

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 710**

51 Int. Cl.:

A61K 38/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2007 E 07716858 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 1984018**

54 Título: **Administración intraventricular de enzimas para enfermedades de depósito lisosomal**

30 Prioridad:

20.01.2006 US 760378 P

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

14.01.2015

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)
500 KENDALL STREET
CAMBRIDGE, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**DODGE, JAMES;
PASSINI, MARCO;
SHIHABUDDIN, LAMYA y
CHENG, SENG**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 526 710 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 intraventricular de enzimas para enfermedades de depósito lisosomal

5 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere al área de las enfermedades de depósito lisosomal. En particular, se refiere al tratamiento y/o prevención de estas enfermedades mediante terapia de reemplazo enzimático.

10 DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0002] El grupo de trastornos metabólicos conocidos como enfermedades de depósito lisosomal (LSD) incluye más de cuarenta trastornos genéticos, muchos de los cuales implican defectos genéticos en diversas hidrolasas lisosomales. Las enfermedades de depósito lisosomal representativas y las enzimas defectuosas asociadas se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

Enfermedad de depósito lisosomal	Enzima defectuosa
Aspartil glucosaminuria	Aspartilglucosaminidasa
Fabry	alfa-galactosidasa A
enfermedad de Batten infantil* (CNL 1)	palmitoil proteín tioesterasa
enfermedad de Batten infantil tardía clásica* (CNL 2)	tripeptidil peptidasa
enfermedad de Batten juvenil* (CNL 1)	proteína transmembrana lisosomal
Batten, otras formas* (CNL-4-CNL-8)	Múltiples productos génicos
Cistinosis	transportadora de cisteína
Farber	ceramidasa ácida
Fucosidosis	alfa-L-fucosidasa ácida
Galactosidosialidosis	proteína protectora/catepsina A
Gaucher tipos 1, 2* y 3*	Beta-glucosidasa ácida, o
Gangliosidosis* G sub. M1	Beta-galactosidasa ácida
Hunter*	Iduronato-2-sulfatasa
Hurler-Scheie*	alfa-L-iduronidasa
Krabbe*	Galactocerebrosidasa
alfa-manosidosis*	Alfa-manosidasa ácida
beta-manosidosis*	Beta-manosidasa ácida
Maroteaux-Lamy	Arilsulfatasa B
Leucodistrofia metacromática*	Arilsulfatasa A
Morquio A	N-acetilgalactosamina-6-sulfato
Morquio B	beta-galactosidasa ácida
Mucopolidosis II/III*	N-acetilglucosamina-1-
Niemann-Pick A*, B	esfingomielinasa ácida
Niemann-Pick C*	NPC-1
Pompe* ácido	alfa-glucosidasa
Sandhoff*	beta-hexosaminidasa B
Sanfilippo A*	Heparán N-sulfatasa
Sanfilippo B*	alfa-N-acetilglucosaminidasa
Sanfilippo C*	Acetil-CoA: alfa-glucosaminida
Sanfilippo D*	N-acetilglucosamina-6-sulfato
Enfermedad de Schindler*	Alfa-N-acetilgalactosaminidasa
Schindler-Kanzaki	Alfa-N-acetilgalactosaminidasa
Sialidosis	Alfa-Neuramidasa
Sly*	Beta-Glucuronidasa
Tay-Sachs*	Beta-Hexosaminidasa A
Wolman*	Lipasa ácida
Implicación del SNC*	

[0003] El rasgo distintivo de las LSD es la acumulación anormal de metabolitos en los lisosomas que conduce a la formación de un gran número de lisosomas expandidos en el pericarion. Un reto importante para el tratamiento de las LSD (en contraposición a tratar una enzimopatía específica de un órgano, por ejemplo, una enzimopatía específica del hígado) es la necesidad de revertir la patología de depósito lisosomal en múltiples tejidos separados. Algunas LSD pueden ser tratarse eficazmente mediante infusión intravenosa de la enzima faltante, conocido como terapia de reemplazo enzimático (ERT). Por ejemplo, en pacientes con Gaucher tipo 1 tienen sólo enfermedad

visceral y responden favorablemente a la ERT con glucocerebrosidasa recombinante (Cerezyme™, Genzyme Corp.). Sin embargo, los pacientes con enfermedad metabólica que afecta al SNC (por ejemplo, enfermedad de Gaucher tipo 2 ó 3) sólo responden parcialmente a ERT intravenosa debido a que se evita que la enzima de reemplazo entre en el cerebro por la barrera hematoencefálica (BBB). Además, los intentos de introducir un enzima de reemplazo en el cerebro mediante la inyección directa se han limitado, en parte, debido a la citotoxicidad de la enzima a altas concentraciones locales y velocidades de difusión limitadas del parénquima en el cerebro (Partridge, Peptide Drug Delivery to the brain, Raven Press, 1991).

[0004] Una LSD de ejemplo es la enfermedad de Niemann-Pick de tipo A (NPA). Según la UniProtKB/Swiss-Prot entrada P 17405, los defectos en el gen SMPD1, localizado en el cromosoma 11, (11p15.4-p15.1), son la causa de la enfermedad de Niemann-Pick tipo de A (NPA), también conocida como la forma infantil clásica de la enfermedad. La enfermedad de Niemann-Pick es una enfermedad recesiva clínica y genéticamente heterogénea. Está causada por la acumulación de esfingomiélin y otros lípidos metabólicamente relacionados en los lisosomas, lo que da lugar a la neurodegeneración empezando de manera temprana. Los pacientes pueden mostrar xantomas, pigmentación, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía y retraso mental. La enfermedad de Niemann-Pick se presenta con más frecuencia entre los individuos de ascendencia judía asquenazí que en la población general. La NPA se caracteriza por un inicio muy temprano en la infancia y una evolución rápidamente progresiva que lleva a la muerte en tres años. La enzima esfingomiélinasa ácida (ASM) que es defectuosa en la NPA convierte la esfingomiélin en ceramida. La ASM también tiene actividades de fosfolipasa C orientadas hacia la 1,2-diacilglicerolfosfolina y 1,2-diacilglicerolfosfoglicerol. La enzima convierte esfingomiélin + H₂O -> N-acilesfingosina + fosfato de colina. Jin et al. (2003) Mol. Ther., 8: 876-885 describe células de médula ósea murina transducidas con un vector retroviral para sobreexpresar y administrar la esfingomiélinasa ácida humana. Las células transducidas se transplantaron intravenosamente en ratones deficientes en esfingomiélinasa, un modelo de enfermedad de Niemann-Pick humana.

[0005] Según la presente descripción, se tratan y/o previenen enfermedades de depósito lisosomal, tales como cualquiera de las enfermedades identificadas en la Tabla 1 anterior, por ejemplo, enfermedad de Niemann-Pick tipo A o B utilizando la administración intraventricular al cerebro de la enzima que es etiológicamente deficiente en la enfermedad. La administración se puede realizar lentamente para lograr el máximo efecto. Los efectos se observan en ambos lados de la barrera hematoencefálica, haciendo que sea un medio de administración útil para enfermedades de depósito lisosomal que afectan al cerebro y/o los órganos viscerales. En un primer aspecto, la presente descripción proporciona de este modo un método de tratamiento o prevención de una enfermedad de depósito lisosomal en un paciente, cuya enfermedad está causada por una deficiencia de la enzima, comprendiendo el método administrar la enzima al paciente a través de una administración intraventricular al cerebro. En un aspecto relacionado, la presente descripción proporciona el uso de una enzima para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad de depósito lisosomal en un paciente, cuya enfermedad está causada por una deficiencia de la enzima en el paciente, en el que el tratamiento o prevención comprende la administración intraventricular de la enzima al cerebro. La deficiencia de la enzima puede estar causada por, por ejemplo, un defecto en la expresión de la enzima o por una mutación en la enzima que conduce a un nivel reducido de actividad (por ejemplo, la enzima es inactiva) o un aumento de la tasa de depuración/descomposición de la enzima in vivo. La deficiencia puede conducir a una acumulación de un sustrato de enzima y la administración de la enzima puede conducir a una reducción en el nivel del sustrato en el cerebro. La enfermedad de depósito lisosomal puede ser cualquiera de las enfermedades identificadas en la Tabla 1 anterior. La enzima puede ser una hidrolasa lisosomal.

[0006] Según una realización de la presente descripción, se trata un paciente con la enfermedad de Niemann-Pick A o B. Se administra una esfingomiélinasa ácida al paciente a través de la administración intraventricular al cerebro en una cantidad suficiente para reducir los niveles de esfingomiélin en dicha cerebro.

[0007] Otro aspecto de la presente descripción es un kit para tratar o prevenir una enfermedad de depósito lisosomal en un paciente, cuya enfermedad está causada por una deficiencia de la enzima. El kit comprende la enzima que es deficiente, y un catéter y/o bomba para la administración de la enzima a uno o más ventrículos en el cerebro. El catéter y/o bomba pueden diseñarse específicamente y/o adaptarse para la administración intraventricular. Según una realización, la presente descripción proporciona un kit para el tratamiento de un paciente con enfermedad de Niemann-Pick A o B. El kit comprende una esfingomiélinasa ácida, y un catéter para la administración de dicha esfingomiélinasa ácida a los ventrículos cerebrales del paciente.

[0008] Sin embargo, otro aspecto de la presente descripción es un kit para el tratamiento de un paciente con la enfermedad de Niemann-Pick A o B. El kit comprende una esfingomiélinasa ácida y una bomba para la administración de dicha esfingomiélinasa ácida a los ventrículos cerebrales del paciente.

[0009] Según la presente descripción, se puede tratar un paciente que tiene una enfermedad de depósito lisosomal que está causada por una deficiencia de la enzima que conduce a la acumulación de sustrato de la enzima. Dichas enfermedades incluyen la enfermedad de Gaucher, enfermedad de MPS I y II, enfermedad de Pompe, y la enfermedad de Batten (CLN2), entre otras. La enzima defectuosa en la enfermedad particular se administra al paciente a través de la administración intraventricular en el cerebro. Se puede administrar a los ventrículos laterales y/o al cuarto ventrículo. La velocidad de administración de la enzima, según la presente descripción, es tal que la

administración de una dosis única puede ser como un bolo o puede tardar aproximadamente 1-5 minutos, aproximadamente 5-10 minutos, aproximadamente 10-30 minutos, aproximadamente 30-60 minutos, aproximadamente 1-4 horas, o consume más de cuatro, cinco, seis, siete, u ocho horas. Los niveles de sustrato en dicho cerebro pueden de este modo reducirse. La administración de una dosis única puede tardar más de 1 minuto, más de 2 minutos, más de 5 minutos, más de 10 minutos, más de 20 minutos, más de 30 minutos, más de 1 hora, más de 2 horas, o más de 3 horas.

[0010] Estas y otras realizaciones de la presente descripción que serán evidentes para los expertos en la materia al leer la memoria descriptiva proporcionan a la técnica métodos y kits para el tratamiento y/o prevención de enfermedades de depósito lisosomal, en particular aquellas que implican el SNC y patologías viscerales.

[0011] En base a la presente descripción, la presente invención proporciona una esfingomielinasa ácida para usar en la prevención o el tratamiento de la enfermedad de Niemann-Pick A o B en un paciente, en el que dicha prevención o tratamiento comprende la administración intraventricular de la esfingomielinasa ácida al cerebro del paciente y la administración de una dosis única de la esfingomielinasa ácida consume más de seis horas. Los aspectos y realizaciones adicionales de la invención se establecen en las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0012]

La figura 1 muestra un diagrama de secciones del cerebro que se analizaron para la esfingomielina. S1 se encuentra en la parte frontal del cerebro y S5 se encuentra en la parte posterior de cerebro.

La figura 2 muestra que la administración intraventricular de rhASM reduce los niveles de SPM en el cerebro de ratón ASMKO.

La figura 3 muestra que la administración intraventricular de rhASM reduce los niveles de SPM en el hígado, bazo y pulmón de ASMKO.

La figura 4 muestra la tinción de hASM en el cerebro después de la infusión intraventricular.

La figura 5 muestra que la infusión intraventricular de rhASM durante un período de 6 h reduce los niveles de SPM en el cerebro de ratón ASMKO.

La figura 6 muestra que la infusión intraventricular de rhASM durante un período de 6 h reduce los niveles de SPM en el hígado, suero y pulmón de ASMKO.

