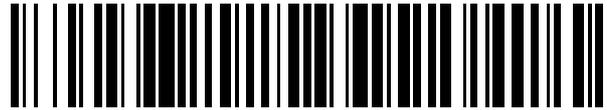


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 510**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2004 E 11152626 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 2353606**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento de lesiones del SNC**

30 Prioridad:

16.05.2003 US 471236 P

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

23.08.2013

73 Titular/es:

**ACORDA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
420 Saw Mill River Road
Ardsley, NY 10502 , US**

72 Inventor/es:

**BLIGHT, ANDREW R.;
CAGGIANO, ANTHONY O.;
GRUSKIN, ELLIOTT A. y
ZIMBER, MICHAEL P.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 420 510 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para el tratamiento de lesiones del SNC.

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de EEUU n.º 60/417.236, presentada el 16 de mayo de 2003.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere, en general, a enzimas que degradan glicosaminoglicanos para su uso para mejorar la recuperación funcional después de una lesión de contusión o una enfermedad del sistema nervioso central ("SNC"). En particular, la presente invención se dirige a la condroitinasa para su uso para estimular la recuperación funcional neurológica autónoma después de una lesión de contusión en la médula espinal. Las composiciones útiles incluyen formulaciones aceptables de condroitinasa, más en particular formulaciones de liberación sostenida de condroitinasa.

Descripción de la técnica relacionada

15 La médula espinal es el nervio más largo del cuerpo y está formado por fibras nerviosas. Estas fibras nerviosas son responsables de los sistemas de comunicación del cuerpo, que incluyen las funciones sensoriales, motoras y autónomas. Las funciones sensoriales incluyen la capacidad de sentir sensaciones, tales como el dolor. La función motora incluye la capacidad de mover el cuerpo de modo voluntario. Las funciones autónomas incluyen las funciones corporales involuntarias, por ejemplo, la capacidad de sudar y respirar.

20 El sistema nervioso central incluye el cerebro y la médula espinal. La médula espinal conecta el sistema nervioso periférico ("SNP") con el cerebro. Los nervios sensoriales, que entran por la raíz dorsal de la médula espinal, transmiten información sensorial desde los receptores sensoriales del cuerpo al cerebro. Los diferentes tipos de sensaciones se envían por diferentes vías sensoriales. Por ejemplo, los tractos espinotalámicos conducen las sensaciones de dolor y temperatura, y los tractos de la columna dorsal conducen las sensaciones de posición y del tacto. Los nervios motores, que salen por los nervios de la raíz ventral de la médula espinal, transmiten información motora voluntaria desde el cerebro al cuerpo.

25 El sistema nervioso autónomo ("SNA") influye en las actividades de los músculos involuntarios, que incluyen el músculo cardíaco y las glándulas que liberan hormonas. En particular, el SNA controla los sistemas cardiovascular, digestivo y respiratorio para mantener un entorno estable dentro del cuerpo. El SNA incluyen los nervios simpáticos, que provocan la contracción de los vasos sanguíneos y aumentan la frecuencia cardíaca, y los nervios parasimpáticos, que actúan de una manera opuesta a los nervios simpáticos dilatando los vasos sanguíneos y disminuyendo la frecuencia cardíaca.

30 Las lesiones en el sistema nervioso central, incluyendo la médula espinal, producen la pérdida de función. Dependiendo del tipo de lesión del sistema nervioso central, la pérdida de función puede manifestarse en una pérdida de función sensorial, motora o autónoma, o sus combinaciones.

35 Los tipos más habituales de lesiones de la médula espinal ("LME") incluyen contusiones (magulladuras de la médula espinal) y lesiones de compresión (provocadas por una presión sobre la médula espinal). En las lesiones de contusión, el tipo más habitual de lesión, a menudo se forma una cavidad o hueco en el centro de la médula espinal. A diferencia de las células nerviosas o de las neuronas del SNP, las neuronas de SNC no se regeneran después de una lesión. La incapacidad de los axones para regenerarse puede conducir a una pérdida de sensaciones, de función motora y de función autónoma, así como a una parálisis permanente. Una razón por la cual las neuronas no pueden regenerarse puede ser su incapacidad para atravesar la cicatriz glial que se desarrolla después de una lesión en la médula espinal. La herida provocada por la lesión desarrollará una cicatrización glial, que contiene moléculas de la matriz extracelular, que incluyen proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG). Los CSPG inhiben el crecimiento del tejido nervioso *in vitro* y la regeneración del tejido nervioso en regiones ricas en CSPG *in vivo*.

40 Se ha implicado a una serie de moléculas, y a regiones específicas de las mismas, en la capacidad para apoyar el brote de neuritas desde una célula neuronal, un proceso también denominado crecimiento de neuritas. El término "neurita" se refiere al axón y a las estructuras dendríticas. Este proceso de brote de neuritas es fundamental para el desarrollo y la regeneración neural, en especial después de una lesión física o una enfermedad que haya dañado a las células neuronales. Las neuritas se alargan profusamente durante el desarrollo en los sistemas nerviosos central y periférico de todas las especies animales. Este fenómeno afecta a los axones y a las dendritas.

45 Se sabe que diversos polipéptidos, en especial las moléculas de adhesión celular (CAM), estimulan el crecimiento de células neurales. Aunque los primeros esfuerzos en esta área de investigación se concentraron en la proteína

de la matriz extracelular estimuladora de la adhesión fibronectin (FN), también se ha descubierto que otros polipéptidos estimulan el crecimiento neural. Por ejemplo, la patente de EEUU n.º 5.792.743 describe nuevos polipéptidos y métodos para estimular el crecimiento neural en el sistema nervioso central de un mamífero mediante la administración de una CAM neural soluble, de uno de sus fragmentos o de un producto de fusión de Fc de la misma. La patente de EEUU n.º 6.313.265 describe polipéptidos sintéticos que contienen las regiones farmacológicamente activas de CAM que pueden utilizarse para estimular la regeneración nerviosa y para reparar lesiones de nervios periféricos, así como lesiones en el sistema nervioso central. Aunque son útiles, el uso solo de proteínas regenerativas puede no ser suficiente para que se produzca la reparación de un sistema nervioso dañado.

Durante aproximadamente las últimas dos décadas se ha expandido con rapidez el conocimiento básico de la adhesión celular y la migración en matrices extracelulares (ECM) a nivel molecular. La acción de enzimas y otros polipéptidos que degradan los componentes de la matriz extracelular y las membranas basales puede facilitar los acontecimientos de reparación neural mediante una diversidad de mecanismos, que incluyen la liberación de citoquinas unidas y el aumento de la permeabilidad de la matriz, potenciando con ello la movilidad de moléculas mediadoras, factores del crecimiento y agentes quimiotácticos, así como de las células implicadas en el proceso de curación. Por ejemplo, la patente de EEUU n.º 5.997.863 describe el uso de glicosaminoglicanos para manipular la proliferación celular y estimular la curación de heridas.

Las moléculas de ECM incluyen los CSPG inhibidores. Se han identificado los componentes de los CSPG como glicosaminoglicanos, sulfato de condroitina (CS) y sulfato de dermatano (DS). La eliminación de estas moléculas inhibitorias permitiría que las neuritas se regenerasen y volvieran a inervar un área después de una lesión física o una enfermedad, así como permitiría la recuperación de las funciones sensoriales, motoras y autónomas.

Estudios previos han descubierto que las condroitinasas pueden lisar y degradar a los CSPG, que incluyen CS y DS. Un estudio descubrió que la condroitinasa ABC elimina las cadenas de glicosaminoglicanos (GAG) en las áreas lesionadas y circundantes del SNC de rata *in vivo*. La degradación de los GAG estimula la expresión de una proteína asociada al crecimiento, GAP-43, lo cual indica la mayor propensión regeneradora en las células tratadas. Sin embargo, esta proteína asociada al crecimiento está asociada con la regeneración en lesiones de nervios periféricos, pero no centrales. Otro estudio descubrió que un tratamiento con condroitinasa ABC *in vitro* de la médula espinal de rata regenera neuronas en un sustrato de sección de tejido. Este estudio observa que la degradación de los CSPG puede estimular los efectos neuroestimulatorios de la laminina (Zuo *et al.*, Degradation of chondroitin sulfate proteoglycan enhances the neurite-promoting potential of spinal cord tissue, *Exp. Neurol.*, 154(2):654-662 (1998)). En un estudio posterior realizado por el mismo investigador principal, se indicó que una inyección de condroitinasa ABC en el sitio de la lesión nerviosa degrada a los CSPG y aumenta el acceso de brotes axonales hacia la lámina basal del segmento nervioso distal, que puede permitir una mayor libertad de crecimiento en la interfase del nervio coaptado (Zuo *et al.*, Regeneration of axons after nerve transaction repair is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan, *Exp. Neurol.*, 176(1): 221-228 (2002)). El mismo grupo de investigadores también ha descubierto que unos tratamientos con condroitinasa ABC regeneran axones hacia injertos acelulares con una velocidad mucho mayor que en los injertos control (Krekoski *et al.*, Axonal regeneration into acellular nerve grafts is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan, *J. Neurosci.*, 15:21(16):6206-6213 (2001)). Las aplicaciones de condroitinasa ABC_{tipo 1} al tracto corticoespinal lesionado, en particular a una lesión en la columna dorsal, evita la retracción de los axones del área afectada y estimula más crecimiento de fibras axonales que el control, ramificándose algunos axones hacia la materia gris. Los axones CST regenerados establecieron conexiones funcionales (Bradbury *et al.*, Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury, *Nature*, 416:636- 640 (2002)).

Sin embargo, la recuperación funcional neurológica inducida por condroitinasa en un modelo animal de lesión de transección de la columna dorsal tiene una aplicabilidad o un poder predictivo limitados con relación a la recuperación de la función autónoma y, en particular, como resultado de una lesión de contusión en la médula espinal. En la lesión de transección de la columna dorsal descrita por Bradbury *et al.*, 2002, las fibras de la columna dorsal se lesionan cortando los tractos nerviosos con un cuchillo. Este método produce una lesión localizada o "limpia" que corta las fibras nerviosas con mínimos daños colaterales al resto del parénquima de la médula espinal. El tejido de la materia gris y otros tractos de la materia blanca sufren un daño mínimo, y así este modelo resulta útil para estudiar la capacidad regenerativa de las neuronas de la columna dorsal, que portan neuronas sensoriales.

Sumario de la invención

La presente invención es una enzima que degrada glicosaminoglicanos para su uso en el tratamiento de una lesión de contusión del sistema nervioso central para mejorar la recuperación funcional, según se reivindica en la reivindicación 1. El uso de condroitinasa AC, condroitinasa B o enzimas de mamífero con actividad similar a la condroitinasa, tales como hialuronidasa 1 (Hyal 1), hialuronidasa 2 (Hyal 2), hialuronidasa 3 (Hyal 3), hialuronidasa 4 (Hyal 4), o sus mezclas, estimula la recuperación funcional neurológica en mamíferos después de una lesión de contusión en el SNC, debido a que estas condroitinasas degradan los componentes de la matriz extracelular del SNC que inhiben la regeneración.

Los anteriores tipos de condroitinasas pueden administrarse a un mamífero que padece un lesión de contusión del SNC, tanto si la lesión es inmediata como si es antigua. La condroitinasa se administra en una cantidad suficiente para degradar los CSPG y así estimula la recuperación de la función neurológica autónoma.

5 Las condroitinasas pueden administrarse de forma óptima con un vehículo farmacéutico adecuado. La administración puede ser local o sistémica, que incluye la aplicación oral, parenteral, intraperitoneal, intratecal o tópica. Los perfiles de liberación de estas formulaciones pueden ser de liberación rápida, de liberación inmediata, de liberación controlada o de liberación sostenida. Por ejemplo, la formulación puede comprender una matriz de liberación sostenida y una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima que degrada glicosaminoglicanos. Como alternativa, las condroitinasas pueden ser segregadas por células genéticamente modificadas que se implantan, en forma libre o en una cápsula, en el sitio o cerca del sitio de la lesión del SNC.

La administración de condroitinasas y la estimulación resultante de la recuperación funcional neurológica según esta descripción restablece las funciones motora, sensorial y autónoma en diversos grados, dependiendo de la capacidad de respuesta de cada individuo después de la lesión contusiva o no contusiva del sistema nervioso central.

Breve descripción de los dibujos

15 Para comprender más a fondo la naturaleza y las ventajas de la presente invención debe hacerse referencia a la siguiente descripción detallada tomada en conexión con los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 es una ilustración gráfica de los volúmenes de orina residual después de una lesión contusiva de la médula espinal.

La figura 2 es una gráfica de la velocidad de liberación de condroitinasa desde matrices de liberación sostenida.

20 La figura 3 es una gráfica de las puntuaciones BBB de ratas después de un tratamiento con condroitinasa ABC_{tipo 1}, penicilinasas o un control después de una lesión contusiva de la médula espinal.

La figura 4 es una gráfica de las puntuaciones BBB de ratas después de un tratamiento con condroitinasa ABC_{tipo 1} o penicilinasas después de una lesión contusiva de la médula espinal.

25 La figura 5 es una gráfica de la media de los cambios en el peso corporal después de la administración de diversas dosis de condroitinasa.

La figura 6 es una ilustración gráfica de la media del cambio de peso por dosis con diversas dosis de condroitinasa ABC_{tipo 1}.

La figura 7 es una ilustración gráfica de la media del cambio de temperatura con diversas dosis de condroitinasa ABC_{tipo 1}.

30 La figura 8 es una ilustración gráfica del cambio de peso con dosis repetidas y crecientes de condroitinasa ABC_{tipo 1}.

La figura 9 es una ilustración gráfica del cambio de temperatura con dosis repetidas y crecientes de condroitinasa ABC_{tipo 1}.

Descripción detallada

35 Antes de describir las presentes composiciones y métodos debe entenderse que esta invención no está limitada a los procesos, las composiciones o las metodologías concretas descritas, puesto que pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la descripción se utiliza con el fin de describir solo las versiones o las realizaciones concretas, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas.

40 También debe advertirse que, tal como se emplea en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/una" y "el/la" incluyen la referencia al plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a una "enzima" es una referencia a una o más enzimas y sus equivalentes conocidos por los expertos en la técnica, etc. A menos que se indique lo contrario, todos los términos y las expresiones técnicos y científicos utilizados en la presente tienen los mismos significados que los que entienden habitualmente los expertos en la técnica. Aunque puede utilizarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente para la práctica o el ensayo de las realizaciones de la presente, a continuación se describirán los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

45 La presente descripción permite el tratamiento de lesiones de contusión del SNC de mamíferos, generalmente provocados por traumatismos o enfermedad. En particular, la condroitinasa AC, la condroitinasa B, Hyal 1, Hyal 2, Hyal 3 y Hyal 4, de modo individual y en combinación, proporcionan un tratamiento terapéutico para las lesiones de la médula espinal. Las expresiones "lesión del sistema nervioso central", "lesión de la médula espinal" y "lesión de contusión", tal como se emplean en la presente, incluyen enfermedades y lesiones traumáticas que pueden dar como resultado el desgarrar, la magulladura o el aplastamiento de neuronas provocados por una lesión traumática,

tal como un accidente de automóvil, una caída o una herida de bala, así como otras lesiones, o una lesión no traumática, o una compresión que puede ser provocada por una fuente interna o externa. La práctica de los presentes métodos conferirá beneficios clínicos al mamífero tratado, proporcionando mejoras importantes desde el punto de vista clínico en al menos una de las funciones de coordinación motora, percepción sensorial, o funciones autónomas del sujeto. Las mejoras importantes desde el punto de vista clínico pueden variar desde una mejora detectable hasta un restablecimiento completo de una función deteriorada o perdida del SNC.

Por contraste con las lesiones "limpias" descritas por Bradbury, el módulo de contusión de una lesión de la médula espinal produce una destrucción indiscriminada del tejido a través de una cascada de mecanismos de respuesta. Una lesión de contusión se produce de modo experimental aplicando una fuerza roma a la médula espinal expuesta e imita de la forma más precisa la típica lesión humana, proporcionando una condición más adecuada para el estudio de procesos patofisiológicos primarios y secundarios (Blight A.R., 2000, Animal models of spinal cord injury, Top Spinal Cord Inj. Rehabil., 6(2):1-13; Kwon B.K., Oxland T.R., Tetzlaff W. (2002), Animal models used in spinal cord regeneration research, Spine, 27(14):1504-1510). Después de la lesión mecánica inmediata al tejido, que puede estirarse y desgarrarse en los axones de la materia blanca, se produce una destrucción más profunda y general del tejido. La barrera hematoencefálica se ve comprometida, y la médula espinal sufre una necrosis hemorrágica de la materia gris central que dispara cascadas inflamatorias y bioquímicas que producen un intenso daño tisular y celular secundario. En un periodo que va de días a semanas se forma una lesión cavitada en el sitio del daño que puede estar rellena de células gliales reactivas, axones residuales, neovacuatura y un depósito de moléculas de la matriz extracelular. Las funciones sensorial, motora y autónoma pueden verse comprometidas. Comparado con la naturaleza relativamente "limpia" de una lesión de transección de la columna dorsal, una lesión contusiva produce una lesión mucho más compleja que implica a un repertorio de mecanismos de respuesta y reparación del tejido de la médula espinal, y es apropiada para evaluar potenciales productos terapéuticos que se dirijan a la fase aguda y crónica de lesiones. Además, las lesiones de contusión producen efectos secundarios que dan como resultado una pérdida de tejido, la formación de cicatrices, la formación de cavidades y similares. La lesión de contusión activa una respuesta inmunológica más robusta, comparada con una lesión de transección, que puede tener consecuencias significativas para la lesión y la reparación (Hirschberg D.L., Yoles E., Belkin M., Schwartz M., 1994).

