

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 697 502**

51 Int. Cl.:

A61B 5/00 (2006.01)

A61N 1/30 (2006.01)

A61M 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.02.2007 PCT/US2007/003382**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2007 WO07095056**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2007 E 07750236 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 1988823**

54 Título: **Administración intraventricular lenta**

30 Prioridad:

09.02.2006 US 771451 P

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

24.01.2019

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)
50 Binney Street
Cambridge, MA 02142 , US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 697 502 T3

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

DESCRIPCIÓN

Administración intraventricular lenta

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

- 5 Esta invención se refiere a la administración de agentes al cerebro. En particular, se refiere al diagnóstico, tratamiento, y formación de imágenes del cerebro.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Un grupo de trastornos metabólicos, conocidos como enfermedades del almacenamiento lisosómico (LSD), incluye alrededor de cuarenta trastornos genéticos, muchos de los cuales implican defectos genéticos en diversas hidrolasas lisosómicas. En la Tabla 1 se enumeran las enfermedades del almacenamiento lisosómico representativas y las enzimas defectuosas asociadas.

Tabla 1

Enfermedad del almacenamiento lisosómico	Enzima defectuosa
Aspartilglucosaminuria	Aspartilglucosaminidasa
Fabry	.alfa.-Galactosidasa A
Enfermedad de Batten infantil* (CNL1)	Palmitoil Proteína Tioesterasa
Enfermedad de Batten infantil tardía clásica* (CNL2)	Tripeptidil Peptidasa
Enfermedad de Batten infantil juvenil* (CNL3)	Proteína transmembránica lisosómica
Batten, otras formas* (CNL4-CNL8)	Múltiples productos genéticos
Cistinosis	Transportador de cisteína
Farber	Ceramidasa ácida
Fucosidosis	.alfa.-L-fucosidasa ácida
Galactosidosis	Proteína protectora/catepsina A
Gaucher tipos 1, 2*, y 3*	.beta.-glucosidasa ácida, o
Gangliosidosis G.sub.M1 *	.beta.-galactosidasa ácida
Hunter*	Iduronato-2-sulfatasa
Hurler-Scheie*	.alfa.-L-Iduronidasa
Krabbe*	Galactocerebrosidasa.
alfa.-Manosidosis*	.alfa.-manosidasa ácida
beta.-Manosidosis*	.beta.-manosidasa ácida
Maroteaux-Lamy	Arlsulfatasa B
Leucodistrofia metacromática*	Arlsulfatasa A
Morquio A	N-Acetilgalactosamina-6-sulfato
Morquio B	.beta.-galactosidasa ácida
Mucopolidosis II/III*	N-Acetilglucosamina-1-
Niemann-Pick A*, B	Esfingomielinasa ácida
Niemann-Pick C*	NPC-1
Pompe*	.alfa.-glucosidasa ácida
Sandhoff*	.beta.-Hexosaminidasa B
Sanfilippo A*	Heparano N-sulfatasa
Sanfilippo B*	.alfa.-N-Acetilglucosaminidasa
Sanfilippo C*	Acetil-CoA: alfa.-glucosaminidasa
Sanfilippo D*	N-Acetilglucosamina-6-sulfato
Enfermedad de Schindler*	.alfa.-N-Acetilgalactosaminidasa
Schindler-Kanzaki	.alfa.-N-Acetilgalactosaminidasa
Sialidosis	.alfa.-Neuramidasa
Sly*	.beta.-Glucuronidasa
Tay-Sachs*	.beta.-Hexosaminidasa A
Wolman*	Lipasa ácida
*Implicación del SNC	

- 15 La característica distintiva de LSD es la acumulación anormal de metabolitos en los lisosomas, lo que conduce a la formación de grandes números de lisosomas hinchados en el pericarion. Un reto importante para tratar LSD (en oposición al tratamiento de una enzimopatía específica del hígado) es la necesidad de invertir la patología del

almacenamiento lisosómico en múltiples tejidos distintos. Algunas LSDs se pueden tratar eficazmente mediante infusión intravenosa de la enzima perdida, conocido como terapia de sustitución enzimática (ERT). Por ejemplo, los pacientes con Gaucher tipo 1 tienen solamente enfermedad visceral, y responden favorablemente a la ERT con glucocerebrosidasa recombinante (Cerezyme™, Genzyme Corp.). Sin embargo, los pacientes con enfermedad metabólica que afecta al SNC (por ejemplo, enfermedad de Gaucher tipo 2 o 3) no responden eficazmente a la ERT intravenosa, debido a que se evita que la enzima de sustitución entre en el cerebro mediante la barrera hematoencefálica (BBB). Además, los intentos para introducir una enzima de sustitución en el cerebro mediante inyección directa se han limitado en parte debido a la citotoxicidad enzimática en concentraciones locales elevadas y a las velocidades de difusión parenquimatosa limitadas en el cerebro (Partridge, Peptide Drug Delivery to the Brain, Raven Press, 1991).

Según la entrada P17405 de UniProtKB/Swiss-Prot, los defectos en el gen SMPD1, situado en el cromosoma 11, (11p15.4-p15.1), son la causa de la enfermedad de Niemann-Pick tipo A (NPA), también denominada como la forma infantil clásica. La enfermedad de Niemann-Pick es un trastorno recesivo clínica y genéticamente heterogéneo. Está causado por la acumulación de esfingomielina y otros lípidos metabólicamente relacionados en los lisosomas, dando como resultado neurodegeneración desde el comienzo de la vida temprana. Los pacientes pueden mostrar xantomas, pigmentación, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, y retraso mental. La enfermedad de Niemann-Pick se produce más frecuentemente entre individuos de linaje judío Asquenazi que en la población general. La NPA se caracteriza por un comienzo muy temprano en la infancia y un curso que progresa rápidamente, conduciendo a la muerte en tres años. La enzima esfingomielinasa ácida (aSM) convierte esfingomielina en ceramida. aSM también tiene actividades de fosfolipasa C frente a 1,2-diacylglicerolfosfolina y 1,2-diacylglicerolfosfoglicerol. La enzima convierte



Hay una necesidad continua en la técnica de métodos para tratar las LSDs que tienen patologías de enfermedad tanto cerebral como visceral. Hay una necesidad continua en la técnica de métodos para acceder a porciones del cerebro con agentes de diagnóstico y terapéuticos que no atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica.

El documento US 2005/0048047 se refiere a la administración intratecal de enzima recombinante para tratar trastornos del almacenamiento lisosómico.

SUMARIO DE LA INVENCION

Según un ejemplo de la descripción, se proporciona un método para administrar un agente a un cerebro de un paciente. El agente se administra al paciente vía un ventrículo lateral del cerebro, a una velocidad tal que la administración de una única dosis se consume en más de dos horas.

Según otro ejemplo de la descripción, se proporciona un método para administrar un agente a un cerebro de un paciente. El agente se administra al paciente vía un ventrículo lateral del cerebro a una velocidad tal que la administración de una única dosis se consume al menos 50% del tiempo de recambio del fluido cerebroespinal en el paciente.

Según todavía otro ejemplo de la descripción, se proporciona un método para administrar un agente a un cerebro de un paciente. Se estima el tiempo de recambio del fluido cerebroespinal del paciente. La velocidad para la administración y un tiempo de administración total del agente vía un ventrículo lateral del cerebro se selecciona en base al tiempo de recambio. Se ajusta una bomba para administrar al paciente a dicha velocidad seleccionada durante dicho tiempo de administración total.

Según todavía otro ejemplo de la descripción, se proporciona un método para administrar un agente a un cerebro de un paciente. Se estima el tiempo de recambio del fluido cerebroespinal del paciente. La velocidad y el tiempo de administración total se seleccionan para la administración del agente vía un ventrículo lateral del cerebro en base al tiempo de recambio. El agente se administra al paciente a dicha velocidad seleccionada durante dicho tiempo de administración total.

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para administrar un agente a un cerebro de un paciente. El agente se administra al paciente vía un ventrículo lateral del cerebro a una velocidad tal que la administración de una única dosis continúa al menos hasta que el agente es detectable en el suero del paciente.

En base a la presente descripción, un primer aspecto de la presente invención proporciona un agente que es adecuado para la administración a un cerebro de un paciente, para uso en un método que comprende administrar el agente al paciente vía un ventrículo lateral del cerebro a una velocidad tal que la administración de una única dosis se consume en más de cuatro horas, en el que la administración se lleva a cabo hasta que dicho agente es detectable en el suero del paciente, y en el que el agente es una enzima que es deficiente en una enfermedad del almacenamiento lisosómico.

