

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 039**

51 Int. Cl.:
A01N 37/18 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04752310 .5**
96 Fecha de presentación: **17.05.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1631234**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.03.2006**

54 Título: **COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE LESIONES DEL CNS.**

30 Prioridad:
16.05.2003 US 471236 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.01.2012

73 Titular/es:
ACORDA THERAPEUTICS, INC.
15 SKYLINE DRIVE
HAWTHORNE, NY 10532, US

72 Inventor/es:
GRUSKIN, Elliott, A.;
CAGGIANO, Anthony, O.;
ZIMBER, Michael, P. y
BLIGHT, Andrew, R.

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 373 039 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

Composiciones y métodos para el tratamiento de lesiones del CNS.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere en general a métodos para promover la recuperación neurológica funcional después de una lesión o enfermedad del sistema nervioso central ("CNS"). En particular, la presente invención se dirige a un método para utilizar la condroitinasa para promover la recuperación neurológica funcional tras una lesión en o a la médula espinal. Las composiciones útiles en este método incluyen formulaciones aceptables de condroitinasa, más particularmente formulaciones de condroitinasa de liberación sostenida. La presente invención también se dirige a un método de promover la recuperación neurológica funcional después de una lesión a la médula espinal por contusión.

Descripción de la técnica relacionada

- 15 La médula espinal es el nervio más grande del cuerpo y está constituido por fibras nerviosas. Estas fibras nerviosas son responsables de los sistemas de comunicación del cuerpo, los cuales incluyen las funciones sensoriales, motoras y autonómicas. Las funciones sensoriales incluyen la capacidad para sentir sensaciones, como el dolor. La función motora incluye la capacidad para mover voluntariamente el cuerpo. Las funciones autonómicas incluyen las funciones corporales involuntarias, por ejemplo, la capacidad para sudar y respirar.

- 20 El sistema nervioso central incluye el cerebro y la médula espinal. La médula espinal conecta el sistema nervioso periférico ("PNS") con el cerebro. Los nervios sensoriales, que entran en la raíz dorsal de la médula espinal, transmiten información sensorial desde los receptores sensoriales del cuerpo al cerebro. Diferentes tipos de sensaciones se envían por rutas sensoriales diferentes. Por ejemplo, el tracto espinotalámico porta sensaciones de dolor y temperatura y el tracto de la columna dorsal porta sensaciones de posición y tacto. Los nervios motores, que salen de los nervios de las raíces ventrales de la médula espinal, transmiten información motora voluntaria desde el cerebro al cuerpo.

- 25 El sistema nervioso autonómico (ANS) influye en las actividades de los músculos involuntarios, incluido el músculo del corazón, y de las glándulas que liberan hormonas. En particular, el ANS controla los sistemas cardiovascular, digestivo y respiratorio para mantener un ambiente estable dentro del cuerpo. El ANS incluye los nervios simpáticos, que provocan la constricción de los vasos sanguíneos y incrementan el ritmo cardíaco, y los nervios parasimpáticos, que actúan de manera opuesta a los nervios simpáticos dilatando los vasos sanguíneos y disminuyendo el ritmo cardíaco.

- 30 El daño al sistema nervioso central, incluyendo la médula espinal, da lugar a una pérdida de funciones. Dependiendo del tipo de lesión al sistema nervioso central, la pérdida de funciones puede manifestarse en sí misma en una pérdida de la función sensorial, motora o autonómica o en una de sus combinaciones.

- 35 Los tipos más comunes de lesiones de la médula espinal (SCI) incluyen contusiones (moretones de la médula espinal) y lesiones por compresión (provocadas por presión sobre la médula espinal). En las lesiones por contusiones, el tipo de lesión más común, con frecuencia se forma una cavidad o agujero en el centro de la médula espinal. Al contrario que las células de los nervios, o neuronas del PNS, las neuronas del CNS no se regeneran después de una lesión. La incapacidad de los axones para regenerarse puede conducir a la pérdida de sensación, función motora y función autonómica, así como a la parálisis permanente. Una razón por la que las neuronas no se regeneran puede ser su incapacidad para atravesar la cicatriz glial que se desarrolla tras una lesión en la médula espinal. El daño causado por la lesión desarrollará una cicatriz glial, la cual contiene moléculas de la matriz extracelular que incluyen proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPGs). Los CSPGs inhiben el crecimiento del tejido nervioso *in vitro* y la regeneración del tejido nervioso en las regiones ricas en CSPGs *in vivo*.

- 45 Varias moléculas, y regiones especificadas de las mismas, han sido implicadas en la capacidad para apoyar el brote de las neuritas en una célula neuronal, un proceso también denominado extensión de las neuritas. El término neurita se refiere tanto a las estructuras de los axones como de las dendritas. Este proceso de brote de las neuritas es esencial en el desarrollo y regeneración neural, especialmente después de que la lesión o la enfermedad hayan dañado a las células neuronales. Las neuritas se alargan profusamente durante el desarrollo tanto en el sistema nervioso central como en el periférico de todas las especies animales. Este fenómeno es propio tanto de los axones como de las dendritas.

- 50 Se sabe que varios polipéptidos, especialmente las moléculas de adhesión celular (CAMs), promueven el crecimiento de las células neurales. Aunque los esfuerzos iniciales en esta área de investigación se concentraron en la proteína fibronectina (FN) que promueve la adhesión sobre la matriz extracelular, también se ha encontrado que otros polipéptidos promueven el crecimiento neural. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.792.743 describe nuevos polipéptidos y métodos para promover el crecimiento neural en el sistema nervioso central de un mamífero administrando una CAM neural soluble, uno de sus fragmentos, o uno de sus productos de fusión Fc. La patente de

- 5 EE.UU. n° 6.313.265 describe polipéptidos sintéticos que contienen las regiones farmacológicamente activas de CAMs que pueden usarse para promover la regeneración y reparación de los nervios tanto en lesiones de los nervios periféricos como en lesiones en el sistema nervioso central. Aunque útiles, el uso único de proteínas regenerativas puede no ser suficiente para efectuar la reparación de un sistema nervioso dañado. El documento WO/03/04080 describe el uso de enzimas que degradan a los glicosaminoglicanos para tratar el tracto corticoespinal dañado, pero no hace referencia a lesiones por contusiones.
- 10 Durante aproximadamente las pasadas dos décadas, el conocimiento base de la adhesión y migración celular en matrices extracelulares (ECMs) a nivel molecular se ha expandido rápidamente. La acción de las enzimas y otros polipéptidos que degradan a los componentes de la matriz extracelular y las membranas basales puede facilitar los sucesos de reparación neural mediante una diversidad de mecanismos, que incluyen la liberación de citoquinas enlazantes, y mediante el aumento de la permeabilidad de la matriz, potenciando de este modo la movilidad de las moléculas mediadoras, los factores de crecimiento y los agentes quimiotácticos, así como las células implicadas en el proceso de curación. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.997.863 describe el uso de glicoaminoglicanos para manipular la proliferación celular y promover la curación de las heridas.
- 15 Las moléculas ECM incluyen los CSPGs inhibidores. Se han identificado componentes de CSPGs como glicoaminoglicanos, sulfato de condroitina (CS) y sulfato de dermatano (DS). La separación de estas moléculas inhibitoras permitiría regenerar y reinervar un área después de una enfermedad o lesión física, así como recuperar las funciones sensoriales, motora y autonómica.
- 20 Estudios previos han encontrado que las condroitinasas pueden lisar y degradar a los CSPGs incluyendo a CS y a DS. Un estudio encontró que la condroitinasa ABC separó cadenas de glicoaminoglicanos (GAG) en y alrededor de áreas lesionadas de SNC de rata *in vivo*. La degradación de GAGs promovió la expresión de una proteína asociada al crecimiento, GAP-43, indicando una propensión regeneradora acrecentada en las células tratadas. Sin embargo, esta proteína asociada al crecimiento está asociada con la regeneración de lesiones en nervios periféricos, pero no centrales. Otro estudio encontró que el tratamiento con condroitinasa ABC de médula espinal de rata regeneró *in vitro* neuronas en un sustrato de una sección de tejido. Este estudio observó que la degradación de CSPGs puede promover los efectos neuroestimuladores de la laminina (Zuo et al., Degradation of chondroitin sulfate proteoglycan enhances the neurite-promoting potential of spinal cord tissue, *Exp. Neurol.* 154(2): 654-62 (1998)). En un estudio posterior del mismo investigador principal se informó que la inyección de condroitinasa ABC en el sitio del daño al nervio degradó CSPGs e incrementó el ingreso de brotes axonales en las láminas basales del segmento distal del nervio (Zuo et al., Regeneration of axons after nerve transection repair is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan. *Exp. Neurol.* 176(1): 221-8 (2002)). El mismo grupo de investigadores también encontró que los tratamientos con condroitinasa ABC regeneraban axones en injertos acelulares a una velocidad mucho mayor que en los injertos testigo (Krekoski et al., Axonal regeneration into acellular nerve grafts is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan. *J. Neurosci.* 15:21(16): 6206-13 (2001)). Aplicaciones de condroitinasa ABC_{Tipol} a un tracto corticoespinal lesionado, en particular una lesión en la columna dorsal, impidieron la retracción de los axones del área afectada y promovieron un mayor crecimiento de las fibras axonales que el testigo, con parte de los axones arborizándose en materia gris. Los axones CST regenerados establecieron conexiones funcionales (Bradbury et al., Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury, *Nature* 416: 636-649 (2002)).
- 35 Sin embargo, la recuperación funcional neurológica inducida por la condroitinasa en un modelo animal de lesión por transección de la columna dorsal ha limitado la aplicabilidad o el poder de predicción relativo a la recuperación de la función autonómica y, en particular, como resultado de una lesión por contusión en la médula espinal. En la lesión por transección de la columna dorsal descrita por Bradbury et al 2002, se lesionan fibras de la columna dorsal cortando los tractos nerviosos con una cuchilla. Este método produce una lesión localizada o "limpia" con un daño colateral mínimo al parénquima restante de la médula espinal. Los tractos de tejido de la materia gris y otra materia blanca sustentan un daño mínimo y, por tanto, este modelo es útil para estudiar la capacidad regeneradora de las neuronas de la columna dorsal, las cuales portan neuronas sensoriales.

Sumario de la invención

- 50 La presente invención se dirige en general a las condroitinasas ABC para usar en la mejora de la recuperación funcional tras una lesión por contusión del CNS, porque estas condroitinasas degradan a los componentes de la matriz extracelular del CNS que son inhibidores de la regeneración.
- Las condroitinasas pueden administrarse a un mamífero afligido por una lesión del CNS, tanto si la lesión es inmediata como producida hace mucho tiempo. La condroitinasa se administra en una cantidad efectiva para degradar a los CSPGs y de este modo promover la recuperación de la función neurológica funcional.
- 55 Las condroitinasas pueden administrarse óptimamente con un vehículo farmacéutico adecuado. La administración puede ser local o sistémica, incluyendo la aplicación oral, parenteral, intraperitoneal, intratecal o tópica. Los perfiles de liberación de tales formulaciones pueden ser de liberación rápida, liberación inmediata, liberación controlada o liberación sostenida. Por ejemplo, la formulación puede comprender una matriz de liberación sostenida y una

cantidad terapéuticamente efectiva de una enzima que degrade a los glicosaminoglicanos. Alternativamente, las condroitinasas pueden ser secretadas por células genéticamente modificadas que se implantan, como tales o en una cápsula, en o cerca del sitio de la lesión del CNS.

- 5 La administración de condroitinasas y la promoción resultante de la recuperación funcional neurológica según esta descripción restaura las funciones motora, sensorial y autonómica, en grados variables, dependiendo de la respuesta de cada individuo tras una lesión contusiva o no en el sistema nervioso central.

Breve descripción de los dibujos

Para una comprensión más completa de la naturaleza y ventajas de la presente invención, debe hacerse referencia a la siguiente descripción detallada tomada en conexión con los dibujos que la acompañan, en los cuales:

- 10 La figura 1 es una ilustración gráfica de los volúmenes residuales de orina tras una lesión por contusión en la médula espinal.
- La figura 2 es un gráfico de la velocidad de liberación de condroitinasa desde matrices de liberación sostenida.
- La figura 3 es un gráfico de las puntuaciones BBB de ratas tras el tratamiento con condroitinasa ABC_{Tipol} o penicilinasa o testigo tras una lesión por contusión en la médula espinal.
- 15 La figura 4 es un gráfico de las puntuaciones BBB de ratas tras el tratamiento con condroitinasa ABC_{Tipol} o penicilinasa tras una lesión por contusión en la médula espinal.
- La figura 5 es un gráfico de los cambios medios en el peso corporal tras la administración de dosis variables de condroitinasa.
- 20 La figura 6 es una ilustración gráfica del cambio medio en el peso por dosis en dosis variables de condroitinasa ABC_{Tipol}.
- La figura 7 es una ilustración gráfica del cambio medio en la temperatura por dosis en dosis variables de condroitinasa ABC_{Tipol}.
- La figura 8 es una ilustración gráfica del cambio en el peso en dosis repetidas y crecientes de condroitinasa ABC_{Tipol}.
- 25 La figura 9 es una ilustración gráfica del cambio medio en la temperatura por dosis en dosis repetidas y crecientes de condroitinasa ABC_{Tipol}.

Descripción detallada

- 30 Antes de describir las presentes composiciones y métodos se ha de entender que esta invención no está limitada a los procedimientos, composiciones o metodologías particulares descritas, ya que éstas pueden variar. También se ha de entender que la terminología usada en la descripción es sólo con el fin de describir las versiones o realizaciones particulares, y no se pretende que limite el alcance de la presente invención el cual estará sólo limitado por las reivindicaciones adjuntas.

- 35 También tiene que advertirse que cuando en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas se usan las formas singulares, uno(a) y “el(la)” incluyen referencia al plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, referencia a “una enzima” es una referencia a una o más enzimas y sus equivalentes conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que normalmente entiende un experto en la técnica. Aunque en la práctica o ensayo de las realizaciones de la presente invención puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria, ahora se describen los
- 40 métodos, dispositivos y materiales preferidos. Nada en la presente memoria debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a preceder tal descripción en virtud de una invención anterior.

- La presente descripción se dirige a una enzima tipo condroitinasa ABC para usar en la mejora de la recuperación funcional tras una lesión del CNS por contusión, típicamente provocada por un trauma o una enfermedad. En particular, la condroitinasa ABC_{Tipol} o la condroitinasa ABC_{Tipoll} individualmente o en combinación, proporcionan un
- 45 tratamiento terapéutico para las lesiones de la médula espinal. La frase “lesión por contusión” incluye, cuando se usa en la presente memoria, lesiones por enfermedad y traumáticas que pueden proceder de desgarros, moretones o aplastamiento de neuronas producidos por una lesión traumática, tal como un accidente de tráfico, una caída, o una herida de bala, así como otras lesiones traumáticas, o una lesión no traumática, o una compresión que puede ser provocada por fuentes internas o externas. La práctica de los métodos presentes conferirá beneficios clínicos al
- 50 mamífero tratado, proporcionando mejoras clínicamente relevantes en al menos una de las funciones de

coordinación motora, percepción sensorial, o autonómicas del sujeto. Las mejoras clínicamente relevantes pueden variar de una mejora detectable a una restauración completa de una función deteriorada o perdida del CNS.

