

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 206**

51 Int. Cl.:

A61K 38/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2007** E 13173895 (7)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018** EP 2666476

54 Título: **Distribución enzimática intraventricular para las enfermedades por depósito lisosomal**

30 Prioridad:

20.01.2006 US 760378 P

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

11.06.2019

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 2 716 206 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

Distribución enzimática intraventricular para las enfermedades por depósito lisosomal.

Campo técnico de la invención

5 Esta invención se refiere al área de enfermedades por depósito lisosomal. En particular, se refiere al tratamiento y/o prevención de estas enfermedades mediante terapia de sustitución enzimática.

Compendio de la invención

10 Un grupo de trastornos metabólicos conocidos como enfermedades por depósito lisosomal (EDL) incluye más de cuarenta trastornos genéticos, muchos de los cuales implican defectos genéticos en varias hidrolasas lisosomales. Las enfermedades por depósito lisosomal representativas y las enzimas defectuosas asociadas se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1

Enfermedad por depósito lisosomal

Enzima defectuosa

Aspartilglucosaminuria

Aspartilglucosaminidasa

Fabry

Alfa-galactosidasa A

Enfermedad de Batten infantil * (CNL1)

Palmitoilproteína tioesterasa

Enfermedad de Batten infantil tardía clásica* (CNL2)

Tripeptidil peptidasa

Enfermedad de Batten juvenil* (CNL3)

Proteína transmembrana lisosomal

Batten, otras formas* (CNL4-CNL8)

Productos génicos múltiples

Cistinosis

Transportador de cisteína

Farber

Ceramidasa ácida

Fucosidosis

Alfa-L-fucosidasa ácida

Galactosidosisialidosis

Proteína protectora/catepsina A

Gaucher tipos 1, 2* y 3*

Beta-glucosidasa ácida, o

G.sub.M1 gangliosidosis*

Beta-galactosidasa ácida

Hunter*

Iduronato-2-sulfatasa

Hurler-Scheie*

Alfa-L-iduronidasa

Krabbe*

Galactocerebrosidasa

alfa-Manosidosis*

Alfa-manosidasa ácida

beta-Manosidosis*

Beta-manosidasa ácida

Maroteaux-Lamy

Arilsulfatasa B

Leucodistrofia metacromática*

Arilsulfatasa A

Morquio A

N-acetilgalactosamina-6-sulfato

Morquio B

Beta-galactosidasa ácida

Mucopolidosis II/III*

N-acetilglucosamina-1-

Niemann-Pick A*, B

esfingomielinasa ácida

Niemann-Pick C*

NPC-1

Pompe* ácida	Alfa-glucosidasa
Sandhoff*	Beta-Hexosaminidasa B
Sanfilippo A*	Heparan N-sulfatasa
Sanfilippo B*	Alfa-N-acetilglucosaminidasa
Sanfilippo C*	Acetil-CoA: alfa-glucosaminida
Sanfilippo D*	N-acetilglucosamina-6-sulfato
Enfermedad de Schindler*	Alfa-N-acetilgalactosaminidasa
Schindler-Kanzaki	Alfa-N-acetilgalactosaminidasa
Sialidosis	Alfa-Neuramidasa
Sly*	Beta-glucuronidasa
Tay-Sachs*	Beta-Hexosaminidasa A
Wolman*	Lipasa ácida

*Implicación del SNC

La característica distintiva de EDL es la acumulación anormal de metabolitos en los lisosomas que lleva a la formación de grandes números de lisosomas distendidos en el pericarion. Un reto principal para tratar EDL (al contrario que para tratar una enzimopatía específica de un órgano, p.ej., una enzimopatía específica del hígado) es la necesidad de invertir la patología por depósito lisosomal en múltiples tejidos separados. Algunas EDL pueden tratarse de forma efectiva por infusión intravenosa de la enzima perdida, conocida como terapia de sustitución enzimática (TSE). Por ejemplo, los pacientes de Gaucher tipo 1 tienen solo enfermedad visceral y responden favorablemente a la TSE con glucocerebrosidasa recombinante (CerezymeTM, Genzyme Corp.). Sin embargo, los pacientes con enfermedad metabólica que afecta al SNC (p.ej.; enfermedad de Gaucher tipo 2 o 3) solo responden parcialmente a la TSE intravenosa porque se evita que la enzima de sustitución entre al cerebro por la barrera hematoencefálica (BHE). Además, los intentos por introducir una enzima de sustitución en el cerebro por inyección directa se ha limitado en parte debido a la citotoxicidad enzimática a altas concentraciones locales y se han limitado las velocidades de difusión parenquimal en el cerebro (Partridge, Peptide Drug Deliver to the Brain, Raven Press, 1991).

Una EDL ejemplar es la enfermedad de Niemann-Pick tipo A (NPA). Según la entrada UniProtKB/Swiss-Prot P17405, 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 de la enfermedad. La enfermedad de Niemann-Pick es un trastorno recesivo clínicamente y genéticamente heterogéneo. Está provocada por la acumulación de esfingomielina y otros lípidos metabólicamente relacionados en los lisosomas, dando por resultado la neurodegeneración que empieza desde la vida temprana. Los pacientes pueden mostrar xantomas, pigmentación, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía y retraso mental. La enfermedad de Niemann-Pick se da más frecuentemente entre individuos de ascendencia judía Asquenazí que en la población general. NPA se caracteriza por un comienzo muy temprano en la infancia y un trayectoria rápidamente progresiva que lleva a la muerte en tres años. La enzima esfingomielinasa ácida (EMA) que es defectuosa en NPA convierte la esfingomielina en ceramida. EMA también tiene actividades de fosfolipasa C hacia 1,2-diacilglicerolfosfocolina y 1,2-diacilglicerolfosfoglicerol. La enzima convierte



De acuerdo con la presente descripción, las enfermedades por depósito lisosomal tal como cualquiera de las enfermedades identificadas en la Tabla 1 anterior, p.ej., enfermedad de Niemann-Pick tipo A o B, se tratan y/o previenen usando la distribución intraventricular al cerebro de la enzima que es etiológicamente deficiente en la enfermedad. La administración puede realizarse lentamente para conseguir el máximo efecto. Los efectos se ven en ambos lados de la barrera hematoencefálica, haciendo esto un medio de distribución útil para las enfermedades por depósito lisosomal que afectan al cerebro y/u órganos viscerales. En un primer aspecto, la presente descripción proporciona por consiguiente un método de tratamiento o prevención de una enfermedad por depósito lisosomal en el paciente, cuya enfermedad está provocada por una deficiencia enzimática, comprendiendo el método la administración de la enzima al paciente por medio de distribución intraventricular al cerebro. En un aspecto relacionado, la presente descripción proporciona el uso de una enzima para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad por depósito lisosomal en un paciente, cuya enfermedad está provocada por una deficiencia de la enzima en el paciente, en la que el tratamiento o prevención comprende la

administración intraventricular de la enzima al cerebro. La deficiencia enzimática puede estar provocada por p.ej., un defecto en la expresión de la enzima o por una mutación en la enzima que lleva a un nivel reducido de actividad (p.ej., estando la enzima inactiva) o una velocidad aumentada de aclaramiento/ruptura de la enzima *in vivo*. La deficiencia puede llevar a una acumulación de un sustrato enzimático y la administración de la enzima puede llevar a una reducción en el nivel del sustrato en el cerebro. La enfermedad por depósito lisosomal puede ser cualquiera de las enfermedades identificadas en la Tabla 1 anterior. La enzima puede ser una hidrolasa lisosomal.

Según un ejemplo de la presente descripción, se trata un paciente con enfermedad de Niemann-Pick A o B. Una esfingomielinasa ácida se administra al paciente por medio de distribución intraventricular al cerebro en una cantidad suficiente para reducir los niveles de esfingomielina en dicho cerebro.

Otro aspecto de la presente descripción es un kit para tratar o prevenir una enfermedad por depósito lisosomal en un paciente, cuya enfermedad está provocada por una deficiencia enzimática. El kit comprende la enzima que es deficiente, y un catéter y/o bomba para la distribución de la enzima a uno o más ventrículos en el cerebro. El catéter y/o bomba puede estar específicamente diseñado y/o adaptado para la distribución intraventricular. Según un ejemplo, la presente descripción proporciona un kit para tratar un paciente con enfermedad de Niemann-Pick A o B. El kit comprende una esfingomielinasa ácida y un catéter para la distribución de dicha esfingomielinasa ácida a los ventrículos cerebrales del paciente.

Aún otro aspecto de la presente descripción es un kit para tratar a un paciente con enfermedad de Niemann-Pick A o B. El kit comprende una esfingomielinasa ácida y una bomba para la distribución de dicha esfingomielinasa ácida a los ventrículos cerebrales del paciente.

Según la presente descripción, puede tratarse un paciente que tiene una enfermedad por depósito lisosomal que está provocada por una deficiencia enzimática que lleva a la acumulación del sustrato enzimático. Dichas enfermedades incluyen la enfermedad de Gaucher, enfermedad MPS I y II, enfermedad de Pompe, y enfermedad de Batten (CLN2), entre otras. La enzima defectuosa en la enfermedad particular se administra al paciente por medio de distribución intraventricular al cerebro. Puede administrarse a los ventrículos laterales y/o al cuarto ventrículo. La velocidad de administración de la enzima de acuerdo con la presente descripción es tal que la administración de una única dosis puede ser como un bolo o puede tardar aproximadamente 1-5 minutos, aproximadamente 5-10 minutos, aproximadamente 10-30 minutos, aproximadamente 30-60 minutos, aproximadamente 1-4 horas, o consume más de cuatro, cinco, seis, siete u ocho horas. Los niveles de sustrato en dicho cerebro pueden por lo tanto reducirse. La administración de una única dosis puede llevar más de 1 minuto, más de 2 minutos, más de 5 minutos, más de 10 minutos, más de 20 minutos, más de 30 minutos, más de 1 hora, más de 2 horas o más de 3 horas.

