(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 643 015**

(51) Int. CI.:

A61K 38/47 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2011 PCT/US2011/041928**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2011 WO11163652**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2011 E 11799039 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2585105**

(54) Título: **Tratamiento del Síndrome de Sanfilippo Tipo B**

(30) Prioridad:

15.04.2011 US 201161476210 P
24.01.2011 US 201161435710 P
11.02.2011 US 201161442115 P
01.07.2010 US 360786 P
25.06.2010 US 358857 P
09.06.2011 US 201161495268 P
29.09.2010 US 387862 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2017

(73) Titular/es:

SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC. (100.0%)
300 Shire Way
Lexington MA 02421, US

(72) Inventor/es:

CONCINO, MICHAEL, F.;
CALIAS, PERICLES;
PAN, JING;
HOLMES, KEVIN;
MARTINI, PAOLO;
ROMASHKO, ALLA;
MEIYAPPAN, MUTHURAMAN;
ZHANG, BOHONG;
ISKENDERIAN, ANDREA;
LUNDBERG, DIANNA;
NORTON, ANGELA;
STRACK-LOGUE, BETTINA;
HUANG, YAN;
ALESSANDRINI, MARY y
PFEIFER, RICHARD

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

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).

Tratamiento del Síndrome de Sanfilippo Tipo B

Descripción

FONDO

[0001] La terapia de reemplazo enzimático (ERT) implica la administración sistémica de proteínas naturales o derivadas de manera recombinante y/o enzimas a un sujeto. Las terapias aprobadas se administran típicamente a sujetos por vía intravenosa y son generalmente eficaces en el tratamiento de los síntomas somáticos de la deficiencia enzimática subyacente. Como resultado de la distribución limitada de la proteína y/o enzima administrada intravenosamente en las células y tejidos del sistema nervioso central (SNC), el tratamiento de enfermedades que tienen una etiología del SNC ha sido especialmente desafiante debido a que las proteínas administradas intravenosamente y/o las enzimas no atraviesan adecuadamente la barrera hematoencefálica (BBB).

[0002] La barrera hematoencefálica (BBB) es un sistema estructural compuesto de células endoteliales que funciona para proteger el sistema nervioso central (SNC) a partir de sustancias perjudiciales en la corriente sanguínea, tales como bacterias, macromoléculas (por ejemplo, proteínas) y otras moléculas hidrofílicas, limitando la difusión de tales sustancias a través de la BBB y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y SNC subyacentes.

[0003] Hay varias formas de eludir la acreditación para mejorar la administración al cerebro de un agente terapéutico incluyendo la inyección directa intra-craneal, la permeabilización transitoria de la BBB, y la modificación del agente activo para alterar la distribución de tejidos. La inyección directa de un agente terapéutico en el tejido cerebral desvía completamente la vasculatura, pero sufre principalmente del riesgo de complicaciones (infección, daño tisular, respuesta inmune) incurridas por inyecciones intracraneales y mala difusión del agente activo desde el sitio de administración. Hasta la fecha, la administración directa de proteínas en la sustancia cerebral no ha conseguido un efecto terapéutico significativo debido a las barreras de difusión y al volumen limitado de fármacos terapéuticos que se pueden administrar. La difusión asistida por convección se ha estudiado mediante catéteres colocados en el parénquima cerebral utilizando infusiones lentas a largo plazo (Bobo et al., Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 91, 2076-2080 (1994), Nguyen et al J. Neurosurg., 98, 584-590 (2003)), pero actualmente no hay terapias aprobadas que utilicen este enfoque para el tratamiento a largo plazo. Además, la colocación de catéteres intracerebrales es muy invasiva y menos deseable como alternativa clínica.

[0004] La inyección intratecal (TI), o la administración de proteínas para el líquido cefalorraquídeo (LCR), también ha sido intentada pero todavía no ha dado el éxito terapéutico. Un reto importante en este tratamiento ha sido la tendencia del agente activo a unir el revestimiento ependimario del ventrículo muy fuertemente, lo que impidió la difusión posterior. Actualmente, no hay productos aprobados para el tratamiento de enfermedades genéticas cerebrales por administración directamente al LCR.

[0005] De hecho, muchos creyeron que la barrera a la difusión en la superficie del cerebro, así como la falta de métodos de entrega eficaces y convenientes, eran un obstáculo demasiado grande para lograr el efecto terapéutico adecuado en el cerebro para cualquier enfermedad.

[0006] El síndrome de Sanfilippo, o mucopolisacaridosis III (MPS III), es un trastorno genético raro caracterizado por la deficiencia de enzimas implicadas en la degradación de los glicosaminoglicanos (GAG). En ausencia de enzima, las moléculas GAG parcialmente degradadas no pueden eliminarse del cuerpo y acumularse en los lisosomas de diversos tejidos, lo que da lugar a una disfunción somática generalizada progresiva (Neufeld y Muenzer, 2001).

[0007] Cuatro formas distintas de MPS III, designado MPS IIIA, B, C, y D, se han identificado. Cada uno representa una deficiencia en una de las cuatro enzimas implicadas en la degradación del sulfato de heparano GAG. Todas las formas incluyen diferentes grados de los mismos síntomas clínicos, incluyendo rasgos faciales gruesos, hepatoesplenomegalia, nubosidad corneal y deformidades esqueléticas. Sin embargo, lo más notable es la pérdida grave y progresiva de la capacidad cognitiva, que está ligada no sólo a la acumulación de sulfato de heparano en las neuronas, sino también a la posterior elevación de los gangliósidos GM2, GM3 y GD2 causadas por la acumulación GAG primaria (Walkley 1998).

[0008] Mucopolisacaridosis tipo IIIB (MPS IIIB; enfermedad Sanfilippo B) es un trastorno autosómico recesivo que se caracteriza por una deficiencia de la enzima alfa-N-acetilo-glucosaminidasa (Naglu). En ausencia de esta enzima, sulfato de heparan GAG se acumula en lisosomas de neuronas y células gliales, con menor acumulación fuera del cerebro. Hasta la fecha, ningún síntoma del SNC resultante

de la enfermedad de Sanfilippo B ha sido tratado con éxito por cualquier medio disponible.

[0009] Por lo tanto, sigue habiendo una gran necesidad de suministrar eficazmente agentes terapéuticos al cerebro. Más particularmente, existe una gran necesidad de una administración más eficaz de agentes terapéuticos al sistema nervioso central para el tratamiento de la enfermedad de Sanfilippo B.

RESUMEN

[0010] La presente invención se define en las reivindicaciones. La presente invención proporciona composiciones para uso en el tratamiento eficaz de la enfermedad de Sanfilippo B. La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que la administración intratecal de una proteína alfa-N-acetilglucosaminidasa (Naglu) (una proteína de fusión Naglu-IGFII) a un modelo de enfermedad animal es inesperadamente eficaz en el tratamiento (por ejemplo, mejorando, inhibiendo, o retardando el inicio de) varios síntomas de la enfermedad de Sanfilippo B, incluyendo la acumulación masiva de GAG en diversos tejidos cerebrales.

[0011] Antes de la presente invención, se informó de que una proteína producida de forma recombinante Naglu carece de manosa-6-fosfato (M6P), que se requiere típicamente para la orientación lisosomal. Por lo tanto, la terapia de reemplazo de enzima para la enfermedad de Sanfilippo B presenta un desafío único debido a la manifestación predominante en el SNC y la falta de residuos de M6P. Tal como se describe a continuación, los presentes inventores han demostrado que las inyecciones intratecales de Naglu-IGFII han dado lugar a una reducción sorprendentemente eficaz de la acumulación de GAG en el cerebro, la inversión del almacenamiento lisosómico en el tejido cerebral y la penetración de Naglu-IGFII en el parénquima cerebral. Sin desear estar limitado por ninguna teoría en particular, se contempla que un resto de direccionamiento lisosomal que se une al receptor de manosa-6-fosfato independiente de catión (CI-MPR) tal como un resto de IGF-II puede superar la falta de M6P, resultando en M6P independiente de orientación lisosomal en los tejidos diana. Estos resultados indican que la administración TI de una proteína Naglu, tal como, una proteína de fusión Naglu-IGFII, puede unirse para tratar eficazmente la enfermedad de Sanfilippo B. Por lo tanto, la presente invención representa un avance significativo en la terapia de sustitución enzimática de Sanfilippo B.

[0012] Una proteína de fusión Naglu de acuerdo con la presente invención se suministra al SNC a través de vía intratecal a través de inyección directa en el LCR.

[0013] En concreto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende proteína recombinante alfa-N-acetilglucosaminidasa (Naglu) y un tampón que comprende fosfato de hasta 50 mM para uso en un método de tratamiento de enfermedad de síndrome de Sanfilippo de tipo B (San B) comprendiendo una etapa de administrar la proteína Naglu recombinante a una concentración de 10-150 mg/ml a un sujeto por vía intratecal mediante inyección en el canal espinal, en el que la proteína Naglu recombinante (i) es una proteína de fusión que comprende un dominio Naglu y un péptido que se une al receptor de manosa-6-fosfato independiente de catión (CI-MPR) de una manera independiente de manosa-6-fosfato o (ii) contiene oligosacáridos bis-fosforilados que tienen mayor afinidad de unión al CI-MPR.

[0014] En ciertas realizaciones, el dominio Naglu comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 70% (por ejemplo, al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 98%) idéntica a la SEQ ID NO: 1 (proteína Naglu humana madura). En algunas realizaciones, el dominio Naglu comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 1 (proteína Naglu humana madura). En algunas realizaciones, el dominio Naglu comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO: 1 (proteína Naglu humana madura).

[0015] En algunas realizaciones, el péptido que se une CI-MPR es un resto IGF-II. En ciertas realizaciones, el resto IGF-II comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 70% (por ejemplo, al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 98%) idéntica a IGF-II humana madura SEQ ID NO: 3). En ciertas realizaciones, el resto IGF-11 comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 80% idéntica a IGF-II humano maduro (SEQ ID NO: 3). En ciertas realizaciones, el resto IGF-II comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 90% idéntica a IGF-II humana madura (SEQ ID NO: 3). En algunas realizaciones, el resto IGF-II comprende una secuencia de aminoácidos que incluye los residuos 8-67 del IGF-II humano maduro (SEQ ID NO: 3).

[0016] En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende además un enlazador entre el dominio Naglu y el péptido que une CI-MPR. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende una o más secuencias de aminoácidos de GGGGGAAAAGGGG (SEQ ID NO: 4). En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de GGGGGAAAAGGGG (SEQ ID NO: 4) está presente en repeticiones en tándem.

[0017] En algunas realizaciones, el ligador comprende además una o más secuencias GAP. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de GAPGGGGGAAAAGGGGGGGGGGAAAAGGGGGAPGGGGGAGAAAGGGGGAP (SEQ ID NO: 5).

[0018] En algunas realizaciones, el péptido que une CI-MPR se fusiona directamente o mediante el engarce a C-terminal del dominio Naglu. En algunas realizaciones, el péptido que se une a CI-MPR se fusiona directamente o mediante el enlazador al extremo N del dominio Naglu.

[0019] En algunas realizaciones, la proteína recombinante se produce a partir de células humanas. En algunas realizaciones, la proteína recombinante se produce a partir de células CHO.

[0020] En algunas realizaciones, la administración intratecal resulta en la entrega de la proteína Naglu en uno o más tejidos cerebrales diana. En ciertas realizaciones, uno o más tejidos cerebrales objetivo se seleccionan del grupo consistente en tejidos de materia gris, materia blanca, áreas periventriculares, pia-aracnoides, meninges, neocórtex, cerebelo, tejidos profundos en corteza cerebral, capa molecular, caudado/región de putamen, mesencéfalo, regiones profundas de la protuberancia o médula, y combinaciones de los mismos.

[0021] En algunas realizaciones, la proteína Naglu se administra a las neuronas, células gliales, células perivasculares y/o células de las meninges. En algunas realizaciones, la proteína Naglu se administra además a las neuronas de la médula espinal.

[0022] En algunas realizaciones, la administración intratecal resulta aún más en la administración sistémica de la proteína Naglu en los tejidos diana periféricos. En ciertas realizaciones, los tejidos diana periféricos se seleccionan de hígado, riñón, bazo y/o corazón.

[0023] En algunas realizaciones, los resultados de la administración intratecal en la localización lisosomal en los tejidos del cerebro diana, neuronas de la médula espinal y/o tejidos diana periféricos.

[0024] En algunas realizaciones, la administración intratecal resulta en la reducción de almacenamiento lisosomal (por ejemplo, sustrato de enzima acumulada) en los tejidos diana del cerebro, las neuronas de la médula espinal y/o tejidos diana periféricos. En ciertas realizaciones, el almacenamiento lisosomal se determina mediante tinción con LAMP-1. En algunas realizaciones, el almacenamiento lisosómico se reduce en al menos 20%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90%, 1 vez, 1,5 veces o 2 veces en comparación con un control.

[0025] En algunas realizaciones, la administración intratecal resulta en vacuolización reducida en las neuronas. En ciertas realizaciones, las neuronas comprenden células de Purkinje.

[0026] En algunas realizaciones, los resultados de la administración intratecal en aumento de la actividad enzimática Naglu en los tejidos diana del cerebro, neuronas de la médula espinal y/o tejidos diana periféricos. En ciertas realizaciones, la actividad enzimática de Naglu se incrementa en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 veces en comparación con un control (por ejemplo, la actividad enzimática endógena de pretratamiento en el sujeto). En ciertas realizaciones, la actividad enzimática aumentada de Naglu es de al menos aproximadamente 10 nmol/h/mg, 20 nmol/h/mg, 40 nmol/h/mg, 50 nmol/h/mg, 60 nmol/h/mg, 70 nmol/h/mg, 80 nmol/h/mg, 90 nmol/h/mg, 100 nmol/h/mg, 150 nmol/h/mg, 200 nmol/h/mg, 250 nmol/h/mg, 350 nmol/h/mg, 400 nmol/h/mg, 450 nmol/h/mg, 500 nmol/h/mg, 550 nmol/h/mg o 600 nmol/h/mg. Como se usa en la presente memoria, nmol/h/mg define la actividad específica de la enzima, que mide el substrato nmol hidrolizado por hora por mg de enzima.

[0027] En algunas realizaciones, la actividad enzimática Naglu se incrementa en la región lumbar. En ciertas realizaciones, la actividad enzimática aumentada de Naglu en la región lumbar es de al menos aproximadamente 500 nmol/h/mg, 600 nmol/h/mg, 700 nmol/h/mg, 800 nmol/h/mg, 900 nmol/h/mg, 1000 nmol/h/mg, 2000 nmol/h/mg, 3000 nmol/h/mg, 4000 nmol/h/mg, 5000 nmol/h/mg, 6000 nmol/h/mg, 7000 nmol/h/mg, 8000 nmol/h/mg, 9000 nmol/h/mg, o 10.000 nmol/h/mg.

[0028] En algunas realizaciones, los resultados de la administración intratecal en la intensidad reducida, la gravedad o la frecuencia, o retraso en la aparición de al menos un síntoma o característica del síndrome de Sanfilippo B. En algunas realizaciones, al menos un síntoma o característica de la enfermedad de San B es pérdida auditiva, desarrollo del habla retardado, déficit de habilidades motoras, hiperactividad, retraso mental, agresividad y/o trastornos del sueño.

[0029] En algunas realizaciones, la administración intratecal se realiza una vez cada dos semanas. En algunas realizaciones, la administración intratecal tiene lugar una vez al mes. En algunas realizaciones, la administración intratecal tiene lugar una vez cada dos meses. En algunas realizaciones, la administración intratecal se usa junto con la administración intravenosa. En algunas realizaciones, la

administración intravenosa no es más frecuente que una vez por semana. En algunas realizaciones, la administración intravenosa no es más frecuente que una vez cada dos semanas. En algunas realizaciones, la administración intravenosa no es más frecuente que una vez al mes. En algunas realizaciones, la administración intravenosa no es más frecuente que una vez cada dos meses. En ciertas realizaciones, la administración intravenosa es más frecuente que la administración mensual, tal como dos veces por semana, semanalmente, cada dos semanas o dos veces al mes.

[0030] En algunas realizaciones, las administraciones intravenosas y intratecales se realizan en el mismo día. En algunas realizaciones, las administraciones intravenosa e intratecal no se realizan dentro de una cierta cantidad de tiempo entre sí, como no dentro de al menos 2 días, dentro de al menos 3 días, dentro de al menos 4 días, dentro de al menos 5 días, dentro de al menos 6 días, dentro de al menos 7 días, o dentro de al menos una semana. En algunas realizaciones, las administraciones intravenosa e intratecal se realizan en un programa alterno, tal como administraciones alternadas semanalmente, cada dos semanas, dos veces al mes o mensualmente. En algunas realizaciones, una administración intratecal reemplaza una administración intravenosa en un programa de administración, tal como en un esquema de administración intravenosa semanal, cada dos semanas, dos veces al mes, o mensualmente, cada tercera o cuarta o quinta administración en ese esquema puede ser reemplazada por una administración intratecal en lugar de una administración intravenosa.

[0031] En algunas realizaciones, las administraciones intravenosas y intratecales se realizan secuencialmente, llevando a cabo administraciones intravenosas primero (por ejemplo, cada semana, cada dos semanas, dos veces al mes, o dosificación mensual durante dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año o más), seguido de administración de TI (por semana, semanalmente, dos veces al mes o dos veces por mes por más de dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año o más). En algunas realizaciones, las administraciones intratecal se realizan primero (por ejemplo, semanalmente, cada dos semanas, dos veces al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses dosificando durante dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año o más) seguido de administración intravenosa (por ejemplo, semanalmente, cada dos semanas, dos veces al mes o dos veces por mes durante más de dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año o más).

[0032] En algunas realizaciones, la administración intratecal se usa en ausencia de administración intravenosa.

[0033] En algunas realizaciones, la administración intratecal se usa en ausencia de terapia de inmunosupresores concurrentes.

[0034] En algunas realizaciones, la proteína de fusión Naglu se administra a una concentración mayor que aproximadamente 20 mg/ml.

[0035] La presente memoria proporciona proteínas de fusión terapéuticas, incluyendo un dominio Naglu; un péptido que se une a CI-MPR, y en el que, una vez administrada, la proteína de fusión terapéutica se dirige a lisosomas y es terapéuticamente activa in vivo.

[0036] En algunas realizaciones, el dominio Naglu comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 70% (por ejemplo, al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 98%) idéntica a la SEQ ID NO: 1 (proteína Naglu humana madura). En algunas realizaciones, el dominio Naglu comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO: 1 (proteína Naglu humana madura). En algunas realizaciones, el péptido que se une a CI-MPR es un resto de IGF-II. En algunas realizaciones, el resto IGF-II comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 70% (por ejemplo, al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 98%) idéntica a IGF-II humano maduro (SEQ ID NO: 3). En algunas realizaciones, el resto IGF-II comprende una secuencia de aminoácidos que incluye los residuos 8-67 del IGF-II humano maduro (SEQ ID NO: 3).

[0037] En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende además un enlazador entre el dominio Naglu y el péptido que se une CI-MPR. En algunas realizaciones, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de GAPGGGGGAAAAGGGGGAPGGGGGAAAAGGGGGAPGGGGGAAAAGGGGGAP (SEQ ID NO: 5).

[0038] En algunas realizaciones, el péptido que se une CI-MPR se fusiona directamente o mediante el engarce a la C-terminal del dominio Naglu. En algunas realizaciones,

[0039] En aún otro aspecto, la presente invención proporciona proteínas de fusión terapéuticas incluyendo secuencia un aminoácido de al menos 70% (por ejemplo, al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 98%) idéntica a la SEQ ID NO: 6 (la proteína de fusión Naglu-IGF-II de longitud completa), en la que, una vez administrada, la proteína de fusión terapéutica se dirige a lisosomas y es

terapéuticamente activa in vivo.

[0040] Como se usa en esta solicitud, los términos "sobre" y "aproximadamente" se utilizan como equivalentes. Los números usados en esta solicitud con o sin sobre/aproximadamente están destinados a cubrir cualquier fluctuación normal apreciada por un experto en la técnica relevante.

[0041] Otras características, objetos, y ventajas de la presente invención son evidentes en la descripción detallada siguiente. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada, si bien indica realizaciones de la presente invención, se da sólo a modo de ilustración, sin limitación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0042] Los dibujos son para fines de ilustración solamente, y no para limitación.

La Figura 1 ilustra un rhNaglu, Naglu-IGFII, Naglu-TAT y Naglu Kif ejemplar, y el resultado del estudio de prueba de concepto (POC). (nº de aa/theori mw - número de aminoácidos y peso molecular teórico).

La Figura 2 ilustra un ejemplo de PerT-Naglu y Naglu-ApoE. Estas dos modificaciones de rhNaglu se produjeron para examinar la enzima transportadora a través de la BBB.

La Figura 3A ilustra una molécula de IGFII ejemplar que muestra las secuencias amino 8-67 (verde) como la secuencia de unión al receptor de IGF II (figura modificada de Hashimoto 1995, 20). La Figura 3B ilustra un receptor M6P/IGF II ejemplar y sus 15 dominios. Los dominios 3 y 9 (verde) unen manosa-6-fosfato, mientras que el dominio 5 se une al diéster de manosa-6-fosfato. El dominio 11 (amarillo) se une a IGFII (figura modificada de Bohnsack 2009, 22).

La Figura 4 ilustra la producción de onda ejemplar del clon Naglu-IGFII 47dz2-15. La producción media de Naglu-IGFII fue de 0,5 pcd (pictograma por millón de células por día). GH, cosecha de crecimiento; H1 a H8, cosecha 1 - 8.

La Figura 5 ilustra un ejemplo de análisis de transferencia Western de las cosechas procedentes de la producción de ondas en la Figura 2-5. Los carriles se normalizaron por el volumen de medio de cultivo.

La Figura 6 ilustra un ejemplo de análisis de transferencia Western de Naglu-IGFII antes y después de la desglicosilación con PNGasa F. La banda dispersada antes de la digestión con PNGasa F es la apariencia típica de proteínas lisosómicas cuando se glicosilan. Tras la digestión con PNGasa F, la banda proteica se volvió aguda y condensada, una apariencia consistente con la de una cadena polipeptídica uniforme. El análisis con Naglu anti-humano y anticuerpo anti-IGFII confirmó que sólo las moléculas intactas de Naglu-IGFII se expresaron mediante el clon 47dz2-15. "-", indica el material de cosecha antes de la administración de PNGaseF. "+", indica el material de la cosecha después de la digestión con PNGasa F.

La Figura 7 ilustra un esquema de purificación ejemplar de Naglu-IGFII y el gel de SDS-PAGE ilustra la purificación escalonada de Naglu-IGFII a partir de medios acondicionados

La Figura 8 ilustra cristales ejemplares de la proteína Naglu-Kif.

La Figura 9 ilustra una estructura cristalina ejemplar de Naglu representada como un modelo de dibujos animados. Tres dominios se indican como dominio I, dominio II y dominio III. Los glicanos se muestran como palos. Los residuos catalíticos son E316 y E446.

La Figura 10 ilustra una estructura trimérica ejemplar de Naglu. Los sitios activos de las tres moléculas están marcados.

La Figura 11 ilustra células fibroblásticas primarias ejemplares de humanos normales para el estudio de interiorización celular de rhNaglu y Naglu-IGFII. La captación celular de rhNaglu fue mínima, mientras que la captación celular de Naglu-IGFII fue muy pronunciada. La curva de saturante de la internalización de Naglu-IGFII indicó una captación mediada por el receptor. Esta absorción fue inhibida por IGFII, pero no por manosa-6-fosfato.

La Figura 12 representa un estudio microscópico confocal ejemplar utilizando células de fibroblastos de paciente Sanfilippo B (GM01426). Se observó una internalización extensa de Naglu-IGFII, y la co-localización de Naglu-IGFII con Lamp-1.

La Figura 13 ilustra la actividad ejemplar de Naglu en ratones de tipo salvaje (WT), Naglu -/- (KO) y

heterocigotos Naglu +/- (Het). La deficiencia total de Naglu en ratón Sanfilippo B se observó en el cerebro, hígado, riñón y bazo.

La Figura 14 representa una vista superior y lateral del cerebro del ratón para indicar el sitio de inyección de CI y el plano de corte para los análisis histológicos. Gráfico medio, una sección transversal del cerebro del ratón visto a una magnitud de 1x. El área en caja indica el campo para la imagen de microscopía 4x en el gráfico inferior. Gráfico inferior, imagen 4x de diapositiva de histología. El recuadro A indica el campo de la imagen de microscopía 40x en las Figuras 15 y 16.

La Figura 15 representa una inmunohistoquímica ejemplar de la corteza cerebral en ratones Sanfilippo B 7 días después de la inyección de CI 40x. Tanto rhNaglu como Naglu-IGFII mostraron extensa captación celular en las neuronas, así como en las células gliales, y la distribución y los patrones de absorción celular fueron muy similares entre las dos proteínas. (anticuerpo monoclonal Naglu anti-humano).

La Figura 16 representa una inmunotinción ejemplar de LAMP-1 de la corteza cerebral 40x. En comparación con el cerebro del ratón de tipo salvaje, el aumento del almacenamiento lisosómico fue obvio en el cerebro del ratón Sanfilippo B tratado con vehículo, como se demuestra por el aumento de las manchas positivas a la inmunotransferencia LAMP-1. El cerebro del ratón Sanfilippo B tratado con rhNalgu y Naglu-IGFII mostró una reducción del almacenamiento lisosómico que era muy similar al ratón de tipo salvaje.

La Figura 17A ilustra una reducción generalizada de la vacuolación celular en los tejidos de la sustancia blanca de ratones deficientes en Naglu administrados por TI Naglu en relación con los mismos ratones deficientes en Naglu que recibieron el vehículo. La Figura 17B ilustra una reducción marcada en la inmunoticción de la proteína de membrana 1 asociada a los lisosomas (LAMP1) en los tejidos de la sustancia blanca de ratones deficientes en Naglu administrados por vía intratecal Naglu en relación con los mismos ratones deficientes de Naglu a los que se les administró un vehículo.

La Figura 18 ilustra y compara cuantitativamente la concentración de LAMP medida en la corteza cerebral, el núcleo caudado y el putamen (CP), el tálamo (TH), el cerebelo (CBL) y la sustancia blanca (WM) de los ratones deficientes de Naglu a los que se administró Naglu tanto a los ratones de tipo salvaje como a los ratones deficientes en Naglu a los que se les administró un vehículo. Las áreas positivas a LAMP en cada área de tejido cerebral analizada se redujeron adicionalmente después de la administración intratecal de tres dosis de Naglu durante el transcurso de siete días (Figura 18A) con relación a dos dosis de Naglu durante el transcurso de dos semanas (Figura 18B).

La Figura 19 ilustra un ejemplo de diagrama anatómico medioespacial del SNC humano que se utiliza como referencia en esta figura, para demostrar el sitio de la inyección de TI en la rata canulada con tipo salvaje. La flecha azul indica la localización anatómica aproximada de la inyección de TI en la médula espinal y la flecha roja indica la región de la corteza cerebral donde se tomaron los tejidos para el estudio de la inmunohistoquímica.

La Figura 20 ilustra la actividad ejemplar de Naglu en el cerebro después de la inyección TI. La actividad de Naglu fue significativamente mayor en el cerebro de ratas de tipo salvaje inyectadas por Naglu-TAT y Naglu-IGFII.

La Figura 21 ilustra la inmunotinción ejemplar de Naglu de la corteza cerebral de la rata canulada con tipo salvaje tratada con NagTI-TAT, Naglu-IGFII, Naglu-kif y PerT-Naglu tratada 24 h después de la inyección TI 20x. Naglu-IGFII fue la única proteína que exhibió una amplia distribución en el parénquima del cerebro. La captación celular en neuronas y células gliales también fue evidente en rata tratada con Naglu-IGFII. Por otro lado, en los grupos tratados con rhNaglu, Naglu-TAT, Naglu kif y PerT-Naglu, la proteína sólo permaneció en las meninges (M).

La Figura 22 representa una ampliación ejemplar de alta potencia de las diapositivas seleccionadas de la Figura 21. El panel superior, en la rata canulada en tipo salvaje tratada con rhNaglu, rhNaglu permaneció en las meninges (M) solamente, no se encontró tinción positiva en el parénquima del cerebro. El panel inferior, en la rata canulada con tipo salvaje tratada con Naglu-IGFII, se observó una distribución extensa bien dentro del parénquima del cerebro, y se observó captación celular en neuronas y células gliales.

La Figura 23 ilustra la actividad ejemplar de Naglu en el cerebro y el hígado 24 horas después de la última inyección de TI. Entre los tres grupos tratados, la actividad de Naglu en el cerebro no mostró diferencias significativas, lo mismo es cierto para la actividad de Naglu en el hígado. Este resultado implicó que la actividad de Naglu detectada en el cerebro y el hígado se debió principalmente a la última inyección que ocurrió 24 horas antes del sacrificio. No está claro en este momento por qué

había una actividad de Naglu significativamente mayor en el hígado comparado a en el cerebro. Un estudio farmacocinético completo después de la inyección de TI puede ayudar a interpretar la diferencia.

La Figura 24 ilustra el nivel de GAG total ejemplar en el cerebro y el hígado después de la inyección TI de Naglu-IGFII. El GAG total en el cerebro de ratones Sanfilippo B tratados con vehículo exhibió aumentos progresivos, un reflejo del efecto acumulativo como el envejecimiento de los ratones Sanfilippo B. Se observó una reducción estadísticamente significativa de GAG en el cerebro en el grupo de inyección 3x ($p < 0,05$). También se observaron reducciones estadísticamente significativas de GAG en el hígado en grupos de inyección 2x y 3x ($p < 0,05$). El cambio más rápido y drástico del nivel de GAG en el hígado que en el cerebro es un fenómeno que se ha observado en otro modelo de ratón de enfermedad de almacenamiento lisosómico, como el síndrome del cazador (comunicaciones internas).

La Figura 25 representa la biodistribución ejemplar de Naglu en el cerebro de ratones Sanfilippo B después de la inyección TI. La tinción inmunofluorescente de Naglu reveló la proteína Naglu-IGFII sobre las meninges (M) y el parénquima del cerebro. Se observó captación celular en los grupos de inyección 2x y 3x. G: células gliales.

La Figura 26 ilustra una sección coronal ejemplar del cerebro de ratón. Las cajas indican dónde se tomaron las imágenes para la inmunotinción con LAMP-1. Para demostrar el alcance de la distribución y eficacia de la proteína, se seleccionaron la corteza cerebral y los tejidos subcorticales tales como el núcleo caudado, el tálamo y la sustancia blanca para la inmunotinción de LAMP1.

La Figura 27 representa una inmunotinción ejemplar de LAMP1 de la corteza cerebral 40x. En comparación con el cerebro del ratón de tipo salvaje, se observó un aumento del almacenamiento lisosómico en el cerebro del ratón Sanfilippo B tratado con vehículo, según se ve por el aumento de puntos positivos de inmunotinción LAMP1. La reducción del almacenamiento lisosómico después de la inyección de Naglu-IGFII TI fue evidente por el tamaño reducido de puntos positivos de 2x cerebro de ratón inyectado tratado con Sanfilippo B, y el tamaño reducido y el número de puntos positivos de 3x de cerebro de ratón inyectado tratado de Sanfilippo B.

La Figura 28 representa una inmunotinción ejemplar de LAMP-1 del núcleo caudado, un núcleo subcortical 40x. Al igual que lo que se observó en la corteza cerebral, se observó un aumento del almacenamiento lisosómico en el cerebro del ratón Sanfilippo B tratado con vehículo, según se observa por el aumento de las manchas positivas de inmunotinción LAMP1. La reducción del almacenamiento lisosómico después de la inyección de Naglu-IGFII TI fue evidente por el tamaño reducido de puntos positivos de 2x cerebro de ratón inyectado tratado con Sanfilippo B y el tamaño reducido y el número de puntos positivos de 3x cerebro de ratón inyectado tratado con Sanfilippo B.

La Figura 29 representa una inmunotinción ejemplar de LAMP-1 del tálamo, un núcleo diencefálico 40x. La reducción del almacenamiento lisosómico después de la inyección de Naglu-IGFII TI fue evidente por el tamaño reducido de puntos positivos de 2x cerebro de ratón inyectado tratado con Sanfilippo B, y el tamaño reducido y el número de puntos positivos de 3x cerebro de ratón inyectado tratado Sanfilippo B.

La Figura 30 representa una inmunotinción ejemplar de LAMP-1 de materia blanca 40x. La pista longitudinal de las fibras del axón de la neurona distingue la materia blanca de las materias grises presentadas en la Figura 26-29. No obstante, el mismo patrón de aumentos de almacenamiento lisosómico se pudo observar en el cerebro de ratón Sanfilippo B tratado con vehículo en comparación con el ratón de tipo salvaje. La reducción del almacenamiento lisosómico después de la inyección de Naglu-IGFII TI fue evidente por el tamaño reducido y el número reducido de puntos positivos 2x y 3x cerebro de ratón inyectado tratado Sanfilippo B.

La Figura 31 representa una inmunotinción ejemplar de LAMP-1 de la corteza cerebelosa. Se observó un efecto similar de la reducción del almacenamiento lisosómico en la corteza cerebelosa como en otras áreas del cerebro. La morfología de la corteza cerebelosa fue evidente por las neuronas granulares densamente pobladas, la capa molecular hipocelular y la capa única de neuronas de Purkinje entre las neuronas granulares y la capa molecular. Las neuronas de Purkinje fueron identificadas por el citoplasma grande y dendritas ocasionales que sobresalían en la capa molecular.

La Figura 32 ilustra la tinción ejemplar de Naglu en el cerebro, la médula espinal y el hígado. En el cerebro y la médula espinal, Naglu inyectado se detectó en las meninges (M) sólo por IHC y no se detectó tinción positiva Naglu en otras regiones. En el hígado, las células sinunoidales (S) fueron Naglu positivas y no se detectó la absorción de Naglu en los hepatocitos (H).

La Figura 33 ilustra la inmunotinción LAMP ejemplar y tinción H&E del hígado y la médula espinal. En comparación con los animales del vehículo, la tinción del LAMP se disminuyó a lo largo en ambos hígados y las médulas espinales tratadas con Naglu. La tinción H&E mostró que vacuolización celular en hepatocitos se redujo evidentemente en el grupo tratado en comparación con los animales tratados con vehículo.

Las Figuras 34A y B ilustran a modo de ejemplo la tinción de H&E del cerebro demostrando mejora en la morfología del cerebro después de 6 inyecciones TI cada dos semanas de perder Naglu durante 3 meses. En el cerebro tratado, la vacuolización celular (flechas) en todas las regiones examinadas se bajó en comparación con el grupo de vehículo.

Las Figuras 35A y B ilustran la inmunotinción LAMP ejemplar en diversas regiones del cerebro después de 6 inyecciones Naglu TI durante 3 meses. En comparación con el grupo tratado con vehículo, administración de Naglu TI a ratones Sanfilippo B resultaron en una reducción de la actividad lisosomal en todas las regiones examinadas reveladas por inmunotinción LAMP. Esta reducción se caracteriza por la disminución en el número de células positivas de LAMP, tamaño de célula más pequeña y tinción más ligera. Una reducción marcada se encontró en el cerebelo y el tronco cerebral, que se encuentra en la parte caudada del cerebro cerca de la médula espinal, en comparación con otras regiones del cerebro. Una reducción clara también se encontró en las regiones profundas del cerebro, incluyendo la sustancia blanca, el hipocampo y el tálamo.

Las Figuras 36A y B ilustran a modo de ejemplo Iba IHC en diversas regiones del cerebro después de 6 inyecciones TI Naglu durante 3 meses, que reveló la activación de las células microgliales. En comparación con el grupo tratado con vehículo, ninguna disminución en el número de células positivas y la intensidad de tinción se observó en el grupo tratado con Naglu. Sin embargo, la morfología celular de las células microgliales positivas cambiadas con tamaño de célula reducida en todas las regiones cerebrales examinadas en comparación con una grande y vacuolada en el grupo vehículo (inserciones).

Las Figuras 37A y B ilustran GFAP IHC ejemplar en diversas regiones del cerebro después de 6 inyecciones TI Naglu durante 3 meses, que reveló la activación de astrocitos. En comparación con el grupo tratado con vehículo, la tinción positiva de GFAP se redujo en el cerebelo y el tronco cerebral, y se disminuyó ligeramente en otras regiones examinadas.

La Figura 38 representa un dispositivo de administración de fármacos por vía intratecal ejemplar (IDDD).

La Figura 39 representa un sistema de acceso implantable intratecal de perfil bajo PORT-A-CATH® ejemplar.

La Figura 40 representa un dispositivo de administración de fármacos por vía intratecal ejemplar (IDDD).

La Figura 41 representa un dispositivo de administración de fármacos por vía intratecal ejemplar (IDDD), que permite la administración en el hogar para la terapia de reemplazo enzimático SNC (ERT).

La Figura 42 ilustra un diagrama de ejemplo de un dispositivo de administración de fármacos por vía intratecal (IDDD) con un mecanismo de fijación.

La Figura 43A representa ubicaciones ejemplares dentro del cuerpo de un paciente donde un IDDD puede ser colocado; la Figura 43B representa los diversos componentes de un dispositivo de administración de fármacos por vía intratecal (IDDD); y la Figura 43C representa una ubicación de inserción a modo de ejemplo dentro del cuerpo de un paciente para la inyección TI-lumbar.

DEFINICIONES

[0043] A fin de que la presente invención se entienda más fácilmente, ciertos términos se definen primero a continuación. Definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos se exponen en toda la memoria.

[0044] *Aproximadamente o sobre:* Como se usa aquí, el término "aproximadamente" o "sobre", tal como se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" o "sobre" se refiere a una gama de valores que caen dentro del 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12 %, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, o menos en cualquier dirección (mayor o menor que) del indicado valor de referencia indicado a menos que se declare de otro modo o sea de otro

modo evidente por el contexto (excepto cuando tal número excederá de 100% de un valor posible).

[0045] *Mejora:* Tal como se usa aquí, el término "mejora" significa la prevención, la reducción o la paliación de un estado, o la mejora del estado de un sujeto. Mejora incluye, pero no requiere la recuperación completa o prevención completa de un estado de enfermedad (por ejemplo, síndrome de Sanfilippo B). En algunas realizaciones, la mejora incluye el aumento de los niveles de proteína relevante o su actividad (por ejemplo, Naglu) que es deficiente en tejidos enfermos relevantes.

[0046] *Activo biológicamente*: Tal como se usa aquí, la frase "biológicamente activo" se refiere a una característica de cualquier agente que tiene actividad en un sistema biológico, y en particular en un organismo. Por ejemplo, un agente que, cuando se administra a un organismo, tiene un efecto biológico sobre ese organismo, se considera que es biológicamente activo. En realizaciones particulares, cuando una proteína o polipéptido es biológicamente activo, una parte de esa proteína o polipéptido que comparte al menos una actividad biológica de la proteína o polipéptido se refiere típicamente como una porción "biológicamente activa".

[0047] *Receptor independiente de cationes de manosa-6-fosfato (CI-MPR):* Tal como se usa aquí, el término "receptor independiente de cationes manosa-6-fosfato (CI-MPR)" se refiere a un receptor celular que se une a etiquetas de manosa-6-fosfato (M6P) sobre los precursores de hidrolasa de ácido en el aparato de Golgi que están destinados para el transporte al lisosoma. Además de manosa-6-fosfato, el CI-MPR también une otras proteínas incluyendo IGF-II. También se conoce el CI-MPR como "receptor M6P/IGF-II", "receptor CI-MPR/IGF-II", "receptor de IGF-II" o "receptor IGF2". Estos términos y abreviaturas de los mismos se utilizan indistintamente en este documento.

[0048] *Terapia inmunosupresora concurrente:* Tal como se usa aquí, el término "terapia inmunosupresora concurrente" incluye cualquier terapia inmunosupresora utilizada como pre-tratamiento, de preacondicionamiento o en paralelo a un método de tratamiento.

[0049] *Diluyente*: Tal como se usa aquí, el término "diluyente" se refiere a una sustancia de dilución útil farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, seguro y no tóxico para la administración a un ser humano) para la preparación de una formulación reconstituida. Diluyentes ejemplares incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución de pH tamponado (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

[0050] *Forma de dosificación:* Tal como se usa aquí, los términos "forma de dosificación" y "forma de dosificación unitaria" se refieren a una unidad físicamente discreta de una proteína terapéutica para el paciente a tratar. Cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado. Se entenderá, sin embargo, que la dosis total de la composición será decidida por el médico asistente dentro del alcance del juicio médico.

[0051] *Terapia de sustitución enzimática (ERT)*: Tal como se utiliza aquí, el término "terapia de reemplazo de enzimas (ERT)" se refiere a cualquier estrategia terapéutica que corrige una deficiencia de la enzima, proporcionando la enzima que falta. En algunas realizaciones, la enzima que falta es proporcionada por la administración intratecal. En algunas realizaciones, la enzima que falta se proporciona mediante la infusión en torrente sanguínea. Una vez administrada, la enzima es absorbida por las células y se transporta a los lisosomas, donde la enzima actúa para eliminar el material que se ha acumulado en los lisosomas debido a la deficiencia de la enzima. Típicamente, para que sea eficaz la terapia de reemplazo de la enzima lisosomal, la enzima terapéutica se suministra a los lisosomas en las células apropiadas en los tejidos diana, donde el defecto de almacenamiento es manifiesto.