5 En contraste con las lesiones “limpias” descritas por Bradbury, el modelo de lesión de la médula espinal por contusión produce una destrucción indiscriminada del tejido a través de una cascada de mecanismos de respuesta. Se produce experimentalmente una lesión por contusión aplicando una fuerza contundente a la médula espinal
 10 expuesta y se mimetiza lo más exactamente la lesión típica en un ser humano, proporcionando un estado más adecuado para el estudio de los procesos patofisiológicos tanto primarios como secundarios (Blight AR, 2000 *Animal models of spinal cord injury*. Top Spinal Cord Inj rehabil 6(2): 1-13; Kwon BK, Oxland TR, Tetzlaff W. (2002) *Animal models used in spinal cord regeneration research*. Spine 27(14):1504-10)). Tras el daño mecánico inmediato del tejido, el cual puede estirar y desgarrar axones de la materia blanca, sobreviene una destrucción más profunda y general del tejido. La barrera sangre-cerebro está comprometida y la médula espinal sufre una necrosis hemorrágica de la materia gris central que dispara cascadas inflamatorias y bioquímicas que dan lugar a un extenso daño
 15 secundario al tejido y a las células. En un período de días a semanas se forma una lesión cavitada en el lugar de la lesión que puede llenarse con células gliales reactivas, axones residuales, neovasculatura y una deposición de moléculas de la matriz extracelular. Las funciones sensorial, motora y autonómica pueden estar comprometidas. En comparación con la naturaleza relativamente “limpia” de una lesión por transección de la columna dorsal, una lesión por contusión produce una lesión mucho más complicada que implica el repertorio de mecanismos de respuesta y de reparación del tejido de la médula espinal y es apropiada para evaluar potenciales terapias que tengan como diana tanto la fase aguda como crónica de la lesión. Adicionalmente, las lesiones por contusión dan lugar a efectos secundarios que producen pérdida de tejido, cicatrices, formación de cavidades y semejantes. La lesión por contusión dispara una respuesta inmune más robusta en comparación con la lesión por transección, lo cual puede ser de consecuencias significativas para la lesión y la reparación (Hirschberg DL, Yoles E, Belkin M, Schwartz M. 1994).

25 El paradigma experimental en el cual evaluar una terapia potencial para la SCI tiene que situarse en el contexto cuando los resultados se trasponen a otros modelos de lesión de la médula espinal. El contraste entre anatomía y patofisiología de la lesión por transección de la columna dorsal y el modelo de contusión está extendido. Las lesiones por transección de la columna dorsal provocan daño a las neuronas que son más propensas a regenerarse y tienen funciones específicas dentro de los tractos sensoriales. Además, la lesión por transección conduce a un daño secundario mínimo del tejido. En contraste, la lesión por contusión daña los tractos tanto de los nervios sensoriales como motores, y las funciones sensoriales afectivas, motoras y autonómicas. Los tractos corticoespinales son bastante menos regenerables que las neuronas encontradas en las columnas dorsales. La lesión por contusión también conduce a daño secundario extenso del tejido que crea una lesión sustancialmente mayor que una lesión en la columna dorsal.

35 Después de una lesión de la médula espinal del CNS de un mamífero adulto, la incapacidad de los axones para regenerarse puede conducir a una parálisis permanente. El sitio de la lesión del CNS desarrolla una lesión o cicatriz glial por un aumento de la deposición de moléculas de la matriz extracelular por astrocitos y oligodendrocitos en el sitio de la lesión. Estas moléculas de la matriz extracelular incluyen CSPGs, las cuales se expresan mucho en áreas de cicatrización. Las CSPGs inhiben el crecimiento del tejido nervioso *in vitro*, y la regeneración del tejido nervioso en regiones ricas en CSPGs *in vivo*. Los sulfatos de condroitina A, B y C son las formas predominantes encontradas
 40 en mamíferos. Estas condroitinas pueden estar implicadas en la modulación de varias actividades biológicas que incluyen la diferenciación, adhesión, rutas enzimáticas e interacciones hormonales celulares. La presencia de proteoglicanos de sulfatos de condroitina es elevada en las etapas tardías del crecimiento celular en respuesta al daño en los tejidos y los vasos sanguíneos.

45 Los glicosaminoglicanos (GAGs), el sulfato de condroitina (CS) y el sulfato de dermatano (DS), son importantes componentes de los CSPGs. Son moléculas inhibitoras que contribuyen a la falta de regeneración del CNS en los mamíferos adultos, impidiendo el crecimiento axonal y neurítico. Sin embargo, los CSPGs son importantes en la guía y el patrón neuronal durante el desarrollo, más que durante la inhibición.

50 Los glicosaminoglicanos son polisacáridos no ramificados que constan de residuos alternantes de hexosamina y ácido hexurónico los cuales portan grupos sulfato en diferentes posiciones. Los GAGs se dividen típicamente en tres familias según la composición de la cadena principal de disacárido. Estos son: sulfato de heparina/heparano; sulfato de condroitina y sulfato de queratano. La familia de sulfatos de condroitina incluye varios subtipos designados sulfato de condroitina no sulfatado, sulfato de condroitina supersulfatado y sulfatos de condroitina A-E, los cuales varían en el número y posición de sus grupos funcionales sulfato. El sulfato de condroitina B también se denomina sulfato de dermatano y difiere en que el residuo predominante es el ácido idurónico en la posición alternativa del ácido hexurónico.
 55

Ahora se ha encontrado que las enzimas que degradan a los CSPGs, tales como la condroitinasa ABC_{Tipol} o la condroitinasa ABC_{Tipoll} son útiles para controlar y/o inhibir los efectos de los sulfatos de condroitina y para desarrollar terapias para el tratamiento de enfermedades. Los hallazgos descritos en la presente memoria son la primera descripción del tratamiento con condroitinasas de las lesiones por contusión que causa una mejora en la

recuperación de la función neurológica, en particular de la función autonómica, tras una lesión por contusión de la médula espinal.

5 La condroitinasa AC y la condroitinasa B son enzimas tipo condroitina liasa, las cuales pueden derivarse de varias fuentes. En la descripción puede usarse cualquier condroitinasa AC o B, incluyendo, pero no limitándose a, condroitinasa AC (derivada de *Flavobacterium heparinum*; T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi, S. Suzuki, J. Biol. Chem., 243, 1523 (1968)); condroitinasa AC II (derivada de *Arthobacter aureus*; K. Hiyama, S. Okada, J. Biol. Chem., 250, 1824 (1975), K. Hiyama, S. Okada, J. Biochem. (Tokio, 80, 1201 (1976)); condroitinasa ACIII (derivada de *Flavobacterium* sp. Hp102; H. Miyazono, H. Kikuchi, K. Yoshida, K. Morikawa, K. Tokuyasu, Seikagaku, 61, 1023 (1989)); condroitinasa B (derivada de *Flavobacterium heparinum*; Y.M. Michelaaci, C.P. Dietrich, Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 973 (1974), V.M. Michelaaci, C.P. Dietrich, Biochem. J., 151, 121 (1975), K. Maeyama, A. Tawada, A. Ueno, K. Yoshida, Seikagaku, 57, 1189 (1985)); y condroitinasa B (derivada de *Flavobacterium* sp. Hp102; H. Miyazono, H. Kikuchi, K. Yoshida, K. Morikawa, K. Tokuyasu, Seikagaku, 61, 1023 (1989)). La condroitinasa AC y la condroitinasa B están comercialmente disponibles en Seikagaku America, Falmouth, Massachusetts, EE.UU. Adicionalmente, las enzimas pueden producirse por los métodos descritos en la patente de EE.UU. nº 6.093.563 de Bennett et al. La condroitinasa ABC_{tipo I} y la condroitinasa ABC_{tipo II} son exo y endo-lipasas, respectivamente, las cuales escinden tanto al sulfato de condroitina como al de dermatano (Hamei et al., 1997). Se han identificado enzimas de mamíferos con actividad semejante a la condroitinasa.

20 La actividad de las enzimas condroitinasas puede estabilizarse mediante la adición de excipientes o por liofilización. Los agentes estabilizantes incluyen carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos y tensioactivos y son conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos incluyen carbohidratos tales como sacarosa, lactosa, manitol y dextrano; proteínas tales como albúmina y protamina; aminoácidos tales como arginina, glicina y treonina; tensioactivos tales como TWEEN® y PLURONIC®; sales tales como cloruro de calcio y fosfato de sodio; y lípidos tales como ácidos grasos, fosfolípidos y sales biliares. Los agentes estabilizantes se añaden en general a la proteína en una relación de 1:20 a 4:1, carbohidratos a proteína, aminoácidos a proteína, proteína estabilizante a proteína y sales a proteína; 25 1:1000 a 1:20, tensioactivo a proteína; y 1:20 a 4:1, lípidos a proteína. Otros agentes estabilizantes incluyen altas concentraciones de sulfato de amonio, acetato de sodio o sulfato de sodio, basados en estudios comparativos con actividad heparinasa. Los agentes estabilizantes, preferiblemente el sulfato de amonio u otra sal similar, se añaden a la enzima en una relación de 0,1 a 4,0 mg de sulfato de amonio/IU de enzima.

30 La condroitinasa puede administrarse local o sistémicamente. Tal administración incluye la administración oral, parenteral, entérica, intraperitoneal, intratecal, por inhalación o tópica. Las formas preferidas de administración incluyen la intravenosa, subcutánea, intratecalmente, intradérmica, intramuscular, internodal, intracutánea o percutánea. Para un mayor control de la aplicación puede ser preferible la administración tópica o local.

35 Las condroitinasas, solas o en combinación, pueden mezclarse con un vehículo farmacéutico apropiado antes de la administración. Ejemplos de vehículos y aditivos farmacéuticos usados en general son diluyentes, ligantes, lubricantes, agentes colorantes, agentes desintegrantes, agentes amortiguadores del pH, ácidos grasos isotonzantes, agentes isotonzantes, conservantes, anestésicos, tensioactivos y semejantes, y son conocidos por los expertos en la técnica. Vehículos específicamente farmacéuticos que pueden usarse son dextrano, sacarosa, lactosa, maltosa, xilosa, trehalosa, manitol, xilitol, sorbitol, inositol, albúmina de suero, gelatina, creatinina, polietilenglicol, tensioactivos no iónicos (por ejemplo, ésteres polioxietilenados de ácidos grasos y sorbitán, aceite de ricino polioxietilenado endurecido, ésteres de ácidos grasos de sacarosa, polipropilenglicol polioxietilenado) y compuestos similares. Los vehículos farmacéuticos también pueden usarse en combinación, tal como polietilenglicol y/o sacarosa, o ésteres de ácidos grasos y sorbitán polioxietilenados, monooleato de sorbitán polioxietilenado (20 moles de óxido de etileno) son particularmente preferidos.

45 Los perfiles de liberación de tales formulaciones pueden ser de liberación rápida, inmediata, controlada o sostenida. En particular, las formulaciones de condroitinasa ABC_{tipo I} o ABC_{tipo II} pueden usarse para mejorar o recuperar la función neurológica, incluyendo la función autonómica. Tal formulación da lugar a una liberación sostenida y controlada de la enzima en el sistema tal que los CSPGs son degradados. La degradación de los CSPGs puede ocurrir en el sitio del daño, cavidad o lesión o puede ocurrir en sitios dentro del CNS aguas arriba o aguas debajo de la lesión.

50 El régimen de tratamiento según la invención puede llevarse a cabo mediante un medio de administrar condroitinasa ABC_{tipo I} o ABC_{tipo II} al CNS, y más preferiblemente a las lesiones del área lesionada del CNS. El modo y la cadencia de administración, y la dosificación se llevan a cabo tal que la recuperación funcional de la discapacidad del CNS se potencie mediante la promoción de la extensión de las neuritas. Los tratamientos de la presente descripción suministran una cantidad efectiva de condroitinasa ABC_{tipo I} o ABC_{tipo II}. La expresión "cantidad efectiva" quiere decir 55 una cantidad suficiente para degradar a los CSPGs del área lesionada de la médula espinal o dentro del CNS o una cantidad suficiente para restaurar, totalmente o en parte, la función motora, sensorial o autonómica del mamífero. Por ejemplo, una cantidad efectiva de enzima puede ser de aproximadamente 0,0001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del paciente. La cantidad efectiva de condroitinasa puede administrarse en una dosis única, en dos dosis o en una pluralidad de dosificaciones. Aunque se ha de entender que la dosificación puede

5 administrarse en cualquier momento, en una realización la dosificación se administra antes de 12 horas después de la lesión, o tan pronto como sea factible. En otra realización, la dosificación se administra a un mamífero lesionado en una, dos o en una pluralidad de dosificaciones; tales dosificaciones dependerían de la gravedad de la lesión y de la cantidad de CSPGs presente en la cicatrización glial. Cuando se administran una pluralidad de dosificaciones, pueden administrarse diaria, semanal o quincenalmente. El suministro de las dosificaciones puede ser por medio de un catéter o de una jeringa. Alternativamente, el tratamiento puede administrarse durante una cirugía para permitir la aplicación directa a la cicatriz glial.

10 Una vez que se han aplicado las condroitinasas, la degradación de los CSPGs elimina las moléculas inhibitoras que bloquean la extensión de las neuritas y permite la regeneración de las neuritas en el área afectada. La administración de condroitinasas también puede degradar los CSPGs en el CNS distante del área afectada, incluyendo aguas arriba y debajo de la lesión. La condroitinasa ABC_{Tipol} o ABC_{Tipoll} son exo- y endo-liasas que escinden tanto a CS como a DS. La eliminación de CS y DS de la cicatriz glial permite la regeneración de extensiones de neuritas en el área lesionada.

15 La regeneración de las células nerviosas en el área del CNS afectada permite el retorno de la función motora, sensorial y autonómica. La mejora clínicamente relevante variará de una mejora detectable a una restauración completa de una función nerviosa perdida o deteriorada, variando con los pacientes y lesiones individuales.

La práctica de la invención, que incluye sus aspectos y realizaciones preferidas adicionales, se entenderá más completamente a partir de los siguientes ejemplos, los cuales se presentan sólo a modo de ilustración y no debe interpretarse que limiten la invención de ninguna forma.

20 Ejemplo 1

La condroitinasa mejora las funciones autonómicas tras una lesión de la médula espinal en roedores

25 Se completó un estudio de la función autonómica tras una lesión por contusión de la médula espinal en ratas con el uso de condroitinasa en el centro de modelos animales Acorda. Los animales (n = 38) se sometieron a un modelo establecido de SCI (Gruner et al., 1996). Comenzando inmediatamente tras la SCI, 19 animales se trataron con condroitinasa ABC 1 (Seikagaku; número de catálogo 100332, número de lote E02201) intratecalmente (i.t.) con 0,06 unidades por rata por dosis en fluido cerebroespinal artificial, un día sí y otro no durante dos semanas. Los otros 19 animales se trataron con una proteína enzimática (penicilinasas – Sigma; número de catálogo P4524) en un vehículo.

30 A los animales se les indujo, y se les mantuvo en él, un estado de anestesia quirúrgica con isoflurano al 1,5% portado en una mezcla de aire calidad médica (oxígeno 95%, CO₂ 5%). Antes de la operación se dio una dosis inicial de cefazolina (50 mg/kg, s.c.). Durante la cirugía, los animales fueron colocados en una almohadilla calefactora para mantener la temperatura corporal, y se monitorizaron el pulso, SpO₂ y la temperatura. Se realizó una laminectomía de las vértebras espinales T9 y T10. Se hizo una laminectomía parcial en la articulación T13/L1 para la colocación de un catéter intratecal. Se hizo una incisión en la duramadre con una aguja hipodérmica. Se insertó un catéter de calibre 32 (ReCathCo., LLC, CS132G, número de lote 20422) a través de la incisión dural y se alimentó rostralmente para que se posicionara inmediatamente caudal a la laminectomía T9/T10. El catéter se aseguró al hueso y al músculo con pegamento de cianoacrilato y suturas. Las paletas de un fórceps modificado articulado por deslizamiento (4 mm de anchura x 0,5 mm de espesor) se insertaron en el canal espinal entre los aspectos laterales de la médula espinal y las vértebras en la laminectomía rostral. Se indujo una SCI comprimiendo la médula espinal entre las paletas del fórceps durante un período de 15 segundos. El grado de gravedad de la lesión se indujo usando un fórceps que comprime la médula espinal hasta una distancia de 0,3 mm (lesión moderada). La duramadre sobre la lesión permaneció intacta. Los fórceps se separaron y el sitio de la lesión se lavó con disolución salina. Las capas musculares superpuestas se suturaron conjuntamente y la herida de la piel se cerró con grapas. Después de la operación, a los animales se les dio un bolo inmediato de 5 mL de disolución salina de Ringer lactada seguido por una segunda administración de 5 mL de disolución salina de Ringer lactada después de unas pocas horas.

