

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 844**

51 Int. Cl.:

C12N 13/00 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

A61K 31/737 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2012 PCT/US2012/043369**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12177778**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2012 E 12803458 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2721151**

54 Título: **Tratamiento dirigido contra TNF para las mucopolisacaridosis y otros trastornos lisosómicos**

30 Prioridad:

20.06.2011 US 201161498946 P
12.12.2011 US 201161569452 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2018

73 Titular/es:

MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE (100.0%)
One Gustave L. Levy Place
New York, New York 10029, US

72 Inventor/es:

SCHUCHMAN, EDWARD H.;
SIMONARO, CALOGERA M.;
STRIKER, GARY E. y
VLISSARA, HELEN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 664 844 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento dirigido contra TNF para las mucopolisacaridosis y otros trastornos lisosómicos

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere a un tratamiento dirigido contra TNF- α para las mucopolisacaridosis y otros trastornos lisosómicos.

10 **Antecedentes de la invención**

Los trastornos lisosómicos de acumulación representan un grupo de aproximadamente 40 enfermedades genéticas distintas y se producen por anomalías de las enzimas presentes en los lisosomas. Los individuos que están afectados con un trastorno lisosómico de acumulación presentan una amplia gama de síntomas clínicos dependiendo del trastorno específico y del genotipo concreto implicado. Los síntomas clínicos asociados con los trastornos lisosómicos de acumulación tienen un impacto devastador sobre los individuos afectados y sus familias. Por ejemplo, enfermedad reticuloendotelial, disfunción del sistema nervioso central, problemas conductuales, y retraso mental grave son característico de muchos trastornos lisosómicos de acumulación. En un grupo de trastornos lisosómicos de acumulación específico denominado mucopolisacaridosis (MPS), otros síntomas clínicos pueden incluir anomalías esqueléticas, organomegalia, opacidad de la córnea, y rasgos dismórficos.

Las mucopolisacaridosis (MPS) son un grupo de 11 deficiencias enzimáticas distintas que dan como resultado un defecto en el catabolismo de los glicosaminoglicanos (GAG). Neufeld et al., "The Mucopolysaccharidoses," en: METABOLIC AND MOLECULAR BASIS OF INHERITED DISEASE 3421-3452 (Scriver et al., eds McGraw-Hill) (2001). Debido a estos defectos enzimáticos heredados, los glicosaminoglicanos (GAG) se acumulan progresivamente en lisosomas y otros compartimentos intracelulares de pacientes con MPS, así como en matrices extracelulares de tejidos conectivos. Como se esperaba, las consecuencias clínicas principales de estas deficiencias enzimáticas son más evidentes en los órganos de tejidos conectivos, que incluyen cartílago, piel, y hueso. Las características clínicas principales incluyen una apariencia facial y un desarrollo craneal tosco y anómalo, extremidades cortas, enfermedad degenerativa de las articulaciones, tráquea y defectos de las válvulas cardíacas, y en algunos casos implicación neurológica. Los pacientes nacen normalmente sin rasgos clínicos de MPS, pero pueden desarrollar una implicación clínica progresiva. En los casos graves, un niño afectado puede requerir una gestión médica constante, pero a menudo, también muere antes de la adolescencia.

Otro tipo de trastorno lisosómico de acumulación, enfermedad de Niemann-Pick, conocido también como lipodosis de la esfingomielina, comprende un grupo de trastornos caracterizados por la infiltración de células espumosas del sistema reticuloendotelial. En la enfermedad de Niemann-Pick, las células espumosas se llenan con esfingomielina y, en un menor grado, con otros lípidos de membrana que incluyen colesterol. La enfermedad de Niemann-Pick está producida por la inactivación de la enzima esfingomielinasa ácida en la enfermedad de Tipos A y B, con actividad enzimática más residual en el Tipo B (véase Kolodny et al., "Storage Diseases of the Reticuloendothelial System," en NATHAN AND OSKI'S HEMATOLOGY OF INFANCY AND CHILDHOOD 5^a ed., vol. 2, 1461-1507 (David G. Nathan y Stuart H. Orkin, Eds., W. B. Saunders Co.) (1998)). La patofisiología de los sistemas de órganos principales en la enfermedad de Niemann-Pick puede resumirse brevemente como sigue. El bazo es el órgano más extensamente implicado de los pacientes de Tipo A y B. Los pulmones están implicados en una extensión variable, y la patología pulmonar en pacientes de Tipo B es la causa principal de mortalidad debida a bronconeumonía crónica. La implicación del hígado es variable, pero los pacientes afectados negativamente pueden tener cirrosis con riesgo para la vida, hipertensión portal, y ascitis. La implicación de los ganglios linfáticos es variable dependiendo de la gravedad de la enfermedad. La implicación del sistema nervioso central diferencia los tipos principales de enfermedades de Niemann-Pick. Aunque la mayoría de pacientes de Tipo B no experimenta implicación del sistema nervioso central, es característica en pacientes de Tipo A. En la enfermedad de Niemann Pick, los riñones están moderadamente implicados.

Se han evaluado algunas estrategias para el tratamiento de estas enfermedades lisosómicas de acumulación, incluyendo el trasplante de médula ósea y el tratamiento enzimático de sustitución. El trasplante de médula ósea ha demostrado ser eficaz en diversos grados, pero, cuando se administra solo, tiene limitados efectos sobre los huesos y las articulaciones. Clarke, LA, "The Mucopolysaccharidoses: A Success of Molecular Medicine," Expert Rev. Mol. Med. 10:e1 (2008). Está también impedido por los efectos secundarios perjudiciales de medicaciones inmunosupresoras y mieloablativas, y la aparición de la enfermedad de injerto frente a hospedador. El uso de sangre de cordón umbilical ha mitigado parcialmente estos factores de complicación, aunque a menudo siguen siendo significativos. El tratamiento enzimático de sustitución implica la infusión intravenosa de enzimas recombinantes, usualmente de forma semanal o bisemanal. Clarke, LA, "The Mucopolysaccharidoses: A Success of Molecular Medicine," Expert Rev. Mol. Med. 10:e1 (2008). En gran parte, la eficacia del tratamiento enzimático de sustitución se basa en la biodistribución de las enzimas infundidas, que se administran fácilmente a los órganos reticuloendoteliales (por ejemplo, hígado, bazo), pero menos a otros órganos. Para los trastornos del MPS, el tratamiento enzimático de sustitución está disponible para tres tipos: MPS I (Síndrome de Hurler/Schie) (Wraith et al., "Mucopolysaccharidosis Type II (síndrome de Hunter): A Clinical Review and Recommendations For Treatment in

the Era of Enzyme Replacement Therapy," *Eur. J. Pediatr.* 167:267-77 (2008); Cox-Brinkman et al., "Ultrastructural Analysis of Dermal Fibroblasts in Mucopolysaccharidosis Type I: Effects of Enzyme Replacement Therapy and Hematopoietic Cell Transplantation," *Ultrastruct. Pathol.* 34:126-32 (2010); Coppa et al., "Effect of 6 Years of Enzyme Replacement Therapy on Plasma and Urine Glycosaminoglycans in Attenuated MPS I Patients," *Glycobiology* 20:1259-73 (2010); MPS II (síndrome de Hunter) (Glamuzina et al., "Treatment of Mucopolysaccharidosis Type II (Hunter Syndrome) With Idursulfase: The Relevance of Clinical Trial End Points," *J. Inherit. Metab. Dis.* (2011)); y MPS VI (síndrome de Maroteaux-Lamy) (Decker et al., "Enzyme Replacement Therapy for Mucopolysaccharidosis VI: Growth and Pubertal Development in Patients Treated With Recombinant Human N-Acetylgalactosamine 4-Sulfatase," *J. Pediatr. Rehabil. Med.* 3:89-100 (2010); Valayannopoulos et al., "Mucopolysaccharidosis VI Orphanet," *J. Rare Dis.* 12:5 (2010); McGill et al., "Enzyme Replacement Therapy for Mucopolysaccharidosis VI From 8 Weeks of Age-A Sibling Control Study," *Clin. Genet.* 77:492-498 (2010)). Se han señalado mejoras significativas en la calidad de vida tras el tratamiento enzimático de sustitución, incluyendo una mejora en la movilidad, respiración y flexibilidad de las articulaciones. Sin embargo, existe poca o ninguna evidencia de que el tratamiento enzimático de sustitución influya directamente sobre la enfermedad del cartílago y hueso en pacientes con MPS, y se cree que estos efectos clínicos positivos, por tanto, derivan principalmente de cambios en los tejidos blandos (por ejemplo, tendones). Otros tratamientos experimentales también están en evaluación para los trastornos de MPS, incluyendo tratamiento génicos (Cotugno et al., "Different Serum Enzyme Levels are Required to Rescue the Various Systemic Features of the Mucopolysaccharidoses," *Hum. Gene Ther.* 21:555-69 (2010); Herati et al., "Radiographic Evaluation of Bones and Joints in Mucopolysaccharidosis I and VII Dogs After Neonatal Gene Therapy," *Mol. Genet. Metab.* 95:142-51 (2008)) y el uso de enzimas recombinantes fusionadas con secuencias de direccionamiento específicas de células (Lu et al., "Expression in CHO Cells and Pharmacokinetics and Brain Uptake in the Rhesus Monkey of an IgG-Iduronate-2-Sulfatase Fusion Protein," *Biotechnol. Bioeng.* (2011); Osborn et al., "Minicircle DNA-Based Gene Therapy Coupled With Immune Modulation Permits Long-term Expression of α -L-Iduronidase in Mice With Mucopolysaccharidosis Type I," *Mol. Ther.* 19:450-60 (2011)).

El pentosán polisulfato (PPS) es una medicación oral autorizada por la FDA que tiene efectos antiinflamatorios y clínicos en modelos animales de algunas enfermedades, incluyendo trastornos lisosómicos de acumulación y, más específicamente, trastornos de MPS (esta solicitud), así como artritis, diabetes, degeneración del disco intervertebral, y neurodegeneración relacionada con la edad. PPS está actualmente autorizado para su uso en pacientes con cistitis intersticial, y se ha demostrado su seguridad mediante ensayo clínico. PPS inhibe el reclutamiento de leucocitos e interfiere algunas funciones de las quimioquinas, citoquinas, y factores de crecimiento, reduciendo de esta forma la inflamación y las especies de oxígeno reactivo (ROS).

Se cree que el factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) juega un importante papel en diversos trastornos, incluyendo, por ejemplo, trastornos inflamatorios tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, y esclerosis múltiple. TNF- α y los receptores CD120a, CD120b se han estudiado en gran detalle. TNF- α , en su forma bioactiva, es un trímero, y la ranura formada por las subunidades vecinas es importante para la interacción citoquina-receptor. Se han desarrollado algunas estrategias para antagonizar la acción de la citoquina y se usan actualmente para tratar diversos estados de enfermedad.

Un inhibidor de TNF- α que tenga suficiente especificidad y selectividad para TNF- α puede ser un compuesto farmacéutico profiláctico o terapéutico eficaz para prevenir o tratar trastornos donde se ha implicado el TNF- α como agente causante. Se han descrito métodos para tratar el choque tóxico (patente EP n.º 0486526 de Rathjen et al.), la regresión tumoral, la inhibición de la toxicidad (patente de Estados Unidos n.º 6.448.380 de Rathjen et al., patente de Estados Unidos n.º 6.451.983 de Rathjen et al., patente de Estados Unidos n.º 6.498.237 de Rathjen et al., enfermedades autoinmunitarias tales como AR y enfermedad de Crohn (patente EP n.º 0663836 de Feldmann et al., patente de Estados Unidos n.º 5.672.347 de Aggarwal et al., patente de Estados Unidos n.º 5.656.272 de Le et al., reacción de injerto frente a hospedador (patente de Estados Unidos n.º 5.672.347 de Aggarwal et al.), meningitis bacteriana (patente EP n.º 0585705 de Hector et al.) por medio de un anticuerpo dirigido contra TNF. Un trabajo previo ha desvelado también el importante impacto de la inflamación sobre las enfermedades de cartílagos y huesos en modelos animales de MPS, y muestra que la inhibición genética de la señalización del receptor 4 de tipo Toll (TLR4) en ratones o el uso de inhibidores de TNF junto con Naglazyme mejora notablemente la enfermedad de huesos y cartílagos. Sin embargo, ninguno de los fármacos actualmente disponibles son completamente eficaces para al tratamiento de los trastornos lisosómicos de acumulación, particularmente, mucopolisacaridosis y enfermedad de Niemann-Pick. Los inhibidores del TNF, aunque eficaces en modelos animales, son medicaciones intravenosas que pueden dar como resultado efectos secundarios significativos, y su uso a largo plazo en pacientes de MPS puede ser difícil de implementar.

La presente divulgación se dirige a superar estas y otras deficiencias en la técnica.

Sumario de la invención

Una divulgación se refiere a un método para tratar un sujeto con un trastorno lisosómico de acumulación. Este método incluye seleccionar un sujeto con un trastorno lisosómico de acumulación y administrar al sujeto seleccionado un agente para un tratamiento enzimático de sustitución, y un agente para un tratamiento dirigido contra TNF en condiciones eficaces para tratar el trastorno lisosómico de acumulación en el sujeto seleccionado.

Otra divulgación se refiere a un método para reducir las citoquinas inflamatorias en un sujeto con un trastorno lisosómico de acumulación que se está tratando mediante un tratamiento enzimático de sustitución. Este método incluye administrar al sujeto un agente para un tratamiento dirigido contra TNF- α en condiciones eficaces para reducir las citoquinas inflamatorias en el sujeto.

La presente invención se refiere a pentosán polisulfato (PPS) para su uso en el tratamiento de un sujeto con trastorno lisosómico. Esto implica seleccionar un sujeto con un trastorno lisosómico de acumulación y administrar pentosán polisulfato (PPS) al sujeto seleccionado en condiciones eficaces para tratar el trastorno lisosómico de acumulación en el sujeto seleccionado.

Otra divulgación se refiere a un método para tratar a un sujeto con una patología esquelética asociada con un trastorno lisosómico de acumulación. El método incluye seleccionar un sujeto con una patología esquelética asociada con un trastorno lisosómico de acumulación y administrar al sujeto seleccionado un agente para un tratamiento de reducción del sustrato y un agente para un tratamiento dirigido contra TNF- α en condiciones eficaces para tratar el trastorno lisosómico de acumulación en el sujeto.

Aunque el tratamiento enzimático de sustitución (ERT) está disponible para algunos trastornos lisosómicos de acumulación, el beneficio de este tratamiento en el sistema esquelético es muy limitado. Un trabajo previo ha mostrado la importancia de la ruta inflamatoria del receptor 4 de tipo Toll/TNF- α en la patología esquelética de las mucopolisacaridoses (MPS), y por tanto, la presente invención estudió el beneficio aditivo de combinar un tratamiento dirigido contra TNF- α con ERT en un modelo de rata de MPS de tipo VI. Al hacerlo, Las ratas MPS VI se trataron durante 8 meses con Naglazyme® (*N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa recombinante humana), o mediante un protocolo combinado utilizando Naglazyme® y el fármaco dirigido contra TNF- α específico de rata, CNTO1081. Ambos protocolos conducen a niveles en suero de TNF- α y activadores del receptor del ligando kappa-B del factor nuclear (RANKL) marcadamente reducidos, y el tratamiento combinado redujo TNF- α en el cartílago articular. El análisis de los condriocitos articulares cultivados mostró que el tratamiento combinado restauró también la expresión del colágeno IIA1 y redujo la expresión del marcador apoptótico, PARP. La actividad motora y la movilidad mejoraron mediante ERT, y se potenciaron significativamente mediante el tratamiento combinado. Las deformidades de la tráquea en los animales MPS VI mejoraron mediante el tratamiento combinado, y hubo una leve mejora en la longitud del hueso. Los niveles de ceramida en la tráquea se redujeron también marcadamente. El análisis por MicroCT no demuestra ningún efecto positivo significativo sobre la microarquitectura del hueso de cualquier tratamiento, ni hubo mejora histológica en las placas de crecimiento del hueso. Los resultados de la presente divulgación demuestran que la combinación de ERT con un tratamiento dirigido contra TNF mejoró el resultado del tratamiento y condujo a un significativo beneficio clínico, y que el tratamiento dirigido contra TNF- α junto con el resultado del tratamiento mejorado y condujo también a un significativo beneficio clínico. Los resultados validan también además la utilidad de TNF- α , RANKL y otras moléculas inflamatorias como biomarcadores para los trastornos lisosómicos de acumulación incluyen trastornos de MPS.

Durante los últimos años, los investigadores de la presente invención han estado investigando la patología de la articulación y el hueso en modelos animales de MPS, con el objetivo a largo plazo de desarrollar tratamientos mejorados, solos o junto con ERT, BMT, o tratamiento génico (Simonaro et al., "Bone Marrow Transplantation in Newborn Rats With Mucopolysaccharidosis Type VI: Biochemical, Pathological, and Clinical Findings," *Transplantation* 63:1386-93 (1997); Simonaro et al., "Articular Chondrocytes From Animals With a Dermatan Sulfate Storage Disease Undergo a High Rate of Apoptosis and Release Nitric Oxide and Inflammatory Cytokines: A Possible Mechanism Underlying Degenerative Joint Disease in the Mucopolysaccharidoses," *Lab Invest.* 81:1319-1328 (2001); Simonaro et al., "Joint and Bone Disease in Mucopolysaccharidosis VI and VII: Identification of New Therapeutic Targets and Biomarkers Using Animal Models," *Pediatr. Res.* 57:701-707 (2005)). Como parte de esta investigación en curso, se han identificado numerosas anomalías en modelos animales de MPS, incluyendo muerte prematura (apoptosis) de los condriocitos articulares de MPS, excesiva proliferación de fibroblastos sinoviales de MPS, y desorganización de placas de crecimiento de MPS. Los investigadores han descubierto también que la adición de GAG al medio de cultivo de los condriocitos articulares normales indujo la apoptosis y la liberación de marcadores inflamatorios, sugiriendo que la acumulación de GAG por sí mismo puede ser un episodio proinflamatorio de iniciación en los trastornos de MPS (Simonaro et al., "Mechanism of Glycosaminoglycan-Mediated Bone & Joint Disease: Implications for the Mucopolysaccharidoses & Other Connective Tissue Diseases," *Amber. J. Path.* 172:112-122 (2008)). La acumulación de GAG en células de MPS condujo también a la activación de la ruta de señalización del receptor 4 de tipo Toll (TLR4), dando como resultado la liberación de TNF- α y otras citoquinas inflamatorias.

