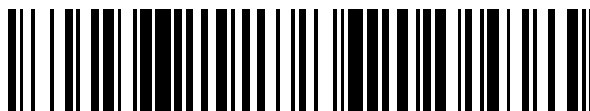


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 612**

51 Int. Cl.:

A61K 38/43 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)
C12N 9/36 (2006.01)
C12N 9/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2004 E 04782579 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 1673104**

54 Título: **Administración de compuestos terapéuticos al cerebro y otros tejidos**

30 Prioridad:

29.08.2003 US 651493

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

05.02.2014

73 Titular/es:

BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC. (100.0%)
105 Digital Drive
Novato, CA 94949 , US

72 Inventor/es:

KAKKIS, EMIL, D.

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 441 612 T3

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

DESCRIPCIÓN

Administración de compuestos terapéuticos al cerebro y otros tejidos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la administración intratecal (IT) de una enzima recombinante para tratar trastornos de almacenamiento lisosómico. Se contempla, además, la inducción de tolerancia específica de antígeno antes de la administración intratecal de enzima de sustitución.

10

Antecedentes de la invención

El cerebro está protegido contra sustancias potencialmente perjudiciales por la barrera hematoencefálica (BHE). La barrera microvascular entre la sangre y el cerebro está compuesta por una capa de endotelio capilar rodeada por una membrana de base y células accesorias estrechamente asociadas (pericitos, astrocitos). El endotelio capilar cerebral es mucho menos permeable a solutos de bajo peso molecular que otros endotelios capilares debido a una banda apical de asociación estrecha entre las membranas de células adyacentes, denominadas como uniones estrechas. Además de una difusión pasiva reducida, los endotelios capilares cerebrales también muestran menos pinocitosis de fase fluida que otras células endoteliales. Los capilares cerebrales poseen menos ventanas y pocas vesículas endocíticas, en comparación con los capilares de otros órganos (véase Pardridge, J. Neurovirol. 5: 556-569 (1999)). Existe poco tránsito a través de la BHE de moléculas hidrófilas grandes aparte de algunas proteínas específicas tales como transferrina, lactoferrina y lipoproteínas de baja densidad, que son captadas por endocitosis mediada por receptores (véase Pardridge, J. Neurovirol. 5: 556-569 (1999)); Tsuji y Tamai, Adv. Drug Deliv. Rev. 36: 277-290 (1999); Kusuha y Sugiyama, Drug Discov. Today 6: 150-156 (2001); Dehouck, y col. J. Cell. Biol. 138: 877-889 (1997); Fillebeen, y col. J. Biol. Chem. 274: 7011-7017 (1999)).

La barrera hematoencefálica (BHE) también impide el acceso de agentes activos beneficiosos (por ejemplo, fármacos terapéuticos y agentes de diagnóstico) a tejidos del sistema nervioso central (SNC), que necesitan el uso de vehículos para su tránsito. La permeabilidad de la barrera hematoencefálica es frecuentemente un factor limitante de la velocidad para la penetración de fármacos o péptidos en el SNC (véase Pardridge, J. Neurovirol. 5: 556-569 (1999); Bickel, y col., Adv. Drug Deliv. Rev. 46: 247-279 (2001)). Por ejemplo, la gestión de las manifestaciones neurológicas de enfermedades de almacenamiento lisosómico (EAL) es impedida significativamente por la incapacidad de enzimas terapéuticas de acceder a los lisosomas de células cerebrales. Las EAL se caracterizan por la ausencia o la actividad reducida de enzimas específicas dentro de los lisosomas celulares, dando como resultado la acumulación de "material de almacenamiento" no degradado dentro del lisosoma intracelular, hinchazón y mal funcionamiento de los lisosomas, y en última instancia daño celular y tisular. La terapia de sustitución enzimática intravenosa (TSE) es beneficiosa para EAL (por ejemplo MPS I, MPS II). Sin embargo, la BHE bloquea la libre transferencia de muchos agentes desde la sangre al cerebro, y no se espera que las EAL que se presentan con secuelas neurológicas significativas (por ejemplo MPSI, MPS III, MLD, GM1) sean tan sensibles a TSE intravenosa. Para dichas enfermedades, un método de administración de la enzima de sustitución a través de la BHE y al interior de los lisosomas de las células afectadas sería altamente deseable.

Existen varias maneras de sortear la BHE para mejorar la administración al cerebro de un agente activo administrado e incluyen inyección intracraneal directa, permeabilización transitoria de la BHE y modificación del agente activo para alterar la distribución tisular. La inyección directa de un agente activo al interior del tejido cerebral evita la vasculatura completamente, pero adolece principalmente del riesgo de complicaciones (infección, daño tisular) incurridas por inyecciones intracraneales y mala difusión del agente activo desde el sitio de administración. La permeabilización de la BHE conlleva comprometer de forma no específica la BHE concomitante con la inyección de agente activo intravenoso y se consigue relajando las uniones estrechas mediante choque hiperosmótico (por ejemplo manitol intravenoso). La elevada osmolaridad plasmática conduce a deshidratación del endotelio capilar con colapso parcial de las uniones estrechas, poca selectividad en los tipos de sustancias transportadas por la sangre que consiguen acceder al cerebro en estas condiciones y daño en el transcurso de un régimen de tratamiento de por vida.

La distribución de un agente activo en el interior del cerebro también puede incrementarse mediante transcitosis, el transporte activo de ciertas proteínas desde el espacio luminal (lado de la sangre) al espacio abluminal (lado del cerebro) de la BHE. Las rutas de transcitosis son distintas de otro tráfico vesicular dentro de la célula del endotelio capilar y el tránsito puede producirse sin alteración de los materiales transportados. La transcitosis es un proceso específico del tipo celular mediado por receptores en la superficie endotelial de la BHE. Se espera que la unión de un agente activo a una proteína transcitosada (vector o vehículo) incremente la distribución de la sustancia activa al cerebro. En transcitosis, se presume que el vector tiene un efecto dominante sobre la distribución del par unido. Las proteínas vectoriales incluyen anticuerpos dirigidos a receptores en el endotelio capilar cerebral (Pardridge, J. Neurovirol. 5: 556-569 (1999)) y ligandos para dichos receptores (Fukuta, y col., 1994, Pharm Res. 1994; 11 (12): 1681-8; Broadwell, y col., Exp Neurol. 1996; 142(1): 47-65)). Los vectores de anticuerpo son transportados a través del endotelio capilar mediante un proceso de endocitosis adsorbtiva (endocitosis de fase de membrana no específica) y son transportados de manera mucho menos eficaz que los ligandos del receptor reales, que cruzan la BHE

mediante un mecanismo saturable, dependiente de energía (Broadwell, y col., *Exp Neurol.* 1996; 142(1): 47-65).

La administración directa de proteínas al interior de la sustancia cerebral no ha conseguido un efecto terapéutico significativo debido a barreras a la difusión y el limitado volumen de agente terapéutico que puede administrarse. La difusión asistida por convección se ha estudiado mediante catéteres colocados en el parénquima cerebral usando infusiones lentas a largo plazo (Bobo, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 91, 2076-2080 (1994); Nguyen, y col. *J. Neurosurg.* 98, 584-590 (2003)), pero terapias no aprobadas usan actualmente este enfoque para terapia a largo plazo. Además, la colocación de catéteres intracerebrales es muy invasiva y menos deseable como alternativa clínica.

La inyección Intratecal (IT), o la administración de proteínas al líquido cefalorraquídeo (LCR), también se ha intentado pero ha producido solamente un éxito moderado en unos pocos ejemplos de administración mediante el LCR [Dittrich y col., *Exp. Neurol.* 141: 225-239 (1996); Ochs y col., *Amyotroph. Lateral. Scler. Other Motor Neuron Disord.* 1: 201-206 (2000); Bowes y col., *Brain Res.* 883: 178-183 (2000)]. Para el factor de crecimiento nervioso (FCN), la administración del factor al interior del ventrículo del cerebro, tenía algunos efectos beneficiosos sobre el cerebro (Koliatsos y col., *Exp. Neurol.* 112, 161-173 (1991), pero no mostraba difusión significativa al interior de la sustancia cerebral. Un desafío fundamental en este tratamiento ha sido la tendencia del factor a unirse al revestimiento ependimario del ventrículo muy estrechamente lo que impedía la posterior difusión. Actualmente, no existen productos aprobados para el tratamiento de enfermedades genéticas del cerebro mediante administración terapéutica directamente al LCR.

Los desafíos en el tratamiento del cerebro con estos y otros agentes terapéuticos estudiados en el pasado han sugerido que la barrera a la difusión en la superficie del cerebro, así como la falta de difusión y la eficacia del tratamiento del cerebro, eran un obstáculo demasiado grande para conseguir un efecto terapéutico adecuado en el cerebro para cualquier enfermedad. Las evidencias anteriores sugieren que la terapia enzimática intraventricular o intratecal no funcionaría suficientemente para ser eficaz y, de hecho, no se han publicado estudios en seres humanos de este enfoque en el pasado reciente y no hay ejemplos exitosos de tratamiento mediante esa vía. La inyección intratecal otorga una ventaja respecto a los regímenes de tratamiento convencionales, sin embargo, en que el LCR proporciona acceso superior al cerebro y las meninges. El LCR cubre el cerebro y proporciona contacto con una gran área superficial con neuronas corticales hasta 6 mm por debajo de la superficie, permitiendo una penetración más eficaz del agente terapéutico al interior del tejido cerebral.

El documento Shull y col. (*Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, vol. 94, págs. 12937-12941) se refiere a sustitución enzimática en un modelo canino de síndrome de Hurler.

El documento von Specht y col. (*Neurology* 29: 848-854, junio de 1979) se refiere a sustitución enzimática en enfermedad de Tay-Sachs.

Los trastornos de almacenamiento lisosómico que afectan al sistema nervioso demuestran desafíos únicos en el tratamiento de estas enfermedades con terapias tradicionales. A menudo existe una gran acumulación de glucosaminoglucanos (GAG) en neuronas y meninges de individuos afectados, lo que conduce a formas leves o graves de la enfermedad. Por ejemplo, la enfermedad cerebral en pacientes con MPS I grave se caracteriza por retardo del desarrollo, hidrocefalia, retraso mental grave y eventual deterioro y muerte debido a los síntomas de la enfermedad. El cerebro con MPS I leve se caracteriza por almacenamiento de GAG perivascular, hidrocefalia, incapacidades de aprendizaje y compresión de la médula espinal debido a hinchazón y fibrosis causada por enfermedad de almacenamiento. En pacientes con MPS I en los que el almacenamiento meníngeo está afectado, las meninges están obstruidas, reduciendo la resorción del LCR y conduciendo a hidrocefalia de alta presión. Este almacenamiento lisosómico aberrante también conduce a espesamiento y fibrosis de las meninges causada por enfermedad de almacenamiento.

En el trastorno de almacenamiento lisosómico, enfermedad de Gaucher, los pacientes con la forma grave de la enfermedad (tipo 2 y tipo 3) tienen enfermedad cerebral y la terapia enzimática intravenosa es insuficiente para tratar de forma eficaz y adecuada el cerebro. La terapia enzimática intratecal e intraparenquimática con glucocerebrosidasa, la enzima deficiente en la enfermedad de Gaucher, ha tenido éxito en alcanzar el cerebro pero no trató con éxito el almacenamiento cerebral (Zirzow y col., *Neurochem. Res.* 24: 301-305. 1999). En este momento, ninguna enfermedad cerebral resultante de un trastorno lisosómico ha sido tratada con éxito mediante ningún medio disponible.

Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad en la técnica de desarrollar métodos que traten eficazmente trastornos de almacenamiento lisosómico a través de la administración eficaz de terapia de sustitución enzimática. Más particularmente, existe una necesidad de métodos más eficaces de administración de compuestos y composiciones que puedan administrar más eficazmente agentes activos al cerebro y al sistema nervioso central para el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de manifestaciones en el sistema nervioso central de enfermedades de almacenamiento enzimático. Más particularmente, la presente invención se basa en el descubrimiento de que la administración intratecal de composiciones que comprenden enzimas que son deficientes o que faltan en trastornos de almacenamiento lisosómico, da como resultado una intervención terapéutica clínicamente útil a largo plazo, sostenida, de manifestaciones en el sistema nervioso central de dichas enfermedades. Por lo tanto, la presente invención se refiere a terapia de sustitución enzimática para dichas enfermedades mediante administración intratecal al interior del líquido cefalorraquídeo de sujetos que necesitan dicha terapia.

Por consiguiente, en un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una enzima que es (a) deficiente en una enfermedad de almacenamiento lisosómico, y (b) comprende o ha sido manipulada para comprender un resto que permite que dicha enzima se una al receptor de manosa-6-fosfato (M6P), para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico mediante administración intratecal a un sujeto mamífero en una cantidad eficaz para mejorar los síntomas en el SNC de dicha enfermedad de almacenamiento lisosómico.

En realizaciones particularmente preferidas, las composiciones farmacéuticas de la presente invención permiten la administración intratecal de iduronidasa para realizar una intervención terapéutica de MPS. Este tratamiento tiene un efecto beneficioso sobre el sujeto, dado que reduce o elimina gránulos de almacenamiento de glucógeno en los tejidos. Además, la inyección intratecal de la enzima al interior del líquido cefalorraquídeo de sujetos tanto neonatos como adultos, da como resultado niveles terapéuticos de iduronidasa en el cerebro y la reducción o eliminación de gránulos de almacenamiento de glucosaminoglucano en el tejido cerebral.

Aunque ciertas realizaciones usan iduronidasa como la enzima que está siendo sustituida, debe entenderse que los métodos de la presente invención pueden usarse para la intervención terapéutica de otras enfermedades que requieren la administración de una enzima diferente. Por ejemplo, la presente invención también contempla la administración intratecal de beta-glucuronidasa (MPS VII), iduronato sulfatasa (MPS II), alfa-N-acetilglucosaminidasa (MPS IIIB), arilsulfatasa A (MLD), glucocerebrosidasa, β -glucosidasa o N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa.

Además, se contempla que la presencia sobre la superficie celular de células cerebrales de un receptor de alta afinidad para la captación de la enzima, incluso a concentraciones bajas de la enzima, producirá un gradiente de concentración en el LCR que conduce a la enzima a atravesar la superficie del cerebro a través de la interfaz cerebro-LCR.

En realizaciones preferidas, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico en un mamífero que comprende administración intratecal al interior del sistema nervioso central del mamífero de una composición farmacéutica que comprende una enzima que es deficiente en la enfermedad de almacenamiento lisosómico en una cantidad eficaz para mejorar los síntomas de la enfermedad de almacenamiento lisosómico. Los expertos en la materia monitorizan de forma rutinaria sujetos en busca de síntomas de enfermedad de almacenamiento lisosómico mediante evaluación rutinaria del historial, examen físico, ecocardiografía, electrocardiografía, imaginología por resonancia magnética, polisomnografía, examen del esqueleto, mediciones del arco de movilidad, fotografías de la córnea y biopsia de piel (véase la Patente de Estados Unidos N° 6.585.971). Cualquiera de dichos métodos puede usarse junto con los métodos de tratamiento desvelados en el presente documento.

Preferentemente, la composición farmacéutica de terapia de sustitución enzimática se administra en una cantidad eficaz para reducir la cantidad de gránulos de almacenamiento presentes en el tejido cerebral del mamífero. Más particularmente, la terapia da como resultado una reducción de la acumulación de GAG en el tejido neuronal y/o meníngeo del sujeto. En algunas composiciones farmacéuticas preferidas de la invención, la intervención terapéutica mejora la hidrocefalia de alta presión asociada con enfermedad de almacenamiento lisosómico. Preferentemente, la administración intratecal de la terapia enzimática de la presente invención produce una reducción de la hinchazón meníngea que resulta de la presencia de gránulos de almacenamiento lisosómico en las meninges de individuos que padecen enfermedad de almacenamiento lisosómico.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse en el tratamiento de cualquier enfermedad de almacenamiento lisosómico que manifieste un efecto en tejido cerebral o meníngeo y requiere que el medicamento entre en el cerebro o las meninges. Las composiciones farmacéuticas de la presente solicitud, consiguen un efecto terapéutico cruzando la interfaz cerebro-LCR y mejorando los efectos perjudiciales de la enfermedad de almacenamiento lisosómico en el tejido cerebral. Por ejemplo, dicha enfermedad puede incluir, aunque no se limita a, aspartilglucosaminuria, enfermedad de almacenamiento de ésteres de colesterol, enfermedad de Wolman, cistinosis, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Danon, enfermedad de Fabry, lipogranulomatosis de Farber, enfermedad de Farber, fucosidosis, galactosialidosis de tipos I/II, enfermedad de Gaucher de tipos I/II/III, enfermedad de Gaucher, leucodistrofia de células globoides, enfermedad de Krabbe, enfermedad de almacenamiento de glucógeno II, enfermedad de Pompe, GM1-gangliosidosis de tipos I/II/III, GM2-gangliosidosis de tipo I, enfermedad de Tay Sachs, GM2-gangliosidosis de tipo II, enfermedad de Sandhoff, GM2-gangliosidosis, α -manosidosis de tipos I/II, β -manosidosis, leucodistrofia metacromática, mucopolidosis de tipo I,

sialidosis de tipos I/II mucopolipidosis de tipos II /III enfermedad de células I, mucopolipidosis de tipo IIIC pseudo-polidistrofia de Hurler, mucopolisacaridosis de tipo I, mucopolisacaridosis de tipo II, síndrome de Hunter, mucopolisacaridosis de tipo IIIA, síndrome de Sanfilippo, mucopolisacaridosis de tipo IIIB, mucopolisacaridosis de tipo IIIC, mucopolisacaridosis de tipo IIID, mucopolisacaridosis de tipo IVA, síndrome de Morquio, mucopolisacaridosis de tipo IVB síndrome de Morquio, mucopolisacaridosis de tipo VI, mucopolisacaridosis de tipo VII, síndrome de Sly, mucopolisacaridosis de tipo IX, deficiencia múltiple de sulfatasa, lipofuscinosis cerioidea neuronal, enfermedad de Batten CLN1, enfermedad de Batten CLN2, enfermedad de Niemann-Pick de tipos A/B, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C1, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C2, picnodisostosis, enfermedad de Schindler de tipos I/II, enfermedad de Schindler y enfermedad de almacenamiento de ácido siálico.

En realizaciones particularmente preferidas, la enfermedad es mucopolisacaridosis y, más preferentemente, la enfermedad es mucopolisacaridosis I. En algunas realizaciones, el sujeto con la enfermedad de almacenamiento lisosómico tiene una actividad de α -L-iduronidasa normal reducida. La actividad puede reducirse debido a que la enzima ha mutado o está ausente en el sujeto. En una realización particular, el mamífero tiene aproximadamente el 50% o menos de una actividad de α -L-iduronidasa normal. En otras realizaciones, el sujeto tiene el 75% o menos de actividad de α -L-iduronidasa normal. Para tratar esta deficiencia, los métodos de la presente invención pueden emplear una composición farmacéutica que comprende una dosis de al menos aproximadamente 125.000 unidades o 0,5 mg/kg de la α -L-iduronidasa humana. Otras dosis preferidas incluyen entre aproximadamente 0,01 mg/15-20 kg de peso corporal del sujeto y aproximadamente 10 mg/15-20 kg de peso corporal del sujeto. La dosis puede administrarse en cualquier dosis conveniente y en cualquier intervalo convenientemente separado determinado por el facultativo que administra el tratamiento. En algunas realizaciones, la terapia de sustitución enzimática se administra semanalmente a un sujeto que padece una deficiencia en una enzima de almacenamiento lisosómico.

En algunas realizaciones ejemplares, la composición farmacéutica comprende una dosis de al menos aproximadamente dosis de entre aproximadamente 0,01 mg/15 cc de LCR y aproximadamente 5,0 mg/15 cc de LCR en el mamífero de la α -L-iduronidasa humana que es administrada semanalmente a un sujeto que padece una deficiencia de la misma. Preferentemente, la composición farmacéutica comprende una dosis de aproximadamente 1 mg/15 cc de LCR en el mamífero de la α -L-iduronidasa humana que es administrada semanalmente a un sujeto que padece una deficiencia de la misma. Una composición farmacéutica ejemplar se formula en un tampón que comprende 0,58 mg/ml de iduronidasa en un tampón que comprende fosfato sódico 100 mM, NaCl 150 mM y polisorbato 80 al 0,001%.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener otros componentes, tales como por ejemplo, albúmina humana. En realizaciones particulares, las composiciones contienen albúmina humana a una concentración de al menos aproximadamente 1 mg/ml. Las composiciones pueden estar en forma de soluciones tamponadas, tales como por ejemplo, en una solución tamponada que comprende un tampón de fosfato sódico a una concentración de aproximadamente 10-50 mM.

En realizaciones específicas, el trastorno de almacenamiento lisosómico es MPS 1 y la enzima es iduronidasa recombinante administrada por vía intratecal en una cantidad de aproximadamente 0,5 μ g a aproximadamente 20 mg por kilogramo de peso corporal. En realizaciones específicas, la cantidad es de aproximadamente 0,5 μ g a aproximadamente 0,5 mg por kilogramo de peso corporal. Más particularmente, se contempla que la iduronidasa recombinante se administre en una dosificación de aproximadamente 1,0 μ g a 100 μ g, de 2,0 μ g a 50 μ g, o de 10 μ g a 100 μ g por kilogramo de peso corporal. Éstas son simplemente cantidades ejemplares de iduronidasa y los expertos en la materia entenderán que estas dosis pueden modificarse dependiendo de la edad del sujeto, el tamaño del sujeto, la fase de la enfermedad y similares. En realizaciones preferidas, la iduronidasa recombinante se administra en una dosificación de aproximadamente 1,0 μ g a 15 mg, de 2,0 μ g a 10 mg, o de 10 μ g a 5 mg.

La enzima para la terapia de sustitución puede prepararse a partir de cualquier fuente usada habitualmente para la preparación de dichas enzimas. En algunas realizaciones, la enzima es iduronidasa que es secretada y purificada a partir de células de mamífero en cultivo transfectadas con una secuencia de ADN que codifica iduronidasa humana.

La enzima administrada en los métodos de tratamiento intratecal puede administrarse a través de cualquier vía conveniente usada habitualmente para administración intratecal. Por ejemplo, la administración intratecal puede ser mediante una infusión lenta de al menos 0,5 mg/kg de la formulación durante aproximadamente una hora. Sin embargo, debe entenderse que la dosificación puede variar entre aproximadamente 0,01 mg/15-20 kg de peso corporal del sujeto y aproximadamente 10 mg/15-20 kg de peso corporal del sujeto a velocidades de infusión similares. Ventajosamente, la administración de la terapia de sustitución enzimática intratecal da como resultado la normalización de gránulos de almacenamiento lisosómico en el tejido neuronal y/o meníngeo de los sujetos tal como se ha descrito anteriormente. En realizaciones particularmente preferidas, se contempla que la deposición de gránulos de almacenamiento mejora a partir de tejido y glial, aliviando de este modo el retardo y la regresión del desarrollo observados en individuos que padecen enfermedad de almacenamiento lisosómico. Otras realizaciones preferidas dan como resultado la normalización de gránulos de almacenamiento lisosómico en las meninges cerebrales cerca de la granulación aracnoidea, cuya presencia en la enfermedad de almacenamiento lisosómico da

como resultado hidrocefalia de alta presión. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas están orientadas al tratamiento de dicha hidrocefalia de alta presión asociada con enfermedad de almacenamiento lisosómico. Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden usarse en el tratamiento de compresión de la médula espinal que resulta de la presencia de gránulos de almacenamiento lisosómico en las meninges cervicales cerca de la médula en C1-C5 o en otro lugar en la médula espinal. Las composiciones farmacéuticas de la invención también están orientadas al tratamiento de quistes que son causados por el almacenamiento perivascular de gránulos de almacenamiento lisosómico alrededor de los vasos del cerebro.

En otras realizaciones, la terapia también puede dar como resultado ventajosamente la normalización del volumen del hígado y la excreción urinaria de glucosaminoglucano, reducción del tamaño del bazo y sucesos de apnea/hipopnea, incremento de la altura y velocidad del crecimiento en sujetos prepúberes, incremento en la flexión del hombro y la extensión del codo y la rodilla, y reducción de la regurgitación tricúspide o regurgitación pulmonar. Para métodos de monitorización de dichos efectos, los expertos en la materia son remitidos específicamente al ejemplo 5 de la Patente de Estados Unidos Nº 6.585.971 y, de forma más general, para enseñar métodos y composiciones de formulación de iduronidasa recombinante.