Otros aspectos y realizaciones de la invención se exponen en las reivindicaciones anejas.

Según un ejemplo de la descripción, que incluye una realización de la invención, se trata un paciente con enfermedad de Niemann-Pick A, B, o D. Se administra una esfingomielinasa ácida al paciente vía administración intraventricular al cerebro en una cantidad suficiente para reducir los niveles de esfingomielina en dicho cerebro.

5 Otro aspecto de la descripción es un kit para tratar un paciente con enfermedad de Niemann-Pick A, B, o D. El kit comprende una esfingomielinasa ácida, y un catéter para administrar dicha esfingomielinasa ácida a los ventrículos del cerebro del paciente.

Todavía otro aspecto de la descripción es un kit para tratar un paciente con enfermedad de Niemann-Pick A, B, o D. El kit comprende una esfingomielinasa ácida y una bomba para administrar dicha esfingomielinasa ácida a los ventrículos del cerebro del paciente.

10 Según la descripción, incluyendo la invención, se puede tratar un paciente que tiene una enfermedad del almacenamiento lisosómico que está provocada por deficiencia enzimática, lo que conduce a la acumulación del sustrato de la enzima.

15 La enzima se administra al paciente vía administración intraventricular al cerebro. La velocidad de administración es tal que la administración de una única dosis se consume en más de cuatro horas. De ese modo se reducen los niveles del sustrato en dicho cerebro.

Estas y otras realizaciones, que serán manifiestas para los expertos en la técnica al leer la memoria descriptiva, proporcionan a la técnica métodos para administrar agentes a porciones del cerebro difíciles de alcanzar.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 La FIG. 1 muestra el diagrama de secciones del cerebro que se analizaron en busca de esfingomielina. S1 está en la parte frontal del cerebro, y S5 está en la parte posterior del cerebro.

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

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

25 La FIG. 4 muestra la tinción de hASM en el cerebro tras la infusión intraventricular.

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

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

30 La FIG. 7 muestra variantes de hASM documentadas y su relación con la enfermedad o actividad enzimática.

La FIG. 8 muestra el sistema ventricular que baña todo el cerebro y la médula espinal con fluido cerebroespinal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

35 Los inventores han descubierto que la administración intraventricular de agentes a pacientes a una velocidad lenta, en lugar de en una administración de bolo, incrementa la penetración eficaz de los agentes en posiciones distales del cerebro desde el sitio de introducción. Los agentes que se pueden administrar de esta manera son cualesquiera, pero sin incluir, agentes de diagnóstico, agentes formadores de imágenes, agentes anestésicos, y agentes terapéuticos. Este modo de administración es particularmente útil para agentes que no pueden atravesar la barrera hematoencefálica.

40 Los solicitantes han observado que la administración intraventricular de bolo no es muy eficaz, mientras que la infusión lenta es muy eficaz. Aunque no se desea estar atados por ninguna teoría de operación particular, se cree que la infusión lenta es eficaz debido al recambio del fluido cerebroespinal (CSF). Aunque las estimaciones y cálculos en la bibliografía varían, se cree que el fluido cerebroespinal de un humano adulto se recambia en alrededor de 4, 5, 6, 7, u 8 horas. La velocidad de recambio puede variar dependiendo del tamaño del individuo y del volumen de fluido cerebroespinal en el individuo. De este modo, por ejemplo, los niños tienen menos fluido cerebroespinal que los adultos, y por lo tanto tienen un tiempo de recambio más corto. La infusión lenta de la descripción se puede medir de manera que el tiempo de administración es alrededor de igual a o mayor que el tiempo de recambio del CSF. La medición puede ser un tiempo fijo, por ejemplo mayor que 2, 4, 6, 8, o 10 horas, o se puede ajustar para que sea una fracción del tiempo de recambio estimado, por ejemplo mayor que 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, o 400%. El CSF se vacía en el sistema sanguíneo venoso. La administración se puede llevar a cabo durante un tiempo hasta que el agente administrado es detectable en el suero del paciente. También se puede detectar y/o medir el agente administrado en otras partes del SNC, tales como en la médula espinal y en el espacio

subaracnoideo. Éstos, también, se pueden usar como criterios de valoración para la administración.

El CSF se segrega a una velocidad de alrededor de 430 a 600 ml/día, o alrededor de 0,35 a 0,4 por minuto en adultos, y el volumen en cualquier momento dado es aproximadamente 80 a 150 ml, sustituyéndose todo el volumen cada seis a ocho horas. Se estima que los neonatos producen 0,15 ml por minuto. Los plexos coroideos de los ventrículos laterales son los más grandes, y producen la mayor parte del CSF. El fluido fluye a través de los agujeros intraventriculares en el tercer ventrículo, está aumentado por el fluido formado en el plexo coroideo de ese ventrículo, y pasa a través del acueducto cerebral de Silvio al cuarto ventrículo. El CSF fluye desde el 4º ventrículo hasta el agujero de Magendie al espacio subaracnoideo que rodea a la médula espinal; el CSF fluye desde el 4 ventrículo al agujero de Lushka al espacio subaracnoideo que rodea al cerebro. La membrana aracnoidea forra el espacio subaracnoideo; las vellosidades aracnoideas son parte de la membrana. Las vellosidades aracnoideas son bombas que recogen el CSF y lo devuelven a la circulación venosa. El CSF es reabsorbido en la sangre a través de las vellosidades aracnoideas.

La administración más lenta que el bolo, según la descripción, que incluye la invención, tiene la ventaja de administrar agentes a porciones del cerebro que no son alcanzadas con un bolo. El agente administrado mediante bolo se acumula en la capa endimaria o en el parénquima adyacente al sitio de inyección. Por el contrario, se encuentra que los agentes administrados lentamente acceden a regiones distales del parénquima desde el sitio de inyección (administración generalizada a lo largo del eje anterior a posterior del cerebro; además, administración generalizada dorsal y ventralmente a la capa endimaria), al tercer ventrículo, al acueducto de Silvio, al cuarto ventrículo, a los agujeros de Lushka, a los agujeros de Magendie, a la médula espinal, al espacio subaracnoideo, y al suero. Desde el suero, también alcanza a órganos periféricos.

El CSF se vacía en la sangre vía las vellosidades aracnoideas y senos vasculares intracraneales, administrando de ese modo las enzimas a los órganos viscerales. Los órganos viscerales que se ven afectados a menudo en la enfermedad de Niemann-Pick son los pulmones, bazo, riñón, e hígado. La infusión intraventricular lenta proporciona cantidades reducidas de sustrato en al menos estos órganos viscerales.

La reducción del sustrato acumulado en el cerebro, los pulmones, el bazo, el riñón y/o el hígado es drástica. Se pueden lograr reducciones de más de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%. La reducción lograda no es necesariamente uniforme de un paciente a otro, o incluso de un órgano a otro dentro de un mismo paciente.

Los agentes para la administración pueden ser cualesquiera que son conocidos en la técnica para el tratamiento y formación de imágenes de cerebros. Los agentes formadores de imágenes pueden ser radioactivos, radio-opacos, fluorescentes, etc. Los agentes terapéuticos pueden ser cualesquiera que sean útiles para tratar enfermedades neurológicas u otras enfermedades cerebrales. Los anestésicos pueden ser para tratar dolor crónico o agudo, por ejemplo hidrocóloro de lidocaína y morfina. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen las enzimas que son deficientes en enfermedades del almacenamiento lisosómico. Otros posibles agentes para uso incluyen vectores de ácidos nucleicos, tales como vectores plasmídicos y víricos, ARNpi, ARN antisentido, etc. Otros agentes terapéuticos incluyen aquellos que incrementan o disminuyen la excitación de las neuronas en el cerebro. Estos incluyen agonistas o antagonistas de glutamato, GABA, y dopamina. Los ejemplos específicos incluyen cicloserina, carboxifenilglicina, ácido glutámico, dizocilpina, ketamina, dextrometorfano, baclofeno, muscimol, gabacina, saclofeno, haloperidol, y metanosulfonato. Agentes adicionales que se pueden usar son agentes antiinflamatorios, en particular agentes antiinflamatorios no esteroideos tales como indometacina e inhibidores de ciclooxigenasas.

Los ácidos nucleicos se pueden administrar en cualquier vector deseado. Estos incluyen vectores víricos o no víricos, incluyendo vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados, vectores retrovíricos, vectores lentivíricos, y vectores plasmídicos. Los tipos ejemplares de virus incluyen HSV (virus del herpes simple), AAV (virus adenoasociado), VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), VIB (virus de la inmunodeficiencia bovina), y MLV (virus de la leucemia murina). Los ácidos nucleicos se pueden administrar en cualquier formato deseado que proporcione niveles de administración suficientemente eficientes, incluyendo en partículas víricas, en liposomas, en nanopartículas, y complejados con polímeros.

