

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 836**

51 Int. Cl.:

C12N 9/18 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
A61K 31/135 (2006.01)
A61K 31/366 (2006.01)
A61K 31/397 (2006.01)
A61K 31/465 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2011 E 14200334 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 2977057**

54 Título: **Lipasa ácida lisosomal N-glicosilada recombinante humana aislada**

30 Prioridad:

09.09.2010 US 403011 P
29.10.2010 US 456014 P
13.01.2011 US 201161432372 P
23.04.2011 WO PCT/US2011/033699

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.06.2020

73 Titular/es:

ALEXION PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
121 Seaport Boulevard
Boston, MA 02210, US

72 Inventor/es:

QUINN, ANTHONY

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 769 836 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

Lipasa ácida lisosomal N-glicosilada recombinante humana aislada

5 **[0001]** La deficiencia de Lipasa Ácida Lisosomal (LAL) es una enfermedad por depósito lisosomal (LSD) rara que se caracteriza por una insuficiencia en la degradación de ésteres de colesterilo (CE) y triglicéridos (TAG) en los lisosomas debido a una deficiencia de la enzima. La deficiencia en LAL se asemeja a otros trastornos por depósito lisosomal con la acumulación de sustrato en un número de tejidos y tipos de células. En la deficiencia en LAL la acumulación de sustrato es más marcada en las células del sistema retículoendotelial, incluyendo las células de Kupffer en el hígado, histiocitos en el bazo y en la lámina propia del intestino delgado. Las células reticuloendoteliales expresan el receptor de manosa/N-acetil glucosamina de macrófagos (también conocido como receptor de manosa de macrófagos, MMR, o CD206), que media la unión, la captación celular y la internalización lisosomal de proteínas con GlcNAc o N-glicanos terminados en manosa, y proporciona una vía para la corrección potencial de la deficiencia de la enzima en estos tipos de células clave.

15 **[0002]** La deficiencia en LAL es una enfermedad multisistémica que se manifiesta más comúnmente con complicaciones gastrointestinales, del hígado y cardiovasculares y se asocia con una morbilidad y mortalidad significativas. Los efectos clínicos de la deficiencia en LAL se deben a una acumulación masiva de material lipídico en los lisosomas en un número de tejidos y una profunda alteración en los mecanismos homeostáticos del colesterol y los lípidos, incluyendo aumentos sustanciales en la síntesis de colesterol hepático. La deficiencia en LAL se presenta como al menos dos fenotipos: Enfermedad de Wolman (WD) y Enfermedad por Depósito de Ésteres de Colesterilo (CESD).

25 **[0003]** La enfermedad de Wolman, denominada así por el nombre del médico que la describió por primera vez, es la presentación más agresiva de la deficiencia en LAL. Este fenotipo se caracteriza por manifestaciones gastrointestinales y hepáticas, incluyendo insuficiencias en el crecimiento, mala absorción, esteatorrea, pérdida importante de peso, linfadenopatía, esplenomegalia y hepatomegalia. La enfermedad de Wolman es rápidamente progresiva e invariablemente fatal por lo general durante el primer año de vida. La revisión de los informes de casos indica que la supervivencia más allá de los 12 meses de vida es extremadamente rara que los pacientes que presentan insuficiencias en el crecimiento debido a una deficiencia en LAL grave en el primer año de vida. En esta forma más agresiva, la insuficiencia en el crecimiento es la característica clínica predominante y es un elemento clave para una mortalidad temprana. La afectación hepática tal como lo demuestra la ampliación del hígado y la elevación de las transaminasas es también común en los bebés.

35 **[0004]** El diagnóstico de la enfermedad de Wolman se establece a través de hallazgos físicos y los análisis de laboratorio. Los bebés son hospitalizados habitualmente en los dos primeros meses de vida debido a la diarrea, vómito persistente, dificultad para alimentarse, retraso del crecimiento e insuficiencia en el desarrollo. Los hallazgos físicos incluyen distensión abdominal con hepatomegalia y esplenomegalia, y el examen radiográfico a menudo revela la calcificación de las glándulas suprarrenales. Los exámenes de laboratorio normalmente revelan niveles elevados de transaminasas en suero y una actividad endógena de la enzima LAL ausente o marcadamente reducida. Los niveles elevados en sangre de colesterol y triglicéridos se observan en algunos pacientes.

45 **[0005]** Los pacientes con deficiencia en LAL también pueden presentar más tarde en su vida afectaciones del hígado y cardiovasculares predominantes, y esto a menudo se denomina Enfermedad por Depósito de Ésteres de Colesterilo (CESD). En CESD, el hígado se ve muy afectado con hepatomegalia marcada, necrosis de hepatocitos, elevación de transaminasas, cirrosis y fibrosis hepática. Debido al aumento de los niveles de CE y TAG, la afectación cardiovascular se puede caracterizar por la hiperlipidemia. Se ha descrito una acumulación de depósitos de grasa en las paredes de las arterias (aterosclerosis) en algunos sujetos que padecen CESD. Los depósitos estrechan el lumen arterial y pueden conducir a la oclusión del vaso aumentando el riesgo de episodios cardiovasculares importantes, incluyendo infarto de miocardio y accidentes cerebrovasculares. Sin embargo, no todos los sujetos que sufren de deficiencia en LAL desarrollan aterosclerosis. Por ejemplo, los pacientes con enfermedad de Wolman están inundados con otros síntomas asociados con la enfermedad, incluyendo el hígado y bazo agrandados, linfadenopatía y la mala absorción por el intestino delgado, pero WD no se caracteriza generalmente por la aterosclerosis (The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. y Valle D., eds) 7ª ed., Volumen 2 pág. 2570 McGraw-Hill, 1995). Del mismo modo, no todos los pacientes de CESD presentan aterosclerosis. Véase, Di Bisceglie et al, Hepatology 11: 764-772 (1990), Ameis et al, J Lipid Res. 36: 241-250 (1995). La presentación del CESD es muy variable con algunos pacientes sin diagnosticar hasta que las complicaciones se manifiestan en una edad adulta tardía, mientras que otros pueden tener una disfunción hepática que se presenta en la primera infancia. La CESD se asocia con una menor esperanza de vida y una mala salud significativa. La esperanza de vida de aquellos con CESD depende de la gravedad de las complicaciones asociadas.

60 **[0006]** Las opciones terapéuticas actuales para la enfermedad de Wolman son muy limitadas. Los antibióticos se administran a bebés con pirexia y/o evidencias de infección. Se pueden prescribir un tratamiento de reemplazo de esteroides para la insuficiencia suprarrenal y un aporte nutricional especializado, y aunque no hay evidencias de que estas intervenciones previenen la muerte, tampoco está claro en la actualidad si tienen un impacto en la supervivencia a corto plazo. En una serie de cuatro pacientes con deficiencia en LAL tratados con trasplante de médula ósea, los cuatro pacientes fallecieron por complicaciones del procedimiento en cuestión de meses del trasplante. Aunque se ha descrito

cierto éxito en informes de casos posteriores, la tasa de mortalidad sigue siendo elevada y muchos pacientes no son trasplantados ya que están demasiado enfermos para sobrevivir al régimen de acondicionamiento previo al trasplante. El pequeño número de supervivientes a largo plazo descritos indican que la corrección de la deficiencia de la enzima en las células hematopoyéticas solas es suficiente para mejorar sustancialmente el estado clínico en esta enfermedad.

5 Habitualmente se proporciona apoyo clínico a través de restricciones en la dieta en un intento de limitar la acumulación de lípidos no transportables y no catabolizables asociados con las manifestaciones agudas de la enfermedad que conducen a la muerte.

10 **[0007]** Las opciones terapéuticas actuales para el fenotipo de CESD se centran en el tratamiento sintomático a través del control de la acumulación de lípidos a través de la dieta que excluye a los alimentos ricos en colesterol y triglicéridos y la supresión de la síntesis de colesterol y la producción de apolipoproteína B a través de la administración de medicamentos para bajar el colesterol (por ejemplo, las estatinas y colestiramina). Aunque puede observarse alguna mejoría clínica, las manifestaciones de la enfermedad subyacentes persisten y la progresión de la enfermedad persiste.

15 **[0008]** Se ha sugerido que el tratamiento de reemplazo enzimático con LAL recombinante puede ser una opción de tratamiento viable para la deficiencia de la lipasa ácida lisosomal y afecciones relacionadas (véase, Meyers et al (1985) Nutrition Res 5 (4): 423-442; WO9811206; y Besley (1984) Clinical Genetics 26: 195-203). Algunos estudios que utilizan un modelo de ratón de la deficiencia en LAL han demostrado la corrección de algunas anomalías de ratones deficientes en LAL (LAL^{-/-}) a través de la infusión de dosis altas (más de 1 miligramo por kilogramo de peso corporal) de LAL humana recombinante una vez cada 3 días (véase, por ejemplo, Grabowski en US 2007/0264249). Estos estudios anteriores para corregir los defectos en ratones deficientes en LAL sugerían que se requerían cantidades relativamente altas y dosis frecuentes de la proteína LAL recombinante con el fin de corregir los fenotipos subyacentes. También es importante señalar que, a diferencia del modelo de rata LAL^{-/-} descrito inicialmente por Yoshida y Kuriyama (1990) Laboratory Animal Science, vol 40, pág. 486-489, el modelo de ratones LAL^{-/-} utilizado en el estudio anterior no se parece mucho a la WD humana en que los ratones deficientes en LAL no presentan los defectos de crecimiento que se observan en pacientes humanos.

20

25

30 **[0009]** Hasta la fecha, no se administrado LAL exógena a los seres humanos y no hay tratamiento efectivo disponible para el tratamiento de deficiencias en LAL incluyendo WD, CESD, y otras. Por lo tanto, hay una gran necesidad de tratamientos con una frecuencia de administración minimizada con el fin de mejorar la calidad de vida de los pacientes. Además, son deseables dosis terapéuticamente eficaces que restauran el crecimiento, normalizan la función del hígado, aumentan las concentraciones tisulares de LAL, y aumentan la actividad de LAL en pacientes humanos.

35 **[0010]** La presente invención se basa en los primeros casos clínicos humanos en los que los pacientes se dosificaron con éxito con LAL exógena. Un bebé (niño) que padece una forma de deficiencia en LAL de otro modo mortal (Enfermedad de Wolman, o deficiencia en LAL de aparición temprana) se trató eficazmente mediante la administración de LAL exógena, y la evaluación de la seguridad de el tratamiento de reemplazo con la enzima LAL se evaluó en un grupo de pacientes humanos que padecen de deficiencia en LAL de aparición tardía. El niño con deficiencia en LAL de aparición temprana se administró a dosis bajas semanalmente sin provocar episodios o reacciones adversas. Se observaron mejoras sorprendentes de los signos vitales y de las mediciones clínicas/de laboratorio para la eficacia ya en una o dos semanas después de la administración inicial. Después de más de 4 meses de dosificación semanal, el niño tratado había restaurado el crecimiento normal y mostró mejoras significativas en todos los síntomas relacionados con la deficiencia en LAL incluyendo mala absorción, hepatomegalia y la función hepática. Los pacientes adultos de aparición tardía también han sido dosificados semanalmente con bajas cantidades de LAL exógena, sin signos de episodios adversos. Por lo tanto, los datos clínicos recogidos hasta la fecha muestran que el tratamiento de reemplazo de enzima utilizando la LAL exógena de la presente invención proporciona un tratamiento seguro y eficaz para la deficiencia en LAL.

40

45

50 **[0011]** Por consiguiente, la presente memoria proporciona procedimientos para tratar enfermedades o afecciones asociadas con la deficiencia en LAL en pacientes humanos mediante la administración de una cantidad eficaz de la lipasa ácida lisosómica (LAL) exógena. La LAL exógena puede ser una LAL humana recombinante que tiene una estructura de glicano unido a N que comprende al menos un manosa y/o manosa-6-fosfato. La LAL exógena se internaliza eficazmente en el lisosoma de, por ejemplo, linfocitos, macrófagos, y/o fibroblastos.

55 **[0012]** En algunos casos, el paciente humano que padece deficiencia en LAL es diagnosticado con la enfermedad de Wolman (WD). En un caso, la administración es suficiente para aumentar el crecimiento de un paciente con WD. En un caso, la administración es suficiente para restablecer el crecimiento normal del paciente con WD. En otros casos, el paciente humano que padece deficiencia en LAL es diagnosticado con la enfermedad de depósito de ésteres de colesterol (CESD). Los procedimientos de tratamiento según la presente memoria se pueden proporcionar a pacientes humanos de cualquier edad.

60

[0013] También se describen en este documento procedimientos para el tratamiento de un paciente humano que padece deficiencia en LAL mediante la administración de LAL humana recombinante al paciente en una cantidad eficaz para mejorar la función hepática. En algunos casos, la administración es suficiente para normalizar las pruebas hepáticas. En un caso, la administración es suficiente para disminuir los niveles séricos de transaminasas hepáticas. Por ejemplo, las transaminasas hepáticas pueden incluir aspartato transaminasa (AST) y/o alanina transaminasa (ALT) en

65

suelo. En un caso, la administración es suficiente para minimizar la hepatomegalia. En un caso, la administración es suficiente para disminuir el tamaño del hígado del paciente. En un caso, la administración es suficiente para disminuir los niveles de ferritina sérica.

5 [0014] En un caso, la administración es suficiente para disminuir los niveles séricos de lípidos, incluyendo, por ejemplo, los niveles de éster de colesterol (CE) y/o de triglicéridos (TG).

[0015] También se describe un procedimiento para aumentar la actividad de LAL en un paciente humano con una deficiencia en LAL. Dicho procedimiento comprende la administración de LAL humana recombinante al paciente de manera que los resultados de la administración dan lugar a un aumento de la actividad de LAL, tal como se puede medir, por ejemplo, en los linfocitos y/o fibroblastos.

10 [0016] En un caso, se describe un procedimiento de tratamiento de una afección asociada con la deficiencia en LAL en un paciente humano mediante la administración de una cantidad eficaz de proteína LAL exógena al paciente de una vez cada 5 días a una vez cada 30 días.

[0017] En algunos casos, el paciente humano que padece deficiencia en LAL se dosifica con aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 50 mg de LAL exógena por kilogramo de peso corporal. En un caso, el paciente humano se dosifica con aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg de LAL exógena por kilogramo de peso corporal. En un caso, el paciente humano se dosifica con aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5 mg de LAL exógena por kilogramo de peso corporal.

[0018] En un caso, la velocidad de infusión está entre aproximadamente 0,1 mg/kg/h y aproximadamente 4 mg/kg/h.

25 [0019] En algunos casos, el paciente humano se trata con un segundo agente terapéutico. El segundo agente terapéutico puede incluir, por ejemplo, un fármaco reductor del colesterol (por ejemplo, estatina o ezetimiba), un antihistamínico (por ejemplo, difenhidramina), o un inmunosupresor.

[0020] En base a la descripción contenida en este documento, la presente invención proporciona una lipasa ácida lisosomal humana recombinante (rhLAL) aislada que contiene glicanos unidos a N unidos a Asn15, Asn80, Asn140, Asn252 y Asn300, tal como se establece en la SEQ ID NO: 1, en la que los glicanos unidos a N comprenden estructuras de dos, tres y cuatro antenas con N-acetilglucosamina (GlcNAc), manosa y/o manosa-6-fosfato (M6P) y en la que la rhLAL comprende glicanos que contienen M6P en Asn80, Asn140 y Asn252. Otros aspectos y realizaciones de la invención se establecen en las reivindicaciones adjuntas.

35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0021]

40 La figura 1A representa los niveles de aspartato transaminasa (AST) en suero de un paciente con enfermedad de Wolman infantil masculina (es decir, deficiencia en LAL de aparición temprana) que recibió la dosis semanal de LAL exógena (SBC-102) (dosis: 0,2 mg/kg (infusión inicial; semana 0); 0,3 mg/kg (semana 1); 0,5 mg/kg (semana 2); y 1,0 mg/kg (semanas 3-8)). La figura 1B representa los niveles de alanina transaminasa (ALT) en suero del mismo paciente. El paciente tenía 4 meses y 1 semana de edad en la infusión inicial.

45 La figura 2 representa los niveles de ferritina en suero del paciente con la enfermedad de Wolman que recibió la dosis semanal de LAL exógena (SBC-102) (dosis: 0,2 mg/kg (infusión inicial; semana 0); 0,3 mg/kg (semana 1); 0,5 mg/kg (semana 2); y 1,0 mg/kg (semanas 3-8)). El paciente tenía 4 meses y 1 semana de edad en la infusión inicial. Los niveles de ferritina en suero se muestran desde la semana 1 después de la dosis inicial en la semana 0.

La figura 3 representa la velocidad de crecimiento del paciente con la enfermedad de Wolman que recibió la dosis semanal de LAL exógena (SBC-102) (dosis: 0,2 mg/kg (infusión inicial; semana 0); 0,3 mg/kg (semana 1); 0,5 mg/kg (semana 2); y 1,0 mg/kg (semanas 3-8)).

50 La figura 4 muestra una curva de crecimiento del paciente con la enfermedad de Wolman (kg, percentiles de peso para la edad para los niños).

La figura 5 representa los niveles de AST en suero de un paciente blanco masculino de 41 años de edad con CESD que recibió dosis semanales de 0,35 mg/kg de LAL exógena.

55 La figura 6 representa los niveles de ALT en suero de un paciente blanco masculino de 41 años de edad con CESD que recibió dosis semanales de 0,35 mg/kg de LAL exógena.

La figura 7 representa los niveles de albúmina en suero de un paciente blanco masculino de 41 años de edad con CESD que recibió dosis semanales de 0,35 mg/kg de LAL exógena.

60 La figura 8 representa los niveles de ferritina en suero de un paciente blanco masculino de 41 años de edad con CESD que recibió dosis semanales de 0,35 mg/kg de LAL exógena.

La figura 9 ilustra la tasa de ganancia de peso en cuatro ratas macho de la misma edad cada una asignada a una de las siguientes cuatro regímenes de dosificación de LAL exógena: 1 mg por kilogramo una vez por semana, 5 mg por kilogramo una vez por semana, 5 mg por kilogramo una vez cada 2 semanas o placebo. Los números dentro de las columnas representan días después del nacimiento.

65 La figura 10 representa los resultados de un examen patológico e histopatológico de un control de tipo salvaje, una rata deficiente en LAL tratada con LAL exógena, y una rata tratada con placebo deficiente en LAL. La patología

macroscópica demuestra una normalización de color y el tamaño del hígado en ratas tratadas con LAL exógena. La histopatología del tejido del hígado de ratas tratadas con LAL exógena muestra esencialmente una histología normal del hígado en marcado contraste con la acumulación sustancial de macrófagos espumosos en los animales tratados con placebo.

5 La figura 11 representa la colocalización de LAL humana recombinante (SBC-102) y marcador lisosomal en los lisosomas de células examinadas mediante microscopía de fluorescencia confocal utilizando un modo de rastreo secuencial.

La figura 12 representa la especificidad de unión de LAL humana recombinante (SBC-102) al receptor de GlcNAc/manosa evaluado mediante ensayos de unión competitiva utilizando la línea celular de macrófagos, NR8383.

10 La figura 13 representa la actividad de LAL humana recombinante en células en células normales y deficientes en LAL *in vitro*.

La figura 14 ilustra el efecto del tratamiento con LAL humana recombinante (SBC-102) en masa de órganos internos de ratas deficientes en LAL. El tamaño del órgano se representa como el porcentaje del peso corporal determinado a las 8 semanas de vida, en ratas LAL ^{-/-} y ratas LAL ^{+/+} después de la administración semanal de vehículo o SBC-102 a 5 mg/kg durante 4 semanas.

15 La figura 15 ilustra el peso corporal en ratas de tipo salvaje y con deficiencia en LAL ratas después de la dosis semanal de vehículo o SBC-102 a 5 mg·kg⁻¹ durante 4 semanas. La administración de dosis se destaca en el eje X mediante diamantes empezando en la semana 4.

20 La figura 16 representa los niveles de colesterol, ésteres de colesterol y triglicéridos del hígado determinados a las 8 semanas de vida en ratas WT y deficientes en LAL después de la dosis semanal de vehículo o SBC-102 al 5 mg·kg⁻¹ durante 4 semanas.

La figura 17 representa el aumento en porcentaje de peso corporal en ratas deficientes en LAL.

La figura 18 representa el peso del hígado, como un porcentaje del peso corporal, en ratas deficientes en LAL después de la administración de SBC-102 durante 4 semanas.

25 La figura 19 ilustra los niveles de éster de colesterol de tejidos en ratas deficientes en LAL después de la administración de SBC-102 durante 4 semanas.

[0022] La presente memoria proporciona procedimientos para el tratamiento de un ser humano que padece una enfermedad o afección que es sensible a la administración de lipasa ácida lisosomal exógena.

30

Definiciones

[0023] Por conveniencia, ciertos términos empleados en la memoria, ejemplos y reivindicaciones adjuntas se exponen en este documento para ilustrar y definir el significado y el alcance de los diversos términos usados para describir la presente memoria.

35

[0024] "LAL", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a "lipasa ácida lisosomal", y los dos términos se utilizan indistintamente en toda la memoria. La LAL puede ser una proteína humana, es decir, una lipasa ácida lisosomal humana. El término "SBC-102", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una lipasa ácida lisosomal humana recombinante. LAL también se conoce en la literatura como colesterol éster hidrolasa ácida, colesterol esterasa, lipasa A, LIPA, y esteroil esterasa.

40

[0025] LAL cataliza la hidrólisis de ésteres de colesterol y triglicéridos a colesterol libre, glicerol y ácidos grasos libres. Por lo tanto, la "actividad de LAL" se puede medir, por ejemplo, mediante la escisión del sustrato fluorogénico, oleato de 4-metilumbeliferilo (4MUO). La escisión de 4MUO se puede detectar, por ejemplo, mediante excitación a aproximadamente 360 nm y emisión a 460 nm del fluoróforo liberado, 4-metilumbeliferona (4MU). Los resultados se pueden indicar en unidades de fluorescencia relativa (RFU). Por ejemplo, la cantidad de sustrato escindido en un ensayo de punto final de 30 minutos se puede cuantificar con respecto a una curva estándar con 4MU, y una unidad (U) de actividad puede definirse como la cantidad de enzima requerida para escindir 1 micromol de 4MUO por minuto a 37°C. En consecuencia, los fragmentos funcionales o variantes de LAL incluyen fragmentos o variantes que tienen actividad de LAL, por ejemplo, la capacidad para hidrolizar ésteres de colesterol y/o triglicéridos.

45

50

[0026] Tal como se utiliza en el presente documento, "LAL exógena" se refiere a LAL que no se produce de forma natural por un paciente. Por ejemplo, LAL exógena incluye proteína LAL recombinante que se administra a un paciente, proteína LAL que se aísla de una persona o animal y se administra a un paciente, y la proteína LAL que se produce (es decir, se expresa) en un paciente como resultado de administración de ARN y/o ADN que codifica LAL u otro tratamiento que aumenta la expresión de la proteína LAL endógena.

55

[0027] "Inyección intravenosa", a menudo referida médicamente como inyección IV de empuje o en bolo, se refiere a una vía de administración en el que una jeringa se conecta al dispositivo de acceso IV y el medicamento se inyecta directamente, por lo general rápidamente y ocasionalmente hasta un período de 15 minutos si puede causar irritación de la vena o un efecto demasiado rápido. Una vez que el medicamento ha sido inyectado en la corriente de fluido del tubo IV, debe haber algunos medios para garantizar que va desde el tubo al paciente. Habitualmente, esto se logra permitiendo que la corriente de fluido fluya normalmente y de ese modo transporte el medicamento al torrente sanguíneo. Sin embargo, en algunos casos, se utiliza una segunda inyección de fluido, a veces denominada "flush", después de la primera inyección para facilitar la entrada de la medicina en el torrente sanguíneo.

60

65

5 [0028] "Infusión intravenosa" se refiere a una vía de administración en la que el medicamento se administra durante un período prolongado de tiempo. Por ejemplo, el medicamento puede administrarse a un paciente durante un período de tiempo entre 1 y 8 horas. El medicamento también se puede administrar a un paciente durante un período de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, o aproximadamente 8 horas. Para conseguir una infusión intravenosa, se pueden utilizar un goteo IV por gravedad o una bomba IV. La infusión IV se utiliza normalmente cuando un paciente requiere medicamentos solamente en ciertos momentos y no requiere líquidos intravenosos adicionales (por ejemplo, soluciones de agua que pueden contener sodio, cloruro, glucosa, o cualquier combinación de los mismos), tales como los que restauran electrolitos, azúcar en la sangre, y la pérdida de agua.

15 [0029] El término "aviar", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier especie, subespecie o raza de organismo de la clase taxonómica aves, tales como, pero sin limitación, pollo, pavo, pato, ganso, codorniz, faisanes, loros, pinzones, halcones, cuervos y aves corredoras, incluyendo avestruz, emú y casuario. El término incluye las diversas razas conocidas de la especie *Gallus gallus*, o los pollos (por ejemplo, White Leghorn, Brown Leghorn, Barrada-Rock, Sussex, New Hampshire, Rhode Island, Australorp, Minorca, Amrox, California Gray), así como razas de pavos, faisanes, codornices, patos, avestruces y otras aves de corral que se crían en cantidades comerciales. También incluye un organismo aviar individual en todas las etapas de desarrollo, incluyendo etapas embrionarias y fetales.

20 [0030] El término "derivado de aves de corral" o "derivado aviar" se refiere a una composición o sustancia producida por u obtenida de las aves de corral. "Aves de corral" se refiere a aves que se pueden mantener como ganado, incluyendo, pero sin limitación, pollos, patos, pavos, codornices y aves corredoras. Por ejemplo, "derivado de aves de corral" puede referirse a derivado de pollo, derivado de pavo y/o derivado de codorniz.

25 [0031] El término "paciente", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier persona que recibe o que ha recibido o va a recibir atención médica o tratamiento, por ejemplo, dirigido por un proveedor de atención médica.

30 [0032] "Dosis terapéuticamente eficaz" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la dosis (por ejemplo, la cantidad y/o el intervalo) de fármaco requerida para producir la respuesta terapéutica pretendida. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a una dosis que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha dosis, da lugar a un tratamiento mejorado, curación, prevención, o mejora de una enfermedad, trastorno, o efecto secundario, o una disminución en la tasa de aparición o el progreso de una enfermedad o trastorno. El término también incluye dentro de su ámbito de aplicación, las dosis eficaces para mejorar las funciones fisiológicas.

35 [0033] Los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento" se refieren a procedimientos para aliviar, disminuir, o mejorar una enfermedad o síntoma, prevenir un síntoma adicional, mejorar o prevenir una causa subyacente de un síntoma, inhibir una enfermedad o afección, detener el desarrollo de una enfermedad o afección, aliviar una enfermedad o afección, provocar la regresión de una enfermedad o afección, aliviar una afección causada por la enfermedad o afección, o detener un síntoma de la enfermedad o afección, ya sea preventivamente y/o después de producirse el síntoma.

40 [0034] Tal como se utiliza en el presente documento con referencia a una dosis particular, "kg⁻¹", "por kg", "/kg," y "por kilogramo" representan "por kilogramo de peso corporal" del mamífero, y por lo tanto los términos se pueden utilizar indistintamente.

45 [0035] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "polipéptido" se pretende abarcar un "polipéptido" en singular, así como "polipéptidos" en plural, y se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) linealmente unidos por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. Por lo tanto, los péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteínas", "cadenas de aminoácidos", o cualquier otro término utilizado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, se incluyen dentro de la definición de "polipéptido", y el término "polipéptido" se puede usar en lugar de, o de forma intercambiable con cualquiera de estos términos. El término "polipéptido" también pretende referirse a los productos de las modificaciones después de la expresión del polipéptido, incluyendo, sin limitación, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos conocidos de protección/bloqueo, división proteolítica, o modificación mediante aminoácidos no naturales. Un polipéptido puede derivar de una fuente biológica natural o producirse mediante tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. Puede generarse de cualquier manera, incluyendo por síntesis química.

60 [0036] Tal como se utiliza en este documento, el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos o dos secuencias de nucleótidos es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = # de posiciones idénticas/# total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que necesitan introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden conseguir utilizando un algoritmo matemático, tal como se describe en los ejemplos no limitantes siguientes.

[0037] El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput Appl Biosci, 4: 11-17 (1988)), que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando ya sea una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ó 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, ó 6.

