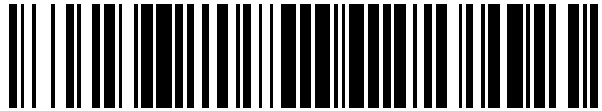


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 605**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A61K 31/737** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2011 E 11852038 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2654899**

54 Título: **Decorina para su uso en el tratamiento de afecciones neurológicas traumáticas por administración por vía intratecal**

30 Prioridad:

**20.12.2010 US 201061424769 P**

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

**14.09.2016**

73 Titular/es:

**SCIDEC THERAPEUTICS, INC. (100.0%)**

**One Mifflin Place, Suite 400**

**Cambridge, MA 02138, US**

72 Inventor/es:

**DAVIES, STEPHEN y**

**MINOR, KENNETH HAL**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 582 605 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

Decorina para su uso en el tratamiento de afecciones neurológicas traumáticas por administración por vía intratecal

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general al uso de composiciones en el tratamiento y promoción de la recuperación funcional de afecciones neurológicas que incluyen lesiones y/o enfermedades del sistema nervioso central.

10

**Antecedentes de la invención**

Las afecciones neurológicas son trastornos del sistema nervioso del cuerpo. Las anomalías estructurales, bioquímicas o eléctricas del cerebro, médula espinal, o en los nervios dan lugar a o por ellas pueden producirse, síntomas tales como parálisis, debilidad muscular, falta de coordinación, pérdida de sensibilidad, así como dolor. Las intervenciones incluyen medidas preventivas, cambios en el estilo de vida, fisioterapia u otras terapias, neuro-rehabilitación, manejo del dolor, medicación, u operaciones llevadas a cabo por neurocirujanos (WHO Neurological Disorders: Public Health Challenges, 2006). Estas afecciones o trastornos se pueden clasificar de acuerdo con la localización primaria afectada, el tipo primario de disfunción implicado, o el tipo primario de causa. La división más amplia es entre trastornos del sistema nervioso central (SNC) y trastornos del sistema nervioso periférico (SNP) (Merck Manual: Brain, Spinal Cord and Nerve Disorders, 2010-2011).

La lesión traumática del sistema nervioso central (SNC) del adulto se asocia con diferentes tipos de daños, los cuales plantean desafíos sustanciales a los intentos de conseguir la reparación tisular. La restauración de la función neurológica tras una lesión grave necesita el crecimiento regenerativo de los axones sensoriales y motores dañados mediante la provisión de factores de crecimiento, sustratos apropiados y/o superación de una variedad de inhibidores que evitan la regeneración de los axones.

Actualmente hay una demanda clínica acuciante de nuevas terapias que promuevan niveles de recuperación funcional robustos cuando se administran al sistema nervioso central (SNC) enfermo o lesionado traumáticamente. El tejido cicatricial que se forma tras la lesión traumática del SNC en el mamífero adulto es rico en proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG) inhibidores del crecimiento del axón y que inhiben el crecimiento de los axones (Davies, S.J., et al. Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature* 390, 680-683 (1997); Davies, S.J. et al., Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord *J. Neurosci* 19, 5810-5822 (1999)). El tejido cicatricial fibrótico mal alineado en las grandes lesiones del SNC presentan claramente una barrera física al crecimiento de los axones, sin embargo el fallo de la regeneración de los axones se puede producir incluso con lesiones mínimas en las que el alineamiento del tejido se restaura rápidamente. Se ha demostrado que varios CSPG individuales, tales como neurocan, NG2, brevican y fosfacan, son inhibidores del crecimiento de los axones *in vitro* y están regulados positivamente en los sitios de lesión del SNC del adulto (revisado en Morgenstern D.A., et al., Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Prog. Brain Res* 137, 163-173 (2002)). Se ha demostrado que también están regulados positivamente otros inhibidores del crecimiento de los axones tales como la semaforina 3A, en el tejido cicatricial en los sitios de la lesión cerebral y de la médula espinal (Pasterkamp R.J. et al. Expression of the gene encoding the chemorepellent semaphorin III is induced in the fibroblast component of neural scar tissue formed following injuries of adult but not neonatal CNS, *Mol. Cell Neurosci* 13: 143-166(1999); Pasterkamp R.J. et al. Peripheral nerve injury fails to induce growth of lesioned ascending dorsal column axons into spinal cord scar tissue expressing the axon repellent Semaphorin3A, *Eur. J. Neurosci.* 13: 457-471(2001); Pasterkamp R.J. y Kolodkin A.L., Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity, *Curr. Opin. Neurobiol.* 13:79-89 (2003)). Además de la regulación positiva de CSPG inhibidores en el tejido cicatricial que se forma directamente en los sitios de la lesión, se sabe que los CSPG inhibidores y la semaforina 3A también están presentes con altos niveles en la materia gris normal de la médula espinal y tras la lesión del SNC (Pasterkamp R.J. et al. Expression of the gene encoding the chemorepellent semaphorin III is induced in the fibroblast component of neural scar tissue formed following injuries of adult but not neonatal CNS, *Mol. Cell Neurosci* 13: 143-166(1999); Pasterkamp R.J. y Kolodkin A.L., Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity, *Curr. Opin. Neurobiol.* 13:79-89 (2003); Andrews E.M. et al. Alterations in chondroitin sulfate proteoglycan expression occur both at and far from the site of spinal contusion injury, *Exp. Neurol.* ePub ahead of print (2011); Tang X., et al. Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue, *J. Neurosci. Res.* 71: 427-444(2003). Además, se ha demostrado que las vainas de mielina alrededor de los axones en la materia blanca del SNC también presentan una variedad de moléculas inhibitoras del crecimiento de axones tales como NOGO (inhibidor del crecimiento de neurita), glucoproteína asociada a la mielina (MAG) y glucoproteína miélica oligodendrocítica (OMgp: revisado en Yiu G. y He Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration, *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 617-627 (2006)). Los axones lesionados que intentan regenerarse de esta manera a través de los sitios de la lesión, luego a través de la materia blanca rica en mielina más allá de los sitios de la lesión y finalmente extienden ramas laterales "colaterales" axonales a partir de la materia blanca en la materia gris (con el fin de establecer conexiones sinápticas funcionales), deben navegar a través de diferentes dominios del SNC lesionado que contiene múltiples moléculas inhibitoras del crecimiento de los axones.

Los pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRP) de la matriz extracelular (ME) comprenden una familia en expansión de proteoglicanos y glucoproteínas actualmente engloban cinco grupos distintos (Hocking, A.M., et al. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol.* 17, 1-19 (1998); Lozzo RV. The biology of the small leucine-rich proteoglycans Functional network of interactive proteins. *J. Biol. Chem* 274, 18843-18846 (1999)). La familia de los SLRP comprende aproximadamente 17 genes que comparten homologías estructurales, tales como restos de cisteína, repeticiones ricas en leucina y al menos una cadena lateral de glucosaminoglicano. La decorina y el biglican pertenecen a la clase I, que presentan similitudes en su secuencia de aminoácidos, en las cadenas laterales de sulfato de condroitina o dermatan y un agrupamiento típico de restos de cisteína en el extremo N que forman dos enlaces disulfuro. La fibromodulina y lumican pertenecen a la clase II, ambos presentan cadenas laterales de sulfato de queratina y poliacetosaminas, así como agrupamientos de restos de sulfato de tirosina en su extremo N (Schaefer, L., et al. Biological functions of small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J. Biol. Chem* 283(31), 21305-21309, (2008)). Algunos SLRP actúan como un depósito de factores de crecimiento en la matriz extracelular, modulando procesos biológicos, tales como la proliferación y diferenciación celular (Hocking, A.M., et al. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol.* 17, 1-19 (1998); Vogel, K.G., et al. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J*, 222, 587-597 (1984)). Son capaces de inducir cascadas de señalización por medio de receptores tirosina cinasa, tipo-toll y TGF- $\beta$ /BMP (Schaefer, L., et al. Biological functions of small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J. Biol. Chem* 283(31), 21305-21309, (2008)).

La decorina es un SLRP de origen natural que se encuentra en la matriz extracelular (ME) de muchos tipos de tejidos en mamíferos, es un antagonista de origen natural de la formación de la cicatriz (revisado por Hocking, A.M., et al. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol.* 17, 1-19 (1998), y se sabe que inhibe la actividad de al menos tres isoformas de TGF- $\beta$  (Yamaguchi, Y., et al. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature* 346, 281-284 (1990)). La decorina también es un antagonista del receptor tirosina cinasa del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Santra, M., et al. Decorin binds to a narrow region of the epidermal growth factor (EGF) receptor, partially overlapping but distinct from the EGF-binding epitope. *J. Biol. Chem.* 277, 35671-35681 (2002)) y se sabe que tiene propiedades tanto anti-inflamatorias como antifibróticas. Tras la lesión del SNC, la decorina se sintetiza en los astrocitos en el neuropilo dañado del SNC (Stichel, C.C., et al. Differential expression of the small chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans decorin and biglycan after injury of the adult rat brain. *Brain Res* 704(2), 263-274 (1995)) y por lo tanto puede que represente un intento endógeno para regular negativamente la actividad de citocinas y promover la plasticidad de los circuitos neuronales en el SNC lesionado en mamíferos.

En muchos casos en los que se ha perdido la función neurológica, tal como en una lesión de la médula espinal, actualmente no hay ninguna intervención aprobada por la FDA (Administración de alimentos y fármacos de Estados Unidos) para revertir el daño y para restaurar la función neurológica. La mayoría de los tratamientos se enfocan a la prevención de lesiones adicionales. En consecuencia, sigue existiendo la necesidad en la técnica de nuevas terapias que promuevan niveles robustos de recuperación neurológica funcional cuando se administran a pacientes que sufren afecciones neurológicas, incluyendo lesiones y/o enfermedades del SNC.

#### 40 **Sumario de la invención**

La invención se refiere al tratamiento de una afección neurológica en un paciente administrando un pequeño proteoglicano rico en leucina (SLRP) en la cavidad intratecal del paciente. La etapa de administración se lleva a cabo sin la administración directa del SLRP en los tejidos del sistema nervioso central. En otro aspecto, la etapa de administración incluye la administración del SLRP en una parte de la cavidad intratecal que se selecciona de entre la cisterna cerebelomedularis (cisterna magna), la cavidad intratecal a niveles cervical, torácico, lumbar de la médula espinal, y la infusión en el líquido cefalorraquídeo (LCR) alrededor de la cauda equina.

50 El SLRP es la decorina. En un aspecto, la decorina se puede modificar químicamente.

La afección neurológica que se va a tratar en el paciente es una afección neurológica traumática.

55 En otros aspectos, la afección neurológica es una afección neurológica traumática que se selecciona de entre una lesión cerebral traumática, una lesión de la médula espinal traumática, ictus, síndrome de médula espinal anclada, e isquemia hipóxica global.

60 En otros aspectos más, la etapa de administración del SLRP puede ser en varios puntos de tiempo después de que se produzca una afección neurológica traumática. Por ejemplo, la etapa de administración se puede llevar a cabo poco después de la afección neurológica traumática, tal como en aproximadamente 24 horas. Además, la etapa de administración del SLRP se puede administrar en tiempos más largos tras la afección neurológica traumática y aún ser eficaz. Por ejemplo, la administración se puede iniciar tras aproximadamente 1 mes después de que se produzca la afección neurológica traumática.

65 En otro aspecto más, el presente uso incluye además un tratamiento adicional para una afección neurológica traumática. El tratamiento adicional para la afección neurológica traumática puede ser la administración de agentes

anti-inflamatorios, agentes reductores de la temperatura, inmovilización, terapias basadas en trasplante celular, terapias basadas en infusión celular, implantes de biomateriales, infusión intratecal de nano-partículas que liberan SLRP, terapias de ejercicio, terapias de rehabilitación basadas en estimulación funcional eléctrica, intervenciones quirúrgicas, terapias del SNC basadas en hipotermia inducida clínicamente o intervenciones basadas en terapia genética. En algunos aspectos de la invención, la afección neurológica traumática se estabiliza en el paciente en el momento de la administración.

La etapa de administración de un SLRP puede incluir la administración de una embolada del SLRP al paciente. De manera alternativa, o además, la etapa de administración puede incluir el suministro continuo del SLRP al paciente.

Los usos de la presente invención pueden dar como resultado la recuperación de la función neurológica del paciente. En un aspecto, el método da como resultado un indicio, en comparación con un control, en el que el indicio es un aumento de la extensión y la ramificación del axón, un aumento en la extensión dendrítica neuronal, la ramificación y formación de espículas, la promoción de sinaptogénesis en el sistema nervioso central enfermo o lesionado, la regulación positiva de los niveles proteicos de plasminógeno, la regulación positiva de los niveles proteicos de plasmina, la supresión de las acciones inhibitoras del crecimiento del axón de la cicatriz de glía, la supresión de la síntesis de inhibidores del crecimiento del axón asociados con la cicatriz de glía, los inhibidores del crecimiento del axón asociados a la materia gris y la mielina, la supresión de la inflamación, la supresión de la astrogliosis, la supresión de la síntesis aberrante de múltiples proteoglicanos de sulfato de condroitina inhibidores del crecimiento del axón, supresión de formación de cicatriz fibrótica, supresión de los niveles de cadenas laterales de glucosaminoglicanos (GAG) / centros proteicos de múltiples proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG) inhibidores del crecimiento del axón y des-sensibilización de neuronas frente a la influencia de las moléculas inhibitoras del crecimiento del axón.

El paciente en la invención puede incluir cualquier mamífero, incluyendo mamíferos humanos y no humanos.

La invención desvela un kit para tratar una afección neurológica que incluye (a) un medio para administrar un SLRP en la cavidad intratecal de un paciente; y (b) un SLRP. En un aspecto el medio para la administración puede ser una bomba intratecal, un catéter, intubación, una derivación de líquido cefalorraquídeo, una derivación ventriculoperitoneal con una válvula que conecta/desconecta un depósito de LCR (RO-VPS), nano-partículas o combinaciones de los mismos. El SLRP es la decorina.