[0052] *Mejorar, aumentar o reducir:* Tal como se usa en el presente documento, los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir", o equivalentes gramaticales, indican valores relativos a una medición de línea de base, tales como una medición en el mismo individuo antes de la iniciación del tratamiento descrito en el presente documento, o una medición en un individuo de control (o múltiples individuos de control) en la ausencia del tratamiento descrito en el presente documento. Un "individuo de control" es un individuo aquejado de la misma forma de la enfermedad de almacenamiento lisosomal (por ejemplo, síndrome de Sanfilippo B) como el individuo que está siendo tratado, que es de aproximadamente la misma edad que el individuo que se está tratando (para garantizar que sean comparables las etapas de la enfermedad en el individuo tratado y el individuo de control).

[0053] *Individuo, sujeto, paciente*: Tal como se usa en este documento, los términos "sujeto", "individuo" o "paciente" se refiere a un ser humano o un sujeto mamífero no humano. El individuo (también referido como "paciente" o "sujeto") que está siendo tratado es un individuo (feto, niño, adolescente o adulto humano) que sufre de una enfermedad, por ejemplo, síndrome de Sanfilippo B.

[0054] *Administración intratecal*: Tal como se usa aquí, el término "administración intratecal" o "inyección intratecal" se refiere a una inyección en el canal espinal (espacio intratecal alrededor de la médula espinal). Varias técnicas pueden ser usadas incluyendo, sin limitación, inyección

cerebroventricular lateral a través de un trepanado o punción cisternal o lumbar o similares. En algunas realizaciones, "administración intratecal" o "entrega intratecal", de acuerdo con la presente invención se refiere a la administración de TI o la entrega a través de la zona lumbar o la región, es decir, la administración de TI lumbar o entrega. Tal como se utiliza aquí, el término "región lumbar" o "zona lumbar" se refiere a la zona entre las vértebras tercera y cuarta lumbares (espalda baja) y, más inclusiva, la región L2-S1 de la columna vertebral.

[0055] *Enlazador:* Tal como se usa aquí, el término "enlazador" se refiere a, en una proteína de fusión, una secuencia de aminoácidos distinta de la que aparece en una posición particular en la proteína natural y generalmente se diseña para ser flexible o interponerse una estructura, tal como un a-hélice, entre dos restos de proteínas. Un enlazador también se conoce como un espaciador.

[0056] *Enzima lisosomal*: Tal como se usa aquí, el término "enzima lisosomal" se refiere a cualquier enzima que es capaz de reducir los materiales acumulados en los lisosomas de mamíferos o que pueden rescatar o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad de almacenamiento lisosomal. El término "enzima lisosomal" incluye tanto enzimas de tipo salvaje como lisosomales modificados. Las enzimas lisosomales pueden producirse usando métodos recombinantes y sintéticos o purificados a partir de fuentes de la naturaleza.

[0057] *Deficiencia de enzimas lisosomales*: Tal como se usa en este documento, "deficiencia de la enzima lisosomal" se refiere a un grupo de trastornos genéticos que resultan de la deficiencia en al menos una de las enzimas que se requieren para romper las macromoléculas (por ejemplo, substartes enzimáticos) hacia abajo a péptidos, aminoácidos, monosacáridos, ácidos nucleicos y ácidos grasos en los lisosomas. Como resultado, los individuos que sufren de deficiencias de enzimas lisosómicas han acumulado materiales en diversos tejidos (por ejemplo, SNC, hígado, bazo, intestino, paredes de los vasos sanguíneos y otros órganos).

[0058] *Enfermedad del almacenamiento lisosómico:* Tal como se usa aquí, el término "enfermedad de almacenamiento lisosomal" se refiere a cualquier enfermedad resultante de la deficiencia de una o más enzimas lisosomales necesarias para metabolizar macromoléculas naturales. Estas enfermedades típicamente resultan en la acumulación de moléculas no degradadas en los lisosomas, resultando en un mayor número de gránulos de almacenamiento (también denominados vesículas de almacenamiento). Estas enfermedades y diversos ejemplos se describen con más detalle a continuación.

[0059] *Polipéptido:* Como se usa en este documento, un "polipéptido", en general, es una cadena de al menos dos aminoácidos unidos entre sí por un enlace peptídico. En algunas realizaciones, un polipéptido puede incluir al menos 3-5 aminoácidos, cada uno de los cuales está unido a otros por medio de al menos un enlace peptídico. Aquellos de experiencia ordinaria en la técnica apreciarán que los polipéptidos a veces incluyen aminoácidos "no naturales" u otras entidades que, sin embargo son capaces de integrarse en una cadena de polipéptido, opcionalmente.

[0060] *Enzima de sustitución*: Según se usa aquí, el término "enzima de sustitución" se refiere a cualquier enzima que puede actuar para reemplazar al menos en parte la enzima deficiente o que falta en una enfermedad a tratar. En algunas realizaciones, el término "enzima de sustitución" se refiere a cualquier enzima que puede actuar para reemplazar al menos en parte la enzima lisosomal deficiente o que falta en una enfermedad de almacenamiento lisosomal que va a tratarse. En algunas realizaciones, una enzima de sustitución es capaz de reducir los materiales acumulados en los lisosomas de mamíferos o que pueden rescatar o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad de almacenamiento lisosomal. El término "enzima de sustitución" incluye tanto enzimas de tipo salvaje como lisosomales modificados. Enzimas de reemplazo pueden producirse usando métodos recombinantes y sintéticos o purificados a partir de fuentes de la naturaleza. Una enzima de sustitución puede ser una enzima recombinante, sintética, activada por genes, o natural.

[0061] *Soluble:* Como se usa aquí, el término "soluble" se refiere a la capacidad de un agente terapéutico para formar una solución homogénea. En algunas realizaciones, la solubilidad del agente terapéutico en la solución en la que se administra y por la que se transporta al sitio diana de la acción (por ejemplo, las células y tejidos del cerebro) es suficiente para permitir la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico al sitio diana de acción. Varios factores pueden afectar a la solubilidad de los agentes terapéuticos. Por ejemplo, los factores relevantes que pueden afectar la solubilidad de proteínas incluyen la fuerza iónica, secuencia de aminoácidos y la presencia de otros agentes co-solubilizantes o sales (por ejemplo, sales de calcio). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan de tal manera que las sales de calcio están excluidas de tales composiciones. En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos son solubles en su composición farmacéutica correspondiente. Se apreciará que, mientras que las soluciones isotónicas generalmente se prefieren para medicamentos administrados por vía parenteral, el uso de soluciones isotónicas puede limitar una solubilidad adecuada para algunos agentes terapéuticos y, en particular, algunas proteínas y/o enzimas. Soluciones ligeramente hipertónicas (por ejemplo, hasta 175 mM de cloruro de sodio en fosfato de sodio 5 mM a pH 7,0) y soluciones que contienen azúcar (por ejemplo,

hasta 2% de sacarosa en fosfato de sodio 5 mM a pH 7,0) se han demostrado ser bien toleradas en los monos. Por ejemplo, la composición de formulación de bolo SNC más común aprobada es solución salina (150 mM NaCl en agua).

[0062] *Estabilidad:* Como se usa aquí, el término "estable" se refiere a la capacidad del agente terapéutico (por ejemplo, una enzima recombinante) para mantener su eficacia terapéutica (por ejemplo, la totalidad o la mayor parte de su actividad biológica prevista y/o integridad físico-química) durante períodos prolongados de tiempo. La estabilidad de un agente terapéutico, y la capacidad de la composición farmacéutica para mantener la estabilidad de dicho agente terapéutico, se pueden evaluar durante largos períodos de tiempo (por ejemplo, durante al menos 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36 meses o más). En general, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se han formulado de tal manera que son capaces de estabilizar, o alternativamente retardar o prevenir la degradación, de uno o más agentes terapéuticos formulado con el mismo (por ejemplo, proteínas recombinantes). En el contexto de una formulación de una formulación estable es una en la que el agente terapéutico retiene en ella esencialmente su integridad física y/o química y la actividad biológica durante el almacenamiento y durante los procesos (tales como congelación/descongelación, mezcla mecánica y liofilización). La estabilidad de la proteína puede ser medida por la formación de agregados (HMW) de alto peso molecular, la pérdida de la actividad enzimática, la generación de fragmentos de péptidos y el desplazamiento de los perfiles de carga.

[0063] *Sujeto:* Como se usa aquí, el término "sujeto" se refiere a cualquier mamífero, incluyendo seres humanos. En ciertas realizaciones de la presente invención, el sujeto es un adulto, un adolescente o un bebé.

[0064] *Homología sustancial:* La frase "homología sustancial" se utiliza aquí para referirse a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos. Como se apreciará por los expertos ordinarios en la técnica, dos secuencias son generalmente consideradas para ser "sustancialmente homólogas" si contienen residuos homólogos en las posiciones correspondientes. Residuos homólogos pueden ser residuos idénticos. Alternativamente, los residuos homólogos pueden ser residuos no idénticos con características estructurales y/o funcionales apropiadamente similares. Por ejemplo, como es bien sabido por los expertos ordinarios en la técnica, ciertos aminoácidos se clasifican típicamente como aminoácidos "hidrófobo" o "hidrófilo" y/o como por tener cadenas laterales "polares" o "no polares". La sustitución de aminoácido por otro del mismo tipo a menudo se puede considerar una sustitución "homóloga".

[0065] Como es bien conocido en esta técnica, secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico pueden compararse utilizando cualquiera de una variedad de algoritmos, incluyendo los disponibles en programas de ordenador comerciales tales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, BLAST en hueco, y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Tales programas ejemplares se describen en Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215 (3): 403-410, 1990; Altschul, et al, Methods in Enzymology; Altschul, et al, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997; Baxevanis, et al, Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias homólogas, los programas mencionados anteriormente típicamente proporcionan una indicación del grado de homología. En algunas realizaciones, dos secuencias se consideran sustancialmente homólogas cuando al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de sus restos correspondientes son homólogas en un tramo correspondiente de residuos. En algunas realizaciones, el tramo pertinente es una secuencia completa. En algunas realizaciones, el tramo pertinente es al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más residuos.

[0066] *Identidad sustancial*: La frase "identidad sustancial" se utiliza aquí para referirse a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos. Como se apreciará por los expertos ordinarios en la técnica, dos secuencias son generalmente consideradas para ser "sustancialmente idénticas" si contienen residuos idénticos en posiciones correspondientes. Como es bien conocido en esta técnica, secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico pueden ser comparadas utilizando cualquiera de una variedad de algoritmos, incluyendo los disponibles en programas de ordenador comerciales tales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, BLAST con espacios, y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Los ejemplos de tales programas se describen en Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215 (3): 403-410, 1990; Altschul, et al, Methods in Enzymology. *;* Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997; Baxevanis et al, Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Además de la identificación de secuencias idénticas, los programas mencionados anteriormente típicamente proporcionan una indicación del grado de la identidad. En algunas

realizaciones, dos secuencias se consideran sustancialmente idénticas si al menos el 50%, 55% 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de sus correspondientes residuos son idénticos en un tramo correspondiente de residuos. En algunas realizaciones, el tramo pertinente es una secuencia completa. En algunas realizaciones, el tramo pertinente es al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más residuos.

[0067] *LCR sintético*: Como se usa aquí, el término "LCR sintético" se refiere a una solución que tiene pH, composición de electrolito, el contenido de glucosa y osmalaridad consistente con el líquido cefalorraquídeo. LCR sintético también se conoce como LCR artificial. En algunas realizaciones, LCR sintético es la solución B de Elliott.

[0068] *Adecuado para la administración de SNC:* Como se usa aquí, la frase "adecuado para la administración SNC" o "adecuado para la administración intratecal" que se refiere a las composiciones farmacéuticas descritas en este documento generalmente se refiere a la estabilidad, tolerabilidad y propiedades de solubilidad de tales composiciones, así como la capacidad de tales composiciones para suministrar una cantidad eficaz del agente terapéutico contenido en el mismo al sitio diana de entrega (por ejemplo, el LCR o el cerebro).

[0069] *Tejidos diana*: Como se usa aquí, el término "tejidos diana" se refiere a cualquier tejido que es afectado por la enfermedad de almacenamiento lisosomal a ser tratada o cualquier tejido en el que se expresa normalmente la enzima lisosomal deficiente. En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen aquellos tejidos en los que hay una cantidad detectable o anormalmente alta de sustrato de la enzima, por ejemplo almacenado en los lisosomas celulares del tejido, en pacientes que padecen o susceptibles a la enfermedad de almacenamiento lisosomal. En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen aquellos tejidos que muestran enfermedad asociada a patología, síntoma o característica. En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen aquellos tejidos en los que la enzima lisosomal deficiente se expresa normalmente en un nivel elevado. Como se usa en este documento, un tejido diana puede ser un tejido diana cerebral, un tejido diana de la médula espinal y/o un tejido periférico diana. Tejidos diana ejemplares se describen en detalle a continuación.

[0070] *Resto terapéutico:* Como se usa aquí, el término "resto terapéutico" se refiere a una porción de una molécula que produce el efecto terapéutico de la molécula. En algunas realizaciones, un resto terapéutico es un polipéptido que tiene actividad terapéutica. Por ejemplo, un resto terapéutico puede ser un polipéptido que puede sustituir a una proteína Naglu natural. En algunas realizaciones, un resto terapéutico puede ser un polipéptido que se puede rescatar a uno o más fenotipos asociados con la deficiencia de Naglu. En algunas realizaciones, un resto terapéutico puede tratar uno o más síntomas en un paciente el síndrome de Sanfilippo B.

[0071] *Cantidad terapéuticamente eficaz:* Como se usa aquí, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una proteína terapéutica (por ejemplo, Naglu) que confiere un efecto terapéutico sobre el sujeto tratado, a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible por alguna prueba o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación de o siente un efecto). En particular, la "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una proteína terapéutica o composición eficaz para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o condición deseada, o para mostrar un efecto terapéutico o preventivo detectable, tal como por mejorar síntomas asociados con la enfermedad, prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad, y/o también la disminución de la gravedad o frecuencia de los síntomas de la enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz se administra comúnmente en un régimen de dosificación que puede comprender múltiples dosis unitarias. Para cualquier proteína terapéutica particular, una cantidad terapéuticamente eficaz (y/o una unidad de dosis adecuada dentro de un régimen de dosificación eficaz) puede variar, por ejemplo, dependiendo de la ruta de administración, de combinación con otros agentes farmacéuticos. Además, la cantidad específica terapéuticamente eficaz (y/o dosis unitaria) para cualquier paciente particular puede depender de una variedad de factores incluyendo el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del agente farmacéutico específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, vía de administración, y/o la velocidad de excreción o metabolismo de la proteína de fusión específico empleado; la duración del tratamiento; y factores similares como es bien conocido en las técnicas médicas.

[0072] *Tolerable*: Como se usa en el presente documento, los términos "tolerable" y "tolerabilidad" se refieren a la capacidad de composiciones farmacéuticas para no provocar una reacción adversa en el sujeto al que se administra dicha composición, o alternativamente no para provocar una reacción adversa grave en el sujeto al que se administra dicha composición. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento son bien toleradas por el sujeto al que tales composiciones se administran.

[0073] *Tratamiento*: Como se utiliza aquí, el término "tratamiento" (también "tratar" o "tratamiento") se refiere a cualquier administración de una proteína terapéutica (por ejemplo, enzima lisosomal) que parcial o completamente alivia, mejora, inhibe, retrasa la aparición de, reduce la severidad de y/o reduce la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad particular, trastorno y/o estado (por ejemplo, síndrome de Sanfilippo B). Tal tratamiento puede ser de un sujeto que no presenta signos de la enfermedad pertinente, trastorno y/o afección y/o de un sujeto que exhibe sólo los signos tempranos de la enfermedad, trastorno, y/o condición. Alternativa o adicionalmente, dicho tratamiento puede ser de un sujeto que exhibe uno o más signos establecidos de la enfermedad pertinente, trastorno y/o afección.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0074] Entre otras cosas, la presente especificación proporciona métodos y composiciones de tratamiento por de síndrome Sanfilippo de tipo B (Sanfilippo B), por, por ejemplo, administración intratecal (TI) de una proteína Naglu. Una proteína Naglu adecuada puede ser una proteína recombinante de genes activados o natural. En algunas realizaciones de la invención, una proteína Naglu adecuada es una proteína Naglu recombinante que contiene oligosacáridos bis-fosforilados que tienen mayor afinidad de unión a la CI-MPR. En otras realizaciones de la invención, una proteína Naglu recombinante es una proteína de fusión que contiene un dominio Naglu y un péptido que se une CI-MPR de una manera manosa-6-fosfato-independiente. En algunas realizaciones, el péptido que se une CI-MPR es un resto IGF-II.

[0075] Se describen varios aspectos de la invención en detalle en las siguientes secciones. El uso de secciones no tiene la intención de limitar la invención. Cada sección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención. En esta aplicación, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario.

Proteínas de fusión terapéuticas

[0076] Según la presente invención, las proteínas de fusión terapéuticas adecuadas para el tratamiento de la enfermedad de Sanfilippo B puede incluir un dominio Naglu (también referido como un resto terapéutico) y un péptido que se une CI-MPR en un manosa-6-fosfato de manera independiente.

Dominio Naglu

[0077] Un dominio Naglu adecuado de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier molécula o una porción de una molécula que puede sustituir por la actividad de proteína Naglu de origen natural o de rescate uno o más fenotipos o síntomas asociados con deficiencia de Naglu. En algunas realizaciones, un resto terapéutico adecuado para la invención es un polipéptido que tiene un N-terminal y un C-terminal y una secuencia de aminoácidos sustancialmente similares o idénticos a madurar proteína de Naglu humano.

[0078] Típicamente, Naglu humano se produce como una molécula de precursor que se procesa a una forma madura. Este proceso se produce generalmente mediante la eliminación del péptido señal de 23 aminoácidos cuando la proteína entra en el retículo endoplásmico. Típicamente, la forma precursora también se conoce como precursor de longitud completa o proteína Naglu de longitud completa, que contiene 743 aminoácidos. Los N-terminales 23 aminoácidos se escinden cuando la proteína precursora entra en el retículo endoplasmático, lo que resulta en una forma madura. Por lo tanto, se contempla que los N-terminales 23 aminoácidos generalmente no se requieren para la actividad de la proteína Naglu. Las secuencias de aminoácidos de la forma madura (SEQ ID NO: 1) y precursor de longitud completa (SEQ ID NO: 2) de una proteína de Naglu humana de tipo salvaje típica o de origen natural se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Naglu humana

Forma madura	DEAREAAAVRALVARLLGPGPAADFSVSVERALAAKPGLDTYSLGGGGAARVRV RGSTGVAAAAGLHRYLRDFCGCHVAWSGSQLRLPRPLPAVPGELTEATPNRYRY YQNVCTQSYSFVWWDWARWEREIDWMALNGINLALAWSGQEAIWQRVYLALGLT QAEINEFFTGPAFLAWGRMGNLHTWDGPLPPSWHIKQLYLQHRVLDQMRSFGMT PVLPAFAGHVPEAVTRVFPQVNVTKMGSWGHFNCSYSCSFLLAPEDPIFPIIGS LFLRELIKEFGTDHIYGADTFNEMQPPSSEPSYLAAATTAVYEAMTAVDTEAVW LLQGWLFQHQPQFWGPAQIRAVLGAVPRGRLLVLDLFAESQPVYTRTASFQGQP FIWCMLHNFGGNHGLFGALEAVNGGPEAARLFPNSTMVGTGMAPEGISQNEVVY SLMAELGWRKDPVPDLAAWVTSFAARRYGVSHPDAGAAWRLLLRSVYNCSGEAC RGHNRSPLVRRPSLQMNTSIWYNRSDVFEAWRLLLTSAPSLATSPAFRYDLLDL TRQAVQELVSLYYEEARSAYLSKELASLLRAGGVLAYELLPALDEVLASDSRFL LGSWLEQARAAAVSEAEADFYEQNSRYQLTLWGPEGNILDYANKQLAGLVANYY TPRWRLFLEALVDSVAQGIPFQQHQFDKNVFQLEQAFVLSKQRYPSQPRGDTVD LAKKIFLKYYPRWVAGSW (SEQ ID NO:1)

Precursor de longitud completa	MEAVAVAAAVGVLLLAGAGGAAGDEAREAAAVRALVARLLGPGPAADFSV ALAAKPGLDTYSLGGGGAARVRVRGSTGVAAAAGLHRYLRDFCGCHVAWS RLPRPLPAVPGELTEATPNRYRYYQNVCTQSYSFVWWDWARWEREIDWMA NLALAWSGQEAIWQRVYLALGLTQAEINEFFTGPAFLAWGRMGNLHTWDG SWHIKQLYLQHRVLDQMRSFGMTPVLPAFAGHVPEAVTRVFPQVNVTKMG FNCSYSCSFLLAPEDPIFPIIGSLFLRELIKEFGTDHIYGADTFNEMQPP SYLAAATTAVYEAMTAVDTEAVWLLQGWLFQHQPQFWGPAQIRAVLGAVP LVLDLFAESQPVYTRTASFQGQPFIWCMLHNFGGNHGLFGALEAVNGGPE FPNSTMVGTGMAPEGISQNEVVYSLMAELGWRKDPVPDLAAWVTSFAARR HPDAGAAWRLLLRSVYNCSGEACRGHNRSPLVRRPSLQMNTSIWYNRSDV RLLLTSAPSLATSPAFRYDLLDLTRQAVQELVSLYYEEARSAYLSKELAS GGVLAYELLPALDEVLASDSRFLLGSWLEQARAAAVSEAEADFYEQNSRY WGPEGNILDYANKQLAGLVANYYTPRWRLFLEALVDSVAQGIPFQQHQFD QLEQAFVLSKQRYPSQPRGDTVDLAKKIFLKYYPRWVAGSW (SEQ ID NO:2)

[0079] Por lo tanto, en algunas realizaciones, un resto terapéutico adecuado para la presente invención es la proteína madura de Naglu humano (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, un resto terapéutico adecuado puede ser un homólogo o un análogo de la proteína madura de Naglu humana. Por ejemplo, un homólogo o un análogo de la proteína madura de Naglu humana puede ser una proteína madura de Naglu humana que contiene una o más sustituciones de aminoácidos, deleciones, e/o inserciones modificadas en comparación con proteínas de Naglu de tipo salvaje o de origen natural (por ejemplo, SEQ ID NO: 1), al tiempo que se conserva una actividad de proteína Naglu sustancial. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un resto terapéutico adecuado para la presente invención es sustancialmente homólogo a proteína madura de Naglu humano (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, un resto terapéutico adecuado para la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homóloga a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, un resto terapéutico adecuado para la presente invención es sustancialmente idéntico a proteína madura de Naglu humano (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, un resto terapéutico adecuado para la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, un resto terapéutico adecuado para la presente invención contiene un fragmento o una porción de la proteína madura de Naglu humana.

[0080] Alternativamente, un resto terapéutico adecuado para la presente invención es de longitud completa de proteína Naglu. En algunas realizaciones, un resto terapéutico adecuado puede ser un homólogo o un análogo de la proteína Naglu humana de longitud completa. Por ejemplo, un homólogo o un análogo de la proteína Naglu humana de longitud completa puede ser una proteína modificada de Naglu humana de longitud completa que contiene una o más sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones en comparación con proteína Naglu de tipo salvaje o de origen natural de longitud completa (por ejemplo, SEQ ID NO: 2), al tiempo que conserva una actividad sustancial de proteína Naglu. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un resto terapéutico adecuado para la presente invención es sustancialmente homóloga a la proteína Naglu humana de longitud completa (SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, un resto terapéutico adecuado para la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homóloga a la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, un resto terapéutico adecuado para la presente invención es sustancialmente idéntica a SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, un resto terapéutico adecuado para la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, un resto terapéutico adecuado para la presente invención contiene un fragmento o una porción de la proteína Naglu humana de longitud completa. Tal como se usa en el presente documento, una proteína Naglu de longitud completa contiene típicamente secuencia de péptido señal.

[0081] En algunas realizaciones, una proteína terapéutica incluye un resto de direccionamiento (por ejemplo, una secuencia diana de lisosomas) y/o un péptido que penetra la membrana. En algunas

realizaciones, una secuencia diana y/o un péptido que penetra la membrana es una parte intrínseca de la fracción terapéutica (por ejemplo, a través de un enlace químico, a través de una proteína de fusión). En algunas realizaciones, una secuencia diana contiene un resto manosa-6-fosfato. En algunas realizaciones, una secuencia diana que contiene un resto de IGF-I. En algunas realizaciones, una secuencia diana que contiene un resto de IGF-II.

Dominio diana lisosomal

[0082] En algunas realizaciones, un dominio terapéutico (es decir, un dominio Naglu) se modifica para facilitar focalización lisosómica. Por ejemplo, un dominio Naglu adecuado puede estar fusionado a un péptido que se une CI-MPR, que puede apuntar al dominio Naglu a los lisosomas de una manera manosa-6-fosfato-independiente.

[0083] En algunas realizaciones, un péptido que se une CI-MPR se deriva de factor de crecimiento humano de tipo insulina II (IGF-II). En algunas realizaciones, una etiqueta GILT es una IGF-II humana madura de tipo salvaje o de origen natural (SEQ ID NO: 3).

IGF-II humana madura (SEQ ID NO: 3)
AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPASRVSRRSRGIVEECCFR SCDLALLETYCATPAKSE

[0084] En algunas realizaciones, un péptido que se une CI-MPR es una IGF-II humana madura modificada que contiene sustituciones de aminoácidos, inserciones o deleciones. En algunas realizaciones, una etiqueta GILT tiene una secuencia de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de IGF-II humana madura (SEQ ID NO: 3). En algunas realizaciones, un péptido que se une CI-MPR es un fragmento de IGF-II humana madura. En realizaciones particulares, un péptido que se une CI-MPR contiene los aminoácidos 8-67 de IGF-II humana madura (SEQ ID NO: 3). En algunas realizaciones, un péptido que se une CI-MPR contiene una deleción N-terminal, C-terminal o interna. Por ejemplo, un péptido que se une CI-MPR contiene una deleción de aminoácidos en el extremo N-terminal (por ejemplo, ⊗ 2-7) de IGF-II humana madura (SEQ ID NO: 3). En algunas realizaciones, un péptido que se une CI-MPR es un péptido IGF-II humano modificado que ha disminuido afinidad de unión para otros receptores, tales como el receptor de IGF-I, en comparación con la IGF-II humana de origen natural.

[0085] Varios otros restos lisosómicos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, ciertos restos de focalización lisosomal basados en péptidos se describen en la Patente de Estados Unidos Nº 7.396.811, 7.560.424, y 7.629.309.; Publicación de Solicitud de Estados Unidos Nºs 2003-0082176, 2004-0006008, 2003-0072761, 20040005309, 2005-0281805, 2005-0244400, y las publicaciones internacionales WO 03/032913, WO 03/032727, WO 02/087510, WO 03/102583, WO 2005/078077, WO/2009/137721.

Enlazador o espaciador

[0086] Un péptido que se une CI-MPR puede fusionarse al extremo N-terminal o C-terminal de un polipéptido que codifica el dominio Naglu. El péptido que se une CI-MPR puede fusionarse directamente al polipéptido de enzima lisosómica o se puede separar del polipéptido de enzima lisosómica mediante un enlazador o un espaciador. Un enlazador de aminoácido o separador está generalmente diseñado para ser flexible o interponer una estructura, tal como una hélice alfa, entre los dos restos de proteínas. Un enlazador o espaciador puede ser relativamente corto, tal como la secuencia GGGGGAAAAGGGG (SEQ ID NO: 4), GAP, GGGGGP (SEQ ID NO: 7), o puede ser más largo, tal como, por ejemplo, 10-50 (por ejemplo, 10-20, 10-25, 10-30, 10-35, 10-40, 10-45, 10-50) aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, diferentes secuencias de engarce corto pueden estar presentes en repeticiones en tándem. Por ejemplo, un ligador adecuado puede contener la secuencia de aminoácidos de GGGGGAAAAGGGG (SEQ ID NO: 4) presentes en repeticiones en tándem. En algunas realizaciones, tales como enlazador puede contener además una o más secuencias GAP, que enmarca la secuencia de GGGGGAAAAGGGG (SEQ ID NO: 4). Por ejemplo, un ligador adecuado puede contener secuencia de aminoácidos de GAPGGGGGAAAAGGGGGAPGGGGGAAAAGGGGGAPGGGGGAAAAGGGGGAP (SEQ ID NO: 5).

[0087] En algunas realizaciones, un enlazador o espaciador adecuado puede contener una secuencia al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 5.

[0088] En algunas realizaciones, una proteína Naglu recombinante adecuada para la presente invención puede contener residuos de M6P. En algunas realizaciones, una proteína Naglu recombinante adecuada para la presente invención puede contener oligosacáridos a-bis-fosforilados que tienen mayor afinidad de unión a CI-MPR. En algunas realizaciones, una enzima adecuada contiene hasta aproximadamente un promedio de alrededor de al menos 20% de oligosacáridos bis-

fosforilados por la enzima. En otras realizaciones, una enzima adecuada puede contener aproximadamente 10%, 15%, 18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% de oligosacáridos bis-fosforilados por enzima. Mientras que tales oligosacáridos bis-fosforilados pueden ser naturalmente presentes en la enzima, hay que señalar que las enzimas pueden ser modificadas para poseer tales oligosacáridos. Por ejemplo, las enzimas de reemplazo adecuadas pueden ser modificadas por ciertas enzimas que son capaces de catalizar la transferencia de N-acetilglucosamina-L-fosfato a partir de UDP-GlcNAc a la posición 6' de manosas 〈−1,2-enlazadadas sobre las enzimas lisosomales. Métodos y composiciones para producir y utilizar tales enzimas son descritas por, por ejemplo, Canfield et al. en la patente de los Estados Unidos. No. 6.537.785, y la patente de los Estados Unidos. No. 6.534.300.

[0089] En algunas realizaciones, una proteína Naglu recombinante adecuada para la presente invención esta subglicosilada. Como se usa en este documento, "subglicosilado" se refiere a una proteína o enzima en la que se ha omitido una o más estructuras de hidratos de carbono (por ejemplo, residuos de M6P) que normalmente estarían presentes en una enzima Naglu de origen natural, que se ha eliminado, modificado o enmascarado. Enzimas lisosomales subglicosiladas pueden ser producidas en un huésped (por ejemplo, bacterias o levaduras) que no glicosilan proteínas como células de mamífero convencionales (por ejemplo, ovario de hámster chino (CHO)). Por ejemplo, proteínas producidas por la célula huésped pueden carecer de manosa terminal, fucosa, y/o residuos de N-acetilglucosamina, que son reconocidas por el receptor de manosa, o pueden ser completamente no glicosiladas. En algunas realizaciones, las enzimas lisosomales subglicosiladas pueden ser producidas en células de mamífero o en otros huéspedes, pero tratadas químicamente o enzimáticamente para eliminar uno o más restos de hidratos de carbono (por ejemplo, uno o más residuos de M6P) o para modificar o enmascarar uno o más residuos de carbohidratos. Tales enzimas tratadas químicamente o enzimáticamente también se denominan enzimas lisosómicas como desglicosiladas. En algunas realizaciones, uno o más sitios de glicosilación potenciales se eliminan por mutación del ácido nucleico que codifica una enzima lisosómica, reduciendo de ese modo la glicosilación de la enzima cuando se sintetizan en una célula de mamífero u otra célula que glicosila las proteínas. En algunas realizaciones, las enzimas lisosomales se pueden producir usando un péptido de señal secretora (por ejemplo, un péptido señal de IGF-II) de tal manera que los niveles de glicosilación de las enzimas se reducen y/o se modifican. Ejemplos de enzimas lisosomales subglicosiladas o desglicosiladas se describen en la Patente de Estados Unidos Nº 7.629.309 y la Publicación de Estados Unidos Nos 20090041741 y 20040248262.

Producción de proteínas

[0090] Las proteínas terapéuticas adecuadas para la presente invención se pueden producir en cualquier célula de mamífero o tipos de células susceptibles de cultivo celular, y a la expresión de polipéptidos, tales como, por ejemplo, de riñón embrionario humano (HEK) 293, células de ovario de hámster chino (CHO), de riñón de mono (COS), HT1080, C10, HeLa, riñón de cría de hámster (BHK), 3T3, C127, CV-1, HaK, O y L-929 células/NS. Ejemplos específicos no limitativos incluyen, pero no se limitan a línea de mieloma de ratón BALB/c (NSO/1, ECACC Nº: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6 (Crucell, Leiden, Países Bajos)); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al, J. Gen Virol, 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino +/- DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc Natl Acad Sci EE.UU., 77: 4216 (1980)); células de ratón sertoli (TM4, Mather, Biol Reprod., 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); Células TRI (Mather et al, Annals NY Acad Sci, 383: 44-68 (1982)); Células MRC 5; Células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). En algunas realizaciones, las enzimas se producen en células CHO. En algunas realizaciones, las enzimas se producen en células derivadas de CHO tales como líneas celulares deficientes por acidificación endosomal (por ejemplo, grupo de complementación END3 derivado de CHO-K1).

[0091] Las enzimas también se pueden expresar en una variedad de células huésped no mamíferas tales como, por ejemplo, insectos (por ejemplo, Sf-9, Sf-21, Hi5), plantas (por ejemplo, *leguminosa,* cereales, o tabaco), levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae, P. pastoris)*, procariotas (por ejemplo, *E. Coli, B. subtilis* y otros *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp), o hongos.

[0092] En otras realizaciones, los mamíferos no humanos transgénicos se han demostrado para producir enzimas lisosómicas en su leche. Tales mamíferos no humanos transgénicos pueden incluir ratones, conejos, cabras, ovejas, porcinos orbovinos. Véase la patente de los Estados Unidos Nos 6.118.045 y 7.351.410.

Administración intratecal

[0093] Según la presente invención, una proteína terapéutica, es decir, una enzima de reemplazo, que contiene un dominio Naglu se administra al SNC. Diversas técnicas y rutas se pueden utilizar para la administración del SNC incluyendo, pero no limitándose a administraciones intraparenquimatosas, intracerebrales, intraventriculares cerebrales (ICV), intratecales (por ejemplo, TI-Lumbar, TI-cisterna magna) y cualesquiera otras técnicas y rutas para inyección directa o indirectamente con el sistema nervioso central y/o LCR.

[0094] De acuerdo con la invención, la enzima de sustitución se administra en el SNC mediante la administración en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de un sujeto en necesidad de tratamiento. La administración intratecal se utiliza para la administración de enzima de repuesto en el LCR. Tal como se utiliza aquí, la administración intratecal (también denominada inyección intratecal) se refiere a una inyección en el canal espinal (espacio intratecal alrededor de la médula espinal). Varias técnicas pueden ser usadas incluyendo, sin limitación, inyección cerebroventricular lateral a través de un trépano o punción cisternal o lumbar o similares. Los métodos ejemplares se describen en Lazorthes et al. Los avances en los sistemas de administración de fármacos y aplicaciones en neurocirugía, 143-192 y Omaya y otros, Cancer Drug Delivery, 1: 169-179.

[0095] Según la presente invención, una enzima se puede inyectar en cualquier región que rodea el canal espinal. En algunas realizaciones, una enzima se inyecta en la zona lumbar o la cisterna magna o intraventricular en un espacio de ventrículo cerebral. Tal como se utiliza aquí, el término "región lumbar" o "zona lumbar" se refiere a la zona entre el vértebras lumbares tercera y cuarta (espalda baja) y, más inclusivamente, la región L2-S1 de la columna vertebral. Típicamente, la inyección intratecal a través de la región lumbar o área de madera también se conoce como "entrega de TI lumbar" o "administración de TI lumbar." El término "cisterna magna" se refiere al espacio alrededor y por debajo del cerebelo a través de la abertura entre el cráneo y la parte superior de la columna vertebral. Típicamente, la inyección intratecal a través de cisterna magna es también conocida como "administración cisterna magna." El término "ventrículo cerebral" se refiere a las cavidades en el cerebro que son continuas con el canal central de la médula espinal. Típicamente, inyecciones a través de las cavidades de ventrículo cerebral se denominan administración cerebral intravetricular (ICV).

[0096] En algunas realizaciones, "administración intratecal" o "administración intratecal", de acuerdo con la presente invención se refiere a administración lumbar de TI o administración, por ejemplo, entre las vértebras lumbares tercera y cuarta (espalda baja) y, más inclusivamente, la región L2-S1 de la columna vertebral. Se contempla que la administración lumbar TI o entrega distingue frente a la administración cisterna magna en que la administración lumbar TI o entrega de acuerdo con nuestra invención proporciona la administración mejor y más eficaz para el canal espinal distal, mientras que la administración cisterna magna, entre otras cosas, por lo general no se administra bien en el canal espinal distal.

Formulaciones estables para la administración de TI

[0097] En algunas realizaciones, las enzimas deseadas se administran en formulaciones estables para la administración intratecal. Ciertas realizaciones de la invención se basan, al menos en parte, en el descubrimiento de que varias formulaciones descritas en este documento facilitan la administración y distribución eficaz de uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, enzimas) para tejidos diana, células y/u orgánulos del SNC. Entre otras cosas, las formulaciones descritas en este documento son capaces de solubilizar altas concentraciones de agentes terapéuticos (por ejemplo, proteínas o enzimas) y son adecuadas para la administración de tales agentes terapéuticos al SNC de los sujetos para el tratamiento de enfermedades que tienen un componente de SNC y/o etiología. Las composiciones descritas en la presente memoria se caracterizan además por una mejor estabilidad y tolerabilidad mejoradas cuando se administran al SNC de un sujeto (por ejemplo, por vía intratecal) en necesidad de las mismas.

[0098] Antes de la presente invención, la solución salina isotónica sin búfer tradicional y la solución B de Elliott, que es LCR artificial, se utilizaron típicamente para la administración intratecal. Una comparación que representa las composiciones de LCR con respecto a la solución B de Elliott se incluye en la Tabla 2 a continuación. Como se muestra en la Tabla 2, la concentración de la solución B de Elliot estrechamente paralela a la de la LCR. Solución B de Elliott, sin embargo contiene una concentración de tampón muy baja y en consecuencia no puede proporcionar la capacidad adecuada de tamponamiento necesaria para estabilizar agentes terapéuticos (por ejemplo, proteínas), especialmente durante períodos prolongados de tiempo (por ejemplo, durante condiciones de almacenamiento). Además, la solución B de Elliott contiene ciertas sales que pueden ser incompatibles con las formulaciones destinadas a administración de algunos agentes terapéuticos, y en proteínas o enzimas particulares. Por ejemplo, las sales de calcio presentes en la solución B de Elliott son capaces de mediar la precipitación de proteínas y reducir de este modo la estabilidad de la formulación.

Tabla 2

Solución	Na^+ mEq/L	K^+ mEq/L	Ca^{++} mEq/L	Mg^{++} mEq/L	$HCO3^-$ mEq/L	Cl^- mEq/L	pH	Fósforo mg/L	Glucosa mg/L
LCR	117-137	2,3	2,2	2,2	22,9	113-127	7,31	1,2-2,1	45-80
Solución B de Elliott	149	2,6	2,7	2,4	22,6	132	6,0-7,5	2,3	80

[0099] Por lo tanto, las formulaciones adecuadas para la administración intratecal de acuerdo con la presente invención no son LCR sintéticos o artificiales.

[0100] Las formulaciones para la administración intratecal se han formulado de tal manera que son capaces de estabilizar, o alternativamente retardar o prevenir la degradación, de uno o más agentes terapéuticos formulados con el mismo (por ejemplo, proteínas recombinantes). Tal como se utiliza aquí, el término "estable" se refiere a la capacidad del agente terapéutico (por ejemplo, una enzima recombinante) para mantener su eficacia terapéutica (por ejemplo, la totalidad o la mayor parte de su actividad biológica deseada y/o la integridad fisicoquímica) durante períodos prolongados de tiempo. La estabilidad de un agente terapéutico, y la capacidad de la composición farmacéutica para mantener la estabilidad de dicho agente terapéutico, se pueden evaluar durante largos períodos de tiempo (por ejemplo, preferiblemente durante al menos 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36 meses o más). En el contexto de una formulación de una formulación estable es una en la que el agente terapéutico retiene en ella esencialmente su integridad física y/o química y la actividad biológica durante el almacenamiento y durante los procesos (tales como congelación/descongelación, mezcla mecánica y liofilización). Para estabilidad de la proteína, puede medirse por la formación de agregados de alto peso molecular (HMW), la pérdida de la actividad enzimática, la generación de fragmentos de péptidos y el desplazamiento de los perfiles de carga.

[0101] La estabilidad del agente terapéutico es de particular importancia. La estabilidad del agente terapéutico puede ser evaluada adicionalmente en relación con la actividad biológica o la integridad fisicoquímica del agente terapéutico durante períodos de tiempo extendidos. Por ejemplo, la estabilidad en un punto de tiempo dado puede ser comparada contra la estabilidad en un punto de tiempo anterior (por ejemplo, en la formulación del día 0) o en contra de agente terapéutico no formulado y los resultados de esta comparación expresados como un porcentaje. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas mantienen al menos 100%, al menos 99%, al menos 98%, al menos 97%, al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 65%, al menos 60%, al menos 55% o al menos 50% de la actividad biológica del agente terapéutico o la integridad fisicoquímica durante un período prolongado de tiempo (por ejemplo, tal como se mide sobre al menos aproximadamente 6-12 meses, a temperatura ambiente o bajo condiciones de almacenamiento acelerado).