Como se divulga en el presente documento, se criaron ratones MPS (MPS VII, enfermedad de Sly) para obtener ratones TLR4 inactivados genéticamente, y se encontró que los animales MPS doblemente inactivados tenían marcadamente reducido TNF- α , IL1- β , RANKL y otras citoquinas, crecimiento mejorado del hueso y placas de crecimiento del hueso más organizadas, y muerte celular de los condriocitos reducida (Simonaro et al., "Involvement of the Toll-Like Receptor 4 Pathway and Use of TNF-Alpha Antagonists for Treatment of the Mucopolysaccharidoses," *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107:222-7 (2010)). Esto llevó a los investigadores a realizar un análisis preliminar del tratamiento dirigido contra TNF en ratas MPS usando CNTO1081, un equivalente de

Remicade®, específico de rata, la FDA homologó un anticuerpo monoclonal dirigido contra TNF- α utilizado en la artritis y otras enfermedades inflamatorias (Weaver, AL, "Efficacy and Safety of the Anti-TNF Biologic Agents," Mod. Rheumatol. 14:101-112 (2004)). En este estudio, se descubrió que el tratamiento con CNT0181 redujo los niveles de citoquinas inflamatorias en animales MPS VI, y redujo también el número de condriocitos articulares apoptóticos. Sin embargo, no hubo efecto sobre el crecimiento óseo o mejoras clínicas en la actividad motora. En la presente invención, aquellos hallazgos se han extendido y se ha evaluado una estrategia con un anticuerpo dirigido contra TNF- α y un anticuerpo combinado con ERT dirigido contra TNF- α en las ratas MPS VI. Se ha descubierto que la estrategia con un anticuerpo dirigido contra TNF- α y la estrategia con un anticuerpo combinado dirigido contra TNF- α proporcionó algunos beneficios sobre ERT solo. Estos incluyeron una marcha y actividad motora mejoradas, tráqueas más delgadas y menos deformadas, y huesos moderadamente más largos. Se restauró también la expresión del colágeno IIA1 en el cartílago articular, y se redujo la apoptosis.

La presente solicitud se basa en las premisas subyacentes que: (a) se necesitan nuevos tratamientos para los trastornos lisosómicos de acumulación tales como MPS que mejoraren el tratamiento del cartílago y el hueso (incluyendo la médula espinal); (b) estos tratamientos deben validarse en modelos animales adecuados antes de su uso en seres humanos; y (c) la gravedad de la enfermedad en el momento del tratamiento tendrá un mayor impacto sobre la eficacia.

La presente invención propone también que PPS puede ser la primera medicación oral para MPS, y puede ser también el primer tratamiento para tener un mayor impacto sobre la enfermedad del cartílago y el hueso en estos trastornos. Esta hipótesis se basa en: (a) estudios anteriores que documentan el importante papel de la inflamación en la patofisiología de la enfermedad MPS del cartílago y el hueso; (b) los conocidos efectos de PPS sobre la inflamación y la condriogénesis; y (c) los datos preliminares iniciales que utilizan PPS en un modelo de rata de un MPS (MPS VI, enfermedad de Maroteaux-Lamy). Dado que PPS ha pasado ya por pruebas de seguridad y ha sido autorizado por la FDA, su uso en pacientes con MPS puede basarse en el "seguimiento rápido" en estudios de modelos animales que se han propuesto en la presente invención. Cabe destacar que, como no se espera que PPS potencie las actividades enzimáticas residuales o conduzca a la reducción de GAG en individuos con MPS, su uso puede combinarse con ERT en estos trastornos. PPS puede utilizarse también solo para tratar trastornos lisosómicos de acumulación. PPS es una molécula GAG análoga a heparina. Por tanto, no se esperaba que proporcione beneficios a los trastornos de MPS, que son enfermedades de acumulación de GAG, u otros trastornos lisosómicos de acumulación. De hecho, antes de las enseñanzas de la presente invención, podría haberse esperado que PPS exacerbe estos trastornos. La presente invención, desde el primer momento, enseña que, a pesar del hecho de que PPS sea una molécula análoga a GAG, proporciona sustanciales beneficios a MPS y otros trastornos lisosómicos de acumulación.

En resumen, el tratamiento de la enfermedad del cartílago y el hueso representa una importante necesidad médica sin satisfacer en los trastornos lisosómicos de acumulación tales como MPS, y la presente invención tendría un impacto mayor y rápido sobre el tratamiento y el cuidado de los pacientes con trastornos lisosómicos de acumulación, específicamente aquellos con MPS.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1C ilustran los efectos antiinflamatorios de ERT y un tratamiento de combinación ERT/anticuerpo anti-TNF- α en ratas MPS VI. En la Figura 1A, las ratas MPS VI se sometieron a ERT (negro) o un tratamiento de combinación ERT/anticuerpo anti-TNF- α (gris) durante 8 meses ($n=8$ /grupo). El tratamiento dirigido contra TNF- α se llevó a cabo usando un anticuerpo dirigido contra TNF- α (CNT01081). Los animales se sometieron a eutanasia 2 días después de la última inyección y se recogió el suero. Se recogieron también los sueros normales de los animales emparejados por edad (37 semanas) (gris claro) y MPS VI sin tratar (blanco), y se determinaron los niveles de TNF- α y RANKL utilizando kits de inmunoensayo (véanse los Ejemplos, *infra*). Como se muestra anteriormente, los animales MPS VI sin tratar marcaron niveles marcadamente elevados de estos dos marcadores inflamatorios, y ambos se redujeron significativamente tanto mediante ERT como mediante tratamiento combinado ($*p < 0,005$). No se observaron diferencias significativas entre los dos protocolos de tratamiento. En la Figura 1B, las ratas MPS VI presentaron inmunotinción de TNF- α marcadamente elevada (rojo) en el cartílago articular en comparación con los animales normales, que se redujo modestamente mediante ERT y se normalizó mediante tratamiento combinado. En la Figura 1C, fueron evidentes membranas sinoviales hiperplásicas (*) con formación de vellosidades (SV), e invasión del sinovio en el hueso subcondrial (punta de flecha, SB) en sinovio de MPS VI sin tratar y sinovio tratado con ERT. Los animales tratados con tratamiento combinado presentaron una inflamación de las articulaciones menos marcada, aunque las células de acumulación seguían presentes.

Las Figuras 2A-2B muestran el análisis de la actividad motora y la marcha en ratas MPS VI sin tratar y tratadas. En la Figura 2A, las ratas MPS VI se sometieron a ERT (cuadrados) o a tratamiento de combinación ERT/anticuerpo anti-TNF- α (círculos) durante 8 meses ($n=8$ /grupo). Se llevó a cabo el tratamiento dirigido contra TNF- α utilizando el anticuerpo CNT01081. Dos días después de la última inyección se sometieron a análisis en rotarod con aceleración a tres velocidades diferentes, y se comparó su comportamiento en animales MPS VI sin tratar, emparejados por edad y género (triángulos). A 10 rpm, ambos grupos de ratas tratadas permanecieron sobre la varilla rotatoria durante el tiempo máximo (180 segundos), significativamente más largo que los animales

sin tratar ($p < 0,005$). Esta tendencia se volvió más pronunciada a velocidades mayores, y hubo también una significativa distinción entre el grupo tratado con ERT y los grupos combinados ($p^* < 0,005$). Se representaron gráficamente los tiempos para los animales individuales, y se indicó el valor promedio de cada grupo por las líneas horizontales. En la Figura 2B, después del tratamiento, los animales se sometieron también al análisis de la marcha. Se utilizaron colorantes alimentarios de dos colores diferentes para marcar las patas delanteras y traseras de las ratas mientras caminaban por un tubo y se midieron las distancias entre etapas y los ángulos de las etapas entre las impresiones de las patas. Se sometió a ensayo cada rata al menos tres veces, y en las Figuras 2A-2B se muestra un resumen de los valores de impresión promedio de las patas. Tal como se puede observar, el ángulo del movimiento de la pata trasera se redujo de 60° (sin tratar) a 45° (en comparación con los animales sin tratar $p=0,004$) y 30° (en comparación con los animales sin tratar $p=0,0001$) para los animales con el tratamiento de ERT y el tratamiento combinado, respectivamente. Además, se aumentó la distancia a la cual los animales moverían sus patas delanteras en cada etapa desde 2,8 cm (sin tratar) a 4,2 cm y, significativamente, a 5,1 cm, en el grupo de tratamiento combinado ($p=0,03$). La distancia que los animales movieron sus patas traseras no cambió en el grupo ERT, y aumentó solo modestamente en el grupo combinado (de 4,9 a 5,1 cm).

Las Figuras 3A-3C muestran la longitud del hueso y la microarquitectura en ratas MPS VI sin tratar y tratadas. En la Figura 3A, las ratas MPS VI se sometieron a ERT (negro) o un tratamiento de combinación ERT/anticuerpo anti-TNF- α (gris) durante 8 meses ($n= 8$ /grupo). El tratamiento contra TNF- α se llevó a cabo con el anticuerpo CNT0181. Los animales se sometieron a eutanasia 2 días después de la última inyección, y se recogieron los fémures y las tibias para el análisis microCT. Se compararon los resultados con las ratas MPS VI emparejadas por edad y género sin tratar (blanco), y se expresaron los valores como un porcentaje de los controles normales. ERT no aumenta la longitud del fémur o la tibia, mientras que el protocolo combinado condujo a aumentos de ~ 6 y 14 %, respectivamente. Cabe destacar que, la tibia y el fémur en el grupo con el tratamiento combinado tuvieron un promedio de ~ 88 y 84 % del normal, en comparación con el 74 y el 77 % en el grupo MPS VI sin tratar. La Figura 3B muestra un análisis microCT de las vistas coronales. En las ratas MPS VI tratadas y sin tratar se redujo la densidad trabecular en el hueso metafisario, la placa de crecimiento fisario era dismórfica y estaba perturbada, y las trabéculas epifisarias estaban desorganizadas con respecto al fémur normal. Se detectó una mejora leve del tratamiento combinado. La Figura 3C es un análisis microCT de la región diafisaria media del fémur que muestra vistas axiales con la infiltración trabecular subcortical en el espacio de la médula ósea. Aunque se señalaron algunas reducciones en la infiltración trabecular tras el tratamiento, esto no se pudo confirmar mediante medidas cuantitativas.

Las Figuras 4A-4B ilustran defectos de la tráquea en ratas MPS VI sin tratar y tratadas. En la Figura 4A, se recogieron la tráqueas de animales MPS VI y normales tratados (con anticuerpo CNT01081) y sin tratar al final del estudio (37 semanas de edad). Como se ilustra mediante esta figura representativa, las ratas MPS VI sin tratar tenían tráqueas colapsadas engrosadas de manera anómala, con aberturas estrechas aplanadas en el interior. Estas anomalías no fueron alteradas por ERT, pero mejoraron claramente mediante el tratamiento combinado que dio como resultado tráqueas redondeadas con áreas de la sección transversal casi estadísticamente normalizadas. La Figura 4B es un análisis inmunohistoquímico de las tráqueas que mostró una expresión aumentada del esfingolípido proinflamatorio y proapoptótico, ceramida, en las células epiteliales de los animales sin tratar y tratados con ERT (rojo), consistente con la incidencia de la enfermedad inflamatoria. Las tráqueas del grupo con tratamiento combinado mostraron una expresión casi normal de la ceramida.

Las Figuras 5A-5B muestran la expresión de la proteína en condrocitos articulares de ratas MPS VI sin tratar y tratadas. En la Figura 5A, Las ratas MPS VI se sometieron a al tratamiento con ERT o al tratamiento de un anticuerpo dirigido contra TNF- α combinado con ERT durante 8 meses ($n= 8$ /grupo). Se llevó a cabo el tratamiento dirigido contra TNF- α utilizando el anticuerpo CNT01081. Los animales se sometieron a eutanasia 2 días después de la última inyección, y se aislaron los condrocitos articulares y se procesaron para la transferencia western (Figura 5A). Como se muestra en este experimento representativo, ERT solo aumentó la expresión del colágeno X, y en un grado más modesto, del colágeno IIA1. Se constataron observaciones similares en el grupo de tratamiento combinado, excepto que los niveles de expresión del colágeno IIA1 fueron incluso más pronunciados. Para confirmar estas observaciones, se llevó a cabo el análisis microscópico inmunofluorescente del colágeno IIA1 en secciones del cartílago articular procedentes de animales sin tratar, tratados con ERT, y con tratamiento combinado (Figura 5B). Como es evidente en la Figura 5B, una mayor expresión del colágeno IIA1 (rojo) estaba presente en el grupo con tratamiento combinado, similar a la normal. La expresión del marcador de la apoptosis, PARP, se examinó también en los animales tratados y del control mediante transferencia western, y se redujo solo mediante tratamiento combinado. Además, los niveles de agreganasa, ADAMTS5, que se elevaron en MPS VI, se redujeron en ambos protocolos de tratamiento.

Las Figuras 6A-6D muestran los resultados de las ratas MPS VI tratadas con PPS. Las ratas MPS VI se mantuvieron en hidratación normal (Figura 6A) o con agua que contenía 25 mg/día de PPS ($n=6$ /grupo) (Figura 6B). Los animales tenían 6 meses de edad cuando comenzó el tratamiento, y se llevó a cabo el tratamiento durante 3 meses. Se tomaron imágenes del cráneo y del morro al final del tratamiento. Se muestran imágenes representativas. En la Figura 6C se muestra la longitud del morro, mientras que en la Figura 6D se muestra la longitud del cráneo. Se determinaron también las mediciones de la longitud y anchura del cráneo a partir de las radiografías de cada uno de los animales, y los datos se muestran en el gráfico de barras (Figuras 6C, 6D). Blanco = normal, 9 meses de edad, Gris = ratas MPS VI con agua normal; Azul = ratas MPS VI que reciben PPS. * = $p < 0,01$.

Las Figuras 7A-7F muestran radiografías del cráneo (Figuras 7A, 7B, 7C) e imágenes microCT (Figuras 7D, 7E, 7F) de ratas normales (Figuras 7A, 7D), ratas MPS VI con tratamiento PPS (Figuras 7C, 7F), y ratas MPS VI sin

tratamiento PPS (Figuras 7B, 7E). Las ratas MPS VI se mantuvieron en hidratación normal o con agua que contenía 25 mg/día de PPS (n=6/grupo). Los animales tenían 6 meses de edad cuando se comenzó el tratamiento, y el tratamiento se llevó a cabo durante 3 meses. Las imágenes superiores muestran radiografías (Figuras 7A, 7B, 7C), y las imágenes de la parte inferior, imágenes microCT (Figuras 7D, 7E, 7F). Los morros más largos y los cráneos más delgados se encontraron en las ratas MPS VI tratadas con PPS en comparación con las ratas MPS VI sin tratar. Las líneas en las radiografías son para referencia. Los datos cuantitativos que se muestran en las Figuras 6A-6D sobre la longitud y anchura del cráneo se midieron a partir de estas radiografías.

Las Figuras 8A-8F muestran imágenes microCT de ratas normales (Figuras 8A, 8B) las ratas MPS VI con tratamiento de PPS (Figuras 8E, 8F) y sin tratamiento de PPS (Figuras 8C, 8D) muestran cambios en la dentición. Las ratas MPS VI se mantuvieron en hidratación normal o con agua que contenía 25 mg/día de PPS (n=6/grupo). Los animales tenían 6 meses de edad cuando se comenzó el tratamiento, y el tratamiento se llevó a cabo durante 3 meses. Las ratas MPS VI sin tratar tienen incisivos demasiado grandes (recuadro) que conducen a una alineación anómala del diente en comparación con las ratas normales. El tratamiento con PPS corrigió la mandíbula y la desalineación.

La Figura 9 representa gráficamente el análisis con rotarod de las ratas MPS VI con y sin PPS. Ratas MPS VI de seis meses de edad se mantuvieron con o sin PPS durante 3 meses (n=6/grupo), y se analizaron antes del sacrificio utilizando un aparato rotarod de aceleración. Gris = ratas MPS VI con agua normal; Azul = ratas MPS VI que reciben PPS. Señalar que las ratas MPS VI tratadas podían permanecer sobre la varilla rotatoria más de dos veces el tiempo que las ratas sin tratar. * = $p < 0,02$.

Las Figuras 10A-10B ilustran el análisis inmunohistoquímico de las ratas tratadas con PPS y sin tratar. La Figura 10A es un análisis inmunohistoquímico del hígado y el bazo en ratas MPS VI tratadas con PPS que mostró una expresión de TNF- α disminuida cuando se comparó con animales MPS de 9 meses de edad emparejados por edad sin tratar. En la Figura 10B, Los niveles de TNF en suero disminuyeron también en los animales tratados con PPS.

Las Figuras 11A-11C muestran los marcadores inflamatorios en suero en ratas MPS VI tratadas y sin tratar. Tres grupos de ratas MPS VI se trataron con PPS a partir de los seis meses (gris claro), un mes (gris oscuro) o prenatal (negro). Todos los animales se sacrificaron a los 9 meses de edad. La duración del tratamiento fue por tanto de 3 meses, 8 meses o 9,75 meses, respectivamente. Los niveles en suero de algunos marcadores inflamatorios se midieron mediante ensayos ELISA, y se compararon con animales normales (rayado) o animales MPS VI sin tratar (blanco). N = 6/grupo. En la Figura 11A se muestran los niveles en suero del marcador MIP-1 α inflamatorio, mientras que en la Figura 11B se muestran los niveles del marcador Rantes y en la Figura 11C se muestran los niveles de TNF- α . Todos los grupos de tratamiento tenían niveles significativamente más bajos (<0,001) de estos marcadores inflamatorios en comparación con las ratas MPS VI sin tratar.

Las Figuras 12A-12C muestran los resultados del tratamiento de ratas MPS VI de un mes de edad. En las Figuras 12A y 12B, ratas MPS VI de un mes de edad se mantuvieron durante ocho meses con agua normal o con agua que contenía 25 mg/día de PPS (n=6/grupo). Se muestran imágenes representativas. Las flechas indican secreciones de porfirina ocular, cráneos amplios y anchos y morros y orejas pequeñas en los animales sin tratar, con una marcada mejora en los animales tratados. En la Figura 12C, los animales se sometieron a prueba en el aparato rotarod de aceleración. Las ratas MPS VI tratadas permanecieron en la varilla rotatoria más de dos veces el tiempo que las ratas sin tratar a 20 rpm. Además, solo las ratas normales y tratadas fueron capaces de permanecer en la varilla rotatoria a velocidades de hasta 35 rpm (60 % de lo normal).

La Figura 13 ilustra las tráqueas de las ratas MPS VI tratadas con PPS. Los grupos 1, 2 y 3 de animales se trataron con PPS comenzando a los 6 meses, 1 mes, y prenatalmente. Se sacrificaron a los 9 meses y se aislaron las tráqueas. Las imágenes muestran que las ratas MPS VI sin tratar tenían las tráqueas colapsadas en comparación con las normales, y que esto se mejoró en todos los grupos de tratamiento con PPS.

Las Figuras 14A-14C muestran una evaluación de la enfermedad de la médula espinal en las ratas MPS VI tratadas (6 meses de edad) y sin tratar. La Figura 14A muestra la tinción con Safranina-O/fast green de los animales del control normales (izquierda) y los animales MPS VI (derecha). La Figura 14B ilustra los resultados bioquímicos de los segmentos de movimiento lumbar, que indican que los animales MPS tenían una rigidez en la zona neutra más baja y una constante de tiempo de deformación por compresión, y lo que sugiere una integridad del colágeno y una función de GAG disminuidas. La Figura 14C muestra radiografías sagitales de los grupos del control, MPS y tratados (T) que indican que el índice de altura del disco (DHI, definido como la altura del disco intervertebral normalizado por la altura promedio de 2 vértebras adyacentes) fue mayor para MPS que para el control, y que el tratamiento con PPS de los animales esqueléticamente maduros (6 meses de edad) no altera este parámetro, motivando una intervención más temprana.