45 Inmediatamente después de la cirugía y uno de cada dos días, los animales fueron anestesiados con isoflurano y se inyectaron en el catéter intratecal el agente experimental (condroitinasa ABC I) o el testigo (Penicilinasas) como se describe a continuación. El volumen inyectado fue 3 microlitros, seguido por un lavado con 4 microlitros de fluido cerebroespinal artificial (aCSF).

Regímenes de tratamiento:

- 50
1. Chase ABC I - Condroitinasa ABC I (Seikagaku) 0,06 U/dosis, i.t. en 3 microlitros de aCSF.
 2. Penicilinasas – Penicilinasas (Sigma), 3 microlitros, i.t. a razón de 228 microgramos por mililitro.

Análisis de los resultados:

Las vejigas urinarias se exprimieron manualmente al menos dos veces por día y se registraron los volúmenes urinarios. Los volúmenes urinarios fueron en todos los grupos aproximadamente 2,7 mililitros durante los primeros 4

días tras la lesión. Los volúmenes urinarios en el grupo tratado con penicilinas alcanzaron volúmenes máximos de 11 mililitros retornando a entre 6 y 8 mililitros por día en aproximadamente 3 semanas después de la lesión. Los volúmenes urinarios en el grupo tratado con condroitinasa alcanzaron volúmenes diarios máximos de 6 mililitros retornando a aproximadamente 2 mililitros en 3 semanas. Véase la figura 1 para una representación gráfica de los volúmenes urinarios medios residuales del grupo con lesión moderada en ratas tratadas con condroitinasa y penicilinas. Este sistema está bien aceptado en el campo para la evaluación de la recuperación de la función autonómica tras una lesión de la médula espinal en rata.

Estos resultados demuestran el uso potencial de una enzima tipo condroitinasa para la recuperación de la función autonómica tras una lesión de la médula espinal. El modelo de lesión de la médula espinal y el sistema de análisis conductual están bien aceptados en el campo y se cree que son los más relevantes para la mayoría de las lesiones de la médula espinal en el ser humano.

Ejemplo 2

Formulaciones de condroitinasa de liberación sostenida

El desarrollo de una tecnología de suministro de la enzima condroitinasa mediante liberación sostenida permite que la condroitinasa se administre en cualquier momento tras una SCI, durante una duración dada. Un sistema ideal de liberación sostenida de la condroitinasa es uno que no sólo permite una liberación prolongada del ingrediente activo, sino uno que es práctico para usar en el contexto de una SCI. Como mínimo, los criterios de diseño incluyen la biocompatibilidad del dispositivo en el CNS, la retención de la actividad catalítica de la condroitinasa y una cinética apropiada de liberación de la condroitinasa. Preferiblemente, el sistema está en forma de una película fina que se aplica al sitio de la SCI o en forma de un sistema de polimerización que se aplica al sitio, polimeriza en contacto con la médula espinal y luego permanece en el lugar a lo largo del curso del período de tratamiento. El sistema es flexible para que la introducción en la SCI no conduzca a un trauma adicional en forma de compresión.

Durante los últimos años los avances en los sistemas biodegradables de liberación de fármacos han dado lugar a una variedad de candidatos con matrices viables. La selección del sistema ideal depende de una evaluación bioquímica y práctica. En general, estos sistemas capturan el agente activo en una matriz que se mantiene junta en una fase uniforme por medio de la formación de reticulaciones covalentes, una matriz cristalina, una emulsión o una transición de fase. El material de la matriz es un sistema biológico o un polímero sintético. Ejemplos de los sistemas candidatos incluyen matrices biológicas como pegamento de fibrina, colágeno y alginato y ejemplos de matrices sintéticas incluyen poli(ácido láctico/ácido glicólico), pluronic y etileno vinil acetato. Se ha de entender que las formulaciones de liberación sostenida de la presente memoria no son sólo adecuadas para usar en el tratamiento de las lesiones del CNS por contusiones sino que también son adecuadas para usar en el tratamiento de otras lesiones y trastornos del CNS.

Las enzimas Chase recombinantes desarrolladas pueden cargarse en una variedad de matrices SR, que incluyen, pero no se limitan a, pegamento de fibrina, colágeno, alginato, poli(ácido láctico/ácido glicólico), pluronic y etileno vinil acetato. Pueden usarse polímeros tanto naturales como sintéticos. Los polímeros sintéticos tienen la ventaja de una formulación precisa y propiedades de liberación predecibles, mientras que las preparaciones con polímeros naturales pueden tener una mayor biocompatibilidad. Cada tipo de sistema basado en polímeros tiene propiedades únicas y los métodos para generar películas o geles impregnados con Chase para cada tipo se describen a continuación.

Geles de colágeno: el colágeno ha sido usado como biomaterial en dispositivos médicos durante décadas debido a su facilidad de preparación y su biocompatibilidad. El colágeno se encuentra en dispositivos médicos aprobados tales como hemostatos, geles para aumentar los tejidos, sustitutos de los huesos para injertos, sellantes y una variedad de productos para la curación de las heridas. El colágeno usado con fines biomédicos es típicamente colágeno fibrilar tipo I aislado de tendones de bovino. Se puede conformar en una variedad de formas que incluyen geles, películas y fibras. Los geles de colágeno pueden formarse a partir de colágeno tipo I de roedores. Los métodos de formación de geles de colágeno han sido usados rutinariamente durante muchos años. El colágeno en un ácido diluido se combina con una disolución de Chase en un tampón a pH fisiológico. Cuando se neutraliza y se calienta, las fibrillas de colágeno tipo I coalescen en conjuntos desordenados para crear un gel. La densidad de reticulación de los geles resultantes puede controlarse variando la concentración de colágeno.

Pegamento de fibrina: el pegamento de fibrina es un producto derivado de la sangre que ha sido usado clínicamente en Europa durante muchos años como hemostato o sellante. El pegamento de fibrina consiste en dos componentes que se combinan para formar un gel. El primer constituyente es fibrinógeno el cual es la proteína principal implicada en la coagulación. El fibrinógeno se combina con la trombina para recapitular la etapa final de la cascada de la coagulación. La trombina es una serina proteasa que actúa sobre el fibrinógeno para exponer sus terminales reactivos que impulsan la polimerización del fibrinógeno para dar una red fibrosa llamada fibrina. Chase puede combinarse con una disolución de fibrinógeno y a continuación polimerizarse mediante la adición de trombina.

Alginato: el alginato es un carbohidrato de gran peso molecular aislado de algas marinas. En su mayor parte se usa con frecuencia como aditivo en alimentos y cosméticos. Su seguridad y biocompatibilidad han dado lugar a su uso en productos para la curación de las heridas. También se usa en preparaciones experimentales para la microencapsulación de células o isletas pancreáticas. El alginato es particularmente versátil porque puede formarse en una variedad de formas y se conforma vía reticulación iónica con cationes divalentes tales como el calcio. La densidad de reticulación puede controlarse pro la concentración de calcio y alginato y los geles resultantes son estables durante largos períodos de tiempo *in vivo*. Puede usarse una disolución de Chase y alginato para formar películas tras la adición de calcio.

PLA/PLG: los polímeros o copolímeros de poli(ácido láctico) y poli(ácido glicólico) son poliésteres hidrolíticamente inestables usados en suturas y otros dispositivos médicos biodegradables implantables. PLA/PLG también han sido usados para crear microcápsulas para la administración de fármacos. Hay varios métodos disponibles para crear sistemas de liberación sostenida con estos polímeros. Por ejemplo, puede usarse un sistema de intercambio de disolventes en el que los polímeros de PSA/PLG están disueltos en N-metil-pirrolidona.

Pluronic: Los Pluronic son polímeros hidrófilos que experimentan una transición de fase reversible. Las disoluciones de Pluronic son líquidas viscosas a bajas temperaturas y luego experimentan una transición de fase líquida a sólida cuando se desplazan a temperaturas más calientes. Los Pluronic han sido usados en una variedad de aplicaciones biomédicas en las que es deseable inyectar o pulverizar un líquido en un tejido y que luego el líquido solidifique para dar una película. Los Pluronic pueden disolverse en los tampones acuosos que contengan Chase. Pueden crearse películas moldeando geles en placas de cultivo de tejidos que se calientan en un incubador para promover la transición de fases inversa y la formación de la película.

Etileno vinil acetato: el etileno vinil acetato (EVA) es representativo de polímeros usados para fabricar implantes biocompatibles no degradables. EVA es soluble en ciertos disolventes orgánicos tales como cloruro de metileno. Puede añadirse Chase en un tampón acuoso ala disolución de EVA con agitación para crear una emulsión. El disolvente orgánico puede evaporarse a continuación de la disolución lo cual impulsa la formación de una matriz semicristalina de polímero impregnada con Chase. Este método puede usarse para fabricar una gama de densidades de reticulación.

Ejemplo 3

Formulaciones de condroitinasa ABC_{Tipol} de liberación sostenida

En un estudio, la condroitinasa ABC_{Tipol} se formuló en tres matrices de liberación sostenida: DurasealTM I (disponible en Confluent Surgical), DurasealTM II (disponible en Confluent Surgical) y Spray Gel. DurasealTM es un hidrogel magnificado. Spay Gel es una espuma de gel basada en colágeno. La liberación se monitorizó midiendo la liberación de condroitinasa de las matrices con el tiempo. Los resultados se ilustran en la figura 2. Los resultados demuestran que la condroitinasa se libera de una matriz de liberación sostenida con el tiempo y puede formularse en una formulación de liberación sostenida.

Ejemplo 4

La condroitinasa ABC_{Tipol} mejora la función neurológica tras una lesión por contusión de la médula espinal en roedores

Se completó un estudio del tratamiento con condroitinasa ABC_{Tipol} de una lesión por contusión en ratas en el centro de modelos animales Acorda. Los animales (n = 30) se sometieron a un modelo establecido de SCI (Gruner et al., 1996). Comenzando inmediatamente tras la SCI, diez animales se trataron con condroitinasa ABC 1 (Seikagaku; número de catálogo 100332, número de lote E02201) intratecalmente (i.t.) con 0,06 unidades por rata por dosis en fluido cerebroespinal artificial, cada día durante una semana y luego en días alternos durante una semana. Otros diez animales recibieron proteína enzimática (penicilinas – Sigma; número de catálogo P4524) y otros diez animales recibieron un vehículo como testigo (fluido cerebroespinal artificial – Harvard Apparatus; número de catálogo 59-7316). Los animales fueron evaluados mediante el ensayo conductual de campo abierto durante un período de 12 a 16 semanas.

A los animales se les indujo, y se les mantuvo en él, un estado de anestesia quirúrgica con isoflurano al 1,5% portado en una mezcla de aire calidad médica (oxígeno 95%, CO₂ 5%). Antes de la operación se dio una dosis inicial de Baytril (25 mg/kg). Durante la cirugía, los animales fueron colocados en una almohadilla calefactora para ayudar a mantener la temperatura corporal, y se monitorizaron el pulso, SpO₂ y la temperatura de los animales. Se realizó una laminectomía de las vértebras espinales T9 y T10. Se hizo una laminectomía parcial en la articulación T13/L1 para la colocación de un catéter intratecal. Se hizo una incisión en la duramadre con una aguja hipodérmica. Se insertó un catéter (Harvard Apparatus) a través de la incisión dural y se alimentó rostralmente para que se posicionara inmediatamente caudal a la laminectomía T9/T10. El catéter se aseguró al hueso y al músculo con pegamento de cianoacrilato y suturas. Las paletas de un fórceps modificado articulado por deslizamiento (4 mm de anchura x 0,5 mm de espesor) se insertaron en el canal espinal entre los aspectos laterales de la médula espinal y las vértebras en

la laminectomía rostral. Se indujo una SCI comprimiendo la médula espinal entre las paletas del fórceps durante un período de 15 segundos. Los fórceps se diseñaron para comprimir la médula espinal hasta una distancia de 0,9 mm. Los fórceps se separaron y el sitio de la lesión se lavó con disolución salina. Las capas musculares superpuestas se suturaron conjuntamente y la herida de la piel se cerró con grapas. Después de la operación, a los animales se les dio un bolo inmediato de 5 mL de disolución salina de Ringer lactada seguido por una segunda administración de 5 mL de disolución salina de Ringer lactada después de unas pocas horas.

Inmediatamente después de la cirugía y luego cada día durante 1 semana y después en días alternos durante una semana, los animales fueron anestesiados con isoflurano y se inyectaron en el catéter intratecal el agente experimental o el testigo ((condroitinasa ABC I, penicilinasas o aCSF) como se describe a continuación. El volumen inyectado fue 6 microlitros, seguido por un lavado con 6 microlitros de fluido cerebroespinal artificial.

Regímenes de tratamiento:

1. Chase ABC I - Condroitinasa ABC I (Seikagaku) 0,06 U/dosis, i.t. en 6 microlitros de aCSF.
2. Penicilinasas – Penicilinasas (Sigma), 6 microlitros, i.t. a razón de 124 microgramos por mililitro.
3. aCSF – Fluido cerebroespinal artificial (Harvard Apparatus), 6 microlitros, i.t.

Análisis conductual:

A las 48 horas y luego semanalmente después de la lesión se observó y se puntuó la actividad locomotora en campo abierto según el sistema de puntuación de Basso, Beattie y Bresnahan (BBB) (Basso et al., 1995). Este sistema está bien aceptado en el campo para la evaluación de la recuperación de la función locomotora tras una lesión de la médula espinal en ratas.

Resultados: hubo una tasa de mortalidad de 40% uniformemente distribuida a lo largo de todos los grupos de tratamiento que fue debida a la caracterización y a sucesos adversos asociados con la gravedad de la lesión. Los animales que fueron tratados con penicilinasas o con aCSF recuperaron la función con una puntuación BBB promedio de aproximadamente 4 (n = 11). Los animales que fueron tratados con condroitinasa ABC I (n = 7) recuperaron la función con una puntuación BBB promedio de aproximadamente 8. El grupo tratado con condroitinasa ABC I fue significativamente diferente de ambos grupos según un análisis ANOVA y post-hoc de Tukey (p < 0,01). Véase la figura 3 que ilustra las puntuaciones BBB de ratas tras una lesión contusiva en la médula espinal con administración de aCSF, penicilinasas o condroitinasa ABC I.

Estos resultados demuestran el uso potencial de una enzima tipo condroitinasa para el tratamiento de una lesión contusiva en la médula espinal. El modelo de lesión de la médula espinal y el sistema de análisis conductual están bien aceptados en el campo y se cree que son los más relevantes para la mayoría de las lesiones de la médula espinal en el ser humano. Estos resultados no podrían haber sido anticipados por los resultados publicados de condroitinasa *in vitro* o por los resultados de modelos de lesión por transección de la médula espinal.

Ejemplo 5

La condroitinasa ABC_{Tipol} mejora la función neurológica tras una lesión por contusión de la médula espinal en roedores

Se completó un estudio de tratamiento con condroitinasa ABC_{Tipol} de una lesión por contusión en ratas en el centro de modelos animales Acorda. Los animales (n = 38) se sometieron a un modelo establecido de SCI (Gruner et al., 1996). Comenzando inmediatamente tras la SCI, 19 animales se trataron con condroitinasa ABC I (Seikagaku; número de catálogo 100332, número de lote E02201) intratecalmente (i.t.) con 0,06 unidades por rata por dosis en fluido cerebroespinal artificial, una día sí y otro no durante dos semanas. Los otros 19 animales se trataron con proteína enzimática (penicilinasas – Sigma; número de catálogo P4524) en un vehículo. Los animales fueron evaluados mediante el ensayo conductual de campo abierto durante un período de 10 semanas.

