuras).

EJEMPLO 2

Clonación de condroitinasa B de Flavobacterium heparinum:

Similarmente se amplificó condroitinasa B como anteriormente, usando los cebadores con un sitio de restricción NdeI en el extremo 5' y un sitio BamHI en el extremo 3' que tienen las secuencias 5'-CATATGCAGGTTGTTGCTTCAAAT-3' (Sec. ID No. 3) y 5'-GATCCTCAGTGCTCTTTATTTCT-3' (Sec. ID No. 4) respectivamente para sintetizar la proteína madura. Se usó un microgramo del DNA genómico en una reacción por PCR de 50 µl que contenía cada dNTP a concentración 10 mM (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), 50 pmol de cada cebador directo e inverso, MgSO₄ 1 mM, y 5 unidades de DNA polimerasa Tfl (Promega). El producto PCR de 1,5 kb se unió en el vector pCR 2.1 (estuche de clonación TOPO, Invitrogen) y se transformó en células competentes OneShot (Invitrogen). El DNA plasmídico se aisló de un número de clones seleccionados por digestión con enzima de restricción EcoRI y teniendo los clones positivos seleccionados el inserto de 1,5 kb. Los genes se clonaron además en pET 15b (Novagen) en los sitios NdeI y BamHI y se confirmaron por secuenciación de DNA.

Expresión y purificación de condroitinasa B:

El DNA plasmídico que contenía la condroitinasa B en pET15b se transformó en BL21(DE3) para expresión. Se desarrollaron cultivos bacterianos en medio LB hasta D.O. 0,6 y se indujeron con IPTG 1 mM, y la inducción se continuó durante una noche a 22°C. Las células se recogieron a 5000 rpm durante 15 min y se resuspendieron en tampón A (1/20 del volumen de cultivo inicial) que contenía Tris 20 mM (pH 7,9) y NaCl 500 mM (Tampón A). Las células resuspendidas se lisaron por sonicación sobre hielo. La proteína soluble se aisló por centrifugación a 13.000 rpm durante 20 min a 4°C. Una columna Ni-NTA (Qiagen) (2-ml) se equilibró con tampón A y el sobrenadante se cargó sobre ella. La columna se lavó completamente con al menos 30-50 volúmenes de columna de tampón A, hasta que la A280 llegó a un valor de 0,002 o más bajo. La proteína unida se eluyó con tampón A que contenía imidazol 250 mM. Las fracciones que contenían Condroitinasa B se analizaron haciéndolas pasar sobre geles de SDS-PAGE al 10% y las fracciones se reunieron. La actividad funcional se probó por zimografía usando agrecano como sustrato.

Se hizo pasar Chasa B sobre un gel de SDS-PAGE no desnaturante al 10% seguido por 16 h de renaturalización a 370°C. El gel se tiñó con azul Alcian que tiñe carbohidratos, y la actividad enzimática se observa como una falta de tinción con azul Alcian (representado en la Fig. 7 como bandas grises oscuras).

EJEMPLO 3

Clonación de condroitinasa ABC de Proteus vulgaris:

Se aisló DNA genómico de Proteus vulgaris usando estuche DNeasy Tissue (Qiagen). Se sintetizaron cebadores PCR con un sitio de restricción NdeI en el extremo 5' y un sitio BamHI en el extremo 3' que tienen las secuencias 5'-CAT ATG GCC ACC AGC AAT CCT GCA TTT G-3' (Sec. ID No. 5) y 5'-GGA TCC TCA AGG GAG TGG CGA GAG-3' (Sec. ID No. 6), respectivamente. El producto PCR de 3,0 kb se unió en el vector pCR 2.1 (estuche de clonación TOPO, Invitrogen) y se transformó en células competentes OneShot (Invitrogen). Se aisló DNA plasmídico de un número de clones seleccionados por digestión con enzima de restricción EcoRI y teniendo los clones positivos seleccionados el inserto de 3,0 kb. Los genes se clonaron además en pET 15b (Novagen) en los sitios NdeI y BamHI y se confirmaron por secuenciación de DNA.

Expresión y purificación de condroitinasa ABC:

El DNA plasmídico que contiene la condroitinasa ABC en pET15b se transforma en BL21(DE3) para expresión. Se desarrollan cultivos bacterianos en medio LB hasta D.O. 0,6, se inducen con IPTG 1 mM y la inducción se continúa durante una noche a 22°C. Las células se recogen a 5000 rpm durante 15 min y se resuspenden en tampón A (1/20 del volumen de cultivo inicial) que contiene Tris 20 mM (pH 7,9) y NaCl 500 mM (Tampón A). Las células resuspendidas se lisan por sonicación sobre hielo. La proteína soluble se aísla por centrifugación a 13.000 rpm durante 20 min a 4°C. Una columna Ni-NTA (Qiagen) (2-ml) se equilibra con tampón A y el sobrenadante se carga sobre ella. La columna se lava completamente con al menos 30-50 volúmenes de columna de tampón A, hasta que la A280 llega a un valor de 0,002 o más bajo. La proteína unida se eluyó con tampón A que contenía imidazol 250

mM. Las fracciones que contienen la condroitinasa ABC se analizan por electroforesis sobre SDS-PAGE al 10% y se reúnen. La actividad funcional se prueba por zimografía usando agregano como sustrato.