La figura 7 muestra las variantes de HASM documentadas y su relación con la enfermedad o la actividad enzimática.

La figura 8 muestra una vista en sección transversal del cerebro con los ventrículos indicados.

Las figuras 9A y 9B muestran vistas laterales y superiores, respectivamente, de los ventrículos.

La figura 10 muestra la inyección en los ventrículos laterales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0013] La práctica de la presente descripción, incluyendo la presente invención, empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que están dentro de la experiencia de el sector. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª edición (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F.M. Ausubel, et al eds (1987)); la serie METHODS IN ENZIMOLGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, y ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Freshney, ed. (1987)).

[0014] Tal como se usa en la memoria descriptiva y reivindicaciones, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de los mismos.

[0015] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "que comprende" pretende significar que las composiciones y procedimientos incluyen los elementos citados, pero sin excluir otros. "Que consiste esencialmente en", cuando se utiliza para definir composiciones y procedimientos, significará que excluye otros elementos de cualquier significado esencial para la combinación. Por lo tanto, una composición que consiste esencialmente en los elementos tal como se definen en el presente documento no excluiría contaminantes traza del procedimiento de aislamiento y purificación y portadores farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con

fosfato, conservantes, y similares. "Que consiste en" significará que excluye más de los elementos traza de otros ingredientes y que excluye etapas del procedimiento sustanciales para administrar las composiciones o medicamentos según la presente descripción.

5 **[0016]** Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de la presente invención.

10 **[0017]** Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, incluyendo intervalos, son aproximaciones que varían (+) o (-) en incrementos de 0,1. Debe entenderse, aunque no siempre se indica explícitamente, que todas las designaciones numéricas están precedidas por el término "aproximadamente". También debe entenderse, aunque no siempre se indica explícitamente, que los reactivos descritos en este documento son meramente de ejemplo y que también se pueden utilizar equivalentes de los mismos que son conocidos en la técnica.

15 **[0018]** Los términos "terapéutico", "cantidad terapéuticamente eficaz", y sus homólogos se refieren a la cantidad de una sustancia, por ejemplo, enzima o proteína, que da lugar a la prevención o retraso de la aparición, o mejora de uno o más síntomas de una enfermedad en un sujeto, o el logro de un resultado biológico deseado, tal como la corrección de la neuropatología. El término "corrección terapéutica" se refiere al grado de corrección que da lugar a la prevención o retraso de la aparición, o mejora de uno o más de los síntomas en un sujeto. La cantidad eficaz puede determinarse por métodos empíricos conocidos.

20 **[0019]** Una "composición" o "medicamento" pretende abarcar una combinación de un agente activo, por ejemplo, una enzima, y un portador u otro material, por ejemplo, un compuesto o composición, que es inerte (por ejemplo, un agente o marcador detectable) o activo, tal como un adyuvante, diluyente, aglutinante, estabilizante, tampón, sal, disolvente lipófilo, conservante, adyuvante o similares, o una mezcla de dos o más de estas sustancias. Los portadores son preferiblemente farmacéuticamente aceptables. Pueden incluir excipientes y aditivos farmacéuticos, proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos, y carbohidratos (por ejemplo, azúcares, incluyendo monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, tetrasacáridos, y oligosacáridos; azúcares derivatizados, tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares; y polisacáridos o polímeros de azúcar), que pueden estar presentes solos o en combinación, que comprenden solos o en combinación 1- 99,99% en peso o volumen. Los excipientes de proteína de ejemplo incluyen albúmina de suero, tal como albúmina de suero humano (HSA), albúmina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína, y similares. Los componentes de aminoácido/anticuerpo representativos, que también pueden funcionar en una capacidad tamponante, incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo, y similares. Los excipientes de carbohidratos también se entienden dentro del alcance de la presente descripción, incluyendo la presente invención, ejemplos de los cuales incluyen, pero sin limitación, monosacáridos, tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa, y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melejitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol) y mioinositol.

40 **[0020]** El término portador también incluye un tampón o un agente de ajuste del pH o una composición que contiene a los mismos; habitualmente, el tampón es una sal preparada a partir de un ácido orgánico o base. Los tampones representativos incluyen sales de ácidos orgánicos, tales como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético, o ácido ftálico, Tris, clorhidrato de trometamina, o tampones de fosfato. Los portadores adicionales incluyen excipientes/aditivos poliméricos, tales como polivinilpirrolidonas, ficoles (un azúcar polimérico), dextratos (por ejemplo, ciclodextrinas, tales como 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina), polietilenglicoles, agentes aromatizantes, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, tensioactivos (por ejemplo, polisorbatos, tales como "TWEEN 20" y "TWEEN 80"), lípidos (por ejemplo, fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides (por ejemplo, colesterol) y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA).

55 **[0021]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" abarca cualquiera de los portadores farmacéuticos estándar, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua y emulsiones, tales como una emulsión de aceite agua o agua/aceite, y diversos tipos de agentes humectantes. Las composiciones y medicamentos que se fabrican y/o utilizan según la presente descripción y que incluyen la enzima particular, cuya deficiencia debe corregirse, pueden incluir estabilizantes y conservantes y cualquiera de los portadores anteriores señalados con la condición adicional de que sea aceptable para utilizar in vivo. Para ejemplos de portadores, estabilizadores y adyuvantes, véase Martin REMINGTON'S PHARM. SCL, 15a Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975) y Williams & Williams, (1995), y en la "PHYSICIAN'S DESK REFERENCE", 52ª ed., Medical Economics, Montvale, Nueva Jersey. (1998).

60 **[0022]** Un "sujeto", "individuo" o "paciente", se usa indistintamente en el presente documento, y se refiere a un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, ratones, ratas, monos, seres humanos, animales de granja, animales de deporte y mascotas.

65

[0023] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "modular" significa variar la cantidad o intensidad de un efecto o resultado, por ejemplo, para mejorar, aumentar, disminuir o reducir.

[0024] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "mejorar" es sinónimo de "aliviar" y significa reducir o aligerar. Por ejemplo, se pueden mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno, haciéndolos más soportables.

[0025] Para la identificación de las estructuras en el cerebro humano, véase, por ejemplo, The Human Brain: Surface, Three-Dimensional Sectional Anatomy With MRI and Blood Supply, 2a ed, eds. Deuteron et al, Springer Vela, 1999; Atlas of The Human Brain, eds. Mai et al, Academic Press; 1997; y Co-Planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain: 3-Dimensional Proportional System: An approach to Cerebral Imaging, eds. Tamarack et al., Thyme Medical Pub., 1988. Para la identificación de las estructuras en el cerebro del ratón, véase, por ejemplo, The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2ª ed., Academic Press, 2000.

[0026] Los presentes inventores han descubierto que la administración intraventricular al cerebro de enzimas hidrolasas lisosomales a los pacientes que tienen deficiencia de las enzimas, produce una mejoría en el estado metabólico de tanto el cerebro como de los órganos viscerales afectados (no SNC). Esto es particularmente cierto cuando la velocidad de administración es baja, con respecto a una administración con bolo. Por lo tanto, las enfermedades de depósito lisosomal causadas por una deficiencia en una enzima en particular, tales como las enfermedades identificadas en la Tabla 1 anterior, se pueden tratar o prevenir mediante la administración intraventricular de la enzima respectiva. Una enzima particularmente útil para el tratamiento de Niemann-Pick A o B es la esfingomielinasa ácida (ASM), tal como la mostrada en la SEQ ID NO: 1. ¹Una enzima particularmente útil para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher es la glucocerebrosidasa. Una enzima particularmente útil para el tratamiento de la enfermedad MPS I es alfa-L-iduronidasa. Una enzima particularmente útil para el tratamiento de la enfermedad MPS II es la iduronato-2-sulfatasa. Una enzima particularmente útil para el tratamiento de la enfermedad de Pompe, o la enfermedad de depósito de glucógeno tipo II (GSDII), también denominada deficiencia de maltasa ácida (AMD), es la alfa-glucosidasa ácida. Una enzima particularmente útil para el tratamiento de la enfermedad de Batten infantil tardía clásica¹. Los residuos 1-46 constituyen la secuencia de señal que se escinde después de la secreción. enfermedad (CLN2) es tripeptidil peptidasa. Las enzimas que se utilizan y/o administran según la presente descripción pueden ser formas recombinantes de las enzimas que se producen utilizando métodos que son conocidos en la técnica. En una realización, la enzima es una enzima humana recombinante.

[0027] La administración de enzimas lisosomales, y más particularmente enzimas hidrolasas lisosomales, a pacientes que son deficientes en las enzimas se puede realizar en cualquiera de uno o más de los ventrículos del cerebro, que están llenos de líquido cefalorraquídeo (CSF). El CSF es un fluido claro que llena los ventrículos, está presente en el espacio subaracnoideo, y rodea el cerebro y la médula espinal. El CSF es producido por los plexos coroideos y mediante supuración o la transmisión de fluido de los tejidos por el cerebro hacia los ventrículos. El plexo coroideo es una estructura que recubre el suelo del ventrículo lateral y el techo de los tercero y cuarto ventrículos. Ciertos estudios han indicado que estas estructuras son capaces de producir 400-600 cc de fluido por día consistente con la cantidad para llenar los espacios del sistema nervioso central cuatro veces en un día. En los adultos, el volumen de este fluido ha sido calculado en 125-150 ml (4-5 oz). El CSF está en continua formación, circulación y absorción. Algunos estudios han indicado que se pueden producir cada día aproximadamente de 430 a 450 ml (aproximadamente 2 tazas). Algunos cálculos estiman que la producción es igual a aproximadamente 0,35 ml por minuto en adultos y 0,15 por minuto en los lactantes. Los plexos coroideos de los ventrículos laterales producen la mayoría de CSF. Fluye a través de los agujeros de Monro al tercer ventrículo en el que se añade mediante la producción a partir del tercer ventrículo y continúa hacia abajo a través del acueducto de Silvio al cuarto ventrículo. El cuarto ventrículo añade más CSF; a continuación, el fluido se desplaza en el espacio subaracnoideo a través de los agujeros de Magendie y Luschka. A continuación, circula a través de la base del cerebro, hacia abajo alrededor de la médula espinal y hacia arriba a través de los hemisferios cerebrales. El CSF se vacía en la sangre a través de las vellosidades aracnoideas y los senos vasculares intracraneales, administrando de este modo las enzimas que se infunden en los ventrículos no sólo al cerebro, sino también a los órganos viscerales que se sabe que están afectados por LSD.

[0028] Aunque en la SEQ ID NO: 1, se muestra una secuencia de aminoácidos particular, también se pueden utilizar variantes de esa secuencia que retienen la actividad, por ejemplo, variantes normales en la población humana. Habitualmente, estas variantes normales difieren en sólo uno o dos residuos de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1. Las variantes de la SEQ ID NO: 1 que se utilizarán según la presente descripción, incluyendo la presente invención, tanto si son naturales como si no, debería ser al menos 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% idénticas a SEQ ID NO: 1. Las variantes de otras enzimas se pueden usar según la presente descripción. Sin embargo, independientemente de la enzima que se utiliza, no se deben utilizar variantes que estén asociadas con la enfermedad o actividad reducida. Habitualmente, se administrará la forma madura de la enzima. En el caso de la SEQ ID NO: 1, la forma madura comenzará con el residuo 47 tal como se muestra en SEQ ID NO: 1. Las variantes que están asociadas con la enfermedad se muestran en la figura 7. De una manera similar, se pueden utilizar también variantes normales en la población humana de dichas enzimas de LSD, tales como glucocerebrosidasa, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, alfa-glucosidasa ácida, y tripeptidil peptidasa que retienen la actividad enzimática.

