

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 227**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/51** (2006.01) **A61P 25/00** (2006.01)  
**A61L 27/36** (2006.01)  
**A61L 27/38** (2006.01)  
**A61K 38/30** (2006.01)  
**A61K 38/47** (2006.01)  
**A61K 38/48** (2006.01)  
**A61K 38/18** (2006.01)  
**A61K 38/19** (2006.01)  
**A61L 27/22** (2006.01)  
**A61L 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02763451 .8**  
96 Fecha de presentación: **13.08.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1425390**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.06.2004**

54 Título: **Materiales y métodos para favorecer la reparación del tejido nervioso**

30 Prioridad:  
**13.08.2001 US 311870 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.04.2012**

73 Titular/es:  
**UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH  
FOUNDATION, INC.  
223 GRINTER HALL  
GAINESVILLE, FL 32611, US**

72 Inventor/es:  
**MUIR, David, F.**

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

ES 2 378 227 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Materiales y métodos para favorecer la reparación del tejido nervioso

## Antecedentes de la invención

5 Las lesiones de los nervios periféricos son una fuente importante de incapacidad crónica. Un tratamiento deficiente de las lesiones de los nervios se asocia con la atrofia muscular y puede llevar a un neuroma doloroso cuando los axones cortados son incapaces de restablecer la continuidad con el nervio distal. Aunque los nervios tienen potencial para regenerarse después de una lesión, esta capacidad es estrictamente dependiente de la regeneración de las fibras nerviosas (y sus brotes axonales) que hacen un contacto apropiado con el segmento del nervio cortado (y las láminas basales de las células de Schwann en el mismo). Los axones regenerados que no atraviesen el hueco  
10 o sitio de la lesión y entren en la lámina basal del segmento del nervio distal cortado sufrirán un deterioro, dando lugar a la muerte neuronal, atrofia muscular y déficit funcional permanente (Fawcett J W *et al.* [1990] *Annu Rev Neurosci* 13: 43-60).

15 En resumen, un nervio soporta los procesos periféricos (o axones) de las neuronas. Los cuerpos neuronales residen en la médula espinal (neuronas motoras), en los ganglios situados a lo largo de la columna vertebral (ganglios raquídeos sensoriales) o en los ganglios que se encuentran en los órganos del cuerpo (ganglios autonómicos y entéricos). Un nervio consiste en axones, células de Schwann y vainas de tejido conjuntivo extensivo (Dagum AB [1998] *J Hand Ther* 11: 111-117). La cubierta exterior, el epineurio, está hecho de tejido conjuntivo de colágeno que protege a los fascículos de la presión externa y rodea el perineurio. El perineurio rodea los fascículos individuales y, junto con las células endoteliales en los microvasos endoneurales, funciona como la barrera sangre-nervio. El endoneurio está dentro del perineurio y consiste en tejido colagenoso que rodea las células de Schwann y los axones. Un grupo fascicular consiste en dos o más fascículos rodeados, respectivamente, por el perineurio y el epineurio. La topografía de los nervios es constante distalmente, con un grupo de fascículos que son o sensoriales o motores. La neurona consiste en un soma (cuerpo) y un axón, que puede tener varios pies de largo.

25 En las lesiones de los nervios en las que hay rotura axonal, pero la continuidad de la vaina endoneural permanece intacta (por ejemplo, lesión por aplastamiento), los axones se regeneran dentro de sus láminas basales originales y se puede esperar una recuperación completa. Por contraste, el rebrote axonal puede estar seriamente en peligro después del seccionamiento transversal del nervio y la reparación quirúrgica depende en gran medida del realineamiento de los elementos del nervio descritos antes (Dagum AB [1998] *J Hand Ther* 11: 111-117). La coaptación epineural (neurorrafia) es el método principal de tratar el seccionamiento transversal de un nervio. Sin embargo, la extensión de la regeneración es muy variable y como mucho, se puede esperar una recuperación parcial de la función (Terzis JK *et al.* [1990] *The Peripheral Nerve: Structure, function and reconstruction*, Hampton Press, Norfolk). La recuperación completa de la función después de la reparación del seccionamiento transversal del nervio sigue siendo un ideal inalcanzable debido a la fina microestructura de los nervios y a una incapacidad de alcanzar la coaptación precisa axón-a-axón, a pesar del estado actual de la técnica en las técnicas de microcirugía.

35 La implantación de injertos de nervios se asegura con la ablación del nervio pero presenta varios desafíos prácticos. A lo largo de los años, se han explorado diferentes alternativas al injerto de nervios. Actualmente se considera como una alternativa en desarrollo la aplicación de injertos de nervios alogénicos. Aunque la disponibilidad de injertos de donantes tiene las mismas dificultades que otras estrategias de sustitución de órganos, la importancia de elementos celulares viables en los injertos de nervios puede ser mucho menos importante. Aunque las células de Schwann contribuyen significativamente al proceso regenerativo, la estructura de la vaina del nervio contiene el soporte esencial y los estímulos adhesivos para promover la regeneración axonal y se ha alcanzado una regeneración significativa en los injertos de nervios acelulares (por ejemplo, desvitalizados por congelación) (Ide C *et al.* [1983] *Brain Res* 288: 61-75; Hall SM [1986] *Neuropathol Appl Neurobiol* 12: 401-414; Gulati AK [1988] *J Neurosurg* 68: 117-123; Nadim W *et al.* [1990] *Neuropathol Appl Neurobiol* 16: 411-421). La inactivación de las células residentes que presentan antígeno (por ejemplo, las células de Schwann, los fibroblastos, las células endoteliales, etc.) reduce en gran medida la inmunogenicidad del injerto. El uso de injertos de nervios acelulares reduce grandemente o elimina los problemas de inmunorrechazo huésped-injerto (Evans PJ *et al.* [1994] *Prog Neurobiol* 43: 187-233; Evans PJ *et al.* [1998] *Muscle Nerve* 21: 1507-1522). Estas características son muy prometedoras para el uso de injertos de nervios alogénicos o xenogénicos desvitalizados por congelación (acelulares). Por otro lado, la ausencia de células viables descarta la degeneración del nervio y el subsiguiente remodelado que parece promover el proceso regenerativo (Bedi KS *et al.* [1992] *Eur J Neurosci* 4: 193-200; Danielsen N *et al.* [1994] *Brain Res* 666: 250-254).

45 La laminina es un componente principal de la lámina basal, promotor del crecimiento, que representa el estímulo adhesivo para la regeneración axonal satisfactoria (Wang, GY *et al.* [1992] *Brain Res* 570: 116-125). Sin embargo, aunque el nervio normal (no lesionado) es rico en laminina, el nervio normal permanece inhibitorio o refractario para el crecimiento axonal. (Langley JN [1904] *J Physiol* 31: 365-391; Brown MC *et al.* [1994] *Eur J Neurosci* 6: 420-428). Esto da a entender que la actividad promotora del crecimiento de la laminina se suprime en el entorno de un nervio normal y que la actividad de la laminina se debe restablecer de algún modo en la degeneración del nervio y en la regeneración subsiguiente.

Los nervios periféricos normales son un pobre sustrato para el crecimiento axonal (Zuo J. *et al.* [1998] *J Neurobiol* 34: 41-54; Bedi KS *et al.* [1992] *Eur J Neurosci* 4: 193-200). Los resultados experimentales indican que la laminina dentro de las láminas basales del nervio normal no es accesible para los brotes regenerativos de los axones (Zuo J. *et al.* [1998] *J Neurosci* 18: 5203-5211; Ferguson TA, and D. Muir [2000] *Mol Cell Neurosci* 16: 157-167; Agius E. *et al.* [1998] *J Neurosci* 18: 328-338). Después de la lesión del nervio, el segmento cortado (distal a la lesión) sufre un extenso proceso degenerativo que inicia un extenso remodelado. En la degeneración del nervio inducida por la lesión, los axones cortados mueren, sus fragmentos de la vaina de mielina y los residuos resultantes se separan por fagocitosis. A pesar de esta degeneración, se conservan las estructuras de la vaina y de la lámina basal. Las células de Schwann proliferan y preparan el nervio para el nuevo crecimiento de los axones. Este proceso entero, incluyendo el aspecto del remodelado, generalmente se denomina degeneración del nervio. Queda claro ahora que la lesión del nervio produce modificaciones positivas para el segmento distal del nervio y los experimentos demuestran que el nervio degenerado tiene mayor potencial promotor del crecimiento de los axones que el nervio normal (Bedi KS *et al.* [1992] *Eur J Neurosci* 4: 193-200; Danielsen NJ *et al.* [1994] *Brain Res* 666: 250-254; Agius E *et al.* [1998] *J Neurosci* 18: 328-338). Por lo tanto, el proceso degenerativo parece que implica mecanismos que convierten el nervio normal de un estado deprimido a un estado que promueve el crecimiento axonal (Salonen VJ *et al.* [1987] *J Neurocytol* 16: 713-720; Danielsen N *et al.* [1995] *Brain Res* 681: 105-108).

La pérdida de la función asociada con la lesión del nervio resulta de la ruptura de los axones. Los axones son muy delgados y frágiles y la lesión más ligera (incluyendo la compresión) puede causar una respuesta grave (axotomía). En la axotomía el axón distal a la lesión se muere y degenera. La lesión menos problemática para un nervio es una lesión por aplastamiento (axonotmesis), en la que hay axotomía pero la continuidad de las vainas del nervio permanece intacta. En el caso de axonotmesis, los axones se regeneran típicamente sin intervención quirúrgica porque las láminas basales permanecen continuas. Para que los nervios periféricos cortados se regeneren satisfactoriamente, se deben localizar en primer lugar los brotes axonales que emanan del tronco proximal del nervio y acceder después a las láminas basales de las células de Schwann en el segmento distal del nervio. Se cree que este requisito decisivo contribuye a la regeneración relativamente pobre alcanzada después del seccionamiento transversal del nervio en comparación con la lesión por aplastamiento. En el seccionamiento transversal del nervio (neurotmesis) se corta el nervio parcial o completamente. Las lesiones por seccionamiento transversal son aquellas en que tanto los axones como las vainas del nervio se cortan, rompiendo la continuidad del nervio y los mecanismos guía requeridos para la regeneración de los axones. La coaptación quirúrgica (neurorrafia) para re-establecer la continuidad de los elementos nerviosos del nervio es esencial para el nuevo crecimiento de los axones. En adición, el recrecimiento axonal y la reparación después del seccionamiento transversal del nervio se complican además por el desalineamiento de los elementos proximales y distales. Incluso en los casos de seccionamiento transversal limpio mediante un instrumento afilado, la estructura del nervio entero se deteriora. La hinchazón y el flujo axoplásmico desde los extremos cortados causan un efecto de multiplicación que interfiere con la coaptación y realineamiento seguros del soporte de la lámina basal. A pesar de las mejoras en el alineamiento fascicular conseguidas por la técnica microquirúrgica, la coaptación axón-a-axón sigue siendo una meta idealista. Debido al pequeño tamaño de los axones y a la preponderancia relativa de los tejidos conjuntivos, la mayoría de los brotes axonales que emergen del tronco proximal después de la coaptación quirúrgica son los que más probablemente encontrarán primero un sustrato no permisivo rico en el proteoglicano sulfato de condroitina (CSPG) inhibitorio. Esto puede explicar la latencia significativa y la regeneración errática asociadas con la reparación del seccionamiento transversal de los nervios periféricos. Hay signos que indican que los CSPG se unen a la laminina e inhiben la actividad promotora del crecimiento de la misma y que el CSPG se degrada durante el proceso degenerativo después de la lesión. Por consiguiente, el proceso por el cual se inactivan los CSPG puede explicar por qué es esencial la regeneración para la regeneración del nervio. Se ha encontrado recientemente que el nervio periférico contiene abundante CSPG, que inhibe la actividad promotora del crecimiento de la laminina endoneural (Zuo J *et al.* [1998a] *J Neurobiol* 34: 41-54). Los CSPG que inhiben las neuritas son abundantes en los tejidos endoneurales que rodean las láminas basales de las células de Schwann y aumentan rápidamente después de la lesión del nervio (Braunewell KH *et al.* [1995a] *Eur Neurosci* 7: 805-814; Braunewell KH *et al.* [1995b] *Eur J Neurosci* 7: 792-804). En consecuencia, cualquier desalineamiento de la microestructura del nervio (después de lesión y reparación) obliga a los brotes axonales regenerativos a superar los tejidos no permisivos que pueden limitar severamente su acceso a las láminas basales en el nervio distal. Una investigación reciente apoya la conclusión de que ciertas enzimas de degradación de CSPG representan un mecanismo por el cual las propiedades promotoras del crecimiento de la laminina se pueden restablecer dentro del nervio degenerado (Zuo J *et al.* [1998b] *J Neurosci* 18: 5203-5211; Ferguson TA *et al.* [2000] *Mol Cell Neurosci* 16: 157-167). En adición, este proceso se puede llevar a cabo por la aplicación de enzimas que degradan el CSPG en el sitio de la lesión del nervio y en los injertos de nervio para mejorar la regeneración (Zuo J *et al.* [2002] *Exp Neurol* 176: 221-228; Krekoski CA *et al.* [2001] *J Neurosci* 21: 6206-6213). Una enzima de este tipo que degrada el CSPG que es particularmente eficaz es la condroitinasa ABC, una enzima bacteriana que degrada las cadenas laterales de disacárido de CSPG (Zuo J *et al.* [1998a] *J Neurobiol* 34: 41-54). Otras enzimas incluyen miembros específicos de la familia de las metaloproteinasas de la matriz, MMP-2 y MMP-9, que degradan la proteína núcleo del CSPG (Ferguson TA *et al.* [2000] *Mol Cell Neurosci* 16: 157-167).

Aunque la condroitinasa ABC (una glicosaminoglicano-liasa) degrada el sulfato de condroitina, el sulfato de dermatán y el hialuronano, su capacidad para aumentar la propiedad promotora de crecimiento del tejido nervioso ha sido atribuida a la degradación del CSPG (Zuo J *et al.* [1998] *Exp Neurol* 154: 654-662; Ferguson TA *et al.* [2000] *Mol Cell Neurosci* 16: 157-167). En adición, se ha demostrado que el tratamiento con la condroitinasa ABC no rompe

la organización de la vaina del nervio ni desplaza la laminina de la lámina basal de las células de Schwann (Krekoski CA *et al.* [2001] *J Neurosci* 21: 6206-6213).

5 En los modelos de reparación del seccionamiento transversal de un nervio, la degradación del CSPG inhibitorio eliminó un obstáculo importante para regenerar los brotes axonales y produjo un crecimiento más robusto y uniforme en el nervio distal (Krekoski CA *et al.* [2001] *J Neurosci* 21: 6206-6213).

10 Se ha demostrado que el nervio degenerado tiene una mayor capacidad de sostener el crecimiento axonal (Giannini C *et al.* [1990] *J Neuropathol Exp Neurol* 49: 550-563; Hasan N *et al.* [1996] *J Anat* 189: 293-302). Los efectos de la degeneración son debidos probablemente a modificaciones de la lámina basal del nervio ya que la regeneración axonal se mejora también en los injertos acelulares preparados a partir de un nervio predegenerado (Danielsen N *et al.* [1995] *Brain Res* 681: 105-108). A lo largo del proceso degenerativo, la lámina basal de las células de Schwann permanece estructuralmente intacta.

15 Los modelos animales han demostrado que los injertos hechos de nervios que están predegenerados *in vivo* son mucho mejores para apoyar la regeneración del nervio que los injertos recientemente cortados (Danielsen N *et al.* [1995] *Brain Res* 681: 105-108). Sin embargo, el procedimiento para crear nervios pre-degenerados en los seres humanos es impracticable (esto es, lesión del nervio seguida por un período de supervivencia *in vivo* para permitir la degeneración del tejido).

20 La degeneración de los nervios periféricos *in vivo* da como resultado un aumento del recambio de varias moléculas de la matriz extracelular que depende de la liberación y activación de las enzimas proteolíticas por las neuronas, las células de Schwann y los macrófagos invasores. La modulación de las actividades de la metaloproteinasa de la matriz (MMP) después de la lesión implica a la MMP-2 y la MMP-9 en el remodelado de la matriz extracelular durante la degeneración y regeneración del nervio (La Fleur *et al.* [1996] *J Exp Med* 184: 2311-2326; Kherif *et al.* [1998] *Neuropathol Appl Neurobiol* 24: 309-319; Ferguson *et al.* [2000] *Mol Cell Neurosci* 16: 157-167). La MMP-9 se expresa en los nervios periféricos inmediatamente después de la lesión y principalmente en el sitio de la lesión. La expresión de la MMP-9 se correlaciona con la rotura de la barrera sangre-nervio, la acumulación de granulocitos y la invasión de macrófagos (Shubayev *et al.* [2000] *Brain Res* 855: 83-89; Siebert *et al.* [2001] *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 85-93). Muchos indicios dan a entender que las células hematogénicas contribuyen significativamente a la elevación de la actividad de MMP-9 (Taskinen *et al.* [1997] *Acta Neuropathol (Berl)* 93: 252-259). Por otro lado, la MMP-2 se expresa constitutivamente por las células de Schwann en los nervios periféricos normales (Yamada *et al.* [1995] *Acta Neuropathol (Berl)* 89: 199-203). Varios días después de la lesión, la expresión de la MMP-2 aumenta y la enzima latente se convierte sustancialmente en su forma activa (Ferguson *et al.* [2000] *Mol Cell Neurosci* 16: 157-167).

35 La degeneración *in vitro* produce un aumento sustancial en la actividad promotora de neuritas de los explantes de nervios. Este aumento se bloquea por la adición de un inhibidor de la MMP, ya que es el aumento casual de la actividad gelatinolítica neta (demostrada por la zimografía *in situ*). El aumento de la actividad promotora de neuritas tiene lugar rápidamente en los explantes de nervios cultivados y en paralelo con la regulación por incremento y la activación de MMP-2. Por contraste, el efecto inicial de la degeneración *in vivo* solamente deprime la actividad promotora de neuritas del nervio normal que ya era baja, durante cuyo tiempo no hay ningún cambio en la expresión ni en la activación de la MMP-2 *in vivo*. Sin embargo, la actividad promotora de neuritas de los nervios seccionados transversalmente, aumenta con el tiempo *in vivo* y esto coincide con un estallido de la expresión y activación de la MMP-2 (Ferguson and Muir, 2000, *Mol Cell Neurosci* 16: 157-167; Shubayev and Myers, 2000, *Brain Res* 855: 83-89).

45 Los ensayos *in vitro* indican que los segmentos de nervios predegenerados *in vivo* tienen mayor actividad promotora de neuritas que los segmentos normales de nervios (Bedi *et al.* [1992] *Eur J Neurosci* 4: 193-200; Agius *et al.* [1998] *J Neurosci* 18: 3283-3288; Ferguson *et al.* [2000] *Mol Cell Neurosci* 16: 157-167). Sin embargo, los estudios *in vivo* que analizan los injertos de nervios predegenerados han producido resultados conflictivos, especialmente cuando se usan injertos de nervios celulares (vivos) (Gordon *et al.* [1979] *J Hand Surg [Am]* 4: 42-47; Danielsen *et al.* [1994] *Brain Res* 666: 250-254; Hasan *et al.* [1996] *J Anat* 189(Pt 2): 293-302). Sin embargo, parece que la predegeneración es particularmente ventajosa para el aumento de regeneración en los injertos acelulares (Ochi *et al.* [1994] *Exp Neurol* 128: 216-225; Danielsen *et al.* [1995] *Brain Res* 681: 105-108). Esto indica que, en la degeneración, actúan mecanismos celulares y moleculares para aumentar las propiedades de promoción del crecimiento de la lámina basal que mantiene entonces la capacidad de estimular la regeneración del nervio una vez que los elementos celulares han sido destruidos. La predegeneración *in vitro* produce un aumento sustancial de la capacidad de promoción del crecimiento de los injertos de nervios acelulares, lo que se ha demostrado fácilmente en los modelos de criocultivo y de implantación de injertos de la presente invención. La implantación de injertos de nervios acelulares se asocia con una latencia sustancial en el inicio de la regeneración axonal (Danielsen *et al.* [1995] *Brain Res* 681: 105-108).

60 Muchas de las investigaciones sobre la conservación de cultivos de explantes de nervios y de injertos de nervios se han enfocado sobre la conservación en frío de segmentos de nervios. A diferencia de los esfuerzos para promover la degeneración finita de los injertos de nervios en cultivo, los métodos de conservación en frío quieren mantener el nervio en condiciones mínimas e isquémicas que reducen las actividades celulares y proteolíticas. Levi *et al.* (Levi A

5 *et al.* [1994] *Glia* 10: 121-131) encontró que la viabilidad de la célula decrece significativamente después de 1 semana y solamente algunas células de Schwann viables permanecieron en los explantes de nervio después de 3 semanas de conservación en frío. Posteriormente, Lassner *et al.* (Lassner *et al.* [1995] *J Reconstr Microsurg* 11: 447-453) publicaron que el medio de cultivo (DMEM, en lugar de la Solución de almacenaje en frío) tiene un efecto positivo sobre el mantenimiento de la viabilidad de las células de Schwann y sobre el potencial regenerativo de los injertos de nervios conservados en condiciones isquémicas frías. Aunque no es beneficioso para optimizar el potencial de promoción del crecimiento de los injertos de nervios, la conservación continuada en frío no reduce adicionalmente la viabilidad de las células, la inmunogenicidad, ni los problemas de inmunorrechazo de los injertos alogénicos de nervios (Evans *et al.* [1998] *Muscle Nerve* 21: 1507-1522). Por esta razón, la conservación prolongada en frío y los aloinjertos de nervios desvitalizados por congelación producen una regeneración mejor que los aloinjertos frescos (Evans *et al.* [1999] *Microsurgery* 19: 115-127).

10 Por consiguiente, sigue existiendo en la técnica la necesidad de una terapia complementaria de bajo riesgo para mejorar el resultado de la reparación convencional de nervios.

### Breve resumen de la invención

15 La presente invención se refiere a composiciones y métodos para promover la reparación de tejido nervioso.

La presente invención se refiere a métodos de preparación de injertos de nervios por tratamiento con enzimas que degradan el CSPG. Preferiblemente, el injerto de nervio (ya sea alogénico o xenogénico) es fresco y no degenerado y se trata con las enzimas que degradan el CSPG antes o después de congelar el injerto de nervio. Si se trata mientras las células del injerto están vivas, el injerto se puede desvitalizar por congelación para hacer que sea acelular. El tejido nervioso se vuelve acelular después del tratamiento. En una realización preferida, el tejido nervioso se vuelve acelular por desvitalización por congelación.

