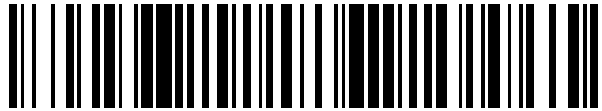


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 412 388**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2008 E 08721006 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 2116255**

54 Título: **Administración intratecal de FCH después de una lesión en la médula espinal**

30 Prioridad:

28.02.2007 WO PCT/JP2007/053804

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.07.2013

73 Titular/es:

KEIO UNIVERSITY (33.0%)
15-45 Mita 2-chome Minato-ku
Tokyo 108-8345, JP;
OSAKA UNIVERSITY (33.0%) y
KRINGLE PHARMA INC. (33.0%)

72 Inventor/es:

OKANO, HIDEYUKI;
TOYAMA, YOSHIAKI;
NAKAMURA, MASAYA;
IWANAMI, AKIO;
KITAMURA, KAZUYA;
NAKAMURA, TOSHIKAZU;
FUNAKOSHI, HIROSHI y
HANADA, KEIGO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 412 388 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

Administración intratecal de FCH después de una lesión en la médula espinal

Campo técnico

5 La presente divulgación se refiere a un agente terapéutico para las lesiones de la médula espinal y, más particularmente, a un agente terapéutico para las lesiones de la médula espinal en el que, como principio activo, se utiliza la proteína factor de crecimiento de hepatocitos (en adelante con la abreviatura "FCH"). La divulgación también se refiere a un agente terapéutico para enfermedades desmielinizantes en el que, como principio activo, se utiliza la proteína FCH.

Técnica antecedente

10 La expresión "lesión de la médula espinal" (LME) se refiere a un estado clínico que presenta parálisis periférica del sistema nervioso periférico motor, sensorial y autónomo por debajo del lugar de la lesión del parénquima de la médula espinal como consecuencia de un traumatismo tal como fractura medular por dislocamiento como resultado, por ejemplo, de un accidente de tráfico o de una caída a elevada altura. Actualmente, el número de pacientes con lesión en la médula espinal es de aproximadamente 100.000 en Japón, y unos 250.000 en Estados Unidos. Cada año el número de estos pacientes aumenta al menos 5.000 en Japón y al menos 10.000 en los Estados Unidos.

15 Con los recientes avances en atención médica, la tasa de supervivencia posterior a las lesiones ha aumentado, y se han hecho también avances extraordinarios en procedimientos de cirugía reconstructiva para las lesiones de la médula espinal destinadas para frenar el avance de la discapacidad. Como consecuencia, también se están empezando a conseguir éxitos frenando el deterioro neurológico secundario. Además, debido a mejoras en la tecnología de rehabilitación y el desarrollo de dispositivos ortopédicos (sillas de ruedas eléctricas, etc.), han mejorado las actividades de la vida diaria (AVD) del paciente. Sin embargo, debido a la ausencia de procedimientos eficaces para el tratamiento fundamentalmente básico de las lesiones de la médula espinal (es decir, protección y regeneración de nervios de la lesión neurológica), actualmente existe una gran cantidad de estos pacientes incapaces de valerse por sí mismos, realizar trabajos manuales o caminar sin la ayuda de otras personas.

25 El FCH se identificó inicialmente como un poderoso mitógeno de hepatocitos maduros y en 1989 se clonó genéticamente (Biochem. Biophys. Res. Commun. 122, 1450-1459 (1984) y Nature 342, 440-443(1989)). Aunque se descubrió como factor de crecimiento de hepatocitos, a partir de numerosos estudios recientes en análisis de expresión y funcionales que incluyen técnicas knock-out/knock-in (genosupresión/genosustitución) en ratones, se ha descubierto que el FCH es un nuevo factor neurotrófico (Nat. Neurosci. 2, 213-217(1999) y Clin. Chim Acta., 327, 1-23(2003)).

30 En el documento WO 03/045439, se describen ejemplos de trabajos en los que se investigaron los efectos del gen FCH sobre modelos de rata de enfermedad de Parkinson tanto histológica como etológicamente. Los resultados experimentales que se presentan en dicho documento indican que la administración, anterior del gen FCH tenían el efecto de protección de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra mesencefálica de la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA). El documento WO 03/045439 también afirma que, basándose en estos resultados experimentales, el gen FCH se puede utilizar en el tratamiento no sólo de la enfermedad de Parkinson, sino también en otros trastornos neurológicos, que incluyen la enfermedad de Alzheimer, degeneración espinocerebelar, esclerosis múltiple, degeneración estriatonigra (DSN), atrofia muscular espinal (AMS), corea de Huntington, síndrome de Shy-Drager, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), ataxia de Friedreich, miastenia grave, enfermedad de moyamoya, amiloidosis, enfermedad de Pick, mielo-óptico-neuropatía subaguda, dermatomiosis/polimiositis, enfermedad de Creutzfeldt-Jacov, síndrome de Behcet, Lupus eritematoso sistémico (LES), sarcoidosis, periarteritis nodosa (PN), osificación del ligamento longitudinal posterior, estenosis difusa del canal medular, enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC), neuritis diabética periférica y trastornos isquémicos cerebrovasculares (por ejemplo, infarto cerebral, hemorragia cerebral), además de las lesiones de la médula espinal mencionadas como un tipo tal de trastorno neurológico.

35 Sin embargo, la 6-OHDA es una toxina sintética especial que tiene un efecto específico sobre las neuronas que sintetizan catecolaminas (específicamente, neuronas productoras de noradrenalina, adrenalina y dopamina), y no muestra ninguna toxicidad contra las neuronas que supuestamente se degeneran o mueren en la mayoría de las enfermedades indicadas anteriormente. Por lo tanto es imposible predecir los efectos de supresión de muerte celular producidos por la 6-OHDA en los trastornos anteriores, incluidas las lesiones de la médula espinal. Además, en el documento WO 03/045439, no se mencionan los efectos terapéuticos de la administración de la proteína HGF.

40 The Journal of the Japanese Orthopaedic Association, Vol. 79, Nº 8, pS764 (25 de agosto del 2005) menciona que, cuando un vector viral que contenía el gen FCH (un vector viral que expresa HGF) se inyectaba en la médula espinal de ratas en la décima vértebra torácica y después se creaba una lesión vertebral por aplastamiento en el mismo lugar, se observaba, en posteriores evaluaciones de la función motora, la recuperación de la función motora en las extremidades inferiores

45 No obstante, a pesar de que las lesiones de la médula espinal generalmente aparecen por un traumatismo externo

sufrido en accidentes y similares, en The Journal of the Japanese Orthopaedic Association, Vol. 79, N° 8, pS764 (25 de agosto del 2005) el vector viral que expresaba el FCH se inyectó 3 días antes de la lesión vertebral torácica por aplastamiento. Claramente, es imposible predecir de esta manera el que ocurra un accidente y el lugar de la lesión, para así administrar localmente de antemano un vector viral que exprese el HGF. Además, es probable que la

5afección de un paciente con una lesión de la médula espinal sea inestable durante las 72 horas que siguen al traumatismo, lo que puede dificultar la inserción de un catéter para administración intratecal. Por tanto, es importante determinar el periodo de administración apropiado. Además, existen diversos problemas que se pueden concebir, tales como la dificultad de controlar la cantidad de proteína expresada en la terapia génica convencional con HGF, el peligro de que algunos vectores de expresión génica desencadenen una respuesta inmunitaria con

10administración repetida, y la posibilidad de que algunos vectores de expresión génica introduzcan genes en el genoma.

Las fibras nerviosas de nervios mielinizados, incluyendo los nervios de la médula espinal, están cubiertas con una vaina compuesta por una capa de lipoproteína denominada mielina. Esta vaina de mielina actúa como aislante de las fibras nerviosas, permitiendo la conducción intermitente por los nervios mielinizados. La destrucción de esta

15vaina de mielina se denomina desmielinización. Cuando se produce la desmielinización, aparecen diversos síntomas neurológicos debido a la desaceleración drástica de la neurotransmisión. Las enfermedades acompañadas por dicha desmielinización se denominan, en general, enfermedades desmielinizantes, y típicamente incluyen, por ejemplo, esclerosis múltiple. Generalmente, las lesiones de la médula espinal también vienen acompañadas de desmielinización.

La esclerosis múltiple es una enfermedad del sistema nervioso central que avanza lentamente caracterizada por la formación de placas desmielinizantes diseminadas. La frecuencia de esclerosis múltiple es aproximadamente de 50 a 100 casos por cada 100.000 personas en Europa y en los Estados Unidos, y es aproximadamente de 1 a 5 casos por cada 100.000 personas en Japón. Los síntomas varían mucho de un individuo a otro, y pueden incluir, pérdida de visión, visión doble, nistagmos, trastornos articulares, debilidad, sensaciones anómalas, problemas de vejiga y

20cambios de humor. La enfermedad avanza con la remisión y reanudamiento repetidos de tales síntomas. Se sospecha que la causa, aún sin determinar, es una anomalía inmunológica. Por tanto, como en otras enfermedades desmielinizantes, actualmente no existe ningún tratamiento básico. Como se ha indicado anteriormente, aunque se conocen procedimientos que implican la inyección de un vector viral que contiene el gen FCH (vector viral de expresión de FCH), también se sabe que virus, tales como herpesvirus (HSV) o adenovirus, producen, en el cerebro, una reacción inflamatoria dependiente de la concentración cuando dichos virus se introducen en el cerebro, propiciando la desmielinización (documento WO 05/100577). Por tanto, también desde esta perspectiva, los procedimientos de tratamiento que implican el uso de un vector viral que contiene el gen FCH, claramente no

25constituyen un enfoque básico para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes. Por tanto, existe el deseo de establecer un procedimiento de tratamiento que no propicie la desmielinización. El documento WO 2006/077675 A1 describe el uso del FCH como un supresor de un órgano trasplantado resultante de la administración de inmunosupresores, pero no explica el tratamiento de lesiones de médula espinal. Kitamura (2006) en The Journal of the Japanese Orthopaedic Association, Vol. 80, N° 8, página S884 investiga el efecto del FCH en lesiones de la médula espinal. Antes de la lesión se administró un vector viral que expresaba el FCH. Kitamura (2006) en Journal of the Japan Spine Research Society, Vol. 17, N° 1, página 557 investiga el efecto del FCH en lesiones de la médula espinal. Antes de la lesión se administró un vector viral que expresaba el FCH. Kato y col. (2005) en Neuroscience Research, Vol. 52, páginas 299-310 describen la transferencia génica retrógrada, mediada por liposomas, del FCH en el sistema nervioso de ratas. Esta referencia no desvela el tratamiento de lesiones de la médula espinal ni la administración intratecal del HGF. Shi y col. (2006) en J. Thoracic and Cardiovasc. Surgery, Vol. 132, N° 4, páginas 941-947 investigan los efectos de la transferencia génica no viral del FCH sobre la isquemia de la médula espinal. Esta referencia no desvela el tratamiento de lesiones de la médula espinal y mucho menos la administración de la proteína FCH para el tratamiento de lesiones de la médula espinal.