[0038] Por un polipéptido "aislado" o un fragmento, variante, o derivado del mismo se entiende un polipéptido que no está en su medio natural. No se requiere ningún nivel particular de purificación. Por ejemplo, un polipéptido aislado puede extraerse de su entorno nativo o natural. Los polipéptidos y proteínas producidos de forma recombinante expresados en células huésped se consideran aislados tal como se describen en el presente documento, ya que son polipéptidos nativos o recombinantes que han sido separados, fraccionados o purificados parcial o sustancialmente por cualquier técnica adecuada.

[0039] Otros polipéptidos descritos en este documento son fragmentos, derivados, análogos, o variantes de los polipéptidos anteriores, y cualquier combinación de los mismos. Los términos "fragmento", "variantes", "derivado" y "análogo" cuando se refieren a cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento incluyen cualquier polipéptido que retiene al menos parte de la actividad del polipéptido nativo correspondiente (por ejemplo, fragmentos de polipéptido LAL, variantes, derivados, y análogos que retienen la capacidad para hidrolizar ésteres de colesterol y/o triglicéridos). Los fragmentos de polipéptidos incluyen, por ejemplo, fragmentos proteolíticos, así como fragmentos por delección. Las variantes de un polipéptido incluyen fragmentos tal como se describe anteriormente, y también polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas debido a sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos. Las variantes pueden ser naturales o de origen no natural. Las variantes de origen no natural pueden producirse usando técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica. Los polipéptidos variantes pueden comprender sustituciones conservativas o no conservativas de aminoácidos, deleciones o adiciones. Los derivados son polipéptidos que han sido alterados con el fin de mostrar características adicionales que no se encuentran en el polipéptido nativo. Los ejemplos incluyen proteínas de fusión. Los polipéptidos variantes también pueden referirse en el presente documento como "análogos de polipéptidos". Tal como se utiliza en el presente documento, un "derivado" de un polipéptido en cuestión puede contener uno o más residuos químicamente derivatizados por reacción de un grupo lateral funcional. También se incluyen como "derivados" aquellos péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos naturales de los veinte aminoácidos estándar. Por ejemplo, 4-hidroxiprolina se puede sustituir por prolina; 5-hidroxisilisina se puede sustituir por lisina; 3-metilhistidina se puede sustituir por histidina; homoserina puede ser sustituido por serina; y/o la ornitina se puede sustituir por lisina.

[0040] El término "polinucleótido" pretende abarcar un ácido nucleico singular así como los ácidos nucleicos plurales, y se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada o construcción, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm) o ADN plasmídico (pDNA). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amida, tal como se encuentra en los ácidos nucleicos peptídicos (PNA)). El término "ácido nucleico" se refiere a cualquiera de uno o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido. Por ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que ha sido extraído de su medio nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica LAL contenido en un vector se considera aislado para los fines de la presente descripción. Otros ejemplos de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de polinucleótidos de la presente descripción. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados según la presente descripción incluyen además dichas moléculas producidas sintéticamente. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico pueden ser o pueden incluir un elemento regulador, tal como un promotor, sitio de unión a ribosomas, o un terminador de transcripción.

[0041] Tal como se utiliza en el presente documento, una "región codificante" es una parte de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de parada" (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, puede considerarse como parte de una región codificante, pero ninguna de las secuencias flanqueantes, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosoma, terminadores de la transcripción, intrones, y similares, no son parte de una región codificante. Dos o más regiones codificantes de la presente descripción pueden estar presentes en una sola construcción de polinucleótido, por ejemplo, en un solo vector, o en construcciones de polinucleótidos separados, por ejemplo, en (diferentes) vectores separados. Además, cualquier vector puede contener una sola región codificante, o puede comprender dos o más regiones codificantes. Además, un vector, polinucleótido o ácido nucleico de la descripción pueden codificar regiones codificantes heterólogas, fusionados o no fusionados a un ácido nucleico que codifica un polipéptido LAL o fragmento, variante, o derivado del mismo. Las regiones codificantes heterólogas incluyen, sin limitación, elementos o motivos especializados, tales como un péptido señal de secreción o un dominio funcional heterólogo.

[0042] Una variedad de regiones de control de la transcripción son conocidos para los expertos en la materia. Estos incluyen, sin limitación, las regiones control de la transcripción que funcionan en células de vertebrados, tales como, pero sin limitación, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (el promotor inmediato temprano, en

conjunto con el intrón A), virus de simio 40 (el promotor temprano), y retrovirus (tales como virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen las derivadas de genes de vertebrados, tales como actina, proteína de choque térmico, la hormona de crecimiento bovina y β -globina de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejido, así como promotores inducibles por linfocinas (por ejemplo, promotores inducibles por interferones o interleuquinas).

[0043] De manera similar, una variedad de elementos de control de la traducción son conocidos por los expertos en la materia. Estos incluyen, pero sin limitación, sitios de unión al ribosoma, codones de iniciación y terminación de la traducción, y elementos derivados de los picornavirus (en particular, un sitio interno de entrada al ribosoma, o IRES, también conocida como una secuencia CITE).

[0044] En otros casos, un polinucleótido de la presente descripción es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm).

[0045] Polinucleótido y regiones codificantes de ácidos nucleicos de la presente descripción pueden estar asociados con regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretores o señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente descripción. Según la hipótesis de la señal, las proteínas secretadas por células de mamíferos tienen un péptido señal o secuencia líder secretora que se escinde de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena de proteína creciente a través del retículo endoplasmático rugoso. Los expertos en la materia son conscientes de que polipéptidos secretados por las células de vertebrados, en general, tienen un péptido señal fusionado al N-terminal del polipéptido, que se escinde del polipéptido completo o de "longitud completa" para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En ciertos casos, se utiliza el péptido señal nativo, por ejemplo, el péptido señal MKMRFGLVCLVLTWHLHSEG (SEQ ID NO: 2) de LAL humana, o un derivado funcional de esa secuencia que conserva la capacidad para dirigir la secreción del polipéptido que está asociado operativamente con el mismo. Alternativamente, se puede usar un péptido señal heterólogo (por ejemplo, un péptido señal de mamífero o aviar heterólogo), o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, la secuencia líder de tipo salvaje puede estar sustituido por la secuencia líder del activador de plasminógeno tisular humano (TPA) o la β -glucuronidasa de ratón.

[0046] "Vector" significa un polinucleótido compuesto por una sola cadena, de doble cadena, circular, o ADN o ARN superenrollado. Un vector típico puede estar compuesto de los siguientes elementos operativamente unidos a distancias apropiadas para permitir la expresión de genes funcionales: origen de replicación, promotor, potenciador, secuencia líder de ARNm 5', sitio de unión ribosomal, casete de ácidos nucleicos, sitios de terminación y de poliadenilación, y secuencias marcadoras seleccionables. Uno o más de estos elementos pueden omitirse en aplicaciones específicas. El casete de ácidos nucleicos puede incluir un sitio de restricción para la inserción de la secuencia de ácido nucleico a expresar. En un vector funcional el casete de ácidos nucleicos contiene la secuencia de ácido nucleico a expresar, incluyendo sitios de iniciación y terminación de la traducción. Opcionalmente se puede incluir un intrón en la construcción, por ejemplo, 5" con respecto a la secuencia codificante. Un vector se construye de manera que la secuencia codificante particular se encuentra en el vector con las secuencias reguladoras apropiadas, siendo la posición y la orientación de la secuencia codificante con respecto a las secuencias de control tales que la secuencia codificante se transcribe bajo el "control" de las secuencias de control o reguladoras. La modificación de las secuencias que codifican la proteína particular de interés puede ser deseable para conseguir este fin. Por ejemplo, en algunos casos, puede ser necesario modificar la secuencia de modo que se puede unir a las secuencias control con la orientación apropiada, o para mantener el marco de lectura. Las secuencias de control y otras secuencias reguladoras pueden unirse a la secuencia codificante antes de la inserción en un vector. Alternativamente, la secuencia codificante puede clonarse directamente en un vector de expresión que ya contiene las secuencias control y un sitio de restricción apropiado que está en marco de lectura con y bajo el control regulador de las secuencias de control.

[0047] El término "expresión", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un proceso por el cual un gen produce un producto bioquímico, por ejemplo, un polipéptido. El proceso incluye cualquier manifestación de la presencia funcional del gen dentro de la célula incluyendo, sin limitación, el "knockdown" de genes, así como tanto la expresión transitoria como la expresión estable. Incluye, sin limitación, la transcripción del gen en ARN mensajero (ARNm), y la traducción de dicho ARNm en un polipéptido o polipéptidos. La expresión de un gen produce un "producto génico". Tal como se utiliza en este documento, un producto génico puede ser un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN mensajero producido por la transcripción de un gen, o un polipéptido que se traduce a partir de un transcrito. Los productos génicos descritos en el presente documento incluyen además ácidos nucleicos con modificaciones post-transcripcionales, por ejemplo, poliadenilación, o polipéptidos con modificaciones post-traduccionales, por ejemplo, metilación, glicosilación, la adición de lípidos, la asociación con otras subunidades de proteínas, escisión proteolítica, y similares.

[0048] Tal como se utiliza en el presente documento, "células huésped" se refiere a células que albergan vectores construidos utilizando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo.

[0049] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "N-glicanos", "oligosacárido", "estructura de oligosacárido", "patrón de glicosilación", "perfil de glicosilación," y "estructura de glicosilación" tienen esencialmente el mismo significado y se refieren cada uno a una o más estructuras que se forman a partir de residuos de azúcar y están

unidos a proteínas glicosiladas.

[0050] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de un compuesto descrito en el presente documento con otros componentes químicos, tales como vehículos, estabilizadores, diluyentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, y/o excipientes.

Pacientes con actividad de LAL insuficiente

[0051] Sin desear limitar la descripción al tratamiento de alguna afección o grupo de afecciones particulares, la descripción incluye el tratamiento de deficiencias en lipasa ácida lisosómica (LAL) en pacientes. Tal como se utiliza en el presente documento, un paciente con una deficiencia en LAL es cualquier paciente que tiene una actividad de LAL insuficiente. La actividad de LAL insuficiente en el paciente puede, por ejemplo, ser el resultado de bajos niveles de ARN, bajos niveles de proteínas, o baja actividad de la proteína. La actividad de LAL insuficiente puede resultar de una mutación en la secuencia codificante de LAL, una secuencia reguladora de LAL, o en otro gen (por ejemplo, un gen que regula LAL). La actividad de LAL insuficiente también puede ser el resultado de factores ambientales.

[0052] La presente descripción se puede utilizar para tratar una amplia variedad de afecciones en un sujeto o paciente. Por lo tanto, cualquier afección que pueda ser tratada de forma beneficiosa por LAL exógena según la descripción se incluye dentro del alcance de la descripción.

[0053] Un caso de la descripción se centra en el tratamiento de enfermedades por depósitos lisosomal (LSD) que resultan de una deficiencia en la lipasa ácida lisosomal, específicamente la enfermedad de Wolman (WD) y Enfermedad por Depósito de Ésteres de Colesterilo (CESD). Sin desear limitar la presente descripción a cualquier teoría o mecanismo de operación en particular, tanto WD como CESD pueden deberse a mutaciones en el locus de LAL y dar lugar a una acumulación masiva de material lipídico en los lisosomas en un número de tejidos y una profunda alteración en los mecanismos homeostáticos de colesterol y lípidos que pueden ser tratados mediante la administración de LAL exógena según los procedimientos de la presente descripción. Por lo tanto, en un caso, la deficiencia en LAL tratada según la descripción es WD. En otro caso, la deficiencia en LAL tratada según la descripción es CESD. En algunos casos, un diagnóstico de WD o CESD se basa en un análisis genético (por ejemplo, identificación de una mutación funcional en una secuencia codificante de LAL). En otros casos, un diagnóstico de WD o CESD se basa en los hallazgos clínicos (por ejemplo, el examen físico y/o pruebas de laboratorio).

[0054] En algunos casos, la LAL exógena puede utilizarse para tratar las complicaciones en una variedad de afecciones, tales como enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH). La NAFLD se refiere a una enfermedad del hígado que tiene una histopatología similar a la enfermedad del hígado que es debida a la ingesta excesiva de alcohol. Se caracteriza por macrovesicular esteatosis que causa el agrandamiento del hígado. La NAFLD puede progresar a NASH que se refiere a la enfermedad hepática que es similar a NAFLD con la adición de la inflamación y el daño al hígado que puede conducir a fibrosis y cirrosis.

[0055] En algunos casos, la LAL exógena se puede utilizar para tratar afecciones incluyendo pancreatitis, por ejemplo, pancreatitis crónica y/o pancreatitis aguda, así como la lesión pancreática inducida por el alcohol, tal como pancreatitis inducida por el alcohol.

[0056] La LAL exógena producida por cualquier procedimiento útil se puede utilizar para tratar enfermedades debidas a la lesión celular inducida por alcohol, incluyendo, pero sin limitación, las lesiones celulares inducidas por el alcohol que dan lugar a la acumulación de ésteres de lípidos en el tejido corporal, tal como, pero sin limitación, hígado, bazo, intestino, y el tejido cardiovascular. Según la descripción, la mala absorción también se puede tratar mediante la administración de LAL exógena. La LAL exógena también es útil para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Tangier e hipoalfalipoproteinemia familiar. La enfermedad de Tangier/hipoalfalipoproteinemia familiar se asocia con la acumulación de ésteres de colesterol en los macrófagos acompañada por hepatoesplenomegalia y/o linfadenopatía junto con niveles bajos de HDL que se pueden tratar mediante la administración de LAL exógena. Por ejemplo, sin desear limitar la descripción a ninguna teoría o mecanismo de operación en particular, la actividad de LAL alterada puede disminuir la expresión de ABCA1 y por el contrario un aumento de la actividad de LAL obtenida mediante la administración de LAL exógena a un paciente con la enfermedad de Tangier/hipoalfalipoproteinemia familiar aumentará la expresión de ABCA1 para superar los efectos de un gen ABCA1 con una actividad funcional reducida como resultado de polimorfismo.

[0057] En algunos casos, el nivel de actividad de LAL en un paciente antes del tratamiento es de aproximadamente el 1%, aproximadamente 2%, aproximadamente 3%, aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, o aproximadamente 80% de los niveles normales de actividad de LAL. En un caso, el nivel de actividad de LAL en un paciente antes del tratamiento es de aproximadamente el 50% o menos de los niveles normales de actividad de LAL. En un caso, el nivel de actividad de LAL en un paciente antes del tratamiento es de aproximadamente 40% o menos de los niveles normales de actividad de LAL. En algunos casos, el nivel de actividad de LAL en un paciente antes del tratamiento es de aproximadamente 30% o menos de los niveles normales de actividad de LAL. En algunos casos, el nivel de actividad de LAL en un paciente antes del tratamiento es de

aproximadamente 30% o menos de los niveles normales de actividad de LAL. En algunos casos, el nivel de actividad de LAL en un paciente antes del tratamiento es de aproximadamente 20% o menos de los niveles normales de actividad de LAL. En algunos casos, el nivel de actividad de LAL en un paciente antes del tratamiento es de aproximadamente 10% o menos de los niveles normales de actividad de LAL. En algunos casos, el nivel de actividad de LAL en un paciente antes del tratamiento es de aproximadamente 5% o menos de los niveles normales de actividad de LAL. En algunos casos, un paciente no muestra actividad de LAL medible antes del tratamiento.

[0058] En algunos casos, el nivel de actividad de LAL se mide en fibroblastos cultivados obtenida de un paciente humano que padece deficiencia en LAL. En algunos casos, el nivel de actividad de LAL se mide en linfocitos (por ejemplo, leucocitos) de un paciente humano que padece deficiencia en LAL. Los linfocitos incluyen, pero sin limitación, células mononucleares de sangre periférica (PMBC). Los procedimientos para la medición se describen, por ejemplo, en Burton et al, (1980) Clinica Chimica Acta 101: 25-32, y en Anderson et al, (1999) Mol. Genet. & Metab, 66: 333-345. Los pacientes con deficiencia en LAL que van a ser tratados con LAL exógena pueden mostrar actividad enzimática de LAL en fibroblastos que es menor de aproximadamente 30, aproximadamente 20, aproximadamente 10, aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2 o aproximadamente 1 pmol/mg/min medida usando trioleína como sustrato. Los pacientes con deficiencia en LAL que van de ser tratados con LAL exógena pueden mostrar actividad enzimática de LAL en leucocito que es menor de aproximadamente 30, aproximadamente 20, aproximadamente 10, aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2 o aproximadamente 1 pmol/mg/min medida mediante trioleína como sustrato. Los pacientes con deficiencia en LAL que van a ser tratados con LAL exógena pueden mostrar actividad enzimática de LAL en fibroblastos que es menor de aproximadamente 30, aproximadamente 20, aproximadamente 10, aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2 o aproximadamente 1 pmol/mg/min medida usando oleato de colesterilo como sustrato. Los pacientes con deficiencia en LAL que van de ser tratados con LAL exógena pueden mostrar actividad enzimática de LAL en leucocitos que es menor de aproximadamente 30, aproximadamente 20, aproximadamente 10, aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2 o aproximadamente 1 pmol/mg/min medidoa usando oleato de colesterilo como sustrato.

Administración de LAL exógena

[0059] La descripción proporciona procedimientos de tratamiento de pacientes humanos con LAL exógena que comprende administrar LAL exógena al paciente, en los que la administración es suficiente para restaurar el crecimiento, mejorar la función hepática, reducir daños en el hígado, aumentar los niveles tisulares de LAL, y/o aumentar la actividad de LAL en el paciente. La descripción proporciona frecuencias útiles y previamente no caracterizadas de la administración (es decir, programas de dosificación) de LAL exógena para tratar afecciones derivadas de la deficiencia en LAL, incluyendo WD y CESD, así como las cantidades de dosificación previamente no caracterizadas para el tratamiento de estas afecciones.

[0060] La descripción proporciona una dosis terapéuticamente eficaz de LAL exógena a administrar a un paciente entre una vez cada 5 días y una vez cada 30 días durante un período de tiempo determinado por un profesional experto en la técnica de las ciencias médicas. En un caso, el período de tiempo será el resto del período de vida del paciente. En un caso, la frecuencia de dosificación es de entre una vez cada 5 días y una vez cada 25 días. En un caso, la frecuencia de dosificación es de entre una vez cada 5 días y una vez cada 21 días. En otro ejemplo, la frecuencia de dosificación es de entre una vez cada 7 días y una vez cada 14 días. La LAL exógena se puede administrar una vez cada 5 días, una vez cada 6 días, una vez cada 7 días, una vez cada 8 días, una vez cada 9 días, una vez cada 10 días, una vez cada 11 días, una vez cada 12 días, una vez cada 13 días, o una vez cada 14 días. En algunos casos, la LAL exógena se administra aproximadamente semanalmente. En otros casos, la LAL exógena se administra aproximadamente cada dos semanas. En un caso, la frecuencia de dosificación es de aproximadamente una vez cada 30 días.

[0061] Para el tratamiento de una afección, en general, la cantidad de LAL exógena administrada puede variar dependiendo de factores conocidos, tales como la edad, salud y peso del receptor, tipo de tratamiento concurrente, frecuencia del tratamiento, y similares. Habitualmente, una dosificación de principio activo puede ser de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal. En un caso, la dosis de LAL exógena según la descripción es de aproximadamente 0,1 a 0,5 mg por kilogramo de peso corporal. En un caso, la dosis es de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5,0 mg por kilogramo. En un caso, la dosis es de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5,0 mg por kilogramo. En un caso, la dosis es de aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,25, aproximadamente 0,30, aproximadamente 0,35, aproximadamente 0,40, aproximadamente 0,45, aproximadamente 0,50 mg por kilogramo. En un caso, la dosis es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5 mg por kilogramo. En un caso, la dosis es de aproximadamente 1 mg por kilogramo. En un caso, la dosis es de aproximadamente 3 mg por kilogramo. Por ejemplo, puede administrarse 0,1 mg por kilogramo de peso corporal, 0,2 mg por kilogramo de peso corporal, 0,3 mg por kilogramo de peso corporal, 0,4 mg por kilogramo de peso corporal, 0,5 mg por kilogramo de peso corporal, 1 mg por kilogramo de peso corporal, 2 mg por kilogramo de peso corporal, 3 mg por kilogramo de peso corporal, 4 mg por kilogramo de peso corporal, o 5 mg por kilogramo de peso corporal. En un caso, la dosis es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 20 mg por kilogramo de peso corporal.

[0062] La descripción también incluye otras dosis cuando se emplea el programa de dosificación de la descripción. Por ejemplo, según un programa de dosificación de la descripción se administra a un paciente entre aproximadamente 0,1

mg y aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal.

5 **[0063]** En algunos casos, se administran aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50 mg de LAL exógena, por ejemplo, a un paciente con la enfermedad de Wolman a la edad de entre 1 mes y 24 meses. En un caso, el paciente es menor de 1 año de edad. En otro caso, el paciente tiene menos de 2 años de edad. En algunos casos, se administra al paciente con enfermedad de Wolman aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 0,2 mg, aproximadamente 0,3 mg, aproximadamente 0,4 mg, aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 40 mg, o aproximadamente 45 mg de LAL exógena. En algunos casos, se administra al paciente con enfermedad de Wolman de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 30 mg, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mg, o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 mg. En algunos casos, se administran de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 mg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg.

15 **[0064]** En algunos casos, se administran de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 350 mg de LAL exógena, por ejemplo, a un paciente diagnosticado con CESD. De este modo, en algunos casos, se administra al paciente con CESD aproximadamente 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, ó 350 mg de LAL exógena. En algunos casos, se administran al paciente con CESD de aproximadamente 5 a aproximadamente 350 mg, de aproximadamente 5 a aproximadamente 300 mg, de aproximadamente 5 a aproximadamente 250 mg, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 mg. En algunos casos, se administran al paciente con CESD de aproximadamente 10 a aproximadamente 350 mg, de aproximadamente 10 a aproximadamente 300, de aproximadamente 10 a aproximadamente 250, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 mg.

25 **Tratamientos de combinación**

[0065] Las proteínas terapéuticas descritas en este documento pueden usarse en combinación con otros agentes terapéuticos. La descripción proporciona un procedimiento de tratamiento previo para minimizar o prevenir cualquier reacción anafiláctica potencial que puede incurrir por la administración de LAL exógena según la descripción. En un caso, para pretratar una reacción anafiláctica potencial, se administra al paciente un antagonista del receptor H-1, también conocido como un antihistamínico (por ejemplo, difenhidramina). En un caso, el antagonista del receptor H-1 se administra en una dosis de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal. Por ejemplo, puede administrarse un antihistamínico en una dosis de aproximadamente 5 mg por kilogramo. La administración del antihistamínico puede ser antes de la administración de LAL exógena según la descripción. En un caso, el antagonista del receptor H-1 se administra de aproximadamente 10 a aproximadamente 90 minutos, por ejemplo, de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 minutos antes de la administración de LAL exógena. El antagonista del receptor H-1 se puede administrar utilizando un sistema ambulatorio conectado a un puerto de acceso vascular. En un caso, el antihistamínico se administra aproximadamente 90 minutos antes de la administración de LAL exógena. En un caso, el antihistamínico se administra entre aproximadamente 10 y aproximadamente 60 minutos antes de la administración de LAL exógena. En otro caso, el antihistamínico se administra entre aproximadamente 20 y aproximadamente 40 minutos antes de la administración de LAL exógena. Por ejemplo, el antihistamínico puede administrarse 20, 25, 30, 35, ó 40 minutos antes de la administración de LAL exógena. En un caso, el antihistamínico administrado es difenhidramina. Puede utilizarse cualquier antihistamínico útil. Dichos antihistamínicos incluyen, sin limitación, clemastina, doxilamina, loratadina, desloratadina, fexofenadina, feniramina, cetirizina, ebastina, prometazina, clorfeniramina, levocetirizina, olopatadina, quetiapina, meclizina, dimenhidrinato, embramina, dimetideno y dexclorfeniramina.

50 **[0066]** En un caso, el antihistamínico se administra en una dosis de entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal. En un caso, el antihistamínico se administra en una dosis entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 5 mg por kilogramo de peso corporal. Por ejemplo, la dosis puede ser de 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg o 5 mg por kilogramo de peso corporal. El antihistamínico puede administrarse mediante cualquier procedimiento útil. En un caso, el antihistamínico se administra por vía intravenosa. En otro caso, el antihistamínico se administra en cápsulas farmacéuticamente aceptables.

55 **[0067]** En otro caso, con referencia a la infusión intravenosa, el potencial de reacciones anafilácticas se puede reducir mediante la administración de las infusiones utilizando un protocolo de rampa en ascenso. En este contexto, un protocolo de rampa en ascenso se refiere a aumentar lentamente la tasa de infusión en el transcurso de la infusión con el fin de desensibilizar al paciente a la infusión de la medicación.

60 **[0068]** También se pueden administrar inmunosupresores, tales como, pero sin limitación, antihistamínicos, corticosteroides, sirolimus, voclosporina, ciclosporina, metotrexato, anticuerpos dirigidos a receptor de IL-2, anticuerpos dirigidos a receptores de células T, anticuerpos dirigidos TNF-alfa o proteínas de fusión (por ejemplo, infliximab, etanercept, o adalimumab), CTLA-4-Ig (por ejemplo, abatacept), anticuerpos anti-OX-40, antes, durante, o después de la administración de LAL exógena, por ejemplo, si se espera o experimenta una reacción anafiláctica o respuesta inmune adversa por un paciente.

[0069] La descripción también abarca tratamiento que implica la administración de composiciones que contienen LAL exógena en combinación con uno o más agentes reductores del colesterol (por ejemplo, inhibidores de la HMG-CoA reductasa). Los ejemplos no limitantes de dichos agentes incluyen: atorvastatina (Lipitor® y Torvast®), fluvastatina (Lescol®), lovastatina (Mevacor®, Altocor®, Altoprev®, pitavastatina (Livalo®, Pitava®), pravastatina (Pravachol®, Selektine®, Lipostat®), rosuvastatina (Crestor®), y simvastatina (Zoeor®, Lipex®).

Efectos de LAL exógena

[0070] La presente descripción proporciona una corrección o normalización de los síntomas relacionados con la enfermedad después del tratamiento con LAL exógena. La progresión clínica (es decir, la mejora de la afección) en respuesta a LAL exógena se puede controlar mediante cualquier método o procedimiento útil.

[0071] En algunos casos, la administración de LAL exógena es suficiente para alcanzar una Cmax de aproximadamente 200 ng/ml a aproximadamente 1.500 ng/mL. En algunos casos, la administración de LAL exógena es suficiente para alcanzar una Cmax de aproximadamente 200 ng/ml a aproximadamente 1.000 ng/mL. En algunos casos, la administración de LAL exógena es suficiente para alcanzar una Cmax de aproximadamente 200 ng/ml a aproximadamente 800 ng/mL. En algunos casos, la administración de LAL exógena es suficiente para alcanzar una Cmax de aproximadamente 200 ng/ml, aproximadamente 300 ng/ml, aproximadamente 400 ng/ml, aproximadamente 500 ng/ml, aproximadamente 600 ng/ml, aproximadamente 700 ng/ml, aproximadamente 800 ng/ml, aproximadamente 900 ng/ml, aproximadamente 1.000 ng/ml, aproximadamente 1.250 ng/ml, o aproximadamente 1.500 ng/mL. En algunos casos, la Cmax se alcanza durante la infusión.

[0072] En algunos casos, la administración de LAL exógena es suficiente para conseguir una semivida de LAL ($t_{1/2}$) que es menor de 40 minutos. En algunos casos, la administración de LAL exógena es suficiente para conseguir una semivida de LAL ($t_{1/2}$) que es menor de 30 minutos. En algunos casos, la administración de LAL exógena es suficiente para conseguir una semivida de LAL ($t_{1/2}$) que es menor de 20 minutos. En algunos casos, la administración de LAL exógena es suficiente para conseguir una semivida de LAL ($t_{1/2}$) que es menor de 15 minutos. En algunos casos, la administración de LAL exógena es suficiente para conseguir una semivida de LAL ($t_{1/2}$) que es menor de 10 minutos. En algunos casos, la administración de LAL exógena es suficiente para conseguir una semivida de LAL ($t_{1/2}$) de aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, ó 40 minutos.

[0073] En algunos casos, la LAL exógena aumenta la actividad de LAL en un paciente. La actividad de LAL se puede aumentar, por ejemplo, en el hígado, el bazo, los ganglios linfáticos, la aorta, leucocitos de sangre periférica, y/o fibroblastos de la piel. En algunos casos, la actividad de LAL se mide en los extractos de linfocitos aislados de muestras de sangre.