La invención se refiere a una composición que incluye un primer pequeño proteoglicano rico en leucina (SLRP) y un segundo compuesto terapéutico para tratar una afección neurológica. En un aspecto, el segundo compuesto terapéutico puede seleccionarse de entre un segundo SLRP que sea diferente del primer SLRP, agentes anti-inflamatorios, agentes reductores de la temperatura, condroitinasas, litio, hidrogeles, factores de crecimiento neurotróficos diseñados para promover el crecimiento del axón o la re-mielinización de los axones, agentes anti-apoptóticos para promover la supervivencia de las neuronas del SNC y glía y combinaciones de los mismos. El primer SLRP es la decorina.

Una realización adicional de la invención es la supresión de la expresión de semaforina 3A en el tejido del sistema nervioso central lesionado, que comprende la administración a un paciente de una composición farmacéutica en la cavidad intratecal de un paciente, en la que la composición farmacéutica comprende un SLRP y en la que se inhibe la expresión de la semaforina 3A. En un aspecto, la etapa de administración incluye la administración del SLRP en una parte de la cavidad intratecal que se selecciona de entre la cisterna cerebelomedularis (cisterna magna), la cavidad intratecal a niveles cervical, torácico, lumbar y sacro de la médula espinal, y la infusión en el líquido cefalorraquídeo (LCR) alrededor de la cauda equina. En un aspecto, la etapa de administración se lleva a cabo con la administración directa del SLRP en los tejidos del sistema nervioso central. El SLRP es la decorina.

## Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 GALACORIN™ infundido por medio de un catéter en el LCR de la Cisterna cerebelomedularis (cisterna magna) en seres humanos para promover la recuperación de la función neurológica. (Esquema adaptado de Grays Anatomy, Trigésima Edición Americana). Duramadre (área sombreada más oscura); Líquido cefalorraquídeo (área sombreada más clara).

Fig. 2 Esquema que muestra el método experimental de la infusión de GALACORIN™ en el líquido cefalorraquídeo de la cisterna magna en ratas adultas con lesión de la médula espinal. Nótese que la infusión en la cisterna magna evita el daño asociado con el contacto del catéter con la superficie de la piamadre de la médula espinal.

Fig. 3 La infusión de GALACORIN™ retardada en la cisterna magna que comienza a los 12 días tras la lesión promueve la recuperación robusta de la función neurológica locomotora en ratas adultas con lesión en la médula espinal. Nótese que el número de malos pasos que hacen las ratas tratadas con GALACORIN™ sigue mejorando durante varias semanas tras el periodo de 8 días de infusión con GALACORIN™ (datos no mostrados). (\*) denota la diferencia estadísticamente significativa en las puntuaciones medias entre las ratas con lesión de la médula espinal (SCI) tratadas y el grupo de Control 1 de ratas con SCI sin tratar. Análisis estadístico: mediciones ANOVA de 2 vías repetidas seguidas por comparaciones múltiples tras ensayo de Holm-Sidak

( $p < 0,05$ ).

Fig. 4A-4H Análisis CatWalk. Además de la recuperación observada en el ensayo Grid Walk / escalera horizontal, las ratas tratadas con decorina mostraban una recuperación robusta de tres parámetros estáticos del comportamiento de extremidades delanteras y cinco de extremidades traseras a continuación del tratamiento retardado de la contusión de la médula espinal a las 5 semanas tras la lesión. RF: garra delantera derecha; RH: garra trasera derecha.

Fig. 5 Análisis de la actuación en GridWalk/escalera horizontal. El gráfico muestra las puntuaciones GridWalk/escalera horizontal (malos pasos) a las 8 semanas tras la lesión para las ratas lesionadas por contusión cervical en la médula espinal tratadas por infusión intratecal de decorina que comenzaba a: Aguda (inmediatamente tras la lesión); 12 días (12d) y 1 mes (1 mes) de puntos de tiempo crónicos tras la lesión.

Fig. 6 La decorina promueve el brote de circuitos espinales de control motor. Las médulas espinales tratadas con decorina a los 12 días post-SCI presentaban un aumento de la densidad de los axones de los tractos cortico/espinales (CST) en el cuerno dorsal de la materia gris caudal a los sitios de la lesión en comparación con las médulas espinales lesionadas sin tratar a las 9 semanas tras el tratamiento. El análisis cuantitativo demostraba una densidad del axón del CST 2,8 veces mayor en el cuerno dorsal de materia gris en las láminas mediales I-VI en las médulas espinales tratadas con decorina frente a los controles sin tratar. El asterisco indica una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) como se determinó utilizando la estadística ANOVA de una vía.

Fig. 7 La decorina promueve la sinaptogénesis en el sistema nervioso central lesionado. Las médulas espinales tratadas con decorina presentaban mayor inmunodensidad de la proteína sinapsina-1 de la vesícula pre-sináptica en comparación con los controles no tratados en la materia gris del cuerno ventral a nivel C6 de la médula caudal al sitio de la lesión. El gráfico del análisis de densidad mostraba un aumento medio de 3,2 veces de inmunodensidad de Sinapsina-1 para las médulas espinales tratadas con decorina frente a los controles tratados. (\*) indica una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) como se determina por la comparación estadística con ANOVA de una vía.

## Descripción detallada

La presente invención se refiere a los usos para tratar afecciones neurológicas en un paciente. La invención incluye la administración de un pequeño proteoglicano rico en leucina (SLRP) en la cavidad intratecal (es decir, en el espacio intratecal) del paciente.

Una afección neurológica se refiere en general a un trastorno del sistema nervioso. En consecuencia, estas afecciones incluyen pero no se limitan a trastornos que implican músculos, trastornos estructurales del cerebro y la médula espinal, trastornos estructurales de los nervios de la cara, tronco y extremidades, así como afecciones que no están producidas por una enfermedad estructural tales como muchas variedades de dolores de cabeza y afecciones tales como la epilepsia, síncope y mareos. La afección neurológica es una afección neurológica traumática. Una afección neurológica traumática es una lesión grave o choque del cuerpo. Una afección neurológica traumática incluye pero no se limita a lesión traumática del cerebro, lesión traumática de la médula espinal, ictus, síndrome de lesión de médula espinal anclada e isquemia hipóxica global.

En otras realizaciones de la presente invención, la práctica de la presente invención tratará eficazmente la afección neurológica traumática, en la que la presente invención puede estabilizar un paciente, sola o en combinación con otros tratamientos. En general, una afección neurológica traumática se estabiliza cuando la afección no supone más un peligro inmediato de muerte o perjuicio al paciente y los signos vitales del paciente son estables (en los límites normales).

La presente invención puede utilizarse para tratar una variedad de diferentes pacientes. En una realización de la invención, los pacientes pueden incluir todos los vertebrados. En una realización específica de la invención, los vertebrados son preferentemente mamíferos. En una realización preferida de la invención, los pacientes incluyen, pero no se limitan a, mamíferos tales como mamíferos no humanos y seres humanos. Los mamíferos no humanos incluyen, pero no se limitan a, perros y gatos. Los pacientes pueden tener afecciones neurológicas, tales como afecciones neurológicas agudas, afecciones neurológicas crónicas o afecciones neurológicas traumáticas.

Los usos de la presente invención que se utilizan para tratar afecciones neurológicas en un paciente incluyen una etapa de administración de un SLRP por vía intratecal al paciente, que se lleva a cabo sin la administración directa del SLRP en los tejidos del sistema nervioso central del paciente. En general, el tejido del sistema nervioso es el componente principal del sistema nervioso (cerebro, médula espinal y nervios) que regula y controla la función corporal. Los tejidos del sistema nervioso central pueden comprender la médula espinal, el cerebro, el córtex cerebral, la corteza cerebelar, las meninges, las células de la glía y el plexo coroideo.

En realizaciones de la presente invención, la etapa de administración puede ser la administración del SLRP en una parte de la cavidad intratecal que se selecciona de entre el grupo que consiste en la cisterna cerebellomedularis (cisterna magna), la cavidad intratecal a niveles cervical, torácica, lumbar y sacra de la médula espinal, y la infusión en el líquido cefalorraquídeo (LCR) que rodea la cauda equina. En realizaciones preferidas, el SLRP se administra en la cavidad intratecal y en la cisterna cerebellomedularis. La cavidad intratecal se refiere en general al espacio bajo la membrana aracnoidea que cubre el cerebro y la médula espinal del paciente. La membrana aracnoidea es una de

las tres meninges, las membranas que cubren el cerebro y la médula espinal. El líquido cefalorraquídeo fluye bajo esta membrana en el espacio subaracnoideo.

5 En realizaciones de la invención, el SLRP se puede administrar en la cavidad intratecal de acuerdo con la presente invención, por medio de una variedad de medios. Por ejemplo, una fuente del SLRP se puede poner en contacto con la cavidad intratecal por medio de una derivación o un catéter que permita el suministro del SLRP en la cavidad intratecal.

10 En realizaciones de la invención, la etapa de administración se lleva a cabo tras producirse una afección neurológica traumática. En algunas realizaciones, la etapa de administración se lleva a cabo lo antes posible después del incidente que produce la afección neurológica traumática. Por ejemplo, la etapa de administración se puede llevar a cabo aproximadamente 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 9 horas, 12 horas o 24 horas tras el incidente. En otras realizaciones, la administración se inicia en un tiempo mayor a partir del incidente que produce una afección neurológica traumática, y el método sigue siendo eficaz. Por ejemplo, la administración se puede iniciar después de aproximadamente 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 20 días o 30 días y en puntos de tiempo más extensos sub-agudos (1 mes) y crónicos a largo plazo después de que se produzca la afección neurológica traumática. En otras realizaciones más, la administración se inicia en tiempos significativamente más largos después de que se produzca una afección neurológica traumática. Por ejemplo, la administración se puede iniciar tras aproximadamente 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 3 años, 5 años, 7 años, o 9 años después de producirse la afección neurológica traumática.

20 En otras realizaciones, la etapa de administración puede llevarse a cabo administrando una embolada de SLRP al paciente y/o un suministro continuo del SLRP al paciente durante un periodo de tiempo, tal como durante aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 24 horas o durante un periodo de 8 días.

30 En consideración al uso específico de un SLRP, tal como la decorina, para el tratamiento de las afecciones neurológicas que incluyen las lesiones o enfermedades del SNC, los estudios publicados previos en modelos de lesión del SNC en ratas, demostraban que la infusión de decorina era anti-inflamatoria y que disminuía los niveles de inhibidores del crecimiento del axón asociados a la cicatrización (Davies, J.E., et al. Decorin Promotes Plasminogen/Plasmin Expression within Acute Spinal Cord Injuries and by Adult Microglia *In vitro*. J Neurotrauma 23, 397-408 (2006); Davies, J.E., et al. Decorin suppresses neurocan, brevican, phosphacan and NG2 expression and promotes axon growth across adult rat spinal cord injuries. Eur. J Neurosci. 19, 1226-1242 (2004); Logan, A., et al. Decorin attenuates gliotic scar formation in the rat cerebral hemisphere. Exp. Neurol. 159, 504-510 (1999)). Notablemente, sin embargo, estos estudios previos de la administración de decorina para las lesiones de médula espinal y cerebro se basaban en una inyección directa de decorina relativamente traumática en o a través del parénquima (tejidos) del cerebro o médula espinal lesionados (Davies, J.E., et al. Decorin Promotes Plasminogen/Plasmin Expression within Acute Spinal Cord Injuries and by Adult Microglia *In vitro*. J Neurotrauma 23, 397-408 (2006); Davies, J.E., et al. Decorin suppresses neurocan, brevican, phosphacan and NG2 expression and promotes axon growth across adult rat spinal cord injuries. Eur. J Neurosci. 19, 1226-1242 (2004); Logan, A., et al. Decorin attenuates gliotic scar formation in the rat cerebral hemisphere. Exp. Neurol. 159, 504-510 (1999)). De manera importante, estos métodos de administración de decorina no mostraban como resultado la recuperación de la función neurológica (Davies, J.E., et al. Decorin Promotes Plasminogen/Plasmin Expression within Acute Spinal Cord Injuries and by Adult Microglia *In vitro*. J Neurotrauma 23, 397-408 (2006); Davies, J.E., et al. Decorin suppresses neurocan, brevican, phosphacan and NG2 expression and promotes axon growth across adult rat spinal cord injuries. Eur. J Neurosci. 19, 1226-1242 (2004); Logan, A., et al. Decorin attenuates gliotic scar formation in the rat cerebral hemisphere. Exp. Neurol. 159, 504-510 (1999)).

50 En consecuencia, los métodos de la presente invención comprenden la administración de SLRP en la cavidad intratecal del paciente, preferentemente en la cisterna cerebellomedullaris que proporciona un medio de distribución simultánea de un SLRP en el LCR tanto del cerebro como de la médula espinal. Los SLRP son una familia de proteoglicanos compuesta por varios miembros que dirigen el ensamblaje y organización de la matriz por medio de interacciones proteína: proteína y/o proteína: carbohidratos. La familia se caracteriza por la presencia de varias regiones conservadas que se encuentran en sus centros proteicos. Estas regiones conservadas incluyen un dominio central de repeticiones ricas en leucina, cuatro restos de cisteína en el extremo amino y 2 restos de cisteína en el extremo carboxilo. (Johnson, J.M., et al. Small leucine rich repeat proteoglycans (SLRPs) in the human sclera: Identification of abundant level of PRELP Mol. Vis. 12, 1057-1066 (2006)). Los SLRP son organizadores tisulares que orientan y ordenan varias matrices de colágeno durante la ontogenia, reparación de heridas y cáncer e interactúan con varios receptores de superficie y factores de crecimiento, regulando de esta manera el comportamiento celular (Lozzo RV. The biology of the small leucine-rich proteoglycans Functional network of interactive proteins. J. Biol. Chem 274, 18843-18846 (1999)). El SLRP es la decorina. Una forma preferida de decorina es GALACORIN™ (Catalent Pharma Solutions, Somerset, NJ) que es una forma de centro proteico de decorina que carece de una cadena lateral de glucosaminoglucano (GAG) de sulfato de condroitina o dermatan.