En realizaciones preferidas, la administración terapéutica en la presente solicitud implica la administración de α -L-iduronidasa recombinante humana, lo que reduce el almacenamiento lisosómico en al menos el tejido cerebral del individuo que tiene la enfermedad de almacenamiento lisosómico. En esos aspectos preferidos de la invención en los que la iduronidasa está siendo administrada por vía intratecal al LCR, la composición que está siendo administrada comprende aproximadamente 1 mg de iduronidasa/20 kg de peso corporal del mamífero que está siendo tratado para MPS. En realizaciones particulares, la dosis anterior es administrada a 15 cc de LCR. A dicha concentración, se contempla que la concentración enzimática será de 18.000 unidades por ml de LCR. Debe entenderse que la dosificación mencionada anteriormente es simplemente una dosificación ejemplar y los expertos en la materia entenderán que esta dosificación puede modificarse.

La administración intratecal puede comprender introducir la composición farmacéutica en un ventrículo cerebral. Como alternativa, la administración intratecal puede comprender introducir la composición farmacéutica en la zona lumbar. En otra alternativa más, la administración intratecal comprende introducir la composición farmacéutica en la cisterna magna. Cualquier dicha administración es, preferentemente, mediante una inyección en embolada. Dependiendo de la gravedad de los síntomas y la sensibilidad del sujeto a la terapia, dicha inyección en embolada puede administrarse una vez por semana, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada 6 meses o anualmente. En otras realizaciones, la administración intratecal se consigue mediante el uso de una bomba de infusión. El agente farmacéutico podría administrarse, por supuesto, por vía intratecal de forma continua durante un periodo de al menos varios días o, como alternativa, la administración intratecal es de forma continua durante un periodo de al menos cuatro semanas. Por supuesto, cuando la administración es mediante infusión continua, la velocidad de administración de la dosis de la terapia de sustitución enzimática puede reducirse enormemente en comparación con la administración por inyección en embolada.

En algunas realizaciones, los regímenes terapéuticos pueden ser tales que la administración intratecal se combina con administración sistémica de la composición farmacéutica que comprende dicha enzima que es deficiente en la enfermedad en combinación. En dichas realizaciones preferidas, la administración intratecal puede realizarse a intervalos mensuales aunque también se contemplan otros intervalos de tiempo entre administración. Preferentemente, la administración sistémica en dichos regímenes de administración combinada es administración intravenosa. En realizaciones específicas, las composiciones farmacéuticas de la invención contemplan tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico administrando una enzima tal como rh-IDU por vía intratecal para realizar el suministro al SNC y por vía sistémica para mejorar los efectos de la enfermedad de almacenamiento lisosómico en sitios no del SNC. Por ejemplo, en realizaciones específicas, la rh-IDU es administrada por vía intratecal a intervalos mensuales y por vía intravenosa a intervalos quincenales, semanales, diarios o incluso cada dos días. En algunas realizaciones, al sujeto puede habersele inducido tolerancia a la administración intratecal y/o de rh-IDU usando un régimen de inducción de tolerancia inmunosupresora antes del inicio del régimen terapéutico.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención son, preferentemente, para la intervención terapéutica de un ser humano que padece una enfermedad de almacenamiento lisosómico.

En realizaciones preferidas de la invención, la enzima que está siendo administrada al líquido cefalorraquídeo comprende de forma natural o ha sido manipulada para comprender un componente que permite la captación de la enzima por un receptor de alta afinidad. Por ejemplo, la enzima comprende o ha sido manipulada para comprender un resto que permite que dicha enzima se una a un receptor seleccionado entre un receptor de manosa-6-fosfato, receptor de melanotransferrina y receptor de LRP o cualquier otro receptor que se exprese de forma ubicua en la superficie de células cerebrales. En realizaciones preferidas, la enzima comprende restos de manosa-6-fosfato que permiten que la enzima sea captada por una célula que expresa un receptor de manosa-6-fosfato. En una realización alternativa, la enzima se une de forma natural, o ha sido manipulada para poseer capacidad de unión a GAG. En una realización alternativa, la enzima comprende p97, RAP, transferrina o IGF2.

En ciertos aspectos de la invención, los sujetos que están siendo tratados con terapia de sustitución enzimática para

enfermedad de almacenamiento lisosómico se han hecho tolerantes a dicha terapia usando regímenes de inducción de tolerancia.

En algunas realizaciones de la invención, la enzima usada para la terapia de sustitución enzimática en la enfermedad de almacenamiento lisosómico es una que comprende de forma natural, o está fusionada a, un resto que facilita la elevada captación de la enzima. En realizaciones preferidas, dicha enzima es iduronidasa, ya sea recombinante o de tipo silvestre. El resto que facilita la captación de la enzima puede ser cualquier resto tal como un socio de unión de un ligando o receptor expresado en la superficie de la célula a la que estará dirigida la terapia. En realizaciones particularmente preferidas, el resto se selecciona entre el grupo constituido por un residuo de manosa-6-fosfato, un polipéptido RAP, y un polipéptido p97. Otros aspectos de la presente invención definen métodos que comprenden, además, inducir tolerancia específica de antígenos antes de la terapia de sustitución enzimática. Dicha inducción de tolerancia a la terapia puede emplear administración de un agente inmunosupresor, tal como, por ejemplo, ciclosporina en solitario o en combinación con un agente tal como azatioprina, que puede tener efectos antiproliferativos y/o de bloqueo de señales coestimuladoras.

Realizaciones específicas contemplan métodos para promover la descomposición de glucosaminoglucano (GAG) en una célula cerebral de un sujeto que tiene enfermedad de almacenamiento lisosómico, comprendiendo el método administrar por vía intratecal al sujeto una composición farmacéutica que comprende una enzima deficiente en la enfermedad de almacenamiento lisosómico en una cantidad eficaz para reducir la cantidad de GAG presente en la célula cerebral en comparación con la cantidad de GAG presente en la célula antes de la administración.

En realizaciones específicas en toda la presente memoria descriptiva debe entenderse que los métodos pueden usarse para reducir el almacenamiento de GAG y/o promover la descomposición de GAG en cualquier célula cerebral que tiene un almacenamiento anormal de GAG. Las células cerebrales pueden ser neuronas, neuroglia o endotelio. En realizaciones específicas, la célula cerebral puede seleccionarse entre al menos uno de los grupos constituidos por neuronas, células gliales, células microgliales, astrocitos, células oligodendrogliales, células perivasculares, pericitos, células meníngeas, endotelio, células de granulosa aracnoidea, membranas aracnoideas, células de dura mater, pia mater y del plexo coroideo. En realizaciones preferidas, la célula cerebral es una célula meníngea. Se contempla que, en algunas realizaciones, el sujeto tiene hidrocefalia de alta presión y la administración reduce la cantidad de líquido LCR en el tejido meníngeo del sujeto. En otras realizaciones, se contempla que el sujeto tiene compresión de la médula espinal y la administración reduce o alivia de otro modo los síntomas de dicha compresión. En realizaciones preferidas, los métodos terapéuticos de la invención reducen el número de gránulos de almacenamiento lisosómico en la célula en comparación con el número de gránulos de almacenamiento lisosómico presentes en una célula similar en ausencia de la administración intratecal.

Otra realización contempla un método de reducción de la hinchazón meníngea en un sujeto que tiene una enfermedad de almacenamiento lisosómico, comprendiendo el método administrar por vía intratecal al sujeto una composición farmacéutica que comprende una enzima deficiente en la enfermedad de almacenamiento lisosómico en una cantidad eficaz para reducir la inflamación meníngea del sujeto en comparación con el tamaño de las meninges del sujeto antes de la administración. El sujeto puede ser un sujeto humano.

Otros aspectos beneficiosos de la invención contemplan composiciones farmacéuticas para su uso en la reducción de la compresión de la médula espinal en un sujeto que padece una enfermedad de almacenamiento lisosómico, comprendiendo el método administrar por vía intratecal al sujeto una composición farmacéutica que comprende una enzima deficiente en la enfermedad de almacenamiento lisosómico en una cantidad eficaz para reducir la inflamación meníngea del sujeto en comparación con el tamaño de las meninges del sujeto antes de la administración. En estos y otros métodos de la invención, las capacidades motrices del sujeto mejoran preferentemente con la administración de la composición farmacéutica en comparación con las capacidades motrices del animal antes de la administración de la composición farmacéutica.

Los párrafos anteriores no pretenden definir cada aspecto de la invención, y aspectos adicionales se describen en otras secciones, tales como la descripción detallada.

Además de lo anterior, la invención incluye, como un aspecto adicional, todas las realizaciones de la invención de alcance de cualquier forma más estrecho que las variaciones definidas por párrafos específicos anteriormente. Por ejemplo, ciertos aspectos de la invención que se describen como un género, y debe entenderse que cada miembro de un género es, individualmente, un aspecto de la invención.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y están incluidos para ilustrar adicionalmente aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor mediante referencia a los dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

La figura 1 describe niveles de enzima en el cerebro de sujetos caninos después de inyección intratecal.

La figura 2 describe niveles de rh-iduronidasa medidos en tejidos cerebral profundo y cerebral superficial en perros.

La figura 3 describe los niveles de actividad de iduronidasa en la médula espinal y las meninges de la médula espinal de animales con MPS I tratados con iduronidasa.

5 La figura 4 describe una comparación de los niveles de glucosaminoglucano (GAG) en animales con MPS I tratados que reciben administración intratecal o IV de iduronidasa.

10 La figura 5 representa microscopía electrónica (en secciones de cerebro) de almacenamiento de GAG en enfermedad de macrófagos perivasculares de animales con MPS I tratados con iduronidasa y no tratados.

15 La figura 6 es un mayor aumento de microscopía electrónica (en secciones de cerebro) de almacenamiento de GAG en enfermedad de macrófagos perivasculares de animales con MPS I tratados con iduronidasa y no tratados, que demuestra que las células perivasculares en animales con MPS I tratados carecen de almacenamiento de GAG.

La figura 7 es una comparación de patología de enfermedad neuronal en animales con MPS I tratados con iduronidasa y no tratados que muestra que los animales tratados están libres de almacenamiento de GAG laminar.

20 La figura 8 es una comparación de secciones de cerebro evaluadas para enfermedad meníngea en animales con MPS I tratados o no tratados que muestra la ausencia de grandes células espumosa llenas de GAG en las meninges de animales tratados, en comparación con controles.

25 La figura 9 ilustra que las secciones de cerebro de animales con MPS I tratados muestran infiltrado linfocitario moderado en las meninges.

30 Las figuras 10A a 10C proporcionan comparaciones de los efectos de administración intratecal mensual frente a semanal de rhIDU. La figura 10A muestra que los niveles de GAG en el cerebro se redujeron a los normales con tratamiento (*pH = 0,03). La figura 10B muestra que los niveles de GAG en la médula espinal se redujeron con el tratamiento (p = 0,22). La figura 10C muestra que los niveles de GAG en las meninges de la médula espinal se redujeron con el tratamiento (*p = 0,02).

35 Las figuras 11A y 11B muestran la comparación de GAG entre perros no tratados y tratados por vía intratecal. El almacenamiento de GAG se reduce visiblemente en células perivasculares, glia, y leptomeninges neocorticales en perros tratados. Las muestras no tratadas (figura 11A) muestran células espumosas, hinchadas, cargadas de GAG en contraste con las muestras tratadas mostradas en la figura 11B que son células finas con un almacenamiento marcadamente inferior.

40 Las figuras 12A a 12D muestran que la tolerancia inmunitaria reduce la respuesta inflamatoria a rhIDU administrada por vía intratecal. Un infiltrado linfocitario y plasmocitario se desarrolla en perros tratados (figura 12A y 12C). El acondicionamiento previo con un régimen para inducir tolerancia inmunitaria reduce enormemente esta respuesta (figura 12B y 12D).

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico usando inyección intratecal de enzimas deficientes en el trastorno particular que está siendo tratado. Las composiciones farmacéuticas pueden acoplarse con un régimen inductor de tolerancia para proporcionar un tratamiento más eficaz a los sujetos.

50 La presente solicitud se basa en el descubrimiento de que la administración intratecal de terapia de sustitución enzimática para trastornos de almacenamiento lisosómico da como resultado intervención terapéutica clínicamente útil a largo plazo, sostenida, de las manifestaciones en el sistema nervioso central de dichas enfermedades. Las propiedades de la enzima tales como solubilidad y unión a sustancias pueden tener un impacto sobre la penetración de la enzima en el tejido cerebral y el cruce del agente terapéutico a través de la interfaz LCR-cerebro.

55 Por lo tanto, por primera vez, la presente memoria descriptiva detalla el tratamiento con éxito de las enfermedades de almacenamiento lisosómico dentro del cerebro y las meninges usando iduronidasa recombinante, mostrando de este modo por primera vez que es posible tratar la enfermedad cerebral y meníngea en enfermedades de almacenamiento tales como MPS I. Dado que la terapia enzimática periférica para MPS I fue aprobada para uso humano en 2003, la presente invención permite el traslado inmediato al tratamiento de pacientes de MPS I humanos en ensayos clínicos que usan las mismas composiciones de iduronidasa recombinante aprobadas actualmente para terapia periférica. Esto representa un importante avance en el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico, dado que las manifestaciones cerebrales de enfermedades de almacenamiento lisosómico han sido, hasta la fecha, resistentes al tratamiento. Mientras que muchos de los métodos ejemplares descritos en el presente documento se ejemplifican usando estudios realizados en MPS I, se contempla que los presentes descubrimientos pueden extenderse al tratamiento de otros trastornos de almacenamiento lisosómico para los cuales actualmente

están en desarrollo terapias enzimáticas.

En realizaciones particulares, la presente memoria descriptiva detalla por primera vez que la enzima iduronidasa puede penetrar en el cerebro mejor que otras enzimas que han sido probadas previamente. En realizaciones preferidas particulares, se usa iduronidasa para tratar trastornos de MPS. La administración intratecal de iduronidasa se contempla debido a la capacidad de esta enzima para unirse a GAG en tejido cerebral, lo que puede proporcionar un sitio de unión para arrastrar a la enzima al interior del espacio fluido del tejido. La presencia de restos de manosa-6-fosfato en la iduronidasa permite una captación de alta afinidad de la enzima del LCR, permitiendo de este modo que pequeñas concentraciones de la enzima en el LCR tengan un efecto clínicamente terapéutico. El hecho de que los restos de manosa-6-fosfato se unan a un receptor de alta afinidad en la superficie de casi todas las células permite que cantidades aún pequeñas de iduronidasa sean captadas por el cerebro y las meninges y sean colectivos de enfermedad de almacenamiento lisosómico en esos sitios.

La iduronidasa demuestra una afinidad extremadamente grande por su receptor con la mitad de la unión máxima a una concentración de aproximadamente 1 nanomolar (12 unidades/ml) y además, dada la mitad de la corrección máxima del defecto a aproximadamente 1 picomolar, la adición de cantidades aún más pequeñas de enzima en el espacio del LCR crearía un enorme gradiente que impulsa a la enzima al interior del cerebro. En un régimen de tratamiento ejemplar, a una dosis de 1 mg en un perro de 20 kg con 15 cc de LCR, se predice que la concentración enzimática en el LCR es de aproximadamente 18.000 unidades/ml. Esta concentración es más de 1.000 veces por encima de la concentración necesaria para observar captación y 1.000.000 de veces por encima de la concentración requerida para la mitad de la concentración máxima. Por lo tanto, incluso un proceso ineficaz en el que solamente el 1% de la enzima penetra en el cerebro daría como resultado niveles en el cerebro que son 10 veces la constante de captación, una concentración que debe impulsar la captación eficaz y aproximadamente 10.000 veces por encima de la mitad de la concentración de corrección máxima. Dado este gradiente que puede alcanzarse fácilmente, los efectos de las propiedades de la enzima sobre la difusión, y la baja concentración necesaria para la captación y la corrección, se demuestra en el presente documento que la iduronidasa trata con éxito los síntomas de MPS I in vivo. Una ventaja adicional en el uso de terapia con iduronidasa intratecal en el tratamiento de MPS I es que la enfermedad de MPS I mejora la permeabilidad de la superficie del cerebro a terapia enzimática lo que hace a la terapia intratecal un método atractivo de tratamiento de MPS I.

La importancia del gran gradiente de concentración que resulta de la administración intratecal de enzima combinada con la pequeña pero significativa penetración de la enzima al interior del cerebro podría ser suficiente para conseguir eficacia terapéutica en cualquier trastorno de almacenamiento lisosómico. El efecto de este gran gradiente de concentración generado por la elevada propiedad de unión al receptor de captación de iduronidasa no se había apreciado antes de la presente invención y es importante para comprender cómo al cerebro se le puede suministrar a la fuerza enzima a través de la capa endotelial y cómo un gran número de enzimas puede ser impulsada ahora para difundirse a través de la barrera hematoencefálica. Los métodos y composiciones para conseguir dicha corrección con iduronidasa, así como otras enzimas para enfermedades de almacenamiento lisosómico se describen con más detalle a continuación en el presente documento.

Definiciones

Debe entenderse también que la terminología usada en el presente documento es para los fines de describir realizaciones preferidas solamente, y no pretende ser limitante, dado que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Donde se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta el décimo de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente otra cosa, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado está abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden estar incluidos de forma independiente en los intervalos más pequeños, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque también pueden usarse cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen a continuación.

Debe observarse que, tal como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a", y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

Por "enfermedad de almacenamiento lisosómico" se entiende cualquier enfermedad que resulta de la deficiencia de una o más enzimas lisosómicas necesarias para metabolizar macromoléculas naturales. Estas enfermedades típicamente dan como resultado la acumulación de moléculas no degradadas en los lisosomas, dando como resultado mayores cantidades de gránulos de almacenamiento (también denominados vesículas de almacenamiento). Estas enfermedades se describen con más detalle a continuación.

Se entiende que un "sujeto" incluye cualquier animal que será tratado usando los métodos de la invención. Preferentemente, el sujeto es un sujeto mamífero, incluyendo, sin limitación, seres humanos y primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de monos; animales de granja tales como vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas y conejillos de indias, y similares. El término no indica una edad o sexo particulares. Por lo tanto, sujetos adultos y recién nacidos, así como fetos, ya sean masculinos o femeninos, están incluidos en el término "sujeto".

Por "terapéuticamente eficaz", la presente memoria descriptiva pretende indicar cualquier beneficio terapéutico que surge como resultado de los métodos de tratamiento de la presente invención. Por ejemplo, dicho efecto puede ser efectos beneficiosos que se manifiestan en un tejido diana apropiado, de la enzima que es deficiente o que falta en el trastorno lisosómico de interés, donde dicho efecto fisiológico beneficioso se compara con el parámetro fisiológico que está siendo medido en ausencia de la terapia de sustitución enzimática. Dicho efecto terapéutico puede ser cualquier reducción o eliminación de una o más manifestaciones clínicas o subclínicas de la enfermedad de interés. Por ejemplo, una reducción del número de vesículas de almacenamiento (también denominados gránulos), o eliminación de las mismas, proporcionará un beneficio terapéutico al sujeto tratado. Los métodos para detectar la presencia de gránulos de almacenamiento en un tejido de interés son bien conocidos en la técnica y se describen adicionalmente a continuación en los ejemplos. Dichos métodos conllevan examen microscópico de secciones de tejido. Véase, por ejemplo, Vogler y col. (1990) Am J Pathol 136: 207-217. Además, la reducción de la acumulación de sustancias debida a la deficiencia de la enzima particular en cuestión, también otorgará un beneficio terapéutico en el sujeto tratado. Dichas sustancias puede detectarse fácilmente usando ensayos conocidos. Por ejemplo, MPS VII da como resultado una acumulación de glucosaminoglucanos (GAG) no degradados. Los niveles de GAG pueden medirse fácilmente usando métodos desarrollados por Farndale y col. (Farndale y col. (1982) Con Tissue Res 9: 247-248) y Poorthuis y col. (Poorthuis y col. (1994) Pediatr Res 36: 187-193).

Composiciones farmacéuticas de la invención

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico proporcionando administración intratecal de enzimas defectuosas o ausentes en dichos trastornos de almacenamiento lisosómico, permitiendo de este modo la sustitución de la enzima defectuosa o ausente en los tejidos cerebrales del sujeto que está siendo tratado. La administración a los tejidos diana cerebrales es a través de una vía de administración intratecal. Estos métodos permiten eficazmente la eliminación o reducción de gránulos de almacenamiento en los tejidos cerebrales de los sujetos tratados.

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico que pueden tratarse usando las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, aunque no se limitan a, enfermedad de Gaucher (véase, por ejemplo, Barranger y col. Neurochemical Res. (1999) 24: 601-615 y NIH Technology Assessment Conference Statement, 27 de febrero de 1995-1 de marzo de 1995) que incluye los tipos 1, 2 y 3, enfermedad de Fabry (véase, por ejemplo, Takanaka y col. Exp. Hem. (1999) 27: 1149-1159, Ziegler y col. Hum. Gene Ther. (1999) 10: 1667-1682 y Takanaka y col. Hum. Gene Ther. (1999) 10: 1931-1939), enfermedad de Tay-Sachs (véase, por ejemplo, Guidotti y col. Hum. Mol. Gen. (1999) 8: 831-838 y Daly y col. Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos (1999) 96: 2296-2300), enfermedad de Neimann Pick, tipos A, B y C, deficiencia de ornitina- δ -aminotransferasa (OAT) (véase, por ejemplo, Jensen y col. Hum. Gene Ther. (1997) 8: 2125-2132, Locrazza et. Rivero y col. Hum. Gene Ther. (1994) 5: 701-707), homocisteinemia hereditaria (véase, por ejemplo, McGill y col. Am. J. Med. Gen. (1990) 36: 45-52, Eikelboom y col. Ann. Int. Med. (1999) 131: 363-365, Watanabe y col. Proc. Nat'l Acad. Sci. Estados Unidos (1995) 92: 1585-1589.), Manosidosis, Fucosidosis, Sialodosis, las Mucopolisidosis, tales como enfermedad de células I (Mucopolisidosis II) y pseudo-polidistrofia de Hurler (Mucopolisidosis III), deficiencia de ácido lipasa, tales como enfermedad de Wolman y enfermedad de almacenamiento de ésteres de colesterol, Lipidosis por sulfátidos incluyendo distrofia metacromática y deficiencia múltiple de sulfatasa, MPS I (enfermedad de Hurler) (véase por ejemplo, Lutzko y col. Hum. Gene Ther. (1999) 10: 1521-1532, Hartung y col. Hum. Gene Ther. (1999) 10: 2163-2172), MPS II (síndrome de Hunter) (véase por ejemplo, Rathmann et. al. Am. J. Hum. Genet. (1996) 59: 1202-1209, Stronicek y col. Transfusion (1999) 39: 343-350, Li y col. J. Med. Genet. (1999) 36: 21-27), MPS III (síndrome de Sanfilippo) (véase por ejemplo, Scott y col. Nat. Genet. (1995) 11: 465-467, Jone y col. J. Neuropath. Exp. Neur. (1997) 56(10): 1158-1167), MPS IV (síndrome de Morquio) (véase por ejemplo, Nothover y col. J. Inherit. Metab. Dis. (1996) 19: 357-365), MPS V (síndrome de Scheie) (véase por ejemplo, Dekaban y col. Arch. Pathol. Lab. Med (1976) 100: 231-245), MPS, VI (síndrome de Maroteaux-Lamy) (véase por ejemplo, Hershovitz y col. J. Inherit. Metab. Dis. (1999) 22: 50-62, Villani y col. Biochim. Biophys. Acta. (1999) 1453: 185-192, Yogalingam y col. Biochim. Biophys. Acta. (1999) 1453: 284-296), y MPS VII (síndrome de Sly) (véase, por ejemplo Watson y col. Gene Ther. (1998) 5: 1642-1649, Elliger y col. Gene Ther. (1999) 6: 1175-1178, Stein y col. J. Virol. (1999) 73 (4): 3424-3429, Daly y col. PNAS (1999) 96: 2296-2300, Daly y col. Hum. Gene Ther. (1999) 10: 85-94); y enfermedad de Sandhoff.