La Figura 15 muestra un análisis de los condriocitos articulares en las ratas MPS VI tratadas con PPS. Los grupos 1, 2 y 3 de animales se trataron con PPS comenzando a los 6 meses, 1 mes y prenatalmente. Se sacrificaron a los 9 meses y se aislaron los condriocitos articulares y se hicieron crecer durante 3 semanas. Se analizaron a continuación mediante transferencia western. Señalar que los marcadores inflamatorios, TNF- α , p38 y Cox-2 estaban elevados en condriocitos de ratas MPS VI en comparación con ratas normales, y que estos niveles se redujeron a los normales en las ratas MPS VI tratadas. ADAMTS-5 es una agreganasa degradadora de proteoglicanos que está también elevada en condriocitos de ratas MPS VI sin tratar, y se redujo en los grupos de tratamiento de MPS VI.

La Figura 16 muestra un análisis mediante rotarod de ratones con enfermedad de Niemann-Pick tratados con PPS. Ratones con enfermedad de Niemann-Pick de un mes de edad (inactivados genéticamente para la esfingomielinasa ácida) se trataron con PPS durante tres meses a partir de un mes de edad (25/kg/día). Se

analizaron a continuación usando un aparato rotarod de aceleración ajustado a 20 rpm. Los ratones NPD tratados con PPS llevaron a cabo significativamente mejor ($p < 0,01$) que aquellos sin tratamiento. Ambos grupos permanecieron significativamente por debajo del natural.

5 Descripción detallada de la invención

La invención se define en las reivindicaciones. La invención proporciona pentosán polisulfato (PPS) para su uso en el tratamiento de un sujeto con trastorno lisosómico de acumulación. Una divulgación se refiere a un método para tratar un sujeto con un trastorno lisosómico de acumulación. Este método incluye seleccionar un sujeto con un trastorno lisosómico de acumulación y administrar al sujeto seleccionado un agente para un tratamiento enzimático de sustitución, y un agente para un tratamiento dirigido contra TNF en condiciones eficaces para tratar el trastorno lisosómico de acumulación en el sujeto seleccionado.

Un trastorno lisosómico de acumulación de acuerdo con la presente divulgación es cualquier trastorno donde se produce la existencia o acumulación de un sustrato enzimático lisosómico debido a una deficiencia en una enzima lisosómica, de tal manera que se produce un efecto indeseado (por ejemplo, acumulación anómala de sustrato o producción de un sustrato anómalo). La enzima lisosómica puede producirse en cantidades anómalas (por ejemplo, la enzima puede no expresarse del todo en un sujeto, puede expresarse a bajos niveles o puede expresarse a altos niveles) o puede funcionar de forma anómala, por ejemplo, debido a una mutación o un plegado de la proteína inadecuado. Una enzima lisosómica de acuerdo con la presente invención es cualquier enzima hidrolítica contenida en el compartimento lisosómico de una célula que metaboliza los subproductos celulares contenidos en la anterior. Un sustrato, como se usa en el presente documento, se refiere a un sustrato lisosómico de una o más enzimas lisosómicas. No se impone limitación concreta sobre los trastornos lisosómicos de acumulación que se van a tratar mediante los métodos del presente método, siempre que los trastornos lisosómicos de acumulación sean trastornos reconocidos como tales en la materia.

Los trastornos lisosómicos de acumulación de la invención se pueden subdividir en los siguientes estados de enfermedad: esfingolipidosis, mucopolisacaridosis, glicoproteínosis, mucopolipidosis, glicogenosis de tipo II, lipofuscinosis ceroides, y aquellos que se encuentran bajo la categoría de "otro" (Caillaud et al., "Gene Therapy in Lysosomal Diseases," Biomed. Pharmacother. 54: 505-12 (2000); Nathan y Oski, HEMATOLOGY OF INFANCY AND CHILDHOOD, Capítulo 35, W.B. Saunders (2003)). Casi todos los trastornos lisosómicos de acumulación son recesivos autosómicos. Dos excepciones señaladas a esto son la enfermedad de Fabry y el síndrome de Hunter, que están vinculados a X. (Solicitud de patente de Estados Unidos 20070009500 de Blazar et al.).

El trastorno lisosómico de acumulación de la presente invención puede incluir, aunque no de forma limitativa, esfingolipidosis, enfermedad de acumulación de mucopolisacáridos (mucopolisacaridosis), glicoproteínosis, mucopolipidosis, glicogenosis de tipo II, lipofuscinosis ceroides, y otras anomalías de la función de la proteína lisosómica. Más específicamente, el trastorno puede ser, aunque no de forma limitativa, gangliosidosis GM1 (enfermedad de Landau), variante B/B1 de la gangliosidosis GM2 (enfermedad de Tay-Sach) y variante 0 (enfermedad de Sandhoff), leucodistrofia metacromática, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Niemann-Pick, (A, B, C), enfermedad de Farber, enfermedad de Wolman, enfermedad de Austin, mucopolisacaridosis de tipo I (enfermedad de Hurler, o síndrome de Hurler), enfermedad de Scheie, enfermedad de Hurler-Scheie, de tipo II (enfermedad de Hunter), de tipo III (enfermedad de Sanfilippo), de tipo III A a D, de tipo IV (enfermedad de Morquio), de tipo IV A y B, de tipo VI (enfermedad de Maroteaux-Lamy), de tipo VII (enfermedad de Sly), de tipo IX, picnodisostosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, α -manosidosis, β -manosidosis, enfermedad de Schindler, enfermedad de Kanzaki, mucopolipidosis de tipo I (sialidosis), tipo IB (galactosialidosis), y tipo II, III, y IV (mucopolipidosis), Glicogenosis de tipo II (caracterizada por la enfermedad de Pompe), enfermedad de Santavuori-Haltia, enfermedad de Jansky-Bielshowsky, enfermedad de Batten, enfermedad de Kufs, patologías caracterizadas por mutaciones en los loci CLN5, CLN6, CLN7, y CLN8, y/u otras enfermedades lisosómicas de acumulación, tales como enfermedades de acumulación de ácido siálico (forma infantil, enfermedad de Salla), y aciduria metilalónica (publicación de patente de Estados Unidos n.º 2007/0009500 de Blazar et al.; patente de Estados Unidos n.º 7.951.545 de Okamura et al.).

En una realización de la presente invención, el trastorno lisosómico de acumulación es una esfingolipidosis, donde la esfingolipidosis es la enfermedad de Niemann-Pick, una enfermedad en la que se acumula esfingomielina. La enfermedad de Niemann-Pick de tipo B es debida a un impedimento en la esfingomielinasa ácida, y la enfermedad de Niemann-Pick de tipo C es debida a un efecto de esterificación del colesterol. Otros ejemplos de esfingolipidosis incluyen las siguientes enfermedades, pero no se limitan a estas enfermedades: gangliosidosis GM₁ (enfermedad de Landau; deficiencia de β -galactosidasa), variante B/B1 de gangliosidosis GM₂ (enfermedad de Tay-Sach; deficiencia en hexosaminidasa A) y variante 0 (enfermedad de Sandhoff, deficiencia en hexosaminidasa A y B), leucodistrofia metacromática (deficiencia en arilsulfatasa A), enfermedad de Krabbe (deficiencia en galactosilceramidasa), enfermedad de Fabry (deficiencia α -galactosidasa), enfermedad de Gaucher (deficiencia en β -glucosidasa), enfermedad de Niemann-Pick, (A, B, C; deficiencia en esfingomielinasa), enfermedad de Farber (deficiencia en ceramidasa), enfermedad de Wolman (deficiencia en lipasa ácida), y enfermedad de Austin (deficiencia en múltiples sulfatasas). (publicación de patente de Estados Unidos n.º 2007/0009500 de Blazar et al.).

En otra realización de la presente invención, el trastorno lisosómico de acumulación es mucopolisacaridosis. El

término mucopolisacaridosis (MPS), como se usa en el presente documento se refiere a un subgrupo de trastornos lisosómicos de acumulación caracterizados por la acumulación y acumulación de GAG en el interior de lisosomas. En una realización particular, la mucopolisacaridosis de acuerdo con la presente invención puede incluir MPS I (síndrome de Hurler/Schie), MPS II (síndrome de Hunter), MPS VI (síndrome de Maroteaux-Lamy), MPS III (síndrome de Sanfilippo), MPS IV (síndrome de Morquio), y/o MPS VII (enfermedad de Sly). Ejemplos adicionales de clases de mucopolisacaridosis de Tipos I a IX y las enzimas deficientes se relacionan en la Tabla 1 que se pueden tratar mediante los métodos de la presente invención incluyen los relacionados en la Tabla 1, *infra* (patente de Estados Unidos n.º. 7.951.545 de Okamura et al.).

10 Tabla 1 - Clases de mucopolisacaridosis

	Nombre de la clase	Enzima de la que carece
IH	síndrome de Hurler	α -L-iduronidasa
IS	síndrome de Scheie	α -L-iduronidasa
IH/S	síndrome de Hurler-Scheie	α -L-iduronidasa
IIA	síndrome de Hunter, de tipo grave	sulfoiduronato sulfatasa
IIB	síndrome de Hunter, de tipo leve	sulfoiduronato sulfatasa
IIIA	síndrome A de Sanfilippo	heparán sulfato N-sulfatasa
IIIB	síndrome B de Sanfilippo	N-acetil- α -D-glucosaminidasa
IIIC	síndrome C de Sanfilippo	acetil-CoA- α -glucosaminidasa N-acetiltransferasa
IIID	síndrome D de Sanfilippo	N-acetilglucosamina-6-sulfatasa
IVA	síndrome A de Morquio	N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa
IVB	(síndrome B de Morquio	β -galactosidasa
VIA	síndrome de Maroteaux-Lamy, de tipo grave	N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa
VIB	síndrome de Maroteaux-Lamy / de tipo leve	N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa
VII	deficiencia en β -glucuronidasa	β -glucuronidasa

15 Las glicoproteinosas de acuerdo con la presente invención comprenden las siguientes enfermedades, pero no se limitan a estas enfermedades: aspartilglucosaminuria (deficiencia en N-acetil β -glucosaminidasa), fucosidosis (deficiencia en α -fucosidasa), α -manosidosis (deficiencia en α -manosidasa), α -manosidosis (deficiencia en β -manosidasa), enfermedad de Schindler, y enfermedad de Kanzaki (α -N-acetilgalactosaminidasa o α -galactosidasa B, para las enfermedades de Schindler y de Kanzaki) (publicación de patente de Estados Unidos n.º 2007/0009500 de Blazar et al.).

20 Las mucopolidosis de la presente invención incluyen, pero sin limitación, enfermedades: de tipo I (sialidosis; deficiencia en α -neuraminidasa), de tipo IB (galactosialidosis; deficiencia en catepsina A), y de tipo II, III, y IV (mucopolidosis; N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa). La glicogenosis de tipo II se caracteriza, por ejemplo, por la enfermedad de Pompe (deficiencia en α -1,4-glucosidasa o maltasa ácida) (publicación de patente de Estados Unidos 2007/0009500 de Blazar et al.).

25 La lipofuscinosis ceroides de la presente invención incluye, pero sin limitación, enfermedad de Santavuori-Haltia (deficiencia palmitoil proteína tioesterasa), enfermedad de Jansky-Bielshowsky (deficiencia en tripeptidil peptidasa I), enfermedad de Batten (deficiencia en proteína CLN3), enfermedad de Kufs, y estados de enfermedad caracterizados por mutaciones en los loci CLN5, CLN6, CLN7, y CLN8 (publicación de patente de Estados Unidos n.º 2007/0009500 de Blazar et al.).

30 Otras enfermedades lisosómicas de acumulación incluyen, pero sin limitación, enfermedades de acumulación de ácido siálico (forma infantil, enfermedad de Salla; deficiente en transportador de ácido siálico), y aciduria metilmalónica (deficiente en proteína transportadora de vitamina B12) (publicación de patente de Estados Unidos n.º 2007/0009500 de Blazar et al.).

35 La expresión tratamiento de sustitución enzimática, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier fármaco o tratamiento que sustituye una enzima deficiente o defectiva en un sujeto con un trastorno de acumulación lisosómico.

40 El tratamiento de sustitución enzimática ("ERT") de acuerdo con la presente divulgación implica la administración, preferentemente intravenosa, de una enzima natural o recombinante producida de forma exógena. Tras la administración, las enzimas de sustitución se secretan por el hígado en la circulación sistémica. Las células tanto adyacentes como distantes recapturan las enzimas secretadas, principalmente a través del receptor de la manosa-6-fosfato, que está presente sobre la superficie de prácticamente todas las células (Suzuki, K. "Lysosomal Diseases," en: GREENFIELD'S NEUROPATHOLOGY 653-735 (Graham, D. I., Lantos, P. K. eds., Arnold: London) (2002)). La administración localizada de la enzima puede reponer, al menos parte de la población de enzimas en células

deficientes. Sin embargo, estas enzimas tienen generalmente semividas en circulación e intracelulares cortas, y el tratamiento requiere la administración parenteral regular de cantidades relativamente grandes de la enzima relevante (publicación de patente de Estados Unidos n.º 2007/0009500 de Blazar et al.). Se ha establecido la prueba de principio del tratamiento enzimático de sustitución en un modelo animal de Hurler (Shull et al., "Enzyme Replacement in a Canine Model of Hurler Syndrome," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:12937-12941 (1994)). Otros han desarrollado métodos eficaces para la expresión en cultivos celulares de enzimas recombinantes en cantidades suficientes para recogerse para su uso terapéutico (Kakkis et al., "Overexpression of the Human Lysosomal Enzyme α -L-Iduronidase in Chinese Hamster Ovary Cells," Prot. Express. Purif. 5:225-232 (1994)). En una realización de la presente divulgación, el tratamiento enzimático de sustitución puede incluir, aunque no de forma limitativa, Alglucerasa, Imiglucerasa, Velaglucerasa Alfa, Laronidasa, Agalsidasa Beta, Galsulfasa, Alglucosidasa Alfa, N-acetilgalactosamina-6 sulfatasa, e Idursulfasa.

El tratamiento de sustitución enzimática es particularmente eficaz cuando se tratan determinadas enfermedades lisosómicas de acumulación. Por ejemplo, la sustitución enzimática en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher y Fabry ha sido eficaz para revertir los síntomas no neuropáticos de estas enfermedades (Weinreb et al., "Effectiveness of Enzyme Replacement Therapy in 1028 Patients With Type 1 Gaucher Disease After 2 to 5 Years of Treatment: A Report From the Gaucher Registry," Am. J. Med. 113:112-119 (2002); Schiffman et al., "Enzyme Replacement Therapy in Fabry Disease: A Randomized Controlled Trial," JAMA 285:2743-2749 (2001)). Sin embargo, en muchas enfermedades de acumulación lisosómico, tales como mucopolisacaridosis de tipo I (es decir, MPS-1H; síndrome de Hurler), la sustitución de la enzima puede dar como resultado potentes respuestas inmunógenas frente a las proteínas donantes infundidas. Además, las enzimas administradas sistémicamente son incapaces de acceder a sitios que surgen posteriormente durante el desarrollo, tales como el SNC y el sistema esquelético. Por tanto, el tratamiento enzimático de sustitución no es eficaz para corregir las manifestaciones neurológicas y los defectos esqueléticos asociados con muchas de estas enfermedades metabólicas de acumulación (publicación de patente de Estados Unidos 2007/0009500 de Blazar et al.).

La expresión tratamiento dirigido contra TNF- α , como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier fármaco o tratamiento que sustituye el TNF- α deficiente o defectivo en un sujeto con un trastorno lisosómico de acumulación. En una divulgación, el agente para el tratamiento dirigido contra TNF- α se selecciona entre el grupo que consiste en Infliximab, Adalimumab, Etanercept, Golimumab, y Natalizumab. En la invención, el agente para el tratamiento dirigido contra TNF- α es pentosán polisulfato (PPS).

Para los fines de este y otros aspectos de la invención, el sujeto diana abarca cualquier animal, preferentemente un mamífero, más preferentemente, un ser humano. En el contexto de administrar una composición de la invención con el fin de prevenir o tratar a un paciente con un trastorno lisosómico de acumulación, el sujeto diana abarca cualquier sujeto que está en riesgo de infectarse por un trastorno lisosómico de acumulación. Los sujetos particularmente susceptibles incluyen bebés y adolescentes, así como adultos inmunocomprometidos. En el contexto de administrar una composición de la invención para tratar un trastorno lisosómico de acumulación en un sujeto, la población diana sujeto abarca cualquier sujeto infectado con cualquier tipo de trastorno lisosómico de acumulación. Los sujetos particularmente adecuados incluyen aquellos en riesgo de infección o aquellos infectados con MPS I, MPS II, MPS III, MPS IV, MPS VI, o MPS VII. Las mucopolisacaridosis, en particular, son generalmente asintomáticas en recién nacidos (es decir, bebés), pero su inicio llega es evidente por manifestaciones que incluyen detención del crecimiento en altura, desarrollo anómalo de huesos, y desarrollo anómalo del aspecto del rostro, piel, y pelo, durante la infancia o la niñez. En algunos casos, aunque los sujetos son normales durante los periodos neonatales, el retraso mental progresa gradualmente durante años. Por lo tanto, el diagnóstico y el tratamiento de las mucopolisacaridosis, etc., en una etapa temprana del recién nacido y la infancia, durante la cual no se manifiestan síndromes clínicos puede evitar posiblemente el retraso mental, etc., mediante el tratamiento enzimático de sustitución temprano, el tratamiento genético, o el trasplante de médula ósea. Por consiguiente, el diagnóstico y el tratamiento de las mucopolisacaridosis puede llevarse a cabo en recién nacidos y bebés (patente de Estados Unidos n.º 7.951.545 de Okamura et al.). En una realización de la presente invención, el sujeto puede ser un bebé o un adolescente. En otra realización, el sujeto puede ser un adulto.

Tal como se usa en el presente documento, una cantidad eficaz significa una cantidad que proporciona el efecto local o sistémico deseado. Por ejemplo, una dosis eficaz es una cantidad suficiente para dar como resultado un resultado beneficioso o clínico o no clínico deseado. Las cantidades terapéuticamente eficaces de agentes para tratamiento enzimático de sustitución, y agentes para tratamiento dirigido contra TNF- α pueden determinarse de acuerdo con procedimientos normalizados, que toman en cuenta numerosos factores, que incluyen, por ejemplo, las concentraciones de estos principios activos en la composición, el modo y la frecuencia de administración, la gravedad del trastorno lisosómico de acumulación que se va a tratar (o prevenir), y los detalles del sujeto, tales como edad, el peso, y la salud y el estado inmunitario general. Se pueden encontrar directrices generales, por ejemplo, en las publicaciones de la International Conference on Harmonization and in REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Company 1990). Un médico puede administrar tratamientos enzimáticos de sustitución o agentes terapéuticos dirigidos contra TNF- α , hasta que se alcanza una dosificación que proporciona el efecto profiláctico o terapéutico deseado o requerido. El progreso de este tratamiento puede controlarse fácilmente mediante ensayos convencionales.