En otras realizaciones, los SLRP que se utilizan en la presente invención se pueden modificar químicamente para alterar la naturaleza química del SLRP. Por ejemplo, un pequeño péptido derivado del centro proteico de un SLRP que mantenga una bioactividad beneficiosa específica del SLRP del que se deriva. Por ejemplo, un SLRP se puede PEGilar (unión covalente de cadenas de polímero de polietilenglicol para prolongar su tiempo circulatorio y ayudar a su captación por los tejidos). Los SLRP pueden PEGilarse por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, la PEGilación selectiva en un único sitio de glucosilación de la proteína diana así como la PEGilación selectiva de un aminoácido no natural que se ha modificado en las proteínas diana. En algunos casos es posible PEGilar el extremo N de una proteína a la vez que se evita la PEGilación de las cadenas laterales de lisina en la proteína diana controlando cuidadosamente las condiciones de la reacción. En otra estrategia de PEGilación específica del sitio de las proteínas diana es la introducción de restos de cisteína que permitan la conjugación selectiva.

La decorina se expresa en muchos tipos de tejidos y se ha demostrado que suprime la cicatrización fibrótica en varios trastornos tisulares incluyendo las lesiones del cerebro y la médula espinal. La decorina es capaz de inhibir la actividad del factor beta transformante del crecimiento y modular la actividad de las rutas de señalización corriente abajo ligadas a varios miembros de la familia del receptor homólogo del oncogén vírico de leucemia eritroblástica (ErbB). La infusión de un centro proteico de decorina recombinante humano en la lesión de médula espinal aguda en ratas adultas podía suprimir los niveles de múltiples proteoglicanos de sulfato de condroitina inhibidores del crecimiento del axón (CSPG) y hacer que los sitios lesionados permitan el crecimiento del axón.

En otras realizaciones de la presente invención, el uso comprende la utilización de una proteína de fusión que comprende un SLRP y otra proteína funcional. Por ejemplo, un SLRP se puede fusionar con un receptor de virus Coxsackie y adenovirus (CAR) (Jarvinen T.A. y Ruoslahti E. Target-seeking antifibrotic compound enhances wound healing and suppresses scar formation in mice, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 107: 21671-21676 (2010)) un péptido vascular de direccionamiento que está diseñado para promover la captación de un SLRP tal como la decorina o pequeños péptidos bioactivos derivados de los centros proteicos de SLRP en el parénquima del SNC lesionado, meninges o raíces del sistema nervioso periférico dorsal y ventral.

Algunos aspectos del uso del tratamiento de las afecciones neurológicas en un paciente administrando un SLRP en la cavidad intratecal del paciente incluyen el aumento de la densidad de los axones del tracto corticoespinal (CST) en el paciente. En el caso de lesiones traumáticas, el efecto del aumento de densidad en los axones supramedulares que se proyectan (del cerebro a la médula espinal) tales como los axones del CST puede producirse en el cerebro y la médula espinal por encima, adyacente o por debajo del sitio de la lesión. Otros aspectos del uso del tratamiento de las afecciones neurológicas en un paciente administrando un SLRP en la cavidad intratecal del paciente incluyen el aumento de la densidad de la sinapsina-1 en el paciente. En el caso de lesiones traumáticas, el efecto del aumento de la densidad de sinapsina-1, que indica un aumento en el número de sinapsis activas, puede producirse en todas las láminas de la materia gris de la médula espinal así como en y alrededor de los grupos de neuronas motoras en la materia gris del cuerno ventral en niveles medulares por encima y por debajo de los sitios de la lesión.

Otros usos de la presente invención se refieren a un método para suprimir la expresión de semaforina 3A (Sema3A) en el tejido lesionado del sistema nervioso central que comprende la administración de una composición farmacéutica que comprende un SLRP en la cavidad intratecal de un paciente. En un aspecto del método, se inhibe la expresión de Sema3A. La sema3A es el miembro de semaforinas de clase 3 segregadas que se sabe que comprenden una gran familia de glucoproteínas secretadas y unidas a la membrana que funcionan en la dirección del axón, fasciculación y formación de sinapsis. La Sema3A se expresa durante el desarrollo y en la madurez y puede funcionar como un potente quimio-repelente para poblaciones neuronales seleccionadas del sistema nervioso central y periférico. Se ha demostrado que la Sema3A no está regulada en los sitios de lesión traumática del sistema nervioso central donde se piensa que actúa como un inhibidor de la regeneración axonal promoviendo el colapso del cono de crecimiento ((Pasterkamp R.J. et al. Expression of the gene encoding the chemorepellent semaphorin III is induced in the fibroblast component of neural scar tissue formed following injuries of adult but not neonatal CNS, Mol. Cell Neurosci 13: 143-166(1999); Pasterkamp R.J. y Kolodkin A.L, Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity, Curr. Opin. Neurobiol. 13:79-89 (2003); Andrews E.M. et al. Alterations in chondroitin sulfate proteoglycan expression occur both at and far from the site of spinal contusion injury, Exp. Neurol. ePub ahead of print (2011); Tang X., et al. Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevicin, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue, J. Neurosci. Res. 71: 427-444(2003)).

Otras realizaciones de la presente invención comprenden el tratamiento de una afección neurológica administrando un SLRP en la cavidad intratecal del paciente en combinación con un tratamiento adicional para una afección neurológica traumática. En una realización preferida, el tratamiento adicional para tratar una afección neurológica traumática comprende la administración de agentes anti-inflamatorios, agentes reductores de la temperatura, inmovilización, terapias basadas en trasplante celular, terapias basadas en infusión celular, implante de biomateriales, infusión intratecal de nano-partículas liberadoras de SLRP, ejercicio y terapias de rehabilitación basadas en estimulación funcional eléctrica, intervenciones quirúrgicas, terapias del SNC basadas en hipotermia inducida clínicamente e intervenciones basadas en terapia genética. Los agentes anti-inflamatorios se conocen

bien en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE) tales como aspirina, ibuprofeno y naproxeno, y analgésicos tales como el paracetamol. Los agentes reductores de la temperatura también se conocen bien en la técnica y pueden incluir el ibuprofeno y el paracetamol.

5 En algunas realizaciones de la presente invención, el tratamiento de una afección neurológica puede incluir, además de la administración de un SLRP, la administración de un segundo compuesto terapéutico para tratar una afección neurológica. Dichos segundos compuestos terapéuticos pueden ser un segundo SLRP que sea diferente del primer SLRP, agentes anti-inflamatorios, agentes reductores de la temperatura, enzimas condroitinasa, factores de crecimiento neurotróficos diseñados para promover el crecimiento del axón o la re-mielinización de los axones, y  
10 agentes anti-apoptóticos para promover la supervivencia de las neuronas del SNC y la glía y combinaciones de los mismos.

Una realización adicional de la presente invención, es la administración de un SLRP en la cavidad intratecal en la que el SLRP se une a una matriz o armazón auto-ensamblable (SAP) (Cigognini D., et al. Evaluation of early and late effects into the acute spinal cord injury of an injectable functionalized self-assembling scaffold PLoS ONE 6:e19782 (2011)). Los SAP son una categoría de péptidos que se someten a ensamblaje espontáneo en nanoestructuras ordenadas. Los SAP proporcionan un armazón para los SLRP y presentan una molécula activa con actividad biológica mejorada. En otras realizaciones, el complejo SLRP-SAP se infunde en la cavidad intratecal. En otras realizaciones, el complejo SLRP-SAP es un complejo decorina-SAP.  
15 20

En realizaciones de la presente invención, los presentes usos pueden dar como resultado la recuperación de la función neurológica en el paciente. En otras realizaciones, los usos pueden dar como resultado uno o más de los siguientes indicios, en comparación con un control, un aumento de la extensión y ramificación del axón, regulación positiva de los niveles proteicos de plasminógeno, regulación positiva de los niveles proteicos de plasmina, supresión de la síntesis de inhibidores del crecimiento del axón asociados a la cicatriz de la glía, supresión de las acciones inhibitoras del crecimiento del axón de la cicatriz de la glía, moléculas inhibitoras del crecimiento del axón asociadas a la materia gris, supresión de la inflamación, supresión de la astrogliosis, supresión de la expresión aberrante de múltiples proteoglicanos de sulfato de condroitina inhibitoras del crecimiento del axón, supresión de la formación de la cicatriz fibrótica y supresión de niveles cadenas laterales de glucosaminoglicanos (GAG)/ centros proteicos de los proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG) inhibitoras del crecimiento del axón, y des-sensibilización de las neuronas a la influencia de las moléculas inhibitoras del crecimiento del axón en el sistema nervioso central enfermo o lesionado de un mamífero adulto con el fin de promover la plasticidad y la función de los circuitos neurales.  
25 30

La presente invención también desvela un kit para tratar una afección neurológica. En una realización, el kit comprende un medio para administrar un SLRP en la cavidad intratecal de un paciente. En una realización, el medio de administración comprende una bomba intratecal. En otra realización, el medio de administración comprende un catéter. En otra realización, el medio de administración de un SLRP comprende una derivación de desvío del líquido cefalorraquídeo. En otra realización, los medios de administración de un SLRP comprenden una derivación ventriculoperitoneal (RO-VPS) con válvula que conecta/desconecta un depósito de LCR. En otra realización, los medios de administración comprenden la intubación. En otra realización, los medios de administración del SLRP comprenden su liberación por nano-partículas inyectadas o infundidas en la cavidad intratecal del SNC. El SLRP que se administra con el kit es la decorina. La presente invención también desvela una composición que comprende decorina y un compuesto terapéutico adicional o secundario para su uso en el tratamiento de afecciones neurológicas. Dichos compuestos adicionales pueden incluir, pero no se limitan a un segundo SLRP que sea diferente al primer SLRP, agentes anti-inflamatorios, agentes reductores de la temperatura, factores neurotróficos de crecimiento diseñados para promover el crecimiento del axón y la re-mielinización de los axones, agentes anti-apoptóticos para promover la supervivencia de la glía del SNC, líquido cefalorraquídeo artificial, condroitinasas, hidrogeles, litio y combinaciones de los mismos. Las condroitinasas son enzimas que catalizan la eliminación de los restos de glucuronato de condroitina A, B y C y es un tratamiento para los proteoglicanos de sulfato de condroitina (proteínas de la matriz extracelular entre las células donde afectan la actividad neural) que se han utilizado para el tratamiento de lesiones medulares experimentales pre-clínicas en animales. El litio puede aumentar la regeneración neuronal y la diferenciación (Wong et al., Spinal Cord; 49 2011). Los hidrogeles pueden mejorar la curación cuando se inyectan en el sitio de la lesión de la médula espinal (Chen, B.K. et al. Comparison of polymer scaffolds in rat spinal cord: a step toward quantitative assessment of combinatorial approaches to spinal cord repair, Biomaterials 32:8077-8086 (2011)).  
35 40 45 50 55

En otra realización de la presente invención, el SLRP se selecciona de entre el grupo que consiste en decorina, una forma modificada de decorina, una forma modificada químicamente de decorina.  
60

Además de la regeneración de los axones lesionados, las estrategias que también promuevan la "plasticidad neural", es decir, la capacidad de supervivencia de los axones en los circuitos neurales para que broten y se formen nuevas sinapsis probablemente también promoverán la recuperación de la función neurológica. Por lo tanto, las estrategias terapéuticas que puedan suprimir la formación de la cicatriz inhibitora del crecimiento del axón en puntos de tiempo agudos tras la sesión y puedan promover también la plasticidad de regeneración y supervivencia de los circuitos neurales en el SNC enfermo o lesionado de manera aguda o crónica después de que se haya formado el tejido  
65



cicatricial, pueden proporcionar una recuperación significativa de las funciones neurológicas.