20 La presente invención se refiere también a métodos de cultivo de tejido nervioso fresco (o conservado durante poco tiempo para transporte) para posterior implantación como un injerto de nervio en un ser humano o animal. Preferiblemente, el tejido nervioso se recoge fresco de un donante humano o animal y se cultiva en condiciones fisiológicas que permiten que el tejido degenera y se remodela *ex vivo*, promoviendo la proliferación de las células de Schwann dentro del tejido y la activación de la lámina basal por procesos endógenos. El tejido/injerto nervioso se vuelve acelular después del cultivo. En una realización preferida, el tejido/injerto nervioso se vuelve acelular mediante desvitalización por congelación.

25 La presente invención hace referencia además a métodos para proporcionar injertos de nervios para implantación en seres humanos o animales. Preferiblemente, las características del corte transversal del injerto del donante son similares a las características del corte transversal del tejido nervioso en el sitio de implantación.

### Breve descripción de los dibujos

30 Las figuras 1A-1D presentan la inmunofluorescencia del neopéptido de CSPG de injertos de nervios acelulares tratados con condroitinasa. Los segmentos acelulares (desvitalizados por congelación) del nervio ciático de rata se trataron en bloque con condroitinasa ABC durante 16 h *in vitro*. La Figura 1A muestra el marcado del neopéptido (condroitinasa-dependiente) con Ab1918, que demuestra que el tratamiento en bloque con condroitinasa impregnó efectivamente todos los compartimentos del nervio y degradó las cadenas laterales de CSPG. En la Figura 1B, la intensidad del inmunomarcado con Ab1918 no aumentó por el tratamiento adicional de las secciones del nervio que se muestran en la Figura 1A con condroitinasa, lo que indica que el tratamiento inicial en bloque había sido riguroso. En la Figura 1C, la integridad estructural de las láminas basales de las células de Schwann en segmentos acelulares de nervios tratados con condroitinasa se demostró por la inmunofluorescencia de la laminina. La Figura 1D presenta el inmunomarcado con Ab1918 del injerto de nervio interposicional acelular tratado con condroitinasa después de 8 días *in vivo*.

35 La Figura 2 muestra la inactivación del CSPG inhibitorio mediante bioensayos de criocultivo de segmentos acelulares de nervios tratados con condroitinasa. Los segmentos acelulares de nervios se trataron en bloque con condroitinasa ("Ch'ase") o con vehículo solo. Se seccionaron los nervios y después se trataron adicionalmente, se post-trataron con condroitinasa o con vehículo solo. Se dejaron crecer neuronas DRG (neuronas del ganglio de la raíz dorsal) embrionarias de pollito disociadas sobre las secciones nerviosas durante 24 h y se puntuaron las longitudes de las neuritas como se describe en Materiales y Métodos. Se hicieron las determinaciones puntuando al menos 250 neuronas en cada condición. Los resultados se expresan como las medias (-SEM) y se determinó la significancia estadística comparando las condiciones del vehículo y la condroitinasa en bloque utilizando la prueba t de Student. \*P < 0,001.

40 La Figura 3 muestra una evaluación de la continuidad y la inmunotinción de GAP-43 (proteína 43 asociada al crecimiento) de los injertos de nervios acelulares interposicionales. La continuidad de cada injerto de nervio se confirmó examinando las coaptaciones proximal y distal del injerto de nervio en sección longitudinal. En la coaptación proximal, el marcado de GAP-43 reveló numerosos axones de regeneración que entran en la vista proximal del injerto. La GAP-43 no marcó ninguno de los elementos restantes dentro del injerto acelular.

La Figura 4 muestra la regeneración axonal en los injertos de nervios acelulares interposicionales después de 8 días. Series representativas de las secciones de dos animales, que reciben cada uno injertos tratados con vehículo e injertos tratados con condroitinasa. Las secciones en serie tomadas del injerto proximal (1,2 mm, parte superior) y los siguientes intervalos de 0,56 mm se inmunomarcaron con GAP-43. En cada animal que recibe los injertos bilaterales (n=9), el crecimiento de los axones fue mayor en el injerto acelular tratado con condroitinasa que en el control tratado con el vehículo. Las imágenes se tomaron en el epineurio para aproximar los campos puntuados por análisis de imagen digital en la Figura 5.

La Figura 5 muestra un mayor acceso de los axones de regeneración en los injertos de nervios acelulares tratados con condroitinasa. Las secciones en serie de injertos de nervios interposicionales de 8 días (como se muestra en la Figura 4) se puntuaron para los perfiles axonales marcados para GAP-43 mediante análisis de imagen digital. Los datos representan las medias (-SEM) de 9 injertos tratados con vehículo y 9 injertos tratados con condroitinasa evaluados a las distancias especificadas en el injerto (proximal a distal).

La Figura 6 muestra la regeneración axonal en el segmento inicial de los injertos de nervios acelulares interposicionales después de 4 días. Se examinaron la interfase nervio-injerto y la región inmediatamente proximal de injertos acelulares de 4 días. Los perfiles de los axones marcados para GAP-43 se compararon cada 0,3 mm dentro de los injertos. Los datos representan las medias (-SEM) de 3 injertos tratados con vehículo y 3 injertos tratados con condroitinasa.

La Figura 7 muestra la asociación de la regeneración de los axones y la migración de las células de Schwann dentro de los injertos. Las secciones en serie de injertos de 8 días se inmunomarcaron para GAP-43 (axones) y S-100 (células de Schwann). En las regiones proximales de los injertos tratados con condroitinasa, se encontraron muy a menudo las células de Schwann en estrecha asociación con los axones de regeneración. Se observaron racimos ocasionales de axones sin células de Schwann co-migrantes (flecha). En puntos más distales de los injertos, se encontraron a menudo axones sin ir acompañados de células de Schwann. Algunas células de Schwann aisladas se inmunomarcaron intensamente con S-100 en las regiones más distales de los injertos, que contenían en su mayor parte una tinción apenas perceptible de S-100 asociada con las células de Schwann inactivadas por congelación remanentes.

Las figuras 8A y 8B muestran el crecimiento de los axones y las células de Schwann en la coaptación del injerto distal. Las secciones longitudinales en serie de injertos tratados con condroitinasa de 8 días y troncos del nervio distal se inmunomarcaron para GAP-43 (axones), como se muestra en la Figura 8A, y para S-100 (células de Schwann), como se muestra en la Figura 8B. En la Figura 8A, los axones (flechas pequeñas) se acercan, atraviesan la coaptación distal, y crecen de forma difusa dentro del tronco distal del hospedante. En la Figura 8B, las células de Schwann marcadas con S-100 son abundantes en los troncos distales del hospedante, aunque pocas, si alguna, invaden la vista distal de los injertos (que contienen una débil inmunotinción de S-100 asociada con las células de Schwann inactivadas por congelación remanentes).

Las figuras 9A y 9B muestran nervios humanos teñidos para el neopéptido de CSPG y laminina, respectivamente. Estos resultados demuestran que, aunque la estructura macroscópica del nervio humano es más compleja que la del nervio de rata, la lámina basal que soporta la regeneración de los axones es principalmente similar y los componentes moleculares que regulan el crecimiento (CSPG y laminina) son abundantes. La Figura 9A demuestra también que, en virtud del marcado del neopéptido, las cadenas laterales del CSPG se degradaron de modo efectivo en los segmentos del nervio humano tratados con condroitinasa.

La Figura 10 muestra la inactivación del CSPG inhibitorio por ensayos de criocultivo utilizando segmentos de nervio humano. Se trataron los nervios humanos con condroitinasa y después se ensayaron en cuanto a la actividad promotora de neuritas. Las neuronas DRG de pollito disociadas se cultivaron sobre las secciones durante 24 h y se puntuaron las longitudes de las neuritas. Los resultados se expresan como las medias (-SEM). Se encontró la significancia estadística (P <0,001) comparando las condiciones tratadas con vehículo y las condiciones tratadas con condroitinasa utilizando la prueba t de Student.

La Figura 11 muestra el mayor crecimiento de los axones en los injertos de nervios acelulares tratados con condroitinasa en un modelo de xenoinjerto humano-a-rata. Los fascículos de nervios humanos (de diámetro similar al nervio ciático de rata) se injertaron en un hueso hecho en el nervio ciático de rata. Las secciones en serie de los xenoinjertos de nervios interposicionales de 8 días se puntuaron para los perfiles axonales marcados para GAP-43 por análisis de imagen digital. Los datos representan las medias (-SEM) de 2 injertos tratados con vehículo y 2 injertos tratados con condroitinasa evaluados en las distancias especificadas dentro del injerto (proximal a distal).

Las figuras 12A-12D muestran la degradación de CSPG en el nervio ciático lesionado por una única inyección de condroitinasa ABC. Se examinaron dos modelos de lesión, seccionamiento transversal bilateral del nervio y reparación (figuras 12A, 12B, y 12D) y aplastamiento bilateral del nervio (Figura 12C). En el momento de la lesión se inyectó el nervio ciático derecho con condroitinasa ABC (1 unidad en 2 µl) en un sitio a 2 mm distal del sitio de lesión del nervio. Cuatro días después del seccionamiento transversal del nervio y de la reparación, la inmunotinción del neopéptido de CSPG fue intensa por todo el endoneurio y las vainas del nervio en el sitio de coaptación (Figura 12A) (obsérvese suturas en el epineurio) y por toda el área de sección transversal del nervio en varios mm tanto distales

(Figura 12B) como proximales (no se muestra) a la coaptación. Como se muestra en la Figura 12C, se obtuvieron resultados similares en los nervios lesionados por aplastamiento que se examinaron 2 días después de la inyección de condroitinasa. Se examinó la extensión de la degradación de CSPG por la inyección *in vivo* de condroitinasa mediante inmunomarcado del neoepítipo de CSPG de los nervios tratados una segunda vez con condroitinasa después de que el tejido fuera seccionado, como se muestra en la Figura 12D. La intensidad de la tinción observada en las secciones en serie no fue especialmente diferente después de la segunda aplicación (compárense la Figura 12B y la Figura 12D), indicando que la única inyección *in vivo* de condroitinasa degradó efectivamente el CSPG en la matriz extracelular de alrededor.

Las figuras 13A y 13B muestran el tratamiento con condroitinasa ABC que no alteró la regeneración axonal después de la lesión del nervio por aplastamiento. Las ratas adultas recibieron el aplastamiento bilateral del nervio ciático y un nervio fue inyectado con condroitinasa ABC y el nervio contralateral recibió el vehículo solo. Se separaron los nervios dos días después de la lesión y los axones que se regeneran se marcaron por inmunocitoquímica de GAP-43. Los perfiles de axones regenerados inmediatamente distales al nervio aplastado en dos animales representativos (que reciben cada uno inyecciones de vehículo y de condroitinasa) se muestran en la Figura 13A. Como se muestran en la Figura 13B, los axones inmunomarcados para GAP-43 se puntuaron en secciones en serie de los nervios distales. No hubo diferencia significativa en la regeneración de axones en los nervios tratados con condroitinasa (Ch'asa) comparados con los nervios control tratados con vehículo. Los datos representan las medias ( $\pm$ SEM) de 6 nervios tratados con condroitinasa y 6 nervios tratados con vehículo evaluados a intervalos de 0,56 mm dentro de los nervios distales.

Las figuras 14A y 14B muestran el tratamiento con condroitinasa ABC que mejoró marcadamente la regeneración de los axones después del seccionamiento transversal del nervio y la reparación neurorráfica. Las ratas adultas sufrieron el seccionamiento transversal bilateral del nervio y la reparación extremo-a-extremo. Se inyectó un nervio con condroitinasa ABC y el nervio contralateral recibió el vehículo solo. Se separaron los nervios cuatro días después de la lesión y los axones en regeneración se marcaron por inmunocitoquímica para GAP-43. Los perfiles de los axones regenerados inmediatamente distales de la coaptación del nervio en dos animales representativos (que reciben cada uno inyecciones de vehículo y de condroitinasa) se muestran en la Figura 14A. Los axones inmunomarcados para GAP43 se puntuaron en secciones en serie de los nervios distales como se muestra en la Figura 14B. La regeneración de los axones fue significativamente mayor en los nervios tratados con condroitinasa (Ch'asa) en comparación con los controles tratados con vehículo. Los datos representan las medias ( $\pm$  SEM) de 7 nervios tratados con condroitinasa y 7 nervios tratados con vehículo evaluados a intervalos de 0,56 mm dentro de los nervios distales.

Las figuras 15A y 15B muestran el ensayo de criocultivo de cultivos de explantes de nervios. Como se muestra en la Figura 15A, se cultivaron explantes de nervio ciático de rata recientemente extirpados durante 1, 2, 4, y 7 días en DMEM/N2 que contenía 0, 2, o 10 % de suero fetal bovino. Como se muestra en la Figura 15B, se cultivaron los explantes de nervio durante 2 días en DMEM/N2 que contenía 2 % de suero (cultivo estándar) con y sin adición de GM6001 (inhibidor de MMP). Se crioseccionaron entonces los nervios y se sembraron las neuronas DRG embrionarias sobre las secciones de tejido en DMEM/N2 que contenía NGF. Después de 24 horas, se inmunotifieron las neuronas DRG para GAP-43 y se midió el crecimiento neurítico por fotomicroscopía digital y análisis de imagen. La condición de control fue el nervio normal (0 días en cultivo). Los datos representan la media de las longitudes de las neuritas ( $\pm$  SEM) de >250 neuronas puntuadas en cada condición a partir de al menos 4 cultivos separados de explantes de nervios ensayados en 2 o más experimentos separados.

La Figura 16 muestra el análisis zimográfico de cultivos de explantes de nervios. Los explantes de nervios se cultivaron durante 0 (Control, C), 1, 2, 4, y 7 días en DMEM/N2 que contenía 2 % de suero. Se extrajeron entonces los nervios y se analizaron por electroforesis con capa de gelatina. La zimografía revela tanto la gelatinasa proforma como la gelatinasa activada que aparecen como bandas claras dentro del gel teñido. El nervio control contenía predominantemente pro-MMP-2 y cantidades trazas de MMP-2 activada. Hubo un aumento progresivo del contenido de MMP-2 y una rápida conversión en la forma activada dentro de los explantes del nervio cultivados durante 2 días o más. La MMP-9 fue despreciable en el control y en los primeros explantes mientras que se detectó una cantidad trazas a los 4 y 7 días. Las masas moleculares indican las posiciones de pro-MMP-9 (92 kD), MMP-9 activada (84 kD), pro-MMP-2 (72 kD) y MMP-2 activada (66 kD) recombinantes humanas.

Las figuras 17A-17F muestran la localización de actividad gelatinolítica neta en los segmentos de nervio por zimografía *in situ*. Las secciones tisulares del nervio control (Figura 17A y Figura 17B) y los explantes de nervio cultivados (2 días, 2 % de suero) (Figura 17C y Figura 17D) fueron recubiertos con gelatina marcada con fluoresceína, apagada, que se convierte en péptidos fluorescentes por actividad gelatinolítica dentro de los tejidos. Se detectó actividad gelatinolítica constitutiva en el nervio normal (Figura 17A) que, a mayor aumento (Figura 17B), se asoció con las células de Schwann. Como se muestra en las figuras 17C y 17D, la actividad gelatinolítica fue más intensa y difusa por todo el endoneurio en los nervios cultivados. Como se muestra en las figuras 17E y 17F, la actividad gelatinolítica en los nervios cultivados en presencia de GM6001 estaba marcadamente reducida.

Las figuras 18A-18D muestran la inmunexpresión de MMP-2 y MMP-9 en explantes de nervios cultivados. Como se muestra en la Figura 18A, el inmunomarcado de MMP-2 de los nervios de cultivo (2 días, 2 % de suero) fue intenso dentro de las células de Schwann y de las láminas basales de alrededor (recuadro). En la Figura 18B, el

5 inmunomarcado con S-100 mostró el reposicionamiento de una población expandida de células de Schwann dentro del nervio. Como se muestra en la Figura 18C, el inmunomarcado de MMP-9 estuvo virtualmente ausente dentro de los fascículos del nervio, excepto para un perfil celular raro. Algunas células del epineurio circundante se marcaron para MMP-9. En la Figura 18D el marcado con OX42 mostró macrófagos esparcidos por el epineurio y raramente dentro de los fascículos del nervio de los nervios cultivados.

10 Las figuras 19A-19D muestran la degeneración de Wallerian en explantes de nervios cultivados. Los cambios degenerativos observados en los segmentos de nervios cultivados durante 2 días fueron reminiscencias de las fases iniciales de la degeneración de Wallerian vista *in vivo*. En la Figura 19A, el inmunomarcado del neurofilamento mostró la formación compacta y contigua de axones en el nervio normal comparado con los axones anulares y fragmentados encontrados en los explantes de nervios cultivados (2 días, 2 % de suero) como se muestra en la Figura 19B (recuadros de las figuras 19A y 19B, secciones longitudinales). Como se muestra en la Figura 19C, el inmunomarcado para la laminina indicó que las láminas basales estaban estructuralmente intactas y que la expresión de laminina estaba regulada por incremento en las células de Schwann (recuadro). Como se muestra en la Figura 19D, la degeneración de los axones y la extrusión de mielina por las células de Schwann fue especialmente evidente en las secciones semi-delgadas teñidas con azul de toluidina. Los procesos degenerativos que producen mayor degeneración de mielina (colapso y condensación) y la separación fagocítica no fueron observados en los segmentos de nervios cultivados de 2 días como se muestra en el recuadro de la Figura 19D.

20 Las figuras 20A y 20B muestran la regeneración axonal dentro de los injertos de nervios acelulares predegenerados *in vitro*. Los injertos de nervios normales y cultivados (2 días, 2 % de suero) fueron desvitalizados por congelación, fueron recortados a 10 mm de longitud y usados como injertos interposicionales para la reparación de nervios ciáticos seccionados transversalmente. Las ratas hospedantes recibieron injertos bilaterales, uno normal (sin cultivar) y uno predegenerado (cultivado). Se evaluó la regeneración axonal después de 8 días puntuando los perfiles inmunopositivos para GAP-43 en secciones transversales. En la Figura 20A, se muestran las secciones representativas de control e injertos predegenerados de dos animales. Las secciones muestran la regeneración axonal a 1,5 mm dentro de los injertos. Se invirtieron los valores pixel de las imágenes inmunofluorescentes. Como se muestra en la Figura 20B, se realizó un análisis cuantitativo a distancias medidas dentro de los injertos. Los datos representan las medias ( $\pm$  SEM) de 6 nervios en cada condición.

#### Descripción detallada de la invención

30 La presente invención proporciona métodos para promover la reparación de tejido nervioso. Los métodos de la presente invención se pueden emplear para restaurar la continuidad del nervio interrumpida por enfermedad, sucesos traumáticos o procedimientos quirúrgicos. Los métodos de la presente invención promueven la reparación del tejido aumentando el número de axones que penetran satisfactoriamente en el tejido nervioso dañado o en los injertos de nervios implantados, dando como resultado una mayor recuperación funcional.

35 Los métodos de la presente invención comprenden enzimas que degradan el proteoglicano sulfato de condroitina (CSPG). En una realización, un método de la presente invención comprende una enzima que degrada el CSPG seleccionada del grupo que consiste en condroitinasa, hialuronidasa, y metaloproteinasa de la matriz (MMP), o combinaciones de las mismas. En otra realización, un método de la presente invención comprende una enzima que degrada el CSPG seleccionada del grupo que consiste en condroitinasa ABC, condroitinasa A, condroitinasa C, condroitinasa AC, hialuronidasa, MMP-2, y MMP-9, o combinaciones de las mismas.

40 Las enzimas que degradan el CSPG pueden ser de origen humano, animal, o bacteriano, naturales o recombinantes. Como se usa aquí, la expresión "enzimas que degradan el CSPG" puede incluir también fragmentos y variantes biológicamente activos de tales enzimas, por ejemplo, que retienen una cantidad sustancial de su actividad de degradación de CSPG. Las composiciones usadas en la presente invención pueden incluir un vehículo farmacéutico apropiado. La presente invención se refiere también a un tejido nervioso tratado con una o más enzimas que degradan el CSPG.

45 En adición a una o más enzimas que degradan el CSPG, las composiciones usadas en la presente invención pueden comprender además moléculas biológicamente o farmacológicamente activas, tales como los factores de crecimiento. Tales factores de crecimiento incluyen, pero sin limitarse a ellos, factor de crecimiento nervioso (NGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF-1 y 2), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3, neurotrofina-4, y neurotrofina-5 (NT-3, NT-4, y NT-5), factor de crecimiento-I y factor de crecimiento-II tipo insulina (IGF-I, II), factor de crecimiento transformante (TGF), factor de crecimiento-2 glial (GGF-2), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y factor infiltrante de linfocitos/ factor de diferenciación colinérgica (LIF/CDF). Tales moléculas se pueden obtener naturalmente o por técnicas de DNA recombinante. Se pueden usar también fragmentos o variantes de tales moléculas que retienen sus actividades biológicas o farmacológicas.

La presente invención se refiere también a métodos para promover la reparación de tejido nervioso dañado en un ser humano o animal. Los métodos de la presente invención comprenden administrar una o más enzimas que degradan el CSPG a un injerto de nervios. Los métodos de la presente invención mejoran la capacidad de regenerar



axones que atraviesan la interfase nervio-nervio y nervio-injerto y potencian el crecimiento axonal dentro de su soporte de la lámina basal. La degradación de CSPG inhibitorio crea un sustrato nervioso más permisivo y permite que los brotes de los axones accedan en mayor medida a la lámina basal de las células de Schwann del nervio, aumentando de este modo el número de axones que penetran satisfactoriamente en el tejido nervioso dañado o en los injertos de nervios implantados.