[0074] La LAL exógena puede aumentar la actividad de LAL hasta al menos aproximadamente 1,5, aproximadamente 2, aproximadamente 2,5, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, o aproximadamente 20 veces la actividad antes de la administración de LAL. La LAL exógena puede aumentar la actividad de LAL hasta al menos aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20 veces la actividad antes de la administración de LAL. La actividad de LAL se puede evaluar usando procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, ensayos usando los sustratos [$1-^{14}C$]oleato de colesterilo, trioleína (tri[$1-^{14}C$]oleato de glicerol), miristato de p-nitrofenilo o 4-MUO (oleato de 4-metilumbeliferilo).

[0075] En un caso, se emplea el volumen y caracterización de órganos y tejido para determinar la mejora de la afección después de la administración de LAL exógena según la presente descripción.

[0076] En un caso, la progresión clínica en la función/lesión hepática después de la administración de LAL exógena está controlada por la cuantificación de transaminasas de la sangre, tales como ácido aspártico aminotransferasa (AST) y/o alanina transaminasa (ALT), y/o otros biomarcadores, tales como albúmina, fosfatasa alcalina y bilirrubina (directa y total), con el tiempo.

[0077] En un caso, la progresión clínica se controla usando la tecnología de imágenes. Por ejemplo, y sin limitación, la tecnología de la imagen usada puede ser ultrasonido, tomografía computarizada, resonancia magnética y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

[0078] En algunos casos, la administración de LAL exógena con las dosis descritas en este documento es suficiente para restablecer el crecimiento y/o aumentar el peso corporal en pacientes humanos. La administración de LAL exógena también puede aumentar la tasa de crecimiento (es decir, aumento del peso corporal) en un bebé o un paciente niño que padece deficiencia en LAL de aparición temprana. Por ejemplo, la administración de LAL exógena puede aumentar la tasa de aumento del peso corporal en al menos aproximadamente el 10%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 100%,

aproximadamente el 200%, aproximadamente el 300%, aproximadamente el 400%, o aproximadamente 500% de la tasa/velocidad de crecimiento observada antes de la administración. En algunos casos, la administración de LAL exógena restablece la tasa de crecimiento normal en un paciente niño que padece de deficiencia en LAL de aparición temprana (por ejemplo, Enfermedad de Wolman), cuya edad está entre aproximadamente 1 mes y aproximadamente 24 meses. "Normal" en este contexto se refiere a la tasa de crecimiento normal para el paciente que está siendo tratado determinado por un médico con experiencia ordinaria en la técnica de las ciencias médicas.

[0079] En un caso, por ejemplo, con referencia a WD y CESD u otras deficiencias en LAL, la hepatomegalia se invierte significativamente regresando el tamaño del hígado a un tamaño de que está dentro de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 60% más grande que el normal. "Normal" en este contexto se refiere a un hígado de tamaño normal para el paciente que está siendo tratado según lo determinado por un médico con experiencia ordinaria en la técnica de las ciencias médicas. En un caso, el tamaño del hígado se reduce a entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 50% mayor de lo normal. En otro caso, el tamaño del hígado se reduce a entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 40% mayor de lo normal. En un caso, el tamaño del hígado se reduce a entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 30% mayor de lo normal. En otro caso, el tamaño del hígado se reduce a entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 20% mayor de lo normal. En otro ejemplo, el tamaño del hígado se reduce a entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 20% mayor de lo normal. Por ejemplo, el hígado puede ser un 10%, 11%, 12% 13% 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, o 20% mayor que el tamaño normal. En todavía otro caso, el tamaño del hígado se reduce a entre aproximadamente un 0% y aproximadamente un 10% mayor de lo normal. Por ejemplo, el hígado puede ser un 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, o 10% mayor que el tamaño normal del hígado.

[0080] El tratamiento con LAL exógena también puede mejorar la función hepática. De este modo, en algunos casos, el tratamiento con LAL exógena es suficiente para restaurar la función normal del hígado y/o normalizar las pruebas hepáticas. En algunos casos, el tratamiento con LAL exógena es suficiente para disminuir los niveles séricos de transaminasas hepáticas, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 20%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, y/o a al menos aproximadamente el 90%. En un caso, el tratamiento con LAL exógena es suficiente para disminuir los niveles séricos de transaminasas hepáticas en al menos aproximadamente el 40%. En un caso, el tratamiento con LAL exógena es suficiente para disminuir los niveles séricos de transaminasas hepáticas en al menos aproximadamente el 50%. En un caso, el tratamiento con LAL exógena es suficiente para disminuir los niveles séricos de transaminasas hepáticas en al menos aproximadamente el 60%. En un caso, el tratamiento con LAL exógena es suficiente para disminuir los niveles séricos de transaminasas hepáticas en al menos aproximadamente el 70%. En un caso, el tratamiento con LAL exógena es suficiente para disminuir los niveles séricos de transaminasas hepáticas en al menos aproximadamente el 80%. En un caso, el tratamiento con LAL exógena es suficiente para disminuir los niveles séricos de transaminasas hepáticas en al menos aproximadamente el 90%.

[0081] En algunos casos, la transaminasa hepática es la alanina aminotransferasa (ALT). En un caso, la administración de LAL exógena es suficiente para reducir la ALT sérica. Por ejemplo, la administración de LAL exógena puede reducir la ALT en suero, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 50%, 60%, 70%, 80% ó 90%. El nivel de ALT en suero puede servir como una indicación de daño hepático. Por lo tanto, la presente descripción también contempla procedimientos para reducir la lesión hepática en un paciente humano que padece deficiencia en LAL mediante la administración de una cantidad eficaz de LAL exógena para reducir la ALT en suero.

[0082] En algunos casos, la transaminasa hepática es aspartato transaminasa en suero (AST). En un caso, la administración de LAL exógena es suficiente para reducir la AST en suero. Por ejemplo, la administración de LAL exógena puede reducir la AST en suero, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 50%, 60%, 70%, 80% ó 90%. El nivel de AST en suero puede servir como una indicación de daño hepático. Por consiguiente, la presente descripción también contempla un procedimiento para reducir la lesión hepática en un paciente que padece deficiencia en LAL mediante la administración de una cantidad eficaz de LAL exógena para reducir la AST en suero.

[0083] En algunos casos, el tratamiento con LAL exógena puede disminuir los niveles de ferritina en suero. Por lo tanto, en algunos casos, el tratamiento con LAL exógena es suficiente para disminuir la ferritina sérica, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ó 95% en comparación con los niveles de pretratamiento. En un caso, el tratamiento con LAL exógena es suficiente para disminuir los niveles séricos de ferritina en al menos el 50%. En otro caso, el tratamiento con LAL exógena es suficiente para disminuir los niveles séricos de ferritina en al menos aproximadamente el 60%. En un caso, el tratamiento con LAL exógena es suficiente para disminuir los niveles séricos de ferritina en al menos aproximadamente el 70%. En un caso, el tratamiento con LAL exógena es suficiente para disminuir los niveles séricos de ferritina en al menos aproximadamente el 80%. En un caso, el tratamiento con LAL exógena es suficiente para disminuir los niveles séricos de ferritina en al menos aproximadamente el 90%. En un caso, el tratamiento con LAL exógena es suficiente para disminuir los niveles séricos de ferritina en al menos aproximadamente el 95%.

[0084] En un caso, por ejemplo, con referencia a la enfermedad de Wolman y CESD u otras deficiencias en LAL, la esplenomegalia se invierte significativamente regresando el tamaño del bazo a un tamaño de que está dentro de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 60% más grande que el normal. "Normal" en este contexto se refiere a

un bazo de tamaño normal para el paciente que está siendo tratado según lo determinado por un médico con experiencia ordinaria en la técnica de las ciencias médicas. En un caso, el tamaño del bazo se reduce a entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 50% mayor de lo normal. En otro caso, el tamaño del bazo se reduce a entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 40% mayor de lo normal. En un caso, el tamaño del bazo se reduce a entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 30% mayor de lo normal. En otro caso, el tamaño del bazo se reduce a entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 20% mayor de lo normal. En otro ejemplo, el tamaño del bazo se reduce a entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 20% mayor de lo normal. Por ejemplo, el bazo puede ser un 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, ó 20% mayor que el tamaño normal. En todavía otro caso, el tamaño del bazo se reduce a entre aproximadamente un 0% y aproximadamente un 10% mayor de lo normal. Por ejemplo, el bazo puede ser un 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, o 10% mayor que el tamaño normal del bazo.

[0085] En un caso, la administración de LAL exógena es suficiente para disminuir la linfadenopatía (es decir, los ganglios linfáticos agrandados). Por lo tanto, en algunos casos, los ganglios linfáticos se reducen hasta aproximadamente un tamaño de que está dentro de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 60% más grande que el normal. "Normal" en este contexto se refiere a los ganglios linfáticos de tamaño normal para el paciente que está siendo estudiado según lo determinado por un médico con experiencia ordinaria en la técnica de las ciencias médicas. En un caso, el tamaño de los ganglios linfáticos se reduce entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 50% mayor de lo normal. En otro caso, el tamaño de los ganglios linfáticos se reduce entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 40% mayor de lo normal. En un caso, el tamaño de los ganglios linfáticos se reduce entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 30% mayor de lo normal. En otro caso, el tamaño de los ganglios linfáticos se reduce entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 20% mayor de lo normal. En otro caso, el tamaño de los ganglios linfáticos se reduce entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 20% mayor de lo normal. Por ejemplo, los ganglios linfáticos pueden ser un 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, o 20% mayor que el tamaño normal. En todavía otro ejemplo, el tamaño de los ganglios linfáticos se reduce entre aproximadamente un 0% y aproximadamente un 10% mayor de lo normal. Por ejemplo, el ganglio linfático puede ser un 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, ó 10% más grande que el tamaño normal de los ganglios linfáticos. En otro caso, se lleva a cabo un análisis de lípidos para controlar la mejora de la afección. Por ejemplo, el análisis de lípidos se puede hacer para evaluar el efecto terapéutico de la LAL exógena. El análisis de lípidos puede llevarse a cabo en una muestra de tejido de un paciente (por ejemplo, una muestra de sangre, muestra de biopsia de hígado) mediante cualquier procedimiento útil, tal como, pero sin limitación, cromatografía líquida de alto rendimiento, cromatografía de gases, espectroscopía de masas, o cromatografía de capa fina, o cualquier combinación de las mismas según se considere apropiado por un experto en la técnica. En un caso, los análisis de lípidos realizados según la descripción demuestran niveles totales de colesterol, triglicéridos, lipoproteínas de baja densidad, lipoproteínas de alta densidad y/o éster de colesterol.

[0086] En un caso, por ejemplo, con referencia a la enfermedad de Wolman y CESD u otras deficiencias en LAL, el análisis de lípidos de un paciente tratado según la descripción muestra una normalización de las concentraciones de lípidos en el hígado, bazo, intestino, ganglios linfáticos, y/o aorta como puede determinarse por un médico con experiencia ordinaria en el campo de las ciencias médicas.

[0087] Los niveles de lípidos pueden evaluarse utilizando los análisis de lípidos en plasma o los análisis de lípidos en tejido. En el análisis de lípidos en plasma, el plasma sanguíneo se puede recoger, y pueden medirse los niveles plasmáticos de colesterol libre total utilizando, por ejemplo, ensayos colorimétricos con un kit de COD-PAP (Wako Chemicals), los triglicéridos plasmáticos totales pueden medirse utilizando, por ejemplo, un kit de Triglicéridos/GB (Boehringer Mannheim), y/o el colesterol total en plasma se puede determinar usando un kit de colesterol/HP (Boehringer Mannheim). En el análisis de lípidos en tejidos, los lípidos se pueden extraer, por ejemplo, de hígado, bazo, y/o muestras de intestino delgado (por ejemplo, usando el procedimiento de Folch proporcionado en Folch et al J. Biol Chem 226: 497-505 (1957)). Las concentraciones de colesterol total en tejido se pueden medir, por ejemplo, usando O-falaldehído.

[0088] En algunos casos, la administración de LAL exógena es suficiente para aumentar la absorción de nutrientes. En un caso, la administración exógena de LAL aumenta la absorción de nutrientes medida por los niveles de alfa tocoferol sérico, 25OH vitamina D, retinol sérico, dideshidoretinol o transtiretina.

[0089] En algunos casos, por ejemplo con referencia a WD y CESD u otras deficiencias en LAL, la administración de LAL exógena es suficiente para aumentar los niveles de hemoglobina (Hb) en suero. En un caso, el nivel de hemoglobina se incrementa al menos aproximadamente el 10% o aproximadamente el 20% en comparación con el observado antes de la administración con LAL exógena.

[0090] En algunos casos, la LAL exógena se puede administrar usando procedimientos para minimizar los efectos secundarios. Por ejemplo, la administración de LAL exógena puede minimizar la respuesta inmune a la LAL exógena.

LAL y composiciones farmacéuticas que comprenden LAL exógena

[0091] La presente descripción abarca el tratamiento de cualquiera de las afecciones relacionadas con la deficiencia en

LAL aquí descritas y otras afecciones no mencionadas anteriormente, pero que se beneficiarían del tratamiento. La LAL exógena utilizada según la descripción incluye LAL recombinante que se puede producir en cualquier sistema útil de expresión de proteínas, incluyendo, sin limitación, cultivo celular (por ejemplo, células CHO, células COS), bacterias tales como *E. coli*, animales transgénicos, tales como mamíferos y aves (por ejemplo, pollos, patos y pavos) y en sistemas vegetales (por ejemplo, lentejas de agua y plantas de tabaco). Un aspecto de la descripción se refiere a LAL recombinante producida según la Patente de Estados Unidos N° 7.524.626, concedida el 3 de octubre de 2006, las solicitudes de patente de Estados Unidos n° 11/973.853, presentada el 10 de octubre de 2007; 11/978.360, presentada el 29 de octubre de 2007; y 12/319.396, presentada el 7 de enero de 2009. Un aspecto de la descripción se refiere a LAL recombinante producida tal como se describe en Du et al., (2005) Am. J. Hum. Genet. 77: 1061-1074, y Du et al, (2008) J. Lipid Res, 49: 1646-1657. En un caso útil, la LAL exógena se produce en el oviducto de un ave transgénica (por ejemplo, un pollo transgénico), por ejemplo, según un procedimiento descrito en WO2011/133960, presentada el 23 de abril de 2011. En algunos casos, la LAL recombinante se produce en una línea celular aviar. En algunos casos, la LAL recombinante se produce en una línea celular de mamífero (por ejemplo, humana).

[0092] La lipasa ácida lisosomal exógena utilizada según la presente invención contiene glicanos que tienen estructuras sustanciales unidas por N terminadas en N-acetilglucosamina (GlcNAc) y manosa. Los glicanos terminados en GlcNAc y manosa en LAL exógena pueden ser reconocidos específicamente e internalizados por los macrófagos y fibroblastos. La manosa-6-fosfato (M6P), que puede dirigir proteínas a los receptores de manosa/GlcNAc que se expresan en las células implicadas en afecciones tratables por la administración de LAL exógena, también está presente habitualmente en LAL exógena utilizada según la presente descripción.

[0093] Habitualmente, la LAL exógena discutida y descrita aquí es LAL humana. En un caso, la LAL exógena tiene la secuencia de aminoácidos proporcionada en GenBank RefSeq NM_000235.2). En un caso, la LAL exógena madura tiene la secuencia de aminoácidos:

SGGKLTAVDPETNMNVSEIISYWGFPSSEYLVETEDGYILCLNRIPHGRKN
HSDKGPKPVVFLQHGLLADSSNWVTNLANSLSLGFILADAGFDVWMGNSR
GNTWSRKHKTLVSQDEFWAFSYDEMAKYDLPASINFILNKGTGQEQVYY
VGHSQGTIGFIAFSQIPELAKRIKMFFALGPVASVAFCTSPMAKLGRLPD
HLIKDLFGDKEFLPQSAFLKWLGHVCTHVILKELCGNLCFLLCGFNERN
LNMSRVDVYTTTHSPAGTSVQNMLHWSQAVKFKQKFAFDWGSSAKNYF
HYNQSYPTYNVKDMLVPTAVWSSGGHDWLADVVDVNILLTQITNLVFH
ESIPEWEHLDFIWGLDAPWRLYNKIINLMRKYQ (SEQ ID NO:1)

[0094] En algunos casos, la LAL exógena comprende los aminoácidos 1 a 378 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 3-378 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 6-378 de la SEQ ID NO: 1, o aminoácidos 7-378 de la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la LAL exógena comprende una mezcla de al menos dos polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en los aminoácidos 1 a 378 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 3-378 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 6-378 de la SEQ ID NO: 1, y los aminoácidos 7-378 de la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la LAL exógena comprende una mezcla de un polipéptido que comprende los aminoácidos 1 a 378 de la SEQ ID NO: 1, un polipéptido que comprende los aminoácidos 3-378 de la SEQ ID NO: 1, y un polipéptido que comprende los aminoácidos 6-378 de la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la LAL exógena comprende un polipéptido que es idéntico a los aminoácidos 1 a 378 de la SEQ ID NO: 1, los aminoácidos 3-378 de la SEQ ID NO: 1, los aminoácidos 6-378 de la SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 7-378 de la SEQ ID NO: 1. En otros casos, la LAL exógena comprende un polipéptido que es al menos aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, o aproximadamente el 99% idéntica a los aminoácidos 1 a 378 de la SEQ ID NO: 1, los aminoácidos 3-378 de la SEQ ID NO: 1, los aminoácidos 6-378 de la SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 7-378 de la SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la LAL exógena comprende un polipéptido que es un fragmento funcional de SEQ ID NO: 1 o es al menos aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, o aproximadamente el 99% idéntica a un fragmento funcional de SEQ ID NO: 1.

[0095] En algunos casos la LAL exógena es una proteína LAL recombinante descrita en el documento PCT/US2011/033699, presentada el 23 de abril de 2011.

5 **[0096]** Se reconoce que las posiciones de aminoácidos que no son idénticas a menudo difieren en sustituciones conservadoras de aminoácidos, donde se sustituyen residuos de aminoácidos por otros residuos de aminoácidos con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad) y por lo tanto no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia puede ser ajustarse al alza para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por los expertos en la técnica. La puntuación de las sustituciones conservadoras se puede calcular según, por ejemplo, el algoritmo de Meyers y Miller, *Computer Applic. Biol. Sci.* 4: 11-17 (1988).

15 **[0097]** Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento de posiciones contiguas, por ejemplo, tal como entre aproximadamente 25 y aproximadamente 400 posiciones, o entre aproximadamente 50 y 200 posiciones, o entre aproximadamente 100 y 150 posiciones, sobre la que puede compararse una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que alinear las dos secuencias de manera óptima. Los procedimientos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de secuencias para comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante un algoritmo de homología local (Smith y Waterman, *Adv Appl Math* 2: 482 (1981), mediante un algoritmo de alineación global (Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), mediante procedimientos de búsqueda de similitud (Pearson y Lipman, *Proc Natl Acad Sci USA.* 85: 2444 (1988); Altschul et al, *Nucl Acids Res* 25:3389-402 (1997), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (por ejemplo, GAP, BESTFIT, FASTA y BLAST en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), habitualmente utilizando la configuración predeterminada, o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al. (eds.), 1994). Por ejemplo, las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos que son idénticas en más de un 80% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma.

30 **[0098]** Un ejemplo de una implementación del algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de secuencias múltiples a partir de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineaciones por pares progresivas. También puede trazar un dendrograma que muestra las relaciones de agrupamiento utilizadas para crear la alineación. PILEUP utiliza una simplificación del procedimiento de alineación progresiva de Feng y Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35: 351-360 (1987). El procedimiento utilizado es similar al procedimiento descrito por Higgins y Sharp, *CABIOS* 5: 151-3 (1989). El procedimiento de alineación múltiple comienza con la alineación por pares de las dos secuencias más similares, produciendo un grupo de dos secuencias alineadas. Este grupo puede alinearse a continuación a la siguiente secuencia o grupo de secuencias alineadas más relacionadas. Pueden alinearse dos grupos de secuencias mediante una simple extensión de la alineación por pares de dos secuencias individuales. Una serie de dichas alineaciones por pares que incluye secuencias y grupos de secuencias cada vez más diferentes en cada iteración produce la alineación final.

40 **[0099]** En algunos casos, los polipéptidos de LAL exógena de la invención incluyen variantes de las secuencias de tipo salvaje. Estas variantes se dividen en una o más de tres clases: variantes por sustitución, inserción, o delección. Estas variantes pueden ser variantes alélicas de origen natural o variantes entre especies o pueden prepararse mediante mutagénesis específica de sitio de nucleótidos en el ADN que codifica la proteína. La mutagénesis específica de sitio se puede realizar utilizando mutagénesis de cassette o por PCR u otras técnicas bien conocidas en el sector para producir ADN que codifica la variante y, posteriormente, que expresa el ADN en un cultivo celular recombinante. Los fragmentos de proteína diana variante que tienen hasta aproximadamente 100-150 residuos de aminoácidos se pueden preparar mediante síntesis *in vitro* utilizando técnicas establecidas. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica (Henikoff y Henikoff, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 89: 10915-10919 (1992)).

50 **[0100]** Las sustituciones de aminoácidos son habitualmente de residuos individuales. Las inserciones normalmente serán del orden de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 aminoácidos, aunque pueden tolerarse inserciones considerablemente más largas. Las delecciones varían de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 residuos, aunque en algunos casos, las delecciones pueden ser mucho más largas. Las sustituciones, delecciones e inserciones o cualquier combinación de las mismas se pueden utilizar para llegar a un derivado final.

55 **[0101]** En algunos casos, la LAL exógena tiene una actividad específica de al menos aproximadamente 100 U/mg. En algunos casos, la LAL exógena tiene una actividad específica de al menos aproximadamente 200 U/mg. En algunos casos, la LAL exógena tiene una actividad específica de al menos aproximadamente 250 U/mg. En algunos casos, la LAL exógena tiene una actividad específica de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000 U/mg. En algunos casos, la LAL exógena tiene una actividad específica de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 U/mg. En algunos casos, la LAL exógena tiene una actividad específica de aproximadamente 100 a aproximadamente 350 U/mg. En algunos casos, la LAL exógena tiene una actividad específica de aproximadamente 200 a aproximadamente 350 U/mg. En algunos casos, la LAL exógena tiene una actividad específica de aproximadamente 250 a aproximadamente 350 U/mg. En algunos casos, la LAL exógena tiene una actividad específica de aproximadamente 250 U/mg. En algunos casos, la LAL exógena tiene una actividad específica de aproximadamente 275 U/mg. En algunos casos, la LAL exógena tiene una actividad específica de aproximadamente 300 U/mg. La LAL humana tiene 6 sitios potenciales en su

5 secuencia de aminoácidos para la glicosilación unida a N: Asn15, Asn51, Asn80, Asn140, Asn252 y Asn300, tal como se establece en SEQ ID NO: 1, Asn15, Asn51, Asn80, Asn140, Asn252 y Asn300 están glicosilados. En algunas realizaciones y casos, Asn51 no está glicosilado. En algunos casos, las estructuras de N-glicano comprenden estructuras con dos, tres y cuatro antenas con N-acetilglucosamina (GlcNAc), manosa, y/o manosa-6-fosfato (M6P). La LAL exógena comprende N-glicanos que contienen M6P en Asn80, Asn140 y Asn252. En algunas realizaciones y casos, la LAL exógena no comprende glicanos unidos a O. En algunas realizaciones y casos, la LAL exógena no comprende ácido siálico.

10 [0102] En algunos casos, el peso molecular de la LAL exógena es de aproximadamente 55 kD.

15 [0103] En ciertos casos, un sujeto se puede tratar con una molécula de ácido nucleico que codifica LAL exógena, por ejemplo, en un vector. Las dosis para los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos varían de aproximadamente 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1 µg a 10 mg, o 30-300 µg de ADN por paciente. Las dosis para vectores virales infecciosos varían de 10 a 100, o más, viriones por dosis.

20 [0104] En algunos casos de la presente descripción la LAL exógena se administra en un procedimiento de tratamiento que incluye: (1) transformar o transfectar una célula huésped implantable con un ácido nucleico, por ejemplo, un vector, que expresa LAL o un fragmento activo, variante, o derivado de la misma; y (2) implantar la célula huésped transformada en un mamífero. En algunos casos de la descripción, la célula huésped implantable se extrae de un mamífero, de manera temporal se cultiva, transforma o transfecta con un ácido nucleico aislado que codifica LAL exógena, y se implanta de nuevo en el mismo mamífero del que se extrajo. La célula puede ser, pero no se requiere que sea, extraída del mismo sitio en el que se implanta. Dichos casos, a veces conocidos como terapia génica *ex vivo*, pueden proporcionar un suministro continuo del polipéptido de LAL exógena, durante un período limitado de tiempo.

25 [0105] Aunque es posible para la proteína terapéutica provista en esta descripción, administrar LAL recombinante en forma cruda, es preferible administrar la proteína terapéutica como parte de una formulación farmacéutica.

30 [0106] La descripción de este modo proporciona además formulaciones farmacéuticas que comprenden proteínas terapéuticas glicosiladas derivadas de aves o un derivado farmacéuticamente aceptable de las mismas junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables de las mismas y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos y procedimientos de administración de dichas formulaciones farmacéuticas. La descripción también proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden proteínas terapéuticas glicosiladas derivadas de mamíferos o un derivado farmacéuticamente aceptable de las mismas junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables de las mismas y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos y procedimientos de administración de dichas formulaciones farmacéuticas.

35 [0107] El portador o portadores deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el receptor de los mismos. Los procedimientos de tratamiento de un paciente (por ejemplo, cantidad de proteína farmacéutica administrada, frecuencia de administración y duración del período de tratamiento) utilizando composiciones farmacéuticas de la presente descripción se pueden determinar usando metodologías estándar conocidas por los médicos expertos en la técnica.

40 [0108] Las formulaciones farmacéuticas incluyen las adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sub-lingual), vaginal o parenteral. Las formulaciones farmacéuticas incluyen las adecuadas para la administración por inyección, incluyendo la administración intramuscular, subcutánea e intravenosa. Las formulaciones farmacéuticas también incluyen aquellas para la administración por inhalación o insuflación. Las formulaciones pueden, cuando sea apropiado, presentarse convenientemente en unidades de dosificación discretas y pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en el campo de la farmacia. Los procedimientos de producción de las formulaciones farmacéuticas incluyen habitualmente la etapa de asociar las proteínas terapéuticas con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos y a continuación, si es necesario, conforma el producto en la formulación deseada.

45 [0109] Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral pueden presentarse convenientemente como unidades discretas, tales como cápsulas, píldoras o comprimidos, conteniendo cada una una cantidad predeterminada del principio activo; como un polvo o gránulos; como una solución; como una suspensión; o como una emulsión. El principio activo también puede presentarse como un bolo, electuario o pasta. Los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales, tales como agentes aglutinantes, cargas, lubricantes, disgregantes, o agentes humectantes. Los comprimidos se pueden revestir según procedimientos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o se pueden presentar como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles) o conservantes.

60 [0110] Las proteínas terapéuticas de la presente descripción también se pueden formular para administración parenteral (por ejemplo, por inyección, por ejemplo, inyección de bolo o infusión continua) y pueden presentarse en forma de

5 dosificación unitaria en ampollas, jeringas precargadas, infusión de pequeño volumen o en recipientes de múltiples dosis con un conservante añadido. Las proteínas terapéuticas se pueden inyectar mediante, por ejemplo, inyecciones subcutáneas, inyecciones intramusculares, e infusiones o inyecciones intravenosas (IV). En un caso, la LAL exógena se administra intravenosamente mediante infusión IV por cualquier procedimiento útil. En un ejemplo, la LAL exógena se puede administrar mediante infusión intravenosa a través de una línea periférica. En otro ejemplo, la LAL exógena se puede administrar mediante infusión intravenosa a través de un catéter central de inserción periférica. En otro ejemplo, la LAL exógena se puede administrar mediante infusión intravenosa facilitada por una máquina de infusión ambulatoria conectada a un puerto de acceso vascular venoso. En un caso, de la infusión intravenosa, el medicamento se administra durante un período de 1 a 8 horas, dependiendo de la cantidad de medicamento a ser infundido y del historial de reacciones relacionadas con infusiones previas del paciente, según se determina por un médico experto en la técnica. En otro caso, la LAL exógena se administra por vía intravenosa mediante inyección IV. En otro caso, la LAL exógena se puede administrar a través de inyección intraperitoneal. En todavía otro caso, la LAL exógena se administra a través de una cápsula farmacéuticamente aceptable de la proteína terapéutica. Por ejemplo, la cápsula puede ser una cápsula de gelatina con cubierta entérica.