- Las moléculas activas de la presente invención (SLRP), que incluyen específicamente la decorina, un antagonista de origen natural de la formación de la cicatriz, son muy eficaces en la supresión de la inflamación, la astrogliosis en los bordes de la lesión, la síntesis de múltiples CSPG inhibidores y la formación de cicatriz fibrótica cuando se infunden en las lesiones agudas de la médula espinal en las ratas (Davies, J.E., et al. Decorin suppresses neurocan, brevicin, phosphacan and NG2 expression and promotes axon growth across adult rat spinal cord injuries. *Eur. J. Neurosci.* 19, 1226-1242 (2004)). De manera más importante, la infusión directa de decorina en la médula espinal permitía el rápido crecimiento de los axones a través de los sitios de la lesión solo en 4 días (Davies, J.E., et al. Decorin suppresses neurocan, brevicin, phosphacan and NG2 expression and promotes axon growth across adult rat spinal cord injuries. *Eur. J. Neurosci.* 19, 1226-1242 (2004)). La capacidad de la decorina para inhibir tanto la transformación del factor de crecimiento beta (Yamaguchi, Y., et al. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature* 346, 281-284 (1990)) y la señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (Csordas, G., et al. Sustained down-regulation of the epidermal growth factor receptor by decorin. A mechanism for controlling tumor growth *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 275, 32879-32887 (2000)) son probablemente los mecanismos moleculares a través de los cuales la decorina puede suprimir la formación de la cicatriz en el SNC ya que los ligandos de TGF $\beta$  y EGFR, EGF y TGF $\alpha$ , han demostrado regular positivamente la síntesis de CSPG por los astrocitos *in vitro* (Asher, R.A., et al. Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J. Neurosci.* 20, 2427-2438 (2000); Properzi, F., et al. Chondroitin 6-sulphate synthesis is upregulated in injured CNS, induced by injury-related cytokines and enhanced in axon-growth inhibitory glia. *Eur. J. Neurosci.* 21, 378-390 (2005); Schnadelbach, O., et al. Expression of DSD-1-PG in primary neural and glial-derived cell line cultures, upregulation by TGF-beta, and implications for cell-substrate inter-actions of the glial cell line Oli-neu. *Glia* 23, 99-119 (1998)) y promueve la astrogliosis (mal alineamiento de los procesos de astrocitos) *in vivo* (Rabchevsky, A. G., et al. A role for transforming growth factor alpha as an inducer of astrogliosis. *J. Neurosci.* 18, 10541-10552 (1998)). Por medio de las interacciones específicas con el receptor Erb B4, la decorina puede suprimir la expresión de semaforina 3A (Minor, K.H., et al. Decorin, erythroblastic leukaemia viral oncogene homologue B4 and signal transducer and activator of transcription 3 regulation of semaphorin 3A in central nervous system scar tissue. *Brain* (2010), otra molécula inhibidora asociada a la cicatriz importante que se expresa por los fibroblastos invasores en el centro del tejido cicatricial del cerebro y la médula espinal (R.J. Pasterkamp, A.L. Kolodkin, Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity, *Curr. Opin. Neurobiol.* 13 (2003) 79-89; F. De Winter, F. De., et al. Injury-induced class 3 semaphorin expression in the rat spinal cord, *Exp. Neurol.* 175 (2002) 61-75; Pasterkamp, R. J., et al. Role for semaphorin III and its receptor neuropilin-1 in neuronal regeneration and scar formation?, *Prog. Brain Res.* 117 (1998) 151-170).
- Además de disminuir los niveles de múltiples moléculas inhibidoras en los sitios de la lesión en el SNC, otros medios potenciales de promoción de la regeneración de los axones lesionados y la plasticidad de supervivencia de los circuitos neurales son eliminar los inhibidores, activar los factores de crecimiento para superar los inhibidores o cambiar directamente la sensibilidad de los axones a los inhibidores.
- La infusión de decorina humana directamente en las lesiones de la médula espinal en ratas adultas puede aumentar significativamente los niveles medulares de la serina proteasa Plasmina (Davies J.E., et al. Decorin promotes plasminogen/plasmin expression within acute spinal cord injuries and by adult microglia *in vitro*. *J. Neurotrauma.* 23 (2006) 397-408). La plasmina es una enzima que se sabe que tiene la capacidad de desconponer los CSPG inhibidores (Wu, Y.P., et al. The tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin extra-cellular proteolytic system regulates seizure-induced hippocampal mossy fiber outgrowth through a proteoglycan sub-strate, *J. Cell Biol.* 148 (2000) 1295-1304) y el colágeno IV {Mackay, 1990 6466 /id}, un componente principal de la lámina basal cicatricial de la glía (Stichel, C.C., et al. Basal membrane-depleted scar in lesioned CNS: characteristics and relationships with regenerating axons, *Neuroscience* 93 (1999) 321-333). La plasmina puede activar también varias metaloproteinasas de la matriz (MMP) (Murphy, G., et al. The role of plasminogen activators in the regulation of connective tissue metalloproteinases, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 667 (1992) 1-12) que pueden degradar la lámina basal y promover el crecimiento del axón en presencia de CSPG inhibidores (Ferguson, T.A., y Muir, D. MMP-2 and MMP-9 increase the neurite-promoting potential of schwann cell basal laminae and are upregulated in degenerated nerve, *Mol. Cell Neurosci.* 16 (2000) 157-167).
- Se pensó durante mucho tiempo que el equilibrio entre la promoción del crecimiento del axón y las señales inhibidoras tenía un papel importante en la regulación de la capacidad de los axones en regeneración para atravesar las lesiones del SNC (Ramon y Cajal, S. *Degeneration and regeneration of the nervous system*, Oxford University Press, London, UK, 1928). Es probable que las neurotrofinas, factores de crecimiento que se expresan transitoriamente en las lesiones del SNC (Nakamura, M. y Bregman, B.S. Differences in neurotrophic factor gene expression profiles between neonate and adult rat spinal cord after injury, *Exp. Neurol.* 169 (2001) 407-415), promuevan el brote de los axones cortados como describió en primer lugar Ramón y Cajal y que la rápida regulación positiva de los inhibidores del crecimiento del axón asociados a la cicatriz tales como los CSPG resulte en la naturaleza abortiva final de los brotes (Davies, S. J., et al. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord, *J. Neurosci.* 19 (1999) 5810-5822; Davies, S. J. y Silver, J. Adult axon regeneration in adult CNS white matter [letter; comment], *Trends Neurosci.* 21 (1998) 515; S.J. Davies, S. J., et al. Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system, *Nature* 390 (1997) 680-

683). El aumento de las señales de promoción del crecimiento por el suministro de neurotrofinas exógenas a los cuerpos celulares de las neuronas axotomizadas (Hiebert, G.W., et al. Brain-derived neurotrophic factor applied to the motor cortex promotes sprouting of corticospinal fibers but not regeneration into a peripheral nerve transplant, *J. Neurosci. Res.* 69 (2002) 160-168; Plunet, W., et al. Promoting axonal regeneration in the central nervous system by enhancing the cell body response to axotomy, *J. Neurosci. Res.* 68 (2002) 1-6) o en la vecindad de los sitios de la lesión en combinación con puentes celulares (Oudega, M. y Hagg, T. Nerve growth factor promotes regeneration of sensory axons into adult rat spinal cord, *Exp. Neurol.* 140 (1996) 218-229); revisado en (Bregman, B.S., et al. Transplants and neurotrophic factors prevent atrophy of mature CNS neurons after spinal cord injury, *Exp. Neurol.* 149 (1998) 13-27; Murray, M., et al. Transplantation of genetically modified cells contributes to repair and recovery from spinal injury, *Brain Res. Brain Res. Rev.* 40 (2002) 292-300) han demostrado que promueven el crecimiento del axón a través del tejido cicatricial del SNC. Las neurotrofinas promueven también el crecimiento del axón *in vitro* en presencia de mielina y glucoproteínas asociadas a mielina (MAG) (Cai, D., et al. Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism, *Neuron* 22 (1999) 89-101). Las neurotrofinas maduras que promueven el crecimiento del axón se derivan de pro-neurotrofinas por escisión enzimática post-traducciona (Edwards, R. H., et al. Processing of the native nerve growth factor precursor to form biologically active nerve growth factor, *J Biol. Chem.* 263 (1988) 6810-6815). Principalmente, el proNGF (pro péptido del Factor de Crecimiento de Nervios humano) y proBDNF (precursor del factor Neurotrófico derivado del cerebro) son escindidos por la plasmina y las metaloproteinasas de la matriz selectivas (MMP) (Dougherty, K.D., et al. Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and micro-glia/macrophages after spinal cord injury, *Neurobiol. Dis.* 7 (2000) 574-585; Lee, R., et al. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins, *Science* 294 (2001) 1945-1948; Pang, P.T., et al. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity, *Science* 306 (2004) 487-491). Los aumentos de plasmina inducidos por la decorina en el CNS lesionado o enfermo por lo tanto puede aumentar los niveles de las neurotrofinas maduras disponibles para promover la regeneración del axón y la plasticidad en la médula espinal y cerebro, lesionados o enfermos aguda y crónicamente.

La decorina puede tener un efecto directo sobre las neuronas y puede des-sensibilizarlas eficazmente frente a los efectos inhibidores de crecimiento del axón de múltiples CSPG e inhibidores asociados a la mielina (Minor, K., et al. Decorin promotes robust axon growth on inhibitory CSPGs and myelin via a direct effect on neurons, *Neurobiol. Dis.* 32 (2008) 88-95). Se observaron aumentos robustos en el crecimiento del axón de 14,5 y 4,8 veces en neuronas sensoriales adultas tratadas con decorina que crecieron sobre los CSPG de la cicatriz inhibidores del crecimiento del axón y la mielina respectivamente (Minor, K., et al. Decorin promotes robust axon growth on inhibitory CSPGs and myelin via a direct effect on neurons, *Neurobiol. Dis.* 32 (2008) 88-95). El potencial para promover el crecimiento del axón a pesar de la presencia de inhibidores asociados a los CSPG y mielina hace que la infusión de decorina en los tejidos del SNC lesionados tenga un atributo importante para su uso como terapia potencial para promover la regeneración del axón y la plasticidad de la conexión en el SNC lesionado sub-aguda y crónicamente en el que se sabe que los niveles de esas moléculas inhibitoras son altos en la materia blanca y la materia gris (Tang, X., et al. Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue, *J. Neurosci. Res.* 71 (2003) 427-444; Schwab, M.E. Nogo and axon regeneration, *Curr. Opin. Neurobiol.* 14 (2004) 118-124). Los datos que se presentan en los ejemplos del presente documento muestran que el tratamiento de ratas adultas con lesiones por contusión de la médula espinal por medio de la infusión intratecal de decorina utilizando el nuevo paradigma de tratamiento de la presente invención puede promover el brote robusto de axones en la médula espinal, la plasticidad sináptica de las neuronas motoras medulares y una recuperación robusta de una variedad de funciones locomotoras.

Como se demuestra en los ejemplos posteriores, se ensayó la capacidad de la infusión intratecal de decorina humana para promover la recuperación funcional en un modelo de lesión por contusión de la médula espinal cervical en roedores relevante clínicamente. En la búsqueda para establecer un medio clínicamente relevante de administración de decorina al sistema nervioso central lesionado, se administró el centro proteico de decorina recombinante humana por vía intratecal a grupos distintos de ratas lesionadas en la médula espinal comenzando inmediatamente después de la lesión, 12 días después de la lesión de la médula espinal y 1 mes después de la lesión. Notablemente en el punto de tiempo de los 12 días y 1 mes tras la lesión, el tejido cicatricial del sistema nervioso central que inhibe del crecimiento del axón ya estaba bien establecido y la oportunidad de promover una neuroprotección significativa de las neuronas lesionadas estaba enormemente reducida. Entonces, se evaluó la capacidad de la decorina para promover la recuperación por medio de mecanismos que impliquen la promoción de la plasticidad de conexión de los circuitos neurales supervivientes. El tratamiento con decorina de las ratas adultas con lesiones de la médula espinal daba como resultado una recuperación funcional robusta de las funciones locomotoras según se medía por los análisis GridWalk/escalera horizontal y CatWalk. El análisis CatWalk de las ratas tratadas a los 12 días tras la lesión demostraba la recuperación tanto de las extremidades anteriores y posteriores en el lado lesionado después del tratamiento con decorina que se correlacionaba con una recuperación de ~85% de las puntuaciones de actuación en GridWalk/escalera horizontal. En particular, la sorprendente recuperación del uso tanto de los dedos de la extremidad delantera y trasera en las ratas con lesión de la médula espinal tratadas con decorina tenía implicaciones importantes en la capacidad potencial del tratamiento intratecal con decorina para promover la recuperación de la función de los dedos de la mano y el pie en seres humanos con lesiones en la médula espinal. Como se proporciona en los datos de la sección de Ejemplos, la recuperación

funcional que se observa en las ratas con lesión de la médula espinal tratadas hasta 12 días tras la lesión se correlacionaban con el aumento de la densidad de los axones del tracto corticoespinal (CST) adyacentes y por debajo del sitio de lesión y también el aumento de la densidad de la sinapsina-1 (una proteína que se expresa en las sinapsis activas) en los sitios por debajo de la materia gris del cuerno ventral. Estos hallazgos apoyan además que la infusión intratecal de decorina puede ser un tratamiento del sistema nervioso central del ser humano adulto lesionado por traumatismo o enfermo (cerebro y médula espinal). De manera importante, la capacidad de la decorina para promover la plasticidad de los circuitos de control motor importantes, tales como el tracto corticoespinal y la densidad de sinapsis activas en las neuronas motoras medulares, extiende la ventana terapéutica de la infusión intratecal de decorina a la promoción de la recuperación funcional a las lesiones del sistema nervioso central crónicas y sub-agudas.

Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención.

**Ejemplos**

Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra el efecto del tratamiento con decorina de acuerdo con la presente invención sobre la capacidad de ratas adultas con lesiones de la médula espinal para cruzar un Grid-Walk / escalera horizontal en comparación con ratas no tratadas.

Se ensayó el centro proteico de decorina humana, GALACORIN™ en un protocolo de tratamiento retardado (sub-agudo) para ratas adultas con lesiones en la médula espinal cervical. Se llevaron a cabo las lesiones de la médula espinal experimentales utilizando un dispositivo de Impacto Infinite Horizon (IH) (Precision Systems and Instrumentation, LLC) para generar una contusión unilateral moderadamente grave a nivel cervical (niveles vertebrales C4-C5; contusión unilateral en el lado derecho; diámetro de punta de 1,7 mm; fuerza 75 kDinas; desplazamiento 1,1 mm) en ratas adultas Sprague Dawley (hembras de tres meses de edad). Comenzando en el punto de tiempo de doce semanas tras la lesión de la médula espinal, las ratas con lesión en la médula espinal (n=9) se trataron con GALACORIN™ utilizando el nuevo paradigma de tratamiento en el que el GALACORIN™ se infundió en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y no directamente en los tejidos del sistema nervioso central de la médula espinal o el cerebro (Figura 2). Para conseguir el suministro en el LCR de GALACORIN™, se implantó una cánula de pequeño tamaño por medio de un pequeño agujero taladrado en el hueso occipital del cráneo (Figuras 1 y 2). Se retiró aproximadamente el 20% (0,1 ml) del total de líquido cefalorraquídeo y se sustituyó con un vehículo de solución salina fosfato tamponada (PBS) que contenía GALACORIN™ a una concentración de 5 mg/ml (es decir, 1 mg de GALACORIN™). Las cánulas se anclaron entonces al cráneo utilizando cemento dental y se conectaron a bombas osmóticas Alzet precargadas con solución salina que contenía GALACORIN™ a una concentración de 5 mg/ml para el suministro continuo intratecal a una velocidad de 0,1 mg de GALACORIN™ al día durante 8 días. Se administraron por lo tanto un total de 1,43 mg de GALACORIN™ durante el periodo de 8 días de infusión. Los grupos de control de ratas con lesión de la médula espinal sin tratar consistían en las que solo recibieron una cánula en la cisterna magna (grupo de control 1: n = 9 ratas) o la cánula en la cisterna magna más infusión de PBS (grupo de control 2: n = 7 ratas).

Después de la cirugía, tanto las ratas tratadas como no tratadas con GALACORIN™ se sometieron a ensayo del comportamiento neurológico durante un periodo de 6 semanas. El ensayo Grid-walk o escalera horizontal es un ensayo riguroso ampliamente reconocido de la recuperación locomotora de colocación voluntaria de la garra en roedores con lesión en la médula espinal en el que se registra el número medio de errores (fallos) que cometen las ratas al andar tres pasos en una escalera de longitud determinada. Los resultados de la recuperación funcional neurológica en Grid walk (Figura 3 y Tabla 1) demostraban claramente una reducción robusta del número de malos pasos (errores) durante el tiempo que se hacía en los animales tratados con GALACORIN™ en comparación con los grupos de control de animales lesionados en la medula espinal sin tratar. Al final de las 6 semanas tras comenzar el tratamiento de GALACORIN™ a los 12 días tras la lesión, las ratas tratadas con GALACORIN™ presentaban una robusta reducción del 61% en el número de errores en comparación con las puntuaciones conseguidas por las ratas con lesión de la médula espinal sin tratar que recibían solo una cánula en la cisterna magna (grupo de control 1) o las que eran infundidas de manera idéntica con solo el vehículo de PBS (grupo de control 2).