El paradigma experimental con el que evaluar un producto terapéutico potencial para LME debe colocarse en contexto cuando se trasladan los resultados a otros modelos de lesiones de la médula espinal. El contraste entre la anatomía y la patofisiología de la lesión de transección de la columna dorsal y el modelo de contusión es grande. Las lesiones de transección de la columna dorsal provocan daños en neuronas que son más propensas a regenerarse y tienen funciones específicas dentro de los tractos sensoriales. Además, la lesión de transección conduce a un mínimo daño secundario en los tejidos. Por contraste, la lesión de contusión daña a los tractos de nervios sensoriales y motores, afectando a la función sensorial, motora y autónoma. Los tractos corticoespinales son menos regenerativos que las neuronas que se encuentran en las columnas dorsales. La lesión de contusión también conduce a un intenso daño secundario en los tejidos que crea una lesión sustancialmente más grande que una lesión de la columna dorsal.

Después de una lesión en la médula espinal del SNC de mamíferos adultos, la incapacidad de los axones para regenerarse puede conducir a una parálisis permanente. El sitio de la lesión del SNC desarrolla una lesión o cicatriz glial por un aumento en el depósito de moléculas de la matriz extracelular por los astrocitos y los oligodendrocitos en el sitio de la lesión. Estas moléculas de la matriz extracelular incluyen CSPG, que se expresan en gran cantidad en las áreas en cicatrización. Los CSPG inhiben el crecimiento del tejido nervioso *in vitro* y la regeneración del tejido nervioso en regiones ricas en CSPG *in vivo*. Los sulfatos de condroitina A, B y C son las formas predominantes encontradas en mamíferos. Estas condroitinas pueden estar implicadas en la modulación de diversas actividades biológicas, que incluyen la diferenciación celular, la adhesión, las vías enzimáticas, y las interacciones hormonales. La presencia de proteoglicanos de sulfato de condroitina es elevada en las etapas tardías del crecimiento celular en respuesta a daños en tejidos y vasos.

Los glicosaminoglicanos (GAG), el sulfato de condroitina (CS) y el sulfato de dermatano (DS) son componentes importantes de los CSPG. Son moléculas inhibitoras que contribuyen a la falta de regeneración del SNC en mamíferos adultos, impidiendo el crecimiento axonal y neurítico. Sin embargo, los CSPG son importantes para la dirección y el diseño neuronal durante el desarrollo, y no en la inhibición.

Los glicosaminoglicanos son polisacáridos no ramificados que consisten en restos alternantes de hexosamina y hexurónico que portan grupos sulfato en diferentes posiciones. Los GAG generalmente se dividen en tres familias según la composición del esqueleto de disacárido. Estas son: heparina/sulfato de heparano; sulfato de condroitina; y sulfato de queratano. La familia del sulfato de condroitina incluye siete subtipos denominados sulfato de condroitina no sulfatado, sulfato de condroitina sobresulfatado, y sulfatos de condroitina A-E, que pueden variar en el número y la posición de sus grupos funcionales sulfato. El sulfato de condroitina B también se denomina sulfato de dermatano, y se diferencia en que el ácido idurónico es el resto predominante en la posición del ácido hexurónico alternativa.

Ahora se ha descubierto que las enzimas que degradan los CSPG condroitinasa AC, condroitinasa B, Hyal 1, Hyal 2, Hyal 3 y Hyal 4, son útiles para controlar y/o inhibir los efectos de los sulfatos de condroitina y para desarrollar productos terapéuticos para el tratamiento de estados de enfermedad. Los descubrimientos descritos en la presente son la primera descripción del tratamiento con condroitinasa de lesiones de contusión que provocan una mejora en

la recuperación de la función neurológica, en particular la función autónoma, después de una lesión de contusión de la médula espinal.

La condroitinasa AC y la condroitinasa B son enzimas de condroitina liasa, que pueden obtenerse de diversas fuentes. Puede utilizarse cualquier condroitinasa AC o B en la descripción que incluyen, pero no se limitan a la condroitinasa AC (derivada de *Flavobacterium heparinum*; T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi, S. Suzuki, J. Biol. Chem., 243, 1523 (1968)); condroitinasa AC II (derivada de *Arthobacter aureescens*; K. Hiyama, S. Okada, J. Biol. Chem., 250, 1824 (1975); K. Hiyama, S. Okada, J. Biochem. (Tokio), 80, 1201 (1976)); condroitinasa AC III (derivada de *Flavobacterium* sp. Hp102; H. Miyazono, H. Kikuchi, K. Yoshida, K. Morikawa, K. Tokuyasu, Seikagaku, 61, 1023 (1989)); condroitinasa B (derivada de *Flavobacterium heparinum*; Y.M. Michelaaci, C.P. Dietrich, Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 973 (1974); V.M. Michelaaci, C.P. Dietrich, Biochem. J., 151, 121 (1975); K. Maeyama, A. Tawada, A. Ueno, K. Yoshida, Seikagaku, 57, 1189 (1985)); y condroitinasa B (derivada de *Flavobacterium* sp. Hp102; H. Miyazono, H. Kikuchi, K. Yoshida, K. Morikawa, K. Tokuyasu, Seikagaku, 61, 1023 (1989)). La condroitinasa AC y condroitinasa B adecuadas están disponibles en el mercado en Seikagaku America, Falmouth, Massachusetts, EEUU. Además, las enzimas pueden producirse mediante los métodos descritos en la patente de EEUU n.º 6.093.563 de Bennett *et al.* Como referencia, la condroitinasa ABC_{tipo I} y la condroitinasa ABC_{tipo II} son exo- y endoliasas, respectivamente, que rompen los sulfatos de condroitina y dermatano (Hamei *et al.*, 1997). Se han identificado enzimas de mamífero con actividad de tipo condroitinasa. Por ejemplo, ciertas hialuronidasas, tales como Hyal 1, Hyal 2, Hyal 3 y Hyal 4, también degradan los CSPG y pueden utilizarse en la presente invención.

La actividad de la enzima condroitinasa puede estabilizarse mediante la adición de excipientes o mediante liofilización. Los estabilizantes 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 estabilizantes generalmente se añaden a la proteína en una proporción de 1:10 a 4:1 de carbohidratos a proteína, de aminoácidos a proteína, de estabilizante de proteínas a proteína, y de sales a proteína; de 1:1000 a 1:20 de tensioactivo a proteína; y de 1:20 a 4:1 de lípidos a proteína. Otros estabilizantes incluyen altas concentraciones de sulfato de amonio, acetato de sodio o sulfato de sodio, basados en estudios comparativos con actividad heparinasa. Los agentes estabilizantes, preferiblemente el sulfato de amonio u otra sal similar, se añaden a la enzima en una proporción de 0,1 a 4,0 mg de sulfato de amonio/IU de enzima.

La condroitinasa puede administrarse de modo local o sistémico. Esta administración incluye la administración oral, parenteral, entérica, intraperitoneal, intratecal, por inhalación, o tópica. Las formas preferidas de administración incluyen la vía intravenosa, subcutánea, intratecal, intradérmica, intramuscular, internodal, intracutánea, o percutánea. La administración tópica o local puede ser preferible para un mayor control de la aplicación.

Las condroitinasas, solas o en combinación, pueden mezclarse con un vehículo farmacéutico apropiado antes de la administración. Los ejemplos de aditivos y vehículos farmacéuticos utilizados en general son diluyentes, ligantes, lubricantes, agentes colorantes, agentes disgregantes, agentes tamponantes, ácidos grasos isotonzantes, agentes isotonzantes, conservantes, anestésicos y tensioactivos convencionales, y similares, y son conocidos por los expertos en la técnica. De modo específico, los vehículos farmacéuticos que pueden utilizarse son dextrano, sacarosa, lactosa, maltosa, xilosa, trehalosa, manitol, xilitol, sorbitol, inositol, albúmina de suero, gelatina, creatinina, polietilenglicol, tensioactivos no iónicos (por ejemplo, ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitano, aceite de ricino endurecido-polioxietileno, ésteres de ácidos grasos-sacarosa, polioxietileno-polioxipropilenglicol) y compuestos similares. Los vehículos farmacéuticos también pueden utilizarse en combinación, tal como polietilenglicol y/o sacarosa, o ésteres de ácidos grasos-polioxietilensorbitano. Se prefiere particularmente el monooleato de polioxietilensorbitano (20 E.O.).

Los perfiles de liberación de estas formulaciones pueden ser de liberación rápida, de liberación inmediata, de liberación controlada o de liberación sostenida. En particular, las formulaciones de liberación sostenida de condroitinasa AC y condroitinasa B o Hyal 1, Hyal 2, Hyal 3 y Hyal 4, pueden utilizarse para mejorar o recuperar la función neurológica, incluyendo la función autónoma. Esta formulación produce una liberación sostenida y controlada de la enzima hacia el sistema, de forma que los CSPG son degradados. La degradación de los CSPG puede producirse en el sitio del daño, la cavidad o la lesión, o puede producirse en sitios dentro del SNC corriente arriba o corriente abajo de la lesión.

El régimen de tratamiento puede realizarse por medio de la administración de condroitinasa AC y condroitinasa B o Hyal 1, Hyal 2, Hyal 3 y Hyal 4, preferiblemente al SNC, y más preferiblemente a las lesiones del área dañada del SNC. La vía de administración, la programación de la administración y la dosificación se realizan de modo que la recuperación funcional de un deterioro del SNC es potenciada por la estimulación del crecimiento de neuritas. Los tratamientos descritos administran una cantidad eficaz de condroitinasa AC y condroitinasa B o Hyal 1, Hyal 2, Hyal 3 y Hyal 4, al SNC o al sitio dañado del SNC. El término "cantidad eficaz" significa una cantidad suficiente para degradar los CSPG del área lesionada de la médula espinal o dentro del SNC o una cantidad suficiente para restablecer, en todo o en parte, la función motora, sensorial o autónoma del mamífero. Por ejemplo, una cantidad eficaz de la enzima puede ser de aproximadamente 0,0001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal

- del paciente. La cantidad eficaz de condroitinasa puede administrarse en una única dosificación, en dos dosificaciones o en una pluralidad de dosificaciones. Aunque debe entenderse que la dosificación puede administrarse en cualquier momento, en una realización la dosificación se administra en las 12 h tras la lesión, o en cuanto sea posible. La dosificación puede administrarse a un mamífero lesionado en una, dos o una pluralidad de dosificaciones; dichas dosificaciones dependerán de la gravedad de la lesión y de la cantidad de CSPG presentes en la cicatrización glial. Cuando se administra una pluralidad de dosificaciones, estas pueden administrarse sobre una base diaria, semanal o bisemanal. La administración de las dosificaciones puede realizarse mediante un catéter o una jeringa. Como alternativa, el tratamiento puede administrarse durante una cirugía para permitir la aplicación directa a la cicatriz glial.
- 5
- 10 Tras haber administrado las condroitinasas, la degradación de los CSPG elimina las moléculas inhibitoras que bloquean el crecimiento de las neuritas, y permiten la regeneración de las neuritas hacia el área afectada. La administración de condroitinasas también puede degradar los CSPG en el SNC distante del área afectada, que incluye corriente arriba o corriente abajo de la lesión. La condroitinasa AC y la condroitinasa B degradan CS y DS, respectivamente, dando como resultado disacáridos sulfatados insaturados. La eliminación de CS y DS de la cicatriz glial permite la regeneración del crecimiento de las neuritas hacia el área lesionada.
- 15
- La regeneración de las células nerviosas en el área del SNC afectada permite la recuperación de las funciones motora, sensorial y autónoma. Las mejoras importantes desde el punto de vista clínica variarán desde una mejora detectable a un restablecimiento completo de una función nerviosa deteriorada o perdida, que variará según los pacientes y las lesiones individuales.
- 20
- La práctica de la invención, incluyendo otros aspectos y realizaciones preferidos de la misma, se comprenderá más a fondo a partir de los siguientes ejemplos, que se presentan sólo como ilustración y no deben considerarse que limiten la invención de ninguna manera.
- La enzima que degrada glicosaminoglicanos para la administración al mamífero comprende una cantidad terapéuticamente eficaz, y opcionalmente la degradación de los proteoglicanos de sulfato de condroitina se produce en el sitio de la lesión del sistema nervioso central. Como alternativa, la degradación de los proteoglicanos de sulfato de condroitina se produce fuera del sitio de la lesión del sistema nervioso central.
- 25
- Opcionalmente, la cantidad terapéuticamente eficaz de la enzima que degrada glicosaminoglicanos comprende una cantidad suficiente para degradar proteoglicanos de sulfato de condroitina.
- Opcionalmente, la cantidad terapéuticamente eficaz de la enzima que degrada glicosaminoglicanos comprende un máximo de aproximadamente 100 mg/kg de condroitinasa.
- 30
- La enzima que degrada glicosaminoglicanos puede administrarse después de una lesión de contusión en el sistema nervioso central.
- La enzima que degrada glicosaminoglicanos se selecciona del grupo que consiste en condroitinasa AC, condroitinasa B, hialuronidasa 1, hialuronidasa 2, hialuronidasa 3, hialuronidasa 4 y sus combinaciones.
- 35
- En una realización, la enzima que degrada glicosaminoglicanos se administra de modo local. Opcionalmente, la administración local se selecciona del grupo que consiste en la administración intratecal y tópica.
- Opcionalmente, la enzima que degrada glicosaminoglicanos está en una formulación de liberación sostenida.
- También se describe una composición de liberación sostenida que comprende una enzima que degrada glicosaminoglicanos y una matriz de liberación sostenida.
- 40
- La matriz de liberación sostenida puede comprender una matriz seleccionada del grupo que consiste en pegamento de fibrina, colágeno, alginato, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), Pluronic y etileno-acetato de vinilo.
- La presente invención proporciona además una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima que degrada glicosaminoglicanos para mejorar la recuperación funcional tras una lesión de contusión en el sistema nervioso central. Opcionalmente, la cantidad terapéuticamente eficaz de la enzima que degrada glicosaminoglicanos comprende una cantidad suficiente para degradar proteoglicanos de sulfato de condroitina.
- 45
- La degradación de los proteoglicanos de sulfato de condroitina puede producirse en el sitio de la lesión de contusión. La degradación de los proteoglicanos de sulfato de condroitina puede producirse fuera del sitio de la lesión de contusión.
- La cantidad terapéuticamente eficaz de la enzima que degrada glicosaminoglicanos comprende opcionalmente una cantidad suficiente para mejorar la función motora, la función sensorial, la función autónoma o sus combinaciones.
- 50
- La enzima que degrada glicosaminoglicanos se selecciona del grupo que consiste en condroitinasa AC, condroitinasa B, hialuronidasa 1, hialuronidasa 2, hialuronidasa 3, hialuronidasa 4 y sus combinaciones.

Opcionalmente, la lesión de contusión comprende una lesión cerebral traumática. Opcionalmente, la lesión de contusión comprende una lesión de la médula espinal. La lesión de la médula espinal puede comprender una lesión de una fuerza roma en la médula espinal. La morfología general de la médula espinal puede mantenerse. Opcionalmente, la lesión de la médula espinal comprende una lesión que resulta de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en monoplejía, diplejía, paraplejía, hemiplejía y cuadriplejía.

Opcionalmente, la lesión de contusión comprende neuronas desgarradas o parcialmente cortadas.

Opcionalmente, la lesión de contusión comprende neuronas aplastadas.

Opcionalmente, la lesión de contusión comprende una compresión del sistema nervioso central. La compresión puede ser provocada por una fuerza traumática en la médula espinal. Como alternativa, la compresión puede ser provocada por un tumor, una hemorragia, un infarto, un proceso infeccioso, una estenosis o una isquemia.