Clonación y expresión de Chasa AC en pCDNA4HisMax, un vector de expresión en mamíferos

5 Se sintetizaron cebadores PCR con un sitio de restricción BamHI en el extremo 5' y un sitio EcoRI en el extremo 3' y que tienen las secuencias 5'-GGATCCCAGCAGACCGGTACTGCA-3' (Sec. ID No. 7) y 5'-GAATTCTCAGTGCTCTTTATTTCT-3' (Sec. ID No. 8) respectivamente para sintetizar la proteína madura. Se usó un microgramo de DNA de Chasa AC en pCR2.1 en una reacción de PCR de 50 µl que contenía cada dNTP a concentración 10 mM (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 50 pmol de cada cebador directo e inverso, MgSO₄ 1 mM, y 5 unidades de DNA polimerasa Tfl (Promega). El producto PCR de 2,0 kb se unió en el vector pCR 2.1 (estuche de clonación TOPO, Invitrogen) y se transformó en células competentes OneShot (Invitrogen). Se aisló DNA plasmídico de un número de clones seleccionados por digestión con enzima de restricción EcoRI, y teniendo los clones positivos seleccionados el inserto de 2,0 kb. El gen se clonó además en pCDNA4HisMax en los sitios BamHI y EcoRI y se confirmó por secuenciación de DNA.

Transfección de células CHO-K con Chasa AC en el vector pCDNA4HisMax:

15 Se cultivaron en placa células CHO-K a una densidad de 1×10^6 por pocillo en una placa de 6 pocillos de manera que casi el 90% de ellas son confluentes después de 18 h. Las células se transfectaron con 1 µg/ml de DNA plasmídico purificado por estuche Qiagen de purificación de DNA (Qiagen) usando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Las células CHO transfectadas se cultivaron en placa a una mayor dilución y se seleccionaron frente a 400 µg/ml de zeocina (Invitrogen) comenzando a las 48 horas después de la transfección. Los clones individuales resistentes a la zeocina se extendieron en placas de 48 pocillos. Las células de cada clon individual se recogieron y se preparó extracto celular global usando tampón de lisis M-Per (Pierce) siguiendo el protocolo del fabricante. Los extractos CHO transfectados o no transfectados se separaron en SDS-PAGE con gradiente de 4-20% y se transfectaron a membrana de nitrocelulosa seguido por la prueba con anticuerpo anti-His etiquetado HRP y detección por quimiluminiscencia (estuche ECL, Amersham-Pharmacia). Los clones positivos se seleccionaron respecto a la actividad por ensayo en gel zimográfico usando agregano como un sustrato como anteriormente.

La Figura 11 contiene transferencia de Western mostrando extractos de células CHO-K transfectados. Los extractos se hicieron pasar sobre geles de poli(acrilamida), las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se probaron con un anticuerpo frente a las proteínas Chasa AC etiquetadas con poli(histidina). Los asteriscos indican clones de expresión superior seleccionados para purificación adicional.

Clonación de Chasa B en pCDNA4HisMax, un vector de expresión en mamíferos:

30 Similarmente, la Chasa B se clonó en el vector pCDNA4HisMax en los sitios BamHI y EcoRI. Se sintetizaron cebadores PCR con un sitio de restricción BamHI en el extremo 5' y un sitio EcoRI en el extremo 3' y que tienen las secuencias 5'-GGATCCCAGGTTGTTGCTTCAAAT-3' (Sec. ID No. 9) y 5'-GAATTCTCAGTGCTCTTTATTTCT-3' (Sec. ID No. 10) respectivamente para sintetizar la proteína madura. Se usó un microgramo de DNA de Chasa B en pCR2.1 en una reacción de PCR de 50 µl que contenía cada dNTP a concentración 10mM (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), 50 pmol de cada cebador directo e inverso, MgSO₄ 1 mM, y 5 unidades de DNA polimerasa Tfl (Promega). El producto PCR de 1,6 kb se unió en el vector pCR 2.1 (estuche de clonación TOPO, Invitrogen) y se transformó en células competentes OneShot (Invitrogen). Se aisló DNA plasmídico de un número de clones seleccionados por digestión con enzima de restricción EcoRI y teniendo los clones positivos seleccionados el inserto de 1,6 kb. El gen se clonó además en pCDNA4HisMax en los sitios BamHI y EcoRI y se confirmó por secuenciación de DNA. El DNA se purificó por Midi-estuche plasmídico HiSpeed (Qiagen) y se transfectó en células CHO por Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. La Figura 12 es un gel de agarosa que representa la expresión de Condroitinasa B en PCDNA4HisMax, un vector de expresión en mamíferos.

Transfección de células CHO-K con Chasa B en el vector pCDNA4HisMax:

45 Se cultivaron en placa células CHO-K a una densidad de 1×10^6 por pocillo de manera que casi el 90% de ellas son confluentes después de 18 h. Las células se transfectaron con 1 µg/ml de DNA plasmídico purificado con estuche Qiagen de purificación de DNA (Qiagen) usando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Las células CHO transfectadas se cultivaron en placa a una dilución mayor y se seleccionaron frente a 400 µg/ml de zeocina (Invitrogen) comenzando a las 48 horas después de la transfección. Los clones individuales resistentes a la zeocina se extendieron en placas de 48 pocillos. Las células de cada clon individual se recogieron y se preparó extracto celular global usando tampón de lisis M-Per (Pierce) siguiendo el protocolo del fabricante. Los extractos CHO transfectados o no transfectados se separaron en SDS-PAGE con gradiente de 4-20% y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa seguido por la prueba con anticuerpo anti-His etiquetado HRP y detección por quimiluminiscencia (estuche ECL, Amersham-Pharmacia). Los clones positivos se seleccionaron respecto a la actividad por ensayo en gel zimográfico usando agregano como un sustrato como anteriormente.

La Figura 13 es una transferencia de Western que muestra extractos de células CHO-K transfectados. Los extractos se hicieron pasar sobre geles de poli(acrilamida), las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se

probaron con un anticuerpo frente a las proteínas Chasa B etiquetadas con poli(histidina). Los asteriscos indican clones de expresión superior seleccionados para purificación adicional.