- 5 **[0029]** Los kits según la presente descripción son ensamblajes de componentes separados. Aunque se pueden envasar en un único recipiente, se pueden subenvasar por separado. Incluso un único recipiente se puede dividir en compartimentos. Normalmente, un conjunto de instrucciones acompañarán el kit y proporcionarán instrucciones para la administración de las enzimas, por ejemplo, las enzimas hidrolasa lisosomal, por vía intraventricular. Las instrucciones pueden estar en forma impresa, en formato electrónico, como un vídeo o DVD con instrucciones, en un disco compacto, en un disquete, en Internet con una dirección proporcionada en el envase, o una combinación de estos medios. Además de la enzima se disponen otros componentes, tales como diluyentes, tampones, disolventes, cintas, tornillos y herramientas de mantenimiento, una o más cánulas o catéteres, y/o una bomba.
- 10 **[0030]** Las poblaciones tratadas por los métodos de la descripción incluyen, pero sin limitación, pacientes que tienen, o que están en riesgo de desarrollar, un trastorno neurometabólico, por ejemplo, una LSD, tal como las enfermedades enumeradas en la Tabla 1, particularmente si dicha enfermedad afecta al SNC y órganos viscerales. En una realización ilustrativa, la enfermedad es enfermedad de Niemann-Pick de tipo A.
- 15 **[0031]** Una ASM u otra enzima hidrolasa lisosomal se pueden incorporar en una composición farmacéutica útil para tratar, por ejemplo, inhibir, atenuar, prevenir, o mejorar, una enfermedad caracterizada por un nivel insuficiente de una actividad hidrolasa lisosomal. La composición farmacéutica se administrará a un sujeto que padece de una deficiencia de hidrolasa lisosomal o alguien que está en riesgo de desarrollar dicha deficiencia. Las composiciones deben contener una cantidad terapéutica o profiláctica de la ASM u otra enzima hidrolasa lisosomal, en un portador farmacéuticamente aceptable. El portador farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible no tóxica adecuada para administrar los polipéptidos al paciente. El agua estéril, alcohol, grasas, y ceras se pueden utilizar como portador. Los adyuvantes farmacéuticamente aceptables, agentes tampón, agentes dispersantes, y similares, también se pueden incorporar en las composiciones farmacéuticas. El portador puede combinarse con la ASM u otra enzima hidrolasa lisosomal en cualquier forma adecuada para administración mediante inyección o infusión intraventricular (cuya forma también es posiblemente adecuada para la administración intravenosa o intratecal) o de cualquier otra manera. Los portadores adecuados incluyen, por ejemplo, solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL.TM. (BASF, Parsippany, NJ.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS), otras soluciones salinas, soluciones de dextrosa, soluciones de glicerol, emulsiones de agua y aceites, tales como los elaborados con aceites de petróleo, animal, vegetal, o sintético (aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, o aceite de sésamo). Como portador se puede utilizar un CSF artificial. El portador será preferiblemente estéril y libre de pirógenos. La concentración de la ASM u otra enzima hidrolasa lisosomal en la composición farmacéutica puede variar ampliamente, es decir, de al menos aproximadamente 0,01% en peso, a 0,1% en peso, a aproximadamente 1% en peso, hasta como máximo 20% en peso o más de la composición total.
- 20 **[0032]** Para la administración intraventricular de ASM u otra enzima hidrolasa lisosomal, la composición debe ser estéril y debe ser fluida. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio, en la composición.
- 25 **[0033]** La dosificación de ASM u otra enzima hidrolasa lisosomal puede variar algo de individuo a individuo, dependiendo de la enzima particular y su actividad in vivo específica, la vía de administración, la condición médica, la edad, el peso o el sexo del paciente, las sensibilidades del paciente a la ASM u otra enzima hidrolasa lisosomal o componentes del vehículo, y otros factores que el médico tratante será capaz de tomar en cuenta fácilmente. Mientras que las dosis pueden variar dependiendo de la enfermedad y el paciente, la enzima se administra generalmente al paciente en cantidades de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 miligramos por 50 kg de paciente por mes. En una realización, la enzima se administra al paciente en cantidades de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 miligramos por 50 kg de paciente por mes. En otras realizaciones, la enzima se administra al paciente en cantidades de aproximadamente 5 a aproximadamente 300 miligramos por 50 kg de paciente por mes, o aproximadamente de 10 a aproximadamente 200 miligramos por 50 kg de paciente por mes.
- 30 **[0034]** La velocidad de administración es tal que la administración de una sola dosis puede administrarse como un bolo. Una sola dosis también puede infundirse durante aproximadamente 1-5 minutos, aproximadamente 5-10 minutos, aproximadamente 10-30 minutos, aproximadamente 30-60 minutos, aproximadamente 1-4 horas, o consume más de cuatro, cinco, seis, siete, u ocho horas. Puede tardar más de 1 minuto, más de 2 minutos, más de 5 minutos, más de 10 minutos, más de 20 minutos, más de 30 minutos, más de 1 hora, más de 2 horas, o más de 3 horas. Los solicitantes han observado que, mientras que la administración intraventricular en bolo puede ser eficaz, la infusión lenta es muy eficaz. Aunque los solicitantes no desean limitarse por ninguna teoría particular de operación, se cree que la infusión lenta es más eficaz debido al recambio del líquido cefalorraquídeo (LCR). Aunque las estimaciones y cálculos en la literatura varían, se cree que el líquido cefalorraquídeo se recambia en aproximadamente 4, 5, 6, 7, u 8 horas en los seres humanos. En una realización, el tiempo de infusión lenta debe ser dosificarse de modo que sea aproximadamente igual o mayor que el tiempo de recambio del CSF. El tiempo de recambio puede depender de la especie, el tamaño y la edad del sujeto, pero se puede determinar usando métodos conocidos en la técnica. La infusión también puede ser continua durante un período de uno o más días. El paciente puede tratarse una vez, dos veces, o tres o más veces al mes, por ejemplo, semanalmente, por ejemplo, cada dos
- 35 **[0032]** Para la administración intraventricular de ASM u otra enzima hidrolasa lisosomal, la composición debe ser estéril y debe ser fluida. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio, en la composición.
- 40 **[0033]** La dosificación de ASM u otra enzima hidrolasa lisosomal puede variar algo de individuo a individuo, dependiendo de la enzima particular y su actividad in vivo específica, la vía de administración, la condición médica, la edad, el peso o el sexo del paciente, las sensibilidades del paciente a la ASM u otra enzima hidrolasa lisosomal o componentes del vehículo, y otros factores que el médico tratante será capaz de tomar en cuenta fácilmente. Mientras que las dosis pueden variar dependiendo de la enfermedad y el paciente, la enzima se administra generalmente al paciente en cantidades de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 miligramos por 50 kg de paciente por mes. En una realización, la enzima se administra al paciente en cantidades de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 miligramos por 50 kg de paciente por mes. En otras realizaciones, la enzima se administra al paciente en cantidades de aproximadamente 5 a aproximadamente 300 miligramos por 50 kg de paciente por mes, o aproximadamente de 10 a aproximadamente 200 miligramos por 50 kg de paciente por mes.
- 45 **[0034]** La velocidad de administración es tal que la administración de una sola dosis puede administrarse como un bolo. Una sola dosis también puede infundirse durante aproximadamente 1-5 minutos, aproximadamente 5-10 minutos, aproximadamente 10-30 minutos, aproximadamente 30-60 minutos, aproximadamente 1-4 horas, o consume más de cuatro, cinco, seis, siete, u ocho horas. Puede tardar más de 1 minuto, más de 2 minutos, más de 5 minutos, más de 10 minutos, más de 20 minutos, más de 30 minutos, más de 1 hora, más de 2 horas, o más de 3 horas. Los solicitantes han observado que, mientras que la administración intraventricular en bolo puede ser eficaz, la infusión lenta es muy eficaz. Aunque los solicitantes no desean limitarse por ninguna teoría particular de operación, se cree que la infusión lenta es más eficaz debido al recambio del líquido cefalorraquídeo (LCR). Aunque las estimaciones y cálculos en la literatura varían, se cree que el líquido cefalorraquídeo se recambia en aproximadamente 4, 5, 6, 7, u 8 horas en los seres humanos. En una realización, el tiempo de infusión lenta debe ser dosificarse de modo que sea aproximadamente igual o mayor que el tiempo de recambio del CSF. El tiempo de recambio puede depender de la especie, el tamaño y la edad del sujeto, pero se puede determinar usando métodos conocidos en la técnica. La infusión también puede ser continua durante un período de uno o más días. El paciente puede tratarse una vez, dos veces, o tres o más veces al mes, por ejemplo, semanalmente, por ejemplo, cada dos
- 50 **[0032]** Para la administración intraventricular de ASM u otra enzima hidrolasa lisosomal, la composición debe ser estéril y debe ser fluida. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio, en la composición.
- 55 **[0033]** La dosificación de ASM u otra enzima hidrolasa lisosomal puede variar algo de individuo a individuo, dependiendo de la enzima particular y su actividad in vivo específica, la vía de administración, la condición médica, la edad, el peso o el sexo del paciente, las sensibilidades del paciente a la ASM u otra enzima hidrolasa lisosomal o componentes del vehículo, y otros factores que el médico tratante será capaz de tomar en cuenta fácilmente. Mientras que las dosis pueden variar dependiendo de la enfermedad y el paciente, la enzima se administra generalmente al paciente en cantidades de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 miligramos por 50 kg de paciente por mes. En una realización, la enzima se administra al paciente en cantidades de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 miligramos por 50 kg de paciente por mes. En otras realizaciones, la enzima se administra al paciente en cantidades de aproximadamente 5 a aproximadamente 300 miligramos por 50 kg de paciente por mes, o aproximadamente de 10 a aproximadamente 200 miligramos por 50 kg de paciente por mes.
- 60 **[0034]** La velocidad de administración es tal que la administración de una sola dosis puede administrarse como un bolo. Una sola dosis también puede infundirse durante aproximadamente 1-5 minutos, aproximadamente 5-10 minutos, aproximadamente 10-30 minutos, aproximadamente 30-60 minutos, aproximadamente 1-4 horas, o consume más de cuatro, cinco, seis, siete, u ocho horas. Puede tardar más de 1 minuto, más de 2 minutos, más de 5 minutos, más de 10 minutos, más de 20 minutos, más de 30 minutos, más de 1 hora, más de 2 horas, o más de 3 horas. Los solicitantes han observado que, mientras que la administración intraventricular en bolo puede ser eficaz, la infusión lenta es muy eficaz. Aunque los solicitantes no desean limitarse por ninguna teoría particular de operación, se cree que la infusión lenta es más eficaz debido al recambio del líquido cefalorraquídeo (LCR). Aunque las estimaciones y cálculos en la literatura varían, se cree que el líquido cefalorraquídeo se recambia en aproximadamente 4, 5, 6, 7, u 8 horas en los seres humanos. En una realización, el tiempo de infusión lenta debe ser dosificarse de modo que sea aproximadamente igual o mayor que el tiempo de recambio del CSF. El tiempo de recambio puede depender de la especie, el tamaño y la edad del sujeto, pero se puede determinar usando métodos conocidos en la técnica. La infusión también puede ser continua durante un período de uno o más días. El paciente puede tratarse una vez, dos veces, o tres o más veces al mes, por ejemplo, semanalmente, por ejemplo, cada dos
- 65 **[0032]** Para la administración intraventricular de ASM u otra enzima hidrolasa lisosomal, la composición debe ser estéril y debe ser fluida. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio, en la composición.

semanas. Las infusiones pueden repetirse en el transcurso de la vida de un sujeto según lo dictado por la reacumulación del sustrato de la enfermedad en el cerebro o en los órganos viscerales. La reacumulación se puede determinar por cualquiera de las técnicas que son bien conocidas en el sector para la identificación y cuantificación del sustrato pertinente, cuyas técnicas pueden realizarse sobre una o más muestras tomadas del cerebro y/o de uno o más de los órganos viscerales. Dichas técnicas incluyen ensayos enzimáticos y/o inmunoensayos, por ejemplo, radioinmunoensayo o ELISA.

[0035] El CSF se vacía en la sangre a través de las vellosidades aracnoideas y los senos vasculares intracraneales, administrando de esta forma las enzimas infundidas a los órganos viscerales que se sabe que se están afectados en LSD. Los órganos viscerales que a menudo se ven afectados en la enfermedad de Niemann-Pick son los pulmones, el bazo, el riñón y el hígado. La infusión intraventricular lenta proporciona cantidades disminuidas del sustrato para una enzima administrada en al menos el cerebro y potencialmente en los órganos viscerales. La reducción en el sustrato acumulado en el cerebro, los pulmones, el bazo, el riñón y/o hígado puede ser drástica. Se pueden lograr reducciones de más de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%. La reducción conseguida no es necesariamente uniforme de paciente a paciente o incluso de un órgano a otro dentro de un único paciente. Las reducciones se pueden determinar por cualquiera de las técnicas que son bien conocidas en el sector, por ejemplo, mediante ensayos enzimáticos y/o técnicas de inmunoensayo, tal como se discute en otros puntos de este documento.