30

35

40

45

Divulgación de la invención

Problemas a resolver por la invención

Un objetivo de la invención es proporcionar un agente que sea capaz de tratar lesiones de la médula espinal y enfermedades desmielinizantes mediante un procedimiento sencillo y conveniente que no implique el uso de un gen.

50

Medios para resolver los problemas

Los inventores han realizado minuciosas investigaciones para resolver los problemas anteriores. Como resultado, han descubierto que la proteína FCH tiene los efectos de regeneración funcional más deseados en el tratamiento de lesiones de la médula espinal, incluyendo un efecto inhibitorio de desmielinización y un efecto regenerador de los

55nervios 5HT, lo que hace que la proteína FCH sea útil como agente terapéutico para lesiones de la médula espinal. Además los autores de la invención también han descubierto que la proteína FCH es útil como agente terapéutico para enfermedades desmielinizantes. Estos descubrimientos dirigen finalmente la presente invención.

Por consiguiente, la invención se refiere a la materia objeto definida en las reivindicaciones adjuntas. La presente divulgación también se refiere a:

- (1) un agente terapéutico para el tratamiento de lesiones de la médula espinal, que comprende, como principio activo, la proteína FCH;
- (2) el agente terapéutico de acuerdo con el punto (1) anterior, en el que la proteína FCH es una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID N°: 1 o 2, una proteína que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que las secuencias de aminoácidos de la SEC. ID Nos: 1 o 2 y que tiene sustancialmente la misma actividad que el HGF, o un péptido que es un péptido parcial de una de dichas proteínas y que tiene sustancialmente la misma actividad que el HGF;
- (3) el agente terapéutico de acuerdo con el punto (1) anterior, en el que la proteína FCH es una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID N°: 2
- (4) el agente terapéutico de acuerdo con cualquiera de los puntos (1) a (3) anteriores, en el que el agente está adaptado para su uso localizado en un lugar donde se produce una lesión de la médula espinal;
- (5) el agente terapéutico de acuerdo con el punto (4) anterior, en el que el agente está en forma de una preparación inyectable para la administración intratecal;
- (6) el agente terapéutico de acuerdo con el punto (4) anterior, en el que el agente está en forma de una preparación inyectable para la administración intratecal mediante una bomba de liberación sostenida;
- (7) el agente terapéutico de acuerdo con cualquiera de los puntos (1) a (6) anteriores, en el que el agente se utiliza para inhibir la desmielinización de los nervios de la médula espinal;
- (8) un agente terapéutico para el tratamiento de lesiones de la médula espinal, que comprende, como principio activo, la proteína FCH, y que se administra 2 semanas después de producirse una lesión de la médula espinal.
- (9) un agente terapéutico para el tratamiento de lesiones de la médula espinal, que comprende, como principio activo, la proteína FCH, y que se administra 4 días después de producirse una lesión de la médula espinal;
- (10) un procedimiento para el tratamiento de lesiones de la médula espinal, comprendiendo el procedimiento administrar a un paciente con una lesión en la médula espinal una dosis eficaz de proteína FCH;
- (11) un uso de la proteína FCH para fabricar un agente para el tratamiento de lesiones de la médula espinal;
- (12) una proteína FCH para el tratamiento de lesiones de la médula espinal;
- (13) un agente terapéutico para el tratamiento de una enfermedad desmielinizante, que comprende, como principio activo, la proteína FCH;
- (14) el agente terapéutico de acuerdo con el punto (13) anterior, en el que la enfermedad desmielinizante es una enfermedad seleccionada entre esclerosis múltiple, enfermedad de Devic, esclerosis concéntrica de Balo, encefalomiелitis aguda diseminada (EMAD), enfermedad de Schilder, panencefalitis esclerosante subaguda (PEES), leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), enfermedad de Binswanger, encefalopatía hipóxica, mielínolisis pontina central, síndrome de Guillain-Barre, síndrome de Fischer y polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC);
- (15) El agente terapéutico de acuerdo con los puntos (13) o (14) anteriores, en el que la proteína FCH es una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 o 2, una proteína que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 o 2 y que tiene sustancialmente la misma actividad que el HGF, o un péptido que es un péptido parcial de una de dichas proteínas y que tiene sustancialmente la misma actividad que el HGF;
- (16) el agente terapéutico de acuerdo con los puntos (13) o (14) anteriores, en el que la proteína FCH es una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2;
- (17) el agente terapéutico de acuerdo con cualquiera de los puntos (13) a (16) anteriores, en el que el agente está adaptado para su uso localizado en el lugar de la enfermedad;
- (18) el agente terapéutico de acuerdo con el punto (17) anterior, en el que el agente está en forma de una preparación inyectable para administración intratecal;
- (19) el agente terapéutico de acuerdo con el punto (17) anterior, en el que el agente está en forma de una preparación inyectable para administración intratecal mediante una bomba de liberación sostenida;
- (20) un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad desmielinizante, comprendiendo el procedimiento la administración, a un paciente con una enfermedad desmielinizante, de una dosis eficaz de proteína FCH;
- (21) el uso de la proteína FCH para fabricar un agente terapéutico para el tratamiento de una enfermedad desmielinizante; y
- (22) una proteína FCH para el tratamiento de una enfermedad desmielinizante.

Efectos ventajosos de la invención

El agente terapéutico descrito en el presente documento produce efectos terapéuticos excepcionales contra las lesiones de la médula espinal y las enfermedades desmielinizantes. El agente terapéutico descrito en el presente documento también ofrece la ventaja de no tener los problemas asociados con la terapia génica. Además, el agente terapéutico descrito en el presente documento presenta la ventaja de que inhibe y trata eficazmente la desmielinización de nervios mielinizados que se produce en las lesiones de la médula espinal y en las enfermedades desmielinizantes (por ejemplo, esclerosis múltiple). Además, como el agente terapéutico descrito en el presente documento no requiere el uso de un vector viral, tal como un HSV o un adenovirus, este no propicia la desmielinización. Una ventaja más del agente terapéutico descrito en el presente documento es que, a diferencia de la terapia génica, la cantidad administrada o la dosis del principio activo HGF, puede ajustarse fácilmente, además de que el tiempo de administración puede ajustarse y la administración puede realizarse de una manera tanto repetida como continua.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra imágenes de tejido de médula espinal teñido con Hematoxilina-Eosina (HE), después de producirse una lesión de médula espinal, de un grupo tratado con proteína FCH al que se le administraron 200 $\mu\text{g}/2$ semanas de proteína FCH empezando inmediatamente después de producirse una lesión de la médula

5

espinal, y de tejido de médula espinal de un grupo control.
La FIG. 2 muestra imágenes de tejido de médula espinal teñido con Azul Luxol Rápido (ALR) después de producirse una lesión de médula espinal, de un grupo tratado con proteína FCH al que se le administraron 200 $\mu\text{g}/2$ semanas de proteína FCH empezando inmediatamente después de producirse una lesión de la médula

10

espinal, y de tejido de médula espinal de un grupo control.
La FIG. 3 muestra imágenes de tejido de médula espinal teñido con 5-hidroxitriptamina (5HT) después de producirse una lesión de médula espinal, de un grupo tratado con proteína FCH al que se le administraron 200 $\mu\text{g}/2$ semanas de proteína FCH empezando inmediatamente después de producirse una lesión de la médula

15

espinal, y de tejido de médula espinal de un grupo control.
La FIG. 4 muestra imágenes de tejido de médula espinal teñido con 5HT y proteína asociada al crecimiento-43 (GAP43) después de producirse una lesión de médula espinal, de un grupo tratado con proteína FCH al que se le administraron 200 $\mu\text{g}/2$ semanas de proteína FCH empezando inmediatamente después de producirse una lesión de la médula espinal.

20

La FIG. 5 es un gráfico lineal que muestra las puntuaciones obtenidas en la escala Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) después de producirse una lesión de médula espinal de un grupo tratado con proteína FCH al que se le administraron 200 $\mu\text{g}/2$ semanas de proteína FCH empezando inmediatamente después de producirse una lesión de la médula espinal y de un grupo control. En el gráfico, la flecha indica el periodo de dosificación de la proteína FCH o de PBS.

25

La FIG. 6 es un gráfico lineal que muestra las puntuaciones BBB después de producirse una lesión de médula espinal de un grupo tratado con proteína FCH al que se le administraron 400 $\mu\text{g}/4$ semanas de proteína FCH empezando inmediatamente después de producirse una lesión de la médula espinal y de un grupo control. En el gráfico, la flecha indica el periodo de dosificación de la proteína FCH o de PBS.

30

La FIG. 7 es un gráfico lineal que muestra las puntuaciones BBB después de producirse una lesión de médula espinal de un grupo tratado con proteína FCH al que se le administraron 400 $\mu\text{g}/4$ semanas de proteína FCH empezando 4 días después de producirse una lesión de la médula espinal y de un grupo control. En el gráfico, la flecha indica el periodo de dosificación de la proteína FCH o de PBS.

35

La FIG. 8 es un gráfico lineal que muestra las puntuaciones BBB después de producirse una lesión de médula espinal de un grupo tratado con proteína FCH al que se le administraron 400 $\mu\text{g}/4$ semanas de proteína FCH empezando 2 semanas después de producirse una lesión de la médula espinal y de un grupo control. En el gráfico, la flecha indica el periodo de dosificación de la proteína FCH o de PBS.

40

La FIG. 9 es un gráfico lineal que muestra las puntuaciones BBB después de producirse una lesión de médula espinal de un grupo tratado con proteína FCH al que se le administraron 400 $\mu\text{g}/4$ semanas de proteína FCH empezando 8 semanas después de producirse una lesión de la médula espinal y de un grupo control. En el gráfico, la flecha indica el periodo de dosificación de la proteína FCH o de PBS.