Clonación de Chasa ABC en pCDNA4HisMax, un vector de expresión en mamíferos:

5 Se clona Chasa ABC en el vector pCDNA4HisMax en los sitios BamHI y EcoRI. Se sintetizaron cebadores PCR con un sitio de restricción BamHI en el extremo 5' y un sitio EcoRI en el extremo 3' que tienen las secuencias 5'-GGA TTC GCC ACC AGC AAT CCT GCA TTT G-3' y 5'-GAA TTC TCA AGG GAG TGG CGA GAG-3' respectivamente. Se usó un microgramo de DNA de Chasa ABC en pCR2.1 en una reacción de PCR de 50 µl que contenía cada dNTP a concentración 10 mM (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), 50 pmol de cada cebador directo e inverso, MgSO₄ 1 mM, y 5 unidades de DNA polimerasa Tfl (Promega). El producto PCR de 3,0 kb se une en el vector pCR 2.1
10 (estuche de clonación TOPO, Invitrogen) y se transformó en células competentes OneShot (Invitrogen). Se aísla DNA plasmídico de un número de clones seleccionados por digestión con enzima de restricción EcoRI y se seleccionan los clones positivos que tienen el inserto de 3,0 kb. El gen se clona además en pCDNA4HisMax en los sitios BamHI y EcoRI y se confirma por secuenciación de DNA.

Transfección de células CHO-K con Chasa ABC en el vector pCDNA4HisMax:

15 Se cultivan en placa células CHO-K a una densidad de 1×10^6 por pocillo en una placa de 6 pocillos de manera que casi el 90% de ellas son confluentes después de 18 h. Las células se transfectan con 1 µg/ml de DNA plasmídico purificado con estuche Qiagen de purificación de DNA (Qiagen) usando reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Las células CHO transfectadas se cultivan en placa a una mayor dilución y se seleccionan frente a 400 µg/ml de zeocina (Invitrogen) comenzando a las 48 horas después de la transfección. Los clones individuales resistentes a la
20 zeocina se extienden en placas de 48 pocillos. Las células de cada clon individual se recogen y se prepara extracto celular global usando tampón de lisis M-Per (Pierce) siguiendo el protocolo del fabricante. Los extractos CHO transfectados o no transfectados se separan en SDS-PAGE con gradiente de 4-20% y se transfieren a membrana de nitrocelulosa seguido por la prueba con anticuerpo anti-His etiquetado HRP y detección por quimiluminiscencia (estuche ECL, Amersham-Pharmacia). Los clones positivos se seleccionan respecto a la actividad por ensayo en gel
25 zimográfico usando agrecano como un sustrato como anteriormente.

Purificación de proteína L1: (Comparativo)

Los medios acondicionados de células que expresan L1 se centrifugaron a $3000 \times g$ durante 60 minutos a 4°C y los medios se filtraron usando un filtro de 40 µm. Los medios acondicionados filtrados se diluyeron con agua desionizada y su pH se ajustó a 6,4. Los medios acondicionados se pasaron después sobre una columna DE-52 y se eluyeron con fosfato sódico 17,5 mM más cloruro sódico 0,5 M a pH 6,4 seguido por lavado. Las fracciones de la columna recorrida se probaron por Elisa de captura de IgG-Fc de humanos, y se añadió suspensión de Proteína A a fracciones que mostraban una reacción positiva. El eluato se incubó con perlas de proteína A durante una noche a 4°C. Las perlas se separaron por centrifugación, se lavaron exhaustivamente, y se eluyó L1-Fc usando glicina 100 mM a pH 2,8. (Ver Fig. 14). Se realizó un adicional Elisa de captura de IgG-Fc de humanos, y las fracciones que
35 contenían proteína se dializaron frente a PBS a pH 6,4 y se esterilizaron. La actividad se confirmó cultivando en placa neuronas granulares de cerebelo en L1 y comparando la longitud neurítica con neuronas desarrolladas en poli(L-lisina).

Ensayo de brote indicador de actividad de L1 en la estimulación de brote neurítico: (Comparativo)

40 Como se observa en la Fig. 15, los procesos neuríticos derivados de neuronas granulares de cerebelo desarrolladas en poli(L-lisina) (a) son aproximadamente 200% más cortos que los procesos neuríticos que se extienden desde neuronas desarrolladas en L1 (b).

Producción de proteína quimérica:

45 Para la expresión de las proteínas quiméricas, el DNA que codifica la enzima condroitinasa se prepara por PCR estándar a partir de PCDNA4 como se ha indicado anteriormente. Con el fin de producir la proteína quimérica, se preparan cebadores para incluir un sitio de restricción, tal como BamHI justo antes del codón de terminación de la enzima condroitinasa. Una molécula enlazante de poliaminoácido tal como (Gly₄Ser)₃ (Kim, et al., J Biol Chem, 269, páginas 31978-8 (1994)) se prepara por PCR estándar usando un cebador que inserta el mismo sitio de restricción en 5' de la secuencia de DNA que codifica la molécula enlazante. El DNA se amplifica por PCR estándar, se digiere con la enzima de restricción apropiada, y las dos cadenas se unen conjuntamente por métodos de unión estándar.

50 Un método alternativo para producir la molécula de fusión de condroitinasa y el enlazante poliaminoácido es preparar un cebador con error de apareamiento que cambiará el DNA que codifica el codón de terminación de la condroitinasa en un aminoácido que codifica el primero de los aminoácidos de la molécula enlazante, seguido por inserción de un sitio de restricción. Los recombinantes se seleccionan por análisis estándar mediante digestión por enzimas de restricción. Los recombinantes se seleccionan nuevamente por análisis estándar mediante digestión por
55 enzimas de restricción, la secuencia se confirma por secuenciación didesoxi, y se clona en un vector de expresión para generar una proteína de fusión sin cambio de marco de lectura. La proteína recombinante se expresa después

y se purifica como se ha descrito anteriormente, y la molécula se prueba respecto a la actividad de modificación de la matriz y actividad favorecedora de brote neurítico como se ha descrito anteriormente.