Estos y otros ejemplos de la presente descripción que serán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de la memoria proveen la técnica con métodos y kits para el tratamiento y/o prevención de enfermedades por depósito lisosomal, en particular las que implican tanto patologías del SNC como viscerales.

En base a la presente descripción, la presente invención proporciona una esfingomielinasa ácida para el uso en la prevención o tratamiento de la enfermedad de Niemann-Pick A o B en un paciente, en el que dicha prevención o tratamiento comprende la administración intraventricular de la esfingomielinasa ácida al cerebro del paciente, en el que la administración de una única dosis de la esfingomielinasa ácida consume más de cinco horas.

Aspectos y realizaciones adicionales de la invención se presentan en las reivindicaciones añadidas.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra un diagrama de secciones del cerebro que se analizaron para la esfingomielina. S1 está en la parte delantera del cerebro y S5 está en la parte trasera del cerebro.

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

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

La FIG. 4 muestra la tinción de EMAh en el cerebro después de la infusión intraventricular.

La FIG. 5 muestra que la infusión intraventricular de EMAhr durante un periodo de 6 h reduce los niveles de EM en el cerebro de ratón ASMKO.

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

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

La FIG. 8 muestra una vista de sección transversal del cerebro con los ventrículos indicados.

Las FIGS. 9A y 9B muestran las vistas lateral y superior, respectivamente, de los ventrículos.

La FIG. 10 muestra la inyección en los ventrículos laterales.

Descripción detallada de la invención

5 La práctica de la presente descripción, que incluye la presente invención, empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que está en las características de la técnica. Véase, p.ej., Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2ª edición (1989); *Current protocols in molecular biology* (F.M. Ausubel, et al., eds., (1987)); la serie *Methods in enzymology* (Academic Press, Inc.): PCR 2: A practical approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor eds. (1995)); Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, a laboratory manual*, y *Animal cell culture* (R.I. Freshney, ed. (1987)).

Como se usa en la memoria y las reivindicaciones, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa. Por ejemplo, el término “una célula” incluye una pluralidad de células, que incluyen mezclas de los mismos.

15 Como se usa en la presente memoria, el término “que comprende” pretende indicar que las composiciones y métodos incluyen los elementos enumerados, pero no excluyen otros. “Que consiste esencialmente en” cuando se usa para definir composiciones y métodos, significará que excluyen otros elementos de cualquier importancia esencial a la combinación. Por consiguiente, una composición que consiste esencialmente en los elementos como se define en la presente memoria no excluiría contaminantes traza del método de aislamiento y purificación y vehículos farmacéuticamente aceptables, tal como solución salina tamponada con fosfato, conservantes y similares.

20 “Que consiste en” significará que excluye más que elementos traza de otros ingredientes y que excluye etapas del método esenciales para administrar las composiciones o medicamentos de acuerdo con la presente descripción.

Las realizaciones definidas por cada uno de los términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

25 Todas las designaciones numéricas, p.ej., pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, incluyendo intervalos, son aproximaciones que están variados (+) o (-) por incrementos de 0,1. Se va a entender, aunque no siempre se afirme de manera explícita que todas las designaciones numéricas están precedidas por el término “aproximadamente”. También se va a entender, aunque no siempre se afirma de forma explícita, que los reactivos descritos en la presente memoria son meramente ejemplares y que pueden usarse también equivalentes de aquellos que se conocen en la técnica.

30 Los términos “terapéutico”, “cantidad terapéuticamente efectiva” y sus semejantes se refieren a esa cantidad de una sustancia, p.ej., enzima o proteína, que da por resultado la prevención o retraso del comienzo, o mejora, de uno o más síntomas de una enfermedad en un sujeto, o un logro de un resultado biológico deseado, tal como la corrección de la neuropatología. El término “corrección terapéutica” se refiere al grado de corrección que da por resultado la prevención o retraso del comienzo, o mejora, de uno o más síntomas en un sujeto. La cantidad efectiva puede determinarse por métodos empíricos conocidos.

35 Una “composición” o “medicamento” pretende incluir una combinación de un agente activo, p.ej., una enzima, y un vehículo u otro material, p.ej., un compuesto o composición, que es inerte (por ejemplo, un agente o etiqueta detectable) o activo, tal como un adyuvante, diluyente, aglutinante, estabilizador, tampón, sal, disolvente lipófilo, conservante, adyuvante o similar, o una mezcla de dos o más de estas sustancias. Los vehículos son preferiblemente farmacéuticamente aceptables. Pueden incluir excipientes farmacéuticos y aditivos, proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos y carbohidratos (p.ej., azúcares, que incluyen monosacáridos, di-, tri-, tetra- y oligosacáridos; azúcares derivados tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares; y polisacáridos o polímeros de azúcar), que pueden estar presentes de forma individual o en combinación, que comprenden solos o en combinación 1-99,99% en peso o volumen. Los excipientes de proteína ejemplares incluyen albúmina sérica tal como albúmina sérica humana (ASH), albúmina humana recombinante (AHR), gelatina, caseína y similares. Los componentes de aminoácido/anticuerpo representativos, que pueden funcionar también en una capacidad tamponante, incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartama y similares. Los excipientes de carbohidratos también están previstos en el alcance de la presente descripción, que incluye la presente invención, cuyos ejemplos incluyen aunque no están limitados a monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melejitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, lactitol, xilitol, sorbitol (glucitol) y mioinositol.

55 El término vehículo también incluye un tampón o un agente de ajuste de pH o una composición que contiene al mismo; típicamente, el tampón es una sal preparada a partir de un ácido o base orgánica. Los tampones representativos incluyen sales ácidas orgánicas tales como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico, tampones de Tris, hidrocloreto de trometamina o fosfato. Los vehículos adicionales incluyen excipientes/aditivos poliméricos tales como polivinilpirrolidonas, ficoles (un azúcar polimérico), dextranos (p.ej., ciclodextrinas, tal como 2-hidroxiopropil-

cuadratura-ciclodextrina), polietilenglicoles, agentes aromatizantes, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, tensioactivos (p.ej., polisorbatos tales como “TWEEN 20” y “TWEEN 80”), lípidos (p.ej., fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides (p.ej., colesterol) y agentes quelantes (p.ej., EDTA).

5 Como se usa en la presente memoria, el término “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar, tal como una solución salina tamponada con fosfato, agua y emulsiones, tal como emulsión de aceite/agua o agua/aceite, y varios tipos de agentes humectantes. Las composiciones y medicamentos que se fabrican y/o usan de acuerdo con la presente descripción y que incluyen la enzima particular cuya deficiencia se va a corregir pueden incluir estabilizantes y conservantes y cualquiera de los vehículos anotados anteriormente con la condición adicional de que sean aceptables para el uso *in vivo*. Para ejemplos de vehículos, estabilizantes y
10 adyuvantes, véase Martin Remington’s Pharm. Sci. 15^a Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975) y Williams & Williams (1995), y en el “Physician’s Desk Reference”, 52^a Ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998).

Un “sujeto”, “individuo” o “paciente” se usa de forma intercambiable en la presente memoria, que se refiere a un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un humano. Los mamíferos incluyen, aunque no están limitados a, ratones, ratas, monos, humanos, animales de granja, animales deportivos y mascotas.

15 Como se usa en la presente memoria, el término “modular” significa variar la cantidad o intensidad de un efecto o resultado, p.ej., mejorar, aumentar, disminuir o reducir.

Como se usa en la presente memoria el término “mejorar” es sinónimo de “aliviar” y significa reducir o aligerar. Por ejemplo, uno puede mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno haciéndolo más tolerable.

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

25 Los inventores han descubierto que la distribución intraventricular al cerebro de enzimas de hidrolasa lisosomales a pacientes que son deficientes en las enzimas, lleva a un estado metabólico mejorado tanto del cerebro como de los órganos viscerales afectados (no SNC). Esto es particularmente cierto cuando la velocidad de distribución es lenta, respecto a la distribución de un bolo. Las enfermedades por depósito lisosomal provocadas por una deficiencia en una enzima particular, tal como las enfermedades identificadas en la Tabla 1 anterior, pueden por lo tanto tratarse o
30 prevenirse por la administración intraventricular de la enzima respectiva. Una enzima particularmente útil para tratar Niemann-Pick A o B es esfingomielinasa ácida (EMA), tal como la mostrada en SEQ ID NO:1.¹ Una enzima particularmente útil para tratar la enfermedad de Gaucher es glucocerebrosidasa. Una enzima particularmente útil para tratar la enfermedad MPS I es alfa-L-iduronidasa. Una enzima particularmente útil para tratar la enfermedad MPS II es iduronato-2-sulfatasa. Una enzima particularmente útil para tratar la enfermedad de Pompe, o enfermedad por depósito de glucógeno tipo II (GSDII), también denominada deficiencia de maltasa ácida (AMD), es alfa-glucosidasa ácida. Una enzima particularmente útil para tratar la enfermedad de Batten infantil tardía clásica (CLN2) tripeptidil peptidasa. Las enzimas que se usan y/o administran de acuerdo con la presente descripción pueden ser formas recombinantes de las enzimas que se producen usando métodos que se conocen bien en la técnica. En un
35 ejemplo, la enzima es una enzima humana recombinante.