Aplicación de las enzimas que degradan el CSPG a injertos de nervios. Las enzimas que degradan el CSPG se aplican a un injerto de nervio. Cuando las enzimas que degradan el CSPG se aplican a un injerto de nervio, el injerto completo puede ser tratado. Las enzimas que degradan el CSPG se pueden aplicar al injerto de nervio completo, en bloque. Esta aplicación es un pretratamiento o incubación anterior a la implantación y puede implicar o no procedimientos para eliminar la enzima aplicada. El tratamiento en bloque se puede aplicar a injertos de nervios vivos (frescos) o previamente congelados. El tratamiento en bloque no excluye, sino que se puede usar conjuntamente con una aplicación adicional de enzimas que degradan el CSPG en el sitio de coaptación con el nervio hospedante.

Según los métodos de la presente invención, la enzima que degrada el CSPG se puede aplicar al injerto de nervio. La enzima que degrada el CSPG se puede aplicar a un injerto de nervio antes de la implantación. La enzima que degrada el CSPG se puede aplicar a cualquier porción del injerto, tal como el extremo o extremos a ser unidos al tronco del nervio dañado. Las enzimas que degradan el CSPG se pueden poner en un medio de cultivo para aplicación al injerto de nervio. El medio de cultivo puede ser un medio indefinido, un medio definido, o un medio definido suplementado con suero por ejemplo. La presente invención incluye también soluciones de conservación para la conservación de injertos de nervios antes de la implantación. La solución de conservación contiene un medio de cultivo, como se ha indicado antes, y al menos una enzima que degrada el CSPG. La solución de conservación puede incluir también un adhesivo de tejidos, tal como goma de fibrina. La solución de conservación puede incluir también otros agentes biológicamente activos, tales como los factores de crecimiento listados antes.

Como se usa en esta memoria, el término "injerto" se refiere a cualquier tejido destinado a implantación dentro de un ser humano o animal. Dentro de la presente invención se engloban diferentes tipos de injertos, tales como autoinjertos, isoinjertos, aloinjertos, y xenoinjertos. El tamaño (por ejemplo, longitud y diámetro) del injerto no es crítico para la presente invención. Por ejemplo, la longitud del injerto de nervio puede ser de aproximadamente 1 centímetro a aproximadamente 10 centímetros, o más de aproximadamente 10 centímetros. El diámetro del el injerto de nervio puede coincidir con el de cualquier nervio o parte de un nervio lesionado, según necesidades. El injerto de nervio puede ser un segmento estructuralmente completo de nervio para tender un puente sobre un hueco a lo largo de la longitud del nervio del receptor o para reemplazar el extremo distal, esto es, para el injerto de extremo-a-extremo. Alternativamente, el injerto de nervio puede ser un segmento parcial de nervio, o de forma excéntrica (por ejemplo, un colgajo de nervio), y se destina a reconstruir un nervio desgarrado que tiene alguna ruptura estructural, pero mantiene su continuidad física.

Opcionalmente, la enzima que degrada el CSPG se puede aplicar a un injerto de nervio conjuntamente con un adhesivo de tejidos, tal como una goma biológica. Preferiblemente, la goma biológica es un adhesivo que contiene fibrina, tal como la goma de fibrina, sellante de fibrina, o gel plaquetario. Las gomas biológicas son bien conocidas en la técnica quirúrgica (Suri A *et al.* [2002] *Neurol. India* 50: 23-26; Alibai E *et al.* [1999] *Iran J Med. Sci.* 24(3&4): 92-97; Sames M *et al.* [1991] *Physiol. Res.* 46(4): 303-306; Jackson M *et al.* [1996] *Blood Coag. Fibrinolysis* 7: 737-746; Fasol R *et al.* [1994] *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 107: 1432-1439). Como se usan aquí, los términos "goma de fibrina", "sellante de fibrina", y "tejido adhesivo de fibrina" se usan de modo intercambiable para referirse a un grupo de formulaciones que contienen fibrinógeno y trombina, que llevan a la formación de un coágulo de fibrina en el sitio de aplicación. El adhesivo de tejido se puede aplicar simultánea o consecutivamente con la enzima que degrada el CSPG. El adhesivo de tejido se puede aplicar al nervio lesionado y/o al injerto de nervio dentro de la misma formulación que la enzima que degrada el CSPG, o en una formulación separada. Preferiblemente, el adhesivo no debe contener sustancias tales como la laminina que atraen el crecimiento de los axones desde la estructura del nervio remanente ni contener sustratos o inhibidores de la enzima o enzimas aplicadas que puedan competir con la actividad de la enzima o enzimas o inhibir dicha actividad

Las enzimas que degradan el CSPG usadas en la presente invención se pueden aplicar al injerto de nervio por diferentes medios y en una variedad de formulaciones. Como se usan aquí, los términos "aplicado", "administrado", "puesto en contacto", y "tratado" se utilizan de modo intercambiable. Por ejemplo, las enzimas que degradan el CSPG se pueden aplicar al injerto de nervio tópicamente (por ejemplo, a gotas). Además, las enzimas que degradan el CSPG, o las composiciones que contienen dichas enzimas, se aplican preferiblemente como una formulación líquida, fluida. La enzima o enzimas que degradan el CSPG se pueden adsorber también sobre una sustancia porosa, o se pueden formular en una pomada, ungüento, gel, crema, o espuma, por ejemplo.

Las enzimas que degradan el CSPG se pueden aplicar al injerto de nervio o tejido nervioso dañado en diferentes concentraciones, pero se aplican preferiblemente en una forma concentrada. Las concentraciones ideales variarán con el tamaño del nervio y con la enzima. Por ejemplo, la condroitinasa se puede aplicar en una concentración que varía de aproximadamente 10 unidades/mL a aproximadamente 1000 unidades/mL. Preferiblemente, la condroitinasa se aplica al injerto de nervio o tejido nervioso dañado a un intervalo de concentración de aproximadamente 100 unidades/mL a aproximadamente 500 unidades/mL. Las MMP se pueden aplicar en una

concentración que varía de aproximadamente 0,1 µg/mL a aproximadamente 100 µg/mL. Preferiblemente, la MMP se aplica en una concentración que varía de aproximadamente 10 µg/mL a aproximadamente 50 µg/mL.

Como se ha indicado antes, según los métodos de la presente invención, la enzima o enzimas que degradan el CSPG se pueden administrar a un injerto de nervio conjuntamente con una molécula biológicamente activa, tal como un factor de crecimiento. Otros agentes biológicamente activos que se pueden administrar con la enzima o enzimas que degradan el CSPG incluyen células modificadas genéticamente o no modificadas genéticamente. Por lo tanto, las composiciones usadas en la presente invención pueden incluir tales células. Las células pueden ser células que no son células madre (células maduras y/o especializadas, o sus precursores o progenitores) o células madre, excluyendo las células madre embrionarias humanas. Así, las células administradas pueden variar en plasticidad desde células madre totipotentes o pluripotentes (por ejemplo, adultas o embrionarias), células precursoras o progenitoras, hasta células altamente especializadas o maduras, tales como las del sistema nervioso central o periférico (por ejemplo, las células de Schwann).

Las células madre se pueden obtener de una variedad de fuentes, incluyendo el tejido fetal, tejido adulto, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, médula ósea, y cerebro, por ejemplo. Las células madre y las células no-madre (por ejemplo, células especializadas o maduras, y células precursoras o progenitoras) se pueden diferenciar y/o modificar genéticamente. Los métodos y marcadores comúnmente utilizados para identificar las células madre y para caracterizar tipos diferenciados de células están descritos en la literatura científica (por ejemplo, Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions, Appendix E1-E5, informe preparado por los National Institutes of Health, Junio, 2001). La lista de tejidos adultos descritos como contenedores de células madre es creciente e incluye la médula ósea, sangre periférica, cerebro, médula espinal, pulpa dental, vasos sanguíneos, músculo esquelético, epitelios de la piel y del sistema digestivo, córnea, retina, hígado, y páncreas.

Según los métodos de la presente invención, se pueden administrar al injerto de nervio o al tejido nervioso dañado, hospedantes modificados genéticamente, tales como células recombinantes. Los hospedantes pueden ser modificados genéticamente para producir una o más enzimas que degradan el CSPG. Preferiblemente, la enzima que degrada el CSPG es segregada por la célula recombinante. Por ejemplo, los sistemas de expresión de enzimas condroitin-lasas son conocidos en la técnica, algunos de los cuales están descritos en la patente de Estados Unidos No. 6.054.569; patente de Estados Unidos No. 6.093.563; solicitud publicada de patente de Estados Unidos serie No. 2001/0034043; y Tralec, A. L. [2000] *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 29-35. Opcionalmente, el hospedante recombinante está genéticamente modificado para producir recombinantemente otros agentes biológicamente activos, en adición a la enzima que degrada el CSPG.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican una o más enzimas que degradan el CSPG se pueden insertar en vectores y se pueden usar como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica se pueden administrar a un paciente, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, administración local, o por inyección estereotáctica. La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable o puede comprender un excipiente de liberación lenta en el que el vehículo de administración génica está embebido o asociado de otra forma. En adición, la preparación farmacéutica puede incluir una cantidad terapéuticamente eficaz de células que producen recombinantemente la enzima que degrada el CSPG.

Los diferentes métodos empleados en la modificación genética de las células del hospedante son bien conocidos en la técnica y están descritos, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition, volumes 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, y Glover, D. M. (1985) *DNA Cloning, Vol. 1: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford. Por lo tanto, los expertos en ingeniería genética saben extraer el DNA de su fuente, realizar digestiones con enzimas de restricción, electroforesis de fragmentos de DNA, seguir y anillar el DNA plásmido y el DNA inserto, ligar el DNA, transformar células, por ejemplo, células procariotas y eucariotas, preparar DNA plásmido, electroforesis de proteínas, y secuenciar el DNA.

Para reducir la inmunogenicidad, los injertos de nervio usados la presente invención se hacen acelulares por una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el tejido nervioso se puede hacer acelular por desvitalización por congelación, como se describe en la sección de Materiales y Métodos, o por extracción química con detergentes (Sondell M *et al.* [1998] *Brain Res* 795: 44-54). Los injertos de nervios se pueden hacer acelulares antes, durante, o después de la aplicación de una o más enzimas que degradan el CSPG.

Cultivo de nervios *in vitro*. La presente invención se refiere también a métodos de cultivo de tejido nervioso para implantación en un ser humano o animal. Los métodos de cultivo de la presente invención incluyen "predegenerar" el tejido nervioso *in vitro*, lo cual, después de la implantación del injerto, mejora la capacidad de regenerar los axones para atravesar la interfase entre el injerto y el tejido nervioso del hospedante. Sin querer limitarse a la teoría, los métodos de cultivo de la presente invención permiten que las células nerviosas vivas expresen las enzimas que degradan el CSPG y promuevan la proliferación de las células de Schwann, como ocurriría naturalmente *in vivo* durante el proceso de remodelado de la degeneración del nervio.

El método de cultivo *in vitro* implica cultivar el tejido nervioso en condiciones que permiten que el tejido nervioso crezca *in vitro* y que aumente la actividad promotora de neuritas del tejido nervioso cuando se implanta

posteriormente como un injerto. El aumento de la actividad promotora de neuritas puede ser como se determina por un ensayo de brote de neuritas *in vitro* del tejido nervioso, tal como el ensayo de criocultivo descrito aquí.

5 Alternativamente, se puede utilizar también un ensayo de brote de neuritas *in vivo* del tejido nervioso. Los métodos para ensayar el brote de neuritas son conocidos en la técnica y típicamente implican determinar cualitativa o cuantitativamente la extensión del brote de neuritas sobre un soporte sólido, tal como una microplaca o un porta de microscopio. Se puede utilizar fluorescencia estándar.

10 Los métodos de la presente invención pueden comprender aislar el tejido nervioso de un ser humano o animal y cultivar el tejido nervioso durante un corto período de tiempo *in vitro*, variando desde aproximadamente 24 horas hasta aproximadamente 96 horas. Las incubaciones más largas *in vitro* pueden producir deterioro y pérdida de las propiedades de promoción del crecimiento. Preferiblemente, el tejido nervioso se cultiva de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 72 horas. Más preferiblemente, el tejido nervioso se cultiva durante aproximadamente 48 horas.

15 El tejido nervioso se puede cultivar a una temperatura dentro de un intervalo de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 37 °C. Preferiblemente, el tejido nervioso se cultiva dentro de un intervalo de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 37 °C. Más preferiblemente, el tejido nervioso se cultiva a aproximadamente 37 °C.

20 El tejido nervioso se puede cultivar en un medio definido o medio suplementado con suero. El medio definido puede ser, por ejemplo, medio N2 o medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Si se utiliza medio suplementado con suero, el suero puede ser humano o animal, tal como suero fetal bovino. Preferiblemente, el tejido nervioso se cultiva en medio definido. En una realización, el tejido nervioso es un injerto de nervio que se vuelve acelular después del cultivo y antes de la implantación dentro de un hospedante. En una realización preferida, el injerto de nervio se vuelve acelular por desvitalización por congelación. Aunque no son necesarias enzimas exógenas para llevar a cabo los métodos de cultivo de la presente invención, los métodos pueden comprender además poner en contacto el tejido nervioso con una o más enzimas que degradan el CSPG.

25 La presente invención se refiere además a métodos para proporcionar injertos de nervio para implantación en seres humanos o animales. Preferiblemente, las características de la sección transversal del injerto de nervio son similares a las características de la sección transversal del tejido nervioso del hospedante en el sitio de implantación, por ejemplo, el tronco del nervio proximal y distal del hospedante. En una realización, el método de la presente invención comprende generar datos de imágenes digitales de la sección transversal del tronco nervioso dentro de un hospedante potencial (esto es, un receptor del injerto), analizar los datos de imagen para definir las localizaciones coordinadas de elementos nerviosos y su diámetro para producir un modelo de receptor, y comparar los datos del modelo de receptor con los datos del modelo de donante que se pueden guardar en memoria. Los datos del modelo de donante representan los datos de imagen digital de un "banco" de injertos de nervios almacenados. Se puede seleccionar entonces para implantación dentro del receptor el injerto de nervios almacenado con el grado más alto de alineamiento de elementos estructurales con el tronco nervioso del receptor. Los parámetros relevantes incluyen el diámetro, espesor, y/o el ordenamiento espacial (esto es, los límites) de uno o más de los elementos estructurales, que incluyen, pero sin limitarse a ellos, el epineurio, los grupos fasciculares, los fascículos, la vaina de mielina, y los axones. Por tanto, el alineamiento entre el injerto de nervio y el nervio del hospedante se puede maximizar. Preferiblemente, el injerto nervioso seleccionado es uno con un ordenamiento similar en la sección transversal de los grupos fasciculares y de los axones.

40 La patente de Estados Unidos No. 5.231.580 describe una variedad de métodos para determinar las características de nervios. La generación de los datos de imagen digital se puede conseguir utilizando métodos y dispositivos bien conocidos en la técnica, tales como una cámara digital. El análisis de los datos de imagen y la comparación de los datos del modelo de receptor con los datos del modelo del donante almacenados se pueden llevar a cabo, por ejemplo, mediante un algoritmo capaz de hacer un barrido de la imagen, análisis, y reconocimiento del patrón. Para seleccionar la mayor concordancia entre el injerto de nervio y el nervio receptor, se pueden establecer valores umbrales de similitud.

50 Los métodos y composiciones de la presente invención son aplicables a tejido nervioso tanto del sistema nervioso central (CNS) como del sistema nervioso periférico (PNS). Por ejemplo, los injertos de nervio de la presente invención se pueden utilizar como injertos de nervio interposicionales en el PNS o como puentes en el cerebro y en la médula espinal y cualquier extensión de los mismos.

55 Las enzimas que degradan el CSPG utilizadas en la presente invención se pueden obtener de una variedad de fuentes, incluyendo organismos que producen la enzima naturalmente u organismos que producen (o sobreproducen) la enzima a través de una modificación genética (produciendo una enzima recombinante). Por ejemplo, las enzimas que degradan el CSPG se pueden obtener de fuentes bacterianas, incluyendo las que producen naturalmente la enzima, o las que han sido modificadas genéticamente para producir (o sobreproducir) la enzima. Las enzimas que degradan el CSPG se pueden obtener también de fuentes de mamíferos, incluyendo aquellos mamíferos que producen naturalmente la enzima o aquellos mamíferos que han sido modificados genéticamente para producir (o sobreproducir) la enzima. Alternativamente, la enzima que degrada el CSPG se puede sintetizar químicamente.

Como se usa aquí, la parte "proximal" significa la parte del axón que permanece en continuidad con los cuerpos celulares neuronales o la parte del nervio que contiene estos axones. La parte "distal" significa la parte del axón que se desconecta del cuerpo de la neurona o la parte del nervio que contiene estos axones desconectados.

5 En el caso de una lesión de nervios periféricos, su parte proximal es la que se conecta con los ganglios o con la médula espinal. La parte distal del nervio periférico puede significar la parte más periférica del nervio que está conectada a la placa final motora (unión neuromuscular) o a los órganos sensoriales. En el caso de una lesión de la médula espinal, la parte proximal es la que está en contacto con los núcleos o más anterior. La parte distal significa la parte que se extiende hasta una sinapsis terminal.

10 Los términos "tratar" o "tratamiento", como se usan aquí, se refieren a la reducción o alivio de al menos un efecto adverso o síntoma asociado con el daño del nervio particular sufrido por el paciente.

15 Como se usa aquí, el término "célula madre" es una célula no especializada que es capaz de replicarse o autorrenovarse, y desarrollarse en células especializadas de una variedad de tipos celulares. El producto de una célula madre que sufre división es al menos una célula madre adicional que tiene las mismas capacidades que la célula original. Por ejemplo, en condiciones apropiadas, una célula madre hematopoyética puede producir una célula madre de segunda generación y una neurona. Las células madre incluyen las células madre embrionarias no humanas (por ejemplo, aquellas células madre que se originan de la masa celular interior de los blastocitos) y las células madre adultas (que se pueden encontrar en todos los animales más maduros, incluyendo los seres humanos). Como se usa aquí, las células madre incluyen aquellas células madre que se encuentran en animales que han madurado después de la etapa embrionaria (por ejemplo, feto, niño, adolescente, joven, adulto, etc.).

20 Como se usa aquí, el término "célula progenitora" (conocida también como una "célula precursora") es una célula no especializada o tiene características parciales de una célula especializada que es capaz de sufrir la división celular y dar dos células especializadas. Por ejemplo, una célula progenitora/precursora mielóide puede sufrir la división celular para dar dos células especializadas (un neutrófilo y un eritrocito).

25 Como se usa aquí, el término "co-administración" y sus variaciones se refiere a la administración de dos o más agentes simultáneamente (en una o más preparaciones), o consecutivamente.

Como se usa aquí, el término "combinación" incluye las sub-combinaciones. Por ejemplo, una combinación de las enzimas que degradan el CSPG, condroitinasa ABC, condroitinasa A, condroitinasa C, condroitinasa AC, hialuronidasa, MMP-2, y MMP-9, incluirían las subcombinaciones de condroitinasa ABC y MMP-2, por ejemplo.

30 Como se usa aquí, el término "actividad biológica" o "biológicamente activo" se refiere a la actividad asociada con el particular agente, molécula, compuesto, etc. Por ejemplo, la actividad biológica presentada por las condroitinasas que degradan el CSPG es la degradación de CSPG. Preferiblemente, la actividad que degrada el CSPG incluye la escisión o la lisis de condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, o ambos condroitin-4-sulfato y condroitin-6-sulfato. Por lo tanto, los fragmentos y variantes biológicamente activos de enzimas específicas que degradan el CSPG presentan también actividad que degrada el CSPG. Asimismo, los fragmentos biológicamente activos de factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento-1 de los fibroblastos, presentan la actividad biológica normalmente asociada con dicho factor de crecimiento.

40 El término "modificación genética" como se usa aquí se refiere a la alteración estable o transitoria del genotipo de una célula de la presente invención mediante introducción intencionada de ácidos nucleicos exógenos por cualquier medio conocido en la técnica (incluyendo por ejemplo, transmisión directa de una secuencia de polinucleótido procedente de una célula o partícula de virus, transmisión de partículas de virus infecciosas, y transmisión por cualquier sustancia conocida que lleva polinucleótidos) dando como resultado una alteración permanente o temporal de genotipo. Los ácidos nucleicos pueden ser sintéticos o derivados naturalmente, y pueden contener genes, porciones de genes, u otros polinucleótidos útiles. El término "modificación genética" no tiene por objeto incluir las alteraciones que ocurren naturalmente tales como las que ocurren a través de la actividad viral natural, recombinación genética natural, o similares.

45 Se pueden utilizar diferentes vectores para llevar a cabo la modificación genética según la presente invención. Los vectores pueden ser vacunas, vectores de replicación, o de amplificación. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, los polinucleótidos se asocian operativamente con elementos reguladores capaces de causar la expresión de las secuencias de polinucleótidos. Tales vectores incluyen, entre otros, vectores cromosómicos, episomiales y derivados de virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de transposones, de episomas de levaduras, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levaduras, de virus tales como baculovirus, papova virus, tal como SV40, virus vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus pseudorábicos y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de las fuentes de vectores mencionadas, tales como los derivados de elementos genéticos de plásmidos y bacteriófagos (por ejemplo, cósmidos y fagémidos).

55 Como se ha indicado antes, los vectores utilizados para llevar a cabo la modificación genética pueden comprender también elementos necesarios para proporcionar la expresión y/o la secreción de un polipéptido, tal como una enzima que degrada el CSPG, o uno de sus fragmentos o variantes biológicamente activos, codificados por las

secuencias de nucleótidos de la invención en una célula hospedante dada. El vector puede contener uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en un promotor, señales para la iniciación de la traducción, señales para la terminación de la traducción, y regiones apropiadas para la regulación de la transcripción. En ciertas realizaciones, los vectores se pueden mantener de forma estable en la célula hospedante y pueden contener opcionalmente secuencias señales que dirigen la secreción de la proteína traducida. Otras realizaciones proporcionan vectores que no son estables en células hospedantes transformadas. Los vectores se pueden integrar en el genoma del hospedante o pueden ser vectores que se replican de forma autónoma.

En una realización específica, el vector comprende un promotor operativamente ligado a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína o un péptido, uno o más orígenes de replicación, y, opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos). Los ejemplos no limitantes de vectores para la expresión de los polipéptidos de la invención incluyen vectores tipo pBr, vectores plásmidos tipo pET (PROMEGA), vectores plásmidos pBAD (INVITROGEN) o los que se indican en los ejemplos que siguen. Además, los vectores según la invención son útiles para transformar las células hospedantes para la clonación o expresión de las secuencias nucleotídicas de la invención.