A los animales se les indujo, y se les mantuvo en él, un estado de anestesia quirúrgica con isoflurano al 1,5% portado en una mezcla de aire calidad médica (oxígeno 95%, CO₂ 5%). Antes de la operación se dio una dosis inicial de cefazolina (50 mg/kg, s.c.). Durante la cirugía, los animales fueron colocados en una almohadilla calefactora para mantener la temperatura corporal, y se monitorizaron el pulso, SpO₂ y la temperatura. Se realizó una laminectomía de las vértebras espinales T9 y T10. Se hizo una laminectomía parcial en la articulación T13/L1 para la colocación de un catéter intratecal. Se hizo una incisión en la duramadre con una aguja hipodérmica. Se insertó un catéter de calibre 32 (ReCathCo., LLC, CS132G, número de lote 20422) a través de la incisión dural y se alimentó rostralmente para que se posicionara inmediatamente caudal a la laminectomía T9/T10. El catéter se aseguró al hueso y al músculo con pegamento de cianoacrilato y suturas. Las paletas de un fórceps modificado articulado por deslizamiento (4 mm de anchura x 0,5 mm de espesor) se insertaron en el canal espinal entre los aspectos laterales de la médula espinal y las vértebras en la laminectomía rostral. Se indujo una SCI comprimiendo la médula espinal entre las paletas del fórceps durante un período de 15 segundos. El grado de gravedad de la lesión se indujo usando

un fórceps que comprime la médula espinal hasta una distancia de 0,9 mm (lesión moderada). La duramadre sobre la lesión permaneció intacta. Los fórceps se separaron y el sitio de la lesión se lavó con disolución salina. Las capas musculares superpuestas se suturaron conjuntamente y la herida de la piel se cerró con grapas. Después de la operación, a los animales se les dio un bolo inmediato de 5 mL de disolución salina de Ringer lactada seguido por una segunda administración de 5 mL de disolución salina de Ringer lactada después de unas pocas horas.

Inmediatamente después de la cirugía y luego uno de cada dos días durante 2 semanas, los animales fueron anestesiados con isoflurano y se inyectaron en el catéter intratecal el agente experimental (condroitinasa ABC I) o el testigo (Penicilinas) como se describe a continuación. El volumen inyectado fue 3 microlitros, seguido por un lavado con 4 microlitros de fluido cerebroespinal artificial.

10 Regímenes de tratamiento:

1. Chase ABC I - Condroitinasa ABC I (Seikagaku) 0,06 U/dosis, i.t. en 3 microlitros de aCSF.
2. Penicilinas – Penicilinas (Sigma), 3 microlitros, i.t. a razón de 228 microgramos por mililitro.

15 Análisis conductual: a las 48 horas y luego semanalmente después de la lesión se observó y se puntuó la actividad locomotora en campo abierto según el sistema de puntuación de Basso, Beattie y Bresnahan (BBB) (Basso et al., 1995). Este sistema está bien aceptado en el campo para la evaluación de la recuperación de la función locomotora tras una lesión de la médula espinal en ratas.

20 Resultados: se enrolaron 37 animales, 19 por grupo de tratamiento en la lesión de 0,9 mm con fórceps. La muerte de animales fue aproximadamente igual entre todos los grupos de tratamiento. De los animales que murieron, más que el 190% tuvieron infecciones en el tracto urinario. Un animal con lesión de 0,9 mm con fórceps tratado con penicilinas se separó de las puntuaciones ya que no se recuperó por encima de un BBB de 3 o fue extremadamente errático. 4 animales adicionales (2 tratados con penicilinas y 2 con condroitinasa) se separaron debido a temblores y disquinesias. La separación de estos animales dio lugar a un número de animales en cada grupo de 0,9 mm de 12.

25 *Fórceps de 0,9 mm (lesión moderada).* Los animales que fueron tratados con penicilinas como testigo recuperaron la función hasta una puntuación BBB de $7,1 \pm 0,36$ (media \pm SEM) ($n = 12$ a las diez semanas tras la operación. Las puntuaciones BBB media de los animales tratados con condroitinasa ABC I ($n = 12$) fueron significativamente mayores a las 10 semanas con una puntuación media de $0,1 \pm 0,64$ ($p < 0,01$). Las puntuaciones de cada grupo después de alcanzar la mesera a las 4 semanas fueron también significativamente diferentes por ANOVA ($p < 0,001$). Véase la figura 4 que ilustra las puntuaciones BBB de los animales tratados con condroitinasa y con testigo tras una SCI contusiva moderada.

35 Se ha mostrado que la condroitinasa mejora la función y promueve la regeneración en la hemisección dorsal en un modelo de DCI de grave compresión con fórceps. El presente estudio confirma el resultado del estudio de compresión con fórceps así como demuestra que la condroitinasa es efectiva para mejorar la función locomotora hasta niveles de lesión más moderados. El estudio de lesión moderada mostró una mejora significativa en la actividad locomotora en campo abierto con el tratamiento con condroitinasa.

Ejemplo 6

Distribución y toxicidad aguda de condroitinasa ABC_{Tipol}

40 Ratas Long Evans hembra de Charles River Laboratories, que pesaban aproximadamente 210 gramos se enjaularon en el centro de cuidado de animales Acorda durante 5 días antes de la inyección para asegurar su salud y la estabilidad de su peso. Las ratas se anestesiaron con isoflurano y se les inyectó i.v. condroitinasa ABC I de Acorda (ABC I lote 3) vía las venas de la cola. A los animales se les inyectó 0, 0,2, 0,775 ó 7,775 mg/kg con disoluciones que contenían 0, 0,2, 0,775 y 7,775 mg/mL, respectivamente, en una disolución salina equilibrada de Hank como se muestra en la tabla 1.

Animal	mg/kg	Peso	Dosis	Volumen	Supervivencia	Fecha del sacrificio
2	0	242	0	0,25	24	Miércoles 3/9/2003
9	0	243	0	0,25	24	Miércoles 3/9/2003
10	0	238	0	0,25	24	Miércoles 3/9/2003
12	0	252	0	0,25	7D	Martes 9/9/2003
14	0	247	0	0,25	7D	Martes 9/9/2003

18	0	244	0	0,25	7D	Martes 9/9/2003
5	0,2	237	0,0474	0,275581	24	Miércoles 3/9/2003
8	0,2	225	0,045	0,261628	24	Miércoles 3/9/2003
11	0,2	237	0,0474	0,275581	24	Miércoles 3/9/2003
13	0,2	235	0,047	0,273256	7D	Martes 9/9/2003
16	0,2	237	0,0474	0,275581	7D	Martes 9/9/2003
19	0,2	237	0,0474	0,275581	7D	Martes 9/9/2003
3	0,75	221	0,16575	0,221	24	Miércoles 3/9/2003
4	0,75	223	0,16575	0,223	24	Miércoles 3/9/2003
17	0,75	225	0,16875	0,225	24	Miércoles 3/9/2003
20	0,75	223	0,16825	0,223	7D	Martes 9/9/2003
21	0,75	225	0,16875	0,225	7D	Martes 9/9/2003
24	0,75	225	0,16875	0,225	7D	Martes 9/9/2003
11	7,75	219	1,69725	0,219	24	Miércoles 3/9/2003
6	7,75	218	1,6895	0,218	24	Miércoles 3/9/2003
7	7,75	203	1,57325	0,203	24	Miércoles 3/9/2003
15	7,75	212	1,643	0,212	7D	Martes 9/9/2003
22	7,75	216	1,674	0,216	7D	Martes 9/9/2003
23	7,75	218	1,6895	0,218	7D	Martes 9/9/2003

Los animales fueron devueltos a sus jaulas y se monitorizaron respecto al dolor y a la angustia. Los pesos de tomaron diariamente.

5 La mitad de los animales fueron sacrificados a las 24 horas después de la inyección. El cerebro, la médula espinal, el corazón, el hígado, los riñones y la sangre se separaron y se congelaron rápidamente en isopentano a -40°C para la evaluación de la distribución enzimática y para histopatología. Los animales restantes se observaron durante 7 días y luego se sacrificaron y procesaron como con el grupo que sobrevivió 24 horas.

10 Los tejidos se bloquearon y crioseccionaron en porciones de $20\ \mu\text{m}$ de espesor. Las secciones se lavaron brevemente en disolución salina tamponada con fosfatos $0,1\ \text{M}$ (PBS) y luego se fijaron durante 10 minutos en una disolución fijadora de etanol, formalina y ácido acético (66, 4 y 5% en volumen, respectivamente). Los tejidos se lavaron y bloquearon en una disolución de suero normal al 10% (que contenía suero de rata normal al 2% y suero de burro normal al 8%) en PBS $0,1\ \text{M}$ pH 7,4. Las secciones se incubaron durante toda la noche en un anticuerpo anti-condroitinasa ABC I (n° 8429). El tejido se evaluó por inmunohistoquímica y manchas western de homogeneizados de tejido con un anticuerpo anti-condroitinasa y uno que reconocía a los condroitina sulfato proteoglicanos digeridos.

15 Resultados: no se observó ninguna reacción evidente durante o inmediatamente después de la inyección. No se advirtió hinchamiento, inflamación, moretones o necrosis en el sitio de la inyección. No se advirtió ninguna alteración en la alimentación, aseo o vocalizaciones. Los animales fueron evaluados respecto a su comportamiento motor en una piscina abierta. Los cuidadores de los animales o los especialistas de la conducta no advirtieron ninguna anomalía. Los animales mostraron signos de sensibilidad o hinchamiento de las articulaciones.

20 Los animales se pesaron cada día antes y después de las inyecciones. Los cambios medios de peso corporal se ilustran en la figura 5. No hubo diferencias significativas en el cambio de peso entre los grupos de tratamiento. Todos los grupos perdieron entre 0 y 6,667 gramos en las 24 horas siguientes a la inyección. El grupo testigo con vehículo perdió peso a las 24 horas. Todos los grupos de tratamiento ganaron peso en cada día sucesivo.

Ejemplo 7

Toxicidad intratecal con una única dosis de condroitinasa ABC_{Tipol}

- 5 Se colocaron catéteres intratecales en 16 ratas hembra normales no lesionadas en aproximadamente la articulación vertebral T13/L1 para administrar condroitinasa. Los catéteres se introdujeron rostralmente para que descansaran en el nivel T9/T10 para simular los estudios previos con condroitinasa. Veinticuatro horas después de la colocación de los catéteres intratecales, se administró a los animales 0, 0,06, 0,6 ó 6 unidades de condroitinasa ABC I de Acorda (100 unidades/miligramo) en 20 microlitros de fluido cerebroespinal artificial en un período de 20 minutos. Estas dosis se escogieron de 0, 1, 10 y 100 veces la dosis usada en los ejemplos 1, 4 y 5. Se observó a los animales durante 24 horas ó 7 días y se siguieron sus pesos y temperaturas.
- 10 No se vio ninguna reacción evidente en ninguna rata. Como se ilustra en las figuras 6 y 7, no se advirtió ninguna diferencia significativa en el peso o la temperatura entre los grupos, respectivamente. La condroitinasa parece segura en dosis intratecales (I.T.) únicas de hasta 100 veces las dosis usadas en los estudios previos.

Ejemplo 8

Estudio de toxicidad intratecal con dosis repetidas y crecientes de condroitinasa ABC_{Tipol}

- 15 Se colocaron catéteres intratecales en cinco ratas hembra adultas Long Evans. Las ratas fueron anestesiadas, los músculos se separaron de las vértebras y se realizó una pequeña laminectomía en aproximadamente la articulación T13/L1. Se colocaron catéteres intratecales de 1,4 mm de longitud para que sus puntas finalizaran en el nivel T9/T10. Las ratas fueron anestesiadas con isoflurano y se les administró vehículo (aCSF), y dosis repetidas o crecientes de condroitinasa ABC I. Las dosis repetidas fueron 0,6 unidades ó 10 veces la dosis eficaz de los estudios previos. Las dosis crecientes fueron: 0,6, 1,2, 2,4, 4,8, 9,6 y 19,2 unidades. Se monitorizaron los cambios de peso y de temperatura, la toxicidad evidente y los cambios conductuales de las ratas.
- 20

- 25 Las ratas tratadas con dosis repetidas o crecientes de condroitinasa ABC I ganaron ligeramente más peso que las tratadas con vehículo. Los efectos adversos estuvieron uniformemente distribuidos entre las ratas tratadas con vehículo, dosis repetidas y dosis crecientes. Los sucesos adversos incluyeron letargia y caída de la cola y usualmente ocurrieron en el día de la anestesia o administración. En la figura 8 se muestra un gráfico de dispersión del cambio de peso y en la figura 9 se muestra el cambio de temperatura durante el régimen de dosificación. En ambas figuras, dos pesos diarios se representan con relación a la primera dosis. La cadencia de dosis está indicada con las flechas.

Ejemplo 9

- 30 La condroitinasa mejora la función neurológica en una lesión crónica por contusión de la médula espinal

- Los individuos que tienen lesiones en el CNS recuperan cierto grado de función neurológica y entonces entran en una fase crónica de la lesión en la que se produce una mejora limitada. Con la excepción de los ejemplos de la presente memoria descriptiva, todos los estudios hasta la fecha con condroitinasa han sido realizados en animales inmediatamente después de lesiones de transección de la médula espinal. En el ejemplo, la condroitinasa ABC_{Tipol}, la condroitinasa ABC_{Tipoll}, la condroitinasa AC y la condroitinasa B o enzimas de mamíferos con actividad semejante a las condroitinasas tales como Hyal 1, Hyal 2, Hyal 3 y Hyal 4 se usan para tratar animales en la fase crónica de la lesión tras una lesión por contusión del CNS. En este ejemplo, las ratas se sometieron a una lesión por contusión de la médula espinal y se dejó que se recuperaran durante al menos semanas. En esta etapa, todos los animales han alcanzado un valor meseta respecto a la locomoción en campo abierto como se evaluó mediante el método de puntuación BBB descrito en el ejemplo 1. Los animales se trataron con condroitinasa ABC_{Tipol}, condroitinasa ABC_{Tipoll}, condroitinasa AC y condroitinasa B o enzimas de mamíferos con actividad semejante a las condroitinasas tales como Hyal 1, Hyal 2, Hyal 3 y Hyal 4.
- 35
- 40

Ejemplo 10

Clonación de condroitinasa AC en *Flavobacterium heparinum*

- 45 Se hizo crecer *Flavobacterium heparinum* (ATCC) en LB (cultivo de Luria) a 25°C durante 4 días. Las bacterias se decantaron por centrifugación y el DNA genómico se aisló mediante el kit DNeasy Tissue (Qiagen). Se sintetizaron cebadores de PRC con un sitio de restricción NdeI en el extremo 5' y un sitio BamH1 en el extremo 3' que tenían secuencias 5'-CATATGCAGCAGACCGGTA CTGCA-3' y 5'-GGATTCTCAGTGCTCTTTATTTCT-3', respectivamente, para sintetizar la proteína madura. Se usó un microgramo de DNA genómico en una reacción PCR de 50 µL que contenía 10 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), 50 pmoles de cada uno de los cebadores hacia adelante y reverso, 1 mM de MgSO₄, y 5 unidades de DNA polimerasa *Tfi* (Promega). La reacción PCR de arranque en caliente se inició por desnaturalización a 95°C durante 2 min seguido por otro ciclo de desnaturalización a 94°C durante 30 s, recocido y extensión a 58°C durante 8 min durante 30 ciclos. La extensión final se llevó a cabo a 72°C durante 8 min antes de enfriar a 4°C. El producto PCR de 2,0 kb se ligó en el vector pCR
- 50

2.1 (kit de clonación TOPO, Invitrogen) y se transformó en células competentes OneShot (Invitrogen). El DNA plásmido se aisló de varios clones explorados por digestión con la enzima de restricción *EcoR1* y se seleccionaron los clones positivos que tenían el inserto de 2,0 kb. La integridad del gen se confirma por secuenciación del DNA y muestra una identidad del 100% con la secuencia publicada (nº de acceso al Genbank U27583). La secuencia de nucleótidos de la condroitinasa AC es SEQ ID No. 1.