Ejemplo comparativo 1: La condroitinasa mejora las funciones autónomas después de una lesión

Se completó un estudio de la función autónoma después de una lesión de contusión de la médula espinal en ratas con el uso de condroitinasa en las instalaciones de Acorda Animal Modeling Facility. Los animales ($n = 38$) se sometieron a un modelo establecido de LME (Gruner *et al.*, 1996). Comenzando inmediatamente después de LME, 19 animales fueron tratados con condroitinasa ABC I (Seikagaku, n.º de catálogo 100332, n.º de lote E02201) por vía intratecal (i.t.) con 0,06 unidades por rata por dosis en fluido cerebroespinal artificial, en días alternos durante dos semanas. Los otros 19 animales se trataron con proteína enzimática (penicilinas, Sigma, n.º de catálogo P4524) en vehículo.

Los animales se indujeron y se mantuvieron en un estado de anestesia quirúrgica con isoflurano al 1,5% en una mezcla de aire de calidad médica (oxígeno al 95%, CO₂ al 5%). Se administró de modo preoperatorio una dosis inicial de cefazolina (50 mg/kg, por vía subcutánea). Durante la cirugía, el animal se colocó sobre una almohadilla calefactora para ayudar a mantener la temperatura corporal, y se controló la velocidad de pulso, SpO₂ y la temperatura del animal. Se realizó una laminectomía de las vértebras espinales T9 y T10. Se realizó una laminectomía parcial en la unión T13/L1 para la colocación de un catéter intratecal. Se realizó una incisión en la dura con una aguja hipodérmica. Se insertó un catéter de calibre 32 (ReCathCo., LLC, CS132G, n.º de lote 20422) a través de la incisión dural y se introdujo rostralmente para que se colocase inmediatamente caudal a la laminectomía T9/T10. El catéter se fijó al hueso y al músculo con pegamento de cianoacrilato y suturas. Se insertaron las cuchillas de un fórceps de cubreobjetos modificado (anchura 4 mm x espesor 0,5 mm) en el canal espinal entre los aspectos laterales de la médula espinal y las vértebras en la laminectomía rostral. Se indujo una LME comprimiendo la médula espinal entre las cuchillas del fórceps durante un periodo de 15 segundos. El nivel de gravedad de la lesión se indujo utilizando un fórceps que comprime la médula espinal hasta una distancia de 0,3 mm (lesión moderada). La dura sobre la lesión permanece intacta. El fórceps se retiró, y el sitio de la lesión se enjuagó con disolución salina. Las capas de músculo subyacentes se suturaron entre sí, y la piel de la herida se cerró con grapas. En el postoperatorio, los animales recibieron una inyección en embolada inmediata de 5 ml de disolución salina de Ringer lactada, seguida de una segunda administración de 5 ml de disolución salina de Ringer lactada después de unas pocas horas.

Inmediatamente después de la cirugía y después cada día alterno durante 2 semanas, los animales se anestesiaron con isoflurano, y el agente experimental (condroitinasa ABC I) o el agente control (penicilinas), según se describe a continuación, se inyectó en el catéter intratecal. El volumen inyectado fue de 3 microlitros, seguido de un lavado de 4 microlitros de fluido cerebroespinal artificial.

Regímenes de tratamiento:

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

Análisis y resultados:

Las vejigas urinarias se exprimieron de forma manual al menos dos veces diarias y se registraron los volúmenes de orina. Los volúmenes de orina en todos los grupos fue de aproximadamente 2,7 mililitros durante los primeros 4 días después de la lesión. Los volúmenes de orina en el grupo tratado con penicilinas alcanzaron unos volúmenes máximos de 11 mililitros, volviendo a entre 6 y 8 mililitros diarios en aproximadamente 3 semanas después de la lesión. Los volúmenes de orina en el grupo tratado con condroitinasa alcanzaron unos volúmenes máximos diarios de 6 mililitros, volviendo a aproximadamente 2 mililitros en 3 semanas. Véase la figura 1 para observar una gráfica de la media de los volúmenes de orina residual del grupo con lesión moderada de las ratas tratadas con condroitinasa y penicilinas. Este sistema está aceptado en la técnica para la evaluación de la recuperación de la función autónoma después de una lesión en la médula espinal en ratas.

Estos resultados demuestran el uso potencial de una enzima condroitinasa para la recuperación de la función autónoma después de una lesión en la médula espinal. El modelo de lesión de la médula espinal y el sistema de

análisis conductual están aceptados en la técnica y se cree que son los más pertinentes con respecto a la mayoría de las lesiones de la médula espinal humana.

Ejemplo 2: Formulaciones de liberación sostenida de condroitinasa

5 El desarrollo de una tecnología de administración de la enzima condroitinasa de liberación sostenida permite administrar condroitinasa en cualquier momento después de un LME, durante un periodo determinado. Un sistema de liberación sostenida ideal para la condroitinasa es un sistema que no sólo proporciona la liberación prolongada del agente activo, sino que también es práctico para usar en el contexto de un LME. Como mínimo, el criterio de diseño incluye la biocompatibilidad del dispositivo en el SNC, el mantenimiento de la actividad catalítica de la condroitinasa, y una cinética de liberación de condroitinasa apropiada. Preferiblemente, el sistema esta en forma de una película delgada que se aplica en el sitio del LME, o un sistema polimerizable que se aplica al sitio, que se polimeriza tras ponerse en contacto con la médula espinal y después se mantiene fijo en su sitio a lo largo del desarrollo del periodo de tratamiento. El sistema es flexible, de forma que la introducción en el LME no produce un mayor traumatismo en forma de una compresión.

10 A lo largo de los últimos años, los avances en los sistemas de administración de fármacos biodegradables han producido una diversidad de candidatos de matriz viables. La selección de un sistema ideal depende de la evaluación de los atributos bioquímicos y prácticos. En general, estos sistemas capturan el agente activo en una matriz que se mantiene junta en una fase uniforme mediante la formación de enlaces covalentes, una matriz cristalina, una emulsión o una transición de fase. El material de matriz es un sistema biológico o un polímero sintético. Los ejemplos de los sistemas candidatos incluyen matrices biológicas, tales como pegamento de fibrina, colágeno y alginato, y los ejemplos de matrices sintéticas incluyen poli(ácido láctico)/poli(ácido glicólico), Pluronic y etileno-acetato de vinilo. Debe entenderse que las formulaciones de liberación sostenida de la presente no solo son adecuadas para su uso en el tratamiento de las lesiones de contusión del SNC, sino que también son adecuadas para el tratamiento de otras lesiones y trastornos del SNC.

15 Las enzimas Chase (condroitinasa) recombinantes desarrolladas pueden cargarse en una diversidad de matrices SR que incluyen, pero no se limitan a pegamento de fibrina, colágeno, alginato, poli(ácido láctico)/poli(ácido glicólico), Pluronic y etileno-acetato de vinilo. Pueden utilizarse polímeros naturales y sintéticos. Los polímeros sintéticos tienen la ventaja de tener una formulación precisa y unas propiedades de liberación predecibles, mientras que las preparaciones de polímeros naturales pueden tener mayor biocompatibilidad. Cada tipo de sistema de polímeros tiene propiedades exclusivas, y los métodos para generar geles o películas impregnadas con Chase para cada tipo se describen a continuación.

20 Geles de colágeno: El colágeno se ha utilizado como biomaterial en dispositivos médicos durante décadas debido a su facilidad de preparación y biocompatibilidad. El colágeno se encuentra en dispositivos médicos aprobados, tales como hemostatos, geles de potenciación de tejidos, sustitutos de injertos de hueso, sellantes y una diversidad de productos de curación de heridas. El colágeno utilizado para fines biomédicos generalmente es colágeno de tipo I fibrilar aislado a partir de tendones de bovino. Puede conformarse en una diversidad de formas, que incluyen geles, películas y fibras. Los geles de colágeno pueden formarse a partir de colágeno de tipo I de roedor. Los métodos para la formación de geles de colágeno se han utilizado de forma habitual durante muchos años. El colágeno en ácido diluido se combina con una disolución de Chase en un tampón a pH fisiológico. Cuando se neutraliza y se calienta, las fibrillas de colágeno de tipo I coalescen en matrices desordenadas para crear un gel. La densidad de reticulación de los geles resultantes puede controlarse variando la concentración de colágeno.

25 Pegamento de fibrina: El pegamento de fibrina es un producto derivado de la sangre que se ha empleado de modo clínico en Europa durante muchos años como hemostato o sellante. El pegamento de fibrina consiste en dos componentes que se combinan para formar un gel. El primer constituyente es fibrinógeno, que es la principal proteína implicada en la coagulación. El fibrinógeno se combina con trombina para recapitular la etapa final de la cascada de la coagulación. La trombina es una serina proteasa que actúa sobre el fibrinógeno para exponer los terminales reactivos que dirigen la polimerización del fibrinógeno para formar una red fibrosa denominada fibrina. Chase puede combinarse con la disolución de fibrinógeno y después polimerizarse mediante la adición de trombina.

30 Alginato: El alginato es un carbohidrato de peso molecular muy alto aislado a partir de quelpos marinos. Se emplea muy a menudo como aditivo en alimentos y cosméticos. Su seguridad y biocompatibilidad han propiciado su uso en productos de curación de heridas. También se emplea en preparaciones experimentales para la microencapsulación de células o islotes pancreáticos. El alginato es particularmente versátil, puesto que puede conformarse en una diversidad de formas mediante enlace iónico con cationes divalentes, tales como calcio. La densidad de reticulación puede controlarse mediante la concentración de calcio y alginato, y los geles resultantes son estables durante largos periodos de tiempo *in vivo*. Puede utilizarse una disolución de Chase y alginato para formar películas tras la adición de calcio.

35 PLA/PGA: Los polímeros o copolímeros de poli(ácido láctico) y poli(ácido glicólico) son poliésteres hidrolíticamente inestables utilizados en suturas y otros dispositivos médicos implantables biodegradables. Los PLA/PGA también se han utilizado para crear microcápsulas para el transporte de fármacos. Existen varios métodos disponibles para

crear sistemas de liberación sostenida con estos polímeros. Por ejemplo, puede utilizarse un sistema de intercambio de disolventes, en el que los polímeros de PLA/PGA se disuelven en n-metilpirrolidona.

5 **Pluronic:** Los Pluronic son polímeros hidrófilos que sufren una transición de fase inversa. Los disoluciones de Pluronic son líquidos viscosos a bajas temperaturas que después sufren una transición de fase de líquido a sólido cuando se desplazan a temperaturas más cálidas. Los Pluronic se han utilizado en una diversidad de aplicaciones biomédicas en las que resulta deseable inyectar o pulverizar un líquido sobre un tejido, solidificándose después el líquido para formar una película. Los Pluronic pueden disolverse en tampones acuosos que contengan Chase. Pueden crearse películas moldeando geles en placas de cultivo de tejidos que se calientan en un incubador para estimular la transición de fase inversa y la formación de la película.

10 **Etileno-acetato de vinilo:** El etileno-acetato de vinilo (EVA) es un compuesto representativo de los polímeros utilizados para fabricar implantes biocompatibles no degradables. El EVA es soluble en ciertos disolventes orgánicos, tales como cloruro de metileno. Puede añadirse Chase en un tampón acuoso a la disolución de EVA con agitación para crear una emulsión. Después, el disolvente orgánico puede evaporarse de la disolución, lo cual produce la formación de una matriz polimérica semicristalina impregnada con Chase. Este método puede utilizarse para fabricar una gama de densidades de reticulación.

Ejemplo comparativo 3: Formulaciones de liberación sostenida de condroitinasa ABC_{tipo I}

En un estudio se formuló la condroitinasa ABC_{tipo I} en tres matrices de liberación sostenida: Duraseal™ I (disponible en Confluent Surgical), Duraseal™ II (disponible en Confluent Surgical), y Spray Gel. Duraseal™ es un hidrogel potenciado. Spray Gel es una espuma de gel con una base de colágeno. La liberación se controló midiendo la actividad condroitinasa liberada desde las matrices a lo largo del tiempo. Los resultados se ilustran en la figura 2. Los resultados demuestran que la condroitinasa es liberada desde una matriz de liberación sostenida a lo largo del tiempo y que puede formularse en una formulación de liberación sostenida.

Ejemplo comparativo 4: La condroitinasa ABC_{tipo I} mejora la función neurológica después de una lesión de contusión en la médula espinal de roedores

25 Se completó un estudio del tratamiento con condroitinasa ABC_{tipo I} de una lesión de contusión en ratas en las instalaciones de Acorda Animal Modeling Facility. Los animales (n = 30) se sometieron a un modelo establecido de LME (Gruner *et al.*, 1996). Comenzando inmediatamente después de LME, diez animales fueron tratados con condroitinasa ABC I (Seikagaku, n.º de catálogo 100332, n.º de lote E02201) por vía intratecal (i.t.) con 0,06 unidades por rata por dosis en fluido cerebroespinal artificial, diariamente durante una semana y en días alternos durante una semana. Otros 10 animales recibieron proteína enzimática (penicilinas, Sigma, n.º de catálogo P4524) y otros diez animales recibieron un vehículo control (fluido cerebroespinal artificial, Harvard Apparatus, n.º de catálogo 59-7316). Los animales se evaluaron mediante un ensayo conductual en campo abierto durante un periodo de 12 a 16 semanas.

35 Los animales se indujeron y se mantuvieron en un estado de anestesia quirúrgica con isoflurano al 1,5% en una mezcla de aire de calidad médica (oxígeno al 95%, CO₂ al 5%). Se administró de modo preoperatorio una dosis inicial de baytril (25 mg/kg). Durante la cirugía, el animal se colocó sobre una almohadilla calefactora para ayudar a mantener la temperatura corporal, y se controló la velocidad de pulso, SpO₂ y la temperatura del animal. Se realizó una laminectomía de las vértebras espinales T9 y T10. Se realizó una laminectomía parcial en la unión T13/L1 para la colocación de un catéter intratecal. Se realizó una incisión en la dura con una aguja hipodérmica. Se insertó un catéter (Harvard Apparatus) a través de la incisión dural y se introdujo rostralmente para que se colocase inmediatamente caudal a la laminectomía T9/T10. El catéter se fijó al hueso y al músculo con pegamento de cianoacrilato y suturas. Se insertaron las cuchillas de un fórceps de cubreobjetos modificado (anchura 4 mm x espesor 0,5 mm) en el canal espinal entre los aspectos laterales de la médula espinal y las vertebras en la laminectomía rostral. Se indujo una LME comprimiendo la médula espinal entre las cuchillas del fórceps durante un periodo de 15 segundos. El fórceps se preparó para que comprima la médula espinal hasta una distancia de 0,9 mm. El fórceps se retiró, y el sitio de la lesión se enjuagó con disolución salina. Las capas de músculo subyacentes se suturaron entre sí, y la piel de la herida se cerró con grapas. En el postoperatorio, los animales recibieron una inyección en embolada inmediata de 5 ml de disolución salina de Ringer lactada, seguida de una segunda administración de 5 ml de disolución salina de Ringer lactada después de unas pocas horas.

50 Inmediatamente después de la cirugía y después cada día durante 1 semana y después en días alternos durante 1 semana, los animales se anestesiaron con isoflurano, y el agente experimental o control (condroitinasa ABC I, penicilinas o aCSF), según se describe a continuación, se inyectó en el catéter intratecal. El volumen inyectado fue de 6 microlitros, seguido de un lavado de 6 microlitros de fluido cerebroespinal artificial.

Regímenes de tratamiento:

- 55 1. Chase ABC I: condroitinasa ABC I (Seikagaku), 0,06 U/dosis, i.t. en 6 microlitros de aCSF.
2. Penicilinas: penicilinas (Sigma), 6 microlitros, i.t. a 124 microgramos por mililitro.

3. aCSF: fluido cerebroespinal artificial (Harvard Apparatus), 6 microlitros, i.t.

Análisis conductual:

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

Resultados:

10 Se produjo una tasa de mortalidad del 40% distribuida uniformemente a través de todos los grupos de tratamiento que fue debida a la cateterización y a acontecimientos adversos asociados con la gravedad de la lesión. Los animales que fueron tratados con penicilinas o aCSF recuperaron la función hasta una puntuación BBB media de aproximadamente 4 (n = 11). Los animales que se trataron con condroitinasa ABC I (n = 7) recuperaron la función locomotora hasta una puntuación BBB de aproximadamente 8. El grupo tratado con condroitinasa ABC I fue significativamente diferente de los otros grupos según ANOVA y análisis de Tukey post-hoc (p < 0,01). Véase la figura 3 que ilustra las puntuaciones BBB de ratas después de una lesión contusiva de la médula espinal con la administración de aCSF, penicilinas o condroitinasa ABC I.