40 La administración de enzimas lisosomales, y más particularmente enzimas hidrolasa lisosomales, a pacientes que son deficientes en las enzimas pueden realizarse en uno cualquiera o más de los ventrículos cerebrales, que están llenos con fluido cerebroespinal (FCE). El FCE es un fluido claro que llena los ventrículos, está presente en el espacio subaracnoideo, y rodea el cerebro y la médula espinal. El FCE se produce por los plexos coroideos y por medio del supurado o transmisión de fluido tisular mediante el cerebro en los ventrículos. El plexo coroideo es una
45 estructura que recubre el suelo del ventrículo lateral y el techo de los ventrículos tercero y cuarto. Ciertos estudios han indicado que estas estructuras son capaces de producir 400-600 ccs de fluido por día coherente con una cantidad para llenar los espacios del sistema nervioso central cuatro veces al día. En los adultos, el volumen de este fluido se ha calculado que es de 125 a 150 ml (4-5 onzas). El FCE está en formación, circulación y absorción continua. Ciertos estudios han indicado que aproximadamente 430 a 450 ml (casi 2 tazas) de FCE pueden producirse cada día. Ciertos cálculos estiman que la producción iguala aproximadamente 0,35 ml por minuto en
50 adultos y 0,15 por minuto en niños. Los plexos coroideos de los ventrículos laterales producen la mayoría de FCE. Fluye a través de los forámenes de Monro al tercer ventrículo a donde se añade a la producción del tercer ventrículo y continua hacia abajo a través del acueducto de Silvio al cuarto ventrículo. El cuarto ventrículo añade más FCE; el fluido viaja entonces al espacio subaracnoideo a través de los forámenes de Magendie y Luschka. Circula después a lo largo de la base del cerebro, hacia abajo alrededor de la médula espinal y hacia arriba sobre los hemisferios
55 cerebrales. El FCE vacía en la sangre por medio de las vellosidades aracnoideas y los senos vasculares

¹ Los residuos 1-46 constituyen la secuencia señal que se escinde tras la secreción.

intracraneales, distribuyendo así las enzimas que se infunden en los ventrículos no solo al cerebro sino también a los órganos viscerales que se sabe que están afectados en las EDL.

Aunque una secuencia de aminoácidos particulares se muestra en la SEQ ID NO:1, pueden usarse también variantes de esa secuencia que retienen la actividad, p.ej., variantes normales en la población humana. Típicamente estas variantes normales difieren en solo uno o dos residuos a partir de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:1. Las variantes de SEQ ID NO:1 que se van a usar de acuerdo con la presente descripción, incluyendo la presente invención, tanto si se dan de forma natural o no, deberían ser al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticos a la SEQ ID NO:1. Las variantes de otras enzimas pueden usarse de acuerdo con la presente descripción. Sin embargo, independientemente de la enzima que se use, no se usarían variantes que estén asociadas con la enfermedad o actividad reducida. Típicamente la forma madura de la enzima se distribuirá. En el caso de la SEQ ID NO:1, la forma madura comenzará con el residuo 47 como se muestra en la SEQ ID NO:1. Las variantes que están asociadas con la enfermedad se muestran en la FIG. 7. De una manera similar, las variantes normales en la población humana de dichas enzimas de EDL como glucocerebrosidasa, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, alfa-glucosidasa ácida y tripeptidil peptidasa que cuando retienen la actividad enzimática pueden usarse también.

Los kits según la presente descripción son montajes de componentes separados. Aunque pueden envasarse en un único recipiente, pueden sub-ensvasarse de forma separada. Incluso un único envase puede dividirse en compartimientos. Típicamente un juego de instrucciones acompañará al kit y proporcionará instrucciones para la distribución de las enzimas, p.ej., las enzimas de hidrolasa lisosomal, de forma intraventricular. Las instrucciones pueden estar en forma impresa, en forma electrónica, como un vídeo o DVD instructivo, o un disco compacto, en un disquete, en internet con una dirección proporcionada en el envase, o una combinación de estos medios. Otros componentes, tales como diluyentes, tampones, disolventes, cinta, tornillos y herramientas de mantenimiento pueden proporcionarse además de la enzima, una o más cánulas o catéteres, y/o una bomba.

Las poblaciones tratadas por los métodos de la presente descripción incluyen, aunque no están limitadas a, pacientes que tienen, o que están en riesgo de desarrollar, un trastorno neurometabólico, p.ej., una EDL, tal como las enfermedades enumeradas en la Tabla 1, particularmente si dicha enfermedad afecta al SNC y órganos viscerales. En un ejemplo ilustrativo, la enfermedad es enfermedad de Niemann-Pick tipo A.

Una EMA u otra enzima hidrolasa lisosomal puede incorporarse en una composición farmacéutica útil para tratar, p.ej., inhibir, atenuar, prevenir o mejorar, una condición caracterizada por un nivel insuficiente de una actividad hidrolasa lisosomal. La composición farmacéutica se administrará a un sujeto que sufre una deficiencia de hidrolasa lisosomal o alguien que está en riesgo de desarrollar dicha deficiencia. Las composiciones contendrían una cantidad terapéutica o profiláctica de la EMA u otra enzima hidrolasa lisosomal, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible, no tóxica, adecuada para distribuir los polipéptidos al paciente. Puede usarse agua estéril, alcohol, grasas y ceras como el vehículo. Los adyuvantes, agentes tamponantes, agentes de dispersión y similares, farmacéuticamente aceptables, pueden incorporarse también a las composiciones farmacéuticas. El vehículo puede combinarse con la EMA u otra enzima hidrolasa lisosomal en cualquier forma adecuada para la administración por inyección o infusión intraventricular (cuya forma es también posiblemente adecuada para la administración intravenosa o intratecal) o de otra forma. Los vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS), otras soluciones salinas, disoluciones de dextrosa, disoluciones de glicerol, emulsiones de agua y aceites tal como las hechas con aceites de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético (aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral o aceite de sésamo). Un FCE artificial puede usarse como un vehículo. El vehículo será preferiblemente estéril y libre de pirógenos. La concentración de la EMA u otra enzima hidrolasa lisosomal en la composición farmacéutica puede variar ampliamente, es decir, de al menos aproximadamente 0,01% en peso, a 0,1% en peso, a aproximadamente 1% en peso, a como mucho 20% en peso o más de la composición total.

Para la administración intraventricular de EMA u otra enzima hidrolasa lisosomal, la composición debe ser estéril y debería ser fluida. Debería ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tal como bacterias y hongos. La prevención de la acción de microorganismos puede alcanzarse por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tal como manitol o sorbitol, o cloruro sódico en la composición.

La dosificación de EMA u otra enzima hidrolasa lisosomal puede variar algo de individuo a individuo, dependiendo de la enzima particular y su actividad *in vivo* específica, la ruta de administración, la condición médica, edad, peso o sexo del paciente, las sensibilidades del paciente a la EMA u otra enzima hidrolasa lisosomal o componentes del vehículo, y otros factores que el médico será capaz de tener en cuenta fácilmente. Aunque las dosificaciones pueden variar dependiendo de la enfermedad y el paciente, la enzima se administra generalmente al paciente en cantidades de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 miligramos por 50 kg de paciente por mes. En un ejemplo, la enzima se administra al paciente en cantidades de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 miligramos por 50 kg de paciente por mes. En otros ejemplos, la enzima se administra al paciente en cantidades de aproximadamente 5 a aproximadamente 300 miligramos por 50 kg de paciente por mes, o aproximadamente 10 a aproximadamente 200 miligramos por 50 kg de paciente por mes.

La velocidad de administración es tal que la administración de una única dosis puede administrarse como un bolo. Una única dosis puede infundirse también durante aproximadamente 1-5 minutos, aproximadamente 5-10 minutos, aproximadamente 10-30 minutos, aproximadamente 30-60 minutos, aproximadamente 1-4 horas, o consume más de cuatro, cinco, seis, siete u ocho horas. Puede tomarse más de 1 minuto, más de 2 minutos, más de 5 minutos, más de 10 minutos, más de 20 minutos, más de 30 minutos, más de 1 hora, más de 2 horas o más de 3 horas. Los solicitantes han observado que, aunque la administración intraventricular en bolo puede ser efectiva, la infusión lenta es muy efectiva. Aunque los solicitantes no desean estar atados por cualquier teoría particular de operación, se cree que la infusión lenta es más efectiva debido a una renovación del fluido cerebroespinal (FCE). Aunque las estimaciones y cálculos en la bibliografía varían, se cree que el fluido cerebroespinal se renueva en aproximadamente 4, 5, 6, 7 u 8 horas en humanos. En un ejemplo, el tiempo de infusión lenta debería medirse de manera que es aproximadamente igual a o mayor que el tiempo de renovación del FCE. El tiempo de renovación puede depender de la especie, tamaño y edad del sujeto pero puede determinarse usando métodos conocidos en la técnica. La infusión también puede ser continua durante un periodo de uno o más días. El paciente puede tratarse una, dos o tres o más veces al mes, p.ej., semanalmente, p.ej. cada dos semanas. Las infusiones pueden repetirse durante el curso de la vida de un sujeto como se dicta por la re-acumulación del sustrato de la enfermedad en el cerebro u órganos viscerales. La re-acumulación puede determinarse por cualquiera de las técnicas que se conocen bien en la técnica para la identificación y cuantificación del sustrato relevante, cuyas técnicas pueden realizarse en una o más muestras tomadas del cerebro y/o de uno o más de los órganos viscerales. Dichas técnicas incluyen ensayos enzimáticos y/o inmunoensayos, p.ej., radioinmunoensayos o ELISA.

El FCE vacía en la sangre por medio de las vellosidades aracnoideas y senos vasculares intracraneales, distribuyendo así las enzimas infundidas a los órganos viscerales que se sabe que están afectados en las EDL. Los órganos viscerales que están afectados normalmente en la enfermedad de Niemann-Pick son los pulmones, bazo, riñón e hígado. La infusión intraventricular lenta proporciona cantidades disminuidas del sustrato para una enzima administrada en al menos el cerebro y potencialmente en los órganos viscerales. La reducción en el sustrato acumulado en el cerebro, pulmones, bazo, riñón y/o hígado puede ser dramática. Las reducciones de más de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% pueden alcanzarse. La reducción alcanzada no es necesariamente uniforme de paciente a paciente o incluso de órgano a órgano en un único paciente. Las reducciones pueden determinarse mediante cualquiera de las técnicas que se conocen bien en la técnica, p.ej., mediante ensayos enzimáticos y/o técnicas de inmunoensayo, como se trata en otro sitio de la presente memoria.

