

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2007.01.22	(73) Titular(es): GENZYME CORPORATION 500 KENDALL STREET CAMBRIDGE, MA 02142 US
(30) Prioridade(s): 2006.01.20 US 760378 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2008.10.29	
(45) Data e BPI da concessão: 2014.10.01 203/2014	(72) Inventor(es): JAMES DODGE US MARCO PASSINI US LAMYA SHIHABUDDIN US SENG CHENG US
	(74) Mandatário: ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **DISTRIBUIÇÃO DE ENZIMAS INTRAVENTRICULAR PARA DOENÇAS DE ARMAZENAMENTO LISSOSSÓMICO**

(57) Resumo:

AS DOENÇAS DE ARMAZENAMENTO LISSOSSÓMICO PODEM SER TRATADAS COM SUCESSO UTILIZANDO A DISTRIBUIÇÃO INTRAVENTRICULAR DA ENZIMA QUE É ETIOLOGICAMENTE DEFICIENTE NA DOENÇA. A ADMINISTRAÇÃO PODE SER EFECTUADA LENTAMENTE PARA CONSEGUIR UM EFEITO MÁXIMO. SURPREENDENTEMENTE, OS EFEITOS SÃO OBSERVADOS EM AMBOS OS LADOS DA BARREIRA HEMATO-ENCEFÁLICA, FAZENDO DESTES UM MEIO IDEAL DE DISTRIBUIÇÃO PARA DOENÇAS DE ARMAZENAMENTO LISSOSSÓMICO QUE AFECTAM O CÉREBRO E ÓRGÃOS VISCERAIS.

RESUMO

"DISTRIBUIÇÃO DE ENZIMAS INTRAVENTRICULAR PARA DOENÇAS DE ARMAZENAMENTO LISOSSÓMICO"

As doenças de armazenamento lisossómico podem ser tratadas com sucesso utilizando a distribuição intraventricular da enzima que é etiologicamente deficiente na doença. A administração pode ser efectuada lentamente para conseguir um efeito máximo. Surpreendentemente, os efeitos são observados em ambos os lados da barreira hemato-encefálica, fazendo destes um meio ideal de distribuição para doenças de armazenamento lisossómico que afectam o cérebro e órgãos viscerais.

DESCRIÇÃO

"DISTRIBUIÇÃO DE ENZIMAS INTRAVENTRICULAR PARA DOENÇAS DE ARMAZENAMENTO LISOSSÓMICO"

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

Esta invenção está relacionada com a área das doenças de armazenamento lisossômico. Em particular, refere-se ao tratamento e/ou prevenção destas doenças por terapia de substituição enzimática.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Um grupo de distúrbios metabólicos conhecidos como doenças de armazenamento lisossômico (LSD) inclui mais de quarenta distúrbios genéticos, muitos dos quais envolvem deficiências genéticas em várias hidrolases lisossômicas. As doenças de armazenamento lisossômico representativas e as enzimas deficientes associadas são listadas na Tabela 1.

TABELA I

<u>Doença de armazenamento lisossómico</u>	<u>Enzima deficiente</u>
Aspartilglucosaminuria	Aspartilglucosaminidase
Fabry	alfa-Galactosidase A
Doença Infantil de Batten* (CNL1)	Proteína Palmitoil-Tioesterase
Doença de Batten Tardia Clássica* (CNL2)	Tripeptidil-Peptidase
Doença de Batten Juvenil* (CNL3)	Proteína Lisossómica Transmembranar
Batten, outras formas* (CNL4-CNL8)	Produtos de genes múltiplos
Cistinose	Transportador de cisteína
Farber	Ceramidase ácida
Fucosidose	Alfa-L-fucosidase ácida
Galactosidosialidose	Proteína protetora/catepsina A
Tipos 1, 2* e 3* de Gaucher	Beta-glucosidase ácida, ou
Gangliosidose G.sub.M1*	Beta-galactosidase ácida
Hunter*	Iduronate-2-sulfatase
Hurler-Scheie*	alpha-L-Iduronidase
Krabbe*	Galactocerebrosidase
alfa-Manosidoses*	Alfa-marmosidase ácida
beta-Manosidose*	Beta-manosidase ácida
Maroteaux-Lamy	Arilsulfatase B
Leucodistrofia metacromática*	Arilsulfatase A