45

Descripción de las realizaciones preferidas

La proteína FCH utilizada en la presente invención es una sustancia conocida. La proteína FCH, preparada mediante cualquiera de diversos procedimientos, puede utilizarse siempre que se haya purificado hasta un grado que permita su uso como una medicación. La proteína FCH se puede preparar, por ejemplo, cultivando células en un cultivo primario o células de una línea celular establecida que produzca la proteína HGF, y a continuación, separando y purificando la proteína FCH del sobrenadante del cultivo. De manera alternativa, se puede usar una técnica de ingeniería genética que implique la integración de un gen que codifique la proteína FCH en un vector adecuado, insertando el vector en una célula huésped adecuada para efectuar la transformación, y obteniendo la proteína FCH recombinante deseada del sobrenadante de un cultivo del transformante (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Japonesa abierta a inspección pública N° H5-111382; y Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 163, p. 967 (1989)). La célula huésped no está sujeta a ninguna limitación en particular. Por ejemplo, puede hacerse un uso adecuado de cualquiera de los diversos tipos de células huésped empleadas hasta ahora en técnicas de ingeniería genética, tales como Escherichia coli, levaduras o células animales. La proteína FCH así obtenida, en tanto que tenga sustancialmente la misma actividad que la proteína FCH de origen natural, puede tener en su secuencia de aminoácidos, uno o más aminoácidos (por ejemplo, de 1 a 8; lo mismo se aplica más adelante) sustituidos, delecionados o añadidos, o puede, de manera similar, tener cadenas glucídicas sustituidas, suprimidas o añadidas. Como ejemplos de dichas proteínas FCH se incluye la proteína FCH del tipo cinco aminoácidos delecionados descrita más adelante. En el presente documento, con respecto a la secuencia de aminoácidos, la frase "uno o más aminoácidos sustituidos, delecionados o añadidos" significa que varios aminoácidos (de uno a una pluralidad) se han sustituido, delecionado o añadido mediante un procedimiento técnico conocido, tal como una técnica de ingeniería genética o mutagénesis específica de sitio, o naturalmente. La proteína FCH que tiene cadenas glucídicas sustituidas, delecionadas o añadidas puede ser, por ejemplo, una proteína FCH obtenida por tratamiento enzimático o similar de una cadena glucídica añadida a una proteína FCH natural, una proteína FCH en la que la secuencia de aminoácidos en el sitio de la adición de la cadena glucídica se ha modificado de tal manera que la adición de la cadena glucídica no se produce, o una proteína FCH en la que la secuencia de aminoácidos se ha

50

55

60

65

modificado de forma que la cadena glucídica se añade en un sitio diferente al sitio natural de adición de la cadena glucídica.

Además, pueden incluirse proteínas que tengan una homología de al menos aproximadamente 80%, preferentemente al menos aproximadamente 90%, más preferentemente al menos una homología de aproximadamente 95% con la secuencia de aminoácidos de la proteína FCH y que actúen sustancialmente como el HGF. En relación con las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente, "homología" se refiere al grado de concordancia en los restos de aminoácidos que constituyen las secuencias de aminoácidos respectivas en comparación con las estructuras primarias de las proteínas. Como ejemplos de las proteínas FCH anteriores se incluyen las secuencias de aminoácidos de la SEC ID N°:1 y 2. La proteína FCH de la SEC ID N° 2 es una proteína FCH de tipo cinco aminoácidos delecionados en la que los cinco restos de aminoácidos de los aminoácidos 161 a 165 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°:1 están delecionados. La proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID N°: 1 o 2 es una proteína FCH natural de origen humano que tiene las actividades mitogénica y motogénica de HGF.

Las proteínas que contienen una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente la misma que la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 o 2 son proteínas que contienen una secuencia de aminoácidos al menos con una identidad de secuencia de aproximadamente 80%, preferentemente al menos aproximadamente 90%, y más preferentemente al menos aproximadamente 95% con la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID N°: 1 o 2. Como ejemplos preferidos se incluyen proteínas que actúan como el FCH y que tienen, en relación con la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID N°: 1 o 2, una secuencia de aminoácidos en la que se han insertado o delecionado, de uno a una pluralidad de restos de aminoácidos, una secuencia de aminoácidos en la que se han sustituido de uno a una pluralidad de restos de aminoácidos con otros restos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos en la que se han modificado de uno a una pluralidad de restos de aminoácidos. Los aminoácidos insertados o sustituidos pueden ser aminoácidos no naturales distintos de los 20 tipos de aminoácidos codificados por genes. Los aminoácidos no naturales pueden ser cualquier compuesto que tenga un grupo amino y un grupo carboxilo, tal como el ácido γ -aminobutírico. Estas proteínas pueden usarse solas o como mezclas de las mismas. Como ejemplos de proteínas que contienen una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente la misma que la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID N°: 1 o 2 se incluyen, sin limitación, el FCH humano depositado en la base de datos NCBI (NCBI-GenBank Flat File Release 164.0) con los N°s de referencia BAA14348 y AAC71655.

Las proteínas FCH que pueden utilizarse en la presente invención son preferentemente las proteínas de origen humano descritas anteriormente para la aplicación en seres humanos aunque también pueden utilizarse proteínas FCH de mamíferos distintos del ser humano (por ejemplo, mono, vaca, caballo, cerdo, oveja, perro, gato, rata, ratón, conejo, hámster, cobaya, y chimpancé). Como ejemplos ilustrativos de dichas proteínas FCH se incluyen, sin limitación, las siguientes depositadas, por ejemplo, en la base de datos NCBI: FCH de ratón (por ejemplo, N°s de referencia AAB31855, NP_034557, BAA01065, BAA01064), FCH de rata (por ejemplo, N° de referencia NP_58713 (la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC. ID N°: 3)), FCH de vaca (por ejemplo, N°s de referencia NP_001026921, BAD02475), FCH de gato (por ejemplo, N°s de referencia NP_001009830, BAC10545, BAB21499), FCH de perro (por ejemplo, N°s de referencia NP_001002964, BAC57560), y FCH de chimpancé (por ejemplo, N° de referencia XP_519174).

La proteína FCH utilizada en la presente invención puede tener un grupo carboxilo (-COOH), un grupo carboxilato (-COO⁻), un grupo amida (-CONH₂) o un grupo éster (-COOR) en el extremo C. En el presente documento la R en el éster se ilustra con grupos alquilo C₁₋₆ tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y n-butilo; grupos cicloalquilo C₃₋₈ tales como ciclopentilo y ciclohexilo; grupos arilo C₆₋₁₂ tales como fenilo y α -naftilo; grupos aralquilo C₇₋₁₄, incluyendo grupos alquil fenilo C₁₋₂ tales como bencilo y fenetilo, y grupos alquil α -naftilo C₁₋₂ tales como α -naftil-metilo; y grupos pivaloíloximetilo. La proteína FCH para su uso de acuerdo con la presente invención también incluye una proteína FCH que tiene un grupo carboxilo (o carboxilato) en un sitio distinto del extremo C cuando el grupo carboxilo se ha amidado o esterificado. El éster en este caso puede ser, por ejemplo, los ésteres del extremo C mencionados anteriormente. Las proteínas FCH que pueden utilizarse en la invención también incluyen cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente en las que el grupo amino en el resto metionina del extremo N está protegido con un grupo protector (por ejemplo, grupos acilo C₁₋₆, incluyendo grupos formilo y alcanoilo C₂₋₆ tales como acetilo), en el que el grupo glutamilo formado por la escisión *in vivo* del extremo N se convierte en ácido piroglutámico, o en el que los grupos funcionales (por ejemplo -OH, -SH, grupo amino, grupo imidazol, grupo indol, grupo guanidina) en las cadenas laterales de los aminoácidos de la molécula están protegidos con grupos de protección adecuados (por ejemplo grupos acilo C₁₋₆, incluyendo grupos formilo y alcanoilo C₂₋₆ tales como acetilo), y también proteínas complejas tales como glucoproteínas obtenidas por el enlace de cadenas glucídicas.

La proteína FCH utilizada en la invención puede estar en forma de un péptido parcial de la misma (a veces denominada posteriormente simplemente como un "péptido parcial"). Como ejemplos de dichos péptidos parciales se incluye cualquier proteína que sea un péptido parcial de las proteínas FCH mencionadas anteriormente y que tenga sustancialmente la misma actividad que el FCH. En la presente invención, los péptidos parciales preferidos incluyen péptidos que contienen una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 20, preferentemente al menos aproximadamente 50, y más preferentemente al menos aproximadamente 100 aminoácidos, de la secuencia de aminoácidos que constituye la proteína FCH mencionada anteriormente. Como ejemplos preferidos específicos se incluyen el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos desde el aminoácido 32 al aminoácido 210

empezando en el lado N terminal de la secuencia de aminoácidos de FCH humana de la SEC. ID N°: 1 (la secuencia desde el bucle en horquilla N terminal en el FCH hasta el primer dominio kringle), y el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos desde el aminoácido 32 al aminoácido 288 empezando en el lado N terminal de la secuencia de aminoácidos de FCH humana de la SEC. ID N°:1 (la secuencia desde el bucle en horquilla N terminal en el FCH hasta el segundo dominio kringle). En el péptido parcial descrito en el presente documento, el extremo C puede ser un grupo carboxilo (-COOH), un grupo carboxilato (-COO⁻), un grupo amida (-CONH₂) o un grupo éster (-COOR). Además, el péptido parcial, como con la proteína FCH mencionada anteriormente, incluye péptidos parciales en los que el grupo amino en el resto metionina del extremo N está protegido con un grupo protector, los péptidos parciales en los que la Gln formada por escisión in vivo del extremo N se convierte en ácido piroglutámico, los péptidos parciales en los que los grupos funcionales de las cadenas laterales de aminoácidos de la molécula están protegidos con grupos protectores adecuados, y también péptidos complejos tales como glucopéptidos obtenidos por la unión de cadenas glucídicas.

Las sales de las proteínas FCH (incluyendo aquellas en forma de péptidos parciales) que pueden utilizarse en la invención son sales fisiológicamente aceptables con un ácido o una base. Se prefiere especialmente la adición de sales ácidas fisiológicamente aceptables. Como ejemplos ilustrativos de dichas sales se incluyen las sales con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico), y sales con ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico).

Cuando la proteína FCH utilizada en la invención está en forma de péptido parcial, este péptido parcial puede prepararse de acuerdo con un procedimiento de síntesis de péptidos conocido o por escisión de una proteína FCH con una peptidasa adecuada. Como ejemplos de procedimientos de síntesis peptídica se incluyen la síntesis en fase sólida y la síntesis en fase líquida. En casos en los que los péptidos parciales o los aminoácidos capaces de constituir la proteína FCH se condensan con las porciones restantes y el producto resultante tiene grupos protectores, el péptido diana puede prepararse suprimiendo los grupos protectores. Los procedimientos conocidos de condensación y los procedimientos para suprimir grupos protectores incluyen, por ejemplo, los descritos por M. Bodanszky y M.A. Ondetti en Peptide Synthesis (Interscience Publishers: Nueva York, 1966), y por Schroeder y Luebke en The Peptide (Academic Press: Nueva York, 1965). Después de la reacción, un péptido parcial de la proteína FCH se puede purificar y aislar mediante un procedimiento de purificación convencional, tal como una combinación de extracción por disolvente, destilación, cromatografía en columna, cromatografía líquida y recristalización. Cuando el péptido parcial obtenido por el procedimiento anterior está en forma de ácido o base libre, se puede convertir en una sal adecuada por un procedimiento conocido. Por el contrario, cuando se obtiene como una sal, se puede convertir en un ácido o base libre por un procedimiento conocido.