5 Aunque los anteriores métodos, compuestos y composiciones se han descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para fines de claridad en el entendimiento, resultará evidente a un profesional que se pueden practicar ciertos cambios y modificaciones sin desviarse de las características de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína quimérica que comprende:
- 5 1) un primer polipéptido que posee actividad de modificación de la matriz por separación de componentes de la matriz extracelular que inhiben el crecimiento y desarrollo neuronal y que se selecciona de enzimas de digestión de la matriz; y
- 2) un segundo polipéptido que posee actividad de factor neurotrófico para células neurales,
- no presentándose conjuntamente en la naturaleza dicho primer y segundo polipéptido y estando unidos conjuntamente en dicha proteína quimérica.
- 10 2. La proteína quimérica de la reivindicación 1 donde el primer polipéptido se selecciona del grupo consistente en condroitinasas, hialuronidasas, y metaloproteinasas de matriz.
3. La proteína quimérica de la reivindicación 2 donde la condroitinasa se selecciona del grupo consistente en condroitinasa ABC exoliasa, condroitinasa ABC endoliasa, condroitinasa AC, y condroitinasa B.
4. La proteína quimérica de la reivindicación 2 donde la condroitinasa se selecciona del grupo consistente en condroitinasa ABC I, condroitinasa ABC II, condroitinasa AC, y condroitinasa B.
- 15 5. La proteína quimérica de la reivindicación 4 donde la condroitinasa es condroitinasa ABC I.
6. La proteína quimérica de la reivindicación 2 donde la metaloproteinasa de matriz se selecciona del grupo consistente en MMP-9, MMP-2, y pepsina.
7. La proteína quimérica de la reivindicación 1 donde el segundo polipéptido que posee actividad de factor neurotrófico se selecciona del grupo consistente en NGF, BDNF, NT-3, IGF, EGF, VEGF, FGF, PDGF, y TGF α y β .
- 20 8. La proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el primer polipéptido está unido al segundo polipéptido por una ligadura peptídica.
9. La proteína quimérica de la reivindicación 8 donde la ligadura peptídica es una parte Fc de una inmunoglobulina.
10. Una composición farmacéutica que comprende una proteína quimérica, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 11. La proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para usar en terapia.
12. Uso de la proteína quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la fabricación de un medicamento para aumentar la reparación y regeneración del sistema nervioso mediante la administración de la proteína quimérica a células dañadas del sistema nervioso.