20 Estos resultados demuestran el uso potencial de una enzima condroitinasa para el tratamiento de una lesión contusiva de la médula espinal. El modelo de lesión de la médula espinal y el sistema de análisis conductual están aceptados en la técnica y se cree que son los más pertinentes con respecto a la mayoría de las lesiones de la médula espinal humana. No es posible haber previsto estos resultados a partir de los resultados publicados de la condroitinasa *in vitro*, o a partir de los resultados de modelos de lesión de transección de la médula espinal.

Ejemplo comparativo 5: La condroitinasa ABC_{tipo I} mejora la función neurológica después de una lesión de contusión en la médula espinal de roedores

25 Se completó un estudio del tratamiento con condroitinasa ABC_{tipo I} de una lesión de contusión en ratas en las instalaciones de Acorda Animal Modeling Facility. Los animales (n = 38) se sometieron a un modelo establecido de LME (Gruner *et al.*, 1996). Comenzando inmediatamente después de LME, 19 animales fueron tratados con condroitinasa ABC I (Seikagaku, n.º de catálogo 100332, n.º de lote E02201) por vía intratecal (i.t.) con 0,06 unidades por rata por dosis en fluido cerebroespinal artificial, en días alternos durante dos semanas. Los otros 19 animales fueron tratados con proteína enzimática (penicilinas, Sigma, n.º de catálogo P4524) en vehículo. Los animales se evaluaron mediante un ensayo conductual en campo abierto durante un periodo de 10 semanas.

30 Los animales se indujeron y se mantuvieron en un estado de anestesia quirúrgica con isoflurano al 1,5% en una mezcla de aire de calidad médica (oxígeno al 95%, CO₂ al 5%). Se administró de modo preoperatorio una dosis inicial de cefazolina (50 mg/kg, por vía subcutánea). Durante la cirugía, el animal se colocó sobre una almohadilla calefactora para ayudar a mantener la temperatura corporal, y se controló la velocidad de pulso, SpO₂ y la temperatura del animal. Se realizó una laminectomía de las vértebras espinales T9 y T10. Se realizó una laminectomía parcial en la unión T13/L1 para la colocación de un catéter intratecal. Se realizó una incisión en la dura con una aguja hipodérmica. Se insertó un catéter de calibre 32 (ReCathCo., LLC, CS132G, n.º de lote 20422) a través de la incisión dural y se introdujo rostralmente para que se colocase inmediatamente caudal a la laminectomía T9/T10. El catéter se fijó al hueso y al músculo con pegamento de cianoacrilato y suturas. Se insertaron las cuchillas de un fórceps de cubreobjetos modificado (anchura 4 mm x espesor 0,5 mm) en el canal espinal entre los aspectos laterales de la médula espinal y las vertebras en la laminectomía rostral. Se indujo una LME comprimiendo la médula espinal entre las cuchillas del fórceps durante un periodo de 15 segundos. El nivel de gravedad de la lesión se indujo utilizando un fórceps que comprime la médula espinal hasta una distancia de 0,9 mm (lesión moderada). La dura sobre la lesión permanece intacta. El fórceps se retiró, y el sitio de la lesión se enjuagó con disolución salina. Las capas de músculo subyacentes se suturaron entre sí, y la piel de la herida se cerró con grapas. En el postoperatorio, los animales recibieron una inyección en embolada inmediata de 5 ml de disolución salina de Ringer lactada, seguida de una segunda administración de 5 ml de disolución salina de Ringer lactada después de unas pocas horas.

45 Inmediatamente después de la cirugía y después cada día alterno durante 2 semanas, los animales se anestesiaron con isoflurano, y el agente experimental (condroitinasa ABC I) o el agente control (penicilinas), según se describe a continuación, se inyectó en el catéter intratecal. El volumen inyectado fue de 3 microlitros, seguido de un lavado de 4 microlitros de fluido cerebroespinal artificial.

Regímenes de tratamiento:

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

Análisis conductual:

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

Resultados:

10 Se reclutaron 37 animales, 19 por cada grupo de tratamiento en la lesión con fórceps de 0,9 mm. La muerte de los animales fue aproximadamente igual entre todos los grupos de tratamiento. De los animales que murieron, más del 90% tenían infecciones del tracto urinario. Un animal con una lesión con fórceps de 0,9 mm tratado con penicilinas fue retirado de las puntuaciones puesto que no se recuperó por encima de una puntuación BBB de 3 o fue extremadamente errático. Otros 4 animales (2 tratados con penicilinas y 2 con condroitinas) fueron retirados debido a temblores y disquinesias. La retirada de estos animales redujo el número de animales en cada grupo de 0,9 mm a 12.

15 Fórceps a 0,9 mm (lesión moderada): Los animales que se trataron con el control de penicilinas recuperaron la función hasta una puntuación BBB de $7,1 \pm 0,36$ (media \pm MEE) ($n = 12$) a las diez semanas después de la lesión. La media de las puntuaciones BBB de los animales tratados con condroitinas ABC I ($n = 12$) fue significativamente mayor a las 10 semanas, con una puntuación media de $9,1 \pm 0,64$ ($p < 0,01$). Las puntuaciones de cada grupo después de alcanzar una meseta a las 4 semanas también fueron significativamente diferentes mediante ANOVA ($p < 0,001$). Véase la figura 4 que ilustra las puntuaciones BBB de los animales con condroitinas y control después de un LME contusivo moderado.

20 Se ha demostrado que la condroitinas mejora la función y estimula la regeneración en una hemisección dorsal y un un modelo de LME de compresión con fórceps grave. El presente estudio confirma los resultados del estudio de compresión con fórceps, así como demuestra que la condroitinas es eficaz para mejorar la función locomotora a unos niveles de lesión más moderados. El estudio de lesión moderada muestra un mejora significativa en la actividad locomotora en campo abierto con un tratamiento de condroitinas.

Ejemplo comparativo 6: Distribución y toxicidad aguda de condroitinas ABC_{tipo I}

30 Ratas Long Evans hembra de Charles River Laboratories, que pesan aproximadamente 210 gramos, se alojaron en las instalaciones de Acorda Animal Modeling Facility durante 5 días antes de la inyección para asegurarse de que estaban sanas y con un peso estabilizado. Las ratas se anestesiaron con isoflurano y se inyectaron por vía intravenosa en la vena de la cola con condroitinas ABC I de Acorda (ABC I, lote 3). Los animales se inyectaron con 0, 0,2, 0,775 o 7,775 mg/kg de disoluciones que contienen 0, 0,2, 0,775 o 7,775 mg/ml, respectivamente, en disolución salina equilibrada de Hank tal como se muestra en la tabla 1.

Animal	mg/kg	peso	dosis	volumen	supervivencia	fecha eutanasia
2	0	242	0	0,25	24	miér. 3/9/03
9	0	243	0	0,25	24	miér. 3/9/03
10	0	238	0	0,25	24	miér. 3/9/03
12	0	252	0	0,25	7 días	jueves 9/9/03
14	0	247	0	0,25	7 días	jueves 9/9/03
18	0	244	0	0,25	7 días	jueves 9/9/03
5	0,2	237	0,0474	0,275581	24	miér. 3/9/03
8	0,2	225	0,045	0,261628	24	miér. 3/9/03
11	0,2	237	0,0474	0,275581	24	miér. 3/9/03
13	0,2	235	0,047	0,273256	7 días	jueves 9/9/03
16	0,2	237	0,0474	0,275581	7 días	jueves 9/9/03
19	0,2	237	0,0474	0,275881	7 días	jueves 9/9/03
3	0,75	221	0,16575	0,221	24	miér. 3/9/03

ES 2 420 510 T3

Animal	mg/kg	peso	dosis	volumen	supervivencia	fecha eutanasia
4	0,75	223	0,16725	0,223	24	miér. 3/9/03
17	0,75	225	0,16875	0,225	24	miér. 3/9/03
20	0,75	223	0,16725	0,223	7 días	jueves 9/9/03
21	0,75	225	0,16675	0,225	7 días	jueves 9/9/03
24	0,75	225	0,16875	0,225	7 días	jueves 9/9/03
1	7,75	219	1,69726	0,219	24	miér. 3/9/03
6	7,75	218	1,6895	0,218	24	miér. 3/9/03
7	7,75	203	1,57325	0,203	24	miér. 3/9/03
15	7,75	212	1,643	0,212	7 días	jueves 9/9/03
22	7,75	216	1,674	0,216	7 días	jueves 9/9/03
23	7,75	218	1,6895	0,218	7 días	jueves 9/9/03

Los animales se devolvieron a sus jaulas y se controlaron para el dolor y la fatiga. Cada día fueron adquiriendo peso.

5 La mitad de los animales se sacrificaron a las 24 horas después de la inyección. Se retiró el cerebro, la médula espinal, el corazón, el hígado, los riñones y la sangre y se congelaron rápidamente en isopentano enfriado hasta -40 °C para la evaluación de la distribución enzimática y la histopatología. El resto de los animales se observaron durante 7 días y después se sacrificaron y se procesaron de la misma forma que el grupo de 24 horas de supervivencia.

10 El tejido se bloqueó y se criocortó en secciones de 20 µm. Las secciones se lavaron brevemente en disolución salina tamponada con fosfato 0,1 M (PBS) y después se fijaron durante 10 minutos en un fijador de etanol, formaldehído y ácido acético (al 66,4%, al 4% y al 5% en volumen, respectivamente). Los tejidos se lavaron y se bloquearon en una disolución de suero normal al 10% (que contenía suero de rata normal al 2% y suero de burro normal al 8%) en PBS 0,1 M, pH 7,4. Las secciones se incubaron durante la noche con un anticuerpo anti-condroitinasa ABC I (n.º 8429). El tejido se evaluó mediante inmunohistoquímica y análisis de la transferencia Western de homogeneizados de tejido con un anticuerpo anti-condroitinasa y un anticuerpo que reconoce los proteoglicanos de sulfato de condroitina digeridos.

Resultados:

20 No se observaron reacciones manifiestas durante la inyección o inmediatamente después. No se advirtió hinchamiento, inflamación, magulladuras ni necrosis en el sitio de la inyección. No se advirtieron alteraciones en la alimentación, el acicalamiento ni las vocalizaciones. Los animales se evaluaron para la conducta motora en una piscina abierta. Los cuidadores de los animales y los especialistas en conducta no advirtieron anomalías. Los animales no mostraron señales de dolor ni hinchamiento en las articulaciones.

25 Los animales se pesaron a diario antes y después de las inyecciones. La media de los cambios en el peso corporal se ilustra en la figura 5. No se observaron diferencias significativas en el cambio de peso entre los grupos de tratamiento. Todos los grupos perdieron entre 0 y 6,667 gramos en las 24 horas siguientes a la inyección. El grupo de control con vehículo perdió la mayor parte del peso en las 24 horas. Todos los grupos de tratamiento ganaron peso en cada día sucesivo.

Ejemplo comparativo 7: Toxicidad intratecal de una única dosis de condroitinasa ABC_{tipo I}

30 Se colocaron catéteres intratecales en 16 ratas hembra normales sin lesiones aproximadamente en la unión vertebral T13/L1 para la administración de condroitinasa. Los catéteres se introdujeron rostralmente para que se colocasen al nivel de T9/T10 para imitar los estudios previos con condroitinasa. Veinticuatro horas después de la colocación del catéter intratecal, los animales recibieron unas dosis de 0, 0,06, 0,6 o 6,0 unidades de condroitinasa ABCI de Acorda (100 unidades/miligramo) en 20 microlitros de fluido cerebroespinal artificial a lo largo de un periodo de 20 minutos. Estas dosis se eligieron a partir de 0, 1, 10 y 100 veces la dosis utilizada en los ejemplos 1, 4 y 5. Los animales se observaron durante 24 horas o 7 días y se controló su peso y temperatura.

35 No se observaron reacciones manifiestas en ninguna de las ratas. Tal como se ilustra en las figuras 6 y 7, no se advirtieron diferencias significativas en el peso o la temperatura entre los grupos, respectivamente. Parece que la

condroitinasa es segura en una única dosis intratecal (i.t.) de hasta 100 veces la dosis utilizada en estudios previos.

Ejemplo comparativo 8: Estudio de la toxicidad intratecal de dosis crecientes y repetidas de condroitinasa ABC_{tipo I}

5 Se colocaron catéteres intratecales en cinco ratas Long Evans hembra adultas. Las ratas se anestesiaron, los músculos se separaron de las vértebras y se realizó una pequeña laminectomía aproximadamente en la unión T13/L1. Se colocaron catéteres intratecales de 1,4 mm de longitud de modo que sus extremos llegan aproximadamente al nivel de T9/T10. Las ratas se anestesiaron con isoflurano y se dosificaron con vehículo (aCSF), dosis repetidas o crecientes de condroitinasa ABCI. Las dosis repetidas fueron de 0,6 unidades o 10 veces la dosis eficaz de los estudios previos. Las dosis crecientes fueron de 0,6, 1,2, 2,4, 4,8, 9,6 y 19,2 unidades. Las ratas se controlaron para determinar cambios en el peso y la temperatura, la toxicidad manifiesta y los cambios en la conducta.

15 Las ratas tratadas con dosis repetidas o crecientes de condroitinasa ABCI ganaron ligeramente más peso que las que recibieron vehículo. Los acontecimientos adversos se distribuyeron uniformemente entre las ratas con vehículo, con dosis repetidas y crecientes. Los acontecimientos adversos incluyen letargo y cola caída, y habitualmente aparecen en el día de la anestesia y la dosificación. En la figura 8 se muestra una gráfica de dispersión del cambio de peso, y en la figura 9 se muestra el cambio en la temperatura durante el régimen. En ambas figuras, se representan dos pesos diarios frente a la primera dosis. La programación de las dosis se indica con flechas.

Ejemplo 9: La condroitinasa aumenta la función neurológica en una lesión de contusión de la médula espinal crónica

20 Los individuos que presentan lesiones en el SNC recuperan cierto grado de función neurológica y después entran en una fase crónica de lesión en la que se produce una mejora limitada. Con la excepción de los ejemplos de la presente, todos los estudios con condroitinasa hasta la fecha se han realizado en animales inmediatamente después de las lesiones de transección de la médula espinal. En el ejemplo se emplea condroitinasa ABC_{tipo I}, condroitinasa ABC_{tipo II}, condroitinasa AC y condroitinasa B, o enzimas de mamífero con actividad de tipo condroitinasa, tales como Hyal 1, Hyal 2, Hyal 3 y Hyal 4, para tratar mamíferos en la fase crónica de una lesión después de una lesión de contusión del SNC. En este ejemplo, las ratas se someten a una lesión de contusión de la médula espinal y se les deja un periodo de recuperación de al menos 6 semanas. En esta etapa, todos los animales han alcanzado un valor de meseta para la locomoción en campo abierto, según se evalúa mediante el método de puntuación BBB descrito en el ejemplo 1. Los animales se trataron con condroitinasa ABC_{tipo I}, condroitinasa ABC_{tipo II}, condroitinasa AC y condroitinasa B, o con enzimas de mamífero con actividad de tipo condroitinasa, tales como Hyal 1, Hyal 2, Hyal 3 y Hyal 4.

Ejemplo 10: Clonación de condroitinasa AC de *Flavobacterium heparinium*

35 Se cultivó *Flavobacterium heparinium* (ATCC) en LB (caldo de cultivo Luria) a 25 °C durante 4 días. Las bacterias se sedimentaron mediante centrifugación, y el ADN genómico se aisló mediante el kit DNeasy Tissue (Qiagen). Se sintetizaron cebadores de PCR con un sitio de restricción *NdeI* en el extremo 5' y un sitio *BamHI* en el extremo 3' que tienen las secuencias 5'-CATATGCAGCAGACCGGTACTGCA-3' y 5'-GGATTCTCAGTGCTCTTTATTCT-3', respectivamente, para sintetizar la proteína madura. Se empleó un microgramo de ADN genómico en una reacción de PCR de 50 µl que contenía 10 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), 50 pmol de cada cebador directo e inverso, 1 mM de MgSO₄, y 5 unidades de ADN polimerasa *Tfi* (Promega). La reacción de PCR de inicio en caliente se inició mediante una desnaturalización a 95 °C durante 2 min, seguido de otro ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 30 sg, hibridación y extensión a 58 °C durante 8 min durante 30 ciclos. La extensión final se realizó a 72 °C durante 8 min antes de enfriar a 4 °C. El producto de la PCR de 2,0 kb se acopló al vector pCR 2.1 (kit de clonación TOPO, Invitrogen) y se transformó en células competentes OneShot (Invitrogen). El ADN plasmídico se aisló a partir de una serie de clones seleccionados mediante digestión con enzimas de restricción *EcoRI*, y se seleccionaron los clones positivos que tenían la inserción de 2,0 kb. La integridad del gen se confirma mediante secuenciación de ADN y muestra 100% de coincidencia con la secuencia publicada (Genbank n.º de registro U27583). La secuencia de nucleótidos de la condroitinasa AC es SEQ ID NO:1.

