

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 411 504**

51 Int. Cl.:

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 9/96 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2005 E 05749189 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 1750757**

54 Título: **Métodos de purificación de condroitinasa y formulaciones estables de la misma**

30 Prioridad:

18.05.2004 US 572030 P

25.10.2004 US 621882 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.07.2013

73 Titular/es:

ACORDA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)

420 Saw Mill River Road

Ardsley, NY 10502 , US

72 Inventor/es:

CAGGIANO, ANTHONY, O.;

GRUSKIN, ELLIOTT, A.;

SHEPTOVITSKY, YELENA, G. y

KASPERBAUER, SARAH

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 411 504 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

Métodos de purificación de condroitinasa y formulaciones estables de la misma.

Campo de la invención

5 Un aspecto de la presente invención se refiere a una formulación estable de condroitinasa. También se describen métodos de purificación de condroitinasa.

Antecedentes

10 Los proteoglicanos, los principales componentes de la matriz extracelular, son conocidos por estar presentes en grandes cantidades en el tejido de la cicatriz glial y por inhibir la recuperación después de lesiones de la médula espinal (Fawcett y Asher, (1999) Brain Res. Bull. 49 (6): 377-391). Las enzimas que son capaces de digerir tejido de la cicatriz glial son un objetivo importante para el desarrollo de agentes terapéuticos para la lesión de la médula espinal (SCI). La condroitinasa ABCI (EC 4.2.2.4; cABCI) es una enzima bacteriana que cataliza la digestión de las cadenas laterales de condroitina sulfatada y dermatán de los proteoglicanos. Se ha demostrado que esta enzima promueve la recuperación funcional después de lesión de la médula espinal (Bradbury et al., (2002) Nature 416:636-640; Caggiano et al., (2005) J. Neurotrauma 22 (2): 226-239).

15 La médula espinal se compone de fibras nerviosas. El daño al sistema nervioso central, incluyendo la médula espinal, da como resultado una pérdida de función. Dependiendo del tipo de lesión en el sistema nervioso central, la pérdida de función se puede manifestar en la pérdida de funciones sensoriales, motoras o autónomas o una combinación de las mismas. Las funciones sensoriales incluyen la capacidad de sentir sensaciones como el dolor. Las funciones motoras incluyen la capacidad de mover voluntariamente el cuerpo. Las funciones autónomas incluyen funciones involuntarias del cuerpo, por ejemplo la capacidad de sudar y respirar.

20 Los tipos más comunes de lesiones de la médula espinal (SCI) incluyen contusiones (hematomas de la médula espinal) y las lesiones por compresión (causadas por una presión prolongada sobre la médula espinal). En lesiones por contusión, a menudo se forma una cavidad o un hueco en el centro de la médula espinal. A diferencia de las células nerviosas, o neuronas del sistema nervioso periférico (SNP), las neuronas del sistema nervioso central (SNC) no se regeneran después de la lesión.

25 La lesión de la médula espinal puede estar caracterizada por contusión del tejido neural que da como resultado una disminución o pérdida de la capacidad del tejido nervioso para transmitir adecuadamente los impulsos nerviosos. La causa habitual es debida a una lesión por impacto de alguna naturaleza, pero también puede ocurrir durante la manipulación de la médula espinal en ciertos procedimientos quirúrgicos. Después de una lesión de la médula espinal en el mamífero adulto, la incapacidad de los axones para regenerarse puede conducir a la pérdida de sensación, pérdida de función motora y/o pérdida de la función autónoma, así como parálisis permanente. Una de las razones de que las neuronas no logren regenerarse es su incapacidad para atravesar la cicatriz glial que se desarrolla tras una lesión de la médula espinal. La lesión inducida por herida desarrollará cicatriz glial, que contiene moléculas de la matriz extracelular incluyendo proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG). Los CSPG inhiben el crecimiento de tejido nervioso *in vitro* y la regeneración del tejido nervioso en regiones ricas en CSPG *in vivo*.

30 Diversas moléculas, y regiones específicas de las mismas, han sido implicadas en la capacidad para apoyar el brote de las neuritas a partir de una célula neuronal, un proceso también conocido como sobrecrecimiento de neuritas. El término neuritas hace referencia tanto a las estructuras de los axones como de las dendritas. El proceso de brote de las neuritas es esencial en el desarrollo y la regeneración neuronales, especialmente después de que una lesión física o enfermedad hayan dañado las células neurales. Las neuritas se prolongan profusamente durante el desarrollo en los sistemas nerviosos tanto centrales como periféricos de todas las especies animales. Este fenómeno se refiere tanto a los axones como a las dendritas.

35 Se sabe que varios polipéptidos, especialmente las moléculas de adhesión celular (CAM), promueven el crecimiento de las células neurales. Si bien los primeros esfuerzos en esta área de investigación se concentraron en la proteína fibronectina (FN) de la matriz extracelular que promueve la adhesión, también se ha encontrado que otros polipéptidos promueven el crecimiento neural. Por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.792.743 se describen nuevos polipéptidos y métodos para promover el crecimiento neural en el sistema nervioso central de un mamífero mediante la administración de una CAM neural soluble, un fragmento de la misma, o un producto de fusión con Fc de la misma. En la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.313.265 se describen polipéptidos sintéticos que contienen las regiones farmacológicamente activas de las CAM que se pueden utilizar en la promoción de la regeneración nerviosa y la reparación tanto de las lesiones de los nervios periféricos como de las lesiones en el SNC. Aunque útil, el uso de proteínas regenerativas por sí solo puede no ser suficiente para efectuar la reparación de un sistema nervioso dañado.

45 Durante aproximadamente las últimas dos décadas, se ha expandido rápidamente el conocimiento de la adhesión celular y la migración en matrices extracelulares (ECM) a nivel molecular. La acción de las enzimas y otros polipéptidos que degradan componentes de la matriz extracelular y las membranas basales puede facilitar los eventos de reparación neural mediante una variedad de mecanismos, incluyendo la liberación de citoquinas unidas y

mediante el aumento de la permeabilidad de la matriz, mejorando de este modo la movilidad de las moléculas mediadoras, factores de crecimiento y agentes quimiotácticos, así como de las células que participan en el proceso de cicatrización. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.997.863 describe el uso de glicosaminoglicanos para manipular la proliferación celular y promover la cicatrización de heridas.

5 Los componentes de los CSPG inhibidores se han identificado como glicosaminoglicanos, sulfato de condroitina (CS) y sulfato de dermatán (DS). La eliminación de estas moléculas inhibitoras permitiría que las neuritas se regeneraran y reinervaran un área después de una lesión física o una enfermedad, así como permitiría la recuperación de las funciones sensoriales, motoras y autónomas.

10 Estudios previos han encontrado que las condroitinasas pueden lisar y degradar los CSPG, incluyendo CS y DS. Un estudio encontró que la condroitinasa ABC eliminaba las cadenas de glicosaminoglicanos (GAG) en y alrededor de las zonas lesionadas del SNC de rata *in vivo*. La degradación de las los GAG promovió la expresión de una proteína asociada al crecimiento, GAP-43, lo que indica un aumento en la capacidad de las células tratadas para regenerarse. Sin embargo, esta proteína asociada al crecimiento está asociada con la regeneración en las lesiones nerviosas periféricas, pero no centrales.

15 Los sulfatos de condroitina (CS) son polisacáridos sulfatados en las cadenas lineales de disacáridos repetidas. Tienen un peso molecular que oscila de alrededor de 10.000 a más de 100.000 Da. Existen sustratos de sulfato de condroitina en diferentes isómeros designados por las letras adjuntas A, B y C (Hoffman et al., (1958) Federation Proc. 17:1078-1082). Las unidades que se repiten están compuestas de ácido urónico (GlcA o IdoA) y galactosamina, y se denominan galactosaminoglicanos, y son un ejemplo de los glicosaminoglicanos, abreviados típicamente como GAG. A pesar de que estas especies de cadenas de GAG tienen diferentes regiones repetidas de disacáridos, están unidas covalentemente a través de la denominada secuencia de tetrasacárido e la región de conexión (véase más abajo) al residuo de serina en la secuencia consenso de anclaje a GAG (Glu/Asp-X-Ser-Gly) de las respectivas proteínas centrales. Los sulfatos de condroitina A y C (ChS-A, ChS-C) son los GAG más abundantes y se encuentran en el cartílago, el hueso y las válvulas cardíacas. La condroitina B (ChS-B, o, 20
25
alternativamente, sulfato de dermatán) se expresa principalmente en la piel, los vasos sanguíneos, las válvulas cardíacas.

30 Cuando se caracterizaron preparaciones bacterianas de condroitinasa frente a diferentes sustratos de sulfato de condroitina (ChS), se descubrió una serie de condroitinasas distintas: condroitinasa AC que degrada la mayor parte de la condroitina A (ChA) y la condroitina C (ChC) (Yamagata et al., (1968) J. Biol. Chem. 243 (7): 1523-1535), condroitinasa B que degrada la condroitina (ChB) (Michelacci y Deitrich, (1976) J. Biol. Chem. 251 (4): 1154-1158), condroitinasa C que actúa principalmente sobre ChC (Michelacci y Dietrich, (1976) supra), y condroitinasa ABC que exhibe especificidad frente a los tres sustratos -ChS-A, ChS-B y ChS-C (Yamagata et al, 1968, supra., Michelacci et al., (1987), Biochem. Biophys. Acta, 923:291-301).

35 En la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.578.480 se describe el aislamiento y la purificación de condroitinasa I utilizando tampón de fosfato 5 mM o 20 mM en la columna de intercambio catiónico.

Sato et al., (1994) Appl. Microbiol. Biotechnol. 41:39-46 hace referencia a un análisis enzimático para la condroitinasa ABC llevado a cabo utilizando tampón de fosfato de potasio 100 mM.

Las Patentes de los Estados Unidos Núms. US 5.763.205 y US 6.007.810 describen cada una condroitinasa ABC combinada con un tampón de fosfato de 1 a 100 mM, preferiblemente de 10 a 50 mM.

40 **Compendio de la invención**

La presente invención proporciona formulaciones estables que comprenden condroitinasa en un tampón de fosfato de sodio como se reivindica en la reivindicación 1. En realización, se proporciona una formulación que comprende condroitinasa ABCI y fosfato de sodio.

45 También se describen métodos de purificación de condroitinasa. Opcionalmente, el método de purificación de condroitinasa comprende extraer la condroitinasa de las células, separar la condroitinasa a partir del extracto, preferiblemente utilizando cromatografía de intercambio catiónico, eliminar contaminantes e impurezas, preferiblemente utilizando la cromatografía de filtración en gel, y eliminar endotoxinas, preferentemente utilizando intercambio aniónico. El método puede comprender adicionalmente diálisis. El método también puede comprender adicionalmente secado. Opcionalmente, la condroitinasa es condroitinasa ABCI. Opcionalmente, la condroitinasa es 50
condroitinasa AC.

Generalmente, las células se suspenden en una disolución tampón que contiene un agente tensioactivo y se someten a sonicación. A continuación se captura o se separa la condroitinasa de la mezcla del extracto, preferiblemente haciendo pasar el extracto a través de una columna de intercambio catiónico. Los contaminantes y las impurezas se eliminan de la condroitinasa capturada, preferiblemente mediante filtración en gel. Las endotoxinas se eliminan de la muestra de condroitinasa, preferiblemente por medio de una columna de intercambio aniónico. La muestra de condroitinasa se puede someter a diálisis, preferiblemente utilizando un tampón volátil. La condroitinasa se puede procesar adicionalmente mediante secado o liofilización. En una realización, la condroitinasa es 55

condroitinasa ABC. En una realización adicional, la condroitinasa es condroitinasa AC. En una realización adicional, la condroitinasa es una condroitinasa recombinante.

5 También se describe un vector de expresión recombinante que comprende una condroitinasa ABCI con una secuencia del SEC ID NO: 1. También se describe un vector de expresión recombinante que comprende una condroitinasa ABCI con una secuencia del SEC ID NO: 2.

Descripción de los dibujos

En parte, otros aspectos, características, beneficios y ventajas de las realizaciones de la presente invención serán evidentes con respecto a la siguiente descripción, reivindicaciones adjuntas y dibujos acompañantes donde:

Fig. 1. Intervalo lineal para las tasas de formación de producto en un análisis de la actividad cABCI.

10 Fig. 2A. Purificación de condroitinasa ABCI, perfil A280 de la columna S200. Fig. 2 B y C: SDS-PAGE de las fracciones de elución de condroitinasa ABCI. B - Teñido con plata. C - Teñido con Azul de Coomassie

Fig. 3. Curvas de Michaelis-Menten para cABCI y sustratos.

15 Fig. 4A-4E. Perfiles de dispersión de luz SEC de la cABCI no tratada (control) y tratada con estrés. Fig. 4A Congelación/descongelación: Rojo - Control, Azul - 1 ciclo; Verde - 2 ciclos; Púrpura - 3 ciclos; Fig. 4B Exposición a H₂O₂: Rojo - control; Azul - 0,5 mM; Verde - 5 mM; Púrpura - 20 mM; Fig. 4C Vórtice continuo: Rojo - Control; Azul - 5 min; Verde - 20 min; Púrpura - 60 min; Fig. 4D Exposición UV: Rojo - Control; Azul - 40 min; verde - 1 hora; Púrpura - 2 horas; Fig. 4E Estrés térmico (37°C): Rojo - Control; Azul - 1 hora; verde - 4 horas; Púrpura - 20hr.

20 Fig. 5. Análisis HPLC de intercambio catiónico débil de las muestras cABCI tratadas con UV. 5A. Muestra inicial; 5B. Después de 30 segundos de exposición UV; 5C. después de 2 minutos de exposición UV; 5D. después de 5 minutos de exposición UV.

Fig. 6. Comparación de área del pico de HPLC de ABCI con la actividad unidad.

Fig. 7. Estabilidad de ABCI - UV portátil.

Fig. 8. Estabilidad de ABCI - exposición a UV en campana.

25 Fig. 9. Correlación de los datos de actividad de cABCI con el perfil de HPLC de cABCI durante la inactivación térmica. 9A. Histograma del porcentaje de áreas de los picos iniciales en la HPLC y porcentaje de la actividad inicial mediante ensayo espectrofotométrico. 9B. Regresión de las áreas de los picos y actividades mediante espectrofotometría.

Fig. 10. Dependencia de la estabilidad térmica de cABCI de la fuerza iónica en presencia de tampón de fosfato de Na 50 mM.

30 Fig. 11. Dependencia de la estabilidad térmica de cABCI de la concentración de las especies de tampón en presencia de NaCl 100 mM y Acetato de Na 50 mM.

Fig. 12. Análisis mediante SDS-PAGE de la condroitinasa AC purificada final.

Descripción detallada

35 Antes de describir las presentes composiciones y métodos, se ha de entender que esta invención no se limita a las moléculas, composiciones, metodologías o protocolos concretos descritos, ya que éstos pueden variar. También se debe entenderse que la terminología usada en la descripción tiene el propósito de describir las versiones o realizaciones concretas solamente, y no se pretende que limite el alcance de la presente invención que estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

40 También se debe observar que según se utilizan en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", y "el" y "la" incluyen las referencias al plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a una "célula" es una referencia a una o más células y equivalentes de las mismas conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen los mismos significados entendidos comúnmente por un experto normal en la técnica. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales cualesquiera similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de 45 las realizaciones de la presente invención, se describen a continuación los métodos, dispositivos, y materiales preferidos.

50 Según se utiliza en la presente memoria, el término "aproximadamente" significa más o menos del 10% del valor numérico del número con el que se está utilizando. Por lo tanto, aproximadamente 50% significa en el intervalo de 45%-55%.

El término "proteína recombinante" hace referencia a un polipéptido que es producido mediante técnicas de ADN recombinante, en donde generalmente, el ADN que codifica un polipéptido se inserta en un vector de expresión adecuado que se utiliza a su vez para transformar una célula anfitriona para producir la proteína. Por otra parte, se pretende que la expresión "derivado de", con respecto a un gen recombinante, incluya dentro del significado de "proteína recombinante" las proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos de una proteína nativa, o una secuencia de aminoácidos similar a la misma que se genera por mutaciones, que incluyen sustituciones y deleciones (incluyendo truncamiento) de una forma de origen natural de la proteína.

Los términos "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz", según se utilizan en la presente memoria, se pueden utilizar indistintamente y hacen referencia a una cantidad de un componente del compuesto terapéutico de la presente invención. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico es una cantidad predeterminada calculada para lograr el efecto deseado, es decir, para tratar con eficacia una lesión en el sistema nervioso central. Por ejemplo, un compuesto terapéutico que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de condroitinasa que se puede purificar mediante un método de la presente invención y formular para proporcionar una enzima estable, activa, es suficiente para degradar los CSPG de la zona lesionada de la médula espinal o una cantidad suficiente para restaurar, en su totalidad o en parte, la función motora, sensorial o autónoma del mamífero y puede dar lugar a una regeneración de neuronas en un sistema nervioso central, por ejemplo promoviendo el crecimiento axónico en un área lesionada.

El término "vector" hace referencia a un vehículo que puede transportar las moléculas de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido condroitinasa se unen covalentemente al ácido nucleico del vector. El vector puede ser un plásmido, un fago mono o bicatenario, un vector viral con ARN o ADN mono- o bicatenario, o un cromosoma artificial, tal como BAC, PAC, YAC, o MAC.

Condroitinasa según se utiliza en la presente memoria incluye, pero no se limita a, condroitinasa ABCI, condroitinasa ABCII, condroitinasa AC, condroitinasa B, Hyal1, Hyal2, Hyal3, Hyal4, y PH2O.

La condroitinasa puede obtenerse a partir de un microorganismo que expresa naturalmente una condroitinasa, por ejemplo, pero no limitado a, *E. coli*, *Proteus vulgaris* o a partir de la expresión de una proteína recombinante en una célula anfitriona. La célula anfitriona puede ser una célula procariótica (tal como *E. coli*) o una célula eucariótica (tal como una levadura, una célula de mamífero o una célula de insecto).

En una realización de la invención, se expresó en exceso *E.coli* una condroitinasa ABCI recombinante de *Proteus vulgaris*. La secuencia primaria de esta proteína se muestra a continuación:

ATSNPAFDPK^uNLMQSEIYHFAQNNPLAD^uFSSDKNSIL^uTLSDKRSIMGNQSL^uLWKWK^gGSSFTLHK^gKLIVPTDKEASKAWGRSSTPVFSFWLYNEKPIDGYLTIDFGEKLISTSEAQAGFKVKLDFTGWR^uTVGVSLNNDLENREMTLNATNTSSDGTQDSIGRSLGAKVDSIRFKAPSNV^uSQGEIYDRIMFSVDDARYQWSDYQVKTRLSEPEIQFHNVKPQLPVTPENLAIDLIRQRLINEFVGGEKETNLALEENISK^gLKSDFDALN^uTHTLANGGTQGRHLITDKQIIYQOPENLNSQDKQLFDNYVILGNYTTLMFNISRAYVLEKDPTQKAQLKQMYLLMTKHLLDQGFVKGSALVTTHHWGYSSRWWYISTLLMSDALKEANLQTQVYDSLLWYSREFKSSFDMKVSADSSDLDYFN^uTLSRQHLALLLLEPDDQKRINLVNTFSHYITGALTQVPPGGKDGLRPDGTAWRHENYPGYSFPAFKNASQLIYLLRDTPF^uSVGESGWN^uSLKKAMVSAWIYSNPEVGLPLAGRHPLNSPSLKSVAQGY^uYWLAMSAKSSPDKTLASIYLAI
SDKTQNESTAIFGETITPASLPQGFYAFNGGAFGIHRWQDKMVT^uLKAYNTNVWSSEIYNKDNRYGRYQSHGVAQIVSNGS^uQLSQGYQQEGWDWNRMPGAT^uTTHLPLKDLDSPKPH^uTLMQRGERGFSGTSSLEGQYGMMAFDLIYPANLERFDPNFTAKKSVLAADNHLIFIGSNINSSDKNKNVETTLFQHAIPTLNTLWINGQKIENMPYQTTLQQGDWLIDSNGNYLITQAEKVN^uVS^uRQHQVSAENKNRQPTEGNFSSAWIDHSTRPKDASYEY^uMVFLDATPEKMGEMAQK^uFRENGLYQVLRKDKDVHILDKLSNVTGYAFYQPASIEDKWIKKVNKPAIVMTHRQKDTLIVSAVTPDLNMTRQKAATPVTINVTINGKWQSADKNSEVKYQVSGDNTEL^uTFTSYFGIPQEIKLSPLP (SEQ ID NO:1),

en donde los residuos en negrita y subrayados indican residuos que no se corresponden con los de las secuencias de GeneBank y los residuos en cursiva indican una secuencia peptídica que se informó que se había escindió de la enzima procesada (Khandke, Patente de los Estados Unidos. Núm. US 5.578.480).