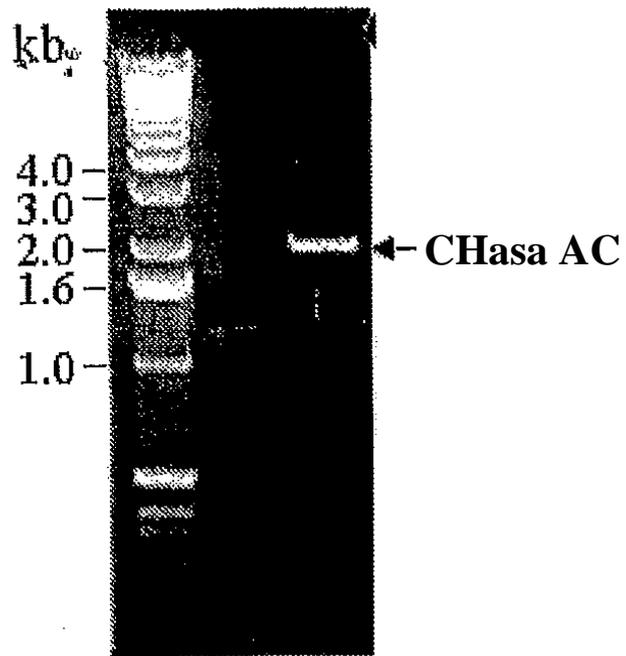


FIGURA 1

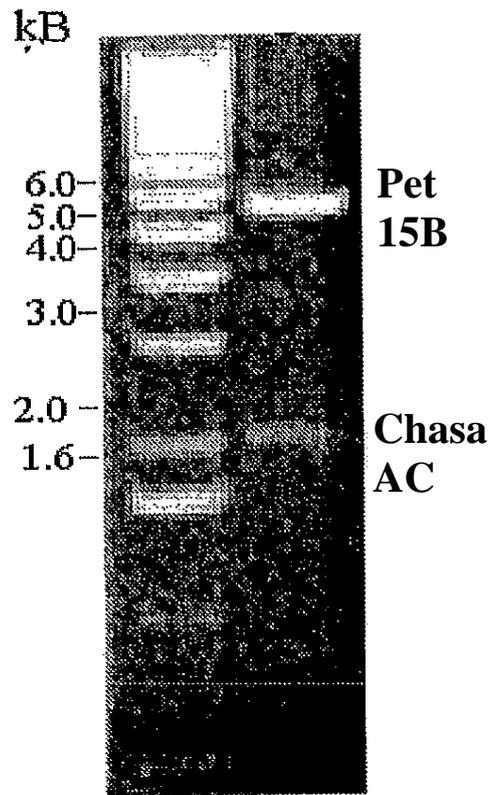


FIGURA 2

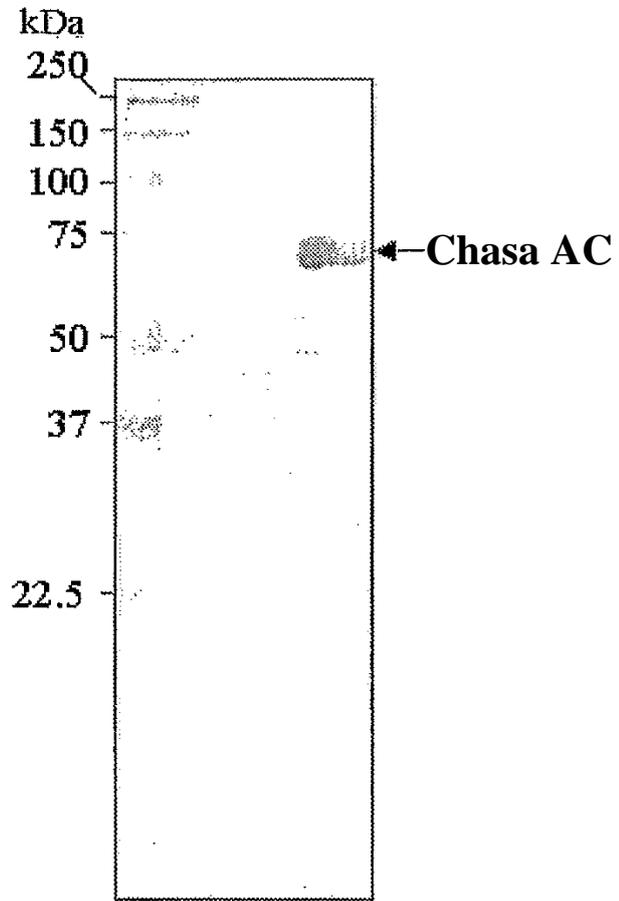


FIGURA 3

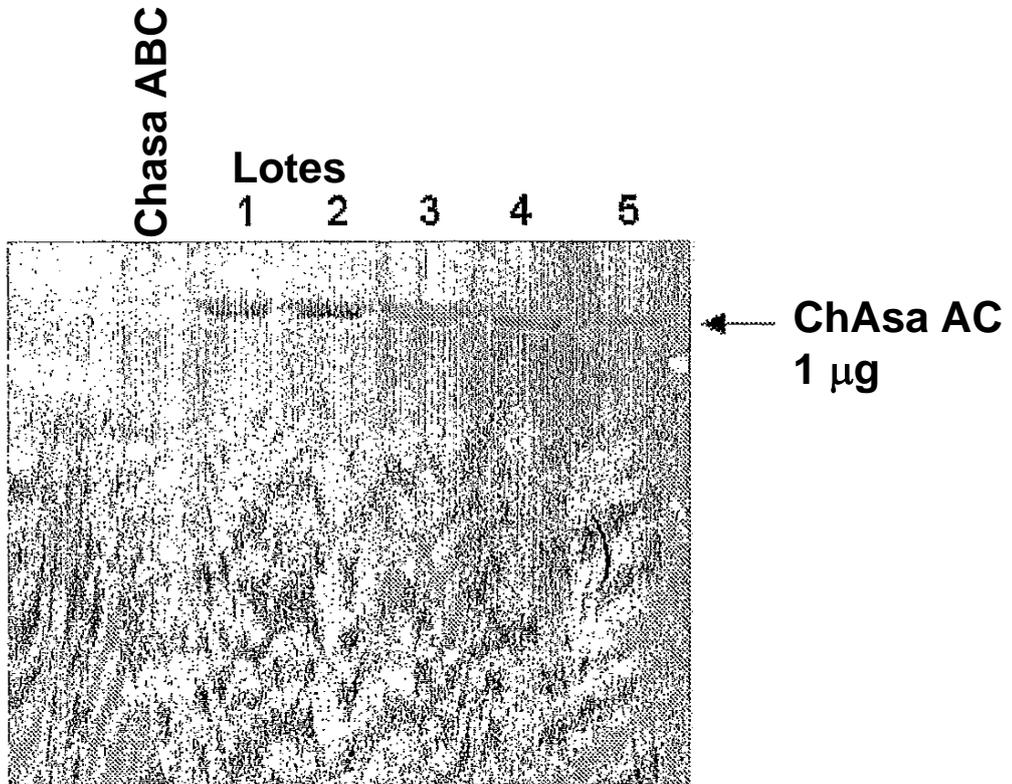


FIGURA 4

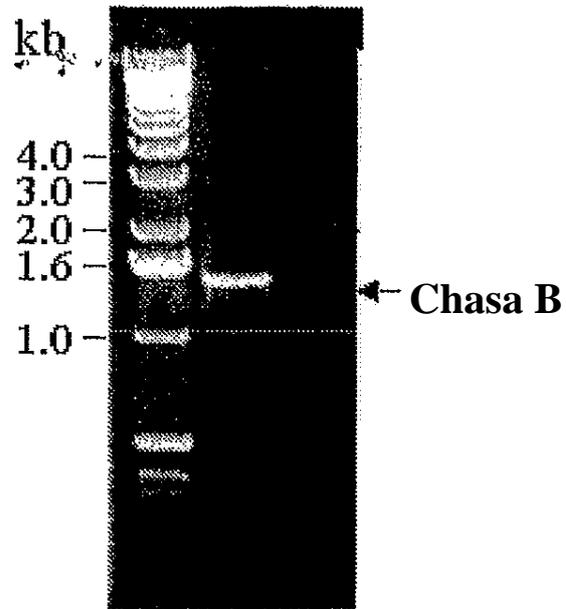


FIGURA 5