Una revisión detallada de la etiología genética, manifestaciones clínicas y biología molecular de las enfermedades de almacenamiento lisosómico se detalla en el documento de Scriver y col., eds., The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 7ª Ed., Vol. II, McGraw Hill, (1995). Por lo tanto, las enzimas deficientes en las enfermedades anteriores son conocidas por los expertos en la materia, algunas de éstas se dan como ejemplo en la tabla a

continuación:

Enfermedad de almacenamiento lisosómico	Deficiencia de proteína
Mucopolisacaridosis de tipo I	L-Iduronidasa
Mucopolisacaridosis de tipo II síndrome de Hunter	Iduronato-2-sulfatasa
Mucopolisacaridosis de tipo IIIA síndrome de Sanfilippo	Heparán-N-sulfatasa
Mucopolisacaridosis de tipo IIIB síndrome de Sanfilippo	α -N-A-cetilglucosaminidasa
Mucopolisacaridosis de tipo IIIC síndrome de Sanfilippo	AcetilCoA:N-acetiltransferasa
Mucopolisacaridosis de tipo IIID síndrome de Sanfilippo	N-Acetilglucosamina 6-sulfatasa
Mucopolisacaridosis de tipo IVA síndrome de Morquio	Galactosa 6-sulfatasa
Mucopolisacaridosis de tipo IVB síndrome de Morquio	β -Galactosidasa
Mucopolisacaridosis de tipo VI	N-Acetilgalactosamina 4-sulfatasa
Mucopolisacaridosis de tipo VII síndrome de Sly	β -Glucuronidasa
Mucopolisacaridosis de tipo IX	hialuronoglucosaminidasa
Aspartilglucosaminuria	Aspartilglucosaminidasa
Enfermedad de almacenamiento de ésteres de colesterol/enfermedad de Wolman	Acidlipasa
Cistinosis	Transportador de cistina
enfermedad de Danon	Lamp-2
enfermedad de Fabry	α -Galactosidasa A
Lipogranulomatosis de Farber/enfermedad de Farber	Ácido ceramida
Fucosidosis	α -L-Fucosidasa
Galactosialidosis de tipos I/II	Proteína protectora
Enfermedad de Gaucher de tipos I/II/III enfermedad de Gaucher	Glucocerebrosidasa (β -glucosidasa)
Leucodistrofia de células globoides/ enfermedad de Krabbe	Galactocerebrosidasa
Enfermedad de almacenamiento de glucógeno II/enfermedad de Pompe	α -Glucosidasa
GM1-Gangliosidosis de tipos I/II/III	β -Galactosidasa
GM2-Gangliosidosis de tipo I/enfermedad de Tay Sachs	β -Hexosaminidasa A
GM2-Gangliosidosis de tipo II enfermedad de Sandhoff	β -Hexosaminidasa A
GM2-Gangliosidosis	deficiencia de activador de GM2
α -Manosidosis de tipos I/II	α -D-Manosidasa
β -Manosidosis	β -D-Manosidasa
Leucodistrofia metacromática	Arilsulfatasa A
Leucodistrofia metacromática	Saposina B
Mucopolipidosis de tipo I/Sialidosis de tipos I/II	Neuraminidasa
Mucopolipidosis de tipos II /III enfermedad de células I	Fosfotransferasa
Mucopolipidosis tipo IIIC pseudo-polidistrofia de Hurler	Subunidad γ de fosfotransferasa
Deficiencia múltiple de sulfatasa	Múltiples sulfatasas
Lipofuscinosis cerioidea neuronal, enfermedad de Batten CLN1	Palmitoil proteína tioesterasa
Lipofuscinosis cerioidea neuronal, enfermedad de Batten CLN2	Tripeptidil peptidasa I
enfermedad de Niemann-Pick de tipos A/B enfermedad de Niemann-Pick	Ácido esfingomielinasa
enfermedad de Niemann-Pick de tipo C1 enfermedad de Niemann-Pick	Tráfico de colesterol
enfermedad de Niemann-Pick de tipo C2 enfermedad de Niemann-Pick	Tráfico de colesterol

Picnodisostosis

Cathepsina K

enfermedad de Schindler de tipos I/II enfermedad de Schindler

 α -Galactosidasa B

Enfermedad de almacenamiento de ácido siálico

Transportador de ácido siálico

Por lo tanto, las enfermedades de almacenamiento lisosómico que pueden tratarse o prevenirse usando las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, aunque no se limitan a, Mucopolisacaridosis I (MPSI), MPS II, MPS IIIA, MPS IIIB, Leucodistrofia metacromática (MLD), Krabbe, Pompe, Lipofuscinosis cerioidea, Tay-Sachs, Niemann-Pick A y B, y otras enfermedades lisosómicas tal como se ha enumerado anteriormente. En realizaciones particularmente preferidas, la enzima es una enzima de almacenamiento lisosómico, tal como α -L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, heparán N-sulfatasa, α -N-acetilglucosaminidasa, arilsulfatasa A, galactosilceramidasa, ácido-alfa-glucosidasa, tripeptidil peptidasa, hexosaminidasa alfa, ácido esfingomielinasa, α -galactosidasa, o cualquier otra enzima de almacenamiento lisosómico.

En realizaciones aún más preferidas, la enfermedad a tratar es MPS I y la enzima que está siendo sustituida es iduronidasa. Los expertos en la materia tienen conocimiento de composiciones que comprenden iduronidasa, véase por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.585.971; la Patente de Estados Unidos N° 6.569.661; la Patente de Estados Unidos N° 6.524.835; la Patente de Estados Unidos N° 6.426.208; 6.238.662; la Patente de Estados Unidos N° 6.149.909. Cada una de las patentes mencionadas anteriormente proporciona enseñanzas de composiciones de iduronidasa que pueden usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención. La iduronidasa también está disponible en el mercado como ALDURAZYME™. La iduronidasa puede ser iduronidasa de origen natural que ha sido aislada de una fuente animal o, como alternativa, puede ser iduronidasa producida de forma recombinante, tal como se produce de acuerdo con métodos ejemplares descritos en las patentes a las que se ha hecho referencia anteriormente. En algunas realizaciones, la iduronidasa puede producirse de forma recombinante en células de mamífero (por ejemplo, tal como se describe en las patentes anteriores) o células vegetales (por ejemplo, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.929.304).

En realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas de la invención reducen los gránulos de almacenamiento lisosómico en el tejido meníngeo y/o neuronal de un individuo que manifiesta enfermedad de almacenamiento lisosómico. En un sentido, por lo tanto, la invención comprende composiciones farmacéuticas para su uso en la reducción del tamaño del tejido meníngeo y/o neuronal de un sujeto que tiene enfermedad de almacenamiento lisosómico, administrando por vía intratecal al sujeto una composición farmacéutica que comprende una enzima que es deficiente en la enfermedad de almacenamiento lisosómico. En otras realizaciones, la invención también se refiere a composiciones farmacéuticas para su uso para reducir hidrocefalia de alta presión asociada a enfermedad de almacenamiento lisosómico en un sujeto proporcionando al sujeto una administración intratecal de una composición farmacéutica que comprende una enzima deficiente en la enfermedad de almacenamiento lisosómico. Preferentemente, la enzima es iduronidasa. Una cantidad terapéuticamente eficaz de iduronidasa en estos contextos es cualquier cantidad de iduronidasa que produce una disminución detectable de los gránulos de almacenamiento lisosómico, disminuye la masa meníngea y/o neuronal, reduce la hinchazón asociada con LCR presente en las meninges de un individuo que padece hidrocefalia asociada a un trastorno lisosómico y similares. Los métodos para determinar si las meninges de un sujeto están hinchadas son bien conocidos por los expertos en la materia y pueden incluir, por ejemplo, exploraciones por TAC.

En realizaciones particulares, la administración intratecal descrita en el presente documento se usa para el tratamiento de síntomas que resultan de gránulos de almacenamiento lisosómico en tejido neuronal, glial u otros tejidos cerebrales de un animal. Dichos gránulos de almacenamiento se manifiestan en retardo y/o regresión del desarrollo en el desarrollo del sujeto que padece la enfermedad. Estos síntomas y su alivio con los métodos de tratamiento contemplados en el presente documento pueden evaluarse clínicamente, por ejemplo usando las escalas Bayley II de desarrollo infantil, que incluyen monitorizar un cociente motor y de desarrollo. El desarrollo también puede evaluarse monitorizando el lenguaje u otros desarrollos intelectuales y motores. También pueden usarse tests de potencial provocado tales como auditivo u otra manera de poner a prueba el potencial provocado para evaluar los efectos de la terapia sobre el retardo y/o la regresión del desarrollo.

Otras realizaciones de la invención contemplan composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de hidrocefalia de alta presión causada por la presencia de gránulos de almacenamiento en las meninges cerebrales cerca de las granulaciones aracnoideas. Dicho tratamiento puede monitorizarse y evaluarse usando métodos reconocidos en la técnica para determinar la presión del LCR mediante punción lumbar y/o mediante un catéter intraventricular. Cualquier liberación o reducción de la presión del LCR como resultado de los regímenes terapéuticos de la presente invención se considerará que es un beneficio terapéutico de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas de tratamiento de la invención también son para su uso para mejorar los efectos del almacenamiento lisosómico en las meninges cervicales cerca de la médula en C1-C5 o en otro lugar a lo largo de la médula. Dicho almacenamiento da como resultado síntomas asociados con alta presión de LCR y también otros síntomas asociados con compresión de la médula espinal. El almacenamiento da como resultado compresión de la médula espinal compresiva progresiva con debilidad de las extremidades inferiores, pérdida del control del intestino

y la vejiga y déficits sensoriales. Dichos síntomas pueden monitorizarse usando, por ejemplo, examen neurológico en busca de reflejos de Babinski anormales, reflejos tendinosos profundos, función o sensación motriz. Los déficits neurofisiológicos de compresión de la médula espinal pueden evaluarse usando potenciales provocados somatosensoriales. Como alternativa, puede usarse imaginología por resonancia magnética con o sin un agente de contraste para identificar la ubicación anatómica de compresión, así como una evaluación de edema u otros índices de lesión medular en el sitio de compresión. La alta presión ejercida por el LCR conducirá a manifestaciones fisiológicas tales como cefalea, edema y similares. Cualquier reducción de la presión ejercida por el LCR, reducción del edema, o cualquier mejora de los déficits neurofisiológicos, reflejos tendinosos, función o sensación motriz observada como resultado de la administración del régimen terapéutico se considerará que es un efecto terapéuticamente beneficioso. El sujeto puede estar particularmente monitorizado para cualquier nivel de mejora en debilidad de las extremidades inferiores, control del intestino y de la vejiga y déficits sensoriales asociados con compresión de la médula espinal.

El almacenamiento perivascular de gránulos de almacenamiento lisosómico alrededor de los vasos del cerebro puede producir quistes. Dichos quistes y la eficacia de los regímenes terapéuticos de la presente solicitud contra dichos quistes también puede evaluarse usando exploración por IRM para determinar el tamaño y el número de dichos quistes. Cualquier reducción de tamaño y/o número de los quistes se considerará que es un efecto terapéuticamente beneficioso de los métodos de la presente invención.

Cualquier liberación o reducción de la presión del LCR, reducción del tamaño y/o el número de quistes o cualquier otra disminución de los síntomas causados por la presencia de gránulos de almacenamiento lisosómico como resultado de los regímenes terapéuticos de la presente invención se considerará que es un beneficio terapéutico de la presente invención. Dichas disminuciones son preferentemente del orden de al menos el 5% en comparación con los niveles de dichos síntomas antes de la administración. Por supuesto, sería preferible una mayor disminución, por ejemplo, del 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o más. De la forma más preferente, los síntomas se reducen/mejoran en una medida tal que haga a los síntomas en el sujeto indistinguibles de los mismos indicios observados en un sujeto sano normal de sexo, edad y características físicas similares.

Evaluación de métodos en animales modelo

Los métodos pueden evaluarse usando modelos de enfermedad de almacenamiento lisosómico que son conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, puede usarse un modelo canino de MPS I tal como se describe en los ejemplos a continuación en el presente documento. También pueden usarse otros modelos de MPS. Muchos estudios pre-clínicos dependen de modelos en ratón para una enfermedad dada. Dicho modelo es el modelo de MPS descrito en el ejemplo 1 de la Patente de Estados Unidos Nº 6.582.692, que detalla el cruce de ratones $Gus^{mps/+}$ en el trasfondo C57BL/6 (B6) original (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me., Estados Unidos) con la cepa congénita B6Gusa (Pfister y col. (1982) Biochem Genet 20: 519-535) para producir una progenie $Gus^{mps/a}$ para una colonia de cría en la ambos progenitores eran siempre $Gus^{mps/a}$ y la progenie portaba combinaciones de alelos mps/a, a/a o mps/mps. Los parámetros para actividad de GUS pueden monitorizarse tal como se describe en esa patente.

Otro modelo más que puede ser útil para evaluar los métodos de la presente invención es uno que se proporciona como ejemplo en la Patente de Estados Unidos Nº 6.002.067, que es un modelo en ratón transgénico para deficiencia de iduronidasa. Por supuesto, los expertos en la materia también estarán al tanto de otros modelos que pueden usarse para evaluar los métodos de la presente invención. Una vez que los métodos han sido evaluados en dichos animales modelo, los métodos son ajustados a escala y adaptados fácilmente para el tratamiento de otros sujetos mamíferos tales como primates y sujetos humanos preferibles.

Una de las características más dramáticas de la enfermedad MPS es la aparición de grandes, vacuolas de almacenamiento citoplasmáticas, evidentes mediante examen microscópico de secciones tisulares (Vogler y col. (1990) Am J Pathol 136: 207-217). En un ejemplo que usa un modelo en ratón de MPS, los ratones con MPS inyectados por vía intratecal con una composición que comprende iduronidasa o solución salina en solitario son sacrificados 4 semanas después de la administración y son examinados histológicamente, de la siguiente manera. Los ratones son sacrificados por dislocación cervical y perfundidos inmediatamente a través del ventrículo izquierdo, en primer lugar con la solución salina y a continuación con formalina tamponada neutra al 10%. Los animales fijados con vísceras expuestas se sumergen a continuación en formalina antes de la evaluación histopatológica. Los tejidos seleccionados se procesan usando técnicas rutinarias, se incluyen en parafina, se cortan a aproximadamente 5 micrómetros, se tiñen con hematoxilina y eosina, y se examinan al microscopio. En particular, será deseable realizar dicha evaluación histopatológica en células meníngeas y/o neuronales de los animales.

Las secciones del cerebro de animales con MPS de control deben mostrar vacuolaciones citoplasmáticas difusas de moderadas a severas en células meníngeas y/o neuronales. Dichas células de ratones tratados presentan una reducción sustancial de vacuolas de almacenamiento que da como resultado una arquitectura tisular normal.

Para evaluar la presencia de gránulos de almacenamiento en el cerebro, los ratones son sacrificados por dislocación cervical, el cerebro se extirpó y un hemisferio se fijó en formalina tamponada neutra al 10%. Secciones de 5 μ M se

tiñen con hematoxilina y eosina (H y E).

Tal como se ha descrito anteriormente, animales tanto neonatos como adultos pueden tratarse con administración intratecal de iduronidasa. En ratones modelo, ratones neonatos de tres días de edad y, por ejemplo, ratones adultos de 7-13 semanas de edad en el momento de la inyección pueden tratarse con de 0,01 μg a aproximadamente 5 μg de enzima. Debe observarse que la dosis está probablemente la 1/1000^{ésima} de la dosis requerida para un mamífero más grande tal como un perro. Para administración intratecal a recién nacidos, los ratones son anestesiados por inhalación de halotano, e iduronidasa en 30 μl de solución salina (con colorante al 2%) puede inyectarse entre las vértebras sexta lumbar y segunda sacra usando una aguja de calibre 30. La introducción con éxito en el espacio del líquido cefalorraquídeo se detecta inmediatamente como una veta verde que se extiende desde la columna vertebral y se difunde al interior del cerebro. Para administración intratecal a adultos, los ratones MPS son anestesiados con avertina (tribromoetanol) y se realiza una incisión de 1 cm a través de la piel paralela a la columna para hacer visibles las posiciones de las vértebras individuales. A continuación puede inyectarse iduronidasa con colorante al 2% entre las vértebras última torácica y la segunda lumbar.

A tiempos crecientes después de este tratamiento, los ratones son sacrificados y los tejidos analizados para detectar los niveles de iduronidasa. Los niveles terapéuticos de enzima iduronidasa se valoran como cualquier nivel que produjo una disminución detectable en vacuolas de almacenamiento. Por supuesto, los estudios del modelo anterior se presentan simplemente a modo de ejemplo, con otros estudios de modelo ejemplares que se describen en los ejemplos a continuación en el presente documento, estos estudios modelo pueden modificarse fácilmente sin alejarse del alcance de la invención reivindicada.

Modificación de enzima para facilitar la captación mejorada

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención, puede ser preferible garantizar que la enzima que está siendo administrada al sujeto a través de administración intratecal es una que comprende un resto que puede ser captado fácilmente por un receptor de captación de alta afinidad en la superficie de una célula cerebral. Por ejemplo, dicho receptor puede ser el receptor de manosa-6-fosfato y la enzima puede comprender hasta aproximadamente un promedio de aproximadamente al menos el 20% de oligosacáridos bis-fosforilados por enzima. En otras realizaciones, la enzima puede comprender el 10%, 15%, 18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% de oligosacáridos bis-fosforilados por enzima. Aunque dichos oligosacáridos bis-fosforilados pueden estar presentes de forma natural en la enzima, debe observarse que las enzimas pueden modificarse para poseer dichos oligosacáridos. Por ejemplo, los expertos en la materia tienen conocimiento de enzimas que son capaces de catalizar la transferencia de N-acetilglucosamina-L-fosfato de UDP-GlcNAc a la posición 6' de manosas unidas en α -1,2 en enzimas lisosómicas. Métodos y composiciones para producir y usar dichas enzimas son descritos, por ejemplo, por Canfield y col., en la Patente de Estados Unidos N° 6.537.785, y la Patente de Estados Unidos N° 6.534.300.

En otras realizaciones, las enzimas lisosómicas para su uso en la presente invención pueden estar conjugadas a una RAP y polipéptidos de RAP, que se unen selectivamente a receptores de LRP que pueden estar presentes en células cerebrales. Como tales, estas moléculas de RAP servirán para incrementar el transporte de la enzima lisosómica a través de la barrera hematoencefálica y/o administrar agentes a lisosomas de células dentro del SNC. Métodos y composiciones para preparar composiciones enzimáticas que comprenden restos de RAP unidos a ellas se describen en detalle en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 10/206.448, presentada el 25 de julio de 2002 y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 10/600.862, presentada el 20 de junio de 2003.

En una realización adicional más, los expertos en la materia pueden emplear una administración de la enzima conjugada a melanotransferrina (p97) tal como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 6.455.494 y la Patente de Estados Unidos N° 5.981.194. Por supuesto, los agentes anteriores que mejoran la administración y/o captación de los agentes terapéuticos al tejido cerebral son meramente ejemplares y los expertos en la materia estarán al tanto de otros receptores, ligandos u otros agentes que pueden usarse en un contexto similar para administrar un agente terapéutico a través de la interfaz cerebro-LCR o incluso la BHE.

Terapia de combinación para inducir tolerancia al sujeto a terapia de sustitución enzimática

Se ha descubierto que, durante la administración de agentes tales como proteínas recombinantes y otros agentes terapéuticos, un sujeto puede montar una respuesta inmunitaria contra estos agentes, conduciendo a la producción de anticuerpos que se unen e interfieren en la actividad terapéutica así como causan reacciones inmunológicas agudas o crónicas. Este problema es el más significativo para agentes terapéuticos que son proteínas debido a que las proteínas son antígenos complejos y, en muchos casos, el sujeto no ha sido inmunológicamente expuesto a los antígenos. Por lo tanto, en ciertos aspectos de la presente invención, será útil hacer al sujeto que recibe la enzima terapéutica tolerante a la terapia de sustitución enzimática. En este contexto, la terapia de sustitución enzimática puede administrarse al sujeto como una terapia de combinación con un régimen inductor de tolerancia.

La Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 10/141.668 de titularidad común y pendiente de tramitación desvela el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico usando inducción de tolerancia inmunitaria. En resumen, el

uso de dicho régimen de inducción de tolerancia puede ser útil para impedir que el sujeto monte una respuesta inmunitaria a la terapia de sustitución enzimática y de este modo reduzca o haga ineficaces de otro modo los potenciales efectos beneficiosos de la terapia de sustitución enzimática.

- 5 En un método preferido, el método contempla reducir o impedir una respuesta inmunitaria específica de antígeno clínicamente significativa a α -L-iduronidasa humana recombinante usada para tratar mucopolisacaridosis I (MPS I), donde la iduronidasa se administra por vía intratecal. El método emplea un régimen inicial de 30-60 días de un agente inmunosupresor de células T tal como ciclosporina A (CsA) y un agente antiproliferativo, tal como, azatioprina (Aza), combinado con infusiones intratecales semanales de dosis bajas de iduronidasa. La potente respuesta de IgG
- 10 típica a infusiones semanales de iduronidasa se vuelve reducida en gran medida o prevenida usando un régimen de 60 días de fármacos inmunosupresores, ciclosporina A (CsA) y azatioprina (Aza), combinado con infusiones intratecales semanales de dosis bajas de rIDU. Usando dichos regímenes de inducción de tolerancia, será posible hacer al sujeto tolerante a dosis terapéuticas mayores de iduronidasa durante hasta 6 meses sin un incremento del valor de anticuerpos contra la iduronidasa, o de hecho cualquier otra enzima que podría usarse para sustitución
- 15 enzimática de una enfermedad de almacenamiento lisosómico. Dichos regímenes de inducción de tolerancia se han descrito en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 10/141.668.

Administración intratecal de las formulaciones farmacéuticamente aceptables

- 20 Tal como se ha descrito anteriormente, la presente invención se basa en sorprendentes descubrimientos de la eficacia terapéutica del uso de administración intratecal de terapia de sustitución enzimática para enfermedad de almacenamiento lisosómico. En una realización, la enzima se administra mediante introducción en el sistema nervioso central del sujeto, por ejemplo, en el líquido cefalorraquídeo del sujeto. En ciertos aspectos de la invención, la enzima se introduce por vía intratecal, por ejemplo, en la zona lumbar, o la cisterna magna o por vía
- 25 intraventricular en el espacio de un ventrículo cerebral.

- Los expertos en la materia tienen conocimiento de dispositivos que pueden usarse para realizar administración intratecal de una composición terapéutica. Por ejemplo, la terapia puede administrarse usando un depósito de Ommaya que es de uso habitual para administrar por vía intratecal fármacos para carcinomatosis meníngea (Lancet
- 30 2: 983-84, 1963). Más específicamente, en este método, un tubo ventricular se inserta a través de un agujero formado en el cuerno anterior y está conectado en un depósito de Ommaya instalado bajo el cuero cabelludo, y el depósito es perforado por vía subcutánea para administrar por vía intratecal la enzima particular que está siendo sustituida, que se inyecta en el depósito. Otros dispositivos para administración intratecal de composiciones terapéuticas a un individuo se describen en la Patente de Estados Unidos N° 6.217.552. Como alternativa, el
- 35 fármaco puede administrarse por vía intratecal, por ejemplo, mediante una única inyección, o infusión continua. Debe entenderse que el tratamiento de dosificación puede ser en forma de la administración de una única dosis o múltiples dosis.