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

En un ejemplo ilustrativo, la administración se consigue por infusión de la enzima de la EDL en uno o ambos de los ventrículos laterales de un sujeto o paciente. Mediante la infusión en los ventrículos laterales, la enzima se distribuye al sitio en el cerebro en que se produce la mayor cantidad de FCE. La enzima puede infundirse también en más de un ventrículo del cerebro. El tratamiento puede consistir en una única infusión por sitio diana, o puede repetirse. Pueden usarse múltiples sitios de infusión/inyección. Por ejemplo, los ventrículos en que la enzima se administra pueden incluir los ventrículos laterales y el cuarto ventrículo. En algunos ejemplos, además del primer sitio de administración, una composición que contiene la enzima de EDL se administra a otro sitio que puede ser contralateral o ipsilateral al primer sitio de administración. Las inyecciones/infusiones pueden ser únicas o múltiples, unilaterales o bilaterales.

La distribución de la disolución u otra composición que contiene la enzima específicamente a una región particular del sistema nervioso central, tal como a un ventrículo particular, p.ej., a los ventrículos laterales o al cuarto ventrículo del cerebro, puede administrarse por microinyección estereotáxica. Por ejemplo, en el día de la cirugía, los pacientes tendrán la base del marco estereotáxico fija en el sitio (atornillada en el cráneo). El cerebro con la base marco estereotáxico (compatible con la IRM con marcas fiduciarias) se captará en imágenes usando IRM de alta resolución. Las imágenes de IRM se transferirán después a un ordenador que ejecuta un programa estereotáxico. Una serie de imágenes coronales, sagitales y axiales se usarán para determinar el sitio diana de la inyección y trayectoria vectorial. El programa traduce directamente la trayectoria en coordenadas tridimensionales apropiadas para el marco estereotáxico. Se taladran agujeros de trépano por encima del sitio de entrada y el aparato estereotáxico localizó con la aguja implantada a la profundidad dada. La disolución enzimática en un vehículo farmacéuticamente aceptable se inyectará entonces. Pueden usarse rutas adicionales de administración, p.ej. aplicación cortical superficial bajo la visualización directa u otra aplicación no estereotáxica.

Una forma de distribuir una infusión lenta es usar una bomba. Dichas bombas están comercialmente disponibles, por ejemplo, de Alzet (Cupertino, CA) o Medtronic (Minneapolis, MN). La bomba puede ser implantable. Otra forma

conveniente para administrar las enzimas es usar una cánula o un catéter. La cánula o catéter puede usarse para administraciones múltiples separadas en el tiempo. Las cánulas y catéteres pueden implantarse estereotáxicamente. Se contempla que se usarán administraciones múltiples para tratar al paciente típico con una enfermedad por depósito lisosomal. Los catéteres y bombas pueden usarse de forma separada o en combinación.

- 5 Las enfermedades con depósito lisosomal (EDL) incluyen más de cuarenta trastornos genéticos, muchos de los cuales implican defectos genéticos en varias hidrolasas lisosomales. Las enfermedades por depósito lisosomal representativas y las enzimas defectuosas asociadas se enumeran en la Tabla 1.

La enfermedad de Gaucher resulta como una consecuencia de una deficiencia hereditaria de la glucocerebrosidasa (GC) hidrolasa lisosomal, que lleva a la acumulación de su sustrato, glucosilceramida (GL-1), en los lisosomas de histiocitos. La acumulación progresiva de GL-1 en macrófagos tisulares (células de Gaucher) se da en varios tejidos. La extensión de la acumulación es dependiente en parte del genotipo. Clínicamente, se reconocen tres fenotipos diferentes de Gaucher, el tipo 1 no neuropático, que es el más común con el comienzo que oscila desde la niñez temprana a la madurez, y los tipos 2 y 3 neuropáticos, que se presentan en la infancia y niñez temprana, respectivamente. Cualquiera de estos fenotipos puede tratarse de acuerdo con la presente descripción. Las manifestaciones clínicas primarias comunes a todas las formas de la enfermedad de Gaucher son hepatoesplenomegalia, citopenia, fracturas óseas patológicas y, ocasionalmente, fallo pulmonar. Una discusión detallada de la enfermedad de Gaucher puede encontrarse en la Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases, Parte 16, capítulo 146 y 146.1 (2007). En los pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 2 y tipo 3 en que hay implicación del sistema nervioso central significativo, la distribución intraventricular de la enzima de EDL defectuosa lleva al estado metabólico mejorado del cerebro y potencialmente de los órganos viscerales afectados (no de SNC). La distribución intraventricular de la enzima de EDL defectuosa en sujetos con enfermedad de Gaucher tipo 1 lleva al estado metabólico mejorado de órganos viscerales afectados (no de SNC). Hay modelos animales de la enfermedad de Gaucher, que han derivado de modelos de ratón creados mediante la interrupción dirigida del correspondiente gen de ratón. Por ejemplo, existe un modelo de ratón de Gaucher que alberga la mutación D409V en la posición GC de ratón (Xu, Y-H et al. (2003). *Am. J. Pathol.* 163:2093-2101). El ratón heterocigoto, *gbaD409V/nulo*, muestra ~5% de actividad GC normal en tejidos viscerales y desarrolla macrófagos hinchados con lípidos (células de Gaucher) en el hígado, bazo, pulmón y médula ósea a los 4 meses de edad. Este modelo es un sistema adecuado en que evaluar los beneficios de y determinar las condiciones para la distribución intraventricular de la enzima de EDL defectuosa en sujetos con la enfermedad de Gaucher.

La enfermedad de Niemann-Pick (ENP) es una enfermedad por depósito lisosomal y es un trastorno neurometabólico hereditario caracterizado por una deficiencia genética en la esfingomielinasa ácida (EMA; esfingomielina colinafosfohidrolasa, EC 3.1.3.12). La falta de proteína de EMA funcional da por resultado la acumulación de sustrato de esfingomielina en los lisosomas de las neuronas y la glía a través del cerebro. Esto lleva a la formación de grandes números de lisosomas distendidos en el pericarion, que son una característica distintiva y el fenotipo celular primario de ENP tipo A. La presencia de lisosomas distendidos correlaciona con la pérdida de función celular normal y un curso neurodegenerativo progresivo que lleva 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, págs. 3589-3610). Los fenotipos celulares secundarios (p.ej., anormalidades metabólicas adicionales) también están asociados con esta enfermedad, especialmente el alto nivel de acumulación de colesterol en el compartimento lisosomal. La esfingomielina tiene fuerte afinidad por el colesterol, que da por resultado el secuestro de grandes cantidades de colesterol en los lisosomas de ratones ASMKO y 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). Una discusión detallada de la enfermedad de ENP puede encontrarse en el Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases, Parte 16, Capítulo 144 (2007). Hay modelos animales de ENP. Por ejemplo, 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 distribución intraventricular de la enzima de EDL defectuosa lleva al estado metabólico mejorado del cerebro y los órganos viscerales afectados (no SNC).

Las mucopolisacaridosis (MPS) son un grupo de trastornos por depósito lisosomal provocadas por deficiencias de enzimas que catalizan la degradación de glucosaminoglucanos (mucopolisacáridos). Hay 11 deficiencias enzimáticas conocidas que dan lugar a 7 MPS distintas, que incluyen MPS I (síndromes de Hurler, Scheie y Hurler-Scheie) y MPS II (síndrome de Hunter). Cualquier MPS puede tratarse de acuerdo con la presente descripción. Una discusión detallada de MPS pueden encontrarse en el Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases, parte 16, capítulo 136 (2007). Hay numerosos modelos animales de MPS, que han derivado de mutaciones que se dan de forma natural en perros, gatos, ratas, ratones y cabras, además los modelos de ratón creados por interrupción dirigida del gen de ratón correspondiente. Las características bioquímicas y metabólicas de estos modelos animales son generalmente bastante similares a los encontrados en humanos; sin embargo, las presentaciones clínicas pueden ser más suaves. Por ejemplo, los modelos aceptados para MPS I incluyen un modelo murino [Clark, LA et al., *Hum. Mol. Genet.* (1997), 6:503] y un modelo canino [Menon, KP et al., *Genomics* (1992), 14:763]. Por ejemplo, los modelos aceptados para MPS II incluyen un modelo de ratón [Muenzer, J. et al., (2002), *Acta Paediatr. Suppl.*; 91(439):98-9]. En las MPS que tienen implicación del sistema nervioso central, tal como se encuentra en pacientes con MPS I y MPS II, la distribución intraventricular de la enzima de EDL defectuosa lleva al estado metabólico mejorado del cerebro y potencialmente los órganos viscerales afectados (no SNC).

La enfermedad de Pompe, o enfermedad por depósito de glucógeno tipo II (EDGII), también denominada deficiencia de maltasa ácida (DMA) es un trastorno hereditario del metabolismo de glucógeno que resulta de defectos en la actividad de la hidrolasa lisosomal alfa-glucosidasa ácida en todos los tejidos de individuos afectados. La deficiencia enzimática da por resultado la acumulación intralisosomal de glucógeno de estructura normal en numerosos tejidos. La acumulación está más marcada en el músculo cardíaco y esquelético y en tejidos hepáticos de niños con el trastorno generalizado. En la EDGII de comienzo tardío, la acumulación intralisosomal de glucógeno está virtualmente limitada al músculo esquelético y es de menor magnitud. Las anomalías electromiográficas que sugieren el diagnóstico incluyen descargas pseudomiótónicas e irritabilidad, aunque en pacientes de comienzo juvenil y adulto, las anomalías pueden variar en diferentes músculos. Los barridos TAC pueden revelar el (los) sitio(s) de músculos afectados. La mayoría de pacientes tienen elevados niveles en plasma sanguíneo de creatina quinasa (CK) y pueden encontrarse elevaciones en enzimas hepáticas, particularmente en pacientes de comienzo en adultos. Hay varios modelos animales que se dan de forma natural de la enfermedad de comienzo infantil y tardío. Hay un modelo de ratón con gen desactivado [Bijvoet AG et al., *Hum. Mol. Genet.* (1998); 7:53-62]. Los efectos mejoradores de terapia enzimática se han descrito en ratones con gen desactivado [Raben, N et al., *Mol. Genet. Metab.* (2003); 80:159-69] y en un modelo de codorniz. La distribución intraventricular de la enzima de EDL defectuosa lleva al estado metabólico mejorado del cerebro y potencialmente los órganos viscerales afectados (no SNC).