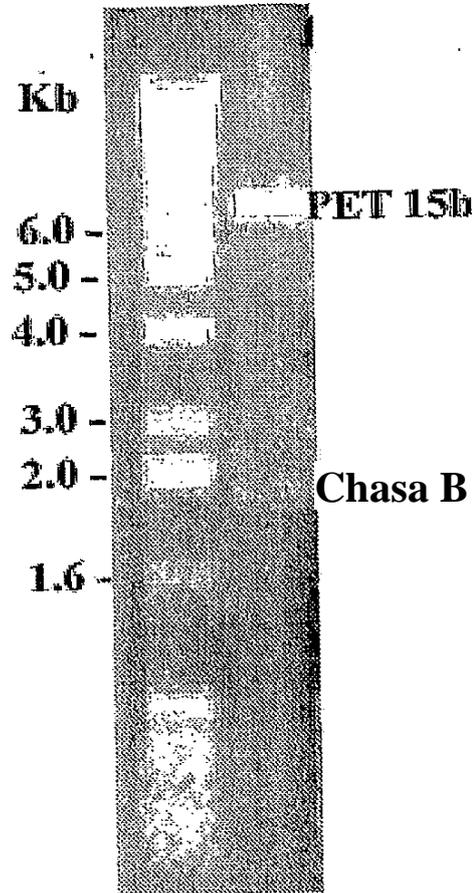


FIGURA 6

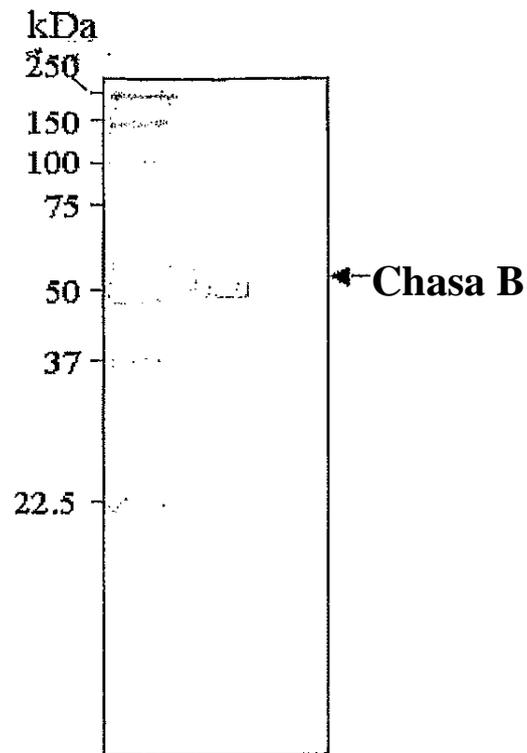


FIGURA 7

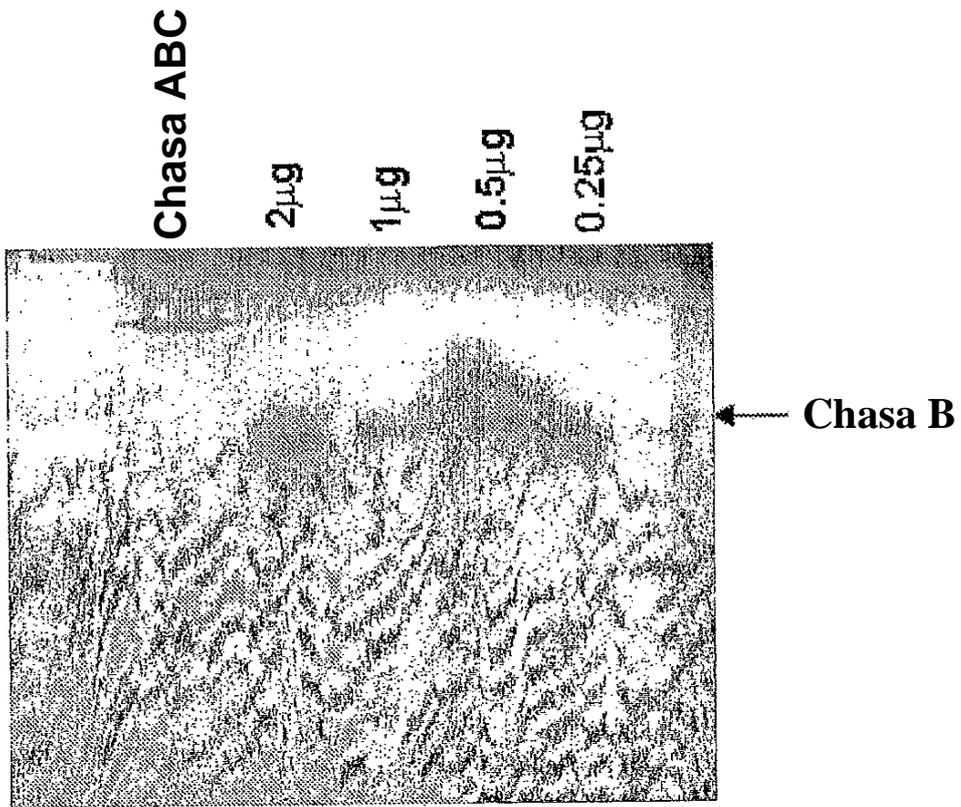


FIGURA 8

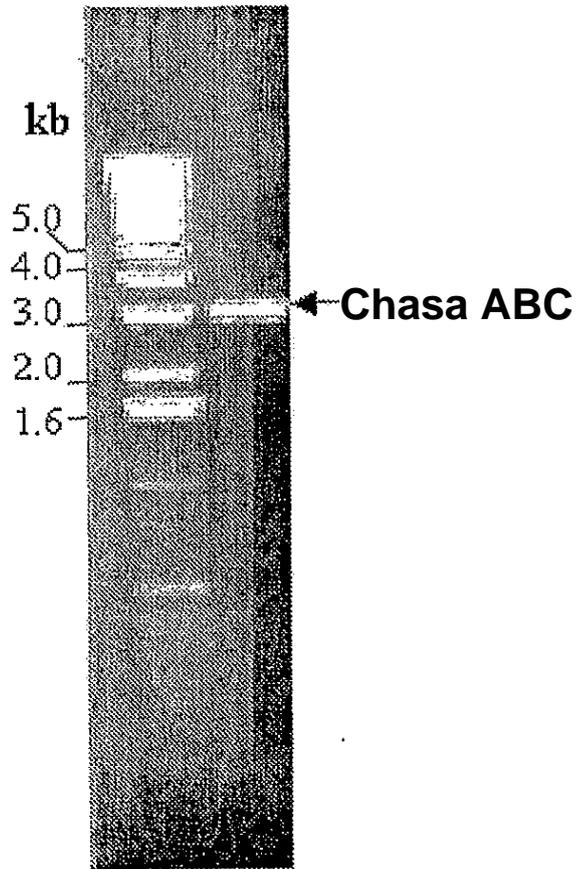


FIGURA 9

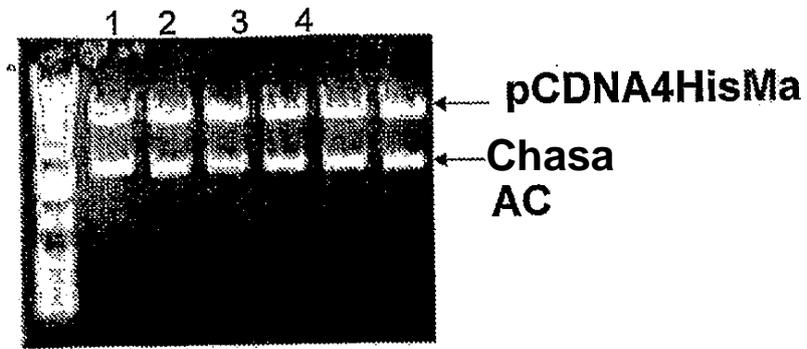


FIGURA 10