Ejemplo 11: Clonación de condroitinasa B de *Flavobacterium heparinium*

50 La condroitinasa B se clonó mediante el mismo método que en el ejemplo 2 utilizando cebadores con un sitio de restricción *NdeI* en el extremo 5' y un sitio *BamHI* en el extremo 3' que tienen las secuencias 5'-CATATGCAGGTTGTTGCTTCAAAT-3' y 5'-GGATCCTCAGTGCTCTTTATT-TCT-3', respectivamente, para sintetizar la proteína madura. Se empleó un microgramo del ADN genómico en una reacción de PCR de 50 µl que contenía 10 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), 50 pmol de cada cebador directo e inverso, 1 mM de MgSO₄, y 5 unidades de ADN polimerasa *Tfi* (Promega). La reacción de PCR de inicio en caliente se inició mediante una desnaturalización a 95 °C durante 2 min, seguido de un segundo ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 30 sg, hibridación y extensión a 58 °C durante 5 min durante 30 ciclos. La extensión final se realizó a 72 °C durante 8 min antes de enfriar a 4 °C. El producto de la PCR de 1,6 kb se acopló al vector pCR 2.1 (kit de clonación TOPO,

Invitrogen) y se transformó en células competentes OneShot (Invitrogen). El ADN plasmídico se aisló a partir de una serie de clones seleccionados mediante digestión con enzimas de restricción *EcoRI*, y se seleccionaron los clones positivos que tenían la inserción de 1,6 kb. La integridad del gen se confirma mediante secuenciación de ADN y muestra 100% de coincidencia con la secuencia publicada (Genbank n.º de registro U27584). La secuencia de nucleótidos de la condroitinasa B es SEQ ID NO:2.

Ejemplo de referencia 12: Clonación de la condroitinasa ABC_{tipo I}

Se aisló el ADN genómico de *Proteus vulgaris* utilizando el kit Dneasey Tissue (Qiagen). Se sintetizaron cebadores de PCR con un sitio de restricción *NdeI* en el extremo 5' y un sitio *BamHI* en el extremo 3' que tienen las secuencias 5'-CAT ATG GCC ACC AGC AAT CCT GCA TTT G-3'(F2) y 5'-GGA TCC TCA AGG GAG TGG CGA GAG-3'(R), respectivamente, para sintetizar la proteína madura (2). Los productos de la PCR de 3,0 kb se acoplaron en el vector pCR 2.1 (kit de clonación TOPO, Invitrogen) y se transformaron en células competentes DH5 α (Invitrogen). El ADN plasmídico se aisló a partir de una serie de clones seleccionados mediante digestión con la enzima de restricción *EcoRI*. La integridad del gen se confirma mediante secuenciación de ADN repetida y muestra 99,7% y 99,5% de coincidencia a nivel de nucleótidos y también de aminoácidos, cuando se compara con la secuencia publicada. La secuencia de nucleótidos de la condroitinasa ABCI es SEQ ID NO:3. La coincidencia de secuencia a nivel de aminoácidos es SEQ ID NO:4.

Ejemplo de referencia 13: Clonación de la condroitinasa ABC_{tipo II}

La condroitinasa ABC II se ha clonado a partir del ADN genómico de *P. vulgaris*. Se diseñaron cebadores directos e inversos que tienen las secuencias 5'-TTA CCC ACT CTG TCT CAT GAA GCT TTC-3' y 5'-TTA CTT AAC TAA ATT AAT AAC AGT AGG-3', respectivamente. Se aisló un único producto de PCT con un peso molecular de 3,0 kb después de 30 ciclos de amplificación del ADN genómico de *P. vulgaris*. El producto de la PCR se clonó en el vector pC2.1y se confirmó mediante digestión de restricción. La integridad del gen se confirmó mediante secuenciación de ADN repetida y muestra 99% de coincidencia con la secuencia publicada. La secuencia de nucleótidos de la condroitinasa ABCII es SEQ ID NO:5.

Las anteriores discrepancias a nivel de nucleótidos produce una coincidencia del 98,3% a nivel de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de la condroitinasa ABCII es SEQ ID NO:6.

Ejemplo 14: Las condroitinasas AC y B provocan el crecimiento de neuritas *in vitro*

Se ensayaron Chase AC y B para su capacidad de estimular el crecimiento de neuritas en un sustrato CSPG inhibidor. Una mezcla de CSPG (0,5 mg/ml, Chemicon) se roció sobre una placa de cultivo de tejidos revestida con poli-L-lisina. Se añadió Chase AC o B recombinante a la placa en medio sin suero a 0,5 o 0,1 mg/ml (respectivamente) durante 3 horas a 37 °C. Se cultivaron sobre el rociado neuronas corticales procedentes de embriones de día 18 de cachorros de rata. Se tomaron fotomicrografías de contacto de fase 48 horas después del cultivo, y las células se evaluaron para el crecimiento de neuritas. Tal como puede observarse en la figura 2, ambas enzimas AC y B clonadas estimularon el crecimiento de neuritas sobre el sustrato CSPG, cuando se compara con los controles no tratados. La estimulación de neuritas fue similar a la provocada por enzimas Chase disponibles en el mercado a concentraciones molares iguales.

Ejemplo 15: Una proteína de fusión de condroitinasa y péptido de transducción celular TAT

Se describe la proteína de fusión de TAT de condroitinasa adecuada para su uso en la presente en la solicitud de patente de EEUU en tramitación junto con la presente de propiedad de los solicitantes n.º [aún no ha sido asignado], presentada al mismo tiempo que la presente e incorporada en la presente como referencia. La proteína TAT del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) contiene un dominio de transducción de proteínas (PTD) que está implicado en la transducción del VIH hacia el interior de las células. El PTD contiene un dominio de 11 aminoácidos (péptido TAT) que es responsable de la actividad del PTD. El péptido TAT puede unirse a proteínas y facilitar la transducción de las proteínas hacia el interior de células. El mecanismo de transducción es independiente del peso molecular o de las propiedades químicas de las proteínas que se unen al péptido TAT. Por tanto, el péptido TAT proporciona un método para transportar cualquier proteína hacia el citoplasma celular. Los estudios *in vivo* demuestran que si una proteína de fusión que consiste en el péptido TAT unido a la enzima de 120 kd beta-galactosidasa (β -Gal) se inyecta en ratones, entonces se observa un sólido transporte de β -Gal hacia el interior de una amplia variedad de células. En particular, se observa β -Gal en el SNC. Sin el péptido TAT no se observa β -Gal en el SNC. Por tanto, las proteínas de fusión del péptido TAT atraviesan la barrera hematoencefálica y también son transducidas hacia el interior de células. El transporte a través de la barrera hematoencefálica normalmente está restringido a ciertas moléculas pequeñas hidrófobas y, en particular, a péptidos lipófilos de bajo peso molecular. El transporte de proteínas tan grandes como β -Gal no es posible sin una alteración sustancial de la barrera hematoencefálica, pero el péptido TAT facilita el transporte dejando intacta la barrera hematoencefálica.

La presente invención es una enzima condroitinasa funcionalmente unida al péptido TAT (TAT-Chase). La primera ventaja es que TAT-Chase atravesará la barrera hematoencefálica y, en ese emplazamiento, TAT-Chase puede utilizarse para tratar sistémicamente una lesión de la médula espinal y trastornos relacionados del SNC. La segunda

ventaja es que TAT-Chase será transducido hacia el interior de las células y, en ese emplazamiento, degrada las reservas de CSPG intracelular. Por tanto, TAT-Chase degrada los CSPG extracelulares e intracelulares.

Ejemplo 16: Células encapsuladas que liberan condroitinasa

5 Los genes que codifican condroitinasa AC, condroitinasa B, condroitinasa ABC_{tipo I}, condroitinasa ABC_{tipo II}, u otras
enzimas con actividad de tipo condroitinasa, tales como Hyal 1, Hyal 2, Hyal 3 y Hyal 4, se transfectan en una célula
de mamífero apropiada, tal como una línea CHO. Las células que expresan condroitinasa catalíticamente activa se
clonan y se expanden. La línea celular que expresa condroitinasa se encapsula utilizando sistemas poliméricos,
tales como poliacrilonitrilo-poli(cloruro de vinilo) (PAN-PVC), que permiten la difusión de nutrientes y gases pero
evitan la intrusión de células del hospedante. Cuando la cápsula se implanta, las líneas celulares productoras de
10 condroitinasa sobreviven y segregan continuamente condroitinas, aunque las células no sufren un rechazo
inmunológico porque están inmunoaisladas en la cápsula polimérica. La ventaja de este sistema es que, en lugar de
administrar condroitinasa a través de catéteres o bombas, la condroitinasa es segregada continuamente. Además,
cuando ya no se requiere tratamiento, la cápsula puede retirarse para finalizar el intervalo de tratamiento. Debe
entenderse que el sistema basado en células encapsuladas de la presente no sólo es adecuado para su uso en el
15 tratamiento de lesiones de contusión en el SNC, sino que también es adecuado para el tratamiento de otras lesiones
y trastornos del SNC.

Ejemplo 17: Mutantes de delección de condroitinasa que son biológicamente activos

Las condroitinasas AC y B producidas de modo recombinante han demostrado eficacia *in vitro* atravesando la
barrera de un frontera de sustrato inhibidor, tal como agregcano, y produciendo la extensión de neuritas para
20 neuronas corticales. Sin embargo, para facilitar un transporte eficaz de las anteriores enzimas hacia el sitio de la
lesión, se realizó un análisis de delección sistemática basado en las estructuras cristalinas disponibles para
determinar el tamaño mínimo de los polipéptidos capaces de degradar los CSPG. La actividad de ruptura de estos
mutantes se ha seleccionado *in vitro* mediante un ensayo zimográfico empleando agregcano como sustrato. Hasta la
fecha, se ha descubierto que un polipéptido truncado de la condroitinasa AC (n Δ 50-c Δ 275) que carece de 50 y 275
25 aminoácidos de los extremos amino- y carboxi-terminales, respectivamente, que tiene un peso molecular de 38 kDa,
comparado con los 75 kDa de la proteína de longitud completa, es el tamaño mínimo que conserva actividad, según
se ensaya en un ensayo de zimografía. Sin embargo, el mutante de delección de la condroitinasa AC (n Δ 120-c Δ 120)
que carece de 120 aminoácidos de cada uno de los extremos amino- y carboxi-terminales, que tiene un peso
molecular de 26 kDa, comparado con los 52 kDa de la proteína de longitud completa, también ha demostrado
30 conservar actividad en un ensayo de zimografía. Las enzimas truncadas purificadas de modo homogéneo se
caracterizarán *in vitro* y después se ensayarán *in vivo* en paralelo a las moléculas de longitud completa para evaluar
la potencia como producto terapéutico para lesiones de la médula espinal. Debe entenderse que los mutantes de
delección de la presente no sólo son adecuados para su uso en el tratamiento de una lesión de contusión en el SNC,
sino que también son adecuados para el tratamiento de otras lesiones y trastornos del SNC.

35 En la presente se han descrito e ilustrado realizaciones de la invención, junto con algunas de sus variaciones. Los
términos, las expresiones, las descripciones y las figuras empleadas en la presente se ofrecen sólo como ilustración
y no pretenden ser limitaciones. Los expertos en la técnica reconocerá que son posibles muchas variaciones dentro
del alcance de la invención, que pretende ser definida mediante las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes,
en las que todos los términos y las expresiones pretenden tener su sentido razonable más amplio posible, a menos
40 que se indique lo contrario.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Acorda Therapeutics, Inc.	
5	<120> Composiciones y métodos para el tratamiento de lesiones del SNC	
	<130> P 43718 EP 02	
	<140>	
10	<141> 17-05-2004	
	<160> 14	
	<170> PatentIn versión 3.3	
15	<210> 1	
	<211> 2037	
	<212> ADN	
	<213> Flavobacterium heparinum	
20	<400> 1	
	cagcagaccg gtactgcaga actgattatg aagcgggtga tgctggacct taaaaagcct	60
	ttgcgcaata tggataaggt ggcggaaaag aacctgaata cgctgcagcc tgacggtagc	120
	tggaaggatg tgccttataa agatgatgcc atgaccaatt ggttgccaaa caaccacctg	180
	ctacaattgg aaactattat acaggcttat attgaaaaag atagtacta ttatggcgac	240
	gataaagtgt ttgaccagat ttccaaagct ttaagtatt ggtatgacag cgacccgaaa	300
	agccgcaact ggtggcacia tgaaattgcc actccgcagg cccttgggtga aatgctgatc	360
	ctgatgctgt acggtaaaaa gccgcttgat gaagcattgg tgcataaatt gaccgaaaga	420
	atgaagcggg gcgaaccgga gaagaaaacg ggggccaaca aaacagatat cgccctgcat	480
	tacttttatc gtgctttgtt aacgtctgat gaggctttgc tttccttcgc cgtaaaagaa	540
	ttgttttatc ccgtacagtt tgtacactat gaggaaggcc tgcaatacga ttattcctac	600
	ctgcagcacg gtccgcaatt acagatatcg agctacggtg ccgtatttat taccggggta	660
	ctgaaacttg ccaattacgt tagggatacc ccttatgctt taagtaccga gaaactggct	720
	atattttcaa agtattaccg cgacagttat ctgaaagcta tccgtggaag ttatatggat	780
	tttaacgtag aaggccgcgg agtaagccgg ccagacattc taaataaaaa ggcagaaaaa	840
	aagaggttgc tggtggcgaa gatgatcgat cttaagcata ctgaagaatg ggctgatgcg	900
	atagccagga cagatagcac agttgcggcc ggctataaga ttgagcccta tcaccatcag	960
	ttctggaatg gtgattatgt gcaacattta agacctgcct attcttttaa tgttcgtatg	1020
	gtgagtaagc ggaccgcagc cagtgaatcc ggcaataaag aaaacctgct gggcaggtat	1080
	ttatctgatg gggctactaa catacaattg cgcggaccag aatactataa cattatgccg	1140
	gtatgggaat gggacaagat tcctggcata accagccgtg attatttaac cgacagacct	1200
	ttgacgaagc tttggggaga gcaggggagc aatgactttg caggaggggt gtctgatggt	1260
	gtatacgggg ccagtgcccta cgcattggat tacgatagct tacaggcaaa gaaagcctgg	1320
	ttcttttttg acaagagat tgtatgtctt ggtgccggtg tcaacagcaa tgcccctgaa	1380
	aacattacca ctacccttaa ccagagctgg ttaaattggcc cggttataag tactgcaggt	1440

ES 2 420 510 T3

aaaaccggcc ggggtaaaat aacaacgttt aaagcacagg gacagttctg gttgttgac 1500
 gatgcgattg gttattactt tcctgaaggg gccaacctta gtctgagtac ccagtcgcaa 1560
 aaaggcaatt ggttccacat caacaattca cattcaaaag atgaagtttc tggatgatga 1620
 tttaaacttt ggatcaacca tgggtccagg ccagaaaaatg cgagtatgac ttatatcgtt 1680
 ttgccgggaa taaacaagcc ggaagaaatt aaaaaatata atggaacggc accgaaagtc 1740
 cttgcccaata ccaaccagct gcaggcagtt tatcatcagc agttagatat ggtacaggct 1800
 atcttctata cagctggaaa attaagcgtg gcgggcgtag aaattgaaac agataagcca 1860
 tgtgcagtgc tgatcaagca catcaatggc aagcaggtaa tttgggctgc cgatccattg 1920
 caaaaagaaa agactgcagt gttgagcatc agggatttaa aacaggaaa aacaaatcgg 1980
 gtaaaaattg attttccgca acaggaattt gcaggtgcaa cggttgaact gaaatag 2037