Los promotores que se pueden utilizar para controlar la expresión incluyen, pero sin limitarse a ellos, el promotor CMV, la región del promotor precoz SV40 (Bemoist and Chambon [1981] *Nature* 290: 304-310), el promotor contenido en la repetición terminal larga en 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto *et al.* [1980] *Cell* 22: 787-797), el promotor de timidina-cinasa del herpes (Wagner *et al.* [1981] *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1441-1445), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster *et al.* [1982] *Nature* 296: 39-42); los vectores procariotas que contienen promotores tales como el promotor de  $\beta$ -lactamasa (Villa-Kamaroff *et al.* [1978] *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3727-3731), o el promotor *tac* (DeBoer *et al.* [1983] *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 21-25); véase también, "Useful Proteins from Recombinant Bacteria" en *Scientific American*, 1980, 242: 74-94; los vectores de expresión de plantas que comprenden la región del promotor nopalina sintetasa (Herrera-Estrella *et al.* [1983] *Nature* 303: 209-213) o el promotor del RNA del virus del mosaico de la coliflor 35S (Gardner *et al.* [1981] *Nucl. Acids Res.* 9: 2871), y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bifosfato carboxilasa (Herrera-Estrella *et al.* [1984] *Nature* 310: 115-120); elementos promotores procedentes de levaduras u hongos tales como el promotor Gal 4, el promotor ADC (alcohol deshidrogenasa), promotor PGK (fosfoglicerol cinasa), y/o el promotor fosfatasa alcalina.

La presente invención proporciona también el uso de secuencias nucleotídicas "homólogas" o "modificadas". Se entenderá que las secuencias de ácido nucleico modificadas significan cualquier secuencia de nucleótido obtenida por mutagénesis según métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, y que presentan modificaciones en relación con las secuencias normales. Por ejemplo, las mutaciones en las secuencias reguladoras y/o promotoras para la expresión de un polipéptido que dan como resultado una modificación del nivel de expresión de un polipéptido según la invención proporcionan una "secuencia nucleotídica modificada". Asimismo, las sustituciones, deleciones, o adiciones de ácido nucleico a los polinucleótidos de la invención proporcionan secuencias nucleotídicas "homólogas" o "modificadas". En varias realizaciones, las secuencias de ácido nucleico "homólogas" o "modificadas" tienen sustancialmente la misma actividad biológica o serológica que la enzima original (la que aparece en la naturaleza) que degrada el CSPG. Se entenderá también que una secuencia nucleotídica "homóloga" o "modificada" significa una variante de corte y empalme de los polinucleótidos de la presente invención o cualquier secuencia nucleotídica que codifica un "polipéptido modificado" como se define más adelante.

Una secuencia nucleotídica homóloga, para los fines de la presente invención, engloba una secuencia nucleotídica que tiene un porcentaje de identidad con las bases de las secuencias nucleotídicas de al menos (o al menos aproximadamente) entre 20,00 % y 99,99 % (inclusive). El intervalo mencionado de porcentaje de identidad se debe considerar que incluye, y proporciona la descripción escrita y el soporte para cualquier porcentaje fraccionario en intervalos de 0,01 %, entre 20,00 % y 99,99 %. Estos porcentajes son puramente estadísticos y las diferencias entre dos secuencias de ácido nucleico se pueden distribuir aleatoriamente y sobre toda la longitud de la secuencia.

En diferentes realizaciones, las secuencias homólogas que presentan un porcentaje de identidad con las bases de las secuencias nucleotídicas usadas en la presente invención pueden tener un 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99 por ciento de identidad con la secuencia de polinucleótidos que codifica la enzima que degrada el CSPG.

Tanto la homología de la secuencia de proteína como la homología de la secuencia de ácido nucleico se pueden evaluar utilizando cualquiera de la variedad de algoritmos y programas de comparación de secuencias conocidos en la técnica. Tales algoritmos y programas incluyen, pero de ningún modo está limitados a, TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA, y CLUSTALW (Pearson and Lipman [1988] *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(8): 2444-2448; Altschul *et al.* [1990] *J. Mol. Biol.* 215(3): 403-410; Thompson *et al.* [199A] *Nucleic Acids Res.* 22(2): 4673-4680; Higgins *et al.* [1996] *Methods Enzymol.* 266: 383-402; Altschul *et al.* [1990] *J. Mol. Biol.* 215(3): 403-410; Altschul *et al.* [1993] *Nature Genetics* 3: 266-272).

Las células o tejidos administrados a un paciente según los métodos de la presente invención se pueden derivar de seres humanos o de otros mamíferos, incluyendo primates no humanos, roedores, y porcinos, por ejemplo. Los

ejemplos específicos de especies fuente incluyen, pero sin limitarse a ellos, seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, simios, chimpancés, orangutanes, monos); animales domésticos (animales de compañía) tales como perros, gatos, cobayas, hámsteres, cerdos panzudos vietnamitas, conejos, y hurones; animales domésticos de granja tales como los bovinos, búfalos, bisontes, caballos, burros, cerdos, ovejas, y cabras; animales exóticos que se encuentran típicamente en los zoológicos, tales como osos, leones, tigres, panteras, elefantes, hipopótamos, rinocerontes, jirafas, antílopes, perezosos, gacelas, cebras, ñúes, perros de las praderas, osos koala, canguros, comadreja, mapaches, pandas, pandas gigantes, hienas, focas, leones marinos, focas elefantes, marsopas, delfines, y ballenas.

Asimismo, las especies de mamíferos que se benefician de los métodos de tratamiento descritos incluyen, y no se limitan a ellos, los seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, simios, chimpancés, orangutanes, monos); animales domésticos (por ejemplo, animales de compañía) tales como perros, gatos, cobayas, hámsteres, cerdos panzudos vietnamitas, conejos, y hurones; animales domésticos de granja tales como los bovinos, búfalos, bisontes, caballos, burros, cerdos, ovejas, y cabras; animales exóticos que se encuentran típicamente en los zoológicos, tales como osos, leones, tigres, panteras, elefantes, hipopótamos, rinocerontes, jirafas, antílopes, perezosos, gacelas, cebras, ñúes, perros de las praderas, osos koala, canguros, comadreja, mapaches, pandas, pandas gigantes, hienas, focas, leones marinos, focas elefantes, marsopas, delfines, y ballenas.

### **Materiales y Métodos**

Procedimientos quirúrgicos para seccionamiento transversal del nervio y experimentos de aplastamiento del nervio. Todos los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité institucional de cuidado y uso de animales (IACUC). Se anestesiaron a fondo ratas SPRAGUE DAWLEY adultas jóvenes (HARLAN Indianapolis, IN) con xilazina (15 mg/kg, i.m.) seguido por ketamina-HCl (110 mg/kg, i.p.). Seis animales recibieron lesiones por aplastamiento de nervios bilaterales. Se expusieron los nervios ciáticos y después se aplastaron con presión firme durante treinta segundos con un fórceps DUMONT nº 5 en un sitio distal a 4 mm del tendón del obturador interno. Se marcó el sitio de aplastamiento con una sutura epineural. En un conjunto separado de experimentos, ocho ratas recibieron lesiones por seccionamiento transversal de nervios ciáticos bilaterales utilizando tijeras dentadas. Los troncos proximal y distal se recubrieron mediante neurografía epineural utilizando suturas ETHILON 9-0. Se aplicó entonces goma de fibrina (fibrinógeno y trombina) para estabilizar la unión. En ambos modelos de lesión, se inyectaron los nervios ciáticos derechos distales a 2 mm de la lesión con condroitinasa ABC (1 unidad en 2 µl) (alta pureza, exenta de proteasa; SIGMA CHEMICAL CO., St. Louis, MS). Los nervios ciáticos izquierdos (con la misma lesión que el lado derecho) se inyectaron con vehículo solo (seroalbúmina bovina al 0,1 % en PBS). Las incisiones del músculo se suturaron y se cerró la piel con pinzas metálicas. Una vez recuperados de la anestesia, los animales volvieron a la jaula estándar. Dos días (para la lesión por aplastamiento) y cuatro días (para la lesión de seccionamiento transversal) después de la cirugía, se separaron los nervios bajo anestesia y se fijaron como se describe más adelante. Uno de los ocho animales que recibieron el seccionamiento transversal del nervio y se excluyó la reparación debido a que durante la convalecencia ocurrió la pérdida de continuidad en un nervio.

Preparación de injertos de nervios acelulares tratados con condroitinasa. Se utilizaron ratas SPRAGUE DAWLEY hembras adultas (180-200 g) (HARLAN, Indianapolis, IN) como donantes de nervios y hospedantes receptores. Se anestesiaron las ratas donantes con halotano y se decapitaron. Se expusieron los nervios ciáticos mediante una incisión que partía el músculo glúteo y se aislaron libres de la fascia subyacente. Se extirpó un segmento del nervio de 15 mm rostral a la bifurcación de los nervios peroneo común y tibial. Se lavaron los segmentos con solución de Ringer estéril, fría, se estabilizaron sujetando los extremos con alfileres a un soporte plástico fino, y se transfirieron a un vial criogénico. Se sumergieron los viales en nitrógeno líquido durante 2 minutos y después se transfirieron a un baño de agua a 37 °C durante 2 minutos. Se repitió este ciclo de congelación/descongelación, obteniéndose injertos de nervios acelulares que se almacenaron entonces en nitrógeno líquido. El día antes de implantar el injerto, se calentaron los injertos de nervios a temperatura ambiente y se incubaron en 100 µl de solución salina tamponada con fosfato de pH 7,4 (PBS) que contenía 2 unidades/mL de condroitinasa ABC (SIGMA, St. Louis, MO) o en PBS (vehículo) solo durante 16 horas a 37 °C. Se lavaron dos veces los injertos con solución de Ringer y se mantuvieron en hielo antes de su uso. La preparación de condroitinasa ABC era altamente purificada y el fabricante garantizaba que estaba esencialmente exenta de actividad proteasa.

Implantación de injerto interposicional de nervio para experimentos con condroitinasa. Doce ratas recibieron injertos bilaterales de nervios acelulares, un injerto tratado con condroitinasa y un injerto tratado con vehículo. Las ratas hospedantes fueron anestesiadas profundamente utilizando xilazina (15 mg/kg, i.m.) y ketamina (110 mg/kg, i.p.). Se expuso el nervio ciático y se apoyó en un inserto plástico colocado entre el nervio y el tejido subyacente. La región de nervio a medio camino entre el corte del ciático y la bifurcación se recubrió en primer lugar con goma de fibrina. Utilizando tijeras dentadas, se extirpó un segmento de 2,5 mm de nervio del hospedante y se reemplazó con un injerto de nervio acelular de 10 mm recientemente recortado. Se ajustó el injerto a los troncos nerviosos del hospedante mediante neurografía epineural utilizando una sutura ETHILON 9-0 en cada extremo. Se aplicó entonces goma de fibrina para estabilizar las coaptaciones, la cual en combinación con la cubierta inicial de fibrina, redujo también la protuberancia de los elementos nerviosos (crecimiento endoneural) (Menovsky T *et al.* [1999]

*Neurosurgery* 44: 224226). Se cerró el músculo con suturas 4-0 y la piel con pinzas para heridas. Una vez recuperados de la anestesia, los animales volvieron a sus jaulas estándar.

5 Nueve ratas fueron dadas de baja a los 8 días y cuatro a los 4 días después del injerto. Los animales fueron anestesiados profundamente y decapitados. Se separaron el injerto y 3 mm de nervio proximal y distal del hospedante, y se sumergieron en paraformaldehído al 4 % en tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,4) durante la noche a 4 °C. Se equilibraron las muestras con PBS y se sumergieron en tampón de fosfato con sacarosa al 30 % durante 2 días a 4 °C. Utilizando un microscopio de disección y las suturas epineurales como marcas, se subdividió cada muestra en 3 segmentos que representan a) la interfase del nervio proximal-injerto, b) el injerto principal y c) la interfase del nervio distal-injerto. Se embebieron las muestras y se crioseccionaron. Se revisaron las secciones longitudinales por las interfases de nervio-injerto para examinar la continuidad de las coaptaciones.

10 Los injertos se seccionaron de forma seriada en el plano transversal con una medida registrada para evaluar la extensión del crecimiento axonal por microscopía. Se marcaron los axones de regeneración por inmunofluorescencia para GAP-43 (véase más adelante) en secciones de los injertos a intervalos de 0,56 mm. Se obtuvieron fotomicrografías epifluorescentes utilizando un sistema de cámara digital SPOT (DIAGNOSTIC INSTRUMENTS, INC., Sterling Heights, MI) y microscopio AXIOVERT 10 (CARL ZEISS, Thornwood, NY). Los perfiles de los axones positivos a GAP-43 se puntuaron utilizando el software IMAGE-PRO PLUS (MEDIA CYBERNETICS, Silver Springs, MD).

20 Cultivo de explantes de nervios para experimentos de predegeneración. Se utilizaron ratas SPRAGUE DAWLEY hembras adultas (180-200 g) (HARLAN, Indianapolis, IN) como donantes de nervios y receptoras de injerto. Este proyecto fue revisado y aprobado por el Comité institucional de cuidado y uso de animales. Se anestesiaron profundamente las ratas donantes con isoflurano y se decapitaron. Se expusieron los nervios ciáticos mediante una incisión que partía el músculo glúteo y se aislaron libres de la fascia subyacente. Se extirpó un segmento de nervio de 15 mm rostral a la bifurcación de los nervios peroneo común y tibial. Se lavaron los segmentos con solución de Ringer estéril, y se estabilizaron sujetando los extremos con alfileres a un soporte plástico fino. Se cultivaron los explantes de nervios durante 1, 2, 4 y 7 días en medio de EAGLES modificado por DULBECCO que contenía suplementos N2 (DMEM/N2) o DMEM/N2 suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 2 % o al 10 % (ATLANTA BIOLOGICALS, Atlanta, GA). Cuando se especifica, algunos explantes se cultivaron en presencia del inhibidor de MMP, GM6001 (50 µM) (Grobely *et al.* [1992] *Biochem.*, 31: 7152-7154). Los nervios cultivados se lavaron cuidadosamente con DMEM y después se transfirieron a tubos sellados. Se sumergieron los tubos en nitrógeno líquido durante 2 minutos y después se descongelaron en un baño de agua a 37 °C durante 5 minutos. Se repitió dos veces este ciclo de congelación/descongelación, obteniéndose segmentos de nervios desvitalizados por congelación (acelulares). Los nervios recientemente extirpados (controles no cultivados) se desvitalizaron por congelación utilizando el mismo procedimiento. Los segmentos de nervios acelulares fueron entonces a) embebidos para crioseccionamiento para uso en ensayos de criocultivo o b) se conservaron en nitrógeno líquido (durante 2 semanas máximo) para análisis bioquímico y para uso en injertos de nervios interposicionales. Los explantes de nervios preparados para exámenes histológicos se fijaron con aldehídos y se omitió la desvitalización por congelación.

35 Se consiguió la degeneración del nervio *in vivo* mediante un único seccionamiento transversal del nervio ciático cerca de la pelvis. El tronco proximal se desplazó y se ligó para descartar el crecimiento axonal. Los músculos de las patas y la piel se cerraron y se dejó que los nervios seccionados transversalmente degeneraran *in situ* durante 2 o 7 días.

40 Inmunocitoquímica. La regeneración axonal se evaluó por inmunofluorescencia para GAP-43 y análisis de imagen digital. Las secciones de tejido montadas en portas se lavaron con PBS y después se trataron con Triton X-100 al 0,5 % en PBS durante 10 min. Se trataron las secciones con tampón de bloqueo (suero al 10 % en PBS + Triton X-100 al 0,1 %) y después se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpos primarios (diluidos en tampón de bloqueo). Los anticuerpos unidos se marcaron con inmunoglobulinas de cerdo anti-conejo (DAKO CORPORATION, Carpintería, CA) o inmunoglobulinas de cabra anti-ratón (Sigma), anticuerpos secundarios conjugados con FITC durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. El anticuerpo secundario anti-ratón fue preadsorbido con suero de rata antes de su uso. Se lavaron las secciones, se fijaron después con paraformaldehído al 4 % en PBS, se enjuagaron, y se cubrieron con un cubre en un medio de montaje fluorescente. El anticuerpo anti-péptido GAP-43 de conejo purificado por afinidad, se produjo utilizando métodos conocidos (Ferguson TA *et al.* [2000] *Mol Cell Neurosci*, 16: 157-167) y se utilizó a 2 µg/mL. El anticuerpo policlonal 1918 (CHEMICON INTERNACIONAL, Temecula, CA) (1:1000) se une solamente a la unidad de disacárido insaturado que permanece ligada a la región de unión de la proteína núcleo de CSPG expuesta por digestión con la condroitinasa ABC (Bertolotto A *et al.* [1986] *J Neurol Sci* 73: 233-244). El anticuerpo policlonal anti-EHS laminina (Sigma) (1:1000) se utilizó para marcar las láminas basales. El antisuero policlonal anti-S-100 (Dako) (1:500) se utilizó para marcar las células de Schwann. Las imágenes en campo oscuro se invirtieron y se optimizaron para imprimir en PHOTOSHOP (ADOBE SYSTEMS INC., San Jose, CA).

50 Bioensayo de criocultivo. El criocultivo es un ensayo de brote de neuritas en el que las neuronas se cultivan directamente sobre secciones de nervio fresco/congelado y se realizó como se ha descrito previamente (Ferguson TA *et al.* [2000] *Mol Cell Neurosci*, 16: 157-167). En resumen, los segmentos de nervio tratados con condroitinasa y

tratados con vehículo se seccionaron a 20  $\mu\text{m}$ , se montaron sobre cubres estériles, recubiertos de aminopropiltriethoxisilano (APTS) y se conservaron a -20  $^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Cuando se indica, se trataron las secciones con condroitinasa ABC (0,1 unidades/mL) o con vehículo (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0), que contenía NaCl 50 mM) durante 2 h a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Las neuronas ganglionales purificadas de la raíz dorsal (DRG) de embriones de pollo de 8 días se sembraron directamente sobre las secciones de nervio en un medio N2 definido (Bottenstein J E *et al.* [1980] *Exp Cell Res* 125: 183-190) que contenía 10 ng/mL de factor de crecimiento nervioso. Los ensayos de criocultivo se terminaron después de 24 h de incubación por fijación con metanol al 100 %. El crecimiento neurítico por las neuronas DRG se observó por marcaje inmunofluorescente para GAP-43. Se obtuvieron fotomicrografías epifluorescentes como se describe para las secciones de tejido. Se midieron las longitudes de las neuritas directamente utilizando el software IMAGE-PRO PLUS (MEDIA CYBERNETICS, Silver Springs, MD). Al menos 250 neuronas con neuritas mayores que un cuerpo celular ( $\sim 15 \mu\text{m}$ ) se puntuaron para cada condición en cada experimento.

Zimografía en gel para experimentos de predegeneración de nervios. Se pusieron los segmentos de nervio en un tampón de extracción enfriado en hielo (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, que contenía Triton X-100 al 1 %, NaCl 200 mM, y  $\text{CaCl}_2$  10 mM) y se homogeneizaron mediante sonicación en sonda (15 segundos). Se agitaron las muestras durante 30 min a 4  $^{\circ}\text{C}$  y la fracción soluble se recogió por centrifugación (12.000 g, 20 min). Se determinó el contenido total de proteínas de las fracciones solubles utilizando el reactivo BRADFORD REAGENT (BIO-RAD LABORATORIES, Hercules, CA). Se utilizó como una proteína estándar la albúmina de suero bovina disuelta en tampón de extracción. Se solubilizaron los extractos en tampón de la muestra no reductor de Laemmli sin calentamiento y se sometieron a electroforesis a 4  $^{\circ}\text{C}$  sobre geles de poliacrilamida con 10 % de SDS conteniendo 1,5 mg/mL de gelatina porcina. Se lavaron brevemente los geles con agua y después se lavaron con Triton X-100 al 2,5 % tres veces durante 45 min. Se eliminó el Triton con tres lavados de 5 min con agua y se desarrollaron los geles zimográficos durante 21 h en tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0,  $\text{CaCl}_2$  5 mM, azida de sodio al 0,02 %). Se fijaron los geles y se tiñeron con azul brillante Coomassie al 0,05 %. Aparecieron bandas de proteína con actividad gelatinolítica como zonas de lisis claras dentro del fondo azul del gel de gelatina. Se comparó la co-emigración de bandas gelatinolíticas con las formas latentes y activadas de MMP-2 y MMP-9 recombinantes humanas, así como los estándares de peso molecular teñidos previamente (BIO-RAD). Se obtuvieron fotomicrografías digitales y se realizó la densitometría de las bandas gelatinolíticas utilizando el software IMAGE-PRO PLUS.

Zimografía *in situ* para experimentos de predegeneración de nervios. Se montaron sobre portas criosecciones (10  $\mu\text{m}$ ) de nervios no fijados normales y cultivados y se cubrieron con tampón de reacción (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM,  $\text{CaCl}_2$  5 mM, azida de sodio 0,2 mM, pH 7,6) conteniendo 20  $\mu\text{g/mL}$  de sustrato de gelatina marcada con fluoresceína apagada intramolecularmente (MOLECULAR PROBES INC., Eugene, OR) (Oh *et al.*, 1999). En el control, se incluyó el inhibidor de MMP EDTA (30 mM) en el tampón de reacción. Después de incubación durante 24 h a 37  $^{\circ}\text{C}$ , se lavaron las secciones con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 % en tampón de fosfato. Se lavaron las secciones con agua y se montaron utilizando Citifluor. Se observaron los péptidos de gelatina con fluoresceína generados por la actividad gelatinolítica en las secciones de tejido y se fotografiaron por microscopía con epifluorescencia.