Tabla 1

Grupo Experimental	Malos pasos en Grid-walk Pre-tratamiento	Malos pasos Grid-walk a las 6 semanas post-tratamiento
SCI + Galacorin (n = 9 ratas)	12,67 (SD +/- 1,04)	3,78 (SD +/- 1,56)
Control 1 SCI + cánula (n = 9 ratas)	12,74 (SD +/- 0,10)	9,70 (SD +/- 2,16)
Control 2 SCI + PBS (n = 7 ratas)	13,07 (SD +/- 1,29)	9,71 (SD +/- 2,89)

Grupo Experimental	Malos pasos en Grid-walk Pre-tratamiento	Malos pasos Grid-walk a las 6 semanas post-tratamiento
SD = Desviación Estándar		

Los análisis histológicos de un grupo piloto de 4 ratas que recibieron una lesión por contusión de la médula espinal idéntica seguida por la infusión inmediata de GALACORIN™ marcado con Alexa-488 en la cisterna magna, mostraba que el GALACORIN™ que se administraba de esta manera era localizable tanto en los tejidos medulares lesionados así como en las meninges de alrededor (duramadre y aracnoides) y en las raíces del sistema nervioso periférico (raíces dorsal y ventral). En este análisis se hizo una lesión unilateral por contusión con un Impactador Infinite Horizon en ratas hembra adultas de tres meses de edad (n = 4) con una infusión aguda de GALACORIN™ marcada con Alexa-488 en la cisterna magna. El análisis histológico se llevó a cabo a las 18 horas tras la infusión. La imagen histológica del análisis era una sección de corte a nivel medular C5 (justo caudal al sitio de la lesión).

### Ejemplo 2

Este ejemplo es un análisis CatWalk de la recuperación locomotora de ratas lesionadas en la médula espinal tratadas con decorina en comparación con ratas lesionadas en la médula espinal no tratadas con decorina (control). También se llevó a cabo la comparación de los animales tratados y no tratados con marcaje de tejidos de la médula espinal con dextrano amina biotinilada (BDA). Se llevó a cabo un análisis cuantitativo automático de la marcha en todos los grupos experimentales utilizando el sistema CatWalk XT (Version 8.1, Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA). El sistema CatWalk se había descrito anteriormente con gran detalle (F.P. Hamers, et al. CatWalk-assisted gait analysis in the assessment of spinal cord injury. J. Neurotrauma 23, 537-548 (2006)). El sistema de hardware consiste en un camino de cristal translúcido bajo el que una videocámara (Fujinon Corporation, Japón) graba las huellas de las garras de las ratas según atraviesan el camino. La adquisición de los datos del CatWalk y los análisis se llevaron a cabo por individuos que eran ignorantes respecto a los grupos de tratamiento. Se recolectaron de cada animal tres ejecuciones que se consideraron conformes en cada punto de tiempo y se determinó el promedio de cada parámetro. La conformidad se determinó basándose en el tiempo total utilizado para atravesar el camino y la variación en la velocidad de la marcha. La longitud recorrida mínima era de 2 segundos; la longitud máxima fue de 12 segundos, y la variación máxima de velocidad de la marcha del 60%. La cámara se posicionó de manera que la longitud del camino medido eran 70 cm. Se ensayaron los animales de todos los grupos inmediatamente antes de la lesión, inmediatamente antes del tratamiento a los 12 días tras la lesión, y a las 5 semanas tras la lesión. Se analizaron los siguientes parámetros: área de la huella, área de la huella de máximo contacto, intensidad de la huella, contacto máximo respecto a la estación, e intensidad máxima en el contacto máximo. Los archivos de video de las ejecuciones conformes de todos los grupos se procesaron utilizando el software CatWalk. El uso de los dedos se determinó adquiriendo imágenes de las huellas en el punto de Contacto Máximo como define el software. Se seleccionaron de manera aleatoria las imágenes de las huellas en máximo contacto para cada extremidad de una manera seriada, seleccionándose 2 huellas por ejecución conforme para un total de 6 huellas seleccionadas aleatoriamente para las cuatro extremidades. Esta selección aleatoria se llevó a cabo sobre las imágenes recolectadas de todos los animales en los tres puntos de tiempo de evaluación. Las imágenes de huellas en máximo contacto se generaron utilizando la característica de visualización 3D del CatWalk XT 8.1. Las huellas de los dedos para cada imagen de huellas se contaron de manera ciega. Las mediciones de los parámetros estáticos y dinámicos de las huellas y la marcha se exportaron entonces a Microsoft Excel y se llevó a cabo el análisis estadístico utilizando el software SigmaStat.

### Cálculo del porcentaje de recuperación por puntuaciones de actuación locomotora CatWalk

Para estimar el porcentaje de recuperación con los resultados del GridWalk y CatWalk, se utilizaron las puntuaciones medias de cada grupo experimental medidas en los periodos pre-lesional, pre-tratamiento, y 5 semanas tras la lesión. A partir de estas medias, el cálculo del porcentaje de recuperación (% de Recuperación) se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{X_{\text{Post Les}} - X_{\text{Pre Tx}}}{X_{\text{Pre Les}} - X_{\text{Pre Tx}}} \times 100\%$$

donde

$X_{\text{Pre Les}}$  = Puntuación media del parámetro de comportamiento antes de la lesión

$X_{\text{Pre Tx}}$  = Puntuación media para el parámetro justo antes del tratamiento

$X_{\text{Post Les}}$  = Puntuación media para el parámetro a un tiempo específico tras la lesión

*Seguimiento anterógrado de la amina dextrano biotinilada (BDA) al tracto corticoespinal (CST) de la extremidad anterior*

5 Dos semanas antes de la eutanasia, todos los animales se anestesiaron y se colocaron en un instrumento estereotáxico (Kopf) para el seguimiento del CST de la extremidad anterior. Tras la exposición del cráneo, se hicieron cuatro perforaciones utilizando una broca quirúrgica y se inyectaron 4 inyecciones a presión de 0,5 ml de una solución al 10% de amina dextrano biotinilada (BDA PM 10,000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en la corteza sensoriomotora de la extremidad delantera izquierda (coordenadas estereotáxicas: 1,0 y 2,0 mm anteriores al bregma, 2,5 y 3,5 mm laterales a bregma, y 1,6 mm de profundidad en la superficie cortical).

10 Las inyecciones se hicieron por medio de capilaridad con cristal empujado finamente que permanecía en la posición durante 2 minutos después del suministro. A continuación de las inyecciones de BDA, los animales se suturaron y se les dejó en recuperación. Se llevó a cabo la visualización de los axones marcados con BDA en las secciones de cortes histológicos de los tejidos de la médula espinal con procedimientos de inmunohistoquímica convencionales (véase Davies J.E., et al. Astrocytes derived from glial restricted precursors promote spinal cord repair Journal of Biology 5:7 (2006)). Las secciones de médula espinal se visualizaron y se tomaron imágenes en un microscopio Zeiss Observer Z1 utilizando un software AxioVision.

*Análisis de densidad de CST/BDA y sinapsina-1 en la materia gris medular*

20 Se utilizó el software ImageJ para el umbral y para medir las densidades de los axones del CST marcados con BDA y la sinapsina-1. Las densidades del CST se midieron en la materia gris del cuerno dorsal a nivel medular C5. En cada sexta sección de una serie se midieron aproximadamente 400 mm de tejido. Las densidades de sinapsina-1 se midieron de manera similar por debajo de la cavidad de lesión (C6) en los cuernos ventrales alrededor de los grupos neuronales de la lámina IX.

*El análisis CatWalk muestra que la infusión intratecal de decorina promueve una recuperación robusta de la función locomotora y el uso de los dedos tras la lesión traumática de la médula espinal.*

30 Además del análisis Gridwalk, la recuperación de la función locomotora de los grupos experimentales se evaluó también utilizando el análisis de la marcha CatWalk a las 5 semanas tras la lesión / 3 semanas tras el tratamiento. Como había informado previamente Gensel, et al. (Behavior and histological characterization of unilateral cervical spinal cord contusion injury in rats. J. Neurotrauma 23, 36-54 (2006)) a continuación de una contusión cervical unilateral, no había cambios significativos en los parámetros dinámicos para las extremidades en el lado ipsilateral después de la lesión, tales como cambios en las posiciones de las huellas, la base del soporte, la longitud de zancada, o patrón de pisada. Sin embargo se encontraron cambios estadísticamente significativos en comparación con los valores pre-lesionales en el pre-tratamiento / 12 días tras la lesión en una variedad de parámetros específicos de la garra tales como en el área de huella, intensidad de huella, área de huella en máximo contacto, máximo contacto respecto a la estación, y máxima intensidad en máximo contacto (Figs. 4A- 4H).

*Área media de huella*

45 El área de huella se define como la superficie del área de una huella completa durante el tiempo completo que la garra está en contacto con la placa de cristal, comparable al método de tampón de tinta de determinación del área de huella (F.P. Hamers, et al. CatWalk-assisted gait analysis in the assessment of spinal cord injury. J. Neurotrauma 23, 537-548 (2006)). El análisis de las áreas de las huellas para los animales de experimentación revelaba valores comprobables con la línea base pre-lesional para las áreas de huellas medias de las extremidades derechas (ipsilaterales) traseras y delanteras en todas las ratas individuales antes de la lesión y antes del tratamiento. Las lesiones por contusión unilateral a nivel medular C4/C5 daba como resultado una reducción significativa de las áreas medias de huellas de las extremidades delantera y trasera ipsilaterales a los sitios de la lesión para todas las ratas de experimentación. El tratamiento con decorina de las ratas lesionadas en la médula espinal a los 12 días tras la lesión daba como resultado una recuperación estadísticamente significativa en el área media de huella tanto para las extremidades delanteras como traseras a las cinco semanas tras la lesión en comparación con las ratas lesionadas en la médula espinal no tratadas solo con solución salina y con un catéter.

55 El porcentaje de aumento de la recuperación del área media de huella se determinó restando los valores del área media pre-tratamiento de la línea base de los valores pre-lesionales y expresa los aumentos como un porcentaje de la diferencia. En comparación con los valores pre-tratamiento, las ratas con SCI tratadas con decorina mostraban una recuperación del 37,36% en el área media de la huella de la extremidad delantera derecha (Fig. 4B) y un 79,23% de recuperación en el área media de la huella de la extremidad trasera derecha (Fig. 4E) es decir, volviendo cerca de los niveles de la línea base pre-lesionales. Los animales tratados con solución salina presentaban una modesta recuperación del 26,08% en el área media de la huella de la extremidad delantera pero una pérdida adicional del 13,3% en el área media de la huella de la extremidad trasera a las cinco semanas tras la lesión (Figs. 4B y 4E) en comparación con los valores de pre-tratamiento. Las ratas con lesión en la médula espinal que recibieron un catéter y sin infusión presentaban un grado de recuperación del 9,45% cinco semanas tras la lesión en el área de huella media de la extremidad anterior y una pérdida en caída del 38,67% en el área de huella de la

extremidad trasera, es decir, una pérdida adicional de la función de la garra en comparación con el punto de tiempo de pre-tratamiento a los 12 días después de la lesión (Fig. 4B y 4E).

#### Área de la huella de máximo contacto

5 Durante la locomoción, cada garra genera un área de huella de máximo contacto, que se produce cuando progresa la fase de frenada a la fase de propulsión del contacto de las garras con el camino de cristal (manual del usuario de Noldus Catwalk XT 8.1: (F.P. Hamers, et al. CatWalk-assisted gait analysis in the assessment of spinal cord injury. J. Neurotrauma 23, 537-548 (2006))). Cada grupo de tratamiento tenía valores de base pre-lesionales para el área de  
10 huella de máximo contacto tanto de las extremidades anteriores como posteriores que no eran diferentes estadísticamente unas de otras. A los 12 días tras la lesión / punto de tiempo pre-tratamiento, todos los grupos de tratamiento presentaban reducciones significativas en las áreas de máximo contacto de las huellas de la extremidad anterior y extremidad posterior derechas ipsilaterales en comparación con los valores de la línea base. A las 5 semanas tras la lesión, las ratas con SCI tratadas con decorina presentaban una recuperación significativa en el  
15 área media de contacto máximo de las extremidades delantera y trasera derechas ipsilaterales con áreas de huella de máximo contacto para las extremidades delantera y trasera ipsilaterales que alcanzaban un 35,92% y un 88,82% de recuperación respectivamente. A las 5 semanas tras la lesión, los animales tratados con solución salina sin embargo presentaban una pequeña recuperación del 29,15% en el área media de máximo contacto de la extremidad delantera derecha y un 16,49% de pérdida en el área media de contacto máximo de la extremidad trasera derecha.  
20 Los animales con SCI sin tratar de control presentaban una recuperación incluso más pequeña del 14,34% en el área media de contacto máximo de la extremidad delantera derecha en comparación con las ratas tratadas con solución salina, y una pérdida incluso mayor del 43,35% del área media de contacto máximo en comparación con los valores pre-tratamiento a las 5 semanas tras la lesión / 3 semanas post-tratamiento (Figs. 4C y 4F).

#### 25 Intensidad media de la huella

Los valores de la intensidad de la huella son directamente proporcionales a la presión que ejerce la garra cuando está en contacto con la placa de cristal (F.P. Hamers, et al. CatWalk-assisted gait analysis in the assessment of spinal cord injury. J. Neurotrauma 23, 537-548 (2006)). La SCI resultaba en déficits significativos constantes en la  
30 intensidad media de las huellas de las extremidades delanteras y extremidades traseras derechas a lo largo de los grupos de tratamiento. A las 5 semanas tras la lesión los animales tratados con decorina presentaban una recuperación estadísticamente significativa del 10,84% en los valores medios de intensidad de la huella de la extremidad delantera derecha, y una recuperación del 89,28% en la intensidad media de la huella de la extremidad trasera derecha. Sin embargo los animales tratados con solución salina presentaban un 41,16% de pérdida de la  
35 intensidad media de la huella en la extremidad delantera derecha y una recuperación del 6,53% en la intensidad media de la huella de la extremidad trasera derecha. Los controles con SCI no tratados presentaban una pérdida del 58,87% de la intensidad media de la huella de la extremidad delantera derecha y una pérdida de la intensidad media de la huella en la extremidad trasera derecha (Fig. 4A y 4D).