La cantidad terapéuticamente eficaz de los agentes terapéuticos enzimáticos de sustitución y los agentes

terapéuticos dirigidos contra TNF- α son normalmente al menos 1 mg de composición por kilogramo de peso corporal (mg/kg), incluyendo al menos 2 mg/kg, al menos 5 mg/kg, al menos 25 mg/kg, al menos 50 mg/kg, al menos 100 mg/kg, al menos 150 mg/kg, al menos 200, al menos 250 mg/kg, al menos 500 mg/kg, al menos 750 mg/kg, y al menos 1000 mg/kg, por dosis o diariamente. El tratamiento enzimático de sustitución y el tratamiento dirigido contra TNF- α se administran usualmente en múltiples ocasiones. los intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, según se indique midiendo los niveles de anticuerpos en sangre en el sujeto. Como alternativa, el tratamiento enzimático de sustitución y el tratamiento dirigido contra pueden administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un periodo de tiempo largo. En aplicaciones terapéuticas, se requiere algunas veces una dosificación relativamente alta a intervalos de tiempo relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad y, preferentemente, hasta que el sujeto muestra una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. En una realización de la presente invención, la administración de realiza de forma repetida.

Los agentes terapéuticos enzimáticos de sustitución y los agentes terapéuticos dirigidos contra TNF- α de la presente invención pueden administrarse como parte de un tratamiento combinado junto con otro principio activo, dependiendo de la naturaleza del trastorno lisosómico de acumulación que se está tratando. En una realización de la presente invención, el método incluye administrar un tratamiento adicional. Las formas ilustrativas del tratamiento adicional de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, trasplante de médula ósea, terapia con chaperona, y terapia génica. El trasplante de médula ósea, en particular, es una estrategia terapéutica para el tratamiento de los trastornos lisosómicos de acumulación. El trasplante de médula ósea reconstituye el sistema hematopoyético de un paciente con citoblastos de donantes sanos inmunocompatibles para establecer fuentes de enzimas duraderas (Steward, C. G., "Bone Marrow Transplantation for Genetic Diseases," en: BLOOD CELL BIOCHEMISTRY. VOLUME 8: HEMATOPOIESIS AND GENE THERAPY 13-56 (Fairbairn, L. J., Testa, N. G. eds., New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.) (1999)). Se han tratado cientos de pacientes con trastornos lisosómicos de acumulación mediante trasplante durante muchos años. Por ejemplo, se ha notificado que el tratamiento de la enfermedad de Gaucher no neuropática mediante el trasplante de médula ósea da como resultado una reversión casi completa de los síntomas (Hoogerbrugge et al., "Allogeneic Bone Marrow Transplantation for Lysosomal Storage Diseases. The European Group for Bone Marrow Transplantation," Lancet 345:1398-1402 (1995); véase la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2007/0009500 de Blazar et al.).

La terapia génica génica de acuerdo con la presente invención se refiere a un método de cambiar la expresión de un gen endógeno mediante la administración exógena de un gen. Tal como se usa en el presente documento, la terapia génica también se refiere a la sustitución de un gen defectivo que codifica una proteína defectiva, o a la sustitución de un gen desaparecido, introduciendo un gen funcional que corresponde el gen defectivo o desaparecido en células somáticas o citoblastos de un individuo que lo necesita. El tratamiento génico puede llevarse a cabo mediante métodos *ex vivo*, en el que citoblastos diferenciados o somáticos se extraen del cuerpo del individuo seguido por la introducción de una copia normal del gen defectivo en las células explantadas utilizando un vector vírico como el vehículo de administración génica. Además, las tecnologías de transferencia génica *in vivo* transfieren genes en células en el *individuo in situ* utilizando una amplia gama de vectores víricos, liposomas, complejos de proteína ADN o ADN puro a fin de conseguir un resultado terapéutico. Véase la patente de Estados Unidos n.º 7.446.098 de Fan.

Se conocen bien en la técnica los tipos y métodos de tratamiento génico que se pueden usar en la presente invención (Fairbairn et al., "Long-Term In Vitro Correction of α -L-Iduronidase Deficiency (Hurler Syndrome) in Human Bone Marrow," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:2025-2030 (1996); Kolodny et al., "Storage Diseases of the Reticuloendothelial System," en: NATHAN AND OSKI'S HEMATOLOGY OF INFANCY AND CHILDHOOD, 5ª ed., vol. 2, páginas 1461-1507 (Nathan and Orkin, Eds., W. B. Saunders Co.) (1998); Medin et al., "Correction in Trans for Fabry Disease: Expression, Secretion, and Uptake of α -Galactosidase A in Patient-Derived Cells Driven by a High-Titer Recombinant Retroviral Vector," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7917-7922 (1996); Pauly et al., "Complete Correction of Acid α -Glucosidase Deficiency in Pompe Disease Fibroblasts in Vitro, and Lysosomally Targeted Expression in Neonatal Rat Cardiac and Skeletal Muscle," Gene Therapy 5:473-480 (1998); Zaretsky et al., "Retroviral Transfer of Acid α -Glucosidase cDNA to Enzyme-Deficient Myoblasts Results in Phenotypic Spread of the Genotypic Correction by Both Secretion and Fusion," Human Gene Therapy 8:1555-1563 (1997); véase también el documento WO 1998/041240). un método usado frecuentemente para la administración de tratamiento génico de acuerdo con la presente invención, *in vivo* y *ex vivo*, es el uso de vectores víricos para la administración del gen. Se conocen muchas especies de virus, y muchas se han estudiado extensamente para fines de tratamiento génico. Los vectores víricos usados más comúnmente incluyen aquellos derivados de adenovirus, virus adenoasociados (VAA) y retrovirus, incluyendo lentivirus como virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Véase el documento WO 99/57296, el documento WO 99/41399, y la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2011/0142818 de Meeker et al. La terapia génica de acuerdo con la presente invención se contempla con genes de sustitución tales como la glucocerebrosidasa o con ARN inhibidor (ARNip) para el gen SNCA. Véase la patente de Estados Unidos n.º 7.446.098 de Fan.

65

- El tratamiento enzimático de sustitución y el tratamiento con PPS de la presente invención pueden administrarse en una monodosis, o de acuerdo con un protocolo multidosis. Por ejemplo, se administran relativamente pocas dosis de la composición terapéutica, tales como una o dos dosis. En las realizaciones que incluyen tratamiento convencional, que generalmente implica múltiples dosis durante un periodo de días o semanas, el PPS se puede
- 5 tomar una, dos o tres o más veces diariamente durante un periodo de tiempo, tal como durante al menos 5 días, 10 días o incluso 14 o más días. Sin embargo, las diferentes dosificaciones, la temporalización de las dosificaciones y las cantidades relativas de la composición terapéutica y los antibióticos se pueden seleccionar y ajustar por un experto en la materia. En una realización, la administración de realiza de forma repetida.
- 10 Los agentes de la presente invención pueden administrarse por vía oral, mediante inhalación, mediante instilación intranasal, por vía tópica, por vía transdérmica, por vía parenteral, por vía subcutánea, mediante inyección intravenosa, mediante inyección intraarterial, mediante inyección intramuscular, por vía intraplural, por vía intraperitoneal, o mediante la aplicación a la membrana mucosa. La ruta de administración más típica es la inyección intravenosa.
- 15 Los agentes farmacéuticos de la presente invención pueden formularse para la administración parenteral. Se pueden preparar soluciones o suspensiones del agente en agua mezclada de forma adecuada con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. Los aceites ilustrativos son los procedentes del petróleo, animal, vegetal, o de origen
- 20 sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, o aceite mineral. En general, agua, solución salina, dextrosa acuosa y solución de azúcares relacionados, y glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicol, son transportadores líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. En condiciones normales de acumulación y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.
- 25 Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que pueda inyectarse fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y acumulación y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que
- 30 contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales.
- Cuando sea deseable administrar los agentes farmacéuticos de la presente invención sistémicamente, pueden formularse para la administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección de bolo o infusión
- 35 continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitaria, *por ejemplo*, en ampollas o contenedores multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden comprender agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.
- 40 administración intraperitoneal o intratecal de los agentes de la presente invención puede también conseguir utilizar dispositivos de bombas de infusión tales como los descritos por Medtronic, Northridge, CA. Dichos dispositivos permiten la infusión continua de compuestos deseados evitando inyecciones múltiples y manipulaciones múltiples.
- Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos también pueden formularse como una
- 45 preparación de depósito. Dichas formulaciones de larga acción pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como derivados poco solubles, por ejemplo, una sal muy poco soluble.
- Se puede usar cualquier método conocido por el experto en la materia para vigilar el estado de los
- 50 mucopolisacáridos y la eficacia de un tratamiento de la invención. Las vigilancias clínicas de las patologías pueden incluir, aunque no de forma limitativa el volumen del órgano (por ejemplo, hígado, bazo), la hemoglobina, el recuento de los eritrocitos, el hematocrito, trombocitopenia, caquexia (degeneración), y niveles de quitinasa en plasma (por ejemplo, quitotriosidasa). La quitotriosidasa, una enzima de la familia quitinasa, se sabe que está producida por macrófagos a altos niveles en sujetos con enfermedades lisosómicas de acumulación (véase Guo et al., "Elevated
- 55 Plasma Chitotriosidase Activity in Various Lysosomal Storage Disorders," J. Inherit. Metab. Dis. 18, 717-722 (1995); den Tandt et al., "Marked Increase of Methylumbelliferyl-tetra-N-acetylchitotetraoside Hydrolase Activity in Plasma From Gaucher Disease Patients," J. Inherit. Metab. Dis. 19, 344-350 (1996); Dodelson de Kremer et al., "Plasma Cchitotriosidase Activity in Argentinian Patients With Gaucher Disease, Various Lysosomal Diseases and Other Inherited Metabolic Disorders," Medicina (Buenos Aires) 57, 677-684 (1997); Czartoryska et al., "Changes in Serum
- 60 Chitotriosidase Activity With Cessation of Replacement Enzyme (Cerebrosidase) Administration in Gaucher Disease," Clin. Biochem. 33, 147-149 (2000); Czartoryska et al., "Serum Chitotriosidase Activity in Gaucher Patients on Enzyme Replacement Therapy (ERT)," Clin. Biochem. 31, 417-420 (1998); Mistry et al., "A Practical Approach to Diagnosis and Management of Gaucher's Disease," Baillieres Clin. Haematol. 10, 817-838 (1997); Young et al., "Plasma Chitotriosidase Activity in Gaucher Disease Patients who Have Been Treated Either by Bone Marrow
- 65 Transplantation or by Enzyme Replacement Therapy With Alglucerase," J. Inherit. Metab. Dis. 20, 595-602 (1997); Hollak et al., "Marked Elevation of Plasma Chitotriosidase Activity. A Novel Hallmark of Gaucher Disease," J. Clin.

Invest. 93, 1288-1292 (1994)).

En una realización de la presente invención, El sujeto tiene una patología esquelética asociada con un trastorno lisosómico de acumulación. Las patologías esqueléticas que se asocian con trastornos lisosómicos de acumulación incluyen, pero sin limitación, longitud del hueso, ampliación de la anchura del eje óseo, anchura de las placas de crecimiento del hueso, densidad mineral del tejido, circunferencia de la tráquea, función locomotora, condriocitos articulares, análisis de la marcha, y mediante marcadores inflamatorios tales como niveles de ceramida, niveles de TNF- α , niveles de RANKL, y expresión del colágeno. Las patologías esqueléticas leves pueden incluir rigidez de la articulación y hepatoesplenomegalia. Estos ejemplos de patología esquelética pueden utilizarse como marcadores para vigilar el estado de progresión o regresión de los trastornos lisosómicos de acumulación descritos *supra*.

Son bien conocidos en la técnica los métodos para medir marcadores y vigilar el estado de los trastornos lisosómicos de acumulación e incluyen, pero sin limitación, inmunohistoquímica, análisis de inmunotransferencia, inmunoensayos en suero, y análisis de la transferencia western.

Otra divulgación se refiere a un método para reducir las citoquinas inflamatorias en un sujeto con un trastorno lisosómico de acumulación que se está tratando mediante un tratamiento enzimático de sustitución. Este método incluye administrar al sujeto un agente para un tratamiento dirigido contra TNF- α en condiciones eficaces para reducir las citoquinas inflamatorias en el sujeto.

Las citoquinas inflamatorias que se pueden reducir mediante los métodos de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, TNF- α , RANKL, e IL1- β . TNF- α , en particular, se puede reducir mediante los métodos de la presente invención. TNF- α es una citoquina pleiotrópica que se produce principalmente por macrófagos y linfocitos activados; pero que se expresa también en células endoteliales y otros tipos de células. TNF- α es un mediador principal de reacciones inflamatorias, inmunológicas, y patofisiológicas. (Grell et al., "The Transmembrane Form of Tumor Necrosis Factor is the Prime Activating Ligand of the 80 kDa Tumor Necrosis Factor Receptor," Cell 83:793-802 (1995)). Existen dos formas distintas de TNF, una forma expresada en una membrana de 26 kDa y una citoquina de 17 kDa soluble que se deriva de la escisión proteolítica de la forma de 26 kDa. El polipéptido TNF soluble tiene 157 aminoácidos de longitud y es la molécula biológicamente activa primaria. TNF- α ejerce sus efectos biológicos a través de la interacción con alta afinidad de los receptores superficiales celulares. Se han clonado y caracterizado dos receptores de membrana de TNF- α distintos. Estos son una especie de 55 kDa, designada p55 TNF-R y una especie de 75 kDa designada p75 TNF-R (Corcoran et al., "Characterization of Ligand Binding by the Human p55 Tumour-Necrosis-Factor Receptor. Involvement of Individual Cysteine-Rich Repeats," Eur. J. Biochem. 223:831-840 (1994)). Los dos receptores de TNF presentan un 28 % de similitud al nivel de aminoácidos. Esto está confinado al dominio extracelular y consiste en cuatro motivos de repetición ricos en cisteína, cada uno de aproximadamente 40 aminoácidos. Cada motivo contiene cuatro a seis cisteínas en posiciones conservadas. El análisis de Dayhoff muestra la mayor similitud intersubunidades entre las primeras tres repeticiones en cada receptor. Esta estructura característica está compartida con numerosos receptores diferentes y moléculas superficiales celulares, que comprenden la superfamilia del receptor del factor de crecimiento nervioso/TNF-R (Corcoran et al., "Characterization of Ligand Binding by the Human p55 Tumour-Necrosis-Factor Receptor. Involvement of Individual Cysteine-Rich Repeats," Eur. J. Biochem. 223:831-840 (1994)).

En una realización, el método incluye seleccionar un sujeto con una patología esquelética asociada con un trastorno lisosómico como se describe *supra*, para someterse a la administración.

La presente divulgación se lleva a cabo de acuerdo con las divulgaciones anteriormente descritas. Se describen los modos de administración y la dosificación terapéuticamente eficaz relacionados con este aspecto de la invención *supra*.

La presente invención se refiere a PPS para su uso en el tratamiento de un sujeto con trastorno lisosómico de acumulación. Este tratamiento incluye seleccionar un sujeto con un trastornos lisosómico de acumulación y administrar pentosán polisulfato (PPS) al sujeto seleccionado en condiciones eficaces para tratar el trastorno lisosómico de acumulación en el sujeto seleccionado.

Pentosán polisulfato de acuerdo con la presente invención incluye un polisacárido semisintético sulfatado compuesto de restos de β -D-xilopiranosas que tienen un peso molecular en el intervalo de 1.500 a 6.000 Dalton y sus sales farmacéuticamente aceptables. El compuesto se describe en el Merck Index, Undécima Edición, Merck & Co, Inc., Rahway, N.J. (1989) pág. 7093; patente de Estados Unidos n.º 5.180.715 de Parsons; patente de Estados Unidos n.º 5.643.892 de Striker et al.; y publicación de patente de Estados Unidos n.º 2001/0034328 de Cartt et al.

Debe apreciarse que pentosán polisulfato se formula a menudo como una sal, tal como pentosán polisulfato de sodio, pentosán polisulfato de calcio, o pentosán polisulfato de potasio, por ejemplo. Pentosán puede obtenerse naturalmente a partir de plantas, microorganismos, o sintetizados. Por consiguiente, las referencias a pentosán polisulfato a lo largo de esta solicitud pueden referirse a pentosán polisulfato así como a las diversas sales del mismo, como sea adecuado ya sea obtenido de forma natural, sintética o semisintética.

Pentosán polisulfato de acuerdo con la presente invención, está disponible como una sal de metal alcalino o como una sal de metal alcalinotérreo, por ejemplo, que comprende sal de calcio o sodio, o metales de transición tales como cobre y cinc y metales nobles tales como platino. Por consiguiente, se pueden seleccionar iones complejantes concretos del grupo que consiste en metales alcalinos, por ejemplo Na^+ y K^+ , metales alcalinotérreos, por ejemplo, Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , así como Ag^+ , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Au^{2+} , Pd^{2+} , Pd^{4+} , Pd^{4+} , Pd^{2+} , iones de metales trivalentes, y complejos de compuestos de amonio cuaternario. Los ejemplos del último compuesto son cloruro de piridinio, cloruro de tetraalquil amonio, cloruro de colina, cloruro de cetilpiridinio, cloruro N-cetil-N,N,N-trialquilamonio o sus derivados. Los más preferidos de estos son los metales alcalinotérreos divalentes, preferentemente calcio, y magnesio y lo más preferible es el complejo de calcio. Se describe en detalle la preparación de los complejos metálicos de polisulfato polisacárido en la patente de Estados Unidos n.º 5.668.116; véase también publicación de patente de Estados Unidos n.º 2009/0111771 de Cullis-hill et al.

La invención se lleva a cabo de acuerdo con los aspectos anteriormente descritos. Se describen los modos de administración y la dosificación terapéuticamente eficaz relacionados con este aspecto de la invención *supra*.

Otra divulgación se refiere a un método para tratar a un sujeto con una patología esquelética asociada con un trastorno lisosómico de acumulación. El método incluye seleccionar un sujeto con una patología esquelética asociada con un trastorno lisosómico de acumulación y administrar al sujeto seleccionado un agente para un tratamiento de reducción del sustrato y un agente para un tratamiento dirigido contra TNF- α en condiciones eficaces para tratar el trastorno lisosómico de acumulación en el sujeto.

El tratamiento de reducción del sustrato, tal como se definen en el presente documento, es una estrategia terapéutica que tiene por objeto reducir la síntesis de las sustancias en la célula y proporcionar por tanto equilibrio con una actividad enzimática reducida disponible en enfermedades lisosómicas de acumulación.

Zavesca® (miglustat), un tratamiento de reducción del sustrato, se ha homologado ahora en los Estados Unidos y los países europeos para la enfermedad de Gaucher, y tiene potencial para tratar otras enfermedades lisosómicas de acumulación en la misma ruta metabólica. Se ha investigado también Cystagon® (cisteamina) como un tratamiento de reducción de sustrato para la lipofuscinosis ceroides neuronal infantil. Zavesca y Cystagon son moléculas pequeñas que se cree que pasan la barrera hematoencefálica. Este tipo de tratamiento es aplicable para aquellos pacientes con alguna actividad enzimática residual, y requiere un equilibrio fino con los procesos de síntesis y catabolización (publicación de patente de Estados Unidos. n.º 2005/0208090 de Keimel, et al.). En una realización, el agente para el tratamiento de reducción del sustrato es Miglustat o Eliglustat.

En una realización, se administra un tratamiento adicional de acuerdo con los aspectos anteriores, pero el tratamiento adicional puede ser también un tratamiento enzimático de sustitución, como se describe *supra*.