Implantación de injerto interposicional de nervio para experimentos de predegeneración. Seis ratas recibieron injertos bilaterales de nervios acelulares, uno normal (sin cultivar) y uno predegenerado *in vitro* (cultivado durante 2 días en suero al 2 %). Las ratas hospedantes fueron anestesiadas profundamente utilizando xilazina (15 mg/kg, i.m.) y ketamina (110 mg/kg, i.p.). Se expuso el nervio ciático y se apoyó en un inserto plástico colocado entre el nervio y el tejido subyacente. La región del nervio a medio camino entre el corte del ciático y la bifurcación se recubrió en primer lugar con goma de fibrina. Utilizando tijeras dentadas, se extirpó un segmento de 2,5 mm de nervio del hospedante. Se descongeló el injerto y se recortó a 10 mm con una hoja de bisturí. Se ajustó el injerto a los troncos nerviosos del hospedante mediante neurografía epineural utilizando una sutura ETHILON 9-0 en cada extremo. Se aplicó entonces goma de fibrina para estabilizar las coaptaciones, la cual en combinación con la cubierta inicial de fibrina aplicada al nervio hospedante, redujo la protuberancia de los elementos nerviosos (crecimiento endoneural) (Menovsky T *et al.* 1999, *Neurosurgery*, 44: 224-225, discusión pp. 225-226). Se cerró el músculo con suturas 4-0 y se cerró la piel con pinzas para heridas. Una vez recuperados de la anestesia, los animales volvieron a sus jaulas estándar. Ocho días después del injerto, las ratas hospedantes fueron anestesiadas profundamente y decapitadas. Se separaron el injerto y 3 mm de nervio proximal y distal del hospedante y se sumergieron en paraformaldehído al 4 % en tampón de fosfato 0,1 M, pH 7,4, durante la noche a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Se equilibraron las muestras con PBS y se sumergieron en sacarosa al 30 % en tampón de fosfato durante 2 días a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Se embebieron las muestras y se crioseccionaron sobre el plano transversal en una medida registrada. Se marcaron los axones de regeneración dentro de los injertos por inmunofluorescencia para GAP-43 (véase más adelante). Se obtuvieron fotomicrografías epifluorescentes y los perfiles de axones positivos a GAP-43 se puntuaron utilizando el software IMAGE-PRO PLUS.

Marcado inmunofluorescente para experimentos de predegeneración de nervios. Las secciones de tejido fijadas se trataron con Triton X-100 al 0,5 % en PBS durante 10 min. Se bloqueó la unión del anticuerpo no específico por pretratamiento con PBS que contenía Triton X-100 al 0,1 % y suero normal al 10 % (tampón de bloqueo). Los anticuerpos primarios se diluyeron en tampón de bloqueo y se aplicaron durante la noche a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Los anticuerpos primarios unidos se marcaron con inmunoglobulinas de cerdo anti-conejo (DAKO, Carpintería, CA) o inmunoglobulinas de cabra anti-ratón (Sigma) conjugadas con fluoresceína o rodamina durante 1 hora a temperatura



ambiente en la oscuridad. El anticuerpo secundario anti-ratón fue preadsorbido con suero de rata antes de su uso. Se evaluaron la longitud de las neuritas (criocultivo) y la regeneración axonal (injerto) por inmunomarcado con IgG policlonal anti-GAP-43 (2 µg/mL) (Ferguson and Muir, 2000, *Mol Cell Neurosci*, 16: 157-167) (NB300-143; NOVUS BIOLOGICAL, Littleton, CO). Otros anticuerpos primarios incluyeron: IgG policlonal anti-MMP-2 (4 µg/mL) (MMP2/475; Muir, 1995); IgG policlonal anti-MMP-9 (4 µg/mL) (AB19047; CHEMICON, Temecula, Calif.); antisuero policlonal anti-S-100 (1:500) (DAKO) y; antisuero policlonal OX42 (1:500) (SEROTEK, Raleigh, NC); e IgG monoclonal anti-neurofilamento (4 µg/mL) (NAP4; Harris *et al.*, 1993). En algunos casos, se invirtieron las fotomicrografías epifluorescentes y se mejoraron por contraste para imprimir en PHOTOSHOP (ADOBE SYSTEMS, San Jose, CA).

A continuación se incluyen ejemplos que ilustran los procedimientos para practicar la invención. Estos ejemplos no se deben considerar como limitantes. Todos los porcentajes están en peso y todas las proporciones de mezclas de disolventes están en volumen a menos que se indique otra cosa.

Algunos de los ejemplos han sido descritos solamente para referencia.

#### **Ejemplo 1. Degradación de CSPG por tratamiento de los segmentos de nervios acelulares con condroitinasa**

El propósito de este experimento fue determinar si el tratamiento con condroitinasa degradaba efectivamente el CSPG a lo largo de los segmentos intactos de nervios acelulares. Segmentos de nervio ciático de rata (1,5 cm de largo) se hicieron acelulares mediante ciclos repetidos de congelación-descongelación y después se bañaron en bloque en una solución de condroitinasa ABC durante 16 horas. Se examinó la degradación de CSPG dentro de los nervios pretratados con condroitinasa por inmunomarcado con el neopéptido del anticuerpo Ab1918. Este anticuerpo se une a un epítipo creado sobre una proteína núcleo después de lisis de las cadenas del sulfato de condroitina por la condroitinasa ABC (Bertolotto *et al.* [1986] *J. Neurol Sci*, 73: 233244). La inmunotinción de Ab1918 fue intensa a lo largo de todo el segmento de nervio pretratado, como se muestra en la Figura 1A. Además, la intensidad de inmunotinción de Ab1918 no aumentó por un tratamiento posterior adicional de las secciones con condroitinasa, como se muestra en la Figura 1B. La inmunorreactividad de Ab1918 estuvo ausente en los nervios acelulares no expuestos a la condroitinasa (no se muestra). Estos resultados indican que el tratamiento con condroitinasa en bloque impregnó de modo efectivo todos los compartimentos del nervio y degradó profundamente las cadenas laterales de CSPG.

En el nervio normal, el CSPG y la laminina están localizados conjuntamente, principalmente en las vainas y en las membranas basales del nervio incluyendo las láminas basales de las células de Schwann (Zuo *et al.* [1998a] *J. Neurobiol*, 34: 41-54). Sus distribuciones no cambiaron después de repetidos ciclos de congelación-descongelación y no hubo ninguna indicación a nivel del microscopio óptico de que el tratamiento en bloque con condroitinasa alterara las estructuras de la matriz extracelular (ECM), como se muestra en las figuras 1A y 1C. La integridad de los segmentos de nervios acelulares tratados con condroitinasa fue una consideración importante para su posterior uso como injertos de regeneración de nervios. Por consiguiente, se examinó también la integridad estructural de los segmentos de nervios pretratados después de la implantación del injerto del nervio. La intensidad y distribución de la inmunorreactividad de Ab1918 (en las regiones de los injertos no infiltradas por las células hospedantes) permanecieron sin cambios después de 8 días *in vivo*, lo que indica que la estructura primaria de las láminas basales de las células de Schwann permaneció intacta, como se muestra en la Figura 1D. En conjunto estos resultados demuestran que el tratamiento en bloque con condroitinasa de los injertos de nervios acelulares degradó de modo efectivo el CSPG sin afectar al soporte de la lámina basal ni trastornar su contenido en laminina.

#### **Ejemplo 2. Inactivación de CSPG inhibitorio por tratamiento de los segmentos de nervios acelulares con condroitinasa**

Se determinó por bioensayo de criocultivo la inactivación de CSPG inhibitorio en los nervios acelulares tratados con condroitinasa. Se sembraron neuronas DRG de embrión de pollo sobre secciones de segmentos de nervios preparados y se evaluó la actividad promotora de neuritas puntuando el crecimiento de las neuritas. Los resultados se muestran en la Figura 2. En las secciones de nervios acelulares pretratados en bloque con vehículo solo la longitud media de las neuritas fue de 49 µm. El crecimiento de las neuritas sobre nervios acelulares pretratados en bloque con condroitinasa fue de 96 µm como media, representando un aumento del 95 % en comparación con el control. Para determinar si el tratamiento con condroitinasa en bloque era riguroso, se realizaron ensayos de criocultivo sobre tejidos nerviosos tratados con condroitinasa después del seccionamiento (post-tratamiento). Como era de esperar, la actividad promotora de neuritas del nervio acelular tratado en bloque con el vehículo solo aumentó significativamente (86 %) por el post-tratamiento con condroitinasa. En contraste, el post-tratamiento con condroitinasa sólo tuvo un ligero efecto aditivo sobre las secciones procedentes de los injertos de nervio tratados en bloque con condroitinasa.

Estos resultados indican que el CSPG inhibitorio fue degradado e inactivado efectivamente al bañar los segmentos de injertos de nervios acelulares en pequeñas cantidades de condroitinasa ABC. En adición, el tratamiento en bloque con condroitinasa desinhibió efectivamente los injertos de nervios sin romper el potencial promotor de neuritas asociado a la laminina, del soporte de la lámina basal. El último punto se vio reforzado por la observación de que, como en los ensayos de criocultivo de nervios normales y degenerados (Ferguson and Muir, 2000, *Mol Cell*

*Neurosci*, 16: 157-167), el crecimiento de las neuritas en las secciones de injertos de nervios acelulares tratados con condroitinasa tenía lugar en estricta asociación con las láminas basales de las células de Schwann.

**Ejemplo 3. La regeneración del nervio aumenta por el tratamiento de los injertos de nervios acelulares con condroitinasa**

5 Los siguientes experimentos comprobaron la hipótesis de que el tratamiento con condroitinasa mejora la regeneración del nervio a través de los isoinjertos de nervios acelulares. Como se describe en el Ejemplo 2, se trataron los segmentos de nervios ciáticos acelulares en bloque con vehículo o con condroitinasa ABC. Se unieron injertos de nervio interposicionales de 10 mm al nervio del hospedante mediante neurorrafía epineural reforzada con goma de fibrina. Cada una de las nueve ratas hospedantes recibió injertos bilaterales, un injerto tratado con vehículo y un injerto tratado con condroitinasa. Se examinó la regeneración inicialmente después de 8 días. En primer lugar, se examinaron las coaptaciones del injerto de nervio proximal y distal en sección longitudinal para evaluar el alineamiento de la coaptación quirúrgica, como se muestra en la Figura 3. Todos los injertos mantuvieron la continuidad y por tanto fueron incluidos en el siguiente análisis. La puntuación de la regeneración se basó en el inmunomarcado de GAP-43 que tiñó intensamente los axones en crecimiento. Los axones y las células de Schwann remanentes dentro de los injertos desvitalizados por congelación fueron inmunonegativos para GAP-43 y las células de Schwann del hospedante solamente fueron teñidas muy débilmente (a una intensidad inferior al umbral utilizado para la puntuación digital). Se evaluó el crecimiento axonal a intervalos espaciales especificados dentro del injerto puntuando los perfiles inmunopositivos para GAP-43 en secciones transversales. Se observó algún crecimiento axonal hacia dentro en todos los injertos, como se muestra en la Figura 4. Sin embargo, el crecimiento en los injertos tratados con condroitinasa fue marcadamente mayor y más ampliamente distribuido que en los injertos control. Los resultados cuantitativos se muestran en la Figura 5.

La media del número de axones (perfiles inmunopositivos para GAP-43) que entran en los injertos tratados con condroitinasa fue una media más de tres veces mayor que en los injertos control. Mientras que los axones que entran en los injertos control estuvieron siempre limitados y muy a menudo se agruparon centralmente, el crecimiento inicial en los injertos tratados con condroitinasa estuvo más ampliamente dispersado y fue especialmente abundante en el extremo proximal. Estos hallazgos indican que el éxito de la penetración axonal en los injertos de nervios acelulares se mejora marcadamente por el pretratamiento de los injertos con condroitinasa. Sin embargo, se observó de forma consistente un número similar de axones en los extremos distales de injertos en ambas condiciones. Esto dio a entender que la penetración axonal en los injertos control tuvo lugar tempranamente y después se limitó temporalmente mientras que los axones continuaron penetrando en los injertos tratados con condroitinasa a lo largo del período de 8 días.

Para determinar si la latencia de crecimiento axonal en los injertos acelulares se reducía por el tratamiento con condroitinasa, se realizó el mismo análisis en injertos de 4 días excepto que también se examinaron las vistas más proximales de los injertos y se puntuaron en la sección transversal. Aunque solamente se examinaron 3 animales que recibieron injertos bilaterales, los resultados fueron consistentes con los observados para los injertos de 8 días. Además, en la vista más proximal del injerto (0,3 mm desde la interfase hospedante-injerto) la penetración axonal estuvo en una media cinco veces mayor en los injertos tratados con condroitinasa, como se muestra en la Figura 6. De estos resultados, se puede sacar en conclusión que el tratamiento con condroitinasa reduce la latencia y mejora significativamente el acceso de la regeneración axonal dentro de los injertos de nervios acelulares.

**40 Ejemplo 4. Regeneración de axones dentro de tubos de lámina basal de injertostratados con condroitinasa**

Debido a que el éxito de la regeneración de nervios depende del crecimiento de los axones dentro de los tubos de lámina basal ricos en laminina, se determinó si la asociación de crecimiento axonal con las láminas basales era alterada por el tratamiento con condroitinasa de los injertos acelulares. Las secciones transversales de injertos de 8 días se marcaron doblemente para GAP-43 y para laminina. El marcado de laminina fue intenso y las láminas basales aparecieron similarmente intactas a lo largo de los injertos control y de los injertos tratados con condroitinasa. A pesar del ciclo repetido de congelación-descongelación, del tratamiento con enzima, de la manipulación quirúrgica y de 8 días *in vivo*, el soporte de la matriz extracelular apareció estructuralmente intacto. Los múltiples axones marcados para GAP43 (o neuritas) fueron evidentes dentro de las láminas basales individuales y la inmensa mayoría de estas se observaron en estrecha asociación con la superficie luminal de los tubos. Se observaron un número similar y menor de neuritas con aposición ambigua en los injertos control y tratado. En términos generales, la propensión de los axones a crecer dentro de las láminas basales no fue alterada por el tratamiento con condroitinasa de los injertos de nervios acelulares.

**Ejemplo 5. Crecimiento axonal y migración de las células de Schwann en injertostratados con condroitinasa**

55 Secciones en serie de los injertos de 8 días se inmunomarcaron para S-100 y GAP-43 para examinar la migración de las células de Schwann con respecto al crecimiento de los axones. Los injertos contenían dos patrones definidos de tinción de S-100; la tinción intensa se asoció con las células de Schwann vivas, derivadas del hospedante y la tinción débil con las células de Schwann restantes inactivadas por congelación. Las descripciones que siguen se refieren a perfiles de células de Schwann teñidas intensamente (vivas), a menos que se indique otra cosa. En las regiones proximales de los injertos las distribuciones de las células de Schwann y los axones coincidieron

fundamentalmente, como se muestra en la Figura 7. Se encontraron agrupamientos ocasionales de axones sin ninguna asociación con las células de Schwann. Se vieron también células de Schwann dispersas en regiones sin axones en crecimiento. La migración de las células de Schwann fue muy clara en los injertos de 8 días. Sin embargo, en los puntos más distales de los injertos, se encontraron a menudo axones sin acompañamiento de células de Schwann, como se muestra en la Figura 7. Esto se confirmó en secciones longitudinales que incluyen la coaptación distal, como se muestra en la Figura 8. Las células de Schwann marcadas con S-100 fueron abundantes en los troncos distales del hospedante, aunque pocas de ellas, si alguna, invadieron la vista distal de los injertos (que contenían solamente células de Schwann remanentes inactivadas por congelación), como se muestra en la Figura 8B. Los ejemplos presentados en las figuras 7, 8A, y 8B, se obtuvieron de injertos tratados con condroitinasa y se observaron idénticos resultados en los injertos control. Estos hallazgos dieron a entender que el aumento del crecimiento axonal en injertos tratados con condroitinasa se atribuyó principalmente a la potenciación de la actividad promotora de neuritas de la lámina basal.

Se examinó la ruta del crecimiento axonal solamente en secciones longitudinales de los tejidos que rodean de forma adyacente las coaptaciones proximal y distal. Después de entrar en los injertos, el crecimiento de los axones se dirigió distalmente y no hubo ninguna indicación de desviación del crecimiento ni de formación de neuromas dentro de los injertos. Esto dio a entender que los mecanismos de orientación (o las propiedades quimioatrayentes asociadas con el tronco distal) no se habían puesto en peligro en los injertos tratados con condroitinasa. En adición, basándose en los pocos casos en los que los axones habían alcanzado la extensión distal del injerto, los axones salieron de los injertos y continuaron el crecimiento en el tronco nervioso del hospedante, como se muestra en la Figura 8A.

#### **Ejemplo 6. Degradación e inactivación de CSPG inhibitorio por el tratamiento de segmentos de nervios humanos acelulares con condroitinasa**

Muchos de los experimentos descritos en los ejemplos anteriores realizados utilizando nervios de rata han sido repetidos también utilizando nervios humanos. Excepto cuando se indique otra cosa, los procedimientos descritos en los Ejemplos 1 y 2 utilizando nervio de rata fueron seguidos también en los Ejemplos 6 y 7 utilizando nervio humano. Se obtuvieron los nervios humanos sural y tibial frescos procedentes de la amputación quirúrgica de la pierna. Las amputaciones fueron necesarias para enfermedades que no habían tenido implicación de nervios (por ejemplo, cáncer de huesos) y los nervios se consideraron normales basándose en el examen histológico.

En primer lugar se examinaron los nervios humanos para determinar si su contenido de CSPG y laminina era similar al observado en los nervios de rata. La inmunocitoquímica demostró que la lámina basal, que sostiene la regeneración del nervio, contenía tanto CSPG como laminina, que están colocalizados de la misma forma que en otras especies. Los nervios humanos teñidos para el neopéptido CSPG y la laminina se muestran, respectivamente, en las figuras 9A y 9B. Además, utilizando el bioensayo de criocultivo, se encontró que las propiedades promotoras del crecimiento de nervios humanos habían aumentado mediante el tratamiento con condroitinasa. Los resultados cuantitativos se muestran en la Figura 10.

#### **Ejemplo 7. Regeneración de axones dentro de injertos de nervios humanos tratados con condroitinasa**

En los siguientes experimentos, se analizó la hipótesis de que el tratamiento con condroitinasa mejora la regeneración del nervio a través de injertos de nervio humano acelulares en un modelo de xenoinjerto de rata. Subunidades (fascículos individuales) tomadas de nervios humanos se trataron en bloque con vehículo o con condroitinasa ABC. Se unieron injertos de nervio interposicionales de 10 mm al nervio ciático de la rata hospedante mediante neurografía epineural reforzada con goma de fibrina. Cada una de 2 ratas hospedantes recibió injertos bilaterales, un injerto tratado con vehículo y un injerto tratado con condroitinasa. Se examinó la regeneración inicialmente después de 8 días. Se evaluó el crecimiento axonal a intervalos espaciales especificados dentro del injerto puntuando los perfiles inmunopositivos para GAP-43 en secciones transversales.

El crecimiento en los injertos tratados con condroitinasa fue marcadamente mayor y más ampliamente distribuido que en los injertos control. Los resultados cuantitativos se muestran en la Figura 11. La media del número de axones (perfiles inmunopositivos para GAP-43) que entran en los injertos tratados con condroitinasa fue una media más de tres veces mayor que en los injertos control. Estos hallazgos indican que el éxito de la penetración axonal en los injertos de nervios humanos acelulares había mejorado marcadamente por el pretratamiento de los injertos con una enzima que degrada el CSPG. Este modelo de xenoinjerto demuestra también que los nervios humanos acelulares no fueron rechazados (antes de 8 días) por la rata hospedante, confirmando la baja inmunogenicidad de los nervios acelulares.

#### **Ejemplo 8. Degradación de CSPG en el nervio después de inyección de condroitinasa**

Los animales recibieron o una lesión bilateral por aplastamiento del nervio o un seccionamiento transversal bilateral del nervio y la reparación directa por sutura. Al mismo tiempo, se inyectó un nervio con condroitinasa ABC y el nervio contralateral recibió el vehículo solo. En primer lugar se examinó si el tratamiento con condroitinasa había degradado efectivamente el CSPG en los nervios lesionados. Las secciones de tejido del nervio en el sitio de la lesión y alrededor de él se inmunomarcaron utilizando anticuerpos del neopéptido de CSPG. Estos anticuerpos se

unen a nuevos epítomos creados sobre la proteína núcleo CSPG después de lisis de las cadenas de sulfato de condroitina por la condroitinasa ABC. En los nervios seccionados transversalmente cuatro días después de la lesión y de la aplicación de la condroitinasa, la inmunotinción del neopítomo de CSPG fue intensa en la coaptación y a lo largo del área de sección transversal del nervio distal varios mm periféricamente, como se muestra en las figuras 12A y 12B. El inmunomarcado intenso se observó también en varios mm de los nervios proximales. Se obtuvieron resultados similares en los nervios lesionados por aplastamiento, como se muestra en la Figura 12C. El marcado con el neopítomo CSPG de tejido cerca del sitio de la coaptación e inyección fue como mucho marginalmente más intenso cuando se aplicó un tratamiento secundario con condroitinasa a las secciones de tejido como parte del procedimiento de inmunotinción, como se muestra en la Figura 12D. Estos resultados indican que el tratamiento *in vivo* con condroitinasa ABC degradó sustancialmente, si no completamente, el CSPG en la matriz extracelular que rodea el sitio de inyección, incluyendo el sitio de lesión y reparación del nervio.

**Ejemplo 9. El tratamiento con condroitinasa no alteró la regeneración axonal después de la lesión por aplastamiento del nervio (axonotmesis)**

Se analizó la hipótesis de que el tratamiento con condroitinasa mejora el crecimiento axonal por todo el sitio de lesión del nervio por aplastamiento. Se alcanzó la axonotmesis bilateral mediante aplastamiento severo de los nervios ciáticos mientras se mantenía la continuidad de las vainas del nervio. En el momento de la lesión, se inyectó un nervio con condroitinasa ABC y el nervio contralateral recibió vehículo solo. Debido al rápido rebrote de los axones después de aplastamiento del nervio, se examinó el crecimiento axonal a través del sitio de lesión dos días después de la lesión. Los axones en regeneración se marcaron por inmunofluorescencia de GAP-43 y se puntuaron por análisis de imagen digital. Como era de esperar, en los nervios control, la regeneración axonal directamente distal al sitio de aplastamiento fue fuerte y extendida por toda la sección transversal del nervio, como se muestra en la Figura 13A. Se observaron una respuesta regenerativa y un patrón de crecimiento similares también en los nervios tratados con condroitinasa. En ambas condiciones, el inmunomarcado fue muy denso y se vieron numerosas neuritas con cada tubo de lámina basal. La evaluación cuantitativa de inmunorreactividad de GAP-43 demostró que la regeneración axonal después de lesión por aplastamiento del nervio no fue afectada significativamente por la aplicación de condroitinasa (Figura 13B). Asimismo, no hubo ninguna indicación de que la latencia o velocidad de regeneración axonal estuviera alterada en los nervios tratados con condroitinasa.