El adenovirus es un virus de ADN nuclear, sin cubierta, con un genoma de alrededor de 36 kb, que se ha caracterizado bastante bien a través de estudios en genética clásica y biología molecular (Hurwitz, M.S., Adenoviruses Virology, 3ª edición, Fields et al., eds., Raven Press, Nueva York, 1996; Hitt, M.M. et al., Adenovirus Vectors, The Development of Human Gene Therapy, Friedman, T. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York 1999). Los genes víricos se clasifican en unidades transcripcionales tempranas (denominadas E1-E4) y tardías (denominadas L1-L5), que hacen referencia a la generación de dos clases temporales de proteínas víricas. La demarcación de estos sucesos es la replicación del ADN vírico. Los adenovirus humanos se dividen en numerosos serotipos (aproximadamente 47, numerados en consecuencia y clasificados en 6 grupos: A, B, C, D, E y F), en base a las propiedades que incluyen la hemaglutinación de glóbulos rojos, oncogenicidad, composiciones y homologías de aminoácidos de ADN y de proteínas, y relaciones antigénicas.

Los vectores adenovíricos recombinantes tienen varias ventajas para uso como vehículos de administración de genes, incluyendo tropismo para células tanto que se dividen como las que no se dividen, potencial patógeno mínimo, capacidad para replicarse a títulos elevados para la preparación de lotes de vectores, y el potencial para

portar grandes insertos (Berkner, K.L., Curr. Top. Micro. Immunol. 158:39-66, 1992; Jolly, D., Cancer Gene Therapy 1:51-64 1994). Se han diseñado vectores adenovíricos con supresiones de diversas secuencias genéticas adenovíricas, tales como los vectores pseudoadenovíricos (PAVs) y adenovíricos parcialmente suprimidos (denominados "DeAd"), para aprovechar las características deseables de los adenovirus que los hacen un vehículo adecuado para la administración de ácidos nucleicos a células receptoras.

En particular, los vectores pseudoadenovíricos (PAVs), también conocidos como "adenovirus sin región vírica codificante (*gutless*)" o vectores miniadenovíricos, son vectores adenovíricos derivados del genoma de un adenovirus que contiene secuencias nucleotídicas que actúan en *cis* mínimas requeridas para la replicación y empaquetamiento del genoma del vector y que puede contener uno o más transgenes (véase la patente U.S. nº 5.882.877, que cubre los vectores pseudoadenovíricos (PAV) y los métodos para producir PAV). Los PAVs se han diseñado para aprovechar las características deseables de los adenovirus que los hacen un vehículo adecuado para la administración de genes. Aunque los vectores adenovíricos pueden portar generalmente insertos de hasta 8 kb de tamaño mediante la supresión de regiones que son prescindibles para el crecimiento vírico, la capacidad portadora máxima se puede lograr con el uso de vectores adenovíricos que contienen supresiones de la mayoría de las secuencias codificantes víricas, incluyendo PAVs. Véanse la patente U.S. nº 5.882.877 de Gregory et al.; Kochanek et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5731-5736, 1996; Parks et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:13565-13570, 1996; Lieber et al., J. Virol. 70:8944-8960, 1996; Fisher et al., Virology 217:11-22, 1996; patente U.S. nº 5.670.488; Publicación PCT nº WO96/33280, publicada el 24 de octubre de 1996; Publicación PCT nº WO96/40955, publicada el 19 de diciembre de 1996; Publicación PCT nº WO97/25446, publicada el 19 de julio de 1997; Publicación PCT nº WO95/29993, publicada el 9 de noviembre de 1995; Publicación PCT nº WO97/00326, publicada el 3 de enero de 1997; Morral et al., Hum. Gene Ther. 10:2709-2716, 1998. Tales PAVs, que pueden alojar hasta alrededor de 36 kb de ácido nucleico extraño, son ventajosos debido a que la capacidad portadora del vector está optimizada, mientras que el potencial para respuestas inmunes del hospedante al vector, o la generación de virus competentes para la replicación, está reducido. Los vectores PAV contienen las secuencias nucleotídicas de repeticiones terminales invertidas (ITR) en 5' e ITR en 3' que contienen el origen de replicación, la secuencia nucleotídica que actúa en *cis* requerida para el empaquetamiento del genoma del PAV, y pueden alojar uno o más transgenes con elementos reguladores apropiados, por ejemplo promotores, potenciadores, etc.

Otros vectores adenovíricos parcialmente suprimidos proporcionan un vector adenovírico parcialmente suprimido (denominado "DeAd"), en el que la mayoría de los genes tempranos adenovíricos requeridos para la replicación del virus están suprimidos del vector y están situados dentro de un cromosoma de célula productora bajo el control de un promotor condicional. Los genes adenovíricos suprimibles que se sitúan en la célula productora pueden incluir E1A/E1B, E2, E4 (solamente es necesario situar en la célula ORF6 y ORF6/7), pIX y pIVa2. E3 también se puede suprimir del vector, pero puesto que no se requiere para la producción del vector, se puede omitir de la célula productora. Los genes tardíos adenovíricos, normalmente bajo el control del promotor tardío principal (MLP), están presentes en el vector, pero el MLP se puede sustituir por un promotor condicional.

Los promotores condicionales adecuados para uso en vectores DeAd y estirpes celulares productoras incluyen aquellos con las siguientes características: baja expresión basal en el estado sin inducir, de manera que los genes adenovíricos citotóxicos o citostáticos no se expresan en niveles dañinos para la célula; y expresión de nivel elevado en el estado inducido, de manera que se producen cantidades suficientes de proteínas víricas para apoyar la replicación y ensamblaje del vector. Los promotores condicionales preferidos, adecuados para uso en vectores DeAd y estirpes celulares productoras, incluyen el sistema de control de gen dimerizador, basado en los agentes inmunosupresores FK506 y rapamicina, el sistema de control del gen de ecdisona, y el sistema de control del gen de tetraciclina. También puede ser útil en la presente invención la tecnología GeneSwitch™ (Valentis, Inc., Woodlands, TX), descrita en Abuzzese et al., Hum. Gene Ther. 1999 10:1499-507. El sistema de expresión adenovírico parcialmente suprimido se describe adicionalmente en el documento WO99/57296.

El virus adenoasociado (AAV) es un parvovirus de ADN humano monocatenario cuyo genoma tiene un tamaño de 4,6 kb. El genoma del AAV contiene dos genes principales: el gen rep, que codifica las proteínas rep (Rep 76, Rep 68, Rep 52, y Rep 40), y el gen cap, que codifica la replicación, rescate, transcripción e integración del AAV, mientras que las proteínas cap forman la partícula vírica del AAV. AAV deriva su nombre de su dependencia de un adenovirus u otro virus auxiliar (por ejemplo, virus del herpes) para suministrar productos genéticos esenciales que permiten al AAV llevar a cabo una infección productiva, es decir, reproducirse en la célula hospedante. En ausencia del virus auxiliar, AAV se integra como un provirus en el cromosoma de la célula del hospedante, hasta que es rescatado por superinfección de la célula hospedante con un virus auxiliar, habitualmente un adenovirus (Muzyczka, Curr. Top. Micro. Immunol. 158:97-127, 1992).

El interés en el AAV como un vector de transferencia de genes resulta de varias características únicas de su biología. En ambos extremos del genoma del AAV hay una secuencia nucleotídica conocida como una repetición terminal invertida (ITR), que contiene las secuencias nucleotídicas que actúan en *cis* requeridas para la replicación, rescate, empaquetamiento e integración del virus. La función de integración de la ITR, mediada por la proteína rep en *trans*, permite que el genoma del AAV se integre en un cromosoma celular tras la infección, en ausencia de virus auxiliar. Esta propiedad única del virus tiene relevancia para el uso de AAV en la transferencia de genes, ya que permite una integración de un AAV recombinante, que contiene un gen de interés, en el genoma celular. Por lo tanto, mediante el uso de vectores rAAV, se puede lograr la transformación genética estable, ideal para muchas de las

metas de transferencia de genes. Además, el sitio de integración para el AAV está bien establecido, y se ha localizado en el cromosoma 19 de seres humanos (Kotin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87:2211-2215, 1990). Esta predictibilidad del sitio de integración reduce el peligro de sucesos de inserción aleatorios en el genoma celular que pueden activar o inactivar genes hospedantes o interrumpir secuencias codificantes, con secuencias que pueden limitar el uso de vectores cuya integración de AAV, eliminación de este gen en el diseño de vectores de rAAV puede dar como resultado patrones de integración alterados que se han observado con los vectores de rAAV (Ponnazhagan et al., Hum Gene Ther. 8:275-284, 1997).