Ejemplo 11

Clonación de condroitinasa B en *Flavobacterium heparinum*

La condroitinasa B se clonó por el mismo método que en el ejemplo 2 usando cebadores con un sitio de restricción *NdeI* en el extremo 5' y un sitio *BamH1* en el extremo 3' que tenían secuencias 5'-CATATGCAGGTTGTTGCTTCAAAT -3' y 5'-GGATCCTCAGTGCTCTTTATTTCT-3', respectivamente, para sintetizar la proteína madura. Se usó un microgramo de DNA genómico en una reacción PCR de 50 µL que contenía 10 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), 50 pmoles de cada uno de los cebadores hacia adelante y reverso, 1 mM de MgSO₄, y 5 unidades de DNA polimerasa *Tfi* (Promega). La reacción PCR de arranque en caliente se inició por desnaturalización a 95°C durante 2 min seguido por un segundo ciclo de desnaturalización a 94°C durante 30 s, recocido y extensión a 58°C durante 8 min durante 30 ciclos. La extensión final se llevó a cabo a 72°C durante 8 min antes de enfriar a 4°C. El producto PCR de 1,6 kb se ligó en el vector pCR 2.1 (kit de clonación TOPO, Invitrogen) y se transformó en células competentes OneShot (Invitrogen). El DNA plásmido se aisló de varios clones explorados por digestión con la enzima de restricción *EcoR1* y se seleccionaron los clones positivos que tenían el inserto de 1,6 kb. La integridad del gen se confirma por secuenciación del DNA y muestra una identidad del 100% con la secuencia publicada (nº de acceso al Genbank U27584). La secuencia de nucleótidos de la condroitinasa B es SEQ ID No. 2.

Ejemplo 12

Clonación de condroitinasa ABC_{Tipol}

Se aisló DNA genómico de *Proteus vulgaris* usando el kit DNeasy Tissue (Qiagen). Se sintetizaron cebadores de PCR con un sitio de restricción *NdeI* en el extremo 5' y un sitio *BamH1* en el extremo 3' que tenían secuencias 5'-CAT ATG GCC ACC AGC AAT CCT GCA TTT G-3' (**F2**) y 5'-GGA TCC TCA AGG GAG TGG CGA GAG-3' (**R**), respectivamente, para sintetizar la proteína madura (2). Los productos PCR de 3,0 kb se ligaron en un vector pCR 2.1 (kit de clonación TOPO, Invitrogen) y se transformaron en células competentes DH5α (Invitrogen). El DNA plásmido se aisló de varios clones explorados por digestión con la enzima de restricción *EcoR1*. La integridad del gen se confirma por secuenciación repetida del DNA y muestra una identidad del 99,7% y 99,5% en la secuencia. La secuencia de nucleótidos de condroitinasa ABC I es SEQ ID No. 3. La identidad de la secuencia al nivel de aminoácidos es SEQ ID No. 4.

Ejemplo 13

Clonación de condroitinasa ABC_{Tipoll}

La condroitinasa ABC_{Tipoll} ha sido clonada a partir de DNA genómico de *Proteus vulgaris*. Se diseñaron cebadores hacia delante y reversos que tenían secuencias 5'-TTA CCC ACT CTG TCT CAT GAA GCT TTC-3' y 5'-TTA CTT AAC TAA ATT AAT AAC AGT AGG-3', respectivamente. Se aisló un producto PCR de peso molecular de 3,0 kb después de 30 ciclos de amplificación del DNA genómico de *Proteus vulgaris*. El producto PCR ha sido clonado en el vector pCR 2.1 y se confirmó mediante digestión con enzimas de restricción. La integridad del gen se confirmó por secuenciación del DNA y muestra una identidad del 99% con la secuencia publicada. La secuencia de nucleótidos de condroitinasa ABC II es SEQ ID No. 5.

Las discrepancias anteriores a nivel de nucleótidos dieron lugar a una identidad del 98,3% al nivel de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de condroitinasa ABC II es SEQ ID No. 6.

Ejemplo 14

Las condroitinasas AC y B causan extensión de las neuritas *in vitro*

Se ensayaron Chase AC y B respecto a su capacidad para promover la extensión de las neuritas sobre un sustrato CSPG inhibitor. Se extendió en motas una mezcla CSPG (0,5 mg/mL; Chemicon) sobre un plástico de cultivo de tejido revestido con poli-L-lisina. Se añadió Chase AC o B recombinante a la placa en medio exento de suero en concentraciones de 0,5 ó 0,1 mg/mL, respectivamente, durante 3 horas a 37°C. Se extendieron sobre las motas neuronas corticales de crías de rata embrionicas de 18 días. Se tomaron fotomicrografías de contacto de fases 48 horas después de la extensión en las placas y se evaluó la extensión de las neuritas en las células. Como se ve en la figura 2, tanto la enzima Chase AC como la B promovieron la extensión de las neuritas sobre el sustrato CSPG cuando se comparan con testigos no tratados. La promoción de las neuritas fue similar a las enzimas Chase comercialmente disponibles a iguales concentraciones molares.

Ejemplo 15

Una proteína de fusión de condroitinasa y péptido de transducción celular TAT

La proteína de fusión TAT de la condroitinasa adecuada para usar en la presente memoria se describe en la solicitud copendiente de patente serial de EE.UU. No (aún no asignado) presentada concurrentemente con la presente memoria e incorporada a la misma por referencia. La proteína TAT forma el virus de inmunodeficiencia de ser humano (HIV) y contiene un dominio de transducción proteico (PTD) que está implicado en la transducción de HIV en las células. El PTD contiene un dominio de 11 aminoácidos (péptido TAT) que es responsable de la actividad del PTD. El péptido TAT puede estar unido a proteínas y facilitar la transducción de las proteínas en las células. El mecanismo de transducción es independiente del peso molecular o de las propiedades químicas de las proteínas que están unidas al péptido TAT. Por lo tanto, el péptido TAT proporciona un método para administrar cualquier proteína en el citoplasma celular. Estudios *in vivo* muestran que si una proteína de fusión que consiste en el péptido TAT unido a la enzima de 120 kd, beta-galactosidasa (β -Gal), se inyecta en ratones, se observa un robusto suministro de β -Gal en una amplia variedad de células. En particular, se observó β -Gal en el CNS.

Sin el péptido TAT no se observó β -Gal en el CNS. Así, las proteínas de fusión del péptido TAT cruzan la barrera sangre – cerebro y también son transducidas en las células. Normalmente, el transporte a través de la barrera sangre – cerebro está restringido a ciertas pequeñas moléculas hidrófobas y péptidos lipófilos particulares de bajo peso molecular. El transporte de proteínas tan grandes como β -Gal no es posible sin una ruptura de la barrera sangre – cerebro, pero el péptido TAT facilita el transporte a la vez que deja intacta la barrera sangre – cerebro.

La presente invención es una enzima tipo condroitinasa funcionalmente unida al péptido TAT (TAT-Chase). La primera ventaja es que TAT-Chase cruzará la barrera sangre – cerebro y allí TAT-Chase puede usarse sistémicamente para tratar una lesión de la médula espinal y trastornos relacionados del CNS. La segunda ventaja es que TAT-Chase será transducida en las células y a continuación degradará los almacenes de CSPGs intracelulares. Por lo tanto, TAT-Chase degradará CPPS tanto extra como intracelulares.

Ejemplo 16

Células encapsuladas que liberan condroitinasa

Los genes que codifican a la condroitinasa AC, la condroitinasa B, la condroitinasa ABC_{Tipol}, la condroitinasa ABC_{Tipoll}, o a otros enzimas con actividad semejante a las condroitinasas tales como Hyal 1, Hyal 2, Hyal 3 y Hyal 4 se transfectan en una célula apropiada de mamífero tal como la línea CHO. Las células que expresan condroitinasa catalíticamente activa se clonan y expanden. La línea celular que expresa la condroitinasa se encapsula usando sistemas poliméricos tales como poli(acrilonitrilo), poli(cloruro de vinilo) (PAN-PVC) que permiten la difusión de nutrientes y gases, pero impiden la intrusión de células huésped. Cuando la cápsula se implanta las líneas celulares que producen condroitinasa sobreviven y secretan continuamente condroitinasa. Sin embargo, las células no están sometidas a rechazo inmune porque están inmunoaisladas en la cápsula polimérica. La ventaja de este sistema es que en lugar de suministrar la condroitinasa a través de catéteres o bombas, la condroitinasa es continuamente secretada. Además, cuando no se requiere un tratamiento más largo, la cápsula puede recuperarse al final del intervalo de tratamiento. Se ha de entender que el sistema de la presente memoria basado en células encapsuladas no es sólo adecuado para usar en el tratamiento de lesiones del CNS por contusiones, sino que también es adecuado para usar en el tratamiento de otras lesiones y trastornos del CNS.

Ejemplo 17

Mutantes de supresión de condroitinasa que son biológicamente activos

Los mutantes de supresión de condroitinasa adecuados para usar en la presente memoria se describen en la solicitud copendiente comúnmente otorgada de patente serial de EE.UU. No. (aún no asignado) presentada concurrentemente con la presente memoria e incorporada a la misma por referencia. Las condroitinasas AC y B producidas recombinantemente han mostrado eficacia *in vitro* para superar la barrera de una frontera de un sustrato inhibidor, tal como agregano, y dan lugar a la extensión de las neuritas en neuronas corticales de ratas. Sin embargo, con el fin de facilitar el transporte efectivo de las enzimas anteriores al sitio de la lesión se llevó a cabo un análisis sistemático de supresión basado en las estructuras cristalinas disponibles con el fin de determinar el tamaño mínimo de polipéptidos capaz de degradar CSPGs. La actividad de escisión de todos estos mutantes ha sido explorada *in vitro* mediante un ensayo zimográfico usando agregano como sustrato. Hasta la fecha, se encontró que un polipéptido truncado de condroitinasa AC (n Δ 50-c Δ 275) que carecía de 50 y 275 aminoácidos desde los terminales amino y carboxi, respectivamente, y que tenía un peso molecular de 38 kDa comparado con el de 75kDa de la proteína de longitud completa era el tamaño mínimo que retenía actividad como se probó mediante el ensayo zimográfico. Sin embargo, el mutante de supresión de condroitinasa B (n Δ 120-c Δ 120) que carecía de 120 aminoácidos desde cada uno de los terminales amino y carboxi y que tenía un peso molecular de 26 kDa comparado con el de 52kDa de la proteína de longitud completa también ha mostrado retener actividad en el ensayo zimográfico. Las enzimas truncadas homogéneamente purificadas se caracterizarán *in vitro* y se ensayarán

adicionalmente *in vivo* en paralelo con las moléculas de longitud completa para evaluar su potencia como agentes terapéuticos en lesiones de la médula espinal. Se ha de entender que los mutantes de supresión de la presente memoria son no sólo adecuados para usar en el tratamiento de lesiones del CNS por contusiones, sino que también son adecuados para usar en el tratamiento de otras lesiones y trastornos del CNS.

- 5 Lo que se ha descrito e ilustrado en la presente memoria son realizaciones de la invención junto con algunas de sus variaciones. Los términos, descripciones y figuras usados en la presente memoria se establecen sólo a modo de ilustración y no significa que sean limitantes. Los expertos en la técnica reconocerán que dentro de la invención son posibles muchas variaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Acorda Therapeutics, Inc.
 Gruskin, Elliott A.
 Caggiano, Anthony O.
 5 Zimber, Michael P.
 Blight, Andrew R.

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE LESIONES DEL CNS

10 <130> 127304.02301

 <140> Aún no designado
 <141> 17-05-2004

15 <150> 60/417.236
 <151> 16-05-2003

 <160> 6

20 <170> PatentIn versión 3.2

 <210> 1
 <211> 2037
 <212> DNA

25 <213> Flavobacterium heparinum

<400> 1

cagcagaccg	gtactgcaga	actgattatg	aagcgggtga	tgctggacct	taaaaagcct	60
ttgcgcaata	tggataaggt	ggcggaaaag	aacctgaata	cgctgcagcc	tgacggtagc	120
tggaaggatg	tgcttataa	agatgatgcc	atgaccaatt	ggttgccaaa	caaccacctg	180
ctacaattgg	aaactattat	acaggcttat	attgaaaaag	atagtacta	ttatggcgac	240
gataaagtgt	ttgaccgat	ttccaaagct	tttaagtatt	ggtatgacag	cgaccgaaa	300
agccgcaact	ggtggcacia	tgaaattgcc	actccgcagg	cccttggtga	aatgctgatc	360
ctgatgctgt	acggtaaaaa	gccgcttgat	gaagcattgg	tgcataaatt	gaccgaaaga	420
atgaagcggg	gcgaaccgga	gaagaaaacg	ggggccaaca	aaacagatat	cgccctgcat	480
tacttttatac	gtgctttggt	aacgtctgat	gaggctttgc	tttccttcgc	cgtaaaagaa	540
ttgttttatac	ccgtacagtt	tgtacactat	gaggaaggcc	tgcaatacga	ttattcctac	600
ctgcagcacg	gtccgcaatt	acagatatcg	agctacggtg	ccgtatttat	taccggggta	660
ctgaaacttg	ccaattacgt	tagggatacc	ccttatgctt	taagtaccga	gaaactggct	720
atattttcaa	agtattaccg	cgacagttat	ctgaaagcta	tccgtggaag	ttatatggat	780
tttaacgtag	aaggccgcgg	agtaagccgg	ccagacattc	taaataaaaa	ggcagaaaaa	840
aagaggttgc	tgggtggcgaa	gatgatcgat	cttaagcata	ctgaagaatg	ggctgatgcg	900
atagccagga	cagatagcac	agttgcggcc	ggctataaga	ttgagcccta	tcaccatcag	960
ttctggaatg	gtgattatgt	gcaacattta	agacctgcct	attcttttaa	tgttcgtatg	1020
gtgagtaagc	ggacccgacg	cagtgaatcc	ggcaataaag	aaaacctgct	gggcaggat	1080
ttatctgatg	gggctactaa	catacaattg	cgcggaccag	aatactataa	cattatgccg	1140
gtatgggaat	gggacaagat	tcctggcata	accagccgtg	attatttaac	cgacagacct	1200

ttgacgaagc tttggggaga gcaggggagc aatgactttg caggaggggt gtctgatggt 1260
 gtatacgggg ccagtgcccta cgcattggat tacgatagct tacaggcaaa gaaagcctgg 1320
 ttcttttttg acaaagagat tgtatgtcct ggtgccggt tcaacagcaa tgcccctgaa 1380
 aacattacca ctacccttaa ccagagctgg ttaaattggcc cggttataag tactgcaggt 1440
 aaaaccggcc ggggtaaaat aacaacgttt aaagcacagg gacagttctg gttgttgac 1500
 gatgcgattg gttattactt tcctgaaggg gccaacctta gtctgagtac ccagtcgcaa 1560
 aaaggcaatt ggttccacat caacaattca cattcaaaag atgaagtttc tggatgatgta 1620
 ttaagcttt ggatcaacca tgggtccagg ccagaaaatg cgcagtatgc ttatatcgtt 1680
 ttgccgggaa taaacaagcc ggaagaaatt aaaaaatata atggaacggc accgaaagtc 1740
 cttgcccaata ccaaccagct gcaggcagtt tatcatcagc agttagatat ggtacaggct 1800
 atcttctata cagctggaaa attaagcgtg gcgggcgtag aaattgaaac agataagcca 1860
 tgtgcagtg tgatcaagca catcaatggc aagcaggtaa tttgggctgc cgatccattg 1920
 caaaaagaaa agactgcagt gttgagcatc agggatttaa aaacaggaaa acaaatcgg 1980
 gtaaaaattg attttccgca acaggaattt gcaggtgcaa cggttgaact gaaatag 2037