[0036] Si se desea, la estructura del cerebro humano puede correlacionarse con estructuras similares en el cerebro de otro mamífero. Por ejemplo, la mayoría de los mamíferos, incluyendo seres humanos y roedores, muestran una organización topográfica similar de las proyecciones entorrinal-hipocampo, con las neuronas en la parte lateral de la corteza entorrinal lateral y medial que se proyectan a la parte dorsal o área septal del hipocampo, mientras que la proyección al hipocampo ventral se origina principalmente de neuronas en las partes medial de la corteza entorrinal (Principles of Neural Science, 4ª ed., eds Kandel et al., McGraw-Hill, 1991; The Rat Nervous System, 2ª ed., Ed. Paxinos, Academic Press, 1995). Además, las células de capa II de la corteza entorrinal se proyectan al giro dentado, y terminan en los dos tercios externos de la capa molecular del giro dentado. Los axones de las células de la capa III se proyectan bilateralmente a las áreas Ammonis Cornu CA1 y CA3 del hipocampo, terminando en la capa molecular de estrato lacunoso.

[0037] En una realización ilustrativa, la administración se lleva a cabo mediante la infusión de la enzima LSD en uno o ambos de los ventrículos laterales de un sujeto o paciente. Al infundir en los ventrículos laterales, la enzima se administra al sitio en el cerebro en la que se produce la mayor cantidad de CSF. La enzima también se puede infundir en más de un ventrículo del cerebro. El tratamiento puede consistir en una sola infusión por sitio diana, o puede repetirse. Pueden utilizarse múltiples sitios de infusión/inyección. Por ejemplo, los ventrículos en los que se administra la enzima pueden incluir los ventrículos laterales y el cuarto ventrículo. En algunas realizaciones, además del primer sitio de administración, una composición que contiene la enzima LSD se administra a otro sitio que puede ser contralateral o ipsilateral al primer sitio de administración. Las inyecciones/infusiones pueden ser individuales o múltiples, unilaterales o bilaterales.

[0038] Para administrar la solución u otra composición que contiene la enzima específicamente a una región particular del sistema nervioso central, tal como a un ventrículo particular, por ejemplo, a los ventrículos laterales o al cuarto ventrículo del cerebro, se puede administrar mediante microinyección estereotáxica. Por ejemplo, en el día de la operación quirúrgica, los pacientes tendrán la base del marco estereotáxico fijado en su lugar (atornillado en el cráneo). El cerebro con la base del marco estereotáxico (compatible con MRI con las marcas fiduciarias) será fotografiado usando MRI de alta resolución. Las imágenes de MRI serán transferidas a un ordenador que ejecuta el software estereotáxico. Se utilizará una serie de imágenes coronales, sagitales y axiales para determinar el sitio diana del vector de inyección, y la trayectoria. El software traduce directamente la trayectoria en coordenadas de 3 dimensiones apropiadas para el marco estereotáxico. Se realizan agujeros de Burr por encima del sitio de entrada y el aparato estereotáxico se localiza con la aguja implantada a una profundidad determinada. A continuación, se inyectará la solución de enzima en un portador farmacéuticamente aceptable. Se pueden utilizar rutas adicionales de administración, por ejemplo, la aplicación cortical superficial bajo visualización directa, u otra aplicación no estereotáxica.

[0039] Una forma para suministrar una infusión lenta es el uso de una bomba. Dichas bombas están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Alzet (Cupertino, CA) o Medtronic (Minneapolis, MN). La bomba puede ser implantable. Otra forma conveniente de administrar las enzimas es utilizar una cánula o un catéter. La cánula o catéter se pueden usar para múltiples administraciones separadas en el tiempo. Las cánulas y catéteres se pueden implantar estereotáxicamente. Se contempla que se usarán múltiples administraciones para tratar el paciente típico con una enfermedad de depósito lisosomal. Los catéteres y bombas se pueden utilizar por separado o combinados.

[0040] Las enfermedades de depósito lisosomal (LSD) incluyen más de cuarenta trastornos genéticos, muchos de los cuales implican defectos genéticos en diversas hidrolasas lisosomales. Las enfermedades de depósito lisosomal representativas y las enzimas defectuosas asociadas se indican en la Tabla 1.

- 5 **[0041]** La enfermedad de Gaucher resulta como consecuencia de una deficiencia hereditaria de la glucocerebrosidasa hidrolasa lisosomal (GC), lo que lleva a la acumulación de su sustrato, la glucosilceramida (GL-1), en los lisosomas de histiocitos. La acumulación progresiva de GL-1 en los macrófagos de tejido (células de Gaucher) se produce en varios tejidos. La extensión de la acumulación es dependiente en parte del genotipo. Clínicamente, se reconocen tres fenotipos diferentes de Gaucher, del tipo no neuropático 1, que es el más común con una aparición que va desde la niñez hasta la edad adulta, y los tipos neuropáticos 2 y 3, que se presentan en la infancia y la niñez, respectivamente. Cualquiera de estos fenotipos se puede tratar según la presente descripción. Las manifestaciones clínicas primarias comunes a todas las formas de la enfermedad de Gaucher son hepatoesplenomegalia, citopenia, fracturas óseas patológicas y, en ocasiones, insuficiencia pulmonar. Una discusión detallada de la enfermedad de Gaucher puede encontrarse en las Bases metabólicas y moleculares en línea de enfermedades hereditarias, Parte 16, Capítulo 146 y 146.1 (2007). En los pacientes con enfermedad de Gaucher de tipo 2 y tipo 3 en los que existe una implicación significativa del sistema nervioso central, la administración intraventricular de la enzima de LSD defectuosa conduce a la mejora del estado metabólico del cerebro y potencialmente los órganos viscerales afectados (no SNC). La administración intraventricular de la enzima de LSD defectuosa en sujetos con enfermedad de Gaucher tipo 1 conduce a la mejora del estado metabólico de los órganos viscerales afectados (no SNC). Existen modelos animales de la enfermedad de Gaucher, que han derivado de los modelos de ratón creados por alteración dirigida del gen de ratón correspondiente. Por ejemplo, un modelo de ratón de Gaucher portador de la mutación D409V en el locus GC de ratón existe (Xu, YH et al. (2003). *Am. J. Pathol.* 163: 2093-2101). El ratón heterocigótico, *gbaD4Q9V/null* muestra ~ 5% de la actividad normal de GC en los tejidos viscerales y desarrolla macrófagos ingurgitados de lípidos (células de Gaucher) en el hígado, bazo, pulmón y médula ósea a los 4 meses de edad. Este modelo es un sistema adecuado para evaluar las ventajas y para determinar las condiciones para la administración intraventricular de la enzima de LSD defectuosa en sujetos con la enfermedad de Gaucher.
- 25 **[0042]** La enfermedad de Niemann-Pick (NPD) es una enfermedad de depósito lisosomal y es un trastorno neurometabólico hereditario caracterizado por una deficiencia genética en esfingomielinasa ácida (ASM; esfingomielina colinafosfohidrolasa, EC 3.1.3.12). La falta de la proteína ASM funcional da lugar a la acumulación de sustrato de esfingomielina dentro de los lisosomas de las neuronas y la glía de todo el cerebro. Esto conduce a la formación de un gran número de lisosomas distendidos en el pericarion, que son un rasgo distintivo y el fenotipo celular primario de NPD de tipo A. La presencia de lisosomas distendidos se correlaciona con la pérdida de la función celular normal y una evolución neurodegenerativa progresiva que conduce a la muerte de la persona afectada en la niñez (The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases, eds. Scriver et al., McGraw-Hill, Nueva York, 2001, pág. 3589-3610). Los fenotipos celulares secundarios (por ejemplo, anomalías metabólicas adicionales) también están asociadas con esta enfermedad, de forma destacada la acumulación a un alto nivel de colesterol en el compartimento lisosomal. La esfingomielina tiene una fuerte afinidad por el colesterol, lo que da lugar al secuestro de grandes cantidades de colesterol en los lisosomas de los ratones ASMKO y pacientes humanos (Leventhal et al (2001) *J. Biol. Chem.*, 276: 44976 a 44983; Slotte (1997) *Subcell. Biochem.*, 28: 277-293; y Viana et al. (1990) *J. Med. Genet.*, 27: 499-504.) Una discusión detallada de la enfermedad NPD se puede encontrar en las Bases metabólicas y moleculares en línea de las enfermedades hereditarias, Parte 16, Capítulo 144 (2007). Existen modelos animales de NPD. Por ejemplo, los ratones ASMKO son un modelo aceptado de la enfermedad de Niemann-Pick tipos A y B ((Horinouchi et al. 1995) *Nat. Genetics*, 10: 288-293; Jin et al. (2002) *J. Clin. Invest.*, 109: 1183-1191; y Otterbach (1995) *Cell*. 81: 1053-1061). La administración intraventricular de la enzima de LSD defectuosa conduce a un mejor estado metabólico del cerebro y de los órganos viscerales afectados (no SNC).
- 45 **[0043]** La mucopolisacaridosis (MPS) son un grupo de enfermedades de depósito lisosomal causados por deficiencias de enzimas que catalizan la degradación de glicosaminoglicanos (mucopolisacáridos). Existen 11 deficiencias enzimáticas conocidas que dan lugar a 7 MPS distintas, incluyendo MPS I (síndromes de Hurler, Schele y Hurler-Scheie) y MPS II (síndrome de Hunter). Cualquier MPS puede tratarse según la presente descripción. Una discusión detallada de MPS se puede encontrar en las Bases metabólicas y moleculares en línea de las enfermedades hereditarias, Parte 16, Capítulo 136 (2007). Existen numerosos modelos animales de MPS que se han derivado de las mutaciones naturales en los perros, gatos, ratas, ratones y cabras, así como modelos de ratón creados por alteración dirigida del gen de ratón correspondiente. Las características bioquímicas y metabólicas de estos modelos animales en general son bastante similares a los encontrados en los seres humanos; sin embargo, las manifestaciones clínicas pueden ser más leves. Por ejemplo, los modelos aceptados para MPS I incluyen un modelo murino [Clark, LA et al., *Hum. Mol. Genet.* (1997), 6: 503] y un modelo canino [Menon, KP et al, *Genomics* (1992), 14: 763]. Por ejemplo, los modelos aceptados para MPS II incluyen un modelo de ratón [Muenzer, J. et al., (2002), *Acta Paediatr. Suppl.*; 91 (439): 98-9]. En las MPS que tienen implicación del sistema nervioso central, tal como se encuentra en los pacientes con MPS I y MPS II, la administración intraventricular de la enzima de LSD defectuosa conduce a la mejora del estado metabólico del cerebro y potencialmente de los órganos viscerales afectados (no SNC).
- 65 **[0044]** La enfermedad de Pompe o enfermedad de depósito de glucógeno del tipo II (GSDII), también denominada deficiencia de maltasa ácida (AMD) es un trastorno hereditario del metabolismo del glucógeno como resultado de defectos en la actividad de la hidrolasa lisosomal alfa-glucosidasa ácida en todos los tejidos de las personas afectadas. La deficiencia de la enzima da lugar a la acumulación intralisosomal de glucógeno de estructura normal en numerosos tejidos. La acumulación es más destacada en el músculo cardíaco y esquelético y en tejidos

hepáticos de los bebés con el trastorno generalizado. En la GSDII de inicio tardío, la acumulación intralisosomal de glucógeno está prácticamente limitada a músculo esquelético y es de menor magnitud. Entre las anomalías electromiográficas sugestivas del diagnóstico se incluyen descargas pseudomiótónicas e irritabilidad, pero en los pacientes con aparición en edad infantil y adulta, las anomalías pueden variar en diferentes músculos. Las tomografías pueden revelar el sitio o sitios de los músculos afectados. Se puede encontrar que la mayoría de los pacientes tienen niveles elevados en plasma sanguíneo de la creatina quinasa (CK) y elevaciones de las enzimas hepáticas, especialmente en pacientes con aparición en edad adulta. Existen varios modelos animales naturales de la enfermedad con aparición en edad infantil y tardía. Existe un modelo de ratón knockout [Bijvoet AG et al., Hum. Mol. Genet. (1998); 7: 53-62]. Se han descrito en ratones knockout efectos de mejora de la terapia enzimática [Raben, N et al., Mol. Genet. Metab. (2003); 80: 159-69] y en un modelo de codorniz. La administración intraventricular de la enzima de LSD defectuosa conduce a un mejor estado metabólico del cerebro y potencialmente de los órganos viscerales afectados (no SNC).