(continuação)

<u>Doença de armazenamento lisossômico</u>	<u>Enzima deficiente</u>
Morquio A	N-Acetilgalactosamina-6-sulfato
Morquio B	Beta-galactosidase ácida
Mucopolidose II/III*	N-Acetilglucosamina-1
-Niemann-Pick A*, B	Esfingomielinase ácida
Niemann-Pick C*	NPC-1
Pompe* ácida	Alfa-glucosidase
Sandhof*	Beta-Hexosaminidase B
Sanfilippo A*	Heparano-N-sulfatase
Sanfilippo B*	Alfa-N-Acetilglucosaminidase
Sanfilippo C*	Acetil-CoA: alfa-glucosaminida
Sanfilippo D*	N-Acetilglucosamina-6-sulfato
Doença de Schindler*	Alfa-N-Acetilgalactosaminidase
Schindler-Kanzaki	Alfa-N-Acetilgalactosaminidase
Sialidose	Alfa-Neuramidase
Sly*	Beta-Glucuronidase
Tay-Sachs*	Beta-Hexosaminidase A
Wolman*	Lipase ácida
*envolvimento do SNC	

A marca característica das LSD é a acumulação anormal de metabolitos nos lisossomas o que leva à formação de um grande número de lisossomas distendidos no pericário. Um dos desafios principais no tratamento de LSD (em oposição ao tratamento de uma enzimopatia de um órgão específico, e. g., uma enzimopatia específica do fígado) é a necessidade de reverter a patologia de armazenamento lisossómico em múltiplos tecidos separados. Algumas LSD podem ser eficazmente tratadas por infusão intravenosa da enzima em falta, conhecida como terapia de substituição enzimática (ERT). Por exemplo, os doentes Gaucher tipo 1 têm apenas doença visceral e respondem favoravelmente a ERT com glucocerebrosidase recombinante (Cerezyme™, Genzyme Corp.). No entanto, doentes com doença metabólica que afecta o SNC (e. g.; doença de Gaucher tipo 2 ou 3) apenas respondem parcialmente a ERT intravenosa porque a enzima de substituição é impedida de entrar no cérebro pela barreira hemato-encefálica (BHE). Além disso, as tentativas para introduzir uma enzima de substituição no cérebro por injeção directa têm sido limitadas, em parte, devido à citotoxicidade da enzima em concentrações locais elevadas e as taxas de difusão limitadas do parênquima no cérebro (Partridge, Peptide Drug Delivery to the Brain, Raven Press, 1991).

Uma LSD exemplificativa é a doença de Niemann-Pick tipo A (NPA). De acordo com a entrada P17405 de UniProtKB/Swiss-Prot, a deficiência no gene SMPD1, localizada no cromossoma 11, (11p15.4-p15.1), são a causa de doença de Niemann-Pick tipo A (NPA), também referido como a forma infantil clássica da doença. A doença de Niemann-Pick é um distúrbio recessivo clinicamente e geneticamente heterogéneo. É causada pela acumulação de esfingomiélin e outros lípidos metabolicamente relacionados nos lisossomas, resultando em início da neurodegeneração desde o

início da vida. Os doentes podem apresentar xantomias, pigmentação, hepatosplenomegalia, linfadenopatia e atraso mental. A doença de Niemann-Pick ocorre, mais frequentemente, entre os indivíduos de ascendência Ashkenazi Jewish do que na população em geral. A NPA é caracterizada pelo início muito precoce na infância e um curso rápido e progressivo que leva à morte em três anos. A enzima esfingomielinase ácida (ASM) que é deficiente em NPA converte a esfingomielina em ceramida. A ASM também possui actividades de fosfolipase C para 1,2-diacilglicerolfosfocolina e 1,2-diacilglicerolfosfoglicerol. A enzima converte Esfingomielina + H₂O -> N-acilesfingosina + fosfato de colina.

Jin *et al.* (2003) *Mol. Ther.*, 8:876-885 divulga células da medula óssea de murino transduzidas com um vector retroviral para sobre-expressar e libertar esfingomielinase ácida humana. As células transduzidas foram transplantadas intravenosamente em murganhos deficientes em esfingomielinase ácida, um modelo de doença de Niemann-Pick humana.