[0102] Los agentes terapéuticos (por ejemplo, enzimas deseadas) son solubles en formulaciones de la presente invención. El término "soluble" como se relaciona con los agentes terapéuticos se refiere a la capacidad de tales agentes terapéuticos para formar una solución homogénea. Preferiblemente, la solubilidad del agente terapéutico en la solución en la que se administra y por la que se transporta al sitio diana de la acción (por ejemplo, las células y tejidos del cerebro) es suficiente para permitir la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico al sitio diana de acción. Varios factores pueden afectar a la solubilidad de los agentes terapéuticos. Por ejemplo, los factores relevantes que pueden afectar la solubilidad de proteínas incluyen la fuerza iónica, secuencia de aminoácidos y la presencia de otros agentes co-solubilizantes o sales (por ejemplo, sales de calcio). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan de tal manera que se excluyen las sales de calcio a partir de tales composiciones.

[0103] Por lo tanto, las formulaciones adecuadas para la administración intratecal pueden contener un agente terapéutico (por ejemplo, enzima) de interés a varias concentraciones. En algunas realizaciones, las formulaciones adecuadas pueden contener una proteína o enzima de interés a una concentración de hasta 150 mg/ml. Las formulaciones adecuadas contienen la proteína de interés a una concentración que oscila entre 10-150 mg/ml). En algunas realizaciones, las formulaciones adecuadas para la administración intratecal pueden contener la proteína de interés a una concentración de 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml o 150 mg/ml.

[0104] En algunas realizaciones, se utilizan soluciones isotónicas. En algunas realizaciones, soluciones levemente hipertónicas (por ejemplo, de hasta 300 mM (por ejemplo, hasta 250 mM, 200 mM, 175 mM,

150 mM, 125 mM) de cloruro de sodio en fosfato de sodio 5 mM a pH 7,0) y soluciones que contienen azúcar (por ejemplo, hasta el 3% (por ejemplo, hasta 2,4%, 2,0%, 1,5%, 1,0%) de sacarosa en fosfato de sodio 5 mM a pH 7,0) se han demostrado ser bien toleradas en los monos. En algunas realizaciones, una composición de la formulación de bolo SNC adecuado es solución salina (por ejemplo, 150 mM de NaCl en agua).

[0105] Muchos agentes terapéuticos requieren pH controlado y excipientes específicos para mantener su solubilidad y la estabilidad en composiciones farmacéuticas. La Tabla 3 a continuación identifica ciertos aspectos ejemplares de formulaciones de proteínas que se consideran importantes para mantener la solubilidad y la estabilidad de la proteína de agentes terapéuticos de la presente invención.

Tabla 3

Parámetro	Rango típico/Tipo	Razón fundamental
pH	5 a 7,5	Para la estabilidad a veces también para la solubilidad
Tipo de tampón	acetato, succinato, citrato, histidina, fosfato o Tris	Para mantener el pH óptimo También puede afectar a la estabilidad
Concentración de tampón	5-50 mM	Para mantener el pH También puede estabilizar o añadir fuerza iónica
Tonificador	NaCl, azúcares, manitol	Para hacer soluciones iso-osmóticas o isotónicas
Surfactante	Polisorbato 20, polisorbato 80	Para estabilizar contra interfaces y cizalla
Otro	Aminoácidos (por ejemplo arginina) en decenas a cientos de mM	Para la solubilidad o estabilidad mejorada

[0106] El pH de la composición farmacéutica es un factor adicional que es capaz de alterar la solubilidad de un agente terapéutico (por ejemplo, una enzima o proteína) en una composición farmacéutica acuosa, composiciones farmacéuticas para su uso con la presente invención contienen uno o más tampones. En algunas realizaciones, las composiciones según la invención contienen una cantidad de tampón suficiente para mantener el pH óptimo de dicha composición entre aproximadamente 4,0-8,0, entre aproximadamente 5,0-7,5, entre aproximadamente 5,5-7,0, entre aproximadamente 6,0-7,0 y entre aproximadamente 6,0-7,5. En algunas realizaciones, el tampón comprende hasta 50 mM de fosfato de sodio. Los tampones adecuados incluyen fosfato. Concentraciones de tampón adecuadas pueden ser de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 20 mM, dependiendo, por ejemplo, en el tampón y la isotonicidad deseada de la formulación. En algunas realizaciones, un agente tampón adecuado está presente en una concentración de aproximadamente 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM.

[0107] En algunas realizaciones, las formulaciones contienen un agente de isotonicidad para mantener las formulaciones isotónicas. Tal como se utiliza en conexión con la administración de TI, por "isotónico" se entiende que la formulación de interés tiene esencialmente la misma osmolaridad como LCR humano. Las formulaciones isotónicas tendrán generalmente una osmolaridad de aproximadamente 240 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg. La isotonicidad se puede medir usando, por ejemplo, una presión de vapor o osmómetros de tipo punto de congelación. Agentes de isotonicidad ejemplares incluyen, pero no se limitan a, glicina, sorbitol, manitol, cloruro de sodio y arginina. En algunas realizaciones, agentes isotónicos adecuados pueden estar presentes en las formulaciones en una concentración de aproximadamente 0,01 - 5% (por ejemplo, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0 o 5,0%) en peso.

[0108] En algunas realizaciones, las formulaciones pueden contener un agente estabilizante para proteger la proteína. Típicamente, un agente estabilizador adecuado es un azúcar no reductor, tal como sacarosa, rafinosa, trehalosa, o aminoácidos tales como glicina, arginina y metionina. La cantidad de agente estabilizante en una formulación es generalmente tal que la formulación será isotónica. Sin embargo, las formulaciones hipertónicas también pueden ser adecuadas. Además, la cantidad de agente estabilizante no debe ser demasiado baja, tal que se produce una cantidad no aceptable de degradación/agregación del agente terapéutico. Los ejemplos de las concentraciones de agente estabilizante en la formulación pueden oscilar desde aproximadamente 1 mM a aproximadamente 400 mM (por ejemplo, desde aproximadamente 30 mM a aproximadamente 300 mM, y de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 100 mM), o alternativamente, de 0,1% a 15% (por ejemplo, de 1% a 10%,

del 5% al 15%, del 5% al 10%) en peso. En algunas realizaciones, la relación de la cantidad de masa del agente estabilizante y el agente terapéutico es de aproximadamente 1: 1. En otras realizaciones, la relación de la cantidad de masa del agente estabilizante y el agente terapéutico puede ser de aproximadamente 0,1: 1, 0,2: 1, 0,25: 1, 0,4: 1, 0,5: 1, 1: 1, 2: 1, 2,6 : 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 10; 1, o 20: 1. En algunas realizaciones, adecuadas para la liofilización, el agente estabilizante es también un lioprotectores.

[0109] Las composiciones farmacéuticas, formulaciones y métodos relacionados descritos en este documento son útiles para suministrar una variedad de agentes terapéuticos al SNC de un sujeto (por ejemplo, por vía intratecal, intraventricular o intracisternal) y para el tratamiento de las enfermedades asociadas. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento son particularmente útiles para suministrar proteínas y enzimas para sujetos que sufren de trastornos de almacenamiento lisosomal.

[0110] En algunas realizaciones, es deseable añadir un tensioactivo para formulaciones. Ejemplos de tensioactivos incluyen tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20 u 80); poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); tritón; dodecilo sulfato de sodio (SDS); sulfato de laurilo sódico; glucósido de octilo sódico; laurilo-, miristilo-, linoleilo- o estearilo-sulfobetaína; laurilo-, miristilo-, linoleilo- o estearilo-sarcosina; linoleilo-, miristilo-, o cetilo-betaína; lauroamidopropilo-, cocamidopropilo-, linolea- midopropilo-, miristamidopropilo-, palmidopropilo-, o isostearamidopropilo-betaína (por ejemplo, lauroamidopropilo); miristarnidopropilo-, palmidopropilo-, o isostearamidopropilo-dimetilamina; cocoilo de sodio y metilo, o ofeiltaurato de metilo disódico; y serie Monaquat™ (Mona Industries, Inc., Paterson, NJ), glicol de polietilo, glicol de polipropilo y copolímeros de etileno y glicol de propileno (por ejemplo, Pluronics, PF68, etc.). Típicamente, la cantidad de tensioactivo añadido es tal que reduce la agregación de la proteína y reduce al mínimo la formación de partículas o efervescencias. Por ejemplo, un agente tensioactivo puede estar presente en una formulación a una concentración de aproximadamente 0,001 - 0,5% (por ejemplo, aproximadamente 0,005 - 0,05%, o 0,005-0,01%). En particular, un agente tensioactivo puede estar presente en una formulación a una concentración de aproximadamente 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, o 0,5%, etc.

[0111] En algunas realizaciones, Las formulaciones adecuadas pueden incluir además uno o más agentes de carga, en particular, para formulaciones liofilizadas. Un "agente de carga" es un compuesto que añade masa a la mezcla liofilizada y contribuye a la estructura física de la torta liofilizada. Por ejemplo, un agente de carga puede mejorar la apariencia de torta liofilizada (torta liofilizada por ejemplo, esencialmente uniforme). Agentes de carga adecuados incluyen, pero no se limitan a, cloruro de sodio, lactosa, manitol, glicina, sacarosa, trehalosa, almidón de hidroxietilo. Concentraciones ejemplares de agentes de carga son de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% (por ejemplo, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0%, 8,5%, 9,0%, 9,5% y 10,0%).

[0112] Las formulaciones se pueden evaluar sobre la base de análisis de la calidad del producto, tiempo de reconstitución (si liofilizado), la calidad de la reconstitución (si liofilizada), de alto peso molecular, la humedad y la temperatura de transición vítrea. Típicamente, la calidad de proteínas y análisis de productos incluyen el análisis del producto de tasa de degradación utilizando métodos incluyendo, pero no limitado a la exclusión por tamaño HPLC (SE-HPLC), intercambio catiónico-HPLC (CEX-HPLC), difracción de rayos X (XRD), calorimetría de exploración diferencial modulada (MDSC), HPLC de fase inversa (RP-HPLC), la dispersión multi-ángulo de luz (MALS), la fluorescencia, la absorción ultravioleta, nefelometría, electroforesis capilar (CE), SDS-PAGE, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la evaluación de un producto puede incluir una etapa de evaluar el aspecto (ya sea líquido o aspecto de la torta).

[0113] En general, las formulaciones (liofilizadas o acuosas) se pueden almacenar durante períodos prolongados de tiempo a temperatura ambiente. La temperatura de almacenamiento típicamente puede variar desde 0°C a 45°C (por ejemplo, 4°C, 20°C, 25°C, 45°C, etc.). Las formulaciones pueden ser almacenadas durante un período de meses a un período de años. El tiempo de almacenamiento generalmente será de 24 meses, 12 meses, 6 meses, 4,5 meses, 3 meses, 2 meses o 1 mes. Las formulaciones se pueden almacenar directamente en el recipiente utilizado para la administración, eliminando pasos de transferencia.

[0114] Las formulaciones se pueden almacenar directamente en el recipiente de liofilización (si se liofiliza), que también puede funcionar como el recipiente de la reconstitución, la eliminación de etapas de transferencia. Alternativamente, las formulaciones de productos liofilizados se pueden medir en incrementos más pequeños para el almacenamiento. El almacenamiento en general, debe evitar las circunstancias que conducen a la degradación de las proteínas, incluyendo pero no limitado a la exposición a la luz solar, la radiación UV, otras formas de radiación electromagnética, calor excesivo o choque térmico frío, rápido, y el choque mecánico.

[0115] En algunas realizaciones, las formulaciones para uso con la presente invención están en una forma líquida o acuosa. En algunas realizaciones, las formulaciones para uso con la presente invención se liofilizan. Dichas formulaciones liofilizadas pueden reconstituirse mediante la adición de uno o más diluyentes a los mismos antes de la administración a un sujeto. Los diluyentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua estéril, agua bacteriostática para inyección y solución salina estéril. Preferiblemente, después de la reconstitución, el agente terapéutico contenido en el mismo es estable, soluble y demuestra tolerabilidad tras la administración a un sujeto.

[0116] Las composiciones farmacéuticas para uso con la presente invención se caracterizan por su tolerabilidad. Como se usa en este documento, los términos "tolerable" y "tolerabilidad" se refieren a la capacidad de las composiciones farmacéuticas para no provocar una reacción adversa en el sujeto al que tal composición se administra, o alternativamente no para provocar una reacción adversa grave en el sujeto a quien se administra dicha composición. Las composiciones farmacéuticas para uso con la presente invención son bien toleradas por el sujeto al que se administra tales composiciones.

Dispositivo para la administración intratecal

[0117] Varios dispositivos se pueden utilizar para la administración intratecal de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, un dispositivo para la administración intratecal contiene un puerto de acceso de fluido (por ejemplo, puerto inyectable); un cuerpo hueco (por ejemplo, un catéter) que tiene un primer orificio de flujo en comunicación de fluido con el puerto de acceso de fluido y un segundo orificio de flujo configurado para la inserción en la médula espinal; y un mecanismo de fijación para fijar la inserción del cuerpo hueco en la médula espinal. Como un ejemplo no limitativo mostrado en la Figura 42, un mecanismo de fijación adecuado contiene una o más perillas montadas en la superficie del cuerpo hueco y un anillo de sutura ajustable sobre una o más perillas para evitar que el cuerpo hueco (por ejemplo, un catéter) salga de la médula espinal. En diversas realizaciones, el puerto de acceso de fluido comprende un depósito. En algunas realizaciones, el puerto de acceso de fluido comprende una bomba mecánica (por ejemplo, una bomba de infusión). En algunas realizaciones, un catéter implantado está conectado ya sea a un depósito (por ejemplo, para suministro de bolo), o una bomba de infusión. El puerto de acceso de fluido puede ser implantado o externo.

[0118] En algunas realizaciones, la administración intratecal puede ser realizada por cualquiera de punción lumbar (es decir, en bolo lento) o por medio de un sistema de administración de puerto-catéter (es decir, la infusión o bolo). En algunas realizaciones, el catéter se inserta entre las láminas de las vértebras lumbares y la punta está roscada por el espacio tecal al nivel deseado (por lo general L3-L4) (Figura 43A-C).

[0119] En relación con la administración intravenosa, un volumen de dosis única adecuada para la administración intratecal es típicamente pequeña. Típicamente, la administración intratecal de acuerdo con la presente invención mantiene el equilibrio de la composición de la LCR, así como la presión intracraneal del sujeto. En algunas realizaciones, la administración intratecal se realiza sin la eliminación correspondiente de LCR de un sujeto. En algunas realizaciones, un volumen de dosis única adecuada puede ser, por ejemplo, menos de aproximadamente 10 ml, 8 ml, 6 ml, 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1,5 ml, 1 ml, o 0,5 ml. En algunas realizaciones, un volumen de dosis única adecuada puede ser de aproximadamente 0,5-5 ml, 0,5-4 ml, 0,5-3 ml, 0,5-2 ml, 0,5-1 ml, 1-3 ml, 1-5 ml, 1,5-3 ml, 1-4 ml, o 0,5-1,5 ml. En algunas realizaciones, la administración intratecal de acuerdo con la presente invención implica una etapa de eliminación de una cantidad deseada de LCR primero. En algunas realizaciones, menos de aproximadamente 10 ml (por ejemplo, menos de aproximadamente 9 ml, 8 ml, 7 ml, 6 ml, 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml) de LCR se retira primero antes de la administración de TI. En esos casos, un volumen de dosis única adecuada puede ser, por ejemplo, más de aproximadamente 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml o 20 ml.

[0120] Varios otros dispositivos pueden utilizarse para efectuar la administración intratecal de una composición terapéutica. Por ejemplo, las formulaciones que contienen enzimas deseadas se pueden administrar usando un depósito Ommaya que es de uso común para la administración intratecal para carcinomatosis meníngea (Lancet 2: 983-84, 1963). Más específicamente, en este método, un tubo ventricular se inserta a través de un orificio formado en el asta anterior y está conectado a un depósito Ommaya instalado debajo del cuero cabelludo, y el depósito se punza por vía subcutánea para administrar por vía intratecal la enzima particular que se reemplaza, que se inyecta en el depósito. Otros dispositivos para la administración intratecal de composiciones terapéuticas o formulaciones a un individuo se describen en la patente de los Estados Unidos. Nº 6.217.552. Alternativamente, el fármaco puede administrarse por vía intratecal, por ejemplo, mediante una única inyección o infusión continua. Se debe entender que el tratamiento de dosificación puede ser en forma de una única administración de una dosis o múltiples dosis.

[0121] Para la inyección, las formulaciones para uso con la invención pueden formularse en soluciones líquidas. Además, la enzima puede formularse en forma sólida y re-disolverse o suspenderse

inmediatamente antes del uso. También se incluyen formas liofilizadas. La inyección puede ser, por ejemplo, en forma de una inyección de bolo o infusión continua (por ejemplo, el uso de bombas de infusión) de la enzima.

[0122] Una enzima se puede administrar mediante inyección ventricular cerebral lateral en el cerebro de un sujeto. La inyección se puede hacer, por ejemplo, a través de un orificio de trepanación hecho en el cráneo del sujeto. Alternativamente, la enzima y/u otra formulación farmacéutica se pueden administrar a través de una derivación quirúrgica insertada en el ventrículo cerebral de un sujeto. Por ejemplo, la inyección se puede hacer en los ventrículos laterales, que son más grandes. En algunas realizaciones, se puede realizar la inyección en los ventrículos tercero y cuarto más pequeños también.

[0123] Composiciones farmacéuticas también pueden administrarse por inyección en la cisterna magna, o área lumbar de un sujeto.

[0124] En ciertas realizaciones de la invención, una formulación farmacéuticamente aceptable proporciona la liberación sostenida, por ejemplo, "liberación lenta" de la enzima u otra composición farmacéutica utilizada en la presente invención, a un sujeto durante al menos una, dos, tres, cuatro semanas o períodos más largos de tiempo después de administrarse al sujeto la formulación farmacéuticamente aceptable.

[0125] Tal como se utiliza aquí, el término "liberación sostenida" se refiere a la administración continua de una formulación farmacéutica *in vivo* durante un período de tiempo después de la administración, preferiblemente al menos varios días, una semana o varias semanas. La liberación sostenida de la composición se puede demostrar mediante, por ejemplo, el continuo efecto terapéutico de la enzima sobre tiempo (por ejemplo, la liberación sostenida de la enzima se puede demostrar por la continua cantidad reducida de gránulos de almacenamiento en el sujeto). Alternativamente, la administración sostenida de la enzima puede ser demostrada por la detección de la presencia de la enzima in vivo con el tiempo.

Administración a los tejidos diana

[0126] Como se discutió anteriormente, una de las características sorprendentes e importantes de la presente invención es que las enzimas de reemplazo (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) administradas usando los métodos y composiciones de la presente invención según la invención son capaces de difundirse con eficacia y extensivamente a través de la superficie del cerebro y penetrar en diferentes capas o regiones del cerebro, incluyendo las regiones profundas del cerebro. Además, los métodos inventivos y composiciones de la presente invención proporcionan eficazmente enzimas de recambio (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) a varios tejidos, neuronas o células de la médula espinal, incluyendo la región lumbar, que es difícil de orientar por métodos de administración de SNC existente tales como la inyección de ICV. Además, los métodos y composiciones de la presente invención de la invención proporcionan una cantidad suficiente de enzimas de recambio (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) a la corriente de la sangre y varios órganos y tejidos periféricos.

[0127] Por lo tanto, en algunas realizaciones, enzimas de reemplazo (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) se administran al sistema nervioso central de un sujeto. En algunas realizaciones, las enzimas de reemplazo (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) se administran a uno o más de tejidos diana de cerebro, médula espinal, y/o los órganos periféricos. Como se usa aquí, el término "tejidos diana" se refiere a cualquier tejido que es afectado por la enfermedad de almacenamiento lisosomal que es tratada o cualquier tejido en el que se expresa normalmente la enzima lisosomal deficiente. En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen aquellos tejidos en los que hay una cantidad detectable o anormalmente alta de sustrato de la enzima, por ejemplo almacenado en los lisosomas celulares del tejido, en pacientes que padecen o son susceptibles a la enfermedad de almacenamiento lisosomal. En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen aquellos tejidos que muestran enfermedad asociada a patología, síntoma o característica. En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen aquellos tejidos en los que la enzima lisosomal deficiente se expresa normalmente en un nivel elevado. Como se usa en este documento, un tejido diana puede ser un tejido diana cerebral, un tejido diana de la médula espinal y/o un tejido diana periférico. Tejidos diana ejemplares se describen en detalle a continuación.

Tejidos diana cerebrales

[0128] En general, el cerebro se puede dividir en diferentes regiones, capas y tejidos. Por ejemplo, el tejido meníngeo es un sistema de membranas que envuelve el sistema nervioso central, incluyendo el cerebro. Las meninges contienen tres capas, incluyendo duramadre, la materia aracnoide, y la materia pia. En general, la función principal de las meninges y el líquido cefalorraquídeo consiste en proteger el sistema nervioso central. En algunas realizaciones, una proteína terapéutica de acuerdo con la presente invención se suministra a una o más capas de las meninges.

[0129] El cerebro tiene tres subdivisiones principales, incluyendo el cerebro, el cerebelo y el tronco cerebral. Los hemisferios cerebrales, que están situados por encima de la mayoría de otras estructuras del cerebro y están cubiertos con una capa cortical. Debajo del cerebro se encuentra el tronco cerebral, que se asemeja a un tallo sobre el que se fija el cerebro. En la parte trasera del cerebro, debajo del cerebro y detrás del tronco cerebral, se encuentra el cerebelo.

[0130] El diencéfalo, que se encuentra cerca de la línea media del cerebro y por encima del mesencéfalo, contiene el tálamo, metatálamo, el hipotálamo, epitálamo, pretálamo, y pretectum. El mesencéfalo, también llamado el cerebro medio, contiene el tectum, tegumentum, mesocoelia ventriculares, y pedúnculos cerebrales, el núcleo rojo, y el núcleo de nervio craneal III. El mesencéfalo está asociado con la visión, la audición, el control motor, sueño/vigilia, el estado de alerta, y la regulación de la temperatura.

[0131] Las regiones de tejidos del sistema nervioso central, incluyendo el cerebro, pueden caracterizarse en base a la profundidad de los tejidos. Por ejemplo, SNC (por ejemplo, cerebro) tejidos pueden caracterizarse como superficie o tejidos superficiales, tejidos mediados de profundidad, y/o los tejidos profundos.

[0132] Según la presente invención, la enzima de reemplazo puede ser administrada a cualquier tejido diana cerebral apropiado asociado con una enfermedad particular a tratar en un sujeto. En algunas realizaciones, la enzima de reemplazo de acuerdo con la presente invención se suministra a la superficie o tejido diana cerebral superficial. En algunas realizaciones, la enzima de reemplazo de acuerdo con la presente invención se suministra a tejido diana cerebral de media profundidad. En algunas realizaciones, la enzima de reemplazo de acuerdo con la presente invención se suministra al tejido diana cerebral profundo. En algunas realizaciones, la enzima de reemplazo de acuerdo con la presente invención se suministra a una combinación de superficie o tejido diana cerebral poco profundo, a mitad de la profundidad del tejido diana cerebral, y/o tejido diana cerebral profundo. En algunas realizaciones, la enzima de reemplazo de acuerdo con la presente invención se suministra a un tejido cerebral profundo al menos 4 mm, 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm, 10 mm o más por debajo (o interna a) la superficie externa del cerebro.

[0133] En algunas realizaciones, las enzimas de reemplazo (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) se administran a una o más superficies o tejidos poco profundos del cerebro. En algunas realizaciones, la superficie específica o tejidos poco profundos del cerebro se encuentran dentro de 4 mm de la superficie del cerebro. En algunas realizaciones, la superficie específica o tejidos poco profundos del cerebro se seleccionan a partir de tejidos pia mater, tejidos de cinta corticales cerebrales, hipocampo, espacio Virchow Robin, vasos sanguíneos dentro del espacio VR, el hipocampo, porciones del hipotálamo en la superficie inferior del cerebro, los nervios ópticos y las vías, el bulbo olfativo y proyecciones, y combinaciones de los mismos.

[0134] En algunas realizaciones, las enzimas de reemplazo (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) se administran a uno o más tejidos profundos del cerebro. En algunas realizaciones, la superficie específica o tejidos poco profundos del cerebro se encuentran 4 mm (por ejemplo, 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm, o 10 mm) por debajo (o interna a) la superficie del cerebro. En algunas realizaciones, tejidos focalizados profundos del cerebro incluyen la cinta cortical cerebral. En algunas realizaciones, tejidos focalizados profundos del cerebro incluyen uno o más del diencéfalo (por ejemplo, el hipotálamo, tálamo, pretálamo, subtálamo, etc.), metencéfalo, núcleos lentiformes, ganglios basales, núcleo caudado, putamen, amígdala, globo pálido, y combinaciones de los mismos.

[0135] En algunas realizaciones, las enzimas de reemplazo (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) se administran a uno o más tejidos del cerebelo. En ciertas realizaciones, los uno o más tejidos focalizados del cerebelo se seleccionan del grupo que consiste en tejidos de la capa molecular, los tejidos de la capa de células de Purkinje, los tejidos de la capa granular de la célula, pedúnculos cerebelosos, y combinación de los mismos. En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos (por ejemplo, enzimas) se administran a uno o más tejidos profundos del cerebelo, incluyendo, pero no limitado a, los tejidos de la capa de células de Purkinje, los tejidos de la capa de células granulares, tejido profundo materia blanca cerebelar (por ejemplo, profundo respecto a la capa de células granulares) y tejido de núcleos profundo cerebeloso.

[0136] En algunas realizaciones, las enzimas de reemplazo (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) se administran a uno o más tejidos del tronco cerebral. En algunas realizaciones, los uno o más tejidos focalizados del tronco cerebral incluyen cerebro madre de tejido de la materia blanca y/o el tejido de núcleos del tronco cerebral.

[0137] En algunas realizaciones, las enzimas de reemplazo (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) se administran a diversos tejidos del cerebro incluyendo, pero no limitado a la materia gris, la materia blanca, áreas periventriculares, pia-aracnoides, meninges, neocórtex, cerebelo, tejidos profundos en la

corteza cerebral, la capa molecular, región de caudado/putamen, cerebro medio, regiones profundas de la protuberancia o médula, y combinaciones de los mismos.

[0138] En algunas realizaciones, las enzimas de reemplazo (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) se administran a diversas células en el cerebro, incluyendo, pero no limitado a, neuronas, células gliales, células perivasculares y/o células de las meninges. En algunas realizaciones, una proteína terapéutica es administrada a los oligodendrocitos de la materia blanca profunda.

Médula espinal

[0139] En general, las regiones o los tejidos de la médula espinal se pueden caracterizar sobre la base de la profundidad de los tejidos. Por ejemplo, los tejidos de la médula espinal se pueden caracterizar como superficie o tejidos superficiales, tejidos mediados de profundidad, y/o los tejidos profundos.

[0140] En algunas realizaciones, las enzimas de reemplazo (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) se administran a una o más superficies o los tejidos superficiales de la médula espinal. En algunas realizaciones, una superficie diana o tejido superficial de la médula espinal se encuentra dentro de 4 mm de la superficie de la médula espinal. En algunas realizaciones, una superficie diana o tejido superficial de la médula espinal contiene materia pia y/o los tractos de materia blanca.

[0141] En algunas realizaciones, las enzimas de reemplazo (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) se administran a uno o más tejidos profundos de la médula espinal. En algunas realizaciones, un tejido profundo focalizado de la médula espinal se encuentra interna a 4 mm de la superficie de la médula espinal. En algunas realizaciones, un tejido profundo focalizado de la médula espinal contiene la materia gris de la médula espinal y/o células ependimarias.

[0142] En algunas realizaciones, las enzimas de reemplazo (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) se administran a las neuronas de la médula espinal.

Tejidos diana periféricos

[0143] Como se usa en el presente documento, los órganos o los tejidos periféricos se refieren a cualquiera de los órganos o tejidos que no son parte del sistema nervioso central (SNC). Tejidos diana periféricos pueden incluir, pero no se limitan al sistema de la sangre, hígado, riñón, corazón, endotelio, médula ósea y células derivadas de médula ósea, bazo, pulmón, ganglios linfáticos, hueso, cartílago, ovario y testículos. En algunas realizaciones, una enzima de sustitución (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) de acuerdo con la presente invención se suministra a uno o más de los tejidos diana periféricos.

Biodistribución y biodisponibilidad

[0144] En diversas realizaciones, una vez administrada al tejido diana, una enzima de sustitución (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) se localiza intracelularmente. Por ejemplo, una enzima de sustitución (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) puede localizarse en exones, axones, lisosomas, mitocondrias o vacuolas de una célula diana (por ejemplo, neuronas tales como las células de Purkinje). Por ejemplo, las enzimas en algunas realizaciones administradas por vía intratecal demuestran la dinámica de translocación de tal manera que los movimientos de la enzima dentro del espacio perivascular (por ejemplo, mecanismos convectivos de pulsación asistida). Además, los mecanismos de transporte axonal activos relativos a la asociación de la proteína o enzima se administra con neurofilamentos también pueden contribuir a o de otra manera facilitar la distribución de las proteínas o enzimas administradas por vía intratecal en los tejidos más profundos del sistema nervioso central.

[0145] En algunas realizaciones, una enzima de sustitución (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) administrada de acuerdo con la presente invención puede lograr niveles terapéutica o clínicamente eficaces en diversos tejidos objetivos descritos en este documento. Tal como se usa en este documento, un nivel o actividad terapéutica o clínicamente eficaz es un nivel o actividad suficiente para conferir un efecto terapéutico en un tejido diana. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible por alguna prueba o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación de o siente un efecto). Por ejemplo, un nivel o actividad terapéutica o clínicamente eficaz puede ser un nivel de actividad enzimática o que es suficiente para mejorar los síntomas asociados con la enfermedad en el tejido diana (por ejemplo, almacenamiento de GAG).

[0146] En algunas realizaciones, una enzima de sustitución (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) administrada de acuerdo con la presente invención puede lograr un nivel enzimático o actividad que es al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% del nivel normal o actividad de la enzima lisosomal correspondiente en el tejido diana. En algunas realizaciones, una enzima de

sustitución (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) administrada de acuerdo con la presente invención puede lograr un nivel enzimático o actividad que se aumenta en al menos 1 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces en comparación con un control (por ejemplo, los niveles endógenos o actividades sin el tratamiento). En algunas realizaciones, una enzima de sustitución (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) administrada de acuerdo a la presente invención puede lograr un nivel enzimático incrementado o actividad al menos aproximadamente 10 nmol/h/mg, 20 nmol/h/mg, 40 nmol/h/mg, 50 nmol/h/mg, 60 nmol/h/mg, 70 nmol/h/mg, 80 nmol/h/mg, 90 nmol/h/mg, 100 nmol/h/mg, 150 nmol/h/mg, 200 nmol/h/mg, 250 nmol/h/mg, 300 nmol/h/mg, 350 nmol/h/mg, 400 nmol/h/mg, 450 nmol/h/mg, 500 nmol/h/mg, 550 nmol/h/mg o 600 nmol/h/mg en un tejido diana.

[0147] En algunas realizaciones, los métodos según la presente invención son particularmente útiles para la orientación de la región lumbar. En algunas realizaciones, una enzima de sustitución (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) administrada de acuerdo a la presente invención puede lograr un nivel enzimático incrementado o actividad en la región lumbar de al menos aproximadamente 500 nmol/h/mg, 600 nmol/h/mg, 700 nmol/h/mg, 800 nmol/h/mg, 900 nmol/h/mg, 1,000 nmol/h/mg, 1,500 nmol/h/mg, 2,000 nmol/h/mg, 3,000 nmol/h/mg, 4,000 nmol/h/mg, 5,000 nmol/h/mg, 6,000 nmol/h/mg, 7,000 nmol/h/mg, 8,000 nmol/h/mg, 9,000 nmol/h/mg, o 10 000 nmol/h/mg.

[0148] En general, los agentes terapéuticos generales (por ejemplo, enzimas de reemplazo) administrados de acuerdo con la presente invención tienen un medio de tiempo suficientemente largo en el LCR y tejidos diana del cerebro, médula espinal, y los órganos periféricos. En algunas realizaciones, una enzima de sustitución (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) administrada según la presente invención puede tener una vida media de al menos aproximadamente 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 2 horas, 3 horas, 4 hora, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 25 horas, 30 horas, 35 horas, 40 horas, hasta 3 días, hasta 7 días, hasta 14 días, hasta 21 días o hasta un mes. En algunas realizaciones, en algunas realizaciones, una enzima de sustitución (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) administrada de acuerdo con la presente invención puede retener un nivel detectable o actividad en LCR o el torrente sanguíneo después de 12 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 42 horas, 48 horas, 54 horas, 60 horas, 66 horas, 72 horas, 78 horas, 84 horas, 90 horas, 96 horas, 102 horas, o una semana después de la administración. El nivel o actividad detectable puede determinarse usando diversos métodos conocidos en la técnica.

[0149] En ciertas realizaciones, una enzima de sustitución (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) administrada de acuerdo con la presente invención logra una concentración de al menos 30 µg/ml en los tejidos y células del sujeto del sistema nervioso central después de la administración (por ejemplo, una semana, 3 días, 48 horas, 36 horas, 24 horas, 18 horas, 12 horas, 8 horas, 6 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos, o menos, después de la administración intratecal de la composición farmacéutica al sujeto). En ciertas realizaciones, una enzima de sustitución (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) suministrada según la presente invención alcanza una concentración de al menos 20 µg/ml, al menos 15 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 7,5 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 2,5 µg/ml, al menos 1,0 µg/ml o al menos 0,5 µg/ml en los tejidos diana o células del sujeto (por ejemplo, los tejidos del cerebro o neuronas) tras la administración a dicho sujeto (por ejemplo, una semana, 3 días, 48 horas, 36 horas, 24 horas, 18 horas, 12 horas, 8 horas, 6 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos, o menos después de la administración intratecal de tales composiciones farmacéuticas al sujeto).

Tratamiento del síndrome de Sanfilippo por la administración intratecal

[0150] Síndrome de Sanfilippo, o mucopolisacaridosis III (MPS III), es un trastorno genético raro caracterizado por la deficiencia de enzimas implicadas en la degradación de los glicosaminoglicanos (GAG). En ausencia de enzima, las moléculas de GAG parcialmente degradadas no se pueden borrar del cuerpo y se acumulan en los lisosomas de diversos tejidos, lo que resulta en la disfunción somática generalizada progresiva (Neufeld y Muenzer, 2001).

[0151] Cuatro formas distintas de MPS III, designadas MPS IIIA, B, C, y D, se han identificado. Cada una representa una deficiencia en una de las cuatro enzimas implicadas en la degradación del sulfato de heparan GAG. Todas las formas incluyen diversos grados de los mismos síntomas clínicos, incluyendo características faciales toscas, hepatoesplenomegalia, turbidez en la córnea y deformidades esqueléticas. Lo más notable, sin embargo, es la pérdida severa y progresiva de la capacidad cognitiva, la cual está ligada no sólo a la acumulación de sulfato de heparano en las neuronas, sino también la posterior elevación de los gangliósidos GM2, GM3 y GD2 causada por la acumulación de GAG primaria (Walkley 1998).

[0152] Mucopolisacaridosis de tipo IIIB (MPS IIIB; enfermedad Sanfilippo B) es un trastorno autosómico recesivo que se caracteriza por una deficiencia de la enzima alfa-N-acetilo-glucosaminidasa (Naglu). En

ausencia de esta enzima, sulfato de heparano GAG se acumula en los lisosomas de las neuronas y células gliales, con menor acumulación fuera del cerebro.

[0153] Una característica clínica determinante de este trastorno es la degeneración del sistema nervioso central (SNC), lo que resulta en la pérdida de, o el fracaso para alcanzar, los principales hitos del desarrollo. El deterioro cognitivo progresivo culmina en la demencia y la mortalidad prematura. La enfermedad normalmente se manifiesta en los niños pequeños, y la esperanza de vida de un individuo afectado por lo general no se extiende más allá del final de la adolescencia a los veinte años.

[0154] Las composiciones y métodos de la presente invención pueden unirse para tratar eficazmente los individuos que sufren de o son susceptibles a SANB. Los términos "tratar" o "tratamiento", como se usa aquí, se refieren a la mejora de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, la prevención o retraso de la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad, y/o disminución de la gravedad o la frecuencia de uno o más síntomas de la enfermedad.

[0155] En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a alivio, mejora, alivio, inhibición, aparición retrasada parcial o completa, reduciendo la gravedad y/o incidencia de deterioro neurológico en un paciente SanB. Tal como se utiliza aquí, el término "deterioro neurológico" incluye diversos síntomas asociados con el deterioro del sistema nervioso central (por ejemplo, el cerebro y la médula espinal). Los síntomas de deterioro neurológico pueden incluir, por ejemplo, retraso en el desarrollo, pro-deterioro cognitivo progresivo, pérdida de la audición, alteración del desarrollo del habla, los déficits en las habilidades motoras, hiperactividad, agresividad y/o trastornos del sueño, entre otros.

[0156] Por lo tanto, en algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la disminución de almacenamiento lisosomal (por ejemplo, de GAG) en diversos tejidos. En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la disminución de almacenamiento lisosomal en los tejidos diana del cerebro, las neuronas de la médula espinal, y/o tejidos diana periféricos. En ciertas realizaciones, el almacenamiento lisosomal se disminuye en alrededor de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más en comparación con un control. En algunas realizaciones, el almacenamiento lisosomal se reduce en al menos 1 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces en comparación con un control. En algunas realizaciones, el almacenamiento lisosomal se determina por tinción de LAMP-1.

[0157] En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la reducción de vacuolización en las neuronas (por ejemplo, las neuronas que contienen las células de Purkinje). En ciertas realizaciones, vacuolización en las neuronas se disminuye en alrededor de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más en comparación con un control. En algunas realizaciones, la vacuolización se reduce en al menos 1 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces como en comparación con un control.

[0158] En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere al aumento de la actividad de la enzima Naglu en diversos tejidos. En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere al aumento de la actividad de la enzima Naglu en los tejidos cerebrales diana, neuronas de la médula espinal y/o tejidos diana periféricos. En algunas realizaciones, la actividad enzimática Naglu se incrementa alrededor de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% 1000% o más en comparación con un control. En algunas realizaciones, la actividad enzimática Naglu se aumenta en al menos 1 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces en comparación con un control. En algunas realizaciones, el aumento de la actividad enzimática Naglu es al menos aproximadamente 10 nmol/h/mg, 20 nmol/h/mg, 40 nmol/h/mg, 50 nmol/h/mg, 60 nmol/h/mg, 70 nmol/h/mg, 80 nmol/h/mg, 90 nmol/h/mg, 100 nmol/h/mg, 150 nmol/h/mg, 200 nmol/h/mg, 250 nmol/h/mg, 300 nmol/h/mg, 350 nmol/h/mg, 400 nmol/h/mg, 450 nmol/h/mg, 500 nmol/h/mg, 550 nmol/h/mg, 600 nmol/h/mg o más. En algunas realizaciones, la actividad enzimática Naglu se incrementa en la región lumbar. En algunas realizaciones, el aumento de la actividad enzimática Naglu en la región lumbar es de al menos aproximadamente 2.000 nmol/h/mg, 3.000 nmol/h/mg, 4.000 nmol/h/mg, 5.000 nmol/h/mg, 6.000 nmol/h/mg, 7.000 nmol/h/mg, 8.000 nmol/h/mg, 9.000 nmol/h/mg, 10.000 nmol/h/mg, o más.

[0159] En ciertas realizaciones, el tratamiento de acuerdo con la presente invención resulta en una reducción (por ejemplo, aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 97,5%, 99% o más de reducción) o una eliminación completa de la presencia, o, alternativamente, la acumulación, de uno o más marcadores patológicos o biológicos que están asociados con las enfermedades de almacenamiento lisosomal. Tal reducción o eliminación tal vez particularmente evidente en las células y tejidos del sistema nervioso central (por ejemplo, neuronas y oligodendrocitos). Por ejemplo, en algunas realizaciones, tras la administración a un sujeto, las composiciones farmacéuticas de la presente invención demuestran o logran una reducción en la acumulación de la proteína de membrana 1 asociada al biomarcador lisosomal (LAMP1) en las células

del sistema nervioso central y los tejidos del sujeto (por ejemplo, en la corteza cerebral, cerebelo, núcleo caudado y el putamen, sustancia blanca y/o tálamo). LAMP1 es una glicoproteína altamente expresada en las membranas lisosomales y su presencia es elevada en muchos pacientes con un trastorno de almacenamiento lisosomal. (Meikle, et al. Clin Chem (1997) 43: 1325-1335). La presencia o ausencia de LAMP1 en los pacientes (por ejemplo, tal como se determina por tinción de LAMP) con una enfermedad de almacenamiento lisosomal, por tanto, puede proporcionar un indicador útil de la actividad lisosomal y un marcador tanto para el diagnóstico como el seguimiento de enfermedades de almacenamiento lisosomal.

[0160] Por consiguiente, en algunas realizaciones, los métodos de reducir o eliminar la presencia o acumulación de uno o más marcadores patológicos o biológicos asociados con una enfermedad de otra manera (por ejemplo, una enfermedad de almacenamiento lisosomal) se proporcionan. Del mismo modo, algunas realizaciones se refieren a métodos de aumento de la degradación (o la velocidad de degradación) de uno o más marcadores patológicos o biológicos (por ejemplo, LAMP 1) asociados con enfermedades de almacenamiento lisosomal.

[0161] En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la disminución de la progresión de la pérdida de la capacidad cognitiva. En ciertas realizaciones, la progresión de la pérdida de la capacidad cognitiva se reduce en aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más en comparación con un control. En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la disminución de retraso en el desarrollo. En ciertas realizaciones, el retraso en el desarrollo se disminuye en alrededor de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más en comparación con un control.