La proteína FCH utilizada en la invención es una proteína de origen humano para su aplicación en seres humanos aunque también puede utilizarse la proteína FCH derivada de mamíferos distintos del hombre. En la SEC ID N°:3 se muestra un ejemplo de proteína FCH adecuada originaria de rata.

Los agentes terapéuticos descritos en el presente documento, que son agentes para el tratamiento de lesiones de la médula espinal y agentes para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes, se pueden utilizar en todos los trastornos neurológicos acompañados por lesión de la médula espinal o desmielinización. Como ejemplos específicos se incluyen esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Devic, esclerosis concéntrica de Balo, encefalomiелitis diseminada aguda (EMAD), enfermedad de Schilder, panencefalitis esclerosante subaguda (PEES), leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), enfermedad de Binswanger, encefalopatía hipóxica, mielínolisis pontina central, síndrome de Guillain-Barre, síndrome de Fischer, y polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC). También se incluyen en el presente documento las lesiones de médula espinal con desmielinización asociada.

Los agentes terapéuticos descritos en el presente documento (agentes para el tratamiento de las lesiones de médula espinal y agentes para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes) se pueden emplear no sólo en seres humanos sino también en otros mamíferos no humanos (por ejemplo, monos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, perros, y gatos).

Cuando los agentes terapéuticos descritos en el presente documento (agentes para el tratamiento de lesiones de la médula espinal y agentes para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes) se administran a un paciente humano o a un animal, se pueden preparar en cualquiera de varias formas de dosificación, tales como medicaciones líquidas y medicaciones sólidas. Generalmente, la proteína FCH por si misma o junto con un vehículo convencional se prepara, por ejemplo, en forma de un fármaco inyectable, un pulverizador, o una preparación de liberación sostenida (por ejemplo, preparaciones de tipo depósito). El fármaco inyectable puede ser un fármaco inyectable acuoso o un fármaco inyectable liposoluble. Si el fármaco inyectable es un fármaco inyectable acuoso, la preparación puede realizarse de acuerdo con un procedimiento conocido, tal como disolviendo la proteína FCH en una solución obtenida por la adición opcional, de un disolvente acuoso (por ejemplo, agua para inyección, agua purificada), excipientes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, agentes de tonicidad (por ejemplo, cloruro sódico, cloruro potásico, glicerina, manitol, sorbitol, ácido bórico, bórax, glucosa, propilenglicol), tampones (por ejemplo, tampón fosfato, tampón acetato, tampón borato, tampón carbonato, tampón citrato, tampón Tris, tampón

glutamato, tampón epsilon-aminocaproato), conservantes (por ejemplo, paraoxibenzoato de metilo, paraoxibenzoato de etilo, paraoxibenzoato de propilo, paraoxibenzoato de butilo, clorobutanol, alcohol bencílico, cloruro de benzalconio, dihidroacetato sódico, edetato sódico, ácido bórico, bórax), espesantes (por ejemplo, hidroxietil celulosa, hidroxipropil celulosa, alcohol polivinílico, polietilenglicol), estabilizadores (por ejemplo, bisulfito sódico, tiosulfato sódico, edetato sódico, citrato sódico, ácido ascórbico, dibutilhidroxitolueno) y ajustadores de pH (por ejemplo, ácido clorhídrico, hidróxido sódico, ácido fosfórico, ácido acético), seguido por filtración con un filtro o similar y esterilización, y después se introduce en un recipiente estéril. También se pueden usar un adyuvante de disolución adecuado, tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), o un tensioactivo no iónico (por ejemplo, polisorbato 80, aceite de ricino 50 endurecido con polioxietileno). Si el fármaco inyectable es un fármaco inyectable liposoluble, se puede usar aceite de sésamo o aceite de soja como disolvente oleaginoso, y benzoato de bencilo o alcohol bencílico como adyuvante de la disolución. El fármaco inyectable que se ha preparado, generalmente se introduce en una ampolla o un vial. La proteína FCH contenida en el fármaco inyectable se ajusta a generalmente de aproximadamente 0,0002 a aproximadamente 2,0% p/v, preferentemente de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1,0 % p/v, y más preferentemente de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,5% p/v. También, para las preparaciones líquidas, tales como fármacos inyectables, es deseable que se conserven congelados o que se conserven tras eliminar la humedad por liofilización o similar. En el momento de su utilización, a la preparación liofilizada se la añade agua destilada para inyección o similar para redissolver el fármaco y prepararlo para su uso.

Los pulverizadores se pueden preparar también de acuerdo con la práctica convencional para preparaciones medicinales. En el caso de la producción como pulverizador, se pueden emplear cualquiera de los aditivos usados comúnmente en preparaciones para inhalarse. Por ejemplo, junto con un propulsor, se pueden usar los disolventes, conservantes, estabilizantes, agentes de tonicidad y ajustadores de pH mencionados anteriormente. Los propulsores que se pueden utilizar incluyen propulsores de gases licuados y de gas comprimido. Como ejemplos de propulsores de gases licuados se incluyen hidrocarburos fluorados (por ejemplo, sustitutos de los CFC, tales como HCFC-22, HCFC-123, HCFC-134a y HCFC-142), petróleo licuado y dimetil éter. Como ejemplos ilustrativos de gases comprimidos se incluyen gases solubles (por ejemplo, dióxido de carbono, óxido nitroso) y gases insolubles (por ejemplo, gas nitrógeno).

La proteína FCH utilizada en la invención se puede preparar como una preparación de liberación sostenida (por ejemplo, una preparación de tipo depósito) junto con un polímero biodegradable. Preparando la proteína FCH como una preparación de tipo depósito en particular, pueden esperarse varios efectos deseables, tales como una disminución en el número de veces que se administra, una buena duración de los efectos terapéuticos, y el alivio de efectos secundarios. Tales preparaciones de liberación sostenida se pueden producir por un procedimiento conocido. El polímero biodegradable utilizado en esta preparación de liberación sostenida se selecciona adecuadamente de entre polímeros biodegradables conocidos, tales como polisacáridos, incluyendo almidón, dextrano, hialuronano (ácido hialurónico) y sales de los mismos; proteínas tales como atelocolágeno, colágeno y gelatina; poliaminoácidos tales como ácido poliglútamico, polilisina, polileucina, polialanina y polimetionina; ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido láctico-glicólico, policaprolactona, ácido poli-β-hidroxibutírico y ácido polimálico; poliésteres y poliortoésteres tales como copolímeros de ácido fumárico- polietilenglicol-vinilpirrolidona; ácidos polialquiloacrilícos tales como el ácido polimetil-α-cianoacrilíco; y policarbonatos tales como el carbonato de polietileno y el carbonato de polipropileno. Se prefieren los poliésteres, y son especialmente preferidos los copolímeros del ácido láctico-glicólico. Cuando se utiliza el copolímero del ácido láctico-glicólico, la proporción composicional (ácido láctico/ácido glicólico) de la misma, en % mol, varía con el periodo de liberación sostenida que se pretende conseguir. Por ejemplo, para un periodo de liberación sostenida de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 3 meses, y preferentemente de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 1 mes, la proporción está en un intervalo de desde aproximadamente 100/0 a aproximadamente 50/50. El peso molecular promedio en peso del copolímero del ácido láctico-ácido glicólico es generalmente de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 20.000. El copolímero del ácido láctico-ácido glicólico se puede producir por un procedimiento de producción conocido, tal como es que se describe en la Solicitud de Patente japonesa abierta a inspección pública N° 61-28521. La proporción en el compuesto entre el polímero biodegradable y la proteína FCH no está sujeta a ninguna limitación en particular. Por ejemplo la proporción entre la proteína FCH y el polímero biodegradable es típicamente de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 30% p/p.

Preferentemente, en el caso de una preparación inyectable, la administración intratecal se realiza por inyección intratecal directa o administración intratecal continua con una bomba de liberación sostenida. La dosis se selecciona adecuadamente de acuerdo con factores tales como la forma de dosificación, la gravedad del trastorno y la edad del paciente, y es generalmente de 1 a 500 µg, y preferentemente de 10 µg a 50 µg, por administración. El procedimiento de administración puede seleccionarse también adecuadamente de acuerdo con la forma de dosificación, la gravedad del trastorno, la edad del paciente y otros factores. Por ejemplo, el agente terapéutico puede administrarse como una sola administración de una vez o como una sola administración sostenida, durante un periodo que varía de aproximadamente 30 minutos a varias semanas (preferentemente durante un periodo que varía de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 2 semanas). De manera alternativa, la anterior administración de una vez o la administración sostenida se pueden aplicar repetitivamente a intervalos espaciados. En el caso de administración repetida, el intervalo de dosificación puede ser de una vez al día a una vez cada varios meses. Por ejemplo, en el caso de administración intratecal sostenida con una bomba de liberación sostenida (por

ejemplo, una bomba osmótica), el intervalo de dosificación puede ser de varias semanas a varios meses. Tal administración sostenida tiene la ventaja de que, como la proteína FCH se libera gradualmente durante un extenso periodo de tiempo en el lugar de la lesión de la médula espinal o enfermedad desmielinizante, el FCH actúa durante un extenso periodo, permitiendo que se alcancen mejores efectos terapéuticos. Una ventaja adicional es que el menor número de administraciones agobia menos al paciente. Una ventaja más es que, si es necesario, se puede administrar la proteína FCH adicional a la bomba osmótica implantada subcutáneamente. Como se señaló anteriormente, la administración intratecal es el procedimiento de administración de la invención, aunque también son posibles otros procedimientos de administración, tales como la administración intramuscular, la administración subcutánea o la infusión por goteo. El periodo de administración se selecciona adecuadamente de acuerdo con factores tales como las formas de dosificación, la gravedad del trastorno y la edad del paciente. En el caso de lesión de la médula espinal, la administración se realiza de acuerdo con la presente invención en los 14 días, preferentemente en los 7 días, y más preferentemente en los 4 días después de que se produzca la lesión. En particular, en los pacientes con lesión en la médula espinal, debido a la dificultad para estabilizar la condición del paciente en las primeras 72 horas siguientes al traumatismo, es especialmente preferible que la administración tenga lugar desde aproximadamente las 72 horas a los 4 días después de que se produzca la lesión. El periodo de administración anterior incluye el comienzo de la administración en el caso de administración sostenida, o la administración inicial en el caso de administración repetitiva.