<210> 2

<211> 1446

5 <212> ADN

<213> Flavobacterium heparinum

<400> 2

caggttgttg cttcaaatga aactttatac caggttgtaa aggaggtaaa acccgggtgtg 60
 ctggtacaga ttgccgatgg gacttataaa gatgttcagc tgattgtcag caattcagga 120
 aaatctggtt tgcccatcac tattaagcc ctgaaccggt gtaaggtttt tttaccgga 180
 gatgctaaag tagagctgag gggcgagcac ctgatactgg aaggcatctg gtttaaagac 240
 gggaaacagag ctattcaggc atggaaatca catggaccgg gattgggtggc tatatatggt 300
 agctataacc gcattaccgc atgtgtattt gattgttttg atgaagccaa ttctgcttac 360
 attactactt cgcttaccga agacggaaag gtacctcaac attgccgat agaccattgc 420
 agttttaccg ataagatcac ttttgaccag gtaattaacc tgaacaatac agccagagct 480
 attaaagacg gttcgggtgg aggaccgggg atgtaccatc gtgttgatca ctgttttttt 540
 tccaatccgc aaaaaccggg taatgccgga gggggaatca ggattggcta ttaccgtaat 600
 gatataggcc gttgtctggt agactctaac ctgtttatgc gtcaggattc ggaagcagag 660
 atcatcacca gcaaatcgca ggaaaatggt tattatggta atacttacct gaattgccag 720
 ggcaccatga actttcgtca cgggtgatcat cagggtggca ttaacaattt ttatataggc 780
 aatgaccagc gatttggata cgggggaatg tttgtttggg gaagcaggca tgtcatagcc 840
 tgtaattatt ttgagctgac cgaaaccata aagtcgaggg ggaacgccgc attgtattta 900
 aaccccggtg ctatggcttc ggagcatgct cttgctttcg atatgttgat agccaacaac 960
 gctttcatca atgtaaatgg gtatgccatc cattttaatc cattggatga gcgcagaaaa 1020
 gaatattgtg cagccaatag gcttaagttc gaaacccgc accagctaat gttaaaaggc 1080
 aatcttttct ttaaggataa accttatggt taccattttt ttaaagatga ttattttata 1140
 gcagggaaaa atagctggac tggtaatgta gccttaggtg tggaaaaggg aatccctggt 1200
 10 aacatttcgg ccaataggtc tgcctataag ccggtaaaaa ttaaagatat ccagcccata 1260
 gaaggaatcg ctcttgatct caatgcgctg atcagcaaag gcattacagg aaagcccctt 1320
 agctgggatg aagtaaggcc ctactgggta aaagaaatgc ccgggacgta tgctttaacg 1380
 gccaggcttt ctgcagatag ggctgcaaag tttaaagccg taattaaag aaataaagag 1440
 cactga 1446

<210> 3

15 <211> 2994

ES 2 420 510 T3

<212> ADN
 <213> Proteus vulgaris

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

<400> 3

10
 gccaccagca atcctgcatt tgatcctaaa aatctgatgc agtcagaaat ttaccatttt 60
 gcacaaaata acccattagc agacttctca tcagataaaa actcaatact aacgttatct 120
 gataaacgta gcattatggg aaaccaatct cttttatgga aatggaaagg tggtagtagc 180
 tttactttac ataaaaaact gattgtcccc accgataaag aagcatctaa agcatgggga 240
 cgctcatcca cccccgtttt ctcatthttg ctttacaatg aaaaaccgat tgatgggtat 300
 cttactatcg atttcggaga aaaactcatt tcaaccagtg aggctcaggc aggctttaa 360
 gtaaaattag atttcactgg ctggcgact gtgggagtct ctttaataa cgatcttgaa 420
 aatcgagaga tgaccttaa tgcaaccaat acctcctctg atggactca agacagcatt 480
 gggcgttctt taggtgctaa agtcgatagt attcgtttta aagcgccttc taatgtgagt 540
 cagggtgaaa tctatatcga ccgtattatg ttttctgctg atgatgctcg ctaccaatgg 600
 tctgattatc aagtaaaaac tcgcttatca gaacctgaaa ttcaatttca caacgtaaag 660
 ccacaactac ctgtaacacc tgaaaattta gcggccattg atcttattcg ccaacgtcta 720
 attaataaat ttgtcggagg tgaaaaagag acaaacctcg cattagaaga gaatatcagc 780
 aaattaaaaa gtgatttcga tgctcttaat actcacactt tagcaaatgg tggaacgcaa 840
 ggcagacatc tgatcactga taaacaaatc attatttatc aaccagagaa tcttaactct 900
 caagataaac aactatttga taattatggt attttaggta attacacgac attaatgttt 960
 aatattagcc gtgcttatgt gctggaaaaa gatcccacac aaaaggcgca actaaagcag 1020
 atgtacttat taatgacaaa gcatttatta gatcaaggct ttgttaaagg gagtgcttta 1080
 gtgacnacc atcactgggg atacagttct cgttggtggt atatttccac gttattaatg 1140
 tctgatgcac taaaagaagc gaacctacaa actcaagttt atgattcatt actgtggtat 1200
 tcacgtgagt ttaaaagtag ttttgatag aaagtaagtg ctgatagctc tgatctagat 1260
 tatttcaata cttatctcg ccaacattta gccttattac tactagagcc tgatgatcaa 1320
 aagcgtatca acttagttaa tactttcagc cattatatca ctggcgcat aacgcaagt 1380
 ccaccgggtg gtaaagatgg tttacgccct gatggtacag catggcgaca tgaaggcaac 1440

ES 2 420 510 T3

tatccgggct actctttccc agcctttaa aatgcctctc agcttattta tttattacgc 1500
gataccat tttcagtggg tgaaagtggg tggaaatagcc tgaaaaaagc gatggtttca 1560
gcgtggatct acagtaatcc agaagtggg ttaaccgcttg caggaagaca ccctcttaac 1620
tcaccttcgt taaaatcagt cgctcaaggc tattactggc ttgccatgtc tgcaaatca 1680
tcgcctgata aaacacttgc atctatttat cttgcgatta gtgataaaac acaaaatgaa 1740
tcaactgcta tttttggaga aactattaca ccagcgtctt tacctcaagg tttctatgcc 1800
tttaatggcg gtgcttttgg tattcatcgt tggcaagata aaatgggtgac actgaaagct 1860
tataacacca atgtttggc atctgaaatt tataacaaag ataaccgtta tggccgttac 1920
caaagtcatg gtgtcgtca aatagtgagt aatggctcgc agctttcaca gggctatcag 1980
caagaaggtt gggattggaa tagaatgcca ggggcaacca ctatccacct tcctcttaaa 2040
gacttagaca gtcctaaacc tcatacctta atgcaacgtg gagagcgtgg atttagcggg 2100
acatcatccc ttgaaggcca atatggcatg atggcattcg atcttattta tcccgccaat 2160
cttgagcgtt ttgatcctaa tttactgcg aaaaagagtg tattagccgc tgataatcac 2220
ttaattttta ttggtagcaa tataaatagt agtgataaaa ataaaaatgt tgaaacgacc 2280
ttattccaac atgccattac tccaacatta aatacccttt ggattaatgg acaaaagata 2340
gaaaacatgc cttatcaaac aacacttcaa caagggtgatt ggtaattga tagcaatggc 2400
aatggttact taattactca agcagaaaaa gtaaattgaa gtcgccaaca tcaggtttca 2460
gcggaataa aaaatcgcca accgacagaa gaaacttta gctcggcatg gatcgatcac 2520
agcactcgcc ccaaagatgc cagttatgag tatatggtct ttttagatgc gacacctgaa 2580
aaaatgggag agatggcaca aaaattccgt gaaataatg ggttatatca ggttcttcgt 2640
aaggataaag acgttcatat tattctcgat aaactcagca atgtaacggg atatgccttt 2700
tatcagccag catcaattga agacaaatgg atcaaaaagg ttaataaacc tgcaattgtg 2760
atgactcatc gacaaaaaga cactcttatt gtcagtgcag ttacacctga tttaaatatg 2820
actcgccaaa aagcagcaac tcctgtcacc atcaatgtca cgattaatgg caaatggcaa 2880
tctgctgata aaaatagtgag agtgaaatat caggtttctg gtgataaacac tgaactgacg 2940
tttacgagtt actttggtat tccacaagaa atcaaaactct cgccactccc ttga 2994

<210> 4
<211> 997
5 <212> PRT
<213> Proteus vulgaris

<400> 4

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

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

10 Lys Asn Ser Ile Leu Thr Leu Ser Asp Lys Arg Ser Ile Met Gly Asn

ES 2 420 510 T3

	35.					40						45			
Gln	Ser	Leu	Leu	Trp	Lys	Trp	Lys	Gly	Gly	Ser	Ser	Phe	Thr	Leu	His
	50					55					60				
Lys	Lys	Leu	Ile	Val	Pro	Thr	Asp	Lys	Glu	Ala	Ser	Lys	Ala	Trp	Gly
65					70					75					80
Arg	Ser	Ser	Thr	Pro	Val	Phe	Ser	Phe	Trp	Leu	Tyr	Asn	Glu	Lys	Pro
				85					90					95	
Ile	Asp	Gly	Tyr	Leu	Thr	Ile	Asp	Phe	Gly	Glu	Lys	Leu	Ile	Ser	Thr
			100					105					110		
Ser	Glu	Ala	Gln	Ala	Gly	Phe	Lys	Val	Lys	Leu	Asp	Phe	Thr	Gly	Trp
		115					120					125			
Arg	Thr	Val	Gly	Val	Ser	Leu	Asn	Asn	Asp	Leu	Glu	Asn	Arg	Glu	Met
	130					135					140				
Thr	Leu	Asn	Ala	Thr	Asn	Thr	Ser	Ser	Asp	Gly	Thr	Gln	Asp	Ser	Ile
145					150					155					160
Gly	Arg	Ser	Leu	Gly	Ala	Lys	Val	Asp	Ser	Ile	Arg	Phe	Lys	Ala	Pro
				165					170					175	
Ser	Asn	Val	Ser	Gln	Gly	Glu	Ile	Tyr	Ile	Asp	Arg	Ile	Met	Phe	Ser
			180					185					190		
Val	Asp	Asp	Ala	Arg	Tyr	Gln	Trp	Ser	Asp	Tyr	Gln	Val	Lys	Thr	Arg
		195					200					205			
Leu	Ser	Glu	Pro	Glu	Ile	Gln	Phe	His	Asn	Val	Lys	Pro	Gln	Leu	Pro
	210					215					220				
Val	Thr	Pro	Glu	Asn	Leu	Ala	Ala	Ile	Asp	Leu	Ile	Arg	Gln	Arg	Leu
225					230					235					240
Ile	Asn	Glu	Phe	Val	Gly	Gly	Glu	Lys	Glu	Thr	Asn	Leu	Ala	Leu	Glu
				245					250					255	
Glu	Asn	Ile	Ser	Lys	Leu	Lys	Ser	Asp	Phe	Asp	Ala	Leu	Asn	Thr	His
			260					265					270		
Thr	Leu	Ala	Asn	Gly	Gly	Thr	Gln	Gly	Arg	His	Leu	Ile	Thr	Asp	Lys
		275					280					285			
Gln	Ile	Ile	Ile	Tyr	Gln	Pro	Glu	Asn	Leu	Asn	Ser	Gln	Asp	Lys	Gln
	290					295					300				
Leu	Phe	Asp	Asn	Tyr	Val	Ile	Leu	Gly	Asn	Tyr	Thr	Thr	Leu	Met	Phe
305					310					315					320

ES 2 420 510 T3

Asn Ile Ser Arg Ala Tyr Val Leu Glu Lys Asp Pro Thr Gln Lys Ala
 325 330 335
 Gln Leu Lys Gln Met Tyr Leu Leu Met Thr Lys His Leu Leu Asp Gln
 340 345 350
 Gly Phe Val Lys Gly Ser Ala Leu Val Thr Thr His His Trp Gly Tyr
 355 360 365
 Ser Ser Arg Trp Trp Tyr Ile Ser Thr Leu Leu Met Ser Asp Ala Leu
 370 375 380
 Lys Glu Ala Asn Leu Gln Thr Gln Val Tyr Asp Ser Leu Leu Trp Tyr
 385 390 395 400
 Ser Arg Glu Phe Lys Ser Ser Phe Asp Met Lys Val Ser Ala Asp Ser
 405 410 415
 Ser Asp Leu Asp Tyr Phe Asn Thr Leu Ser Arg Gln His Leu Ala Leu
 420 425 430
 Leu Leu Leu Glu Pro Asp Asp Gln Lys Arg Ile Asn Leu Val Asn Thr
 435 440 445
 Phe Ser His Tyr Ile Thr Gly Ala Leu Thr Gln Val Pro Pro Gly Gly
 450 455 460
 Lys Asp Gly Leu Arg Pro Asp Gly Thr Ala Trp Arg His Glu Gly Asn
 465 470 475 480
 Tyr Pro Gly Tyr Ser Phe Pro Ala Phe Lys Asn Ala Ser Gln Leu Ile
 485 490 495
 Tyr Leu Leu Arg Asp Thr Pro Phe Ser Val Gly Glu Ser Gly Trp Asn
 500 505 510
 Ser Leu Lys Lys Ala Met Val Ser Ala Trp Ile Tyr Ser Asn Pro Glu
 515 520 525
 Val Gly Leu Pro Leu Ala Gly Arg His Pro Leu Asn Ser Pro Ser Leu
 530 535 540
 Lys Ser Val Ala Gln Gly Tyr Tyr Trp Leu Ala Met Ser Ala Lys Ser
 545 550 555 560
 Ser Pro Asp Lys Thr Leu Ala Ser Ile Tyr Leu Ala Ile Ser Asp Lys
 565 570 575
 Thr Gln Asn Glu Ser Thr Ala Ile Phe Gly Glu Thr Ile Thr Pro Ala
 580 585 590

ES 2 420 510 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Met Gln Arg Gly Glu Arg Gly Phe Ser Gly Thr Ser Ser Leu
 690 695 700

Glu Gly Gln Tyr Gly Met Met Ala Phe Asp Leu Ile Tyr Pro Ala Asn
 705 710 715 720

Leu Glu Arg Phe Asp Pro Asn Phe Thr Ala Lys Lys Ser Val Leu Ala
 725 730 735

Ala Asp Asn His Leu Ile Phe Ile Gly Ser Asn Ile Asn Ser Ser Asp
 740 745 750

Lys Asn Lys Asn Val Glu Thr Thr Leu Phe Gln His Ala Ile Thr Pro
 755 760 765

Thr Leu Asn Thr Leu Trp Ile Asn Gly Gln Lys Ile Glu Asn Met Pro
 770 775 780

Tyr Gln Thr Thr Leu Gln Gln Gly Asp Trp Leu Ile Asp Ser Asn Gly
 785 790 795 800

Asn Gly Tyr Leu Ile Thr Gln Ala Glu Lys Val Asn Val Ser Arg Gln
 805 810 815

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

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

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

ES 2 420 510 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Pro Leu Pro
995

- <210> 5
- <211> 2973
- 5 <212> ADN
- <213> Proteus vulgaris

<400> 5

```

ttaccactc tgtctcatga agctttcggc gatatttattc tttttgaagg cgaattaccc      60
aatatcctta ccacttcaaa taataatcaa ttatcgctaa gcaaacagca tgctaaagat      120
ggatgaacaat cactcaaatg gcaatatcaa ccacaagcaa cattaacact aaataatatt      180
gttaattacc aagatgataa aaatacagcc acaccactca cttttatgat gtggatttat      240
aatgaaaaac ctcaatcttc cccattaacg ttagcattta aacaaaataa taaaattgca      300
ctaagtttta atgctgaact taattttacg ggggtggcgag gtattgctgt tccttttcgt      360
gatatgcaag gctctgcgac aggtcaactt gatcaattag tgatcaccgc tccaaaccaa      420
gccggaacac tcttttttga tcaaatcatc atgagtgtac cgttagacaa tcggtgggca      480
gtacctgact atcaaacacc ttacgtaaat aacgcagtaa acacgatggt tagtaaaaac      540
tggagtgcac tattgatgta cgatcagatg tttcaagccc attaccctac tttaaacttc      600
gatactgaat ttcgcatgta ccaaacagaa atggcttcga tttatcagcg ctttgaatat      660
tatcaaggaa ttcgtagtga taaaaaatt actccagata tgctagataa acatttagcg      720
ttatgggaaa aattggggtt aacacaacac gctgatggct caatcacagg aaaagccctt      780
gatcacctca accggcaaca ttttatgaaa gtcgaagggtg tatttagtga ggggactcaa      840
    
```