De acordo com a presente divulgação, as doenças de armazenamento lisossómico, tais como qualquer das doenças identificadas na Tabela 1 acima, *e. g.*, doença de Niemann-Pick tipo A ou B, são tratadas e/ou prevenidas utilizando distribuição intraventricular no cérebro da enzima que é etiologicamente deficiente na doença. A administração pode ser efectuada lentamente para conseguir o efeito máximo. Os efeitos são observados em ambos os lados da barreira hemato-encefálica, tornando-a um meio de distribuição útil para doenças de armazenamento lisossómico que afectam o cérebro e/ou órgãos viscerais. Num primeiro aspecto, a presente divulgação proporciona, deste modo, um método de tratamento ou prevenção de

uma doença de armazenamento lisossómico no doente, doença que é causada por uma deficiência enzimática, compreendendo o método a administração da enzima ao doente via distribuição intraventricular no cérebro. Num aspecto relacionado, a invenção proporciona a utilização de uma enzima para a preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma doença de armazenamento lisossómico num doente, doença que é causada pela deficiência da enzima no doente, em que o tratamento ou prevenção compreende a administração intraventricular da enzima no cérebro. A deficiência enzimática pode ser causada por, e. g., uma deficiência na expressão da enzima ou através de uma mutação na enzima que leva a uma redução do nível de actividade (e. g., sendo a enzima inactiva) ou uma taxa aumentada de eliminação/clivagem da enzima *in vivo*. A deficiência pode levar a uma acumulação de um substrato de enzima e a administração da enzima pode levar a uma redução no nível de substrato no cérebro. A doença de armazenamento lisossómico pode ser qualquer das doenças identificadas na Tabela 1 acima. A enzima pode ser um hidrolase lisossómica.

De acordo com um exemplo da presente divulgação, é tratado um doente com doente com doença de Niemann-Pick A ou B. É administrada uma esfingomielinase ácida ao doente via distribuição intraventricular no cérebro numa quantidade suficiente para reduzir os níveis de esfingomielina no referido cérebro.

Outro aspecto da presente divulgação é um kit para tratamento ou prevenção de uma doença de armazenamento lisossómico num doente, doença que é causada por uma deficiência enzimática. O kit compreende a enzima que é deficiente, e um cateter e/ou bomba para distribuição da enzima em um ou mais

ventrículos no cérebro. O cateter e/ou bomba pode ser especificamente concebida e/ou adaptada para distribuição intraventricular. De acordo com uma circunstância, a presente divulgação proporciona um kit para tratar um doente com doença de Niemann-Pick A ou B. O kit compreende uma esfingomielinase ácida e um cateter para distribuição da referida esfingomielinase ácida nos ventrículos do cérebro de um doente.

Ainda outro aspecto da presente divulgação é um kit para tratamento de um doente com doença de Niemann-Pick A ou B. O kit compreende uma esfingomielinase ácida e uma bomba para a distribuição da referida esfingomielinase ácida nos ventrículos do cérebro do doente.

De acordo com a presente divulgação, pode ser tratado um doente que tem uma doença de armazenamento lisossômico que é causada por uma deficiência enzimática que leva a uma acumulação do substrato da enzima. Estas doenças incluem a doença de Gaucher, doença de MPS I e II, doença de Pompe, e doença de Batten (CLN2), entre outras. A enzima deficiente na doença particular é administrada ao doente via distribuição intraventricular no cérebro. Pode ser administrada aos ventrículos laterais e/ou ao quarto ventrículo. A taxa de administração da enzima, de acordo com a presente divulgação, é tal que a administração de uma única dose pode ser como um bólus ou pode demorar cerca de 1-5 minutos, cerca de 5-10 minutos, cerca de 10-30 minutos, cerca de 30-60 minutos, cerca de 1-4 horas, ou consome mais do que quatro, cinco, seis, sete ou oito horas. Os níveis de substrato no referido cérebro podem ser deste modo reduzidos. A administração de uma única dose pode demorar mais do que 1 minuto, mais do que 2 minutos, mais do que 5 minutos, mais do que 10 minutos, mais do que 20 minutos, mais

do que 30 minutos, mais do que 1 hora, mais do que 2 horas ou mais do que 3 horas.