Hay otras ventajas para el uso de AAV para la transferencia de genes. El intervalo de hospedantes del AAV es amplio. Además, a diferencia de los retrovirus, AAV puede infectar tanto a células en reposo como a células en división. Además, AAV no se ha asociado con enfermedad humana, obviando muchas de las preocupaciones que han surgido con vectores de transferencia de genes derivados de retrovirus.

Los enfoques estándar para la generación de vectores de rAAV recombinantes han requerido la coordinación de una serie de sucesos intracelulares: la transfección de la célula hospedante con un genoma del vector de rAAV que contiene un transgén de interés flanqueado por las secuencias de ITR del AAV, la transfección de la célula hospedante por un plásmido que codifica los genes para las proteínas rep y cap del AAV que se requieren en trans, y la infección con un virus auxiliar de la célula transfectada para suministrar las funciones auxiliares no de AAV requeridas en trans (Muzyczka, N., Curr. Top. Micor. Immunol. 158:97-129, 1992). Las proteínas adenovíricas (o de otros virus auxiliares) activan la transcripción del gen rep del AAV, y las proteínas rep activan entonces la transcripción de los genes cap del AAV. Las proteínas cap utilizan entonces las secuencias de ITR para empaquetar el genoma del rAAV en una partícula vírica de rAAV. Por lo tanto, la eficiencia del empaquetamiento está determinada, en parte, por la disponibilidad de cantidades adecuadas de las proteínas estructurales, así como por la accesibilidad de cualesquiera secuencias de empaquetamiento que actúan en cis requeridas en el genoma del vector de rAAV.

Los vectores retrovíricos son una herramienta habitual para la administración de genes (Miller, Nature (1992) 357:455-460). La capacidad de los vectores retrovíricos para administrar un gen de una sola copia, no reordenado, en un amplio intervalo de células somáticas de roedores, de primates y de seres humanos hace a los vectores retrovíricos muy adecuados para transferir genes a una célula.

Los retrovirus son virus de ARN en los que el genoma vírico es ARN. Cuando una célula hospedante es infectada con un retrovirus, el ARN genómico es transcrito de forma inversa en un intermedio de ADN que se integra muy eficientemente en el ADN cromosómico de células infectadas. Este intermedio de ADN integrado se denomina provirus. La transcripción del provirus y el ensamblaje en virus infeccioso se producen en presencia de un virus auxiliar apropiado, o en una estirpe celular que contiene secuencias apropiadas que permiten el encapsidamiento sin producción coincidente de un virus auxiliar contaminante. No es necesario un virus auxiliar para la producción del retrovirus recombinante si las secuencias para el encapsidamiento se proporcionan mediante cotransfección con vectores apropiados.

El genoma retrovílico y el ADN provílico tienen tres genes: el gag, el pol, y el env, que están flanqueados por dos secuencias de repetición terminal larga (LTR). El gen gag codifica las proteínas estructurales internas (matriz, cápside, y nucleocápside); el gen pol codifica la ADN polimerasa dirigida por ARN (transcriptasa inversa); y el gen env codifica las glicoproteínas de la cubierta vírica. Las 5' y 3' LTRs sirven para promover la transcripción y poliadenilación de los ARN viriónicos. La LTR contiene todas las otras secuencias que actúan en cis necesarias para la replicación vírica. Los lentivirus tienen genes adicionales que incluyen vif, vpr, tat, rev, vpu, nef, y vpx (en HIV-1, HIV-2 y/o SIV). Adyacentes a la 5' LTR se encuentran secuencias necesarias para la transcripción inversa del genoma (el sitio de unión del cebador de ARNt), y para el encapsidamiento eficiente del ARN vírico en partículas (el sitio Psi). Si las secuencias necesarias para el encapsidamiento (o empaquetamiento de ARN retrovílico en viriones infecciosos) faltan en el genoma vírico, el resultado es un defecto en cis que evita el encapsidamiento del ARN genómico. Sin embargo, el mutante resultante todavía es capaz de dirigir la síntesis de todas las proteínas viriónicas.

Los lentivirus son retrovirus complejos que, además de los genes retrovíricos habituales gag, pol y env, contienen otros genes con función reguladora o estructural. La mayor complejidad permite que el lentivirus module su ciclo de vida, como en el transcurso de la infección latente. Un lentivirus típico es el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente etiológico del SIDA. *In vivo*, el VIH puede infectar células terminalmente diferenciadas que raramente se dividen, tales como linfocitos y macrófagos. *In vitro*, el VIH puede infectar cultivos primarios de macrófagos derivados de monocitos (MDM), así como células HeLa-Cd4 o linfoides T cuyo ciclo celular se ha detenido mediante tratamiento con afidicolina o irradiación gamma. La infección de las células depende de la importación nuclear activa de complejos de preintegración del VIH a través de los poros nucleares de las células diana. Eso ocurre por la interacción de múltiples determinantes moleculares, parcialmente redundantes, en el complejo con la maquinaria de importación nuclear de la célula diana. Los determinantes identificados incluyen una señal de localización nuclear funcional (NLS) en la proteína de la matriz gag (MA), la proteína asociada al virión cariólico, vpr, y un resto de fosfotirosina C-terminal en la proteína gag MA. El uso de retrovirus para la terapia genética se describe, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos de América 6.013.516; y en la patente U.S. 5.994.136.

Los inventores han descubierto que la administración intraventricular de enzimas de hidrolasas lisosómicas a pacientes que tienen deficiencia de las enzimas conduce a un estado metabólico mejorado tanto del cerebro como de los órganos viscerales (no SNC) afectados. Esto es particularmente cierto cuando la velocidad de administración es lenta, con respecto a una administración de bolo. Una enzima particularmente útil para tratar Niemann-Pick A, B, o D, es la esfingomielinasa ácida (aSM), tal como la mostrada en la SEQ ID NO: 1.¹

¹ Los restos 1-46 constituyen la secuencia señal que se escinde con la secreción.

Aunque en SEQ ID NO: 1 se muestra una secuencia de aminoácidos particular, igualmente se pueden usar variantes normales en la población humana que retengan la actividad. Típicamente, estas variantes normales difieren en justamente uno o dos restos de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1. Las variantes a usar deberían ser al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idénticas a SEQ ID NO: 1. Las variantes que están asociadas con enfermedad o actividad reducida no se deberían usar. Típicamente, se administrará la forma madura de la enzima. Esto comenzará con el resto 47 como se muestra en la SEQ ID NO: 1. En la FIG. 7 se muestran variantes que están asociadas con la enfermedad.

Los kits según la presente descripción son ensamblajes de componentes distintos. Aunque se pueden envasar en un único recipiente, se pueden subenvasar por separado. Incluso un único recipiente se puede dividir en compartimentos. Típicamente, un conjunto de instrucciones acompañará al kit y proporcionará instrucciones para administrar los agentes de diagnóstico, terapéuticos, o anestésicos, tales como las enzimas de hidrolasas lisosómicas, intraventricularmente. Las instrucciones pueden estar en forma impresa, en forma electrónica, como un vídeo o DVD de instrucciones, en un disco compacto, en un disquete, en internet, proporcionándose la dirección en el envase, o una combinación de estos medios. Además del agente, una o más cánulas o catéteres, y/o una bomba, se pueden proporcionar otros componentes, tales como diluyentes, amortiguadores, disolventes, cinta, tornillos, y herramientas de mantenimiento. La materia impresa u otros materiales instructivos pueden correlacionar el volumen del CSF, el tiempo de recambio del CSF, el peso del paciente, la edad del paciente, la velocidad de administración, el tiempo de administración, y/u otros parámetros. Las bombas se pueden calibrar para administrar a velocidades específicas en base al volumen del CSF y/o del tiempo de recambio y/o de la edad del paciente y/o del peso del paciente.

Las poblaciones tratadas mediante los métodos de la descripción incluyen, pero no se limitan a, pacientes que tienen o están en riesgo de desarrollar un trastorno neurometabólico, por ejemplo una LSD, tales como las enfermedades enumeradas en la Tabla 1, particularmente si tal enfermedad afecta al SNC y a órganos viscerales. En una realización ilustrativa, la enfermedad es enfermedad de Niemann-Pick tipo A. Si se ha determinado la propensión genética a la enfermedad, el tratamiento puede comenzar prenatalmente. Otras enfermedades o afecciones que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a, pacientes neuroquirúrgicos, pacientes con apoplejía, enfermedad de Huntington, epilepsia, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Lou Gehrig, enfermedad de Alzheimer.