Ejemplos

A continuación se utilizan ejemplos para describir la invención, aunque esta no se limita a estos ejemplos. La proteína FCH utilizada en los siguientes ejemplos era una proteína FCH recombinante de tipo cinco aminoácidos deletados (SEC. ID N°: 2).

Ejemplo 1

(Preparación de Animales con Lesión en la Médula Espinal y Administración de Proteína HGF)

(1) Preparación de los Animales con Lesión en la Médula Espinal

En primer lugar, se preparó una bomba osmótica esterilizada para su uso. Se vertió proteína FCH (concentración: 1 mg/ml; disuelta en PBS) o PBS (control) en una bomba miniosmótica Alzet (Modelo 2002, fabricada por ALZA Corporation). Un tubo de silicona (tubo catéter, fabricado por Imamura Co., Ltd.) que tenía un diámetro interno de 0,3 mm y un diámetro externo de 0,7 mm cuya luz se llenó con proteína FCH o PBS se conectó a la salida de la bomba y la conexión se cubrió con otro tubo de silicona (Imamura Co., Ltd.) que tenía un diámetro interno de 1,0 mm y un diámetro externo de 2,0 mm, después de lo cual el ensamblaje bomba y tubo se incubó a 37 °C durante 12 horas y después se reservó para su uso en el experimento. Se anestesiaron ratas hembra Sprague-Dawley adultas, (con un intervalo de edad de aproximadamente 10 a 12 semanas, y un peso corporal de aproximadamente 250 g) por administración intraperitoneal de hidrato de cloral al 14% p/v, y se laminectomizaron la décima y duodécima vértebras torácicas. Después, se implantó una bomba osmótica (previamente cargada con solución de proteína FCH por el procedimiento descrito anteriormente) por vía subcutánea en el lado dorsal derecho, y el tubo catéter se pasó a través de la capa muscular desde el área subcutánea. Posteriormente, la punta del tubo catéter se hizo avanzar a la posición del arco de la duodécima vértebra torácica. Luego, se creó una lesión por aplastamiento de 200 kDinas en el décimo segmento torácico de la médula espinal utilizando un Impactor IH (fabricado por Precision Systems). Después, la membrana duramadre y aracnoides del duodécimo segmento torácico de la médula espinal se dividieron juntas en dirección del eje craneocaudal, desde el cual se insertó el tubo catéter en el espacio subaracnoideo y la punta del catéter se hizo avanzar hacia el punto de la lesión de la médula espinal. El catéter se inmovilizó en el lado interno y externo de la capa muscular con adhesivo quirúrgico Aron Alpha A Sankyo (disponible de Sankyo Co., Ltd.). Después de que el adhesivo se secase del todo, se suturaron respectivamente la capa muscular y la piel, completando la intervención.

(2) Administración de la proteína HGF

Después de la intervención (tras la lesión por aplastamiento), la solución de proteína FCH se administró por vía intratecal durante 2 semanas mediante la bomba osmótica descrita anteriormente (dosis de proteína HGF, 200 µg/2 semanas). Al grupo control solo se le administró PBS.

Ejemplo 2

(Análisis de Tejidos y Resultados)

Después del periodo postoperatorio fijado, las ratas se anestesiaron profundamente por administración intraperitoneal de hidrato de cloral al 14 % p/v, después de lo cual se realizó la perfusión del ventrículo izquierdo, primero con PBS, y después con paraformaldehído al 4% p/v / PBS. Se extirpó una parte de la médula espinal y posteriormente se fijó en paraformaldehído al 4% p/v / PBS durante 24 horas a 4 °C. La muestra de tejido se sumergió en una solución de sacarosa al 10% p/v / PBS y luego en sacarosa al 30% p/v / PBS cada una a 4 °C y durante 24 horas, tras lo cual se embebió en compuesto OCT (Sakura Fine Technical). El tejido embebido se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se prepararon secciones congeladas de 20 µm. Las secciones de tejido se tiñeron después con hematoxilina y eosina (HE), y se realizó el examen histológico. Como resultado, como se muestra en la FIG. 1, se suprimió claramente la formación de cavidades debido a la degeneración de neuronas motoras y muerte celular en el grupo tratado con la proteína FCH cuando se comparó con el grupo control, indicando así que se suprimió la degeneración de la médula espinal por aplastamiento.

(Tinción de la Vaina de Mielina y Resultados)

Ejemplo 3

Las secciones preparadas por el procedimiento descrito en el Ejemplo 2 se trataron con etanol al 95% v/v, después de lo cual se incubaron a 60 °C durante dos horas en solución Azul Luxor Rápido (ALR). Tras retirarlas de la incubadora, las secciones se dejaron reposar a temperatura ambiente para que se enfriaran y se lavaron con etanol al 95% v/v y agua destilada. Después, se realizó el fraccionamiento con una solución de carbonato de litio y etanol al 70% v/v, y el lavado con agua destilada se realizó repetidamente hasta que se obtuvo un contraste adecuado, tras lo cual las secciones se deshidrataron y se sellaron, y se examinó la vaina de mielina. Como se muestra en la FIG. 2, el área de la superficie de la vaina de mielina positiva a ALR en el grupo tratado con la proteína FCH fue mayor que el área en el grupo control, indicando que se suprimió la desmielinización debido a la lesión de la médula espinal.

Ejemplo 4

(Análisis Inmunohistoquímico y Resultados)

Las secciones preparadas por el procedimiento descrito en el Ejemplo 2 se tiñeron con anticuerpo policlonal 5 HT (dilución 1:100) y anticuerpo policlonal anti-GAP43 (dilución 1:1.000). Es decir, se realizó un bloqueo de una hora a temperatura ambiente con PBS que contenía suero de cabra al 5% v/v y Triton X-100 al 0,1% p/v, tras lo cual las secciones se incubaron durante una noche en la solución de anticuerpos a 4 °C. Estas secciones se lavaron con PBS, y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora en un anticuerpo secundario que estaba marcado con fluorescencia con Alexa 488 (verde) y Alexa 546 (rojo) (dilución 1:1.000), y se sellaron en portaobjetos y con un microscopio de fluorescencia se examinaron las fibras nerviosas positivas a 5 HT y las fibras nerviosas positivas a GAP43. Como resultado, como se muestra en la FIG. 3, se encontró que las fibras nerviosas positivas a 5 HT eran significativamente más abundantes en los 4 mm caudales al lugar de la lesión en el grupo tratado con la proteína FCH al compararse con el grupo control. Además, como se muestra en la FIG. 4, había una buena concordancia entre las localizaciones de las señales positivas a 5 HT y las señales positivas a GAP43. El hecho de que las fibras nerviosas positivas a 5 HT sean responsables de la función motora después de una lesión de la médula espinal y que, en adultos, la GAP43 se exprese solo en las fibras nerviosas regeneradas, indicaba que la regeneración de las fibras nerviosas asociadas con la función motora se facilitaba con la administración de la proteína HGF.

Ejemplo 5

(Evaluación de la función motora y Resultados)

La función motora de los animales tratados con proteína FCH (200 µg/2 semanas) empezando inmediatamente después de la lesión de la médula espinal, por el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, se examinó utilizando un ensayo de campo abierto. Diversos observadores comprobaron visualmente el comportamiento de los animales y se evaluó utilizando el sistema de puntuación de la escala Basso-Beattie-Bresnahan (BBB), en la que la función motora se evalúa en una escala de 21 etapas que varía de 0 (completamente paralizado) a 21 (normal). La función motora de las extremidades posteriores se evaluó durante 6 semanas después de la intervención. Los resultados se muestran en la FIG. 5. En la FIG. 5, resulta evidente que la recuperación funcional se observa comenzando a los 4 días siguientes a la lesión de la médula espinal en el grupo tratado con la proteína HGF, y se observaron efectos de recuperación funcional significativa cuando se comparó con el grupo control en las 5 semanas siguientes ($p < 0,05$).

Ejemplo 6

Los animales con lesión de la médula espinal se prepararon de la misma manera que en el Ejemplo 1, a continuación se implantó una bomba osmótica cargada con proteína FCH (2 mg/ml, disuelta en PBS) o PBS (control) y se realizó la inserción del catéter. Después de la intervención (tras la lesión por aplastamiento), con la bomba osmótica se administró por vía intratecal una solución de proteína FCH (dosis de proteína HGF, 400 µg/4 semanas) durante un periodo de 4 semanas. Al grupo control se le administró solo PBS. Se realizó la evaluación funcional motora por el procedimiento descrito en el Ejemplo 5 hasta 9 semanas después de la intervención. Los resultados se muestran en la FIG. 6. Como resulta obvio en la FIG. 6, la recuperación funcional en los animales tratados con la proteína FCH mejoró significativamente comparada con la de los animales control. La diferencia fue evidente desde

los 4 días después de la lesión de la médula espinal. Además, incluso después de finalizar la administración de la proteína HGF, continuó el aumento de la puntuación BBB.

Ejemplo 7

5 Se anestesiaron ratas hembra Sprague-Dawley adultas (con edades de aproximadamente 10 a 12 semanas, y un peso corporal de aproximadamente 250 g) por administración intraperitoneal de hidrato de cloral al 14% p/v, y se creó una lesión por aplastamiento de 200 kDinas en el décimo segmento torácico de la médula espinal utilizando un Impactor IH (fabricado por Precision Systems), obteniendo así un animal con lesión de la médula espinal. La médula espinal lesionada volvió a operarse a los 4 días, 2 semanas u 8 semanas después de la lesión por aplastamiento con el fin de implantar una bomba osmótica. Se realizó la re-operación. Se implantó subcutáneamente una bomba osmótica cargada con proteína FCH (2 mg/ml, disuelta en PBS) o PBS (control) por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 y el tubo catéter se insertó en el espacio subaracnoideo, tras lo cual la punta del tubo catéter se hizo avanzar hacia el punto de la lesión de la médula espinal y finalmente se inmovilizó el catéter. Empezando a los 4 días, 2 semanas u 8 semanas después de la lesión medular, se administró por vía intratecal la solución de proteína FCH desde la bomba osmótica durante un periodo de 4 semanas (dosis de proteína HGF: 400 µg/4 semanas). En el grupo control, se administró solamente PBS. Se realizó la evaluación de la función motora todo el tiempo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 5. Los resultados se muestran en las FIG. 7, 8 y 9. En el grupo de animales en el que el tratamiento con FCH empezó a los 4 días tras la lesión por aplastamiento, como es aparente en la FIG. 7, se observó una recuperación funcional más rápida que en los animales control. En el grupo de animales en el que el tratamiento con FCH empezó a las 2 semanas tras la lesión por aplastamiento, como es aparente en la FIG. 8, el efecto de promoción de recuperación funcional se observó 2 semanas después de empezar el tratamiento con FCH (4 semanas después de la lesión por aplastamiento) en comparación con el grupo control. En el grupo de animales en el que el tratamiento con FCH empezó 8 semanas después de la lesión por aplastamiento, como es aparente en la FIG.9, no se observaron diferencias en la recuperación funcional entre los animales a los que se les administró la proteína FCH y los animales control.