- Tal como se usa en el presente documento, la expresión "administración intratecal" pretende incluir administrar una
- 40 composición farmacéutica directamente al líquido cefalorraquídeo de un sujeto, mediante técnicas que incluyen inyección cerebroventricular lateral a través de un trepanado o punción cisternal o lumbar o similar (descrito en Lazorthes y col. Advances in Drug Delivery Systems and Applications in Neurosurgery, 143-192 y Omayya y col., Cancer Drug Delivery, 1: 169-179, cuyo contenido se incorpora en el presente documento como referencia). La expresión "región lumbar" pretende incluir la zona entre la tercera y la cuarta vértebras lumbares (parte baja de la
- 45 espalda) y, de forma más inclusiva, la región L2-S1 de la columna. La expresión "cisterna magna" pretende incluir acceso al espacio alrededor y por debajo del cerebelo mediante la abertura entre el cráneo y la parte superior de la columna. La expresión "ventrículo cerebral" pretende incluir las cavidades en el cerebro que son continuas con el canal central de la médula espinal. La administración de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención a cualquiera de los sitios mencionados anteriormente puede conseguirse mediante inyección directa de la
- 50 composición o mediante el uso de bombas de infusión. Para inyección, la composición de la invención puede formularse en soluciones líquidas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón fosfato. Además, la enzima puede formularse en forma sólida y disolverse de nuevo o suspenderse inmediatamente antes del uso. Las formas liofilizadas también están incluidas. La inyección puede ser, por ejemplo, en forma de una inyección en embolada o infusión continua (por ejemplo, usando bombas
- 55 de infusión) de la enzima.

- En una realización de la invención, la enzima se administra mediante inyección cerebroventricular lateral en el cerebro de un sujeto. La inyección puede realizarse, por ejemplo, a través de un trepanado realizado en el cráneo del sujeto. En otra realización, la enzima y/o otra formulación farmacéutica se administra a través de una derivación
- 60 insertada quirúrgicamente en el ventrículo cerebral de un sujeto. Por ejemplo, la inyección puede realizarse en los ventrículos laterales, que son mayores, incluso también puede realizarse a través de inyección en los tercer y cuarto ventrículos más pequeños.

- En otra realización más, las composiciones farmacéuticas usadas en la presente invención se administran mediante
- 65 inyección en la cisterna magna, o la zona lumbar de un sujeto.

En otra realización del método de la invención, la formulación farmacéuticamente aceptable proporciona administración sostenida, por ejemplo, "liberación lenta" de la enzima u otra composición farmacéutica usada en la presente invención, a un sujeto durante al menos una, dos, tres, cuatro semanas o periodos de tiempo más largos después de que la formulación farmacéuticamente es administrada al sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "administración sostenida" pretende incluir administración continua de una composición farmacéutica de la invención in vivo durante un periodo de tiempo después de la administración, preferentemente al menos varios días, una semana o varias semanas. La administración sostenida de la composición puede demostrarse mediante, por ejemplo, el efecto terapéutico continuado de la enzima a lo largo del tiempo (por ejemplo, la administración sostenida de la enzima puede demostrarse mediante la cantidad reducida continuada de gránulos de almacenamiento en el sujeto). Como alternativa, la administración sostenida de la enzima puede demostrarse detectando la presencia de la enzima in vivo a lo largo del tiempo.

La formulación farmacéutica usada en la invención contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima para su uso en terapia de sustitución enzimática de una enfermedad de almacenamiento lisosómico. Dicha cantidad terapéuticamente eficaz es cualquier cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado deseado. En realizaciones preferidas, las composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de iduronidasa. Una cantidad terapéuticamente eficaz de iduronidasa puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, la edad y el peso del sujeto, y la capacidad de la enzima (en solitario o en combinación con uno o más otros agentes) para desencadenar una respuesta deseada en el sujeto. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad terapéuticamente eficaz es, también, una en la que cualesquiera efectos tóxicos o perjudiciales de la composición son superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Un intervalo no limitante para una concentración terapéuticamente eficaz de iduronidasa es de 0,001 μg de enzima/ml a aproximadamente 150 μg de enzima/ml. Debe observarse que los valores de dosificación pueden variar con la gravedad de la afección a aliviar. Debe entenderse, además, que para cualquier sujeto particular, regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de la terapia de sustitución enzimática y esos intervalos de dosificación descritos en el presente documento son solamente ejemplares y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la invención reivindicada.

La composición enzimática está, preferentemente, en forma de una dosificación unitaria inyectable. Los ejemplos de vehículos o diluyentes utilizables para preparar dichas dosis inyectables incluyen diluyentes tales como agua, alcohol etílico, macrogol, propilenglicol, alcohol isoestearílico etoxilado, alcohol polioxiisoestearílico y ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán, agentes de ajuste del pH o tampones tales como citrato sódico, acetato sódico y fosfato sódico, estabilizantes tales como piro-sulfato sódico, EDTA, ácido tioglicólico y ácido tioláctico, agentes isotónicos tales como cloruro sódico y glucosa, anestésicos locales tales como clorhidrato de procaina y clorhidrato de lidocaína. Además, pueden añadirse agentes solubilizantes y analgésicos habituales. Las inyecciones pueden prepararse añadiendo dichos vehículos a la enzima u otro agente activo, siguiendo procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. Un exhaustivo análisis de excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en el documento REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Las formulaciones farmacéuticamente aceptables pueden suspenderse fácilmente en vehículos acuosos e introducirse a través de agujas convencionales o usando bombas de infusión. Antes de la introducción, las formulaciones pueden esterilizarse, preferentemente, con radiación gamma o esterilización por haz de electrones.

Kits

Los agentes utilizados pueden proporcionarse en un kit, kit que puede incluir, además, instrucciones de uso. Dicho kit comprenderá una enzima para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico, habitualmente en una dosis y una forma adecuada para administración al huésped. El kit comprenderá habitualmente un dispositivo para administrar la enzima por vía intratecal. El kit puede comprender, además, un agente inmunosupresor de células T, en una forma adecuada para administración, y puede incluir, además, reactivos de ensayo para monitorizar los niveles en sangre del agente, y/o para determinación de la supresión de la actividad de células T. Un agente antiproliferativo también puede estar incluido, en una forma adecuada para administración.

También puede proporcionarse un kit para la conjugación de un antígeno, particularmente un antígeno polipeptídico, a un resto de captación elevada, para generar una composición toleragénica. Por ejemplo, puede proporcionarse un resto tal como un grupo manosa 6 fosfato, conjugado a un enlazador adecuado para enlazar azúcares y polipéptidos, tal como se ha descrito anteriormente. El resto de captación elevada también puede proporcionarse en una forma no conjugada, en combinación con un enlazador adecuado e instrucciones de uso.

Otro kit puede comprender instrucciones para la administración intratecal de las composiciones terapéuticas de la presente invención, además de las composiciones terapéuticas. En algunas realizaciones, los kits de la invención pueden comprender catéteres u otros dispositivos para la administración intratecal de la terapia de sustitución

enzimática que están cargados previamente con las composiciones terapéuticas de la presente invención. Por ejemplo, se contemplan específicamente catéteres cargados previamente con 0,001 mg, 0,005 mg, 0,01 mg, 0,015 mg, 0,02 mg, 0,03 mg, 0,04 mg, 0,05 mg, 0,06 mg, 0,07 mg, 0,08 mg, 0,09 mg, 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg, 0,5 mg, 0,6 mg, 0,7 mg, 0,8 mg, 0,9 mg o 1,0 mg o más de iduronidasa en una formulación farmacéuticamente aceptable. Otras enzimas para su uso en enfermedades de almacenamiento lisosómico también pueden presentarse de forma similar en catéteres cargados previamente para administración intratecal. Los catéteres ejemplares pueden ser catéteres de un solo uso que pueden desecharse después del uso. Como alternativa, los catéteres cargados previamente pueden ser rellenables y presentarse en kits que tienen cantidades apropiadas de la enzima para rellenar dichos catéteres.

Aspectos y detalles adicionales de la invención serán evidentes a partir de los siguientes ejemplos, que pretenden ser ilustrativos en lugar de limitantes.

Ejemplo 1

Protocolos para evaluar inyección directa del cerebro con Iduronidasa humana recombinante

Los expertos en la materia también tienen conocimiento de modelos caninos bien conocidos para enfermedades de almacenamiento lisosómico. En una realización, se usaron perros con MPS I para evaluar la eficacia de los métodos de la presente invención. Para dichas determinaciones, es deseable que perros normales y perros con MPS I se evalúen de forma concurrente. El siguiente ejemplo proporciona protocolos ejemplares para su uso junto con los métodos descritos en el presente documento.

Para evaluar la penetración enzimática en el cerebro de perros normales, perros Beagle normales (por ejemplo, 2 planeados inicialmente, hasta 4 posibles) se preparan para anestesia y esterilidad. Un depósito de Ommaya o dispositivo equivalente se implanta con un catéter ventricular colocado en el ventrículo lateral. Un depósito de LCR y un catéter lumbar también pueden implantarse en la región lumbar. El LCR se extrae para confirmar la permeabilidad. La administración enzimática y el muestreo de LCR se realizan en el ventrículo lateral en uno de los perros Beagle. El sistema en la región lumbar en este Beagle sirve como sistema de apoyo en el caso de que se produzcan problemas irreversibles en el sitio de acceso original. El segundo Beagle se prepara para recibir enzima y el muestreo de LCR en la región lumbar. El sistema en el ventrículo lateral en este segundo Beagle servirá como sistema de apoyo en caso de problemas irreversibles en el sitio de acceso original. La enzima se administra a inyecciones semanales durante cuatro semanas. Estudios farmacocinéticos del aclaramiento en LCR de iduronidasa se evalúan usando un conjunto de muestreos temporizados en la primera y la última semanas de inyección. Todas las muestras de LCR obtenidas son analizadas para seguridad, farmacocinética y farmacodinámica de penetración enzimática. En el caso de que surjan complicaciones mientras se coloca el sistema ventricular en los Beagle normales, los métodos de la presente invención pueden evaluarse usando un sistema de administración colocado solamente en la región lumbar. Por lo tanto, la administración enzimática y el muestreo de LCR se producirán en las regiones lumbares solamente. Al finalizar el tratamiento, puede recogerse tejido cerebral para evaluar la actividad de iduronidasa usando un ensayo validado. El tejido cerebral se analizará también para almacenamiento usando microscopía óptica e inmunofluorescencia confocal. Pueden evaluarse tejidos tanto proximales como distales al sitio de penetración ventricular para la penetración enzimática.

Para determinar la penetración enzimática en los animales modelo para enfermedad de almacenamiento lisosómico, el protocolo anterior se repite usando perros con MPS I.

Para evaluar la respuesta de los animales al tratamiento, pueden monitorizarse diversos parámetros. Para obtener una evaluación de referencia, puede ser deseable realizar un examen clínico para evaluar, el estado físico, los signos vitales y el peso. Esta evaluación debe suplementarse preferentemente con análisis clínicos de laboratorio para determinar el hemograma completo (CBC) y el perfil de Superchem y el análisis de orina de los animales. Deben analizarse muestras de orina en busca de la presencia de glucosaminoglucanos, deben realizarse análisis de suero para evaluar la presencia de anticuerpos antiiduronidasa dado que esto puede tener un efecto sobre la cantidad de iduronidasa que debe administrarse. La actividad de iduronidasa en plasma también debe evaluarse. La evaluación de referencia también debe incluir un análisis del LCR para análisis de laboratorio del LCR convencionales (recuento celular, proteína, glucosa y citología), GAG, ELISA para anticuerpos anti-idu, y análisis de iduronidasa. Las células presentes en el LCR deben ser evaluadas para la presencia de gránulos de almacenamiento usando una tinción sencilla. Estos parámetros deben evaluarse a continuación periódicamente durante todo el periodo de terapia. Al final del periodo de análisis, puede obtenerse y analizarse adicionalmente tejido cerebral. Dichos análisis pueden incluir una biopsia del cerebro para realizar un ensayo de iduronidasa y niveles de GAG en el tejido. La patología de animales con MPS I puede evaluarse usando microscopía óptica y electrónica, y también puede realizarse inmunofluorescencia confocal usando anticuerpos antiiduronidasa.

Lo siguiente es una descripción de los métodos generales usados para realizar las evaluaciones perfiladas anteriormente.

Examen clínico: Para evaluar el estado físico de los animales, un examen físico general debe observar la postura,

actividad, conducta y aspecto general, preferentemente a intervalos diarios durante toda la duración del experimento el examen debe observar los signos vitales del animal (frecuencia cardíaca, temperatura corporal y frecuencia respiratoria), particularmente después de cada inyección. El crecimiento puede evaluarse realizando periódicamente mediante mediciones del peso corporal.

5

Niveles de α -L-iduronidasa en LCR y plasma: Los niveles de enzima pueden medirse en el plasma y el LCR justo antes de la administración enzimática al LCR cada semana. El LCR se obtiene después de preparación estéril del orificio de acceso al LCR y se accede a él con una aguja estéril. La enzima en muestras de sangre se estabiliza añadiendo 1/10^o volumen de NaPO₄ 100 mM/Citrato, pH 4,0. La enzima se ensaya para iduronidasa usando un ensayo validado con el sustrato artificial 4-metilumbeliferil- α -1-iduronida. La fluorescencia neta se determina mediante fluorometría a excitación a 365 nm y emisiones a 440 nm. Una unidad de iduronidasa es equivalente al número de micromoles de sustrato escindidos por minuto a 37°C en las condiciones del ensayo.

10

α -L-iduronidasa en tejido cerebral: Los niveles de enzima pueden medirse en una muestra de biopsia obtenida. En los perros con MPS I, las biopsias pueden obtenerse antes de la perfusión. Una muestra de cerebro se congela instantáneamente en un frasco marcado en nitrógeno líquido. Después de descongelar, la muestra se pesa rápidamente y 3 volúmenes de PAD (tampón fosfato 10 mM, pH 5,8, azida al 0,02% y ditiotreitól 0,1 mM) + Triton X-100 al 0,1%. La muestra de tejido se tritura en un homogeneizador de vidrio triturado Dounce mediante un mínimo de 10 pulsaciones mientras estaba en hielo y el homogenato se aclaró de partículas grandes centrifugando en una microcentrífuga durante varios segundos. El extracto se almacena mediante congelación inmediata. La enzima se ensaya para iduronidasa usando un ensayo validado con el sustrato artificial 4-metilumbeliferil- α -1-iduronida. Los ensayos piloto deben realizarse preferentemente para determinar el tiempo de ensayo requerido y si se necesita dilución. La fluorescencia neta se determina por fluorometría a excitación a 365 nm y emisiones a 440 nm. Una unidad de iduronidasa es equivalente al número de micromoles de sustrato escindidos por minuto a 37°C en las condiciones del ensayo.

15

20

25

Análisis de GAG: A la conclusión de la terapia, los perros pueden ser sacrificados y las muestras de tejido cerebral recogerse mediante biopsia y congelarse rápidamente con nitrógeno líquido para posteriores análisis del glucosaminoglucano en el tejido. Para análisis de GAG en el tejido, se ensayarán glucosaminoglucanos sulfatados usando una modificación del método de Azul Alciano de Bjornsson según lo publicado (Kakkis y col., Biochem Mol Med. 1996; 58(2): 156-67). Las cantidades de GAG pueden determinarse mediante comparación con estándares de dermatán sulfato. La cuantificación de GAG urinaria y en el LCR se completa en un método casi idéntico al usado para cuantificar el contenido de GAG en el tejido realizado en muestras de orina y LCR.

30

Almacenamiento del LCR: Restos celulares del LCR pueden identificarse usando una tinción sencilla y las células evaluadas fácilmente para almacenamiento de GAG.

35

Estudios farmacocinéticos de LCR: Pueden completarse estudios farmacocinéticos en cada perro tratado durante las primera y última semanas de terapia de sustitución enzimática para monitorizar el aclaramiento de α -L-iduronidasa del LCR después de una infusión. Después de administración de enzima al LCR mediante el orificio de acceso ventricular, se extraen muestras del mismo sitio de administración de la enzima a 1, 2, 4 horas. Las muestras se extraen y se preparan como en la sección sobre muestras de LCR. Los datos se representan gráficamente como tiempo frente a actividad iduronidasa en el LCR. Puede determinarse la semivida de iduronidasa en la circulación.

40

CBC, Perfil de Superchem y análisis de orina: Las muestras de sangre se recogen cada dos semanas para un CBC y un perfil de Superchem. El análisis de orina con tiras reactivas también se realiza cada dos semanas en una muestra de orina fresca para monitorizar elementos como proteinuria y hematuria.

45

ELISA para anticuerpos específicos para α -L-iduronidasa: Se recogen muestras de suero y se congelan a -20°C para posteriores análisis de anticuerpos. Los anticuerpos específicos para iduronidasa son detectados mediante protocolo ELISA convencional usando IgG de cabra anti-perro marcada con fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario. Los anticuerpos en el LCR se determinan mediante el mismo método aunque se espera que pueda ser necesaria una dilución más pequeña.

50

Composición enzimática administrada: La α -L-iduronidasa humana recombinante es suministrada por BioMarin Pharmaceutical a partir de lotes a granel que pueden ser o no lanzados para uso humano. La enzima debe satisfacer preferentemente todas las especificaciones relevantes requeridas para terapia enzimática y administración segura incluyendo potencia de paso, actividad, esterilidad y niveles de endotoxina. La forma de dosificación está constituida por enzima a 100.000 u/ml en tampón de formulación (NaPO₄ 100 mM, pH 5,8, NaCl 150 mM a pH 5,3-5,8).

55

60

Colocación del dispositivo ventricular permanente: Se han descrito procedimientos para muestrear mediante el sistema ventricular (McCully y col; Poplack y col; Moir y Dow y col; Kusumi y Plouffe; Haslberger y Gaab). Algunos de estos también implican traumatismo para el cerebro y no permiten una colocación precisa del sistema de administración. Se usará una técnica que permite a un investigador obtener múltiples muestras de LCR estériles o

65

administrar múltiples inyecciones el LCR de animales no anestesiados que están sedados con una dosis mínima de tranquilizantes. El procedimiento implica la colocación de un catéter permanente en los ventrículos laterales así como el espacio intratecal de la región lumbar de la columna.

- 5 En los ejemplos descritos en el presente documento, los animales, por ejemplo, se usan dos perros Beagle normales, macho, adultos criados en laboratorio y dos perros macho con mucopolisacaridosis I. A los perros se les administra atropina (0,045 mg/kg), y la anestesia se induce con Propofol intravenoso (1-6 mg/kg) valorado a tal efecto. Los perros se intuban y se mantienen bajo anestesia por Isoflurano con oxígeno, y se colocan en una almohadilla calefactora durante cirugía para mantener la temperatura corporal normal. Se administrará solución salina normal para mantenimiento del fluido. Pueden administrarse antibióticos antes de y durante la cirugía para prevenir la infección.

15 El perro se coloca sobre su vientre con la cabeza apoyada para garantizar que las vías respiratorias permanecen permeables. El occipucio y la línea media dorsal se sujetan con pinzas, se lavan quirúrgicamente y se cubren con gasa. Se usa una técnica estéril y aumento con lupa durante todo el procedimiento. La longitud apropiada del catéter se predetermina midiendo el grosor de las dos primeras vértebras cervicales (C1 y C2), la distancia de C2 y la distancia hasta la cisterna. Se calcula el volumen de fluido necesario para llenar el volumen del catéter y el depósito (espacio muerto).

20 Se realiza una incisión en la piel en la línea media desde la protuberancia occipital a lo largo de la línea media dorsal para dejar expuesto el foramen magnum, la unión de la C1 y el occipucio, y la membrana atlanto-occipital. Los músculos subcutáneos se diseccionan rápidamente y se dividen los ligamentos nuchales. Usando un taladro neumático y un escalpelo se crea un pequeño orificio en los elementos posteriores de la C1 y se realiza una hendidura horizontal de 2 mm en la dura para entrar en la cisterna magna. Usando un gancho quirúrgico, la longitud medida previamente de un catéter de silicona lumbar Spetzler perforado que contenía un estilete se enrosca en el espacio ventricular y se extrae LCR para confirmar la permeabilidad. El catéter se ancla al músculo cerca del depósito. La hemostasia se consigue con una unidad de electrocauterización bipolar. Un bolsillo subgaleal subcutáneo se crea en la zona occipital para alojar al depósito de Ommaya. El depósito se fija con sutura no absorbible al pericráneo occipital. La parte externa restante del catéter se extiende hasta el bolsillo subcutáneo, y se usa un conector intermedio de metal para unir el catéter al depósito de Ommaya y puede usarse sutura de seda para garantizar la conexión.

35 Para determinar la permeabilidad del catéter, una pequeña cantidad de LCR, que justamente supera el espacio muerto combinado del catéter y el depósito, se retira suavemente usando una aguja de calibre 25 de 5/8 pulgadas fijada a una jeringa de 1 cc. El depósito se fija con suturas no absorbibles al pericráneo occipital. El sistema se examina en busca de fugas, y el sitio operativo se cierra en capas anatómicas con suturas 3.0 Vicryl interrumpidas. La piel se cierra a continuación con suturas de nylon.

40 La extracción de LCR o las inyecciones en el depósito se realizan usando técnica estéril (lavado quirúrgico de la piel y guantes estériles) con una aguja de calibre 25 de 5/8 pulgadas fijada a una jeringa de 1 cc. El LCR debe retirarse de forma suave y constante.

45 De forma postoperatoria, el perro es monitorizado y se administran fluidos intravenosos según sea necesario hasta que sea capaz de permanecer en pie, comer y beber. El analgésico buprenorfina (0,01 mg/kg subcutánea a intervalos de 12 horas) puede administrarse agente sea necesario para aliviar la incomodidad. Pueden administrarse antibióticos 10 días de forma postoperatoria. El perro debe ser examinado clínicamente a diario.

50 Para mantener la permeabilidad, el sistema debe ser lavado semanalmente. Esto permitirá el muestreo de LCR y la administración de enzima. Para administrar la enzima o retirar LCR, los perros se sedan con 0,1 mg/kg de acepromazina y se incrementa según sea necesario. La piel sobre el depósito se sujeta con pinzas y se lava quirúrgicamente. Llevando guantes estériles, se determina la ubicación del depósito detrás de la oreja, y se entra usando una aguja de calibre 25 unida a una jeringa de 1 ml. Hay que tener un cuidado particular de entrar en la cúpula del depósito varios milímetros lejos de la zona de la perforación de la piel para minimizar la contaminación exógena. Un volumen de LCR igual a volumen del catéter más el depósito se retira y se desecha retirando la jeringa y expulsando su contenido; a continuación, la cantidad deseada de LCR se extrae o la enzima se administra al depósito. Cuando la enzima se administra (18.000 unidades/ml, LCR), es preferible "perseguir" a la enzima con un volumen de solución salina fisiológica equivalente al volumen del espacio muerto del catéter y el depósito. Esto garantiza que la enzima es administrada directamente en el sistema ventricular. El muestreo de LCR y la administración enzimática se continúan tal como se ha descrito anteriormente después de la instalación del catéter.

60 Para el análisis del tejido, después de ocho semanas de tratamiento enzimático, los perros son anestesiados profundamente (pérdida de los reflejos de pellizco del dedo y del párpado) con una sobredosis de pentobarbital sódico, y se lavan de forma intracárdica con solución salina heparinizada. Se realiza una pequeña abertura craneal en la zona frontal y se extirpa una pequeña sección de cerebro. Al perro se le perfunde a continuación por vía intracárdica con paraformaldehído al 4%.

En todos los anteriores protocolos de tratamiento, los perros deben monitorizarse estrechamente en busca de signos de una reacción anafiláctica durante e inmediatamente después de la administración enzimática. Los signos de una reacción pueden incluir cambios comportamentales, tales como inquietud, irritabilidad, o inmovilidad extrema, así como vómitos, movimientos intestinales y pérdida de color en las membranas mucosas. Si cualquiera de estos síntomas u otros síntomas adversos aparecen, la administración debe interrumpirse, puede administrarse difenhidramina, seguida por un goteo de solución salina y administración de oxígeno. La infusión puede continuar cuando la reacción remite.

Los perros también son monitorizados para infección debido al catéter exteriorizado y son tratados mediante medidas apropiadas (retirada del catéter, control local de la infección, antibióticos sistémicos). Si se produce una infección, tal como ventriculitis, los tratamientos enzimáticos se pospondrán hasta que las infecciones hayan sido tratadas adecuadamente con gentamicina.

Los siguientes ejemplos describen los resultados de estudios realizados sobre la administración intratecal de iduronidasa a animales modelo con MPS I usando algunos o todos los métodos descritos en el ejemplo anterior.