En otra realización, se puede producir una condroitinasa recombinante a partir de la secuencia de aminoácidos de la enzima procesada que tiene la secuencia:

QDSIGRSLGAKVDSIRFKAPSNVSGEYIDRIMFSVDDARYQWSDYQVKTRLSEPEI
 QFHNVPQLPVTPENLAAIDLIRQLINEFVGGEKETNLALEENISKLKSDFDALNTHT
 LANGGTQGRHLITDKQIIYQPENLNSQDKQLFDNYVILGNYYTLLMFNISRAYVLEKD
 PTQKAQLKQMYLLMTKHLLDQGFVKGSALVTTHHWGYSSRWYISTLLMSDALKE
 ANLQTVYDSSLWYSREFKSSFDMKVSADSSDLDFNTLSRQHLALLLLEPDDQKRI
 NLVNTFSHYITGALTQVPPGGKDGLRPDGTAWRHEGNYPGYSFPAFKNASQLIYLLR
 DTPFSVGESGWNSLKKAMVSAWIYSNPEVGLPLAGRHPLNSPSLKSVAQGYWLA
 MSAKSSPDKTLASIYLAISDKTQNESTAIFGETITPASLPQGFYAFNGGAFGIHRWQDK
 MVTLKA YNTNVWSSEIYNKDNRYGRYQSHGVAQIVSNGS QLSQGYQQEGWDWNR
 MPGATTIHLPLKDLDSPKPHITLMQRGERGFSGTSSLEGQYGMMAFDLIYPANLERFD
 PNFTAKKSVLAADNHLIFIGSNINSSDKNKNVETTLFQHAIPTLNTLWINGQKIENMP
 YQTTLQQGDWLIDSNNGYLITQAEKVNVSROHQVSAENKNRQPTEGNFSSA WIDH
 STRPKDASYEYMVFLDATPEKMGEMAQKFRENGLYQVLRKDKDVHILDKLSNVT
 GYAFYQPASIEDKWIKKVNKPAIVMTHRQKDTLIVSAVTPDLNMTRQKAATPVTINV
 TINGKWQSADKNSEVKYQVSGDNTELTFTSYFGIPQEIKLSPLP (SEQ ID NO:2).

La expresión de un gen de condroitinasa recombinante puede ser producido por ligación de un ácido nucleico que codifica una proteína condroitinasa, o una porción de la misma, a un vector adecuado para la expresión en células procarióticas, células eucarióticas, o ambas. Los procedimientos para la ligación son bien conocidos por los expertos normales en la técnica. Los vectores de expresión para la producción de formas recombinantes de los polipéptidos de condroitinasa sujeto incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados para la expresión de un polipéptido de condroitinasa incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para la expresión en células procariotas, tales como *E. coli*.

Existen diversos vectores para la expresión de proteínas recombinantes en levadura. Por ejemplo, YEP24, YIP5, YEP51, YEP52, pYES2 y YRP17 son vehículos de clonación y de expresión útiles en la introducción de constructos genéticos en *S. cerevisiae* (Véase, por ejemplo, Broach et al. (1983) en *Experimental Manipulation of Gene Expression*, ed. M. Inouye Academic Press, pág. 83). Estos vectores pueden replicarse en *E. coli* debido a la presencia del origen de replicación de pBR322, y en *S. cerevisiae* debido al determinante de replicación del plásmido de 2 micras de levadura. Además, se pueden utilizar marcadores de resistencia a fármacos tales como ampicilina.

Opcionalmente, se produce un polipéptido de condroitinasa de recombinantemente utilizando un vector de expresión generado mediante subclonación de la secuencia codificante de una de las proteínas condroitinasa representadas en el SEQ ID NO: 1 o el SEQ ID NO: 2.

Los vectores de expresión en mamíferos pueden contener secuencias procarióticas, para facilitar la propagación del vector en bacterias, y una o más unidades de transcripción eucarióticas que son expresadas en células eucarióticas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, PTK2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamíferos adecuados para la transfección de células eucarióticas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y la selección de resistencia a fármacos en células tanto procarióticas como eucarióticas. Alternativamente, se pueden utilizar derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1), o el virus de Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) para la expresión transitoria de proteínas en células eucarióticas. Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y la transformación de los organismos anfitriones son bien conocidos en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procarióticas como eucarióticas, así como procedimientos recombinantes generales, véase *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989) Capítulos 16 y 17.

En algunos casos, puede ser deseable expresar el polipéptido de condroitinasa recombinante mediante el uso de un sistema de expresión en insectos tal como el sistema de expresión de baculovirus. Los ejemplos de tales sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUW1), y vectores derivados de pBlueBac (tales como β -gal que contiene pBlueBac III).

Los vectores de expresión enumerados en la presente memoria se proporcionan a modo de ejemplo únicamente y representan los vectores bien conocidos disponibles para los expertos normales en la técnica que pueden ser útiles para expresar las moléculas de ácido nucleico. El experto con un conocimiento práctico normal en la técnica sería consciente de otros vectores adecuados para el mantenimiento de la propagación o la expresión de las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria. Estos se encuentran por ejemplo en Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989.

5 Cuando es deseable expresar solo una porción de una proteína condroitinasa, tal como una forma que carece de una porción del extremo N-terminal, es decir, un mutante por truncamiento que carece del péptido señal, puede ser necesario añadir un codón de inicio (ATG, que codifica el aminoácido metionina) al fragmento de oligonucleótido que contiene la secuencia deseada que se va a expresar. Es bien sabido en la técnica que una metionina en la posición N-terminal puede ser escindida enzimáticamente mediante el uso de la enzima metionina aminopeptidasa (MAP). La MAP ha sido clonada de *E. coli* (Ben-Bassat et al. (1987) *J. Bacteriol.* 169:751-757) y *Salmonella typhimurium* y se ha demostrado su actividad in vitro en proteínas recombinantes (Miller et al. (1987) *PNAS* 84:2718-1722). Por lo tanto, la eliminación de una metionina N-terminal, si se desea, se puede lograr ya sea in vivo mediante la expresión de polipéptidos derivados de condroitinasa en un anfitrión que produce MAP (por ejemplo, *E. coli* o CM89 o *S. cerevisiae*), ya sea in vitro mediante el uso de MAP purificada.

10 Los vectores de expresión contienen regiones reguladoras que actúan en cis actuando que están conectadas operablemente en el vector al ácido nucleico de condroitinasa de manera que se permita la transcripción de las moléculas de ácido nucleico en una célula anfitriona.

15 Las células anfitriona recombinantes se preparan introduciendo los constructos de vectores en las células mediante mecanismos fácilmente asequibles para los expertos normales en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección, lipofección, y otros mecanismos tales como los que se encuentran en Sambrook, et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2^a ed*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.).

20 Como es conocido en la técnica, los polipéptidos de condroitinasa se pueden producir mediante técnicas biológicas convencionales o mediante síntesis química. Por ejemplo, una célula anfitriona transfectada con un vector de ácido nucleico que dirige la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica los polipéptidos sujeto se puede cultivar en condiciones apropiadas para permitir que se produzca la expresión del péptido. El polipéptido de condroitinasa se puede secretar y aislar de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido de condroitinasa recombinante. Se describen en la presente memoria métodos de purificación en los que la condroitinasa se aísla en una forma pura que es más estable y activa, que en los métodos utilizados actualmente.

25 Alternativamente, el péptido puede ser retenido citoplásmicamente retirando la secuencia del péptido señal del gen de la condroitinasa recombinante y las células cosechadas, lisadas y la proteína aislada mediante los métodos de purificación descritos en la presente memoria.

30 Según se describe en la presente memoria, un procedimiento de purificación de condroitinasa comprende las siguientes etapas: 1) extraer la enzima de una célula, 2) separar el extracto celular bruto utilizando cromatografía de intercambio catiónico, 3) separar adicionalmente el extracto mediante cromatografía de filtración en gel, y 4) eliminar las endotoxinas a través de una membrana de intercambio aniónico para producir una condroitinasa purificada, que exhibe una elevada actividad con respecto a la condroitinasa purificada mediante los métodos convencionales.

35 Extracción de condroitinasa a partir de las células puede ser más eficaz mediante el uso de una disolución tampón a la cual se añade un tensioactivo. Un tensioactivo es un agente activo de superficie que tiene tendencias solubilizadoras y que contiene grupos de polaridad opuesta. Estos agentes se pueden utilizar para alterar la integridad de una célula. Por lo tanto, un agente tensioactivo se puede utilizar para extraer una enzima de una célula. Se puede utilizar cualquier tensioactivo que promueva la extracción de condroitinas de una célula, preferiblemente, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico.

40 Los tensioactivos no iónicos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, polioxietilentalquiléter, polioxietileno-p-t-octilfeniléteres, polisorbato, y similares. Los tensioactivos de tipo Emulgen, los tensioactivos de tipo Liponox, los tensioactivos de tipo Brij, y similares, se proporcionan como ejemplos específicos de polioxietilentalquiléteres. Los tensioactivos disponibles comercialmente entre estos son Emulgen 120, Emulgen 109P, Liponox DCH, Brij 35, 78, 76, 96, 56, 58, 98, Nikkol BL-9EX, BL-21, BL-25, y similares. Como ejemplos específicos de polioxietileno-p-t-octilfeniléteres se proporcionan tensioactivos de tipo Triton, tensioactivos de tipo Nonidet P40, tensioactivos de tipo Igepal/CA, Polytergent G, tensioactivos de tipo Neutronyx, tensioactivos de tipo Conco, y similares. Entre estos tipos de tensioactivos, Triton X-100, X-45, X-114, X-102, X-165, X-305, X-405, Nonidet P-40, Igepal CA-630, Neutronyx 605, Conco NIX-100, y similares están disponibles comercialmente. Los tensioactivos de tipo Tween, los tensioactivos de tipo Emasol, los tensioactivos de tipo Sorbestar, los tensioactivos de tipo Crill, y similares, se dan como ejemplos específicos de los polisorbatos. Se prefieren los derivados de poli(oxi-1,2-etanodiol) de mono-9-octadecanoato de sorbitán, asequible comercialmente como Tween 80.

45 De los tensioactivos anteriores, se prefieren los tensioactivos Triton X, incluyendo, pero no limitados a, Triton X-114. Generalmente, el detergente, tal como, pero no limitado a, Triton X, se puede añadir a la muestra de células a extraer. En una realización de la invención, la concentración del detergente puede variar de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 10% (v/v), preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 3% (v/v), o más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,2% a aproximadamente 2%.

Según se describe en la presente memoria, el proceso de extracción también puede implicar sonicación. La sonicación implica el uso de ondas de sonido para desorganizar las células frágiles (que se han vuelto frágiles, por ejemplo, por la exposición a un tensioactivo, tal como Triton X). Esto da como resultado la dispersión y desorganización de las células de tal manera que la integridad de la célula se destruye adicionalmente, provocando de este modo la liberación de los componentes intracelulares. La sonicación puede implicar una o ambas de una exposición pulsada o continua a las ondas de sonido. Por ejemplo, para someter a sonicación las células, se puede utilizar una sonda pequeña (micro). El aparato de ultrasonidos se puede ajustar a pulsos (no continuo). En otra realización, el aparato de ultrasonidos se puede ajustar a continuo. Opcionalmente, la etapa de sonicación puede utilizar una combinación de sonicación pulsada y continua. Opcionalmente, la suspensión celular se puede someter a sonicación con 10 ráfagas cortas de 10 segundos seguidas de intervalos de 30 segundos para la refrigeración. La suspensión celular se puede mantener sobre hielo durante la sonicación para evitar el sobrecalentamiento de los constituyentes de la muestra. Después de la sonicación los restos de células se pueden eliminar por centrifugación. Se pueden emplear otros métodos de sonicación, como determinan fácilmente los expertos en la técnica, dependiendo del tipo de célula que se esté desorganizando.

Opcionalmente, la extracción de la enzima también puede implicar la homogeneización en un Polytron. Este proceso triturará mecánicamente las células tratadas con tensioactivo, desorganizando de ese modo la integridad celular, y liberando los componentes celulares a una disolución para su purificación adicional. Generalmente, la muestra se mantiene sobre hielo para evitar o limitar cualquier calentamiento de la muestra. La muestra se puede homogeneizar durante aproximadamente 30 segundos, o hasta que se hayan dispersado a los grupos de células. Los métodos para la realización de homogeneización con Polytron son bien conocidos en la técnica.

La condroitinasa se puede capturar del extracto celular utilizando cromatografía de intercambio iónico. En la cromatografía de intercambio iónico, las sustancias cargadas se separan utilizando los materiales de la columna que portan una carga opuesta. Se diferencian dos tipos de intercambiadores: alcalinos (de carga positiva) y ácidos (de carga negativa). Los tipos de intercambiadores de iones se pueden dividir además en débilmente alcalinos o ácidos o fuertemente alcalinos o ácidos. Con los materiales fuertemente alcalinos o ácidos todos los grupos funcionales están presentes generalmente en forma ionizada. Por ejemplo, los grupos amino cuaternario (R_3N^+) están cargados positivamente, mientras que los grupos ácido sulfónico (SO_3^-) están cargados negativamente. También existen tipos débilmente alcalinos y tipos débilmente ácidos de columnas de intercambio iónico. Los tipos débilmente alcalinos son generalmente grupos funcionales amino secundarios y terciarios; los tipos débilmente ácidos son generalmente grupos funcionales carboxilo.

Muchas proteínas se pueden separar en forma de polianiones ($pH > pI$) o en forma de policationes ($pH < pI$). Los grupos de intercambio iónico más comunes incluyen, pero no se limitan a, dimetilamonioetilo (anión), dietilaminoetilo (anión), dimetilaminoetilo (anión), carboxi (catión), carboxialquilo (catión), sulfoisobutilo (catión), sulfoalquilo (catión), sulfopropilo (catión) y sulfoetilo (catión).

Para capturar la enzima del extracto celular, el extracto obtenido se puede someter a cromatografía de intercambio catiónico. Mediante el uso de una resina de intercambio catiónico se produce un condroitinasa con aumento de la actividad y la pureza en comparación con el producto lisado bruto. Se pueden utilizar resinas de intercambio catiónico débiles o fuertes, por ejemplo, pero no limitadas a, resinas de intercambio catiónico que tienen un grupo carboxialquilo y un grupo sulfoalquilo o sulfopropilo, respectivamente. Otras resinas de intercambio catiónico son bien conocidas en la técnica (véase más arriba).

Por lo tanto, la enzima puede ser capturada del extracto celular mediante la carga de la muestra en la cromatografía de intercambio catiónico, el lavado el intercambiador catiónico, en el que los componentes celulares que no sean condroitinasa se lavan mediante el aumento de la fuerza iónica y/o mediante cambios de pH, es decir, bajo condiciones de cromatografía de intercambio catiónico; y la elución de la muestra de condroitinasa mediante un aumento adicional de la fuerza iónica y/o mediante un cambio de pH.

Los tampones utilizados en la cromatografía de intercambio catiónico incluyen, pero no se limitan a los enumerados en la Tabla 1.

Tabla 1. Tampones de la cromatografía de intercambio catiónico

| Molécula | pKa | dpKa/grado C. | Contraión |
|--------------------|------|---------------|---------------|
| Ácido maleico | 2,00 | | sodio |
| Ácido malónico | 2,88 | | sodio |
| ácido cítrico | 3,13 | -0,0024 | sodio |
| ácido láctico | 3,81 | | sodio |
| ácido fórmico | 3,75 | 0,0002 | sodio o litio |
| ácido butanodioico | 4,21 | -0,0018 | sodio |
| ácido acético | 4,76 | 0,0002 | sodio o litio |
| ácido malónico | 5,68 | | sodio o litio |
| fosfato | 7,20 | -0,0028 | sodio |
| HEPES | 7,55 | -0,0140 | sodio o litio |
| BICINE | 8,35 | -0,0180 | sodio |

5 La eliminación de los agregados y los contaminantes de bajo peso molecular y las impurezas se puede llevar a cabo a través de diversos métodos de filtración, incluyendo, por ejemplo, filtración en gel o cromatografía de exclusión por tamaño. Los ejemplos asequibles comercialmente de filtración en gel son Sephadex y Sephacryl.

10 La cromatografía de filtración en gel es una separación basada en el tamaño. También se denomina exclusión molecular o cromatografía de penetración en gel. En la cromatografía de filtración en gel, la fase estacionaria consiste en cuentas porosas con una gama bien definida de tamaños de poro. Se dice que la fase estacionaria para la filtración en gel tiene un intervalo de fraccionamiento, lo que significa que las moléculas dentro de ese intervalo de peso molecular se pueden separar.

15 Por lo tanto, las proteínas que son lo suficientemente pequeñas pueden caber dentro de los poros de las cuentas y se dice que están incluidas. Estas proteínas pequeñas tienen acceso a la fase móvil en el interior de las cuentas, así como a la fase móvil entre las cuentas y eluyen en último lugar en la separación de filtración en gel. Las proteínas que son demasiado grandes para caber dentro de cualquiera de los poros se dice que están excluidas. Estas tienen acceso solamente a la fase móvil entre las cuentas y, por lo tanto, eluyen primero. Las proteínas de tamaño intermedio están parcialmente incluidas - lo que significa que pueden caber dentro de algunos pero no de todos los poros en las cuentas. Estas proteínas eluirán después entre las proteínas grandes ("excluidas") y las pequeñas ("totalmente incluidas").

20 Otro contaminante que puede estar presente en la preparación del producto lisado celular es la endotoxina. La endotoxina es un contaminante tóxico común en los sistemas biológicos. Es importante eliminar suficientemente la endotoxina que es un componente de la pared celular de las bacterias. La endotoxina es un lipopolisacárido de la pared celular de la mayoría de las bacterias gram-negativas, tales como *E.coli*. Se sabe que la endotoxina incluida en las proteínas ocasiona síntomas de fiebre alta, choque por endotoxinas, e inflamación, incluso en una cantidad muy pequeña. Puesto que los extractos bacterianos pueden estar altamente contaminados con endotoxina, las realizaciones de la invención pueden incluir una etapa de eliminación de endotoxina en un procedimiento de purificación. Se pueden emplear diversos métodos para la eliminación de la endotoxina, tales como, pero no limitados a, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de afinidad, ultrafiltración, y separación de fases utilizando un tensioactivo.

30 Opcionalmente, la endotoxina se elimina utilizando una columna de intercambio aniónico. Los ejemplos de la cromatografía de intercambio aniónico incluyen, pero no se limitan a, membrana Q, una amina cuaternaria; y resina de dietilaminoetano (DEAE). Los tampones utilizados en la cromatografía de intercambio aniónico incluyen, pero no se limitan a los que se ilustran en la Tabla 2.

Tabla 2. Tampones de la cromatografía de intercambio aniónico

| Molécula | pKa | dpKa/grado C. | Contraión |
|-----------------------|-------|---------------|--------------------|
| N-metilpiperazina | 4,75 | -0,015 | cloruro |
| piperazina | 5,68 | -0,015 | cloruro o formiato |
| L-histidina | 5,96 | | cloruro |
| bis-tris | 6,46 | -0,017 | cloruro |
| bis-tris propano | 6,80 | | cloruro |
| trietanolamina | 7,76 | -0,020 | cloruro o acetato |
| Tris | 8,06 | -0,028 | cloruro |
| N-metil-dietanolamina | 8,52 | -0,028 | cloruro |
| dietanolamina | 8,88 | -0,025 | cloruro |
| 1,3-diaminopropano | 8,64 | -0,031 | cloruro |
| etanolamina | 9,50 | -0,029 | cloruro |
| piperazina | 9,73 | -0,026 | cloruro |
| 1,3-diaminopropano | 10,47 | -0,026 | cloruro |
| piperidina | 11,12 | -0,031 | cloruro |
| fosfato | 12,33 | -0,026 | cloruro |

El reparto puede ocurrir en diferentes etapas del procedimiento, preferiblemente durante la purificación antes de la filtración en gel. La filtración a través de membranas Q es otra alternativa para la etapa de limpieza de endotoxina.

- 5 En una realización, se puede emplear la filtración en membrana Q utilizando un pH de pH 5,5 en acetato de Na 20 mM y NaCl 100 mM. De acuerdo con K.C. Hou y R. Zaniewski, *Biotech. Appl. Biochem.* 12, 315-324, 1990, se espera que estas condiciones de pH y sal eliminen endotoxina en el intervalo de aproximadamente 70 a 85%. En una realización, un procedimiento de filtración Q en un modo de recolección de flujo continuo produce más de aproximadamente 95% de condroitinasa. La filtración en membrana Q se puede realizar en varios momentos durante el procedimiento, incluyendo, por ejemplo, al final de la purificación después de la filtración en gel.

- 10 De este modo, la eliminación de la endotoxina de la condroitinasa de la muestra puede incluir la carga de la muestra en la cromatografía de intercambio aniónico, el lavado del intercambiador aniónico, en el que las impurezas se lavan mediante el aumento de la fuerza iónica y/o mediante los cambios de pH, es decir, en condiciones de cromatografía de intercambio aniónico; y la elución de la muestra de condroitinasa mediante un aumento adicional de la fuerza iónica y/o mediante un cambio de pH.