25 Ejemplo de preparación 1

Se disolvió un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (1,9 g; ácido láctico/ácido glicólico = 50/50; peso molecular promedio en peso = 10.000; disponible de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en 3,0 ml de diclorometano. Luego, se añadieron 100 mg de un polvo liofilizado de proteína FCH a esta solución de disolvente orgánico y se molieron finamente en un molinillo mezclador (Retsch Technology), preparando así una dispersión de proteína HGF. La dispersión se añadió a 800 ml de una solución acuosa de alcohol polivinílico al 0,1% p/v, entonces se agitó y se homogenizó usando un agitador homomixer. El diclorometano se evaporó por agitado durante 3 horas a temperatura ambiente, tras lo cual se recogieron las microcápsulas por centrifugación a aproximadamente 2.000 rpm. Las microcápsulas se lavaron dos veces utilizando 400 ml de agua destilada, a continuación se añadieron 0,2 g de D-manitol y se llevó a cabo la liofilización. Para retirar el disolvente sobrante, se realizó el secado al vacío durante 3 días a 40 °C, de esta manera se obtuvieron microcápsulas de liberación sostenida que contenían la proteína FCH (proporción de FCH en base al biopolímero: 5,3% v/v).

Ejemplo de preparación 2

Se disolvieron un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (1,89 g; ácido láctico/ácido glicólico = 50/50; peso molecular promedio en peso = 10.000; disponible de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 10 mg de óxido de zinc en 3,0 ml de diclorometano. Luego, se añadieron 100 mg de un polvo liofilizado de proteína FCH a esta solución de disolvente orgánico y se molió finamente en un molinillo mezclador (Retsch Technology), preparando así una dispersión de proteína HGF. La dispersión se añadió a 800 ml de una solución acuosa de alcohol polivinílico al 0,1% p/v, entonces se agitó y se homogenizó usando un agitador homomixer. El diclorometano se evaporó por agitado durante 3 horas a temperatura ambiente, tras lo cual se recogieron las microcápsulas por centrifugación a aproximadamente 2.000 rpm. Las microcápsulas se lavaron dos veces utilizando 400 ml de agua destilada, a continuación se añadieron 0,2 g de D-manitol y se realizó la liofilización. Para retirar el disolvente sobrante, se realizó el secado al vacío durante 3 días a 40 °C, de esta manera se obtuvieron microcápsulas de liberación sostenida que contenían la proteína FCH (proporción de FCH en base al biopolímero: 5,3% v/v).

Ejemplo de preparación 3

50 Se disolvió un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (1,7 g; ácido láctico/ácido glicólico = 75/25; peso molecular promedio en peso = 15.000; disponible de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en 2,7 ml de diclorometano. Luego, se añadieron 300 mg de un polvo liofilizado de proteína FCH a esta solución de disolvente orgánico y se molió finamente en un molinillo mezclador (Retsch Technology), preparando así una dispersión de proteína HGF. La dispersión se añadió a 800 ml de una solución acuosa de alcohol polivinílico al 0,1% p/v, entonces se agitó y se homogenizó usando un agitador homomixer. El diclorometano se evaporó por agitado durante 3 horas a temperatura ambiente, tras lo cual se recogieron las microcápsulas por centrifugación a aproximadamente 2.000 rpm. Las microcápsulas se lavaron dos veces utilizando 400 ml de agua destilada, a continuación se añadieron 0,2 g de D-manitol y se llevó a cabo la liofilización. Para retirar el disolvente sobrante, se realizó el secado al vacío durante 3 días a 40 °C, de esta manera se obtuvieron microcápsulas de liberación sostenida que contenían la proteína FCH

(proporción de FCH en base al biopolímero: 17,6% v/v).

Ejemplo de preparación 4

5 Se disolvieron un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (1,69 g; ácido láctico/ácido glicólico = 75/25; peso molecular promedio en peso = 15.000; disponible de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 10 mg de óxido de zinc en 2,7 ml de diclorometano. Luego, se añadieron 300 mg de un polvo liofilizado de proteína FCH a esta solución de disolvente orgánico y se molió finamente en un molinillo mezclador (Retsch Technology), preparando así una dispersión de proteína HGF. La dispersión se añadió a 800 ml de una solución acuosa de alcohol polivinílico al 0,1% p/v, entonces se agitó y se homogenizó usando un agitador homomixer. El diclorometano se evaporó por agitado durante 3 horas a temperatura ambiente, tras lo cual se recogieron las microcápsulas por centrifugación a aproximadamente 2.000 rpm. Las microcápsulas se lavaron dos veces utilizando 400 ml de agua destilada, a continuación se añadieron 0,2 g de D-manitol y se realizó la liofilización. Para retirar el disolvente sobrante, se realizó el secado al vacío durante 3 días a 40 °C, de esta manera se obtuvieron microcápsulas de liberación sostenida que contenían la proteína FCH (proporción de FCH en base al biopolímero: 17,8% v/v).

Ejemplo de preparación 5

15 Se disolvió un copolímero DL-ácido láctico (5 g; ácido láctico/ácido glicólico = 100/0; peso molecular promedio en peso = 5.000; disponible de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en 50 ml de cloruro de metileno, preparando de esta manera una solución al 10% p/v. Luego, se añadieron 2,5 mg de un polvo liofilizado de proteína FCH a esta solución. La mezcla resultante se añadió entonces a una solución acuosa de quitosano al 0,5% p/v, que se había calentado por separado a 40 °C, tras lo cual se realizó el agitado y emulsificación a una velocidad de agitado de 20 1.000 rpm usando un agitador homomixer. La emulsión resultante se agitó durante otras 3 horas a temperatura ambiente para evaporar el cloruro de metileno, tras lo cual se recogieron las microesferas que se formaron por centrifugación a aproximadamente 2.000 rpm. Las microesferas se lavaron cinco veces con agua destilada que se había precalentado a 40 °C, entonces se secaron al vacío a temperatura ambiente, obteniendo de esta manera, microesferas que contenían la proteína FCH (proporción de FCH en base al biopolímero: 0,05% v/v).

25 Ejemplo de preparación 6

Se disolvió un copolímero ácido láctico-ácido glicólico (10 g; ácido láctico/ácido glicólico = 75/25; peso molecular promedio en peso = 5.000; disponible de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en 200 ml de cloruro de metileno/etanol (4:1), para de esta manera preparar una solución al 5% p/v. A esta solución se le añadieron 2,5 mg de un polvo liofilizado de proteína HGF. La mezcla resultante se añadió poco a poco, agitándola con un agitador homomixer a una velocidad de 500 rpm, a una solución acuosa de gelatina 1% p/v que se había calentado separadamente a 40 °C, efectuando de esta manera la emulsificación. La emulsión resultante se agitó adicionalmente a temperatura ambiente durante 3 horas para evaporar el cloruro de metileno y el etanol, tras lo cual se recogieron las microesferas que se formaron por centrifugación a aproximadamente 2.000 rpm, se lavaron cinco veces con agua destilada que se había precalentado a 40 °C, y se secaron al vacío a temperatura ambiente, obteniendo así microesferas que contenían proteína FCH (proporción en base al biopolímero: 0,025% v/v).

Ejemplo de preparación 7

Una solución acuosa de proteína FCH al 2% p/v se mezcló con 2 ml de solución tampón fosfato de atelocolágeno al 2%, y se liofilizó. El material liofilizado se fracturó a baja temperatura utilizando nitrógeno líquido, se colocó entonces en un molde y se moldeó por compresión para formar una preparación cilíndrica de liberación sostenida que contenía FCH (proporción de FCH en base al biopolímero: 10% v/v).

Ejemplo de preparación 8

Una solución acuosa de proteína FCH al 0,01% p/v (100 ml) y 50 g de una solución acuosa de colágeno al 2% p/v se mezclaron entre sí uniformemente y se agitaron, y después se liofilizaron. El material liofilizado se fracturó a baja temperatura utilizando nitrógeno líquido, tras lo cual el material fracturado se moldeó por compresión en una barra, produciendo de esta manera una preparación de liberación sostenida que contenía FCH (proporción de FCH en base al biopolímero: 1% p/p).

Ejemplo de preparación 9

Una proteína FCH (1 mg) se disolvió en 2 ml de una solución de atelocolágeno al 2% p/v, después de esto se realizó la liofilización. El compuesto resultante se fracturó, y después se moldeó por compresión con una forma cilíndrica, produciendo una preparación de liberación sostenida que contenía FCH (proporción de FCH en base al biopolímero 2,5% p).

Ejemplo de preparación 10

Se mezcló sal sódica de hialuronano (0,58 g; viscosidad intrínseca, 4.500 cm³/g) con 20 ml de agua y se produjo el hinchamiento. Después, a esta mezcla se añadieron 2 ml de hidróxido sódico 2 N y se agitó para producir una

5 solución uniforme. Después se añadió divinilsulfona (0,10 g) en 2,4 ml de agua y se agitó. La mezcla resultante se dejó en reposo durante 70 minutos, tras lo cual, el gel formado se puso en 223 ml de una solución tampón Biotris (un tampón fosfato que contiene NaCl 0,15 M y que tiene un pH de aproximadamente 7,2) y se indujo el hinchamiento durante 3 horas. Después, a esta mezcla se añadió 1 ml de HCl 2 N. Tras una hora, se añadieron 0,6 ml de HCl 2 N, y la mezcla se dejó en reposo durante 16 horas. Se continuó con la adición 0,35 ml de HCl 2 N, tras lo cual el gel hinchado se agitó lentamente en la solución tampón durante 3 días. Se obtuvo un gel con propiedades viscoelásticas uniformes. El gel se dializó con NaCl 0,15 M durante 5 días. El gel se mezcló después con proteína FCH al 1% p/v en solución salina tamponada para establecer la concentración final de proteína FCH al 0,25% p/v, se obtuvo de esta manera una preparación que contenía FCH (proporción de FCH en base al biopolímero: 25% p/v).