Ejemplo 2

Enzima administrada mediante inyección intraventricular penetra en la barrera hematoencefálica y es detectada en el tejido cerebral

La administración de enzimas directamente al sitio de daño inducido por almacenamiento lisosómico en los cerebros de sujetos con trastorno de almacenamiento lisosómico ha demostrado ser difícil en este punto. Los grandes complejos enzimáticos necesarios para tratar estas enfermedades típicamente no pueden penetrar en la barrera hematoencefálica. Para determinar un método eficaz para arrastrar estas enzimas a través de la interfaz cerebro-LCR, se ensayaron dos vías de administración enzimática en un modelo en rata y canino del trastorno de almacenamiento lisosómico MPS I.

Para administrar la enzima por vía intraventricular, a las ratas se les inyectó en el ventrículo lateral, usando guía estereotáxica, con 5-10 μ l de iduronidasa humana recombinante (rhIDU) o proteína control. Los animales se sacrificaron 24 horas después de la inyección y se obtuvieron secciones del cerebro.

Las secciones de cerebro se analizaron en busca de la presencia de rhIDU usando microscopía confocal con anticuerpos antiiduronidasa. El análisis inmunohistoquímico mostraba que la enzima inyectada es captada por las neuronas cerebrales, y además que la iduronidasa está localizada en los lisosomas en las células neuronales. La tinción anti-IDU indica que la enzima penetra en el tejido cerebral varios milímetros, pero existe un gradiente decreciente de enzima, lo que significa que, cuanto más alejado está el sitio de inyección, menos enzima se detecta en el cerebro. La tinción también indicaba que la semi-vida de la enzima era de aproximadamente 7 días.

Las secciones de cerebro se analizaron también para la actividad de rhIDU.

Ejemplo 3

La enzima administrada mediante inyección intratecal penetra y es detectada en tejido cerebral

Para determinar si la inyección intratecal de enzima implicada en trastornos de almacenamiento lisosómico podría cruzar la barrera hematoencefálica tan eficazmente, o más eficazmente, que la inyección intraventricular, se realizó una inyección intratecal en el LCR en sujetos caninos.

A los animales (n = 2/grupo) se les administró 1 cc de rh-iduronidasa, con un contenido total de proteína de 0,33 mg, 1 mg o 3 mg, mediante inyección en la cisterna magna. Este protocolo se repitió semanalmente durante un total de cuatro semanas. Las secciones cerebrales se tomaron para análisis 48 horas después de la última inyección. Para análisis, la mitad derecha del cerebro se cortó en tiras cranealmente y secciones alternas se analizaron para actividad enzimática, localización inmunohistoquímica de enzima en el cerebro y contenido de glucosaminoglucano en secciones cerebrales. La mitad izquierda del cerebro se cortó en tiras coronalmente y se ensayó mediante microscopía óptica y microscopía electrónica.

El análisis de los niveles de enzima en el cerebro de sujetos después de la inyección intratecal (figura 1) demostró que los animales a los que se administraron 0,33 mg de iduronidasa mostraban un incremento de 5 veces de enzima en el cerebro en comparación con los animales de control (media, 65 ± 28 Unidades/mg de proteína), los animales que recibían 1 mg/inyección mostraban un incremento de 7 veces de enzima (niveles medios de enzima de 89 ± 62 U/mg), mientras que los animales que recibían 3 mg de enzima/inyección mostraban un incremento de 17 veces en los niveles de enzima, con un nivel medio de iduronidasa de aproximadamente 224 ± 32 U/mg. Por lo tanto, incrementar la dosificación de iduronidasa administrada a un sujeto incrementa el nivel de iduronidasa detectada en el cerebro.

En experimentos similares en los que los 6 perros se trataron con bajas (0,46 mg/inyección), medias (1,08/1,38 mg/inyección) y altas (4,14 mg/inyección) dosis de rh-iduronidasa administradas por la cisterna magna una vez por semana durante cuatro semanas y se ensayó el contenido de iduronidasa del cerebro a 48 horas después de la última dosis (véase la tabla 1 para dosis específicas). Los dos perros tratados por vía intratecal en cada nivel de dosis se compararon con los niveles de enzima iduronidasa en dos perros normales no tratados. Los perros tratados IT tenían 5,6, 7,5 y 18,9 veces los niveles de enzima de animales no tratados o tratados con vehículo para las dosis bajas, medias y altas, respectivamente (tabla 1). Dado que la concentración correctora de enzima es de hasta el 2-5% de la normal, estos niveles representaban concentraciones muy alejadas por encima de los niveles correctores requeridos de enzima.

Tabla 1: Efectos de respuesta a la dosis de rhIDU administrada IT a perros normales

Dosis semanal de rhIDU IT (mg)	Cerebro total [‡]	Veces la normal	Cerebro superficial [‡]	Veces la normal	Cerebro profundo [‡]	Veces la normal
Normal no tratado / tratado con placebo	11,9 ± 1,95 [10,1 - 15,0]	1	ND	1	ND	1
Baja (0,46)	66,4 ± 4,07 [63,5, 69,3]	5,6 p = 0,0001*	101 ± 19,5 [87,5, 115]	8,5 p = 0,0001*	31,8 ± 3,75 [29,1, 34,4]	2,7 p = 0,0002*
Media (1,08/1,38)	89,0 ± 18,2 [76,0, 102]	7,5 p = 0,0001*	121 ± 43,4 [90,5, 152]	10,2 p = 0,0011*	52,3 ± 0,64 [51,8, 52,7]	4,4 p < 0,0001*
Alta (4,14)	225 ± 89,5 [161, 288]	18,9 p = 0,0014*	355 ± 198 [214, 495]	29,8 p = 0,0057*	70,6 ± 14,1 [60,6, 80,5]	5,9 p = 0,0001*

Los niveles de iduronidasa se calculan a partir de valores medios para cada región para cada perro sacrificado. Las medias de las medias para cada animal ± desviación estándar se muestran. N = 5 para el grupo no tratado y N = 2 para cada grupo de dosificación. [‡] Los niveles de iduronidasa se expresan en unidades de iduronidasa por mg de proteína. *Estadísticamente significativo. ND es no realizado.

Los niveles de rh-iduronidasa también se midieron en tejidos cerebral profundo y cerebral superficial (figura 2) de animales a los que se administró 0,33 mg, 1 mg o 3 mg de enzima. De nuevo, los análisis mostraban que, cuanto mayor sea la dosis de enzima, mayor será la cantidad de iduronidasa detectada en el tejido cerebral, con el grupo de 3 mg/inyección demostrando un incremento de 5 veces en el tejido cerebral profundo. La iduronidasa medida en la superficie del tejido cerebral se detectó a una diferencia de 8 veces en animales que recibían 0,33 mg de proteína/inyección mientras que los animales que recibían 3 mg/inyección mostraban un incremento de 27 veces en la expresión superficial de iduronidasa en comparación con controles normales. Por lo tanto, aunque la mayoría de la iduronidasa se detecta en el tejido cerebral superficial, una cantidad significativa penetra en el tejido cerebral profundo, indicando que este tipo de tratamiento sería una terapia útil para administración de enzimas en trastornos de almacenamiento lisosómico de tejido cerebral profundo. Experimentos adicionales en los que las dosis baja, media y alta eran de 0,46 mg; 1,08/1,38 mg; y 4,14 mg, respectivamente, mostraban que las muestras de cerebro profundo presentaban 2,7, 4,4 y 5,9 veces la actividad normal a estas dosis respectivas.

Análisis inmunohistoquímicos mediante microscopía confocal mostraban que grandes cantidades de rh-iduronidasa podrían detectarse en la superficie de la corteza así como dentro de células del hipocampo. Particularmente, células gliales en el hipocampo, la parte del cerebro implicada en la memoria, captan cantidades significativas de enzima. La tinción también demostraba que la enzima se difunde al interior del cerebro y algunas células gliales se tiñen brillantemente con anti-iduronidasa. Las dosis más altas no dan como resultado actividad de α -L-iduronidasa sustancialmente mayor en las regiones profundas del cerebro y, por lo tanto, una dosis de aproximadamente 1 mg se seleccionó para tratar perros con MPS I en los estudios adicionales.

Estos resultados indican que la inyección intratecal de rh-iduronidasa proporciona un método eficaz para administrar proteína a través de la barrera hematoencefálica. La proteína es detectable tanto en la superficie de las células cerebrales como en lisosomas de las células cerebrales, tal como se muestra en el ejemplo 2, demostrando que la inyección intratecal es un medio eficaz para transportar enzimas implicadas en trastornos de almacenamiento lisosómico puede administrarse por vía intratecal y proporciona un beneficio terapéutico a sujetos afectados por dicha enfermedad.

Ejemplo 4

La inyección intratecal de Rh-iduronidasa mejora los síntomas de MPS I

Los experimentos iniciales demostraron que la iduronidasa administrada mediante inyección intratecal cruzaba eficazmente la barrera hematoencefálica y podría detectarse en cantidades significativas en los lisosomas de neuronas, en la superficie de células de la corteza cerebral, y también penetraba en el tejido cerebral profundo. En base a estos resultados, parece probable que los trastornos de almacenamiento lisosómico que alteran la función cerebral podrían tratarse mediante inyección intratecal de terapia de sustitución enzimática.

Para evaluar la eficacia de la inyección intratecal de enzimas implicadas en trastornos de almacenamiento lisosómico, sujetos caninos afectados con el trastorno de almacenamiento lisosómico MPS I y que carecían de la enzima iduronidasa se trataron con una administración intratecal de rh-iduronidasa. Los niveles de iduronidasa en el tejido cerebral y del sistema nervioso central se evaluaron después de 4 semanas de tratamiento.

Tal como se ha indicado anteriormente, se seleccionó una dosis de 1 mg de rh-iduronidasa/inyección. Cuatro animales afectados por MPS I fueron tratados con 1 mg de rh-iduronidasa/inyección mediante inyección intracisternal, una vez por semana durante cuatro semanas y los niveles de enzima se midieron 48 horas después de la última dosis de tratamiento. Las inyecciones intratecales dieron como resultado la distribución ampliamente extendida de la enzima en el cerebro, la médula espinal y las meninges. La detección de la actividad enzimática en animales con MPS I revelaba un incremento medio de 21 veces de los niveles de iduronidasa en estos animales en comparación con el grupo de control. El análisis de la actividad enzimática en tejido cerebral profundo y cerebral superficial de animales con MPS I mostraba un promedio de un incremento de 11 veces y 37 veces de actividad, respectivamente.

En un conjunto adicional de experimentos, la actividad enzimática global en el cerebro en los cuatro perros tratados alcanzaba una medida de 277 unidades/mg en comparación con un nivel medio de 11,9 unidades/mg en perros normales no tratados, y promediada 23 veces el normal con un intervalo de 17-34 veces los niveles normales. Como era el caso para los perros normales, las actividades de α -L-iduronidasa eran más altas (3-4 veces) en la superficie del cerebro que en sus regiones internas ($474,0 \pm 257,7$ frente a $138,7 \pm 93,5$). No obstante, los niveles en el cerebro profundo seguían estando por encima de 11 veces los normales.

Dado que la administración intratecal de una proteína coloca la proteína directamente en el LCR, que baña todo el sistema nervioso central, es probable que cualquier proteína inyectada mediante esta vía sea detectable en todas las zonas del SNC. Los animales con MPS I usados anteriormente se usaron para evaluar la presencia de iduronidasa en la médula espinal y las meninges de animales tratados, tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1.

Se obtuvieron muestras de médula espinal y meninges de cuatro animales con MPS I y la actividad de iduronidasa se midió como anteriormente (media de las regiones cervical, torácica y lumbar). Los niveles en la médula espinal de actividad de iduronidasa en animales con MPS I eran de promedio 13 veces más altos que en animales de control mientras que los niveles de enzima eran aproximadamente 300 veces más altos en las meninges de la médula espinal de animales con MPS I. En experimentos repetidos, en la médula espinal, los niveles de rh-iduronidasa en perros con MPS I tratados por vía intratecal alcanzaron una media de 160 unidades/mg de aproximadamente 13 veces el nivel normal de 11,7 unidades/mg ($p = 0,022$, Tabla 2). La penetración de la enzima era mejor en las regiones cervical y torácica que en la columna lumbar posiblemente debido a la distribución incompleta de enzima desde el sitio de inyección en la cisterna magna. Los niveles de RHIDU en perros con MPS I tratados eran 17 veces los normales en la médula espinal cervical, 18 veces en la columna torácica y aproximadamente 5 veces en la columna lumbar. En las meninges de la médula espinal, los niveles de rh-iduronidasa alcanzaron una media de 4.780 unidades/mg de más de 300 veces mayor que los niveles normales de 15,4 unidades/mg ($p = 0,0018$, Tabla 2). Incluso en el animal con el nivel más bajo de penetración enzimática de promedio, los niveles de iduronidasa en las meninges alcanzaban 2.160 unidades/mg o 140 veces los niveles normales.

Tabla 2: Niveles de iduronidasa en perros con MPS I tratados IT (dosis semanal de ~1 mg)

Sitio del SNC	Tratado IT [intervalo] (n = 4)	Normal no tratado/ tratado con placebo (n = 5)	Relación tratados IT frente a normales
Cerebro	$277 \pm 89,1$ [203 - 403]	$11,9 \pm 1,95$	$23,3$ $p = 0,0003^*$
Médula espinal			
Cervical	196 ± 133 [43,3 - 367,3]	$11,1 \pm 1,69$	$17,7$
Torácica	224 ± 138 [132,4 - 428,7]	$12,0 \pm 3,10$	$18,7$
Lumbar	$59,8 \pm 85,9$ [8,8 - 188,0]	$12,1 \pm 2,90$	$4,9$
Promedio	160 ± 115 [73,1 - 328,0]	$11,7 \pm 0,57$	$13,7$ $p = 0,0216^*$
Meninges de la médula espinal			
Cervicales	7030 ± 3480 [4060 - 11,100]	$15,6 \pm 4,85$	451
Torácicas	5490 ± 4200 [1570 - 9970]	$14,6 \pm 3,34$	376

Lumbares	1810 ± 2690 [95,4 - 5820]	16,1 ± 9,10	112
Promedio	4780 ± 2220,0 [2160 - 7580]	15,4 ± 0,76	308
p = 0,0018*			

Los niveles de iduronidasa se calculan a partir de valores medios para cada región para cada perro sacrificado. Los niveles de iduronidasa se expresan en unidades de iduronidasa por mg de proteína. Las medias de las medias para cada animal ± desviación estándar se muestran. Los intervalos para cada conjunto de datos son valores medios de actividad de iduronidasa en cada tipo de tejido para cada perro. *Estadísticamente significativo.

5

Ejemplo 5

El tratamiento intratecal con iduronidasa reduce los niveles de GAG en animales con MPS I

10 Un factor significativo en el debilitamiento de sujetos con trastornos de almacenamiento lisosómico tales como MPS I es la falta de descomposición de macromoléculas que da como resultado una acumulación de glucosaminoglucanos en los lisosomas de las células. Se plantea la hipótesis de que la terapia de sustitución enzimática mediante inyección intratecal debe mejorar la descomposición de GAG y devolver los niveles de GAG a aquellos comparables con individuos normales.

15

Para poner a prueba la capacidad del tratamiento con iduronidasa recombinante de mejorar el almacenamiento de GAG en sujetos con MPS I, perros con MPS I tratados como anteriormente se ensayaron para niveles lisosómicos cerebrales de glucosaminoglucanos. Los niveles cerebrales en animales con MPS I que recibían rh-iduronidasa se redujeron a niveles normales o por debajo de lo normal mientras que los animales con MPS I no tratados demostraron niveles de GAG aproximadamente 2 veces los de los sujetos normales. Los niveles de GAG medidos en las meninges de la médula espinal eran 7 veces los niveles normales en animales con MPS I no tratados, pero se reducían en un 57% hasta 3 veces los niveles normales en animales con MPS I que recibían iduronidasa intratecal.

20

25 Los niveles de GAG también se compararon en animales con MPS I tratados que recibían tratamiento intratecal o IV (una única embolada, embolada semanal, embolada mensual, embolada trimestral, embolada administrada cada seis meses, embolada anual o como alternativa, administrada de forma continua) con rh-iduronidasa (figura 4). Los niveles de GAG en animales con MPS I que recibían tratamiento IV con iduronidasa eran similares a, o ligeramente superiores, que los niveles observados en animales con MPS I no tratados (aproximadamente 10 µg/mg en comparación con aproximadamente 8 µg/mg, respectivamente). La administración intratecal de iduronidasa reducía los niveles de GAG en el cerebro a por debajo de lo normal, mostrando aproximadamente 4 µg/mg de método, o 2 veces menos que los animales con MPS I no tratados.

30

En experimentos adicionales, se demostró de nuevo que el incremento de muchas veces de los niveles normales de actividad de rh-iduronidasa en los cerebros de perros con MPS I tratados condujo a disminuciones significativas de los niveles de GAG con respecto a los perros con MPS I de control no tratados y alcanzaron niveles de GAG normales (Tabla 3). Los niveles medios de GAG en los cerebros de perros con MPS I tratados por vía intratecal con rh-iduronidasa eran de $4,47 \pm 0,69$ µg/mg de peso seco en comparación con $8,26 \pm 1,23$ µg/mg para los perros con MPS I no tratados ($p = 0,0017$). El nivel de GAG en los cerebros de los perros tratados por vía intratecal no era significativamente diferente del de los perros normales no tratados ($5,43 \pm 1,95$, $n = 8$, $p = 0,37$). Los niveles de GAG en el cerebro en perros con MPS I tratados por vía intratecal también estaban considerablemente por debajo de los de los perros con MPS I tratados en estudios anteriores con infusiones IV de rhIDU ($10,4 \pm 2,14$, $n = 12$, Tabla 3). Dado que el incremento de la edad puede dar como resultado un almacenamiento incrementado, el contenido de GAG en el cerebro también se representó gráficamente frente a la edad canina para perros de control, tratados IV y tratados IT. El gráfico corrobora, además, la normalización de GAG total para perros tratados IT cuando se comparan perros de control o tratados IV de edad comparable.

35

40

45

Los niveles de GAG meníngeos se analizaron en muestras obtenidas de las regiones cervical, torácica y lumbar (Tabla 3). Globalmente, el nivel medio de GAG en las meninges de la médula espinal de perros tratados con IT disminuía un 57%, hasta 15,3 µg/mg (intervalo de 9,33 a 22,5 µg/mg) en comparación con una media de perros no tratados de 35,9 µg/mg. Esto representa una disminución desde un nivel 7 veces el normal en perros con MPS I no tratados a 3 veces el normal en los animales tratados y era estadísticamente significativo ($p = 0,009$). Las muestras de las meninges cervicales y torácicas a menudo tenían un mejor aclaramiento de GAG que las meninges lumbares más distales. Los niveles de GAG totales medios en las médulas espinales de los perros con MPS I tratados IT disminuían a 3,43 µg/mg en comparación con 5,04 µg/mg para perros con MPS I no tratados, pero los niveles totales eran relativamente bajos, y el cambio no era estadísticamente significativo.

50

55

Tabla 4: Niveles de glucosaminoglucano en perros con MPS I no tratados, con MPS I tratados IT, perros con MPS I tratados IV y perros normales no tratados

Sitio del SNC	MPS I no tratada [intervalo]	MPS I tratada IT [intervalo]	Relación de MPS I tratada IT con respecto a no tratada	MPS I tratada IV [intervalo]	Relación de MPS I tratada IT con respecto a tratada IV	Normal no tratado [intervalo]	Relación MPS I tratada IT con respecto a normal
Cerebro	826 ± 1,23 [6,91 - 9,56] n = 4	4,47 ± 0,69 [3,63 - 5,26] n = 4	0,54 p=0,0017*	10,4 ± 2,14 [7,42 - 16,6] n = 12	0,43 p=0,0001*	5,43 ± 1,95 [2,95 - 8,31] n = 8	0,82 p=0,37
Médula espinal							
Cervical	3,52 ± 0,56 [3,12, 3,91]	2,99 ± 0,50 [2,71- 3,73]		-	-	1,84 ± 0,84 [0,93 - 2,59]	
Torácica	5,50 ± 0,77 [4,95, 6,04]	2,56 ± 0,77 [1,90 - 3,68]		-		2,11 ± 1,03 [1,29 - 3,26]	
Lumbar	6,11 ± 1,47 [5,07, 7,15]	4,75 ± 1,08 [3,53 - 5,73]		-		5,49 ± 0,63 [4,81 - 6,06]	
Promedio	5,04 ± 0,93 [4,38, 5,70] n=2	3,43 ± 0,72 [2,72 - 4,38] n=4	0,68 p=0,075			3,14 ± 0,81 [2,34 - 3,97] n=3	1,09 p=0,64
Meninges de la médula espinal							
Cervicales	20,0 ± 1,98 [18,6, 21,4]	10,8 ± 2,45 [9,07 - 14,4]		-		4,51 ± 0,51 [3,92 - 4,86]	
Torácicas	40,5 ± 0,95 [39,8, 41,2]	13,4 ± 4,30 [7,05 - 16,4]		-		4,35 ± 1,47 [3,05 - 5,94]	
Lumbares	47,2 ± 12,0 [38,6, 55,7]	21,6 ± 13,8 [10,6 - 41,7]		-		5,17 ± 2,53 [2,33 - 7,21]	
Promedio	35,9 ± 3,03 [33,8, 38,0] n = 2	15,3 ± 5,56 [9,3 - 22,5] n = 4	0,43 p=0,009*			4,68 ± 0,97 [3,75 - 5,69] n = 3	3,26 p=0,024*

Los niveles de GAG se calculan a partir de valores medios para cada región para cada perro sacrificado y se expresan en µg/mg de peso seco. Las medias de las medias para cada animal ± desviación estándar se muestran.

La dosis semanal de tratamiento IV variaba entre 0,5 y 2,0 mg/kg durante 3-15 meses. *Estadísticamente significativo

- 5 Estos resultados muestran que el tratamiento intratecal de MPS I es un medio eficaz para reducir el almacenamiento debilitante en estos trastornos de almacenamiento lisosómico, tales como acumulación de macromoléculas en lisosomas del tejido, y es más eficaz en la reducción de los niveles de GAG que la administración IV convencional de terapia de sustitución enzimática con iduronidasa.

10 Ejemplo 6

Reducción de patología lisosómica después de rhIDU intratecal

- 15 En MPS I canina, el almacenamiento lisosómico más prominente en histología cerebral está presente en las células mesenquimáticas perivasculares que se encuentran cerca de los capilares cerebrales, separadas del torrente sanguíneo por la barrera hematoencefálica. Para determinar el grado de la enfermedad de almacenamiento en animales afectados por MPS I, se realizó un análisis patológico mediante microscopía electrónica para detectar depósitos de GAG en tejido cerebral. Los animales con MPS I fueron tratados con 1 mg de iduronidasa en dosis semanales (4x) tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1.

- 20 Tejido tomado de animales con MPS I no tratados con enfermedad de macrófagos perivasculares demuestra distinto almacenamiento de GAG en pericitos mientras que los animales tratados muestran un espacio alrededor de vasos de almacenamiento, sin almacenamiento de GAG (figura 5 y figura 6). El análisis de la patología de enfermedad neuronal en animales con MPS I revela que los animales no tratados muestran almacenamiento laminar de GAG y gangliósidos mientras que los animales tratados con iduronidasa muestran gránulos densos con un almacenamiento mínimo de la macromolécula (figura 7). En microfotografías electrónicas, ultraestructuralmente la cantidad total de almacenamiento en neuronas en perros con MPS I no tratados era modesta. El almacenamiento unido a membrana, granular, floculado, membranoso, citoplasmático y en cuerpos cebra neuronales disminuyó en los perros con MPS I
- 25 tratados. Sin embargo, agregados de material denso a electrones, complejo, similar a lipofuscina permanecían en

los animales tratados con MPS I. Las secciones cerebrales evaluadas para enfermedad meníngea en animales con MPS I tratados o no tratados demostraban la presencia de grandes células espumosas en las meninges de animales no tratados, mientras que las meninges de animales tratados con iduronidasa estaban libres de células espumosas hinchadas que contenían GAG (figura 8). Las secciones cerebrales de animales con MPS I tratados mostraban infiltrado linfocitario secundario en las meninges (figura 9). Por lo tanto, los perros con MPS tratados por vía intratecal mostraban una drástica reducción del almacenamiento en células perivasculares en zonas tanto superficiales como más profundas del cerebro (véase las figuras 5 y 6). El almacenamiento de GAG también se redujo en la glia de los cerebros de perros con MPS I tratados por vía intratecal. La reducción focal en el almacenamiento de GAG neocortical también se observó en tres de los cuatro perros con MPS I tratados IT. El almacenamiento de GAG también se redujo en las meninges de la médula espinal de animales tratados en secciones gruesas teñidas con azul de toluidina. Las células espumosas meníngeas de la médula espinal se observaron de forma menos frecuente en los cuatro perros con MPS I tratados con rhIDU que en los perros con MPS I no tratados, y había cierta agregación del patrón de aclaramiento.