[0162] En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere al aumento de la supervivencia (por ejemplo, el tiempo de supervivencia). Por ejemplo, el tratamiento puede resultar en un aumento de la esperanza de vida de un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento según la presente invención da como resultado un aumento de la esperanza de vida de un paciente en más de aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 100%, aproximadamente 105%, aproximadamente 110%, aproximadamente 115%, aproximadamente 120%, aproximadamente 125%, aproximadamente 130%, aproximadamente 135%, aproximadamente 140%, aproximadamente 145%, aproximadamente 150%, aproximadamente 155%, aproximadamente 160%, aproximadamente 165%, aproximadamente 170%, aproximadamente 175%, aproximadamente 180%, aproximadamente 185%, aproximadamente 190%, aproximadamente 195%, aproximadamente 200% o más, en comparación con la esperanza media de vida de uno o más individuos de control con enfermedad similar sin tratamiento. En algunas formas de realización, el tratamiento de acuerdo con la presente invención resulta en un aumento de la esperanza de vida de un paciente en más de aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 5 años, alrededor de 6 años, aproximadamente 7 años, aproximadamente 8 años, aproximadamente 9 años, aproximadamente 10 años o más, en comparación con el promedio de vida de uno o más individuos de control con enfermedad similar sin tratamiento. En algunas realizaciones, el tratamiento de acuerdo con la presente invención resulta en la supervivencia a largo plazo de un paciente. Tal como se utiliza aquí, el término "supervivencia a largo plazo" se refiere a un tiempo de supervivencia o la esperanza de vida más larga que cerca de 40 años, 45 años, 50 años, 55 años, 60 años, o más.

[0163] Los términos, "mejorar", "aumentar" o "reducir", como se usa en el presente documento, indican valores que son con respecto a un control. En algunas formas de realización, un control adecuado es una medición de línea de base, tal como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito en el presente documento, o una medición en un individuo de control (o múltiples individuos de control) en la ausencia del tratamiento descrito en el presente documento. Un "control individuo" es un individuo aquejado de SanB, que es aproximadamente la misma edad y/o género como el individuo que se está tratando (para garantizar que las etapas de la enfermedad en el individuo tratado y el individuo de control son comparables).

[0164] El individuo (también referido como "paciente" o "sujeto") que está siendo tratado es un individuo (feto, niño, adolescente o adulto humano) que tiene SanB o que tengan el potencial para desarrollar SanB. El individuo puede tener una expresión residual endógena Naglu y/o actividad, o ninguna actividad mensurable. Por ejemplo, el individuo que tiene SanB puede tener niveles de expresión Naglu que son menos de aproximadamente 30-50%, menos de aproximadamente 25-30%, menos de aproximadamente 20-25%, menos de aproximadamente 15-20%, menos de aproximadamente 10 - 15%, menos de aproximadamente 5-10%, menos de aproximadamente 0,1-5% de los niveles normales

de expresión Naglu.

[0165] En algunas realizaciones, el individuo es un individuo que ha sido recientemente diagnosticado con la enfermedad. Por lo general, el tratamiento precoz (tratamiento que comienza tan pronto como sea posible después del diagnóstico) es importante para minimizar los efectos de la enfermedad y para maximizar los beneficios del tratamiento.

Tolerancia inmunológica

[0166] En general, la administración intratecal de una enzima de sustitución (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) de acuerdo con la presente invención no da lugar a efectos adversos graves en el tema. Tal como se usa en el presente documento, los efectos adversos graves inducen, pero no se limitan a respuesta inmune sustancial, la toxicidad, o la muerte. Tal como se utiliza aquí, el término "respuesta inmune sustancial" se refiere a respuestas inmunes graves o serias, tales como respuestas inmunes de células T de adaptación.

[0167] Por lo tanto, en muchas realizaciones, los métodos según la presente invención no implican terapia inmunosupresora concurrente (es decir, cualquier terapia inmunosupresora utilizada como pre-tratamiento/acondicionamiento previo o en paralelo con el método). En algunas realizaciones, los métodos según la presente invención no implican una inducción de la tolerancia inmune en el sujeto que está siendo tratado. En algunas realizaciones, los métodos según la presente invención no implican un pre-tratamiento o preacondicionamiento del sujeto usando agente inmunosupresor de células T.

[0168] En algunas realizaciones, la administración intratecal de agentes terapéuticos puede montar una respuesta inmune contra estos agentes. Así, en algunas realizaciones, puede ser útil hacer el sujeto que recibe la enzima de reemplazo tolerante a la terapia de reemplazo enzimática. Tolerancia inmune puede ser inducida mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, 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 una enzima de sustitución deseada puede ser usado.

[0169] Cualquier agente inmunosupresor conocido por el experto en la técnica puede emplearse junto con una terapia de combinación de la invención. Tales agentes inmunosupresores incluyen, pero no se limitan a la ciclosporina, FK506, rapamicina, CTLA4-Ig, y agentes anti-TNF tales como etanercept (véase, por ejemplo Moder, 2000, Ann Allergy Asthma Immunol 84,280-284; Nevins, 2000, Curr. Opin. Pediatr. 12, 146-150; Kurlberg et al., 2000, Scand. J. Immunol. 51, 224-230;. Ideguchi et al, 2000, Neuroscience 95, 217-226; Potteret al., 1999, Ann. NY Acad. Sci. 875, 159-174; Slavik et al., 1999, Immunol. Res. 19, 1-24; Gaziev et al., 1999, Bone Marrow Transplant. 25, 689-696; Henry, 1999, Clin. Trasplant. 13, 209-220; Gummert et al., 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10, 1366-1380; Qi et al., 2000, Transplantation 69, 1275-1283). El anticuerpo daclizumab de receptor anti-IL2 (alfa-subunidad) (por ejemplo Zenapax.TM.), que se ha demostrado eficaz en pacientes de transplante, también se puede usar como un agente inmunosupresor (véase por ejemplo Wiseman et al., 1999, Drugs 58, 1029-1042; Beniaminovitz et al, 2000, N. Engl J. Med 342, 613-619; Ponticelli et al, 1999, Drugs RD 1, 55-60; Berard et al, 1999, Pharmacotherapy 19, 1127-1137; Eckhoff et al, 2000, Transplantation 69, 1867-1872; Ekberg et al, 2000, Transpl Int 13, 151-159). Agentes inmunosupresores adicionales incluyen, pero no se limitan a anti-CD2 (Branco et al, 1999, Transplantation 68, 1588-1596; Przepiorka et al, 1998, Blood 92, 4066-4071), anti-CD4 (Marinova-Mutafchieva et al., 2000, Arthritis Rheum 43, 638-644; Fishwild et al, 1999, Clin Immunol 92, 138-152), y ligando anti-CD40 (Hong et al, 2000, Semin Nephrol 20, 108-125; Chirmule et al, 2000, J. Virol 74, 3345-3352; Ito et al, 2000, J. Immunol 164, 1230-1235).

Administración

[0170] Métodos inventivos de la presente invención contemplan una cantidad individual, así como múltiples administraciones de una enzima de sustitución terapeúticamente eficaz (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) descrita en este documento. Enzimas de reemplazo (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) se pueden administrar a intervalos regulares, dependiendo de la naturaleza, severidad y extensión de la afección del sujeto. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de la enzima de reemplazo (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu) de la presente invención se puede administrar por vía intratecal periódicamente a intervalos regulares (por ejemplo, una vez al año, una vez cada seis meses, una vez cada cinco meses, una vez cada tres meses, cada dos meses (una vez cada dos meses), mensualmente (una vez al mes), dos veces por semana (una vez cada dos semanas), semanalmente).

[0171] En algunas realizaciones, la administración intratecal puede ser utilizada en conjunción con otras vías de administración (por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, transdérmica o transmucosa (por ejemplo, por vía oral o nasal)). En algunas realizaciones, las otras vías de administración (por ejemplo, la administración intravenosa) se pueden realizar no más

frecuentemente que quincenalmente, mensualmente, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses, una vez cada cinco meses, una vez cada seis meses, anualmente.

[0172] Tal como se utiliza aquí, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" es la base en gran parte determinada de la cantidad total del agente terapéutico contenido en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para lograr un beneficio significativo para el sujeto (por ejemplo, el tratamiento, la modulación, el curado, prevenir y/o mejorar la enfermedad o afección subyacente). Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, tal como una cantidad suficiente para modular los receptores de la enzima lisosómica o su actividad para tratar así como enfermedad de almacenamiento lisosómico o los síntomas de los mismos (por ejemplo, una reducción o eliminación de la presencia o la incidencia de "cuerpos cebra" o vacuolización celular tras la administración de las composiciones de la presente invención a un sujeto). Generalmente, la cantidad de un agente terapéutico (por ejemplo, una enzima lisosómica recombinante) administrada a un sujeto en necesidad del mismo dependerá de las características del sujeto. Tales características incluyen la condición, gravedad de la enfermedad, la salud general, edad, sexo y peso corporal del sujeto. Un experto en la técnica será fácilmente capaz de determinar las dosificaciones apropiadas dependiendo de estos y otros factores relacionados. Además, opcionalmente se pueden emplear ambos ensayos objetivos y subjetivos para identificar intervalos de dosificación óptimos.

[0173] Una cantidad terapéuticamente eficaz se administra comúnmente en un régimen de dosificación que puede comprender múltiples dosis unitarias. Para cualquier proteína terapéutica particular, una cantidad terapéuticamente eficaz (y/o una unidad de dosis adecuada dentro de un régimen de dosificación eficaz) puede variar, por ejemplo, dependiendo de la ruta de administración, de combinación con otros agentes farmacéuticos. Además, la cantidad específica terapéuticamente eficaz (y/o dosis unitaria) para cualquier paciente particular pueden depender de una variedad de factores incluyendo el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del agente farmacéutico específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, vía de administración, y/o la velocidad de excreción o metabolismo de la proteína de fusión específica empleada; la duración del tratamiento; y factores similares como es bien conocido en las técnicas médicas.

[0174] En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz varía de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso del cerebro a 500 mg/kg de peso del cerebro, por ejemplo, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso del cerebro a 400 mg/kg de peso del cerebro, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso del cerebro a 300 mg/kg del peso del cerebro, desde aproximadamente 0,005 mg/kg de peso del cerebro a 200 mg/kg de peso del cerebro, desde aproximadamente 0,005 mg/kg de peso del cerebro a 100 mg/kg de peso del cerebro, desde aproximadamente 0,005 mg/kg de peso del cerebro a 90 mg/kg de peso del cerebro, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso del cerebro a 80 mg/kg de peso del cerebro, desde aproximadamente 0,005 mg/kg de peso del cerebro a 70 mg/kg de peso del cerebro, desde aproximadamente 0,005 mg/kg de peso del cerebro a 60 mg/kg de peso del cerebro, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso del cerebro a 50 mg/kg de peso del cerebro, desde aproximadamente 0,005 mg/kg de peso del cerebro a 40 mg/kg de peso del cerebro, desde aproximadamente 0,005 mg/kg de peso del cerebro a 30 mg/kg de peso cerebro, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso del cerebro a 25 mg/kg de peso del cerebro, desde aproximadamente 0,005 mg/kg de peso del cerebro a 20 mg/kg de peso del cerebro, desde aproximadamente 0,005 mg/kg de peso del cerebro a 15 mg/kg de peso del cerebro, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso del cerebro a 10 mg/kg de peso del cerebro.

[0175] En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es mayor que aproximadamente 0,1 mg/kg de peso del cerebro, mayor que aproximadamente 0,5 mg/kg de peso del cerebro, mayor que aproximadamente 1,0 mg/kg de peso del cerebro, más de aproximadamente 3 mg/kg de peso del cerebro, más de aproximadamente 5 mg/kg de peso del cerebro, más de aproximadamente 10 mg/kg de peso del cerebro, más que aproximadamente 15 mg/kg de peso del cerebro, mayor que aproximadamente 20 mg/kg de peso del cerebro, más de aproximadamente 30 mg/kg de peso del cerebro, más que aproximadamente 40 mg/kg de peso del cerebro, más de aproximadamente 50 mg/kg de peso del cerebro, más que aproximadamente 60 mg/kg de peso del cerebro, más que aproximadamente 70 mg/kg de peso del cerebro, más de aproximadamente 80 mg/kg de peso del cerebro, más que aproximadamente 90 mg/kg de peso del cerebro, más de aproximadamente 100 mg/kg de peso del cerebro, más de aproximadamente 150 mg/kg de peso del cerebro, más de aproximadamente 200 mg/kg de peso del cerebro, más que aproximadamente 250 mg/kg de peso del cerebro, más que aproximadamente 300 mg/kg de peso del cerebro, más que aproximadamente 350 mg/kg de peso del cerebro, más de aproximadamente 400 mg/kg de peso del cerebro, más que aproximadamente 450 mg/kg de peso del cerebro, más que aproximadamente 500 mg/kg de peso del cerebro.

[0176] En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz puede también ser definida por mg/kg de peso corporal. Como apreciará un experto en la técnica, los pesos cerebrales y los pesos corporales se pueden correlacionar. Dekaban AS. "Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights," Ann Neurol 1978; 4: 345-56. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las dosis se pueden convertir, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Correlación entre pesos cerebrales, peso corporal y edades de los varones			
	Edad (año) (kg)	Peso cerebral (kg)	Peso corporal
meses)	3 (31-43	1,27	15,55
	4-5	1,30	19,46

[0177] En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz puede también ser definida por mg/15 cc de LCR. Como apreciará un experto en la técnica, las dosis terapéuticamente eficaces en base a los pesos cerebrales y los pesos corporales se pueden convertir a mg/15 cc de LCR. Por ejemplo, el volumen de LCR en seres humanos adultos es de aproximadamente 150 ml (Johanson CE, et al "Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease", Cerebrospinal Fluid Res 2008 14 de mayo; 5: 10). Por lo tanto, las inyecciones de dosis única de 0,1 mg a 50 mg de proteína a los adultos sería de aproximadamente 0,01 mg/15 cc de LCR (0,1 mg) a 5,0 mg/15 cc de LCR (50 mg) dosis en adultos.

[0178] Se ha de entender que para cualquier sujeto particular, regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de la terapia de reemplazo enzimático y que los intervalos de dosificación establecidos más en el presente documento son solamente ejemplares y no están destinados a limitar la invención reivindicada.

Kits

[0179] La presente descripción proporciona además kits u otros artículos de fabricación que contienen la formulación descrita en el presente documento y proporcionar instrucciones para su reconstitución (si se liofilizan) y/o uso. Kits y demás artículos de fabricación pueden incluir un recipiente, un IDDD, un catéter y cualesquiera otros artículos, dispositivos o equipos útiles en la administración intertecal y cirugía asociada. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas (por ejemplo, jeringas precargadas), ampollas, cartuchos, depósitos, o lyo-Jects. El recipiente puede estar formado a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. En algunas realizaciones, un recipiente es una jeringa precargada. Jeringas precargadas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, jeringas de vidrio de borosilicato con revestimiento de silicona al horno, jeringas de vidrio de borosilicato con silicona pulverizada, o jeringas de resina de plástico sin silicona.

[0180] Típicamente, el recipiente puede tener formulaciones y una etiqueta en, o asociarse con, el recipiente que puede indicar instrucciones para la reconstitución y/o uso. Por ejemplo, la etiqueta puede indicar que la formulación se reconstituye a las concentraciones de proteína como se describió anteriormente. La etiqueta puede indicar además que la formulación es útil o destinarse a, por ejemplo, la administración de TI. En algunas realizaciones, un recipiente puede contener una sola dosis de una formulación estable que contiene una enzima de sustitución (por ejemplo, una proteína de fusión Naglu). En diversas realizaciones, una dosis única de la formulación estable está presente en un volumen de menos de aproximadamente 15 ml, 10 ml, 5,0 ml, 4,0 ml, 3,5 ml, 3,0 ml, 2,5 ml, 2,0 ml, 1,5 ml, 1,0 ml, o 0,5 ml. Alternativamente, un recipiente que contiene la formulación puede ser un vial multiusos, que permite administraciones repetidas (por ejemplo, de 2-6 administraciones) de la formulación. Kits u otros artículos de fabricación pueden incluir además un segundo recipiente que comprende un diluyente adecuado (por ejemplo, BWFI, solución salina, solución salina tamponada). Tras la mezcla del diluyente y la formulación, la concentración final de proteína en la formulación reconstituida será generalmente al menos 1 mg/ml (por ejemplo, al menos 5 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml). Kits u otros artículos de fabricación pueden incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, IDDDs, catéteres, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

[0181] La invención se entenderá más plenamente por referencia a los siguientes ejemplos. No deben, sin embargo, interpretarse como limitantes de la invención como se describe en las reivindicaciones.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Expresión de proteínas de fusión rhNaglu y Naglu

[0182] Este ejemplo demuestra el desarrollo de una proteína humana recombinante Naglu destinada a la administración directa en el sistema nervioso central de los pacientes de Sanfilippo B a través de inyecciones intratecales.

[0183] Sanfilippo de tipo B (Sanfilippo B) es un trastorno autosómico recesivo que es causado por la deficiencia de alfa-N-acetilo-glucosaminidasa (Naglu). Naglu es la enzima que elimina la alfa-N-acetilglucosamina desde el extremo no reductor de los oligosacáridos en la vía de degradación de sulfato de heparina. El gen humano que codifica Naglu tiene seis exones que abarcan más de 8,2kb en cromosoma 17q21,1. Naglu humana se sintetiza en las células como un precursor de aminoácidos 743 que contiene un péptido señal. La secuencia de aminoácidos de longitud completa de Naglu se proporciona a continuación en la Tabla 5:

Tabla 5

MEAVAVAAAVGVLLLAGAGGAAGDEAREAAAVRALVARLLGPGPAADFSVSVERALAAKPGLDTYS
LGGGGAARVRVRGSTGVAAAAGLHRYLRDFCGCHVAWSGSQLRLPRPLPAVPGELTEATPNRYRYY
QNVCTQSYSFVWWDWARWEREIDWMALNGINLALAWSGQEAIWQRVYLALGLTQAEINEFFTGPAF
LAWGRMGNLHTWDGPLPPSWHIKQLYLQHRVLDQMRSFGMTPVLPAFAGHVPEAVTRVFPQVNVTK
MGSWGHFNCSYSCSFLLAPEDPIFPIIGSLFLRELIKEFGTDHIYGADTFNEMQPPSSEPSYLAAATTAVY
EAMTAVDTEAVWLLQGWLFQHQPQFWGPAQIRAVLGAVPRGRLLVLDLFAESQPVYTRTASFQGQPF
IWCMLHNFGGNHGLFGALEAVNGGPEAARLFPNSTMVGTGMAPEGISQNEVVYSLMAELGWRKDPV
PDLAAWVTSFAARRYGVSHPDAGAAWRLLLRSVYNCSGEACRGHNRSPLVRRPSLQMNTSIWYNRSD
VFEAWRLLLTSAPSLATSPAFRYDLLDLTRQAVQELVSLYYEEARSAYLSKELASLLRAGGVLAYELLP
ALDEVLASDSRFLLGSWLEQARAAAVSEAEADFYEQNSRYQLTLWGPEGNILDYANKQLAGLVANYY

TPRWRLFLEALVDSVAQGIPFQQHQFDKNVFQLEQAFVLSKQRYPSQPRGDTVDLAKKIFLKYYPRWV
AGSW **(SEQ ID NO:2)**

[0184] El péptido de señal de aminoácidos 23 se elimina cuando la proteína entra en el retículo endoplásmico. La proteína madura de Naglu resultante se ordena a los lisosomas donde la degradación enzimática de sulfato de heparina tiene lugar o se secreta en el espacio extracelular. El peso molecular de Naglu madura humana recombinante es 80,2 kDa sin glicosilación y aproximadamente 93,4 kDa con el peso añadido de la glicosilación. La secuencia de proteína madura de Naglu, en la que los residuos de aminoácidos 1-23 se escinden, se proporciona a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6

DEAREAAAVRALVARLLGPGPAADFSVSVERALAAKPGLDTYSLGGGGAARVRVRGSTGVAAAAGL
HRYLRDFCGCHVAWSGSQLRLPRPLPAVPGELTEATPNRYRYYQNVCTQSYSFVWWDWARWEREID
WMALNGINLALAWSGQEAIWQRVYLALGLTQAEINEFFTGPAFLAWGRMGNLHTWDGPLPPSWHIK
QLYLQHRVLDQMRSFGMTPVLPAFAGHVPEAVTRVFPQVNVTKMGSWGHFNCSYSCSFLLAPEDPIFP
IIGSLFLRELIKEFGTDHIYGADTFNEMQPPSSEPSYLAAATTAVYEAMTAVDTEAVWLLQGWLFQHQP
QFWGPAQIRAVLGAVPRGRLLVLDLFAESQPVYTRTASFQGQPFIWCMLHNFGGNHGLFGALEAVNG
GPEAARLFPNSTMVGTGMAPEGISQNEVVYSLMAELGWRKDPVPDLAAWVTSFAARRYGVSHPDAG
AAWRLLLRSVYNCSGEACRGHNRSPLVRRPSLQMNTSIWYNRSDVFEAWRLLLTSAPSLATSPAFRYD
LLDLTRQAVQELVSLYYEEARSAYLSKELASLLRAGGVLAYELLPALDEVLASDSRFLLGSWLEQARA
AAVSEAEADFYEQNSRYQLTLWGPEGNILDYANKQLAGLVANYYTPRWRLFLEALVDSVAQGIPFQQ
HQFDKNVFQLEQAFVLSKQRYPSQPRGDTVDLAKKIFLKYYPRWVAGSW **(SEQ ID NO:1)**

[0185] Para generar Naglu humana recombinante (rhNaglu), el ADNc de Naglu humano se insertó en un vector de expresión y se transfectó en la línea celular HT1080. Un ensayo de actividad enzimática Naglu se utilizó para la detección de clones HT1080 de alta expresión. La proteína secretada generada por Naglu expresando células HT1080 es la forma madura de Naglu humana. La Naglu humana recombinante producida por las células HT1080 está glicosilada. La rhNaglu está completamente activa hacia un sustrato sintético, 4-MU-N-acetilo alfa-D-glucosaminida.

[0186] La diferencia más significativa entre Naglu recombinante y la aislada de fuentes naturales, tales como Naglu urinaria, placentaria y del hígado es la falta de los glicanos de manosa-6-fosfato (M6P). La falta de M6P en Naglu recombinante ha sido reportada por varios investigadores en el estudio de rhNaglu derivada de células CHO y HEK 293. También se encontró que RhNaglu expresada por HT1080 estaba privada de glicano M6P. No se conoce el mecanismo para la falta de M6P en Naglu recombinante. Los presentes inventores han desarrollado varias proteínas de fusión y modificaciones de glicano en un esfuerzo por superar la dependencia de M6P para la administración celular en Naglu recombinante (Figuras 1-3).

Naglu-TAT

[0187] Una proteína de fusión de Naglu y el dominio de transducción de proteína de VIH se denominó Naglu-TAT. Naglu-TAT fue diseñado, producido, y purificado. Péptido TAT se ha demostrado para facilitar la transducción de la proteína a través de las membranas celulares en el citoplasma. Se ha demostrado previamente que el péptido TAT fusionado con la enzima lisosomal beta-glucuronidasa (GUS-TAT) resultó en una mayor reducción de almacenamiento lisosomal en el riñón de GUS después de la inyección IV en ratones MPSVII (Grubb JH et al, Rejuvenation Research 13: 2, 2010). Experimentos separados demostraron la mejora de la captación celular de Naglu-TAT en fibroblastos de pacientes de Sanfilippo B en comparación con rhNaglu (datos no mostrados). Sin embargo, estudios in vivo de biodistribución indicaron que tras la inyección TI, Naglu-TAT mostró biodistribución similar a rhNaglu y sólo ligeramente mejoraron la captación celular. En este estudio, la mayoría de la proteína se mantuvo en las meninges con una penetración muy limitada para el parénquima del cerebro. Este resultado indicó que la administración mediada por péptido TAT no era suficiente para reemplazar receptor mediado por la captación celular de Naglu.

Naglu Kif

[0188] Naglu-Kif fue producido usando un proceso de cultivo celular modificado con la adición de kifunensina a los medios. Naglu-Kif fue propuesto, producido y purificado. La adición de kifunensina alteró la ruta de glicosilación de rhNaglu para mejorar la producción de glicano de alta manosa y reprimir la adición de hidratos de carbono complejos. Kifunensina inhibe la actividad Golgi alfa-manosidasa I, y de este modo inhibe la eliminación del glicano de alta manosa, que conduce a la represión del acoplamiento de glicanos complejos. Como resultado, Naglu-Kif contiene en su mayoría glicanos de alta manosa. La captación celular utilizando líneas celulares derivadas de macrófagos confirmó la captación dependiente de receptor de manosa de Naglu-Kif. Sin embargo, un experimento in vivo indicó que después de la inyección intratecal en el líquido cefalorraquídeo de ratas canuladas de tipo salvaje, Naglu-Kif no logró mostrar una mejor distribución en el parénquima del cerebro sobre rhNaglu. Se concluyó que captación mediada por receptor de manosa de Naglu-Kif no facilitará la administración rhNaglu en el SNC.

Naglu-ApoE

[0189] El dominio de unión al receptor de ApoE (Apolipoproteína E) se fusionó al C-terminal de Naglu para utilizar el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR) para la captación celular de Naglu. Este enfoque se basa en estudios que apoyan la presencia de LDLR en la acreditación (Begley DJ et al., Current Pharmaceutical Design, 2008, 14, 1566-1580). Un estudio de ratón preliminar in vivo indicó que Naglu-ApoE administrado por vía intravenosa en Sanfilippo B de ratón no se transportó al cerebro.

Administración IV de rhNaglu

[0190] Se llevaron a cabo experimentos in vivo para investigar rhNaglu y Naglu-IGFII en el transporte a través de la BBB. El estudio indicó que la administración IV de rhNaglu y Naglu-IGFII en ratón Sanfilippo B no dio como resultado ninguna enzima en el cerebro, y mejora histo-patológica no se encontró en el cerebro de ratón tratado.

Naglu-IGFII

[0191] Naglu-IGFII se construyó mediante la fusión de una porción de la secuencia de factor de crecimiento similar a la insulina II (aa 8 a 67, 8-67IGFII) al C-terminal de la secuencia Naglu. En comparación con la molécula de IGFII de longitud completa, se informa que 8-67IGFII se unirá a receptor M6P/IGF II con una mayor afinidad de 2-10 veces, mientras que su capacidad para unirse al receptor de IGF I se disminuye 30 veces (Hashimoto R, JBC 1995 270 (30): 18.013-18.018).

[0192] La molécula de Naglu-IGFII contiene una secuencia enlazante que fue insertada entre Naglu y 8-67IGFII. Esta secuencia de ligador consistió en tres repeticiones en tándem de "GGGGGAAAAGGGG" (SEQ ID NO: 4) con dos secuencias de "GAP" que flanquean cada extremo y una secuencia de "GAP" entre cada repetición final. La secuencia real del enlazador se proporciona en la Tabla 7 a continuación:

Tabla 7: Secuencia enlazadora

Naglu-GAPGGGGGAAAAGGGGGAPGGGGGAAAAGGGGGAPGGGGGAAAAGGGGGAP-IGFII **(SEQ ID NO:5)**

[0193] Para generar la fusión Naglu-IGFII recombinante, el ADNc se insertó en un vector de expresión,

pXD671, y se transfectó en una línea celular de fibroblastos humanos. La secuencia de proteína de la proteína de fusión Naglu-IGFII recombinante se proporciona a continuación en la Tabla 8:

Tabla 8: Secuencia de proteína de proteína de fusión de Naglu-IGFII recombinante

DEAREAAAVRALVARLLGPGPAADFSVSVERALAAKPGLDTYSLGGGGAARVRVRGSTGVAAAAGL
HRYLRDFCGCHVAWSGSQLRLPRPLPAVPGELTEATPNRYRYYQNVCTQSYSFVWWDWARWEREID
WMALNGINLALAWSGQEAIWQRVYLALGLTQAEINEFFTGPAFLAWGRMGNLHTWDGPLPPSWHIK
QLYLQHRVLDQMRSFGMTPVLPAFAGHVPEAVTRVFPQVNVTKMGSWGHFNCSYSCSFLLAPEDPIFP
IIGSLFLRELIKEFGTDHIYGADTFNEMQPPSSEPSYLAAATTAVYEAMTAVDTEAVWLLQGWLFQHQP
QFWGPAQIRAVLGAVPRGRLLVLDLFAESQPVYTRTASFQGQPFIWCMLHNFGGNHGLFGALEAVNG
GPEAARLFPNSTMVGTGMAPEGISQNEVVYSLMAELGWRKDPVPDLAAWVTSFAARRYGVSHPDAG
AAWRLLLRSVYNCSGEACRGHNRSPLVRRPSLQMNTSIWYNRSDVFEAWRLLLTSAPSLATSPAFRYD
LLDLTRQAVQELVSLYYEEARSAYLSKELASLLRAGGVLAYELLPALDEVLASDSRFLLGSWLEQARA
AAVSEAEADFYEQNSRYQLTLWGPEGNILDYANKQLAGLVANYYTPRWRLFLEALVDSVAQGIPFQQ
HQFDKNVFQLEQAFVLSKQRYPSQPRGDTVDLAKKIFLKYYPRWVAGSWGAPGGGGGAAAAAGGGG
GGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPA
SRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPAKSE **(SEQ ID NO:6)**

[0194] Ensayo de actividad enzimática Naglu se utilizó para la detección de clones HT1080 de alta expresión. Para aumentar aún más la expresión de Naglu-IGFII, la línea celular seleccionada se transfectó de nuevo con plásmido de expresión adicional que lleva la misma unidad de transcripción. En las líneas celulares tanto de única transfección y transfección doble, la Naglu-IGFII secretada contiene la secuencia de Naglu de longitud completa madura y 8-67IGFII de longitud completa. La proteína de fusión Naglu-IGFII mostró actividad enzimática hacia el mismo sustrato sintético, 4-MU-N-acetilo alfa-D-glucosaminida. Las Figuras 4-6 representan un ciclo de producción de onda ejemplar utilizando la línea celular Naglu-IGFII de doble transfección. La producción de la onda de esta línea celular Naglu-IGFII presentada en la Figura 4 logra 0,5 pcd (pictograma por millones de células por día) de Naglu-IGFII.

Purificación de rhNaglu y Naglu-IGFII

[0195] Un proceso de purificación similar se aplicó para rhNaglu, Naglu-IGFII, Naglu-ApoE y Naglu Kif. Un proceso de purificación modificado se aplicó para Naglu-TAT. La purificación de rhNaglu y proteína Naglu-IGFII se resumen a continuación.

[0196] Para la purificación de rhNaglu y Naglu-IGFII, se utilizó un proceso de tres pasos (Figura 7). En primer lugar, el medio acondicionado se concentró usando un dispositivo de ultrafiltración (UF). A continuación, los medios concentrados se aplicaron a la columna de cromatografía de sefarosa de butilo (butilo), y, posteriormente, columna de cromatografía de una sefarosa Q (Q). La proteína purificada se cambió de tampón en una formulación de PBS (fosfato de sodio 11,9 mM, 2,7 mM de fosfato de potasio, cloruro de sodio 137 mM a pH 7,4) para el almacenamiento. rhNaglu y Naglu-IGFII purificados tenían una pureza de 99% y 95%, respectivamente, tal como se evaluó mediante cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (datos no mostrados).

Propiedad bioquímica de rhNaglu y Naglu-IGFII

[0197] Todas las variantes Naglu, rhNaglu, Naglu-TAT, Naglu-IGFII, Naglu-Kif y Naglu-ApoE mostró actividad biológica similar hacia el sustrato sintético, 4-metilumbeliferilo-N-acetilo-aD-glucosaminida. Todas las variantes fueron negativas para glicosilaciones fosfariladas como se determina por análisis de glucano a través de cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento y por análisis de monosacáridos.

[0198] La siguiente sección resume las propiedades bioquímicas de rhNaglu y Naglu-IGFII solamente (Tabla 9). Como puede verse en la Tabla 9, la comparación bioquímica de rhNaglu y Naglu-IGFII indica actividad enzimática similar y estabilidad entre las dos proteínas. El pH óptimo para la estabilidad térmica se mide por calorimetría diferencial de barrido para rhNaglu era pH 5 - pH 6,5, y pH 6 a pH 6,5 para Naglu-IGFII. Este resultado está de acuerdo con el requisito de hidrolisasa lisosomal para exhibir una estabilidad óptima en el ambiente ácido de los lisosomas.

Tabla 9: comparación bioquímica de rhNaglu y Naglu-IGFII

Sistema de expresión	Células HT 1080
Formulación (PBS)	Fosfato de sodio 11,9 mM, fosfato de potasio 2,7 mM cloruro sódico 137 mM a pH 7,4
Límites de solubilidad	16,5 mg/ml; rhNaglu 26 mg/ml; Naglu-IGFII
Actividad enzimatica	Km = 0,3 mM; rhNaglu Km = 0,2 mM; Naglu-IGFII
pH óptimo para Termo-estabilidad	5-6,5; rhNaglu 6-6,5; Naglu-IGFII
Estado de asociación nativa	Trímero (MALS y AUC) (estructura cristalina del rhNaglu)
Glicosilación M6P	Negativo

[0199] Además, Naglu-IGFII se concentró con éxito hasta 26 mg/ml como se determina mediante un ensayo de proteínas de Bradford y sin signos de agregación o pérdida de actividad después de almacenarse a 4°C durante un máximo de 3 meses. Una formulación (por ejemplo, para la administración de TI) de 5 mM de fosfato de sodio pH 6,5, 150 mM de cloruro de sodio, 0,005% de Polisorbato 20 también fue ensayado para la formulación de Naglu-IGFII. Se observaron estabilidad y solubilidad similares entre Naglu-IGFII en la formulación de PBS y las formulaciones de TI (datos no mostrados).

Estructura cristalina de Naglu

[0200] Uno de los avances en el desarrollo de rhNaglu fue la determinación de la estructura cristalina de Naglu por PEPR. Este logro proporcionó información a la estructura del Naglu, y ayuda en la predicción de la estabilidad de proteínas y el requisito de formulación. Se contempla que la alineación de las mutaciones de pacientes de Sanfilippo B en la estructura 3D de Naglu proporcionará información y una herramienta para el desarrollo de fármacos.

[0201] Los cristales (Figura 8) se obtuvieron de proteína rhNaglu purificada a partir de medios de cultivo tratado con inhibidor de manosidasa-I, kifunensina. Naglu Kif contiene secuencias de proteínas idénticas como rhNaglu, pero diferente patrón de glicosilación. Los cristales adquiridos de Naglu Kif se cultivaron a pH = 7,5 y la estructura de Naglu Kif se resolvió en resolución de 2,4 Å por cristalografía de rayos X. La estructura de Naglu (Figura 9) se identifica por tener tres dominios distintos, un dominio N-terminal (dominio-I, aa 24-126) seguido de un (⟨/®) 8 dominio de barril que contiene el glutamatos catalíticos (dominio-II, aa 127-467) y un todo dominio helicoidal C-terminal (dominio-III, aa 468-743). La estructura de dominio similar se ha observado para otra proteína de familia de hidrolasa de glucósido 89, cpGH89, un homólogo bacteriano de Naglu (Ficko-Blean E, et al., PNAS 6 de mayo 2008 vol. 105 nº 18 6560-6565). El sitio activo se encuentra en una hendidura entre los dominios II y III y los residuos catalíticos son identificados como E316 y E446 ubicados en el dominio II.

[0202] Una disposición de trímero simétrico de moléculas Naglu se puede ver en la estructura cristalina (Figura 10), que está de acuerdo con el estado de asociación nativo observado de ultracentrifugación analítica (AUC) y la cromatografía de exclusión de tamaño con experimentos de dispersión de luz de multi-ángulo en línea (SEC-MALS). Interacción hidrófoba y enlaces de hidrógeno en el dominio II tienen la conformación trimérica de la proteína. H227 parece formar interacciones de apilamiento con R297 de una molécula adyacente durante la trimerización. Además, E302 forma la interacción de enlace de hidrógeno intermolecular con K301.

[0203] Naglu tiene seis sitios potenciales de N-glicosilación (N261, N272, N435, N503, N526 y N532) y todos los seis sitios están glicosilados en la estructura cristalina. Densidades electrónicas claras para dos moléculas de NAG unidos a cada uno de N272 y N435 y una molécula NAG cada uno unido a N261, N503, N526 y N532 se observaron en el mapa de densidad de electrones a 2,4 Å de resolución. El resto de las estructuras de glicano no son claramente visibles en el mapa de densidad de electrones debido a la naturaleza flexible de los restos de azúcares expuestos a disolvente.

[0204] La información estructural de las ayudas Naglu en el análisis de estabilidad y caracterización de nivel molecular de Naglu. Hay ocho cisteínas en Naglu, cuatro de ellos forman dos puentes de disulfuro (Cys273-Cys277 y Cys504-Cys509). Los otros cuatro, C97, C99, C136 y C405 aparecen como cisteínas reducidas en la estructura cristalina a pesar de que no hay agentes reductores utilizados durante los procesos de purificación y cristalización. C97 y C99 están cerca uno del otro y están parcialmente expuestos cerca de la superficie. Sin embargo C136 y C405 están enterrados y es

improbable que forman enlaces de disulfuro intermoleculares en base a la estructura.

[0205] Se contempla que, en base a la información estructural disponible en la actualidad, la cartografía de las mutaciones de los pacientes de Sanfilippo B arrojará luz sobre futuros potenciales de desarrollo de fármacos para esta enfermedad tales como el diseño racional de los chaperones moleculares pequeños. Mutaciones San B graves reportadas de la literatura (Yogalingam 2001) fueron asignadas en la estructura cristalina. Unas agrupaciones de mutaciones podrían estar relacionados con las regiones estructurales o funcionales, tales como el sitio activo, un bucle que contiene tres sitios de glicosilación en el dominio-III, y la interfaz entre los tres dominios (Figura 10). Además, las agrupaciones de mutaciones podrían verse en N-terminal de dominio-I y el haz helicoidal C-término de dominio-III. La mayor parte de estos residuos que están mutados son parte de enlaces de hidrógeno y otras interacciones no covalentes y están involucrados en la estabilización estructural de Naglu.

Ejemplo 2: En el estudio in vitro de rhNaglu y Naglu-IGFII

[0206] El mecanismo de captación celular por cada una de las variantes Naglu se estudió utilizando dos cepas de células de fibroblastos de pacientes de Sanfilippo B, GM02391 (P359L) y GM 01426 (E153K), y una línea celular de fibroblastos humanos normales. Atribuido a la expresión del receptor de M6P en la línea celular, las células de fibroblastos se utilizan tradicionalmente por los investigadores para el estudio de la captación celular de enzimas lisosomales.

[0207] Estudios de captación celular se realizaron por incubación de células de fibroblastos con rhNaglu o Naglu-IGFII durante cuatro horas a 37°C. Las células se lavaron y se lisaron después de la incubación, y se midió la actividad enzimática Naglu en los lisados celulares. La incubación de rhNaglu con células de fibroblastos resultó en una cantidad apenas detectable de la enzima intracelularmente. En contraste, la incubación de Naglu-IGFII con células de fibroblastos dio lugar a nivel pronunciado de la enzima intracelular (Figura 11). La cantidad de Naglu-IGFII internalizado alcanzó la saturación al aumentarse la cantidad de enzima utilizada para la incubación. La absorción de saturación dependiente de la dosis es un hallazgo típico para receptor mediado por la captación celular. Además, la internalización de Naglu-IGFII no fue inhibida por M6P exógeno, pero fue inhibida completamente por IGFII exógeno (Figura 11). Este resultado indicó que la internalización Naglu-IGFII en células de fibroblastos depende de receptor de M6P/IGFII de una manera independiente de glicosilación.

[0208] Un experimento también se llevó a cabo para estudiar el tráfico de rhNaglu y Naglu-IGFII a los lisosomas. Se utilizaron células de fibroblastos de pacientes de Sanfilippo B (GM01426) para este estudio. La detección de rhNaglu y Naglu-IGFII se examinó mediante la tinción de las células con anticuerpo policlonal Naglu anti-humano después de la incubación inicial de las proteínas con las células. La tinción Inmunofluorescente de LAMP-1 (proteína de membrana lisosomal asociada 1) se utilizó para la detección de los lisosomas. Co-localización de rhNaglu y Naglu-IGFII con los lisosomas se visualizó por microscopía confocal (Figura 12).

[0209] Se observóa amplia internalización de Naglu-IGFII después de 4 horas de incubación de la proteína con las células, se demostró co-localización de Naglu-IGFII con los lisosomas. Por el contrario, rhNaglu no pudo demostrar la internalización en el mismo marco de tiempo, y no se observó co-localización con los lisosomas. Este resultado proporciona además la evidencia de que Naglu-IGFII se internaliza en las células y se transporta al compartimento celular correcto, los lisosomas. La media vida de internalizado Naglu-IGFII en células de fibroblastos de pacientes de Sanfilippo B se determinó que era de 1,5 días (datos no mostrados).

Ejemplo 3: Estudios in vivo en modelos de ratón

Rata canulada de tipo salvaje

[0210] Además del modelo de ratón Sanfilippo B, la rata canuladz de tipo silvestre, un modelo de animal no deficiente, también se utilizó para el cribado de la molécula *in vivo.* Las ratas canuladas de tipo silvestre habían implantado quirúrgicamente cánula en la región del lumbar superior y torácica inferior de la médula espinal, y una única inyección de 35ul a la LCR se hizo a través de la cánula. Los criterios evaluados para el examen molecular utilizando este modelo animal eran un ensayo de actividad de Naglu e inmunohistoquímica del cerebro y la médula espinal.