Esta divulgación se lleva a cabo de acuerdo con los aspectos anteriormente descritos. Se describen los modos de administración y la dosificación terapéuticamente eficaz relacionados con este aspecto de la invención *supra*.

Habiendo ahora descrito de forma general la invención, la misma será más fácilmente comprensible haciendo referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que limiten la presente invención, a menos que se especifique.

45 Ejemplos

En la medida que los Ejemplos contienen materia sujeta que no está comprendida en el alcance de las reivindicaciones, se proporciona simplemente con fines informativos. Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar realizaciones de la presente invención pero en forma alguna pretenden limitar su alcance.

50 Ejemplo 1 - Materiales y métodos

Animales - Las ratas MPS VI se han descrito anteriormente y se han utilizado ampliamente por los investigadores de la presente invención y por otros investigadores (Yoshida et al., "Arylsulfatase B-Deficient Mucopolysaccharidosis in Rats," J. Clin. Invest. 91:1099-1104 (1993); Kunieda et al., "Mucopolysaccharidosis Type VI in Rats: Isolation of CDNAs Encoding Arylsulfatase B, Chromosomal Localization of the Gene, and Identification of the Mutation," Genomics 29:582-587 (1995)). Se estableció una colonia reproductiva a partir de parejas reproductoras heterocigóticas, y el genotipado se realizó mediante ADN de clipaje de la cola usándose métodos establecidos (Kunieda et al., "Mucopolysaccharidosis Type VI in Rats: Isolation of CDNAs Encoding Arylsulfatase B, Chromosomal Localization of the Gene, and Identification of the Mutation," Genomics 29:582-587 (1995)). La eutanasia de las ratas se llevó a cabo por inhalación de dióxido de carbono. Todos los protocolos con animales recibieron la aprobación del Comité de cuidado y uso animal del Mount Sinai Institutional (permiso n.º 08-0108), y se llevaron a cabo según las directrices de la NIH.

Tratamiento de ratas MPS VI - Naglazyme® (*N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa recombinante humana) se obtuvo de BioMarin Pharmaceutical Inc., y CNTO1081 procedía de Centocor Ortho Biotech Inc. Ratas MPS VI de veintinueve días de edad (presintomáticas) se dividieron en dos grupos ($n=8/\text{grupo}$), y se sometieron bien a ERT o a tratamiento de combinación ERT/anticuerpo anti-TNF- α . Los animales que recibieron solamente ERT recibieron una inyección i.v. (vena de la cola) semanalmente con 1 mg/kg de Naglazyme®. Los que recibieron la terapia combinada también recibieron una inyección i.v. con 3 mg/kg de CNTO1081 dos veces a la semana (cada tres días). El tratamiento se llevó a cabo durante un total de 32 semanas. El suero se recogió cada 2 semanas para análisis de TNF- α y RANKL (véase más adelante). Para cada grupo, los animales tratados se sacrificaron 2 semanas después de la última inyección (37 semanas de edad). Ratas MPS VI normales y no tratadas emparejadas por edad se usaron como control durante la totalidad del estudio.

Las tráqueas, fémures, y tibias, se recogieron de las ratas MPS VI de control y tratadas, y se introdujeron bien en solución salina tamponada con fosfato para el aislamiento de sinoviocitos análogos a fibroblastos (FLS) y condrocitos articulares, o se fijaron en formalina neutra tamponada al 10 % (Sigma Chemical) para histología, análisis por microCT e inmunohistoquímica (véase más adelante). Los huesos fijados se descalcificaron en ácido fórmico al 8 % (Sigma Chemical) durante 5 días, se incluyeron en parafina, y se seccionaron (5 μm) para tinción posterior. Los cultivos de FLS primarios y condrocitos articulares se establecieron como se ha descrito anteriormente (Simonaro et al., "Joint and Bone Disease in Mucopolysaccharidosis VI and VII: Identification of New Therapeutic Targets and Biomarkers Using Animal Models," *Pediatr. Res.* 57:701-707 (2005); Simonaro et al., "Mechanism of Glycosaminoglycan-Mediated Bone & Joint Disease: Implications for the Mucopolysaccharidoses & Other Connective Tissue Diseases," *Amer. J. Path.* 172:112-122 (2008)), y la expresión de los marcadores de la inflamación y la apoptosis se evaluaron mediante transferencia western.

Obtención de imágenes microCT - Se tomaron imágenes tridimensionales de las ratas MPS VI de 37 semanas de edad tratadas y no tratadas emparejadas por edad usando el sistema de microCT eXplore Locus SP PreClinical Specimen (GE Healthcare; Londres, Ontario, Canadá). Las exploraciones se realizaron para un tamaño de voxel de 14,4 μm . El protocolo de exploración consistió en la adquisición de 3600 imágenes durante un periodo de barrido de cinco horas (parámetros de adquisición: 80kVp, 80uA, 3 segundos de tiempo de exposición [-69 kJ], filtro de haz de aluminio de 0,010" (0,0254 cm). Un cuerpo de calibración que contenía aire, agua, e hidroxipatito (SB3: Gamex RMI, Middleton, WI, EE.UU.) se incluyó en todas las exploraciones para ajustar la variabilidad en la atenuación de los rayos X inherente a las sesiones de exploración independientes.

Mediciones de la longitud del hueso y de la tráquea - Las mediciones de las extremidades y la tráquea se tomaron al final del estudio (37 semanas de edad). La longitud de cada fémur se midió a partir de las imágenes microCT usando el programa informático Microview. Se usó el trocánter más grande como el margen proximal del fémur, mientras que la extensión de los cóndilos distales se consideró el margen distal. Por tanto, la longitud de cada fémur se calculó aproximadamente a lo largo del eje vertical del hueso. Para su validación, las longitudes físicas del fémur y la tibia, así como de la anchura de las tráqueas, se midieron con un calibre digital. El promedio de los dos grupos de tratamiento (ERT y combinación ERT/CNTO1081) se compararon mediante un análisis de la prueba de la *t* de Student normal.

Análisis del hueso cortical - Una región representativa de la diáfisis media de cada imagen femoral por microCT se aisló para su análisis. El volumen de interés (VOI) está limitado proximalmente por la aparición inicial del tercer trocánter y distalmente por la aparición de la metáfisis, indicado por la formación del hueso trabecular y la expansión de la anchura del árbol. La región del análisis no quedó restringida por el tamaño de la medida para admitir variaciones en la longitud del hueso. El hueso cortical se segmentó manualmente a partir de hueso trabecular residual y se puso un umbral diferente para diferenciar entre vóxeles óseos y no óseos. El programa informático MicroView se utilizó para cuantificar los rasgos morfológicos.

Las imágenes microCT se procesaron adicionalmente para cuantificar la densidad mineral del tejido (TMD) del hueso cortical de cada muestra. TMD representa el valor mineral promedio de los vóxeles óseos solamente, expresados en equivalentes de densidad del hidroxipatito (HA), a diferencia de la densidad del hueso mineral (BMD), que incluye vóxeles no óseos. El TMD se calculó convirtiendo los valores de la escala de grises de los vóxeles óseos en unidades Hounsfield (HU) a valores de mineral (mg/cc de HA) mediante el uso de un cuerpo de calibración que contenía aire, agua, y HA (Gamex RMI, Middleton, Wisconsin, EE. UU.). TMD se define como el valor promedio de vóxeles óseos HU dividido por el valor promedio HU del cuerpo de calibración HA dividido por 1130 mg/cc (densidad de HA).

Análisis del hueso trabecular - Los VOI trabeculares se extrajeron de un región de 4 mm de la metáfisis distal del fémur usando el programa informático de procesamiento de imágenes MicroView. El margen distal se define como la aparición inicial de la fisis. En lugar de una marca proximal evidente, se seleccionó una distancia normalizada (4 mm) para abarcar el VOI trabecular. El hueso trabecular se segmentó desde el hueso cortical en rodajas en serie axial para generar una representación tridimensional del VOI trabecular. Cada VOI trabecular tuvo un umbral diferente para distinguir los vóxeles óseos de los no óseos. El TMD del hueso trabecular se calculó a partir de la exploración por microCT de la misma forma que para el hueso cortical, con la inclusión del mismo cuerpo de calibración para cada uno. Los rasgos microarquitecturales se midieron usando el programa informático Microview,

incluida la fracción de hueso trabecular en volumen, el cociente entre la superficie y el volumen del hueso trabecular, y el número trabecular, espesor, y separación. Todos los valores se promediaron para el VOI total.

5 Función locomotora - Ratas MPS VI normales y MPS VI no tratadas y MPS VI tratadas emparejadas por edad de 37 semanas de edad se colocaron en un Rotarod series 8 (IITC Life Science) en aceleración para realizar la evaluación tal como se ha descrito anteriormente (Cotugno et al., "Different Serum Enzyme Levels are Required to Rescue the Various Systemic Features of the Mucopolysaccharidoses," Hum. Gene Ther. 21:555-69 (2010)). Los animales se instruyeron en la varilla durante dos días consecutivos antes de la grabación real. El rotarod se ajustó a velocidades crecientes de 10 a 30 rpm durante 3 minutos, y se registró el promedio de la latencia hasta la caída de la varilla. Los resultados se analizaron mediante análisis de la varianza monolateral (ANOVA) con el grupo variable.

15 Análisis de motilidad - Las almohadillas delanteras y traseras de los animales tratados y de control se tiñeron con dos colores diferente usando colorantes no tóxicos. Las ratas se entrenaron para caminar por un túnel durante dos días consecutivos, dejando sus huellas impresas en papel secante. El tercer día o se midieron varios parámetros; distancia entre las patas delanteras izquierda y derecha en la dirección longitudinal, el ángulo que se ha formado, y la distancia entre las patas derechas delantera y posterior. Para el análisis estadístico, se evaluaron las diferencias por grupo usando análisis multivariante de la varianza (MANOVA), seguido por ajustes de Bonferroni post hoc para todos los puntos temporales analizados.

20 Histología e inmunohistoquímica del cartílago articular, sinovio y placa de crecimiento - Fémures de ratas MPS VI normales, MPS VI no tratadas y MPS VI tratadas de 37 semanas de edad se fijaron, incluyeron, seccionaron y tiñeron con azul de toluidina y H & E. Los estudios inmunohistoquímicos también se realizaron. Para la inmunohistoquímica, las secciones se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS, se permeabilizaron con Triton-X-100 al 0,5 %, se bloquearon y se incubaron durante la noche a 4° C con anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra colágeno de tipo IIA1 de ratón (anticuerpo policlonal de conejo sc-28887, Santa Cruz Biotechnology) y anticuerpo TNF- α (anticuerpo policlonal de cabra (anticuerpo policlonal de cabra sc-1348, Santa Cruz Biotechnology). Después de varios lavados con PBS, la visualización se llevó a cabo usando un anticuerpo secundario fluorescente, anticuerpo de burro dirigido contra IgG-Cy-3 de cabra (711-165-152, Jackson Laboratory). Los núcleos se tiñeron con 1 mg/ml de colorante bis-benzimida Hoechst (Sigma-Aldrich) durante 10 min, se enjuagaron, y las secciones se montaron con medio de montaje contra blanqueador. Los portas se visualizaron y se fotografiaron con un microscopio de barrido láser confocal (Carl Zeiss 510 Meta).

35 Inmunohistoquímica de las tráqueas - Traqueas de ratas MPS VI normales, MPS VI no tratadas y MPS VI tratadas de 37 semanas de edad se fijaron, incluyeron, seccionaron y prepararon como se describe anteriormente. Las secciones se incubaron durante la noche con anticuerpo monoclonal primario de ratón dirigido contra ceramida (MID15B4, Alexis Corporation) y la visualización se llevó a cabo usando un anticuerpo secundario fluorescente, anticuerpo de burro dirigido contra IgG-Cy-3 de cabra (711-165-152, Jackson Laboratory). Los portas se visualizaron y se fotografiaron con un microscopio de barrido láser confocal (Carl Zeiss 510 Meta).

40 Análisis por inmunotransferencia - Los cartílagos articulares procedentes de ratas MPS VI normales, no tratadas y tratadas de 37 semanas de edad se recogieron usando la digestión secuencial del cartílago con enzimas, se aglomeraron y se lisaron para realizar el análisis por inmunotransferencia tal como se ha descrito anteriormente (Simonaro et al., "Mechanism of Glycosaminoglycan-Mediated Bone & Joint Disease: Implications for the Mucopolysaccharidoses & Other Connective Tissue Diseases," Amer. J. Path. 172:112-122 (2008)). Las membranas se incubaron con anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra colágeno tipo IIA1 (sc-8784-R, Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra colágeno tipo X (AB58632, Abcam), anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra ADAMTS5 (sc-28887, Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra PARP (sc-7150, Santa Cruz Biotechnology), y anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra GAPDH (sc-25778, Santa Cruz Biotechnology), como control de carga. Los anticuerpos unidos se reconocieron mediante anticuerpos secundarios conjugados con HRP (NA934V), GE Healthcare). La detección de los complejos de anticuerpo se llevó a cabo usando un reactivo de detección por quimioluminiscencia potenciada (Amersham Biosciences).

55 Inmunoensayos en suero - Los valores de TNF- α y RANKL en suero en ratas MPS VI emparejadas por edad tratadas y no tratadas emparejadas por edad se evaluó en inmunoensayos usando kits ultrasensibles para ratas Biosource Elisa (Invitrogen y ALPCO Diagnostics) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

60 Presentación de datos y análisis estadístico - Todos los experimentos se replicaron de forma independientemente al menos tres veces. Los datos de dos grupos se sometieron a análisis mediante la prueba de la t de student, análisis de la varianza monolateral (ANOVA) con el grupo variable, análisis multivariante de la varianza (MANOVA) seguido por ajustes de Bonferroni post hoc. Los resultados se consideraron significativos para $P < 0,05$. Se realizó la estadística usando Sigma Stat 3.1 (Systat Software). Los gráficos representan el promedio \pm error estándar del promedio (SEM) de los datos combinados de los experimentos por triplicado.

65

Ejemplo 2 - Efecto de la terapia dirigida contra TNF- α sobre el tratamiento de sustitución enzimática en las mucopolisacaridosis

5 Ratas MPS VI de veintiún días de edad se trataron bien con ERT (1 mg/kg una vez a la semana) o con un protocolo
 combinado de ERT y terapia dirigida contra TNF- α (3 mg/kg, dos veces a la semana). Ambos se administraron por
 vía intravenosa (vena de la cola). Los animales se trataron durante un total de 8 meses (es decir, 32 dosis de ERT y
 64 dosis de anticuerpo dirigido contra TNF- α). Como controles, se usaron ratas normales y MPS VI no tratadas de la
 misma camada (n=8 por grupo). La terapia dirigida contra TNF- α se llevó a cabo usando un anticuerpo dirigido
 10 contra TNF- α (CNT01081) (regalo de Centocor). Naglazyme® (regalo de BioMarin) es la forma humana de la *N*-
 acetilgalactosamina-4-sulfatasa recombinante, la enzima deficiente en MPS VI, y se usó para ERT. Los animales se
 sacrificaron 2 semanas después del tratamiento final (es decir, 37 semanas de edad).

15 La Figura 1A resume los niveles séricos de TNF- α y RANKL al final del estudio. Ambos marcadores inflamatorios
 estuvieron fuertemente elevado en las ratas MPS VI sin tratar en comparación con los animales normales, y ambos
 protocolos de tratamiento condujeron a reducciones significativas. Los efectos quedaron algo potenciados en el
 grupo de tratamiento combinado, aunque no estadísticamente diferente. La Figura 1B muestra tinción
 inmunohistoquímica del cartílago articular para TNF- α . Los animales MPS VI sin tratar tenían elevada TNF- α del
 cartílago, que se redujo modestamente mediante ERT y más con el tratamiento combinado. La Figura 1C muestra
 20 imágenes en sección transversal de las rodillas de ratas de control y MPS VI tratadas. Las membranas sinoviales (*)
 fueron hiperplásicas en las ratas MPS VI sin tratar, lo que conduce a la formación de vellosidades sinoviales (SV).
 ERT no redujo la inflamación sinovial, a diferencia del tratamiento combinado, donde la inflamación y la formación de
 vellosidades quedó notablemente reducida. Indicar que la acumulación seguía siendo muy evidente en el cartílago
 articular (AC) de ambos grupos de tratamiento, así como en el hueso subcondrial (SB). La flecha en negrita de la
 imagen de ERT indica la invasión de la membrana sinovial al SB, que indica inflamación.

Ejemplo 3 - Efecto del tratamiento de sustitución enzimática y la terapia dirigida contra TNF- α sobre la actividad motora, marcha, enfermedad ósea, y enfermedad articular

30 Los efectos de estos tratamientos sobre la actividad motora y la marcha también se evaluaron. En un aparato rotarod
 en aceleración (Figura 2A), los animales tratados con ERT o con tratamiento combinado permanecieron en la varilla
 giratoria durante el tiempo máxima (180 segundos) a la velocidad mínima (10 RPM), por el contrario, los animales
 MPS VI sin tratar (promedio de 70 segundos). A velocidades mayores (20 y 30 RPM), se observó una mejora
 significativa del tratamiento combinado versus el grupo ERT. La Figura 2B muestra imágenes representativas de los
 patrones de marcha de estos animales. En su conjunto, los animales tratados con ERT caminaron más rápido con
 35 zancadas más largas y coordinadas que los animales MPS VI sin tratar, y esto mejoró con el tratamiento combinado.
 Por ejemplo, el ángulo del movimiento de la pata posterior se redujo de 60° (MPS VI sin tratar), a 45° (ERT) a 30°
 (combinado), y la distancia para la pata delantera mejoró de 2,8 cm (sin tratar) a 4,2 cm (ERT) a 5,1 cm
 (combinado).

40 Se usó el análisis por microCT para evaluar las longitudes del fémur y la tibia en los animales MPS VI tratados y sin
 tratar, así como en los animales normales. Tal como se muestra en la Figura 3A, a las 37 semanas de edad, los
 fémures de los animales MPS VI sin tratar fueron en promedio solo aproximadamente un 77 % de sus compañeros
 de camada normales. No se observaron mejoras en el grupo ERT, mientras que, en los animales que recibieron el
 tratamiento combinado, los fémures fueron de aproximadamente un 6 % más largos (aproximadamente un 83 % de
 45 los normales). Las tibias de las ratas MPS VI sin tratar fueron análogamente aproximadamente similares al 74 % del
 normal, y esto se mejoró en aproximadamente el 14 % en la terapia combinada, hasta aproximadamente un 88 %
 del valor normal. No se observó mejora en el grupo ERT. Aunque estas mejoras en la longitud del hueso derivadas
 del tratamiento combinado se observaron consistentemente, fueron más evidentes en los animales macho y no
 alcanzaron significación estadística cuando todos los ratones tratados (machos y hembras) se agruparon
 50 conjuntamente.

A pesar de estos efectos positivos sobre la longitud del hueso, fueron evidentes pocos cambios en la
 microarquitectura del hueso para cualquiera de los grupos de tratamiento. Las Figuras 3B y 3C muestran imágenes
 55 microCT de los fémures distales. En los animales MPS VI sin tratar se redujo la densidad trabecular en el hueso
 metafisario, la placa de crecimiento fisario era dismórfica y estaba perturbada, y las trabéculas epifisarias estaban
 desorganizadas con respecto al fémur normal (Figura 3B). Se detectaron mejoras leves del tratamiento combinado.