15 [0111] En algunos casos, las proteínas terapéuticas se administran mediante infusión, y la infusión puede tener lugar durante un período de tiempo prolongado, por ejemplo, de 30 minutos a 10 horas. Por lo tanto, la infusión puede tener, por ejemplo, durante un período de aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, o aproximadamente 5 horas. La infusión también puede tener a diferentes tasas. De este modo, por ejemplo, la velocidad de infusión puede ser de aproximadamente 1 ml por hora a aproximadamente 20 ml por hora. En algunos casos, la velocidad de infusión es de 5 ml a 10 ml por hora. En un caso, la velocidad de infusión es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 ml por hora. En un caso, la velocidad de infusión es de 0,1 a 5 mg/kg/h. En un caso, la velocidad de infusión es de aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,5, aproximadamente 1,0, aproximadamente 1,5, aproximadamente 2,0, o aproximadamente 3 mg/kg/h.

20 [0112] Las proteínas terapéuticas pueden tomar formas, tales como suspensiones, soluciones, o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizadores y/o dispersantes. Las proteínas terapéuticas pueden estar en forma de polvo, obtenido por aislamiento aséptico de un sólido estéril o por liofilización a partir de la solución, para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril, libre de pirógenos, antes de su uso.

30 [0113] Para la administración tópica a la epidermis, las proteínas terapéuticas se pueden formular como pomadas, cremas o lociones, o como un parche transdérmico. Los ungüentos y cremas pueden formularse, por ejemplo, con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes adecuados. Las lociones pueden formularse con una base acuosa u oleosa y en general también contendrán uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizadores, agentes dispersantes, agentes espesantes, agentes de suspensión o agentes colorantes.

35 [0114] Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas de chupar que comprenden el principio activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un portador líquido adecuado. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración rectal en las que el portador es un sólido se representan más preferiblemente como supositorios en dosis unitaria. Los portadores adecuados incluyen manteca de cacao y otros materiales comúnmente usados en la técnica, y los supositorios pueden formarse convenientemente mediante mezcla del compuesto activo con el portador o portadores ablandados o fundidos, seguido por enfriamiento y conformación en moldes.

45 [0115] Las formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o pulverizadores que contienen, además del principio activo, potadores tales como se conocen en la técnica como apropiados.

50 [0116] Para la administración intranasal las proteínas terapéuticas de la invención se pueden utilizar como un pulverizador líquido o polvo dispersable o en forma de gotas.

55 [0117] Las gotas se pueden formular con una base acuosa o no acuosa que comprenden también uno o más agentes dispersantes, agentes solubilizantes o agentes de suspensión. Los pulverizadores líquidos se suministran convenientemente desde envases presurizados.

60 [0118] Para la administración por inhalación, las proteínas terapéuticas según la presente descripción pueden administrarse convenientemente desde un insuflador, nebulizador o un envase presurizado u otros medios convenientes de administración de un pulverizador de aerosol. Los envases presurizados pueden comprender un propelente adecuado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse disponiendo una válvula para suministrar una cantidad medida.

65 [0119] Para la administración por inhalación o insuflación, las proteínas terapéuticas según la presente descripción

5 pueden tomar la forma de una composición de polvo seco, por ejemplo, una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón. La composición en polvo puede presentarse en forma de dosificación unitaria en, por ejemplo, cápsulas o cartuchos o, por ejemplo, gelatina o envases blister de los cuales puede administrarse el polvo con la ayuda de un inhalador o insuflador. Cuando se desee, se pueden emplear formulaciones descritas anteriormente adaptadas para popocionar una administración sostenida del principio activo.

[0120] Las composiciones farmacéuticas según la presente descripción también pueden contener otros pincipios activos, tales como agentes antimicrobianos o conservantes.

10 [0121] En algunos casos, la concentración de LAL exógena en la composición farmacéutica es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mg/ml. En algunos casos, la concentración de LAL es de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/ml. En algunos casos, la concentración de LAL es de aproximadamente 1, aproximadamente 1,5, aproximadamente 2, aproximadamente 2,5, aproximadamente 3, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6, aproximadamente 6,5, o
15 aproximadamente 7,5 mg/ml.

[0122] En algunos casos, una composición farmacéutica que comprende LAL exógena comprende además un tampón. Los tampones de ejemplo incluyen tampones de acetato, fosfato, citrato y glutamato. Los tampones de ejemplo también incluyen citrato de litio, citrato de sodio, citrato de potasio, citrato de calcio, lactato de litio, lactato de sodio, lactato de potasio, lactato de calcio, fosfato de litio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, fosfato de calcio, maleato de litio, maleato de sodio, maleato de potasio, maleato de calcio, tartrato de litio, tartrato de sodio, tartrato de potasio, tartrato de calcio, succinato de litio, succinato de sodio, succinato de potasio, succinato de calcio, acetato de litio, acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de calcio, y mezclas de los mismos. En algunos casos, el tampón es dihidrato de citrato trisódico. En algunos casos, el tampón es monohidrato de ácido cítrico. En algunos casos, una composición
20 farmacéutica comprende dihidrato de citrato trisódico y monohidrato de ácido cítrico.

[0123] En algunos casos, una composición farmacéutica que comprende LAL exógena comprende además un estabilizador. Los estabilizadores de ejemplo incluyen albúmina, trehalosa, azúcares, aminoácidos, polioles, ciclodextrinas, sales, tales como cloruro de sodio, cloruro de magnesio y cloruro de calcio, lioprotectores, y mezclas de los mismos. En algunos casos, una composición farmacéutica que comprende albúmina de suero humano.
30

[0124] En un ejemplo específico, la LAL humana recombinante producida tal como se describe aquí, se emplea en una formulación farmacéutica en la que cada 1 mililitro contiene LAL exógena (por ejemplo, 2 mg de LAL), dihidrato de citrato trisódico (por ejemplo, 13,7 mg), monohidrato de ácido cítrico (por ejemplo, 1,57 mg), y albúmina de suero humano (por ejemplo, 10 mg), y se formula a un pH ácido, tal como $5,9 \pm 0,1$. La presente descripción abarca cualquier vía de administración que facilita la captación de LAL exógena en los lisosomas de órganos y tejidos pertinentes.
35

EJEMPLOS

40 [0125] Los siguientes ejemplos específicos están destinados a ilustrar la presente descripción.

Ejemplo 1

45 *Tratamiento de deficiencia en LAL de aparición temprana (Enfermedad de Wolman) mediante la administración de LAL recombinante*

[0126] A las 15 semanas de vida, un bebé de sexo masculino fue admitido en el hospital a causa del poco aumento de peso desde el nacimiento (peso al nacer, 3,88 kg). El bebé se presentó con vómitos, problemas de alimentación, mal estado nutricional, diarrea, aumento de la distensión abdominal y anemia. El paciente fue diagnosticado con la enfermedad de Wolman.
50

[0127] En el examen físico inicial, el paciente pesaba 5,62 kg colocándolo por debajo del 5^o percentil de peso para la edad. Durante las siguientes 4 semanas a partir del examen inicial a las 15 semanas de vida y antes de la infusión inicial a las 19 semanas de edad, el paciente no pudo ganar peso. La velocidad de crecimiento estimada se calculó que era menor que el 1^{er} percentil de peso para la edad. El abdomen estaba marcadamente distendido, con una hepatomegalia y esplenomegalia significativa. La ecografía abdominal y la TC confirmaron la hepatoesplenomegalia y glándulas suprarrenales bilaterales simétricamente agrandadas con calcificación. El nivel de alanina transaminasa (ALT) sérica se elevó a 119 U/L (normal 10-50 U/L), así como la aspartato transaminasa (AST) a 216 U/L (normal 10-45 U/L). Antes de la iniciación del tratamiento, la ferritina sérica, un marcador de la inflamación, fue de aproximadamente 1500 µg/l (normal 7-144 µg/l). El paciente fue persistentemente anémico antes del tratamiento con valores de hemoglobina que oscilaban entre 7,2 y 8,3 g/dl.
55
60

[0128] A las 19 semanas de vida, una vez se iniciaron infusiones IV semanales de rhLAL (SBC-102) a una dosis inicial de 0,2 mg/kg. El paciente se trató previamente con 1 mg/kg de difenhidramina aproximadamente 90 minutos antes de la infusión de SBC-102 a fin de contrarrestar las reacciones potenciales de la infusión. La duración de la infusión fue de aproximadamente 4 horas. Las infusiones se toleraron bien, y el paciente no experimentó reacciones adversas o
65

reacciones relacionadas con la infusión.

[0129] Siete días después de la infusión inicial, la segunda infusión se administró al paciente. El paciente fue dosificado con 0,3 mg/kg de SBC-102 aproximadamente durante 4 horas y toleró la infusión sin mostrar ningún signo de reacción adversa.

[0130] En dos semanas después de iniciar el tratamiento, el paciente presentó una mejoría significativa en el bienestar general, incluyendo el aumento de la vigilancia y la capacidad de respuesta. La diarrea y los vómitos se estabilizaron. El paciente comenzó a ganar peso y mostró una reducción destacada de las transaminasas séricas (por ejemplo, AST y ALT), esencialmente hasta los niveles normales (figuras 1A y 1B). La velocidad de crecimiento del paciente se normalizó rápidamente (figuras 3 y 4). La distensión abdominal disminuyó, lo que corresponde con una reducción en la circunferencia abdominal. Las pruebas de función hepática mostraron mejoras continuadas (figuras 1A y 1B).

[0131] En la tercera visita, el paciente recibió SBC-102 a 0,5 mg/kg. Las infusiones continuaron siendo bien toleradas. El estado clínico mostró una mejora continuada, con un aumento de peso de 150 g en 7 días, y un aumento de 1,5 cm en la circunferencia del brazo desde el inicio del tratamiento (figuras 3 y Fig. 4). Las pruebas de función hepática se mantuvieron estables, los niveles de hemoglobina aumentaron (10-11 g/dl), y los niveles de ferritina siguieron disminuyendo (figura 2). La fosfatasa alcalina se encontraba en el intervalo bajo de lo normal antes del tratamiento 137 U/L (normal 110- 300 U/L) y aumentó con el tratamiento (204 U/L). Este efecto con la administración SBC-102 fue consistente con las observaciones realizadas en el modelo preclínico de la enfermedad.

[0132] Con la cuarta infusión, el paciente comenzó a recibir una dosis semanal de 1,0 mg/kg. Dos meses después del inicio del tratamiento, el crecimiento del paciente mejoró sustancialmente con una velocidad de crecimiento estimada próxima al 95º percentil. Este aumento en el crecimiento dio lugar a una ganancia de 1,25 kg o 2,79 libras en 63 días con un peso de 7,21 kg, colocándolo en el percentil 30 de peso para la edad (figuras 3 y 4). Los niveles de AST y ALT disminuyeron rápidamente después de la primera infusión.

[0133] Con tres meses de tratamiento, la AST y ALT fueron normales. Además de las mejoras en la función hepática, también se observó una marcada reducción en la ferritina (figura 2).

[0134] Durante el transcurso de 4 meses de tratamiento, los síntomas GI del paciente se resolvieron y el estado nutricional del paciente era excelente. El paciente continuó ganando peso (figuras 3 y 4) y demostró signos físicos de un bebé normal y saludable. El paciente continuó tolerando las infusiones sin mostrar ninguna reacción a la infusión u otros efectos secundarios. El paciente recibió la dosis 21 a 1,0 mg/kg como un paciente ambulatorio.

Ejemplo 2

Diseño del estudio para la deficiencia en LAL de aparición temprana

[0135] SBC-102, una rhLAL producida en *Gallus* transgénico, se administra mediante infusión IV semanal. El estudio está diseñado para evaluar la seguridad, tolerabilidad y eficacia de dos regímenes de dosis de SBC-102 administrados mediante infusiones IV semanales. Por tanto, las principales variables del resultado en este estudio determinan la seguridad y tolerabilidad de SBC-102 en niños con retraso de crecimiento debido a la deficiencia en LAL, e incluyen: signos vitales y hallazgos en el examen físico; pruebas de laboratorio clínico; pruebas de anticuerpos antifármaco; y el uso de medicación concomitante. Teniendo en cuenta que un retraso del crecimiento es una característica clínica universal de deficiencia en LAL/ fenotipo de Wolman, una terapia exitosa para este trastorno debe ser capaz de hacer frente al retraso en el crecimiento observado en los niños afectados por deficiencia en LAL. Los parámetros directamente relacionados con el crecimiento del niño y el estado nutricional se evalúan como objetivos secundarios o exploratorios: por ejemplo, la velocidad de crecimiento gradual de peso; aumento de peso; y la tasa de crecimiento lineal. Este estudio también investiga los efectos de SBC-102 sobre biomarcadores farmacodinámicos; el tamaño del hígado y el bazo; linfadenopatía; hemoglobina y plaquetas; evaluaciones de laboratorio de la función hepática y la nutrición; la circunferencia abdominal, la circunferencia del brazo y circunferencia de la cabeza. Este estudio también describe la farmacocinética preliminar de SBC-102 en niños con retraso de crecimiento debido a la deficiencia en LAL, incluyendo C_{max} en plasma y depuración estimada.

Tabla 1: Programa de las evaluaciones: cribado hasta la semana 24

Evaluaciones	Diagnóstico inicial	Semana 1 ± 2 días	Semana 2 ± 2 días	Semana 3 ± 2 días	Semana 4 ± 2 días	Semana 6 ± 2 días	Semana 8 ± 2 días	Semana 10 ± 2 días	Semana 12 ± 2 días	Semana 14 ± 2 días	Semana 16 ± 2 días	Semana 18 ± 2 días	Semana 20 ± 2 días	Semana 22 ± 2 días	Semana 24 ± 2 días
Consentimiento informado	X														
Inclusión/Exclusión	X														
Historial médico	X														
Muestra para análisis genético molecular															
Mancha de sangre seca															
Relacionado con la salud	X								X						X
ECG de 12 derivaciones	X								X ^F						
Examen físico ²	X				X ^F				X ^F						
Prueba de embarazo ³	X				X ^F				X ^F		X ^F		X ^F		X ^F
Laboratorio clínico	X				X ^F				X ^F						X ^F
Hígado, lípido, y	X				X ^F				X ^F						X ^F
Fase aguda	X				X ^F				X ^F						X ^F
Anti SBC-102	X				X ^F		X ^F		X ^F		X ^F		X ^F		X ^F
Colección de biomarcadores exploradores en suero y orina	X				X ^F		X ^F		X ^F		X ^F		X ^F		X ^F
MRI/MRS abdominal ⁶	X								X						
Signos vitales ⁷		X	X	X	X	X	X	X	X	X ⁹	X	X	X	X	X
Infusión de SBC-102		X	X	X	X	X	X	X	X	X ¹⁰	X	X	X	X	X
Efectos adversos															

Continuo

Tabla 1 (continuación)

Evaluaciones	Diagnóstico inicial	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12	Semana 14	Semana 16	Semana 18	Semana 20	Semana 22	Semana 24
	Preinfusión	± 2 días	± 2 días	± 2 días	± 2 días	± 2 días	± 2 días	± 2 días	± 2 días						
Medicamentos/terapias concomitantes	Continuo														
F ¹ Preinfusión															
1 HRQOL apropiado para la edad															
2 Examen físico incluirá la medición del peso (altura solo en el cribado), valoración del tamaño de hígado y bazo, linfadenopatía y enfermedad arterial.															

5 [0136] Los sujetos se inscriben en dos cohortes secuenciales de igual tamaño (4 sujetos cada uno). La dosificación escalonó dentro de cada cohorte y entre cohortes, con la dosificación comenzando con el primer sujeto en la cohorte de dosis baja (cohorte 1, dosis de inicio 0,35 mg·kg⁻¹). La dosificación de sujetos adicionales en la cohorte 1 y el inicio de la dosificación en la cohorte de dosis alta (cohorte 2; dosis inicial 1 mg·kg⁻¹) se basa en la seguridad y tolerabilidad aceptables en anteriores sujetos.

Cohorte 1

10 [0137] Los primeros cuatro sujetos inscritos en el estudio constituyen la cohorte 1. El primer sujeto en esta cohorte recibe una dosis única de SBC-102 de 0,35 mg·kg⁻¹ y, si se aprueba para la dosificación continuada en base a una revisión de seguridad durante al menos 24 horas después de la dosis, el sujeto recibe entonces una segunda dosis de SBC-102 de 0,35 mg·kg⁻¹ una semana después. Después de que el sujeto reciba la segunda dosis de SBC-102, se revisan todos los datos de seguridad disponibles, en cuyo punto se decide la aceptabilidad con respecto a si se escala la dosis para el primer sujeto hasta 1 mg·kg⁻¹ y se inicia la dosificación de los otros sujetos en la cohorte 1. La dosificación de los otros 3 sujetos de la cohorte 1 procede de una manera similar. Si la revisión de seguridad no garantiza el escalado de la dosis de un sujeto de 0,35 mg·kg⁻¹ a 1 mg·kg⁻¹, pero se considera que es seguro para el sujeto continuar con el tratamiento a la dosis inicial, el sujeto puede seguir recibiendo una dosis de 0,35 mg·kg⁻¹. Si algún sujeto en la cohorte 1 muestra una respuesta subóptima al tratamiento después de recibir al menos 4 dosis de SBC-102 de 1 mg·kg⁻¹, se considera un escalado adicional de la dosis hasta 3 mg·kg⁻¹.

Cohorte 2

25 [0138] El inicio de la dosificación en la cohorte 2 se produce después de que la cohorte 1 esté totalmente inscrita y la seguridad se haya revisado para al menos 2 sujetos que recibieron 2 o más dosis de 1 mg·kg⁻¹ de SBC-102 en la cohorte 1. Los últimos 4 sujetos que entran en el estudio se inscriben y dosifican en la cohorte 2. El primer sujeto en esta cohorte recibe una dosis única de SBC-102 de 1 mg·kg⁻¹ y, si se aprueba para la dosificación continuada en base a una revisión de seguridad durante al menos 24 horas después de la dosis, el sujeto recibe entonces una segunda dosis de SBC-102 de 1 mg·kg⁻¹ una semana después. Después de que el sujeto reciba la segunda dosis de SBC-102, se revisan todos los datos de seguridad disponibles para la aceptabilidad de lo siguiente: escalar la dosis para el primer sujeto hasta 3 mg·kg⁻¹ e iniciar la dosificación de los otros sujetos en la cohorte 2. La dosificación de los otros 3 sujetos de la cohorte 2 se realiza de una manera similar, con una revisión de la seguridad. Si el revisor de la seguridad no aprueba un escalado de la dosis de un sujeto de 1 mg·kg⁻¹ a 3 mg·kg⁻¹, pero se considera que es seguro para el sujeto continuar con el tratamiento a la dosis inicial, el sujeto puede seguir recibiendo una dosis de 1 mg·kg⁻¹. Si la dosis inicial de 1 mg·kg⁻¹ no es bien tolerada por el sujeto, se puede considerar una dosis reducida de 0,35 mg·kg⁻¹.

35 [0139] El estudio consiste en aproximadamente 22 visitas programadas: visita 1 (cribado), la visita 2 (valoración inicial, inicio del fármaco del estudio) hasta la visita 21 (administración semanal del fármaco del estudio), visita 22 (final del estudio de seguimiento). Teniendo en cuenta la gravedad y la naturaleza mortal del retraso en el crecimiento de aparición temprana debido a la deficiencia en LAL, es probable que estos sujetos sean hospitalizados.

40 [0140] La población objetivo para el estudio son niños y niñas con retraso del crecimiento debido a la deficiencia en LAL. Un sujeto es elegible para participar en este estudio si se cumplen los siguientes criterios: (1) el padre del sujeto o tutor legal comprende la naturaleza y el propósito completo del estudio, incluidos los posibles riesgos y efectos secundarios, y proporciona por escrito el consentimiento/permiso antes de realizar cualquier procedimiento del estudio; (2) niño o niña con un actividad de LAL disminuida documentada en relación al intervalo normal del laboratorio que realiza el ensayo o el resultado documentado de la prueba genética molecular que confirma un diagnóstico de deficiencia en LAL; y (3) retraso del crecimiento con inicio antes de los 6 meses de vida.

Seguridad

50 [0141] Los criterios de valoración principales de seguridad incluyen la incidencia de efectos adversos (AE) y reacciones relacionadas con la infusión (IRR); cambios desde el inicio en los signos vitales (presión arterial, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria y temperatura), hallazgos del examen físico y pruebas de laboratorio clínico (CBC/hematología, química del suero y análisis de orina); uso de medicamentos/terapias concomitantes; y caracterización de anticuerpos anti-SBC-102 (ADA), incluyendo la tasa de seroconversión, tiempo hasta la seroconversión, la mediana y el máximo de título de ADA de inmunoglobulina G (IgG) y tiempo hasta el máximo de título de ADA de IgG.

Eficacia

60 [0142] Los criterios de valoración de la eficacia incluyen: (1) el cambio y/o porcentaje de cambio desde el inicio en el tamaño del hígado y el bazo (por ultrasonido) y el volumen del hígado y el bazo y el contenido de grasas (mediante imagen por resonancia magnética [RMI]); y (2) el cambio desde el inicio de las transaminasas séricas, lípidos séricos (colesterol total, triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad [HDL], y lipoproteínas de baja densidad [LDL]), hemoglobina y recuento de plaquetas. Los parámetros de crecimiento, incluido el cambio desde el inicio en el percentil y las puntuaciones z, también son evaluados por los sujetos ≤ 18 años de edad. Estos parámetros de crecimiento se basan en las tablas de crecimiento de los Centros de Control de Enfermedades (CDC) e incluyen el peso para la edad (WFA),

peso para la talla (WFL), talla para la edad (LFA), y circunferencia de la cabeza para la edad (HCFA) en sujetos <30 meses de edad y WFA, estatura para la edad (SFA; Nota: estatura se refiere a la altura de un sujeto), y el peso para la estatura (WFS) en sujetos \geq 36 meses hasta 18 años de edad, así como los indicadores del estado de crecimiento correspondientes de bajo peso, debilidad y retraso del crecimiento en todos los sujetos.

5

Ejemplo 3

Evaluaciones físicas de pacientes con deficiencia en LAL de aparición temprana

10 **[0143]** Los pacientes que están clínicamente lo suficientemente estables como para tolerar la anestesia general deben ser considerados para la colocación de la línea central para el acceso vascular a largo plazo. En los sujetos que recibieron anestesia general y/o sedación para otros procedimientos, se considera un rastreo mediante la formación de imágenes de resonancia magnética (MRI) abdominal en la línea base. En el caso de nuevos procedimientos que requieren anestesia general y/o sedación, se considera un MRI de seguimiento si no es antes de 3 meses después de la primera infusión. Se mide la antropometría (peso, altura, circunferencia abdominal, circunferencia del brazo y circunferencia de la cabeza). Se realiza un examen físico general. Se lleva a cabo un examen físico completo. El examen incluye una evaluación de la apariencia general del sujeto, piel, cabeza, ojos, oídos, nariz y garganta, corazón, pulmones, abdomen, extremidades/articulaciones, y el estado neurológico. Cada examen físico también incluye lo siguiente:

20 **Tamaño de hígado:** Se realiza una evaluación clínica del tamaño del hígado (palpable/no palpable y centímetros por debajo del margen costal), regularidad (liso/nodular) y sensibilidad (blando/no blando).

Tamaño del bazo: Se realiza una evaluación clínica del tamaño del bazo (palpable/no palpable y centímetros por debajo del margen costal), regularidad (liso/nodular) y sensibilidad (blando/no blando).

Linfadenopatía: Se realiza una evaluación del tamaño, la ubicación, y el carácter de cualquier ganglio linfático palpable.

25 Las áreas a examinar incluyen: cefálica (occipital, preauricular, retroauricular, submentoniana, submandibular), cervical, clavicular, axilar y inguinal. Cualquier ganglio agrandado se caracteriza como blando o no blando.

Fotografía: Se toma una imagen digital del sujeto en posición supina (longitud total y abdominal de cerca).

Ultrasonidos y MRI de hígado/bazo

30

[0144] La ecografía abdominal se puede realizar para medir el tamaño del hígado y el bazo. La MRI abdominal puede proporcionar una mejor cuantificación del volumen del hígado y el bazo, y debe considerarse al inicio y en una visita al menos 3 meses después de la primera infusión.

Signos vitales

35

[0145] Los signos vitales incluyen la frecuencia del pulso, la frecuencia respiratoria, presión arterial sistólica y diastólica y la temperatura corporal central (rectal u oral). La evaluación de la frecuencia del pulso y la presión arterial se toman después de que el sujeto haya estado en una posición supina. Los signos vitales se miden en todas las visitas de estudio. En los días de dosificación, los signos vitales se registran antes de la infusión, cada 15 minutos (\pm 10) durante la infusión y durante 2 horas después de la infusión y a continuación cada 30 minutos (\pm 15) entre 2 y 4 horas después de completar la infusión.

40

Ejemplo 4

Evaluaciones de laboratorio

45

[0146] Las siguientes evaluaciones de laboratorio se realizan como pruebas de diagnóstico y eficacia:

50 **1) CBC/Hematología:** Recuento de glóbulos blancos, recuento de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular promedio (MCV), hemoglobina corpuscular promedio (MCH), concentración de hemoglobina corpuscular promedio (MCHC), recuento de plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, frotis periférico para el examen de la morfología celular.

2) Panel químico: glucosa, nitrógeno de urea, creatinina, sodio, potasio, cloruro, calcio (total e ionizado), magnesio, fósforo inorgánico, proteínas totales, lactato deshidrogenasa

55 **3) Pruebas de función hepática:** AST/transaminasas glutámico oxalacética en suero (SGOT), ALT/transaminasas glutámico pirúvico en suero (SGPT), fosfatasa alcalina, gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT), albúmina, bilirrubina (directa, total)

4) Anticuerpo anti-fármacos: anticuerpo anti-SBC-102

5) Análisis de orina: pH, glucosa, cetonas, sangre, proteínas, nitritos

60 **6) Estudios de coagulación:** leucocitos (se puede realizar examen microscópico si la sangre, nitrito y/o leucocitos son anormales)

7) Evaluaciones nutricionales de laboratorio: proporción de alfa tocoferol: colesterol en suero, 25OH vitamina D, retinol sérico, dideshidroretinol, transtretina, ferritina sérica

8) Panel de lípidos: colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL

65 **9) Perfil genético**

Las secuencias de ADN, incluyendo tanto la secuencia de codificación de la proteína como las secuencias que regulan la transcripción de genes, la estabilidad del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y la eficacia de la traducción de proteínas, que se pueden identificar incluyen:

1. Lipasa ácida lisosomal (gen LIPA)
2. Los genes que codifican otras proteínas implicadas en la biología de los lípidos que pueden contribuir a, y/o modificar el fenotipo de la enfermedad de la deficiencia en LAL, por ejemplo, ABCA1
3. Los genes que pueden modificar la susceptibilidad a cualquier SBC-102

10) Evaluaciones farmacocinéticas

[0147] Para reducir el riesgo de anemia iatrogénica, se puede limitar el muestreo de PK. En orden de importancia, se recogen muestras para obtener los siguientes parámetros: 1) C_{max} y 2) estimación de CL. Se recogen muestras para la medición de los niveles de SBC-102 en suero en el día 0 (dosis 1) y el día 105 (16 dosis). En todos los sujetos, las muestras se recogen antes de la dosis (a los 30 minutos de la dosis); a 90 (± 5) minutos después del comienzo de la infusión; y a los 110 (± 5) minutos después del inicio de la infusión. Todas las muestras de PK, en puntos de tiempo que coinciden con una evaluación de los signos vitales, han de tomarse antes de inflado del manguito para la evaluación de la PA en el brazo sin infusión. Las muestras de PK en otros puntos de tiempo se toman al menos 5 minutos después de la deflación del manguito.