Modelo de ratón Sanfilippo B

[0211] El modelo de ratón de Sanfilippo B (ratón de Naglu -/-, ratón de Sanfilippo BSanfilippo B) se generó por E. Neufeld y compañero (Li HH, et al, PNAS 96 (25): 14505-14510; 1999). El exón 6 del gen Naglu del ratón se ve interrumpido por la inserción de un marcador de selección, gen resistente a neomicina. El homocigoto resultante de ratón Naglu -/- son completamente deficientes en Naglu (Figura 13), y tienen la acumulación total de GAG en el hígado y el riñón. A pesar de la carencia total de Naglu,

estos ratones son generalmente sanos y tienen una duración de vida de 8-12 meses. Los cambios de la expresión de otras enzimas lisosomales suceden a la edad de aproximadamente 5 meses, estos cambios incluyen un aumento compensatorio de ®-galactosidasa, ⟨-glucosidasa, ®-glucuronidasa y ®–hexosaminidasa en el hígado y el cerebro, la elevación de ⟨-L-iduronidasa en el hígado pero no en el cerebro, y la reducción de la neuraminidasa en el hígado y el cerebro. La muerte generalmente se produce como resultado de la retención urinaria y la infección urinaria. El modelo de ratón Sanfilippo B se ha estudiado ampliamente en la literatura para mostrar los cambios patológicos de Sanfilippo B. Se informó que la patología del SNC relacionada con fenotipo de ratón de Naglu -/- era hipo-activa a la edad de 4,5 meses, pero también se ha observado hiperactividad en otras edades.

[0212] Los cambios neuro-patológicos en ratón de Naglu -/- se describen como vacuolas y cuerpos de inclusión en las neuronas, macrófagos y células epiteliales como se observa por EM (microscopía electrónica). Estos cambios patológicos suelen comenzar a los 33 días de edad, y empeoran progresivamente a medida que los animales envejecen. Astrocitos activados y células microgliales también se demostraron por análisis histo-patológico. El análisis bioquímico de dos gangoliosides, GM2 y GM3, mostró aumentos de 5 veces y 9 veces en el cerebro. (Ya que GM2 y GM3 no son sustratos directos de Naglu, y podría ser difícil de demostrar la reducción significativa después de ERT para el período corto de tiempo, que se no se utilizaron como biomarcadores finales para POC).

[0213] El análisis bioquímico hecho por la medición de actividades enzimáticas Naglu y niveles de GAG, el análisis histológico se realizó por el anticuerpo anti-humano Naglu, anticuerpo anti-LAMP-1, anticuerpo anti-Iba-1 e inmunohistoquímica de anticuerpo anti-GFAP. El anticuerpo Naglu anti-humano utilizado para este estudio fue un anticuerpo monoclonal de ratón que no une Naglu endógeno murino en el ratón en peso o el Naglu mutado en ratón de Sanfilippo B. La inmunotinción de LAMP-1 utilizada como anticuerpo se une a proteína de membrana lisosomal, asociada a la proteína de membrana lisosomal 1. La tinción Iba-1 utilizó un anticuerpo que se une a la proteína adaptadora de unión a calcio ionizado que es específico para células de la microglía y los macrófagos. La tinción de GFAP utiliza un anticuerpo que se une a la proteína ácida fibrilar glial que es específico para astrocitos.

En el examen de la actividad biológica in vivo mediante inyecciones intracraneales (IC) en ratón de Sanfilippo B

[0214] El objetivo de este estudio consistió en evaluar la actividad biológica de las enzimas Naglu *in vivo.* En este estudio, las proteínas se administraron a través de inyección de IC en el cerebro de Sanfilippo B de ratón. La edad de los ratones de Sanfilippo B para el estudio fue muy similar, a las 8 semanas de edad. La vía de inyección IC ofreció el mejor de los casos para evaluar la eficacia de las moléculas. Las proteínas Naglu se evaluaron por la capacidad de absorbirse en las células neuronales y a reducir el almacenamiento lisosómico. La inmunohistoquímica se utilizó para evaluar la biodistribución. Y almacenamiento lisosomal se caracterizó por el número y el tamaño de la tinción positiva utilizando la inmunotinción de LAMP-1.

[0215] La inyección IC se realizó por inyección directa a través del cráneo del ratón Sanfilippo B en la corteza derecha del cerebro. Dos microlitros, o 35 µg de proteína Naglu se inyectaron en cada animal. Sacrificios de los animales se llevaron a cabo 7 días después de la inyección. Se pre-determinó el momento del sacrificio en un estudio piloto en el cual se llevaron a cabo los sacrificios de los animales 3, 7 y 14 días después de la inyección. A partir del estudio piloto, se determinó que 7 días tras la inyección es el momento óptimo para el estudio inmunohistoquímico. Las secciones de cerebro se cortaron transversalmente (Figura 14), y se realizó inmunotinción de Naglu y Lamp-1. La captación celular en tanto las neuronas como las células gliales en ratón de Sanfilippo B tratado con rhNaglu y Naglu-IGFII se demostró mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo de Naglu anti-humano (Figuras 14-16). No hubo diferencia significativa entre ratón de Sanfilippo B tratado con rhNaglu y Naglu-IGFII, en cuanto a la captación celular. Adicionalmente, la inmunotinción de LAMP-1 del tejido cerebral de ratón tratado tanto con rhNaglu y Naglu-IGFII indica un nivel significativo de reducción de almacenamiento lisosomal. El nivel de reducción de almacenamiento lisosomal en grupos tratados tanto con rhNaglu y Naglu-IGFII fue casi al mismo nivel de ratón de tipo silvestre normal.

[0216] La reducción de almacenamiento lisosomal también se observó en ratones de Sanfilippo B ensayados con Naglu-TAT, Naglu-Kif y Pert-Naglu después de la inyección de IC (datos no mostrados). Este estudio demostró la actividad biológica *in vivo* de todas las variantes de Naglu.

[0217] En un estudio separado, se les administró por TI a ratones deficientes en Naglu un vehículo o, alternativamente, una, dos o tres dosis semanales de un constructo de proteína de fusión Naglu-IGF-II (Naglu) recombinante en PBS. Un grupo de tipo silvestre no tratado de ratones sirvió como un control de tipo silvestre sin tratar y se les administró un vehículo sin Naglu. Los ratones se sacrificaron después de 24 horas después de la inyección final, seguido de la preparación del tejido para la inmunohistoquímica (IHC) y el análisis histopatológico.

[0218] La distribución de Naglu a los tejidos cerebrales de los ratones deficientes en Naglu era evidente después de administración TI de la Naglu recombinante. Como se ilustra en la Figura 17A, la administración TI de la Naglu recombinante a los ratones Naglu deficientes dio como resultado la reducción generalizada de vacuolización celular en los tejidos de la materia blanca en comparación con ratones deficientes por Naglu a los que se les administró por TI el vehículo. Del mismo modo, y como se ilustra en la Figura 17B, el análisis morfométrico reveló una marcada reducción en la inmunotinción LAMP1 en los tejidos de la sustancia blanca de los ratones tratados con relación a los ratones deficientes por Naglu sin tratar, reflejando de este modo una mejora en la patología de la enfermedad.

[0219] Como se muestra en las Figuras 18A-B, en cada área de tejido cerebral evaluado (la corteza, el núcleo caudado y putamen (CP), el tálamo (TH), cerebelo (CBL) y la materia blanca (WM)) el área positiva por LAMP se redujo en los ratones tratados con Naglu con relación a los ratones de control deficientes por Naglu sin tratar, y se acercó al área positiva por LAMP-de los ratones de tipo salvaje. Particularmente notable es que las áreas positivas por LAMP en cada área de tejido cerebral analizado se redujeron aún más después de la administración TI de dos o tres dosis (Figura 18B) en relación con una sola dosis (Figura 18A) de Naglu.

[0220] Estos resultados también confirman que Naglu administrado por TI es capaz de alterar la progresión de enfermedades de almacenamiento lisosomal, tales como síndrome de Sanfilippo de tipo B en el modelo de ratón deficientes por Naglu, lo que confirma además la capacidad de enzimas administradas por TI como Naglu para tratar las manifestaciones del SNC asociadas con enfermedades de almacenamiento lisosomal, tales como síndrome de Sanfilippo de tipo B.

Examen de la molécula por vía inyecciones intratecales (TI) en rata canulada de tipo silvestre

[0221] Este estudio imita directamente un enfoque mediado por puerto por la administración del fármaco. Proteína Naglu se administraba por vía inyecciones de TI en ratas canuladas de tipo silvestre para determinar la biodistribución en el parénquima del cerebro.

[0222] La cánula en estos animales se colocó en el lumbar superior y porción torácica inferior de la médula espinal (Figura 19). Los animales fueron inyectados con 35 µl, o 385 µg de rhNaglu, Naglu-TAT, Naglu-IGFII y Pert-Naglu, a través de la cánula (debido a la limitación de solubilidad, Naglu Kif se inyectaron con sólo el 38,5 ug, que es 10 veces menos que el resto de la Naglu). Los sacrificios sucedieron 4 horas y 24 horas después de las inyecciones.

[0223] Se recogieron los tejidos del cerebro y la médula espinal y se midieron por el ensayo de actividad Naglu. En el cerebro de los animales tratados, animales tratados con Naglu-TAT y Naglu-IGFII mostraron una actividad más alta que la rhNaglu y todos los demás animales tratados con variantes de Naglu (Figura 20). Como tendencia general, la actividad de Naglu fue significativamente mayor en la médula espinal que en el cerebro de todos los animales tratados (datos no mostrados). Este fenómeno puede indicar que las proteínas se recogieron más en el lugar más cercano a la inyección de TI.

[0224] El análisis inmunohistoquímico indica que la biodistribución del grupo Naglu-IGFII tratado fue más extensa en el cerebro de todos los demás grupos tratados con variantes de Naglu 24 hr después de las inyecciones (Figuras 21 y 22). En los animales tratados con rhNaglu se observó la proteína en las meninges de sólo el cerebro. En la sección de la médula espinal, IHC indicó cierta captación celular de rhNaglu en las neuronas de la materia gris, pero en un grado mucho menor que la captación Naglu-IGFII en las neuronas de la médula espinal (datos no mostrados).

[0225] En grupo inyectado con Naglu-TAT, a pesar de que se observó una actividad más alta de Naglu en el tejido cerebral mediante análisis bioquímico, pero IHC no indicó penetración de Naglu-TAT en el parénquima del cerebro, excepto que queda en las meninges. Además de Naglu-IGFII, todas las otras variantes Naglu no lograron mostrar biodistribución más allá de las meninges, un fuerte testimonio de la dependencia de los receptores/IGFII M6P para la captación celular de Naglu en el cerebro después de la inyección de TI. Este estudio apuntó a Naglu-IGFII como la molécula principal para el desarrollo de fármacos para Sanfilippo B.

Ejemplo 4: Estudio de prueba de concepto utilizando Naglu-IGFII

Diseño experimental

[0226] El estudio de prueba de concepto fue diseñado para mostrar tanto la biodistribución como la inversión del almacenamiento lisosomal después de la inyección TI de Naglu-IGFII de ratones de Sanfilippo B. Para este estudio, tres grupos de ratones de Sanfilippo B de 8 semanas de edad fueron tratados con una inyección TI de Naglu-IGFII. Cada inyección de TI constituye un volumen de 10 ul o 260 ug de Naglu-IGFII. Había tres grupos tratados, grupo de 1x inyección, 2x inyección y 3x inyección. Para el grupo de inyección 1x, una sola dosis de la proteína se administró en el día 0. Los animales se

sacrificaron 24 h después de la inyección. Para el grupo de inyección 2x, dos inyecciones de TI se administraron en el día 0 y el día 7, y los animales se sacrificaron 24 horas después de la última inyección. Para el grupo de inyección 3x, inyecciones de TI se administraron en el día 0, día 7 y día 14, y los animales se sacrificaron 24 horas después de la última inyección. También se incluyeron tres grupos de ratón tratados con vehículo. Para los grupos de control del vehículo, los ratones de Sanfilippo B fueron inyectados con vehículo en el mismo intervalo de tiempo que los grupos tratados y sacrificados de la misma forma como los grupos tratados.

[0227] Se aplicaron tanto los análisis bioquímicos como los histológicos para evaluar el resultado del estudio. Los análisis bioquímicos incluyen un ensayo de actividad de Naglu para medir la cantidad de enzimas en el tejido y un ensayo de GAG totales para evaluar la reducción de almacenamiento lisosomal. Hígado y cerebro fueron los dos tejidos sometidos a análisis bioquímicos (Figura 23 y 24). Los análisis histológicos incluyen tinción H&E de los tejidos para la evaluación morfológica (datos no mostrados), y la tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo Naglu anti-humano, LAMP, Iba y GFAP (datos de tinción Iba y GFAP no mostrados).

[0228] El anticuerpo Naglu anti-humano utilizado para este estudio fue un anticuerpo monoclonal de ratón que no se une Naglu endógeno murino en el ratón en peso o el Naglu mutado en ratones de Sanfilippo B. Inmunotinción de Lamp-1 con el uso de un anticuerpo, se une a la proteína de membrana lisosomal asociada. La tinción de Iba-1 con el uso de un anticuerpo se une a calcio ionizado de unión a proteína adaptadora que es específico para células de la microglía y los macrófagos. La tinción GFAP con el uso de un anticuerpo que se une a la proteína ácida fibrilar glial que es específica para astrocitos.

[0229] Imágenes microscópicas representativas de inmunofluorescencia de Naglu se muestran en la Figura 25. Áreas ejemplares del cerebro se representan en la Figura 26. A pesar de que Naglu-IGFII se detectó en la corteza cerebral, que está más cerca de las meninges, que no ha sido encontrado en la región subcortical tal como el núcleo caudado, el tálamo y la sustancia blanca (datos no mostrados). Dado que la inmunotinción de LAMP-1, Iba-1 y GFAP de las mismas áreas subcorticales hizo demostrar la reversión de almacenamiento lisosomal, se creía que la inmunotinción negativa de Naglu en las zonas profundas del cerebro se debía probablemente a la sensibilidad de la inmunofluorescencia Naglu.

[0230] Imágenes microscópicas representativas de inmunotinción de Lamp-1 se muestran en las Figuras 27-31. Para demostrar la extensión de la distribución de las proteínas y la eficacia, la corteza cerebral y las regiones subcorticales, tales como el núcleo caudado, el tálamo y la sustancia blanca, y la corteza cerebelosa se seleccionaron para el análisis inmunohistoquímico. El resultado de Iba-1 y inmunotinción de GFAP (datos no mostrados) indicó que lo que se ve en la inmunotinción de Lamp-1 fue el efecto combinado de los cambios de las células microgliales y astrocitos, los dos tipos de células que fueron reportados a ser afectados en el modelo de ratón de Sanfilippo B (Li 2002, Ohmi 2002), además de las neuronas. Debido a limitaciones técnicas, la inmunotinción de Lamp-1 no fue capaz de revelar el almacenamiento lisosomal en las neuronas. Para observar mejor la acumulación lisosomal en las neuronas, tales vacuolas y las inclusiones, se utiliza por lo general la microscopía electrónica (EM no se incluyó en el estudio actual).

[0231] Se apreciará que la identificación de tipos de células se limitó a las neuronas y células gliales. Las neuronas se identifican típicamente por el núcleo relativamente grande y pálido que contiene uno o más nucleolos manchados densamente, y el citoplasma frecuentemente detectable. Las células gliales se identifican generalmente por el pequeño núcleo denso y el citoplasma inconspicuo. La distinción entre los diferentes tipos de células gliales, tales como astrocitos, células de la microglía, células ependimarias y oligodendrocitos, típicamente se realiza mejor mediante la tinción con marcadores específicos de tipo celular.

[0232] Además de la reducción de almacenamiento lisosomal exhibida por la inmunotinción de Lamp-1, la inmunotinción Iba-1 indica la reducción del tamaño de la célula y el número de procesos en células microgiales, e inmunotinción GFAP indicó la reducción de tamaño de célula y longitud/número de procesos en los astrocitos, en la corteza cerebral, nucleado caudado, el tálamo, la materia blanca y el cerebelo después de las inyecciones TI de Naglu-IGFII (datos no mostrados). Además, el análisis histopatológico por tinción H&E (hematoxilina y eosina) de los tejidos cerebrales de las mismas áreas que se había examinado para inmunohistoquímica, demostró la reducción de vacuolas en las células gliales después de inyección de TI 3x de Naglu-IGFII. Todo los resultados mencionados anteriormente también sugerieron el efecto relacionado con la dosis de inyecciones TI de Naglu-IGFII.

[0233] Los análisis bioquímicos de ratones de Sanfilippo B después de la inyección de TI de Naglu-IGFII detectaron actividad de Naglu en el cerebro y el hígado. La eficacia de la Naglu-IGFII se demostró mediante reducción total de GAG en el cerebro y el hígado. La inmunohistoquímica demostró la biodistribución de Naglu-IGFII en el parénquima del cerebro. La inmunotinción de la LAMP- 1, Iba-1,

GFAP y el análisis histopatológico por tinción H&E exhibió una reducción de almacenamiento lisosomal, reducción del tamaño y proceso por microglial y astrocitos no sólo en la zona cortical cerebral del cerebro, sino también en las áreas subcorticales, la sustancia blanca del cerebelo y la corteza del cerebro.

Conclusiones

[0234] Entre otras cosas, se ha demostrado que la proteína de fusión, Naglu-IGFII, exhibió actividad enzimática *in vitro* hacia un sustrato que tiene una estructura similar a la del sustrato natural de Naglu. El estudio de captación celular *in vitro* demostró que la molécula se recogió a las células por el receptor de M6P/IGFII de una manera que era independiente de glicosilación M6P. Naglu-IGFII internalizada se demostró para co-localizar con lisosomas. Se mostró que Naglu-IGFII reducía el almacenamiento lisosómico *in vivo* después de la inyección IC en el ratón de Sanfilippo B. En comparación con rhNaglu y otras fusiones y modificaciones Naglu, Naglu-IGFII los superó en penetrar en el parénquima del cerebro de rata canulada de tipo silvestre después de la inyección de TI. Por último, la inyección de TI de la fusión Naglu-IGFII en ratones de Sanfilippo B demostró extensa distribución más allá de las meninges, y la inversión observada de almacenamiento lisosomal en la corteza cerebral, así como en las regiones subcorticales. Tomados en conjunto, estos datos indican que Naglu-IGFII es un fármaco candidato para el tratamiento de la enfermedad de Sanfilippo B.

Ejemplo 5: Toxicidad, farmacocinética (PK) y estudios de biodistribución del tejido de Naglu-IGFII

Prueba de estudios de concepto en ratón

[0235] Tres grupos (n = 3) de ratones de Naglu (-/-) fueron inyectados con 10 uL que contiene 260 ug de Naglu-IGFII dado como una inyección lumbar TI de bolo único. La dosis de 260 ug se traduce en una dosis de 520 mg/kg de peso del cerebro (cerebro de ratón = 0,0005 kg). Un grupo se inyectó en el día 0 y se sacrificó 24 h después de la inyección. Se le inyectó un segundo grupo en los días 0 y 7, y se sacrificó 24 horas después de la última inyección. El tercer grupo se inyectó en los días 0, 7, y 14, y se sacrificó 24 horas después de la última inyección. Cada grupo dosificado con Naglu-IGFII fue emparejado con un grupo de control del vehículo con el fin de controlar la gravedad de edad/enfermedad.

[0236] La actividad enzimática de Naglu en el cerebro y el hígado fue similar para los tres grupos dosificados con Naglu-IGFII. Al comparar la actividad enzimática de rhNaglu en el hígado con el cerebro, se encontró en el hígado más de 10 veces la actividad enzimática de rhNaglu. Se contempla que dado que los niveles de actividad de la enzima rhNAGLU fueron comparables en el cerebro y el hígado después de 1, 3 y 6 meses de dosificación en los estudios de toxicidad pivotales en ratas y monos jóvenes, una parte de la dosis rhNaglu dada a los ratones Naglu (-/-) no puede haber sido administrada, sino más bien sistémicamente. Sin embargo, el nivel total de GAG en el cerebro mostró una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,05$) después de 3 inyecciones de TI. Una tendencia relacionada con la dosis para la reducción total del nivel de GAG se observó en los hígados, lo cual era estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en los grupos que recibieron 2 o 3 dosis.

[0237] Se observó que la biodistribución de Naglu-IGFII después de la inyección de TI llegaba mucho más allá de las meninges en el parénquima del cerebro, pero regiones profundas subcorticales fueron negativas para la inmunotinción del anticuerpo anti-Naglu. Se observó una reducción de la actividad lisosomal por inmunotinción de proteína de membrana lisosomal asociada (LAMP) en los grupos que únicamente recibieron 2 ó 3 dosis. Áreas de reducción de la actividad lisosomal incluyen la corteza cerebral y profundas regiones subcorticales del núcleo caudado, tálamo, y la materia blanca. Así, la reducción de diversos parámetros de inmunotinción en animales dosificados con Naglu-IGFII sugirieron que los niveles terapéuticos de Naglu pueden estar presentes a pesar de la ausencia de inmunotinción anti-NAGLU. Una respuesta inflamatoria atenuada se evidenció por la reducción de la inmunotinción de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) de los astrocitos y la reducción de la tinción de molécula adaptadora de unión a calcio ionizada (Iba) de microglia/macrófagos en grupos que únicamente recibieron 2 ó 3 dosis. Áreas de análisis incluyen la corteza cerebral y profundas regiones subcorticales del núcleo caudado, tálamo, y materia blanca.

Estudios en rata

[0238] La rata S-D fue seleccionada como la especie de roedores para la evaluación toxicológica de Naglu-IGFII administrado con TI. Como resultado de ello, dieciséis ratas (ocho por sexo) se dosifican con Naglu-IGFII recombinante en la dosis máxima factible (MFD), y aproximadamente en 1/4 y 1/2 el MFD (niveles bajos y medianos de dosis, respectivamente) cada 4 días para un total de 8 dosis.

[0239] Estudio PK/biodistribución de dosis única en ratas S-D se realiza para determinar LCR y la

concentración de suero, o distribución en los tejidos, respectivamente, después de la administración de TI-L a animales machos y hembras.

[0240] Los estudios toxicológicos están diseñados para evaluar la administración TI-L de Naglu-IGFII desde una perspectiva farmacológica de toxicología y seguridad (seguridad neurológica, respiratoria, y cardiovascular) tanto en animales machos como hembras. La evaluación toxicológica en estos estudios incluye observaciones clínicas, pesos corporales, consumo de alimentos, la patología clínica, evaluaciones de farmacología de seguridad apropiadas (por exploración física o electrocardiografía), tejido bruto y evaluación microscópica. Un número limitado de muestras de LCR y de suero se recogió y se analizó para Naglu-IGFII, y anticuerpos contra el artículo de prueba. La distribución tisular de Naglu-IGFII y localización subcelular se cuantifican mediante ensayo de actividad enzimática y la inmunohistoquímica, respectivamente. Además, los estudios seleccionados incluyen un período de recuperación para evaluar la reversibilidad, o aparición retardada potencial, de cualesquiera resultados tóxicos significativos notables.

Estudios en monos

[0241] El mono cynomolgus se ha seleccionado como la especie no roedor para las evaluaciones toxicológicas de Naglu-IGFII administrado con TI debido a su similitud genética y anatómica para los seres humanos y por lo tanto se piensa que es la especie más relevante. Dado que la población de pacientes planeada para los ensayos clínicos de Sanfilippo B es pediátrica, se lleva a cabo un estudio toxicológico crónico de 6 meses en monos cynomolgus juveniles que ofrecen administración de Naglu-IGFII por un dispositivo de administración de fármaco intratecal (IDDD). Monos cynomolgus menores son generalmente de menos de 1 año de edad al inicio del estudio (aproximadamente 7-9 meses de edad) y pesan entre 900 g a 1500 g al inicio del estudio. Los datos obtenidos a partir de un estudio de toxicidad de mono cynomolgus menores de dosis repetida de 1 mes guían la selección de la dosis y el diseño del estudio de mono juvenil de 6 meses. Los estudios de toxicología de dosis repetidas están diseñados para imitar la ruta esperada clínica (TI-L bolo) y frecuencia de administración (cada dos semanas; EOW) durante un período de 1 a 6 meses.

[0242] Como se ha descrito anteriormente, los estudios de toxicología están diseñados para evaluar la administración TI-L de Naglu-IGFII desde una perspectiva farmacológica de toxicología y seguridad (seguridad neurológica, respiratoria, y cardiovascular) tanto en animales machos como hembras. Evaluación toxicológica en estos estudios incluye observaciones clínicas, pesos corporales, consumo de alimentos, la patología clínica, evaluaciones de farmacología de seguridad apropiadas (por exploración física o electrocardiografía), tejido bruto y la evaluación microscópica. Un número limitado de muestras de LCR y de suero se recogió y se analizó para Naglu-IGFII, y anticuerpos al artículo de prueba. La distribución tisular de Naglu-IGFII y localización subcelular se cuantifican mediante ensayo de actividad enzimática y la inmunohistoquímica, respectivamente. Además, los estudios seleccionados incluyen un período de recuperación para evaluar la reversibilidad, o aparición retardada potencial, de cualesquiera resultados tóxicos significativos notables.

Ejemplo 6. Administración intratecal EOW de Naglu-IGFII

[0243] Este ejemplo se diseñó para determinar la viabilidad de dosificación de TI-lumbar EOW para 6 inyecciones (estudio de 3 meses) en el modelo de ratón de Naglu -/-. Este régimen de dosificación puede ser más clínicamente relevante en comparación con la dosificación semanal.

[0244] Ratones machos y hembras Naglu -/- de ocho semanas de edad fueron estudiados según el siguiente diseño experimental:

Tabla 10: Diseño Experimental para EOW TI Administración de Naglu-IGFII

Grupo	N	Tratamiento	Dosis	Frecuencia	Sacrificio
A	3	Vehículo	N/A	Inyección de TI EOW durante 3 meses (total de 6 inyecciones)	24 h después de la última inyección
B	6	Naglu-IGFII	60 mg/kg peso de cerebro (30 ug)	Inyección de TI EOW durante 3 meses (total de 6 inyecciones)	24 h después de la última inyección

[0245] Los estudios fisiológicos, incluyendo ensayo de actividad de Naglu en hígado, cerebro y suero, ensayo de anticuerpos anti-Naglu en suero, y ensayo BCA en el hígado y el cerebro, se llevaron a cabo. Los estudios histológicos, incluyendo Naglu IHC en el cerebro, la médula espinal y el hígado, y la tinción de LAMP en el cerebro y la médula espinal, se llevaron a cabo.

[0246] El cerebro, la médula espinal y el hígado se recogieron y se fijaron en NBF al 10%. Secciones de parafina de cinco µm se prepararon para la tinción histológica. La tinción inmunohistoquímica (IHC) de Naglu se utilizó para detectar la captación celular de la proteína inyectada. La tinción H&E se utilizó para observar los cambios morfológicos. LAMP, un indicador de la actividad lisosomal y estado de enfermedad, GFAP y Iba-1, dos marcadores patológicos del SNC para astrocitos activados y células microgliales, se utilizaron para la evaluación de la mejora histopatológica.

[0247] La inmunotinción de Naglu de cerebro, la médula espinal y el hígado de vehículo y los ratones tratados Naglu-IGFII demostraron que, en el cerebro y la médula espinal, Naglu inyectado se detectó en meninges (M) solamente por IHC y ninguna tinción positiva de Naglu se detectó en cualesquiera otras regiones (Figura 32). En el hígado, las células sinunoidales (S) eran positivas por Naglu y no se encontró absorción de Naglu en los hepatocitos (H).

[0248] La inmunotinción LAMP y tinción H&E del hígado y la médula espinal de vehículo y ratones tratados con Naglu-IGFII demostraron que, en comparación con los animales del vehículo, la tinción del LAMP se disminuyó a lo largo en ambos hígados y las médulas espinales tratadas con Naglu. La tinción H&E mostró vacuolización celular en hepatocitos se redujo evidentemente en el grupo tratado en comparación con los animales tratados con vehículo (Figuras 33 y 34).

[0249] La tinción H&E del cerebro de vehículo y los ratones tratados con Naglu-IGFII demostraron una mejora morfológica en el cerebro después de 6 inyecciones de TI cada dos semanas de Naglu-IGFII durante 3 meses. En el cerebro tratado, la vacuolización celular (flechas) en todas las regiones examinadas se disminuyó en comparación con el grupo de vehículo (Figura 35)

[0250] LAMP IHC en diversas regiones del cerebro después de 6 inyecciones TI Naglu para 3 meses demostraron que, en comparación con el grupo tratado con vehículo, administración de TI Naglu a ratones de SFB resultó en una reducción de la actividad lisosomal en todas las regiones examinadas reveladas por inmunotinción de LAMP (Figura 35). Esta reducción se caracteriza por la disminución en el número de células positivas de LAMP, tamaño de célula más pequeño y más ligero de tinción. Una reducción marcada se encontró en el cerebelo y el tronco cerebral, que se encuentra en la parte caudada del cerebro cerca de la médula espinal, en comparación con otras regiones del cerebro. Una reducción clara también se encontró en las regiones profundas del cerebro, incluyendo la sustancia blanca, el hipocampo y el tálamo.

[0251] Iba IHC en diversas regiones del cerebro después de 6 inyecciones TI Naglu para 3 meses de activación de las células microgliales reveladas (Figura 36). En comparación con el grupo tratado con vehículo, ninguna disminución en el número de células positivas y la intensidad de tinción se observó en grupo tratado con Naglu. Sin embargo, la morfología celular de las células microgliales positivas cambiaron con tamaño de célula reducido en todas las regiones cerebrales examinadas en comparación con la grande y vacuolada en el grupo de vehículo (inserciones).

[0252] GFAP IHC en diversas regiones del cerebro después de 6 inyecciones TI Naglu para 3 meses reveló la activación de astrocitos (Figura 37). En comparación con el grupo tratado con vehículo, tinción positiva de GFAP se redujo en el cerebelo y el tronco cerebral, y se disminuyó ligeramente en otras regiones examinadas.

[0253] Con respecto a la captación celular, estos datos demuestran que en el cerebro y la médula espinal, Naglu se detectó en las células meningial sólo después de 6 tiempo cada dos semanas de la inyección de TI Naglu IGFII para 3 meses. Naglu era indetectable por IHC en otras regiones del cerebro y la médula espinal. En el hígado, tinción positiva de Naglu se encuentra en las células sinusoidales.

[0254] En el cerebro y la médula espinal, después de 6 cada dos semanas de la inyección de TI de Naglu-IGFII durante 3 meses, la mejora histopatológica se observó en todo el cerebro y la médula espinal a pesar de que se inyecta Naglu era indetectable por IHC. La tinción H&E demostró una reducción de vacuolización celular en todas las regiones cerebrales examinadas. La tinción de LAMP se disminuyó a lo largo de la médula espinal tratada y en todas las regiones cerebrales evaluadas, incluyendo la sustancia blanca, hipocampo y tálamo que son áreas profundas del cerebro, con una marcada disminución en el cerebelo y el tronco cerebral en el grupo tratado con Naglu-IGFII. El patrón de tinción disminuido de la tinción de GFAP para astrocitos era consistente con la tinción de LAMP al mismo tiempo que no se disminuía dramáticamente como LAMP. La tinción Iba-1 mostró una reducción del tamaño de la célula de las células microgliales en todas las regiones de cerebro examinadas. En el hígado, tinción H&E demostró una reducción de vacuolización celular con marcada reducción en la tinción LAMP en el grupo tratado con Naglu.

Ejemplo 7: Tratamiento de pacientes de Sanfilippo B

[0255] La administración directa del SNC a través de, por ejemplo, administración TI puede unirse para

tratar con eficacia pacientes con síndrome de Sanfilippo de tipo B (Sanfilippo B). Este ejemplo ilustra un estudio de escalada de dosis multicéntrico diseñado para evaluar la seguridad de hasta 3 niveles de dosis cada dos semanas (EOW) durante un total de 40 semanas de Naglu-IGFII y/o rhNaglu administrado a través de un dispositivo de administración de fármacos por vía intratecal (IDDD) a los pacientes con síndrome de Sanfilippo B. Diversos dispositivos de administración de fármacos por vía intratecal a modo de ejemplo adecuados para el tratamiento humano se representan en las Figuras 38-41.

[0256] Serán inscritos hasta 20 pacientes:

Pacientes de cohorte 1: 5 (dosis más baja)

Pacientes de cohorte 2: 5 (dosis intermedia)

Pacientes de cohorte 3: 5 (dosis más alta)

5 pacientes serán asignados al azar a ningún tratamiento.

[0257] Los pacientes son seleccionados para el estudio en base a la inclusión de los siguientes criterios:

[0258] Seguridad de dosis ascendentes de Naglu administrado por inyección de TI durante 40 semanas en pacientes con San A se determina. Además, se evaluó la actividad clínica de Naglu-IGFII y/o rhNaglu sobre la función cognitiva, y farmacocinética de dosis repetidas en el suero y las concentraciones en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

[0259] Mientras que ciertos compuestos, composiciones y métodos descritos en el presente documento se han descrito con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los siguientes ejemplos sirven solamente para ilustrar la invención y no están destinados a limitar la misma.

[0260] Los artículos "un" y "una" como se utiliza aquí en la especificación y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, debe entenderse para incluir los referentes plurales. Reclamaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechos si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, empleados en, o de otra manera son relevantes para un producto o proceso dado a menos que se indique lo contrario o de otro modo sea evidente por el contexto. Esta descripción incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente en, empleado en, o de otra manera pertinente a un producto o proceso dado. La descripción también incluye realizaciones en las que más de uno, o la totalidad de los miembros del grupo están presentes en, empleados en, o de otra manera pertinentes a un producto o proceso dado.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0261]

<110> Shire Human Genetic Therapies, Inc.

<120> TRATAMIENTO DE SÍNDROME DE SANFILIPPO DE TIPO B

<130> P060858EP

<140> EP11799039.0
<141> 2011-06-25

<150> PCT/US2011/041928
<151> 2011-06-25

<150> 61/358.857
<151> 2010-06-25

<150> 61/360.786
<151> 2010-07-01

<150> 61/387.862
<151> 2010-09-29

<150> 61/435.710
<151> 2011-01-24

<150> 61/442.115
<151> 2011-02-11

<150> 61/476.210
<151> 2011-04-15

<150> 61/449.225
<151> 2011-03-04

<150> 61/495.268
<151> 2011-06-09

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 720
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Asp Glu Ala Arg Glu Ala Ala Ala Val Arg Ala Leu Val Ala Arg Leu
1               5                  10                  15

Leu Gly Pro Gly Pro Ala Ala Asp Phe Ser Val Ser Val Glu Arg Ala
            20                  25                  30

Leu Ala Ala Lys Pro Gly Leu Asp Thr Tyr Ser Leu Gly Gly Gly Gly
        35                  40                  45

Ala Ala Arg Val Arg Val Arg Gly Ser Thr Gly Val Ala Ala Ala Ala
    50                  55                  60
```

```
Gly Leu His Arg Tyr Leu Arg Asp Phe Cys Gly Cys His Val Ala Trp
65                  70                  75                  80

Ser Gly Ser Gln Leu Arg Leu Pro Arg Pro Leu Pro Ala Val Pro Gly
                85                  90                  95

Glu Leu Thr Glu Ala Thr Pro Asn Arg Tyr Arg Tyr Tyr Gln Asn Val
            100                 105                 110

Cys Thr Gln Ser Tyr Ser Phe Val Trp Trp Asp Trp Ala Arg Trp Glu
        115                 120                 125

Arg Glu Ile Asp Trp Met Ala Leu Asn Gly Ile Asn Leu Ala Leu Ala
    130                 135                 140

Trp Ser Gly Gln Glu Ala Ile Trp Gln Arg Val Tyr Leu Ala Leu Gly
145                 150                 155                 160

Leu Thr Gln Ala Glu Ile Asn Glu Phe Phe Thr Gly Pro Ala Phe Leu
                165                 170                 175

Ala Trp Gly Arg Met Gly Asn Leu His Thr Trp Asp Gly Pro Leu Pro
            180                 185                 190

Pro Ser Trp His Ile Lys Gln Leu Tyr Leu Gln His Arg Val Leu Asp
        195                 200                 205

Gln Met Arg Ser Phe Gly Met Thr Pro Val Leu Pro Ala Phe Ala Gly
    210                 215                 220

His Val Pro Glu Ala Val Thr Arg Val Phe Pro Gln Val Asn Val Thr
225                 230                 235                 240

Lys Met Gly Ser Trp Gly His Phe Asn Cys Ser Tyr Ser Cys Ser Phe
                245                 250                 255

Leu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Ile Phe Pro Ile Ile Gly Ser Leu Phe
            260                 265                 270

Leu Arg Glu Leu Ile Lys Glu Phe Gly Thr Asp His Ile Tyr Gly Ala
        275                 280                 285

Asp Thr Phe Asn Glu Met Gln Pro Pro Ser Ser Glu Pro Ser Tyr Leu
    290                 295                 300

Ala Ala Ala Thr Thr Ala Val Tyr Glu Ala Met Thr Ala Val Asp Thr
```

```
305                 310                 315                 320

Glu Ala Val Trp Leu Leu Gln Gly Trp Leu Phe Gln His Gln Pro Gln
                325                 330                 335

Phe Trp Gly Pro Ala Gln Ile Arg Ala Val Leu Gly Ala Val Pro Arg
            340                 345                 350

Gly Arg Leu Leu Val Leu Asp Leu Phe Ala Glu Ser Gln Pro Val Tyr
        355                 360                 365

Thr Arg Thr Ala Ser Phe Gln Gly Gln Pro Phe Ile Trp Cys Met Leu
    370                 375                 380

His Asn Phe Gly Gly Asn His Gly Leu Phe Gly Ala Leu Glu Ala Val
385                 390                 395                 400

Asn Gly Gly Pro Glu Ala Ala Arg Leu Phe Pro Asn Ser Thr Met Val
                405                 410                 415

Gly Thr Gly Met Ala Pro Glu Gly Ile Ser Gln Asn Glu Val Val Tyr
            420                 425                 430

Ser Leu Met Ala Glu Leu Gly Trp Arg Lys Asp Pro Val Pro Asp Leu
        435                 440                 445

Ala Ala Trp Val Thr Ser Phe Ala Ala Arg Arg Tyr Gly Val Ser His
    450                 455                 460

Pro Asp Ala Gly Ala Ala Trp Arg Leu Leu Leu Arg Ser Val Tyr Asn
465                 470                 475                 480

Cys Ser Gly Glu Ala Cys Arg Gly His Asn Arg Ser Pro Leu Val Arg
                485                 490                 495

Arg Pro Ser Leu Gln Met Asn Thr Ser Ile Trp Tyr Asn Arg Ser Asp
            500                 505                 510

Val Phe Glu Ala Trp Arg Leu Leu Leu Thr Ser Ala Pro Ser Leu Ala
        515                 520                 525

Thr Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Asp Leu Leu Asp Leu Thr Arg Gln Ala
    530                 535                 540

Val Gln Glu Leu Val Ser Leu Tyr Tyr Glu Glu Ala Arg Ser Ala Tyr
545                 550                 555                 560
```

```
Leu Ser Lys Glu Leu Ala Ser Leu Leu Arg Ala Gly Gly Val Leu Ala
                565                 570                 575

Tyr Glu Leu Leu Pro Ala Leu Asp Glu Val Leu Ala Ser Asp Ser Arg
            580                 585                 590

Phe Leu Leu Gly Ser Trp Leu Glu Gln Ala Arg Ala Ala Ala Val Ser
        595                 600                 605

Glu Ala Glu Ala Asp Phe Tyr Glu Gln Asn Ser Arg Tyr Gln Leu Thr
    610                 615                 620

Leu Trp Gly Pro Glu Gly Asn Ile Leu Asp Tyr Ala Asn Lys Gln Leu
625                 630                 635                 640

Ala Gly Leu Val Ala Asn Tyr Tyr Thr Pro Arg Trp Arg Leu Phe Leu
                645                 650                 655

Glu Ala Leu Val Asp Ser Val Ala Gln Gly Ile Pro Phe Gln Gln His
            660                 665                 670

Gln Phe Asp Lys Asn Val Phe Gln Leu Glu Gln Ala Phe Val Leu Ser
        675                 680                 685

Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Gln Pro Arg Gly Asp Thr Val Asp Leu Ala
    690                 695                 700