Las lipofuscinosis neuronales ceroides (LNC) son un grupo de trastornos neurodegenerativos distinguidos de otras enfermedades neurodegenerativas por la acumulación de material autofluorescente ("pigmento de envejecimiento") en el cerebro y otros tejidos. Las características clínicas principales incluyen, crisis epilépticas, deterioro psicomotor, ceguera y muerte prematura. Se han reconocido distintos subgrupos de LNC que difieren en la edad de comienzo de los síntomas y la aparición del material de depósito por microscopía electrónica. Tres grupos principales - infantil (LNCI), infantil tardía clásica (LNCIT) y juvenil (LNCJ, también denominada como enfermedad de Batten) - están provocados por mutaciones recesivas autosómicas en los genes CLN1, CLN2 y CLN3, respectivamente. Los productos de proteína de los genes CLN1 (palmitoil-proteína tioesterasa) y CLN2 (tripeptidil peptidasa o pepinasa) son enzimas lisosomales solubles, mientras que la proteína CLN3 (battenina) es una proteína de membrana lisosomal, como es (provisionalmente) la proteína CLN5. La identificación de mutaciones en genes que codifican proteínas lisosomales en varias formas de LNC ha llevado al reconocimiento de las lipofuscinosis como trastornos por depósito lisosomal reales. Cualquier subgrupo de LNC puede tratarse de acuerdo con la presente descripción. Una discusión detallada de la enfermedad de LNC puede encontrarse en la *Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*, parte 16, capítulo 154 (2007). Los trastornos de LNC que se dan de forma natural se han descrito en los modelos de oveja, perro y ratón se han derivado por interrupción dirigida de un gen de ratón correspondiente [véase p.ej., Katz, ML et al., *J. Neurosci. Res.* (1999); 57:551-6; Cho, SK et al., *Glycobiology* (2005); 15:637-48]. La distribución intraventricular de la enzima de EDL defectuosa lleva al estado metabólico mejorado del cerebro y posiblemente los órganos viscerales afectados (no SNC).

Una discusión detallada de trastornos por depósito lisosomal adicionales descritos en la Tabla 1, en que la distribución intraventricular de la enzima de EDL defectuosa en la enfermedad, puede encontrarse en la *Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*, parte 16 (2007).

Se proporciona anteriormente una descripción general de la presente descripción.

Un entendimiento más completo puede obtenerse por referencia a los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en la presente memoria para propósitos de ilustración solo, y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Modelo 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 (ENP) se clasifica como una enfermedad por depósito lisosomal y es un trastorno neurometabólico hereditario caracterizado por una deficiencia genética en la esfingomielinasa ácida (EMA; esfingomielina colinafosfohidrolasa, EC 3.1.3.12). La falta de proteína de EMA funcional da por resultado la acumulación de sustrato de esfingomielina en los lisosomas de las neuronas y la glía a través del cerebro. Esto lleva a la formación de grandes números de lisosomas distendidos en el pericarion, que son una característica distintiva y el fenotipo celular primario de la ENP tipo A. La presencia de lisosomas distendidos correlacionan con la pérdida de función celular normal y un curso neurodegenerativo progresivo que lleva 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, págs. 3589-3610). Los fenotipos celulares secundarios (p.ej., anomalías metabólicas adicionales) están también asociados con esta enfermedad, especialmente el alto nivel de acumulación de colesterol en el compartimiento lisosomal. La esfingomielina tiene fuerte afinidad por el colesterol, que da por resultado el secuestro de grandes cantidades de colesterol en los lisosomas de ratones ASMKO y 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 continua de EMAhr en el ratón ASMKO".

Objetivo: determinar qué efecto tiene la infusión intraventricular de EMA humana recombinante (EMAhr) en la patología por depósito (es decir, depósito de esfingomielina y colesterol) en el cerebro de ratón ASMKO.

- 5 Métodos: se implantó estereotáxicamente a los ratones ASMKO una cánula guía interna entre las semanas 12 y 13 de edad. A las 14 semanas de edad, se infundió a los ratones con ,250 mg de EMAh (n=5) durante un periodo de 24 h (~,01 mg/h) durante cuatro días consecutivos (se administró 1 mg total) usando una sonda de infusión (se ajusta dentro de la cánula guía) que está conectada a una bomba. Se disolvió EMAh liofilizada en fluido cerebroespinal artificial (FCEa) antes de la infusión. Los ratones se sacrificaron 3 días después de la infusión. Para el sacrificio, se aplicó una sobredosis a los ratones con eutasol (>150 mg/kg) y después se perfundió con PBS o parformaldehído al 4%. Se quitaron el cerebro, hígado, pulmón y bazo y se analizaron para los niveles de esfingomielina (EM). El tejido cerebral se dividió en 5 secciones antes del análisis de EM (S1 = parte delantera del cerebro, S5 = parte trasera del cerebro; véase Fig. 1).

Tabla 2

Grupo	Tratamiento	n
ASMKO	,250 mg/24 h (1 mg total)	5
ASMKO	Ninguno	4
TS	ninguno	4

- 15 Resumen de resultados: la infusión intraventricular de EMAh a ,250 mg/24 h durante 4 días continuos (1 mg total) dio por resultado la tinción de EMAh y aclaramiento de filipin (es decir, depósito de colesterol) a través del cerebro ASMKO. El análisis bioquímico mostró que la infusión intraventricular de EMAh también llevó a una reducción global en los niveles de EM a través del cerebro. Los niveles de EM se redujeron a los niveles del tipo salvaje (TS). Una reducción significativa en EM se observó también en el hígado y el bazo (una tendencia hacia abajo se vio en el pulmón).

Ejemplo 3

"Distribución intraventricular de EMAh en ratones ASMKO II"

Objetivo: determinar la menor dosis eficaz durante un periodo de infusión de 6 h.

- 25 Métodos: se implantó estereotáxicamente a los ratones ASMKO con una cánula guía interna entre las semanas 12 y 13 de edad. A las 14 semanas de edad, se infundió a los ratones durante un periodo de 6 horas a una de las siguientes dosis de EMAh: 10 mg/kg (,250 mg; n=12), 3 mg/kg (,075 mg; n=7), 1 mg/kg (,025 mg; n=7), ,3 mg/kg (,0075 mg; n=7) o FCEa (fluido cerebroespinal artificial; n=7). Se perfundió a dos ratones de cada nivel de dosis con parformaldehído al 4% inmediatamente después de la infusión de 6 h para evaluar la distribución enzimática en el cerebro (la sangre se recogió entonces a partir de estos para determinar los niveles de EMAh en suero). Los ratones restantes de cada grupo se sacrificaron 1 semana después de la infusión. El tejido cerebral, hepático y pulmonar de estos ratones se analizó para los niveles de EM 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 (,3 mg/kg)	7
ASMKO	FCEa	7
TS	Ninguno	7

Resumen de resultados: la EMAh intraventricular durante un periodo de 6 h llevó a una reducción significativa en los niveles de EM a través del cerebro a pesar de la dosis. Los niveles de EM cerebral en ratones tratados con dosis >,025 mg se redujeron a los niveles de TS. Los niveles de EM de los órganos viscerales se redujeron también significativamente (pero no a niveles de TS) de una manera dependiente de la dosis. En soporte de este descubrimiento la proteína de EMAh se detectó también en el suero de ratones ASMKO infundidos con proteína EMAh. El análisis histológico mostró que la proteína EMAh se distribuyó ampliamente a través del cerebro (de S1 a S5) después de la administración intraventricular de EMAh.

Ejemplo 4

“Infusión intraventricular de EMAhr en ratones ASMKO III”

Objetivo: determinar (1) el tiempo que lleva a la EM acumularse de nuevo en el cerebro (y médula espinal) después de 6 h de infusión de EMAh (dosis = ,025 mg); (2) si hay diferencias por sexo en respuesta a la administración de EMAh intraventricular (experimentos previos demuestran que hay diferencias por sexo en la acumulación de sustrato en el hígado, si esto ocurre o no en el cerebro es desconocido).

Métodos: se implantó estereotáxicamente a los ratones ASMKO con una cánula guía interna entre las semanas 12 y 13 de edad. A las 14 semanas de edad se infundió a los ratones durante un periodo de 6 h con ,025 mg de EMAh. Después de la distribución intraventricular de EMAh los ratones se sacrificaron o bien a la 1 semana después de la infusión (n = 7 machos, 7 hembras), o a las 2 semanas después de la infusión (n = 7 machos, 7 hembras) o a las 3 semanas después de la infusión (n = 7 machos, 7 hembras). En el sacrificio se quitaron el cerebro, médula espinal, hígado y pulmón para el análisis de EM.

Tabla 4

Grupo	Tratamiento	N	Sacrificio
macho ASMKO	,025 mg	7	1 semana después de la infusión
Hembra ASMKO	,025 mg	7	1 semana después de la infusión
Macho ASMKO	,025 mg	7	2 semanas después de la infusión
Hembra ASMKO	,025 mg	7	2 semanas después de la infusión
Macho ASMKO	,025 mg	7	3 semanas después de la infusión
Hembra ASMKO	,025 mg	7	3 semanas después de la infusión
Macho ASMKO	FCEa	7	1 semana después de la infusión
Hembra ASMKO	FCEa	7	1 semana después de la infusión
Macho TS	Ninguno	7	1 semana después de la infusión
Hembra TS	Ninguno	7	1 semana después de la infusión

Las muestras tisulares se preparan para el análisis de EM.