**Ejemplo 10. Regeneración de axones después del seccionamiento transversal de nervios (neurotmesis), la reparación mejorada por el tratamiento con condroitinasa**

Se analizó la hipótesis de que el tratamiento con condroitinasa mejora el crecimiento axonal a través del sitio de coaptación del nervio. Se alcanzó la neurotmesis bilateral mediante el corte con una tijera de los nervios ciáticos que fueron reparados después por sutura epineural y goma de fibrina. Se inyectó un nervio con condroitinasa ABC y el nervio contralateral recibió vehículo solo. Debido a la latencia de regeneración después del seccionamiento transversal, se examinó el crecimiento axonal del nervio a través de la coaptación cuatro días después de la lesión. En los nervios control, el acceso de los axones tuvo lugar principalmente en parches y se limitó a subsecciones diferenciadas del nervio distal; aparte de eso solamente algunos axones se encontraron dispersados por toda la sección transversal del nervio restante, como se muestra en la Figura 14A. El número de axones que se extienden más lejos dentro del distal (después de 4 días) disminuyó rápidamente y se aproximó a cero dentro de los 3 mm de la coaptación. En contraste, el acceso de los axones en los nervios tratados con condroitinasas fue más fuerte y dispersado por toda la sección transversal del nervio. En 7 de 7 animales, el número de axones que entraron en el nervio distal fue mayor en el nervio tratado con condroitinasa que en el nervio control. Como media, la puntuación de axones inmediatamente distales a la coaptación fue dos veces mayor en los nervios tratados con condroitinasa, y en 3 de 7 animales había aumentado más de 3,5 veces, como se muestra en la Figura 14B. La relación del número de axones en los nervios tratados con condroitinasa comparados con los nervios control aumentó progresivamente desde 2:1 (justo pasando la coaptación) hasta más de 4:1 en los puntos más lejos dentro del tronco distal. Por lo tanto, en adición al aumento del número de axones que invaden el nervio distal, el tratamiento con condroitinasa redujo también la latencia del acceso axonal y/o aumentó la velocidad de crecimiento dentro del segmento del nervio distal. Quedó claro que el crecimiento de axones en todas las porciones del nervio distal fue estrictamente lineal y alineado con el eje longitudinal del nervio. En adición, el doble-inmunomarcado para los axones de regeneración (GAP-43) y para las láminas basales (laminina) indicó que la fuerte propensión de los axones a volver a crecer dentro de las láminas basales del nervio distal no fue alterada por el tratamiento con condroitinasa.

Estos hallazgos demuestran que el rebrote axonal después de la lesión por aplastamiento fue similar en los nervios tratados con condroitinasa que en los nervios control. Por contraste, el rebrote axonal se aceleró a través de la coaptación de nervios seccionados transversalmente y el acceso de axones al segmento distal aumentó varias veces en los nervios inyectados con condroitinasa. Por lo tanto, en la lesión por seccionamiento transversal cuando se rompe la continuidad del nervio, la aplicación de condroitinasa aumentó significativamente la capacidad de los axones para acceder a las láminas basales del segmento distal del nervio y aumentó de forma notable la regeneración.

De acuerdo con la presente invención, una única inyección de condroitinasa puede mejorar marcadamente la regeneración axonal a lo largo de la interfase de los nervios periféricos coaptados. La degradación de CSPG inhibitorio crea un sustrato nervioso más permisivo y permite brotes de axones de mayor flexibilidad para localizar y

acceder a las láminas basales de las células de Schwann del nervio distal. La dificultad de que los axones se enfrenten en este proceso se pone en evidencia por el aumento de la latencia asociado con la regeneración después de la lesión por seccionamiento transversal comparada con la lesión por aplastamiento. Notablemente, los datos sugieren que un efecto importante del tratamiento con condroitinasa es reducir la latencia de regeneración en el modelo de seccionamiento transversal de los nervios periféricos. En adición, es sabido que los brotes axonales degenerarán si no atraviesan la coaptación (Fu, S. Y, and T. Gordon 1997, *Mol Neurobiol* 14: 67-116).

#### **Ejemplo 11. La actividad promotora de neuritas de los segmentos de nervios cultivados**

Se cultivaron durante 7 días, segmentos de nervio ciático de rata (celular) recientemente extirpados en medio que contenía 0, 2 y 10 % de suero fetal bovino. Se crioseccionaron los nervios control (sin cultivar) y los nervios cultivados y se evaluó su actividad promotora de neuritas mediante un ensayo de criocultivo. Los resultados se muestran en la Figura 15A. Las neuronas DRG de embrión de pollo crecidas en las secciones de los nervios control tenían una longitud media de neuritas de 118  $\mu\text{m}$ . El crecimiento neurítico sobre las secciones de explantes de nervio cultivados durante 1-4 días fue significativamente mayor. Para los nervios cultivados en medio definido (0 % de suero), la actividad promotora de neuritas alcanzó un máximo a los 2 días *in vitro*, lo que representa un 43 % de aumento comparado con los nervios control. Hubo más de un 70 % de aumento en la actividad promotora de neuritas para los explantes de nervios cultivados durante 1 o 2 días en medio que contenía 2 % de suero. Los explantes de nervios cultivados en 10 % de suero también alcanzaron un máximo similar a los 2 días *in vitro*. La actividad promotora de neuritas de los explantes de nervios disminuyó después de períodos más largos de cultivo y cayó por debajo del nivel de control a los 7 días. Estos datos indican que la actividad promotora de neuritas de los explantes de nervios aumentó de forma marcada cuando se cultivaron durante cortos períodos *in vitro* con y sin la adición de suero al medio de cultivo. Se evitó que los explantes de nervios se adhirieran al vaso de cultivo y no se observó ningún brote celular. Sin embargo, se confirmó la viabilidad de las células en todas las condiciones en experimentos separados en los que se observó una fuerte migración celular desde los explantes de nervios que fueron troceados y presionados sobre la superficie de cultivo.

#### **Ejemplo 12. Comparación de la predegeneración *in vitro* e *in vivo***

Utilizando el ensayo de criocultivo, se comparó la actividad promotora de neuritas de los nervios ciáticos de rata predegenerados *in vitro* con la de los predegenerados *in vivo*. Como se ha descrito anteriormente (véase las figuras 15A y 15B), el crecimiento neurítico de las neuronas DRG sobre explantes de nervios cultivados durante 2 días en 2 % de suero (predegeneración *in vitro*) fue 70 % mayor que en los nervios control (no predegenerados). También, el cultivo de explantes de nervios durante períodos más largos (4 y 7 días) dio como resultado una actividad promotora de neuritas progresivamente menor. Los nervios cultivados durante 7 días tuvieron 37 % menos actividad que el control. Por comparación, la actividad promotora de neuritas de los nervios predegenerados *in vivo* fue mucho más baja que la de los predegenerados *in vitro*. El crecimiento neurítico sobre los nervios predegenerados *in vivo* durante 2 días fue 35,8  $\mu\text{m}$ , 72 % menos de actividad que el control (126,5  $\mu\text{m}$ ) (prueba t,  $p < 0,001$ ). Sin embargo, esta inhibición se invirtió con el tiempo y la predegeneración *in vivo* durante 7 días dio como resultado un crecimiento neurítico 12 % mayor que el control ( $p = 0,06$ ). Estos datos demuestran que la predegeneración *in vitro* aumentó la actividad promotora de neuritas de los segmentos de nervio en mayor medida que la alcanzada por la predegeneración *in vivo*.

#### **Ejemplo 13. La degeneración *in vitro* es MMP-dependiente**

Se cultivaron segmentos de nervio durante 2 días en medio que contiene 2 % de suero con y sin la adición del inhibidor de la MMP, GM6001. Se evaluó la actividad promotora de neuritas de los nervios cultivados por un ensayo de criocultivo. Los resultados se muestran en la Figura 15B. De modo similar a lo mostrado en la Figura 15A, la longitud media de las neuritas de las neuronas DRG crecidas sobre los nervios cultivados (2 días, 2 % de suero) fue 210  $\mu\text{m}$ , lo que representa un 68 % de aumento sobre la de los nervios control (sin cultivar). Sin embargo, este aumento se redujo a solamente el 14 % para los nervios cultivados en presencia de GM6001. El cultivo de disociación (preparaciones aplastadas) de los segmentos de nervio en cada condición presentó un profuso brote de células que indica que no hay pérdida de la viabilidad celular. En adición, el tratamiento de cultivos aislados de células de Schwann con GM6001 confirmó la toxicidad muy baja de este dipéptido basado en *hydromate*. Estos resultados implican fuertemente la actividad de la MMP en un proceso degenerativo que aumenta la actividad promotora de neuritas de los explantes de nervios cultivados.

#### **Ejemplo 14. Expresión de MMP en los segmentos de nervios cultivados: análisis zimográfico en gel**

Las MMP-2 y MMP-9 son las principales proteinasas extracelulares capaces de degradar la gelatina (colágeno escindido) y su principal sustrato es el colágeno tipo IV de la lámina basal. La MMP-2 es expresada constitutivamente por las células de Schwann *in vivo* y es regulada por incremento después de la lesión del nervio en la rata. Por otro lado, la MMP-9 es indetectable en el nervio normal y está presente después de la lesión en asociación con los granulocitos y macrófagos invasores. El examen de la degeneración del nervio *in vitro* en la presente invención proporciona una oportunidad única para determinar el papel de la expresión de MMP por las células del nervio residentes con una mínima contribución por las células hematogénicas. Los niveles de MMP en explantes de nervios cultivados fueron examinados en primer lugar por electroforesis en gel recubierto con sustrato

de gelatina (zimografía). La zimografía en gelatina es muy sensible en la detección de MMP-2 y MMP-9 y tiene la ventaja añadida de revelar tanto la forma latente como la activada. Se cultivaron los segmentos de nervio durante 1, 2, 4 y 7 días en presencia de 2 % de suero. En la Figura 16 se muestra un análisis zimográfico representativo de los nervios extraídos. El nervio normal (control sin cultivar) presentó una banda gelatinolítica predominante a Mr=72 kD que coemigró con la proforma de MMP-2 humana recombinante. Se observaron trazas de la MMP-2 activada (Mr=66 kD), mientras que la MMP-9 (Mr=92 y 84 kD) no se detectó. En los nervios cultivados, hubo un rápido incremento de la MMP-2 activada y un incremento sustancial en el contenido total de MMP-2. La MMP-9 fue indetectable en los nervios cultivados durante 1 o 2 días y se detectaron cantidades trazas de MMP-9 activada en las muestras de los días 4 y 7. Se obtuvieron resultados similares para los explantes de nervios cultivados en medio definido, lo que confirma que el suero no contribuyó a la actividad gelatinolítica observada en las muestras de nervios. Estos hallazgos indican que la MMP-2 se activa rápidamente y se regula por incremento en la degeneración del nervio *in vitro*. Es notable que la zimografía en gelatina sea varias veces más sensible para detectar la MMP-9 que para la MMP-2. (Ladwig *et al.* [2002] *Wound Repair Regen* 10: 26-37), lo que significa que el contenido de MMP-9 en las muestras de nervios era despreciable.

#### 15 **Ejemplo 15. Actividad de MMP en los segmentos de nervios cultivados: zimografía *in situ***

La actividad de las MMP se regula por transcripción génica, activación proenzimática y por la acción de inhibidores tisulares de las metaloproteinasas. Se examinó la actividad gelatinolítica neta en los segmentos de nervios por zimografía *in situ*. Se cubrieron secciones de tejido con gelatina con fluoresceína apagada, que se convierte en péptidos fluorescentes por la actividad gelatinolítica dentro de los tejidos. Se detectó la actividad gelatinolítica constitutiva en el nervio normal principalmente asociada a las células de Schwann alineadas a lo largo de la lámina basal endoneural (como se muestra en las figuras 17A y 17B). En los nervios cultivados hubo un aumento generalizado de la actividad gelatinolítica que fue difusa dentro del endoneurio y las células de Schwann se marcaron más intensamente, como se muestra en las figuras 17C y 17D. Se examinó también, la actividad gelatinolítica en los nervios cultivados en presencia de GM6001. Como se ha descrito anteriormente, el GM6001 bloqueó los aumentos de la actividad promotora de neuritas observada en los nervios cultivados. La actividad gelatinolítica en los explantes de nervios tratados con GM6001 fue casi indetectable, como se muestra en las figuras 17E y 17F. Estos hallazgos juntos indican que la actividad gelatinolítica aumentó notablemente por el cultivo de explantes de nervios y que el GM6001 bloqueó efectivamente *de novo* la actividad de MMP durante la degeneración *in vitro*.

#### 30 **Ejemplo 16. Localización de MMP en los segmentos de nervios cultivados: marcado inmunofluorescente**

Se examinaron las distribuciones de MMP-2 y MMP-9 en los explantes de nervios cultivados durante 2 días por microscopía de inmunofluorescencia. El inmunomarcado de la MMP-2 de los nervios de cultivo fue intenso dentro de las células de Schwann y las láminas basales que las rodean, como se muestra en la Figura 18A. La tinción de las células de Schwann con S-100 indicó que el inmunomarcado más intenso de la MMP-2 estaba asociado con las células de Schwann migratorias (Figura 18B; y véase más adelante). También, la inmunoexpresión de MMP-2 fue muy similar al patrón de actividad gelatinolítica obtenido por zimografía *in situ*. Por otro lado, el inmunomarcado de la MMP-9 estuvo virtualmente ausente dentro de los fascículos nerviosos, excepto para perfiles celulares raros. Se vio alguna inmunoexpresión celular de MMP-9 en el epineurio circundante, como se muestra en la Figura 18C. El marcado con OX42 se utilizó para identificar los macrófagos que estaban extendidos a lo largo del epineurio y raramente dentro de los fascículos nerviosos de los nervios cultivados, como se muestra en la Figura 18D. Las distribuciones compartimentales de marcado de MMP-9 y OX42 sugirieron que los macrófagos eran la fuente principal de la MMP-9. En adición, las células de Schwann, y quizás algunos fibroblastos perineurales, expresaron la MMP-2 y la inmunorreactividad de MMP-2 se observó también difusamente en la matriz extracelular circundante.

#### 45 **Ejemplo 17. Distribuciones celulares y degeneración axonal en los segmentos de nervios cultivados**

Después de la lesión del nervio las células de Schwann se activaron, disociaron su mielina y emigraron ampliamente. El inmunomarcado por S-100 de los explantes de nervios cultivados demostró que muchas células de Schwann habían perdido su morfología alargada y la estrecha asociación con los axones, típico de la respuesta a la lesión, como se muestra en la Figura 18B. Como era de esperar cuando se desconectaron del sistema circulatorio, el número de macrófagos en los explantes de nervios fue muy inferior al observado en la degeneración del nervio *in vivo*. Además, se encontraron muy pocos macrófagos dentro de los fascículos nerviosos y casi todas las células marcadas con OX42 se limitaron al epineurio, como se muestra en la Figura 18D. Era claro que los macrófagos presentes en el compartimento epineural al tiempo de la extirpación del nervio no invadieron los compartimentos internos del nervio durante el cultivo. Por consiguiente, los explantes de nervios *in vitro* representan un modelo de degeneración de nervios en el que se puede evaluar la contribución de las células de Schwann independientemente de la de los macrófagos invasores.

Se examinó la degradación de los axones en los explantes de nervios cultivados mediante inmunomarcado de neurofilamentos. Los resultados se muestran en las figuras 19A-19D. A diferencia de la tinción del neurofilamento contiguo observada en el nervio normal, mostrada en la Figura 19A, los perfiles de neurofilamento en los segmentos de nervios cultivados durante 2 días fueron fragmentados e irregulares, como se muestra en la Figura 19B. Similarmente a la degeneración axonal *in vivo*, los nervios cultivados contenían perfiles de neurofilamento tanto

anulares como condensados, indicativos de la desintegración del citoesqueleto y de la degeneración axonal. La degeneración de los axones fue especialmente obvia en las secciones semi-delgadas teñidas con azul de toluidina que mostraron un vacío o un sedimento denso dentro de las vainas de mielina residuales, como se muestra en la Figura 19D. Los cambios degenerativos observados en los nervios cultivados durante 2 días fueron reminiscencias de la fase inicial de la degeneración de Wallerian vista *in vivo* (revisado por Stoll and Muller, 1999, *Brain Pathol* 9: 313-325). Las principales características de la fase secundaria de la degeneración de Wallerian se observaron también en los nervios cultivados incluyendo cambios morfológicos en la vaina de mielina y extrusión de la mielina por las células de Schwann, así como la proliferación de las células de Schwann, como se muestra en la Figura 19D. Sin embargo, los procesos degenerativos produjeron una degeneración adicional de mielina (colapso y condensación) y no tuvo lugar la separación fagocítica en los cultivos de explantes de nervios a los 2 días. A pesar de las alteraciones degenerativas sustanciales, el soporte de la lámina basal permaneció estructuralmente intacto y la remodelación estuvo indicada por el alto nivel de expresión de laminina por las células de Schwann, como se muestra en la Figura 19C.

### Ejemplo 18. Nervios cultivados como injertos interposicionales acelulares

El presente experimento comprueba la hipótesis de que la predegeneración *in vitro* mejora la regeneración de nervios por medio de aloinjertos de nervios acelulares. Las ratas hospedantes recibieron injertos bilaterales de nervios acelulares, uno control (no predegenerado) y uno predegenerado *in vitro* (cultivado durante 2 días en 2 % de suero). Se observó la regeneración axonal después de 8 días puntuando los perfiles inmunopositivos para GAP-43 en las secciones transversales. Se observó crecimiento axonal en todos los injertos y se distribuyó centralmente, lo que indica un buen alineamiento y coaptación del nervio proximal del hospedante y del injerto, como se muestra en las figuras 20A y 20B. En 6 de 6 animales, el número de axones que cruzaron la coaptación proximal nervio-injerto y entraron en el injerto fue mayor en el injerto predegenerado *in vitro* que en el injerto control contralateral. Como media, la puntuación de axones dentro de los injertos predegenerados *in vitro* fue dos veces mayor, como se muestra en la Figura 20B. En ambas condiciones de injerto, el crecimiento axonal tuvo lugar dentro de tubos de lámina basal y fue acompañado de las células de Schwann derivadas del hospedante. Estos hallazgos demuestran que la regeneración axonal en los injertos de nervios acelulares se aumenta con la predegeneración *in vitro*.

La degeneración aumenta las propiedades promotoras del crecimiento de los nervios periféricos desnervados y de los injertos de nervio derivados. El presente experimento investigó el papel de las MMP en este proceso degenerativo utilizando un modelo de cultivo de explantes de nervios. También, puesto que no es factible la predegeneración del nervio *in vivo* para la preparación de aloinjertos humanos, se examinaron los atributos de los injertos de nervios predegenerados *in vitro*. Los resultados del presente experimento apoyan las siguientes conclusiones. En primer lugar, las etapas iniciales de la degeneración de Wallerian tienen lugar en cultivo a corto plazo de explantes de nervios periféricos, a pesar de la ausencia de macrófagos hematogénicos. La actividad promotora de neuritas de los segmentos se aumenta notablemente por la degeneración *in vitro* y en mayor medida que en el nervio predegenerado *in vivo*. El aumento de la actividad promotora de neuritas que resulta de la degeneración *in vitro* se atribuye a una mayor expresión y activación de MMP-2 por las células de Schwann. En último lugar, la predegeneración *in vitro* aumenta la regeneración axonal en los injertos de nervios interposicionales acelulares.

El presente experimento de degeneración de nervios periféricos *in vitro*, encuentra que la MMP-9 está presente en cantidades trazas asociada principalmente con una población menor de células limitadas a la vaina epineural. El inmunomarcado para MMP-9 está esencialmente ausente en el compartimento endoneural de los nervios cultivados. Por contraste, la MMP-2, particularmente la forma activada, aumenta rápidamente dentro del endoneurio en los nervios cultivados. Tomados junto con la inmunolocalización y los datos de la zimografía *in situ*, los datos experimentales llevan a la conclusión de que la MMP-2 es expresada por las células de Schwann y la enzima activa es liberada en el endoneurio circundante durante la degeneración del nervio *in vitro*.

Combinados con las presentes observaciones de explantes de nervios, los datos experimentales muestran que la MMP-2 representa un suficiente, si no principal, mecanismo degenerativo para el aumento de las propiedades promotoras del crecimiento de nervios desnervados (e injertos de nervios predegenerados).