60 El análisis cuantitativo se realizó para investigar adicionalmente los cambios morfológicos que se producen en el
 hueso trabecular de las ratas MPS VI sin tratar y tratadas. Los volúmenes de interés (VOI) representativos de la
 metáfisis distal, intermedia proximal a la fisis, se recopilaron y se compararon entre los grupos. Se generaron
 imágenes tridimensionales de las estructuras trabeculares para garantizar que solamente se incluía huesos
 trabecular. De cada VOI, se extrajeron la TMD (densidad mineral trabecular) y BV (volumen óseo)/TV (volumen
 trabecular). Ningún protocolo de tratamiento tuvo un impacto estadísticamente relevante sobre el los valores TMD o
 BV/TV del hueso trabecular.

65 También se recopilaron imágenes MicroCT de la región diafisaria intermedia de los fémures. Se extrajeron las

secciones transversales axiales en la aparición distal del tercer trocánter y las muestras representativas de yuxtapusieron para su comparación (Figura 3C). A grandes rasgos, las ratas MPS VI sin tratar mostraron mayor infiltración trabecular subcortical en el espacio de la médula ósea. El aparente aumento de la densidad trabecular no fue corroborados por medidas cuantitativas, aunque este importante hallazgo fue consistente para todo el intervalo de muestras. De ningún tratamiento surgió una reversión importante del crecimiento trabecular.

Las medidas cuantitativas de la morfología del hueso cortical se calcularon para los VOII de la diáfisis intermedia. Los valores del área de sección transversal cortical promedio, área total, y TMD del hueso cortical se recopilaron para ilustrar el tamaño y la mineralización. El área cortical fue un 22 % ($p = 0,002$) inferior en ratas MPS VI en comparación con las normales, sin alterar el área total o TMD. Como resultado, el área cortical relativa disminuyó un 15 % ($p = 0,015$), lo que representa una importante pérdida de espesor de hueso cortical en las ratas MPS VI pero que no es a expensas del espesor o mineralización total del hueso de la diáfisis femoral. Cabe destacar que, los fémures de las ratas tratadas con ERT o tratamiento combinado presentaron mayor área cortical y área cortical relativa, sin un cambio significativo en el área total o TMD. La adición de una terapia contra TNF- α no aumentó el efecto positivo de la terapia con ERT. En su conjunto, estos hallazgos tienen poca significación estadística.

La solidez se calculó como medida final de la arquitectura femoral. Definida como el cociente entre el tamaño de la sección transversal y la altura, la solidez refleja la relación entre crecimiento horizontal y vertical. Se descubrió que los fémures de las ratas MPS VI eran más sólidos que los normales, consistente con su aspecto "corto y graso". No se demostró una mejoría significativa con el tratamiento, aunque la terapia combinada redujo la solidez en un 5 % ($p = 0,25$), una pequeña mejora (casi insignificante).

Tráqueas colapsadas y engrosadas fueron evidentes en las ratas MPS VI sin tratar (Figura 4A), consistente con las anomalías traqueales observadas en pacientes de MPS (Semenza et al., "Respiratory Complications of Mucopolysaccharide Storage Disorders," *Medicine* 67:209-19 (1988)). A grandes rasgos, se observó una notable mejora de las tráqueas después del tratamiento combinado, pero no ERT. Las tráqueas de ratas MPS VI sin tratar tuvieron un área de sección transversal significativamente más pequeña en comparación con las normales ($2,9 \pm 0,6 \text{ mm}^2$ versus $7,5 \pm 0,8 \text{ mm}^2$; $p = 0,0002$). Las tráqueas de los animales tratados con ERT mejoraron de forma modesta, pero significativa ($3,6 \pm 0,5 \text{ mm}^2$; $p=0,02$ en comparación con los animales sin tratar), mientras que en el grupo del tratamiento combinado, las áreas de sección transversal casi se duplicaron, $6,0 \pm 0,8 \text{ mm}^2$ ($p=0,003$ en comparación con los animales sin tratar).

Ejemplo 4 - Tinción con ceramidas en mucopolisacaridosis de condrocitos articulares

La ceramida es un esfingolípido de señalización que está implicado en la inducción de la inflamación, apoptosis, e infección, y se ha demostrado que se acumula en los condrocitos articulares MPS (Simonaro et al., "Involvement of the Toll-Like Receptor 4 Pathway and Use of TNF-Alpha Antagonists for Treatment of the Mucopolysaccharidoses", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107:222-7 (2010)). La ceramida también se acumula en la tráquea en diferentes enfermedades graves con complicaciones respiratorias, y tiene un papel importante en la homeostasia del cartílago (Becker et al., "Accumulation of Ceramide in the Trachea and Intestine of Cystic Fibrosis Mice Causes Inflammation and Cell Death", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17:368-74 (2010)), lo que lleva a la exploración de la ceramida en las tráqueas de las ratas MPS VI. Como se observa en la Figura 4B, se observó una fuerte tinción de ceramidas en las células epiteliales de tráqueas de ratas MPS VI sin tratar y tratadas con ERT, y se redujo a la normalidad en las tráqueas de los animales con tratamiento combinado.

Ejemplo 5 - Análisis histológico de las placas de crecimiento óseo

Para estudiar más en profundidad los efectos de estos tratamientos, se llevó a cabo un análisis histológico de las placas de crecimiento óseo. Las placas de crecimientos de ratas MPS VI son más espesas que sus compañeros de camada no manipulado debido a las grandes células vacuoladas. Además, la organización columnar normal de las placas de crecimiento está alterada en los animales MPS, lo que contribuye a la formación de hueso anómalo (Simonaro et al., "Involvement of the Toll-Like Receptor 4 Pathway and Use of TNF-Alpha Antagonists for Treatment of the Mucopolysaccharidoses", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107:222-7 (2010); Metcalf et al., "Mechanism of Shortened Bones in Mucopolysaccharidosis VII," *Mol. Genet. Metab.* 97:202-211 (2009)). Ningún protocolo de tratamiento tuvo un efecto notable sobre la histología de la placa de crecimiento MPS VI.

Ejemplo 6 - Expresión del colágeno en condriocitos articulares

Finalmente, se recogieron condriocitos articulares de animales MPS VI tratados y sin tratar para evaluar los cambios en la expresión del colágeno y los marcadores de la apoptosis. Los niveles de colágeno IIA1 y X son más bajos que los normales en ratas MPS VI, y se elevó cada uno en los animales MPS VI tratados frente a los sin tratar (Figura 5A). Como es evidente en esta transferencia western, el tratamiento combinado condujo a una mayor expresión del colágeno IIA1, un hallazgo que se confirmó mediante tinción inmunohistológica en cortes de cartílago (Figura 5B). Esto es consistente con un trabajo previo que muestra que el tratamiento dirigido contra TNF- α redujo la tinción TUNEL en condriocitos articulares de las ratas MPS VI (Simonaro et al., "Involvement of the Toll-Like Receptor 4 Pathway and Use of TNF-Alpha Antagonists for Treatment of the Mucopolysaccharidoses", *Proc. Natl. Acad. Sci.*

107:222-7 (2010)). La expresión de la enzima degradadora de la matriz, la agrecanasa, ADAMTS5, se redujo tanto mediante ERT como con el tratamiento combinado, mientras que el marcador de la apoptosis, PARP, que se elevó en condriocitos procedentes de ratas MPS VI (Simonaro et al., "Articular Chondrocytes From Animals With a Dermatan Sulfate Storage Disease Undergo a High Rate of Apoptosis and Release Nitric Oxide and Inflammatory Cytokines: A Possible Mechanism Underlying Degenerative Joint Disease in the Mucopolysaccharidoses," Lab Invest. 81:1319-1328 (2001)), se redujo solo mediante el protocolo del tratamiento combinado.

Ejemplo 7 - Efectos del tratamiento enzimático de sustitución en las mucopolisacaridoses

10 A pesar del hecho de que ERT proporciona claros beneficios clínicos a pacientes con MPS, incluyendo movilidad de la articulación mejorada, motilidad y respiración (Decker et al., "Enzyme Replacement Therapy for Mucopolysaccharidosis VI: Growth and Pubertal Development in Patients Treated With Recombinant Human N-Acetylgalactosamine 4-Sulfatase," J. Pediatr. Rehabil. Med. 3:89-100 (2010); Miebach, E, "Enzyme Replacement Therapy in Mucopolysaccharidosis Type II (Hunter syndrome) with Idursulfase: The Relevance of Clinical Trial End Points," Acta Paediatr. Suppl. 94:58-60 (2005)), la eficacia de este tratamiento sobre el cartílago y el hueso es extremadamente limitada. Esto puede atribuirse a la biodistribución de las enzimas recombinantes infundidas, que no puede alcanzar fácilmente estos tejidos debido a su mal suministro vascular, y al hecho de que las células dianas (por ejemplo, condriocitos) están incluidas en una matriz que impide la administración del fármaco. La movilidad de la articulación mejorada en pacientes con MPS tras ERT se piensa por tanto que se refiere a cambios de tejidos blandos (e.g, tendones), más bien que los efectos directos sobre el cartílago y el hueso. Además, incluso cuando las enzimas recombinantes se han inyectado directamente en el espacio articular de los animales MPS a edades muy tempranas, los efectos en el hueso y el cartílago han sido muy limitados (Auclair et al., "Long-Term Intra-Articular Administration of Recombinant Human N-Acetylgalactosamine 4-Sulfatase in Feline Mucopolysaccharidosis VI", Mol. Gen. Metab. 91:352 (2007)). Por tanto, sigue existiendo una importante necesidad de mejorar el resultado de ERT en estos tejidos.

Ejemplo 8 - Efectos del tratamiento dirigido contra TNF- α en la mucopolisacaridosis

30 Un trabajo anterior realizado por los solicitantes demostró la importancia de la ruta inflamatoria TLR4 en la patogénesis del cartílago y el hueso en modelos animales de MPS (Simonaro et al., "Involvement of the Toll-Like Receptor 4 Pathway and Use of TNF-Alpha Antagonists for Treatment of the Mucopolysaccharidoses", Proc. Natl. Acad. Sci. 107:222-7 (2010)). Puesto que no hay inhibidores directos de TLR4 autorizados para uso clínico, la eficacia de la terapia contra TNF- α se evaluó con un producto posterior de la ruta de TLR4 en el modelo de rata de MPS VI. En los seres humanos, los anticuerpos dirigidos contra TNF- α (por ejemplo, Remicade® (infliximab)) se utilizan para tratar algunas enfermedades inflamatorias habituales graves, incluyendo artritis reumatoide, artritis psoriásica, y enfermedad de Crohn (Klaasen et al., "Body Mass Index and Clinical Response to Infliximab in Rheumatoid Arthritis", Arthritis Rheum. 63:359-64 (2011); Rodgers et al., "Etanercept, Infliximab and Adalimumab for the Treatment of Psoriatic Arthritis: A Systematic Review and Economic Evaluation," Health Technol. Assess. 15:1-329 (2011); Rutella et al., "Infliximab Therapy Inhibits Inflammation-Induced Angiogenesis in the Mucosa of Patients With Crohn's Disease", Am. J. Gastroenterol. (2011)). Se ha descubierto que el tratamiento de ratas MPS VI con esta terapia dirigida contra TNF- α reduce la inflamación y la apoptosis del cartílago articular, pero no mejora significativamente el crecimiento de hueso anómalo o la movilidad (Simonaro et al., "Involvement of the Toll-Like Receptor 4 Pathway and Use of TNF-Alpha Antagonists for Treatment of the Mucopolysaccharidoses", Proc. Natl. Acad. Sci. 107:222-7 (2010)).

Ejemplo 9 - Efecto del tratamiento de sustitución enzimática combinado y la terapia dirigida contra TNF- α en la mucopolisacaridosis

50 En el estudio actual, la eficacia de combinar ERT con una terapia contra TNF- α se evaluó para determinar si había algún beneficio clínico/patológico respecto de ERT en solitario. Se usó un anticuerpo monoclonal específico de rata contra TNF- α (CNTO1081) y la N-acetil-galactosamina-4-sulfatasa (Naglazyme®) recombinante humana para ERT. Se sabe que las respuestas inmunitarias contra esta enzima humana se producen en ratas y gatos MPS VI tras la inyección intravenosa, aunque estas reacciones por lo general no son graves. Se puede utilizar la inmunosupresión para minimizar esta respuesta (Connor, V, "Anti-TNF Therapies: A Comprehensive Analysis of Adverse Effects Associated With Immunosuppression," Rheumatol. Int. 31:327-37 (2011)) pero puesto que la terapia dirigida contra TNF- α ya se administra en este estudio, un inmunosupresor conocido, no se añadió un tratamiento complejo adicional al diseño experimental: de la presente invención. Para algunas terapias de ERT, las respuestas inmunitarias a las enzimas infundidas pueden limitar notablemente su eficacia, y una ventaja óptima de combinar la terapia dirigida contra TNF- α con ERT puede ser la minimización de esta respuesta y evitar la necesidad de inmunosupresión adicional. Sin embargo, este potencial ventaja debe equilibrarse cuidadosamente con el riesgo potencial de un aumento de infecciones y, por tanto, debe evaluarse cuidadosamente en ensayos clínicos controlados.

65 Curiosamente, una de las observaciones iniciales del estudio actual era que ERT por sí solo redujo notablemente los niveles séricos de varios marcadores inflamatorios, incluyendo TNF- α y RANKL. Los niveles séricos de estas citoquinas reflejan el estado inflamatorio global de estos animales, en lugar de un órgano o tejido específico, y se

teorizó que la reducción de los niveles de estas moléculas en circulación después de aplicar ERT probablemente era debido a la eficacia de la terapia en órganos conocidos por ser fácilmente accesibles a la enzima recombinante (por ejemplo, el hígado). Se había mostrado previamente que la enfermedad inflamatoria en MPS está impulsada, en gran parte, por la acumulación de GAG, y que una reducción de los GAG en estos órganos después de ERT podría conducir a una reducción en la liberación sistémica de TNF- α (Simonaro et al., "Involvement of the Toll-Like Receptor 4 Pathway and Use of TNF-Alpha Antagonists for Treatment of the Mucopolysaccharidoses", Proc. Natl. Acad. Sci. 107:222-7 (2010)). El hecho de que los niveles de TNF- α (y otras moléculas inflamatorias) en circulación quedase notablemente reducido en estos animales después de ERT también sugiera que esta terapia podría tener efectos antiinflamatorios positivos secundarios sobre otros órganos que no son accesibles para la enzima (por ejemplo, el cartílago), proporcionando beneficios adicionales. Durante la totalidad del tratamiento con la terapia de sustitución enzimática para los pacientes con un trastorno lisosómico de acumulación, los marcadores séricos de inflamación, la toxicidad, etc., se miden de forma rutinaria. Véase Simonaro et al., "Involvement of the Toll-Like Receptor 4 Pathway and Use of TNF-Alpha Antagonists for Treatment of the Mucopolysaccharidoses", Proc. Natl. Acad. Sci. 107:222-7 (2010). Los pacientes de MPS sometidos a terapia de sustitución enzima podrían esperar niveles de TNF- α normales o casi normales. Basándose en los resultados de citoquinas séricas, parecería que la terapia de sustitución enzimática por sí misma sería eficaz. Como tal, los expertos en el campo que tratan pacientes con trastornos lisosómicos de acumulación con terapia de sustitución enzimática no habían pensado en añadir TNF- α al régimen de tratamiento antes de los resultados de la presente invención.

La mejora clínica de los animales MPS VI tratados se evaluó con dos medidas de la actividad motora, el comportamiento en un aparato rotarod en rotación y análisis de la marcha. ERT mejoró estos criterios de valoración, pero se observó un beneficio aditivo evidente al combinar esta terapia con un tratamiento contra TNF- α . Se teorizó que los efectos positivos de ERT en estos fenotipos se debía probablemente a los cambios en los tejidos blandos de las articulaciones, en lugar de a una administración directa de la enzima al cartílago o hueso. Puesto que las ratas MPS VI no presentan hígados y bazo notablemente agrandados, la mejora en la actividad motora y en la marcha después de ERT tampoco se puede atribuir a la reducción en el tamaño de los órganos, aunque claramente esto es un beneficio positivo en pacientes de MPS tratados con ERT.

Cabe destacar que, los beneficios aditivos del tratamiento ERT/CTNO1018 combinado sobre estos criterios de valoración clínicos fueron significativos, y se produjeron a pesar del hecho de que la reducción de los niveles séricos de TNF- α y RANKL en ambos grupos de tratamiento fueron similares. De hecho, se observaron algunos cambios en el cartílago de los animales que recibieron tratamiento combinado que no se observaron en el grupo ERT. Por ejemplo, las tráqueas de las ratas MPS VI que recibieron el tratamiento combinado eran significativamente más delgadas y anchas que los animales sin tratar o tratados con ERT, y la expresión de colágeno IIA1 estaba elevada en el colágeno articular. La ceramida también se redujo en las tráqueas, indicativo de una disminución de la inflamación, y la expresión de PARP (indicativa de apoptosis) estaba reducida en los condrocitos articulares.

Además, la inflamación del sinovio se redujo de forma notable con la terapia combinada, dando como resultado menos vellosidades y menos invasión del tejido sinovial hacia el hueso subyacente. Si estos cambios se debieron a un efecto directo del CTNO1018 sobre estos tejidos, o un efecto indirecto resultado de la reducción sistémica de TNF- α , sigue siendo desconocido. Los efectos sobre la morfología traqueal fueron especialmente notables, lo que sugiere que las complicaciones respiratorias asociadas con la patología traqueal en pacientes de MPS se pueden beneficiar de los efectos positivos de la terapia ERT/anti-TNF- α combinada (Semenza et al., "Respiratory Complications of Mucopolysaccharide Storage Disorders", Medicine 67:209-19 (1988); Shinhar et al., "Airway Management in Mucopolysaccharide Storage Disorders", Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 130:233-237 (2004)). CTNO1018 es un anticuerpo dirigido contra TNF- α . Como tal, tiene un peso molecular y biodistribución que no se habrían esperado que alcanzaran los tejidos del cartílago principalmente avasculares tales como la tráquea.

A pesar de estos cambios positivos en las articulaciones y tráqueas de los animales MPS VI tratados, hay pocos efectos evidentes en los huesos. Las longitudes de fémures y tibias mejoraron poco mediante el tratamiento combinado, pero la histología de la placa de crecimiento no lo hizo. Estos cambios en la longitud del hueso fueron muy modestos, comparados con los anteriormente observados en animales con doble inactivación genética MPSVII/TLR4 (Simonaro et al., "Involvement of the Toll-Like Receptor 4 Pathway and Use of TNF-Alpha Antagonists for Treatment of the Mucopolysaccharidoses", Proc. Natl. Acad. Sci. 107:222-7 (2010)), donde fue evidente una clara mejoría en la organización de la placa de crecimiento junto con huesos significativamente más largos. Sin embargo, se reconocieron varias diferencias importantes entre los dos experimentos, incluidos diferentes modelos de roedores y enfermedades, y el hecho que, en la MPS VII, el estudio con ratones creó una inactivación genética completa de la ruta TLR4 que se estaba presente durante la totalidad del desarrollo, mientras que en el estudio actual las ratas se sometieron a tratamiento con una terapia sistémica dirigida contra TNF- α a partir de, aproximadamente, las 3 semanas.