Ejemplo 5

“Efecto de la infusión intraventricular de EMAhr en la función cognitiva en los ratones ASMKO”

Objetivo: determinar si la infusión intraventricular de EMAhr alivia los déficits cognitivos inducidos enfermos en ratones ASMKO.

Métodos: se implanta estereotáxicamente a los ratones ASMKO con una cánula guía interna entre las semanas 9 y 10 de edad. A las 13 semanas de edad, se infunde a los ratones durante un periodo de 6 h con ,025 mg de EMAh. A las 14 y 16 semanas de edad, los ratones experimentan pruebas cognitivas usando el laberinto de Barnes.

Ejemplo 6

“La distribución de proteína EMAh en el SNC de ASMKO después de la infusión intraventricular”

Objetivo: determinar la distribución de proteína EMAh (como función del tiempo) en el cerebro y la médula espinal de los ratones ASMKO después de la infusión intraventricular.

Métodos: se implanta estereotáxicamente a los ratones ASMKO con una cánula guía interna entre las semanas 12 y 13 de edad. A las 14 semanas de edad, se infunde a los ratones durante un periodo de 6 h con ,025 mg de EMAh. Después del procedimiento de infusión, los ratones se sacrifican o inmediatamente o 1 semana o 2 semanas o 3 semanas después.

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

TIEMPO DE INFUSIÓN											
Enzima para la infusión	Bolo	1-5 min	5 - 10 min	10 - 30 min	30 - 60 min	1-4 h	Más de 4 h	Más de 5 h	Más de 6 h	Más de 7 h	Más de 8 h
Aspartilglucosaminidasa alfa-galactosidasa-A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Palmitoil proteína tioesterasa	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Tripeptidil peptidasa	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Proteína transmembrana lisosomal	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Transportador de cisteína	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ceremidasa ácida	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Alfa-L-fucosidasa ácida	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Proteína protectora/catepsina A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Beta-glucosidasa ácida o beta-galactosidasa ácida	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Iduronato-2-sulfatasa	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Alfa-L-iduronidasa	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Galactocerebrosidasa	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Alfa-manosidasa ácida	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Beta-manosidasa ácida	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Arilsulfatasa B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Arilsulfatasa A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
N-acetilgalactosamina-6-sulfato	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Beta-galactosidasa ácida	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
N-acetilglucosamina-1-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Esfingomielinasa ácida	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Referencias

- 10 1) Belichenko PV, Dickson PI, Passage M, Jungles S, Mobley WC, Kakkis ED. Penetration, diffusion, and uptake of recombinant human alpha-l-iduronidase after intraventricular injection into the rat brain. *Mol Genet Metab.* 2005; 86(1-2):141-9.
- 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.

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*. Abril 2005; 57(4):542-8.

5

Listado de secuencias

<110> Dodge, James

Passini, Marco

Shihabuddin, Lamy

10 Cheng, Seng

<120> Distribución enzimática intraventricular para enfermedades por depósito lisosomal

<130> 003482.00036

<160> 1

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

15 <210> 1

<211> 629

<212> PRT

< 213> Homo sapiens

```

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

```

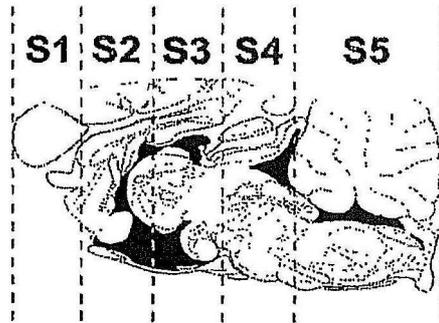
ES 2 716 206 T3

Val Tyr Trp Thr Gly Asp Ile Pro Ala His Asp Val Trp His Gln Thr
 275 280 285
 Arg Gln Asp Gln Leu Arg Ala Leu Thr Thr Val Thr Ala Leu Val Arg
 290 295 300
 Lys Phe Leu Gly Pro Val Pro Val Tyr Pro Ala Val Gly Asn His Glu
 305 310 315 320
 Ser Thr Pro Val Asn Ser Phe Pro Pro Phe Ile Glu Gly Asn His
 325 330 335
 Ser Ser Arg Trp Leu Tyr Glu Ala Met Ala Lys Ala Trp Glu Pro Trp
 340 345 350
 Leu Pro Ala Glu Ala Leu Arg Thr Leu Arg Ile Gly Gly Phe Tyr Ala
 355 360 365
 Leu Ser Pro Tyr Pro Gly Leu Arg Leu Ile Ser Leu Asn Met Asn Phe
 370 375 380
 Cys Ser Arg Glu Asn Phe Trp Leu Leu Ile Asn Ser Thr Asp Pro Ala
 385 390 395 400
 Gly Gln Leu Gln Trp Leu Val Gly Glu Leu Gln Ala Ala Glu Asp Arg
 405 410 415
 Gly Asp Lys Val His Ile Ile Gly His Ile Pro Pro Gly His Cys Leu
 420 425 430
 Lys Ser Trp Ser Trp Asn Tyr Tyr Arg Ile Val Ala Arg Tyr Glu Asn
 435 440 445
 Thr Leu Ala Ala Gln Phe Phe Gly His Thr His Val Asp Glu Phe Glu
 450 455 460
 Val Phe Tyr Asp Glu Glu Thr Leu Ser Arg Pro Leu Ala Val Ala Phe
 465 470 475 480
 Leu Ala Pro Ser Ala Thr Thr Tyr Ile Gly Leu Asn Pro Gly Tyr Arg
 485 490 495
 Val Tyr Gln Ile Asp Gly Asn Tyr Ser Arg Ser Ser His Val Val Leu
 500 505 510
 Asp His Glu Thr Tyr Ile Leu Asn Leu Thr Gln Ala Asn Ile Pro Gly
 515 520 525
 Ala Ile Pro His Trp Gln Leu Leu Tyr Arg Ala Arg Glu Thr Tyr Gly
 530 535 540
 Leu Pro Asn Thr Leu Pro Thr Ala Trp His Asn Leu Val Tyr Arg Met
 545 550 555 560
 Arg Gly Asp Met Gln Leu Phe Gln Thr Phe Trp Phe Leu Tyr His Lys
 565 570 575
 Gly His Pro Pro Ser Glu Pro Cys Gly Thr Pro Cys Arg Leu Ala Thr
 580 585 590
 Leu Cys Ala Gln Leu Ser Ala Arg Ala Asp Ser Pro Ala Leu Cys Arg
 595 600 605
 His Leu Met Pro Asp Gly Ser Leu Pro Glu Ala Gln Ser Leu Trp Pro
 610 615 620
 Arg Pro Leu Phe Cys
 625

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una esfingomielinasa ácida para usar en la prevención o tratamiento de la enfermedad de Niemann-Pick A o B en un paciente, en la que dicha prevención o tratamiento comprende la administración intraventricular de la esfingomielinasa ácida al cerebro del paciente, en el que la administración de una dosis única de la esfingomielinasa ácida consume más de cinco horas.
2. La esfingomielinasa ácida para usar según la reivindicación 1, en la que dicha prevención o tratamiento comprende la administración de la esfingomielinasa ácida a los ventrículos laterales y/o al cuarto ventrículo del cerebro.
- 10 3. La esfingomielinasa ácida para usar según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que dicha prevención o tratamiento comprende determinar la re-acumulación de esfingomielina en el cerebro y/o en uno o más órganos viscerales.
4. La esfingomielinasa ácida para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la esfingomielinasa ácida se va a administrar usando una bomba y/o un catéter.
- 15 5. La esfingomielinasa ácida para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la administración comprende una pluralidad de infusiones de esfingomielinasa ácida.