#### 40 Máximo contacto en porcentaje en estación

Este parámetro como se define en el presente documento es el periodo de tiempo durante el cual la garra está en contacto con el camino de cristal (al que se hace referencia como la "estación") y el punto de máximo contacto que divide la fase de frenado de la fase de propulsión (conocido de otra manera como máximo contacto en %: Manual  
45 Noldus). Aunque cada garra se utiliza tanto para el frenado y la propulsión, las extremidades delanteras y las extremidades traseras se utilizan de manera diferente durante cada estación. Las extremidades anteriores se utilizan predominantemente para el frenado, mientras que las extremidades posteriores se utilizan principalmente para la propulsión (Webb, A.A., et al. Compensatory locomotor adjustments of rats with cervical or thoracic spinal cord hemisections, J. Neurotrauma 19, 239-256 (2002); Webb, A.A., et al. Unilateral dorsal column and rubrospinal tract  
50 injuries affect overground locomotion in the unrestrained rat, Eur. J. Neurosci. 18, 412-422 (2003)). Por lo tanto, las extremidades traseras tienen un porcentaje mayor de estación (duración de contacto con en cristal) unido a la propulsión, y por lo tanto el área de huella alcanza un máximo contacto antes en la estación. El CatWalk mide este parámetro que es el porcentaje de estación cuando la extremidad trasera alcanza el máximo contacto. Por lo tanto, antes de la lesión, las extremidades traseras alcanzan el máximo contacto con un porcentaje menor de estación en  
55 comparación con las extremidades delanteras, debido a su papel en la propulsión durante la locomoción.

El modelo de lesión por contusión cervical de los inventores daba como resultado un déficit funcional en el que la extremidad trasera derecha que alcanzaba un contacto máximo con un porcentaje significativamente mayor de la estación (Máximo Contacto en %) en comparación con los valores de la línea base pre-lesionales en todos los  
60 animales. A las cinco semanas tras la lesión, los animales tratados con decorina presentaban una disminución significativa en el máximo contacto en % de la extremidad trasera derecha, que correspondía con un 56,38% de recuperación de la propulsión en esta extremidad (Fig. 4H). Los animales tratados con solución salina presentaban un descenso mínimo en el máximo contacto en % (una mejoría del 17,46%), mientras que los controles con SCI no tratados continuaban presentando una pérdida de función a las cinco semanas tras la lesión (una pérdida de función del 5,52%). Por lo tanto, el tratamiento con decorina promovía una vuelta hacia la división normal del uso de frenado  
65 frente a propulsión en la extremidad trasera del lado lesionado del animal, permitiendo en último término una

propulsión mejorada de la extremidad trasera durante la locomoción (Fig. 4H). [Nótese que en el título de la Figura 4H debería leerse “Máx. Contacto en % de la extremidad trasera derecha” y NO “Máx. Contacto en Media de la extremidad trasera derecha”] Corrijan esto por favor en los archivos Excel.

5 *Máxima intensidad de máximo contacto*

La máxima intensidad en el punto de máximo contacto es una medida de la presión y soporte del peso ejercido en la placa de cristal durante la frontera entre las fases de frenado y propulsión (Noldus Catwalk manual: (F.P. Hamers, et al. CatWalk-assisted gait analysis in the assessment of spinal cord injury. J. Neurotrauma 23, 537-548 (2006))). El modelo de lesión por contusión cervical de los inventores producía una reducción estadísticamente significativa de este parámetro en comparación con los valores de la línea base, que indicaban la disfunción durante la transición entre las fases de frenado y propulsión. Las ratas con SCI tratadas con decorina presentaban una recuperación del 63,51% en este parámetro en la extremidad trasera derecha cinco semanas tras la lesión, mientras que los animales tratados con solución salina presentaban una recuperación mucho más pequeña del 17,81% y los controles sin tratar presentaban una pérdida mayor del 37,02% cinco semanas tras la lesión (Fig. 4G).

*Dedos en máximo contacto*

Hamers, et al. (CatWalk-assisted gait analysis in the assessment of spinal cord injury. J. Neurotrauma 23, 537-548 (2006)) habían demostrado anteriormente que en el punto de máximo contacto, casi todos los dedos de la garra estarán en contacto con la placa de cristal en las extremidades traseras de las ratas normales no lesionadas. El estudio de los inventores confirmaban esto, y también demostraban que cuando la garra delantera alcanza el máximo contacto con la placa de cristal en las ratas lesionadas, todos los dedos ( $3,89 \pm 0,04$  de 4 dedos posibles) hacen contacto con el cristal en este punto también. Para la extremidad trasera en el estudio de los inventores, los animales no lesionados presentaban una media de  $3,75 \pm 0,11$  de 5 dedos a máximo contacto (Tabla 2). El modelo de lesión por contusión cervical de los inventores daba como resultado una reducción significativa del número medio de huellas de dedos en máximo contacto, tanto en las garras delanteras ( $1,95 \pm 0,12$  dedos) como en las garras traseras ( $1,26 \pm 0,14$  dedos) ipsilaterales a la lesión en los puntos de tiempo de 12 días tras la lesión / pre-tratamiento. Las ratas con SCI tratadas con decorina presentaban una recuperación significativa con una media de  $3,76 \pm 0,58$  de huellas de dedos de la garra delantera a las 5 semanas tras la lesión, y de  $3,88 \pm 0,69$  huellas de dedos de la garra trasera. Las ratas tratadas con solución salina presentaban una recuperación menor en el número de huellas de dedos en contacto máximo, con  $2,58 \pm 0,47$  huellas de dedos de la garra anterior y  $1,37 \pm 0,78$  huellas de dedos de la garra posterior. Los controles sin tratamiento presentaban incluso menos huellas de dedos en máximo contacto, con medias de  $2,19 \pm 0,60$  en las garras anteriores, y  $0,96 \pm 0,68$  en las garras posteriores.

Como se muestra en la Tabla 2, el análisis CatWalk demostraba que la infusión intratecal de decorina promovía la recuperación del uso de los dedos de la garra en ratas con lesiones en la médula espinal. Las ratas lesionadas en la médula espinal tratadas con decorina presentaban huellas de la garra a máximo contacto con números de contacto digital extraordinariamente similares a las huellas antes de la lesión al contrario de las ratas de control lesionadas en la médula espinal sin tratar que no presentaban recuperación del uso de los dedos a las 5 semanas tras la lesión de la médula espinal en comparación con las puntuaciones pre-tratamiento.

Tabla 2

Análisis CatWalk		
	Sin tratamiento	Tratadas con decorina
Uso de los dedos de la garra delantera derecha (4 máx.)	2,2 +/- 1,3 SD	3,8 +/- 0,6 SD
Uso de los dedos de la garra trasera derecha (5 máx.)	1,0 +/- 1,5 SD	3,9 +/- 1,4 SD

45 Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra el efecto de la administración de decorina de acuerdo con la presente invención en distintos puntos de tiempo (tiempo = 0, 12 días, 1 mes) después de la lesión en la actuación de las ratas lesionadas en la médula espinal en el análisis GridWalk.

Se analizaron los beneficios de la infusión intratecal de la decorina en la cisterna magna de ratas adultas con lesiones por contusión unilateral a niveles medulares cervicales C4/C5. Este análisis comenzaba o inmediatamente tras la lesión o 1 mes después de la lesión utilizando un número comparable de animales por grupo experimental y un protocolo de infusión, quirúrgico y de ensayo del comportamiento GridWalk/escalera horizontal idéntico al que se ha descrito para los resultados que se obtienen con la infusión de decorina a los 12 días después de la lesión de la médula espinal. Como se muestra en la Figura 5 había reducciones robustas del número de malos pasos en las ratas al cruzar la escalera horizontal para todas las ratas tratadas con decorina en comparación con las ratas lesionadas en la médula espinal de control sin tratar que recibían solo la cánula en la cisterna magna pero sin infundir decorina. Las puntuaciones de la actuación que se muestran en la Figura 5 representan las puntuaciones de actuación (malos pasos) a las 8 semanas tras la lesión para las ratas lesionadas en la médula espinal por contusión cervical tratadas con infusión de decorina intratecal que comenzaban en: punto de tiempo Agudo (inmediatamente

después de la lesión), 12 días (12d) y Crónico 1 mes (1 mes), tras la lesión.

#### Ejemplo 4

- 5 Este ejemplo ilustra el efecto del tratamiento con decorina sobre el aumento en la densidad colateral del CST en la materia gris adyacente o debajo de los sitios de la lesión.

Los estudios previos habían demostrado déficits significativos en la función de la extremidad anterior tras la lesión por contusión cervical unilateral a nivel C4-C5 a pesar de la escasa materia blanca de la columna de CST dorsal, y se ha demostrado que el brote colateral del CST a nivel cervical se correlaciona con la recuperación locomotora tras la lesión en la médula espinal (Schucht, P., et al. Anatomical correlates of locomotor recovery following dorsal and ventral lesions of the rat spinal cord, *Exp. Neurol.* 176, 143-153 (2002)). Este ejemplo evalúa la capacidad de la infusión intratecal de decorina para promover la plasticidad colateral del CST del axón en la supervivencia de la materia gris caudal a los sitios de la lesión. En las ratas con SCI tratadas con decorina y sin tratar, se inyectó amina dextrano biotinilada (BDA) en el área de la extremidad anterior de la corteza sensoriomotora del hemisferio izquierdo para hacer el seguimiento de los axones y colaterales de la lámina V de las neuronas motoras superiores en el lado del CST derecho de la médula espinal cervical. El análisis seriado de secciones histológicas de materia gris de las médulas espinales tratadas con decorina frente a las no tratadas, en los sitios por encima, adyacentes, y por debajo de la lesión revelaba que los cambios más significativos en la densidad colateral del CST + BDA se encontraban en la materia gris dorsomedial de la lámina 1-5 (Fig.6), un campo terminal del CST conocido por su función del soporte sensoriomotor. Los colaterales de los axones del CST de la extremidad delantera presentaban una extensa ramificación y arborización en la materia gris dorsomedial de las láminas 1-5 caudales a los sitios de la lesión cuando se comparaban con los controles sin tratar. El análisis cuantitativo de secciones en serie demostraban que el tratamiento con decorina promovía un aumento de 2,8 veces en la densidad de los axones del CST marcados con BDA en la materia gris dorsomedial de las láminas 1-5 frente a lo que se observaba en las médulas espinales no tratadas (Fig. 6).

#### Ejemplo 5

- 30 Este ejemplo ilustra la capacidad de la infusión intratecal de decorina para promover la plasticidad sináptica en la materia gris ventral de los grupos neuronales motores.

Se analizó la plasticidad sináptica en la materia gris de médulas espinales lesionadas tratadas con decorina y controles sin tratar, enfocándose en la sinapsina-1, una proteína pre-sináptica que se encuentra en sinapsis activas y que se sabe que tiene papeles en la maduración sináptica y el mantenimiento de la sinapsis a largo plazo y la transmisión (Lu, B. Expression of synapsin I correlates with maturation of the neuromuscular synapse, *Neuroscience* 74, 1087-1097 (1996); Thiel, G. Synapsin I, synapsin II, and synaptophysin: marker proteins of synaptic vesicles, *Brain Pathol.* 3, 87-95 (1993); Gulino, R., et al. Synaptic plasticity modulates the spontaneous recovery of locomotion after spinal cord hemisection, *Neurosci. Res.* 57, 148-156 (2007); Koelsch, A., et al. Transgene-mediated GDNF expression enhances synaptic connectivity and GABA transmission to improve functional outcome after spinal cord contusion, *J Neurochem.* 113, 143-152 (2010); Mundy, W.R., et al. Protein biomarkers associated with growth and synaptogenesis in a cell culture model of neuronal development, *Toxicology* 249, 220-229 (2008); De, C.P., et al. Synapsin I (Protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. II. Its specific association with synaptic vesicles demonstrated by immunocytochemistry in agarose-embedded synaptosomes, *J Cell Biol.* 96, 1355-1373 (1983)). La inmunodensidad de sinapsina-1 estaba elevada en la materia gris ventral por debajo del nivel de la lesión en el nivel C6 medular para los grupos de neuronas motoras de la lámina IX que controlan el movimiento de la extremidad anterior. Como se muestra en la Figura 7, las médulas espinales tratadas con decorina presentaban aumentos sorprendentes en la inmunodensidad de sinapsina-1 en la materia gris ventral en comparación con los controles no tratados. En las médulas espinales tratadas con decorina, se observaron niveles aumentados de sinapsina-1 puntuales tanto en los cuerpos celulares neuronales como en las dendritas, con poca o ninguna evidencia de sinapsina-1 asociada directamente con GFAP + cuerpos celulares de astrocitos o procesos. Los análisis seriados cuantitativos de las secciones revelaron un aumento de 3,2 veces en la inmunodensidad de sinapsina-1 en la lámina IX de C6 de los grupos de neuronas motoras en las médulas tratadas con decorina en comparación con las médulas de control sin tratar (Fig. 7).