ES 2 420 510 T3

aaagcattac ttgatgccaa tatgctaaga gatgtgggca aaacgcttct tcaaactgct 900
 atttacttgc gtagcgattc attatcagca actggtagaa aaaaattaga agagcgctat 960
 ttattaghta ctcgttatgt ccttgaacaa ggttttacac gaggaagtgg ttatcaaatt 1020
 attactcatg ttggttacca aaccagagaa ctttttgatg catggtttat tggccgctat 1080
 gttcttgcaa aaaataacct tttagcccc actcaacaag ctatgatgtg gtacaacgcc 1140
 acaggacgta tttttgaaaa agataatgaa attggtgatg caaatgtcga tattctcaat 1200
 actcaattgc aatggatgat aaaaagctta ttgatgctac cggattatca acaacgtaa 1260
 caagccttag cgcaactgca aagttggcta aataaaacca ttctaagctc aaaagggttt 1320
 gctggcggtt tcaaatctga tggttctatt tttcaccatt cacaacatta ccccgcttat 1380
 gctaaagatg catttggtgg tttagcacc agtggttatg cattaagtga ttcacctttt 1440
 cgcttatcta cttcagcaca tgagcattta aaagatggtt tgtaaaaaat gcggatctac 1500
 accaaagaga cacaaattcc tgtggtatta agtggtcgtc atccaactgg gttgcataaa 1560
 atagggatcg cgccatttaa atggatggca ttagcaggaa ccccagatgg caaacaaaag 1620
 ttagatacca cattatccgc cgcttatgca aacttagaca acaaacgca ttttgaaggc 1680
 attaacgctg aaagtgagcc agtcggcgca tgggcaatga attatgcatc aatggcaata 1740
 caacgaagag catcgaccca atcaccacaa caaagctggc tcgccatagc gcgcggtttt 1800
 agccgttatc ttggtggtaa tgaaagctat gaaaataaca accgttatgg tcgttattta 1860
 caatattggac aattggaaat tattccagct gatttaactc aatcagggtt tagccatgct 1920
 ggatgggatt ggaatagata tccaggtaca acaactattc atcttccta taacgaactt 1980
 gaagcaaac ttaatcaatt acctgctgca ggtattgaag aaatggtgct ttcaacagaa 2040
 agttactctg gtgcaaac ccttaataat aacagtatgt ttgccatgaa attacacggg 2100
 cacagtaaat atcaacaaca aagcttaagg gcaataaat cctatttctt atttgataat 2160
 agagttattg ctttaggctc aggtattgaa aatgatgata aacaacatac gaccgaaaca 2220
 acactattcc agtttgccgt ccctaaatta cagtcagtga tcattaatgg caaaaaggta 2280
 aatcaattag atactcaatt aactttaaat aatgcagata cattaattga tcctgccggc 2340
 aatttatata agctcactaa aggacaaact gtaaaattta gttatcaaaa acaacattca 2400
 cttgatgata gaaattcaaa accaacagaa caattatttg caacagctgt tatttctcat 2460
 ggtaaggcac cgagtaatga aaattatgaa tatgcaatag ctatcgaagc acaaaataat 2520
 aaagctcca aatacacagt attacaacat aatgatcagc tccatgcggg aaaagataaa 2580
 ataaccaag aagagggata tggttttttt gaagccacta agttaaatac agcggatgca 2640
 acattattat ccagtgatgc gccggttatg gtcattgcta aaatacaaaa tcagcaatta 2700
 acattaagta ttgtaatcc tgatttaaat ttatatcaag gtagagaaaa agatcaattt 2760
 gatgataaag gtaatcaaat cgaagttagt gtttattctc gtcattggct tacagcagaa 2820
 tcgcaatcaa caaatagtac tattaccgta aaaggaatat ggaaattaac gacacctcaa 2880
 cccggtgtta ttattaagca ccacaataac aacctctta ttacgacaac aaccatacag 2940
 gcaacaccta ctgttattaa tttagttaag taa 2973

5 <210> 6
 <211> 990
 <212> PRT
 <213> Proteus vulgaris

10 <400> 6

ES 2 420 510 T3

Leu Pro Thr Leu Ser His Glu Ala Phe Gly Asp Ile Tyr Leu Phe Glu
 1 5 10 15
 Gly Glu Leu Pro Asn Ile Leu Thr Thr Ser Asn Asn Asn Gln Leu Ser
 20 25 30
 Leu Ser Lys Gln His Ala Lys Asp Gly Glu Gln Ser Leu Lys Trp Gln
 35 40 45
 Tyr Gln Pro Gln Ala Thr Leu Thr Leu Asn Asn Ile Val Asn Tyr Gln
 50 55 60
 Asp Asp Lys Asn Thr Ala Thr Pro Leu Thr Phe Met Met Trp Ile Tyr
 65 70 75 80
 Asn Glu Lys Pro Gln Ser Ser Pro Leu Thr Leu Ala Phe Lys Gln Asn
 85 90 95
 Asn Lys Ile Ala Leu Ser Phe Asn Ala Glu Leu Asn Phe Thr Gly Trp
 100 105 110
 Arg Gly Ile Ala Val Pro Phe Arg Asp Met Gln Gly Ser Ala Thr Gly
 115 120 125
 Gln Leu Asp Gln Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gln Ala Gly Thr Leu
 130 135 140
 Phe Phe Asp Gln Ile Ile Met Ser Val Pro Leu Asp Asn Arg Trp Ala
 145 150 155 160
 Val Pro Asp Tyr Gln Thr Pro Tyr Val Asn Asn Ala Val Asn Thr Met
 165 170 175
 Val Ser Lys Asn Trp Ser Ala Leu Leu Met Tyr Asp Gln Met Phe Gln
 180 185 190
 Ala His Tyr Pro Thr Leu Asn Phe Asp Thr Glu Phe Arg Asp Asp Gln
 195 200 205
 Thr Glu Met Ala Ser Ile Tyr Gln Arg Phe Glu Tyr Tyr Gln Gly Ile
 210 215 220
 Arg Ser Asp Lys Lys Ile Thr Pro Asp Met Leu Asp Lys His Leu Ala

ES 2 420 510 T3

```

225                230                235                240
Leu Trp Glu Lys Leu Gly Leu Thr Gln His Ala Asp Gly Ser Ile Thr
      245
Gly Lys Ala Leu Asp His Pro Asn Arg Gln His Phe Met Lys Val Glu
      260
Gly Val Phe Ser Glu Gly Thr Gln Lys Ala Leu Leu Asp Ala Asn Met
      275
Leu Arg Asp Val Gly Lys Thr Leu Leu Gln Thr Ala Ile Tyr Leu Arg
      290
Ser Asp Ser Leu Ser Ala Thr Gly Arg Lys Lys Leu Glu Glu Arg Tyr
      305
Leu Leu Gly Thr Arg Tyr Val Leu Glu Gln Gly Phe Thr Arg Gly Ser
      325
Gly Tyr Gln Ile Ile Thr His Val Gly Tyr Gln Thr Arg Glu Leu Phe
      340
Asp Ala Trp Phe Ile Gly Arg His Val Leu Ala Lys Asn Asn Leu Leu
      355
Ala Pro Thr Gln Gln Ala Met Met Trp Tyr Asn Ala Thr Gly Arg Ile
      370
Phe Glu Lys Asp Asn Glu Ile Val Asp Ala Asn Val Asp Ile Leu Asn
      385
Thr Gln Leu Gln Trp Met Ile Lys Ser Leu Leu Met Leu Pro Asp Tyr
      405
Gln Gln Arg Gln Gln Ala Leu Ala Gln Leu Gln Ser Trp Leu Asn Lys
      420
Thr Ile Leu Ser Ser Lys Gly Val Ala Gly Gly Phe Lys Ser Asp Gly
      435
Ser Ile Phe His His Ser Gln His Tyr Pro Ala Tyr Ala Lys Asp Ala
      450
Phe Gly Gly Leu Ala Pro Ser Val Tyr Ala Leu Ser Asp Ser Pro Phe
      465
Arg Leu Ser Thr Ser Ala His Glu His Leu Lys Asp Val Leu Leu Lys
      485
Met Arg Ile Tyr Thr Lys Glu Thr Gln Ile Pro Val Val Leu Ser Gly
      500

```

ES 2 420 510 T3

Arg His Pro Thr Gly Leu His Lys Ile Gly Ile Ala Pro Phe Lys Trp
 515 520 525
 Met Ala Leu Ala Gly Thr Pro Asp Gly Lys Gln Lys Leu Asp Thr Thr
 530 535 540
 Leu Ser Ala Ala Tyr Ala Asn Leu Asp Asn Lys Thr His Phe Glu Gly
 545 550 555 560
 Ile Asn Ala Glu Ser Glu Pro Val Gly Ala Trp Ala Met Asn Tyr Ala
 565 570 575
 Ser Met Ala Ile Gln Arg Arg Ala Ser Thr Gln Ser Pro Gln Gln Ser
 580 585 590
 Trp Leu Ala Ile Ala Arg Gly Phe Ser Arg Tyr Leu Val Gly Asn Glu
 595 600 605
 Ser Tyr Glu Asn Asn Asn Arg Tyr Gly Arg Tyr Leu Gln Tyr Gly Gln
 610 615 620
 Leu Glu Ile Ile Pro Ala Asp Leu Thr Gln Ser Gly Phe Ser His Ala
 625 630 635 640
 Gly Trp Asp Trp Asn Arg Tyr Pro Gly Thr Thr Thr Ile His Leu Pro
 645 650 655
 Tyr Asn Glu Leu Glu Ala Lys Leu Asn Gln Leu Pro Ala Ala Gly Ile
 660 665 670
 Glu Glu Met Leu Leu Ser Thr Glu Ser Tyr Ser Gly Ala Asn Thr Leu
 675 680 685
 Asn Asn Asn Ser Met Phe Ala Met Lys Leu His Gly His Ser Lys Tyr
 690 695 700
 Gln Gln Gln Ser Leu Arg Ala Asn Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Asp Asn
 705 710 715 720
 Arg Val Ile Ala Leu Gly Ser Gly Ile Glu Asn Asp Asp Lys Gln His
 725 730 735
 Thr Thr Glu Thr Thr Leu Phe Gln Phe Ala Val Pro Lys Leu Gln Ser
 740 745 750
 Val Ile Ile Asn Gly Lys Lys Val Asn Gln Leu Asp Thr Gln Leu Thr
 755 760 765
 Leu Asn Asn Ala Asp Thr Leu Ile Asp Pro Ala Gly Asn Leu Tyr Lys
 770 775 780

ES 2 420 510 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7
 <211> 24
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> cebador directo utilizado para clonar condroitinasa AC a partir de Flavobacterium heparinum
 <400> 7

catatgcagc agaccggtac tgca 24

15 <210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador inverso utilizado para clonar condroitinasa AC a partir de Flavobacterium heparinum
 <400> 8

ES 2 420 510 T3

	ggattctcag tgctctttat ttct	24
5	<210> 9 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador directo utilizado para clonar condroitinasa B a partir de Flavobacterium heparinium	
	<400> 9	
15	catatgcagg ttgttgcttc aaat	24
20	<210> 10 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador inverso utilizado para clonar condroitinasa B a partir de Flavobacterium heparinium	
	<400> 10	
25	ggatcctcag tgctctttat ttct	24
30	<210> 11 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> cebador directo utilizado para clonar condroitinasa ABC _{Tipo I} a partir de Proteus vulgaris	
	<400> 11	
40	catatggcca ccagcaatcc tgcatttg	28
45	<210> 12 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador inverso utilizado para clonar condroitinasa ABC _{Tipo I} a partir de Proteus vulgaris	
	<400> 12	
50	ggatcctcaa gggagtggcg agag	24
55	<210> 13 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador directo utilizado para clonar condroitinasa ABC _{Tipo II} a partir de Proteus vulgaris	
60	<400> 13	
	ttaccactc tgtctcatga agctttc	27
65	<210> 14 <211> 27 <212> ADN	

ES 2 420 510 T3

<213> Artificial

<220>

<223> cebador inverso utilizado para clonar condroitinasa ABC_{Tipo II} a partir de Proteus vulgaris

5

<400> 14

ttacttaact aaattaataa cagtagg

27

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una enzima que degrada glicosaminoglicanos seleccionada de condroitinasa AC, condroitinasa B, hialuronidasa 1, hialuronidasa 2, hialuronidasa 3, hialuronidasa 4 y sus combinaciones, para su uso en el tratamiento de una lesión de contusión en el sistema nervioso central para mejorar la recuperación funcional, administrándose dicha enzima en una cantidad terapéuticamente eficaz.
- 2.- La enzima para su uso en el tratamiento de una lesión de contusión en el sistema nervioso central para mejorar la recuperación funcional según la reivindicación 1, en la que la cantidad terapéuticamente eficaz de la enzima que degrada glicosaminoglicanos comprende una cantidad suficiente para degradar proteoglicanos de sulfato de condroitina.
- 10 3.- La enzima para su uso en el tratamiento de una lesión de contusión en el sistema nervioso central para mejorar la recuperación funcional según la reivindicación 1, en la que la recuperación funcional es de una función autónoma neurológica.
- 15 4.- La enzima para su uso en el tratamiento de una lesión de contusión en el sistema nervioso central para mejorar la recuperación funcional según la reivindicación 2, en la que la degradación de los proteoglicanos de sulfato de condroitina se produce en el sitio de la lesión del sistema nervioso central.
- 5.- La enzima para su uso en el tratamiento de una lesión de contusión en el sistema nervioso central para mejorar la recuperación funcional según la reivindicación 1, en la que la cantidad terapéuticamente eficaz de la enzima que degrada glicosaminoglicanos comprende una cantidad suficiente para mejorar la función motora, la función sensorial, la función autónoma o sus combinaciones.
- 20 6.- La enzima para su uso en el tratamiento de una lesión de contusión en el sistema nervioso central para mejorar la recuperación funcional según la reivindicación 1, en la que la lesión de contusión comprende una lesión cerebral traumática.
- 7.- La enzima para su uso en el tratamiento de una lesión de contusión en el sistema nervioso central para mejorar la recuperación funcional según la reivindicación 1, en la que la lesión de contusión comprende una lesión de la médula espinal.
- 25 8.- La enzima para su uso en el tratamiento de una lesión de contusión en el sistema nervioso central para mejorar la recuperación funcional según la reivindicación 7, en la que la lesión de la médula espinal comprende una lesión de fuerza roma en la médula espinal.
- 30 9.- La enzima para su uso en el tratamiento de una lesión de contusión en el sistema nervioso central para mejorar la recuperación funcional según la reivindicación 7, en la que se mantiene la morfología general de la médula espinal.
- 35 10.- La enzima para su uso en el tratamiento de una lesión de contusión en el sistema nervioso central para mejorar la recuperación funcional según la reivindicación 7, en la que la lesión de la médula espinal comprende una lesión que provoca un trastorno seleccionado del grupo que consiste en monoplejía, diplejía, paraplejía, hemiplejía y cuadriplejía.
- 11.- La enzima para su uso en el tratamiento de una lesión de contusión en el sistema nervioso central para mejorar la recuperación funcional según la reivindicación 1, en la que la lesión de contusión comprende neuronas desgarradas o parcialmente cortadas.
- 40 12.- La enzima para su uso en el tratamiento de una lesión de contusión en el sistema nervioso central para mejorar la recuperación funcional según la reivindicación 1, en la que la lesión de contusión comprende neuronas aplastadas.
- 13.- La enzima para su uso en el tratamiento de una lesión de contusión en el sistema nervioso central para mejorar la recuperación funcional según la reivindicación 1, en la que la lesión de contusión comprende la compresión del sistema nervioso central.
- 45 14.- La enzima para su uso en el tratamiento de una lesión de contusión en el sistema nervioso central para mejorar la recuperación funcional según la reivindicación 13, en la que la compresión está provocada por una fuerza traumática en la médula espinal.
- 50 15.- La enzima para su uso en el tratamiento de una lesión de contusión en el sistema nervioso central para mejorar la recuperación funcional según la reivindicación 13, en la que la compresión está provocada por un tumor, una hemorragia, un infarto, un proceso infeccioso, una estenosis o una isquemia.
- 16.- La enzima para su uso en el tratamiento de una lesión de contusión en el sistema nervioso central para mejorar la recuperación funcional según la reivindicación 2, en la que la degradación de los proteoglicanos de sulfato de condroitina se produce fuera del sitio de la lesión del sistema nervioso central.

17.- La enzima para su uso en el tratamiento de una lesión de contusión en el sistema nervioso central para mejorar la recuperación funcional según la reivindicación 1, formulada para la administración local.

18.- La enzima para su uso en el tratamiento de una lesión de contusión en el sistema nervioso central para mejorar la recuperación funcional según la reivindicación 1, formulada para la administración intratecal.

5 19.- La enzima para su uso en el tratamiento de una lesión de contusión en el sistema nervioso central para mejorar la recuperación funcional según la reivindicación 1, formulada para la administración tópica.