- 15 La diálisis es uno de los métodos más comúnmente utilizados para la transferencia de una muestra biológica, por lo general a base de proteínas, de un medio a otro. Con frecuencia es necesario eliminar las sales o cambiar el tampón después de una etapa en la purificación para que la siguiente etapa funcione eficazmente. Esto se puede conseguir mediante diálisis en donde la disolución de proteína se mantiene en una membrana semi-permeable y se coloca en el tampón de modo que las moléculas pequeñas, p. ej., sales, puedan pasar libremente a través de la membrana, mientras que las moléculas grandes, por ejemplo proteínas, son retenidas. Opcionalmente, se utiliza una etapa de diálisis para purificar adicionalmente la condroitinasa. Se puede utilizar un tampón volátil, tal como bicarbonato de amonio, pH 8,0 para la etapa de diálisis. También se pueden utilizar otros tampones. La elección del tampón seleccionado debe ser apropiada para la proteína que se está sometiendo a diálisis. Tales tampones son bien

20

conocidos en la técnica (por ejemplo, pero no limitados a, tampones basados en Tris, tampones de fosfato, etc.). El tampón utilizado para la diálisis puede ser cualquier tampón que sea capaz de mantener el pH apropiado en el cual estabilizar la proteína que está siendo aislada.

5 Para el almacenamiento y la distribución de la condroitinasa purificada, el procedimiento de purificación de la condroitinasa puede incluir además la etapa de secado. La etapa de secado puede implicar secado por calor convencional o, más preferiblemente, liofilización o secado por congelación.

Se puede proporcionar adicionalmente un método de seguimiento de los rendimientos y perfiles de pureza enzimáticos mediante HPLC de fase inversa. Esto se puede realizar después de cualquiera o de todas las etapas en el procedimiento de purificación.

10 El rendimiento final de enzima puede ser de hasta aproximadamente 50 mg de condroitinasa a partir de 1L de células cultivadas. El rendimiento final de enzima puede estar en el intervalo de aproximadamente 75 a 85 mg/1 L de células.

15 La condroitinasa purificada se puede caracterizar por una o más de las siguientes propiedades: la actividad de la enzima, el pl, la especificidad de sustrato, la velocidad de catálisis de sustrato, el efecto inhibitor de las sales de metales divalentes, el pH óptimo del tampón de almacenamiento, los efectos de las diferentes condiciones de estrés, el tampón y la fuerza iónica óptimos, la estabilización de la enzima en diversos excipientes, y el efecto de la concentración de la enzima en la estabilidad térmica.

20 Se utilizó una condroitinasa ABCI como ejemplo de una condroitinasa que se puede purificar y formular. La condroitinasa ABCI liofilizada purificada se reconstituyó y se analizó para determinar su actividad que se comparó con las actividades de las enzimas condroitinasa ABCI disponibles de otras fuentes. La actividad de la enzima condroitinasa ABCI fue una preparación de enzima relativamente alta. La actividad de la condroitinasa ABCI purificada es de aproximadamente 160 U/mg. El pl de la condroitinasa ABCI purificada es de aproximadamente 7,8 a aproximadamente 8,0. La afinidad de la condroitinasa ABCI purificada es similar para la condroitina A, la condroitina B, y la condroitina C. La velocidad de catálisis de un sustrato para la condroitinasa ABCI purificada es mayor para la condroitina A que para la condroitina C, que es mayor que la velocidad de catálisis de la condroitina B.

25 Las sales de metales divalentes pueden inhibir una actividad de condroitinasa. Por ejemplo, la condroitinasa ABCI purificada puede ser inhibida por Zn, Ni y Co. El Ca y el Mg parecen ser menos inhibidores. El pH del tampón de almacenamiento no afecta a la actividad de la condroitinasa purificada. En realizaciones preferidas, el tampón de almacenamiento tiene un pH 7,4, pH fisiológico.

30 Si bien la condroitinasa generalmente puede verse afectada por varias condiciones adversas, la condroitinasa purificada no parece verse afectada por congelación y descongelación repetidas.

35 Varias realizaciones proporcionan una formulación estable de la enzima tanto para el almacenamiento como para la administración. En general, la condroitinasa de tales formulaciones estables exhibe al menos aproximadamente 50% de actividad en aproximadamente 24 horas, preferiblemente al menos aproximadamente 75% de actividad, más preferiblemente al menos aproximadamente 85% de actividad. En otro aspecto de la invención, las formulaciones proporcionan consecuentemente actividad condroitinasa estable.

40 En la invención, la condroitinasa se formula en un tampón de fosfato de sodio con una concentración en el intervalo de aproximadamente 750 mM a aproximadamente 1 M. Una realización preferida es fosfato de sodio aproximadamente 750 mM. En una realización adicional, la condroitinasa se puede formular en un tampón de fosfato de sodio que comprende además acetato de sodio. El acetato de sodio puede estar presente en el intervalo de 25 mm a aproximadamente 75 mM. En una realización preferida, la concentración de acetato de sodio es aproximadamente 50 mM. En una realización, una formulación preferida para la administración es una condroitinasa en un tampón con un pH de 7,4. Otras realizaciones de formulaciones para el almacenamiento y la administración se proporcionan en los ejemplos descritos.

45 En otra realización, se proporciona una formulación que comprende condroitinasa purificada y un tampón que comprende un aumento de la fuerza iónica. Las realizaciones en las que una formulación comprende un aumento de la concentración iónica pueden aumentar la estabilidad de una formulación de enzima. Por ejemplo, una realización preferida proporciona una formulación con aproximadamente NaCl 1 M en fosfato de sodio. La concentración de fosfato de sodio puede ser de aproximadamente 50 mM. En una realización preferida, la concentración de almacenamiento de condroitinasa es inferior a aproximadamente 0,4 mg/ml.

50 En otra realización, se proporciona una formulación que comprende una condroitinasa B con una condroitinasa ABC purificada.

55 Opcionalmente, se proporciona una purificación de condroitinasa AC que comprende las siguientes etapas: 1) extracción de la enzima a partir de una célula, 2) separar el extracto de células bruto utilizando cromatografía de intercambio catiónico, 3) separar adicionalmente el extracto mediante cromatografía de filtración en gel, y 4) eliminar la endotoxina a través de una membrana de intercambio aniónico para producir una condroitinasa AC purificada.

Opcionalmente, una condroitinasa AC purificada se somete a diálisis en un tampón volátil, se liofiliza y se almacena a -80°C. El Ejemplo 12 describe un método de purificación de una condroitinasa AC.

En una realización, se proporciona tampón de estabilización (para a aproximadamente 37°C) fosfato de sodio aproximadamente 0,75 M, pH 7,4, acetato de sodio 50 mM. En otra realización el almacenamiento de condroitinasa es en forma liofilizada.

La actividad condroitinasa se puede estabilizar mediante la adición de excipientes o mediante liofilización. Los estabilizadores incluyen carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos y tensioactivos y son conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen carbohidratos tales como sacarosa, lactosa, manitol, y dextrano, proteínas tales como albúmina y protamina, aminoácidos tales como arginina, glicina, y treonina, tensioactivos tales como TWEEN® y PLURONIC®, sales tales como cloruro de calcio y fosfato de sodio, y lípidos tales como ácidos grasos, fosfolípidos y sales biliares.

Los estabilizadores se añaden generalmente a la proteína a una proporción de 1:10 a 4:1, carbohidrato a proteína, aminoácidos a proteína, estabilizador de proteína a proteína, y sales a proteína; 1:1000 a 1:20, tensioactivo a proteína; y 1:20 a 4:1, lípidos a proteína. Otros estabilizadores incluyen concentraciones elevadas de sulfato de amonio, acetato de sodio o sulfato de sodio, basándose en estudios comparativos con actividad heparinasa. Los agentes estabilizantes, preferiblemente el sulfato de amonio u otra sal similar, se añaden a la enzima a una proporción de 0,1 a 4,0 mg de sulfato de amonio/UI enzima.

La condroitinasa se puede administrar tópicamente, localmente o sistémicamente. La administración tópica o local es preferible para un mayor control de la aplicación. Las condroitinasas, singularmente o combinadas, se pueden mezclar con un vehículo farmacéutico apropiado antes de su administración. Los ejemplos de los vehículos y aditivos farmacéuticos generalmente utilizados son diluyentes, aglutinantes, lubricantes, agentes colorantes, agentes disgregantes, agentes tamponadores, ácidos grasos isotonzantes, agentes isotonzantes, conservantes, anestésicos, agentes tensioactivos convencionales y similares, y son conocidos por los expertos en la técnica. Específicamente los vehículos farmacéuticos que se pueden utilizar son dextrano, sacarosa, lactosa, maltosa, xilosa, trehalosa, manitol, xilitol, sorbitol, inositol, albúmina de suero, gelatina, creatinina, polietilenglicol, tensioactivos no iónicos (p. ej., ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán, aceite de ricino endurecido con polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de sacarosa, polioxietileno-polioxipropilenglicol) y compuestos similares. Los vehículos farmacéuticos también pueden ser utilizados combinados, por ejemplo polietilenglicol y/o sacarosa, o ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán, es particularmente preferido el monooleato de polioxietilensorbitán (20 O.E.).

Se puede llevar a cabo un régimen de tratamiento por medio de la administración, sola o combinada de condroitinasa ABCI, condroitinasa ABCII, condroitinasa AC, condroitinasa B, HYAL1, Hyal2, Hyal3, Hyal4, y PH2O a las lesiones de la zona lesionada del SNC. El modo de administración, el momento de administración y la dosificación se llevan a cabo de manera que la recuperación funcional del deterioro del sistema nervioso central se vea reforzada por la promoción del crecimiento de las neuritas. Los tratamientos de la presente descripción liberan una cantidad eficaz de condroitinasa ABCI purificada como se ha descrito anteriormente, sola o combinada con condroitinasa ABCII, condroitinasa AC, condroitinasa B, Hyal 1, Hyal 2, Hyal 3, Hyal 4, y PH2O al sitio de la lesión .

La cantidad eficaz de condroitinasa puede administrarse en una sola dosis, dos dosis o una pluralidad de dosis. Aunque se debe entender que la dosis se puede administrar en cualquier momento, en un ejemplo, la dosis se administra a las 12 horas de la lesión, o tan pronto como sea posible. En otro ejemplo, la dosis se administra a un mamífero herido en una, dos o una pluralidad de dosis; tales dosis dependerían de la gravedad de la lesión y la cantidad de CSPG presente en la cicatrización glial. Cuando se administra una pluralidad de dosis, ésta se puede liberar diariamente, semanalmente o quincenalmente. La liberación de las dosis puede ser por medio de un catéter o una jeringa. Alternativamente, el tratamiento se puede administrar durante la cirugía para permitir la aplicación directa a la cicatriz glial.

Como ejemplo de una formulación purificada de una condroitinasa, se purificó y se caracterizó una ABCI recombinante (cABCI) como se ha descrito anteriormente utilizando los siguientes parámetros: la estabilidad de la temperatura, las características de la enzima, la susceptibilidad a diversas condiciones de estrés, los productos de degradación; los efectos de diferentes excipientes sobre la estabilidad de la enzima.

Los siguientes métodos se utilizan para ilustrar las diversas realizaciones de la presente invención. Los métodos son métodos ilustrativos y no se pretende que limiten la invención.

Análisis de la actividad. La actividad enzimática de cABCI se analizó de acuerdo con una versión modificada de Hamai et al. (1997) J. Biol. Chem. 272 (14) :9123-9130. Se incubaron 125 µl de la mezcla de reacción que contenía Tris 40 mM, pH 8,0, acetato de Na 40 mM, caseína al 0,002% a aproximadamente 37°C durante al menos 3 min. Después de la incubación, se añadieron 1 mg/ml (concentración final) de sulfato de condroitina C y 0,05-0.5 µg de enzima cABCI, la mezcla se sometió a vórtice suavemente y después se verificó la velocidad de formación de producto por medio de absorción a aproximadamente 232 nm durante aproximadamente 45-90 segundos. Los cálculos de las concentraciones de sustrato y producto están basadas en el PM de los residuos hexuronato equivalentes a 521 y un coeficiente de extinción molar (ϵ^{232}) para hexuronato-6-sulfato insaturado a 232 nm de 5500.

5 Cuando se utilizaron condroitina A y B como sustratos en el análisis, los cálculos para los productos de hexuronato-4-sulfato insaturado se realizaron con un PM equivalente a 503 y un ϵ^{232} de 5100. Las tasas de actividad iniciales se calcularon en nmoles de disacárido/min mediante el ajuste de los datos recogidos en una función lineal. La actividad específica de la enzima se expresó en U/mg, donde unidad (U) se define como μ moles de producto formado en 1 min. El intervalo lineal para medir la velocidad de degradación de condroitina fue amplio como se muestra en la Figura 1.

10 Estimación del coeficiente de extinción. Se determinó el coeficiente de extinción para diferentes lotes de cABCI. Dos lotes diferentes de condroitinasa ABCI purificada se reconstituyeron en acetato de sodio 20 mM, pH 5,5, NaCl 100 mM. Algunas muestras contenían sacarosa 0,3 M en el tampón de reconstitución. Se tomaron para cada muestra la absorción a 280 nm y las concentraciones de proteína utilizando mediciones de análisis de proteínas de Lowry modificado. La estimación del coeficiente de extinción para cABCI se presenta a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Coeficiente de extinción

| Muestra cABCI | A280 | Concentración, mg/ml | ϵ_{280} 0,1% |
|--|-------|----------------------|-----------------------|
| Lote 5c-4°C | 0,928 | 0,68 | 1,36 |
| Lote 5c-4°C sacarosa | 0,53 | 0,4 | 1,32 |
| Lote 5c-T _{ambiente} | 0,672 | 0,342 | 1,96 |
| Lote 5c-T _{ambiente} sacarosa | 0,46 | 0,25 | 1,84 |
| Lote 5d | 1,81 | 0,98 | 1,84 |
| | | | Promedio |
| | | | 1,66 |

15 La estimación del coeficiente de extinción para la disolución de cABCI al 0,1% se obtuvo dividiendo A280 por la concentración (mg/ml). El coeficiente de extinción promedio (1,66) se utilizó en experimentos posteriores para las mediciones de la concentración de cABCI.

20 Caracterización mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Se utilizó la SEC analítica para caracterizar la agregación y la conformación de la condroitinasa ABCI. La SEC analítica se realizó utilizando columnas Shodex KW-803, que tiene un rango de separación de alrededor de 50.000 a 150.000 Daltons (Da) y Shodex KW-804, que tiene un rango de separación de alrededor de 100.000 a 600.000 Daltons (Da). El tampón para la fase móvil fue fosfato de sodio 100 mM, NaCl 50 mM, betaína al 0,5%, pH 7,3. El análisis se realizó a una velocidad de flujo de 1 ml/min a temperaturas ambiente (aproximadamente 22°C).

Análisis de Proteína. Para determinar la concentración de proteína se utilizaron un análisis de proteína de Lowry modificado (BioRad) y BCA (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

25 SDS-PAGE. Las proteínas se separaron en minigel performado para SDS-PAGE con un gradiente de 4-20% (BioRad) y la electroforesis se llevó a cabo a 200 V en un aparato para minigel (BioRad). Los geles se tiñeron con Coomassie o tinción de plata.

30 IEF-PAGE. La IEF-PAGE se llevó a cabo para determinar el valor de pI para condroitinasa ABCI en un intervalo de pH de 3-10 utilizando geles Novex IEF (Invitrogen) y se ejecutó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando un aparato de gel Novex. Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie Coloidal.

Transferencia Western. Las proteínas se separaron sobre SDS-PAGE y después se sometieron a electrotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa mediante el método de transferencia de tanque (BioRad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tampón de transferencia contenía Tris 25 mM y glicina 192 mM a pH 8,3, SDS al 1%.

35 Análisis Oxyblot. La detección de los grupos carbonilo que se introducen en las cadenas laterales de las proteínas mediante un mecanismo específico de sitio fue proporcionada por el kit de Detección de la Oxidación de Proteína OxyBlot de Chemicon Internacional. Específicamente, los grupos carbonilo en las cadenas laterales de las proteínas fueron derivatizados por 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) a 2,4-dinitrofenilhidrozona (DNP-hidrozona). Las muestras

se transfirieron después a nitrocelulosa. La membrana se expuso a continuación a un anticuerpo primario específico de DNP. Después de la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario conjugado con HRP. La presencia del complejo de anticuerpo se detectó mediante quimioluminiscencia.

5 Análisis HPLC de intercambio catiónico. Los productos de oxidación de cABCI se analizaron utilizando una columna de Intercambio Catiónico WCX-10 Dionex ProPac unida a un sistema Thermo Finnigan Chromatographic que consiste en un detector Surveyor PDA, bomba y muestreador automático. La enzima se hizo eluir con un gradiente de NaCl en tampón de Fosfato de Na 10 mM, pH 6,0. La longitud de onda del detector se ajustó a 215 nm.

10 Cromatografía de exclusión por tamaño. La cromatografía de exclusión por tamaño analítica se llevó a cabo a través de una columna KW-803 (Showdex Inc.), que tiene un rango de separación de aproximadamente 50 a 150.000, y una columna de KW-804, que tiene un rango de separación de alrededor de 100.000-600.000, utilizando HPLC (ESA Inc.) provista de dispersión de luz (Wyatt Technology) y detector UV (Waters Co.). Se utilizó Fosfato de Na 100 mM, pH 7,4 como fase móvil.

15 Estudios de Estrés de cABCI. La enzima cABCI liofilizada se reconstituyó en un tampón de elección. Se dejó que la enzima se reconstituyera o bien sobre hielo o bien a aproximadamente 4°C durante varias horas y el material insoluble, si lo hubiera, se eliminó mediante centrifugación a 14.000 g. Después alícuotas de 100 µl se sometieron a diferentes condiciones de estrés, incluyendo pero no limitadas a, temperatura, vórtice continuo, congelación-descongelación, luz UV, presencia de peróxido de hidrógeno. Las muestras sometidas a luz UV se mantuvieron en hielo durante la exposición para minimizar cualquier efecto de calentamiento sobre la enzima. El vórtice se realizó a aproximadamente 4°C. La oxidación por medio de peróxido de hidrógeno se sometió a ensayo mediante la
20 incubación de las muestras con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno durante la noche a 4°C. Los ciclos de congelación-descongelación se ejecutaron sobre hielo seco. Las muestras de post-tratamiento se analizaron para determinar la concentración de proteína por medio de lecturas a A280, actividad enzimática mediante espectrofotometría y adicionalmente se evaluaron mediante SDS-PAGE reductora y no reductora, IEF-PAGE desnaturalizada, SEC y HPLC de intercambio catiónico.

25 Estudios de formulación para cABCI. Puesto que la cABCI puede ser susceptible de inactivación por calor, también se utilizó la incubación a aproximadamente 37°C como un factor de estrés en los estudios de formulación. Las muestras de cABCI reconstituidas se incubaron durante la noche o más tiempo en un baño de agua a 37°C con diferentes aditivos y componentes del tampón. Después de la incubación, las muestras se analizaron para determinar la actividad de la enzima.

30 **Ejemplo 1**

La condroitinasa ABCI recombinante se expresó en exceso en *E.coli* y se purificó de acuerdo con las siguientes etapas:

(i)extracción de la enzima con Triton X-114/PBS y sonicación del sedimento de células bacterianas;

(ii)cromatografía de intercambio catiónico SP en tampón de acetato de sodio a pH 5,5;

35 (iii)cromatografía de filtración en gel Sephacryl S200 en tampón de acetato de sodio a pH 5,5;

(iv)filtración a través de membrana de intercambio aniónico Q para la eliminación de endotoxina y ADN; y

(v) diálisis en un tampón volátil (bicarbonato de amonio a pH 8,0). Opcionalmente, esta etapa puede estar seguida de liofilización, o de cualquier otro método de concentración y eliminación de tampón (por ejemplo, filtración en condiciones estériles seguido de suspensión en una formulación apropiada).

40 Se expresó en exceso una condroitinasa ABCI recombinante en *E. coli*. Una gran parte de la enzima se liberó en disolución con detergente no iónico y sonicación. Una SDS-PAGE, visualizada con tinción de plata, del extracto soluble en detergente y fracciones de sedimento insolubles en detergente de las células bacterianas que expresan en exceso ABCI reveló una única banda grande que corre entre marcadores de tamaño de aproximadamente 75 kDa y 100 kDa.

45 La cromatografía de intercambio catiónico se utilizó como una etapa de captura en purificaciones adicionales. La cromatografía CEX SP a pH aproximadamente 5,5 en tampón de acetato fue eficaz para la captura de la condroitinasa ABCI del extracto de células bacterianas. Se encontró que la enzima se había unido cuantitativamente y eluía de la columna SP con una pureza y un rendimiento relativamente altos cuando se utilizaba detergente Triton X-114, concentración final en el intervalo de aproximadamente 0,2-1%, en el tampón de extracción. El análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones inicio, flujo continuo y de elución de la condroitinasa ABCI (25%B) de la columna SP para el extracto con Triton X-114 reveló que la condroitinasa ABCI había eluido. Un extracto que contenía Triton X-100 pareció alterar las características de carga de la condroitinasa ABCI dando como resultado una captura escasa, unos rendimientos de elución pobres y una baja pureza en la etapa.

La eliminación de endotoxina se logró mediante dos métodos, específicamente reparto en Triton X-114 y filtración en membrana de intercambio aniónico Q.

5 El análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones condroitinasa ABCI durante etapa de eliminación de endotoxina utilizando el método de reparto con Triton X-114 detectó una única banda grande en ausencia de cualquiera de las bandas de fondo.