55



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una decorina o un fragmento funcional de la misma para su uso en un método de tratamiento de una afección neurológica traumática del sistema nervioso central (SNC) en un paciente, en el que la decorina o fragmento funcional de la misma se administra en la cavidad intratecal del paciente sin administración directa de la decorina o el fragmento funcional de la misma en los tejidos del sistema nervioso central.
- 10 2. La decorina o fragmento funcional de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la decorina o fragmento funcional de la misma se administra en una parte de la cavidad intratecal que se selecciona de entre el grupo que consiste en la cisterna cerebellomedullaris (cisterna magna), la cavidad intratecal a nivel de la médula espinal cervical, torácica, lumbar y sacra, y la infusión en el líquido cefalorraquídeo (LCR) que rodea la cauda equina.
- 15 3. La decorina o el fragmento funcional de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la decorina es la decorina humana, o un fragmento funcional de la misma.
- 20 4. La decorina o un fragmento funcional de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, en el que la decorina, o fragmento funcional de la misma, está modificada químicamente.
- 25 5. La decorina o el fragmento funcional de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3 o 4, en el que la afección neurológica traumática se selecciona de entre el grupo que consiste en una lesión cerebral traumática, una lesión de la médula espinal traumática, ictus, síndrome de médula espinal anclada, e isquemia hipóxica global.
- 30 6. La decorina o el fragmento funcional de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la decorina, o el fragmento funcional de la misma, se administra aproximadamente a las 24 horas después de producirse la afección neurológica traumática.
- 35 7. La decorina o el fragmento funcional de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la decorina, o el fragmento funcional de la misma se empieza a administrar tras aproximadamente 1 mes después de que se produzca la afección neurológica traumática.
- 40 8. La decorina o el fragmento funcional de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el uso comprende además que se administre un tratamiento adicional para la afección neurológica traumática.
- 45 9. La decorina o el fragmento funcional de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el tratamiento adicional que se administra para tratar una afección neurológica traumática comprende agentes anti-inflamatorios, agentes reductores de la temperatura, inmovilización, terapias basadas en trasplante celular, terapias basadas en infusión celular, implante de biomateriales, infusión intratecal de nano-partículas liberadoras de SLRP, terapias de ejercicio, terapias de rehabilitación basadas en la estimulación funcional eléctrica, intervenciones quirúrgicas, terapias del SNC basadas en hipotermia inducida clínicamente e intervenciones basadas en terapia genética.
- 50 10. La decorina o el fragmento funcional de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la decorina o el fragmento de la misma estabiliza la afección neurológica traumática en el paciente.
- 55 11. La decorina o el fragmento funcional de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se administra mediante una embolada de decorina, o el fragmento de la misma, al paciente.
- 60 12. La decorina o el fragmento funcional de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que se administra por suministro continuo de la decorina, o el fragmento de la misma, al paciente.
- 65 13. La decorina o el fragmento funcional de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la afección neurológica produce pérdida de la función neurológica en el paciente y en el que el uso da como resultado la recuperación de la función neurológica en el paciente.
14. La decorina o el fragmento funcional de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el uso da como resultado una mejoría con un indicio, en comparación con un control, que se selecciona de entre el grupo que consiste en un aumento de la extensión y ramificación del axón, un aumento de la extensión de dendritas, ramificación y formación de espinas neuronales, promoción de la sinaptogénesis en el sistema nervioso central enfermo o lesionado, regulación positiva de los niveles proteicos de plasminógeno, regulación positiva de los niveles proteicos de plasmina, supresión de las acciones inhibitoras del crecimiento del axón por la cicatriz de glía, supresión de la síntesis de inhibidores del crecimiento del axón asociados a la cicatriz de glía, inhibidores del crecimiento del axón asociados a la materia gris y mielina, supresión de la inflamación, supresión de astrogliosis, supresión de la síntesis aberrante de múltiples proteoglicanos de sulfato de condroitina inhibidores del crecimiento del axón, supresión de la formación de la cicatriz fibrótica, supresión de los niveles de cadenas laterales de

glucosaminoglicano / centro proteico de múltiples proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG) inhibidores del crecimiento del axón y des-sensibilización de las neuronas a la influencia de moléculas inhibidoras del crecimiento del axón.

5 15. La decorina o el fragmento funcional de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la decorina comprende un centro proteico de decorina humana.

16. La decorina o el fragmento funcional de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la decorina es un centro proteico de decorina humana.