Las indicaciones globales son que la administración intratecal de iduronidasa facilita el aclaramiento de glucosaminoglucanos para el cerebro y las meninges de sujetos tratados, reduciendo los niveles de vuelta a aquellos observados en sujetos normales. También se observó que la administración intratecal de enzima causa infiltrado linfocitario en las meninges, generando quizás una respuesta inmunitaria que es eficaz para aclarar el almacenamiento inapropiado de materiales. El análisis de los síntomas clínicos de trastornos de almacenamiento lisosómico mostraba que el tratamiento intratecal con iduronidasa de animales con MPS I reducía la debilidad inducida por compresión de la médula y resolvía el nistagmo en estos animales.

La eficacia del tratamiento con iduronidasa intratecal respecto a técnicas IV convencionales indica que este método de terapia de sustitución enzimática es eficaz para aliviar los síntomas de sujetos con MPS I y es fácilmente aplicable a otros trastornos de almacenamiento lisosómico habituales descritos anteriormente.

Ejemplo 7

Respuesta inmunitaria y otros efectos adversos

Se detectaron niveles moderados de anticuerpo contra rh-iduronidasa tanto en el suero (hasta 202 unidades/ μ l) como en LCR (hasta 82,0 unidades/ μ l) de dos perros con MPS I y un perro normal tratado con rhIDU (Tabla 4). Estos tres animales tenían exposición anterior a rhIDU intravenosa meses antes de la inclusión en el estudio. Para los animales tratados restantes, se detectaron niveles bajos de anticuerpos para rhIDU en el suero (de 3,61 a 40,9 unidades/ μ l al final del estudio), y se detectaron niveles más bajos en el LCR (de 1,39 a 2,28 unidades/ μ l). Se produjeron modestos incrementos en los recuentos de leucocitos en LCR en los perros tratados. En todos los perros (normales y con MPS I) tratados con rhIDU IT, había acumulaciones variables de linfocitos B, células del plasma y otros linfocitos en las meninges de la médula espinal, zonas de la dura de la médula espinal y alrededor del cerebro. Estos infiltrados duros típicamente eran más intensos alrededor de las raíces de los nervios de la médula espinal y en casos afectados de forma más grave se extendían a la grasa y el tejido conectivo extradural adyacente. En dicho caso, también había una arteritis linfocitaria extradural focal moderada. No había meningitis ni inflamación en animales no tratados, con la excepción de un perro normal que recibía vehículo. Dos perros normales tratados con rhIDU desarrollaban una meningitis leve. El grado de la respuesta inflamatoria del SNC variaba entre perros y parecía estar relacionado con la dosis. No había efectos clínicamente evidentes de la respuesta inmunitaria observada; los perros parecían estar bien y activos.

Tabla 5: Valor de ELISA de anticuerpos para rhIDU en el LCR de perros tratados IT

Perro	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Fin del tratamiento
perros con MPS I tratados IT					
Om	0,001	0,000	0,166	2,09	2,28
Oz	0,007	0,000	0,046	1,08	1,57
Ta [†]	0,000	0,473	ND	45,0	52,0
Vk [†]	0,000	4,16	53,1	81,5	82,0
Perros normales tratados IT					
Xu	0,011	0,008	0,014	1,35	ND
Xi	0,012	0,015	0,024	2,49	ND
Bu	0,030	0,009	0,670	1,43	1,39
Ca [†]	0,105	3,08	31,1	30,7	32,8
Dv	0,007	0,000	0,526	1,57	1,90

Df	0,004	0,000	0,025	0,670	2,25
Valores expresados en unidades de DO por μ l de LCR no diluido. ND = no realizado. *Om, Oz y Bu recibieron 1,08 mg, Ta, Vk, y Ca recibieron 1,38 mg, Xu y Xi recibieron 4,14 mg, y Dv y Df recibieron 0,46 mg de rHIDU IT. †Ta, Vk y Ca fueron expuestos a rHIDU meses antes de la inclusión en el estudio					

- 5 La administración de cualquier producto proteico conlleva un riesgo de una respuesta inmunitaria, en forma de formación crónica de anticuerpos o una respuesta inflamatoria. Tal como se ha observado anteriormente, se observaron respuestas inmunitarias en perros tratados con rh-iduronidasa intratecal. Los anticuerpos para α -L-iduronidasa se descubrieron en el suero y el LCR de tres perros que habían tenido exposición a la enzima intravenosa antes de la inclusión en este estudio. Aparte del infiltrado linfoplasmocitario, no había efectos clínicos adversos de esta respuesta inmunitaria.

- 10 Los tratamientos de base intratecal de MPS y otros trastornos, tal como se describen en el presente documento, pueden administrarse ventajosamente en combinación con un régimen que produce tolerancia inmunitaria al agente que está siendo administrado. Los métodos de tolerancia inmunitaria particularmente contemplados incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20030211113 y la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20040009906, cada una incorporada en el presente documento como referencia en su totalidad. Ejemplos adicionales de protocolos de tolerancia inmunitaria se proporcionan en el ejemplo 9.

20 Ejemplo 8

Tratamiento de sujetos con MPS I con iduronidasa recombinante

El tratamiento con éxito de perros con MPS I con iduronidasa humana recombinante indica que la terapia de sustitución enzimática intratecal proporciona tratamiento eficaz de sujetos humanos con MPS I.

- 25 Para tratar pacientes de MPS I humanos con rh-iduronidasa, se seleccionan pacientes con mucopolisacaridosis I para el tratamiento. Los sujetos son evaluados en el inicio y a 6, 10, 14, 18, 22, 26, y de al menos una vez al mes hasta 52 semanas mediante exámenes clínicos detallados, imaginología por resonancia magnética del abdomen y el cerebro, ecocardiografía, mediciones del arco de movilidad, polisomnografía, evaluaciones clínicas de laboratorio, mediciones de actividad de α -L-iduronidasa leucocitaria, y excreción urinaria de glucosaminoglucano. Los sujetos también deben ser evaluados para los síntomas del SNC que resultan de gránulos de almacenamiento lisosómico en el cerebro. Dichos síntomas incluyen retardo y/o regresión del desarrollo en el desarrollo del sujeto que padece la enfermedad, que puede evaluarse clínicamente, por ejemplo, usando escalas Bayley II de desarrollo infantil (incluyendo monitorizar un cociente motor y del desarrollo), monitorizar el lenguaje o otros desarrollos intelectuales y motores, monitorizar tests de potencial provocado tales como auditivo u otras maneras de poner a prueba el potencial provocado. Otro síntoma, hidrocefalia de alta presión causada por la presencia de gránulos de almacenamiento en las meninges cerebrales cerca de las granulaciones aracnoideas, puede monitorizarse y evaluarse clínicamente usando métodos reconocidos en la técnica para determinar la presión del LCR mediante punción lumbar y/o mediante un catéter intraventricular. El almacenamiento lisosómico en las meninges cervicales cerca de la médula en C1-C5 o en otro lugar a lo largo de la médula también pueden evaluarse clínicamente, lo que se manifiesta como compresión de la médula espinal compresiva progresiva con debilidad de las extremidades inferiores, pérdida de control del intestino y de la vejiga y déficits sensoriales también podrían monitorizarse. Dichos síntomas pueden monitorizarse usando, por ejemplo, examen neurológico para reflejos anormales de Babinski, reflejos tendinosos profundos, función o sensación motriz. Déficit neurofisiológicos de compresión de la médula espinal puede evaluarse usando potenciales provocados somatosensoriales. También puede usarse imaginología por resonancia magnética con o sin un agente de contraste para identificar la ubicación anatómica de la compresión así como una evaluación de edema u otros indicios de lesión medular en el sitio de compresión. El almacenamiento perivascular de gránulos de almacenamiento lisosómico puede evaluarse determinando la presencia de quistes alrededor de los vasos, lo que puede evaluarse usando exploraciones por IRM para determinar el tamaño y el número de dichos quistes. La monitorización de estos síntomas antes y después del tratamiento permitirá una evaluación de la eficacia de la intervención terapéutica.

- 55 La iduronidasa se administra a sujetos mediante infusión intratecal (diluida en solución salina normal con albúmina e suero humano al 0,1 por ciento) a una dosis de, por ejemplo, 1 mg de iduronidasa por 20 kg de peso del animal, administrada semanalmente. La administración intratecal se realiza mediante inyección directa en el LCR o como en el documento Penn y col., (Neurosurgery. 40.94-9. 1997), mediante una bomba de fármaco implantada en el espacio subaracnoideo lumbar, por ejemplo una bomba SYNCHROMED® de Medtronic o dispositivo similar, para administración intratecal. La bomba se implanta según las instrucciones del fabricante y puede implantarse en cualquier nivel apropiado para el sujeto o el trastorno que está siendo tratado. Por ejemplo, la punta del catéter de la bomba puede colocarse a nivel de la T-10 en la columna. Los sujetos están medicados previamente con difenhidramina (de 0,5 a 1,25 mg por kilogramo de peso corporal).

En terapia inicial, la iduronidasa es administrada a sujetos afectados semanalmente durante un periodo de cuatro semanas. La administración puede prolongarse durante periodos de tiempo prolongados dependiendo de la

gravedad de la enfermedad MPS I en el sujeto que está siendo tratado así como la edad, el peso o el sexo del sujeto. Las cantidades y la duración de dosificación pueden ser determinadas por el facultativo a cargo del estudio.

Los sujetos se evalúan para el cambio de los síntomas de MPS I usando tests de capacidades motrices, análisis por IRM de depósitos tisulares de GAG, y niveles de GAG en la orina en los momentos indicados anteriormente. Por ejemplo, los niveles de GAG urinarios en sujetos con MPS-I se comparan con valores de excreciones normales. Existe un amplio intervalo de valores de GAG en la orina en sujetos con MPS-I no tratados. Una reducción mayor del 50% en la excreción de GAG no degradados después de terapia con la rh-iduronidasa es un medio válido para medir la respuesta de un individuo a la terapia. Por ejemplo, se recogen datos que miden la actividad de iduronidasa leucocitaria y la actividad de iduronidasa bucal antes y después de la terapia en sujetos con MPS I.

La capacidad motriz incrementada o evidencias reducidas de depósitos de GAG en el cerebro o niveles de GAG en la orina son indicativos de que el tratamiento con rh-iduronidasa está descomponiendo con éxito el exceso de GAG en los sujetos tratados y aliviando los síntomas de la enfermedad.

Ejemplo 9

Tolerancia específica de antígeno y terapia de sustitución enzimática intratecal en el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico

Tal como se ha indicado anteriormente, el tratamiento con iduronidasa intratecal de animales afectados por MPS I dio como resultado infiltrado linfocitario en las meninges de animales tratados. Esto puede deberse a una sobre-reacción por parte del sistema inmunitario a la presencia de grandes cantidades de antígeno extraño administrado al animal. Para superar estos tipos de reacciones, se han usado métodos de tolerancia específica de antígenos para suprimir con éxito el sistema inmunitario. La Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de titularidad común, pendiente de tramitación describe un régimen de tratamiento de perros con MPS I que conlleva la inducción de tolerancia específica de antígeno y administración intravenosa de terapia de sustitución de iduronidasa. En base a los resultados descritos en el presente documento, que indican que la administración enzimática intratecal es más eficaz que la inyección intravenosa en almacenamiento de GAG decreciente en el cerebro y aliviar síntomas clínicos de MPS I, se puede decir que el uso de inyección intratecal acoplada con tolerancia específica de antígeno proporcionará mayor alivio a sujetos que padecen MPS L

Los sujetos con mucopolisacaridosis I se seleccionan para el tratamiento. Los sujetos se evalúan en el inicio y a 6, 12, 26 y 52 semanas mediante exámenes clínicos detallados, imaginología por resonancia magnética del abdomen y el cerebro, ecocardiografía, mediciones del arco de movilidad, polisomnografía, evaluaciones clínicas de laboratorio, mediciones de la actividad de α -L-iduronidasa leucocitaria, y excreción urinaria de glucosaminoglucano.

Ciclosporina A (Neoral o Sandimmune) y Azatioprina (Imuran) se obtienen de fuentes comerciales. Ambos fármacos se dosifican por vía oral a las siguientes dosis y frecuencia: CsA Neoral® 12,5 mg/kg/cada día dividida bid po; Aza Imuran® 5 mg/kg qod po durante un periodo de acondicionamiento de dos semanas. Los fármacos se administran a continuación a esa dosis durante dos semanas adicionales en presencia de tolerágeno. Las dosis se dividen por la mitad para todos los fármacos cada 2 semanas después de la primera infusión del tolerágeno. Los sujetos se monitorizan para reacciones adversas, y para el pico de CsA y a través de niveles. El CsA está preferentemente a un nivel mayor de 400 ng/ml.

La α -L-iduronidasa recombinante se produce en células de ovario de hámster chino con el uso de biorreactores y cromatografía en columna convencional, y se analizó exhaustivamente para seguridad y pureza. La actividad de α -L-iduronidasa se mide según el método de Shull y col. *supra.*, o con un ensayo cuyos resultados se describen en unidades SI (Kakkis y col., Mol Genet Metab. 2001, 72(3): 199-208; Kakkis y col., N Engl J Med. 2001; 344(3): 182-8). Cuando se usa este último ensayo, una dosis de 125.000 U de α -L-iduronidasa por kilogramo es equivalente a 100 unidades SI por kilogramo. La excreción urinaria de glucosaminoglucano se mide según una adaptación del método de Bjornsson. Los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas para anticuerpos para α -L-iduronidasa usan una variación del método de Shull y col., y la transferencia de Western se realiza según un método convencional.

El tolerágeno se administra mediante infusión intravenosa (diluido en solución salina normal con albúmina de suero humano al 0,1 por ciento) a una dosis de 0,056 mg/kg, administrada semanalmente. Después de la inducción de tolerancia a iduronidasa, el tratamiento intratecal con la composición enzimática se realiza tal como se describe en el presente documento. En una realización preferida, los métodos del presente ejemplo se ensayaron en perros tratados mensualmente usando una inyección de 1 mg de rh-iduronidasa como tolerágeno. Después de 4 inyecciones durante un periodo de tres meses, los niveles de GAG en los cerebros de estos animales se observaron como normales. El protocolo de administración es preferentemente eficaz de modo que las inyecciones de 1 mg se administran trimestralmente o cada 6 meses.

La administración intratecal para su uso en los presentes métodos se realiza mediante inyección directa en el LCR o

como en el documento Penn y col., (Neurosurgery. 40: 94-9. 1997), mediante una bomba de fármaco implantada en el espacio subaracnoideo lumbar, por ejemplo una bomba SYNCHROMED® de Medtronic o un dispositivo similar, para administración intratecal. La bomba se implanta según las instrucciones del fabricante y puede implantarse en cualquier nivel apropiado para el sujeto o trastorno que está siendo tratado. Por ejemplo, la punta del catéter de la bomba puede colocarse a nivel de la T-10 en la columna. La primera dosis se administra una vez completado el periodo de acondicionamiento de dos semanas, y en adelante semanalmente. Los sujetos están medicados previamente con difenhidramina (de 0,5 a 1,25 mg por kilogramo de peso corporal).

Después de la inducción de tolerancia, preferentemente 12 después del inicio del periodo de acondicionamiento, la dosis se incrementa a una vez a la semana, 0,58 mg por kilogramo.

Los sujetos son evaluados para el cambio en uno o más indicadores de los síntomas de enfermedad cerebral asociada con enfermedad de almacenamiento lisosómico después del tratamiento con iduronidasa recombinante. Dichos indicadores incluyen, aunque no se limitan a, cambios en el desarrollo, funciones motrices, mantenimiento del desarrollo a lo largo del tiempo, presión de LCR reducida, síntomas neurológicos reducidos mediante quejas o mediante examen, compresión medular reducida según lo examinado mediante análisis de IRM del cuello o la columna y potenciales provocados somatosensoriales después del tratamiento con iduronidasa recombinante. Se prefiere que el tratamiento con iduronidasa incremente la descomposición del exceso de GAG en el cerebro y la médula espinal de individuos afectados y libere la presión ejercida sobre la médula espinal. Una mejora de la capacidad motriz es indicativa de una disminución de la compresión de la médula como resultado del tratamiento con iduronidasa.

Ejemplo 10

Tratamiento intratecal de otras enfermedades de almacenamiento lisosómico

Los métodos anteriores son útiles en el tratamiento de sujetos humanos que manifiestan un fenotipo clínico de deficiencia de cualquier enzima lisosómica. Todos los sujetos manifiestan alguna evidencia clínica de acumulación visceral y en tejido blando de glucosaminoglucanos u otra macromolécula con grados variables de alteración funcional. Las enfermedades que son tratadas o prevenidas usando los métodos de la presente invención son: Mucopolisacaridosis II (MPS II), MPS IIIA, MPS IIIB, Leucodistrofia metacromática (MLD), Krabbe, Pompe, Lipofuscinosis cerioidea, Tay-Sachs, Niemann-Pick A y B, enfermedad de Gaucher y otras enfermedades lisosómicas tal como se han descrito anteriormente.

Para cada enfermedad, la enzima administrada en la terapia de sustitución enzimática intratecal o durante el régimen de inducción de tolerancia comprendería un compuesto o enzima específica. Para métodos que implican MPS II, el compuesto o enzima preferida es iduronato-2-sulfatasa. Para métodos que implican MPS IIIA, el compuesto o enzima preferida es heparán N-sulfatasa. Para métodos que implican MPS IIIB, el compuesto o enzima preferida es α -N-acetilglucosaminidasa. Para métodos que implican Leucodistrofia metacromática (MLD), el compuesto o enzima preferida es arilsulfatasa A. Para métodos que implican Krabbe, el compuesto o enzima preferida es galactosilceramidasa. Para métodos que implican Pompe, el compuesto o enzima preferida es ácido α -glucosidasa. Para métodos que implican CLN, el compuesto o enzima preferida es tripeptidil peptidasa. Para métodos que implican Tay-Sachs, el compuesto o enzima preferida es hexosaminidasa alfa. Para métodos que implican Niemann-Pick A y B el compuesto o enzima preferida es ácido esfingomielinasa.

La enzima puede administrarse a dosis apropiadas para los sujetos que están siendo tratados y se basan generalmente en una relación de mg/kg tal como se describe en la descripción detallada. Los sujetos que reciben enzima son monitorizados para los niveles de enzima en muestras de sangre y de tejido y para otros síntomas particulares al trastorno de almacenamiento lisosómico que está siendo tratado. Por ejemplo, los sujetos con enfermedad de Gaucher (tipo 3) que muestran capacidades motrices disminuidas o crisis mioclónicas debido a almacenamiento aberrante de lípidos son monitorizados para la mejora de las capacidades motrices y disminución de la frecuencia de las crisis después de la administración intratecal de terapia de sustitución con glucocerebrosidasa.

La mejoría en uno o más síntomas de un trastorno de almacenamiento lisosómico después de la administración intratecal de una enzima deficiente en el trastorno de almacenamiento lisosómico demuestra que esta vía de administración es un método nuevo y útil para el tratamiento de trastornos lisosómicos que afectan a sujetos humanos.

Ejemplo 11

Régimen de tratamiento intratecal mensual

Tal como se describe en todo el presente documento, la administración intratecal de rHIDU ha demostrado penetrar eficazmente en el SNC. En ciertos estudios ejemplares, dosis semanales de aproximadamente 1 mg de rHIDU administradas por vía intratecal han demostrado penetrar en el SNC y reducir el almacenamiento de

glucosaminoglucano (GAG) en mucopolisacaridosis I (MPS I) canina. Estudios adicionales descritos en el presente ejemplo muestran que tratamientos mensuales, en lugar de semanales, también son eficaces.

Tres perros con MPS I recibieron 4 dosis mensuales de ~ 1 mg de rhIDU IT en combinación con rhIDU IV semanalmente. En este régimen combinado, se observó que los niveles de iduronidasa alcanzaron 23 veces los niveles normales en el cerebro, 7 veces en la médula espinal, y 423 veces los niveles en las meninges de perros tratados mensualmente, frente a 23 veces, 13 veces y 300 veces en 4 perros tratados semanalmente con rhIDU intratecal solamente. El GAG cerebral alcanzaba niveles normales en ambos regímenes. Con tratamiento mensual, se observó una reducción del 51% en el almacenamiento de GAG cerebral (frente al 46% con administración IT semanal; figura 10A), una reducción del 22% en GAG de la médula espinal (frente al 32% con administración IT semanal; figura 10B), y una reducción del 57% en GAG meníngeo (frente al 57% con administración IT semanal; figura 10C) en comparación con 4 perros con MPS I no tratados. No había ninguna diferencia significativa en los niveles de iduronidasa o GAG con rhIDU IT mensual frente a semanal. Como tal, puede usarse administración intratecal mensual.

Los animales se ensayaron para respuesta inflamatoria y para inducción de tolerancia. Un perro desarrolló un infiltrado linfoplasmocitario en las meninges y una leve respuesta a anticuerpos en la sangre y el LCR. Un perro presentaba signos neurológicos (véase la tabla a continuación) al comienzo del tratamiento pero estos signos mejoraban después de 4 dosis de rhIDU IT mensual con rhIDU IV semanal concurrente.

ANTES	DESPUÉS
Letárgico	Alerta
Marcha atáxica	Sin ataxia
Reflejo nauseoso ausente	Reflejo nauseoso presente
Inclinación de cabeza	Sin inclinación de cabeza

El segundo perro se había hecho tolerante a rhIDU usando un nuevo método (descrito, por ejemplo en, las solicitudes de Estados Unidos de titularidad común números de serie 10/141.668 presentadas el 6 de mayo de 2002 y 10/429.314 presentada el 5 de mayo de 2003, (publicadas como Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20030211113 y Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20040009906, respectivamente, cada una incorporada en el presente documento como referencia en su totalidad) y tenía poca o ninguna respuesta inmunitaria detectable en sangre y LCR y una meningitis muy leve. Los perros tratados tenían almacenamiento de GAG leptomeníngeo y perivascular reducido histológicamente. El hecho de que el almacenamiento de GAG está visiblemente reducido en células perivasculares, glia, y leptomeninges neocorticales en perros tratados IT se representa en la figura 11A (mostrando los no tratados células hinchadas, espumosas, cargadas de GAG) y 11B (tratados; células finas con almacenamiento de GAG marcadamente inferior). Con respecto a la inducción de tolerancia, los datos representados en las figuras 12A-12D muestran que un animal que ha sido acondicionado previamente con un régimen inmunosupresor y se volvió tolerante a rhIDU muestra una respuesta inmunitaria mucho más leve a la terapia de rhIDU. Las figuras 12A y 12C muestran que, en animales tratados con rhIDU en solitario, se desarrolla un infiltrado linfocitario y plasmocitario (figuras 12A y 12C). El acondicionamiento previo con un régimen para inducir tolerancia inmunitaria, por otro lado, reduce enormemente esta respuesta (figura 12B y figura 12D).

Estos estudios demuestran que rhIDU IT mensual puede ser tan eficaz como rhIDU IT semanal para corregir el almacenamiento lisosómico en el cerebro y las meninges de perros con MPS.