10 La filtración a través de membranas Q se empleó para la etapa de eliminación de endotoxina. Este método se sometió a ensayo a aproximadamente pH 5,5. Se encontró que el acetato de Na 20 mM, pH 5,5, NaCl 100 mM era un tampón eficaz para la unión de la endotoxina a las membranas Q (de acuerdo con K.C. Hou y R. Zaniewski, Biotech. Appl. Biochem. 12, 315-324, 1990, se espera que estas condiciones de pH y sal eliminen aproximadamente 75% de endotoxina) y para reducir al mínimo las pérdidas cABCI durante esta etapa. Se recogió más de 95% de la cABCI en un modo de flujo continuo. Esta etapa se llevó a cabo después de filtración en gel al final de la purificación, tal como se describe a continuación.

15 La filtración en gel se utilizó como una etapa de refinado para la condroitinasa ABCI. Los ejemplos de la filtración en gel que se pueden utilizar incluyen Sephacryl S200 y Sephacryl S300. Se sometieron a ensayo Sephacryl S200 y Sephacryl S300 para determinar su eficacia en la separación de los agregados y los contaminantes de bajo peso molecular. Se sometieron a ensayo dos tampones de elución diferentes (Tampón 1: Tris 20 mM a pH 8,0, NaCl 200 mM, betaína 0,5% y Tampón 2: acetato de sodio 20 mM a pH 5,5, NaCl 100 mM) para cada gel y se encontró que funcionaban igual de bien. La condroitinasa ABCI se hizo eluir con los tiempos de retención esperados sin una pérdida sustancial en la muestra.

20 La Figura 2 representa la purificación de condroitinasa ABCI mediante en gel. La Figura 2A es un perfil de cromatografía para columna 26/60 de Sephacryl S300. La Figura 2B es un análisis de SDS-PAGE de la fracción de elución de condroitinasa ABCI de una columna 26/60 de Sephacryl S300 en Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 200 mM, betaína al 0,5%. La Figura 2C es un análisis de SDS-PAGE de la fracción de elución de condroitinasa ABCI de una columna 26/60 de Sephacryl S200 en acetato de Na 20 mM, pH 5,5, NaCl 100 mM.

25 Para la liofilización, la enzima purificada se sometió a diálisis en tampón volátil de NH_4CO_3 0,1 M, a pH aproximadamente 8,0.

30 Se llevó a cabo una SDS-PAGE en gradiente (4-20%), en condiciones reductoras, de muestras de la columna de captura de intercambio catiónico (extracto de partida, flujo continuo, lavado y conjunto de elución de SP) y de las etapas de filtración en gel (conjunto de elución de S200). El gel se tiñó con azul de Coomassie. El análisis en gel mostró que las etapas de purificación eliminaron relativamente todos los restos celulares y contaminantes, proporcionando una muestra de enzima relativamente pura.

Ejemplo 2

35 Este ejemplo ilustra la actividad enzimática de la condroitinasa ABCI recombinante purificada del Ejemplo 1 en comparación con la enzima nativa. La actividad enzimática de la condroitinasa ABCI se analizó como se describe en otra parte en la presente memoria. La condroitinasa ABCI recombinante del Ejemplo 1 tiene la misma o mayor actividad específica que la enzima nativa, y una actividad mucho más alta que la condroitinasa ABCI expresada de manera recombinante como se muestra a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4. Actividad enzimática

| Fuente de Enzima | Actividad Específica, U/mg |
|--|----------------------------|
| Condroitinasa ABCI nativo (Seikagaku) | 120 |
| Condroitinasa recombinante (Glyko) | 24 |
| Condroitinasa ABCI recombinante (Acorda) | 160 |

40 La caracterización mediante SEC se llevó a cabo tanto para la condroitinasa ABCI recombinante del Ejemplo 1 como para la condroitinasa ABCI nativa descrita anteriormente. Los perfiles de elución de la condroitinasa ABCI recombinante y la condroitinasa ABCI nativa fueron los mismos. La condroitinasa ABCI recombinante tuvo el tiempo de retención y el peso molecular esperados para una condroitinasa ABCI.

45 Determinación del punto isoeléctrico de la condroitinasa ABCI recombinante. Se utilizó IEF-PAGE, como se describe en otra parte en la presente memoria, para determinar el valor de pI para la condroitinasa ABCI recombinante del

Ejemplo 1. La proteína recombinante del Ejemplo 1 mostró 3 formas isoméricas con un pl de aproximadamente 7,8-8,0 para la isoforma principal. Este valor fue mayor de lo esperado para una enzima nativa.

Ejemplo 3

5 Se sometieron a ensayo condroitinasa ABCI, AC, y B en una serie de sustratos y en médula espinal de ratas para determinar su especificidad y su actividad utilizando un método mejorado de HPLC de intercambio aniónico. Este método detecta los disacáridos productos de escisión de CSPG (Δ di-4DS y Δ di-6DS) con un límite de cuantificación de 25 ng.

10 Las mediciones de los productos de escisión disacáridos liberados revelaron concentraciones de enzimas, combinaciones de enzimas, y características del sustrato en médula espinal de ratas óptimas. La actividad catalítica de la condroitinasa ABCI y la condroitinasa AC aumentó sinérgicamente con la adición de condroitinasa B. Las digestiones *ex vivo* de médula espinal de rata proporcionan Δ di-4DS y Δ di-6DS en una proporción de aproximadamente 95:5. Los estudios de evolución en el tiempo revelaron que la formación máxima del producto tenía lugar en el plazo de 6 horas incluso aunque las enzimas fueran activas durante mucho más tiempo. La inhibición del producto se descartó como causa de esta observación.

15 **Ejemplo 4**

El siguiente ejemplo ilustra la especificidad de sustrato de la cABCI recombinante purificada. La cABCI (lote 7b) se reconstituyó en fosfato de sodio 0,1 M, y NaCH_3COO 50 mM a pH 7,4. Las tasas de formación de producto se midieron a diferentes concentraciones para las condroitinas A, B, y C. Los datos se representaron gráficamente y, cuando fue apropiado, se ajustaron directamente a la ecuación de Michaelis-Menten para el cálculo de los valores de K_m y V_{max} . Las curvas para las condroitinas A, B y C mostraron saturación a altas concentraciones de sustrato lo que es típico para la cinética de Michaelis-Menten. Se midieron los siguientes parámetros cinéticos de cABCI (Figuras 1 y 3, Tablas 3-5): $K_m = 0,033$ mg/ml y $V_{max} = 283$ U/mg para la condroitina A, $K_m = 0,021$ mg/ml y $V_{max} = 74$ U/mg para la condroitina B, $K_m = 0,025$ mg/ml y $V_{max} = 188$ U/mg para la condroitina C. Teniendo en cuenta los niveles de impurezas que están presentes en cada sustrato (aproximadamente 70%, para la condroitina A, aproximadamente 85% para la condroitina B y aproximadamente 90% para la condroitina C), parece que la cABCI tiene una afinidad similar para todas las condroitinas, pero las digiere a diferentes tasas específicas (condroitina A > condroitina C > condroitina B). La Tabla 5 proporciona los datos en bruto para las curvas de dependencia de la concentración de la condroitina A, B y C.

Tabla 5. Actividad

| Sustrato, mg/ml | Tasas medidas, nmol/min | Actividad media, U/mg |
|--|---------------------------|-----------------------|
| Condroitina A (pureza de 70%) 0,032 | 5,03; 5,54; 6,8 | 127,9 |
| 0,048 | 6,85; 7,39; 7,15 | 157,6 |
| 0,08 | 9,50; 8,25; 10,38 | 207,2 |
| 0,12 | 11,34; 9,78; 11,41 | 239,6 |
| 0,16 | 11,65; 12,24; 9,19 | 243,6 |
| 0,24 | 8,97; 14,65; 10,46; 12,44 | 257,0 |
| 0,32 | 10,95; 10,45; 10,98 | 238,4 |
| 0,48 | 11,81; 11,48; 11,34 | 255,1 |
| Condroitina B (pureza de 85%) 0,04 | 9,85; 10,49 | 47,1 |
| 0,06 | 12,97; 10,67 | 54,7 |
| 0,08 | 12,46; 12,88 | 58,7 |

| Sustrato, mg/ml | Tasas medidas, nmol/min | Actividad media, U/mg |
|-------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| 0,16 | 14,47; 14,50 | 67,0 |
| 0,20 | 14,58; 12,72 | 63,2 |
| 0,40 | 15,20; 15,31 | 70,6 |
| 0,60 | 15,21; 13,98; 16,03 | 69,8 |
| 0,80 | 16,10; 14,97 | 71,9 |
| Condroitina C (pureza de 90%) | | |
| 0,03 | 5,26; 3,91; 4,26 | 91,6 |
| 0,053 | 6,57; 6,41; 6,23 | 131,2 |
| 0,107 | 8,00; 8,55; 8,46 | 170,7 |
| 0,160 | 7,49; 7,98; 7,66 | 158,0 |
| 0,267 | 8,84; 8,49; 7,46 | 169,3 |
| 0,400 | 8,23; 9,23; 7,58 | 171,1 |
| 0,533 | 9,65; 8,33; 8,18 | 178,7 |

5 Las tasas medias específicas (U/mg) se representaron gráficamente como una función de la concentración de sustrato (mg/ml) y los datos se ajustaron directamente en la ecuación de Michaelis-Menten para la determinación de los parámetros cinéticos de cABCI. La Figura 3 muestra las curvas de Michaelis-Menten para cABCI y sus sustratos: condroitina A, B y C.

Ejemplo 5

10 Se midió la inhibición de la enzima condroitinasa ABCI purificada en presencia de diversas sales de metales divalentes (1 mM). Se analizó la actividad cABCI después realizar adiciones de metales. La capacidad de inhibición de los metales sometido a ensayo parece estar en el orden siguiente: Zn >> Ni >> Co > Ca > Mg. En particular, los iones de calcio y magnesio parecen tener algunos efectos inhibidores medibles sobre cABCI. La Tabla 6 proporciona la inhibición por metal de la cABCI recombinante.

Tabla 6. Inhibición por metal

| Sales metálicas, 1 mM | Tasas medidas, nmol/min | Actividad retenida, U/mg | Actividad retenida % |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------|
| Ninguno | 12,6; 13,9; 14,7 | 127 | 100 |
| CoCl ₂ | 6,5; 6,6 | 61 | 48 |
| NiSO ₄ | 1,8; 1,9 | 17 | 14 |
| ZnCl ₂ | 0,23; 0,29 | 2,4 | 2 |
| CaCl ₂ | 7,6; 9,2 | 78 | 61 |

| Sales metálicas, 1 mM | Tasas medidas, nmol/min | Actividad retenida, U/mg | Actividad retenida % |
|--------------------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------|
| MgCl ₂ | 9,1; 9,2 | 85 | 67 |
| FeCl ₂ | interfirió en un análisis | ND | ND |
| Cu(CH ₃ COO) ₂ | interfirió en un análisis | ND | ND |

Ejemplo 6

5 Este ejemplo ilustra el efecto que tiene el pH del tampón de almacenamiento sobre la estabilidad de la cABCI recombinante purificada. La cABCI liofilizada se reconstituyó en tampón de acetato de Na 20 mM, pH 5,5, NaCl 100 mM a 2,0 mg/ml de concentración (utilizando un análisis de proteína BCA). Se lograron diferentes condiciones de pH mediante la dilución de la muestra reconstituida a razones de aproximadamente 1:2 con tampones de Bis-Tris propano 50 mM con diversas condiciones de pH. La concentración de cABCI de las muestras finales fue de aproximadamente 1 mg/ml. Las muestras se almacenaron a aproximadamente 4°C y su actividad se midió a las 24 horas, 48 horas y 72 horas. Tabla 7 proporciona los datos de actividad medidos para las muestras de cABCI recombinante almacenadas bajo diferentes condiciones de pH.

Tabla 7. Actividades medidas

| PH Almacenamiento | Tasas de inicio, nmol/min | Cambio después de 24 horas a 4°C, nmol/min | Cambio después de 48 horas a 4°C, nmol/min | Cambio después de 72 horas a 4°C, nmol/min | Tasas promedio, nmol/min |
|-------------------|---------------------------|--|--|--|--------------------------|
| 4 | 1,63; 2,47 | 5,47; 5,28 | 5,16; 5,00 | 4,84; 5,59 | 4,4 |
| 5 | 2,55; 3,13 | 5,92; 4,09 | 4,00; 3,70 | 4,89; 4,59 | 4,1 |
| 6 | 3,93; 4,04 | 4,46; 3,74 | 2,64; 2,78 | 4,90; 4,67 | 3,9 |
| 7 | 4,15; 5,55 | 4,41; 4,57 | 4,97; 5,09 | 4,91; 4,51 | 4,8 |
| 8 | 4,43; 3,49 | 3,62; 4,21 | 4,29; 4,04 | 4,24; 4,80 | 4,1 |
| 9 | 4,47; 3,65 | 4,53; 4,27 | 5,09; 4,49 | 5,05; 4,10 | 4,5 |

No se observaron diferencias significativas entre las muestras almacenadas a diferentes condiciones de pH. Se prefiere el pH 7,4 para que esté dentro del intervalo de pH fisiológico.

15 Ejemplo 7

La cABCI recombinante se sometió a diferentes condiciones de estrés. Los datos de actividad y concentración de proteína para las muestras cABCI recombinante después de diversos tratamientos de estrés se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Actividad después de condiciones de estrés

| Núm. Muestra | Tratamiento | Puntos de Tratamiento | Concentración, mg/ml | Tasas medidas, nmol/min | Actividad, U/mg |
|--------------|-------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|-----------------|
| Control | 4°C | | 0,976 | 31,7, 30,0 | 126,4 |
| 1 | Congelación | 1 ciclo | 0,952 | 30,1, 29,2 | 124,6 |
| 2 | Congelación | 2 ciclo | 0,952 | 22,8, 27,8 | 108,6 |

| Núm. Muestra | Tratamiento | Puntos de Tratamiento | Concentración, mg/ml | Tasas medidas, nmol/min | Actividad, U/mg |
|--------------|-------------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|-----------------|
| 3 | Congelación | 3 ciclo | 0,932 | 27,3; 25,8 | 114 |
| 4 | H ₂ O ₂ | 0,5 mM | 0,952 | 24,3; 22,7 | 98,8 |
| 5 | H ₂ O ₂ | 5 mM | 0,964 | 4,3; 6,1 | 21,3 |
| 6 | H ₂ O ₂ | 20 mM | 0,982 | 1,1; 1,4 | 5,15 |
| 7 | Vórtice | 5 min | 0,765 | 18,4; 17,9 | 94,8 |
| 8 | Vórtice | 20 min | 0,432 | 13,0; 12,3 | 117 |
| 9 | Vórtice | 60 min | 0,066 | 0,7; 0,8 | 46 |
| 10 | UV | 40 min | 0,976 | 0,1; 0,3 | 0,8 |
| 11 | UV | 1 hora | 0,976 | 0,1; 0,1 | 0,36 |
| 12 | UV | 2 horas | 0,976 | 0,1; 0,1 | 0,33 |
| 13 | 37°C | 1 hora | 0,922 | 18,9; 16,0 | 75,5 |
| 14 | 37°C | 4 horas | 0,934 | 15,8; 17,0 | 70,1 |
| 15 | 37°C | 20 horas | 0,801 | 14,6; 8,8 | 58,3 |

Las muestras tratadas con estrés también se analizaron mediante SEC con un detector de dispersión de luz. Los perfiles de dispersión de luz de SEC de las muestras de cABCI no tratadas (control) y tratadas con estrés se muestran en las Figuras 4A-4E.

- 5 La cABCI recombinante, a aproximadamente 1 mg/ml, no pareció ser afectada por 3 ciclos de congelación y descongelación. La enzima precipitó y se inactivó en una manera dependiente del tiempo cuando se utilizó vórtice como factor de estrés. La exposición a peróxido de hidrógeno dio como resultado la pérdida de la actividad de una manera dependiente de la concentración con cambios notables en sus perfiles de isoforma sobre IEF-PAGE. La exposición a la luz UV tuvo un efecto negativo sobre la actividad de cABCI. La enzima no parecía ser estable a 37°C y su pérdida de actividad parecía ser dependiente del tiempo. Las muestras inactivadas térmicamente tuvieron una disminución de la concentración de proteína y mostraron cambios similares en el perfil de isoforma, pero en menor grado, con respecto a los observados para las muestras tratadas con peróxido de hidrógeno.

- 15 Se desarrolló un método de HPLC de intercambio catiónico débil (CEX) con el fin de cuantificar los productos de oxidación de cABCI. Por lo tanto, se llevó a cabo otro estudio estrés con el fin de identificar y correlacionar la presencia de productos de oxidación con la pérdida de actividad enzimática. Algunos tratamientos de estrés se repitieron en condiciones más suaves que las utilizadas en el estudio anterior (exposición a UV). Las muestras de cABCI reconstituidas (0,6 mg/ml) se expusieron a 2 diferentes fuentes de luz UV (exposición de larga distancia y de corta distancia) durante aproximadamente 0,5, 1, 3 y 5 minutos e inactivación térmica (aproximadamente 37°C) en tampón acetato de Na 20 mM, pH 5,5, NaCl 100 mM. Las muestras se analizaron para determinar la actividad y mediante IEF-PAGE, SDS-PAGE, oxyblot y CEX-HPLC. Los resultados se describen a continuación.

Después del tratamiento de oxidación, apareció un pico adicional en CEX-HPLC y se supuso que era la condroitinasa oxidada de la Figura 5. Este pico se incrementó con el aumento en el tiempo de exposición a UV. Las áreas totales bajo la curva en los cromatogramas de RP-HPLC se mantuvieron casi iguales.

- 25 La Figura 5 muestra un análisis CEX-HPLC débil de las muestras de cABCI tratadas con UV. Se muestran los cromatogramas de cABCI antes (Figura 5A) y después de 0,5 (Figura 5B), 3 (Figura 5C) y 5 minutos (Figura 5D) de exposición a UV cercano (fuente de luz portátil).

ES 2 411 504 T3

La Tabla 9 proporciona los datos de actividad de cABCI para las muestras no tratadas (control) y tratadas con estrés.

Tabla 9. Actividad para las muestras tratadas con estrés y de control.

| Muestras | Tasas, nmol/min, | Actividad, U/mg, |
|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------|
| Control | 49,3; 40,9; 40,9 | 146,7 |
| Luz UV de larga distancia | | |
| 0,5 min | 53,5; 37,9; 46,3 46,304 45,87 | 154,0 |
| 1min | 34,0; 44,6; 44,0 | 137,1 |
| 3min | 37,62; 39,3; 32,4 | 122,2 |
| 5 minutos | 20,4; 29,2; 23,9 | 82,04 |
| Luz ultravioleta de corta distancia | | |
| 0,5 min | 41,0; 36,0; 35,2 | 125,5 |
| 1min | 16,3; 19,8; 19,2 | 61,9 |
| 3min | 8,6; 9,3; 7,8 | 28,7 |
| 5 minutos | | |
| 1 día a 37°C | 13,3; 18,0; 14,1 | 50,9 |

5 Después de la exposición a UV y calor, las muestras de cABCI se analizaron para determinar la actividad por medio del análisis espectrofotométrico descrito anteriormente. Parece que hay una correlación entre la disminución relativa en el área del pico de cABCI no oxidada con la disminución relativa de la actividad (U/mg). La Tabla 10, mostrada a continuación, es la correlación de la disminución de la cABCI no oxidada con la actividad después de la exposición a luz ultravioleta de corta distancia y de larga distancia.

Tabla 10. Actividad después de la exposición UV

| Tiempo, minutos | Área del pico | área del pico de control | % De área inicial | % De actividad inicial |
|---------------------------|---------------|--------------------------|-------------------|------------------------|
| 0 | 19239 | 2739975 | 100,0 | 100,0 |
| Luz UV de corta distancia | | | | |
| 0,5 | 93587 | 2429091 | 88,7 | 85,6 |
| 1 | 171634 | 1225441 | 44,7 | 42,1 |
| 3 | 180745 | 292674 | 10,7 | 19,7 |
| 5 | 181961 | 216126 | 7,9 | 6,4 |

| Tiempo, minutos | Área del pico | área del pico de control | % De área inicial | % De actividad inicial |
|---------------------------|---------------|--------------------------|-------------------|------------------------|
| Luz UV de larga distancia | | | | |
| 0,5 | 31900 | 2770293 | 101,1 | 105,0 |
| 1,0 | 28732 | 2670994 | 97,5 | 93,6 |
| 3,0 | 68466 | 2410100 | 88,0 | 83,3 |
| 5,0 | 89149 | 1877997 | 68,5 | 55,8 |

5 Las Figuras 6-8 muestran la correlación de la presencia del producto oxidado de cABCI con la reducción de la actividad de la enzima. También se observó cierta relación entre la aparición del producto oxidado y la actividad enzimática para las muestras inactivadas térmicamente. Las muestras de cABCI fueron expuestas a calor y se analizaron para determinar su actividad mediante espectrofotometría y para determinar el producto oxidado mediante CEX-HPLC como se ha descrito anteriormente.

10 La Tabla 11 muestra los datos de las mediciones de la actividad de cABCI después de la incubación a 37°C durante 0 a 24 horas. Se reconstituyó un vial de cABCI del lote 7b en acetato de sodio 50 mM/cloruro de sodio 100 mM. Las muestras se incubaron a 37°C durante 1, 2, 4, 6 y 24 horas. Se determinó la concentración de la muestra de control (antes de cualquiera de las incubaciones). La A280 de la muestra fue 0,88, y se calculó que la concentración era igual a aproximadamente 0,53 mg/mL.