<210> 2

<211> 1446

<212> DNA

5 <213> Flavobacterium heparinum

<400> 2

caggttggtg cttcaaatga aactttatac caggttgtaa aggaggtaaa acccggtggt 60
 ctggtacaga ttgccgatgg gacttataaa gatgttcagc tgattgtcag caattcagga 120
 aaatctgggt tgcccatcac tattaagcc ctgaaccgg gtaaggtttt ttttaccgga 180
 gatgctaaag tagagctgag gggcgagcac ctgatactgg aaggcatctg gtttaaagac 240
 gggacacagag ctattcaggc atggaatca catggaccg gattggtggc tatatatggt 300
 agctataacc gcattaccgc atgtgtatgt gattgttttg atgaagccaa ttctgcttac 360
 attactactt cgcttaccga agacggaaag gtacctcaac attgccgat agaccattgc 420
 agttttaccg ataagatcac ttttgaccag gtaattaacc tgaacaatac agccagagct 480
 attaaagacg gttcgggtggg aggaccgggg atgtaccatc gtgttgatca ctgttttttt 540
 tccaatccgc aaaaaccggg taatgccgga gggggaatca ggattggcta ttaccgtaat 600
 gatataggcc gttgtctggt agactctaac ctgtttatgc gtcaggattc ggaagcagag 660
 atcatcacca gcaaatcgca ggaaaatggt tattatggta atacttacct gaattgccag 720
 ggcaccatga actttcgta cggatgatcat caggtggcca ttaacaattt ttatatagcc 780
 aatgaccagc gatttgata cgggggaatg tttgtttggg gaagcaggca tgtcatagcc 840
 tgaattatt ttgagctgtc cgaaaccata aagtcgaggg ggaacgccgc attgtattta 900
 aacccgggtg ctatggcttc ggagcatgct cttgctttcg atatgttgat agccaacaac 960
 gctttcatca atgtaaatgg gtatgccatc cattttaatc cattggatga ggcagaaaa 1020

gaatattgtg cagccaatag gcttaagttc gaaacccccg accagcta at gttaaaaggc 1080
aatcttttct ttaaggataa accttatgtt taccattttt ttaaagatga ttattttata 1140
gcagggaaaa atagctggac tggtaatgta gccttaggtg tggaaaaggg aatccctgtt 1200
aacatttcg ccaataggtc tgcctataag ccggtaaaaa ttaaagatat ccagcccata 1260
gaaggaatcg ctcttgatct caatgcgctg atcagcaaag gcattacagg aaagcccctt 1320
agctgggatg aagtaaggcc ctactgggta aaagaaatgc ccgggacgta tgctttaacg 1380
gccaggcttt ctgcagatag ggctgcaaag tttaaagccg taattaaaag aaataaagag 1440
cactga 1446

<210> 3
<211> 2994
<212> DNA
5 <213> Proteus vulgaris

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (1086)..(1086)
10 <223> n es a, c, g, o t

<400> 3
gccaccagca atcctgcatt tgatcctaaa aatctgatgc agtcagaaat ttaccatttt 60
gcacaaaata acccattagc agacttctca tcagataaaa actcaatact aacgttatct 120
gataaacgta gcattatggg aaaccaatct cttttatgga aatggaaagg tggtagtagc 180
tttactttac ataaaaaact gattgtcccc accgataaag aagcatctaa agcatgggga 240
cgctcatcca cccccgtttt ctcatittgg ctttacaatg aaaaaccgat tgatggttat 300
cttactatcg atttcggaga aaaactcatt tcaaccagtg aggctcaggc aggctttaa 360
gtaaaattag atttcactgg ctggcgact gtgggagtct ctttaataa cgatcttgaa 420
aatcgagaga tgaccttaa tgcaaccaat acctcctctg atggtactca agacagcatt 480
ggcgttctt taggtgctaa agtcgatagt attcgtttta aagcgccttc taatgtgagt 540
cagggtgaaa tctatatcga ccgtattatg ttttctgctg atgatgctcg ctaccaatgg 600
tctgattatc aagtaaaaac tcgcttatca gaacctgaaa ttcaatttca caacgtaaag 660
ccacaactac ctgtaacacc tgaaaattta gcggccattg atcttattcg ccaacgtcta 720
attaatgaat ttgtcggagg tgaaaaagag acaaacctcg cattagaaga gaatatcagc 780
aaattaaana gtgatttca tgctcttaat actcacact tagcaaatgg tggaaacgca 840
ggcagacatc tgatcactga taacaaatc attatttatc aaccagagaa tcttaactct 900
caagataaac aactatttga taattatgtt attttaggta attacacgac attaattgtt 960
aatattagcc gtgcttatgt gctggaaaaa gatccacac aaaaggcgc actaaagcag 1020
atgtacttat taatgacaaa gcatttatta gatcaaggct ttgttaaagg gagtgcttta 1080
gtgacnacc atcactgggg atacagttct cgttgggtgt atatttcac gttattaatg 1140

ES 2 373 039 T3

tctgatgcac taaaagaagc gaacctacaa actcaagttt atgattcatt actgtgggat 1200
 tcacgtgagt ttaaaagtag ttttgatag aaagtaagtg ctgatagctc tgatctagat 1260
 ttttcaata ccttatctcg ccaacattta gccttattac tactagagcc tgatgatcaa 1320
 aagcgtatca acttagttaa tactttcagc cattatatca ctggcgatt aacgcaagtg 1380
 ccaccgggtg gtaaagatgg ttacgccct gatggtacag catggcgaca tgaaggcaac 1440
 tatccgggct actctttccc agcctttaa aatgcctctc agcttattta tttattacgc 1500
 gatacaccat tttcagtggg tgaaagtggg tggaaatagcc tgaaaaaagc gatggtttca 1560
 gcgtggatct acagtaatcc agaagtggg ttaccgcttg caggaagaca ccctcttaac 1620
 tcaccttcgt taaaatcagt cgctcaaggc tattactggc ttgccatgct tgcaaaatca 1680
 tcgcctgata aaacacttgc atctatttat cttgcgatta gtgataaac acaaaatgaa 1740
 tcaactgcta tttttggaga aactattaca ccagcgtctt tacctcaagg tttctatgcc 1800
 ttaaatggcg gtgcttttgg tattcatcgt tggcaagata aaatggtgac actgaaagct 1860
 tataacacca atgtttggc atctgaaatt tataacaaag ataaccgta tggccgttac 1920
 caaagtcatg gtgtcgtca aatagtgagt aatggctcgc agctttcaca gggctatcag 1980
 caagaagggt gggattggaa tagaatgcca ggggcaacca ctatccacct tcctcttaaa 2040
 gacttagaca gtcctaaacc tcatacctta atgcaacgtg gagagcgtgg atttagcggg 2100
 acatcatccc ttgaaggcca atatggcatg atggcattcg atcttattta tcccgccaat 2160
 cttgagcgtt ttgatcctaa tttcactgcg aaaaagagtg tattagccgc tgataatcac 2220
 ttaattttta ttggtagcaa tataaatagt agtgataaaa ataaaaatgt tgaaacgacc 2280
 ttattccaac atgccattac tccaacatta aatacccttt ggattaatgg acaaaagata 2340
 gaaaacatgc cttatcaaac aacacttcaa caagggtgatt ggtaattga tagcaatggc 2400
 aatggttact taattactca agcagaaaaa gtaaagttaa gtcgccaaca tcaggtttca 2460
 gcggaaaata aaaatcgcca accgacagaa ggaacttta gctcggcatg gatcgatcac 2520
 agcactcgcc ccaaagatgc cagttatgag tatatggtct ttttagatgc gacacctgaa 2580
 aaaatgggag agatggcaca aaaattccgt gaaaataatg ggttatatca ggttcttcgt 2640
 aaggataaag acgttcatat tattctcgt aaactcagca atgtaacggg atatgccttt 2700
 tatcagccag catcaattga agacaaatgg atcaaaaagg ttaataaacc tgcaattgtg 2760
 atgactcacc gacaaaaaga cactcttatt gtcagtgcag ttacacctga tttaaatag 2820
 actcgccaaa aagcagcaac tcctgtcacc atcaatgtca cgattaatgg caaatggcaa 2880
 tctgctgata aaaatagtga agtgaaatat caggtttctg gtgataaac tgaactgacg 2940
 tttacgagtt actttggat tccacaagaa atcaactct cgccactccc ttga 2994

<210> 4
 <211> 997
 <212> PRT
 <213> Proteus Vulgaris

5

<400> 4

Ala Thr Ser Asn Pro Ala Phe Asp Pro Lys Asn Leu Met Gln Ser Glu
1 5 10 15

Ile Tyr His Phe Ala Gln Asn Asn Pro Leu Ala Asp Phe Ser Ser Asp
20 25 30

Lys Asn Ser Ile Leu Thr Leu Ser Asp Lys Arg Ser Ile Met Gly Asn
35 40 45

Gln Ser Leu Leu Trp Lys Trp Lys Gly Gly Ser Ser Phe Thr Leu His
50 55 60

Lys Lys Leu Ile Val Pro Thr Asp Lys Glu Ala Ser Lys Ala Trp Gly
65 70 75 80

Arg Ser Ser Thr Pro Val Phe Ser Phe Trp Leu Tyr Asn Glu Lys Pro
85 90 95

Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ile Asp Phe Gly Glu Lys Leu Ile Ser Thr
100 105 110

Ser Glu Ala Gln Ala Gly Phe Lys Val Lys Leu Asp Phe Thr Gly Trp
115 120 125

Arg Thr Val Gly Val Ser Leu Asn Asn Asp Leu Glu Asn Arg Glu Met
130 135 140

Thr Leu Asn Ala Thr Asn Thr Ser Ser Asp Gly Thr Gln Asp Ser Ile
145 150 155 160

Gly Arg Ser Leu Gly Ala Lys Val Asp Ser Ile Arg Phe Lys Ala Pro
165 170 175

Ser Asn Val Ser Gln Gly Glu Ile Tyr Ile Asp Arg Ile Met Phe Ser
180 185 190

Val Asp Asp Ala Arg Tyr Gln Trp Ser Asp Tyr Gln Val Lys Thr Arg
195 200 205

Leu Ser Glu Pro Glu Ile Gln Phe His Asn Val Lys Pro Gln Leu Pro
210 215 220

Val Thr Pro Glu Asn Leu Ala Ala Ile Asp Leu Ile Arg Gln Arg Leu
225 230 235 240

Ile Asn Glu Phe Val Gly Gly Glu Lys Glu Thr Asn Leu Ala Leu Glu
245 250 255

Glu Asn Ile Ser Lys Leu Lys Ser Asp Phe Asp Ala Leu Asn Thr His
260 265 270

Thr Leu Ala Asn Gly Gly Thr Gln Gly Arg His Leu Ile Thr Asp Lys
 275 280 285

Gln Ile Ile Ile Tyr Gln Pro Glu Asn Leu Asn Ser Gln Asp Lys Gln
 290 295 300

Leu Phe Asp Asn Tyr Val Ile Leu Gly Asn Tyr Thr Thr Leu Met Phe
 305 310 315

Asn Ile Ser Arg Ala Tyr Val Leu Glu Lys Asp Pro Thr Gln Lys Ala
 325 330 335

Gln Leu Lys Gln Met Tyr Leu Leu Met Thr Lys His Leu Leu Asp Gln
 340 345 350

Gly Phe Val Lys Gly Ser Ala Leu Val Thr Thr His His Trp Gly Tyr
 355 360 365

Ser Ser Arg Trp Trp Tyr Ile Ser Thr Leu Leu Met Ser Asp Ala Leu
 370 375 380

Lys Glu Ala Asn Leu Gln Thr Gln Val Tyr Asp Ser Leu Leu Trp Tyr
 385 390 395 400

Ser Arg Glu Phe Lys Ser Ser Phe Asp Met Lys Val Ser Ala Asp Ser
 405 410 415

Ser Asp Leu Asp Tyr Phe Asn Thr Leu Ser Arg Gln His Leu Ala Leu
 420 425 430

Leu Leu Leu Glu Pro Asp Asp Gln Lys Arg Ile Asn Leu Val Asn Thr
 435 440 445

Phe Ser His Tyr Ile Thr Gly Ala Leu Thr Gln Val Pro Pro Gly Gly
 450 455 460

Lys Asp Gly Leu Arg Pro Asp Gly Thr Ala Trp Arg His Glu Gly Asn
 465 470 475 480

Tyr Pro Gly Tyr Ser Phe Pro Ala Phe Lys Asn Ala Ser Gln Leu Ile
 485 490 495

Tyr Leu Leu Arg Asp Thr Pro Phe Ser Val Gly Glu Ser Gly Trp Asn
 500 505 510

Ser Leu Lys Lys Ala Met Val Ser Ala Trp Ile Tyr Ser Asn Pro Glu
 515 520 525

Val Gly Leu Pro Leu Ala Gly Arg His Pro Leu Asn Ser Pro Ser Leu
 530 535 540

Lys Ser Val Ala Gln Gly Tyr Tyr Trp Leu Ala Met Ser Ala Lys Ser
 545 550 555 560
 Ser Pro Asp Lys Thr Leu Ala Ser Ile Tyr Leu Ala Ile Ser Asp Lys
 565 570 575
 Thr Gln Asn Glu Ser Thr Ala Ile Phe Gly Glu Thr Ile Thr Pro Ala
 580 585 590
 Ser Leu Pro Gln Gly Phe Tyr Ala Phe Asn Gly Gly Ala Phe Gly Ile
 595 600 605
 His Arg Trp Gln Asp Lys Met Val Thr Leu Lys Ala Tyr Asn Thr Asn
 610 615 620
 Val Trp Ser Ser Glu Ile Tyr Asn Lys Asp Asn Arg Tyr Gly Arg Tyr
 625 630 635 640
 Gln Ser His Gly Val Ala Gln Ile Val Ser Asn Gly Ser Gln Leu Ser
 645 650 655
 Gln Gly Tyr Gln Gln Glu Gly Trp Asp Trp Asn Arg Met Pro Gly Ala
 660 665 670
 Thr Thr Ile His Leu Pro Leu Lys Asp Leu Asp Ser Pro Lys Pro His
 675 680 685
 Thr Leu Met Gln Arg Gly Glu Arg Gly Phe Ser Gly Thr Ser Ser Leu
 690 695 700
 Glu Gly Gln Tyr Gly Met Met Ala Phe Asp Leu Ile Tyr Pro Ala Asn
 705 710 715 720
 Leu Glu Arg Phe Asp Pro Asn Phe Thr Ala Lys Lys Ser Val Leu Ala
 725 730 735
 Ala Asp Asn His Leu Ile Phe Ile Gly Ser Asn Ile Asn Ser Ser Asp
 740 745 750
 Lys Asn Lys Asn Val Glu Thr Thr Leu Phe Gln His Ala Ile Thr Pro
 755 760 765
 Thr Leu Asn Thr Leu Trp Ile Asn Gly Gln Lys Ile Glu Asn Met Pro
 770 775 780
 Tyr Gln Thr Thr Leu Gln Gln Gly Asp Trp Leu Ile Asp Ser Asn Gly
 785 790 795 800
 Asn Gly Tyr Leu Ile Thr Gln Ala Glu Lys Val Asn Val Ser Arg Gln
 805 810 815

His Gln Val Ser Ala Glu Asn Lys Asn Arg Gln Pro Thr Glu Gly Asn
820 825 830

Phe Ser Ser Ala Trp Ile Asp His Ser Thr Arg Pro Lys Asp Ala Ser
835 840 845

Tyr Glu Tyr Met Val Phe Leu Asp Ala Thr Pro Glu Lys Met Gly Glu
850 855 860

Met Ala Gln Lys Phe Arg Glu Asn Asn Gly Leu Tyr Gln Val Leu Arg
865 870 875 880

Lys Asp Lys Asp Val His Ile Ile Leu Asp Lys Leu Ser Asn Val Thr
885 890 895

Gly Tyr Ala Phe Tyr Gln Pro Ala Ser Ile Glu Asp Lys Trp Ile Lys
900 905 910

Lys Val Asn Lys Pro Ala Ile Val Met Thr His Arg Gln Lys Asp Thr
915 920 925

Leu Ile Val Ser Ala Val Thr Pro Asp Leu Asn Met Thr Arg Gln Lys
930 935 940

Ala Ala Thr Pro Val Thr Ile Asn Val Thr Ile Asn Gly Lys Trp Gln
945 950 955 960

Ser Ala Asp Lys Asn Ser Glu Val Lys Tyr Gln Val Ser Gly Asp Asn
965 970 975

Thr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Tyr Phe Gly Ile Pro Gln Glu Ile Lys
980 985 990