Ejemplo 5

Preparación de dosis e infusión

[0148] Se proporciona SBC-102 en una dosis única en viales de vidrio de 10 ml como un líquido transparente. La solución (en total 10,5 ml incluyendo 5% de saturación) tiene una concentración de 2 mg·kg⁻¹. Todos los viales de SBC-102 se almacenaron a una temperatura controlada de 2-8°C. Los viales se congelan y protegen de la luz durante el almacenamiento. Se preparó la jeringa que contiene SBC-102 diluido en 0,9% de solución salina inmediatamente antes de la infusión. Cuando la jeringa de SBC-102 se había preparado de antemano, la solución diluida se marcó y se utilizó dentro de las 4 horas desde la preparación.

[0149] Se utilizó el peso del paciente, según lo registrado antes de la dosis en la mañana de la infusión y redondeado en 0,1 kg, para el cálculo del volumen de SBC-102 para cada infusión. Los volúmenes totales de infusión utilizados en el estudio se basan en el régimen de dosificación mostrado en la tabla 2.

Tabla 2

Dosis	Volumen de infusión
0,35 mg/kg	10 ml
1 mg/kg	10 ml
3 mg/kg	20 ml

[0150] La preparación y administración de la dosis deben realizarse utilizando materiales desechables estériles apirógenas incluyendo, pero sin limitación, jeringas, agujas, tubo de transferencia y válvulas de paso.

[0151] La velocidad de infusión en el dispositivo de regulación de flujo se debe establecer para administrar el volumen total duante aproximadamente 120 minutos, tal como se muestra en la tabla 3

Tabla 3

Dosis	Flujo de infusión por hora	Flujo de infusión por minuto	Flujo de infusión por quilogramo por hora
0,35 mg/kg	5 ml	0,083 ml	0,175 mg/kg/h
1 mg/kg	5 ml	0,083 ml	0,5 mg/kg/h
3 mg/kg	10 ml	0,167 ml	1,5 mg/kg/h

Ejemplo 6

Efectos adversos (EA)

[0152] En los sujetos que experimentan EA o reacciones relacionadas con la infusión (IRR) con efectos cardiovasculares, respiratorios u otros efectos clínicamente significativos, la infusión debe interrumpirse y el sujeto debe tratarse de una reacción anafiláctica según las directrices institucionales para la gestión de reacciones a la infusión graves en niños menores de 2 años de edad. Esto puede incluir antihistamínicos, corticosteroides, y epinefrina por vía intravenosa, si es necesario. Para los productos biológicos relacionados, la mayoría de las IRR tardías aparecen más de

24 horas después de la infusión. Los síntomas incluyen artralgias, mialgias, síntomas similares a la gripe, dolor de cabeza, cansancio, y sarpullido o urticaria. Las reacciones tardías pueden tratarse con analgésicos o antihistamínicos según criterio clínico. Las IRR se clasifican como agudas (que se producen dentro de las 24 horas del inicio de la infusión) o tardía (que se producen entre 1 y 6 días después de la infusión). Los medicamentos y equipos para el tratamiento de reacciones de hipersensibilidad deben estar disponibles para su uso inmediato en caso de reacciones de hipersensibilidad graves inesperadas. Estos suministros incluyen, pero sin limitación, oxígeno, acetaminofeno, antihistamínicos (por ejemplo, difenhidramina, parenteral y PO), corticosteroides, epinefrina y dispositivos de reanimación cardiopulmonar. En productos biológicos similares, las IRR más agudas aparecen dentro de las 24 horas de la infusión (información de prescripción de Cerezyme®, VPRIV®, Fabrazyme®). Los signos de una posible IRR aguda pueden clasificarse como: IRR leves a moderadas: hiperemia, sofocos, fiebre y/o escalofríos, náuseas, prurito, urticaria, síntomas gastrointestinales (vómitos, diarrea, calambres abdominales) Las reacciones leves se definen como reacciones autolimitantes, que se solucionan espontáneamente después del cese temporal o una reducción en la tasa de infusión. Las reacciones moderadas se definen como reacciones que no se solucionan con medidas sencillas, requieren la observación prolongada y la interrupción de la terapia. La IRR grave conlleva dolor en el pecho, disnea, sibilancias, estridor, hipotensión o hipertensión, paro respiratorio, apnea, disnea, bradicardia o taquicardia. Si se observa alguno de los signos y síntomas anteriores durante la infusión y el sujeto permanece hemodinámicamente estable, la tasa de infusión puede ralentizarse (reducirse a la mitad de la tasa que se está administrando al inicio del suceso, por ejemplo de $10 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$ a $5 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$) y prolongar el tiempo de infusión. Una vez que se haya resuelto el suceso, la infusión debe continuar durante un mínimo de 30 minutos a la velocidad reducida antes de incrementar la tasa hasta el 75% de la tasa original en el programa de infusión. Si el sujeto continúa mostrando signos de hipersensibilidad, puede administrarse una dosis IM o IV lenta de un antihistamínico según las directrices institucionales para la gestión de reacciones a la infusión en niños menores de 2 años de edad.

Ejemplo 7

Administración de rhLAL a un paciente humano con deficiencia en LAL de aparición tardía

[0153] El objetivo principal del estudio es evaluar la seguridad y tolerabilidad de SBC-102 en pacientes con disfunción hepática debido a la deficiencia en LAL de aparición tardía (signos vitales, examen físico, pruebas de laboratorio clínico, pruebas de inmunogenicidad, evaluación de efectos adversos, terapias concomitantes). El objetivo secundario es caracterizar la farmacocinética de SBC-102 administrado por infusión IV después de dosis únicas y múltiples (pre y post infusión días 0 y 21). Los criterios de inclusión para los sujetos con deficiencia en LAL de aparición son los siguientes:

1. El paciente entiende la naturaleza y el propósito completo del estudio, incluidos los posibles riesgos y efectos secundarios, y está dispuesto y es capaz de cumplir con todos los procedimientos del estudio y dar su consentimiento;
2. Los pacientes varones o mujeres de cómo mínimo 18 años de edad y como máximo 65 años de edad;
3. Actividad en LAL disminuida documentada en relación con el intervalo normal del laboratorio que realiza el ensayo o el resultado documentado de pruebas de genética molecular que confirman el diagnóstico de deficiencia en LAL;
4. Pruebas de afectación hepática basadas en la presentación clínica (hepatomegalia) y/o los resultados de pruebas de laboratorio (ALT o $\text{AST} \geq 1,5\text{xULN}$);
5. Si está con estatinas o ezetimiba, el paciente debe estar en una dosis estable durante al menos 4 semanas antes del cribado;
6. Todas las mujeres deben dar negativo en la prueba de embarazo en suero en el cribado y no pueden dar el pecho; y
7. Las pacientes mujeres en edad fértil deben acordar el uso de un método o métodos anticonceptivos muy eficaces y aprobados para la duración del estudio y seguirlo utilizando durante 30 días después de la última dosis.

[0154] Las evaluaciones clínicas incluyen exámenes físicos, análisis de orina, análisis de química clínica, CBC/hematología, reactivos de fase aguda, estudios de coagulación, ECG de 12 derivaciones, anticuerpos anti-SBC-102 y PK para derivar C_{max} , AUC_{inf} , $T_{1/2}$, Cl y V_{ss} .

[0155] Los pacientes reciben $0,35 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ o $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de LAL una vez por semana a través de infusión por vía intravenosa (IV) durante 2 horas. El primer sujeto se dosifica y se controla por la tolerabilidad durante al menos 24 horas antes de proceder a la dosificación de los otros sujetos en la cohorte. Cada sujeto permanece ingresado durante 24 horas después de su primera infusión de SBC-102. Los sujetos continúan con 3 dosis adicionales de infusiones IV una vez por semana de la dosis de SBC-102 siempre que la tolerabilidad y la seguridad sigan siendo aceptables.

Farmacocinética

[0156] Los datos PK se analizan utilizando todos los sujetos introducidos en el estudio que recibieron al menos una dosis de la medicación del estudio con exclusión de los puntos de datos que pueden haber sido influenciados por una desviación mayor del protocolo. Los análisis de PK se realizan utilizando un modelo de infusión de un solo compartimento. Se derivan y presentan los siguientes parámetros PK por cohorte (C_{max} , AUC_{inf} , $T_{1/2}$, Cl y V_{ss}). Se comparan los parámetros PK de dosis individuales y múltiples mediante los datos de la visita 2 y la visita 6.

[0157] El incremento propuesto entre las dosis en este estudio pueden ser de 3, 4, 5 ó 6 veces, lo que puede permitir la evaluación de la seguridad inicial, tolerabilidad y farmacocinética en humanos a través de un intervalo de 6 veces de la dosis en una base de $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. En un modelo de rata preclínico pertinente, los efectos farmacodinámicos de $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

una vez a la semana, $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ cada dos semanas, y $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ una vez a la semana son comparables. Por lo tanto, aunque no se prevé que los sujetos necesiten dosis mayores de $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ una vez por semana, se pueden considerar dosis de más de $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, tal como 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ dependiendo de la gravedad de la enfermedad.

5 *Diseño del estudio*

[0158] Dada la rareza de pacientes con esta afección, el número previsto para este estudio es de 9 sujetos evaluables. Los sujetos se inscriben en tres cohortes secuenciales de 3 sujetos por cohorte. Los sujetos asignados a la cohorte 1 comienzan primero con la dosificación, seguidos de los asignados a la cohorte 2, a continuación los de cohorte 3.

10

Tabla 4: Programa de estudio de la deficiencia en LAL de aparición tardía: visitas, evaluaciones e intervalos

Evaluaciones	Pretratamiento			Fase activa							Fase postactiva		
	Visita 1 (Día -28 a -7)	Visita 2 (Día 0)	Visita 3 (Día 1)	Visita 4 (Día 7 ± 1)	TC Día 8	Visita 5 (Día 14 ± 1)	TC Día 15	Visita 6 (Día 22)	TC Día 22	Visita 7 (Día 28 ± 1)	Visita 7.1 (Día 35 ± 1)	Visita 8 (Día 52 ± 1)	
Consentimiento informado	X												
Criterio inclusión/exclusión	X	X											
Información demográfica	X												
Resultados d la salud del paciente	X												
Historial médico¹	X											X	
ECG de 12 derivaciones	X²									X²		X	
Examen físico	X	X³						X³		X		X	
Signos vitales³	X	X²	X	X³				X³		X		X	
Análisis de orina	X	X²	X²	X				X²		X		X	
Prueba de embarazo⁴	X	X²						X²				X	
CBC/Hematología	X	X²	X²	X²				X²		X		X	
Panel químico	X	X²	X²	X²				X²		X		X	
Panel del hígado	X	X²	X²	X²				X²		X		X	
Panel de lípidos	X	X²	X²	X²				X²		X		X	
Reactivos de fase aguda	X	X²						X²		X		X	
Pruebas de coagulación	X											X	
Cribado de hepatitis viral	X												
Cribado de hepatitis autoinmune	X												
Muestra de ADN	X											X	
Actividad de LAL de PBMC de sangre	X												
Ab anti-SBC-102 (ADA)	X	X²								X		X	
Muestra de biomarcador explorador	X	X²								X	X	X	
Muestra de PK⁵		X						X					

Tabla 4 (continuación)

Evaluaciones	Pretratamiento	Fase activa							Fase postactiva			
	Visita 1 (Día -28 a -7)	Visita 2 (Día 0)	Visita 3 (Día 1)	Visita 4 (Día 7 ± 1)	TC Día 8	Visita 5 (Día 14 ± 1)	TC Día 15	Visita 6 (Día 21 ± 1)	TC Día 22	Visita 7 (Día 28 ± 1)	Visita 7.1 (Día 35 ± 1)	Visita 8 (Día 52 ± 1)
Dosificación de SBC-102		X		X		X		X				
Efectos adversos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Terapias concomitantes	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
TC = Llamada telefónica												
# Predosis												
¹ Incluyendo el historial de alcohol (cuestionario AUDIT)												
² Incluyendo altura y peso												
³ Predosis, cada 15 minutos durante infusión, cada 15 minutos durante las 2 horas después de la infusión y cada 30 minutos durante las horas 2-4 después de la infusión												
⁴ Suero en la visita 1 y la visita 8; orina en la visita 2 y la visita 6												
⁵ Predosis, 10, 15, 20, 40, 60, 90 minutos durante la infusión, al final de la infusión (aproximadamente 120 minutos) y a los 5, 10, 20, 30, 40, 60 y 120 minutos después de la infusión												

Cohorte 1

5 [0159] Tres sujetos reciben infusiones IV de 0,35 mg·kg⁻¹ de SBC-102. El primer sujeto se dosifica y controla para la tolerabilidad durante al menos 24 horas antes de proceder a la dosificación de los otros 2 sujetos en la cohorte. Cada sujeto permanece ingresado durante 24 horas después de su primera infusión de SBC-102. Los sujetos continúan con 3 infusiones IV adicionales de 0,35 mg·kg⁻¹, siempre que la tolerabilidad y la seguridad sean aceptables.

Cohorte 2

10 [0160] Tres sujetos reciben infusiones IV de 1 mg·kg⁻¹ de SBC-102. El primer sujeto en la cohorte 2 se dosifica y controla para la tolerabilidad durante al menos 24 horas antes de proceder a la dosificación de los otros 2 sujetos en la cohorte. Cada sujeto permanece ingresado durante 24 horas después de su primera infusión de SBC-102. Los sujetos continúan con 3 infusiones IV adicionales de 1 mg·kg⁻¹, siempre que la tolerabilidad y la seguridad sean aceptables.

Cohorte 3

15 [0161] Tres sujetos reciben infusiones IV de 3 mg·kg⁻¹ de SBC-102. El primer sujeto en la cohorte 3 se dosifica y controla para la tolerabilidad durante al menos 24 horas antes de proceder a la dosificación de los otros sujetos en la cohorte. Cada sujeto permanece ingresado durante 24 horas después de su primera infusión de SBC-102. Los sujetos continúan con 3 dosis adicionales de una vez por semana de infusiones IV de 3 mg·kg⁻¹, siempre que la tolerabilidad y la seguridad sean aceptables.

20 [0162] El Comité de Seguridad (SC) puede suspender la dosificación de una cohorte completa o para un sujeto individual en cualquier momento debido a la mala tolerabilidad o los riesgos potenciales de seguridad.

25 [0163] Si el sujeto se encuentra suspendido del tratamiento del estudio en una visita programada distinta de la visita 8 (final del estudio) o en una visita no programada, el sujeto debe volver no antes de 7 días después de la última dosis de SBC-102 para las evaluaciones de Fin de estudio realizadas en la visita 8.

30 [0164] SBC-102 se administra por infusión intravenosa en las Visitas 2, 4, 5 y 6. Las terapias concomitantes se registran durante todo el estudio. Los efectos adversos se registran desde el momento de la firma del consentimiento informado.

35 [0165] Cada sujeto recibe un total de cuatro dosis semanales de SBC-102 siempre que la tolerabilidad y la seguridad siguen siendo aceptables.

Duración del estudio

40 [0166] El estudio implica 4 semanas de dosificación con SBC-102 y un período de lavado para apoyar la evaluación de la seguridad y de la programación de dosificación para los ensayos clínicos posteriores. Tras la finalización de este estudio, los sujetos pueden ser elegibles para reanudar SBC-102 en virtud de un protocolo separado para evaluar la seguridad a largo plazo y la eficacia de SBC-102 en pacientes con fenotipo de deficiencia en LAL/CESD.

Examen físico

45 [0167] Se lleva a cabo un examen físico general por una persona con capacitación médica. Los sistemas (incluyendo, pero sin limitación, los sistemas neurológicos, cardiovascular, respiratorio, y gastrointestinal) deben especificarse y registrarse. Cualquier anomalía debe indicarse cada vez que el examen se lleva a cabo. El diagnóstico de nuevas anomalías debe registrarse como efecto adverso, si procede.

50 [0168] Las evaluaciones adicionales del examen físico que se realizarán en la visita de cribado:

a) **Tamaño de hígado:** Se realiza una evaluación clínica del tamaño del hígado (palpable/no palpable y centímetros por debajo del margen costal), regularidad (liso/nodular) y sensibilidad (blando/no blando).

55 b) **Linfadenopatía:** Se realiza una evaluación del tamaño, la ubicación, y el carácter de cualquier ganglio linfático palpable. Las áreas a examinar incluyen: cefálica (occipital, preauricular, retroauricular, submentoniana, submandibular), cervical, clavicular, axilar y inguinal. Cualquier ganglio agrandado se caracteriza como blando o no blando.

c) **Enfermedad Arterial:** se evalúan clínicamente los pulsos tibial posterior y dorsal del pie izquierdo y derecho y se registran los índices tobillo-brazo derecho e izquierdo (ABI). ABI se define como la relación de la presión sistólica en la arteria dorsal del pie o de la arteria tibial posterior dividido por la presión sistólica braquial del brazo derecho o izquierdo (el más alto).

Signas vitales

60 [0169] Se miden los signos vitales, incluyendo la frecuencia del pulso, la frecuencia respiratoria, la presión arterial sistólica y diastólica y la temperatura. La evaluación de la frecuencia del pulso y la presión arterial se realiza después de que el sujeto se haya colocado en una posición semisupina durante al menos 5 minutos. En los días de dosificación, los signos vitales se registran antes de la infusión, cada 15 minutos (\pm 5) durante la infusión y durante 2 horas después de

la infusión y a continuación cada 30 minutos (± 10) entre 2 y 4 horas después de completar la infusión. Se pueden tomar lecturas adicionales a discreción del investigador en el caso de una reacción relacionada con la infusión (IRR). El electrocardiograma con 12 derivaciones (ECG) con registros formales se realiza después de que el sujeto haya estado en posición supina durante al menos 5 minutos.

5

Evaluaciones de laboratorio

[0170] Las muestras para las pruebas de laboratorio se recogen en los puntos de tiempo indicados en el Programa de Evaluación. Se realizan los siguientes análisis (con la excepción de ESR, estudios de coagulación y anticuerpos anti-SBC-102).

10

CBC/Hematología: Recuento de glóbulos blancos, glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular promedio (MCV), hemoglobina corpuscular promedio (MCH), concentración de hemoglobina corpuscular promedio (MCHC), recuento de plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos

15

Panel Químico: glucosa, nitrógeno de urea, creatinina, sodio, potasio, cloruro, calcio, magnesio, fósforo inorgánico, proteínas totales, lactato deshidrogenasa, ácido úrico

Prueba de funcionamiento hepático: AST/SGOT, ALT/SGPT, fosfatasa alcalina, GGTP, albúmina, bilirrubina (directa, total)

Panel de lípidos: colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL

20

Estudios de coagulación: relación normalizada internacional (INR) del tiempo de protrombina (PT), tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT)

Análisis de orina: glucosa, cetonas, sangre, pH, proteínas, nitritos y leucocitos (examen microscópico sólo se hará si hay sangre, y proteínas, nitritos y/o leucocitos son anormales)

Cribado de Hepatitis Viral: HBsAg y serología HCV (en el cribado o si está clínicamente indicado durante la prueba)

25

Cribado de Hepatitis Autoinmune: anticuerpos anti-músculo liso (ASMA), anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpo anti-LKM1, anticuerpo anti-SLA

Anticuerpo anti-fármaco: Anticuerpo anti-SBC-102

Reactivos de fase aguda: proteína C reactiva (PCR) de alta sensibilidad, velocidad de sedimentación globular (VSG) y la ferritina sérica

30

Prueba de embarazo: Todas las mujeres tienen, como mínimo, pruebas de embarazo mensuales. Estos se llevan a cabo utilizando suero en la Visita 1 y Visita 8 y la orina en la visita 2 y la visita 6.

[0171] Evaluaciones farmacocinéticas (PK): se toman muestras de PK del brazo opuesto a la cánula de infusión. Se recoge el muestreo intensivo para la medición de los niveles séricos de SBC-102 en el día 0 (dosis 1, Visita 2) y el día 21 (Dosis 4, Visita 6): inmediatamente antes de la dosis (dentro de los 30 minutos de la dosificación); a 10 (± 1), 15 (± 1), 20 (± 1), 40 (± 2), 60 (± 2) y 90 (± 2) minutos durante la infusión y al final de la infusión (aproximadamente 120 minutos); y a 5 (± 1), 10 (± 1), 20 (± 1), 30 (± 1), 40 (± 2), 60 (± 2) y 120 (± 2) minutos después de completar la infusión.

35

Preparación de SBC-102

[0172] El peso del sujeto registrado en la visita 1 se utiliza para calcular el volumen de SBC-102 para cada infusión. El producto farmacéutico de SBC-102 para la infusión IV se prepara mediante dilución utilizando las siguientes etapas:

40

1. Se extraen los viales del refrigerador.
2. Se confirma que no ha pasado la fecha de caducidad del vial.
3. Se determina el volumen total calculado de SBC-102 requerido para la dosificación.

45

Ejemplo:

Peso del sujeto (en kg): 70 kg

Nivel de dosis del sujeto: 3 mg·kg⁻¹

50

Concentración de fármaco: 2,0 mg·ml⁻¹

1. Cálculo de dosis del sujeto:

55

$$\frac{\text{Peso en kg} \times \text{Nivel de dosis} = \text{Dosis total}}{70 \text{ kg} \quad \times \quad 3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \quad = \quad 210 \text{ mg}}$$

2. Cálculo del volumen de inyección

60

$$\frac{\text{Dosis diaria total} \div \text{Concentración de fármaco en vial} = \text{Volumen total de inyección}}{210 \text{ mg} \quad \div \quad 2,0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} \quad = \quad 105 \text{ ml}}$$

65

4. Se utilizan las siguientes bolsas de infusión de solución salina al 0,9% en base a la asignación del grupo de

dosificación:

Cohorte	Dosis (mg·kg ⁻¹)	Volumen de bolsa de infusión (ml)
1	0,35	100
2	1	
3	3	250

5. Se extrae un volumen equivalente al volumen de SBC-102 necesario para la dosificación (calculado en la etapa 3 anterior) de una bolsa de infusión de 100 ml o 250 ml de solución salina al 0,9% (es decir, utilizando el ejemplo anterior, se extraen 105 ml de solución salina de una bolsa de infusión de 250 ml).
6. Se aspira el volumen total calculado de SBC-102 con respecto a la bolsa de infusión de solución salina al 0,9% y se transfiere (es decir, utilizando el ejemplo anterior, se aspiran 105 ml de solución de SBC-102 y se transfieren a la bolsa de infusión).
7. Se realiza una inversión suave para mezclar la bolsa.

Administración de rhLAL

[0173]

1. El tubo de infusión IV se une a la bolsa diluida de SBC-102.
2. El tubo se prepara, y se expulsa todo el aire.
3. La tasa de infusión en el dispositivo de regulación de flujo se establece para administrar el volumen total a las siguientes tasas durante aproximadamente 100 minutos:

Cohorte	Dosis (mg·kg ⁻¹)	Tasa de infusión (por hora)	Tasa de infusión (por minuto)
1	0,35	60 ml	1 ml
2	1		
3	3	150 ml	2,5 ml

4. Se selecciona el punto de infusión IV, que varía entre sujetos, y puede incluir venas antecubitales o de la muñeca (o un catéter venoso central).
5. Se une el tubo IV al angiocatéter. Se inyecta la solución salina en la línea IV para evaluar la permeabilidad y verificar que la solución salina se vacía fácilmente.
6. Se asegura la línea IV con cinta.
7. Se inicia la infusión de SBC-102 utilizando un dispositivo de regulación de flujo.
8. Se monitoriza la infusión de forma regular.
9. Cuando la bolsa está vacía, se inyectan inmediatamente 25 ml de solución salina al 0,9% en la bolsa de infusión utilizando el puerto de inyección.
10. Se vacía la línea a la misma tasa de infusión (60 ml por hora [1 ml por minuto] para la dosis de 0,35 mg·kg⁻¹ y 1 mg·kg⁻¹ y 150 ml por hora [2,5 ml por minuto] para la dosis de 3 mg·kg⁻¹) hasta completar la infusión. EL final de la infusión se define cuando se han completado la infusión y el vaciado y se ha documentado.

Reacciones a la infusión

[0174] Una reacción relacionada con la infusión (IRR) se define como cualquier efecto adverso mediado inmunológicamente que está al menos posiblemente relacionado con la infusión. Las IRR se clasifican como aguda (que se produce dentro de las 24 horas del inicio de la infusión) o retardada (que se produce entre 1 y 14 días después de la infusión).

[0175] Los medicamentos y equipos para el tratamiento de reacciones de hipersensibilidad deben estar disponibles para su uso inmediato en caso de reacciones de hipersensibilidad graves inesperadas. Incluyen, pero sin limitación, oxígeno, acetaminofeno, antihistamínicos (por ejemplo, difenhidramina, parenteral y PO), corticosteroides, epinefrina (adrenalina) y dispositivos de reanimación cardiopulmonar.

[0176] Los signos de una posible IRR aguda pueden ser hiperemia, sofocos, fiebre y/o escalofríos, náuseas, prurito, urticaria, síntomas gastrointestinales (vómitos, diarrea, calambres abdominales), reacciones cardiopulmonares, incluyendo dolor en el pecho, disnea, sibilancias, estridor, hipotensión o hipertensión. Si se observa cualquiera de los signos y síntomas anteriores durante la infusión y el sujeto permanece hemodinámicamente estable: la tasa de infusión debe ralentizarse o detenerse. Si el sujeto continúa mostrando signos de hipersensibilidad, debe administrarse una dosis IM o IV lenta de un antihistamínico. En los sujetos que experimentan reacciones a la infusión graves con efectos cardiovasculares o respiratorios clínicamente significativos, se interrumpe la infusión. En tal reacción anafiláctica, el sujeto puede tratarse con antihistamínicos, corticosteroides y epinefrina por vía intravenosa.

Ejemplo 8

Administración de LAL recombinante en un modelo de rata

[0177] Se evaluaron los efectos de la dosificación con repetición con LAL humana recombinante en el peso, los triglicéridos y el colesterol de tejidos, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía, el peso intestinal, y otros parámetros en ratas Donryu deficientes en LAL descritos en Yoshida y Kuriyama (1990) Laboratory Animal Science, vol 40, p. 486-489 (véase también Kuriyama et al (1990) Journal of Lipid Research, vol 31, p 1605-1611; Nakagawa et al, (1995) Journal of Lipid Research, vol 36, p 2212-2218).

[0178] A las 4 semanas de vida, se asignaron las ratas Donryu que son homocigotas para la delección de LAL (LAL -/-) en grupos para ser dosificadas con LAL humana recombinante producida en un sistema oviducto de pollo transgénico o con un placebo de solución salina. Como controles se utilizaron ratas crías de tipo salvaje de la misma edad. Las ratas LAL -/- se dosificaron una vez a la semana durante cuatro semanas (cuatro dosis en total) o una vez cada dos semanas durante cuatro semanas (dos dosis en total) mediante inyección en la vena de la cola como una sola dosis o en dos dosis iguales administradas con 30 minutos de diferencia. Las dosis de LAL recombinante fueron 1 mg/kg o 5 mg/kg. El programa de dosificación se muestra en la tabla 5. Las ratas se pretrataron con difenhidramina (5 mg/kg) para contrarrestar posibles reacciones anafilácticas, un procedimiento que se basa en experiencias previas en modelos animales de tratamiento de sustitución enzimática para el tratamiento de la enfermedad de depósito lisosomal (Shull et al., (1994) Proceedings of the National Academy of Science, vol 91, p.12937; Bielicki et al (1999) The Journal of Biological Chemistry, 274, p. 36335; Vogler et al (1999) Pediatric Research, 45, p. 838.).

[0179] La figura 9 muestra el progreso diario en el aumento de peso de ratas a las que se les administró 1 mg/kg de LAL recombinante por semana o 5 mg/kg de LAL recombinante por semana o 5 mg/kg de LAL recombinante por dos semanas. Se puede observar en la figura que hay poca o ninguna diferencia en el efecto terapéutico entre los dos tamaños de dosis y frecuencias.

Tabla 5 Programación del peso y dosificación de ratas Donryu deficientes en LAL

Día desde el nacimiento	Evaluaciones/inyecciones realizadas
Día 13	
Día 14	
Día 20	
Día 21	Cría destetada
Día 24	
Día 25	
Día 27	
Día 28	Primera inyección para la administración una vez por semana y una vez cada dos semanas
Día 31	
Día 32	
Día 34	
Día 35	Segunda inyección para la administración una vez por semana
Día 38	
Día 39	
Día 41	
Día 42	Tercera inyección para la administración una vez por semana; segunda administración una vez cada dos semanas
Día 45	
Día 48	
Día 49	Cuarta inyección para la administración una vez por semana
Día 55	
Día 56	Necropsia

Ejemplo 9

Examen patológico de ratas LAL -/- tratadas con LAL recombinante

[0180] Al final del estudio descrito en el ejemplo 8, se sacrificaron humanitariamente los animales de estudio y se hicieron las necropsias para examinar la patología macroscópica, la histopatología, y la química clínica. La necropsia macroscópica incluyó el examen de la superficie externa del cuerpo, todos los orificios, y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. Se determinó para las ratas la masa de órganos y tejidos internos y se recogieron los

órganos y tejidos y se fijaron en formalina al 10% tamponada neutra. Tras la fijación, los tejidos se procesaron y se prepararon y evaluaron portamuestras histológicas de secciones impregnadas de hematoxilina y eosina.