Estas e outras circunstâncias da presente divulgação que serão óbvias para os especialistas na técnica após leitura da descrição proporciona à técnica métodos e kits para o tratamento e/ou prevenção de doenças de armazenamento lisossómico, em particular os que envolvem as patologias do SNC e viscerais.

Com base na presente divulgação, a presente invenção proporciona uma esfingomielinase ácida, para utilização na prevenção ou tratamento da doença de Niemann-Pick A ou B num doente, em que a referida prevenção ou tratamento compreende a administração intraventricular da esfingomielinase ácida ao cérebro do doente e a administração de uma única dose da esfingomielinase ácida consome mais de seis horas. Outros aspectos e formas de realização da invenção são apresentados nas reivindicações em anexo.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A FIG. 1 mostra o diagrama de secções do cérebro que foram analisadas para a esfingomielina. S1 está na frente do cérebro e S5 está na parte anterior do cérebro.

A FIG. 2 mostra que a administração intraventricular de rhASM reduz os níveis de SPM no cérebro de murganho ASMKO.

A FIG. 3 mostra que a administração intraventricular de rhASM reduz os níveis SPM no fígado, baço e pulmão do murganho ASMKO.

A FIG. 4 mostra a coloração com hASM no cérebro após infusão intraventricular.

A FIG. 5 mostra que a infusão intraventricular de rhASM por um período superior a 6 h reduz níveis de SPM no cérebro de murganho ASMKO.

A FIG. 6 mostra que a infusão intraventricular de rhASM por um período superior a 6 h reduz os níveis de SPM em fígado, soro e pulmão de ASMKO.

A FIG. 7 mostra variantes documentadas de hASM e sua relação com a doença ou actividade de enzima.

A FIG. 8 mostra uma vista da secção transversal do cérebro com os ventrículos indicados.

As FIGS. 9A e 9B mostram vistas laterais e superiores, respectivamente, dos ventrículos.

A Fig. 10 mostra a injeção nos ventrículos laterais.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A prática da presente divulgação, incluindo a presente invenção, empregará, a menos que se indique o contrário, técnicas convencionais de imunologia, biologia molecular, microbiologia, biologia celular e ADN recombinante, que estão na especialidade da técnica. Ver, e. g., Sambrook, Fritsch e Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2^a edição

(1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, *et al.* eds., (1987)); a série METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (MJ. MacPherson, B.D. Hames e G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow e Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, e ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Freshney, ed. (1987)).

Como utilizado na descrição e reivindicações, as formas singulares "um," "uma" e "a/o" incluem referências plurais a menos que o contexto o dite claramente de outra forma. Por exemplo, o termo "uma célula" inclui uma pluralidade de células, incluindo as suas misturas.

Como aqui utilizado, o termo "compreendendo" pretende significar que as composições e métodos incluem os elementos citados, mas sem excluir outros. "Consistindo essencialmente em" quando utilizado para definir composições e métodos, deve significar a exclusão de outros elementos de qualquer significância essencial para a combinação. Deste modo, a composição consistindo essencialmente nos elementos conforme aqui definido não deverá excluir contaminantes vestigiais provenientes do método de isolamento e purificação e veículos farmacêuticamente aceitáveis, tais como salino tamponado com fosfato, conservantes e semelhantes. "Consistindo em" deverá significar a exclusão de mais do que elementos vestigiais de outros ingredientes e exclusão de passos substanciais do método para administração das composições ou medicamentos de acordo com a presente divulgação.

As formas de realização definidas por cada um destes termos de transição estão no âmbito desta invenção.

Todas as designações numéricas, e. g., pH, temperatura, tempo, concentração e peso molecular, incluindo intervalos, são aproximações que são variadas (+) ou (-) por incrementos de 0,1. Deve ser entendido que, embora nem sempre explicitamente declarado, todas as designações numéricas são precedidas pelo termo "acerca de." Também deve ser entendido, embora nem sempre explicitamente declarado, que os reagentes descritos são aqui meramente exemplificativos e que equivalentes destes que são conhecidos na técnica podem ser também utilizados.