Un agente, tal como una enzima de hidrolasa lisosómica, se puede incorporar en una composición farmacéutica. La composición puede ser útil para diagnosticar, anestesiarse, o tratar, por ejemplo inhibir, atenuar, prevenir, o mejorar, una afección caracterizada por un nivel insuficiente de una actividad de hidrolasa lisosómica. La composición farmacéutica se puede administrar a un sujeto que sufre una deficiencia de la hidrolasa lisosómica, o a alguien que está en riesgo de desarrollar dicha deficiencia. Las composiciones deberían contener una cantidad diagnóstica, anestésica, terapéutica o profiláctica eficaz del agente, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéutico puede ser cualquier sustancia no tóxica compatible, adecuada para administrar los polipéptidos al paciente. Como vehículo, se pueden usar agua estéril, alcohol, grasas, y ceras. También se pueden incorporar en las composiciones farmacéuticas adyuvantes, agentes amortiguadores, agentes dispersantes, y similares, farmacéuticamente aceptables. El vehículo se puede combinar con el agente en cualquier forma adecuada para la administración mediante inyección o infusión intraventricular (también posiblemente intravenosa o intratecal), o de otro modo. Los vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, disolución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL.TM. (BASF, Parsippany, N.J.), o disolución salina amortiguada con fosfato (PBS), otras disoluciones salinas, disoluciones de dextrosa, disoluciones de glicerol, emulsiones de agua y de aceites, tales como las obtenidas con aceites de origen de petróleo, animal, vegetal, o sintético (aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, o aceite de sésamo). Se puede usar como vehículo un CSF artificial. El vehículo será preferiblemente estéril, y estará libre de pirógenos. La concentración del agente en la composición farmacéutica puede variar ampliamente, es decir, desde al menos alrededor de 0,01% en peso a 0,1% en peso, a alrededor de 1% en peso, hasta tanto como 20% en peso o más.

Para la administración intraventricular, la composición debe ser estéril, y debería ser fluida. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y se debe conservar frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio.

La dosis de cualquier agente, ya sea aSM u otra enzima de hidrolasa lisosómica, puede variar en cierto modo de un

individuo a otro, dependiendo del agente o enzima particular y su actividad in vivo específica, la vía de administración, el estado médico, la edad, peso o sexo del paciente, las sensibilidades del paciente al agente aSM o a los componentes del vehículo, y otros factores que el médico a cargo será capaz de tener en cuenta fácilmente. Aunque las dosis pueden variar dependiendo de la enfermedad y del paciente, la enzima se administra generalmente al paciente en cantidades de alrededor de 0,1 a alrededor de 1000 miligramos por 50 kg de paciente al mes, preferiblemente de alrededor de 1 a alrededor de 500 miligramos por 50 kg de paciente al mes.

Una forma para administrar una infusión lenta es usar una bomba. Tales bombas están comercialmente disponibles, por ejemplo de Alzet (Cupertino, CA) o Medtronic (Minneapolis, MN). La bomba puede ser implantable, o externa. Otra manera conveniente de administrar las enzimas es usar una cánula o un catéter. La cánula o catéter se puede usar para múltiples administraciones separadas en el tiempo. Las cánulas y catéteres se pueden implantar estereotácticamente. Se contempla que se usarán múltiples administraciones para tratar al paciente típico con una enfermedad del almacenamiento lisosómico. Los catéteres y las bombas se pueden usar por separado o en combinación. Los catéteres se pueden insertar quirúrgicamente, como se conoce en la técnica. Los kits pueden comprender un agente y un catéter y/o una bomba. La bomba puede tener ajustes adecuados para velocidades de administración en base al volumen del CSF en un individuo.

La descripción anterior describe generalmente la presente invención.

Se puede obtener una comprensión más completa mediante la referencia a los siguientes ejemplos específicos, que se proporcionan aquí simplemente con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Modelo de animal

Los ratones ASMKO son un modelo aceptado de enfermedad de Niemann-Pick tipos A y B (Horinouchi et al. (1995) Nat. Genetics, 10:288-293; Jin et al. (2002) J. Clin. Invest., 109:1183-1191; y Otterbach (1995) Cell, 81:1053-1061). La enfermedad de Niemann-Pick (NPD) se clasifica como una enfermedad del almacenamiento lisosómico, y es un trastorno neurometabólico heredado caracterizado por una deficiencia genética en esfingomielinasa ácida (ASM; esfingomielina colinafosfohidrolasa, EC 3.1.3.12). La falta de proteína ASM funcional da como resultado la acumulación del sustrato esfingomielina en los lisosomas de las neuronas y glías a lo largo del cerebro. Esto conduce a la formación de grandes números de lisosomas hinchados en el pericarion, que son un rasgo distintivo y el fenotipo celular primario de NPD tipo A. La presencia de lisosomas hinchados se correlaciona con la pérdida de función celular normal y un curso neurodegenerativo progresivo que conduce a la muerte del individuo afectado en la niñez temprana (The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases, eds. Scriver et al., McGraw-Hill, Nueva York, 2001, p. 3589-3610). Los fenotipos celulares secundarios (por ejemplo, anomalías metabólicas adicionales) también están asociados con esta enfermedad, principalmente la acumulación en nivel elevado de colesterol en el compartimento lisosómico. La esfingomielina tiene una fuerte afinidad por el colesterol, lo que da como resultado el secuestro de grandes cantidades de colesterol en los lisosomas de ratones ASMKO y de pacientes humanos (Leventhal et al. (2001) J. Biol. Chem., 276:44976-44983; Slotte (1997) Subcell. Biochem., 28:277-293; y Viana et al. (1990) J. Med. Genet., 27:499-504).

EJEMPLO 2

"Infusión intraventricular de rhASM en el ratón ASMKO II"

Meta: Determinar qué efecto tiene la infusión intraventricular de rhASM sobre la patología del almacenamiento (es decir, almacenamiento de esfingomielina y de colesterol) en el cerebro del ratón ASMKO.

Métodos: A ratones ASMKO se les implantó estereotácticamente una cánula guía permanente entre las 12 y 13 semanas de edad. A las 14 semanas de edad, se infundió a los ratones con 0,250 mg de hASM (n = 5) a lo largo de un período de 24 h (~01 mg/h) durante cuatro días consecutivos (se administró un total de 1 mg) usando una sonda de infusión (se ajusta dentro de la cánula guía), que está conectada a una bomba. Antes de la infusión, hASM liofilizada se disolvió en fluido cerebroespinal artificial (aCSF). Los ratones se sacrificaron 3 días después de la infusión. En el momento del sacrificio, a los ratones se les sobredosificó con euthasol (>150 mg/kg), y después se perfundieron con PBS o con paraformaldehído al 4%. El cerebro, el hígado, los pulmones y el bazo se retiraron y se analizaron para determinar los niveles de esfingomielina (SPM). El tejido cerebral se dividió en 5 secciones antes del análisis de SPM (S1 = parte frontal del cerebro, S5 = parte posterior del cerebro; véase la Fig. 1).

Tabla 2.

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

Grupo	Tratamiento	N
WT	Ninguno	4

Sumario de resultados: La infusión intraventricular de hASM a 0,250 mg/24 h durante 4 días consecutivos (1 mg total) dio como resultado la tinción de hASM y el aclaramiento de filipina (es decir, almacenamiento de colesterol) a lo largo del cerebro ASMKO. El análisis bioquímico mostró que la infusión intraventricular de hASM también condujo a una reducción global en los niveles de SPM a lo largo del cerebro. Los niveles de SPM se redujeron hasta aquél de los niveles de tipo salvaje (WT). También se observó una reducción significativa en SPM en el hígado y en el bazo (se observó una tendencia descendente en el pulmón).

EJEMPLO 3

“Administración intraventricular de hASM en ratones ASMKO III”

Meta: Determinar la dosis eficaz más baja a lo largo de un período de infusión de 6 h.