5 [0181] El examen patológico macroscópico de los animales tratados analizados mostró una normalización sustancial en el tamaño y el color del hígado, tal como puede verse en la disección mostrada en la figura 10. Se determinaron las proporciones de órgano con respecto a cuerpo y se demostró una reducción en el tamaño relativo de los órganos para el hígado, el bazo, tejido mesentérico, el duodeno, el yeyuno y el íleon en los animales tratados con éxito que se diseccionaron, en comparación con las ratas que recibieron placebo. La histopatología de tejido hepático analizado de 10 ratas tratadas con LAL recombinante muestra esencialmente una histología hepática normal en marcado contraste con la acumulación sustancial de macrófagos espumosos en los animales tratados con placebo (figura 10).

Ejemplo 10

Internalización de LAL humana recombinante en lisosomas de macrófagos y fibroblastos

15 [0182] Se examinó *in vitro* la capacidad de LAL recombinante humana ("SBC-102") derivada de ave transgénica de unirse a células e internalizarse en el compartimento lisosomal utilizando células de macrófagos y fibroblastos. Cuando se incubaron con células de macrófagos, se encontró que el SBC-102 marcado fluorescentemente que se localizaba en los lisosomas. Este efecto podría atenuarse mediante el uso de un competidor de polisacárido manosa, que implica el 20 receptor de N-acetilglucosamina/manosa (GlcNAc/manosa) como un mecanismo de reconocimiento y captación por estas células. El SBC-102 aumentó la actividad de LAL asociada a células, tanto en fibroblastos humanos con deficiencia en LAL como en fibroblastos murinos normales después de la incubación *in vitro*, lo que indica que la exposición a SBC-102 puede dar lugar a la sustitución sustancial de la actividad enzimática deficiente.

25 [0183] La manosa-6-fosfato (M6P) está presente en las estructuras de oligosacáridos de SBC-102 que han demostrado estar involucradas en la liberación de enzimas lisosomales a una amplia variedad de tipos de células a través del receptor M6P ubicuo.

30 [0184] La LAL recombinante se purificó a partir de clara de huevo de gallinas transgénicas. Se obtuvo Oregon Green NHS de Invitrogen® (# 0-10241). La línea de macrófagos alveolares de rata, NR8383, y la línea de fibroblastos de ratón, NIH-3T3, se obtuvieron de ATCC. Los fibroblastos de Wolman deficientes en LAL se obtuvieron de Coriell Institute for Medical Research and LysoTracker® Red se obtuvo de Invitrogen.

35 [0185] Marcaje de enzimas: Se marcaron 4 mg de LAL derivada de ave transgénica en PBS con Oregon Green de acuerdo con las recomendaciones de fabricación y la reacción se dializó posteriormente contra PBS y después se concentró.

40 [0186] Captación de macrófagos: Se incubaron LAL derivada de ave transgénica marcada fluorescentemente (5 µg/ml) y LysoTracker® Red con células NR8383 durante 2 horas. Las células se examinaron mediante microscopía de fluorescencia confocal utilizando un modo de escaneo secuencial a 488 nm y a continuación a 514 nm.

45 [0187] Inhibición competitiva con manano: Se incubaron SBC-102 marcado fluorescentemente (5 µg/ml) y manano con células NR8383 durante 2 horas. Las células se trataron con tripsina, y se midió la absorción de LAL recombinante mediante clasificación de células activadas por fluorescencia utilizando la intensidad de fluorescencia mediana como punto final.

50 [0188] Se examinó la capacidad de LAL derivada de ave transgénica de captarse y posteriormente incorporarse en los lisosomas de células diana usando la línea celular de macrófagos, NR8383. Se incubaron la LAL derivada de ave transgénica marcada fluorescentemente y el marcador lisosomal, "LysoTracker® Red" (Invitrogen®) con las células durante 2 horas. La colocalización de LAL derivada de ave transgénica y marcador lisosomal en los lisosomas de estas células se examinó posteriormente mediante microscopía de fluorescencia confocal utilizando un modo de escaneo secuencial (Figura 11). La LAL recombinante demostró la localización en los lisosomas, que es consistente con estudios similares *in vitro* utilizando LAL humana recombinante (rhLAL) de una variedad de fuentes.

55 [0189] La especificidad de unión de LAL derivada de ave transgénica al receptor de GlcNAc/manosa se ha evaluado mediante ensayos de unión competitiva utilizando la línea celular de macrófagos, NR8383 (Figura 12). La LAL derivada de ave transgénica marcada fluorescentemente (Oregon Green) a 5 µg/ml y diversas concentraciones de oligosacárido que contiene manosa, manano, se incubaron con las células durante 2 horas. La inhibición relativa de la captación de LAL derivada de ave transgénica por manano, en comparación con ningún control con manano, se cuantificó mediante 60 análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia usando la intensidad de fluorescencia mediana como el punto final. Se observó una inhibición dependiente de la dosis de manosa en la unión/captación de LAL derivada de ave transgénica, que es consistente con la interacción de LAL derivada de ave transgénica:GlcNAcR.

65 [0190] Además, se demostró la captación mediada por manosa-6-fosfato en células de fibroblastos mediante experimentos de competición con manosa-6-fosfato.

Ejemplo 11*Aumento de actividad de LAL en células tratadas*

5 **[0191]** La LAL cataliza la hidrólisis de ésteres de colesterol y triglicéridos a colesterol libre, glicerol y ácidos grasos libres. De este modo, la actividad de LAL se puede medir, por ejemplo, mediante la escisión del sustrato fluorogénico, oleato de 4-metilumbeliferilo (4MUO).

Fibroblastos

10

[0192] Se ha examinado la capacidad de LAL derivada de ave transgénica para aumentar la actividad de LAL en células utilizando células normales y deficientes en LAL *in vitro*. Se aislaron fibroblastos de un paciente de Wolman y se incubaron fibroblastos murinos normales (NIH-3T3) en presencia de LAL derivada de ave transgénica a concentraciones de 0, 0,16, ó 0,5 microgramos/ml durante 5 horas. Las células se lavaron a continuación para eliminar la señal no específica, y se ensayaron los lisados celulares por la actividad de LAL utilizando el sustrato oleato de 4-metilumbeliferilo (4-MUO). La figura 13 demuestra que la actividad de LAL asociada a células endógenas fue menor en los fibroblastos de Wolman en comparación con NIH-3T3, y se observaron aumentos dependientes de la dosis en la actividad de LAL en ambos tipos de células después de la incubación con LAL derivada de ave transgénica (Figura 13).

15

20

Leucocitos

[0193] Se obtuvieron leucocitos mononucleares de suero de pacientes con deficiencia en LAL antes y después de la administración. Las muestras de sangre se almacenaron en refrigeración sin pérdida de actividad de la enzima. Se aislaron leucocitos mononucleares (linfocitos) de sangre usando una preparación de Ficoll y diatrizoato de sodio. Se depositaron suavemente 4-8 ml de sangre, previamente diluida 1:1 con solución salina equilibrada de Hanks, sobre 3 ml de Ficoll-Paque y se centrifugó. El anillo de células mononucleares se aspiró y se lavó una vez con solución de Hanks, a continuación, al menos dos veces mediante la resuspensión del sedimento en 1-2 ml de agua. Los sedimentos se congelaron a -20°C antes de su uso. Antes del ensayo, se descongelaron los sedimentos, se resuspendieron en agua destilada y se sonicaron en hielo. La preparación se centrifugó a continuación a 20.000 xg durante 15 min a 4°C. El sobrenadante (que contiene 0,5-1,5 mg de proteína/ml) se mantuvo en hielo, antes del ensayo.

25

30

[0194] El sustrato para el ensayo de la lipasa ácida se preparó añadiendo 1 ml de 4MUO 10 mM (oleato de 4-metilumbeliferilo) en hexano a 1 ml de L- α -fosfatidilcolina 16 mM en CHCl₃. Los disolventes se evaporaron bajo N₂ y se añadieron 25 ml de ácido taurodesoxicólico (sal de sodio) 2,4 mM en agua. La mezcla se sonicó en hielo durante 1-2 min a 30-40 W. Antes del ensayo, se diluyó 1 volumen de sustrato madre con 7 volúmenes de tampón 200 mM de acetato de sodio/ácido acético (pH 4,0). Cada cubeta de reacción de 2 ml contenía oleato de 4-metilumbeliferilo 100 nmol, L- α -fosfatidilcolina 160 nmol y taurodesoxicolato de sodio 600 nmol.

35

40

[0195] La reacción se inició mediante la adición de 5-100 μ l de enzima y se controló a 37°C utilizando un espectrofotofluorímetro. Se detectó la escisión de 4MUO, por ejemplo, mediante excitación a aproximadamente 360 nm y emisión a aproximadamente 460 nm del fluoróforo liberado, 4-metilumbeliferona (4MU). Se registró el cambio en la fluorescencia con el tiempo.

Ejemplo 12

45

Análisis in vivo de LAL humana recombinante (SBC-102)

[0196] Se trataron ratas Yoshida deficientes en LAL (es decir, homocigóticas) (ver Kuriyama et al (1990), Journal of Lipid Research, vol 31, pág 1605-1611; Nakagawa et al, (1995) Journal of Lipid Research, vol 36, pág 2212-2218; y Yoshida y Kuriyama (1990) Laboratory Animal Science, vol 40, pág 486-489) con SBC-102 (5 mg/kg, IV) o placebo, una vez/semana durante cuatro semanas a partir de las cuatro semanas de vida. Para cada administración el SBC-102 se inyectó en la vena de la cola de la rata en dos dosis iguales (2,5 mg/kg) con 30 minutos de diferencia. Las ratas y los controles de tipo salvaje emparejados por la edad se examinaron una semana después de la dosis final. Los análisis se realizaron por triplicado.

50

55

[0197] El examen patológico macroscópico de los animales tratados con SBC-102 demostró una normalización en el color del hígado además de una reducción en el tamaño del órgano. Las ratas tratadas con SBC-102 mostraron una histología hepática esencialmente normal en marcado contraste con la acumulación sustancial de macrófagos espumosos en los animales tratados con vehículo. Los niveles de alanina y aspartato transferasa en suero, que son elevados en ratas LAL^{-/-}, también se redujeron en ratas tratadas con SBC-102.

60

[0198] La masa de órganos y tejidos internos se determinó para cada rata y los datos se muestran en la figura 14. El tamaño del órgano se representa como el porcentaje de peso corporal determinado a las 8 semanas de vida, en ratas LAL^{-/-} y ratas LAL^{+/+} después de la administración semanal de vehículo o SBC-102 a 5 mg/kg durante 4 semanas.

65

[0199] Los pesos corporales de ratas Yoshida tratadas con SBC-102 o vehículo se compararon con ratas de tipo

salvaje, tal como se muestra en la figura 15. El SBC-102 (5 mg/kg) o vehículo se administraron mediante inyección IV como una dosis única o como dosis divididas (administradas en un período de 4 horas) a ratas LAL^{-/-}. Las ratas LAL^{+/+} eran crías de control de la misma edad.

5 **Ejemplo 13**

Análisis de triglicéridos

10 **[0200]** Se llevó a cabo un análisis de triglicéridos en tejido de hígado y bazo de animales homocigotos tipo salvaje tratados con placebo y SBC-102. Los análisis de triglicéridos se realizaron utilizando metodologías estándar (es decir, kit de cuantificación de triglicéridos de MBL Internacional, catálogo # JM-K622-100) y se realizaron por triplicado.

Tabla 6: Niveles de triglicéridos en hígado y bazo en ratas de tipo salvaje y deficientes en LAL

Triglicérido (ug/mg de tejido húmedo)			
	Tipo salvaje (n = 3)	Placebo (n =3)	SBC-102 (n = 3)
Hígado	48	84	57
Bazo	3	22	48

15 **Niveles de sustrato en hígado**

[0201] La figura 16 muestra los niveles de colesterol, éster de colesterol, triglicéridos en hígado determinados a las 8 semanas de vida, en ratas WT y deficientes en LAL después de la administración semanal de vehículo o SBC-102 a 5 mg·kg⁻¹ durante 4 semanas.

20

Ejemplo 14

Estudio de respuesta a la dosis en ratas

25 **[0202]** En base a los estudios realizados anteriormente, se examinaron los efectos farmacodinámicos (PD) de una variedad de dosis y programación de dosis (cada semana y cada dos semanas) de LAL ("SBC-102") en ratas LAL^{-/-}. En estos estudios, se administró SBC-102 mediante inyecciones IV en dosis de 0,2, 1, 3 y 5 mg/kg, cada dos semanas, o 0,35, 1,0 y 5,0 mg/kg, cada semana, durante 1 mes, a partir de las 4 semanas de vida. Los resultados demuestran mejoras en la ganancia de peso corporal (BW) (Figura 17), organomegalia (Figura 18), y los niveles de sustrato en tejido (Figura 19). Los niveles de transaminasas en suero también se redujeron a medida que aumentaba la dosis de SBC-102, alcanzando los niveles los niveles esencialmente de tipo salvaje en las dosis más altas.

30

Ejemplo 15

35 *Farmacocinética de SBC-102*

a. Muestreo

40 **[0203]** Se tomaron muestras de PK de pacientes adultos que padecían de deficiencia en LAL de aparición tardía. Los pacientes se dosificaron con 0,35 mg/kg durante dos horas. Las muestras de suero en el día 0 (dosis 1, visita 2) y el día 21 (Dosis 4, Visita 6) se recogieron inmediatamente antes de la dosis (dentro de los 30 minutos de la dosis); a los 10 (± 1), 15 (± 1), 20 (± 1), 40 (± 2), 60 (± 2) y 90 (± 2) minutos durante la infusión (DI) y al final de la infusión (EOI) (aproximadamente 120 minutos desde el comienzo de la infusión); y a los 5 (± 1), 10 (± 1), 20 (± 1), 30 (± 1), 40 (± 2), 60 (± 2) y 120 (± 2) minutos después de la finalización de la infusión (AI).

45

b. Ensayo enzimático en suero

50 **[0204]** Se descongeló 4-MUO (4 mM) mantenido en un congelador a -20°C en un frigorífico a 4°C en la oscuridad y se colocó en una incubadora a 25°C durante 1,5 horas en la oscuridad antes de su uso. Se preparó un patrón diluyendo el medicamento SBC-102 hasta 1,56 ng/mL. Se incluyó un tampón de ensayo en blanco. Todas las muestras se diluyeron hasta 50 ng/ml para la primera dilución. Los patrones y las muestras se sembraron inmediatamente después de hacer diluciones. Después de preparar patrones y muestras, se añadieron a cada pocillo 62,5 uL de tampón de ensayo (0,2 mol/L de trihidrato de acetato de sodio, pH 5,5). Se añadieron a cada pocillo 12,5 uL de patrones y muestras, por duplicado. Se diluyó 4-MUO (4 mM) hasta 1,6x con Triton X-100 al 4% y se añadió 25 uL por pocillo. La placa de múltiples pocillos se golpeó varias veces para mezclar, se selló herméticamente y se colocó en una incubadora a 37°C durante 30 minutos. Después de la incubación, se añadieron 50 uL de solución de parada (Tris 0,77M pH 8,0) a cada pocillo para obtener un volumen final de 150 uL/pocillo. La placa se colocó en un lector de microplacas y se midieron los niveles de fluorescencia de la parte inferior de la placa a la excitación de 360 nm y de emisión de 460 nm.

55

60 **[0205]** Como se muestra en las tablas 7-11, la C_{max} en suero de la LAL recombinante administrada a pacientes adultos que padecen de deficiencia en LAL de aparición tardía varió de aproximadamente 270 ng/ml a 720 ng/mL. La semivida

ES 2 769 836 T3

($t_{1/2}$) varió de 7,6 minutos a 16,7 minutos, y el $t_{1/2}$ promedio fue de aproximadamente 13 minutos (desviación estándar, 3,812).

Tabla 7

ID paciente (dosis: 0,35 mg/kg)	Visita#	Concentración (ng/ml)	Tiempo nominal
02-001	2	5,63	Preinfusión
02-001	2	241,88	10 min DI
02-001	2	369,44	15 min DI
02-001	2	369,93	20 min DI
02-001	2	359,64	40 min DI
02-001	2	294,64	60 min DI
02-001	2	71,85	90 min DI
02-001	2	71,20	EOI
02-001	2	37,95	5 min DI
02-001	2	24,91	10 min DI
02-001	2	14,16	20 min DI
02-001	2	9,76	30 min DI
02-001	2	9,02	40 min DI
02-001	2	7,20	60 min DI
02-001	2	7,51	120 min DI

C_{max} = 369,93 ng/ml; $t_{1/2}$ = 16,8 min; LLOQ = 4,68 ng/ml

Tabla 8

ID paciente (dosis: 0,35 mg/kg)	Visita#	Concentración (ng/ml)	Tiempo nominal
03-001	2	8,23	Pre
03-001	2	199,80	10 min DI
03-001	2	215,10	15 min DI
03-001	2	228,12	20 min DI
03-001	2	237,25	40 min DI
03-001	2	210,73	60 min DI
03-001	2	262,41	90 min DI
03-001	2	102,39	EOI
03-001	2	52,20	5 min DI
03-001	2	33,75	10 min DI
03-001	2	17,60	20 min DI
03-001	2	12,17	30 min DI
03-001	2	10,82	40 min DI
03-001	2	9,39	60 min DI
03-001	2	8,72	120 min DI

C_{max} = 262 ng/ml; $t_{1/2}$ = 15,3 min; LLOQ = 4,68 ng/ml

Tabla 9

ID paciente (dosis: 0,35 mg/kg)	Visita#	Concentración (ng/ml)	Tiempo nominal
03-002	2	<4,68	Preinfusión
03-002	2	480,55	10 min DI
03-002	2	531,16	15 min DI
03-002	2	613,85	20 min DI
03-002	2	717,75	40 min DI
03-002	2	84,46	60 min DI
03-002	2	54,34	90 min DI
03-002	2	171,41	EOI
03-002	2	87,95	5 min DI
03-002	2	49,70	10 min DI
03-002	2	16,47	20 min DI
03-002	2	11,01	30 min DI
03-002	2	9,76	40 min DI
03-002	2	6,28	60 min DI
03-002	2	5,19	120 min DI

C_{max} = 718 ng/ml; $t_{1/2}$ = 10,8 min; LLOQ = 4,68 ng/ml

Tabla 10

ID paciente (dosis: 0,35 mg/kg)	Visita#	Concentración (ng/ml)	Tiempo nominal
02-001	6	5,12	Preinfusión
02-001	6	249,91	10 min DI
02-001	6	294,37	15 min DI
02-001	6	313,75	20 min DI
02-001	6	330,04	40 min DI
02-001	6	245,48	60 min DI
02-001	6	262,78	90 min DI
02-001	6	81,09	EOI
02-001	6	32,10	5 min DI
02-001	6	20,39	10 min DI
02-001	6	10,74	20 min DI
02-001	6	8,08	30 min DI
02-001	6	6,38	40 min DI
02-001	6	5,82	60 min DI
02-001	6	< 4,68	120 min DI

$C_{max} = 330 \text{ ng/ml}$; $t_{1/2} = 15,3 \text{ min}$; LLOQ = 4,68 ng/ml

Tabla 11

ID paciente (dosis: 0,35 mg/kg)	Visita#	Concentración (ng/ml)	Tiempo nominal
03-001	6	6,63	Preinfusión
03-001	6	317,45	10 min DI
03-001	6	333,46	15 min DI
03-001	6	310,83	20 min DI
03-001	6	378,68	40 min DI
03-001	6	234,49	60 min DI
03-001	6	246,07	90 min DI
03-001	6	206,06	EOI
03-001	6	253,80	5 min DI
03-001	6	70,81	10 min DI
03-001	6	24,61	20 min DI
03-001	6	12,32	30 min DI
03-001	6	9,03	40 min DI
03-001	6	7,18	60 min DI
03-001	6	5,56	120 min DI

$C_{max} = 379 \text{ ng/ml}$; $t_{1/2} = 7,7 \text{ min}$; LLOQ = 4,68 ng/ml

Ejemplo 16

5

Análisis de inmunogenicidad: Medición de anti-SBC-102

10

[0206] Cada muestra desconocida, positiva y negativa se diluyó 1:20 en leche en polvo al 5% en 1x PBS y se incubó a 4°C durante 12-18 horas en un rotador (500 rpm). Antes del ensayo, las muestras se centrifugaron a 2000 xg durante 20 minutos y el sobrenadante se separó a un nuevo tubo de 1,5 ml.

15

20

25

[0207] El SBC-102 se diluyó en tampón 1X PBS hasta una concentración de 0,5 ug/ml, y se colocaron 100 uL en cada pocillo de una placa ELISA de 96 pocillos. La placa se cubrió con una cubierta adhesiva y se incubó a temperatura ambiente durante 8 horas o durante la noche a 4°C. Después de la incubación, los pocillos se lavaron tres veces con 1x tampón de lavado. Se añadieron 200 uL de BSA-IgG libre al 5% a cada pocillo y la placa se selló y se incubó a 4°C durante 12-18 horas o temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la incubación, los pocillos se lavaron tres veces con 1x tampón de lavado. Se añadieron 100 ul de cada muestra de control, muestra desconocida, y muestra negativa a los pocillos por triplicado. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1,5 horas en un agitador de microplacas (500 rpm). Después de la incubación, los pocillos se lavaron tres veces con 1x tampón de lavado. Se añadieron 100 uL de SBC-102 biotinilado diluido en tampón de dilución hasta una concentración de 100 ng/ml a cada pocillo, y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1,5 horas en un agitador de microplacas (500 rpm). Después de la incubación, los pocillos se lavaron con 1x tampón de lavado. Se añadieron 100 ul de conjugado de estreptavidina-HRP diluido a 1:4000 en tampón de dilución a cada pocillo. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1,5 horas en un agitador de microplacas (500 rpm). Después de la incubación, los pocillos se lavaron cuatro veces con 1x tampón de lavado. Se añadieron 100 uL de sustrato TMB se añadió a cada pocillo, y la placa se incubó durante 15 minutos en la oscuridad. Se añadieron 50 uL de solución de parada (H₂SO₄ 0,5N) a cada pocillo para detener la reacción. Se midió la DO a 450 nm.

[0208] Como se tabulan en la tabla 12, los pacientes que recibieron la dosis semanal de 0,35 mg/kg de SBC-102 durante 4 semanas no mostraron niveles elevados de anticuerpo anti-SBC-102, lo que sugiere que la terapia de sustitución de enzimas por la infusión de SBC-102 no provoca ninguna inmunogenicidad significativa en pacientes humanos. Estos pacientes no presentan ningún efecto adverso o reacción relacionada con la infusión (IRR).

5

Tabla 12

Muestra	DO promedio	Desv. Estan.	Concentración de SBC-102 (ng/ml)
Control negativo	0,056	N/D	0
Control positivo 1	0,076	0,005	15,6
Control positivo 2	0,090	0,003	31,2
Control positivo 3	0,132	0,008	62,5
Control positivo 4	0,201	0,009	125
Control positivo 5	0,349	0,019	250
Control positivo 6	0,635	0,012	500
Control positivo 7	0,958	0,101	1000
Paciente ID	DO promedio	Desv. Estan.	
01-001 Visita 1	0,053	0,000	
02-001 Visita 1	0,051	0,000	
02-001 Visita 7	0,053	0,002	
02-001 Visita 8	0,050	0,001	
03-001 Visita 1	0,051	0,001	
03-001 Visita 2	0,051	0,001	
03-001 Visita 7	0,050	0,000	
03-002 Visita 1	0,052	0,004	
03-002 Visita 2	0,056	0,006	

Ejemplo 17

10

Tratamiento de la enfermedad de Wolman (WD) mediante la administración de LAL recombinante

[0209] A las 7 semanas de vida una paciente es admitida en el hospital debido a la dificultad en el aumento de peso y la mala evolución desde su nacimiento. En la exploración física inicial la paciente pesa 3,6 kg (peso al nacer 3,7 kg) y está delgada, con pliegues de piel suelta. El abdomen está distendido, con una hepatomegalia firme de 6 cm y una esplenomegalia firme de aproximadamente 4 cm. Los ganglios linfáticos agrandados se observan en la ingle y la actividad muscular es débil.

[0210] El nivel de hemoglobina inicial es de 9,2 g, plaquetas 506.000, y glóbulos blancos 11.550. El análisis de orina es normal, y frotis de médula ósea reveló linfocitos vacuolados y numerosas células espumosas. Mediciones químicas en suero: lípidos totales 834 mg/100 ml, fosfolípidos 176 mg/100 ml, triglicéridos 141 mg/100 ml, colesterol 129 mg/100 ml, bilirrubina 0,3 mg/100 ml, fosfatasa alcalina 9,0 BU%, SGOT 90 unidades, SGPT 50 unidades, colinesterasa 20 unidades, nitrógeno de urea 8,3 mg, azúcar en ayuno 45 mg/100 ml. La tomografía computarizada del abdomen muestra hepatoesplenomegalia y glándulas suprarrenales bilaterales simétricamente agrandadas con calcificación.

25

[0211] A la paciente se le implanta quirúrgicamente un puerto de acceso vascular venosa para la dosificación. Después de conectar el puerto a una máquina de infusión ambulatoria, la paciente se trata previamente con 1 mg/kg de difenhidramina 20 minutos antes de la infusión de LAL recombinante con el fin de contrarrestar posibles reacciones anafilácticas de la infusión. A la paciente se le administra entonces LAL recombinante a 1 mg/kg en el transcurso de 5 horas mediante infusión intravenosa. Esta terapia se repite una vez cada 7 días indefinidamente.

30

[0212] Dentro de las dos semanas después de la administración de la primera dosis de LAL recombinante, la paciente es evaluada en el aumento de peso y el tamaño de los órganos abdominales clave según lo determinado por ecografía. También se realizan resultados de laboratorio que analizan la actividad de la lipasa ácida lisosomal en la paciente.

35

Ejemplo 18

Tratamiento de la enfermedad por depósito de éster de colesterilo (CESD) mediante la administración de LAL recombinante

40

[0213] Se examina por su pediatra un niño de 3 años de edad con una erupción pruriginosa abdominal. Tras un examen abdominal, se observa hepatomegalia por el médico y confirmada por ultrasonido. En este punto no se realiza un diagnóstico y el paciente es monitorizado periódicamente.

5 **[0214]** A los 8 años, es admitido en el hospital con gastroenteritis. La microscopía óptica de una muestra de biopsia del hígado muestra un aumento de glucógeno intracitoplasmático y pequeñas gotas de lípidos en los hepatocitos. La microscopía electrónica muestra gotas de lípidos unidos a membrana con pequeños gránulos densos de electrones. Se realiza un diagnóstico de trabajo de la enfermedad de depósito de glicógeno tipo III (enfermedad de DeBrancher), pero la actividad Debrancher de los fibroblastos de la piel es normal.

10 **[0215]** A los 10 años, persiste la hepatomegalia y se realiza una segunda biopsia hepática se toma. La microscopía óptica muestra una arquitectura lobular alterada del parénquima hepático con hepatocitos distendidos que contienen gránulos citoplásmicos y vacuolas con fibrosis periportal leve. Se encuentra que la actividad de la lipasa ácida de fibroblastos es un 7% de lo normal, lo que confirma el diagnóstico de CESD. Las concentraciones plasmáticas de colesterol total (CT), triglicéridos (TG), colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) están cada una por encima del percentil 95 para la edad y el sexo en 7,51, 3,24 y 5,58 mmol/L, respectivamente, mientras que el colesterol de lipoproteína de alta densidad en plasma (HDL-C) está por debajo del percentil 5 a 0,47 mmol/L; ha combinado hiperlipidemia (hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hipoalfalipoproteinemia y hiperbetalipoproteinemia).