Lo anterior describe y ejemplifica la invención pero no pretende limitar la invención definida por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una enzima que es (a) deficiente en una enfermedad de almacenamiento lisosómico, y (b) comprende o ha sido manipulada para comprender un resto que permite que dicha enzima se una al receptor de manosa-6-fosfato (M6P), para uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico mediante administración intratecal a un sujeto mamífero en una cantidad eficaz para mejorar los síntomas en el SNC de dicha enfermedad de almacenamiento lisosómico.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que la cantidad es eficaz para disminuir la cantidad de gránulos de almacenamiento lisosómico presentes en el tejido cerebral de dicho mamífero.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que la cantidad es eficaz para disminuir la cantidad de gránulos de almacenamiento lisosómico presentes en el tejido meníngeo de dicho mamífero.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que la cantidad es eficaz para reducir la acumulación de glucosaminoglucano (GAG) en tejido neuronal y/o meníngeo.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el resto es un residuo de manosa-6-fosfato.
6. La composición de la reivindicación 5, en la que la enzima comprende el 10%, 15%, 18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% o 45% de oligosacáridos bis-fosforilados por enzima.
7. La composición de la reivindicación 5, en la que la enzima comprende al menos el 20% de oligosacáridos bis-fosforilados por enzima.
8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el mamífero es un ser humano.
9. La composición de la reivindicación 8, en la que la enzima es una enzima recombinante.
10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la enfermedad de almacenamiento lisosómico se selecciona entre el grupo constituido por aspartilglucosaminuria, enfermedad de almacenamiento de ésteres de colesterol, enfermedad de Wolman, cistinosis, enfermedad de Danon, enfermedad de Fabry, lipogranulomatosis de Farber, enfermedad de Farber, fucosidosis, galactosialidosis de tipos I/II, leucodistrofia de células globoides, enfermedad de Krabbe, enfermedad de almacenamiento de glucógeno II, enfermedad de Pompe, GM1-gangliosidosis de tipos I/II/III, GM2-gangliosidosis de tipo I, GM2-gangliosidosis de tipo II, enfermedad de Sandhoff, GM2-gangliosidosis, α -manosidosis de tipos I/II, β -manosidosis, leucodistrofia metacromática, mucopolipidosis de tipo I, sialidosis de tipo I/II mucopolipidosis de tipos II/III enfermedad de células I, mucopolipidosis de tipo IIIC pseudo-polidistrofia de Hurler, mucopolisacaridosis de tipo I, mucopolisacaridosis de tipo II, síndrome de Hunter, mucopolisacaridosis de tipo IIIA, síndrome de Sanfilippo, mucopolisacaridosis de tipo IIIB, mucopolisacaridosis de tipo IIIC, mucopolisacaridosis de tipo IIID, mucopolisacaridosis de tipo IVA, síndrome de Morquio, mucopolisacaridosis de tipo IVB síndrome de Morquio, mucopolisacaridosis de tipo VI, mucopolisacaridosis de tipo VII, síndrome de Sly, mucopolisacaridosis de tipo IX, deficiencia múltiple de sulfatasa, lipofuscinosis ceroida neuronal, enfermedad de Batten CLN1, enfermedad de Batten CLN2, enfermedad de Niemann-Pick de tipos A/B, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C1, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C2, picnodisostosis, enfermedad de Schindler de tipos I/II, enfermedad de Schindler y enfermedad de almacenamiento de ácido siálico.
11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para administración una vez al mes.
12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para administración una vez a la semana.
13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que dicha administración intratecal comprende introducir dicha composición farmacéutica en un ventrículo cerebral.
14. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que dicha administración intratecal comprende introducir dicha composición farmacéutica en la zona lumbar.
15. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que dicha administración intratecal comprende introducir dicha composición farmacéutica en la cisterna magna.
16. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que dicha administración intratecal se consigue mediante el uso de una bomba de infusión.
17. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que dicha composición farmacéutica se administra por vía intratecal de forma continua durante un periodo de al menos varios días.

18. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que dicha composición farmacéutica se administra por vía intratecal de forma continua durante un periodo de al menos cuatro semanas.
- 5 19. La composición de la reivindicación 1, en la que la enfermedad es mucopolisacaridosis.
20. La composición de la reivindicación 1, en la que la enfermedad es mucopolisacaridosis I.
- 10 21. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho mamífero con dicha enfermedad de almacenamiento lisosómico demuestra aproximadamente el 50% o menos de una actividad de α -L-iduronidasa normal.
22. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha composición farmacéutica comprende una dosis de entre aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal y 0,5 mg/kg de peso corporal de dicha α -L-iduronidasa humana y es administrada semanalmente a un sujeto que padece una deficiencia de la misma.
- 15 23. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha composición farmacéutica comprende una dosis de al menos aproximadamente 0,01 mg/kg de dicha α -L-iduronidasa humana y es administrada semanalmente a un sujeto que padece una deficiencia de la misma.
- 20 24. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha composición farmacéutica comprende una dosis de al menos aproximadamente 0,01 mg/15 cc de LCR a aproximadamente 5,0 mg/15 cc de LCR en el mamífero de dicha α -L-iduronidasa humana y es administrada semanalmente a un sujeto que padece una deficiencia de la misma.
- 25 25. La composición de la reivindicación 24, en la que dicha composición farmacéutica comprende una dosis de aproximadamente 1 mg/15 cc de LCR en el mamífero de dicha α -L-iduronidasa humana y es administrada semanalmente a un sujeto que padece una deficiencia de la misma.
- 30 26. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha composición farmacéutica es formulada en un tampón que comprende 0,58 mg/ml de iduronidasa en un tampón que comprende fosfato sódico 100 mM, NaCl 150 mM y polisorbato 80 al 0,001%.
27. La composición de la reivindicación 23, en la que dicha composición farmacéutica comprende albúmina humana a una concentración de al menos aproximadamente 1 mg/ml.
- 35 28. La composición de la reivindicación 23, en la que dicha composición farmacéutica está en una solución tamponada que comprende un tampón de fosfato sódico a una concentración de aproximadamente 10-50 mM.
- 40 29. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es MPS 1 y dicha enzima es iduronidasa recombinante administrada por vía intratecal en una cantidad de aproximadamente 0,5 μ g a aproximadamente 0,5 mg por kilogramo de peso corporal.
30. La composición de la reivindicación 29, en la que la iduronidasa recombinante es administrada en una dosificación de aproximadamente 1,0 μ g a 100 μ g, de 2,0 μ g a 50 μ g, o de 10 μ g a 100 μ g por kilogramo de peso corporal.
- 45 31. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha enzima es iduronidasa que es secretada y purificada a partir de células de mamífero en cultivo transfectadas con una secuencia de ADN que codifica iduronidasa humana.
32. La composición de la reivindicación 1 en la que dicha administración intratecal da como resultado la normalización de retardo y regresión del desarrollo en dicho sujeto, reducción de hidrocefalia de alta presión, reducción de compresión de la médula espinal en dicho sujeto, y reducción del número y/o el tamaño de quistes perivasculares alrededor de los vasos cerebrales de dicho sujeto.
- 50 33. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha administración de α -L-iduronidasa recombinante humana reduce el almacenamiento lisosómico.
- 55 34. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha enzima es iduronidasa.
35. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho resto es un residuo de manosa-6-fosfato o un polipéptido IGF2.
- 60 36. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho método comprende, además, inducir tolerancia específica de antígeno antes de la terapia de sustitución enzimática.
- 65 37. La composición de la reivindicación 36, en la que dicha tolerancia específica de antígeno comprende administración de un agente inmunosupresor.

38. La composición de la reivindicación 37, en la que dicho agente inmunosupresor es ciclosporina A.
- 5 39. La composición de la reivindicación 37, en la que dicha tolerancia específica de antígeno comprende, además, la administración de un agente antiproliferativo.
40. La composición de la reivindicación 39, en la que el agente antiproliferativo se selecciona entre el grupo constituido por un análogo de nucleótido o un antimetabolito.
- 10 41. La composición de la reivindicación 39, en la que el agente antiproliferativo es azatioprina.
42. La composición de la reivindicación 4, en la que dicho tejido es una célula cerebral que es una neurona, una célula neuroglial, un ependimocito, o se selecciona entre al menos uno del grupo constituido por neuronas, células gliales, células microgliales, astrocitos, células oligodendrogliales, células perivasculares, pericitos, células menínges, ependimocitos, células de granulación aracnoidea, membranas aracnoideas, células de dura mater, pia mater y plexo coroideo.
- 15 43. La composición de la reivindicación 4, en la que dicha célula cerebral es una célula meníngea.
- 20 44. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho sujeto tiene hidrocefalia de alta presión y dicha administración reduce la cantidad de líquido LCR en el tejido meníngeo de dicho sujeto.
45. La composición de la reivindicación 2 ó 3, en la que el número de gránulos de almacenamiento lisosómico se reduce.
- 25 46. La composición de la reivindicación 2 ó 3, en la que el tamaño de gránulos de almacenamiento lisosómico se reduce.
47. La composición de la reivindicación 1, en la que la cantidad es eficaz para reducir la inflamación meníngea en un sujeto.
- 30 48. La composición de la reivindicación 1, en la que la cantidad es eficaz para reducir la compresión de la médula espinal en un sujeto.
- 35 49. La composición de la reivindicación 48, en la que las capacidades motrices de dicho sujeto mejoran con la administración de dicho medicamento en comparación con las capacidades motrices de dicho animal antes de dicha administración de dicho medicamento.

FIGURA 1
Nivel medio de rhIDU en perros normales después de diferentes dosis IT x4

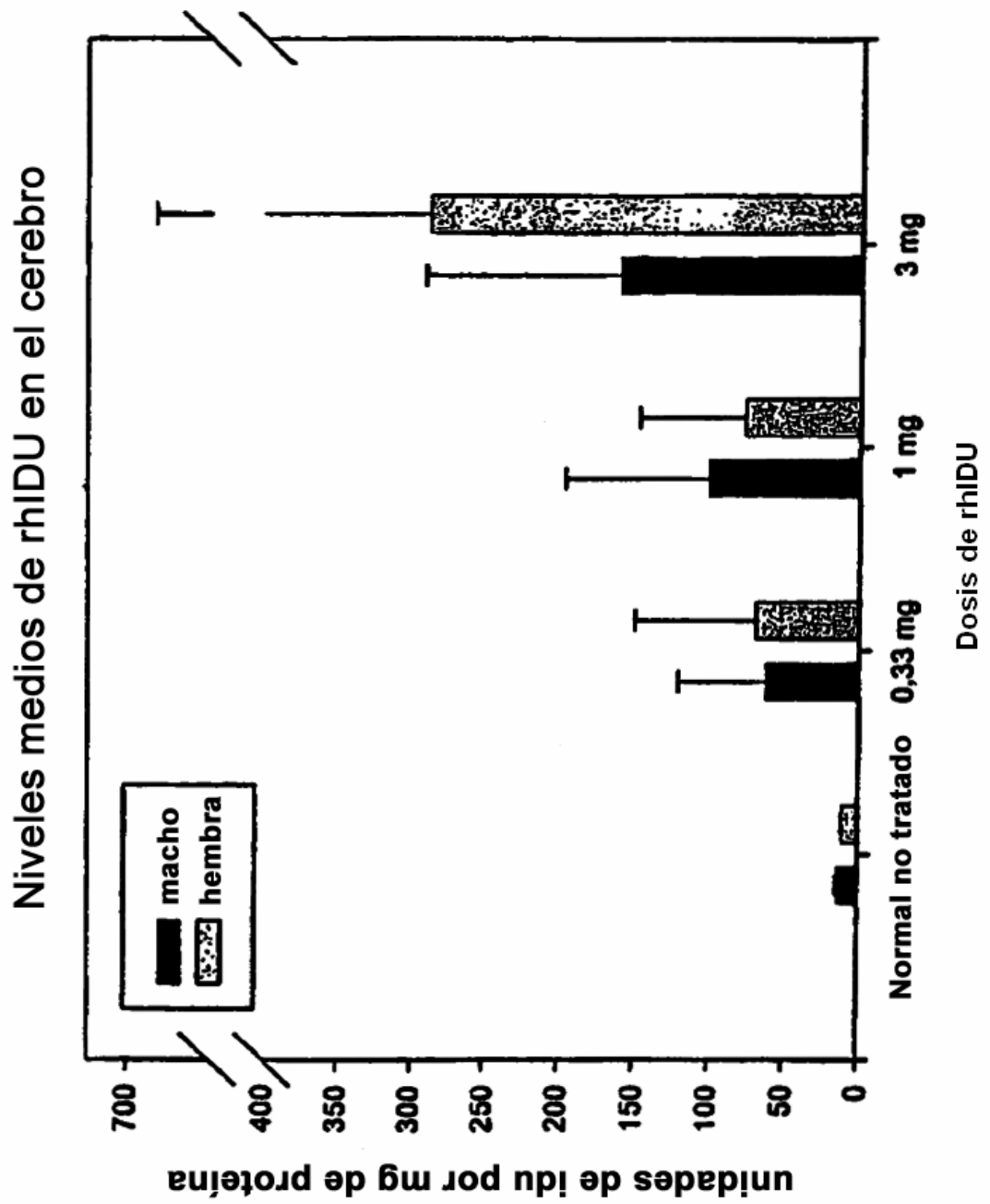


FIGURA 2
Niveles de iduronidasa en el cerebro en animales a los que se
administraron 4 dosis semanales de iduronidasa IT
Comparación de los niveles de idu en tejido profundo y
superficial a diferentes dosis

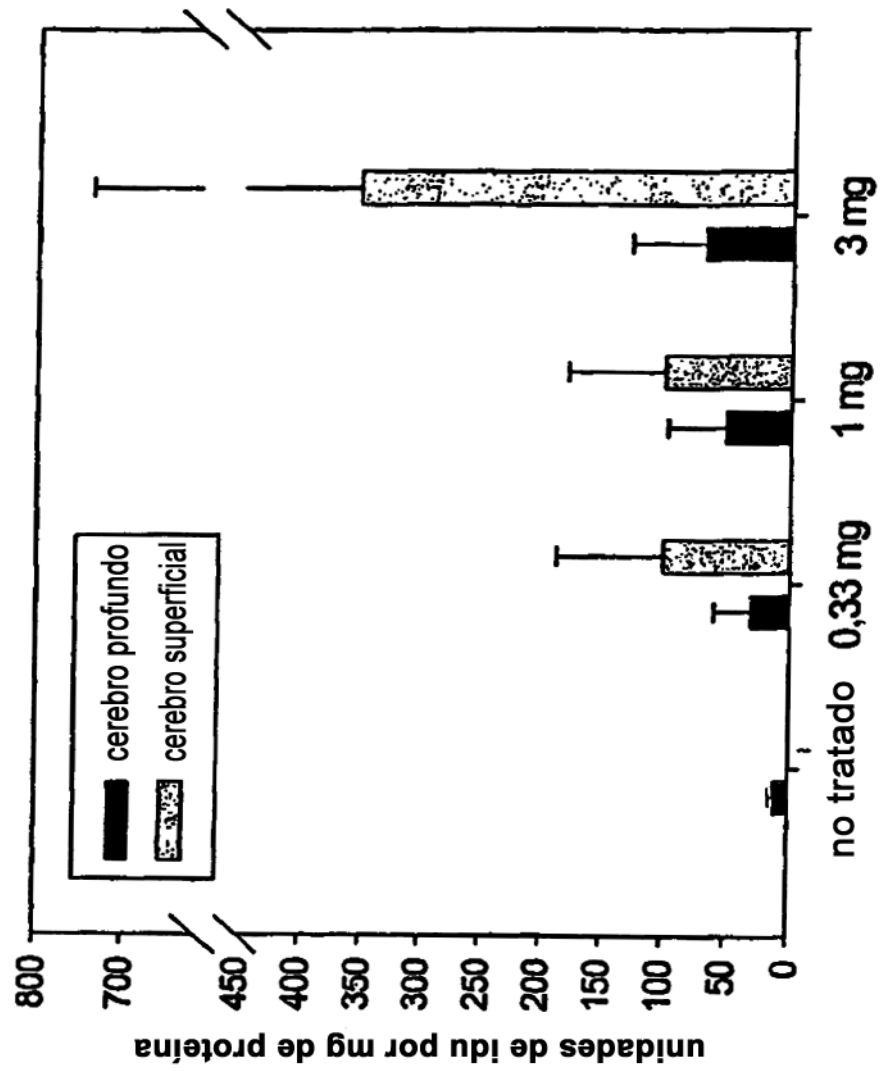


FIGURA 3
Iduronidasa en el cerebro, la médula espinal y las meninges después
de cuatro inyecciones semanales

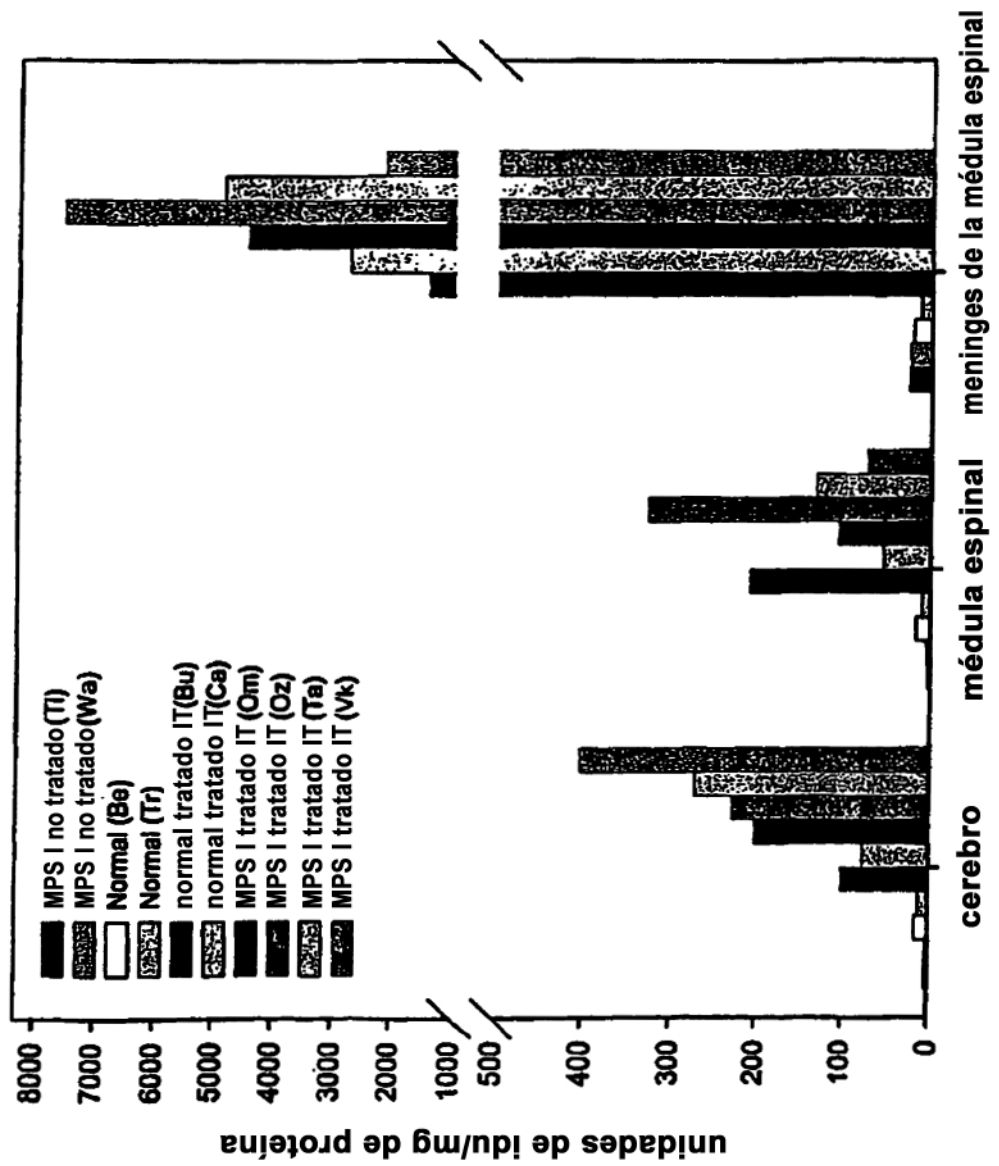


FIGURA 4
Comparación del contenido de GAG cerebral en animales con MPS
tratados IT e IV

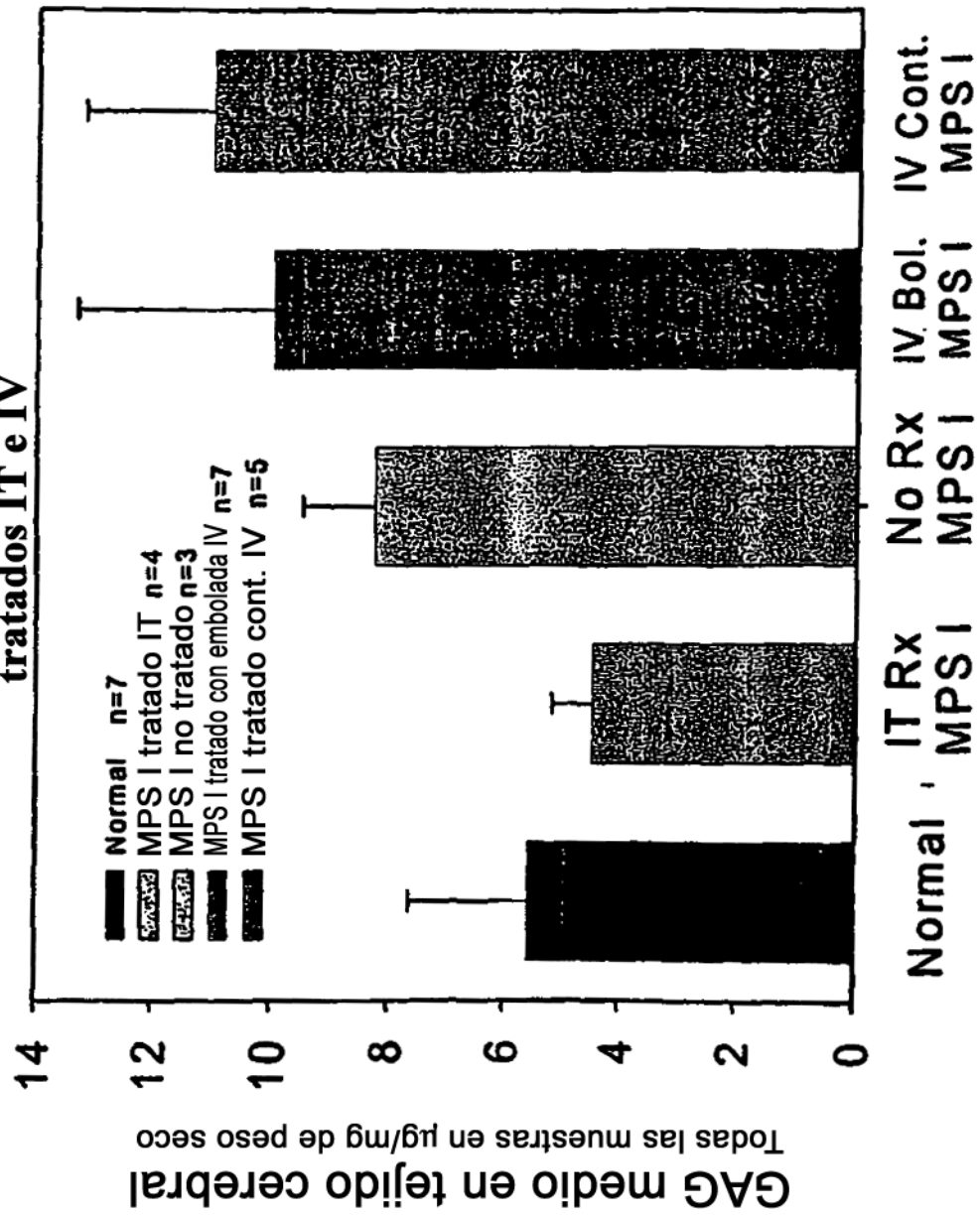
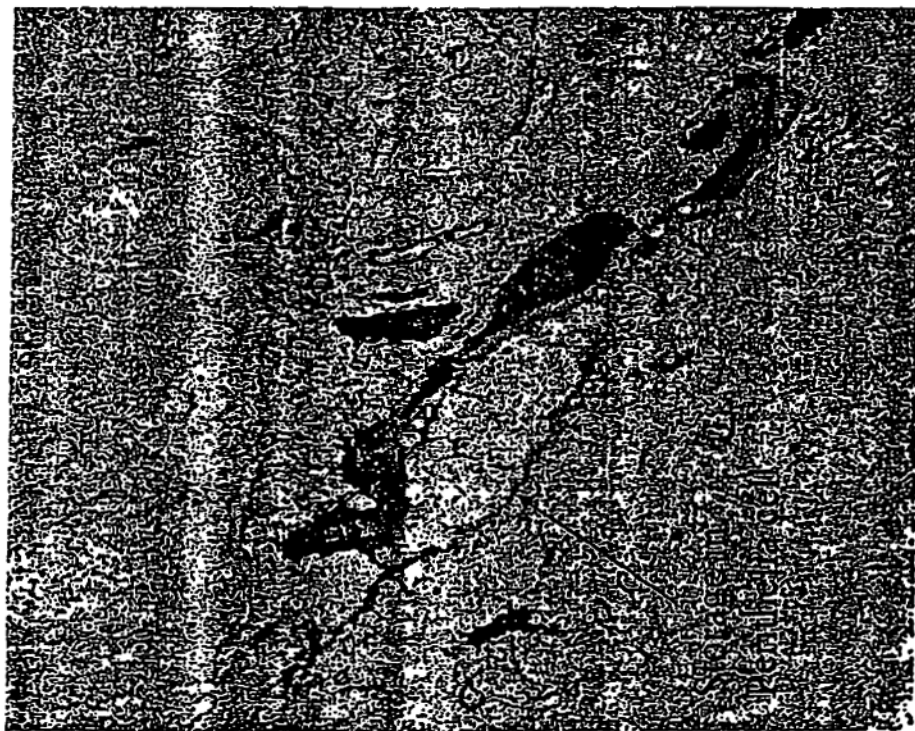
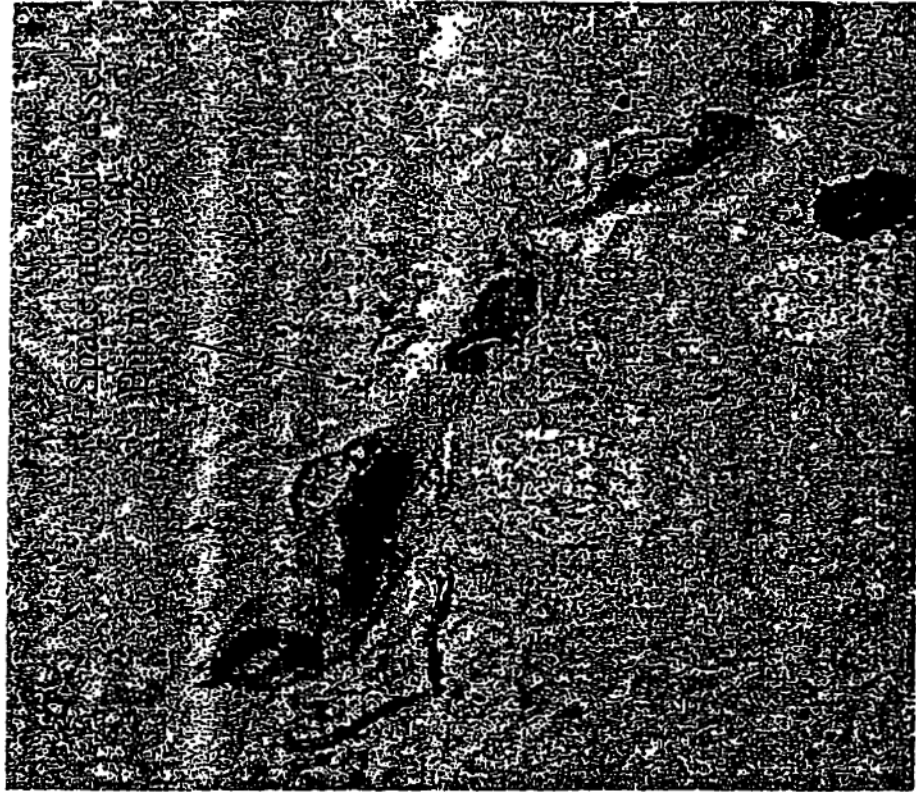