En su conjunto, estos resultados sugieren que la combinación de una terapia dirigida contra TNF- α con ERT proporciona beneficios adicionales e inesperados en el cartílago y el hueso de animales MPS, dando como resultado mejores resultados clínicos. La implementación de esta terapia en pacientes de MPS se puede facilitar por el hecho de que algunos fármacos contra TNF- α están disponibles para uso clínico en otras afecciones inflamatorias (por ejemplo, Remicade®, etc.). Sin embargo, el uso crónico de estas terapias en pacientes de MPS también puede tener

efectos nocivos, y se necesitarán ensayos clínicos cuidadosamente controlados para determinar la seguridad y la eficacia de este de este protocolo de tratamiento combinado. Un segundo hallazgo importante es que ERT en solitario reduce la inflamación relacionada con TNF- α , proporcionando evidencia adicional de que la acumulación de GAG en las enfermedades de MPS es el punto que activa directamente esta ruta. De hecho, el efecto antiinflamatorio general de ERT da como resultado, probablemente, efectos secundarios positivos en órganos que la enzima no puede alcanzar. Por último, los datos notificados en la presente memoria validan el hecho de que TNF- α , RANKL y otros marcadores inflamatorios pueden usarse como biomarcadores para controlar los efectos de las terapias en las enfermedades MPS. Actualmente, el único biomarcador que se utiliza ampliamente en estos trastornos es la liberación de GAG en la orina, y este simple análisis sérico puede tener notables beneficios adicionales.

Ejemplo 10 - Estudios preliminares sobre los efectos de la terapia dirigida contra TNF- α sobre el tratamiento de sustitución enzimática en pentosán polisulfato

Para desarrollar datos de la "prueba de principio", seis ratas MPS VI de 6 meses de edad se trataron con PPS durante 3 meses. Las ratas MPS VI de 6 meses de edad tiene enfermedad de hueso, cartílago e inflamatoria establecida, y la meta específica de este estudio inicial era, por tanto, evaluar si PPS podría bien ralentizar o bien revertir cualquiera de los hallazgos clínicos o patológicos en animales MPS con enfermedad avanzada. Tal como puede observarse en las Figuras 6A-6D, el aspecto facial de los animales MPS VI de 9 meses de edad tratados era notablemente diferente del de los animales MPS VI de control. Como se ilustra en las Figuras 7A-7F, se tomaron radiografías del cráneo y microCT de ratas normales (Figuras 7A, 7D), ratas MPS VI con tratamiento PPS (Figuras 7C, 7F), y ratas MPS VI sin tratamiento PPS (Figuras 7B, 7E). Los cráneos de los animales tratados (Figuras 7C, 7F) eran más largos, los ojos, que normalmente sobresalen en MPS VI debido a una órbita óptica anómala, estaban rebajados como en los normales, y se produjeron notablemente menos secreciones de porfirina ocular. Las imágenes que se muestran son representativas de las observaciones generales de estos animales. Las radiografías del cráneo confirmaron estas observaciones, y revelaron cráneos y morros significativamente más largos en el grupo de tratamiento: (es decir, los tratados con PPS), a pesar de la edad avanzada a la que se inició el tratamiento (Figuras 7A-7F).

Las imágenes de microCT respaldaron adicionalmente estas observaciones, tal como se muestra en las Figuras 8A-8F. Las ratas MPS VI con tratamiento de PPS (Figuras 8E, 8F) y sin tratamiento de PPS (Figuras 8C, 8D) mostraron cambios en la dentición. Las ratas MPS VI sin tratamiento de PPS (Figuras 8C, 8D) en comparación con ratas MPS VI con tratamiento de PPS (Figuras 8E, 8F) mostraron incisivos sobrecrecidos (recuadro) que produce un alineamiento anómalo de los dientes en comparación con ratas normales (Figuras 8A-8F). Las imágenes de microCT de ratas normales se muestran en las Figuras 8A, 8B. Las ratas MPS VI sin tratar tienen incisivos demasiado grandes (recuadro) (Figuras 8C, 8D) que conducen a una alineación anómala del diente en comparación con las ratas normales. El tratamiento con PPS corrigió la mandíbula y la desalineación (Figuras 8E, 8F).

Inmediatamente antes del sacrificio, los animales también se estudiaron mediante un aparato rotarod en aceleración. Tal como puede observarse en la Figura 9, las ratas MPS VI que se trataron con PPS durante 3 meses permanecieron en el rotarod significativamente más tiempo que los animales de control sin tratar. Se teorizó que esto refleja bien un aumento en la movilidad de la articulación y/o una reducción en el dolor y la inflamación en el grupo de tratamiento. Además, el análisis inmunohistoquímico mostró que los niveles de TNF se redujeron en el hígado y bazo, y que los niveles de estas citoquinas también se habían reducido en la sangre de forma similar (Figuras 10A-10B). Los ensayos ELISA mostraron que los marcadores inflamatorios séricos de las ratas MPS VI tratadas eran significativamente más bajos que los mismos niveles de marcadores inflamatorios en las ratas MPS VI sin tratar (Figuras 11A-11C). En la Figura 11A se muestran los niveles en suero del marcador MIP-1 α inflamatorio, mientras que en la Figura 11B se muestran los niveles del marcador Rantes y en la Figura 11C se muestran los niveles de TNF- α .

También se inició el tratamiento con PPS de las ratas MPS VI de 1 mes de edad y, análogamente a lo observado en animales más viejos, se produjo un efecto significativo sobre el aspecto facial, longitud del cráneo, secreciones oculares y nasales, y movilidad tal como se evaluó por el comportamiento en rotarod (Figuras 12A-12C). Las tráqueas de las ratas MPS VI que no se trataron con PPS mostraron tráqueas colapsadas en comparación con tráqueas normales, mientras que esto mejoró en todos los grupos de tratamiento con PPS (Figura 13).

Por último, se evaluó la enfermedad de la espina dorsal en ratas MPS VI tratadas (6 meses de edad) y no tratadas. Estos estudios han documentado varios criterios de valoración importantes y clínicamente relevantes que se pueden seguir durante el tratamiento con PPS. Histológicamente, los discos MPS VI tienen gran cantidad de células nucleares y anulares vacuoladas alargadas, así como capas anulares engrosadas, defectos focales en el núcleo pulposo, y un aumento en la altura del disco cuando se compara con discos de control (Figura 14A). Biomecánicamente, en comparación con el segmento dorsal normal, el ensayo de tensión-compresión cíclico (Deformación) mostró que el segmento de movimiento MPS VI tenía una zona neutra (447,9 %; Figura 14B) y rigidez a la tracción (110,0 %) significativamente disminuidas. El ensayo de Deformación también mostró una constante de tiempo significativamente menor en las muestras de MPS VI (82,8 %; Figura 14B). Los condrocitos articulares de las ratas MPS VI que no se trataron con PPS muestran valores elevados de TNF- α , p38 y Cox-2 en comparación con

los normales, pero estos niveles se redujeron a la normalidad en las ratas MPS VI tratadas (Figura 15). ADAMTS-5 es una agreganasa degradadora de proteoglicanos que está también elevada en condriocitos de ratas MPS VI sin tratar, pero se redujo en los grupos de tratamiento de MPS VI (Figura 15). Un análisis en rotarod ilustró que ratones con enfermedad de Niemann-Pick de un mes de edad (desactivación génica de esfingomielina) que se trataron con PPS durante un período de tres meses se comportaron significativamente mejor que los ratones con enfermedad de Niemann-Pick sin tratamiento (Figura 16).

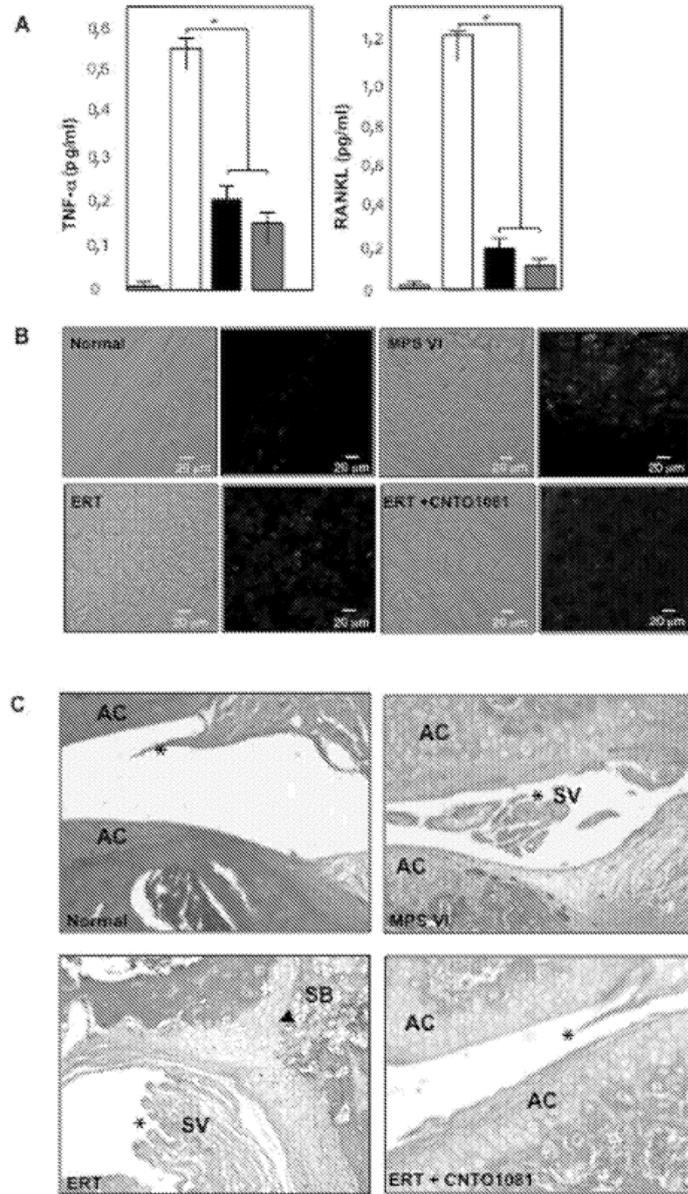
En su conjunto, los animales MPS VI demostraron cambios sustanciales en la biomecánica del movimiento del segmento dorsal y la estructura del disco, que se pueden asociar con el desarrollo y la progresión de la patología espinal observada en la población con MPS. La integridad del núcleo pulposos y anillo fibroso posterior son importantes para soportar la función biomecánica normal del segmento vertebral. Los efectos dimensionales en estas estructuras en las ratas MPS VI se puede asociar con una función biomecánica disminuida, tal como se representa mediante la reducción en la rigidez de la zona neutra. Esta disminución en la constante de tiempo (tiempo de deformación) también reveló que existía una alteración en el transporte de agua intervertebral y en la capacidad de retención, que probablemente podría estar relacionada con GAG disfuncionales, pero también podría estar parcialmente relacionado con alteraciones en la permeabilidad de la placa final y la función del colágeno, como se inicia mediante el modelo de MPS VI en cánidos.

Cabe destacar que, PPS no restaura el índice de altura de disco (DHI) aumentado en los animales MPS VI tratados con enfermedad avanzada (Figura 14C), a pesar de sus efectos positivos sobre las longitudes del cráneo y el morro, comportamiento en rotarod e inflamación (Figuras 6A-6D, 9, 10A-10B, 12A-12C). Estos hallazgos revelan la importancia de un cribado e intervención tempranos para el tratamientos de estos (y quizás, otros) parámetros en MPS, y la necesidad de evaluar cuidadosamente los efectos del tratamiento farmacológico en función de la edad y la progresión de la enfermedad.

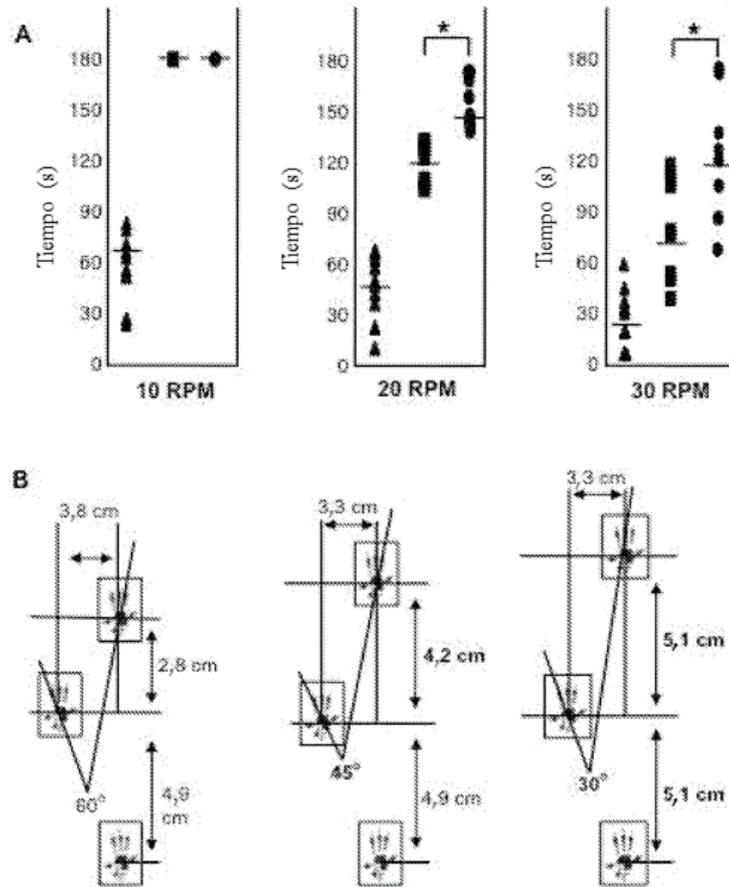
Puesto que PPS es un polisacárido de tipo GAG, no se esperaba que fuera terapéuticamente útil en la acumulación de GAG en MPS. Los resultados positivos en los animales MPS VI fueron, por lo tanto, sorprendentemente inesperados. Además, puesto que no se sabe que PPS cruce la barrera hematoencefálica, no se esperaba que tuviera efectos neurológicos positivos (como los presentados en la Figura 16) en el modelo de la enfermedad de Niemann-Pick en ratones.

REIVINDICACIONES

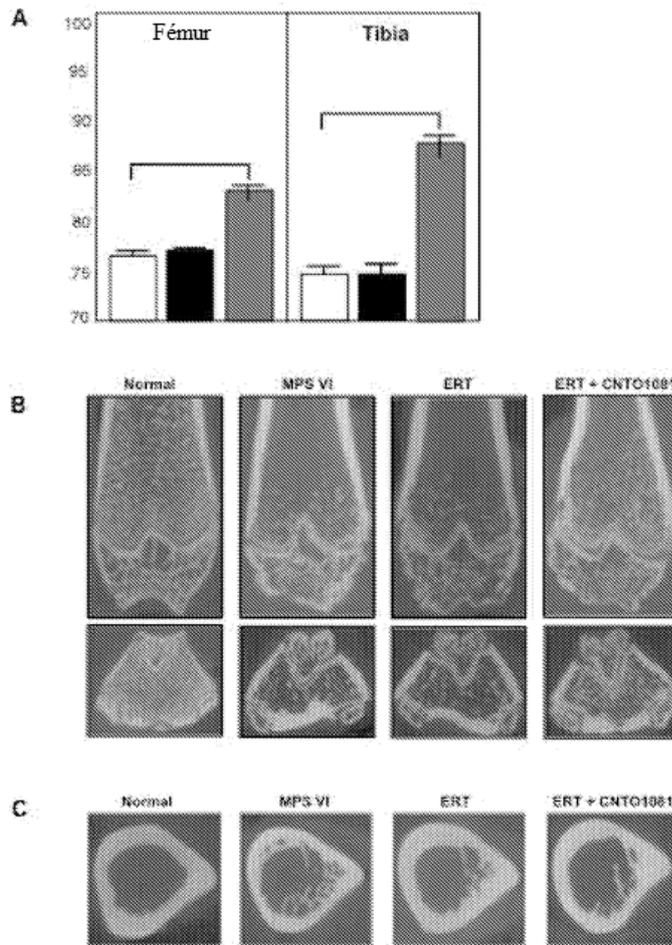
1. Pentosán polisulfato (PPS) para su uso en el tratamiento de un sujeto con trastorno lisosómico de acumulación.
- 5 2. El PPS para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde se administra una terapia adicional, en donde la terapia adicional se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en trasplante de médula ósea, terapia con chaperona y terapia génica.
- 10 3. El PPS para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el trastorno lisosómico de acumulación se selecciona entre el grupo que consiste de esfingolipidosis, enfermedad de acumulación de mucopolisacáridos (mucopolisacaridosis), glicoproteínosis, mucolipidosis, glicogenosis de tipo II, lipofuscinosis ceroides y otras anomalías de la función de la proteína lisosómica.
- 15 4. El PPS para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 en donde el trastorno lisosómico de acumulación es una enfermedad de acumulación de mucopolisacáridos (mucopolisacaridosis).
- 20 5. El PPS para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 en donde la enfermedad de acumulación de mucopolisacáridos es MPS I (síndrome de Hurler/Schie), MPS II (síndrome de Hunter), MPS VI (síndrome de Maroteaux-Lamy), MPS III (síndrome de Sanfilippo), MPS IV (síndrome de Morquio), o MPS VII (enfermedad de Sly).
- 25 6. El PPS para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 en donde el trastorno lisosómico de acumulación es una esfingolipidosis.
- 30 7. El PPS para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 en donde la esfingolipidosis es la enfermedad de Niemann-Pick.
- 35 8. El PPS para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho PPS se administra por vía oral, mediante inhalación, mediante instilación intranasal, por vía tópica, por vía transdérmica, por vía parenteral, por vía subcutánea, mediante inyección intravenosa, mediante inyección intraarterial, mediante inyección intramuscular, por vía intrapleural, por vía intraperitoneal o mediante la aplicación a la membrana mucosa.
9. El PPS para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho PPS se administra más de una vez.
10. El PPS para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto es un bebé, un adolescente o un adulto.
11. El PPS para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene una patología esquelética asociada a un trastorno lisosómico de acumulación.