15 **[0216]** Al paciente se le implanta quirúrgicamente un puerto de acceso vascular venosa para la dosificación. Después de conectar el puerto a una máquina de infusión ambulatoria, la paciente se trata previamente con 5 mg/kg de difenhidramina 20 minutos antes de la infusión de LAL recombinante con el fin de contrarrestar posibles reacciones anafilácticas de la infusión. Al paciente se le administra entonces LAL recombinante a 5 mg/kg en el transcurso de 5 horas mediante infusión intravenosa. Esta terapia se repite una vez cada 14 días indefinidamente.

20 **[0217]** Dentro de las dos semanas después de la administración de la primera dosis de LAL recombinante, el paciente es evaluado en el aumento de peso y el tamaño de los órganos abdominales clave según lo determinado por ecografía. También se realizan resultados de laboratorio que analizan la actividad de la lipasa ácida lisosomal en el paciente.

25 **[0218]** Cada ejemplo en la memoria anterior se proporciona a modo de explicación de la presente descripción, sin limitarla. De hecho, será evidente para los expertos en la materia que se pueden hacer diversas modificaciones, combinaciones, adiciones, supresiones y variaciones en la presente descripción. Por ejemplo, las características ilustradas o descritas como parte de un ejemplo o realización pueden utilizarse en otro ejemplo o realización para producir un ejemplo o realización adicional.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 **[0219]**
 <110> Synageva BIOPHARMA CORP.
 <120> PROCEDIMIENTOS PARA TRATAR LA DEFICIENCIA EN LIPASA ÁCIDA LISOSOMAL EN PACIENTES
 <130> P40523EP-D1-PCT
 <140> Divisional de EP11758644.6
 40 <141> 2011-09-09
 <150> 61/403 011
 <151> 2010-09-09
 <150> 61/456 014
 <151> 2010-10-29
 45 <150> 61/432 372
 <151> 2011-01-13
 <150> PCT/US2011/033699
 <151> 2011-04-23
 <160 > 2
 50 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 378
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55 <220>
 <221> MISC-FEATURE
 <223> LAL
 <400> 1

60

65

ES 2 769 836 T3

Ser Gly Gly Lys Leu Thr Ala Val Asp Pro Glu Thr Asn Met Asn Val
 1 5 10 15

5

Ser Glu Ile Ile Ser Tyr Trp Gly Phe Pro Ser Glu Glu Tyr Leu Val
 20 25 30

10

Glu Thr Glu Asp Gly Tyr Ile Leu Cys Leu Asn Arg Ile Pro His Gly
 35 40 45

15

Arg Lys Asn His Ser Asp Lys Gly Pro Lys Pro Val Val Phe Leu Gln
 50 55 60

20

His Gly Leu Leu Ala Asp Ser Ser Asn Trp Val Thr Asn Leu Ala Asn
 65 70 75 80

25

Ser Ser Leu Gly Phe Ile Leu Ala Asp Ala Gly Phe Asp Val Trp Met

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 769 836 T3

					85					90					95		
5	Gly	Asn	Ser	Arg	Gly	Asn	Thr	Trp	Ser	Arg	Lys	His	Lys	Thr	Leu	Ser	
				100					105					110			
10	Val	Ser	Gln	Asp	Glu	Phe	Trp	Ala	Phe	Ser	Tyr	Asp	Glu	Met	Ala	Lys	
			115					120					125				
15	Tyr	Asp	Leu	Pro	Ala	Ser	Ile	Asn	Phe	Ile	Leu	Asn	Lys	Thr	Gly	Gln	
		130					135					140					
20	Glu	Gln	Val	Tyr	Tyr	Val	Gly	His	Ser	Gln	Gly	Thr	Thr	Ile	Gly	Phe	
	145					150					155					160	
25	Ile	Ala	Phe	Ser	Gln	Ile	Pro	Glu	Leu	Ala	Lys	Arg	Ile	Lys	Met	Phe	
				165						170					175		
30	Phe	Ala	Leu	Gly	Pro	Val	Ala	Ser	Val	Ala	Phe	Cys	Thr	Ser	Pro	Met	
			180						185					190			
35	Ala	Lys	Leu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Leu	Ile	Lys	Asp	Leu	Phe	Gly	
			195					200					205				
40	Asp	Lys	Glu	Phe	Leu	Pro	Gln	Ser	Ala	Phe	Leu	Lys	Trp	Leu	Gly	Thr	
		210					215					220					
45	His	Val	Cys	Thr	His	Val	Ile	Leu	Lys	Glu	Leu	Cys	Gly	Asn	Leu	Cys	
	225					230					235					240	
50	Phe	Leu	Leu	Cys	Gly	Phe	Asn	Glu	Arg	Asn	Leu	Asn	Met	Ser	Arg	Val	
				245						250					255		
55	Asp	Val	Tyr	Thr	Thr	His	Ser	Pro	Ala	Gly	Thr	Ser	Val	Gln	Asn	Met	
			260						265					270			
60	Leu	His	Trp	Ser	Gln	Ala	Val	Lys	Phe	Gln	Lys	Phe	Gln	Ala	Phe	Asp	
			275					280					285				
65	Trp	Gly	Ser	Ser	Ala	Lys	Asn	Tyr	Phe	His	Tyr	Asn	Gln	Ser	Tyr	Pro	
		290					295					300					
70	Pro	Thr	Tyr	Asn	Val	Lys	Asp	Met	Leu	Val	Pro	Thr	Ala	Val	Trp	Ser	
	305					310					315					320	
75	Gly	Gly	His	Asp	Trp	Leu	Ala	Asp	Val	Tyr	Asp	Val	Asn	Ile	Leu	Leu	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Lipasa ácida lisosomal humana recombinante (rhLAL) aislada que contiene glicanos unidos a N unidos a Asn15, Asn80, Asn140, Asn252 y Asn300, tal como se establece en la SEQ ID NO: 1, en la que los glicanos unidos a N comprenden estructuras de dos, tres y cuatro antenas con N-acetilglucosamina (GlcNAc), manosa y/o manosa-6-fosfato (M6P) y en la que la rhLAL comprende glicanos que contienen M6P en Asn80, Asn140 y Asn252.
2. rhLAL aislada, según la reivindicación 1, en la que la rhLAL no contiene ácido siálico.
- 10 3. rhLAL aislada, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el peso molecular de la rhLAL es de aproximadamente 55 kD.
4. rhLAL aislada, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la actividad específica de la rhLAL es al menos de aproximadamente 100 U/mg.
- 15 5. rhLAL aislada, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la rhLAL no comprende glicanos unidos a O.
6. rhLAL aislada, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que Asn51 de la rhLAL no está glicosilado.
- 20 7. rhLAL aislada, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la rhLAL tiene una semivida ($t_{1/2}$) en suero que es menor de 40 minutos.

AST en suero con WD

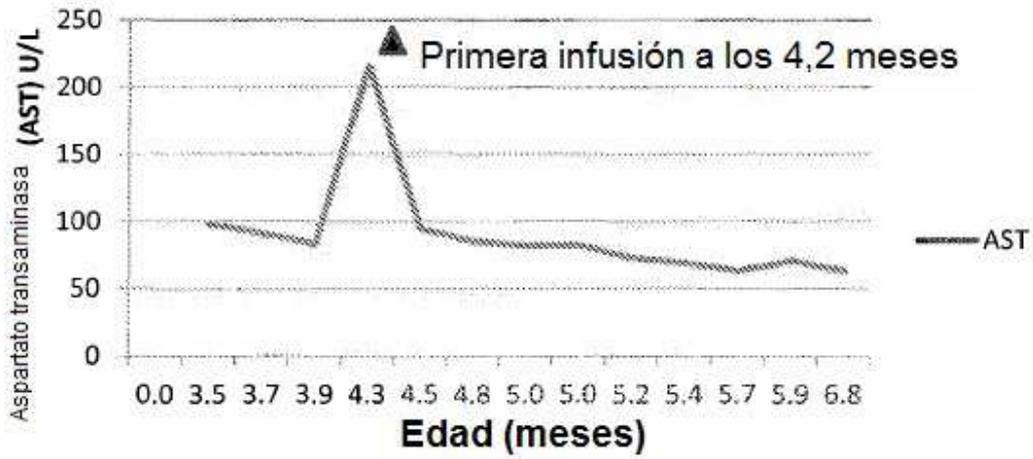


Figura 1A

ALT en suero con WD

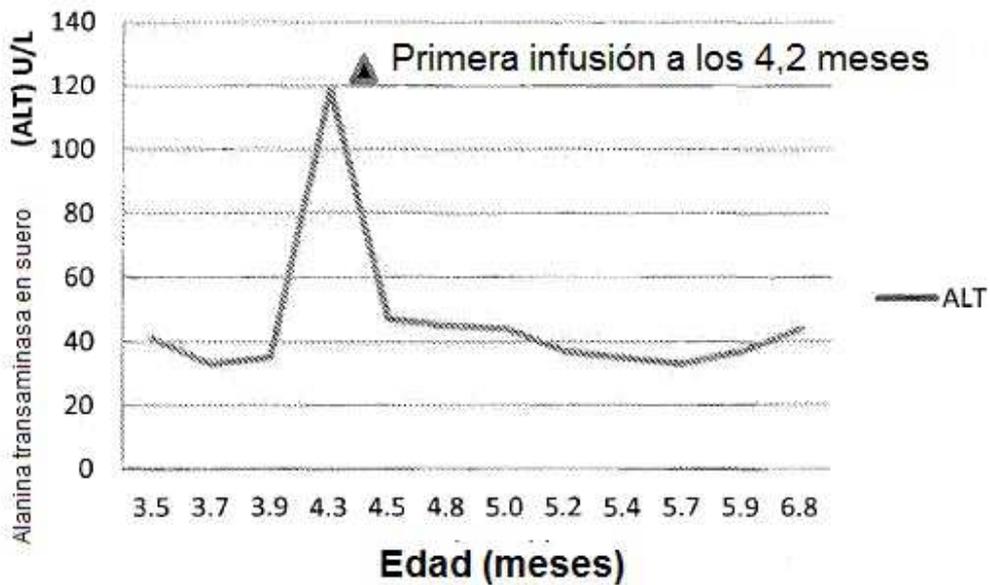


Figura 1B

Ferritina en suero con WD (ng/l)

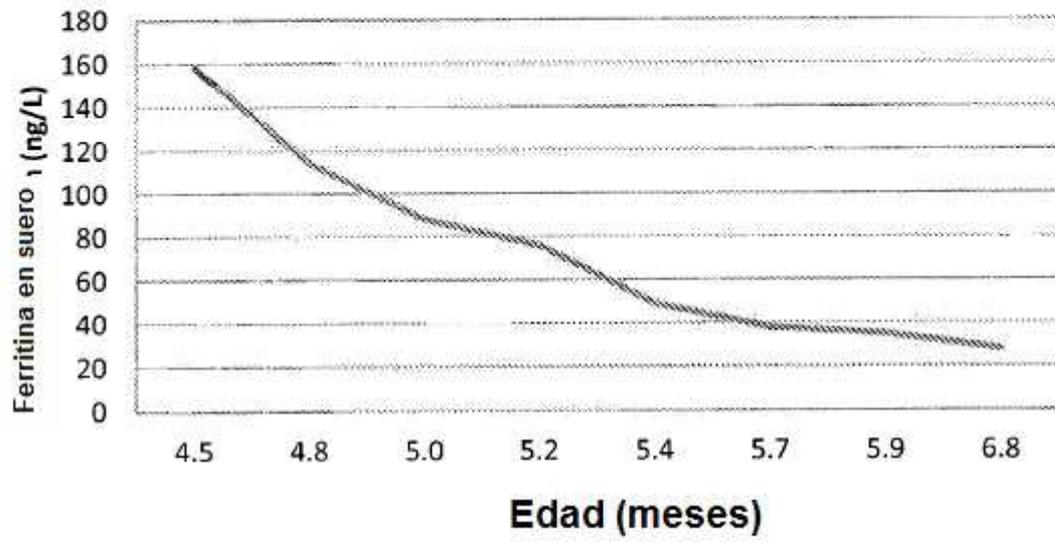


Figura 2

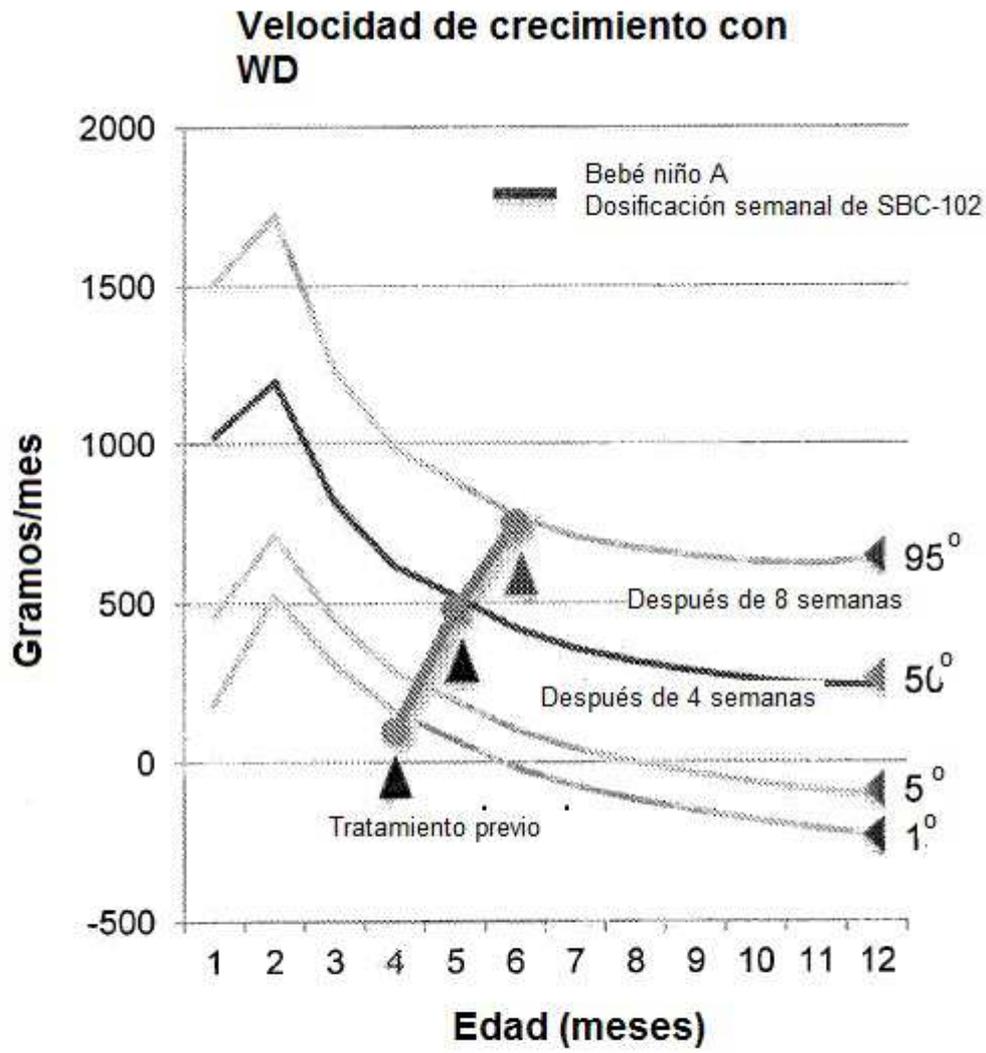


Figura 3

Datos de crecimiento con WD

Percentiles de peso por edad: niños

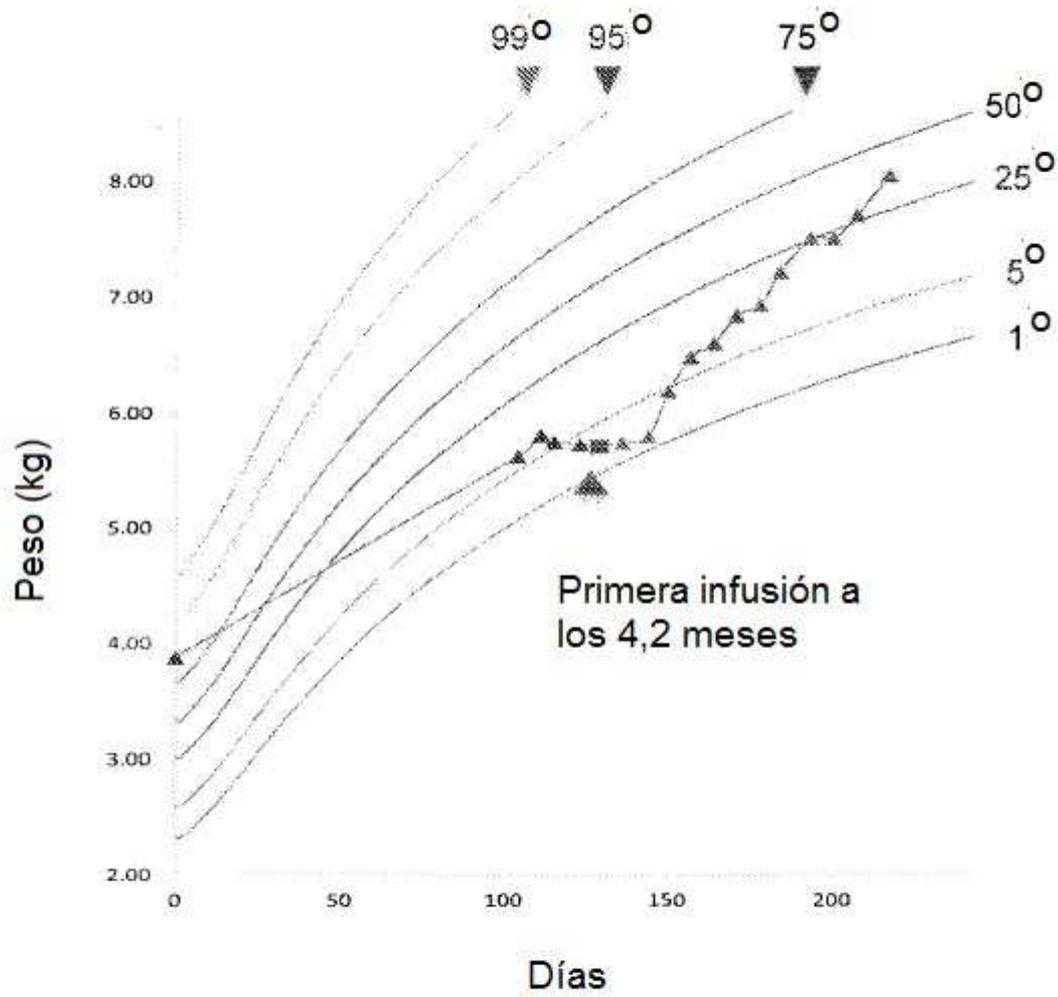


Figura 4

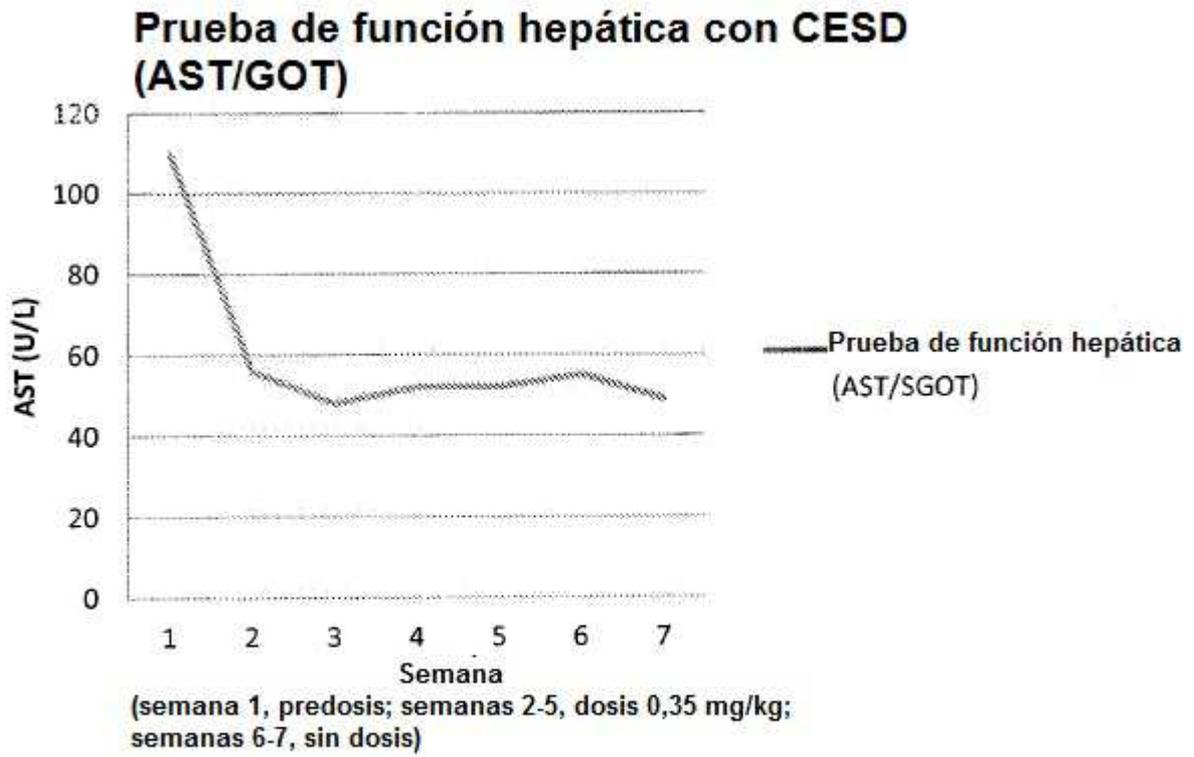


Figura 5

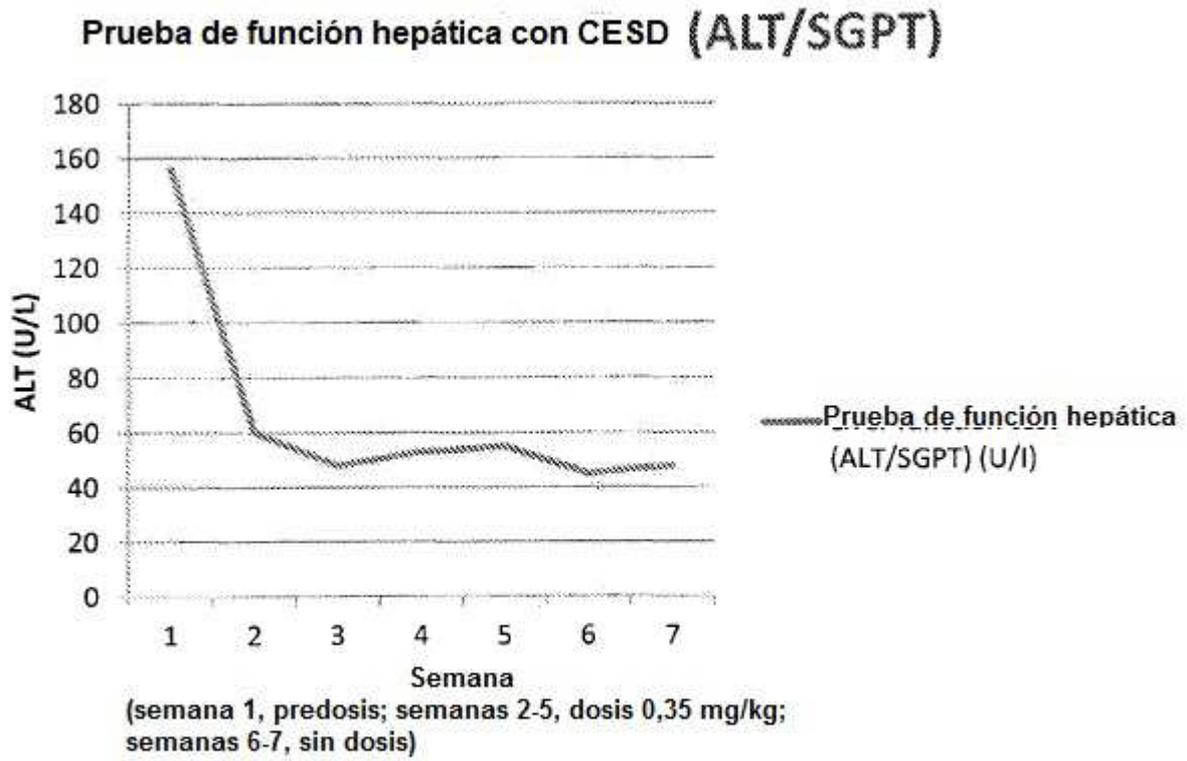


Figura 6

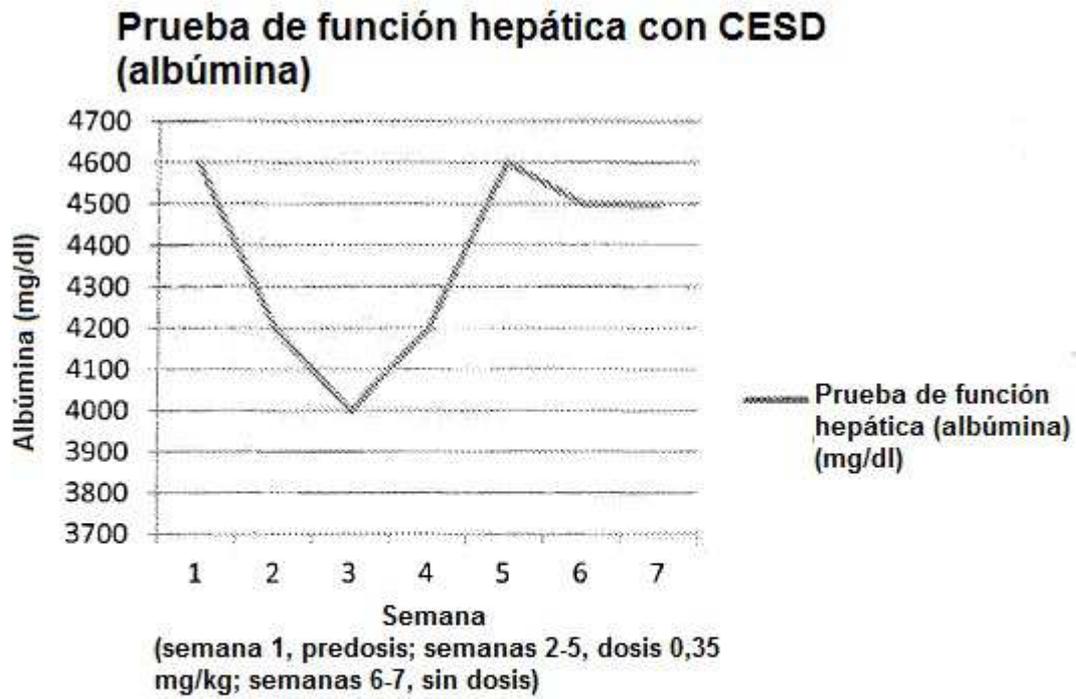


Figura 7

Ferritina sérica con CESD

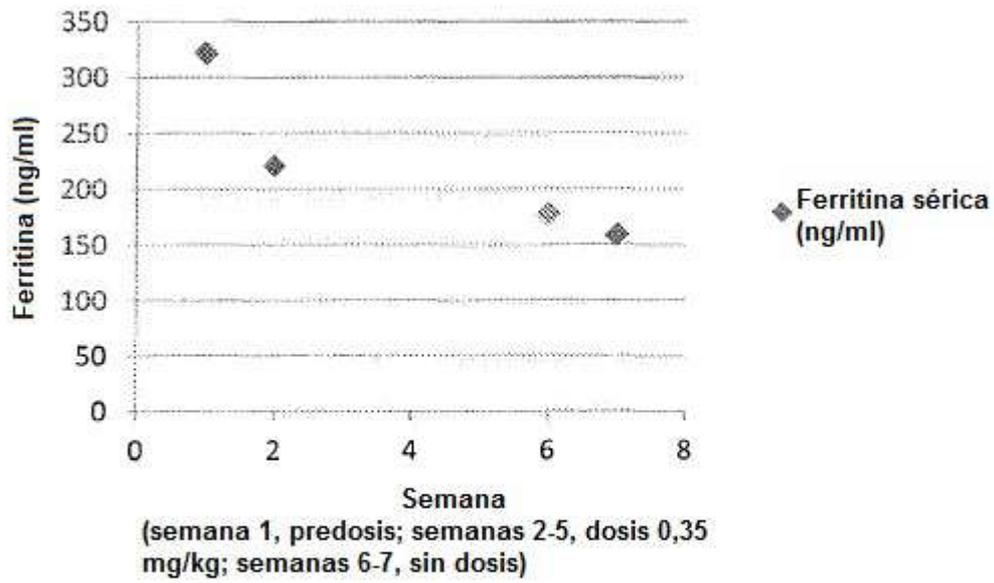


Figura 8

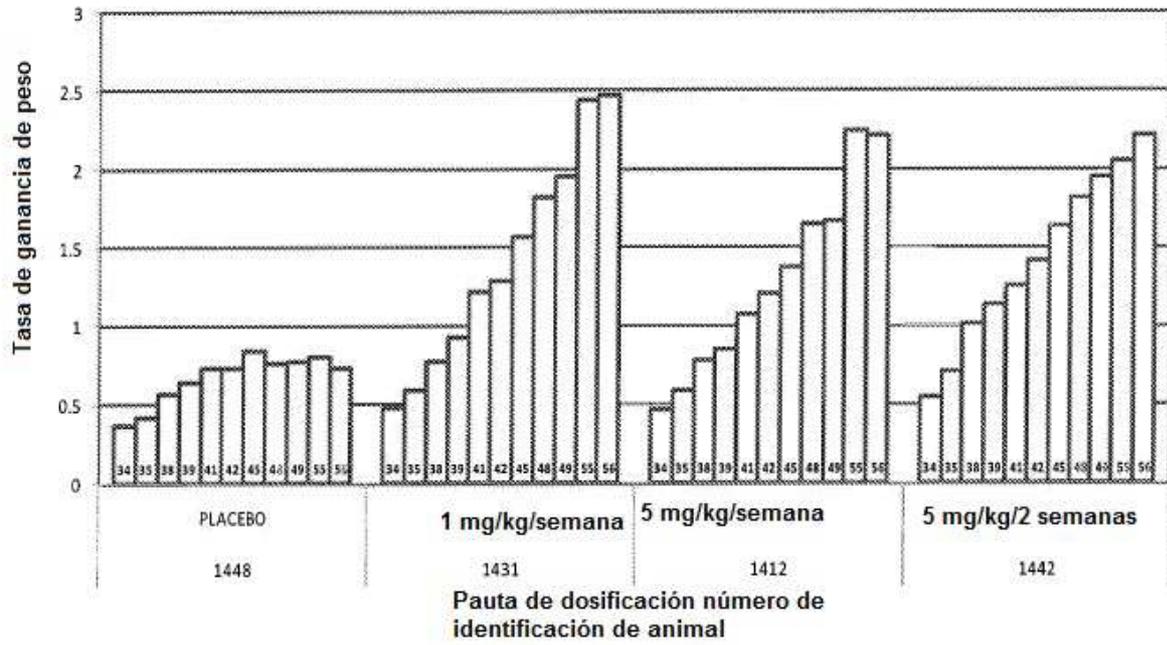
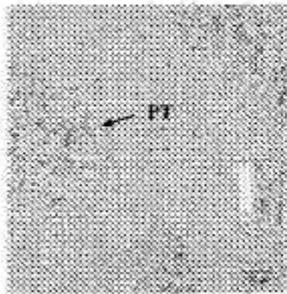
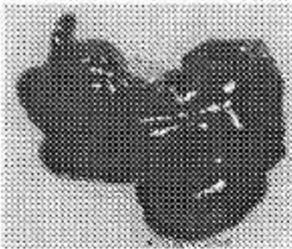
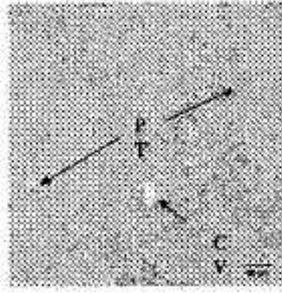
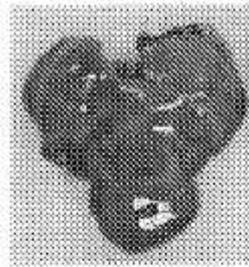