Métodos: A ratones ASMKO se les implantó estereotácticamente una cánula guía permanente entre 12 y 13 semanas de edad. A las 14 semanas de edad, los ratones se infundieron durante un período de 6 h a una de las siguientes dosis de hASM: 10 mg/kg (0,250 mg; n = 12), 3 mg/kg (0,075 mg; n = 7), 1 mg/kg (0,025 mg; n = 7), 0,3 mg/kg (0,0075 mg; n = 7), o aCSF (fluido cerebroespinal artificial; n = 7). Dos ratones de cada nivel de dosis se perfundieron con paraformaldehído al 4% inmediatamente tras la infusión de 6 h, para evaluar la distribución de la enzima en el cerebro (también se recogió sangre de éstos, para determinar los niveles de hASM del suero). Los restantes ratones de cada grupo se sacrificaron 1 semana tras la infusión. El tejido del cerebro, del hígado y del pulmón de estos ratones se analizó para determinar los niveles de SPM, como en el estudio 05-0208.

Tabla 3.

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

Sumario de resultados: hASM intraventricular a lo largo de un período de 6 h condujo a una reducción significativa en los niveles de SPM por todo el cerebro, independientemente de la dosis. Los niveles de SPM cerebrales, en ratones tratados con dosis > 0,025 mg, se redujeron hasta los niveles de WT. Los niveles de SPM de órganos viscerales también se redujeron significativamente (pero no hasta los niveles de WT), de una manera dependiente de la dosis. En apoyo a este hallazgo, la proteína hASM también se detectó en el suero de ratones ASMKO infundidos con proteína hASM. El análisis histológico mostró que la proteína hASM estaba ampliamente distribuida por todo el cerebro (desde S1 hasta S5) tras la administración intraventricular de hASM.

EJEMPLO 4

“Infusión intraventricular de rhASM en ratones ASMKO IV”

Meta: Determinar (1) el tiempo que tarda SPM en reaccumularse en el cerebro (y en la médula espinal) después de una infusión de 6 h de hASM (dosis = 0,025 mg); (2) si hay diferencias de sexo en respuesta a la administración intraventricular de hASM (experimentos previos demuestran que hay diferencias de sexo en la acumulación de sustrato en el hígado; se desconoce si esto ocurre o no en el cerebro).

Métodos: A ratones ASMKO se les implantó estereotácticamente una cánula guía permanente entre 12 y 13 semanas de edad. A las 14 semanas de edad, los ratones se infundieron a lo largo de un período de 6 h con 0,025 mg de hASM. Tras la administración intraventricular de hASM, los ratones se sacrificaron a 1 semana tras la infusión (n = 7 machos, 7 hembras), o a las 2 semanas tras la infusión (n = 7 machos, 7 hembras), o a las 3 semanas tras la

infusión (n = 7 machos, 7 hembras). En el momento del sacrificio, se retiró el cerebro, la médula espinal, el hígado y los pulmones para el análisis de SPM.

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

Se prepararon muestras de tejido para el análisis de SPM.

5 EJEMPLO 5

“Efecto de la infusión intraventricular de rhASM sobre la función cognitiva en ratones ASMKO”

Meta: Determinar si la infusión intraventricular de rhASM alivia los déficits cognitivos inducidos por la enfermedad en ratones ASMKO.

10 Métodos: A ratones ASMKO se les implantó estereotácticamente una cánula guía permanente entre 9 y 10 semanas de edad. A las 13 semanas de edad, los ratones se infundirán a lo largo de un período de 6 h con 0,025 mg de hASM. A las 14 y 16 semanas de edad, los ratones se someterán a un ensayo cognitivo usando el laberinto de Barnes.

EJEMPLO 6

“Distribución de la proteína hASM en el SNC de ASMKO tras la infusión intraventricular”

15 Meta: Determinar la distribución de la proteína hASM (en función del tiempo) en el cerebro y médula espinal de ratones ASMKO tras la infusión intraventricular.

20 Métodos: A ratones ASMKO se les implantó estereotácticamente una cánula guía permanente entre 12 y 13 semanas de edad. A las 14 semanas de edad, los ratones se infundirán a lo largo de un período de 6 h con 0,025 mg de hASM. Tras el procedimiento de infusión, los ratones se sacrificaron inmediatamente, o 1 semana o 2 semanas o 3 semanas más tarde.

Referencias

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

REIVINDICACIONES

1. Un agente que es adecuado para la administración a un cerebro de un paciente, para uso en un método que comprende administrar el agente al paciente vía un ventrículo lateral del cerebro a una velocidad de manera que la administración de una única dosis se consume en más de cuatro horas, en el que la administración se lleva a cabo hasta que dicho agente es detectable en el suero del paciente, y en el que el agente es una enzima que es deficiente en una enfermedad del almacenamiento lisosómico.
2. El agente de la reivindicación 1, en el que el agente accede al tercer ventrículo, al acueducto de Silvio, al cuarto ventrículo, a los agujeros de Luschka, al agujero de Magendie, a la médula espinal, al espacio subaracnoideo, o al suero.
3. El agente de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el agente se selecciona del grupo que consiste en esfingomielinasa, alfa-L-iduronidasa, glucocerebrosidasa, alfa-galactosidasa A, maltasa ácida, hexosaminidasa, y alfa-glucosidasa.
4. El agente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el paciente tiene una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Niemann-Pick B, síndrome de Hurler, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, enfermedad de Pompe, enfermedad de Tay-Sachs, o enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II.
5. El agente de la reivindicación 1, en el que la velocidad es tal que la administración de una única dosis se consume en más de seis horas, más de ocho horas, o más de diez horas.
6. El agente de la reivindicación 1, en el que la velocidad es tal que la administración de una única dosis se consume en hasta diez horas.
7. El agente de la reivindicación 1, en el que la velocidad es tal que la administración de una única dosis se consume en seis a diez horas.
8. El agente de la reivindicación 1, en el que el agente se administra usando un catéter, una bomba, o una bomba implantable.

Fig. 1

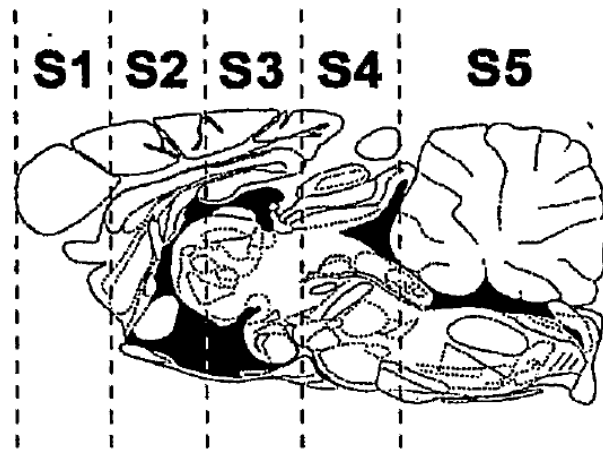


FIG. 2.