Leu Ser Pro Leu Pro
995

<210> 5

<211> 2973

<212> DNA

<213> Proteus vulgaris

5

<400> 5

ttaccactc tgtctcatga agctttcggc gatatttatc tttttgaagg cgaattaccc	60
aatatcctta ccacttcaaa taataatcaa ttatcgctaa gcaaacagca tgctaaagat	120
ggtgaacaat cactcaaatg gcaatatcaa ccacaagcaa cattaacact aaataatatt	180
gttaattacc aagatgataa aaatacagcc acaccactca cttttatgat gtggatttat	240
aatgaaaaac ctcaatcttc cccattaacg ttagcattta aacaaaataa taaaattgca	300
ctaagtttta atgctgaact taattttacg ggggtggcgag gtattgctgt tccttttcgt	360

ES 2 373 039 T3

gatatgcaag gctctgagac aggtcaactt gatcaattag tgatcaccgc tccaaaccaa 420
gccggaacac tcttttttga tcaaatcatc atgagtgtac cgttagacaa tcgttgggca 480
gtacctgact atcaaacacc ttacgtaaat aacgcagtaa acacgatggt tagtaaaaac 540
tggagtgcac tattgatgta cgatcagatg tttcaagccc attacctac tttaaacctc 600
gatactgaat ttcgcgatga ccaaacagaa atggcttcga tttatcagcg ctttgaatat 660
tattcaagaa ttcgtaagaa taaaaaaatt actccaagata tctatagataa acatttaaga 720

ES 2 373 039 T3

cttgatgata gaaattcaaa accaacagaa caattatgtg caacagctgt tattttctcat 2460
 ggtaaggcac cgagtaatga aaattatgaa tatgcaatag ctatcgaagc acaaaataat 2520
 aaagctccca aatacacagt attacaacat aatgatcagc tccatgcggt aaaagataaa 2580
 ataaccaag aagagggata tggttttttt gaagccacta agttaaatac agcggatgca 2640
 acattattat ccagtgatgc gccggttatg gtcattggcta aaatacaaaa tcagcaatta 2700
 acattaagta ttgttaatcc tgatttaaata ttatatcaag gtagagaaaa agatcaattt 2760
 gatgataaag gtaatcaaat cgaagttagt gtttattctc gtcattggct tacagcagaa 2820
 tcgcaatcaa caaatagtac tattaccgta aaaggaatat ggaaattaac gacacctcaa 2880
 cccggtgtta ttattaagca ccacaataac aacctctta ttacgacaac aaccatacag 2940
 gcaacaccta ctgttattaa tttagttaag taa 2973

<210> 6
 <211> 990
 <212> PRT
 <213> Proteus vulgaris

5

<400> 6

Leu Pro Thr Leu Ser His Glu Ala Phe Gly Asp Ile Tyr Leu Phe Glu
 1 5 10 15
 Gly Glu Leu Pro Asn Ile Leu Thr Thr Ser Asn Asn Asn Gln Leu Ser
 20 25 30
 Leu Ser Lys Gln His Ala Lys Asp Gly Glu Gln Ser Leu Lys Trp Gln
 35 40 45
 Tyr Gln Pro Gln Ala Thr Leu Thr Leu Asn Asn Ile Val Asn Tyr Gln
 50 55 60
 Asp Asp Lys Asn Thr Ala Thr Pro Leu Thr Phe Met Met Trp Ile Tyr
 65 70 75 80
 Asn Glu Lys Pro Gln Ser Ser Pro Leu Thr Leu Ala Phe Lys Gln Asn
 85 90 95
 Asn Lys Ile Ala Leu Ser Phe Asn Ala Glu Leu Asn Phe Thr Gly Trp
 100 105 110
 Arg Gly Ile Ala Val Pro Phe Arg Asp Met Gln Gly Ser Ala Thr Gly
 115 120 125
 Gln Leu Asp Gln Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gln Ala Gly Thr Leu
 130 135 140
 Phe Phe Asp Gln Ile Ile Met Ser Val Pro Leu Asp Asn Arg Trp Ala
 145 150 155 160

Val Pro Asp Tyr Gln Thr Pro Tyr Val Asn Asn Ala Val Asn Thr Met
 165 170 175
 Val Ser Lys Asn Trp Ser Ala Leu Leu Met Tyr Asp Gln Met Phe Gln
 180 185 190
 Ala His Tyr Pro Thr Leu Asn Phe Asp Thr Glu Phe Arg Asp Asp Gln
 195 200 205
 Thr Glu Met Ala Ser Ile Tyr Gln Arg Phe Glu Tyr Tyr Gln Gly Ile
 210 215 220
 Arg Ser Asp Lys Lys Ile Thr Pro Asp Met Leu Asp Lys His Leu Ala
 225 230 235 240
 Leu Trp Glu Lys Leu Gly Leu Thr Gln His Ala Asp Gly Ser Ile Thr
 245 250 255
 Gly Lys Ala Leu Asp His Pro Asn Arg Gln His Phe Met Lys Val Glu
 260 265 270
 Gly Val Phe Ser Glu Gly Thr Gln Lys Ala Leu Leu Asp Ala Asn Met
 275 280 285
 Leu Arg Asp Val Gly Lys Thr Leu Leu Gln Thr Ala Ile Tyr Leu Arg
 290 295 300
 Ser Asp Ser Leu Ser Ala Thr Gly Arg Lys Lys Leu Glu Glu Arg Tyr
 305 310 315 320
 Leu Leu Gly Thr Arg Tyr Val Leu Glu Gln Gly Phe Thr Arg Gly Ser
 325 330 335
 Gly Tyr Gln Ile Ile Thr His Val Gly Tyr Gln Thr Arg Glu Leu Phe
 340 345 350
 Asp Ala Trp Phe Ile Gly Arg His Val Leu Ala Lys Asn Asn Leu Leu
 355 360 365
 Ala Pro Thr Gln Gln Ala Met Met Trp Tyr Asn Ala Thr Gly Arg Ile
 370 375 380
 Phe Glu Lys Asp Asn Glu Ile Val Asp Ala Asn Val Asp Ile Leu Asn
 385 390 395 400
 Thr Gln Leu Gln Trp Met Ile Lys Ser Leu Leu Met Leu Pro Asp Tyr
 405 410 415
 Gln Gln Arg Gln Gln Ala Leu Ala Gln Leu Gln Ser Trp Leu Asn Lys
 420 425 430

Thr Ile Leu Ser Ser Lys Gly Val Ala Gly Gly Phe Lys Ser Asp Gly
 435 440 445

Ser Ile Phe His His Ser Gln His Tyr Pro Ala Tyr Ala Lys Asp Ala
 450 455 460

Phe Gly Gly Leu Ala Pro Ser Val Tyr Ala Leu Ser Asp Ser Pro Phe
 465 470 475 480

Arg Leu Ser Thr Ser Ala His Glu His Leu Lys Asp Val Leu Leu Lys
 485 490 495

Met Arg Ile Tyr Thr Lys Glu Thr Gln Ile Pro Val Val Leu Ser Gly
 500 505 510

Arg His Pro Thr Gly Leu His Lys Ile Gly Ile Ala Pro Phe Lys Trp
 515 520 525

Met Ala Leu Ala Gly Thr Pro Asp Gly Lys Gln Lys Leu Asp Thr Thr
 530 535 540

Leu Ser Ala Ala Tyr Ala Asn Leu Asp Asn Lys Thr His Phe Glu Gly
 545 550 555 560

Ile Asn Ala Glu Ser Glu Pro Val Gly Ala Trp Ala Met Asn Tyr Ala
 565 570 575

Ser Met Ala Ile Gln Arg Arg Ala Ser Thr Gln Ser Pro Gln Gln Ser
 580 585 590

Trp Leu Ala Ile Ala Arg Gly Phe Ser Arg Tyr Leu Val Gly Asn Glu
 595 600 605

Ser Tyr Glu Asn Asn Asn Arg Tyr Gly Arg Tyr Leu Gln Tyr Gly Gln
 610 615 620

Leu Glu Ile Ile Pro Ala Asp Leu Thr Gln Ser Gly Phe Ser His Ala
 625 630 635 640

Gly Trp Asp Trp Asn Arg Tyr Pro Gly Thr Thr Thr Ile His Leu Pro
 645 650 655

Tyr Asn Glu Leu Glu Ala Lys Leu Asn Gln Leu Pro Ala Ala Gly Ile
 660 665 670

Glu Glu Met Leu Leu Ser Thr Glu Ser Tyr Ser Gly Ala Asn Thr Leu
 675 680 685

Asn Asn Asn Ser Met Phe Ala Met Lys Leu His Gly His Ser Lys Tyr
 690 695 700

Gln Gln Gln Ser Leu Arg Ala Asn Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Asp Asn
705 710 715 720

Arg Val Ile Ala Leu Gly Ser Gly Ile Glu Asn Asp Asp Lys Gln His
725 730 735

Thr Thr Glu Thr Thr Leu Phe Gln Phe Ala Val Pro Lys Leu Gln Ser
740 745 750

Val Ile Ile Asn Gly Lys Lys Val Asn Gln Leu Asp Thr Gln Leu Thr
755 760 765

Leu Asn Asn Ala Asp Thr Leu Ile Asp Pro Ala Gly Asn Leu Tyr Lys
770 775 780

Leu Thr Lys Gly Gln Thr Val Lys Phe Ser Tyr Gln Lys Gln His Ser
785 790 795 800

Leu Asp Asp Arg Asn Ser Lys Pro Thr Glu Gln Leu Phe Ala Thr Ala
805 810 815

Val Ile Ser His Gly Lys Ala Pro Ser Asn Glu Asn Tyr Glu Tyr Ala
820 825 830

Ile Ala Ile Glu Ala Gln Asn Asn Lys Ala Pro Lys Tyr Thr Val Leu
835 840 845

Gln His Asn Asp Gln Leu His Ala Val Lys Asp Lys Ile Thr Gln Glu
850 855 860

Glu Gly Tyr Gly Phe Phe Glu Ala Thr Lys Leu Lys Ser Ala Asp Ala
865 870 875 880

Thr Leu Leu Ser Ser Asp Ala Pro Val Met Val Met Ala Lys Ile Gln
885 890 895

Asn Gln Gln Leu Thr Leu Ser Ile Val Asn Pro Asp Leu Asn Leu Tyr
900 905 910

Gln Gly Arg Glu Lys Asp Gln Phe Asp Asp Lys Gly Asn Gln Ile Glu
915 920 925

Val Ser Val Tyr Ser Arg His Trp Leu Thr Ala Glu Ser Gln Ser Thr
930 935 940

Asn Ser Thr Ile Thr Val Lys Gly Ile Trp Lys Leu Thr Thr Pro Gln
945 950 955 960

Pro Gly Val Ile Ile Lys His His Asn Asn Asn Thr Leu Ile Thr Thr
965 970 975

Thr Thr Ile Gln Ala Thr Pro Thr Val Ile Asn Leu Val Lys
980 985 990

REIVINDICACIONES

1. Una enzima condroitinasa ABC para usar en mejorar la recuperación funcional tras una lesión por contusión del sistema nervioso central, enzima que se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva.
- 5 2. La enzima según la reivindicación 1, en la que la cantidad terapéuticamente efectiva de la enzima condroitinasa ABC comprende una cantidad suficiente para degradar condroitina sulfato proteoglicanos.
3. La enzima según la reivindicación 2, en la que la degradación de los condroitina sulfato proteoglicanos se produce en el sitio de la lesión por contusión.
- 10 4. La enzima según la reivindicación 2, en la que la degradación de los condroitina sulfato proteoglicanos se produce fuera del sitio de la lesión por contusión.
5. La enzima según la reivindicación 1, en la que la cantidad terapéuticamente efectiva de la enzima condroitinasa ABC comprende una cantidad suficiente para mejorar la función motora, la función sensorial, la función autonómica o una de sus combinaciones.
- 15 6. La enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la condroitinasa es condroitinasa ABC_{Tipol}.
7. La enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la condroitinasa es condroitinasa ABC_{Tipoll}.
8. La enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la lesión por contusión comprende una lesión traumática del cerebro.
- 20 9. La enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la lesión por contusión comprende una lesión de la médula espinal.
10. La enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la lesión por contusión comprende una lesión de la médula espinal mediante un objeto contundente.
- 25 11. La enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 9 y 7, en la que se mantiene la morfología gruesa de la médula espinal.
12. La enzima según la reivindicación 9, en la que la lesión de la médula espinal comprende una lesión que da lugar a una afección seleccionada del grupo que consiste de monoplejía, diplejía, paraplejía, hemiplejía y cuadriplejía.
- 30 13. La enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la lesión por contusión comprende neuronas rotas o parcialmente cortadas.
14. La enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la lesión por contusión comprende neuronas aplastadas.
15. La enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la lesión por contusión comprende la compresión del sistema nervioso central.
- 35 16. La enzima según la reivindicación 15, en la que la compresión es causada por una fuerza traumática en la médula espinal.
17. La enzima según la reivindicación 15, en la que la compresión es causada por un tumor, hemorragia, infarto, proceso infeccioso, estenosis o isquemia.