Tabla 11. Actividad después de la incubación

| Muestras | Tasas medidas, nmol/min | ** Actividad, U/mg |
|----------------|-------------------------|--------------------|
| Control, 4°C * | 34,4; 26,7 | 181,85 |
| 1 hr | 26,6; 27,5 | 161,17 |
| 2 hr | 22,0; 26,7; 21,3 | 138,87 |
| 4 hr | 21,0; 21,5 | 126,56 |
| 6 hr | 19,9; 11,6; 17,9; 9,6 | 87,79 |
| 24 hr | 4,7; 4,7 | 27,91 |

15 Tabla 12. Correlación de los datos de actividad de cABCI con el perfil de HPLC de cABCI durante la inactivación térmica.

Tabla 12. Actividad después de la inactivación térmica

| Tiempo | Área del pico | Área del pico de control | % De área inicial | % De actividad inicial |
|---------|---------------|--------------------------|-------------------|------------------------|
| Inicial | 49607 | 3342595 | 100 | 100,0 |
| 1 hr | 60633 | 2926126 | 87,5 | 84,7 |
| 2 hr | 77000 | 2728818 | 81,6 | 72,8 |
| 4 hr | 88621 | 2068080 | 61,9 | 66,6 |

| Tiempo | Área del pico | Área del pico de control | % De área inicial | % De actividad inicial |
|--------|---------------|--------------------------|-------------------|------------------------|
| 6 hr | 134161 | 1375960 | 41,2 | 45,9 |
| 25 hr | 311574 | 336266 | 10,1 | 14,7 |

Después de la determinación de la actividad y del análisis mediante CEX-HPLC débil, también se analizaron las muestras inactivadas térmicamente y con UV mediante SDS-PAGE, IEF-PAGE y Oxyblot.

5 El estudio de incubación a 37°C se repitió para otras condiciones de tampón: Fosfato de Na 0,1 M, pH 7,4, Acetato de Na 50 mM y Fosfato de Na 0,75 M, Acetato de Na 50 mM, como se describe en el Ejemplo 8.

Ejemplo 8

10 En el siguiente estudio, se utilizaron diferentes tampones para determinar la estabilidad de la enzima. La cABCI recombinante se reconstituyó en Acetato de Na 50 mM, pH 6,5, NaCl 100 mM y se diluyó 1:3 con disoluciones 0,2 M de acetato de sodio, fosfato de sodio, Tris y HEPES. Después de una incubación durante la noche a 37°C en los diferentes tampones se determinó la actividad de cABCI. Los datos se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Actividad basada en el sistema tampón

| Sistema tampón | Tasas medida, nmol/min | Actividad, U/mg |
|--|------------------------|-----------------|
| Acetato, pH 6,5 después de incubación a 4°C | 31,7; 30,0 | 126,4 |
| Acetato, pH 6,5 después de incubación a 37°C | 16,4; 20,8 | 82,4 |
| Tris, pH 8,1 después de incubación a 37°C | 15,5; 18,9 | 76,1 |
| Fosfato de Na, pH 7,4 después de incubación a 37°C | 28,4; 28,0 | 124,8 |
| HEPES, pH 6,8 después de incubación a 37°C | 24,2; 26,9 | 113 |

Este estudio reveló que el tampón de fosfato proporcionó la mayor protección para cABCI contra la inactivación térmica.

15 Ejemplo 9

Este ejemplo demuestra el efecto de diversos estabilizadores de proteína (tampones) y excipientes sobre su capacidad para estabilizar la cABCI. Los resultados de esta evaluación de diferentes estabilizadores de proteínas y condiciones de tampón para la formulación de tampón para cABCI se enumeran en la Tabla 14.

Tabla 14. Actividad basada en estabilizadores de proteína y tampones

| Tratamiento | Tasas de inicio, nmol/min | Actividad de inicio, U/mg | Tasas 72 horas, 37°C, nmol/min | Actividad 72 horas, 37°C, U/mg | Actividad retenida % |
|---|---------------------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------|
| Control: Fosfato de Na 100 mM pH 7,4, Acetato de Na 50 mM, NaCl 50 mM | 8,6; 9,8 | 91,6 | 2,6; 2,4 | 5,3 | 5,8 |
| NaCl 500 mM | 7,9; 10,0 | 89,5 | 14,2; 12,3 | 17,7 | 19,7 |
| Fosfato de Na 750 mM | 11,3; 12,2 | 117,9 | 11,3; 11,8 | 106,0 | 90,0 |
| Hidroquinona 0,1 mM | 10,3; 10,2 | 102,9 | 0,03; 0,09 | 0 | 0 |

ES 2 411 504 T3

| Tratamiento | Tasas de inicio, nmol/min | Actividad de inicio, U/mg | Tasas 72 horas, 37°C, nmol/min | Actividad 72 horas, 37°C, U/mg | Actividad retenida % |
|--|---------------------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------|
| Manitol al 1% | 11,6; 9,2 | 104,5 | 4,6; 6,1 | 7,6 | 7,2 |
| Sacarosa 0,3 M | 10,5; 8,9 | 87,3 | 13,0; 13,7 | 13,3 | 15,3 |
| Glicerol al 10% | 9,6; 10,2 | 98,8 | 3,6; 3,1 | 3,5 | 3,6 |
| Arginina 100 mM | 10,2; 11,6 | 109,2 | 0,06; 0,12 | 2,5 | 2,3 |
| Trehalosa 0,3 M | 8,7; 8,7 | 87,1 | 0,8; 0,8 | 1,2 | 1,4 |
| Fosfato de Na 50 mM | 3,0; 3,0 | 51,4 | 0,2; 0,3 | 3,3 | 6,4 |
| Fosfato de Na 50 mM Polietilimida al 0,01% | 4,5; 4,3 | 68,3 | 2,2; 3,0 | 11,3 | 16,5 |
| * Mostrados son ejemplos de dos pruebas | | | | | |

La Tabla 15 proporciona una evaluación de EDTA como aditivo para la formulación de tampón para cABCI.

Tabla 15. Actividad después de la administración de EDTA

| Tratamiento | Tasas de inicio, nmol/min | Actividad de inicio, U/mg | Tasas 36 a hrs, 37°C, nmol/min | Actividad a 36 horas, 37°C, U/mg | Actividad retenida % |
|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------|
| Fosfato de Na 50 mM | 5,9; 6,1 | 83,3 | 23,9; 26,0 | 53,1 | 63,7 |
| Fosfato de Na 50 mM, EDTA 1 mM | 6,0; 4,8 | 75,0 | 18,0; 21,1 | 65,2 | 86,9 |
| Fosfato de Na 750 mM | 12,0; 10,8 | 158,2 | 5,9; 6,2 | 151,1 | 95,5 |
| Fosfato de Na 750 mM EDTA 1 mM | 11,3; 8,2 | 135,8 | 5,9; 6,0 | 149,5 | 110,1 |

- 5 Ninguno de los excipientes o tampones, excepto el fosfato de sodio 750 mM, fue eficaz contra la inactivación térmica de cABCI. El NaCl 500 mM también mostró una cierta mejora en la estabilidad térmica de cABCI. Los resultados sugirieron que la fuerza iónica podría desempeñar un papel en la protección de cABCI frente a la inactivación térmica.

Ejemplo 10

- 10 Este ejemplo demuestra los efectos que diferentes sales y diferentes concentraciones de sal tienen sobre la estabilidad de cABCI usando cloruro de sodio en el tampón de formulación para cABCI. Se reconstituyó cABC recombinante en Fosfato de Na 50 mM, pH 7,4 a aproximadamente 2 mg/ml. Se tomó una lectura de la actividad inicial para determinar el nivel básico de actividad. La condroitinasa (1 mg/ml) se diluyó en cloruro de sodio (NaCl) en Fosfato de Na 50 mM, pH 7,4 a concentraciones que oscilaban de 0 a 1 M. Las muestras se dejaron incubando a 37°C durante 48 horas. Después de dos días, las muestras se analizaron para determinar su actividad. Los datos se presentan a continuación en la Tabla 16-18 y en las Figuras 10 y 11. La Tabla 16 demuestra que la estabilidad térmica de cABCI depende de la fuerza iónica del NaCl en presencia de tampón de Fosfato de Na 50 mM.

Tabla 16. Estabilidad térmica y fuerza iónica

| NaCl, mM | Tasas medidas, nmol/min | Actividad a 48 horas, 37°C, U/mg | Actividad retenida, % |
|----------|-------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| 0 | 0,33; 0,33 | 3,3 | 5,1 |
| 10 | 0,11; 0,27 | 2,0 | 3,0 |
| 100 | 0,79; 0,92 | 8,5 | 13,2 |
| 250 | 0,83; 0,84 | 8,4 | 12,9 |
| 500 | 1,30; 1,76 | 15,3 | 23,7 |
| 1000 | 1,80; 1,67 | 17,4 | 26,9 |

La Figura 10 es una representación gráfica de los datos que se muestran en la Tabla 16. La Tabla 17 demuestra que los efectos de la concentración de tampón sobre la estabilidad térmica de cABCI son dependientes de la concentración del tampón en presencia de NaCl 100 mM y Acetato de Na 50 mM.

Tabla 17. Estabilidad térmica y tampón

| Tampón de fosfato, mM | Tasas, nmol/min | Actividad a 96 horas, 37°C, U/mg | Actividad Retenida % |
|-----------------------|-----------------|----------------------------------|----------------------|
| 50 | 0,10; 0,07 | 0,83 | 0,8 |
| 100 | 4,4; 4,6 | 9,0 | 8,8 |
| 250 | 18,6; 20,8 | 43,9 | 43,0 |
| 500 | 16,4; 15,3 | 69 | 67,6 |
| 750 | 24,6; 20,8 | 103,3 | 101,4 |
| 1000 | 16,9; 19,9 | 92,2 | 90,5 |

La Figura 12 es una representación gráfica de los datos presentados en la Tabla 17. Los datos demostraron que el aumento de la fuerza iónica parece mejorar la estabilidad térmica de cABCI. El Fosfato de Na 750 mM también proporciona protección para cABCI.

El siguiente conjunto de experimentos se realizó con el fin de optimizar las condiciones de fuerza iónica, mientras que se mantenía la concentración de sal lo más baja posible en la formulación final. La estabilidad térmica de la cABCI se determinó en una disolución de fosfato de sodio y sulfato de sodio. El sulfato de sodio es conocido por sus efectos estabilizadores de proteínas. Las concentraciones de ambas sales se variaron y se midieron las tasas catalíticas de cABCI después de incubaciones a 37°C durante 19 hrs, 48 hrs, 120 hrs, y 192 hrs.

La Tabla 18 representa la optimización de las concentraciones de fosfato de sodio y sulfato de sodio para la formulación tampón para cABCI. La cABCI se reconstituyó en Na₂HPO₄ 0,1 M, Acetato de Na 50 mM, pH 7,4. Todas las muestras tuvieron concentraciones de cABCI de 0,37 mg/ml, y la misma concentración de acetato (50 mM), el mismo pH (7,4) pero diferentes concentraciones de fosfato y sulfato. Las muestras se mantuvieron en un baño de agua a 37°C durante los tiempos indicados (19 hrs, 48 hrs, 120 hrs y 192 hrs).

ES 2 411 504 T3

Tabla 18. Formulaciones de fosfato de sodio y sulfato de sodio

| Muestra | Tasa después de 19 horas, nmol/min (Actividad, U/mg) | Tasa después de 48 horas, nmol/min (Actividad, U/mg) | Tasa después de 120 horas, nmol/min (Actividad, U/mg) | Tasa después de 192 horas, nmol/min (Actividad, U/mg) |
|--|--|--|---|---|
| Control, 4°C 0,37 mg/ml | 33,701 35,646 40,353 (197,66) | N/A | N/A | N/A |
| Na ₂ HPO ₄ 0,05 M | | | | |
| Núm. 1 | 0,185 0,2766 (1,25) | N/A | N/A | N/A |
| Núm. 2 Na ₂ SO ₄ 0,15 M | 0,984 0,777 (4,8) | N/A | N/A | N/A |
| Núm. 3 Na ₂ SO ₄ 0,22 M | 1,3588 1,3924 (7,44) | N/A | N/A | N/A |
| Núm. 4 Na ₂ SO ₄ 0,3 M | 1,9721 1,8339 (10,29) | N/A | N/A | N/A |
| Na ₂ HPO ₄ 0,1 M | | | | |
| Núm. 5 | 1,1044 0,9543 (5,56) | N/A | N/A | N/A |
| Núm. 6 Na ₂ SO ₄ 0,15 M | 1,6853 1,4162 (8,38) | N/A | N/A | N/A |
| Núm. 7 Na ₂ SO ₄ 0,22 M | 2,7917 2,5572 (14,46) | N/A | N/A | N/A |
| Núm. 8 Na ₂ SO ₄ 0,3 M | 3,3989 3,8001 (19,46) | N/A | N/A | N/A |
| Na ₂ HPO ₄ 0,1 M | | N/A | N/A | N/A |
| Núm. 9 | 3,9975 3,2614 (19,62) | N/A | N/A | N/A |
| Núm. 10 Na ₂ SO ₄ 0,15 M | 7,7154 5,48 (35,66) | N/A | N/A | N/A |

ES 2 411 504 T3

| Muestra | Tasa después de 19 horas, nmol/min (Actividad, U/mg) | Tasa después de 48 horas, nmol/min (Actividad, U/mg) | Tasa después de 120 horas, nmol/min (Actividad, U/mg) | Tasa después de 192 horas, nmol/min (Actividad, U/mg) |
|--|--|--|---|---|
| Núm. 11 Na ₂ SO ₄ 0,22 M | 5,1651 4,9371 (27,3) | N/A | N/A | N/A |
| Núm. 12 Na ₂ SO ₄ 0,3 M | 8,4036 8,6568 (46,1) | 2,64 3,24 (15,89) | 0,06 0,23 0,1 0,02 (0,27) precip. | N/A |
| Na ₂ HPO ₄ 0,4 M | | | | |
| Núm. 13 | 11,995 14,978 (72,9) | 8,08 9,74 9,97 (50,07) | 1,15 1,05 1,41 (0,45) precip. | N/A |
| Núm. 14 Na ₂ SO ₄ 0,15 M | 20,921 17,78 (104,6) | 17,2 15,5 (88,38) | 5,29 5,25 (14,2) precip. | N/A |
| Núm. 15 Na ₂ SO ₄ 0,22 M | 20,066 22,769 (115,77) | 14,5 19,0 15,26 11,72 (81,7) | 7,48 9,75 (23,3) precip. | N/A |
| Núm. 16 Na ₂ SO ₄ 0,3 M | 18,07 16,462 (93,32) | 16,4 18,1 12,8 19,0 (90,0) | 13,4 12,4 8,2 (30,5) precip. | N/A |
| Na ₂ HPO ₄ 0,75 M | | | | |
| Núm. 17 cABC1 | 30,481 27,388 28,128 (154,95) | 22,3 28,7 30,9 26,1 (145,9) | 20,3 7,0 9,1 13,8 (90,45) precip. | 13,234 13,749 (73) |

Los datos para las muestras de 19 horas se resumen en la Tabla 19 como el porcentaje de actividad restante.

Tabla 19. Actividad por ciento después de 19 horas

| Na ₂ HPO ₄ Na ₂ SO ₄ | 0,05 M | 0,1 M | 0,2 M | 0,4 M | 0,75 M |
|---|--------|-------|-------|-------|--------|
| 0 | 0,6 | 2,8 | 9,9 | 37,0 | 78,7 |
| 0,15 M | 2,4 | 4,3 | 18,1 | 53,1 | NA |
| 0,22 M | 3,8 | 7,4 | 13,9 | 58,8 | NA |
| 0,3 M | 5,2 | 9,9 | 23,4 | 47,4 | NA |

5 Aunque el sulfato de sodio parece mejorar la estabilidad de cABCI, la protección del fosfato parece ser más pronunciada. El tampón de fosfato de sodio 0,75 M se seleccionó para las formulaciones de cABCI para su uso a 37°C. Este tampón no se seleccionó para las formulaciones que podían ser almacenadas a temperaturas más bajas debido a su propensión a precipitar.

Ejemplo 11

10 Este ejemplo ilustra el efecto de la concentración de la enzima sobre su estabilidad térmica. Las muestras se suspendieron en fosfato 0,75 M de pH 7,4, acetato de Na 50 mM. Para determinar el intervalo de funcionamiento de las concentraciones de cABCI, se midió la estabilidad térmica de cABCI a diferentes concentraciones de enzima. Se observó que la cABCI a bajas concentraciones era tan estable como la cABCI a altas concentraciones (véase la Tabla 20). También se encontró que la cABCI a altas concentraciones tiende a precipitar después de una exposición prolongada a 37°C. Para evitar este problema, por ejemplo, las concentraciones de cABCI pueden mantenerse por debajo de ~ 0,4 mg/ml como se muestra en la Tabla 20.

15 Tabla 20. Estabilidad a 37°C de las muestras de cABCI a diferentes concentraciones de enzima en tampón Fosfato de Na 0,75 M.

| cABCI, mg/ml | Tasas de partida, nmol/min (Actividad, U/mg) | Tasas a 19 horas a 37°C, nmol/min (Actividad, U/mg) | Tasas a 48 horas a 37°C, nmol/min (Actividad, U/mg) | Tasas a 120 horas a 37°C, nmol/min (Actividad, U/mg) | Tasas a 192 horas a 37°C, nmol/min (Actividad, U/mg) |
|--------------|--|---|---|--|--|
| 0,75 | NA | 26,3; 16,1; 21,9 (115,9) | 21,8; 19,6; 27,1 (101,5) | precipita | 2,7; 2,5 (14) |
| 0,35 | 33,7; 35,6; 40,3 (197,66) | 30,5; 27,3; 28,1 (155,0) | 22,3; 28,7; 30,9 (145,9) | precipita | 13,2; 13,7 (73) |
| 0,18 | NA | 24,3; 24,3; 26,0 (134,36) | 29,1; 26,6; 21,1 (138,4) | 14,6; 20,6; 24,4 (107,4) | 14,7; 15,3 (81) |
| 0,09 | NA | 20,7; 21,9; 22,2 (116,79) | 23,7; 21,4; 20,3 (117,8) | 20,4; 18,0 (103,8) | 11,0; 12,9 (65) |

20 La SDS-PAGE y el análisis de transferencia Western de la cABCI recombinante revelaron una fragmentación parcial de la cABCI después de un almacenamiento prolongado a 4°C. La observación de que los productos de degradación son los mismos tanto para las proteínas recombinantes como nativas sugiere que la fragmentación observada puede ser debida a una propiedad intrínseca de la cABCI.

25 El extremo amino terminal de los productos de degradación se secuenció. Estos resultados revelaron que la mayoría de los productos de degradación eran una mezcla de fragmentos de proteínas. Banda Núm. 1: ATSNPAF (SEC ID NO: 3); Banda Núm. 2: ATSNPAF principal (SEC ID NO: 4); NLNTSGD minoritaria (SEC ID NO: 5); Banda Núm. 3: ASNPAFD (SEC ID NO: 6) más una mezcla de secuencias; Banda Núm. 4: X₁X₂NX₃VX₄-X₅ (SEQ ID NO: 7) mezcla en la que X₁ puede ser A o N; X₂ puede ser T o P; X₃ puede ser T o E; X₄ puede ser A o G y X₅ puede ser F o E; Banda Núm. 5: X₁X₂NX₃X₄X₅ (SEQ ID NO: 8) mezcla en la que X₁ puede ser A o N; X₂ puede ser T o Y; X₃ puede ser T o P; X₄ puede ser A o E, X₅ puede ser A o G; Banda Núm. 6: MQVNERD principal (SEQ ID NO: 9); GPRGAGT

minoritaria (SEQ ID NO: 10); Banda Núm. 7: no se identificó ninguna secuencia; Banda Núm. 8: ATSNPAF (SEC ID NO: 11).

Ejemplo 12

Este ejemplo muestra los resultados de un método de purificación para la purificación de condroitinasa AC.

5 Las células que expresaban condroitinasa AC se extrajeron usando un sonicador de punta cuadrada a una velocidad máxima de aproximadamente 9. La sonicación se realizó durante aproximadamente 30 segundos. Esto estuvo seguido inmediatamente por aproximadamente 10 segundos sin sonicación. Estas etapas de encendido/apagado se realizaron para un total de aproximadamente 10 ciclos. Cada sedimento se sometió a sonicación por separado y a continuación se agruparon. Las extracciones se sacudieron durante la noche a 4°C.

10 Después de la extracción celular de la condroitinasa AC, la muestra sometida a sonicación se analizó mediante SDS-PAGE para analizar la solubilidad de la proteína condroitinasa AC. La enzima se detectó principalmente en el sobrenadante, lo que implica que la proteína es soluble. La purificación se continuó utilizando una columna de intercambio catiónico para capturar la enzima.