Fig. 1



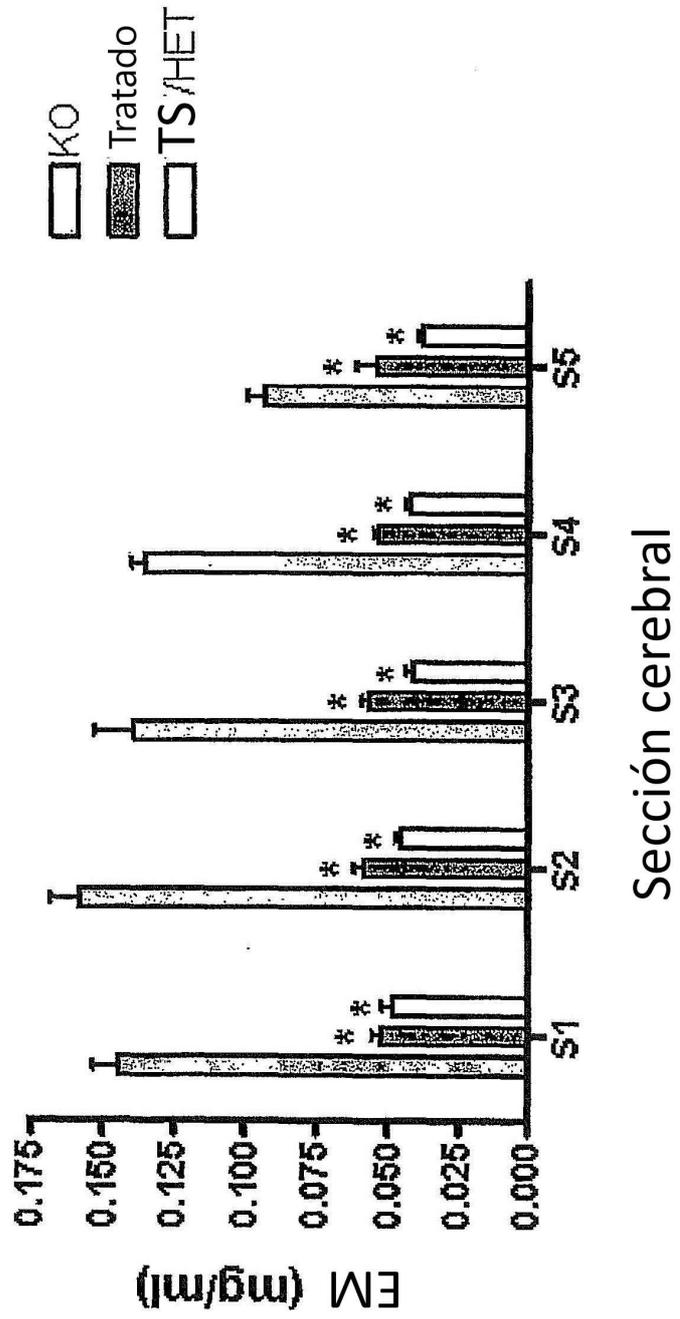
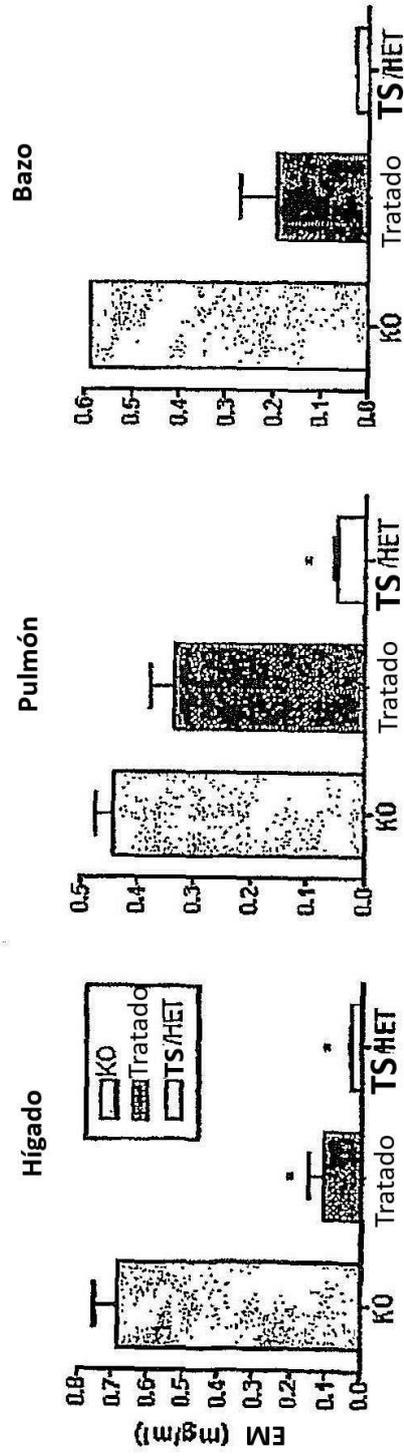


FIG. 2.

FIG. 3.



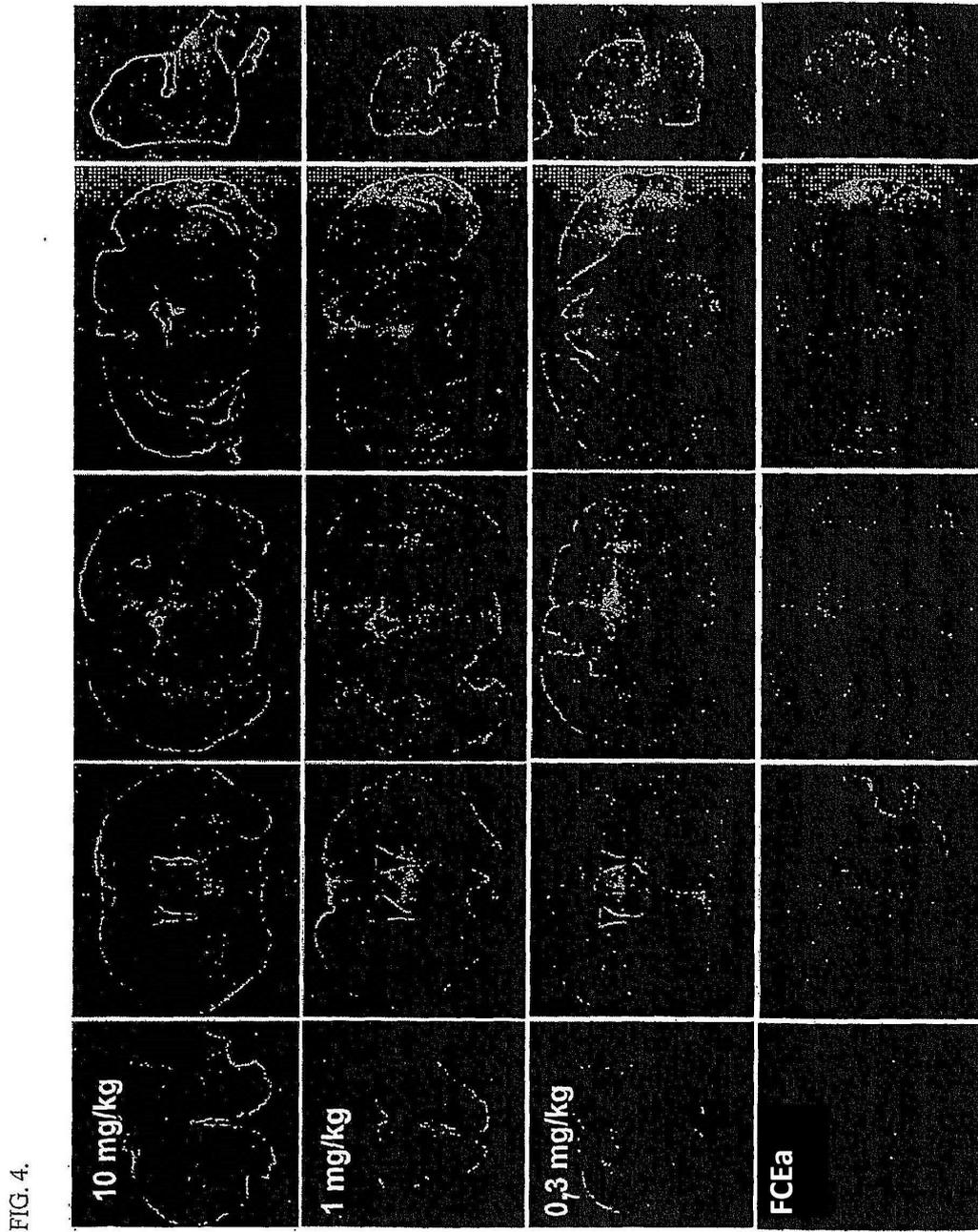
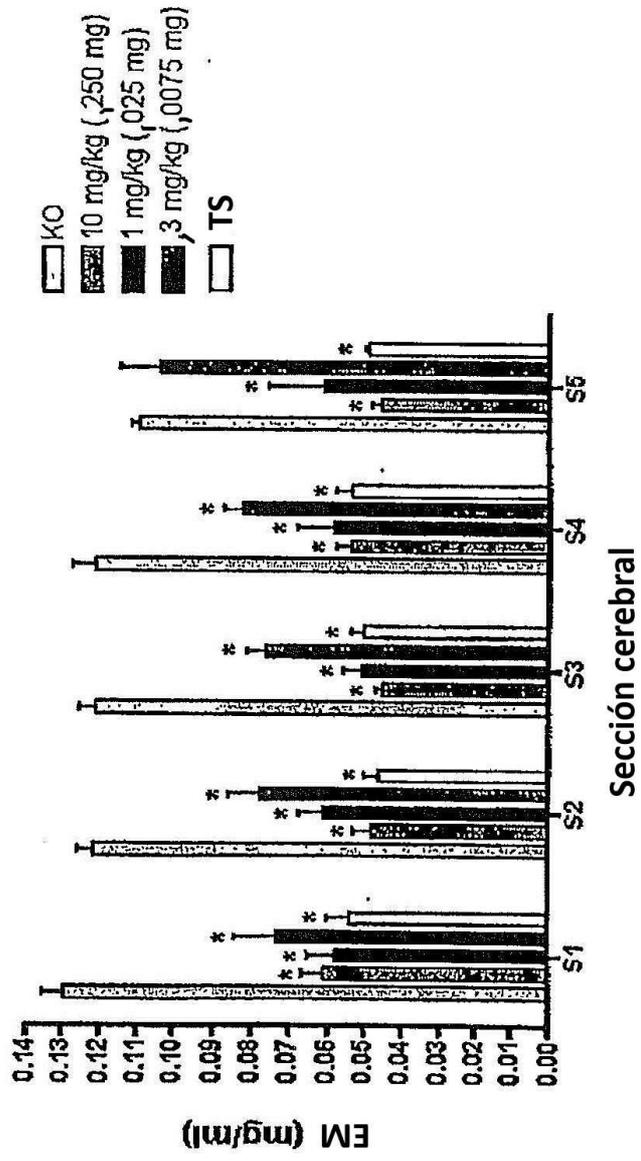