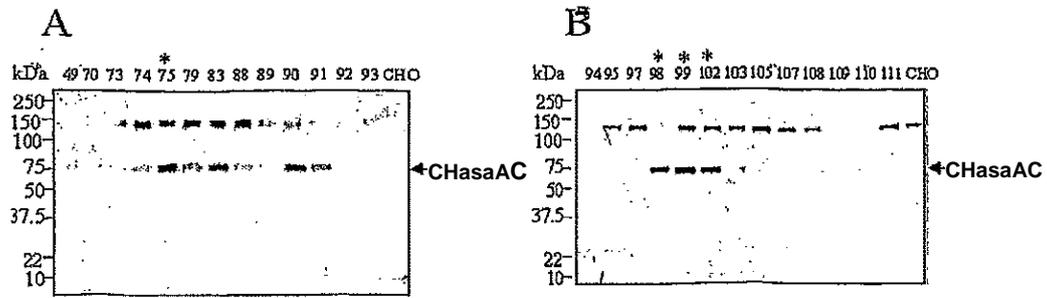


FIGURA 11

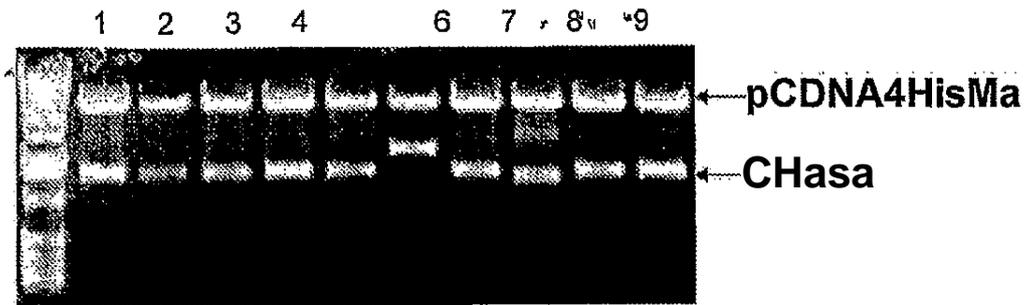


FIGURA 12

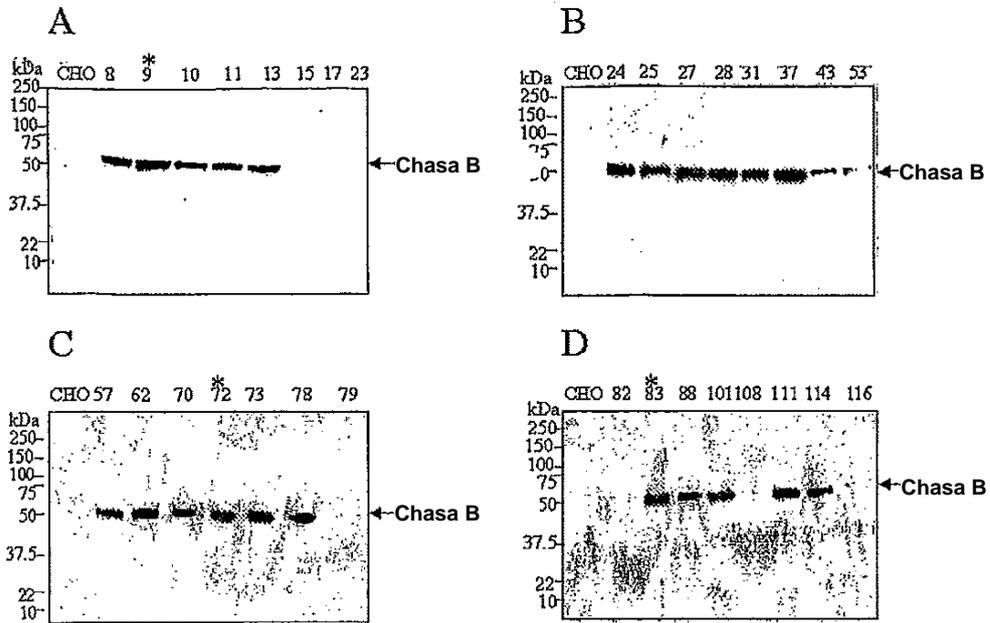


FIGURA 13

FIG. 14

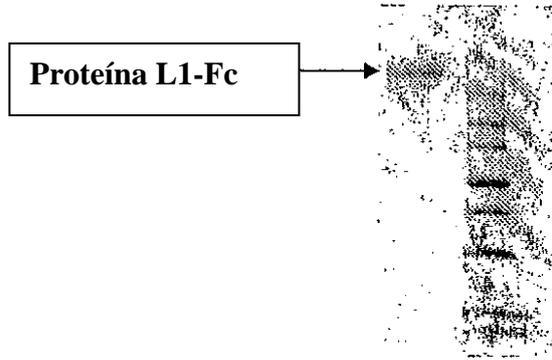


FIGURA 15

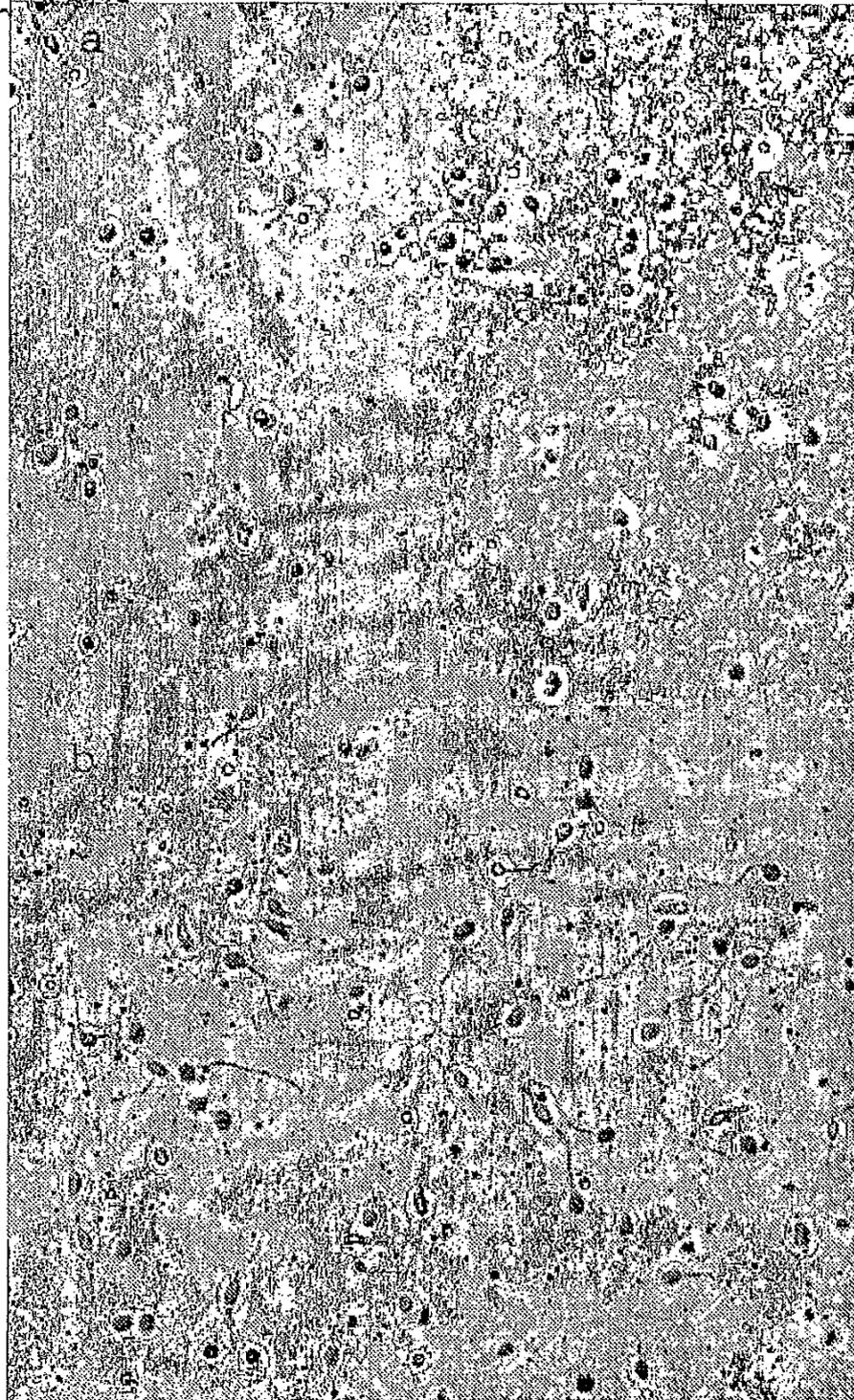