15 Todo el extracto celular se cargó en una columna SP de 20 ml. El extracto se cargó en la columna a aproximadamente 0,5 ml/min. La columna SP se adjuntó a AKTA Explorer para visualizar el lavado y los picos de elución. La columna se lavó y se hizo eluir la condroitinasa AC. Las fracciones de la columna se analizaron después en SDS-PAGE para verificar la pureza y el análisis del gel reveló que la condroitinasa AC eluía desde NaCl aproximadamente 245 mM a NaCl aproximadamente 370 mM. El análisis de SDS-PAGE reveló que las fracciones eluidas contenían condroitinasa AC relativamente pura y éstas se reunieron dando como resultado un volumen total de 190 ml. Los 190 ml de las fracciones reunidas se concentraron utilizando una membrana MWCO de 10.000 (Millipore) hasta un volumen total de 105 ml con una absorbancia (A280) de 1,47. A continuación, la muestra concentrada se purificó adicionalmente usando una columna de filtración en gel.

25 Las muestras de la etapa de intercambio catiónico se cargaron en una columna de filtración de gel S200. Las muestras se eluyeron utilizando acetato de sodio 20 mM, NaCl 100 mM, pH 5,5. La primera ronda de purificación a través de la columna de filtración en gel se analizó mediante SDS-PAGE para comprobar la pureza. Las fracciones que revelaron una condroitinasa AC relativamente pura se reunieron. Después de la quinta ronda de purificación a través de la columna las muestras de las fracciones se verificaron nuevamente mediante SDS-PAGE para determinar la pureza. Las fracciones que revelaron una condroitinasa AC relativamente pura procedente de las siete rondas se reunieron hasta un volumen total de 250 ml con una absorción (A280) de 0,431. Los 250 ml se concentraron hasta un volumen total de 83 ml con absorción (A280) de 1,40.

35 La eliminación de la endotoxina de la muestra de condroitinasa AC se logró mediante purificación adicional de la muestra aislada de la etapa de filtración en gel. Las muestras se centrifugaron a través de una membrana de intercambio aniónico Q (como se describe en otra parte de la presente memoria) y condroitinasa AC se recogió en un modo de flujo continuo. Este método se sometió a ensayo a pH aproximadamente 5,5. Se encontró que el acetato de sodio 20 mM, pH 5,5, NaCl 100 mM era un tampón eficaz para la unión de la endotoxina a las membranas Q, se espera que estas condiciones de pH y sal eliminen aproximadamente 75% de endotoxina. La absorción resultante (A280) fue de 1,37. El producto final se analizó mediante SDS-PAGE para determinar la pureza. Los resultados revelaron una condroitinasa AC pura con un peso molecular de aproximadamente 50 a 75 kDa.

40 La condroitinasa AC purificada se sometió a diálisis en un tampón volátil de bicarbonato de amonio 0,1 M, pH 8,0 durante la noche y se dividió en alícuotas en pequeñas muestras (aproximadamente 1,0 ml), se liofilizó y se almacenó a -80°C. La Figura 12 muestra la SDS-PAGE de la condroitinasa AC purificada final.

Aunque la presente invención se ha descrito en detalle considerable con referencia a ciertas realizaciones preferidas de la misma, son posibles otras versiones.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ACORDA THERAPEUTICS, INC. CAGGIANO, Anthony O. GRUSKIN, Elliott_A. SHEPTOVITSKY, Yelena KASPERBAUER, Sarah

5

<120> Formulaciones de condroitinasa purificada y métodos para emplear la misma

<130> 127304.02702

10

<140> aún sin asignar

<141> 18-05-2005

<150> 60/572.030

<151> 18-05-2004

15

<150> 60/621.82

<151> 25-10-2004

20

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 997

25

<212> PRT

<213> Proteus vulgaris

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

30

ES 2 411 504 T3

Thr 145 Leu Asn Ala Thr 150 Asn Thr Ser Ser Asp Gly 155 Thr Gln Asp Ser Ile 160
 Gly Arg Ser Leu 165 Gly Ala Lys Val Asp Ser 170 Ile Arg Phe Lys Ala Pro 175
 Ser Asn Val 180 Ser Gln Gly Glu Ile Tyr 185 Ile Asp Arg Ile Met Phe Ser 190
 Val Asp 195 Asp Ala Arg Tyr Gln Trp 200 Ser Asp Tyr Gln Val 205 Lys Thr Arg
 Leu Ser 210 Glu Pro Glu Ile 215 Gln Phe His Asn Val Lys 220 Pro Gln Leu Pro
 Val 225 Thr Pro Glu Asn 230 Leu Ala Ala Ile Asp Leu 235 Ile Arg Gln Arg Leu 240
 Ile Asn Glu Phe 245 Val Gly Gly Glu Lys 250 Glu Thr Asn Leu Ala Leu 255 Glu
 Glu Asn Ile Ser 260 Lys Leu Lys Ser Asp 265 Phe Asp Ala Leu Asn Thr His 270
 Thr Leu Ala 275 Asn Gly Gly Thr 280 Gln Gly Arg His Leu Ile Thr Asp Lys 285
 Gln Ile Ile Ile Tyr Gln 295 Pro Glu Asn Leu Asn Ser 300 Gln Asp Lys Gln 305
 Leu Phe Asp Asn Tyr Val 310 Ile Leu Gly Asn Tyr Thr Thr Leu Met Phe 320
 Asn Ile Ser Arg Ala 325 Tyr Val Leu Glu Lys 330 Asp Pro Thr Gln Lys Ala 335
 Gln Leu Lys Gln 340 Met Tyr Leu Leu Met Thr Lys His Leu 350 Leu Asp Gln 355
 Gly Phe Val 355 Lys Gly Ser Ala Leu Val Thr Thr His His Trp Gly Tyr 365
 Ser Ser 370 Arg Trp Trp Tyr 375 Ile Ser Thr Leu Leu Met Ser Asp Ala Leu 380
 Lys 385 Glu Ala Asn Leu Gln 390 Thr Gln Val Tyr Asp 395 Ser Leu Leu Trp Tyr 400
 Ser Arg Glu Phe 405 Lys Ser Ser Phe Asp Met 410 Lys Val Ser Ala Asp Ser 415

ES 2 411 504 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Val Ala Gln Gly Tyr Tyr Trp Leu Ala Met Ser Ala Lys Ser
545 550 555 560

Ser Pro Asp Lys Thr Leu Ala Ser Ile Tyr Leu Ala Ile Ser Asp Lys
565 570 575

Thr Gln Asn Glu Ser Thr Ala Ile Phe Gly Glu Thr Ile Thr Pro Ala
580 585 590

Ser Leu Pro Gln Gly Phe Tyr Ala Phe Asn Gly Gly Ala Phe Gly Ile
595 600 605

His Arg Trp Gln Asp Lys Met Val Thr Leu Lys Ala Tyr Asn Thr Asn
610 615 620

Val Trp Ser Ser Glu Ile Tyr Asn Lys Asp Asn Arg Tyr Gly Arg Tyr
625 630 635 640

Gln Ser His Gly Val Ala Gln Ile Val Ser Asn Gly Ser Gln Leu Ser
645 650 655

Gln Gly Tyr Gln Gln Glu Gly Trp Asp Trp Asn Arg Met Pro Gly Ala
660 665 670

Thr Thr Ile His Leu Pro Leu Lys Asp Leu Asp Ser Pro Lys Pro His
675 680 685

ES 2 411 504 T3

Thr Leu Met Gln Arg Gly Glu Arg Gly Phe Ser Gly Thr Ser Ser Leu
 690 695 700
 Glu Gly Gln Tyr Gly Met Met Ala Phe Asp Leu Ile Tyr Pro Ala Asn
 705 710 715 720
 Leu Glu Arg Phe Asp Pro Asn Phe Thr Ala Lys Lys Ser Val Leu Ala
 725 730 735
 Ala Asp Asn His Leu Ile Phe Ile Gly Ser Asn Ile Asn Ser Ser Asp
 740 745 750
 Lys Asn Lys Asn Val Glu Thr Thr Leu Phe Gln His Ala Ile Thr Pro
 755 760 765
 Thr Leu Asn Thr Leu Trp Ile Asn Gly Gln Lys Ile Glu Asn Met Pro
 770 775 780
 Tyr Gln Thr Thr Leu Gln Gln Gly Asp Trp Leu Ile Asp Ser Asn Gly
 785 790 795 800
 Asn Gly Tyr Leu Ile Thr Gln Ala Glu Lys Val Asn Val Ser Arg Gln
 805 810 815
 His Gln Val Ser Ala Glu Asn Lys Asn Arg Gln Pro Thr Glu Gly Asn
 820 825 830
 Phe Ser Ser Ala Trp Ile Asp His Ser Thr Arg Pro Lys Asp Ala Ser
 835 840 845
 Tyr Glu Tyr Met Val Phe Leu Asp Ala Thr Pro Glu Lys Met Gly Glu
 850 855 860
 Met Ala Gln Lys Phe Arg Glu Asn Asn Gly Leu Tyr Gln Val Leu Arg
 865 870 875 880
 Lys Asp Lys Asp Val His Ile Ile Leu Asp Lys Leu Ser Asn Val Thr
 885 890 895
 Gly Tyr Ala Phe Tyr Gln Pro Ala Ser Ile Glu Asp Lys Trp Ile Lys
 900 905 910
 Lys Val Asn Lys Pro Ala Ile Val Met Thr His Arg Gln Lys Asp Thr
 915 920 925
 Leu Ile Val Ser Ala Val Thr Pro Asp Leu Asn Met Thr Arg Gln Lys
 930 935 940
 Ala Ala Thr Pro Val Thr Ile Asn Val Thr Ile Asn Gly Lys Trp Gln
 945 950 955 960

ES 2 411 504 T3

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

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

Leu Ser Pro Leu Pro
 995

<210> 2
 <211> 841
 <212> PRT
 <213> Proteus vulgaris

5

<400> 2
 Gln Asp Ser Ile Gly Arg Ser Leu Gly Ala Lys Val Asp Ser Ile Arg
 1 5 10 15

Phe Lys Ala Pro Ser Asn Val Ser Gln Gly Glu Ile Tyr Ile Asp Arg
 20 25 30

Ile Met Phe Ser Val Asp Asp Ala Arg Tyr Gln Trp Ser Asp Tyr Gln
 35 40 45

Val Lys Thr Arg Leu Ser Glu Pro Glu Ile Gln Phe His Asn Val Lys
 50 55 60

Pro Gln Leu Pro Val Thr Pro Glu Asn Leu Ala Ala Ile Asp Leu Ile
 65 70 75 80

Arg Gln Arg Leu Ile Asn Glu Phe Val Gly Gly Glu Lys Glu Thr Asn
 85 90 95

Leu Ala Leu Glu Glu Asn Ile Ser Lys Leu Lys Ser Asp Phe Asp Ala
 100 105 110

Leu Asn Thr His Thr Leu Ala Asn Gly Gly Thr Gln Gly Arg His Leu
 115 120 125

Ile Thr Asp Lys Gln Ile Ile Ile Tyr Gln Pro Glu Asn Leu Asn Ser
 130 135 140

Gln Asp Lys Gln Leu Phe Asp Asn Tyr Val Ile Leu Gly Asn Tyr Thr
 145 150 155 160

Thr Leu Met Phe Asn Ile Ser Arg Ala Tyr Val Leu Glu Lys Asp Pro
 165 170 175

Thr Gln Lys Ala Gln Leu Lys Gln Met Tyr Leu Leu Met Thr Lys His
 180 185 190

Leu Leu Asp Gln Gly Phe Val Lys Gly Ser Ala Leu Val Thr Thr His

ES 2 411 504 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 195 | | | | | 200 | | | | | | 205 | | | |
| His | Trp 210 | Gly | Tyr | Ser | Ser | Arg 215 | Trp | Trp | Tyr | Ile | Ser 220 | Thr | Leu | Leu | Met |
| Ser | Asp 225 | Ala | Leu | Lys | Glu 230 | Ala | Asn | Leu | Gln | Thr 235 | Gln | Val | Tyr | Asp | Ser 240 |
| Leu | Leu | Trp | Tyr | Ser 245 | Arg | Glu | Phe | Lys | Ser 250 | Ser | Phe | Asp | Met | Lys 255 | Val |
| Ser | Ala | Asp | Ser 260 | Ser | Asp | Leu | Asp | Tyr 265 | Phe | Asn | Thr | Leu | Ser 270 | Arg | Gln |
| His | Leu | Ala 275 | Leu | Leu | Leu | Leu | Glu 280 | Pro | Asp | Asp | Gln | Lys 285 | Arg | Ile | Asn |
| Leu | Val 290 | Asn | Thr | Phe | Ser | His 295 | Tyr | Ile | Thr | Gly | Ala 300 | Leu | Thr | Gln | Val |
| Pro | Pro 305 | Gly | Gly | Lys | Asp 310 | Gly | Leu | Arg | Pro | Asp 315 | Gly | Thr | Ala | Trp | Arg 320 |
| His | Glu | Gly | Asn | Tyr 325 | Pro | Gly | Tyr | Ser | Phe 330 | Pro | Ala | Phe | Lys | Asn 335 | Ala |
| Ser | Gln | Leu | Ile 340 | Tyr | Leu | Leu | Arg | Asp 345 | Thr | Pro | Phe | Ser | Val 350 | Gly | Glu |
| Ser | Gly | Trp 355 | Asn | Ser | Leu | Lys | Lys 360 | Ala | Met | Val | Ser | Ala 365 | Trp | Ile | Tyr |
| Ser | Asn 370 | Pro | Glu | Val | Gly | Leu 375 | Pro | Leu | Ala | Gly | Arg 380 | His | Pro | Leu | Asn |
| Ser | Pro 385 | Ser | Leu | Lys | Ser 390 | Val | Ala | Gln | Gly | Tyr 395 | Tyr | Trp | Leu | Ala | Met 400 |
| Ser | Ala | Lys | Ser | Ser 405 | Pro | Asp | Lys | Thr | Leu 410 | Ala | Ser | Ile | Tyr | Leu 415 | Ala |
| Ile | Ser | Asp | Lys 420 | Thr | Gln | Asn | Glu | Ser 425 | Thr | Ala | Ile | Phe | Gly | Glu 430 | Thr |
| Ile | Thr | Pro 435 | Ala | Ser | Leu | Pro | Gln 440 | Gly | Phe | Tyr | Ala | Phe 445 | Asn | Gly | Gly |
| Ala | Phe 450 | Gly | Ile | His | Arg | Trp 455 | Gln | Asp | Lys | Met | Val 460 | Thr | Leu | Lys | Ala |
| Tyr | Asn | Thr | Asn | Val | Trp | Ser | Ser | Glu | Ile | Tyr | Asn | Lys | Asp | Asn | Arg |

740

745

750

Lys Trp **Ile** Lys Lys Val Asn **Lys** Pro Ala Ile Val Met Thr His Arg
755 760 765

Gln **Lys** Asp Thr Leu Ile Val Ser Ala Val Thr Pro Asp Leu Asn Met
770 775 780

Thr Arg Gln Lys Ala **Ala** Thr Pro Val Thr **Ile** Asn Val Thr Ile Asn
785 790 795 800

Gly Lys Trp Gln **Ser** Ala Asp Lys Asn **Ser** Glu Val Lys Tyr Gln Val
805 810 815

Ser Gly Asp **Asn** Thr Glu Leu Thr **Phe** Thr Ser Tyr Phe Gly Ile Pro
820 825 830

Gln Glu **Ile** Lys Leu Ser Pro Leu Pro
835 840

<210> 3
<211> 7
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> fragmento de proteína

<400> 3

Ala Thr Ser Asn Pro Ala Phe
1 5

15 <210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> fragmento de proteína

<400> 4

Ala Thr Ser Asn Pro Ala Phe
1 5

25 <210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> fragmento de proteína

<400> 5

Asn Leu Asn Thr Ser Gly Asp
1 5

35 <210> 6
<211> 7

<212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> fragmento de proteína

 <400> 6
Ala Ser Asn Pro Ala Phe Asp
1 5

 10 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> fragmento de proteína

 <220>
 <221> característica miscelánea
 20 <222> (1) .. (1)
 <223> Xaa puede ser A o N

 <220>
 <221> característica miscelánea
 25 <222> (2) .. (2)
 <223> Xaa puede ser T o P

 <220>
 <221> característica miscelánea
 30 <222> (4) .. (4)
 <223> Xaa puede ser T o E

 <220>
 <221> característica miscelánea
 35 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser A o G

 <220>
 <221> característica miscelánea
 40 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser F o E

 <400> 7
Xaa Xaa Asn Xaa Val Xaa Xaa
1 5

 45 <210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> fragmento de proteína

 <220>
 <221> característica miscelánea
 55 <222> (1) .. (1)
 <223> Xaa puede ser A o N

 <220>
 <221> característica miscelánea
 60 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser T o Y

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser T o P
 5
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser A o E
 10
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (6) .. (6)
 <223> Xaa puede ser A o G
 15
 <400> 8
Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Xaa
1 5
 20
 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> fragmento de proteína
 <400> 9
Met Gl̄n Val Asn Gl̄u Arg Asp
1 5
 30
 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> fragmento de proteína
 <400> 10
Gly Pro Arg Gly Ala Gly Thr
1 5
 40
 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> fragmento de proteína
 <400> 11
Ala Thr Ser Asn Pro Ala Phe
1 5
 50

REIVINDICACIONES

1. Una formulación que comprende una condroitinasa en un tampón de fosfato de sodio a una concentración de aproximadamente 750 a 1000 mM.
- 5 2. La formulación de la reivindicación 1, en donde la concentración de tampón de fosfato de sodio es de 750 a 1000 mM.
3. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde la condroitinasa está purificada.
- 10 4. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde la condroitinasa conserva al menos de 45 a 55% de la actividad aproximadamente a las 24 horas.
- 15 5. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde la condroitinasa se selecciona del grupo que consiste en condroitinasa ABC I, condroitinasa ABC II, condroitinasa AC, condroitinasa B, Hyal1, Hyal2, Hyal3, Hyal4, y PH20.
6. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde la condroitinasa es condroitinasa ABCI.
- 20 7. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde la condroitinasa es condroitinasa AC.
8. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, que comprende adicionalmente acetato de sodio.
- 25 9. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde dicha formulación está a un pH de 7,4.
- 30 10. La formulación de la reivindicación 6, en donde la condroitinasa ABC I tiene una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2.
11. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde la concentración de tampón de fosfato de sodio es de aproximadamente 750 mM.
- 35 12. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde la concentración de tampón de fosfato de sodio es de aproximadamente 1.000 mM.