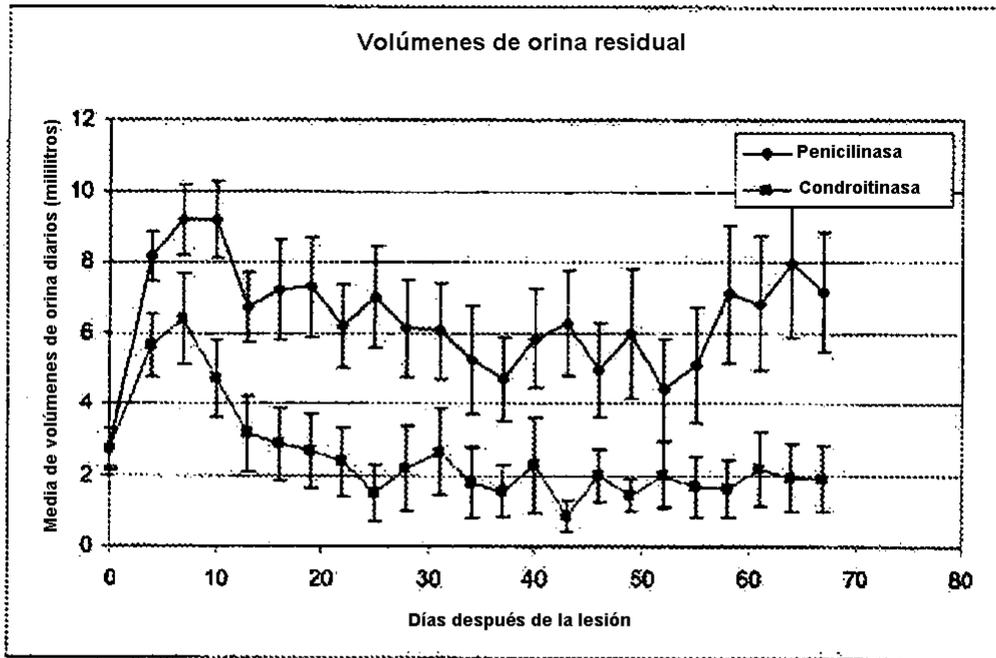


Figura 1

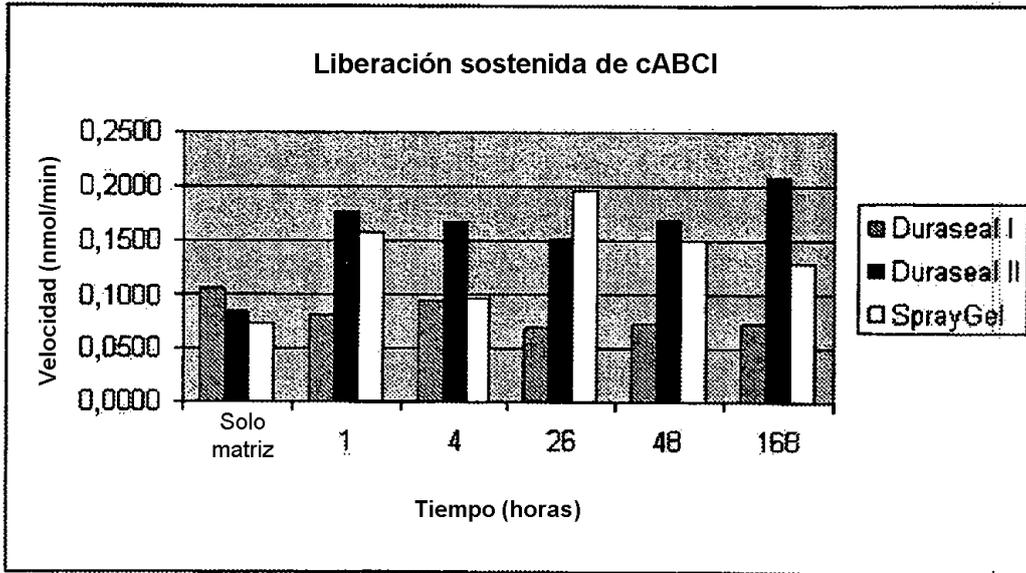


Figura 2

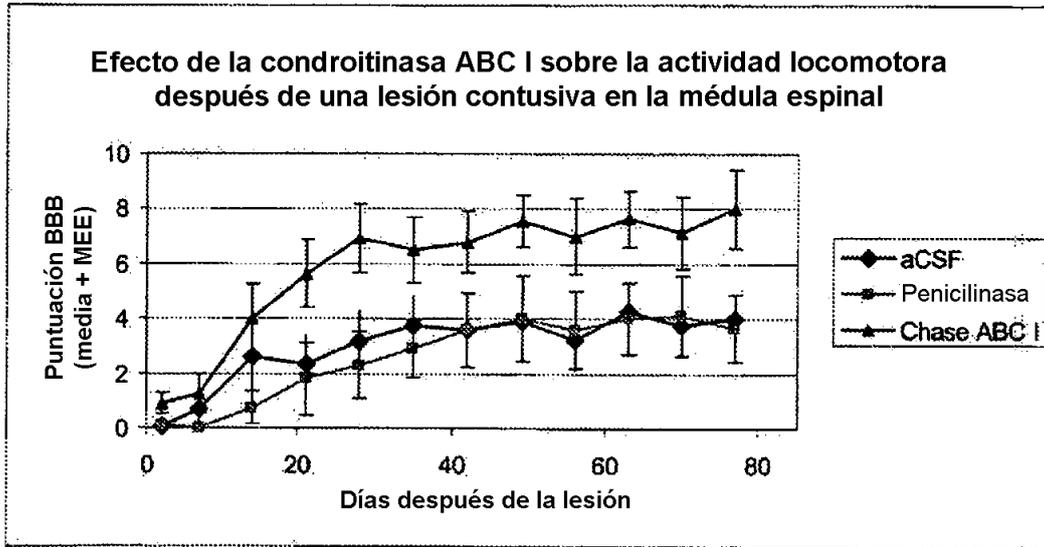


Figura 3

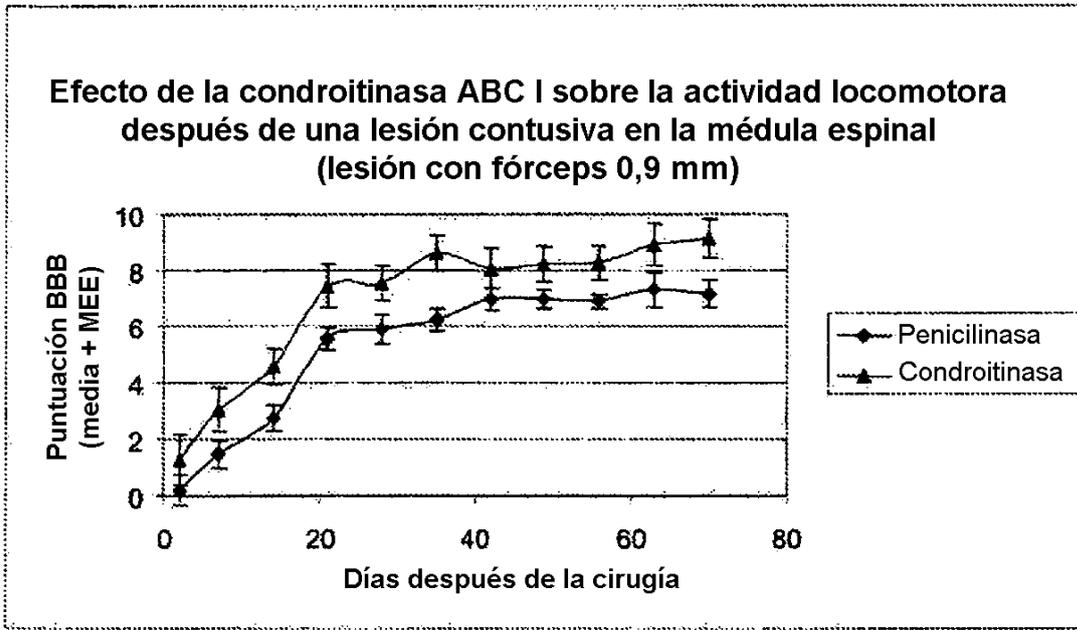


Figura 4

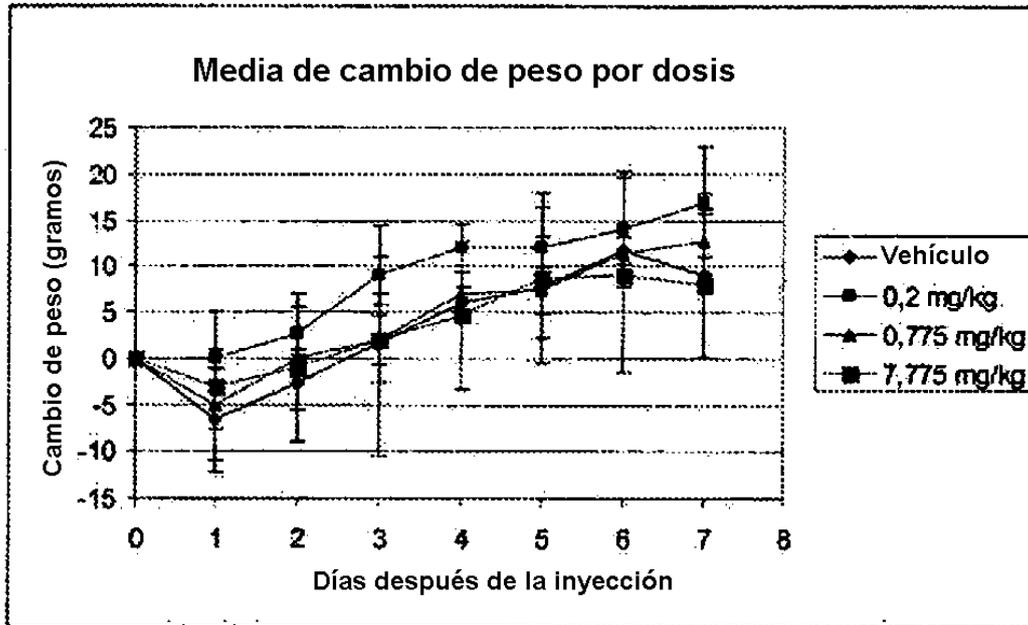


Figura 5

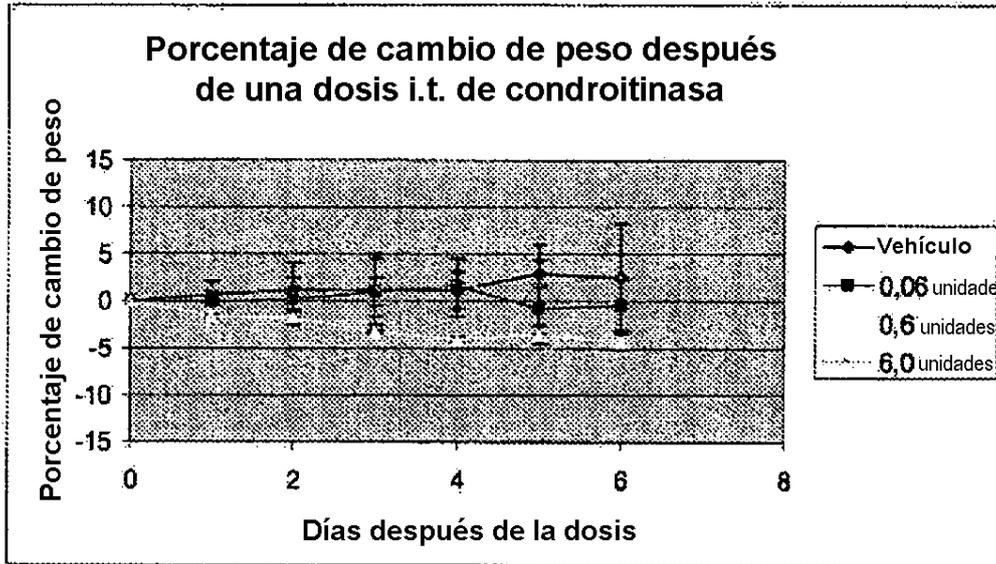


Figura 6

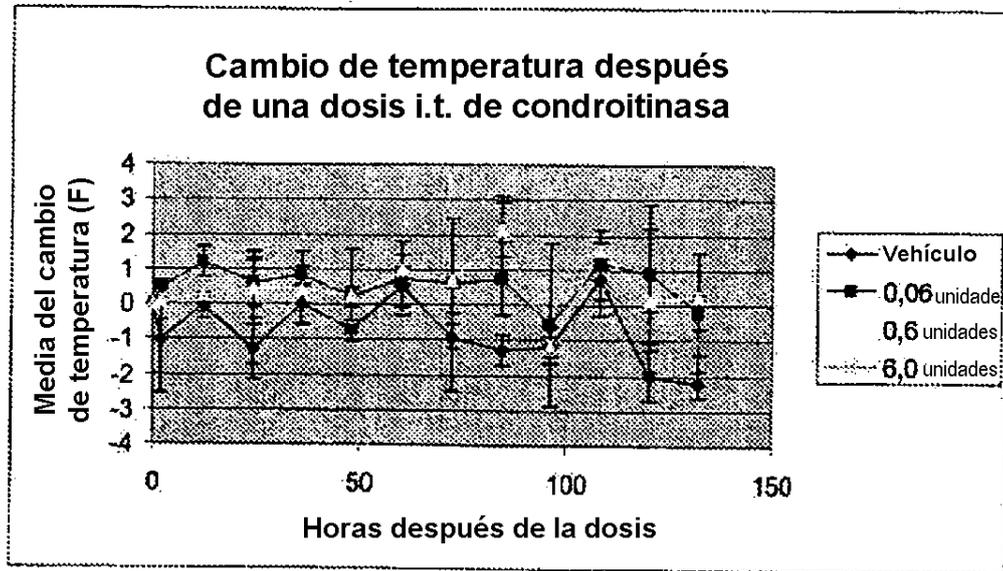


Figura 7

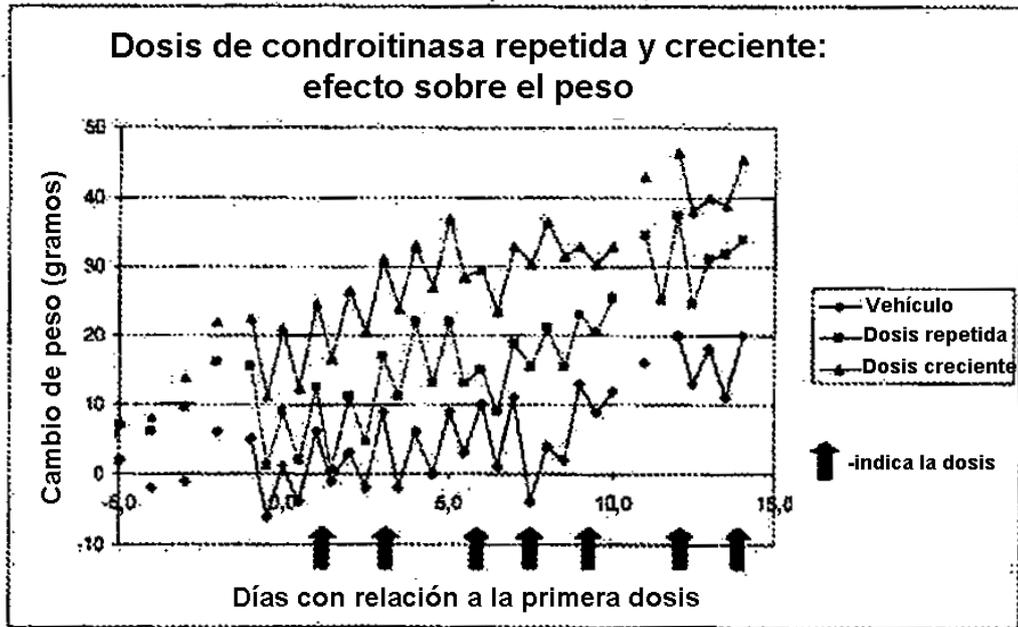


Figura 8

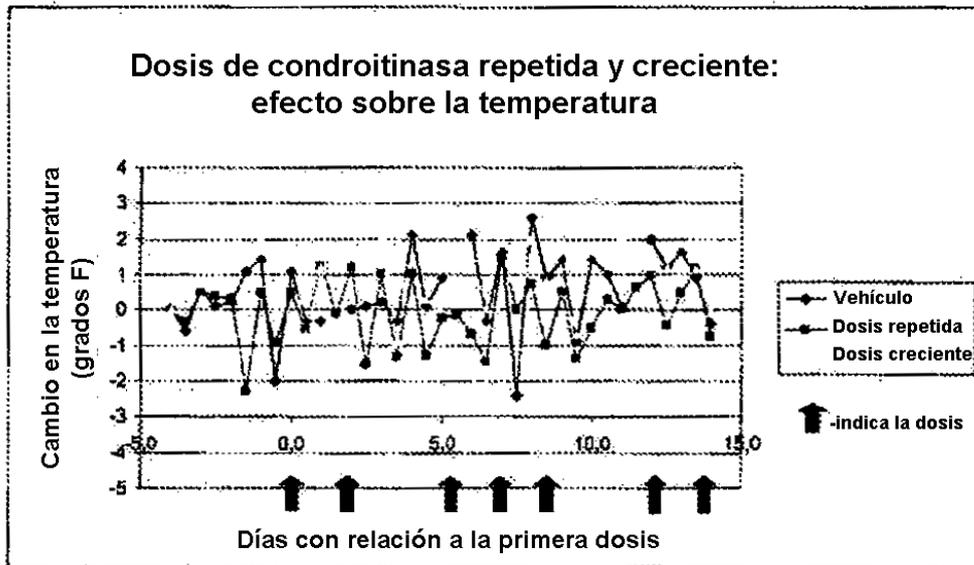


Figura 9