[0045] La lipofuscinosis ceroides neuronales (NCL) son un grupo de trastornos neurodegenerativos que se distinguen de otras enfermedades neurodegenerativas por la acumulación de material autofluorescente ("pigmento de envejecimiento") en el cerebro y otros tejidos. Las principales características clínicas incluyen convulsiones, deterioro psicomotor, ceguera y muerte prematura. Se han reconocido distintos subgrupos de NCL que difieren en la edad de aparición de los síntomas y la apariencia del material de depósito mediante microscopía electrónica. Los tres grupos principales, infantil (INCL), infantil tardía clásica (LINCL) y juvenil (JNCL, también conocida como enfermedad de Batten), son causados por mutaciones recesivas autosómicas en los genes de CLN1, CLN2 y CLN3, respectivamente. Los productos proteicos de los genes CLN1 (palmitoil proteína tioesterasa) y CLN2 (tripeptidil peptidasa o pepinasa) son enzimas lisosómicas solubles, mientras que la proteína CLN3 (batenina) es una proteína de membrana lisosomal, como es (provisionalmente) la proteína CLN5. La identificación de mutaciones en genes que codifican proteínas lisosomales en varias formas de NCL ha llevado al reconocimiento de la lipofuscinosis como verdaderos trastornos de depósito lisosomal. Cualquier subgrupo de NCL puede tratarse según la presente descripción. Una discusión detallada de la enfermedad NCL se puede encontrar en las Bases metabólicas y moleculares en línea de enfermedades hereditarias, Parte 16, Capítulo 154 (2007). Se han descrito trastornos de NCL naturales en oveja, perro, y se han derivado modelos de ratón mediante alteración dirigida de un gen de ratón correspondiente [véase, por ejemplo, Katz, ML et al., J. Neurosci. Res. (1999); 57: 551-6; Cho, SK et al., Glycobiology (2005); 15: 637-48.] La administración intraventricular de la enzima de LSD defectuosa conduce a un mejor estado metabólico del cerebro y posiblemente de los órganos viscerales afectados (no SNC).

[0046] Una discusión detallada de trastornos de depósito lisosomal adicionales descritas en la Tabla 1, en el que la administración intraventricular de la enzima de LSD defectuosa en la enfermedad, se puede encontrar en las Bases metabólicas y moleculares en línea de enfermedades hereditarias, Parte 16 (2007).

[0047] Anteriormente se proporciona una descripción general de la presente memoria. Puede obtenerse una comprensión más completa por referencia a los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento para fines de ilustración solamente, y no pretenden limitar el alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Modelo animal

[0048] Los ratones ASMKO son un modelo aceptado de de la enfermedad de Niemann-Pick tipos A y B (Horinouchi et al. (1995) Nat. Genetics, 10: 288-293; Jin et al. (2002) J. Clin. Invest., 109: 1183-1191; y Otterbach (1995) Cell 81: 1053-1061). La enfermedad de Niemann-Pick (NPD) se clasifica como una enfermedad de depósito lisosomal y es un trastorno neurometabólico hereditario caracterizado por una deficiencia genética en esfingomielinasa ácida (ASM; esfingomielina colinafosfohidrolasa EC 3.1.3.12). La falta de proteína ASM funcional da lugar a la acumulación de sustrato de esfingomielina dentro de los lisosomas de las neuronas y la glía de todo el cerebro. Esto conduce a la formación de un gran número de lisosomas distendidos en el pericarion, que son un rasgo distintivo y el fenotipo celular primario de NPD de tipo A. La presencia de lisosomas distendidos se correlaciona con la pérdida de la función celular normal y una evolución neurodegenerativa progresiva que conduce a la muerte de la persona afectada en la niñez (The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases, eds. Scriver et al., McGraw-Hill, Nueva York, 2001, pág. 3589-3610). Los fenotipos celulares secundarios (por ejemplo, anomalías metabólicas adicionales) también están asociadas con esta enfermedad, de forma destacada la acumulación a un alto nivel de colesterol en el compartimento lisosomal. La esfingomielina tiene una fuerte afinidad por el colesterol, lo que da lugar al secuestro de grandes cantidades de colesterol en los lisosomas de los ratones ASMKO y pacientes humanos (Leventhal et al (2001) J. Biol. Chem., 276: 44976 a 44983; Slotte (1997) Subcell. Biochem, 28: 277-293; y Viana et al. (1990) J. Med. Genet., 27: 499-504.)

EJEMPLO 2

"Infusión intraventricular continua de rhASM en el ratón ASMKO"

[0049] Objetivo: Determinar qué efecto tiene la infusión intraventricular de ASM humana recombinante (rhASM) en la patología de depósito (es decir, el depósito de esfingomielina y colesterol) en el cerebro del ratón ASMKO.

5 **[0050]** Métodos: a los ratones ASMKO se les implantó estereotáxicamente una cánula guía permanente entre 12 y 13 semanas de edad. A las 14 semanas de edad los ratones se infundieron con 0.250 mg de HASM (n = 5) en un periodo de 24 h (~ 0,01 mg/h) durante cuatro días seguidos (se administró 1 mg en total) utilizando una sonda de infusión (se ajusta dentro de la cánula guía) que está conectada a una bomba. La hASM liofilizada se disolvió en líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) antes de la infusión. Los ratones se sacrificaron 3 días después de la infusión. En el sacrificio, a los ratones se les administró una sobredosis con eutasol (> 150 mg/kg) y posteriormente se perfundieron con PBS o paraformaldehído al 4%. Se extrajeron el cerebro, el hígado, el pulmón y el bazo y se analizaron los niveles de esfingomielina (SPM). El tejido cerebral se dividió en 5 secciones antes del análisis de SPM (S1 = parte frontal del cerebro, S5 = parte posterior del cerebro; véase la figura 1)

Tabla 2

15

Grupo	Tratamiento	n
ASMICO	0,250 mg/24 h (1 mg total)	5
ASMKO	Ninguno	4
WT	Ninguno	4

20

[0051] Resumen de resultados: la infusión intraventricular de hASM a 0,250 mg/24 h durante 4 días consecutivos (1 mg en total) dio lugar a tinción de hASM y depuración de filipina (es decir, el depósito de colesterol) en todo el cerebro de ASMKO. El análisis bioquímico mostró que la infusión intraventricular de hASM también condujo a una reducción global de los niveles de SPM en todo el cerebro. Los niveles de SPM se redujeron hasta los niveles de tipo salvaje (WT). También se observó una reducción significativa en SPM en el hígado y el bazo (se observó una tendencia a la baja en el pulmón).

25

EJEMPLO 3

“Administración intraventricular de hASM en ratones ASMKO II”

30

[0052] Objetivo: determinar la dosis eficaz más baja durante un periodo de infusión de 6 horas.

35

[0053] Métodos: a ratones ASMKO se les implantó estereotáxicamente una cánula guía permanente entre 12 y 13 semanas de edad. A las 14 semanas de edad los ratones se infundieron durante un periodo de 6 horas en una de las siguientes dosis de hASM: 10 mg/kg (0,250 mg; n = 12), 3 mg/kg (0,075 mg; n = 7), 1 mg/kg (0,025 mg; n = 7), 0,3 mg/kg (0,0075 mg; n = 7), o aCSF (líquido cefalorraquídeo artificial; n = 7). Dos ratones de cada nivel de dosis se perfundieron con paraformaldehído al 4% inmediatamente después de la 6 h de infusión para evaluar la distribución de la enzima en el cerebro (también se recogió sangre de éstos para determinar los niveles séricos de hASM). El resto de los ratones de cada grupo fueron sacrificados 1 semana después de la infusión. Se analizó el cerebro, el hígado y el tejido pulmonar de estos ratones por los niveles de SPM como en el estudio 05-0208.

40

Tabla 3

Grupo	Tratamiento	n
ASMKO	0,250 mg (10 mg/kg)	12
ASMKO	0,075 mg (3 mg/kg)	7
ASMKO	0,025 mg (1 mg/kg)	7
ASMKO	0,0075 mg (0,3 mg/kg)	7
ASMKO	aCSF	7
WT	Ninguno	7

45

[0054] Resumen de resultados: la hASM intraventricular durante un periodo de 6 horas condujo a una reducción significativa en los niveles de SPM en todo el cerebro independientemente de la dosis. Los niveles en el cerebro de SPM en los ratones tratados con dosis > 0,025 mg se redujeron a niveles de WT. Los niveles de SPM en órganos viscerales también se redujeron significativamente (pero no hasta los niveles de WT) de una manera dependiente de la dosis. Como soporte a este descubrimiento, también se detectó la proteína hASM en el suero de los ratones ASMKO infundidos con proteína hASM. El análisis histológico mostró que la proteína hASM se distribuía ampliamente por todo el cerebro (de S1 a S5) después de la administración intraventricular de hASM.

50

EJEMPLO 4

“Infusión intraventricular de rhASM en ratones ASMKO ratones III”

[0055] Objetivo: determinar (1) el tiempo que tarda la SPM en reacumularse dentro del cerebro (y la médula espinal) después de una infusión de 6 horas de hASM (dosis = 0,025 mg); (2) si existen diferencias entre sexos en respuesta a la administración de hASM intraventricular (experimentos permeables demuestran que existen diferencias entre sexos en la acumulación de sustrato en el hígado, se desconoce tanto si se produce o no en el cerebro).

5 [0056] Métodos: a ratones ASMKO se les implantó estereotáxicamente una cánula guía permanente entre 12 y 13 semanas de edad. A las 14 semanas de edad los ratones se infundieron durante un período de 6 horas con 0.025 mg de hASM. Después de la administración intraventricular de hASM, los ratones se sacrificaron ya sea 1 semana después de la infusión (n = 7 machos, 7 mujeres), o a las 2 semanas después de la infusión (n = 7 machos, 7 mujeres) o a las 3 semanas después de la infusión (n = 7 machos, 7 mujeres). En el sacrificio, se extrajeron el cerebro, la médula espinal, el hígado y el pulmón para el análisis de SPM.

Tabla 4

Grupo	Tratamiento	N	Sacrificio
ASMKO macho	0,025 mg	7	1 semana después de la infusión
ASMKO hembra	0,025 mg	7	1 semana después de la infusión
ASMKO macho	0,025 mg	7	2 semanas después de la infusión
ASMKO hembra	0,025 mg	7	2 semanas después de la infusión
ASMKO macho	0,025 mg	7	3 semanas después de la infusión
ASMKO hembra	0,025 mg	7	3 semanas después de la infusión
ASMKO macho	aCSF	7	1 semana después de la infusión
ASMKO hembra	aCSF	7	1 semana después de la infusión
WT macho	Ninguno	7	1 semana después de la infusión
WT hembra	Ninguno	7	1 semana después de la infusión

15 [0057] Las muestras de tejido se preparan para el análisis de SPM.

EJEMPLO 5

20 "Efecto de la infusión intraventricular de rhASM sobre la función cognitiva en ratones ASMKO"

[0058] Objetivo: determinar si la infusión intraventricular de rhASM alivia los déficits cognitivos inducidos por la enfermedad en ratones ASMKO

25 Métodos: a ratones ASMKO se les implantó estereotáxicamente una cánula guía permanente entre 9 y 10 semanas de edad. A las 13 semanas de edad los ratones se infundieron durante un período de 6 horas con 0.025 mg de hASM. A las 14 y 16 semanas de edad, los ratones realizaron pruebas cognitivas utilizando el laberinto de Barnes.

EJEMPLO 6

30 [0059] "Distribución de proteína hASM en el SNC de ASMKO después de la infusión intraventricular"

[0060] Objetivo: determinar la distribución de proteína hASM (en función del tiempo) en el cerebro y la médula espinal de ratones ASMKO después de la infusión intraventricular.