Lys Lys Ile Phe Leu Lys Tyr Tyr Pro Arg Trp Val Ala Gly Ser Trp
705                 710                 715                 720
```

<210> 2
<211> 743
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Glu Ala Val Ala Val Ala Ala Ala Val Gly Val Leu Leu Leu Ala
1               5                  10                  15

Gly Ala Gly Gly Ala Ala Gly Asp Glu Ala Arg Glu Ala Ala Ala Val
            20                  25                  30

Arg Ala Leu Val Ala Arg Leu Leu Gly Pro Gly Pro Ala Ala Asp Phe
        35                  40                  45

Ser Val Ser Val Glu Arg Ala Leu Ala Ala Lys Pro Gly Leu Asp Thr
    50                  55                  60
```

```
Tyr Ser Leu Gly Gly Gly Gly Ala Ala Arg Val Arg Val Arg Gly Ser
65                  70                  75                  80

Thr Gly Val Ala Ala Ala Ala Gly Leu His Arg Tyr Leu Arg Asp Phe
                85                  90                  95

Cys Gly Cys His Val Ala Trp Ser Gly Ser Gln Leu Arg Leu Pro Arg
            100                 105                 110

Pro Leu Pro Ala Val Pro Gly Glu Leu Thr Glu Ala Thr Pro Asn Arg
        115                 120                 125

Tyr Arg Tyr Tyr Gln Asn Val Cys Thr Gln Ser Tyr Ser Phe Val Trp
    130                 135                 140

Trp Asp Trp Ala Arg Trp Glu Arg Glu Ile Asp Trp Met Ala Leu Asn
145                 150                 155                 160

Gly Ile Asn Leu Ala Leu Ala Trp Ser Gly Gln Glu Ala Ile Trp Gln
                165                 170                 175

Arg Val Tyr Leu Ala Leu Gly Leu Thr Gln Ala Glu Ile Asn Glu Phe
            180                 185                 190

Phe Thr Gly Pro Ala Phe Leu Ala Trp Gly Arg Met Gly Asn Leu His
        195                 200                 205

Thr Trp Asp Gly Pro Leu Pro Pro Ser Trp His Ile Lys Gln Leu Tyr
    210                 215                 220

Leu Gln His Arg Val Leu Asp Gln Met Arg Ser Phe Gly Met Thr Pro
225                 230                 235                 240

Val Leu Pro Ala Phe Ala Gly His Val Pro Glu Ala Val Thr Arg Val
                245                 250                 255

Phe Pro Gln Val Asn Val Thr Lys Met Gly Ser Trp Gly His Phe Asn
            260                 265                 270

Cys Ser Tyr Ser Cys Ser Phe Leu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Ile Phe
        275                 280                 285

Pro Ile Ile Gly Ser Leu Phe Leu Arg Glu Leu Ile Lys Glu Phe Gly
    290                 295                 300

Thr Asp His Ile Tyr Gly Ala Asp Thr Phe Asn Glu Met Gln Pro Pro
305                 310                 315                 320
```

```
Ser Ser Glu Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ala Thr Thr Ala Val Tyr Glu
                325                 330                 335

Ala Met Thr Ala Val Asp Thr Glu Ala Val Trp Leu Leu Gln Gly Trp
            340                 345                 350

Leu Phe Gln His Gln Pro Gln Phe Trp Gly Pro Ala Gln Ile Arg Ala
        355                 360                 365

Val Leu Gly Ala Val Pro Arg Gly Arg Leu Leu Val Leu Asp Leu Phe
    370                 375                 380

Ala Glu Ser Gln Pro Val Tyr Thr Arg Thr Ala Ser Phe Gln Gly Gln
385                 390                 395                 400

Pro Phe Ile Trp Cys Met Leu His Asn Phe Gly Gly Asn His Gly Leu
                405                 410                 415

Phe Gly Ala Leu Glu Ala Val Asn Gly Gly Pro Glu Ala Ala Arg Leu
            420                 425                 430

Phe Pro Asn Ser Thr Met Val Gly Thr Gly Met Ala Pro Glu Gly Ile
        435                 440                 445

Ser Gln Asn Glu Val Val Tyr Ser Leu Met Ala Glu Leu Gly Trp Arg
    450                 455                 460

Lys Asp Pro Val Pro Asp Leu Ala Ala Trp Val Thr Ser Phe Ala Ala
465                 470                 475                 480

Arg Arg Tyr Gly Val Ser His Pro Asp Ala Gly Ala Ala Trp Arg Leu
                485                 490                 495

Leu Leu Arg Ser Val Tyr Asn Cys Ser Gly Glu Ala Cys Arg Gly His
            500                 505                 510

Asn Arg Ser Pro Leu Val Arg Arg Pro Ser Leu Gln Met Asn Thr Ser
        515                 520                 525

Ile Trp Tyr Asn Arg Ser Asp Val Phe Glu Ala Trp Arg Leu Leu Leu
    530                 535                 540

Thr Ser Ala Pro Ser Leu Ala Thr Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Asp Leu
545                 550                 555                 560

Leu Asp Leu Thr Arg Gln Ala Val Gln Glu Leu Val Ser Leu Tyr Tyr
                565                 570                 575
```

```
Glu Glu Ala Arg Ser Ala Tyr Leu Ser Lys Glu Leu Ala Ser Leu Leu
            580                 585                 590

Arg Ala Gly Gly Val Leu Ala Tyr Glu Leu Leu Pro Ala Leu Asp Glu
        595                 600                 605

Val Leu Ala Ser Asp Ser Arg Phe Leu Leu Gly Ser Trp Leu Glu Gln
    610                 615                 620

Ala Arg Ala Ala Ala Val Ser Glu Ala Glu Ala Asp Phe Tyr Glu Gln
625                 630                 635                 640

Asn Ser Arg Tyr Gln Leu Thr Leu Trp Gly Pro Glu Gly Asn Ile Leu
                645                 650                 655

Asp Tyr Ala Asn Lys Gln Leu Ala Gly Leu Val Ala Asn Tyr Tyr Thr
            660                 665                 670

Pro Arg Trp Arg Leu Phe Leu Glu Ala Leu Val Asp Ser Val Ala Gln
        675                 680                 685

Gly Ile Pro Phe Gln Gln His Gln Phe Asp Lys Asn Val Phe Gln Leu
    690                 695                 700

Glu Gln Ala Phe Val Leu Ser Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Gln Pro Arg
705                 710                 715                 720

Gly Asp Thr Val Asp Leu Ala Lys Lys Ile Phe Leu Lys Tyr Tyr Pro
                725                 730                 735

Arg Trp Val Ala Gly Ser Trp
            740
```

<210> 3
<211> 67
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

```
Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr
1               5                   10                  15

Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro Ala
            20                  25                  30

Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe
        35                  40                  45
```

Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Glu
65

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> enlazador entre el dominio Naglu y el resto lisosómico

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 5
<211> 51
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> enlazador entre el dominio Naglu y el resto lisosómic

<400> 5

Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ala Pro
50

<210> 6
<211> 837
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína de fusión recombinante Naglu-IGFII

<400> 6

Asp Glu Ala Arg Glu Ala Ala Ala Val Arg Ala Leu Val Ala Arg Leu

```
1               5                   10                  15

Leu Gly Pro Gly Pro Ala Ala Asp Phe Ser Val Ser Val Glu Arg Ala
            20                  25                  30

Leu Ala Ala Lys Pro Gly Leu Asp Thr Tyr Ser Leu Gly Gly Gly Gly
        35                  40                  45

Ala Ala Arg Val Arg Val Arg Gly Ser Thr Gly Val Ala Ala Ala Ala
    50                  55                  60

Gly Leu His Arg Tyr Leu Arg Asp Phe Cys Gly Cys His Val Ala Trp
65                  70                  75                  80

Ser Gly Ser Gln Leu Arg Leu Pro Arg Pro Leu Pro Ala Val Pro Gly
                85                  90                  95

Glu Leu Thr Glu Ala Thr Pro Asn Arg Tyr Arg Tyr Tyr Gln Asn Val
            100                 105                 110

Cys Thr Gln Ser Tyr Ser Phe Val Trp Trp Asp Trp Ala Arg Trp Glu
        115                 120                 125

Arg Glu Ile Asp Trp Met Ala Leu Asn Gly Ile Asn Leu Ala Leu Ala
    130                 135                 140

Trp Ser Gly Gln Glu Ala Ile Trp Gln Arg Val Tyr Leu Ala Leu Gly
145                 150                 155                 160

Leu Thr Gln Ala Glu Ile Asn Glu Phe Phe Thr Gly Pro Ala Phe Leu
                165                 170                 175

Ala Trp Gly Arg Met Gly Asn Leu His Thr Trp Asp Gly Pro Leu Pro
            180                 185                 190

Pro Ser Trp His Ile Lys Gln Leu Tyr Leu Gln His Arg Val Leu Asp
        195                 200                 205

Gln Met Arg Ser Phe Gly Met Thr Pro Val Leu Pro Ala Phe Ala Gly
    210                 215                 220

His Val Pro Glu Ala Val Thr Arg Val Phe Pro Gln Val Asn Val Thr
225                 230                 235                 240

Lys Met Gly Ser Trp Gly His Phe Asn Cys Ser Tyr Ser Cys Ser Phe
                245                 250                 255
```

```
Leu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Ile Phe Pro Ile Ile Gly Ser Leu Phe
            260                 265                 270

Leu Arg Glu Leu Ile Lys Glu Phe Gly Thr Asp His Ile Tyr Gly Ala
        275                 280                 285

Asp Thr Phe Asn Glu Met Gln Pro Pro Ser Ser Glu Pro Ser Tyr Leu
    290                 295                 300

Ala Ala Ala Thr Thr Ala Val Tyr Glu Ala Met Thr Ala Val Asp Thr
305                 310                 315                 320

Glu Ala Val Trp Leu Leu Gln Gly Trp Leu Phe Gln His Gln Pro Gln
                325                 330                 335

Phe Trp Gly Pro Ala Gln Ile Arg Ala Val Leu Gly Ala Val Pro Arg
            340                 345                 350

Gly Arg Leu Leu Val Leu Asp Leu Phe Ala Glu Ser Gln Pro Val Tyr
        355                 360                 365

Thr Arg Thr Ala Ser Phe Gln Gly Gln Pro Phe Ile Trp Cys Met Leu
    370                 375                 380

His Asn Phe Gly Gly Asn His Gly Leu Phe Gly Ala Leu Glu Ala Val
385                 390                 395                 400

Asn Gly Gly Pro Glu Ala Ala Arg Leu Phe Pro Asn Ser Thr Met Val
                405                 410                 415

Gly Thr Gly Met Ala Pro Glu Gly Ile Ser Gln Asn Glu Val Val Tyr
            420                 425                 430

Ser Leu Met Ala Glu Leu Gly Trp Arg Lys Asp Pro Val Pro Asp Leu
        435                 440                 445

Ala Ala Trp Val Thr Ser Phe Ala Ala Arg Arg Tyr Gly Val Ser His
    450                 455                 460

Pro Asp Ala Gly Ala Ala Trp Arg Leu Leu Leu Arg Ser Val Tyr Asn
465                 470                 475                 480

Cys Ser Gly Glu Ala Cys Arg Gly His Asn Arg Ser Pro Leu Val Arg
                485                 490                 495

Arg Pro Ser Leu Gln Met Asn Thr Ser Ile Trp Tyr Asn Arg Ser Asp
            500                 505                 510
```

```
Val Phe Glu Ala Trp Arg Leu Leu Leu Thr Ser Ala Pro Ser Leu Ala
        515                 520                 525

Thr Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Asp Leu Leu Asp Leu Thr Arg Gln Ala
    530                 535                 540

Val Gln Glu Leu Val Ser Leu Tyr Tyr Glu Glu Ala Arg Ser Ala Tyr
545                 550                 555                 560

Leu Ser Lys Glu Leu Ala Ser Leu Leu Arg Ala Gly Gly Val Leu Ala
                565                 570                 575

Tyr Glu Leu Leu Pro Ala Leu Asp Glu Val Leu Ala Ser Asp Ser Arg
            580                 585                 590

Phe Leu Leu Gly Ser Trp Leu Glu Gln Ala Arg Ala Ala Ala Val Ser
        595                 600                 605

Glu Ala Glu Ala Asp Phe Tyr Glu Gln Asn Ser Arg Tyr Gln Leu Thr
    610                 615                 620

Leu Trp Gly Pro Glu Gly Asn Ile Leu Asp Tyr Ala Asn Lys Gln Leu
625                 630                 635                 640

Ala Gly Leu Val Ala Asn Tyr Tyr Thr Pro Arg Trp Arg Leu Phe Leu
                645                 650                 655

Glu Ala Leu Val Asp Ser Val Ala Gln Gly Ile Pro Phe Gln Gln His
            660                 665                 670

Gln Phe Asp Lys Asn Val Phe Gln Leu Glu Gln Ala Phe Val Leu Ser
        675                 680                 685

Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Gln Pro Arg Gly Asp Thr Val Asp Leu Ala
    690                 695                 700

Lys Lys Ile Phe Leu Lys Tyr Tyr Pro Arg Trp Val Ala Gly Ser Trp
705                 710                 715                 720

Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly
                725                 730                 735

Gly Gly Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly
            740                 745                 750

Gly Gly Gly Gly Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala
        755                 760                 765
```

```
Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Pro Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val
    770                 775                 780

Asp Thr Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser Arg
785                 790                 795                 800

Pro Ala Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys
                805                 810                 815

Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr
            820                 825                 830

Pro Ala Lys Ser Glu
        835
```

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> enlazador corto

<400> 7

```
Gly Gly Gly Gly Gly Pro
1               5
```

Reivindicaciones

1. Una composición farmacéutica que comprende proteína de alfa-N-acetilglucosaminidasa recombinante (Naglu) y un tampón que comprende fosfato de hasta 50 mM para uso en un método de tratamiento de enfermedad de síndrome de Sanfilippo de tipo B (San B) que comprende una etapa de administrar la proteína Naglu recombinante a una concentración de 10-150 mg/ml a un sujeto por vía intratecal a través de inyección en el canal espinal, donde la proteína recombinante Naglu (i) es una proteína de fusión que comprende un dominio Naglu y un péptido que se une a receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes (CI-MPR) de una manera independiente de manosa-6-fosfato o (ii) contiene oligosacáridos bis-fosforilados que tienen mayor afinidad de unión a la CI-MPR.

2. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el dominio Naglu comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 80%, o al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 1 (proteína Naglu madura humana), o es idéntica a SEQ ID NO: 1 (proteína Naglu madura humana).

3. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el péptido que se une a CI-MPR que comprende:

(i) una secuencia de aminoácidos de al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% idéntica a IGF-II humana madura (SEQ ID NO: 3), o
(ii) una secuencia de aminoácidos que incluye los residuos 8-67 de IGF-II humana madura (SEQ ID NO: 3).

4. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en la que la proteína de fusión comprende además un conector entre el dominio Naglu y el péptido que se une CI-MPR,

opcionalmente en el que el enlazador comprende además una o más secuencias de GAP, opcionalmente en el que el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGG GGGAP, que corresponde a los residuos 721-777 de SEQ ID NO: 6.

5. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en la que:

(i) el péptido se fusiona directamente o mediante el engarce a la C-terminal del dominio Naglu, o
(ii) el péptido se fusiona directamente o mediante el engarce a la N-terminal del dominio Naglu.

6. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:

(i) la proteína recombinante se produce a partir de células humanas, o
(ii) la proteína recombinante se produce a partir de células CHO.

7. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que:

(i) los resultados de la administración intratecal en la administración de la proteína Naglu en uno o más tejidos cerebrales diana, opcionalmente en el que:

(a) el uno o más tejidos del cerebro diana se seleccionan del grupo que consiste en tejidos de la materia gris, la materia blanca, áreas periventriculares, pia-aracnoides, meninges, neocórtex, cerebelo, tejidos profundos en la corteza cerebral, capa molecular, región de caudado/putamen, mesencéfalo, las regiones profundas de la protuberancia o médula, y combinaciones de los mismos, y/o
(b) la proteína Naglu se administra a las neuronas, células gliales, células perivasculares y/o células de las meninges,

(ii) la proteína Naglu se suministra adicionalmente a las neuronas en la médula espinal,
(iii) la administración intratecal resulta aún más en la administración sistémica de la proteína Naglu en los tejidos diana periféricos, opcionalmente en el que los tejidos diana periféricos se seleccionan a partir de hígado, riñón, y/o el corazón,
(iv) los resultados de la administración intratecal en la localización lisosomal en tejidos diana del cerebro, neuronas de la médula espinal y/o tejidos diana periféricos,
(v) los resultados de la administración intratecal en la reducción de almacenamiento lisosomal en los tejidos diana del cerebro, neuronas de médula espinal y/o tejidos diana periféricos,

opcionalmente en el que el almacenamiento lisosomal se determina por tinción de LAMP-1, y en el que el almacenamiento lisosomal se reduce opcionalmente por al menos 20%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90%, 1 veces, 1,5 veces, o 2 veces en comparación con un control, y/o
(vi) la administración intratecal resulta en vacuolización reducida en las neuronas, opcionalmente en la que las neuronas comprenden células de Purkinje.

8. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los resultados de la administración intratecal en aumento de la actividad enzimática Naglu en los tejidos diana de cerebro, neuronas de la médula espinal y/o tejidos diana periféricos, opcionalmente en la que:

(i) la actividad enzimática Naglu se aumenta en al menos 1 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces en comparación con un control, y/o
(ii) el aumento de la actividad HNS enzimática es de al menos aproximadamente 10 nmol/h/mg, 20 nmol/h/mg, 40 nmol/h/mg, 50 nmol/h/mg, 60 nmol/h/mg, 70 nmol/h/mg, 80 nmol/h/mg, 90 nmol/h/mg, 100 nmol/h/mg, 150 nmol/h/mg, 200 nmol/h/mg, 250 nmol/h/mg, 300 nmol/h/mg, 350 nmol/h/mg, 400 nmol/h/mg, 450 nmol/h/mg, 500 nmol/h/mg, 550 nmol/h/mg o 600 nmol/h/mg, o
(iii) la actividad enzimática Naglu se incrementa en la región lumbar,

opcionalmente en el que el aumento de la actividad enzimática Naglu en la región lumbar es de al menos aproximadamente 500 nmol/h/mg, 600 nmol/h/mg, 700 nmol/h/mg, 800 nmol/h/mg, 900 nmol/h/mg, 1,000 nmol/h/mg, 1,500 nmol/h/mg, 2,000 nmol/h/mg, 3,000 nmol/h/mg, 4,000 nmol/h/mg, 5,000 nmol/h/mg, 6,000 nmol/h/mg, 7,000 nmol/h/mg, 8,000 nmol/h/mg, 9,000 nmol/h/mg, o 10 000 nmol/h/mg.

9. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los resultados de la administración intratecal en la intensidad reducida, la gravedad o la frecuencia, o retraso en la aparición de al menos un síntoma o característica del síndrome de Sanfilippo B,

opcionalmente en el que al menos un síntoma o característica de la enfermedad de San B es la pérdida auditiva, retraso en el desarrollo del habla, los déficits en las habilidades motoras, hiperactividad, retraso mental, la agresividad y/o de la perturbación del sueño.

10. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:

(i) la administración intratecal se usa conjunto con la administración intravenosa, opcionalmente en la que la administración intravenosa no es más frecuente que una vez cada mes o no es más frecuente que una vez cada dos meses.
(ii) la administración intratecal se utiliza en ausencia de la administración intravenosa, y/o
(iii) la administración intratecal se realiza una vez cada dos semanas, una vez cada mes, o una vez cada dos meses, y/o
(iv) la administración intratecal se utiliza en ausencia de terapia inmunosupresora concurrente.

11. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-10, en la que la proteína de fusión Naglu se administra a una concentración mayor que aproximadamente 20 mg/ml.

12. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición farmacéutica comprende además un agente tensioactivo.

13. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 12, en la que el tensioactivo es un tensioactivo no iónico seleccionado de un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20 o 80); un poloxámero (por ejemplo, poloxámero 188); triton; sulfato de dodecilo sódico (SDS); sulfato de laurilo sódico; glucósido de octilo sódico; laurilo-, miristilo-, linoleilo- o estearilo-sulfobetaína; laurilo-, miristilo-, linoleilo- o estearilo-sarcosina; linoleilo-, miristilo-, o cetilo-betaína; lauroamidopropilo-, cocamidopropilo-, linoleamidopropilo-, miristamidopropilo-, palmidopropilo-, o isostearamidopropilo-betaína (por ejemplo, lauroamidopropilo); miristarnidopropilo-, palmidopropilo-, o isostearamidopropilo-dimetilamina; metilcocoílo sódico o metilo disódico ofeílo-taurato; polietilglicol; glicol de polipropilo; y copolímeros de etileno y glicol de propileno (por ejemplo, Pluronics o PF68).

14. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en la que el tensioactivo está presente a una concentración desde 0,001 hasta 0,5%, opcionalmente en la que el tensioactivo está presente a una concentración de aproximadamente 0,2%.

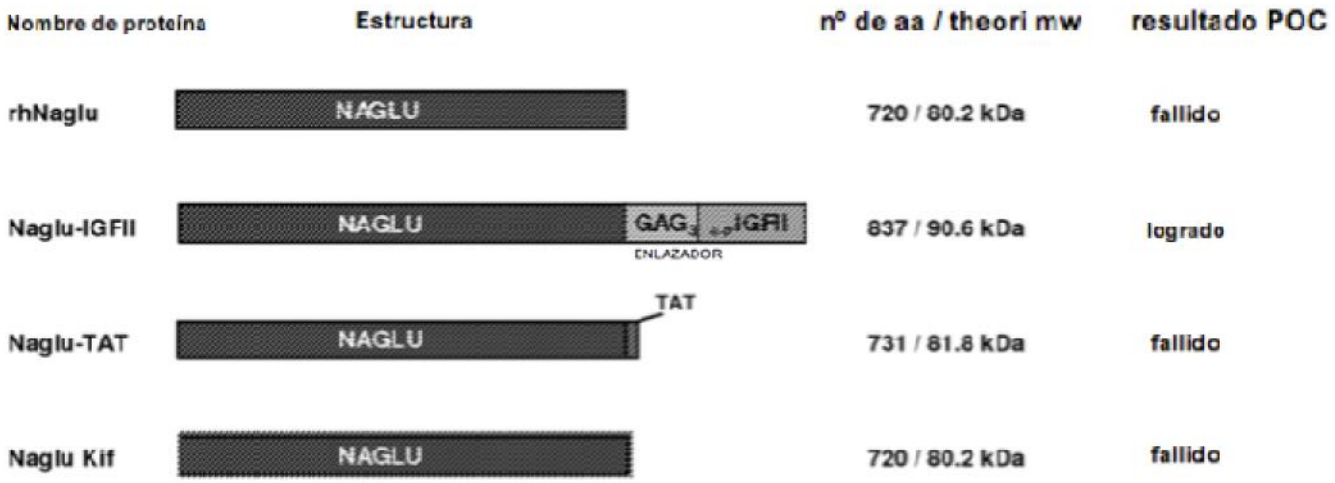


Figura 1. Representación esquemática de rhNaglu, Naglu-IGFII, Naglu-TAT y Naglu Kif, y el resultado de prueba del estudio de concepto (POC). (nº de aa / theori mw - número de aminoácido y el peso molecular teórico.)

Figura 1

Nombre de proteína	Estructura	nº de aa / theori mw	resultado POC
PerT-Naglu		720 / 80.2 kDa	fallido (BBB)
Naglu-ApoE		769 / 86.0 kDa	en progreso (BBB)

Figura 2. Representación esquemática de PerT-Naglu y Naglu-ApoE. Estas dos modificaciones de rhNaglu fueron producidas para examinar la enzima transportadora a través de BBB.

Figura 2

Figura 2-4. Ilustración esquemática del receptor M6P / IGF II y sus 15 dominios. Los dominios 3 y 9 (verdes) enlazan manosa-6-fosfato, mientras que el dominio 5 enlaza diéster de manosa-6-fosfato. El dominio 11 (amarillo) se enlaza a IGFII (figura modificada de Bohnsack 2009, 22

Figura 2-3. Ilustración esquemática de una molécula IGFII mostrando secuencia de amino 8-67 (verde) como la secuencia enlazadora al receptor de IGF II (figura modificada de Hashimoto 1995, 20).

Figura 3

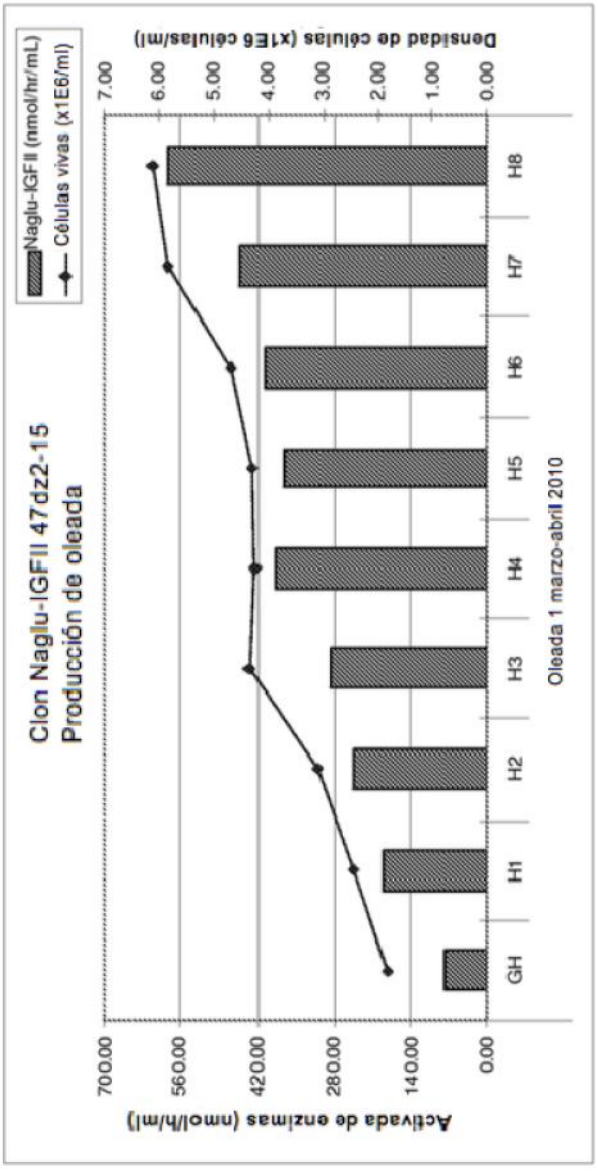


Figura 4 Un ejemplo de una producción de oleada del clon Naglu-IGFII 47dz2-15. La producción media de Naglu-IGFII era 0,5 pcd (pictograma por millón de células por día). GH, cosecha de crecimiento; H1 a H8, cosecha 1 - 8.

Figura 4

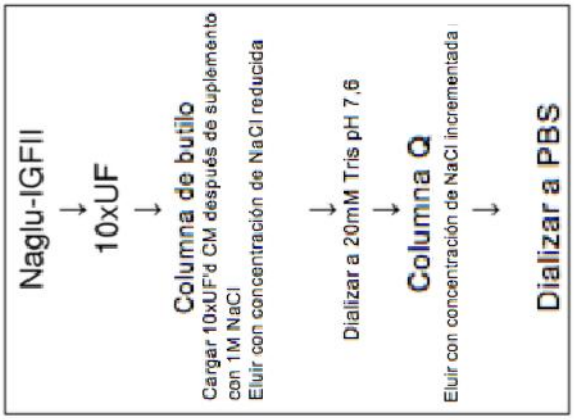
Figura 5. Análisis de transferencia Western de cosechas de la producción de oleada en la Figura 2-5. Los carriles fueron normalizados por el volumen del medio de cultivo

Figura 5

Figura 6. Análisis de transferencia Western de Naglu-IGFII antes y después de la deglicosilación con PNGasa F. La banda dispersada antes de la digestión de PNGasa F es la apariencia típica de proteínas lisosomales al glicosilarse. En la digestión de PNGasa F, la banda de proteína se hizo fuerte y condensada, una apariencia consistente con la de una cadena polipeptídica uniforme.

El análisis con el anticuerpo Naglu y anti-IGFII antihumano confirmó que sólo moléculas intactas de Naglu-IGFII se expresaron por clon 47dz2-15. "-", indica material de cosecha antes de la digestión de PNGasaF. "+", indica material de cosecha después de la digestión de PNGasa F.

Figura 6



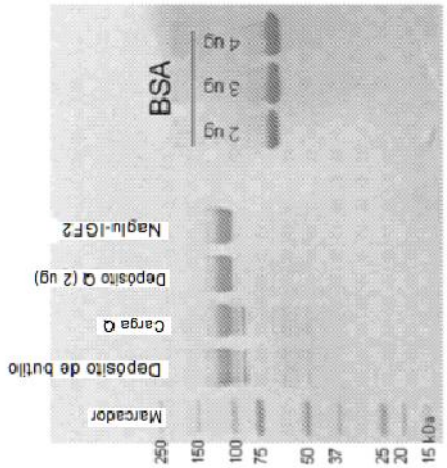


Figura 7. La esquema de purificación de Naglu-IGFII y el gel de SDS-PAGE ilustra la purificación por pasos de Naglu-IGFII de medios acondicionados

Figura 7

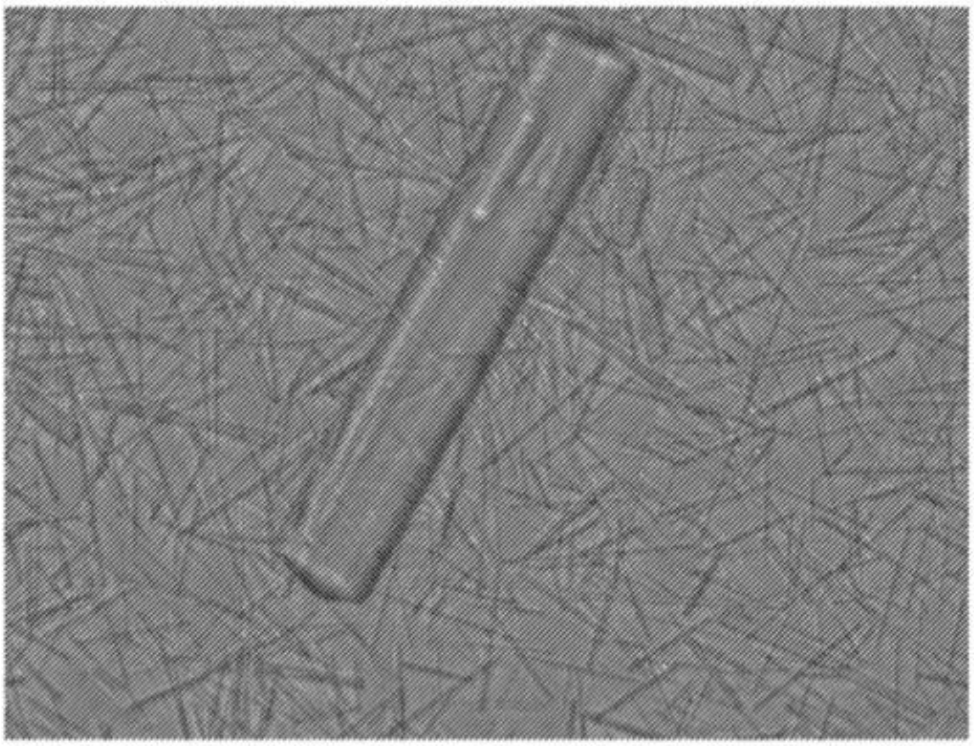


Figura 8

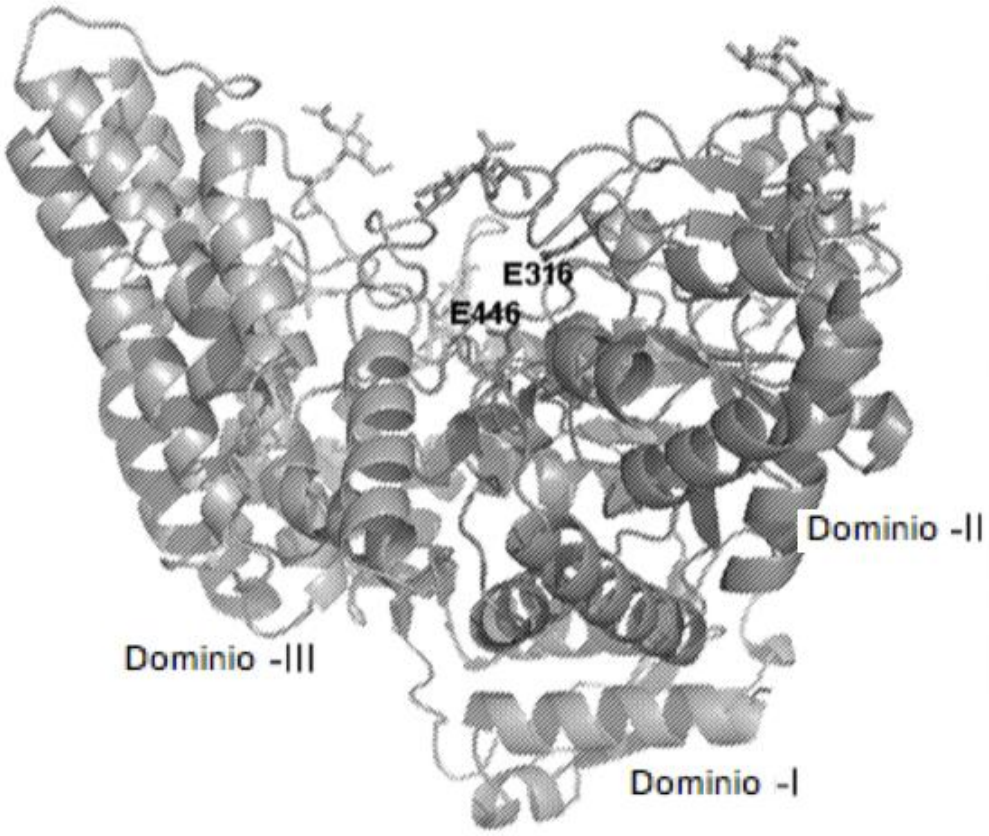


Figura 9

Figura 10

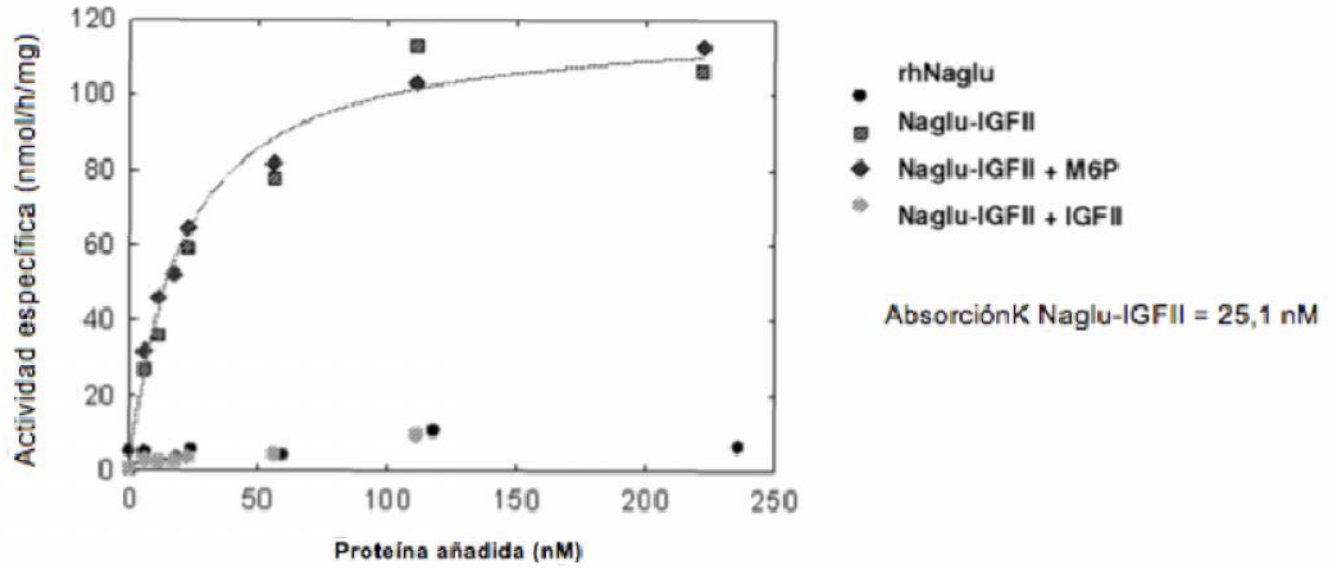


Figura 2-13 Células de fibroblasto primarias de (células Shire HF1156) normales humanas se utilizaron para estudio de internalización celular de rhNaglu y Naglu-IGFII. Absorción celular de rhNaglu era mínima, mientras que la absorción celular de Naglu-IGFII era mucho más pronunciada. La curva de saturación de internalización de Naglu-IGFII indicó una absorción mediada por receptor. Esta absorción fue inhibida por IGFII, pero no manosa-6-fosfato

Figura 11

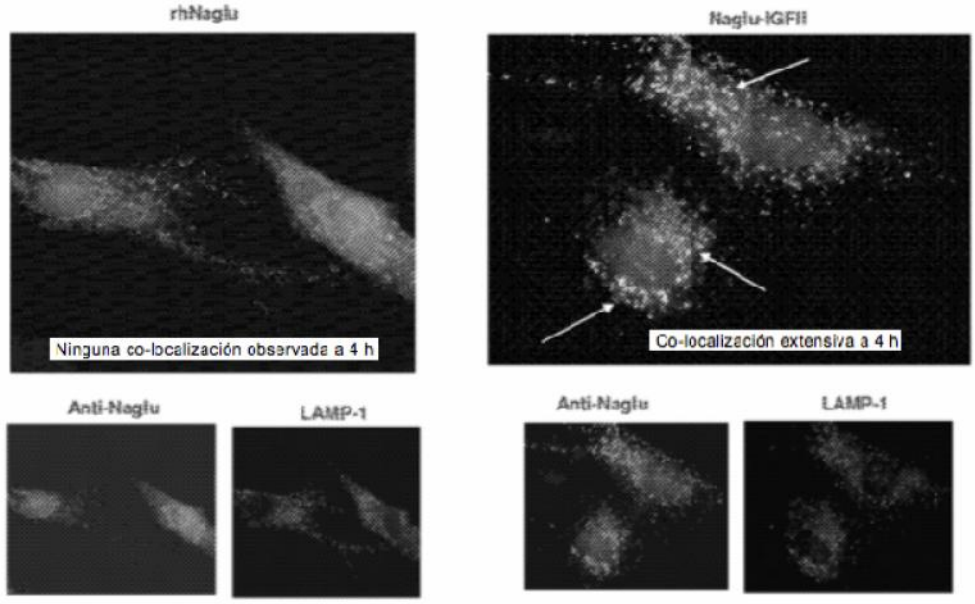


Figura 2-14. Estudio de microscopía confocal usando las células de fibroblasto del paciente SanB (GM01426). Se observó internalización extensiva de Naglu-IGFII, y co-localización de Naglu-IGFII con Lamp-1.

Figura 12

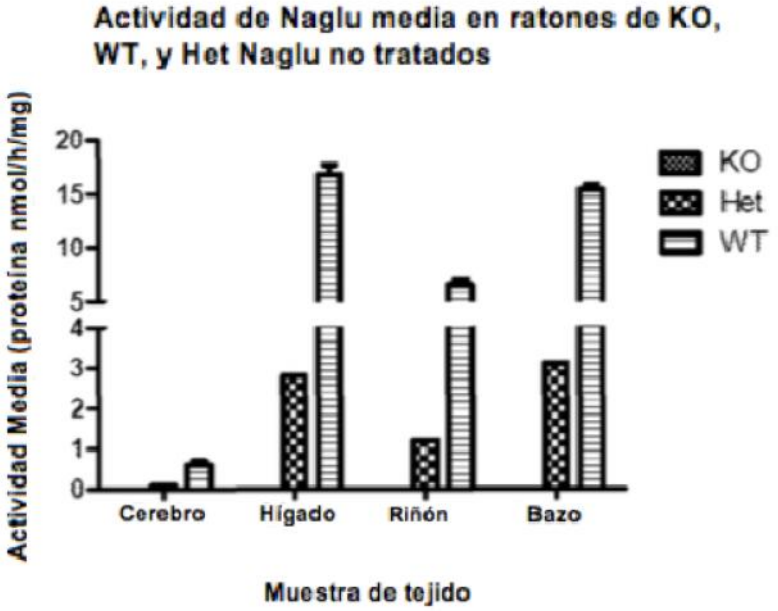


Figura 2-15. Actividad de Naglu en ratón de tipo silvestre (WT), Naglu-/- (KO) y heterocigota Naglu+/- (Het). Deficiencia total de Naglu en ratón SanB se observó en cerebro, hígado, riñón y bazo.

Figura 13

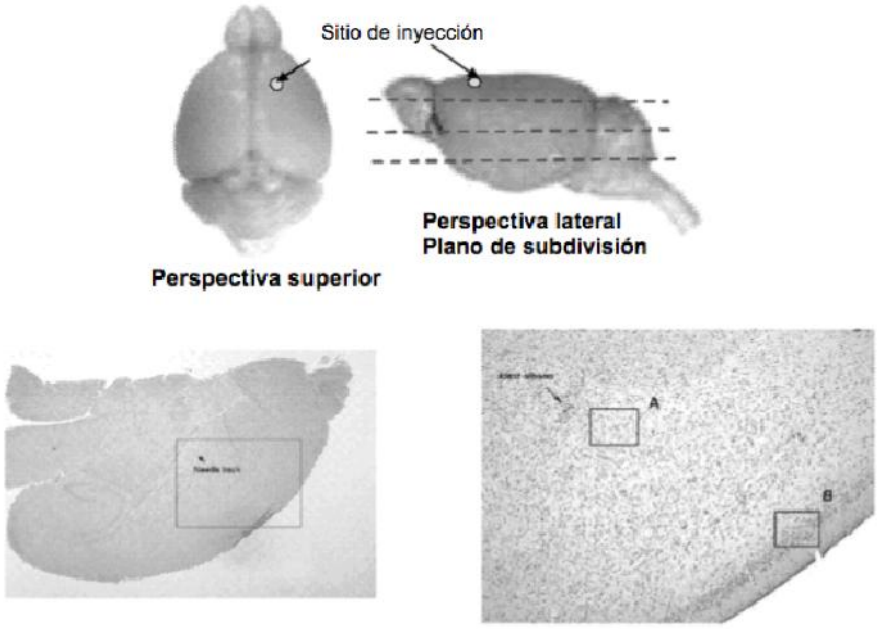


Gráfico superior, vista superior y lateral del cerebro de ratón para indicar el sitio de inyección IC y el plano de subdivisión para análisis de histología. Gráfico medio, una sección transversal de cerebro de ratón observada a una magnitud de 1x. Área en cuadro indica el campo para imagen de microscopía 4x en el gráfico inferior. Gráfico inferior, imagen 4x de histología. Cuadro A indica el campo de imagen de microscopía 40x en la Figura 2-17 y 2-18.