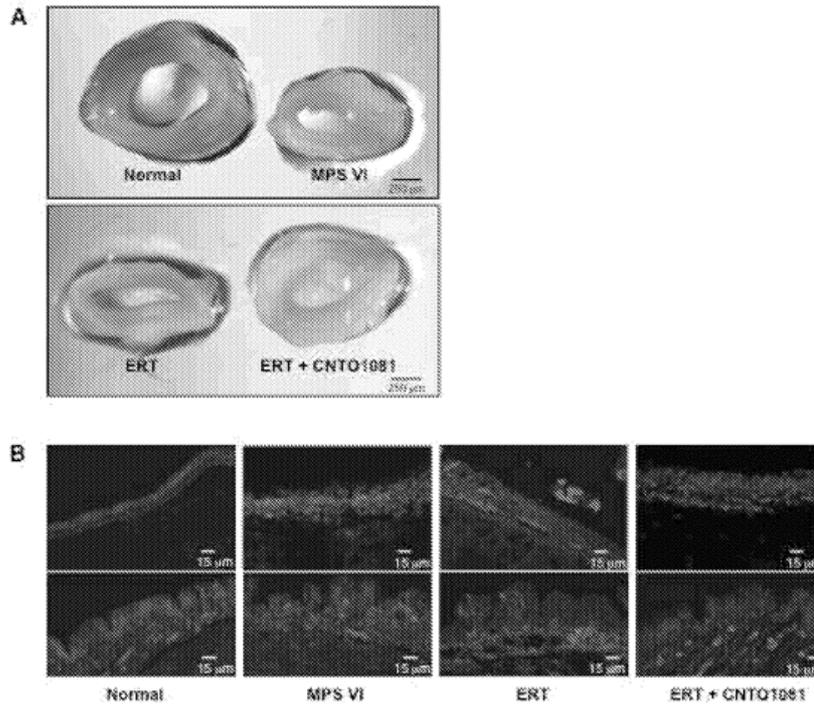
FIGURAS 1A-1C



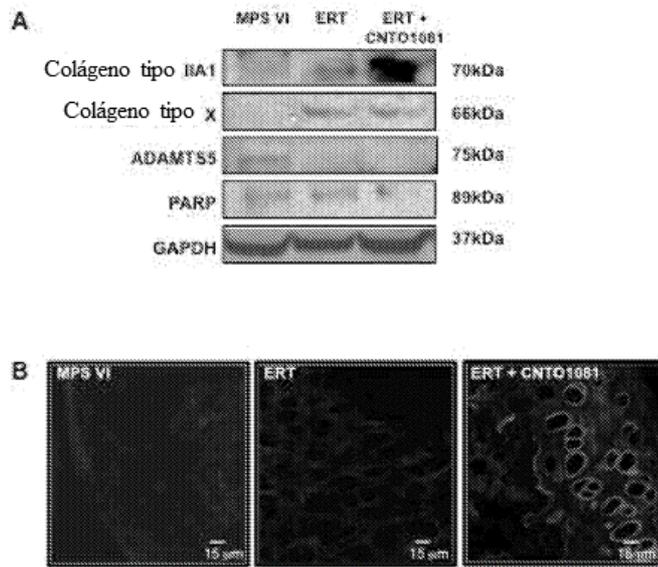
FIGURAS 2A-2B



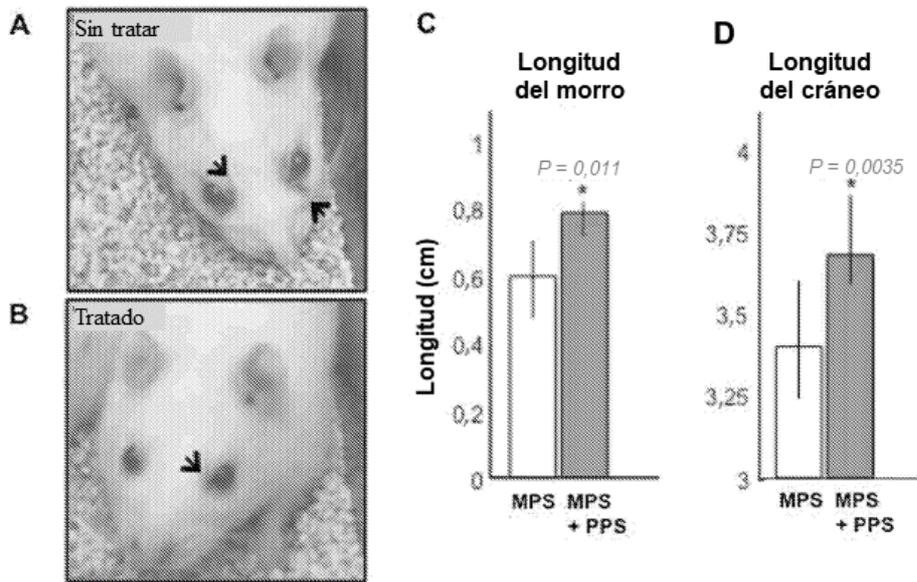
FIGURAS 3A-3C



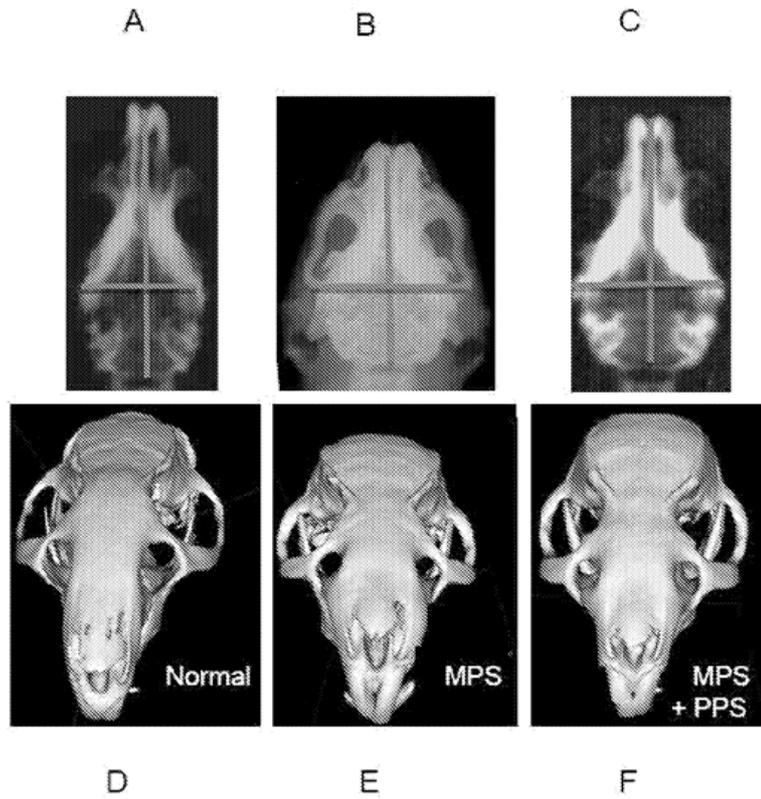
FIGURAS 4A-4B



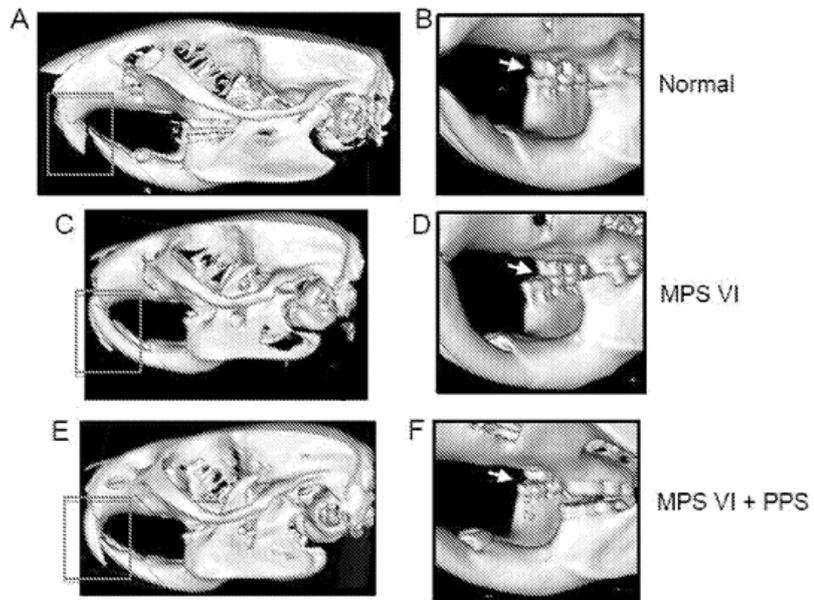
FIGURAS 5A-5B



FIGURAS 6A-6D



FIGURAS 7A-7F



FIGURAS 8A-8F

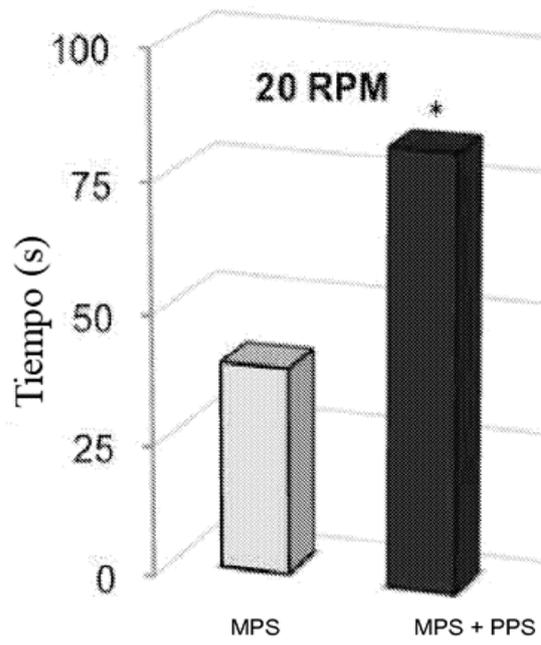
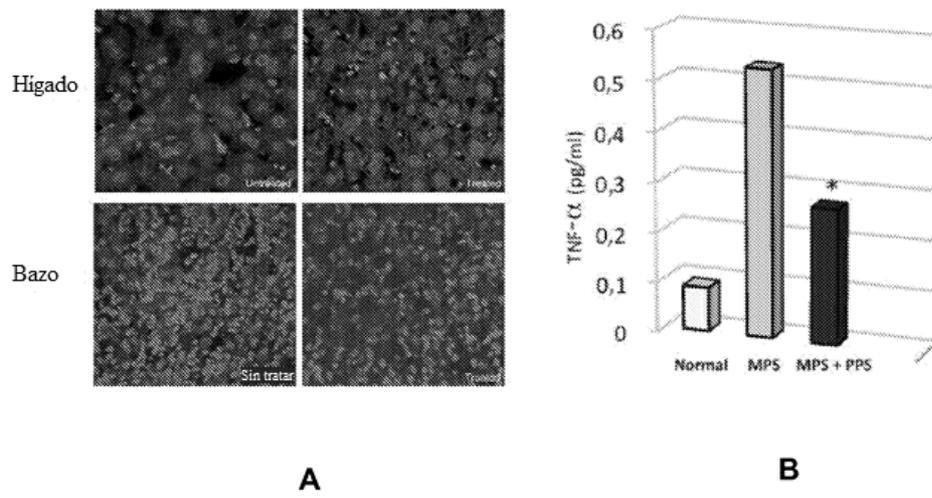
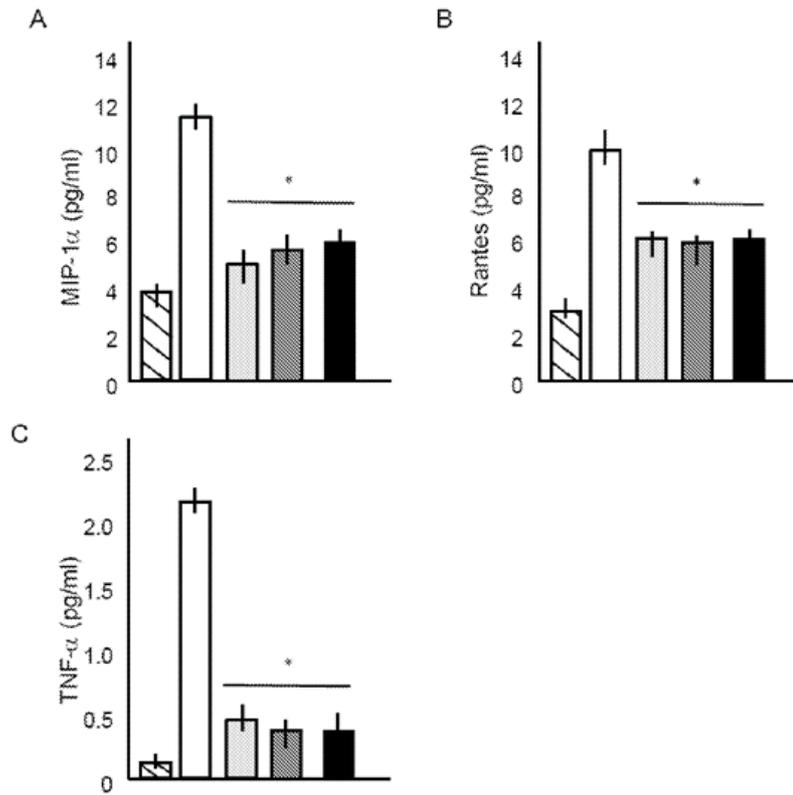


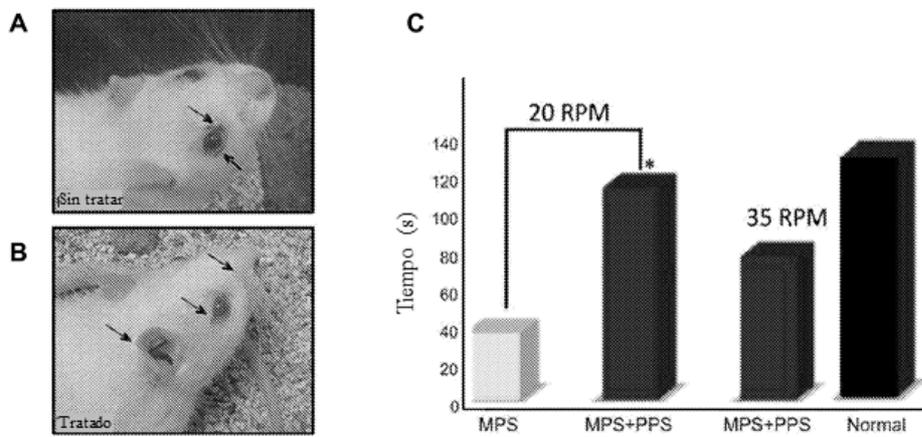
FIGURA 9



FIGURAS 10A-10B



FIGURAS 11A-11C



FIGURAS 12A-12C

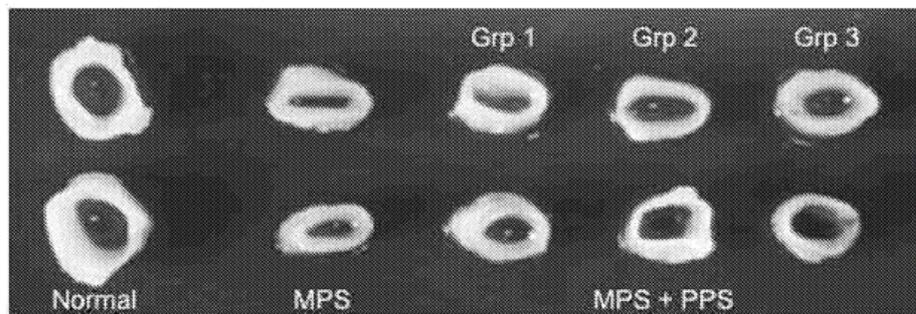
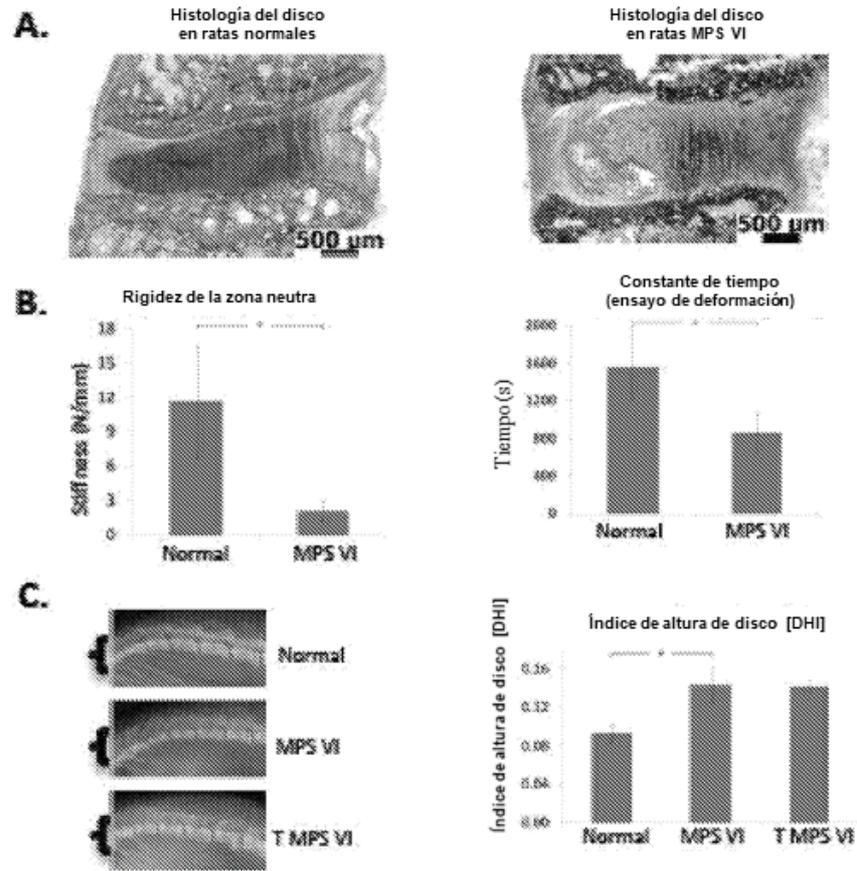


FIGURA 13



FIGURAS 14A-1

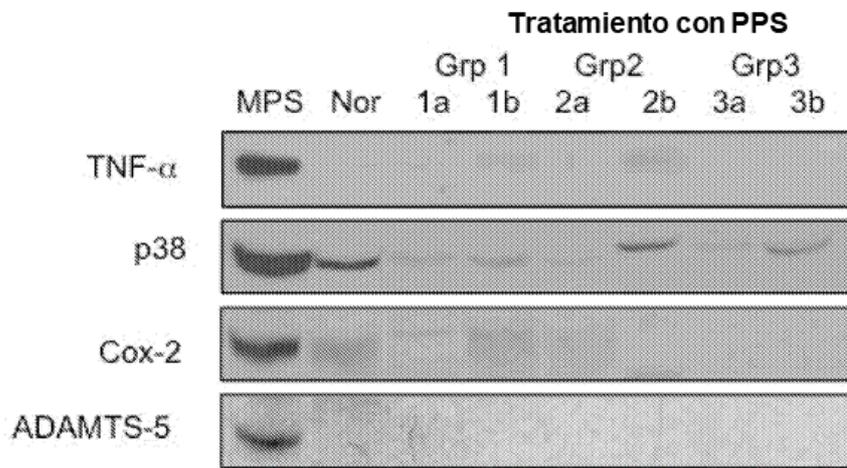


FIGURE 15

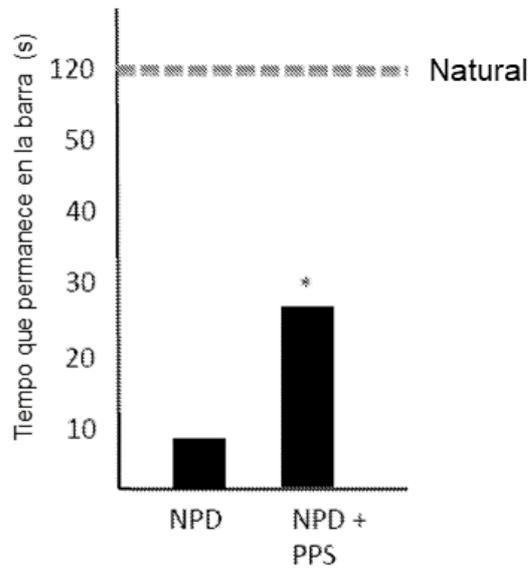


FIGURA 16