35 [0061] Métodos: a ratones ASMKO se les implantó estereotáxicamente una cánula guía permanente entre 12 y 13 semanas de edad. A las 14 semanas de edad los ratones se infundieron durante un período de 6 horas con 0.025 mg de hASM. Después del procedimiento de infusión, se sacrificaron los ratones inmediatamente o 1 semana o 2 semanas o 3 semanas más tarde.

40

Tabla 5: Indica los tiempos de infusión que se pueden utilizar con una enzima particular para el tratamiento de la enfermedad en la que es deficiente tal como se indica en la Tabla 1

Enzima para infusión	BOLO	TIEMPO DE INFUSIÓN												
		1-5 min	5-10 min	10-30 min	30-60 min	1-4 horas	más de 4 horas	más de 5 horas	más de 6 horas	más de 7 horas	más de 8 horas			
Aspartilglucosaminidasa alfa-galactosidasa A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
palmitoil protein tioesterasa	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
tripeptidil peptidasa	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
proteína transmembrana lisosomal	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
transportadora de cisteína	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
ceramidasa ácida	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
alfa-L-fucosidasa ácida	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
proteína protectora/catepsina A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Beta-glucosidasa ácida, o beta-galactosidasa ácida	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Iduronato-2-sulfatasa	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
alfa-L-iduronidosa	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Galactocerebrosidasa	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Alfa-manosidasa ácida	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Beta-manosidasa ácida	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Arilsulfatasa B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Arilsulfatasa A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
N-acetilgalactosamina-6-sulfato	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
beta-galactosidasa ácida	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
N-acetilglucosamina-1-esfingomielinasa ácida	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Referencias

[0062]

- 5 1) Belichenko PV, Dickson PI, Passage M, Jungles S, Mobley WC, Kakkis ED. Penetration, diffusion, and uptake of recombinant human alpha-1-iduronidase after intraventricular injection into the rat brain. *Mol Genet Metab.* 2005; 86(1-2):141-9.
- 10 2) Kakkis E, McEntee M, Vogler C, Le S, Levy B, Belichenko P, Mobley W, Dickson P, Hanson S, Passage M. Intrathecal enzyme replacement therapy reduces lysosomal storage in the brain and meninges of the canine model of MPS I. *Mol Genet Metab.* 2004; 83(1-2):163-74.
- 15 3) Bembi B, Ciana G, Zanatta M, et al. Cerebrospinal-fluid infusion of alglucerase in the treatment for acute neuronopathic Gaucher's disease. *Pediatr Res* 1995; 38:A425.
- 4) Lonser RR, Walbridge S, Murray GJ, Aizenberg MR, Vortmeyer AO, Aerts JM, Brady RO, Oldfield EH. Convection perfusion of glucocerebrosidase for neuronopathic Gaucher's disease. *Ann Neurol.* 2005 Apr;57(4):542-8.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0063]

<110> Dodge, James Passini, Marco Shihabuddin, Lamy Cheng, Seng

<120> ADMINISTRACIÓN INTRAVENTRICULAR DE ENZIMAS PARA ENFERMEDADES DE DEPÓSITO LISOSOMAL

<130> 003482.00036

<160> 1

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 629

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

40

45

50

55

60

65

	Met	Pro	Arg	Tyr	Gly	Ala	Ser	Leu	Arg	Gln	Ser	Cys	Pro	Arg	Ser	Gly
	1				5					10					15	
5	Arg	Glu	Gln	Gly	Gln	Asp	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala	Pro	Gly	Leu	Leu	Trp
				20					25					30		
	Met	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	Ser								
			35					40					45			
10	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Trp	Ala	Pro	Ala	Glu	Ala	His	Pro	Leu	Ser	Pro
		50					55					60				
	Gln	Gly	His	Pro	Ala	Arg	Leu	His	Arg	Ile	Val	Pro	Arg	Leu	Arg	Asp
	65				70						75					80
15	Val	Phe	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Thr	Cys	Pro	Ile	Cys	Lys	Gly	Leu	Phe
				85						90					95	
	Thr	Ala	Ile	Asn	Leu	Gly	Leu	Lys	Lys	Glu	Pro	Asn	Val	Ala	Arg	Val
				100						105				110		
20	Gly	Ser	Val	Ala	Ile	Lys	Leu	Cys	Asn	Leu	Leu	Lys	Ile	Ala	Pro	Pro
			115						120				125			
	Ala	Val	Cys	Gln	Ser	Ile	Val	His	Leu	Phe	Glu	Asp	Asp	Met	Val	Glu
			130				135					140				
25	Val	Trp	Arg	Arg	Ser	Val	Leu	Ser	Pro	Ser	Glu	Ala	Cys	Gly	Leu	Leu
	145					150					155					160
	Leu	Gly	Ser	Thr	Cys	Gly	His	Trp	Asp	Ile	Phe	Ser	Ser	Trp	Asn	Ile
				165						170					175	
	Ser	Leu	Pro	Thr	Val	Pro	Lys	Pro	Pro	Pro	Lys	Pro	Pro	Ser	Pro	Pro
				180						185				190		
30	Ala	Pro	Gly	Ala	Pro	Val	Ser	Arg	Ile	Leu	Phe	Leu	Thr	Asp	Leu	His
			195					200					205			
	Trp	Asp	His	Asp	Tyr	Leu	Glu	Gly	Thr	Asp	Pro	Asp	Cys	Ala	Asp	Pro
		210					215					220				
35	Leu	Cys	Cys	Arg	Arg	Gly	Ser	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Ser	Arg	Pro	Gly
	225					230					235					240
	Ala	Gly	Tyr	Trp	Gly	Glu	Tyr	Ser	Lys	Cys	Asp	Leu	Pro	Leu	Arg	Thr
				245						250					255	
40	Leu	Glu	Ser	Leu	Leu	Ser	Gly	Leu	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	Phe	Asp	Met
				260					265					270		

45

50

55

60

65

	Val	Tyr	Trp	Thr	Gly	Asp	Ile	Pro	Ala	His	Asp	Val	Trp	His	Gln	Thr
			275					280				285				
5	Arg	Gln	Asp	Gln	Leu	Arg	Ala	Leu	Thr	Thr	Val	Thr	Ala	Leu	Val	Arg
		290					295				300					
	Lys	Phe	Leu	Gly	Pro	Val	Pro	Val	Tyr	Pro	Ala	Val	Gly	Asn	His	Glu
	305					310					315					320
10	Ser	Thr	Pro	Val	Asn	Ser	Phe	Pro	Pro	Pro	Phe	Ile	Glu	Gly	Asn	His
					325					330					335	
	Ser	Ser	Arg	Trp	Leu	Tyr	Glu	Ala	Met	Ala	Lys	Ala	Trp	Glu	Pro	Trp
				340					345					350		
15	Leu	Pro	Ala	Glu	Ala	Leu	Arg	Thr	Leu	Arg	Ile	Gly	Gly	Phe	Tyr	Ala
			355					360					365			
	Leu	Ser	Pro	Tyr	Pro	Gly	Leu	Arg	Leu	Ile	Ser	Leu	Asn	Met	Asn	Phe
		370					375					380				
20	Cys	Ser	Arg	Glu	Asn	Phe	Trp	Leu	Leu	Ile	Asn	Ser	Thr	Asp	Pro	Ala
	385					390					395					400
	Gly	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Val	Gly	Glu	Leu	Gln	Ala	Ala	Glu	Asp	Arg
				405						410					415	
25	Gly	Asp	Lys	Val	His	Ile	Ile	Gly	His	Ile	Pro	Pro	Gly	His	Cys	Leu
				420					425					430		
	Lys	Ser	Trp	Ser	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Arg	Ile	Val	Ala	Arg	Tyr	Glu	Asn
			435				440						445			
30	Thr	Leu	Ala	Ala	Gln	Phe	Phe	Gly	His	Thr	His	Val	Asp	Glu	Phe	Glu
		450				455						460				
	Val	Phe	Tyr	Asp	Glu	Glu	Thr	Leu	Ser	Arg	Pro	Leu	Ala	Val	Ala	Phe
	465					470					475					480
	Leu	Ala	Pro	Ser	Ala	Thr	Thr	Tyr	Ile	Gly	Leu	Asn	Pro	Gly	Tyr	Arg
				485						490					495	
35	Val	Tyr	Gln	Ile	Asp	Gly	Asn	Tyr	Ser	Arg	Ser	Ser	His	Val	Val	Leu
				500					505					510		
	Asp	His	Glu	Thr	Tyr	Ile	Leu	Asn	Leu	Thr	Gln	Ala	Asn	Ile	Pro	Gly
			515					520					525			
40	Ala	Ile	Pro	His	Trp	Gln	Leu	Leu	Tyr	Arg	Ala	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly
						535						540				
	Leu	Pro	Asn	Thr	Leu	Pro	Thr	Ala	Trp	His	Asn	Leu	Val	Tyr	Arg	Met
	545					550					555					560
45	Arg	Gly	Asp	Met	Gln	Leu	Phe	Gln	Thr	Phe	Trp	Phe	Leu	Tyr	His	Lys
				565						570					575	
	Gly	His	Pro	Pro	Ser	Glu	Pro	Cys	Gly	Thr	Pro	Cys	Arg	Leu	Ala	Thr
				580					585					590		
50	Leu	Cys	Ala	Gln	Leu	Ser	Ala	Arg	Ala	Asp	Ser	Pro	Ala	Leu	Cys	Arg
			595					600					605			
	His	Leu	Met	Pro	Asp	Gly	Ser	Leu	Pro	Glu	Ala	Gln	Ser	Leu	Trp	Pro
		610					615						620			
55	Arg	Pro	Leu	Phe	Cys											
	625															

REIVINDICACIONES

- 5 1. Esfingomielinasa ácida para usar en la prevención o el tratamiento de la enfermedad de Niemann-Pick del tipo A o B en un paciente, en la que dicha prevención o tratamiento comprende la administración intraventricular de la esfingomielinasa ácida al cerebro del paciente y la administración de una dosis única de la esfingomielinasa ácida consume más de seis horas.
- 10 2. Esfingomielinasa ácida para usar, según la reivindicación 1, en la que la administración de una dosis única de la esfingomielinasa ácida consume más de siete horas o más de ocho horas.
3. Esfingomielinasa ácida para usar, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicha prevención o tratamiento comprende la administración de la esfingomielinasa ácida a los ventrículos laterales y/o al cuatro ventrículo del cerebro.
- 15 4. Esfingomielinasa ácida para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la cantidad de la esfingomielinasa ácida a administrar al paciente es suficiente para reducir los niveles de esfingomielina en el hígado, pulmones, bazo o riñones del paciente.
- 20 5. Esfingomielinasa ácida para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la prevención o tratamiento comprende monitorizar los niveles de esfingomielina en el paciente y administrar esfingomielinasa ácida adicional en respuesta a los niveles de esfingomielina determinados.
- 25 6. Esfingomielinasa ácida para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la esfingomielinasa ácida es una esfingomielinasa ácida humana.
- 30 7. Esfingomielinasa ácida para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la esfingomielinasa ácida comparte al menos un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos, al menos un 96% de identidad en la secuencia de aminoácidos, al menos un 97% de identidad en la secuencia de aminoácidos, al menos un 98% de identidad en la secuencia de aminoácidos, al menos un 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos o el 100% de identidad en la secuencia de aminoácidos con una esfingomielinasa ácida que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1.
- 35 8. Esfingomielinasa ácida para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la esfingomielinasa ácida se administra utilizando un catéter permanente.
9. Esfingomielinasa ácida para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la administración comprende un conjunto de infusiones.