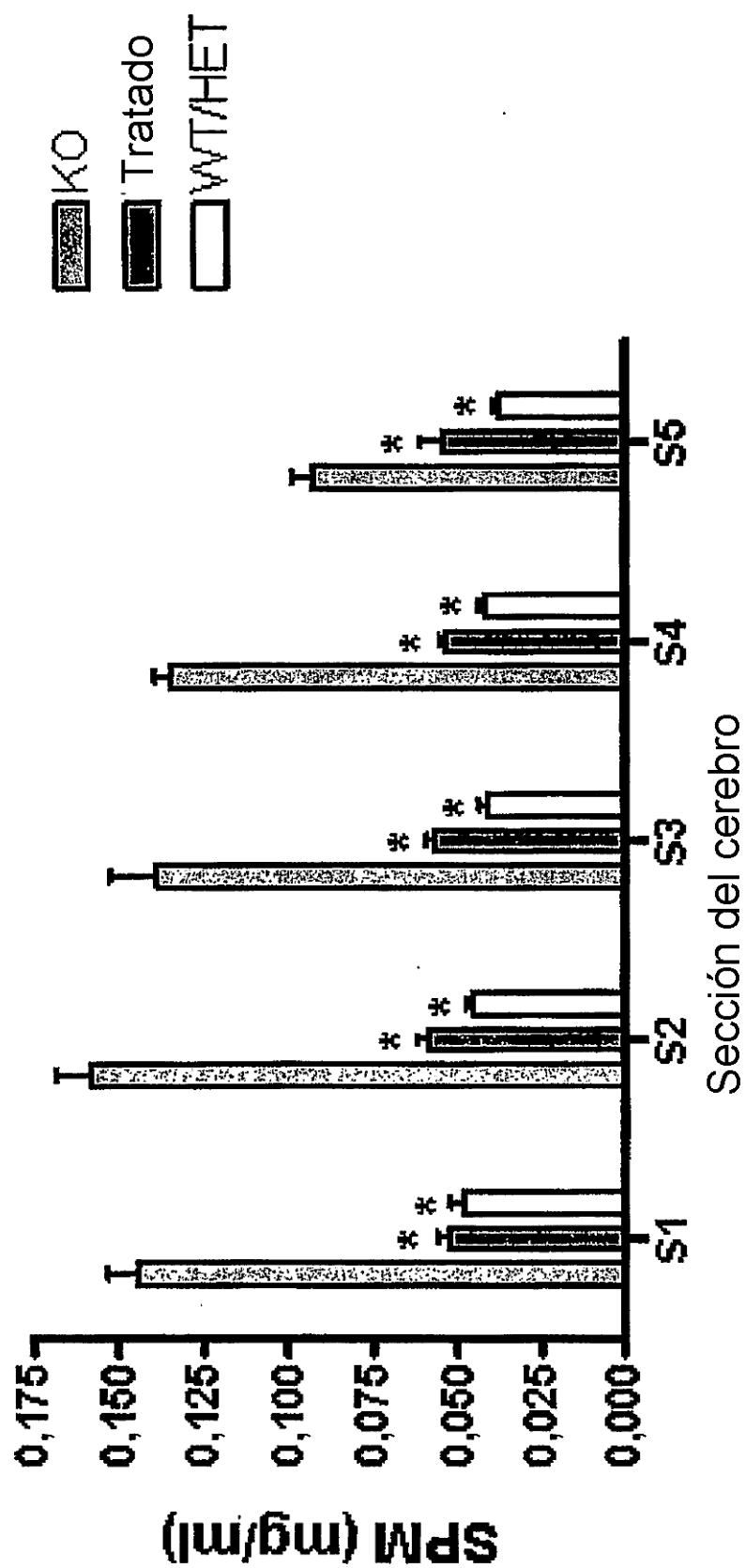


FIG. 3.

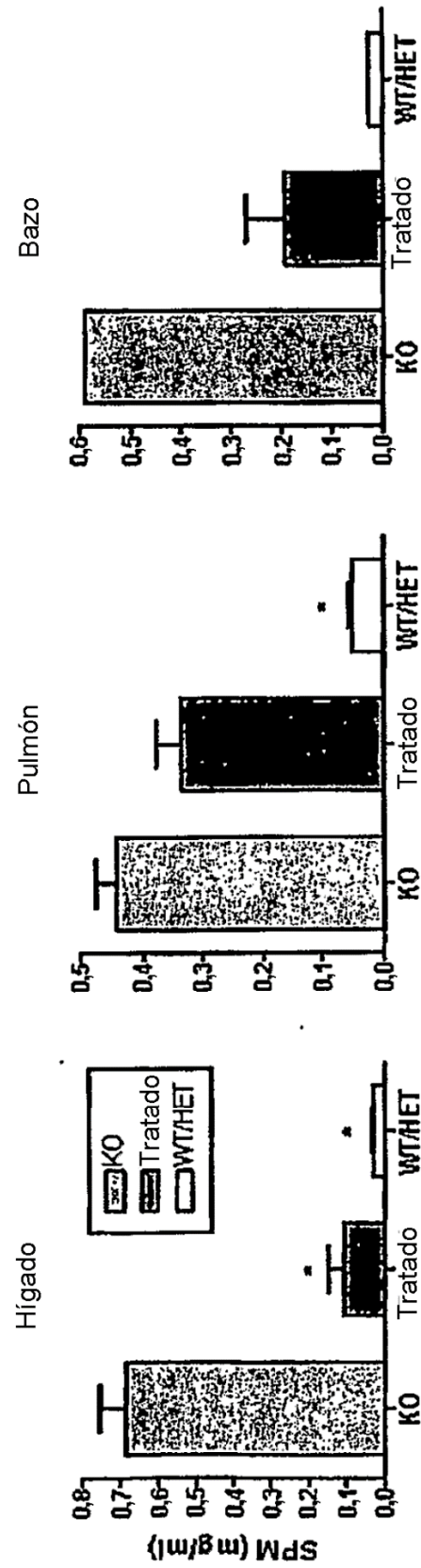


FIG. 4.

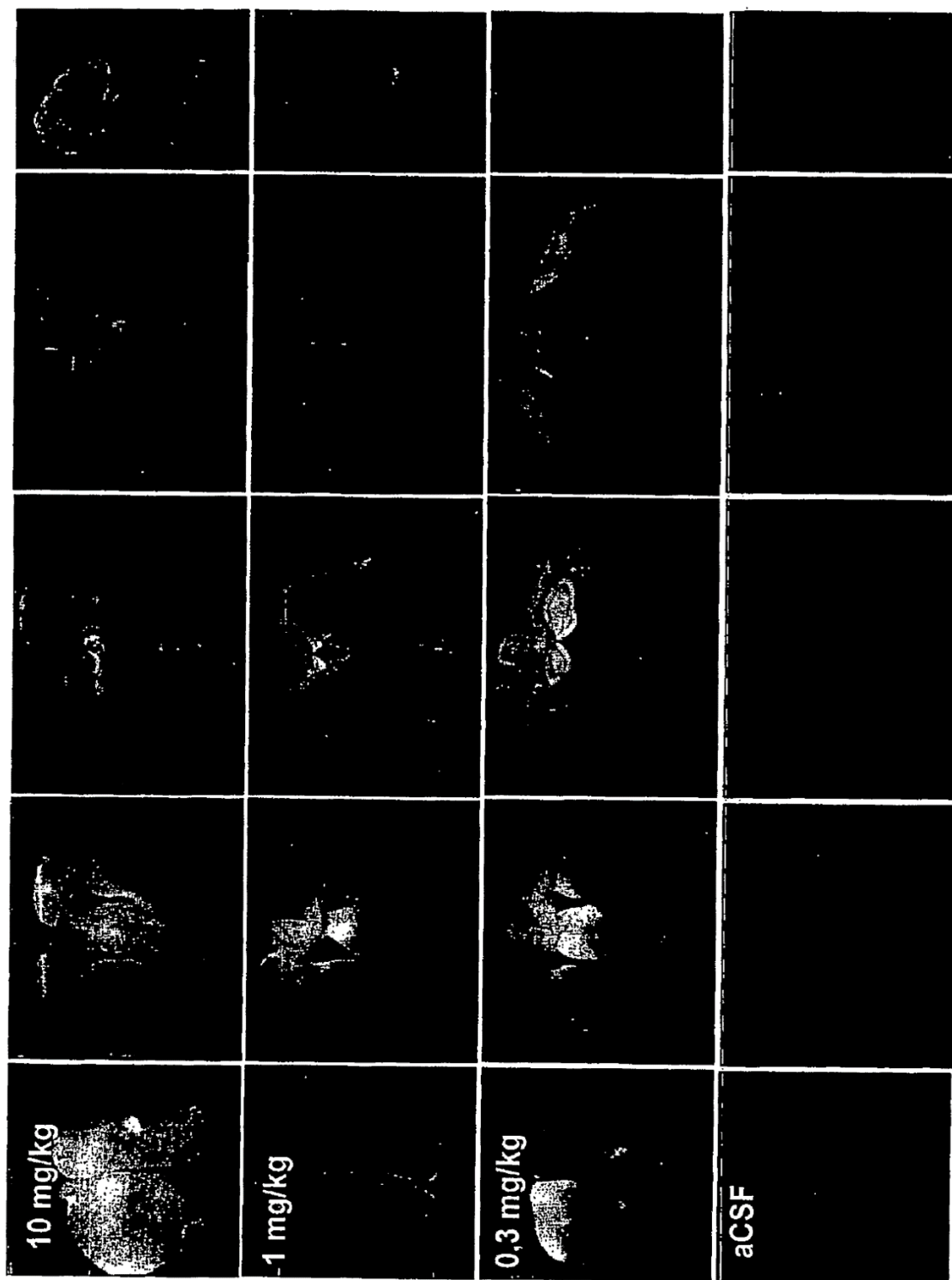
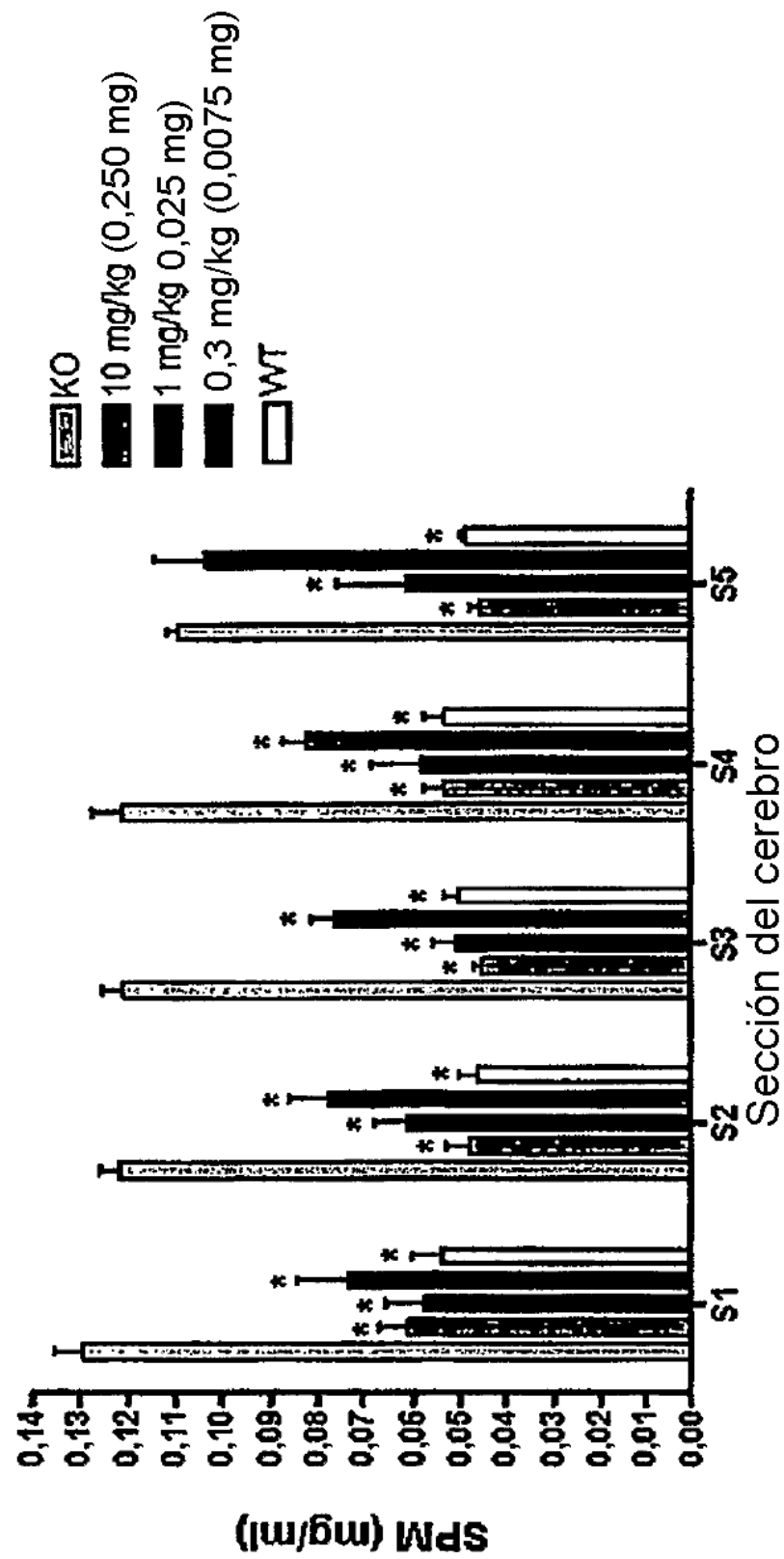