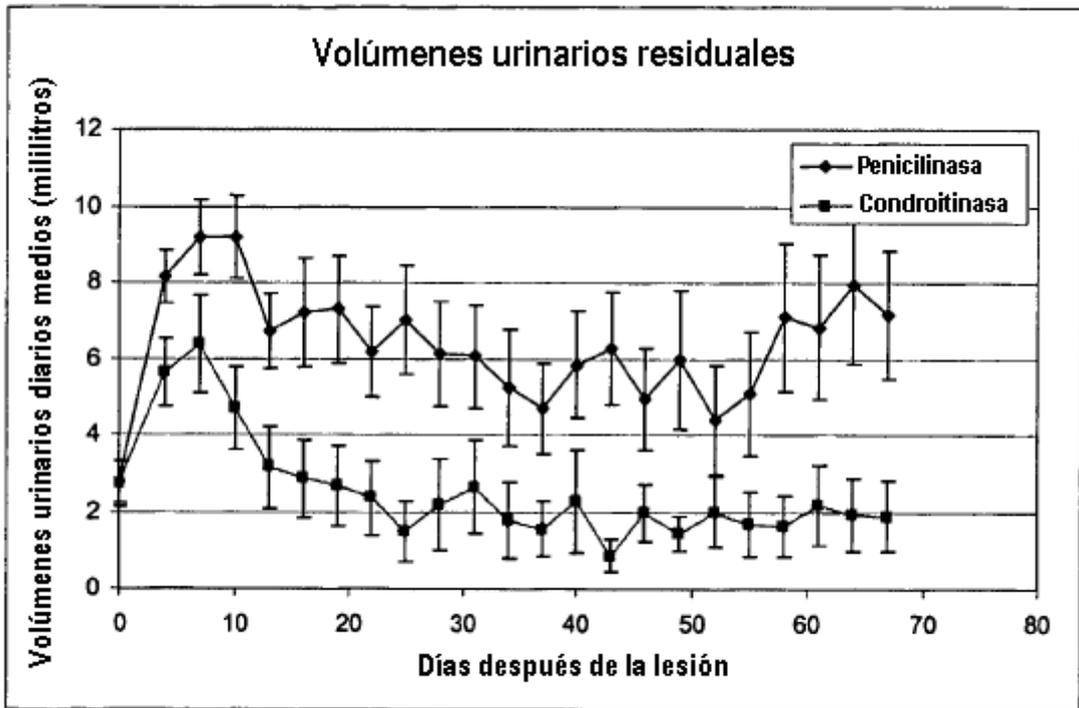


Figura 1

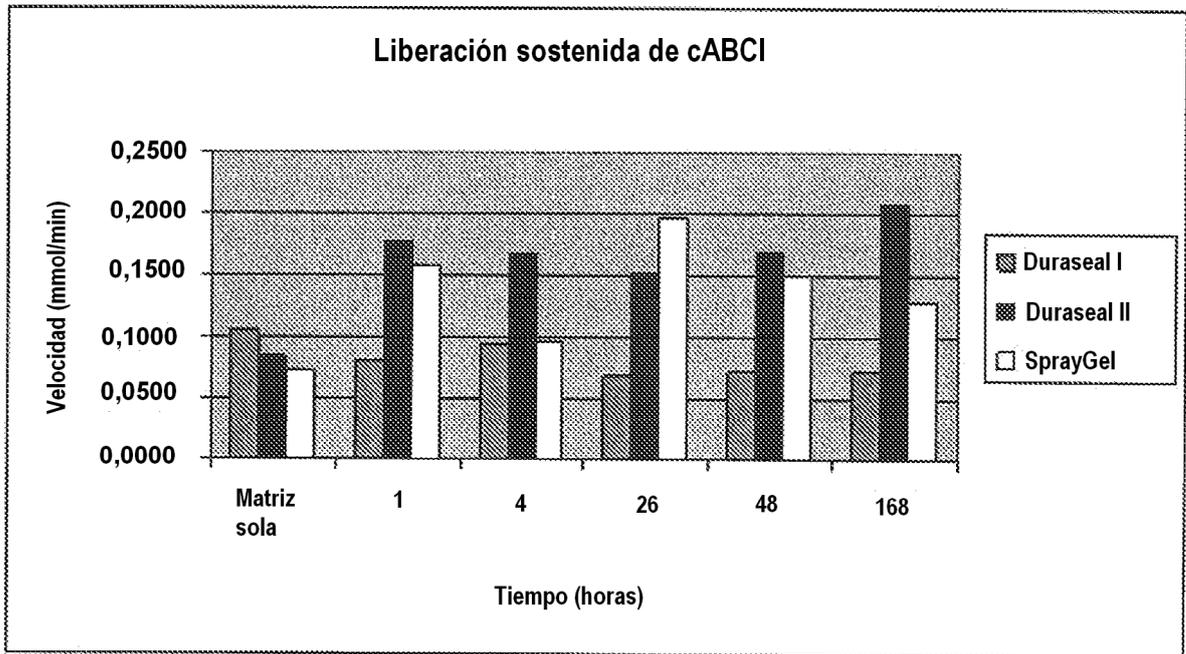


Figura 2

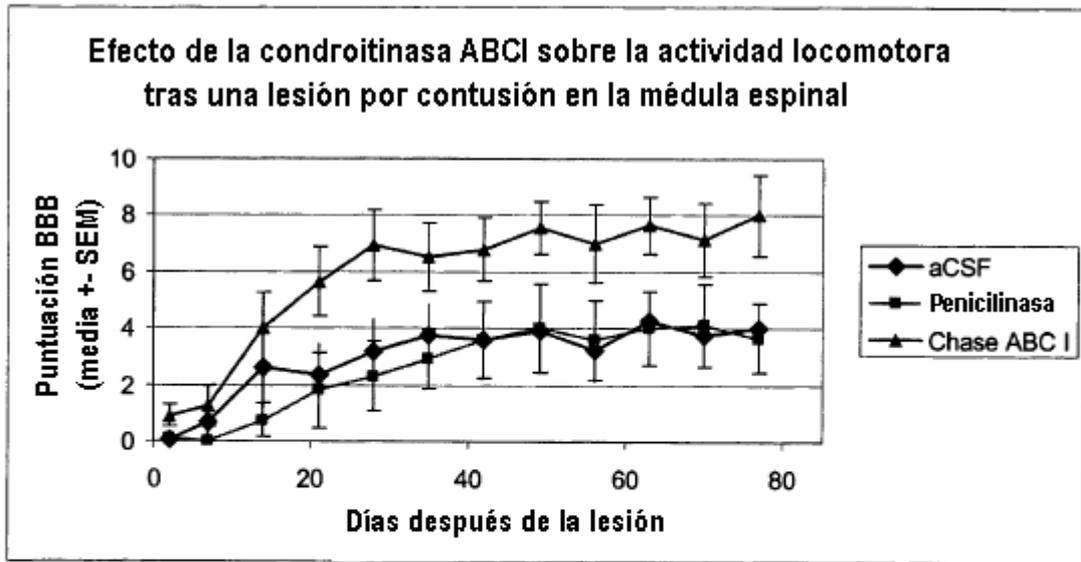


Figura 3

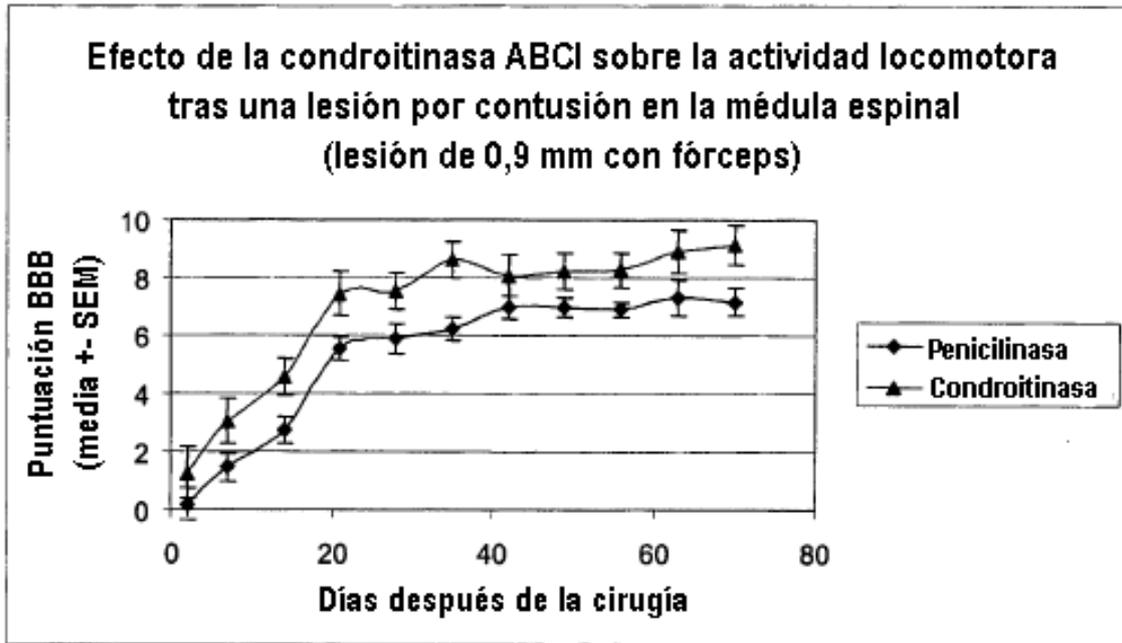


Figura 4

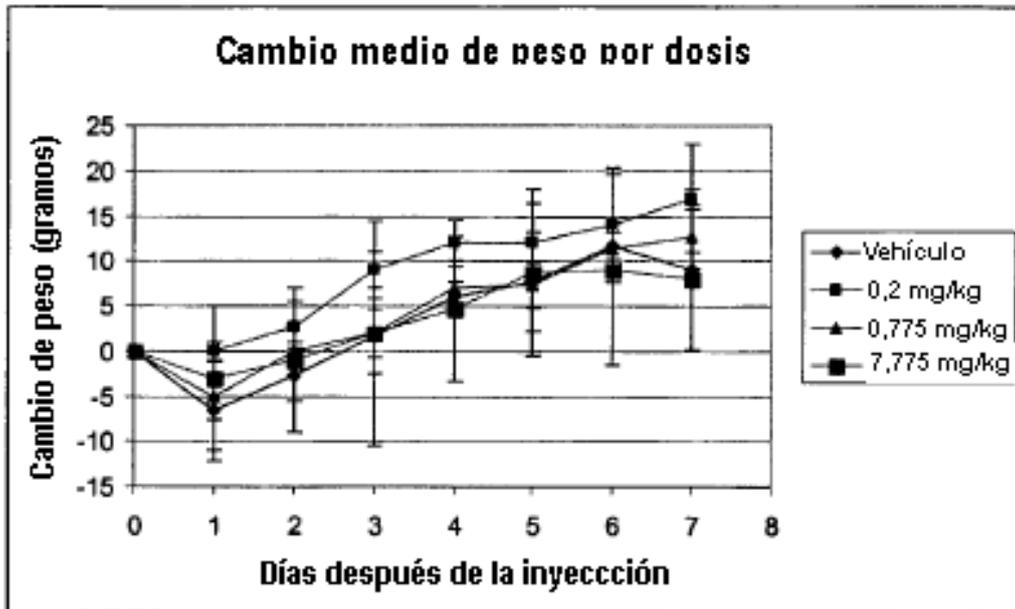


Figura 5

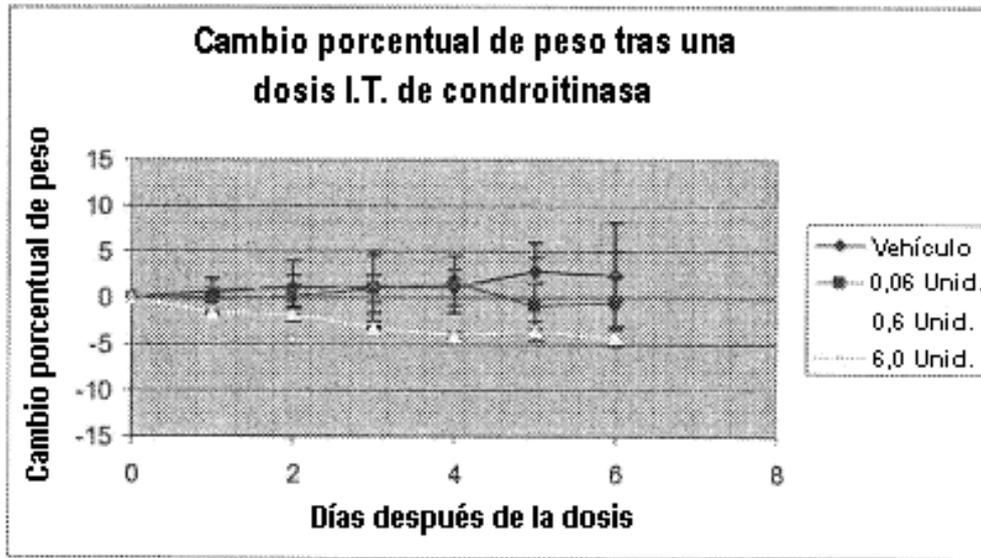


Figura 6

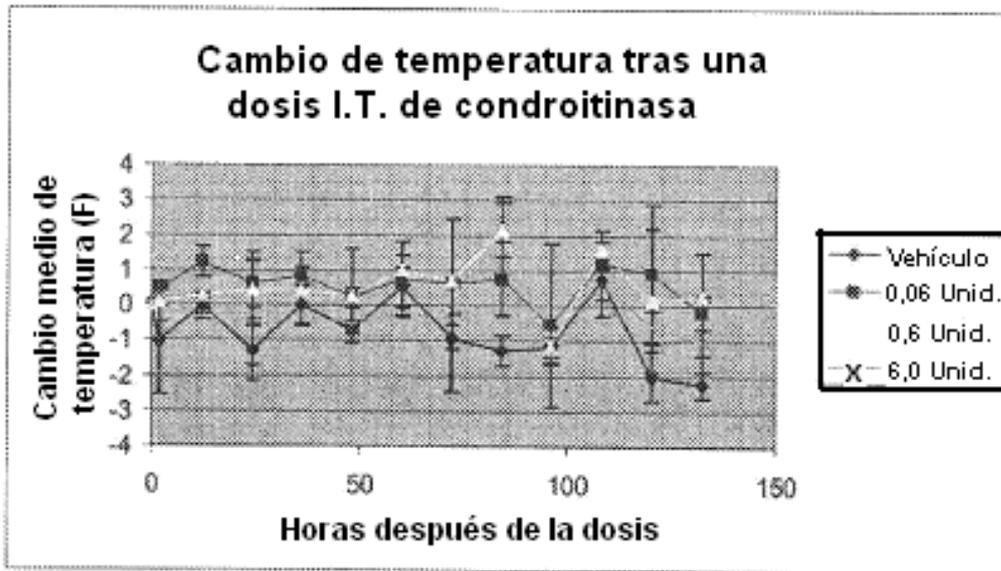


Figura 7

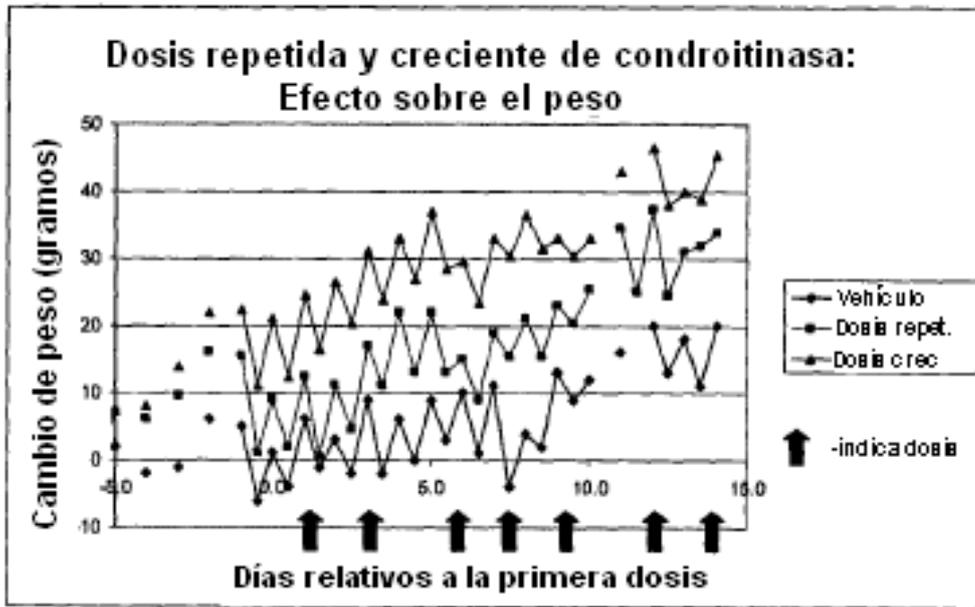


Figura 8

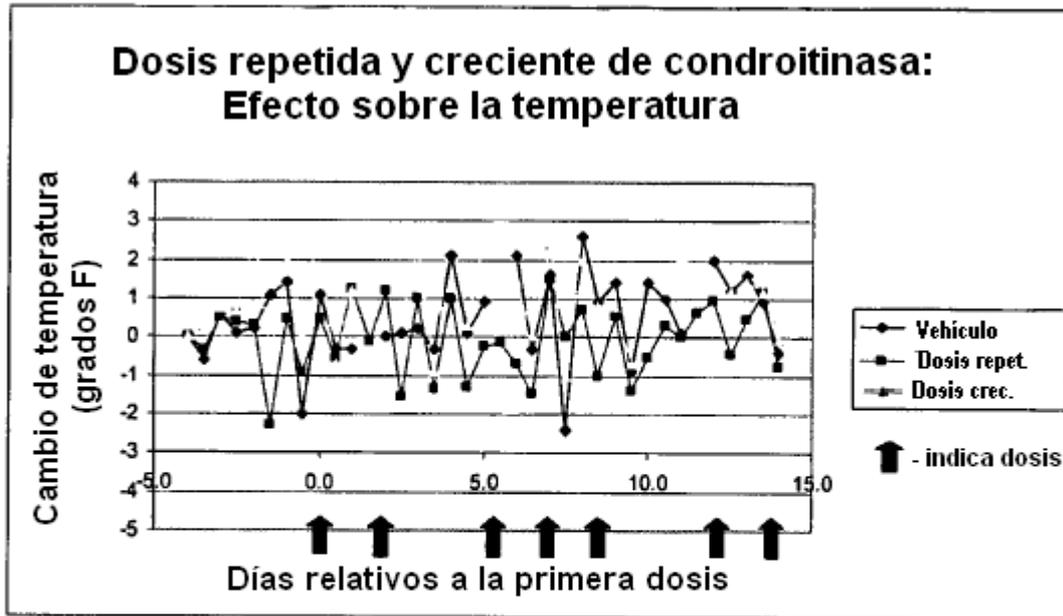


Figura 9