Figura 9

control tipo salvaje



Tratado con SBC-102



Placebo

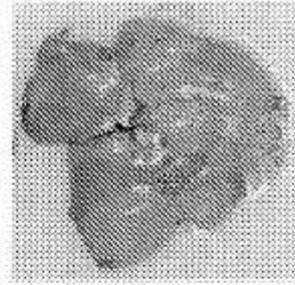


Figura 10

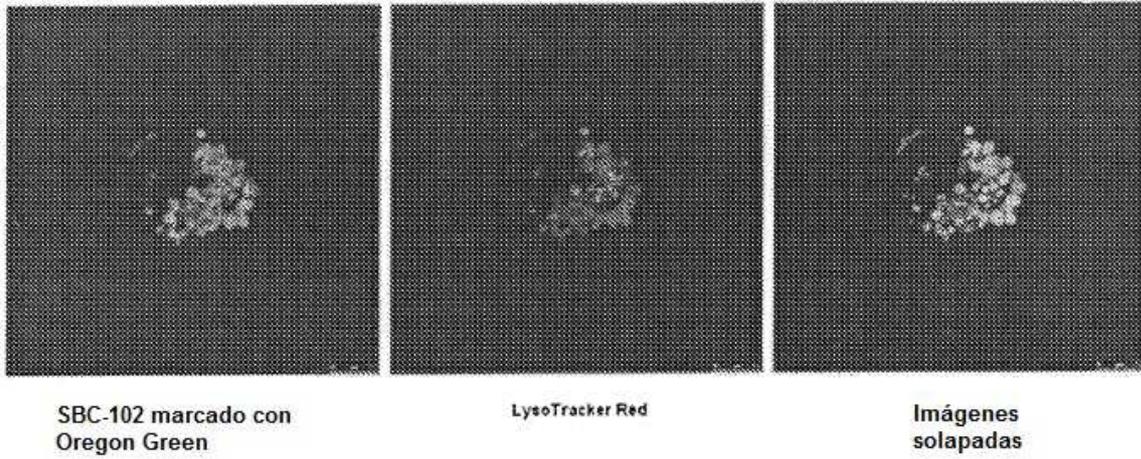


Figura 11

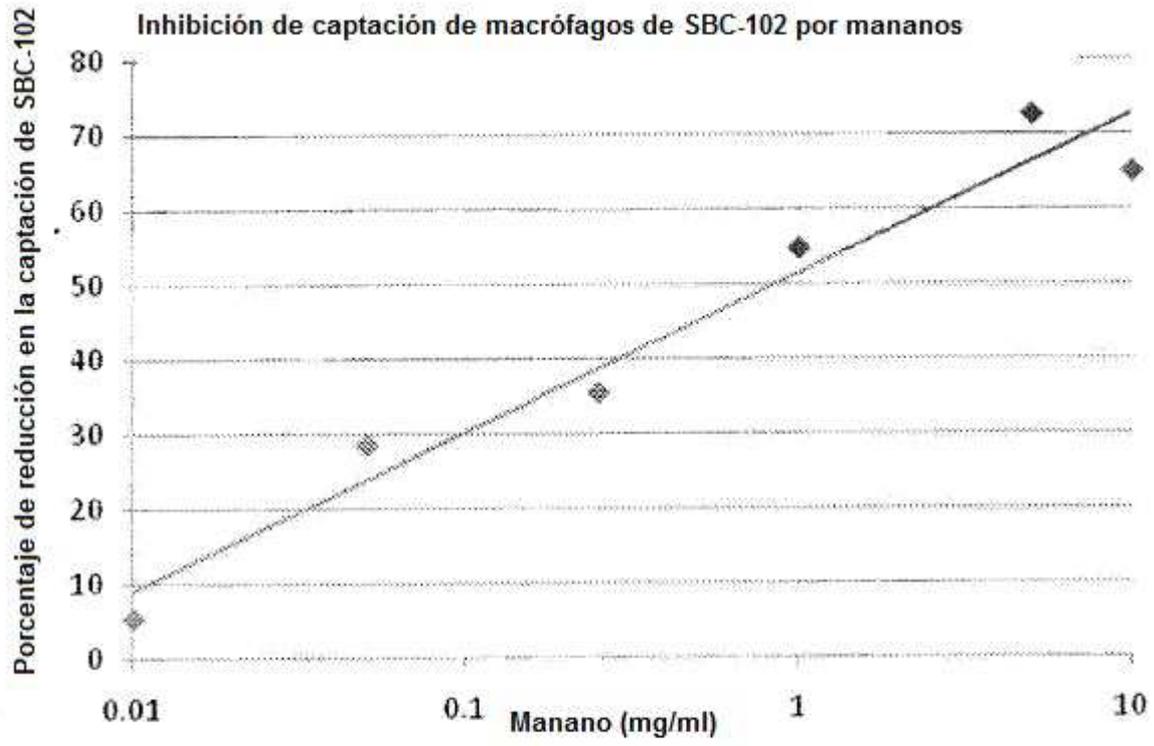


Figura 12

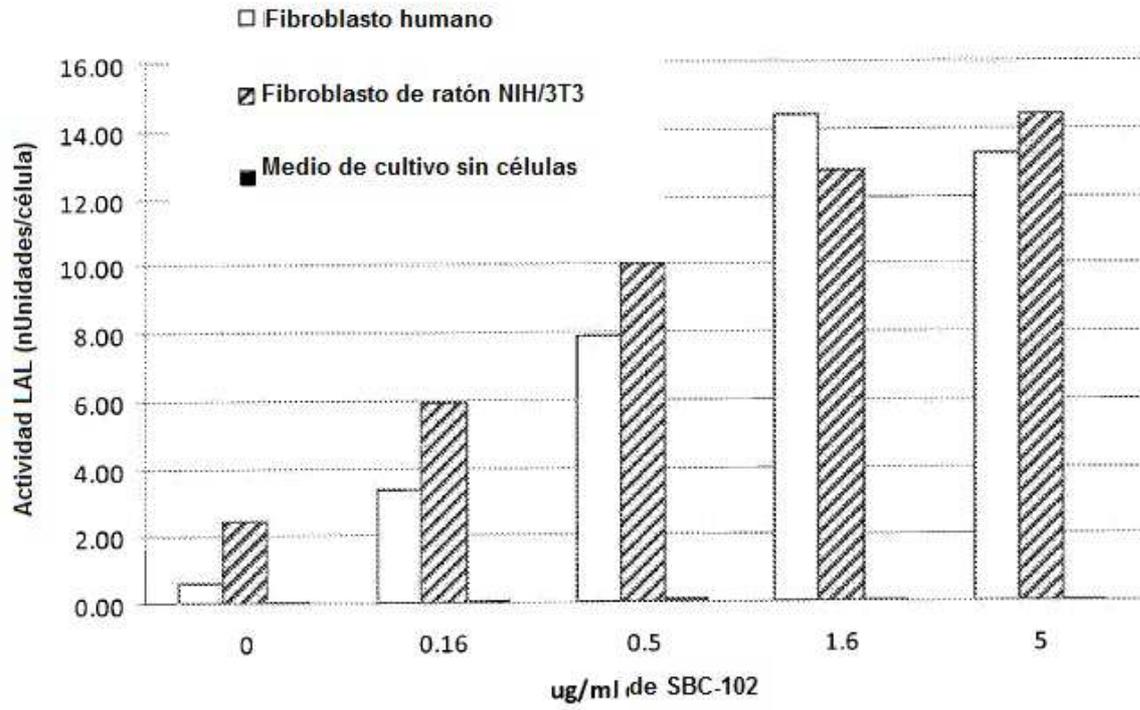


Figura 13

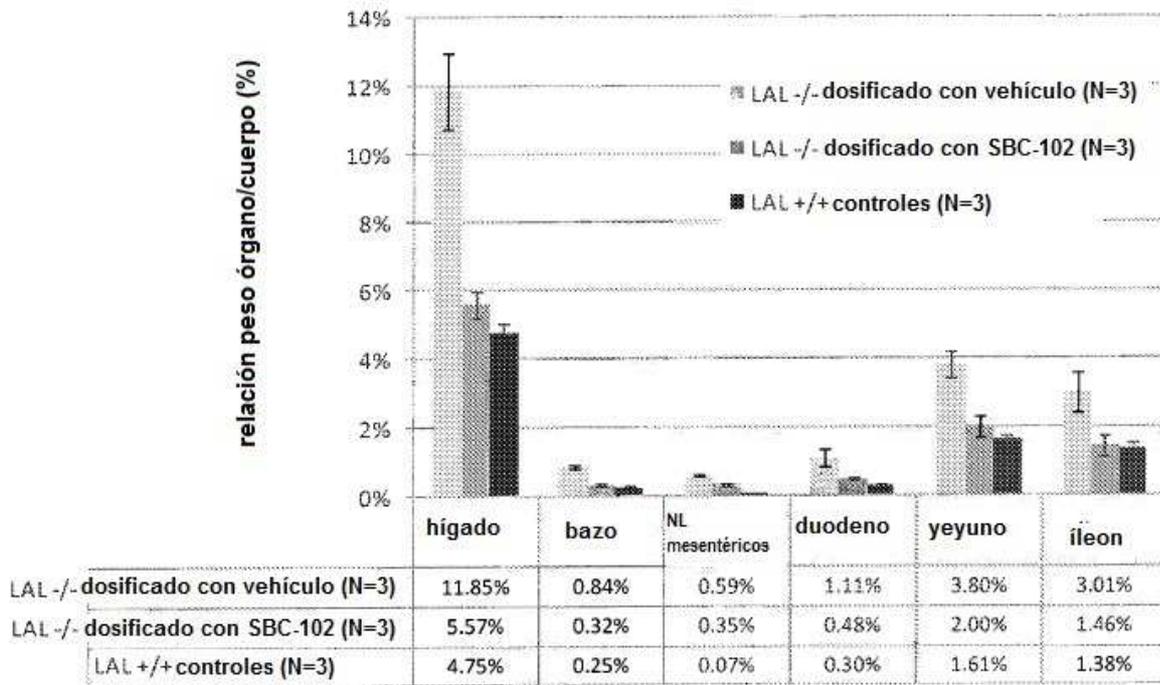


Figura 14

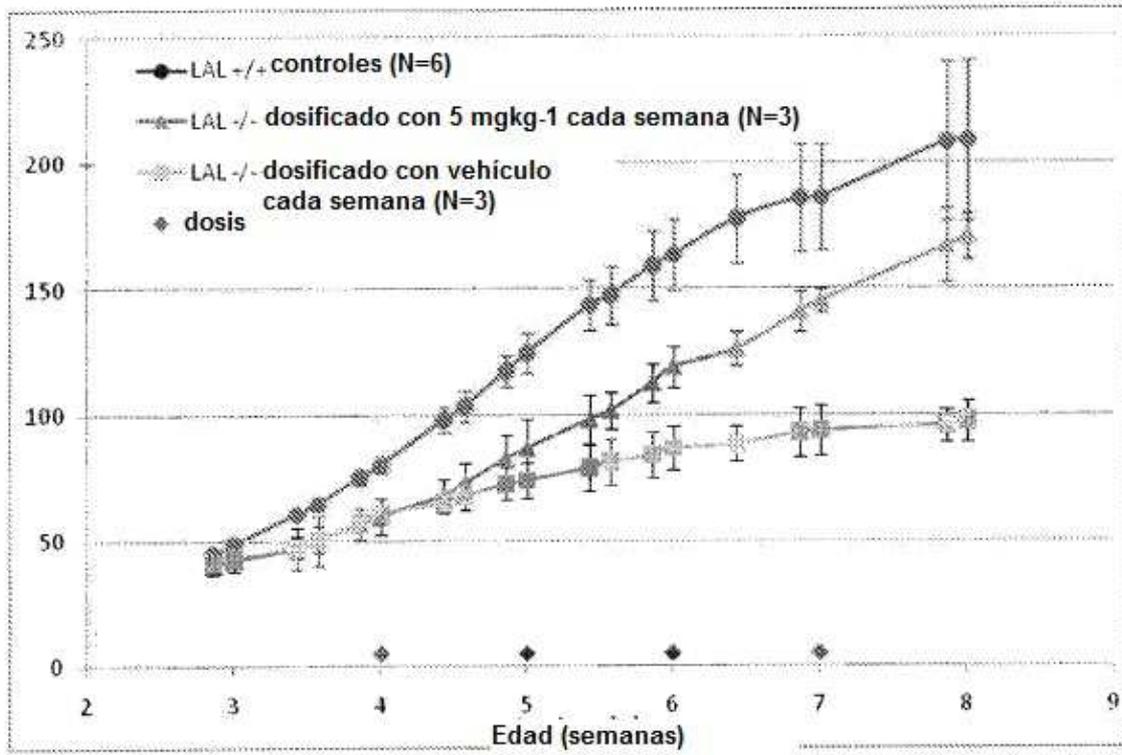


Figura 15

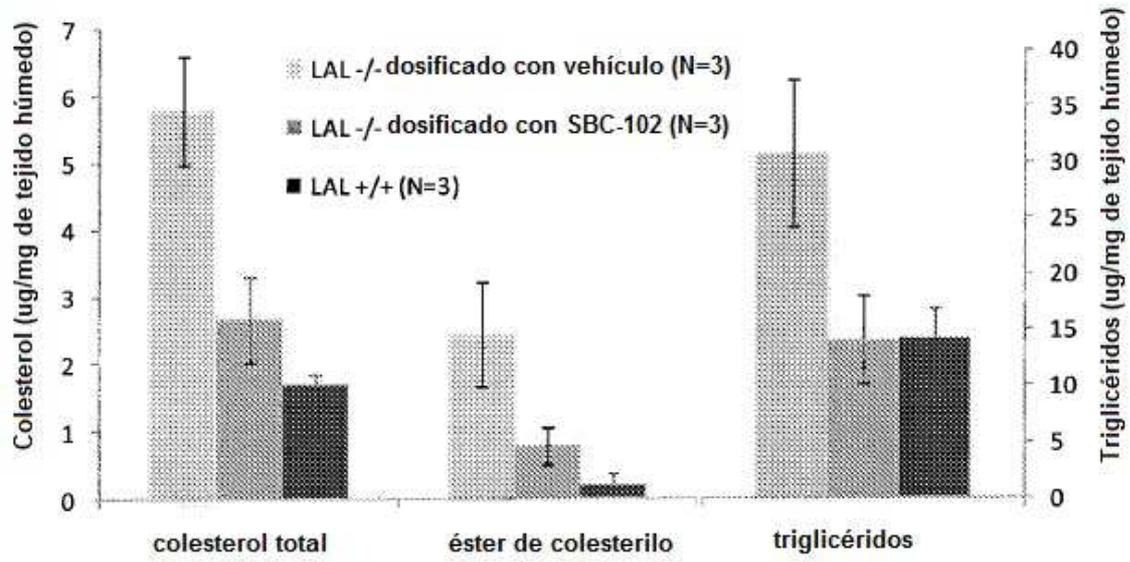
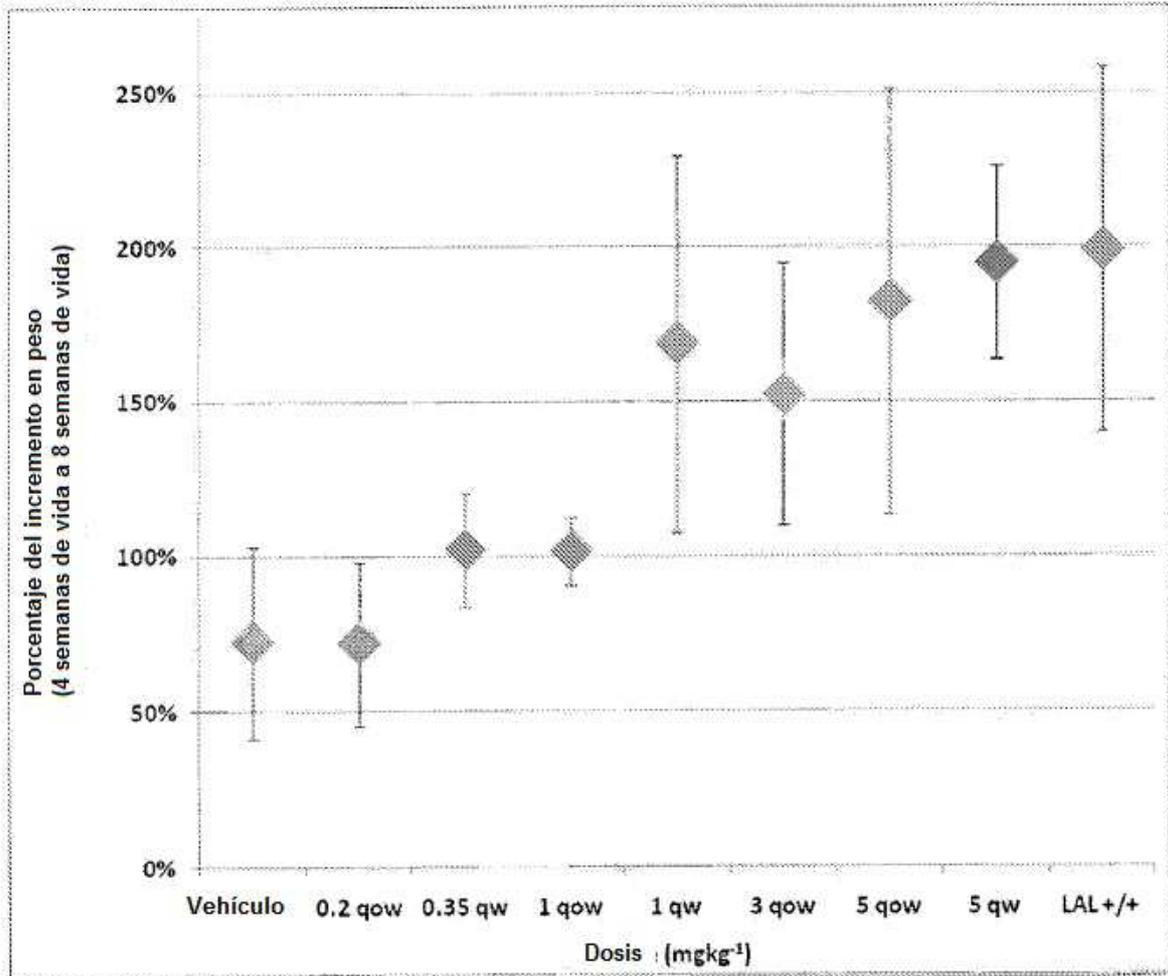
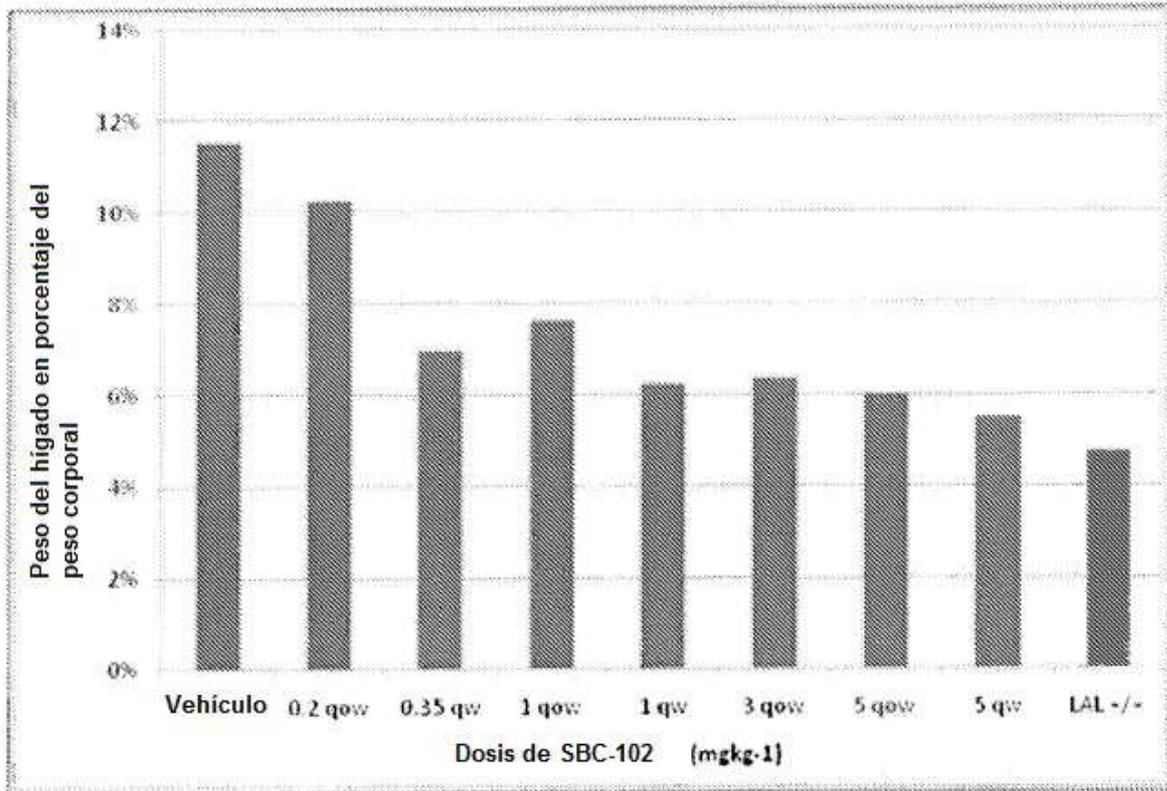


Figura 16



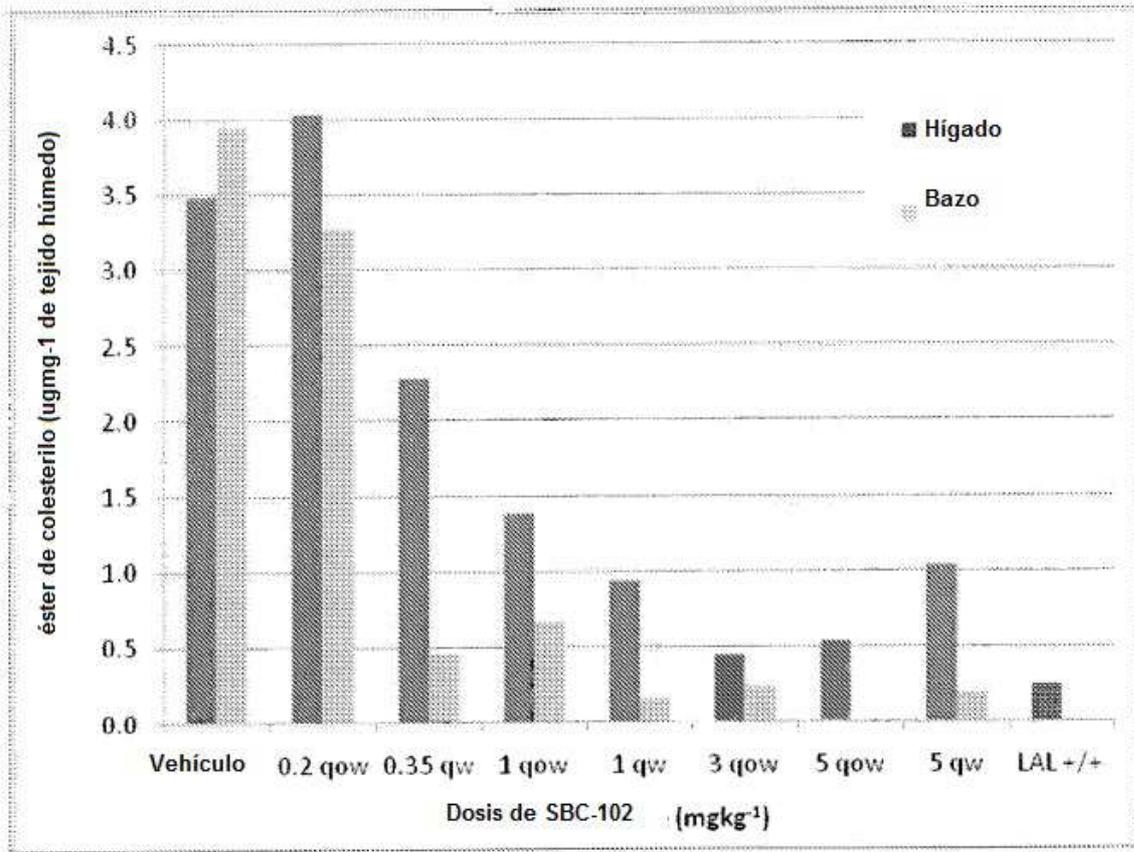
qw: cada semana
 qow: una vez cada
 dos semanas

Figura 17



qw: cada semana
 qow: una vez cada dos
 semanas

Figura 18



qw: cada semana
 qow: una vez cada dos
 semanas

Figura 19