FIG. 5



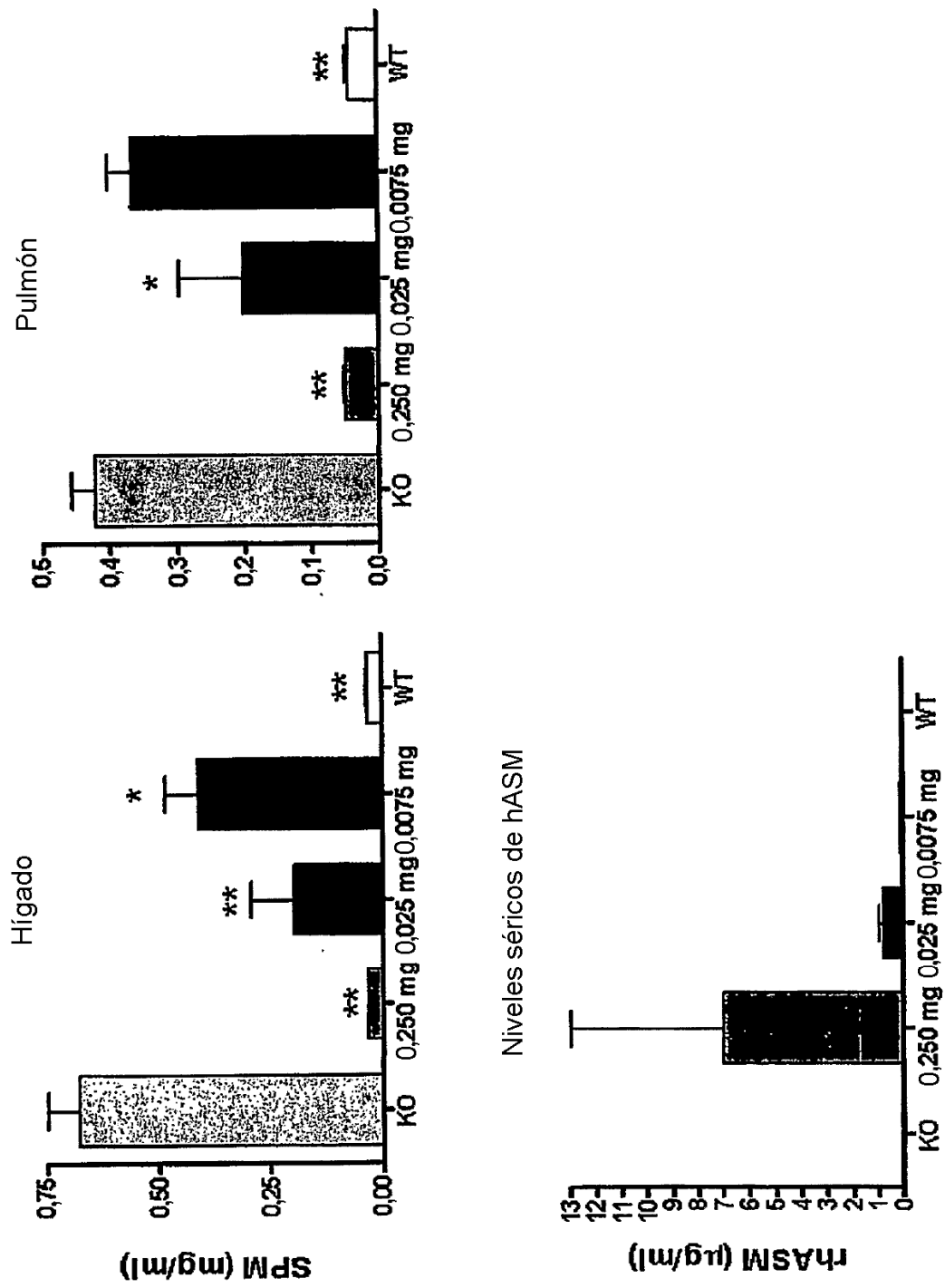


Fig. 6.

FIG. 7. Variantes conocidas

VARIANTE	157	157	1	C -> R	(parece ser menos activa).
VARIANTE	242	242	1	G -> R	(en NPB).
VARIANTE	246	246	1	E -> Q	(en NPA; 30% de actividad residual).
VARIANTE	248	248	1	S -> R	(en NPA).
VARIANTE	302	302	1	L -> P	(en NPA; en 23% de pacientes judíos Asquenazi con NPA).
VARIANTE	319	319	1	H -> Y	(en NPA).
VARIANTE	371	371	1	P -> S	(en NPB).
VARIANTE	382	382	1	M -> I	(en NPA).
VARIANTE	383	383	1	N -> S	(en NPB).
VARIANTE	389	389	1	N -> T	(en NPA).
VARIANTE	391	391	1	W -> G	(en NPB; velocidades bajas de degradación de esfingomielina).
VARIANTE	421	421	1	H -> Y	(en NPB).
VARIANTE	436	436	1	S -> R	(en NPB).
VARIANTE	446	446	1	Y -> C	(en NPA).
VARIANTE	463	463	1	F -> S	(en NPA).
VARIANTE	475	475	1	P -> L	(en NPA).
VARIANTE	496	496	1	R -> L	(en NPA; en 32% de pacientes judíos Asquenazi con NPA).
VARIANTE	537	537	1	Y -> H	(en NPA).
VARIANTE	577	577	1	G -> S	(en NPA).
VARIANTE	608	608	1	Ausente	(en NPB; prevalente entre pacientes con NPB procedentes de la región norteafricana del Magreb).

FIG. 8