Figura 1

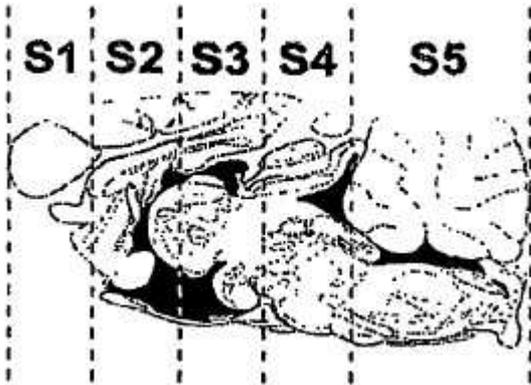


Figura 2

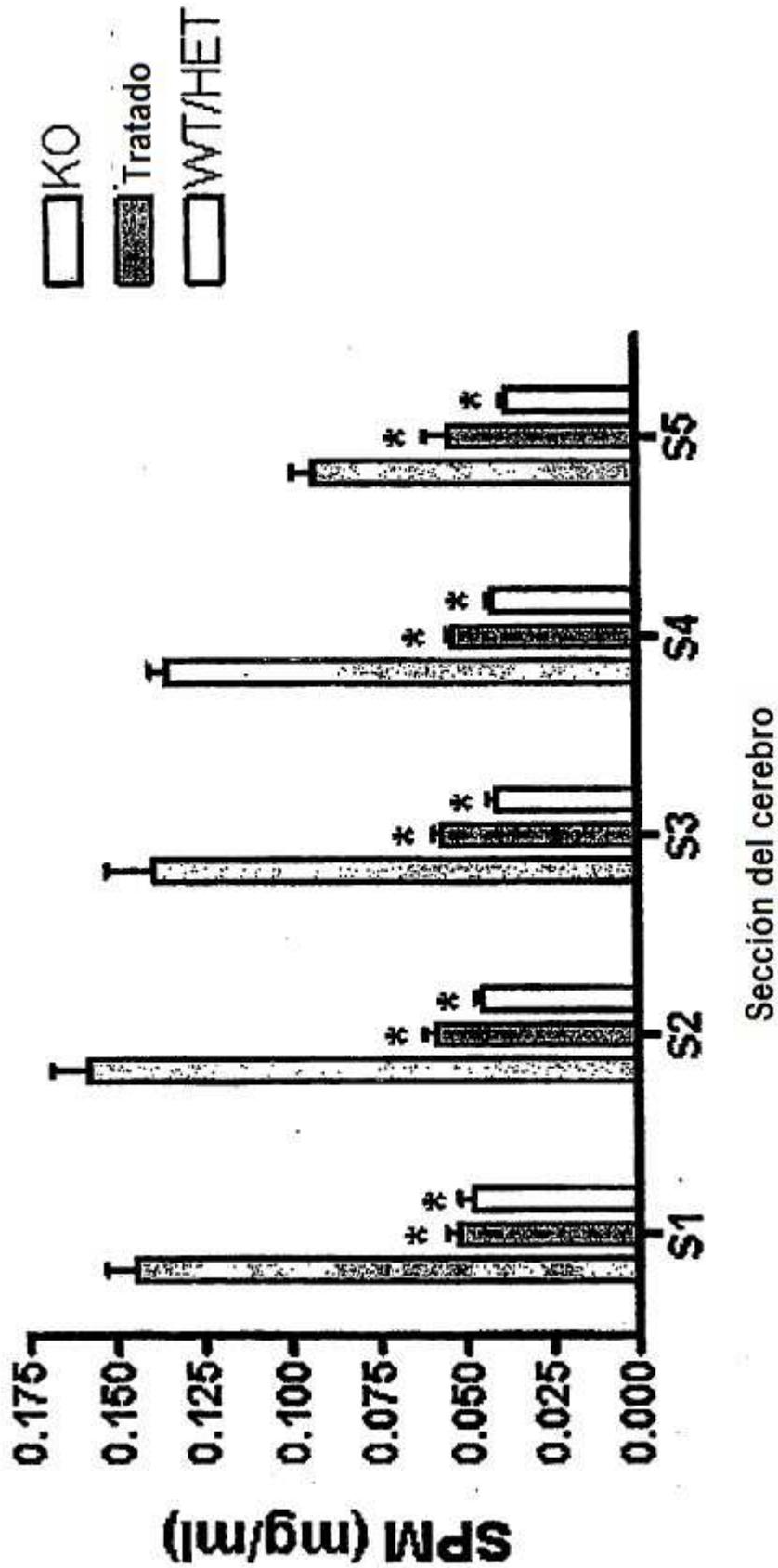


Figura 3

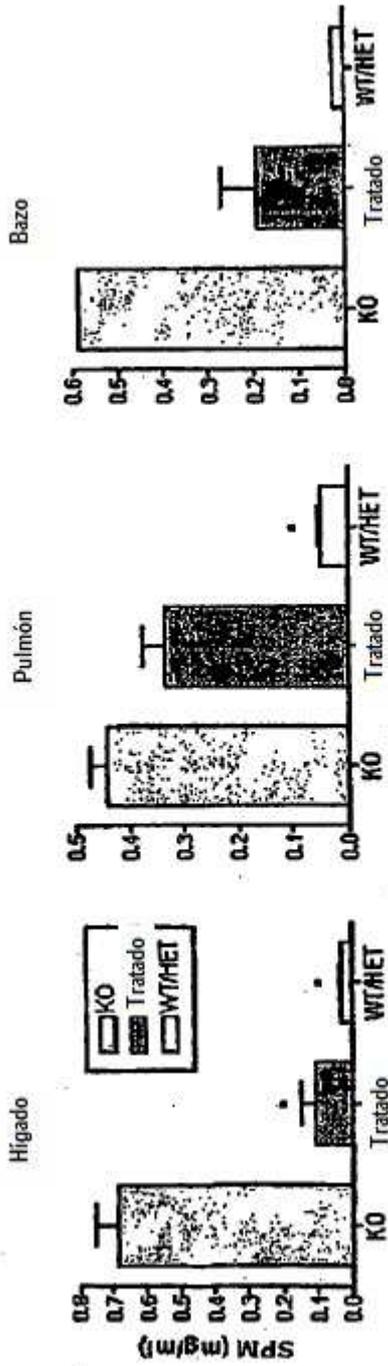


Figura 4

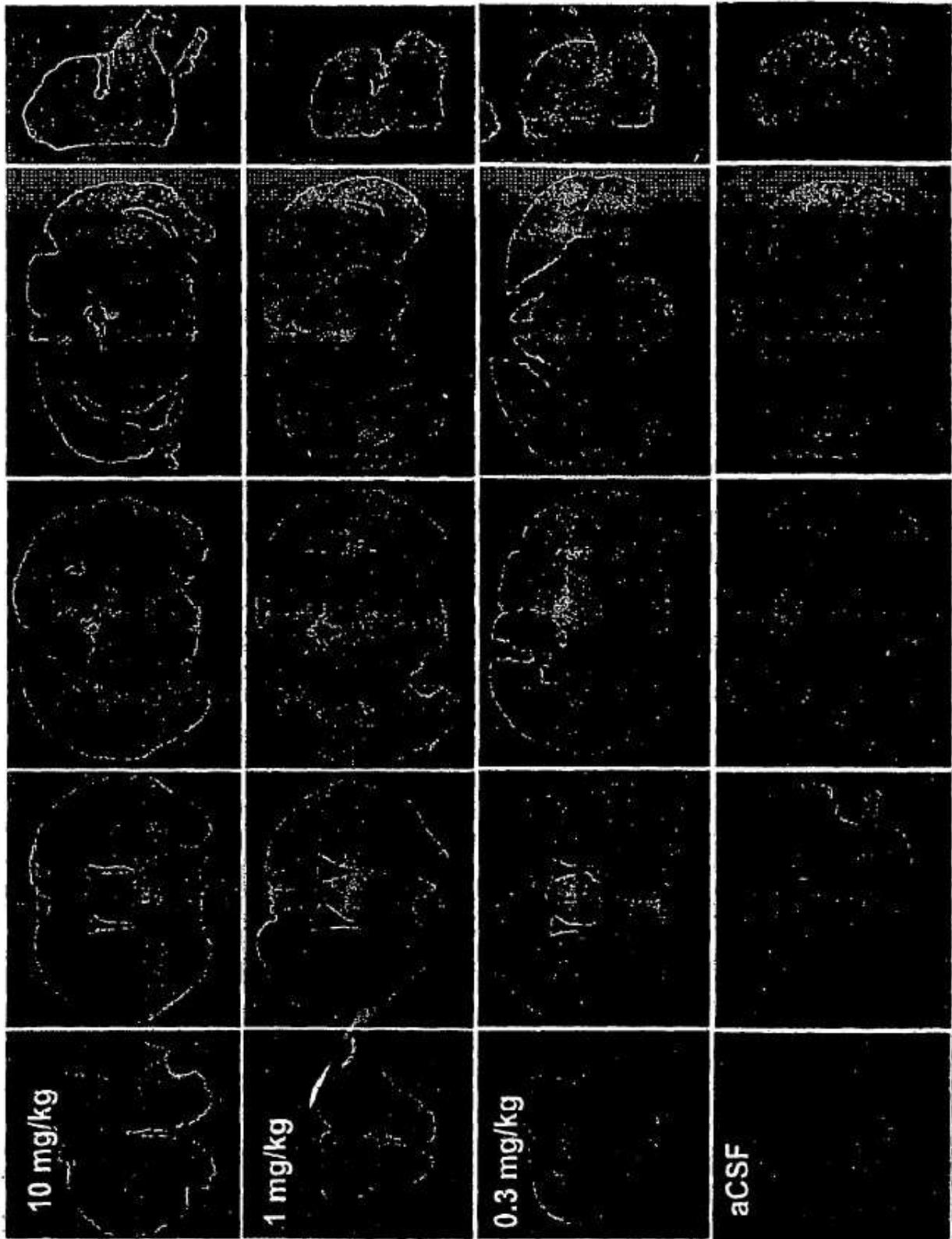


Figura 5

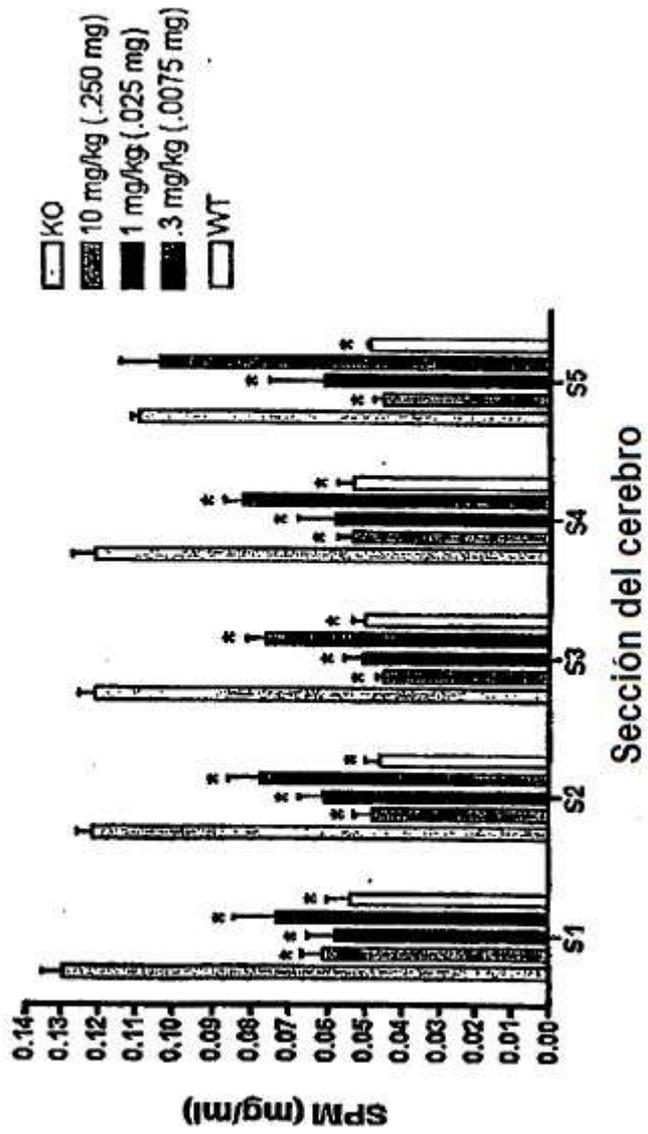


Figura 6

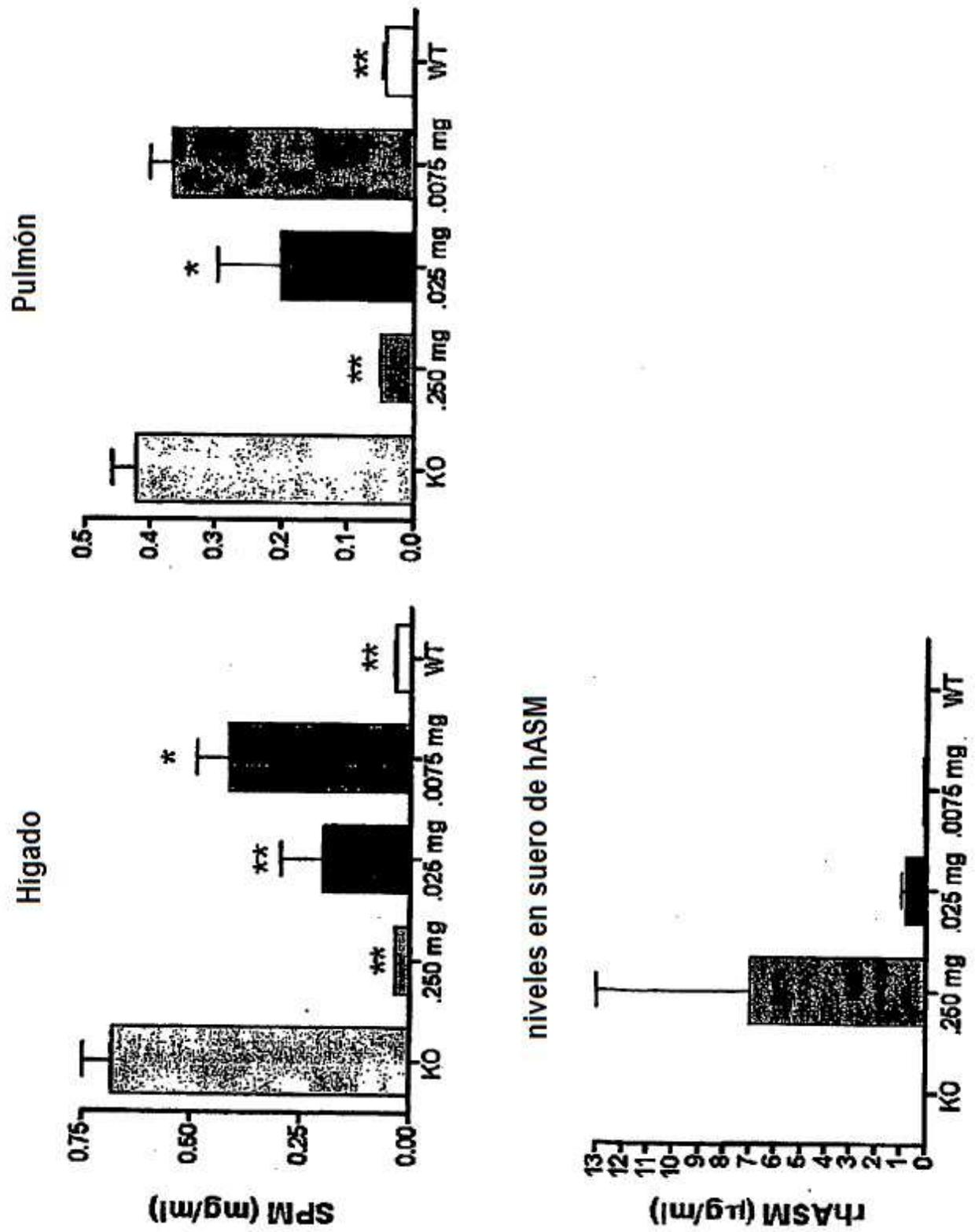