FIG. 5



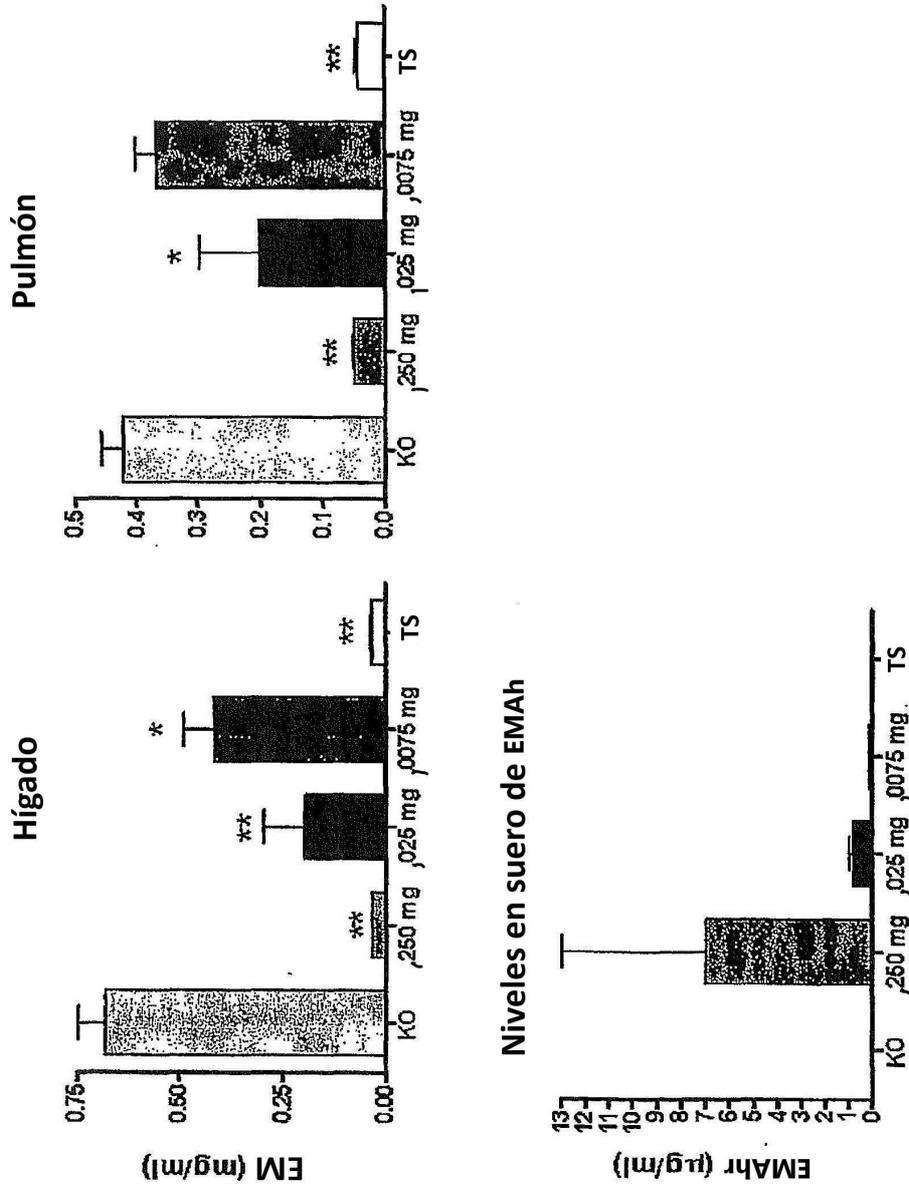
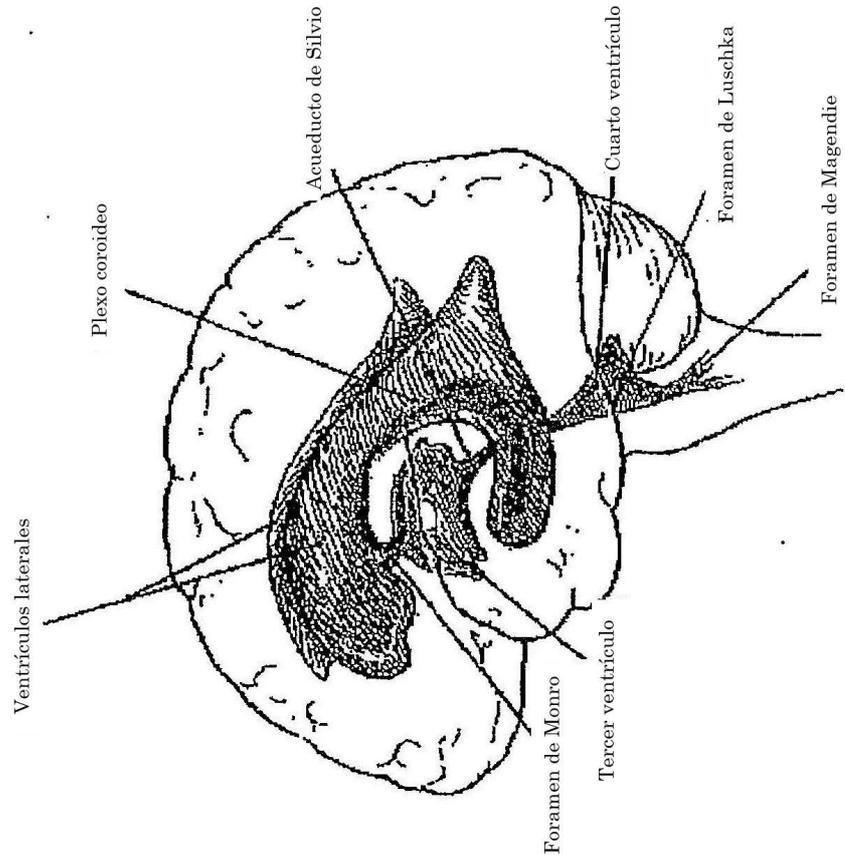


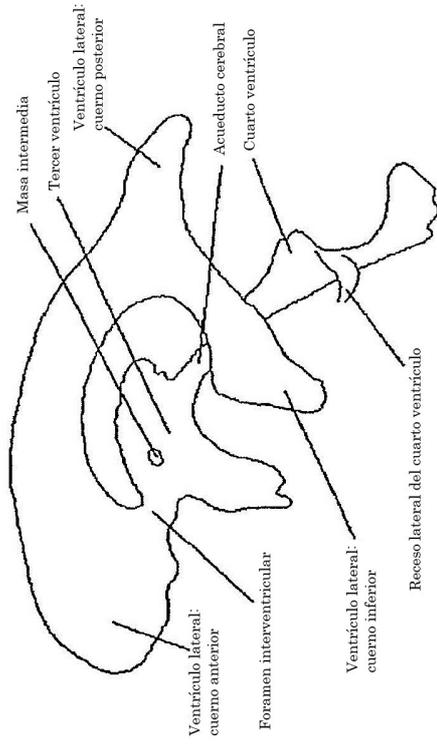
Fig. 6.

FIG. 7. Variantes conocidas

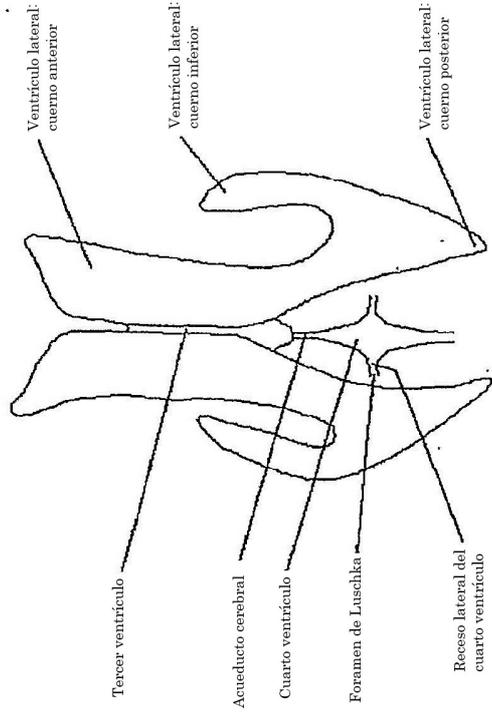
VARIANTE	157	157	1	C -> R (parece ser menos activo).
VARIANTE	242	242	1	G -> R (en NPB).
VARIANTE	246	246	1	E -> Q (en NPA; 30% de actividad residual).
VARIANTE	248	248	1	S -> R (en NPA).
VARIANTE	302	302	1	L -> P (en NPA; en el 23% de los pacientes judíos Asquenazí de NPA).
VARIANTE	319	319	1	H -> Y (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; bajas velocidades 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 el 32% de los pacientes judíos asquenazí de NPA).
VARIANTE	537	537	1	Y -> H (en NPA).
VARIANTE	577	577	1	G -> S (en NPA).
VARIANTE	608	608	1	perdido, (en NPB, prevalente entre los pacientes de NPB de la región del magreb de África del norte).

Fig. 8





Ventrículos cerebrales: vista lateral



Ventrículos cerebrales: vista superior

Figs. 9A y 9B.

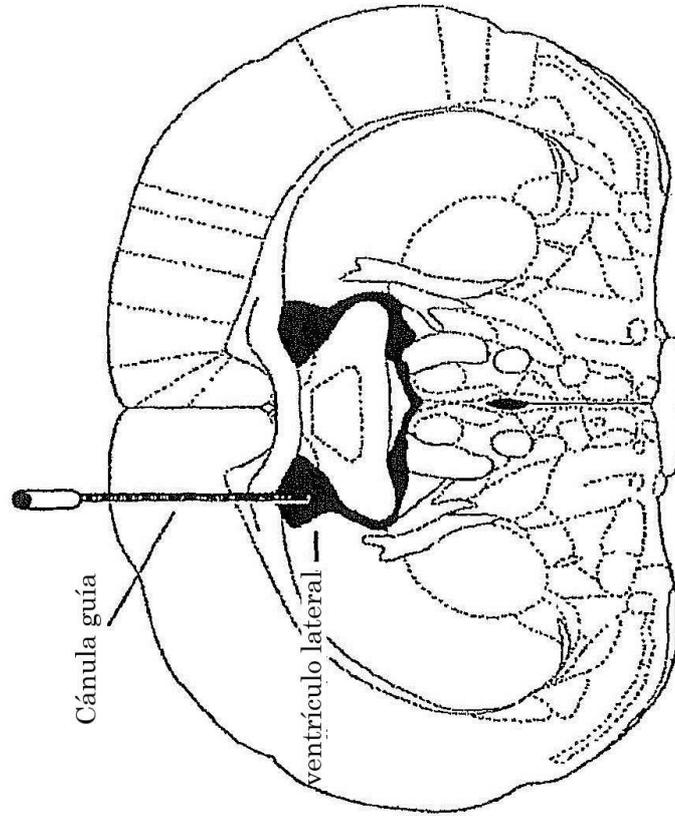


Fig. 10.