10

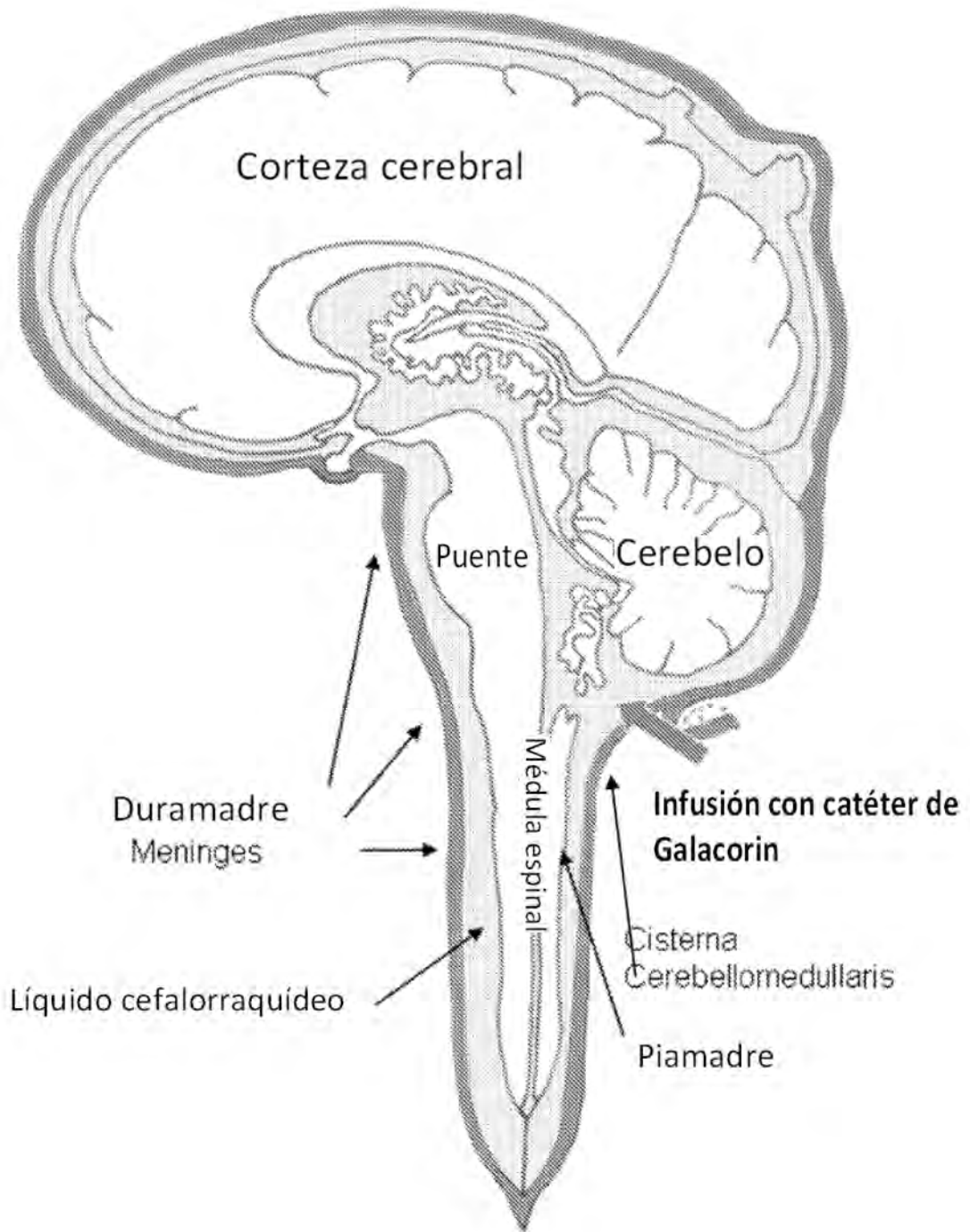


Figura 1

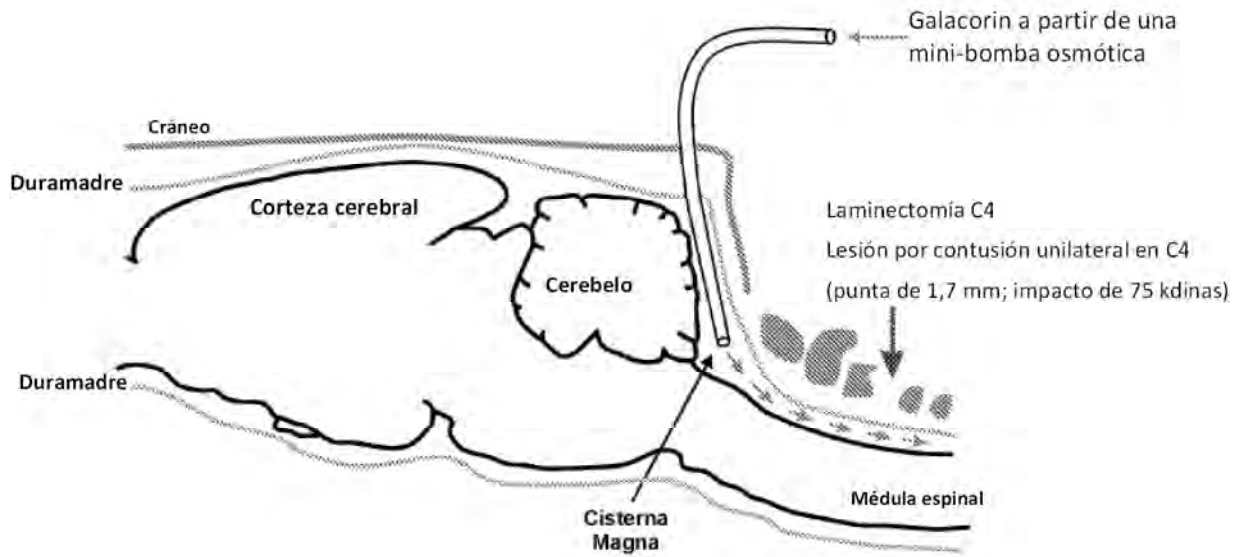


Figura 2

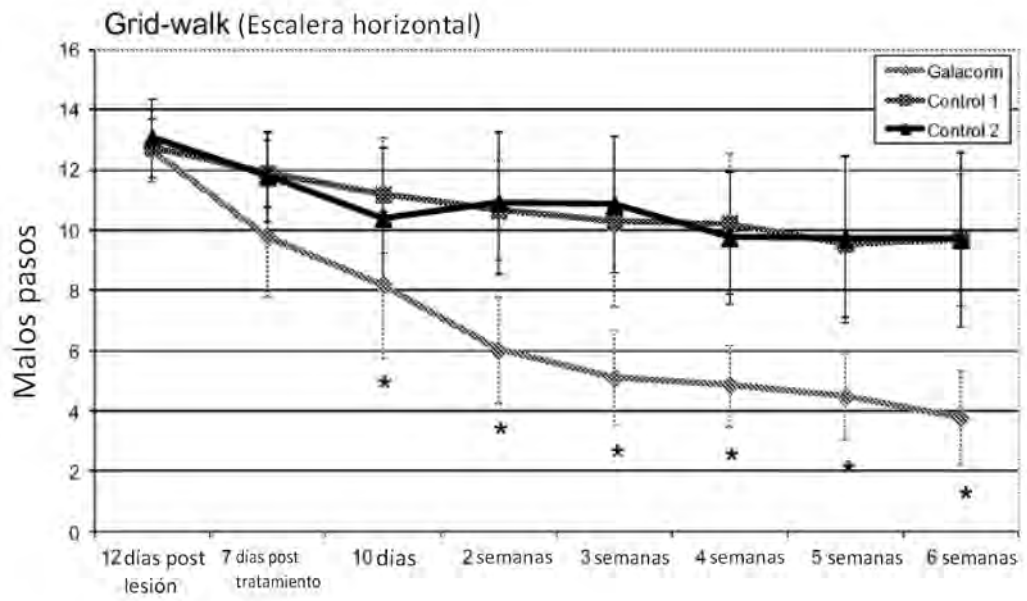


Figura 3

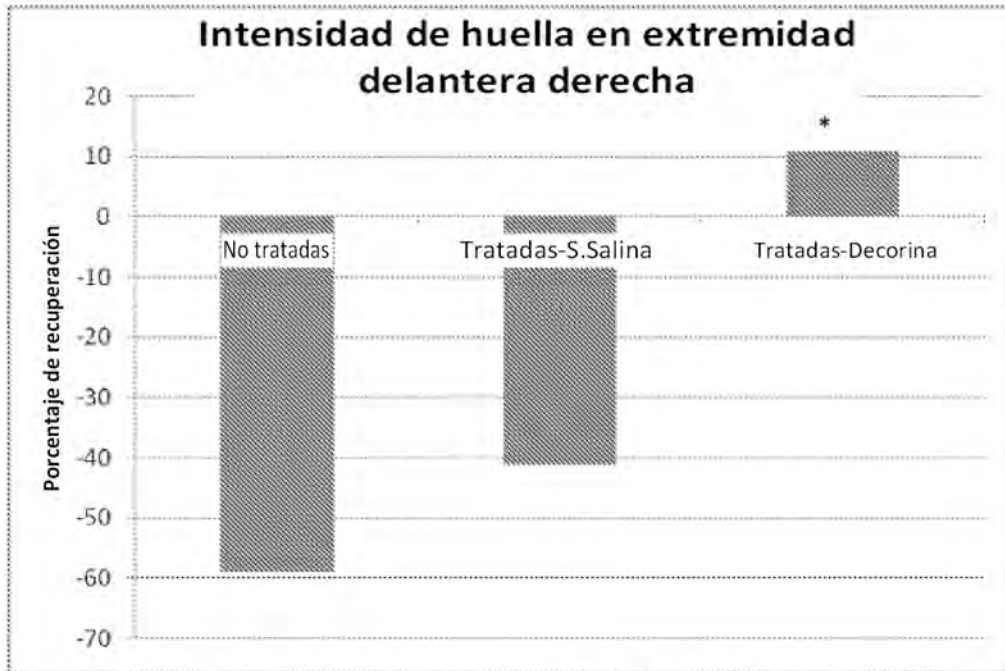


Figura 4A

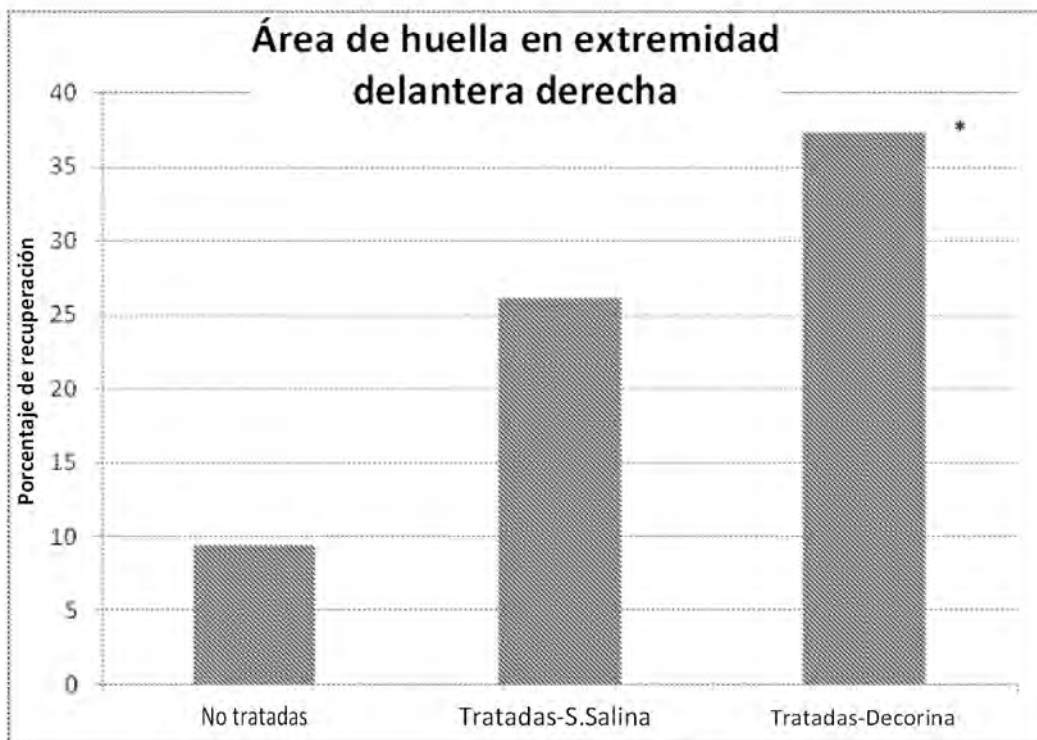


Figura 4B

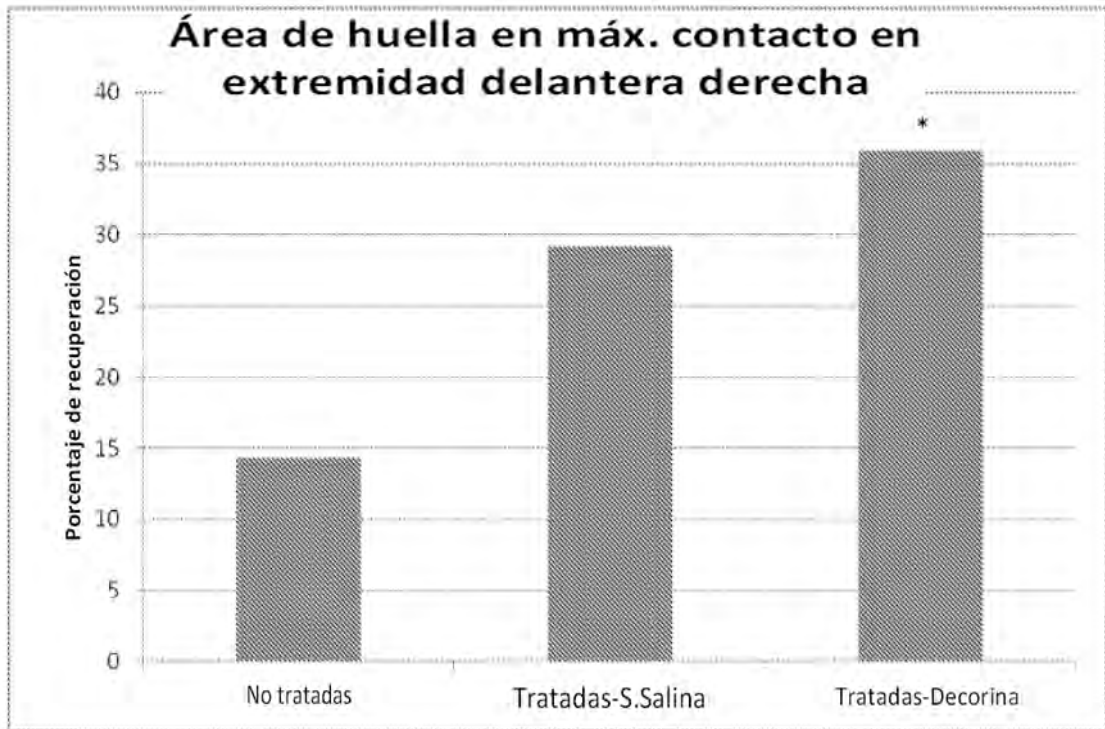


Figura 4C



Figura 4D

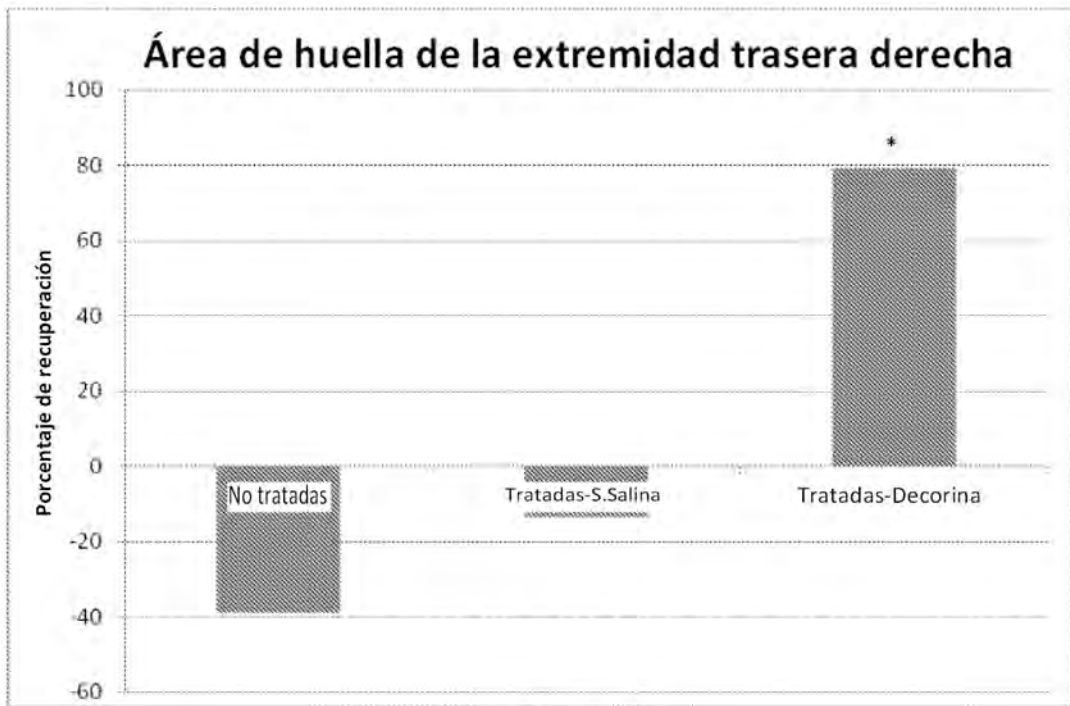


Figura 4E

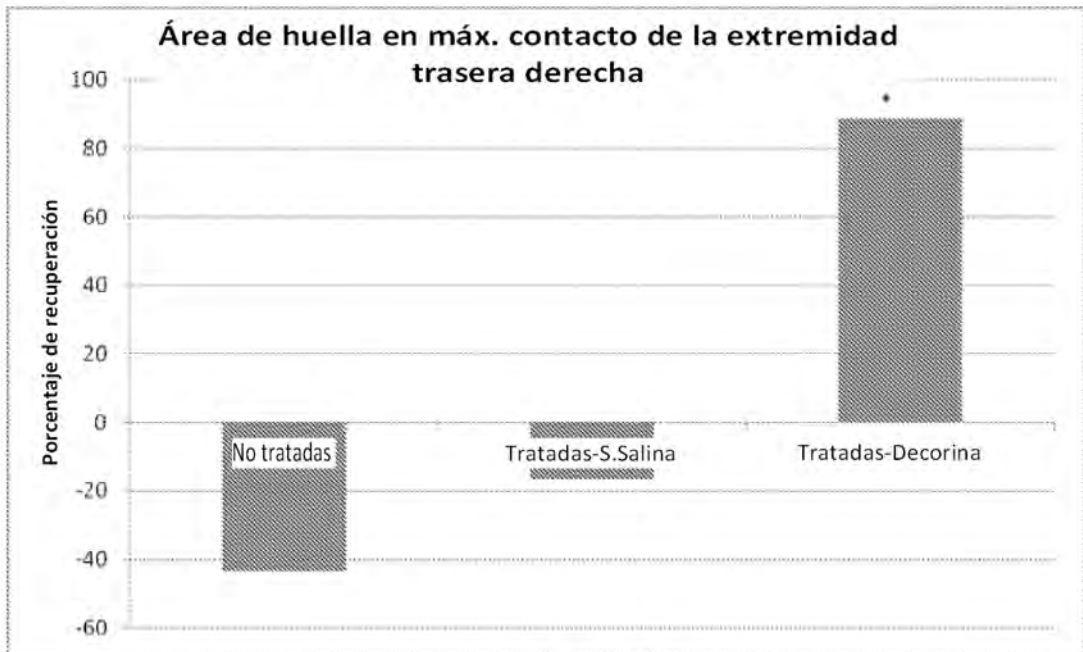


Figura 4F





Figura 4G



Figura 4H

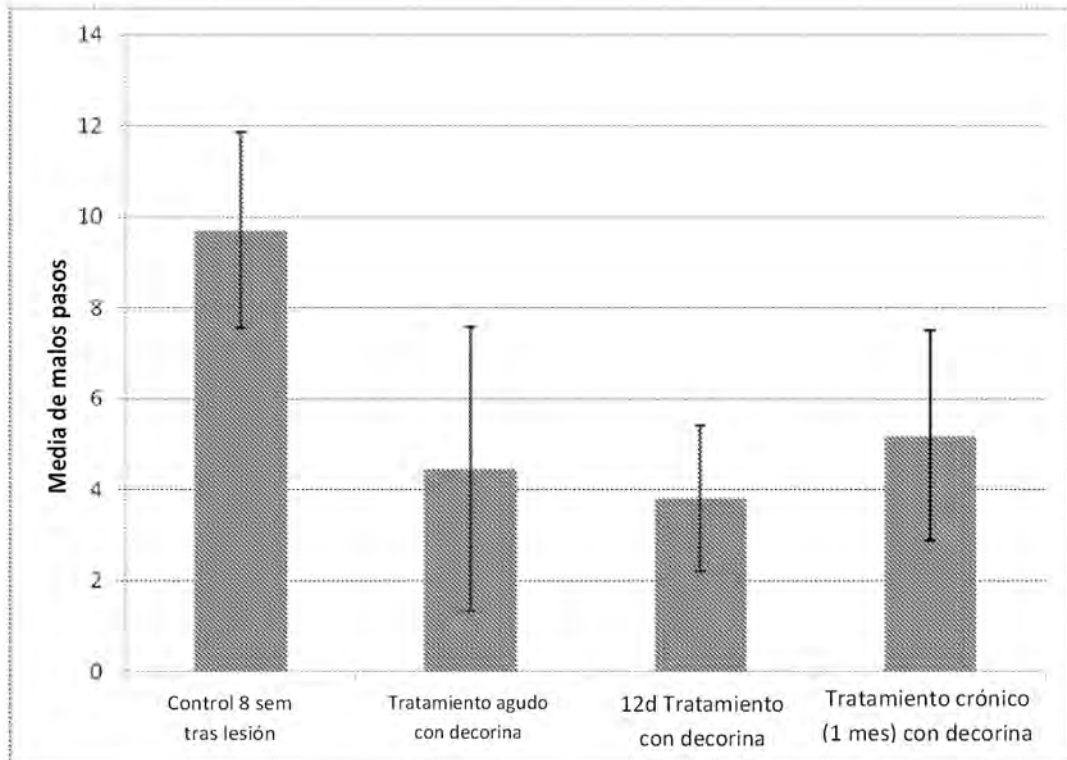
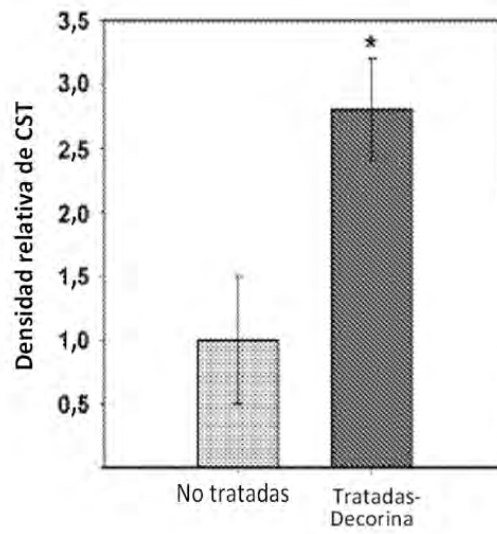
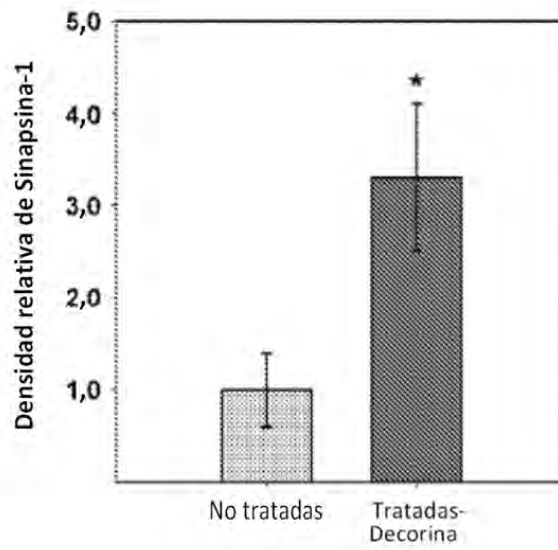


Figura 5



**Figura 6**



**Figura 7**