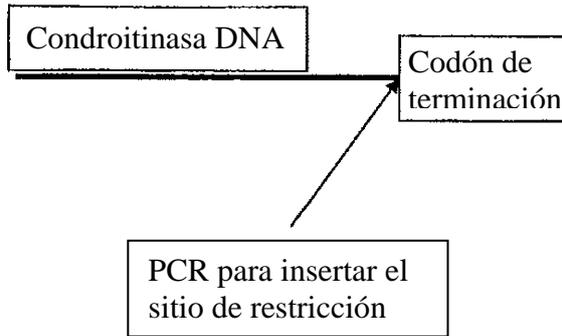
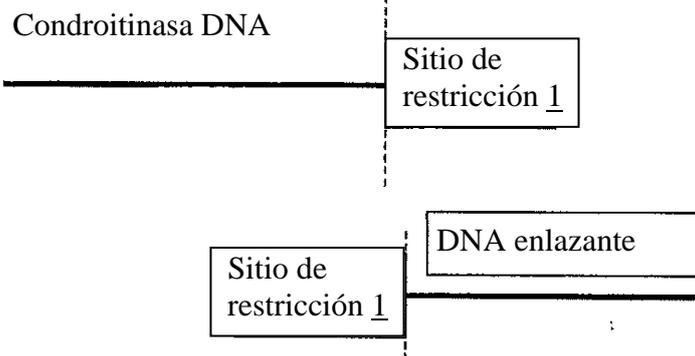


Fig. 16

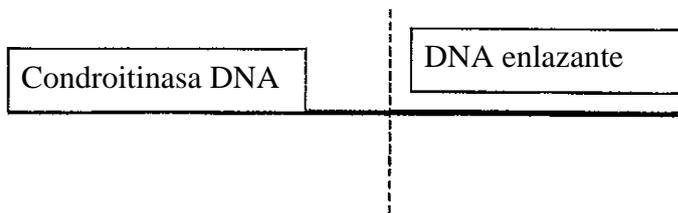
1. Supresión del codón de terminación
e inserción del sitio de restricción 1



2. Digestión 1
con restricción



3. Ligadura



5. Ligadura