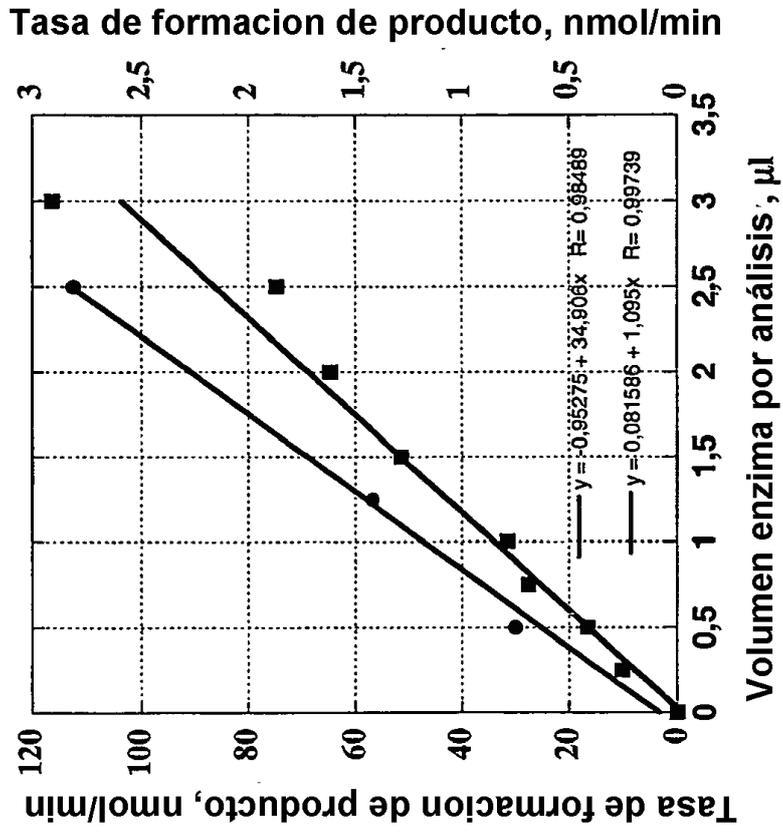
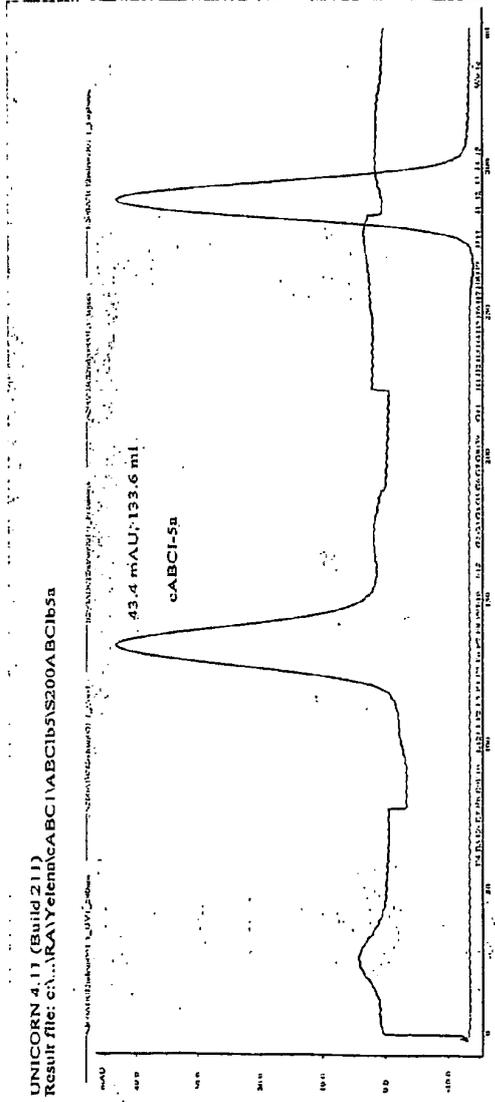
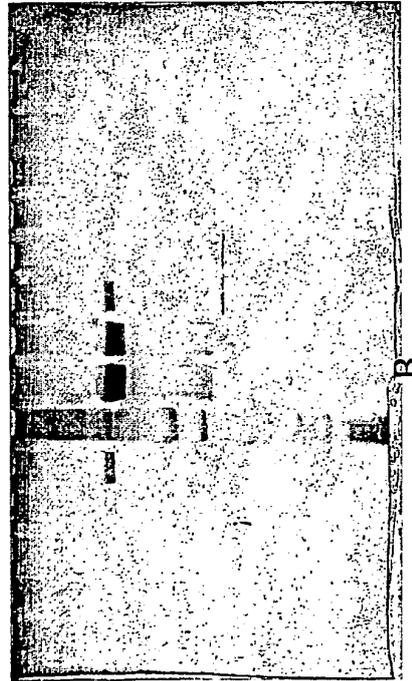