10 **Aplicabilidad industrial**

La presente invención proporciona un agente útil para tratar lesiones de la médula espinal y enfermedades desmielinizantes.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> KE10 UNIVERSITY
OSAKA UNIVERSITY
KRINGLE PHARMA INC.
- 20 <120> AGENTE TERAPÉUTICO PARA LESIONES DE LA MÉDULA ESPINAL
- <130> K12F2684
- <150> PCT/JP2007/053804
<151> 28-02-2007
- 25 <160> 3
- <210> 1
<211> 728
30 <212> PRT
<213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 412 388 T3

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu
1 5 10 15

Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln
20 25 30

Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr
35 40 45

Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val
50 55 60

Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
65 70 75 80

Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys
85 90 95

Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe
100 105 110

Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys
115 120 125

Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
130 135 140

Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
145 150 155 160

Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr
165 170 175

Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser
180 185 190

Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu
195 200 205

Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp
210 215 220

His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro
225 230 235 240

His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp
245 250 255

Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr
260 265 270

Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys
275 280 285

Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu
290 295 300

Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile
305 310 315 320

ES 2 412 388 T3

Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu
 325 330 335
 His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn
 340 345 350
 Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr
 355 360 365
 Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp
 370 375 380
 Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met
 385 390 395 400
 Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp
 405 410 415
 Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala
 420 425 430
 Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Ala His
 435 440 445
 Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys
 450 455 460
 Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu
 465 470 475 480
 Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val
 485 490 495
 Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg
 500 505 510
 Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp
 515 520 525
 Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr
 530 535 540
 Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys
 545 550 555 560
 Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly
 565 570 575
 Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp
 580 585 590
 Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu
 595 600 605
 Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn
 610 615 620
 Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu
 625 630 635
 Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu
 645 650 655
 Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp
 660 665 670
 Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu
 675 680 685
 Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly
 690 695 700
 Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile
 705 710 715 720
 Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser
 725

<210> 2
<211> 723
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 2

ES 2 412 388 T3

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu
1 5 10 15

Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln
20 25 30

Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr
35 40 45

Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val
50 55 60

Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
65 70 75 80

Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys
85 90 95

Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe
100 105 110

Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys
115 120 125

Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
130 135 140

Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
145 150 155 160

Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg
165 170 175

Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg
180 185 190

Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr
195 200 205

Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly
210 215 220

Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe
225 230 235 240

Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys Arg
245 250 255

Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His
260 265 270

Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met
275 280 285

Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln
290 295 300

Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro
305 310 315 320

Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr Pro
325 330 335

Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro
340 345 350

Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg
355 360 365

Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln
370 375 380

Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln
385 390 395 400

Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu Asp
 405 410 415
 Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu
 420 425 430
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr
 435 440 445
 Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys
 450 455 460
 Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp His Pro Val Ile
 465 470 475 480
 Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro Thr
 485 490 495
 Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His
 500 505 510
 Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg
 515 520 525
 Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly
 530 535 540
 Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu
 545 550 555 560
 Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu
 565 570 575
 Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile
 580 585 590
 Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser
 595 600 605
 Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu
 610 615 620
 Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His
 625 630 635 640
 His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly Ala
 645 650 655
 Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu
 660 665 670
 Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val Ile Val Pro
 675 680 685
 Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val
 690 695 700
 Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile Leu Thr Tyr Lys Val
 705 710 715 720
 Pro Gln Ser

<210> 3
 <211> 728
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

5

<400> 3

ES 2 412 388 T3

Met Met Trp Gly Thr Lys Leu Leu Pro Val Leu Leu Leu Gln His Val
1 5 10 15
Leu Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Val Thr Ile Pro Tyr Ala Glu Gly
20 25 30
Gln Lys Lys Arg Arg Asn Thr Leu His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys
35 40 45
Thr Thr Leu Thr Lys Glu Asp Pro Leu Val Lys Ile Lys Thr Lys Lys

ES 2 412 388 T3

50		55		60											
Val	Asn	Ser	Ala	Asp	Glu	Cys	Ala	Asn	Arg	Cys	Ile	Arg	Asn	Lys	Gly
65					70					75					80
Phe	Pro	Phe	Thr	Cys	Lys	Ala	Phe	Val	Phe	Asp	Lys	Ser	Arg	Lys	Arg
				85					90					95	
Cys	Tyr	Trp	Tyr	Pro	Phe	Asn	Ser	Met	Ser	Ser	Gly	Val	Lys	Lys	Gly
			100					105					110		
Phe	Gly	His	Glu	Phe	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Lys	Asp	Tyr	Ile	Arg	Asn
		115					120					125			
Cys	Ile	Ile	Gly	Lys	Gly	Gly	Ser	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Ser	Ile	Thr
	130					135					140				
Lys	Ser	Gly	Ile	Lys	Cys	Gln	Pro	Trp	Asn	Ser	Met	Ile	Pro	His	Glu
145					150					155					160
His	Ser	Phe	Leu	Pro	Ser	Ser	Tyr	Arg	Gly	Lys	Asp	Leu	Gln	Glu	Asn
				165					170					175	
Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Arg	Gly	Glu	Glu	Gly	Gly	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr
			180					185					190		
Ser	Asn	Pro	Glu	Val	Arg	Tyr	Glu	Val	Cys	Asp	Ile	Pro	Gln	Cys	Ser
		195					200					205			
Glu	Val	Glu	Cys	Met	Thr	Cys	Asn	Gly	Glu	Ser	Tyr	Arg	Gly	Pro	Met
	210					215					220				
Asp	His	Thr	Glu	Ser	Gly	Lys	Thr	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	Gln	Gln	Thr
225					230					235					240
Pro	His	Arg	His	Lys	Phe	Leu	Pro	Glu	Arg	Tyr	Pro	Asp	Lys	Gly	Phe
				245					250					255	
Asp	Asp	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Lys	Pro	Arg	Pro	Trp	Cys
		260						265					270		
Tyr	Thr	Leu	Asp	Pro	Asp	Thr	Pro	Trp	Glu	Tyr	Cys	Ala	Ile	Lys	Met
		275					280					285			
Cys	Ala	His	Ser	Ala	Val	Asn	Glu	Thr	Asp	Val	Pro	Met	Glu	Thr	Thr
	290					295					300				
Glu	Cys	Ile	Lys	Gly	Gln	Gly	Glu	Gly	Tyr	Arg	Gly	Thr	Thr	Asn	Thr
305					310					315				320	
Ile	Trp	Asn	Gly	Ile	Pro	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	Ser	Gln	Tyr	Pro	His
			325						330					335	
Lys	His	Asp	Ile	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe	Lys	Cys	Lys	Asp	Leu	Arg	Glu
		340						345					350		
Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Ala	Glu	Ser	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr
		355					360					365			
Thr	Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Val	Gly	Tyr	Cys	Ser	Gln	Ile	Pro	Lys	Cys
	370					375					380				
Asp	Val	Ser	Ser	Gly	Gln	Asp	Cys	Tyr	Arg	Gly	Asn	Gly	Lys	Asn	Tyr
385					390					395					400
Met	Gly	Asn	Leu	Ser	Lys	Thr	Arg	Ser	Gly	Leu	Thr	Cys	Ser	Met	Trp
			405						410					415	
Asp	Lys	Asn	Met	Glu	Asp	Leu	His	Arg	His	Ile	Phe	Trp	Glu	Pro	Asp
			420					425					430		
Ala	Ser	Lys	Leu	Thr	Lys	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asp	Asp	Ala
		435						440				445			
His	Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Gly	Asn	Pro	Leu	Val	Pro	Trp	Asp	Tyr
	450					455					460				
Cys	Pro	Ile	Ser	Arg	Cys	Glu	Gly	Asp	Thr	Thr	Pro	Thr	Ile	Val	Asn
465					470					475					480

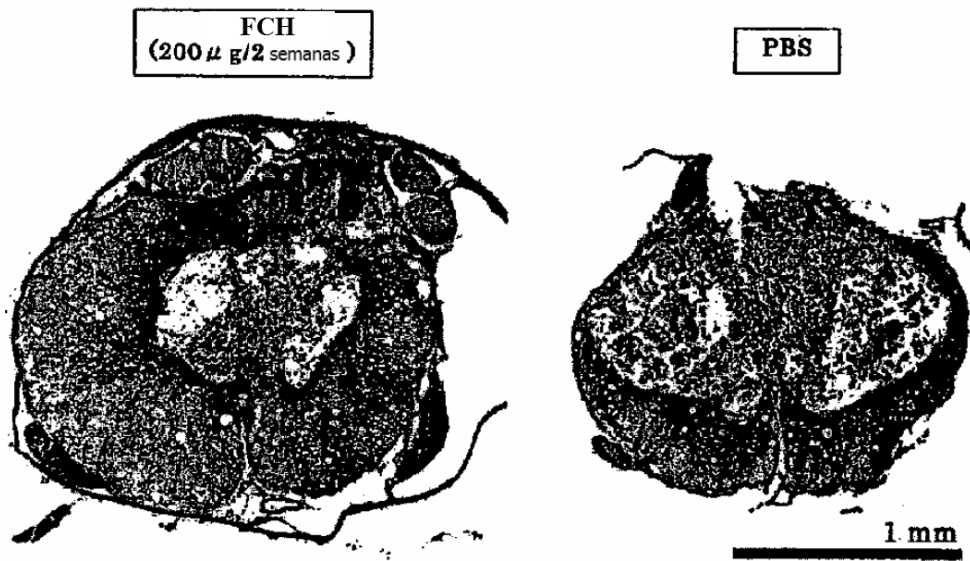
ES 2 412 388 T3

Leu Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val
 485 490 495
 Val Asn Gly Ile Pro Thr Gln Thr Thr Val Gly Trp Met Val Ser Leu
 500 505 510
 Lys Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser
 515 520 525
 Trp Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ala Arg Asn Lys Asp Leu
 530 535 540
 Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Glu Arg Gly
 545 550 555 560
 Glu Glu Lys Arg Lys Gln Ile Leu Asn Ile Ser Gln Leu Val Tyr Gly
 565 570 575
 Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu Leu Lys Leu Ala Arg Pro Ala Ile
 580 585 590
 Leu Asp Asn Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Ser Tyr Gly Cys Thr
 595 600 605
 Ile Pro Glu Lys Thr Thr Cys Ser Ile Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly
 610 615 620
 Leu Ile Asn Ala Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met
 625 630 635 640
 Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His His Gln Gly Lys Val Thr Leu Asn
 645 650 655
 Glu Ser Glu Leu Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys
 660 665 670
 Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Ile Cys Glu Gln His Lys Met Arg
 675 680 685
 Met Val Leu Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn
 690 695 700
 Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His
 705 710 715 720
 Lys Val Ile Leu Thr Tyr Lys Leu
 725