Figura 7

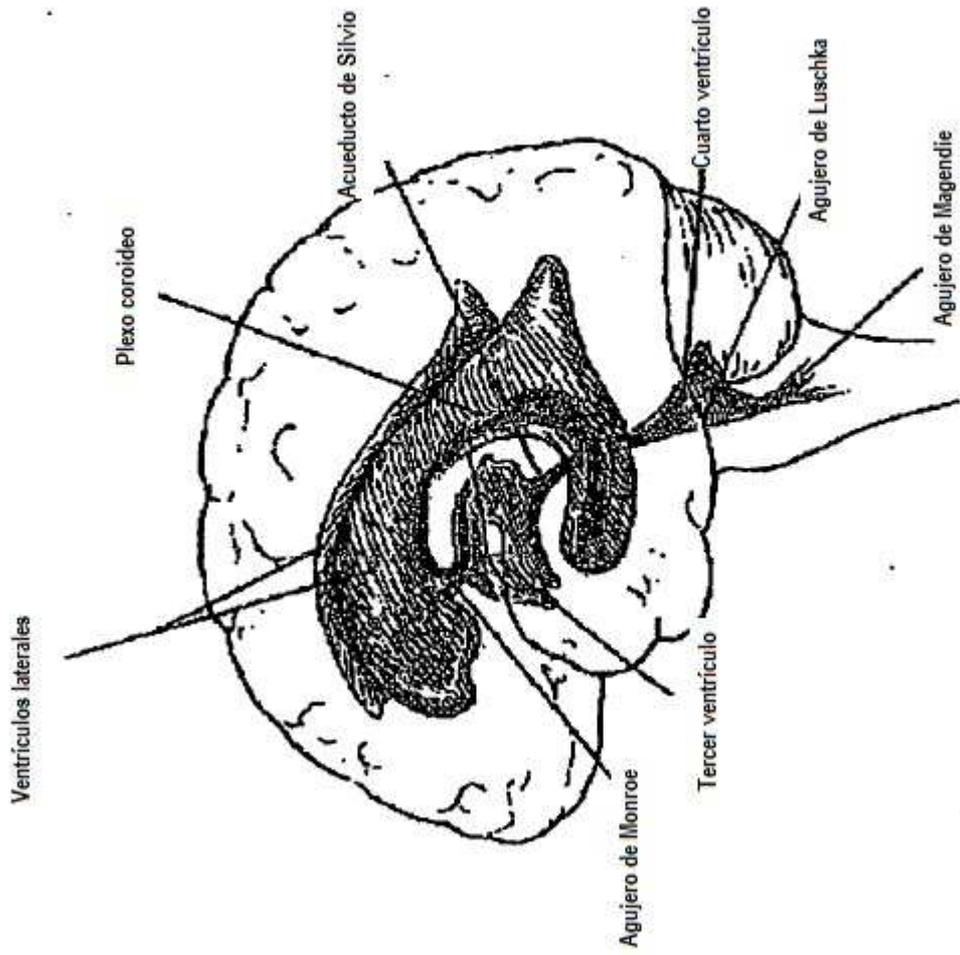
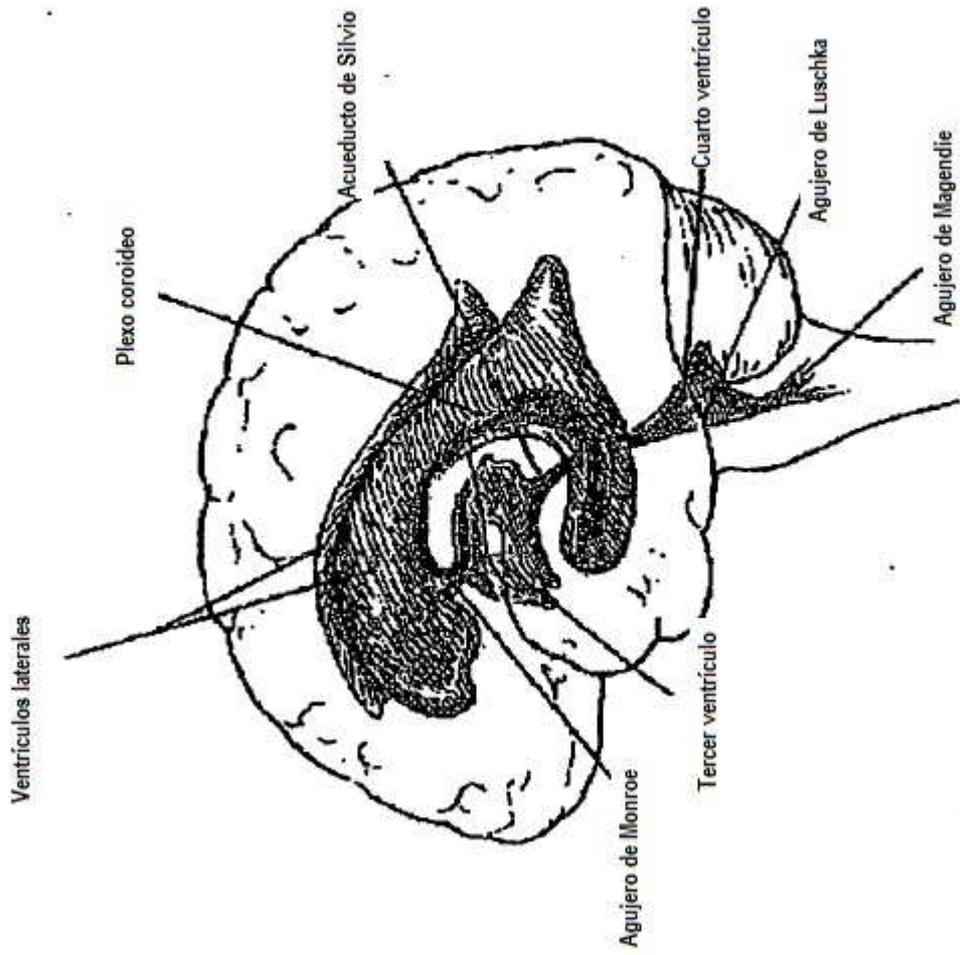
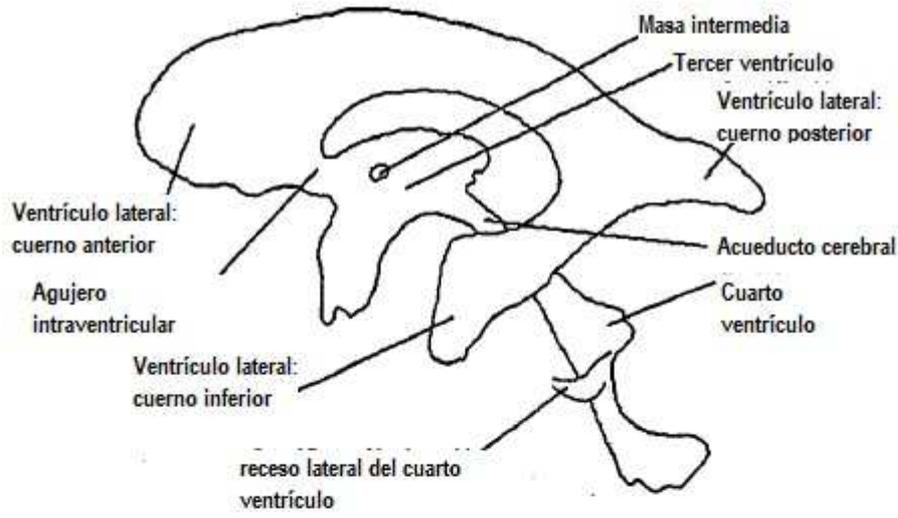


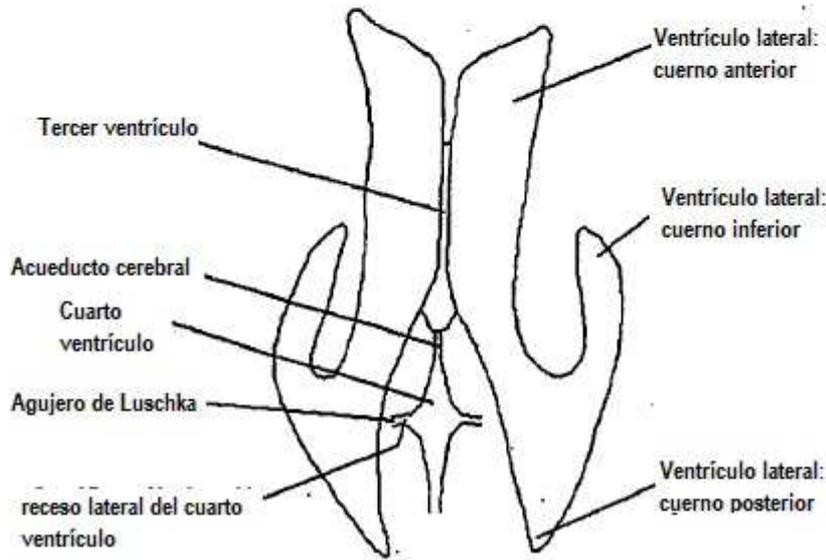
Figura 8



Figuras 9A y 9B



Ventrículos del cerebro: vista lateral



Ventrículos del cerebro: vista superior

Figura 10