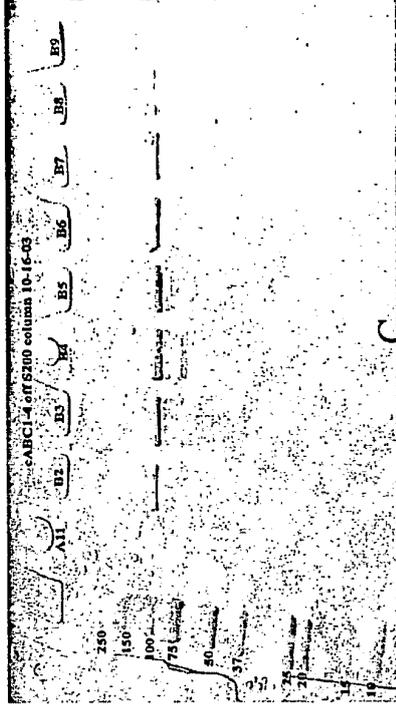
Fig. 1



A



B



C

Fig. 2

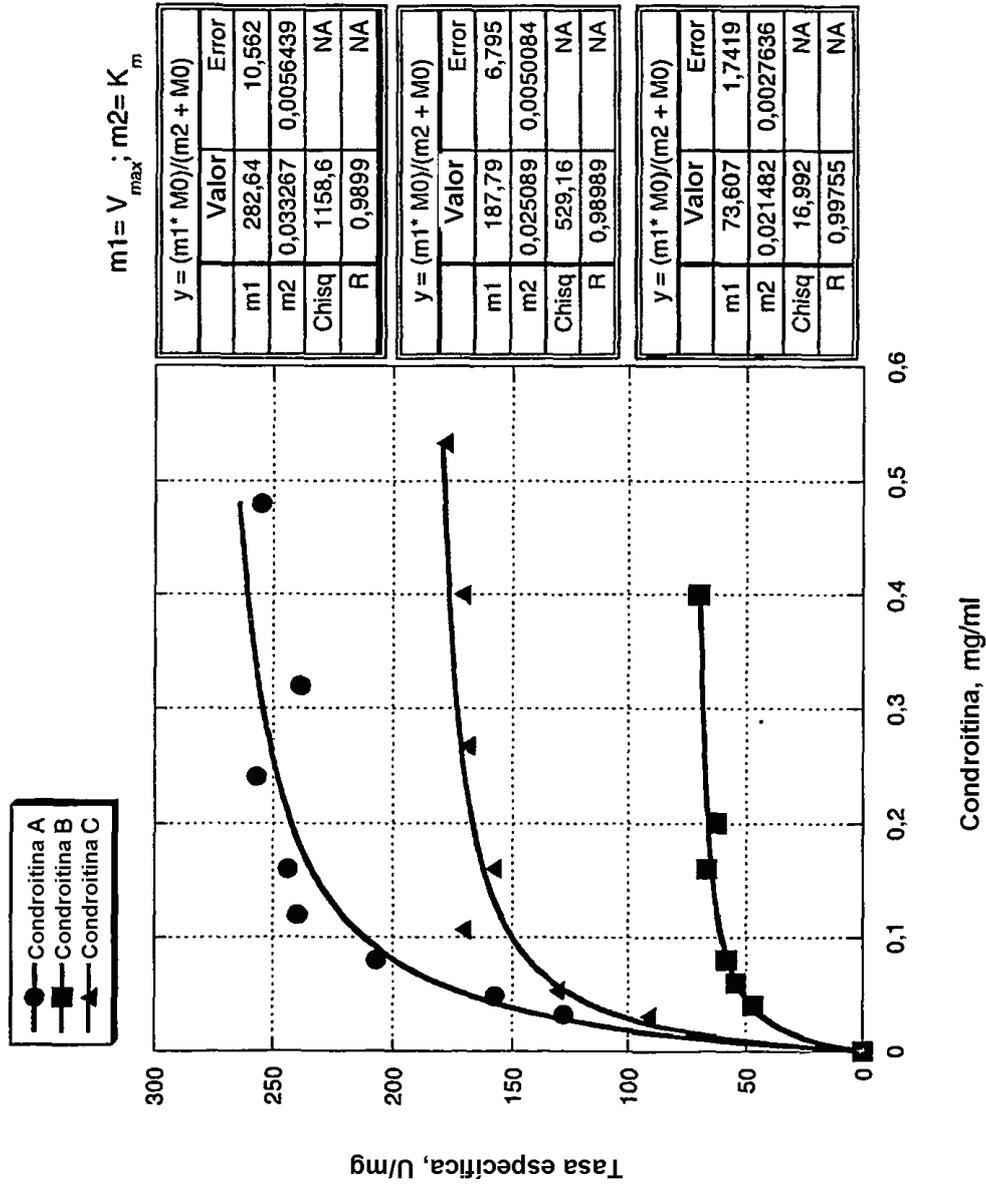


Fig. 3

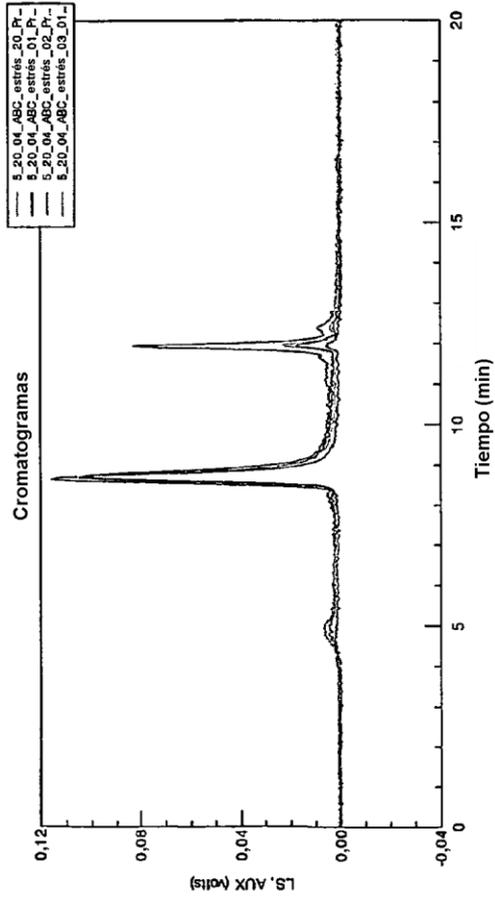


Fig. 4A

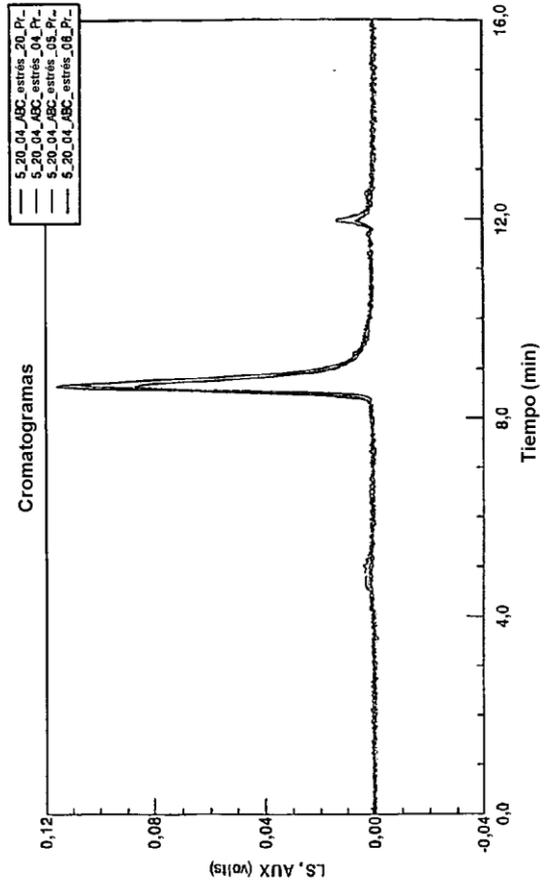


Fig. 4B

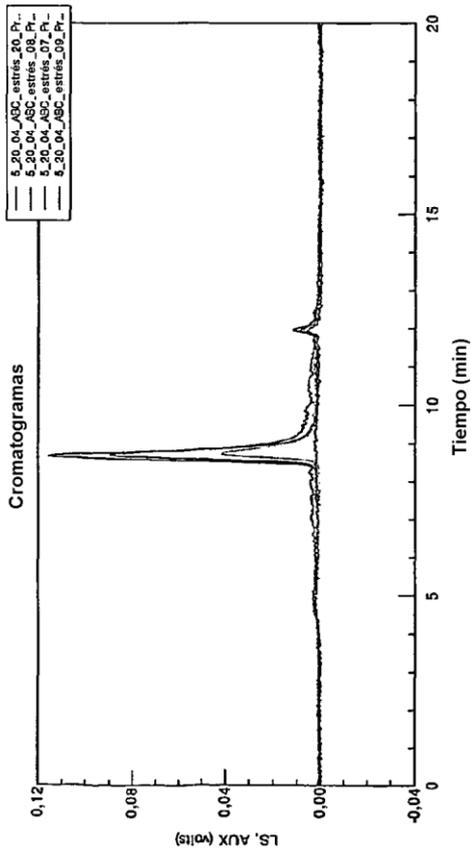


Fig. 4C

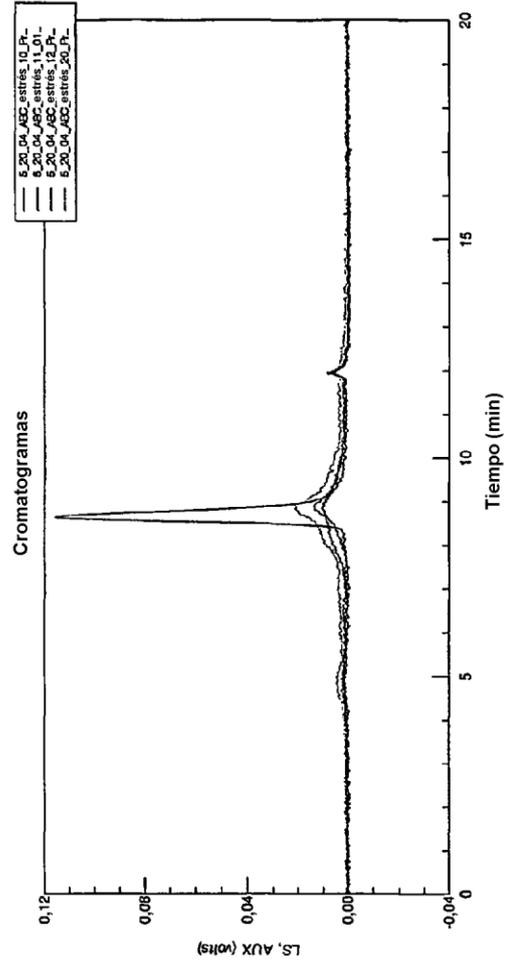


Fig. 4D

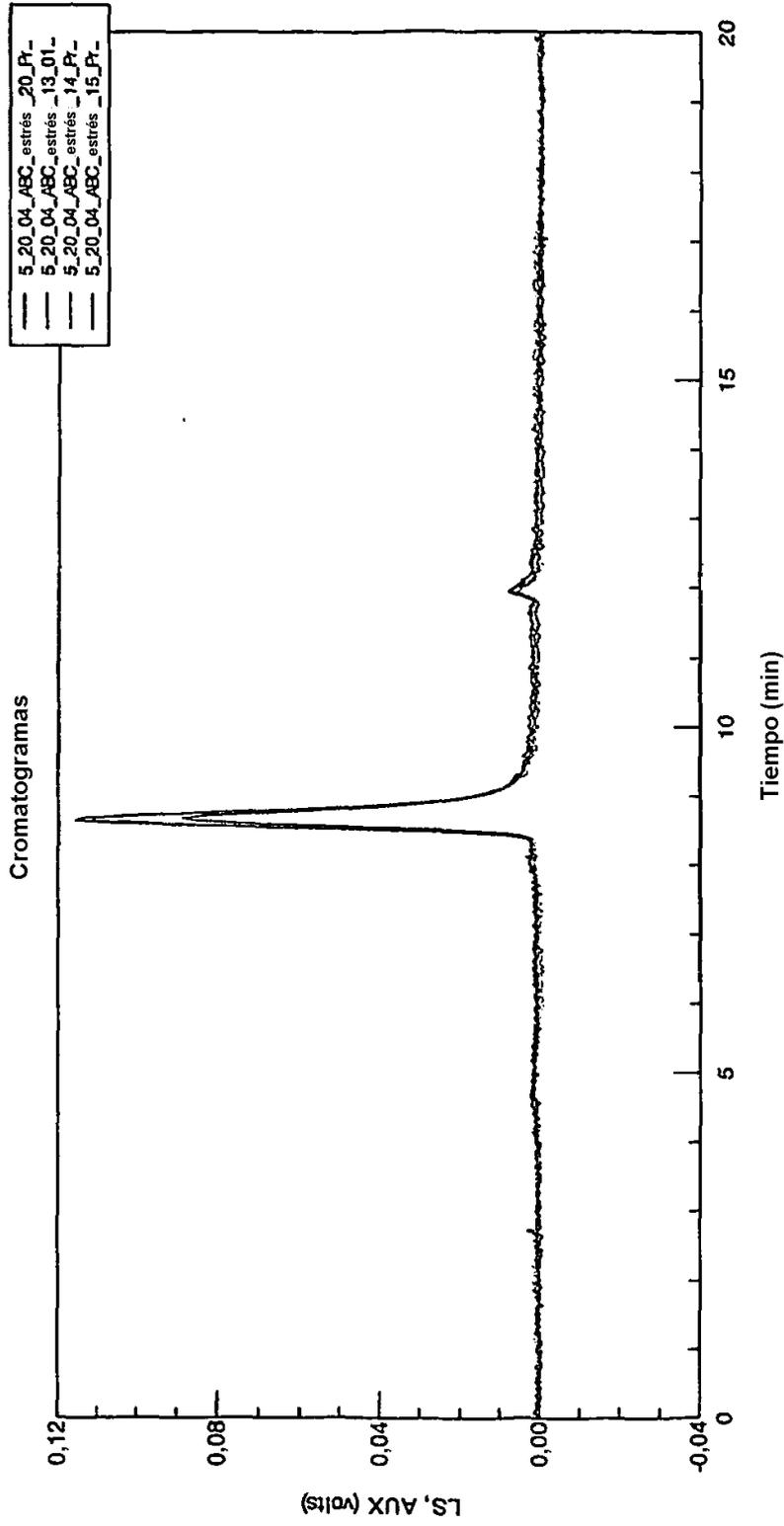


Fig. 4E

Fig. 5A

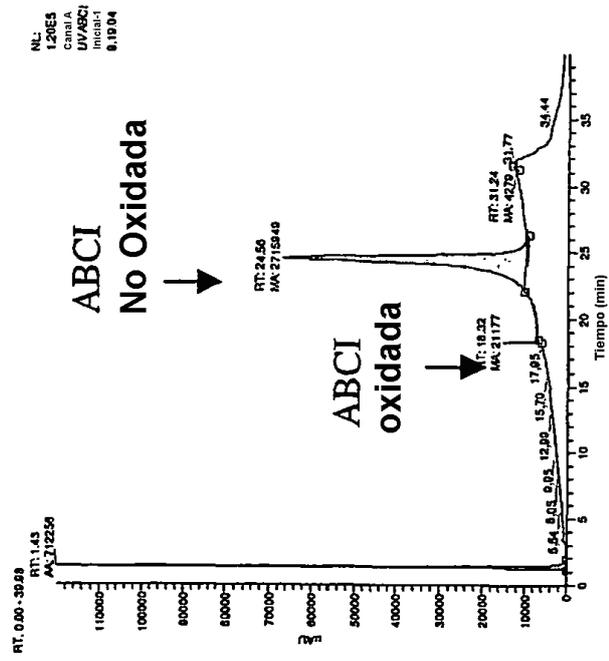


Fig. 5B

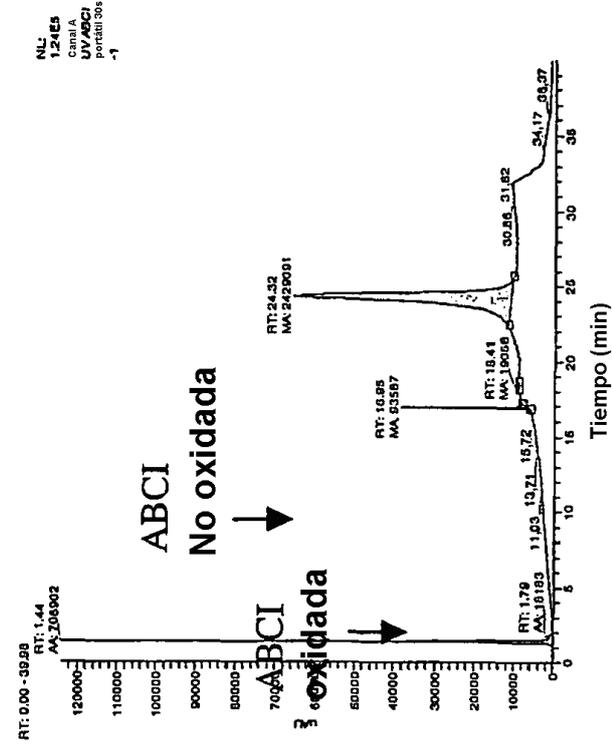


Fig. 5C

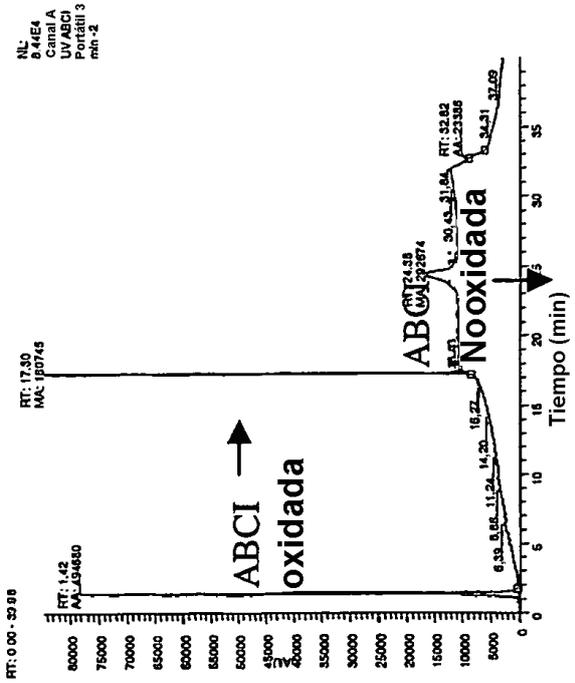


Fig. 5D

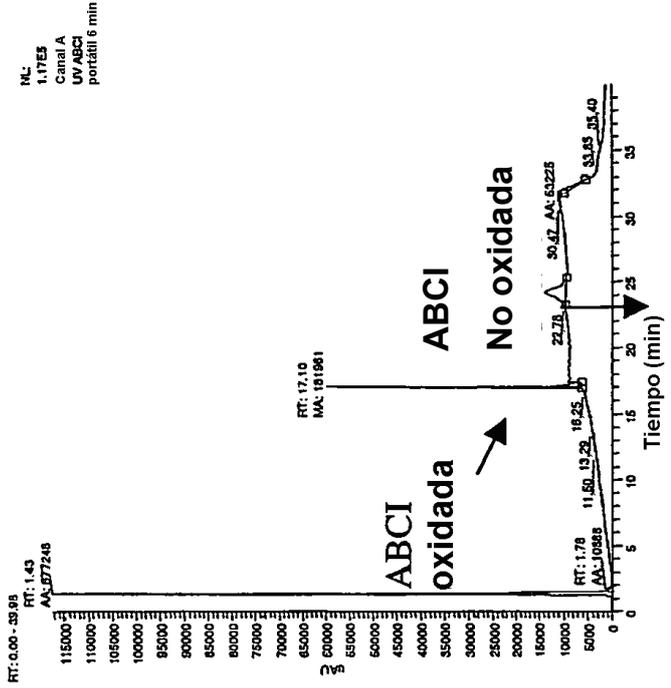


Fig. 6

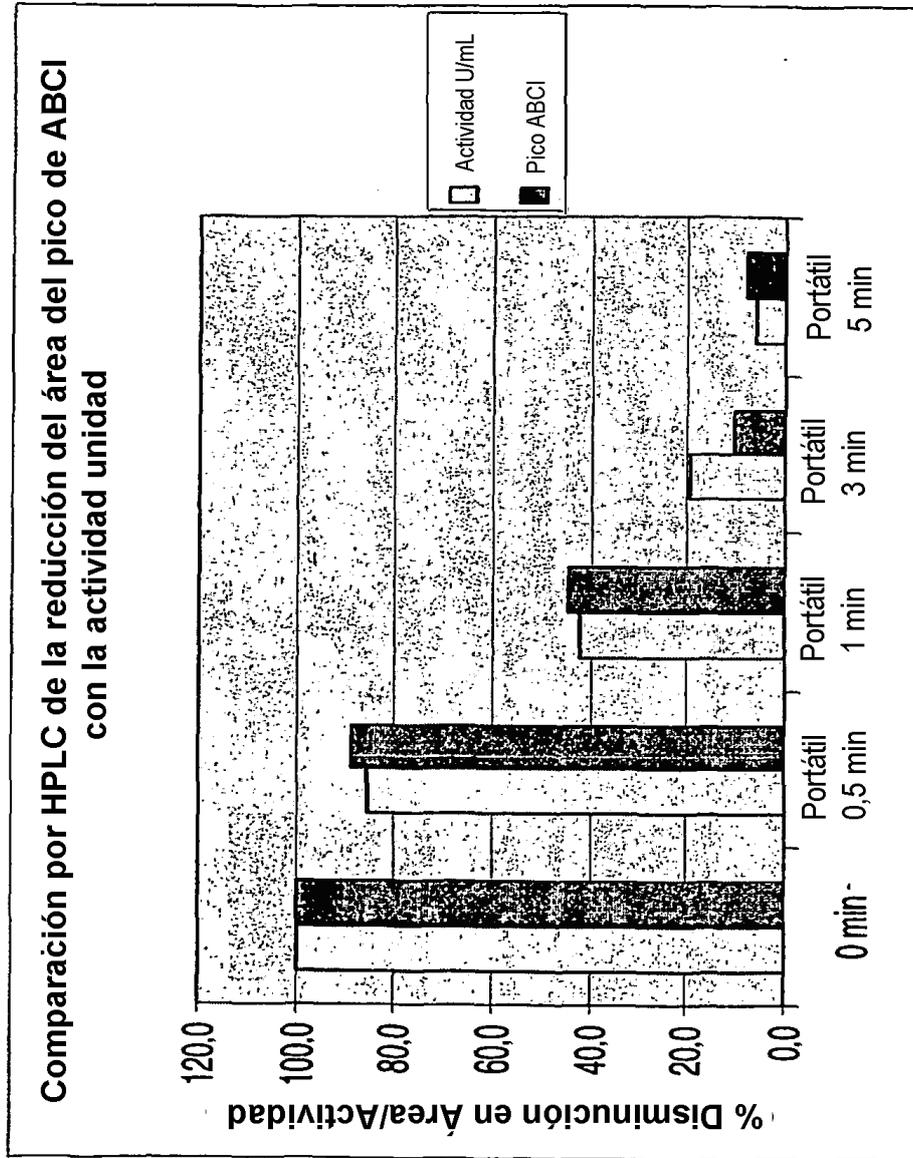


Fig. 7

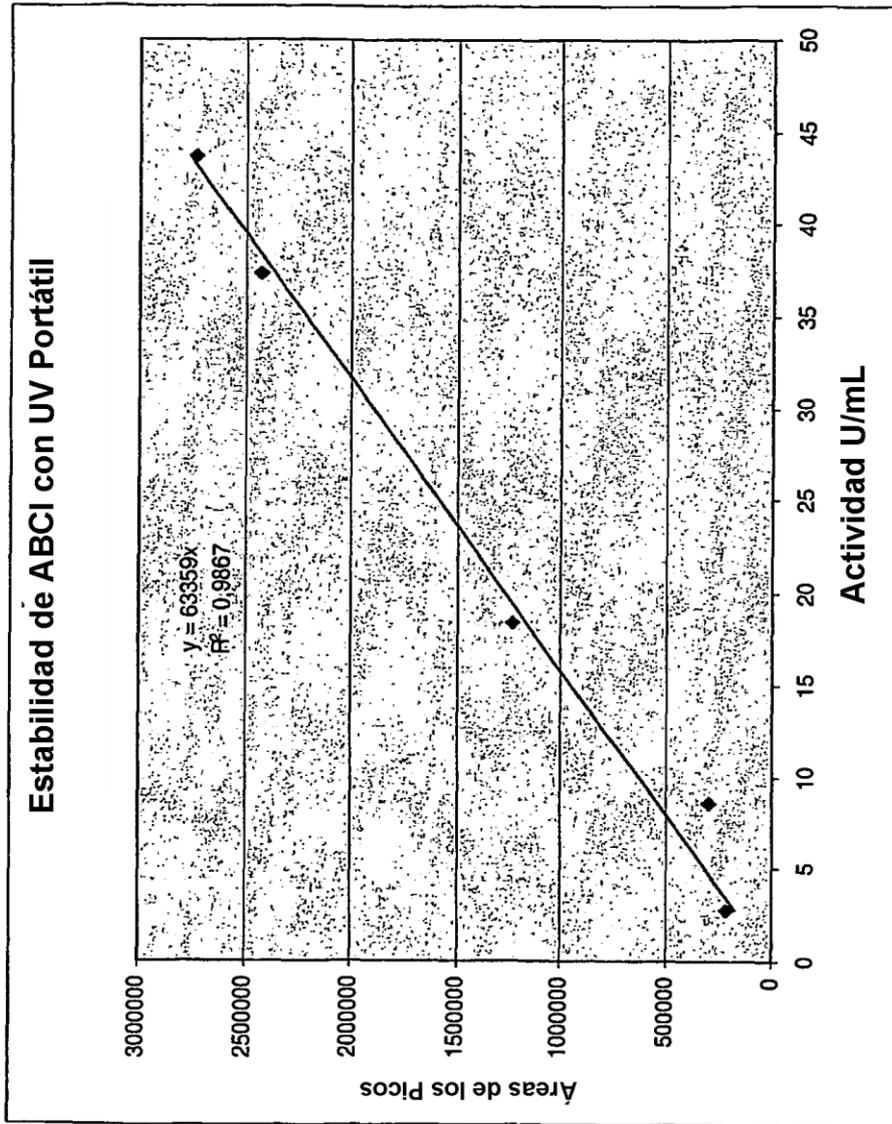
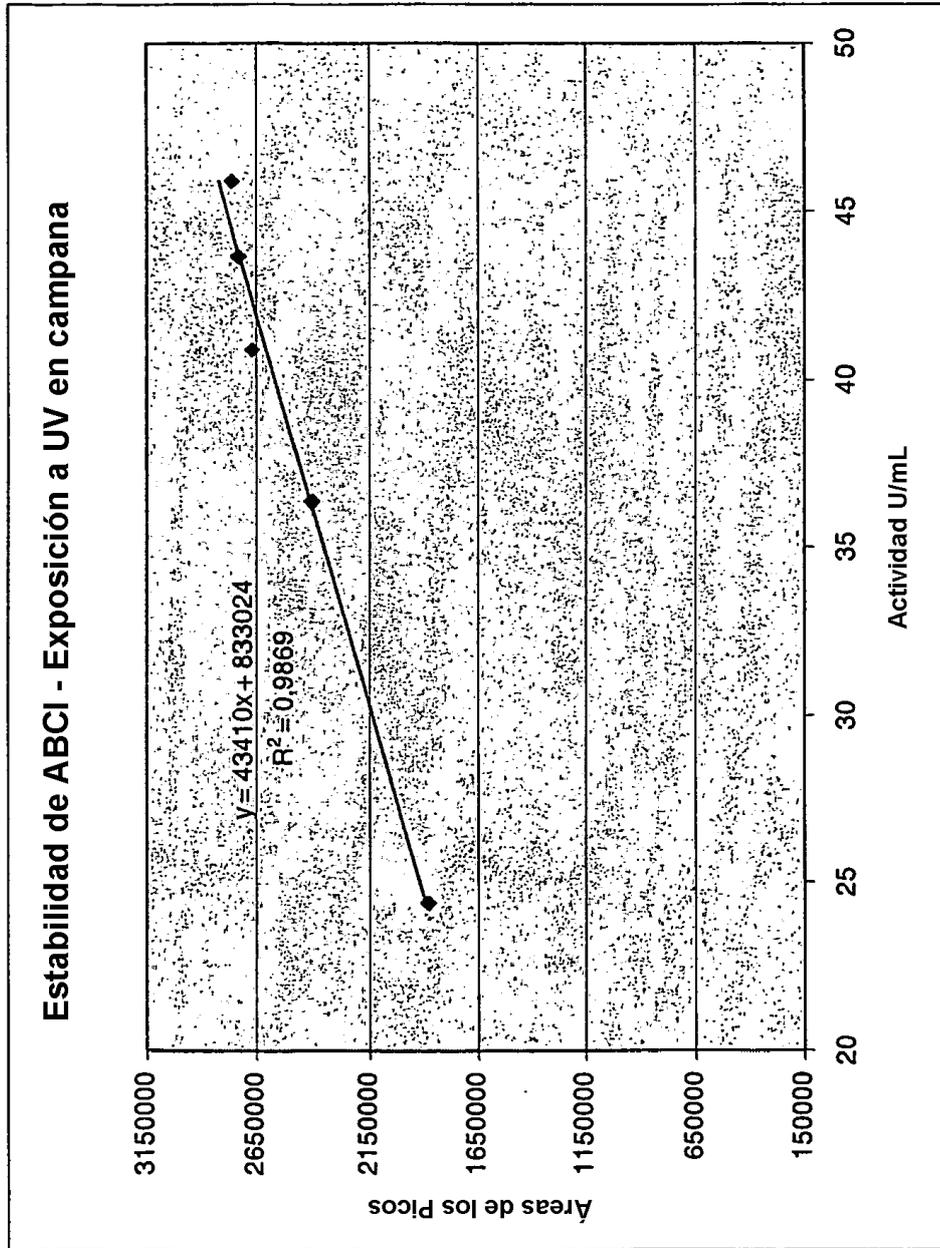


Fig. 8



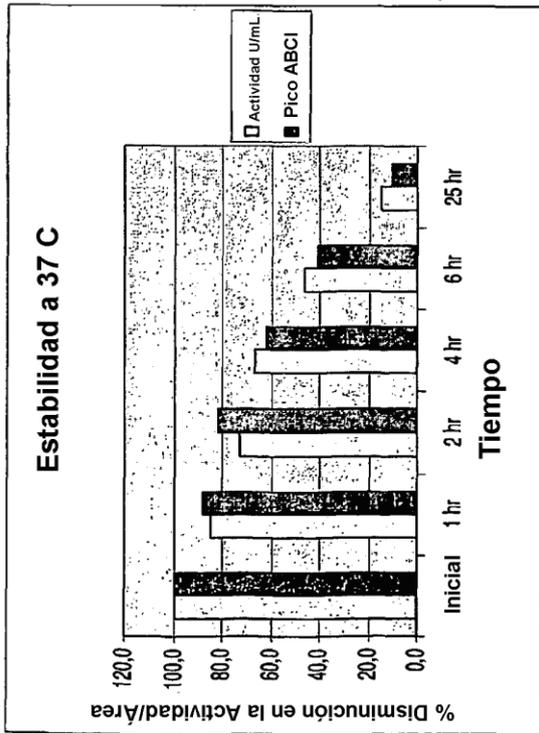


Fig. 9A

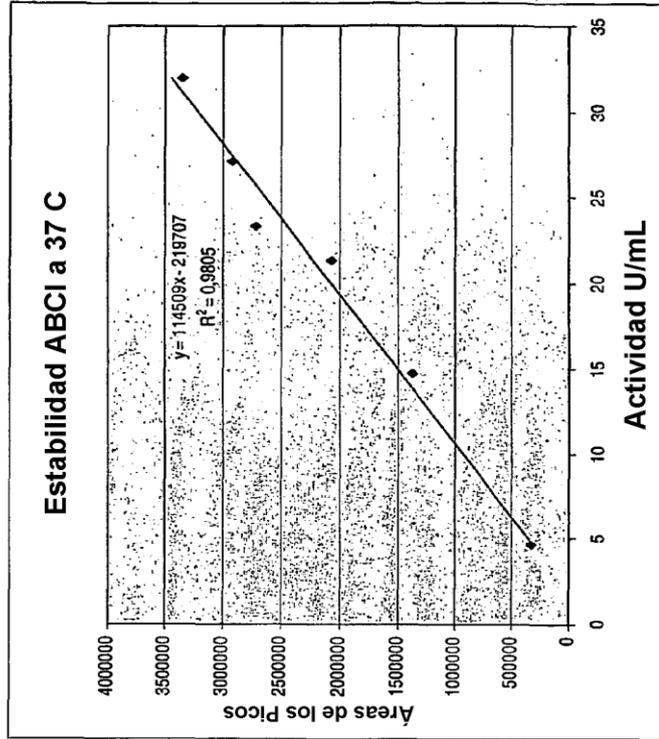


Fig. 9B

Fig. 10

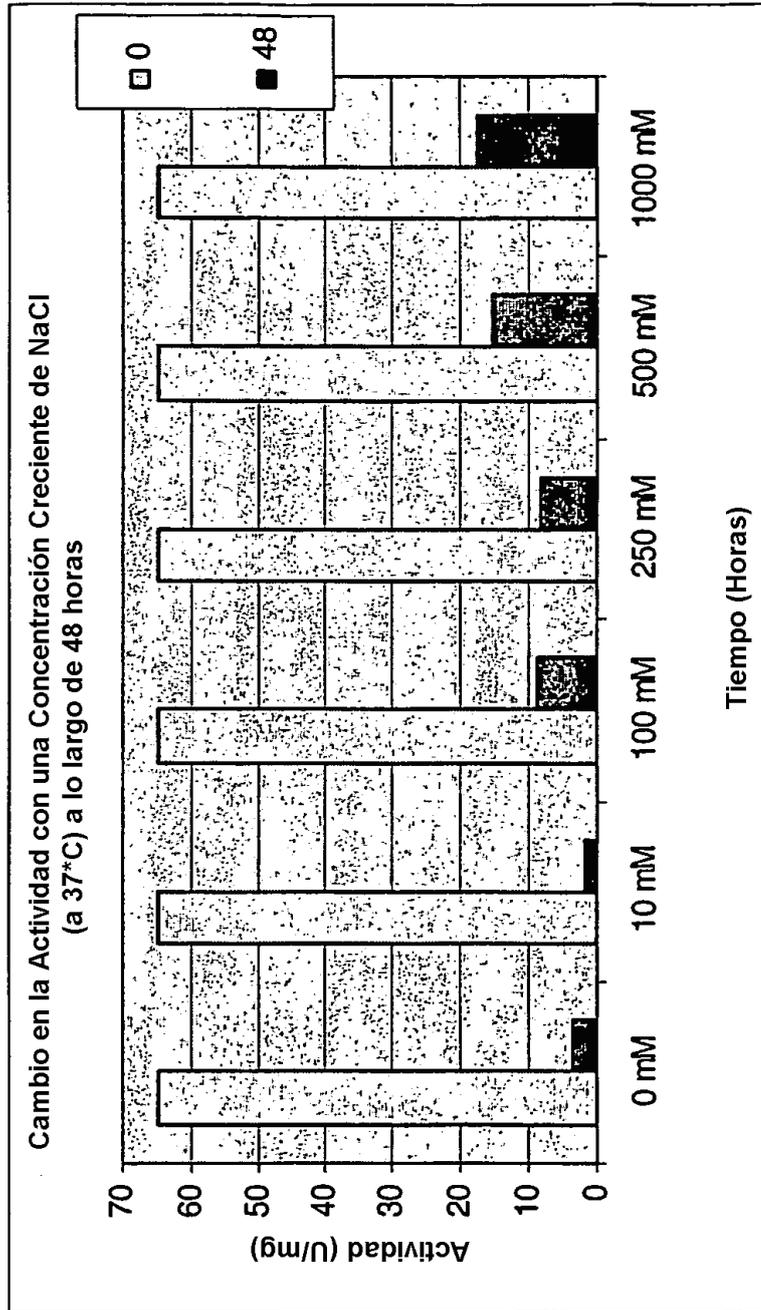
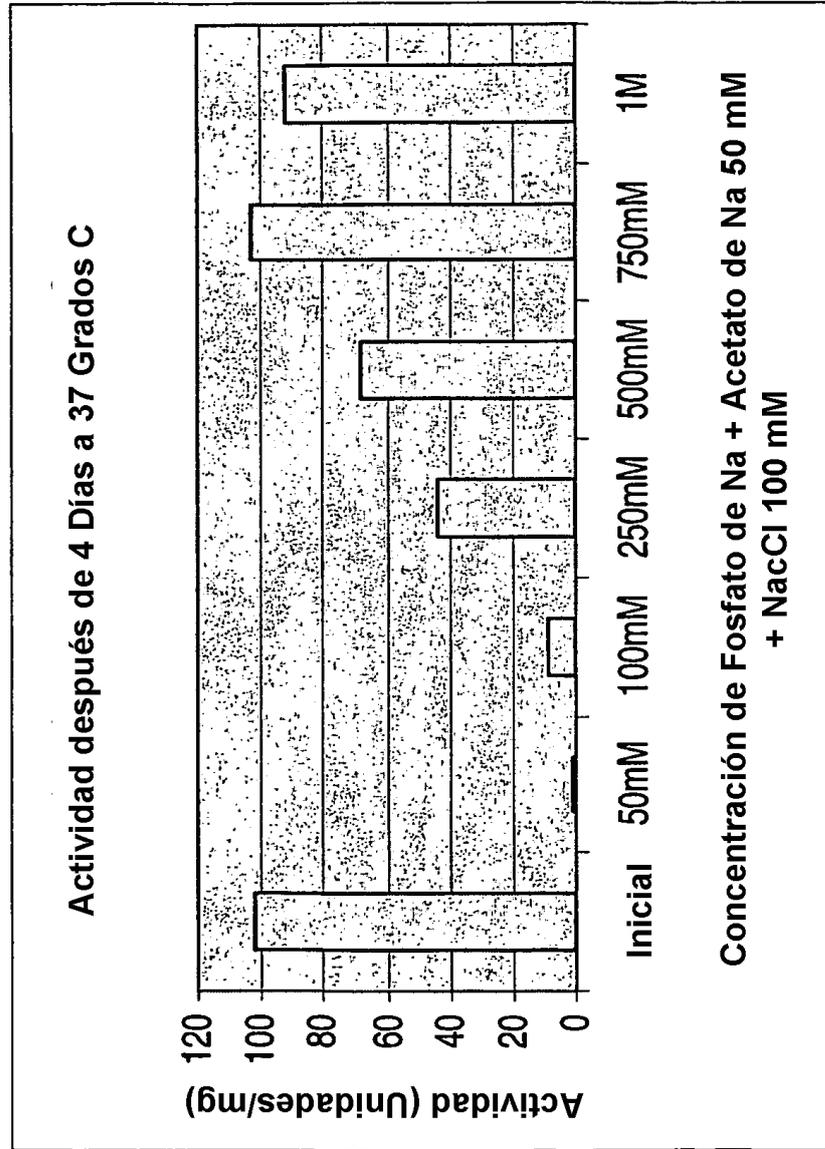


Fig. 11



Rendimiento pureza: 100%

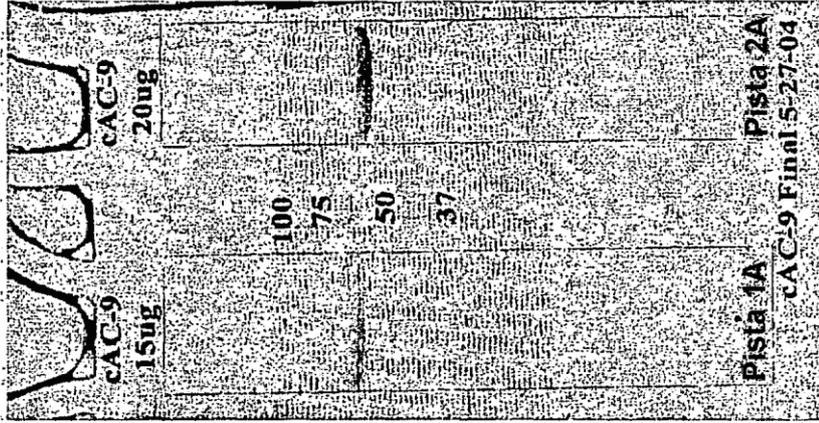


Fig. 12