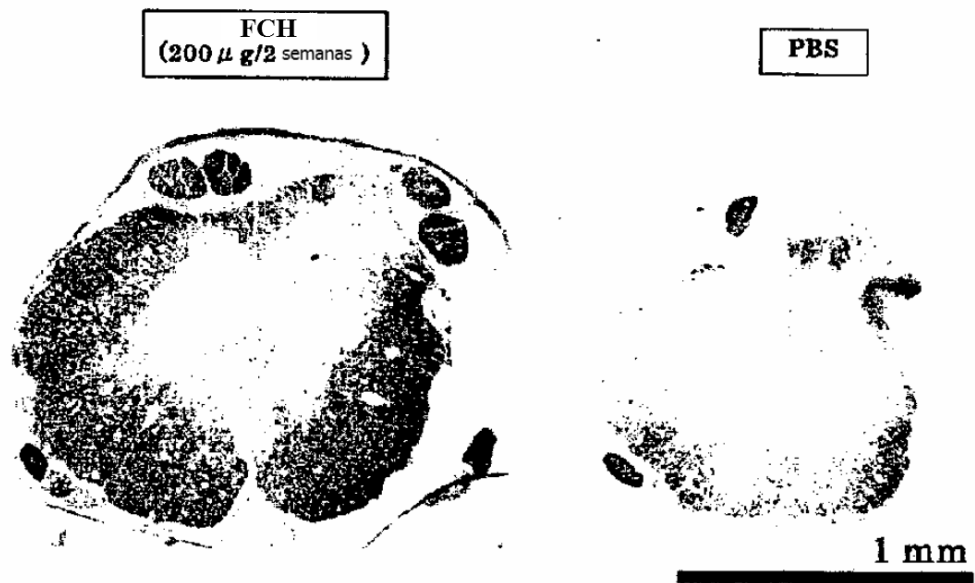
REIVINDICACIONES

1. Una proteína FCH para su uso en un procedimiento para tratar una lesión de la médula espinal, comprendiendo el procedimiento la administración de FCH por vía intratecal a un paciente que tiene una lesión de la médula espinal en un periodo de tiempo de 2 semanas después de la lesión de la médula espinal.
- 5 2. Una proteína FCH para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento la administración de FCH 72 horas después de producirse una lesión de la médula espinal.
3. Una proteína FCH para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento la administración de 10 µg a 50 mg de FCH mediante una administración única.
- 10 4. Una proteína FCH para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento la administración de 10 µg a 50 mg de FCH mediante una administración sostenida durante un periodo que varía de 30 minutos a varias semanas.
5. Una proteína FCH para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, en la que la administración única o la administración sostenida se repite de una vez al día a una vez cada varios meses.
- 15 6. Una proteína FCH para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento la administración de FCH en un fármaco inyectable que contiene del 0,0002% al 2,0% en p/v de HGF.

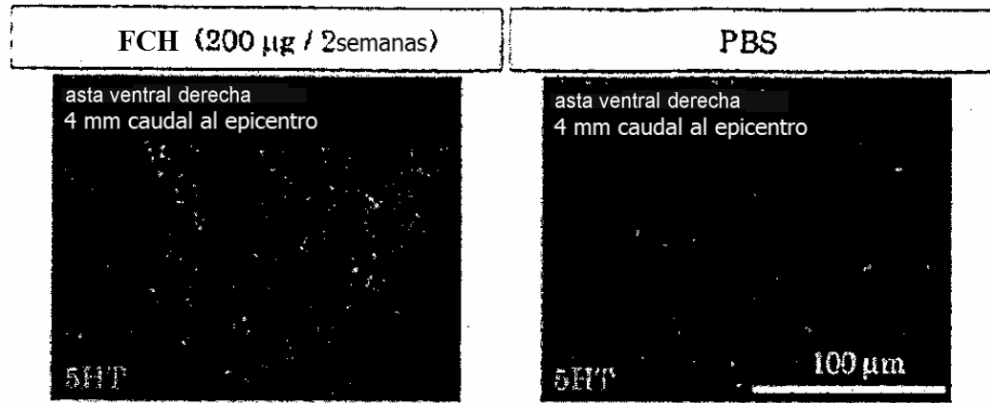
[Fig. 1]



[Fig.2]



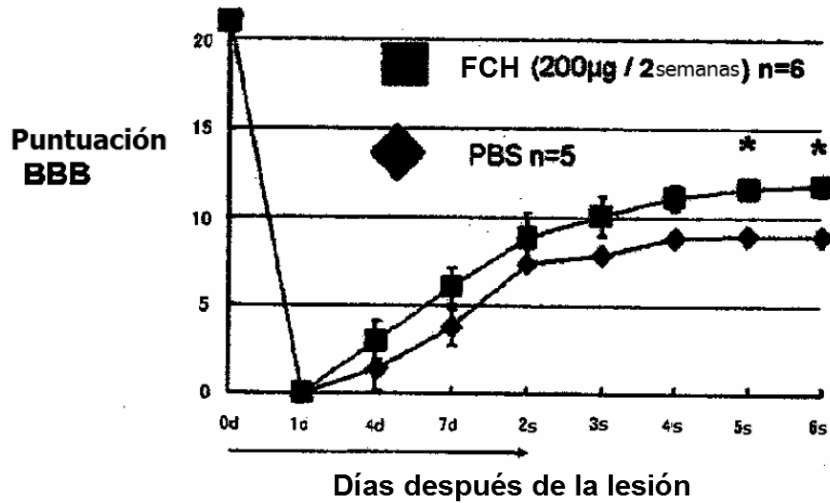
[Fig. 3]



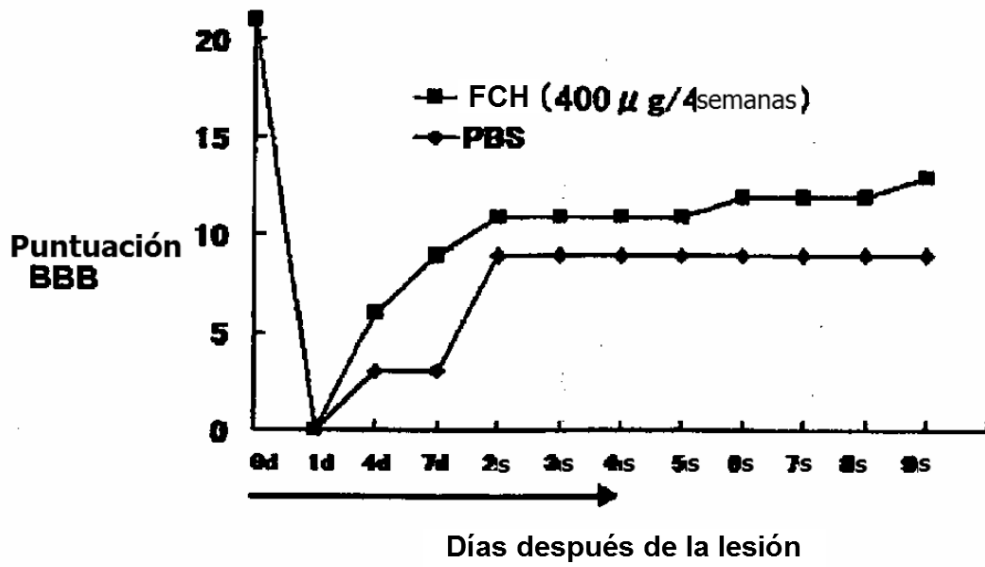
[Fig. 4]



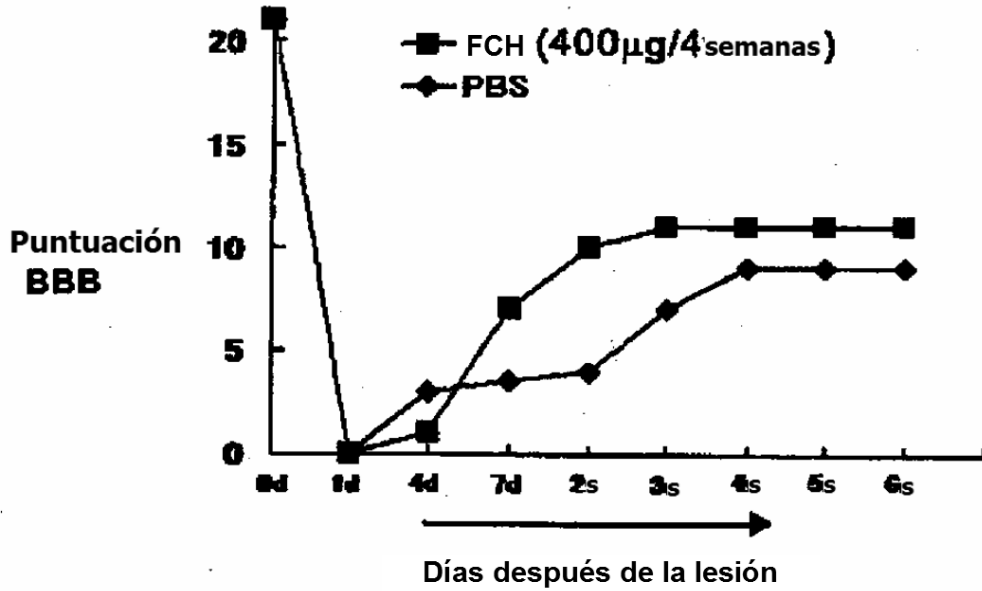
[Fig. 5]



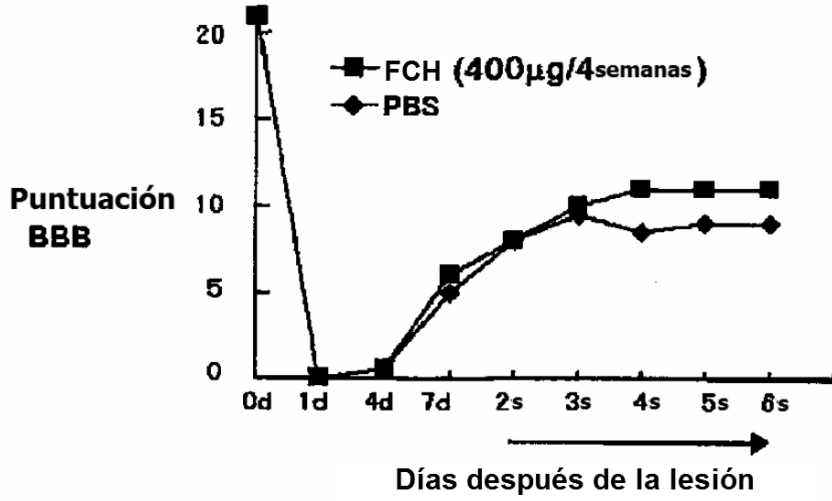
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]