De acuerdo con la presente invención, el cultivo de explantes de nervios, utilizando condiciones para apoyar la viabilidad y el crecimiento de las células, permite la degeneración mediada por células y aumenta significativamente el potencial regenerativo de los injertos de nervios. Los explantes de nervios se pueden desvitalizar por congelación y se pueden conservar congelados para un uso posterior como injertos de nervios interposicionales. La desvitalización por congelación de los injertos de nervios elimina virtualmente los problemas de inmunorrechazo del injerto. Por esta razón los injertos de nervios acelulares tienen un mayor potencial para aplicaciones clínicas que los injertos de nervios celulares en la implantación de aloinjertos sin inmunodepresión.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para preparar un injerto de nervio para implantación, que comprende en cualquier orden, degradar el proteoglicano sulfato de condroitina del injerto de nervio *in vitro* utilizando una enzima que degrada el proteoglicano sulfato de condroitina y hacer que el injerto de nervio sea acelular.
- 5 2. El método según la reivindicación 1, en el que la degradación del proteoglicano sulfato de condroitina del injerto de nervio comprende aplicar al injerto de nervio mediante inyección o como un líquido, formulación fluida, pomada, gel, crema, o película, una enzima que degrada el proteoglicano sulfato de condroitina.
3. El método según la reivindicación 1, en el que la degradación del proteoglicano sulfato de condroitina del injerto de nervio comprende cultivar el injerto de nervio antes de hacer que el injerto de nervio sea acelular, y en el que la enzima que degrada el proteoglicano sulfato de condroitina es expresada por células del injerto de nervio.
- 10 4. El método según la reivindicación 3, en el que el cultivo tiene lugar durante un periodo de tiempo dentro del intervalo de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 96 horas.
5. El método según la reivindicación 3, en el que el cultivo tiene lugar a una temperatura dentro del intervalo de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 37 °C.
- 15 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que la degradación del proteoglicano sulfato de condroitina del injerto de nervio comprende cultivar el injerto de nervio y aplicar al injerto de nervio mediante inyección o como un líquido, formulación fluida, pomada, gel, crema, o película, una enzima que degrada el proteoglicano sulfato de condroitina.
- 20 7. El método según la reivindicación 2 o la reivindicación 6, en el que la enzima que degrada el proteoglicano sulfato de condroitina aplicada produce la lisis de condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato, o ambos condroitina-4-sulfato y condroitina-6-sulfato dentro del injerto de nervio.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 2, 6, o 7, en el que la enzima que degrada el proteoglicano sulfato de condroitina aplicada se selecciona del grupo que consiste en una condroitinasa, una hialuronidasa, una metaloproteínasa de la matriz, un fragmento o variante biológicamente activo de las mismas y las combinaciones de las mismas.
- 25 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 2, 6, o 7, en el que la enzima que degrada el proteoglicano sulfato de condroitina aplicada se selecciona del grupo que consiste en condroitinasa ABC, condroitinasa A, condroitinasa C, condroitinasa AC, metaloproteína-2 de la matriz, metaloproteína-9 de la matriz y las combinaciones de las mismas.
- 30 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el hacer que el injerto de nervio sea acelular comprende al menos un procedimiento entre la desvitalización por congelación y la extracción química con detergentes.
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el injerto de nervio comprende tejido nervioso periférico.
- 35 12. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el injerto de nervio comprende tejido del sistema nervioso central.
13. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el injerto de nervio comprende tejido de mamífero.
14. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el injerto de nervio es un autoinjerto.
- 40 15. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el injerto de nervio es un aloinjerto.
16. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el método comprende además congelar el injerto de nervio para conservación.
17. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el método comprende además añadir al menos una célula al injerto de nervio.
- 45 18. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el método comprende además aplicar un corte quirúrgico al injerto de nervio, en el que el corte quirúrgico facilita al menos un resultado entre proporcionar estimulación eléctrica al injerto de nervio y registrar la actividad eléctrica del nervio.
19. Un injerto de nervio obtenible por el método descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-18.



FIG. 1A

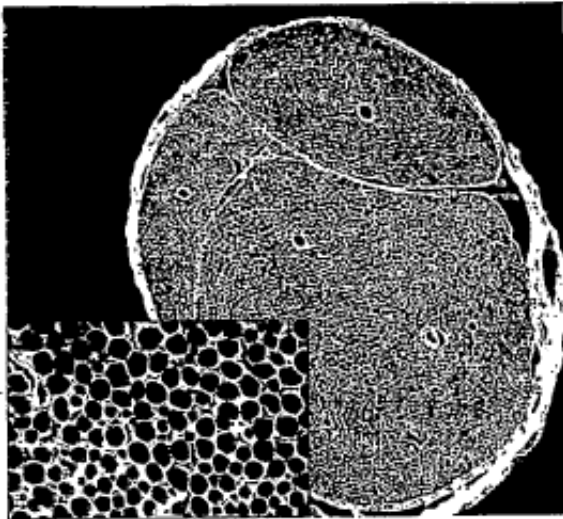


FIG. 1B

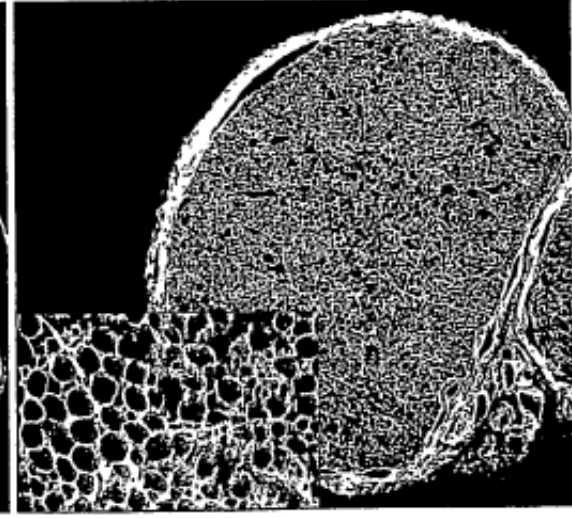
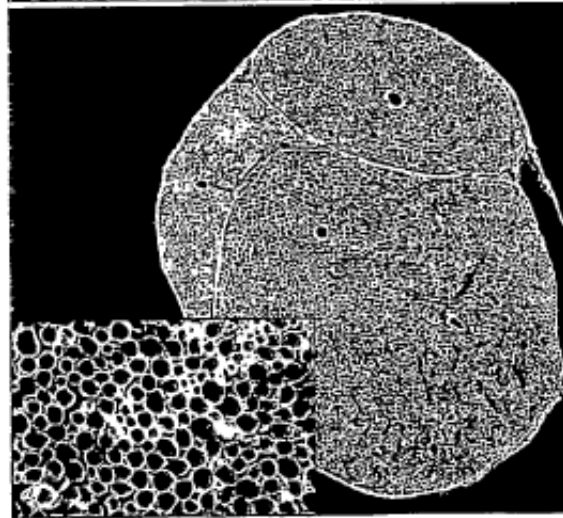
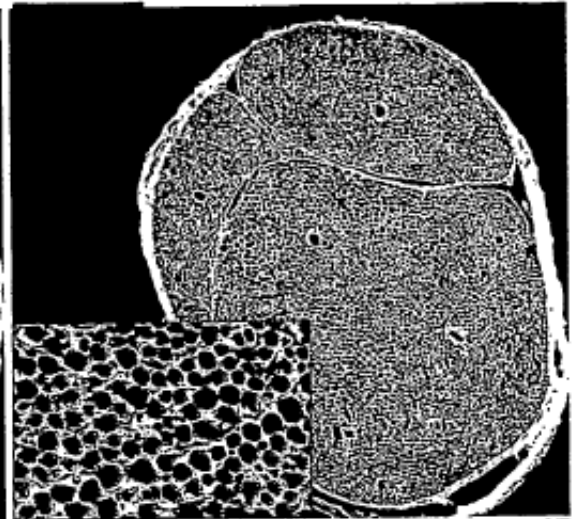