FIGURA 5

Enfermedad de macrófagos perivascular con y sin 4 dosis IT de 1 mg

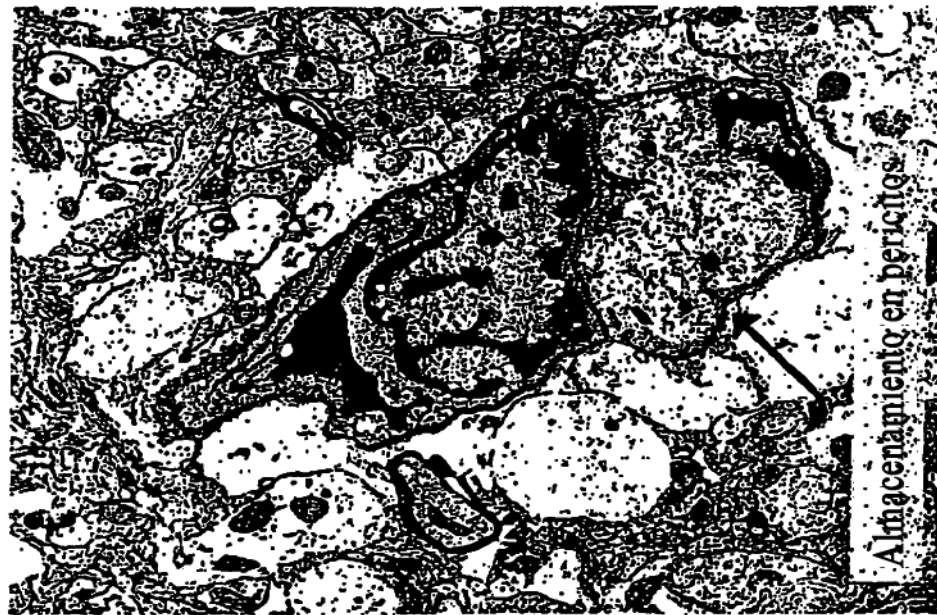


NO TRATADO



TRATADO

FIGURA 6
Microscopía electrónica de enfermedad de macrófagos perivasculares con
y sin 4 dosis IT de 1 mg



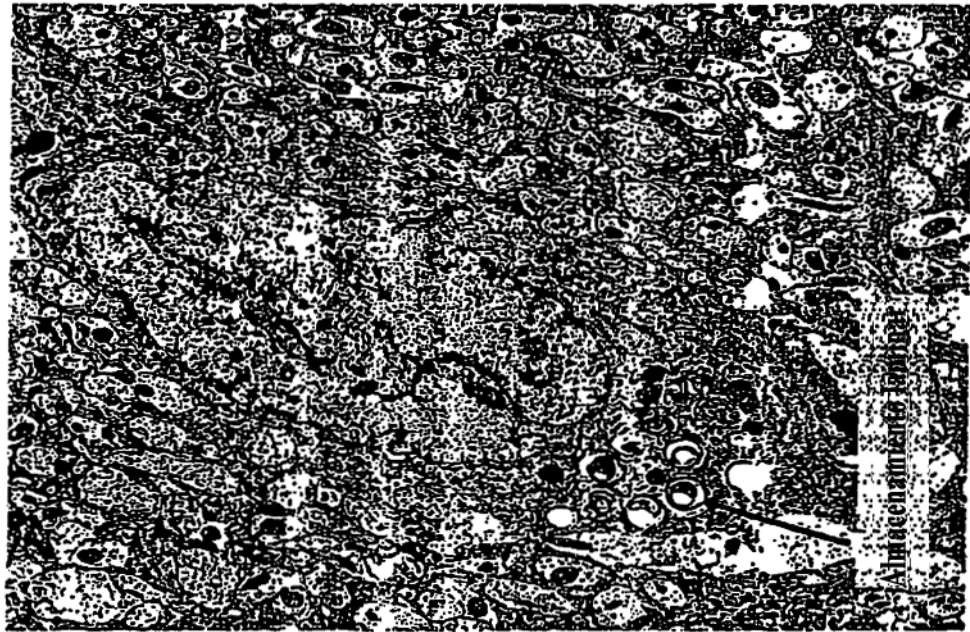
NO TRATADO



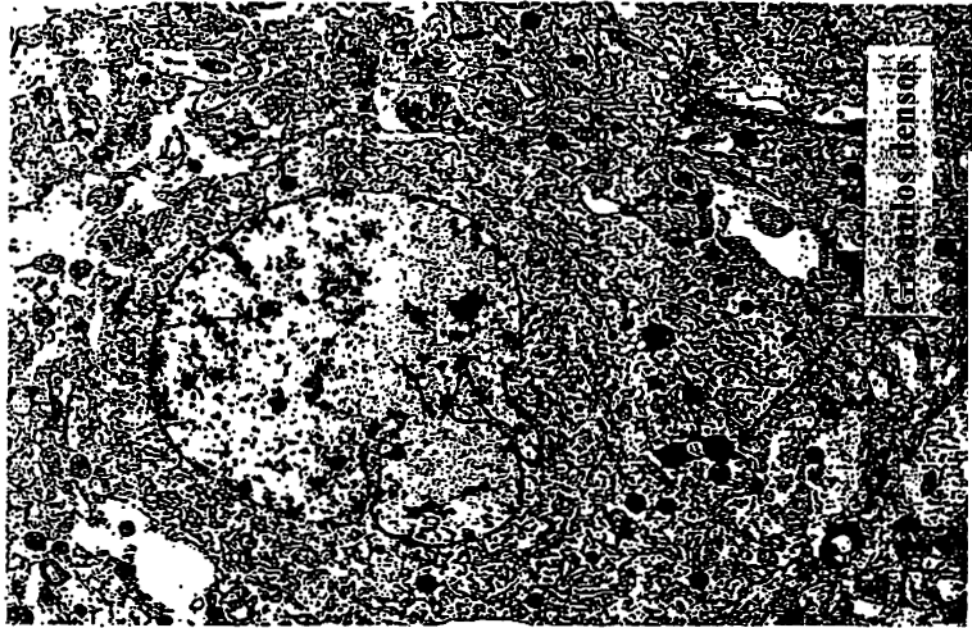
TRATADO

FIGURA 7

Enfermedad neuronal en microscopía electrónica, con y sin 4 dosis IT de 1 mg



NO TRATADO



TRATADO

FIGURA 8

Enfermedad meníngea, con y sin 4 dosis IT de 1 mg



NO TRATADO

TRATADO

FIGURA 9
Enfermedad meníngea, con y sin 4 dosis IT de 1 mg

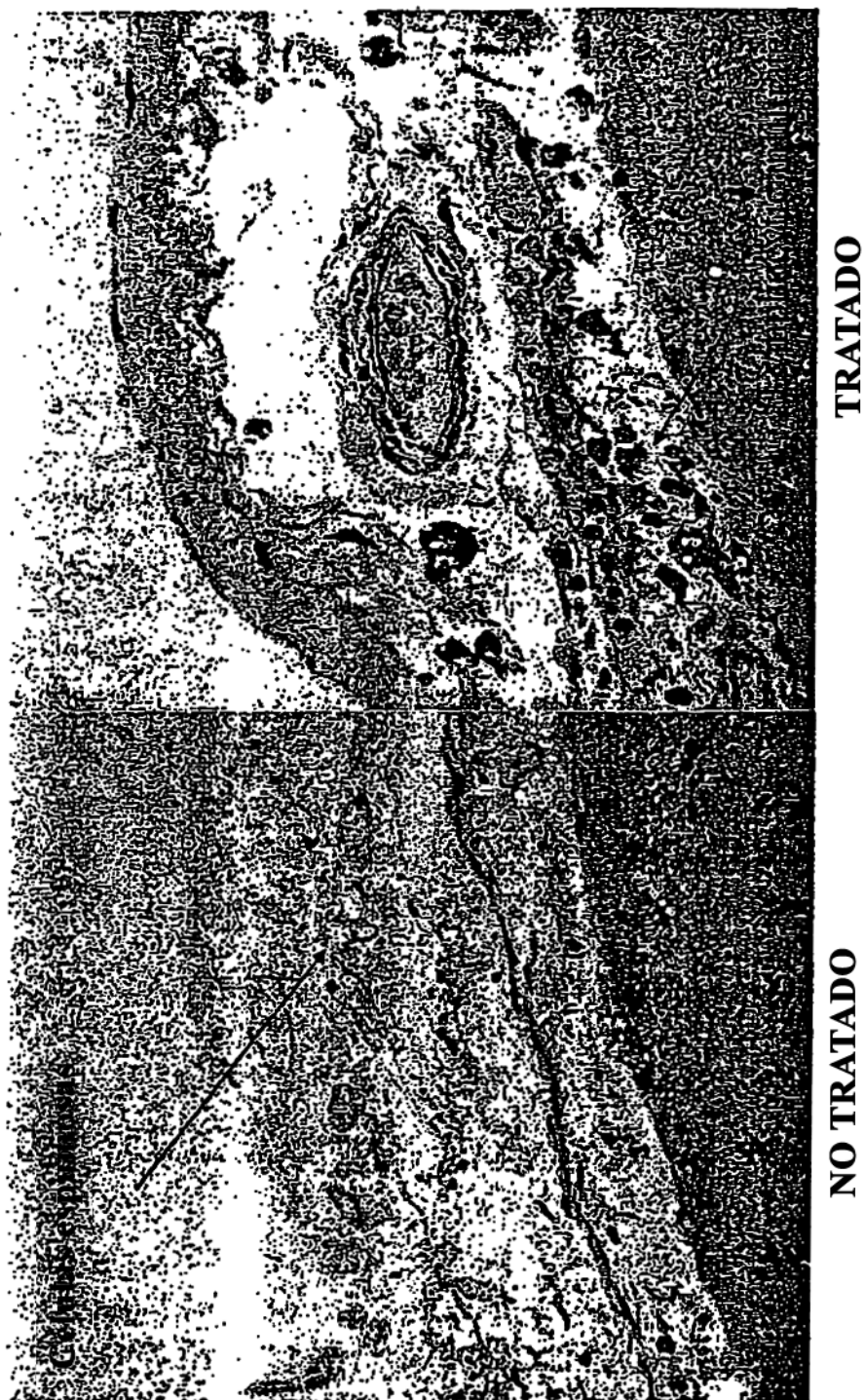


FIG. 10A

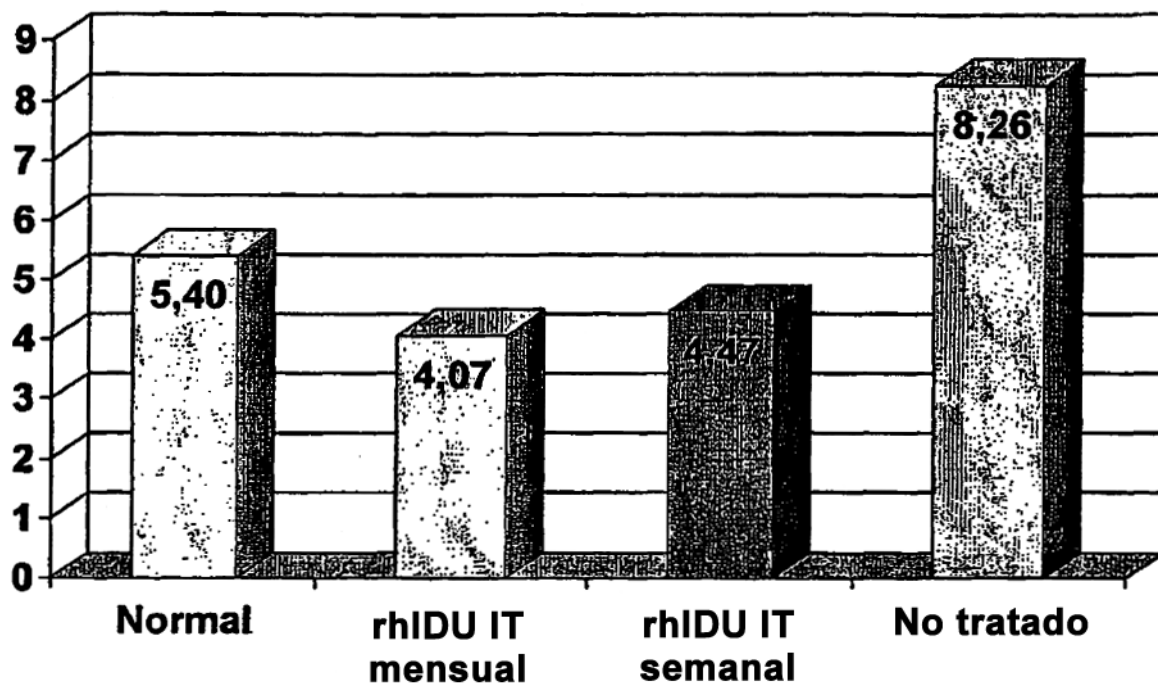


FIG. 10B

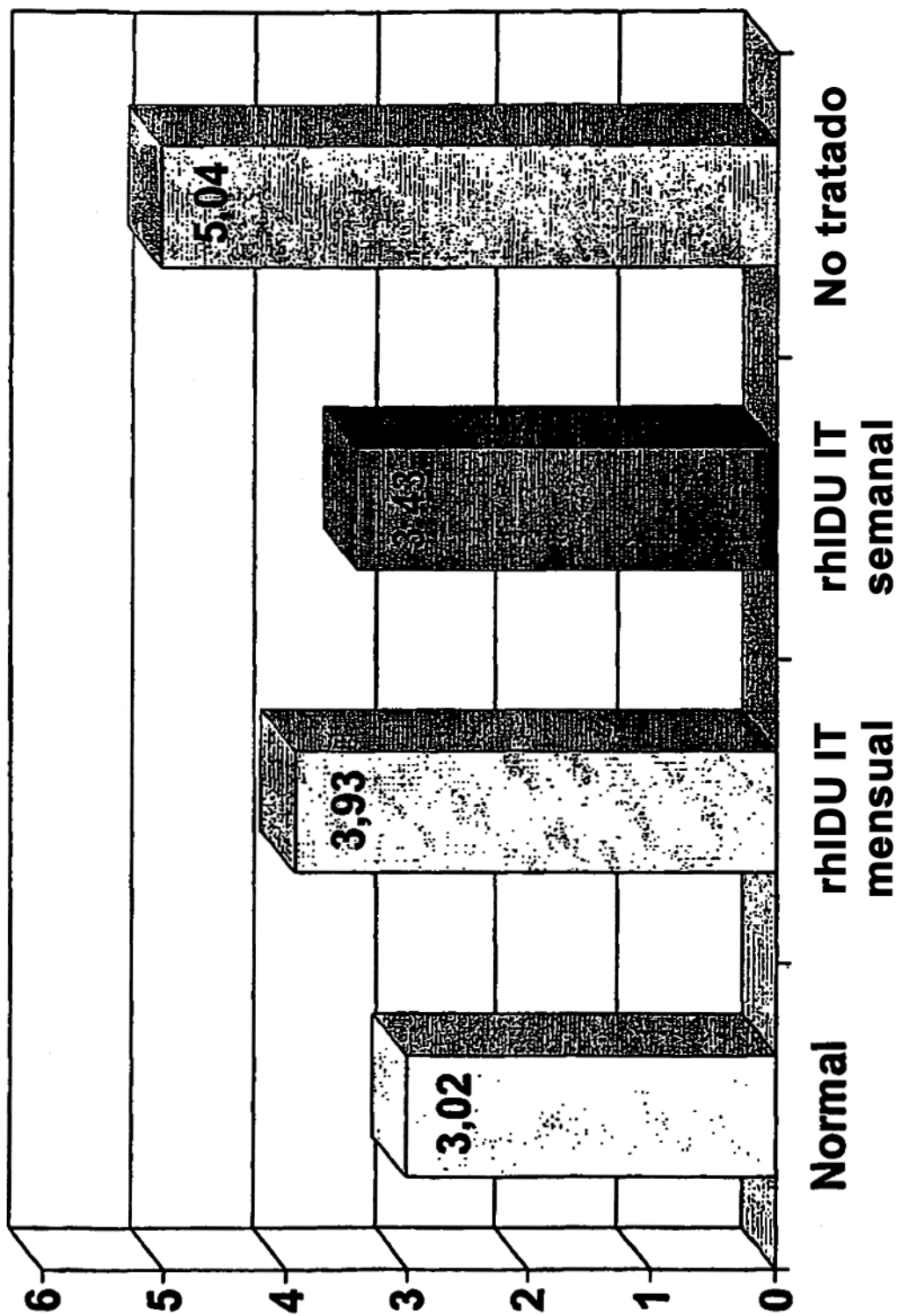


FIG. 10C

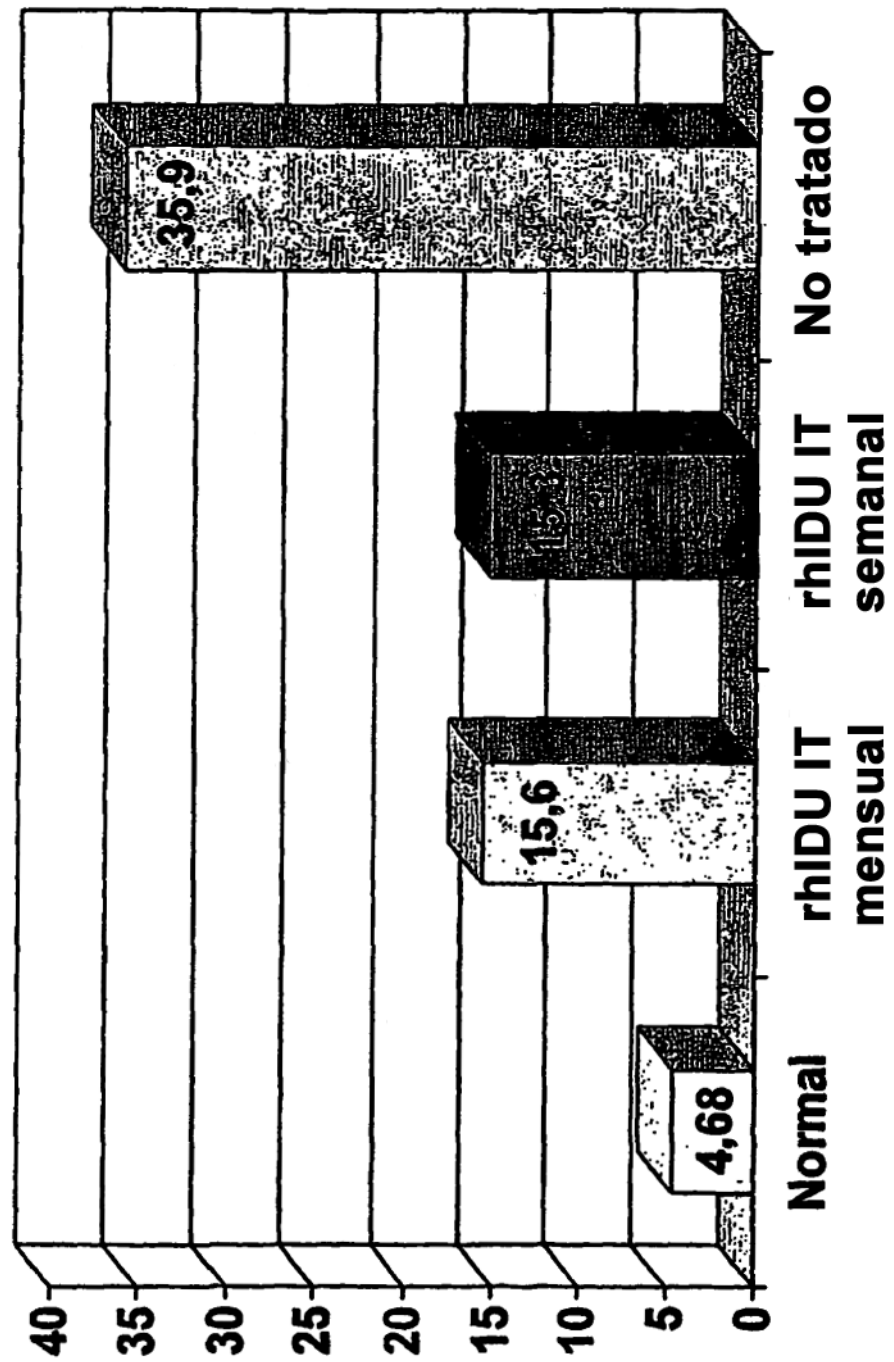


Figura 11A



Figura 11B



Figura 12A - 12D