Figura 14

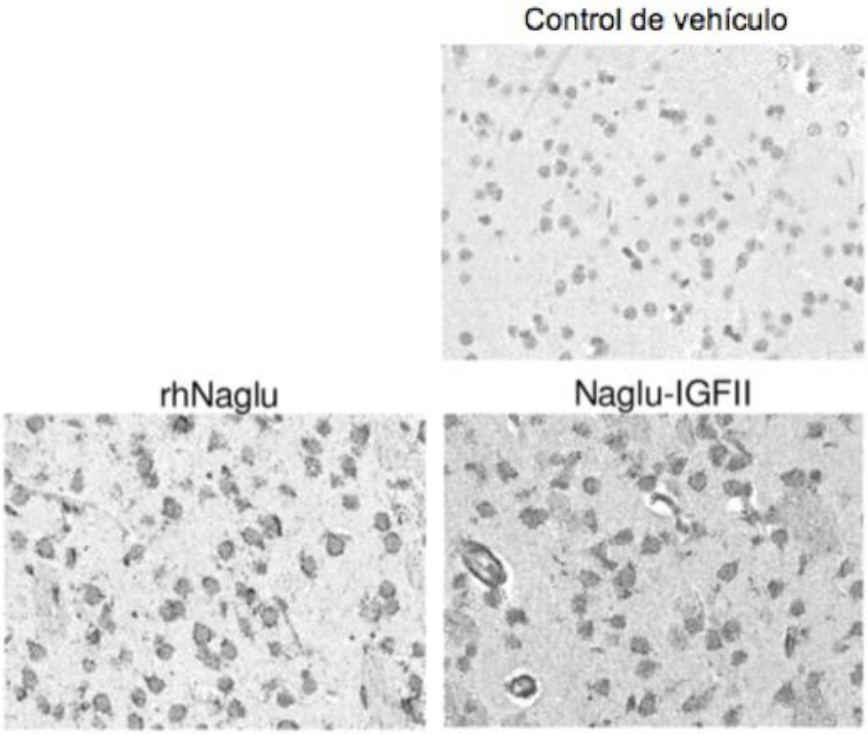


Figura 2-17 Inmunohistoquímica de la corteza cerebral en ratón SanB 7 días después de la inyección IC 40x. Tanto rhNaglu como Naglu-IGFII exhibieron absorción celular extensiva en neuronas así como en células gliales, y los patrones de distribución y absorción celular eran muy similares entre las dos proteínas. (anticuerpo monoclonal Naglu anti-humano)

Figura 15

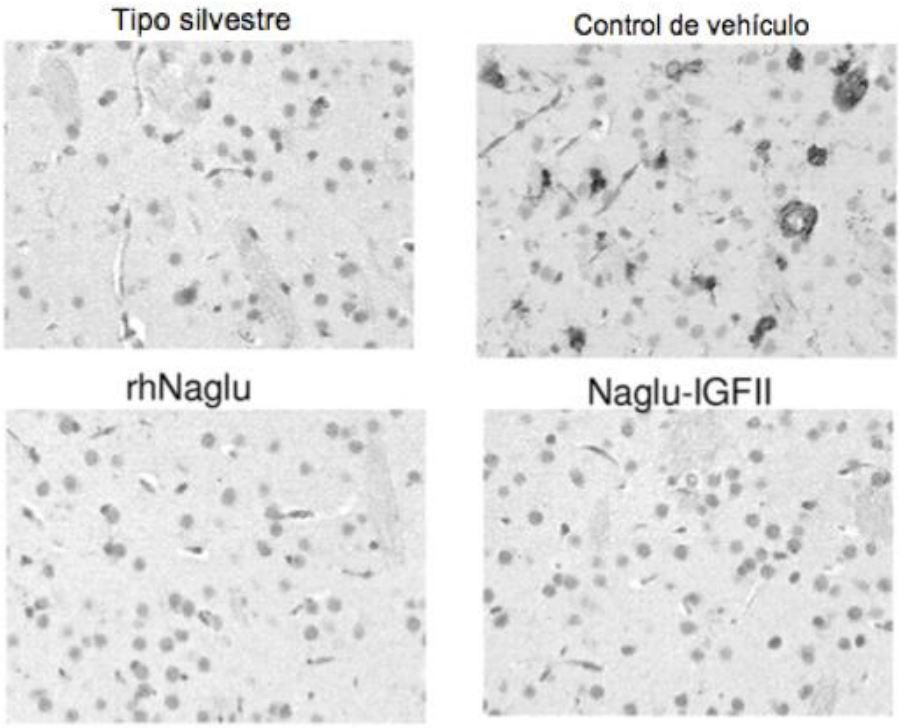


Figura 2-18. Inmunotinción de LAMP-1 de la corteza cerebral 40x. En comparación con el cerebro del ratón de tipo silvestre, almacenamiento lisosomal incrementado era obvio en el cerebro del ratón SanB tratado con vehículo, como se había demostrado por los puntos positivos de inmunotinción LAMP-1 incrementada. El cerebro del ratón SanB tratado tanto con rhNalgu como Naglu-IGFII exhibió reducción del almacenamiento lisosomal que era muy similar al ratón de tipo silvestre.

Figura 16

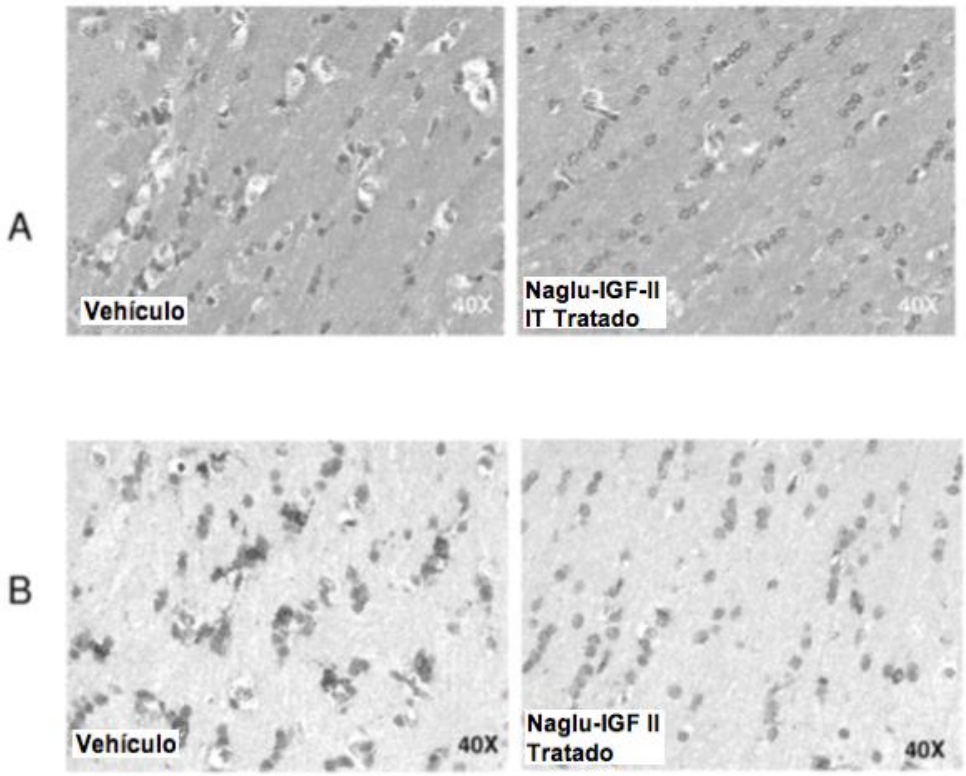
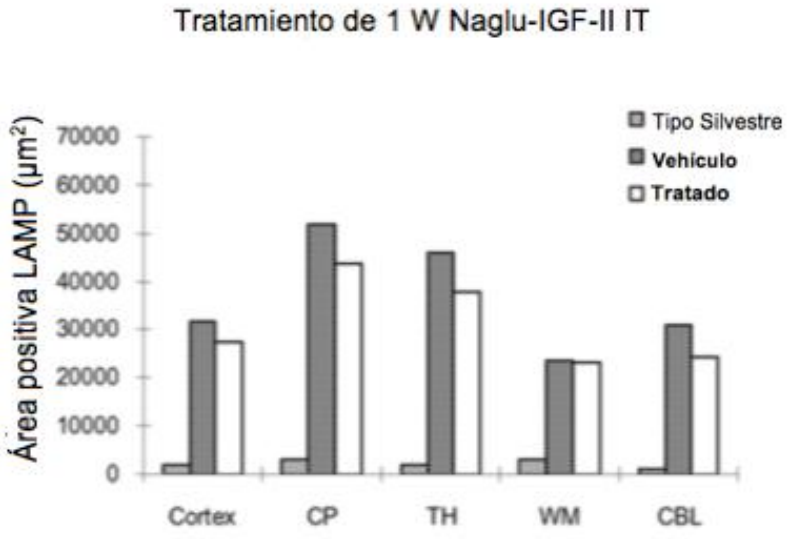

A
Vehículo
40X
Naglu-IGF-II
IT Tratado
40X
B
Vehículo
40X
Naglu-IGF II
Tratado
40X

Figura 17

A


Tratamiento de 1 W Naglu-IGF-II IT
Área positiva LAMP (µm²)
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
Cortex
CP
TH
WM
CBL
Tipo Silvestre
Vehículo
Tratado

B

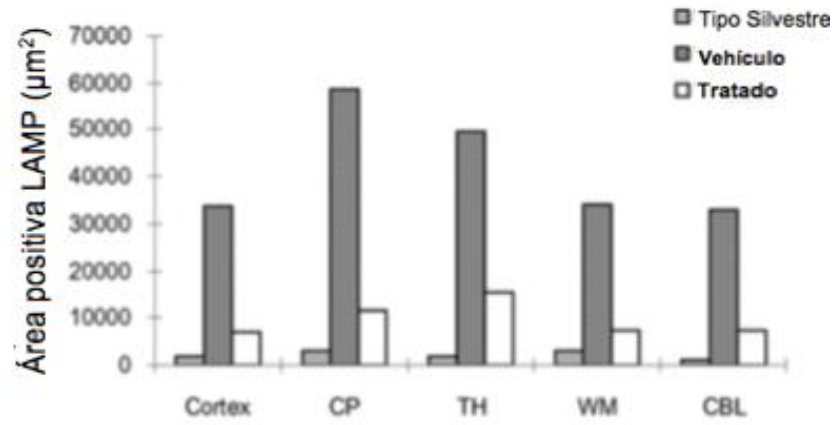

Tratamiento de 2 W Naglu-IGF-II IT
Área positiva LAMP (µm²)
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
Cortex
CP
TH
WM
CBL
Tipo Silvestre
Vehículo
Tratado

Figura 18

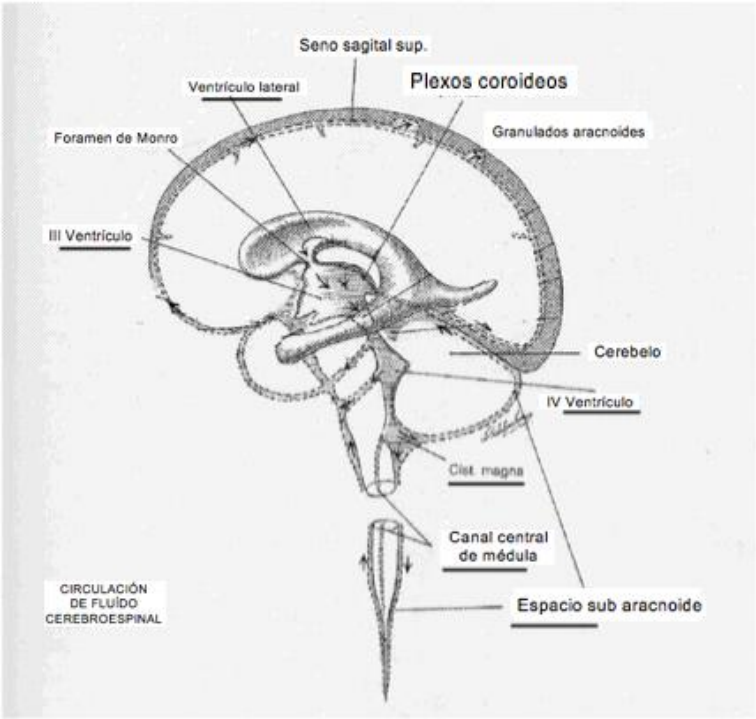


Figura 2-19. Para demostrar el sitio de inyección IT en raton de tipo silvestre canulado, un diagrama anatómico Sagital medio de CNS humano se utiliza como referencia en esta figura. La flecha azul indica la ubicación anatómica aproximada de la inyección IT en la médula espinal, y la flecha roja indica la región de corteza cerebral, donde los tejidos se obtuvieron para el estudio de inmunohistoquímica.

Figura 19

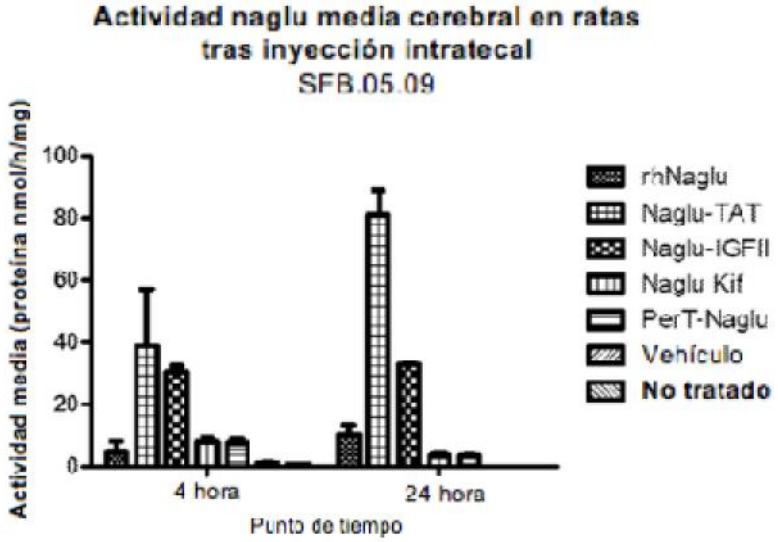


Figura 2-20 Actividad Naglu en el cerebro tras inyexxión IT. La actividad de Naglu era significativamente más alta en el cerebro de rata de tipo silvestre inyectado con Naglu-TAT y Naglu-IGFII

Figura 20

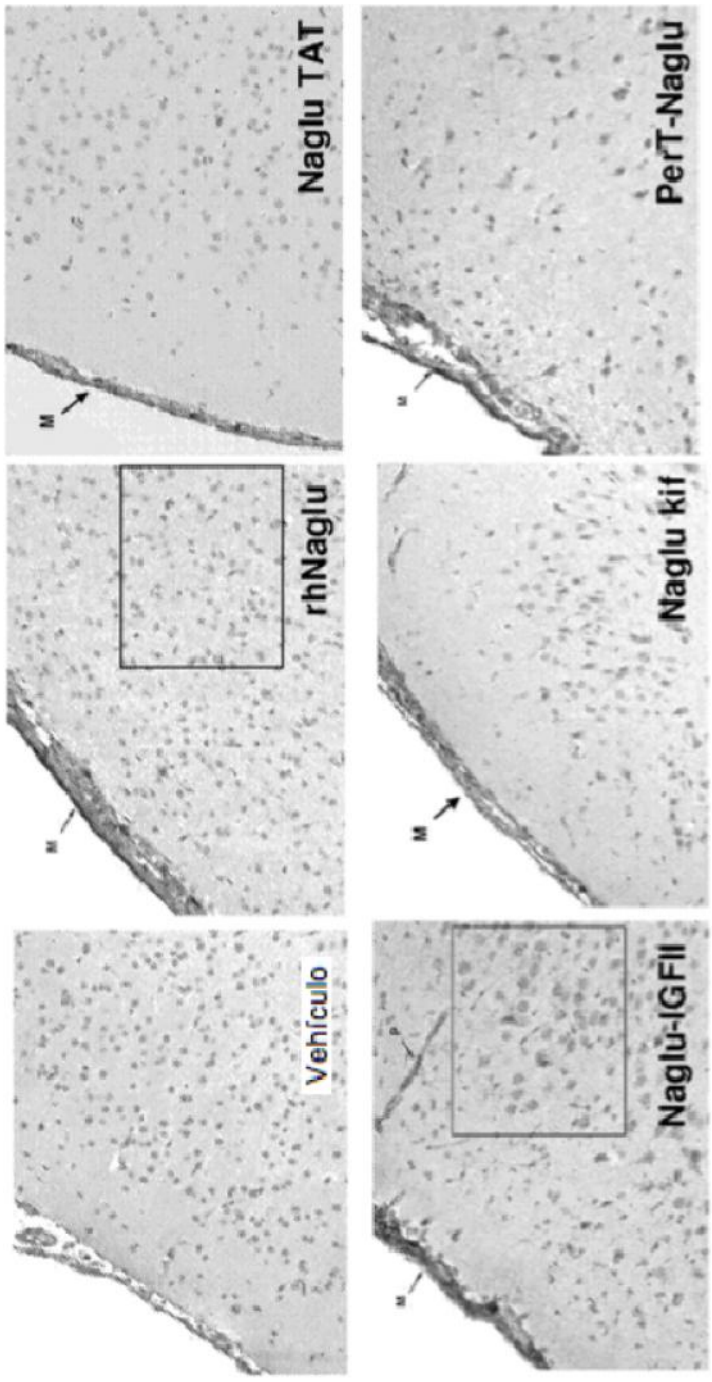


Figura 2-21. La inmunotinción de Naglu de la corteza cerebral de rata canulada de tipo silvestre tratada con rhNaglu, Naglu-TAT, Naglu-IGFII, Naglu-Kif y PerT-Naglu 24 h después de inyección IT 20x. Naglu-IGFII era la única proteína que exhibió distribución extensiva en parénquimas del cerebro. La absorción celular en las neuronas y células gliales también eran evidentes en la rata tratada con Naglu-IGFII. Por otra parte, en grupos tratados con rhNaglu, Naglu-TAT, Naglu kif y PerT-Naglu, la proteína sólo permaneció en la meninges (M)

Figura 21

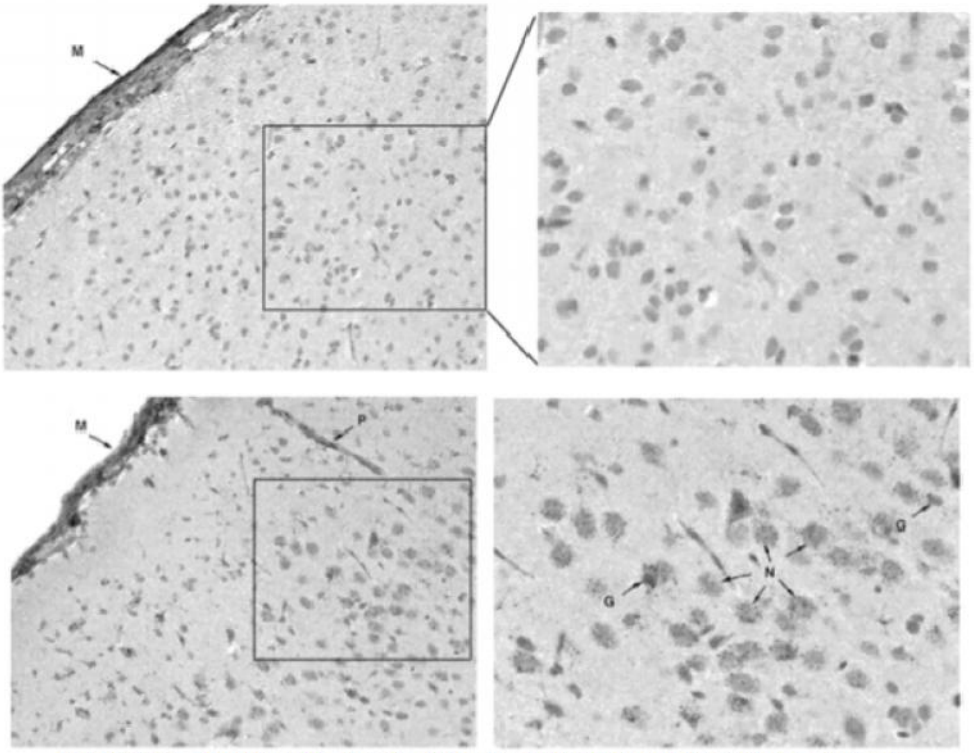


Figura 2-22. Magnificación de alta potencia de los portaobjetos seleccionados de Figura 2-21. El panel superior, en la rata canulada de tipo silvestre tratado con rhNaglu, rhNaglu permaneció en la meninges (M) sólo, ninguna tinción positiva encontrada en la parénquima del cerebro. Panel inferior, en rata canulada de tipo silvestre tratada con Naglu-IGFII, distribución extensiva se observó en la parénquima del cerebro, y la absorción celular se observó en neuronas y células gliales.

Figura 22

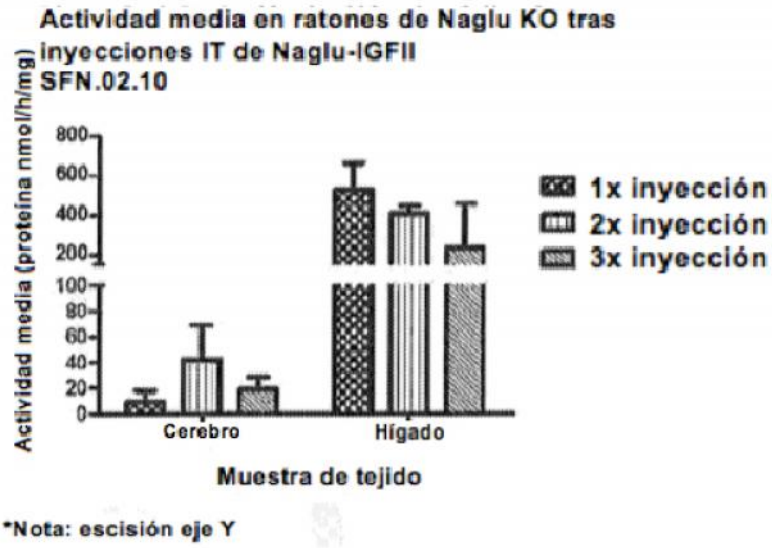


Figura 2-23. Actividad Naglu en el cerebro e hígado 24 h tras última inyección IT. Entre los tres grupos tratados, la actividad de Naglu en el cerebro no mostró diferencias significativas, lo mismo es cierto para la actividad de Naglu en el hígado. Este resultado implicó que la actividad Naglu detectada en el cerebro e hígado se debió principalmente a la última inyección que ocurrió 24 h antes del sacrificio No está claro en este momento por qué hubo actividad de Naglu significativamente más alta en el hígado en comparación a en el cerebro. Un estudio farmacocinético completo tras inyección IT puede ayudar a interpretar la diferencia.

Figura 23

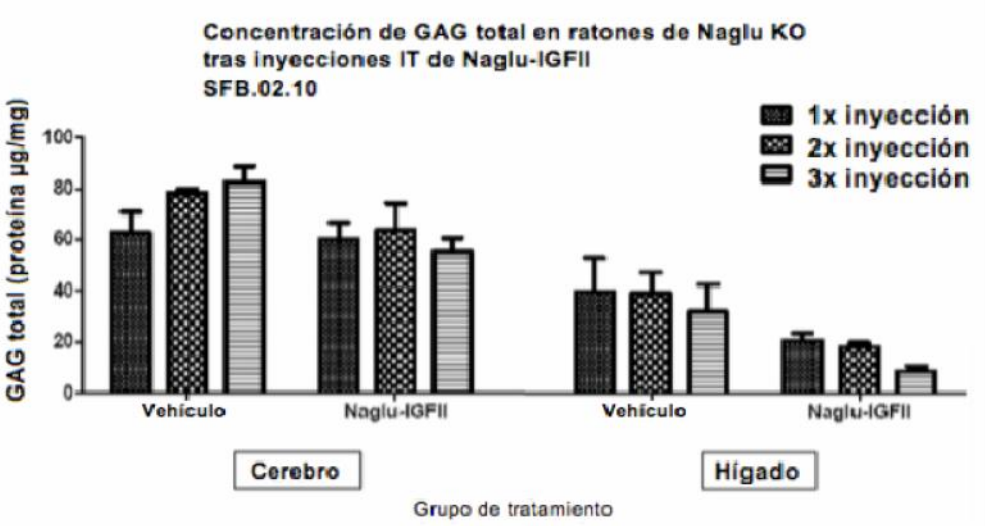


Figura 2-24. Nivel GAG total en el cerebro e hígado tras inyección IT de Naglu-IGFII. GAG total en el cerebro de ratones SanB tratados con vehículo exhibió incrementos progresivos, un reflejo del efecto acumulativo como el envejecimiento de ratones SanB. Una reducción estadísticamente significativa de GAG en el cerebro se observó en el grupo de 3x inyección ($p<0,05$). Reducciones estadísticamente significativas de GAG en el hígado también se observaron en grupos de inyección 2x y 3x ($p<0,05$). El cambio más rápido y más drástico

Figura 24

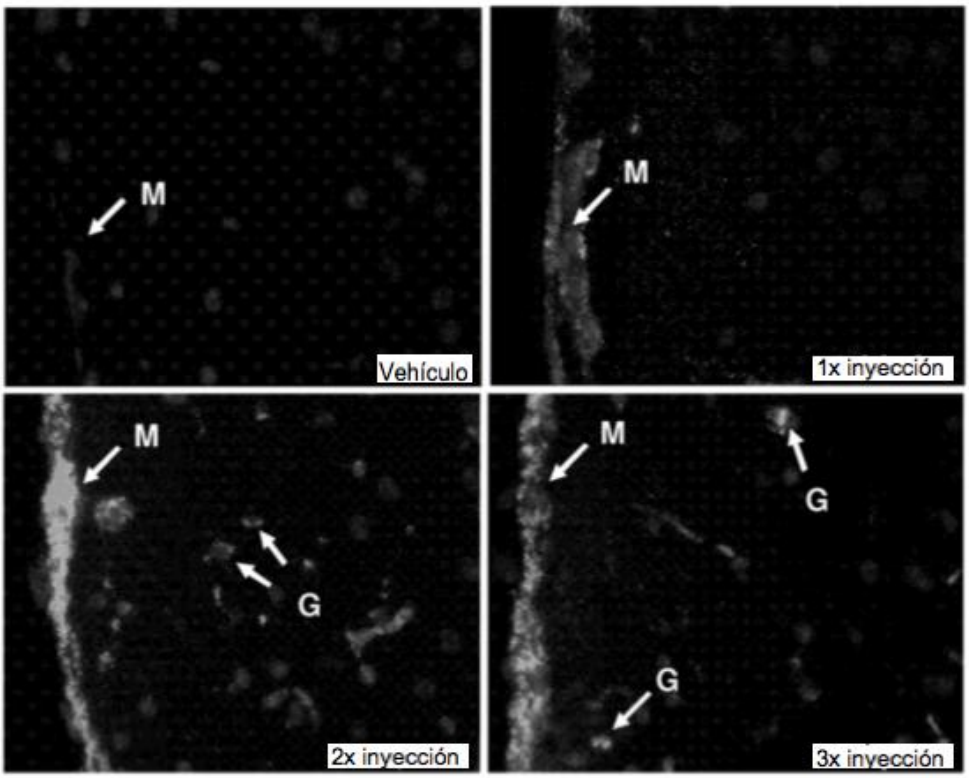


Figura 2-25. Biodistribución de Naglu en el cerebro de ratones SanB tras inyección IT. La tinción inmunofluorescente de Naglu reveló la proteína de Naglu-IGFII en la meninges (M) y parénquima del cerebro. Absorción celular se observó en los grupos de inyección 2x y 3x. G: células gliales.

Figura 25

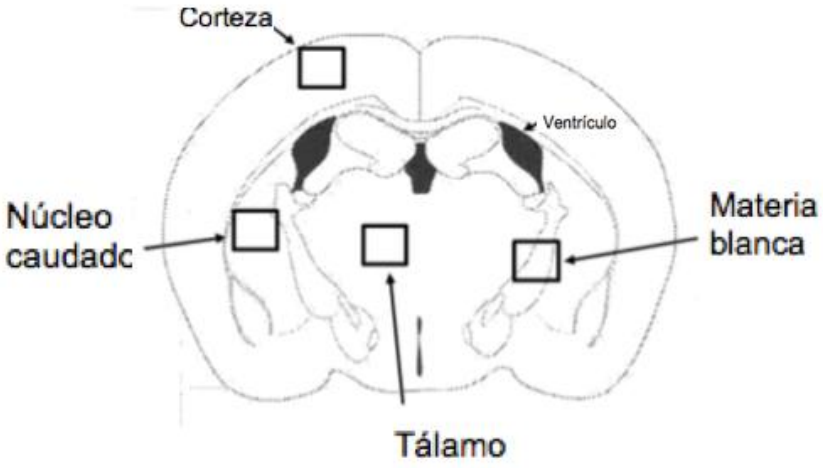


Figura 2-26. Sección coronal del cerebro de ratón. Los cuadros indican donde se tomaron los imágenes para inmunotinción LAMP-1 (Figura 2-27 a 2-31). Para demostrar la extensión de distribución de proteína y eficacia, corteza cerebral y tejidos subcorticales, tales como núcleo caudado, tálamo y sustancia blanca se seleccionaron para inmunotinción LAMP1

Figura 26

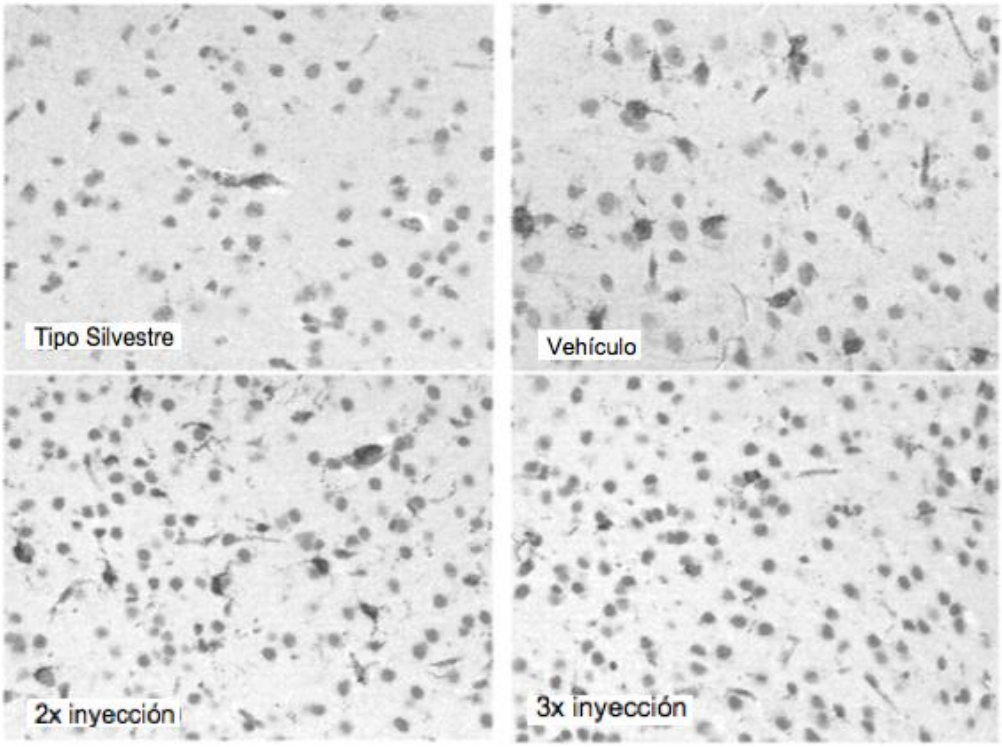


Figura 2-27. La inmunotinción LAMP1 de la corteza cerebral 40x. En comparación con el cerebro del ratón de tipo silvestre, almacenamiento lisosomal incrementado se observó en el cerebro de ratón SanB tratado con vehículo, como se ha observado por los puntos positivos de inmunotinción LAMP1 incrementada. La reducción de almacenamiento lisosomal tras inyección Naglu-IGFII IT era evidente por el tamaño reducido de puntos positivos de cerebro de ratón SanB tratado por 2x inyección, y el tamaño reducido y el número de puntos positivos del cerebro de ratón SanB tratado por 3x inyección.

Figura 27

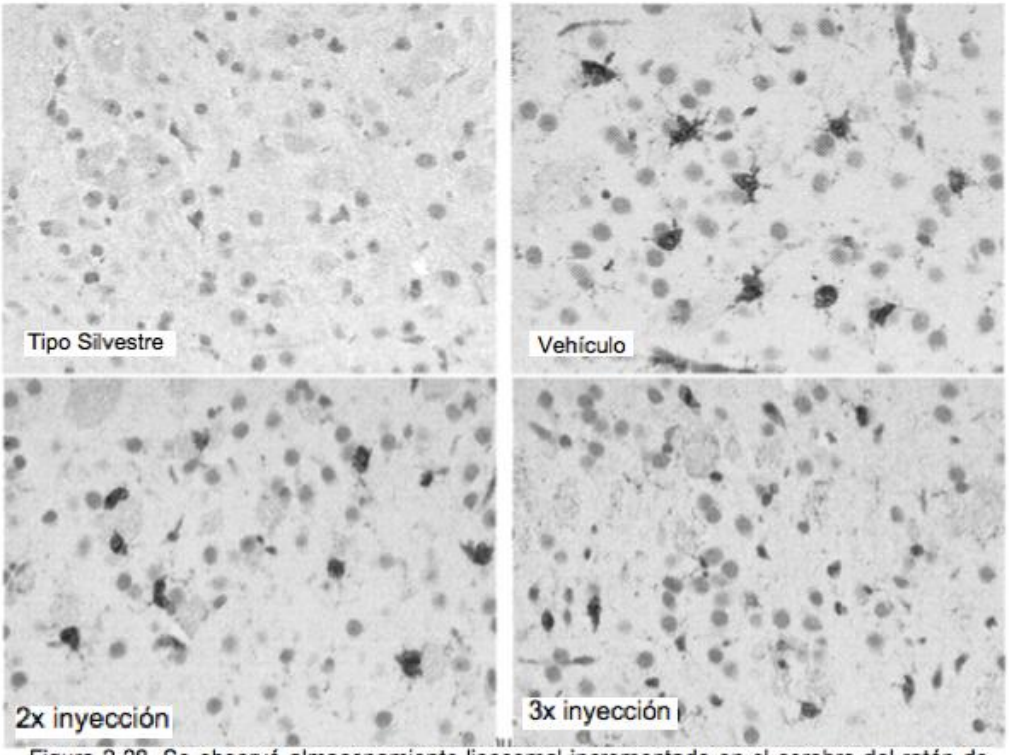


Figura 2-28. Se observó almacenamiento lisosomal incrementado en el cerebro del ratón de SanB tratado con vehículo, como se ha observado por los puntos positivos de inmunotinción LAMP1 incrementada. La reducción de almacenamiento lisosomal tras inyección IT de Naglu-IGFII era evidente por el tamaño reducido de puntos positivos de cerebro de ratón SanB tratado con 2x inyección, y el tamaño reducido y número de puntos positivos del cerebro de ratón SanB tratado con 3x inyección.

Figura 28

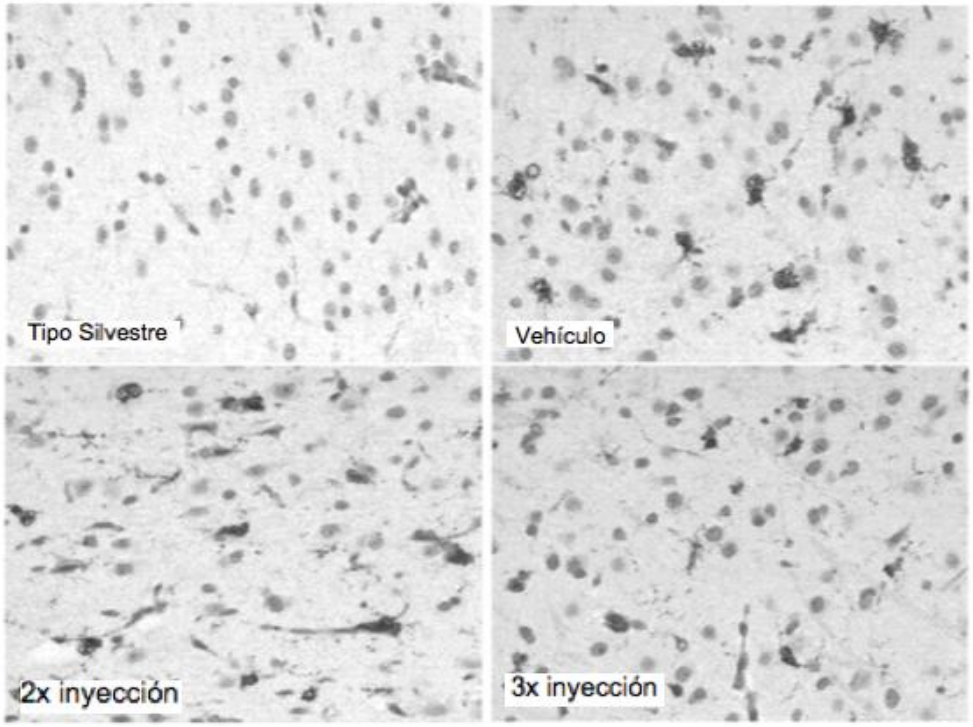


Figura 2-29. La inmunotinción LAMP-1 del tálamo, un núcleo diencefálico 40x. La reducción de almacenamiento lisosomal tras inyección Naglu-IGFII IT era evidente por el tamaño reducido de puntos positivos del cerebro de ratón SanB tratado con 2x inyección, y el tamaño reducido y el número de puntos positivos del cerebro de ratón SanB tratado con 3x inyección

Figura 29

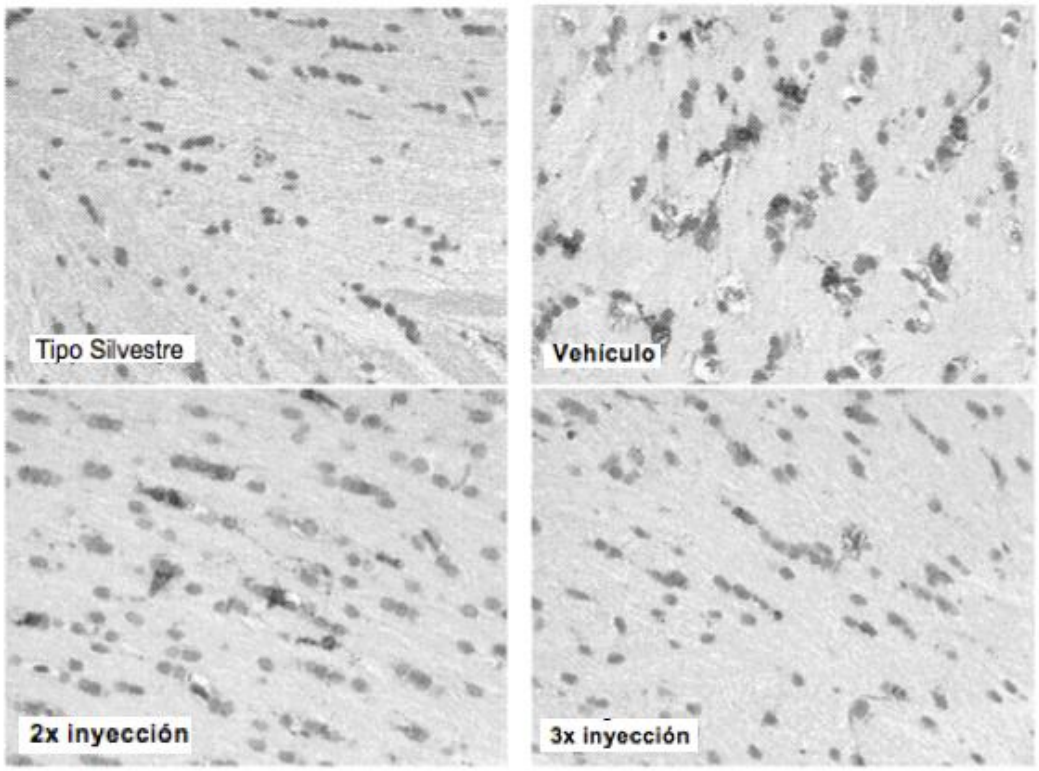


Figura 2-30. Inmunotinción LAMP-1 de sustancia blanca 40x. La pista longitudinal de fibras de axon de neurona distingue la sustancia blanca de sustancia gris presentadas en al Figura 2-27 a 2-30. No obstante, el mismo patrón de incrementos de almacenamiento lisosomal podría observarse en cerebro de ratón SanB tratado con vehículo cuando se compara con el ratón de tipo silvestre. La reducción de almacenamiento lisosomal tras inyección Naglu-IGFII IT era evidente por el tamaño reducido y número reducido de puntos positivos en el cerebro de ratón SanB tratado con inyección 2x y 3x.