FIG. 1C

FIG. 1D

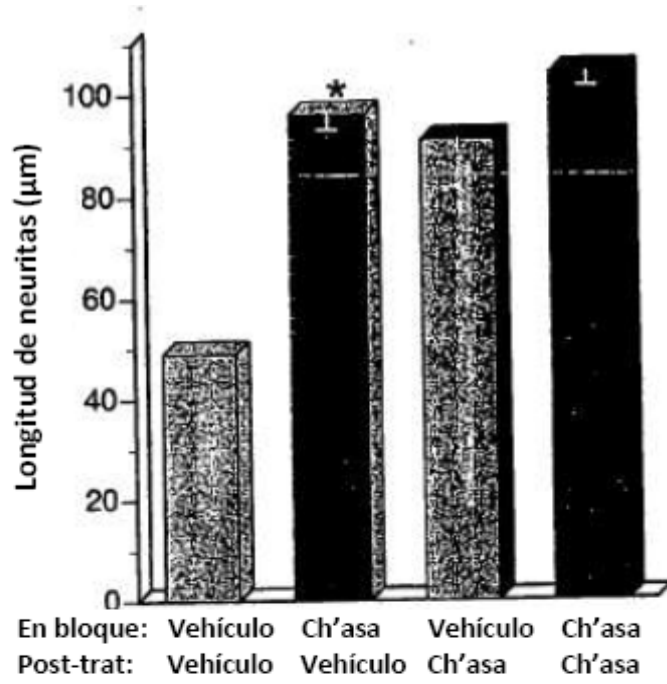


FIG. 2

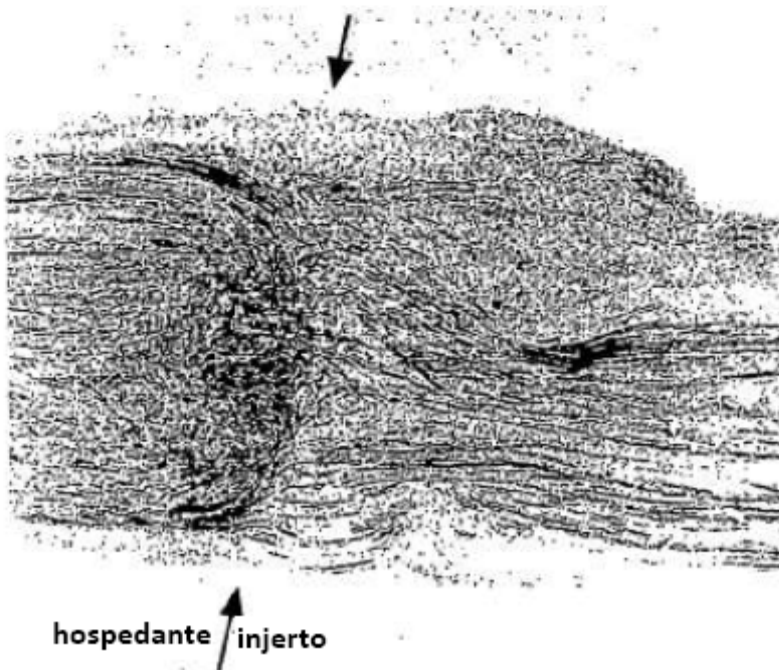


FIG. 3

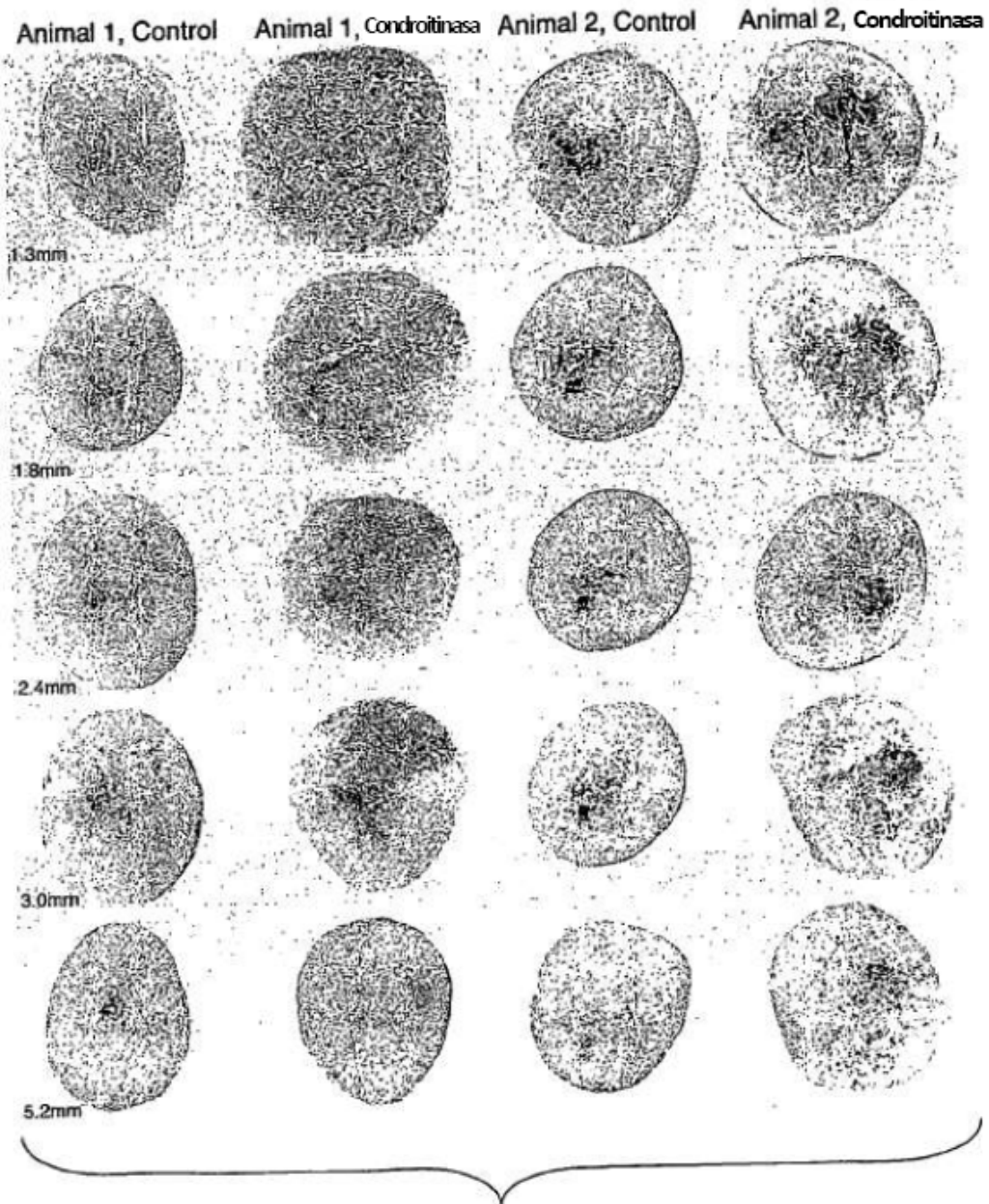


FIG. 4

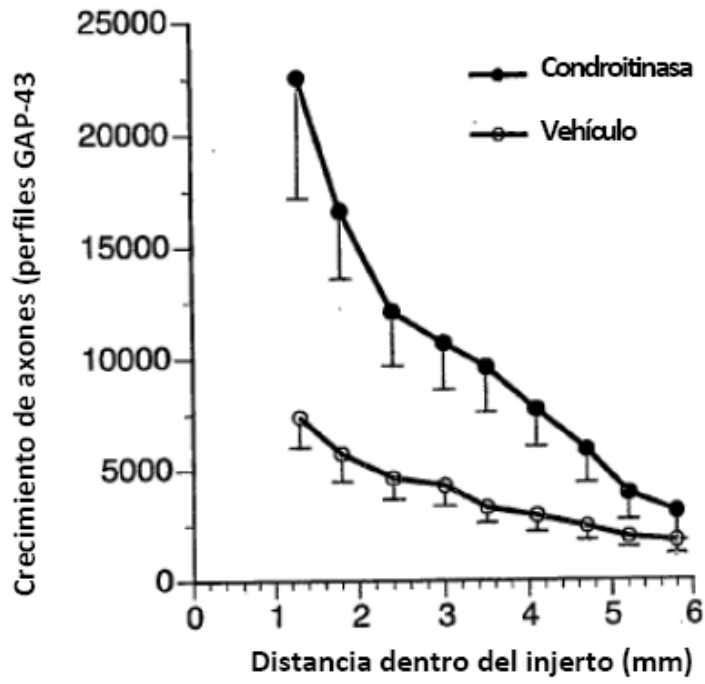


FIG. 5

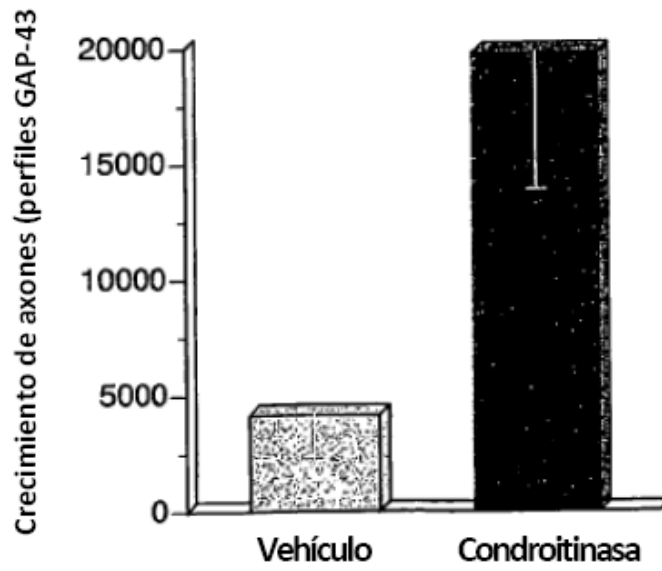


FIG. 6

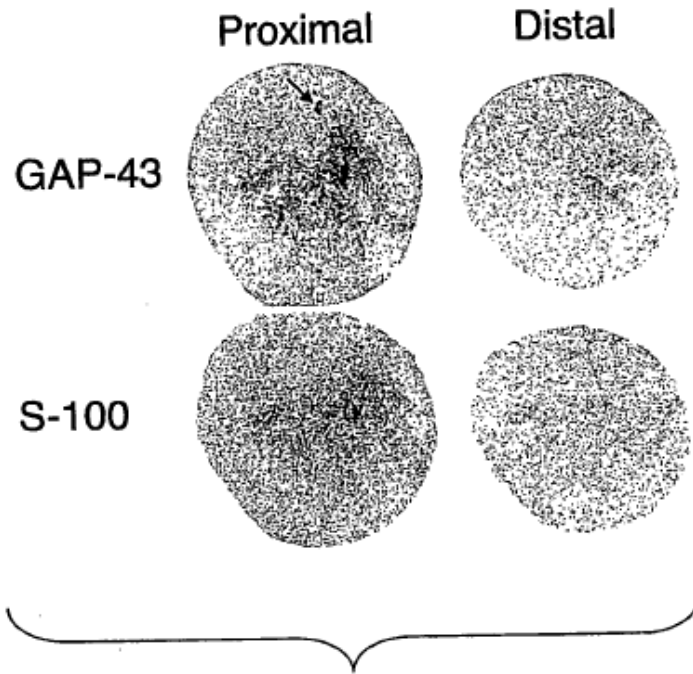


FIG. 7

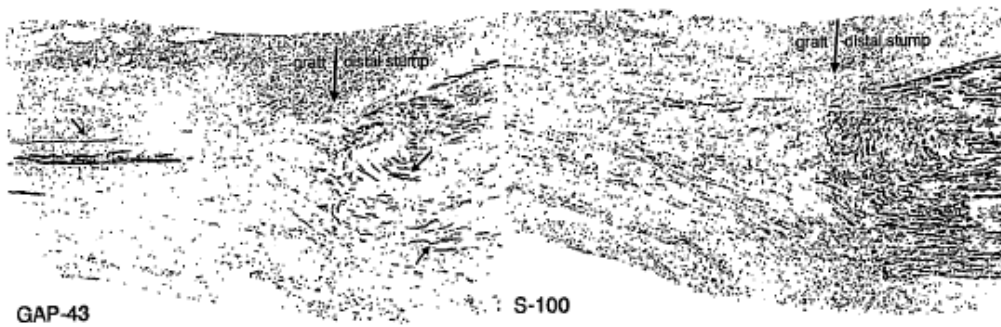


FIG. 8A

FIG. 8B

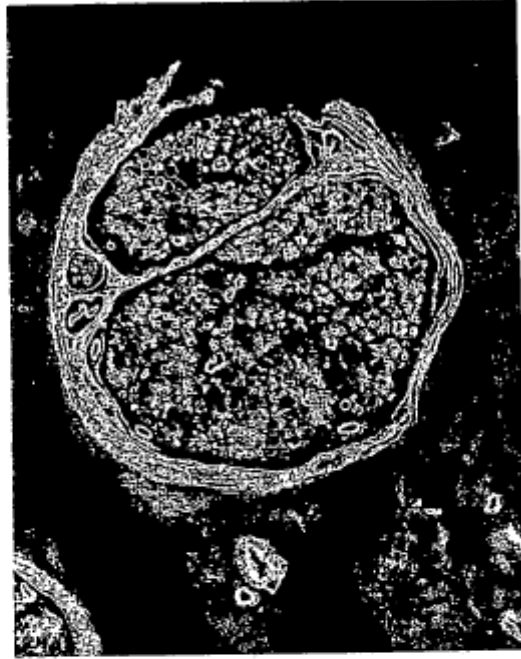


FIG. 9B



FIG. 9A

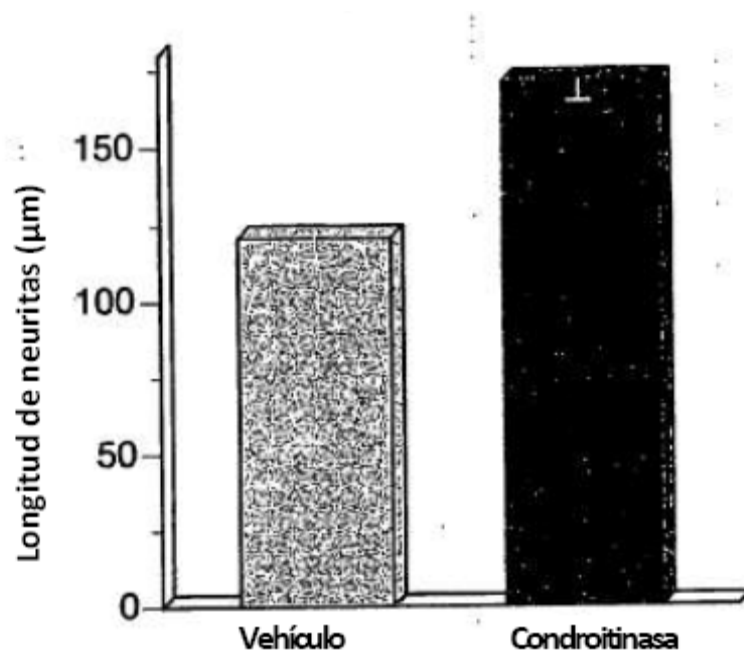


FIG. 10

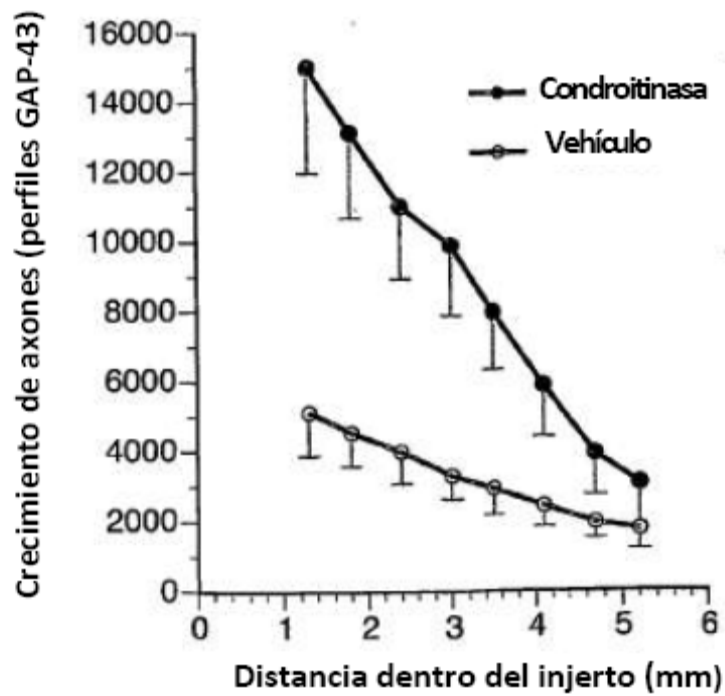


FIG. 11

FIG. 12A

FIG. 12B

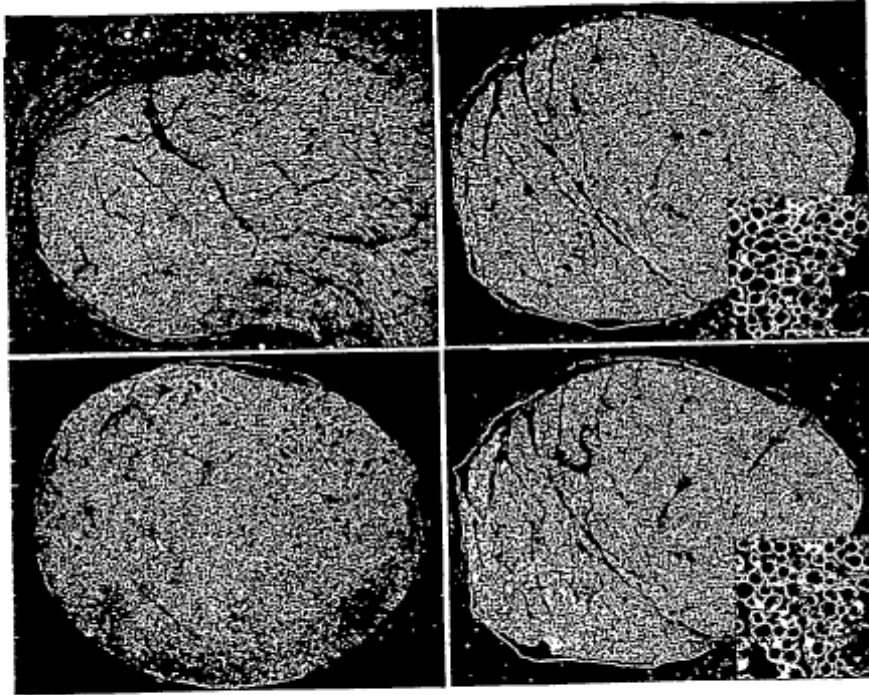


FIG. 12C

FIG. 12D



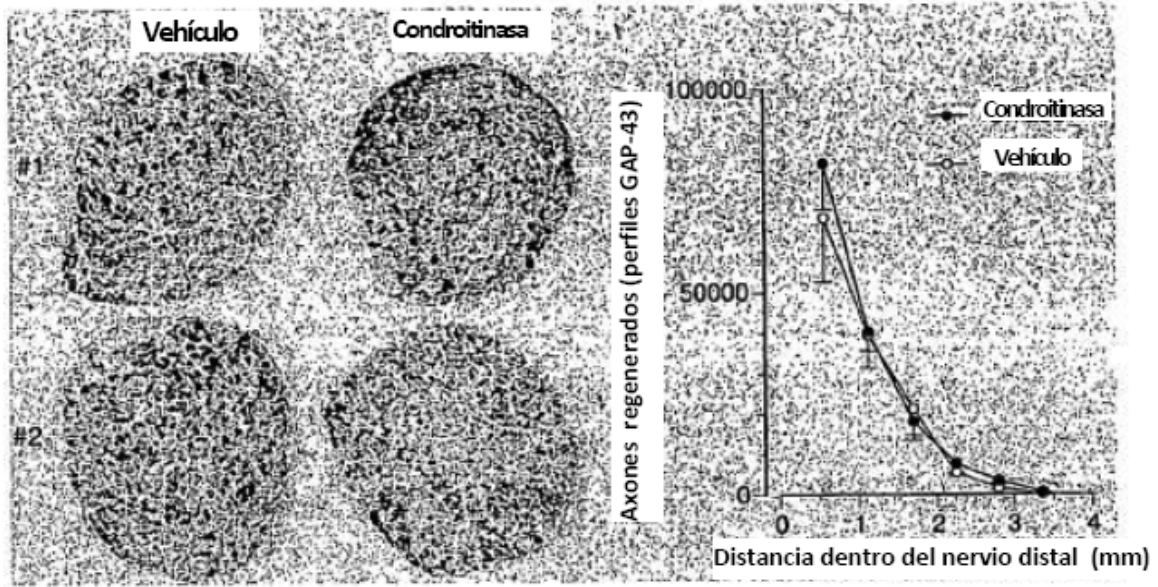


FIG. 13A

FIG. 13B

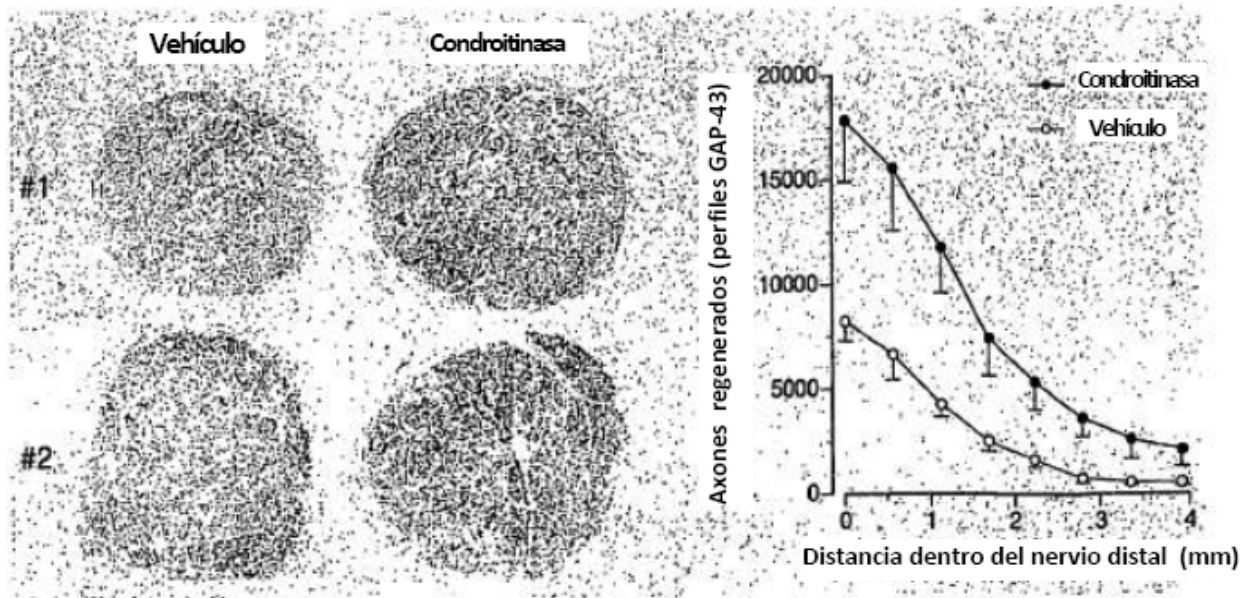


FIG. 14C

FIG. 14D

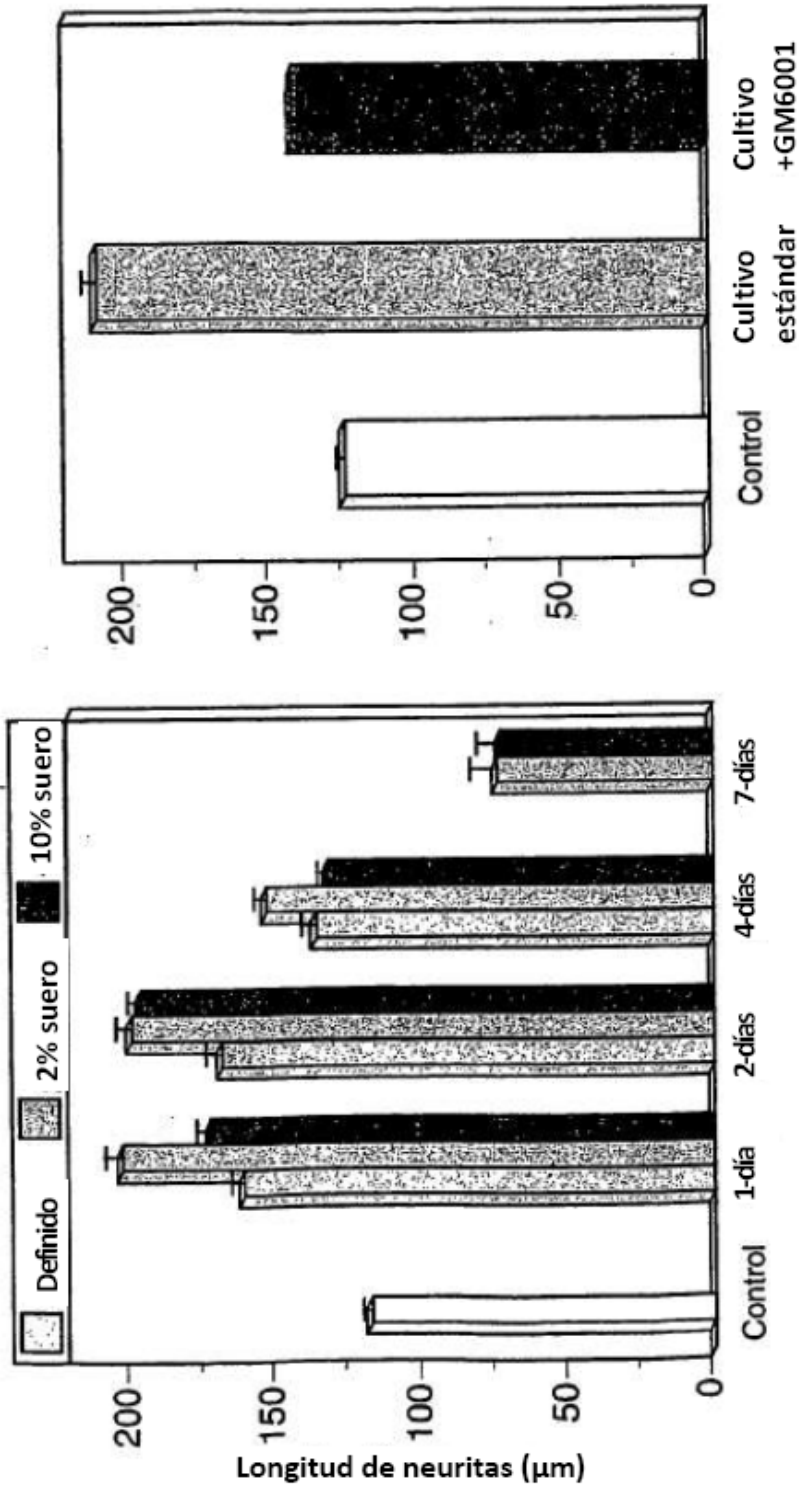


FIG. 15B

FIG. 15A

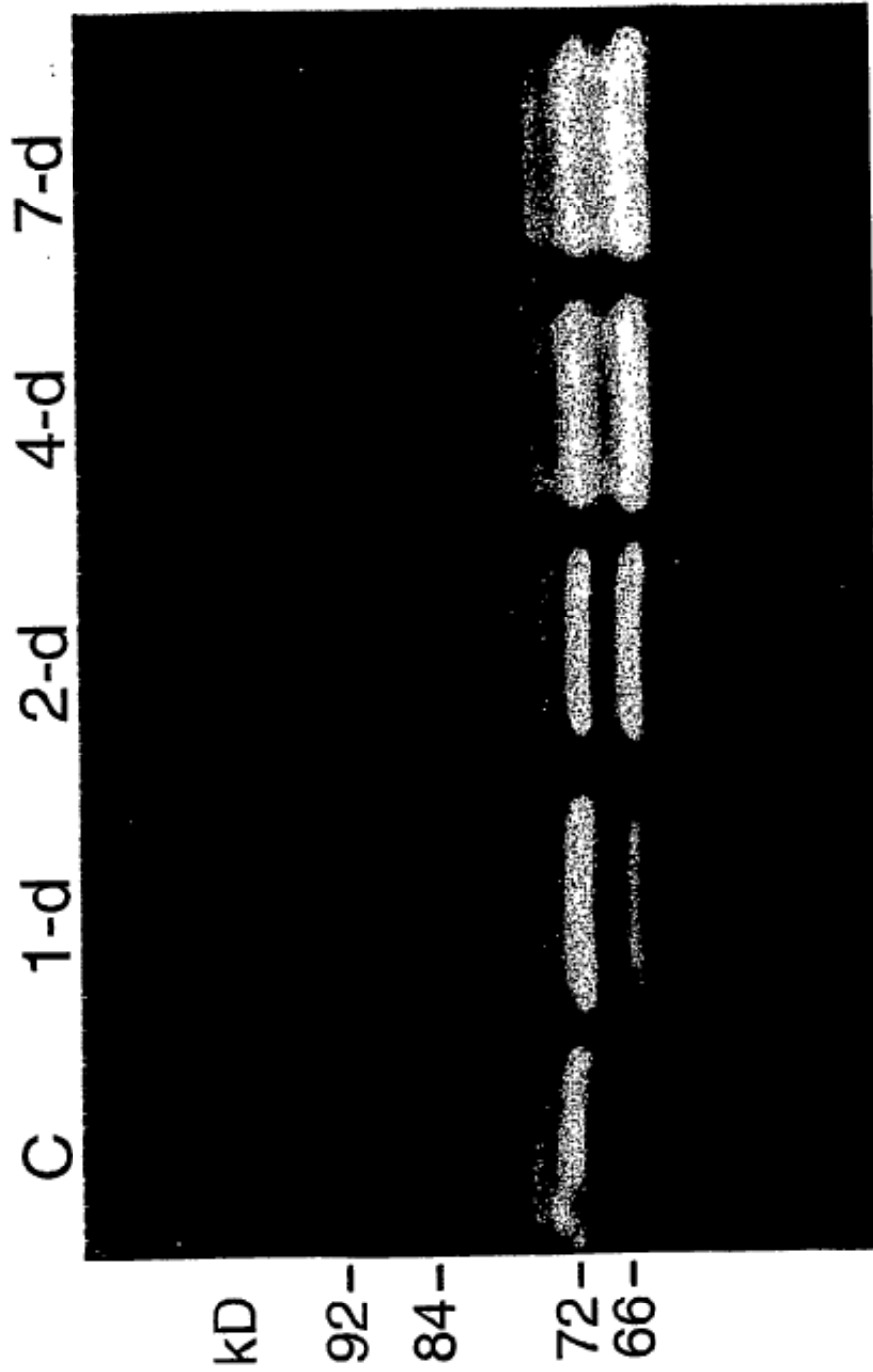


FIG. 16

FIG. 17B

FIG. 17D

FIG. 17F

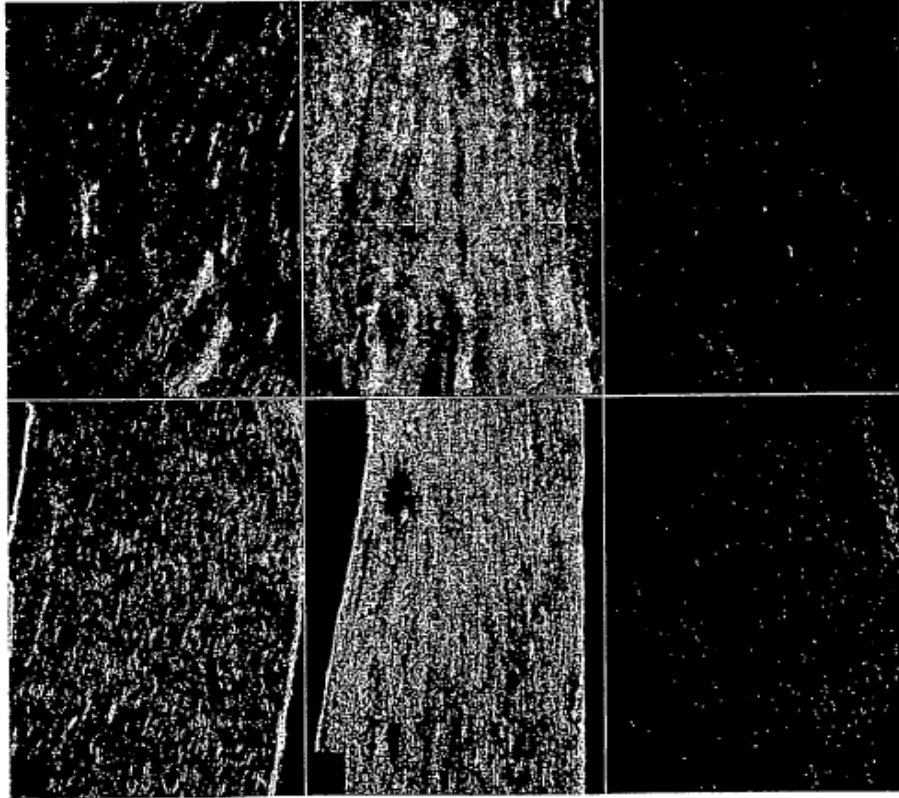


FIG. 17A

FIG. 17C

FIG. 17E

FIG. 18B

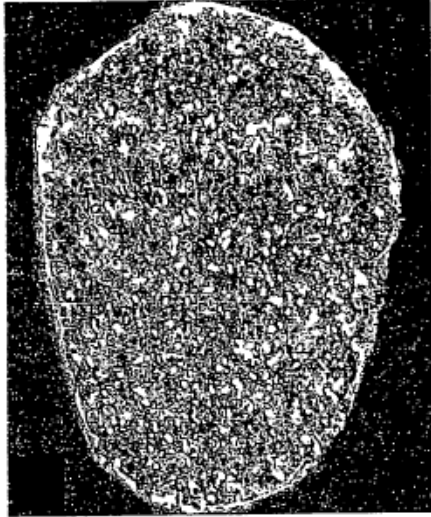


FIG. 18D

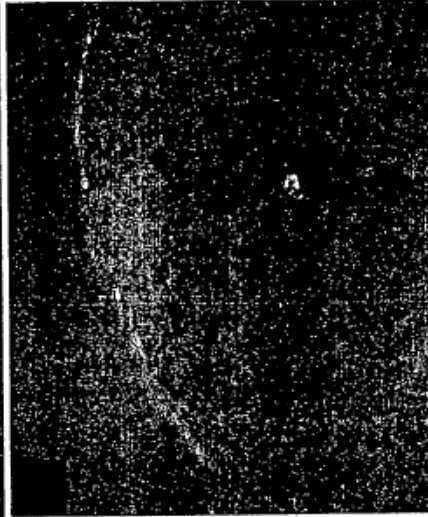


FIG. 18A

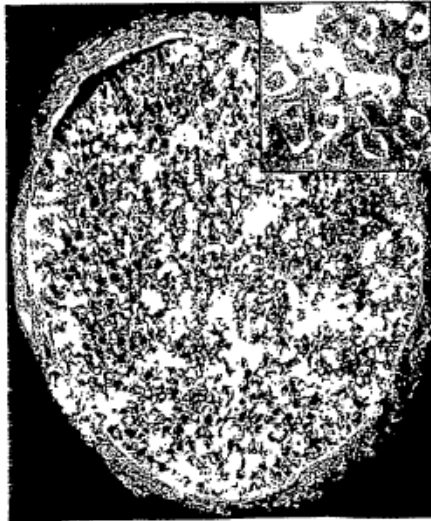


FIG. 18C

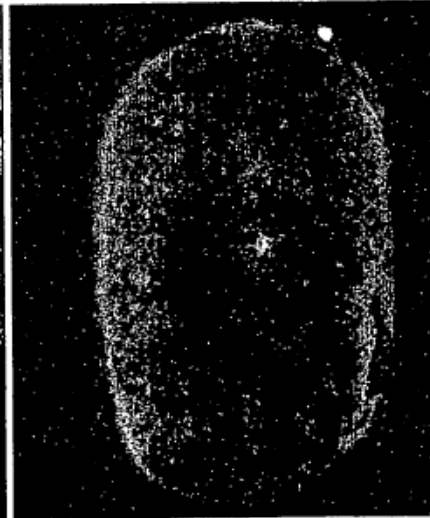


FIG. 19B

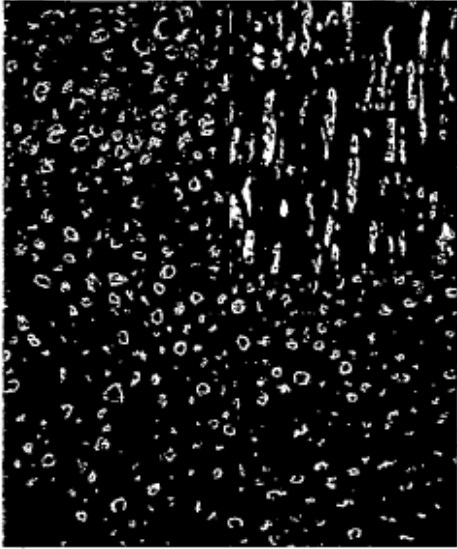


FIG. 19D

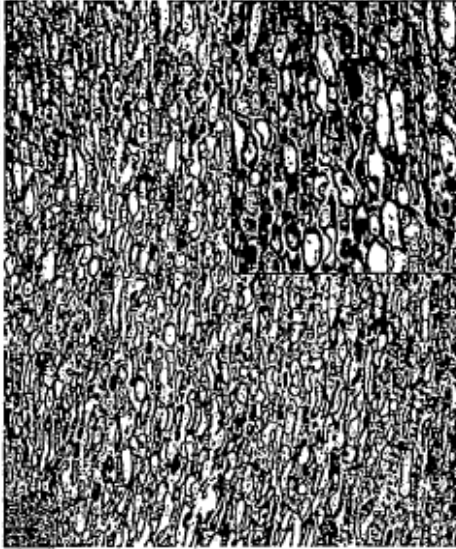


FIG. 19A



FIG. 19C