Figura 30

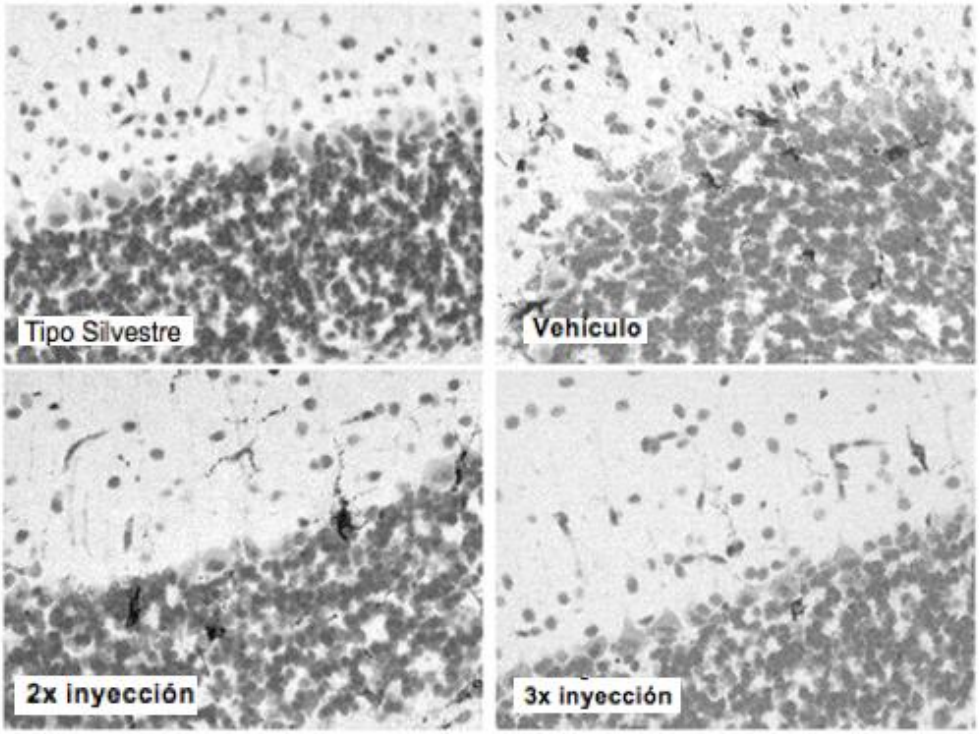


Figura 2-31. Inmunotinción LAMP-1 de la corteza cerebelar. Efecto similar de la reducción de almacenamiento lisosomal se observó en la corteza cerebelar como en otras áreas del cerebro. La morfología de la corteza cerebelar era evidente por las neuronas granulares populadas densamente, la capa molecular hipocelular, y la capa única de neuronas Purkinje entre las neuronas granulares y la capa molecular. Las neuronas Purkinje fueron identificadas por el citoplasma grande y dendritas ocasionales en la capa molecular.

Figura 31

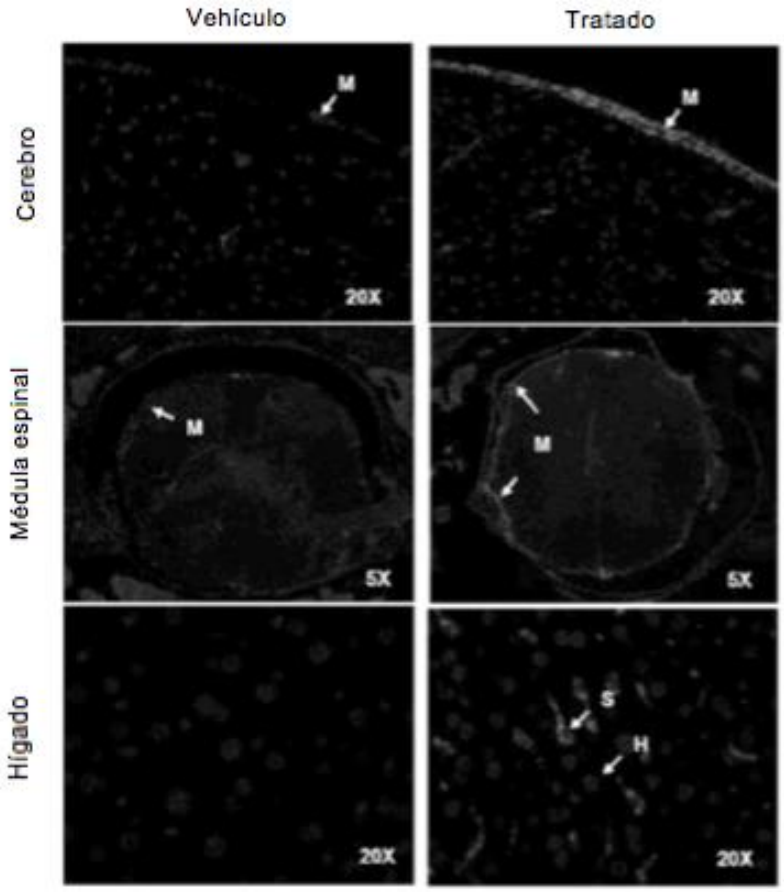

Vehículo
Tratado
Cerebro
Médula espinal
Hígado
M
M
M
M
S
H
20X
20X
5X
5X
20X
20X

Fig. 32

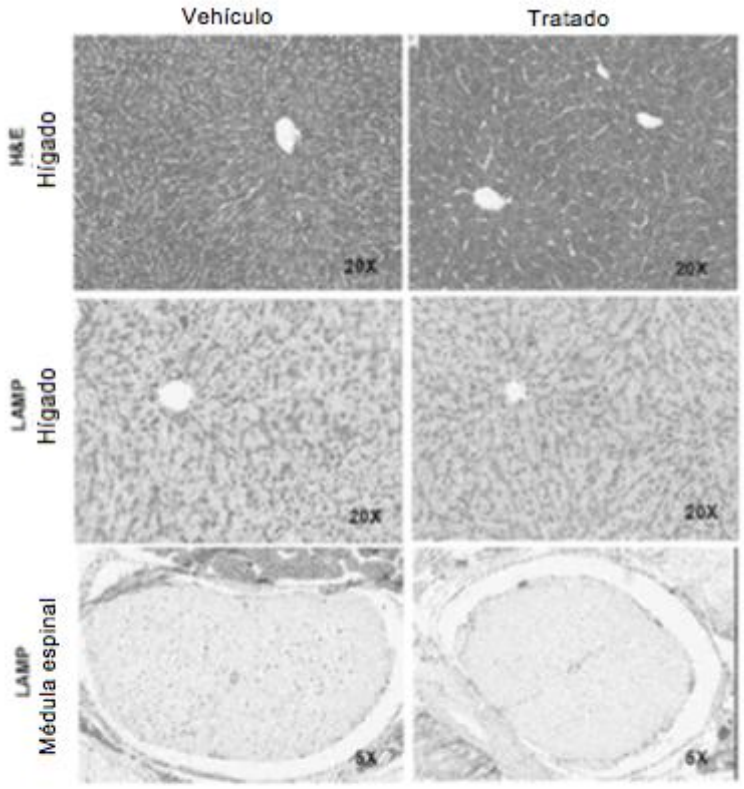

Vehículo
Tratado
H&E
Hígado
20X
20X
LAMP
Hígado
20X
20X
LAMP
Médula espinal
5X
5X

Fig. 33

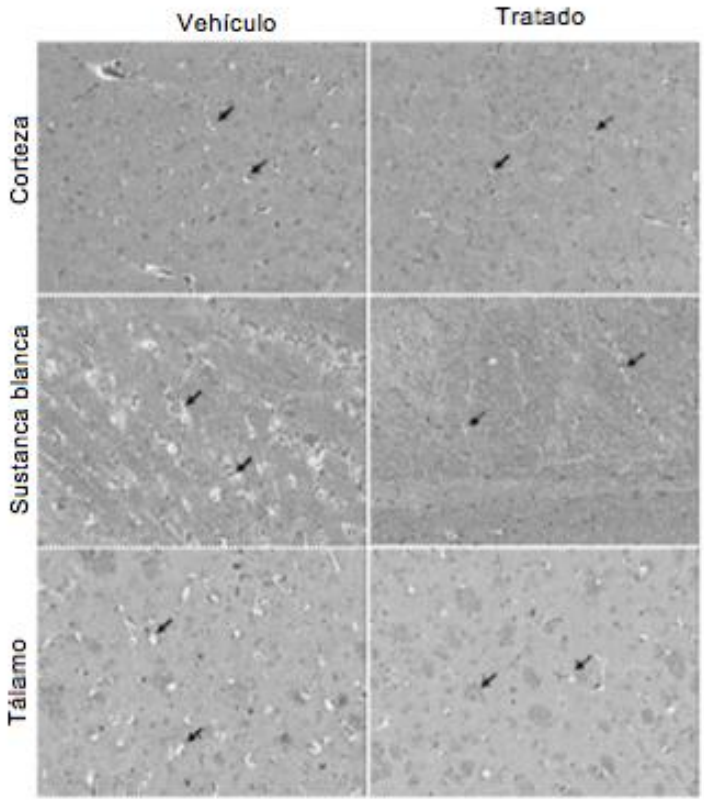


Fig. 34A

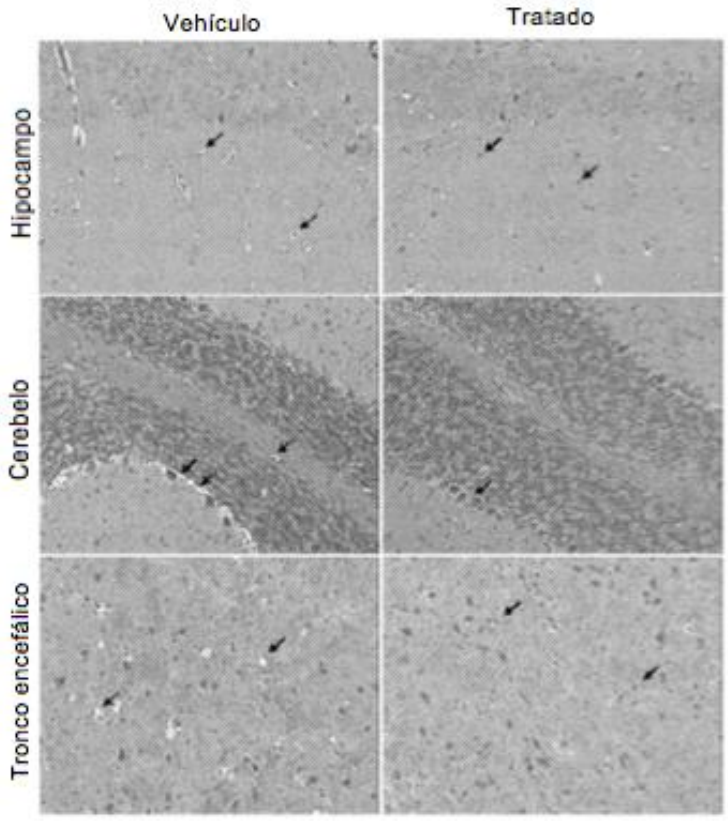


Fig. 34B

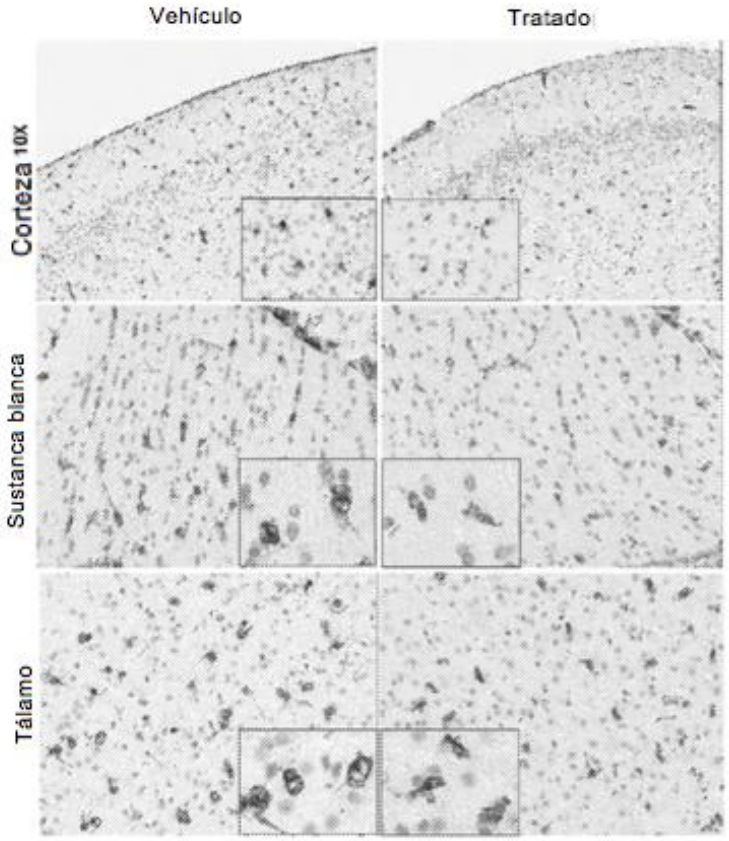


Fig. 35A

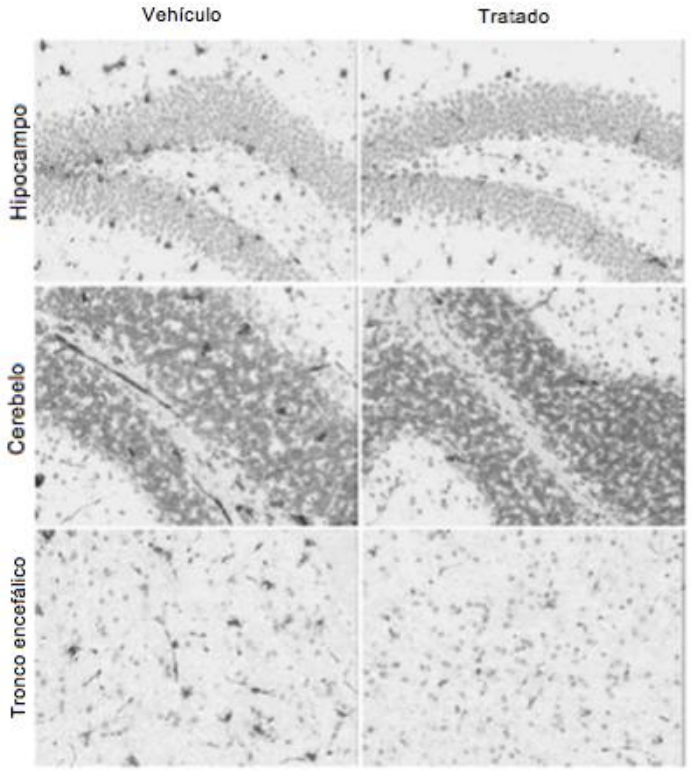


Fig. 35B

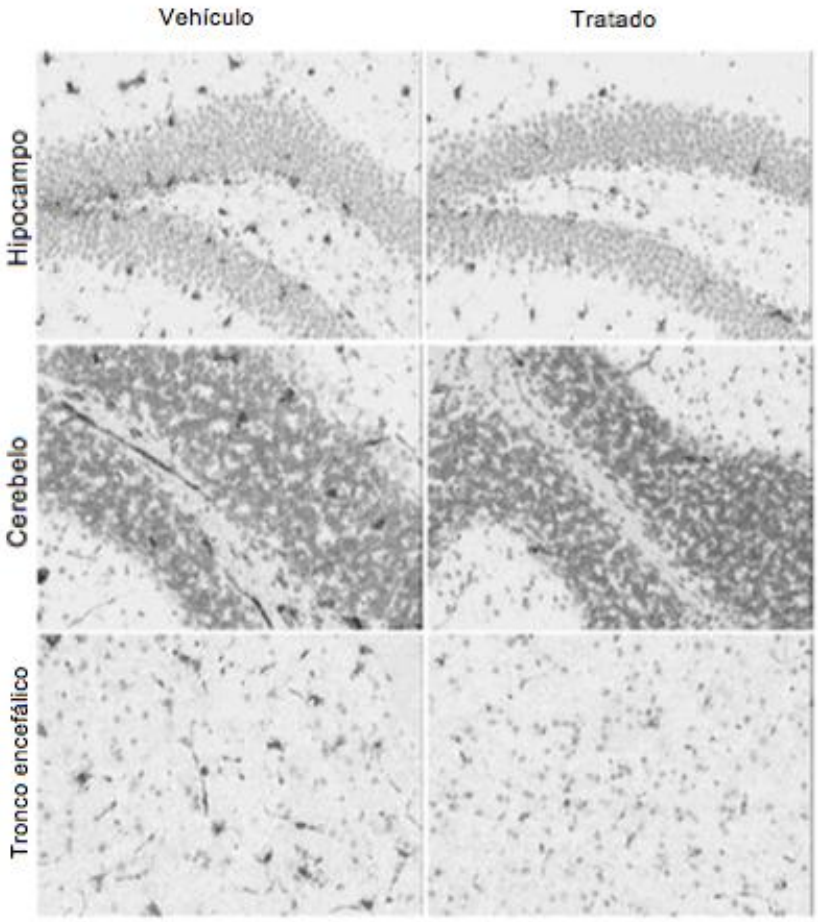


Fig. 35B

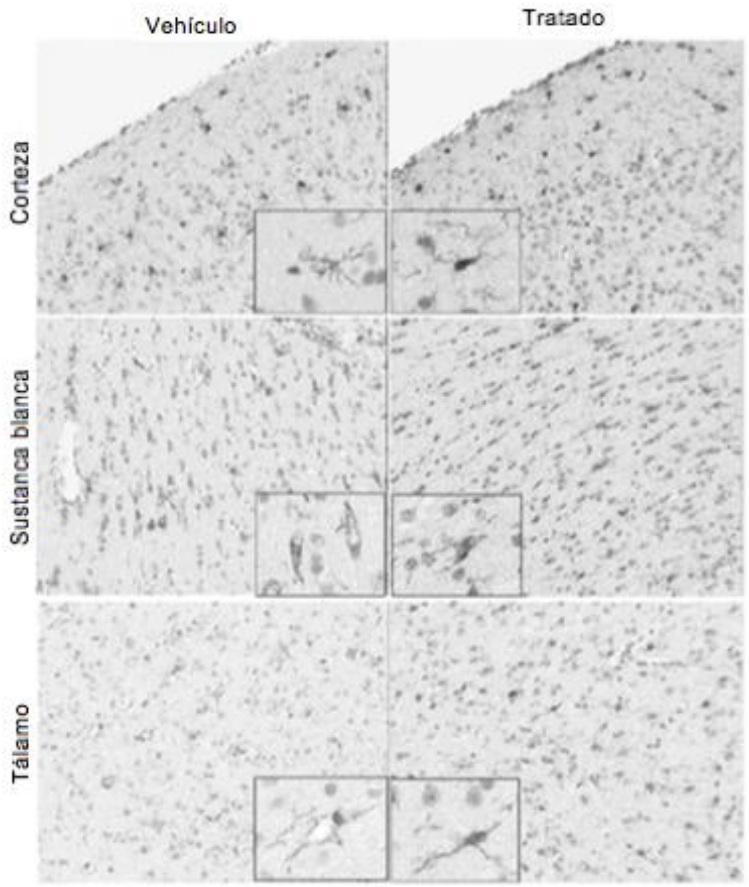


Fig. 36A

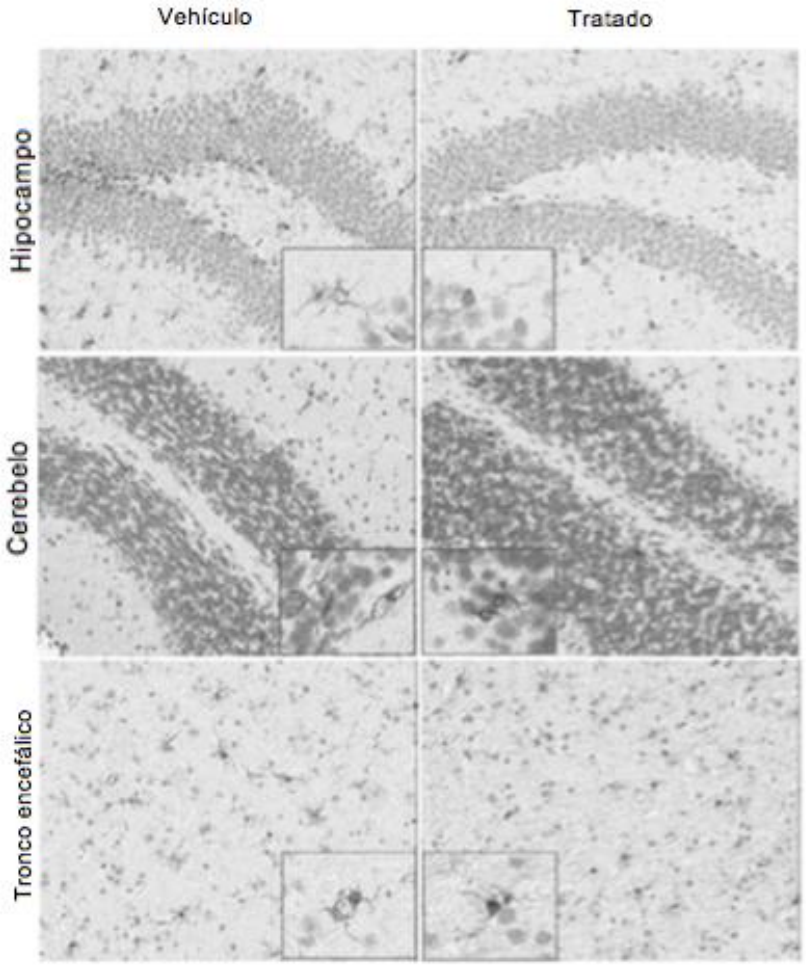


Fig. 36B

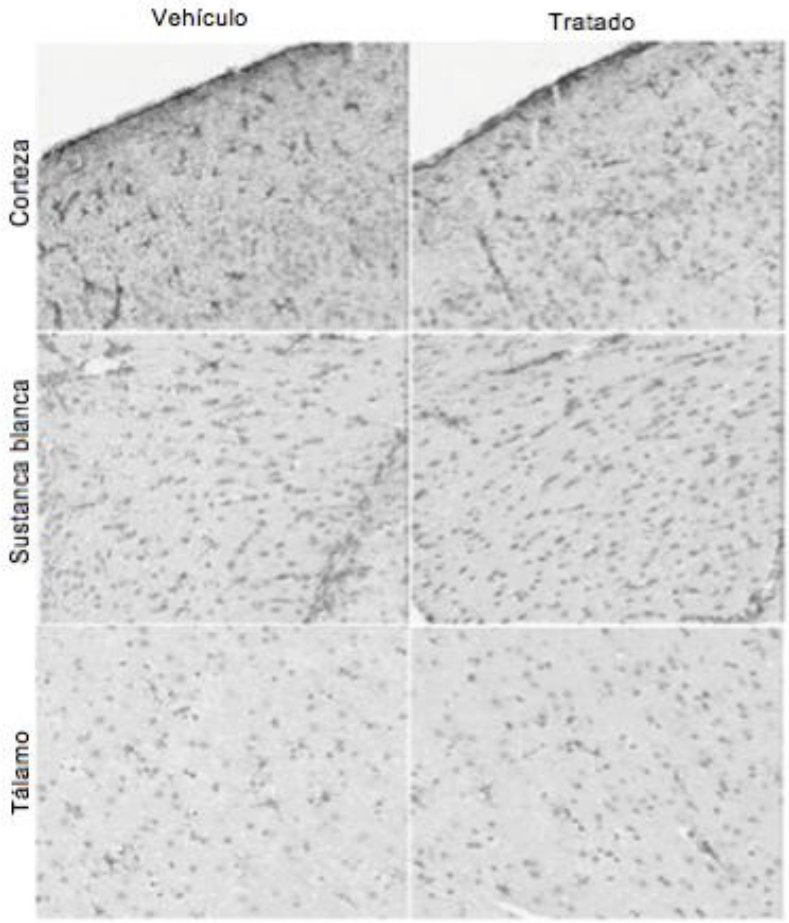


Fig. 37A

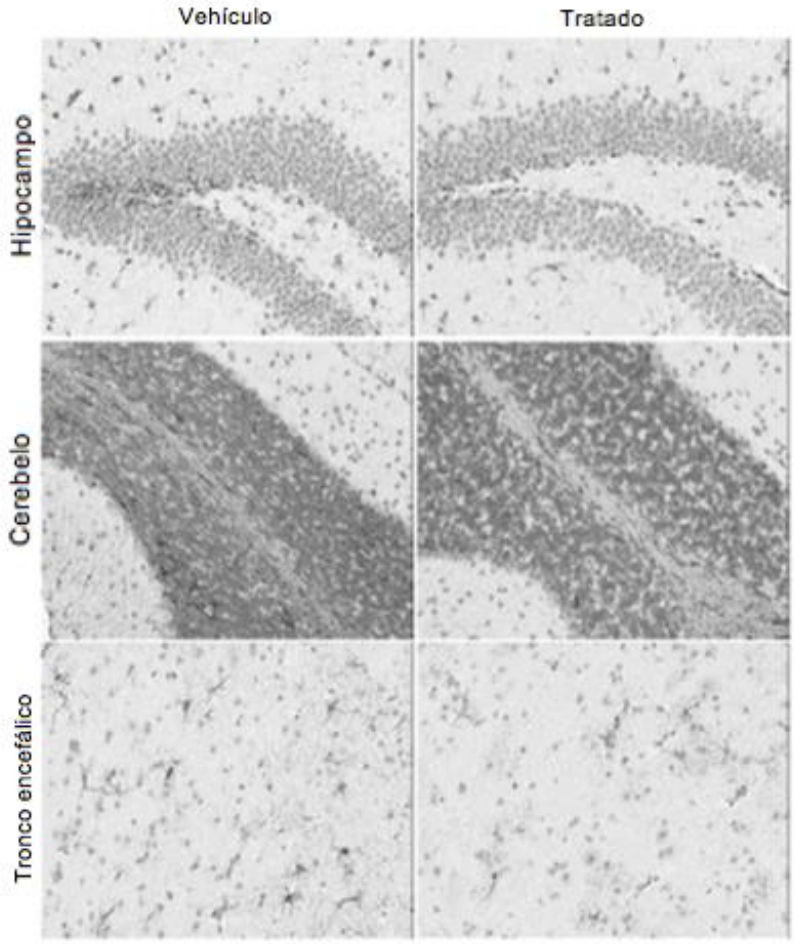


Fig. 37B

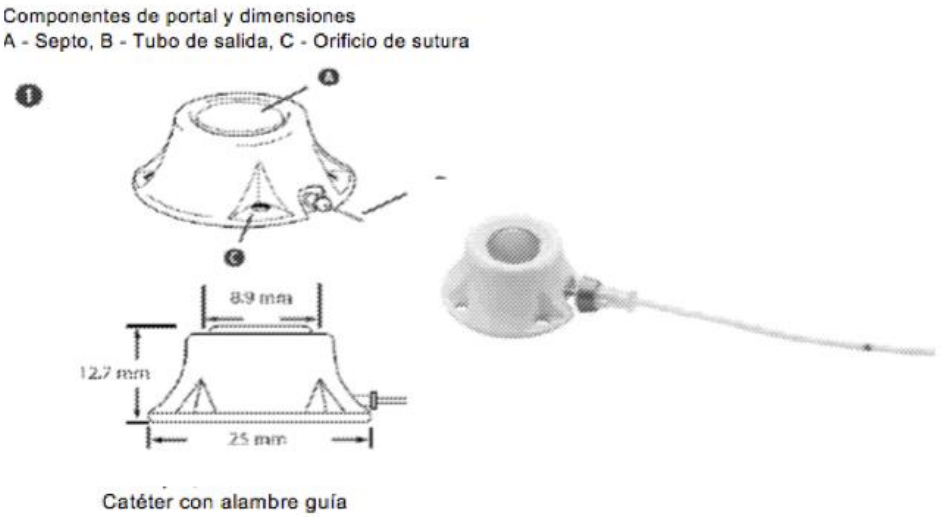

Componentes de portal y dimensiones
A - Septo, B - Tubo de salida, C - Orificio de sutura
A
C
8.9 mm
12.7 mm
25 mm
Catéter con alambre guía

Fig. 38

Sistema de acceso implantable intratecal de perfil bajo Puerto-A-Cath

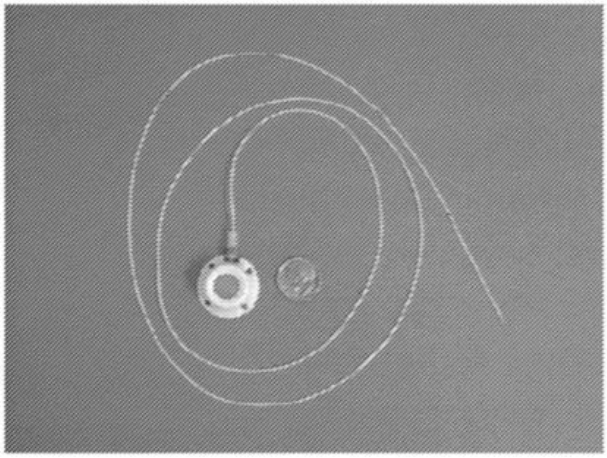


Fig. 39

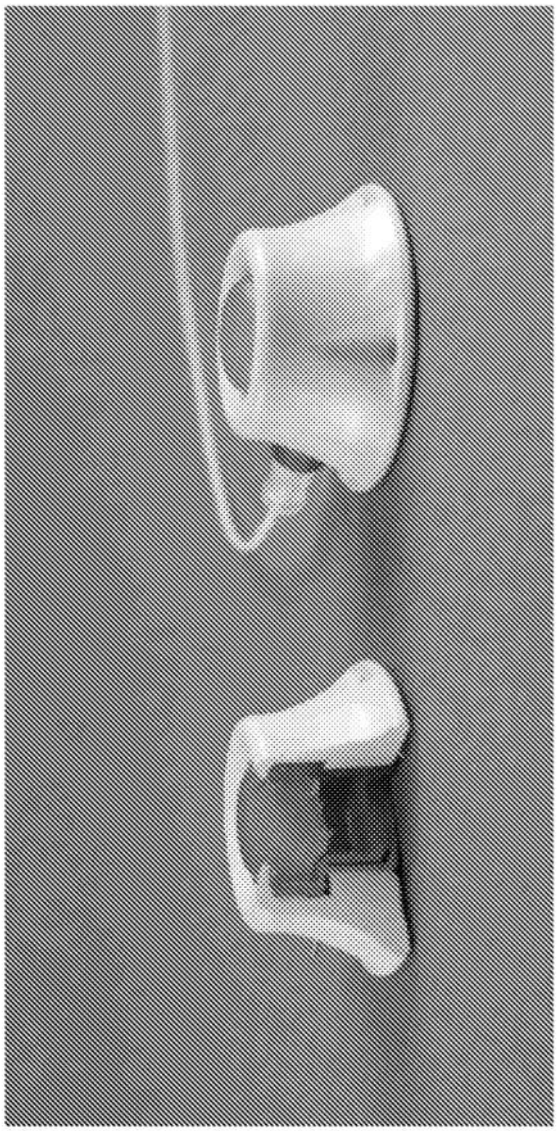


Fig. 40

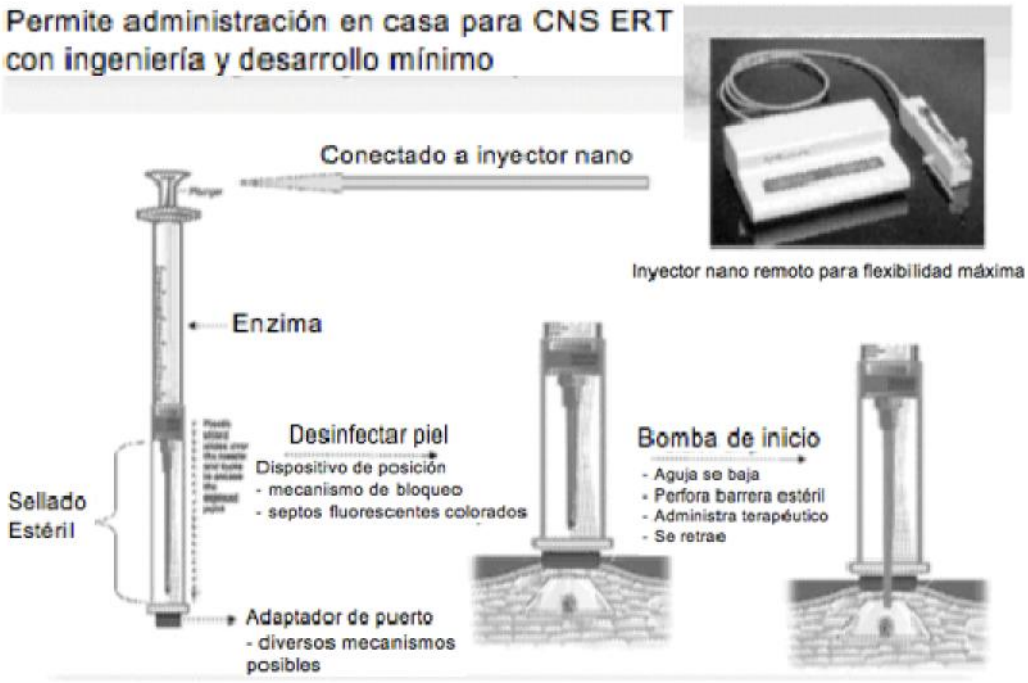

Permite administración en casa para CNS ERT con ingeniería y desarrollo mínimo
Conectado a inyector nano
Inyector nano remoto para flexibilidad máxima
Enzima
Desinfectar piel
Dispositivo de posición
- mecanismo de bloqueo
- septos fluorescentes colorados
Bomba de inicio
- Aguja se baja
- Perfora barrera estéril
- Administra terapéutico
- Se retrae
Sellado Estéril
Adaptador de puerto
- diversos mecanismos posibles

Fig. 41

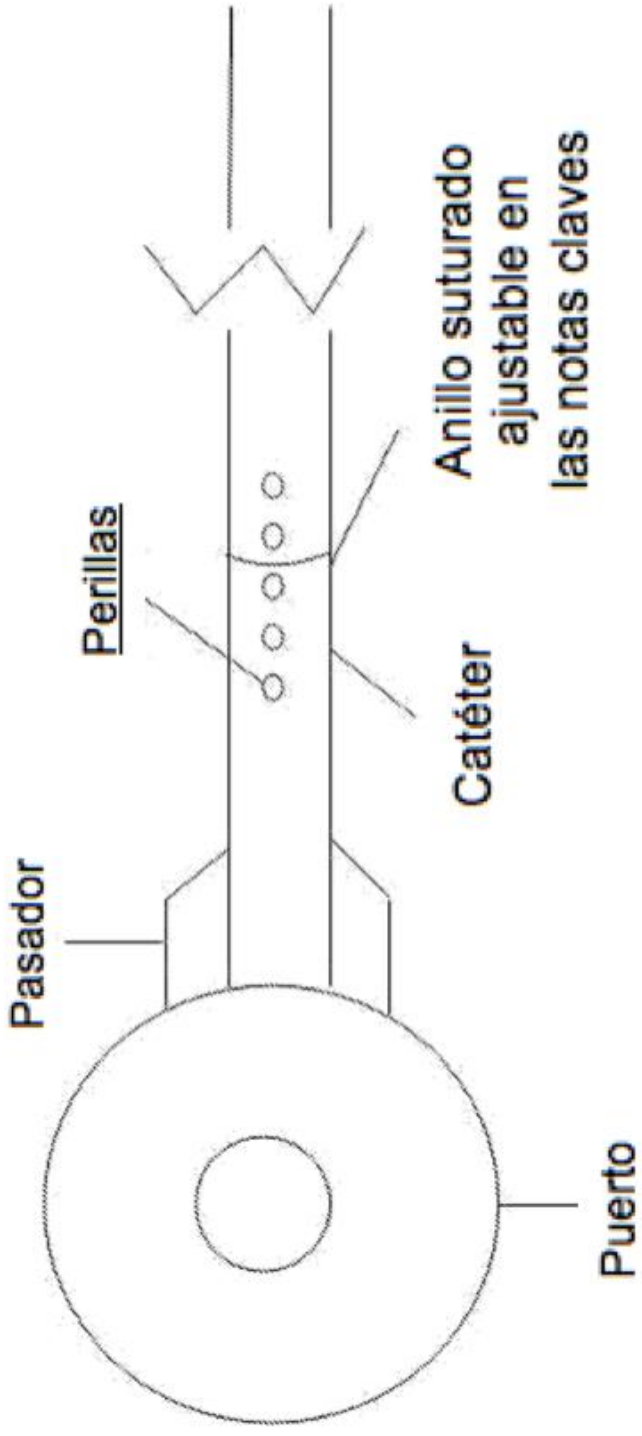

Anillo suturado ajustable en las notas claves
Perillas
Catéter
Pasador
Puerto

Fig. 42

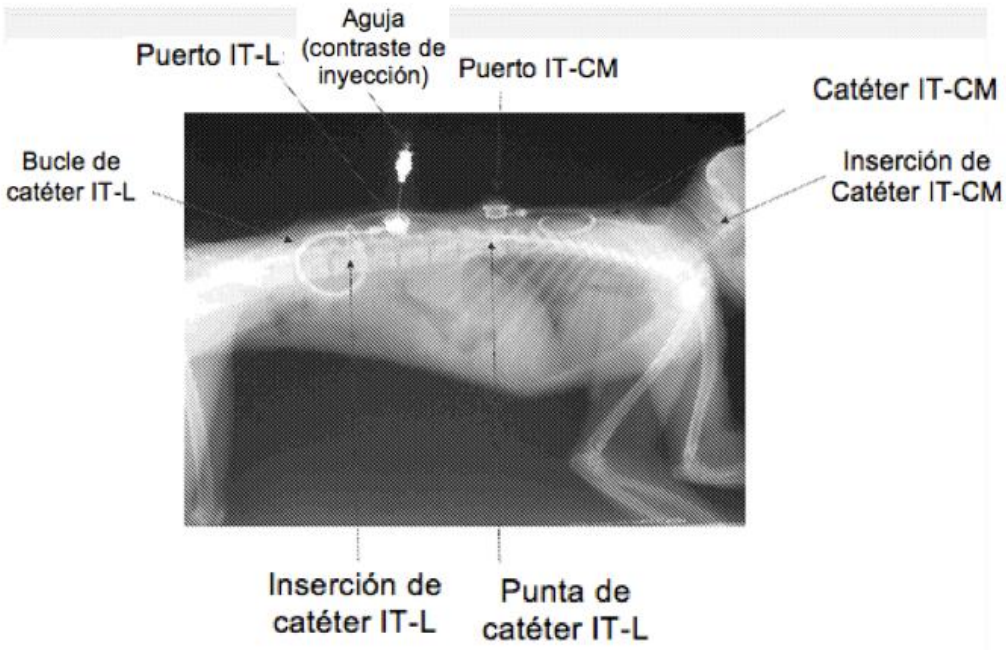


Fig. 43A

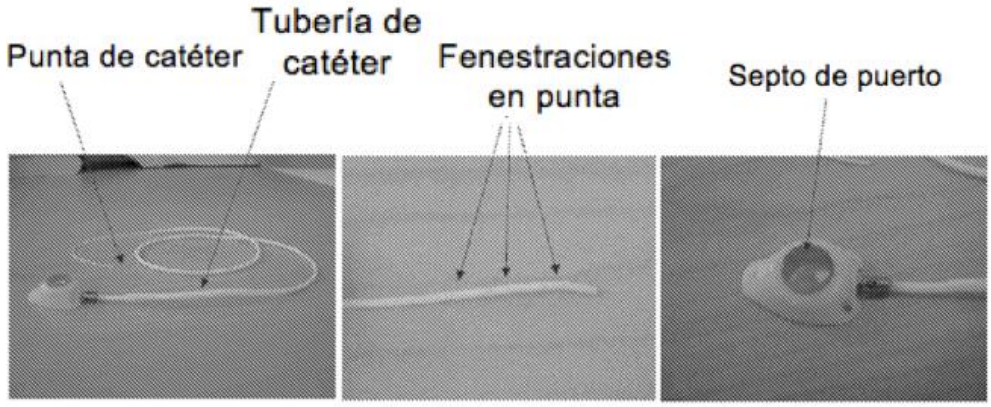


Fig. 43B

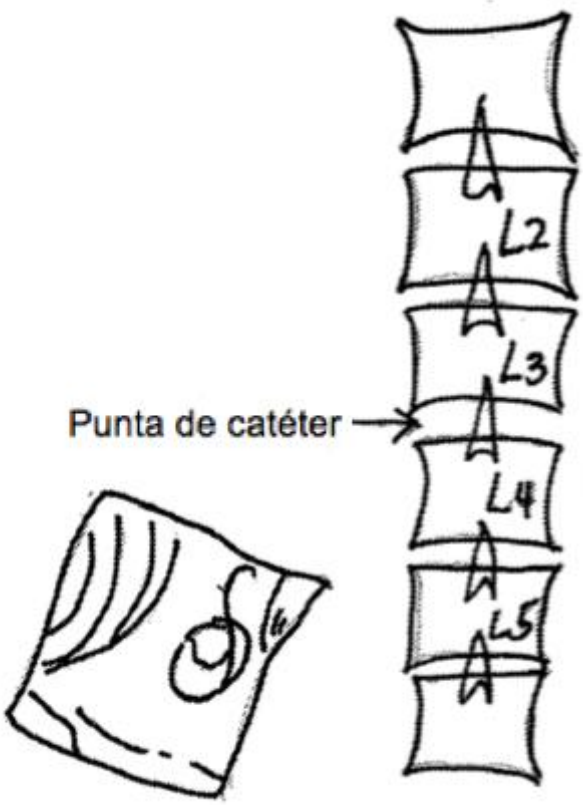


Fig. 43C