O termo "terapêutico", a expressão "quantidade terapeuticamente eficaz" e seus cognatos, referem que a quantidade de uma substância, e. g., enzima ou proteína, que resulta na prevenção ou atrasa o início, ou melhoria, de um ou mais sintomas de uma doença num indivíduo, ou uma realização de um resultado biológico desejado, tal como correcção de neuropatologia. O termo "correcção terapêutica" refere-se ao grau de correcção que resulta na prevenção ou atraso no início, ou melhoria, de um ou mais sintomas num indivíduo. A quantidade eficaz pode ser determinada por métodos empíricos conhecidos.

Uma "composição" ou "medicamento" pretende incluir uma combinação de um agente activo, e. g., uma enzima, e um veículo ou outro material, e. g., um composto ou composição, que é inerte (por exemplo, um agente ou marcador detectável) ou activo, tais como um adjuvante, diluente, ligante, estabilizador, tampão, sal, solvente lipofílico, conservante, adjuvante ou semelhantes, ou uma mistura de duas ou mais destas substâncias. Os veículos são, de um modo preferido, farmacêuticamente aceitáveis. Estes podem incluir excipientes farmacêuticos e aditivos, proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos e hidratos de carbono (e. g., açúcares, incluindo

monossacáridos, di-, tri-, tetra-, e oligossacáridos; açúcares derivados, tais como alditóis, ácidos aldônicos, açúcares esterificados e semelhantes; e polissacáridos ou polímeros de açúcares), que podem estar presentes isolados ou em combinação, compreendendo isolado ou em combinação, 1-99,99% em peso ou volume. As proteínas excipientes exemplificativas incluem albumina do soro, tais como albumina de soro humano (HSA), albumina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína, e semelhantes. Os componentes de aminoácidos/anticorpos representativos, que podem também funcionar numa capacidade tampão, incluem alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutâmico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartame e semelhantes. Os excipientes de hidratos de carbono são também incluídos no âmbito da presente divulgação, incluindo a presente invenção, cujos exemplos incluem, mas não estão limitados a, monossacáridos, tais como frutose, maltose, galactose, glucose, D-manose, sorbose, e semelhantes; dissacáridos, tais como lactose, sacarose, trealose, celobiose, e semelhantes; polissacáridos, tais como rafinose, melezitose, maltodextrinas, dextranos, amidos e semelhantes; e alditóis, tais como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol, sorbitol (glucitol) e mioinositol.

O termo veículo também inclui um tampão ou um agente de ajuste de pH ou uma composição que os contém; tipicamente, o tampão é um sal preparado a partir de um ácido ou base orgânicos. Tampões representativos incluem sais de ácidos orgânicos, tais como sais de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético ou ácido ftálico, Tris, cloridrato de trometamina, ou tampões fosfato. Os veículos adicionais

incluem excipientes/aditivos poliméricos, tais como polivinilpirrolidonas, ficóis (um açúcar polimérico), dextratos (e. g., ciclodextrinas, tais como 2-hidroxi-propil-quadratura-ciclodextrina), polietilenoglicóis, agentes aromatizantes, agentes antimicrobianos, adoçantes, antioxidantes, agentes anti-estáticos, agentes tensioactivos (e. g., polissorbatos tais como "TWEEN 20" e "TWEEN 80"), lípido (e. g., fosfolípido, ácidos gordos), esteróides (e. g., colesterol) e agentes quelantes (e. g., EDTA).

Como aqui utilizada, a expressão "veículos farmacêuticamente aceitáveis" inclui qualquer dos veículos farmacêuticos convencionais, tais como uma solução salina tamponada com fosfato, água, e emulsões, tais como uma emulsão óleo/água ou emulsão água/óleo, e vários tipos de agentes de humedecimento. As composições e medicamentos que são preparados e/ou utilizados de acordo com a presente divulgação e que incluem a enzima particular cuja deficiência tem de ser corrigida, podem incluir estabilizadores e conservantes e qualquer dos veículos acima notados com a condição adicional de que estes sejam aceitáveis para utilização *in vivo*. Para exemplos de veículos, estabilizadores e adjuvantes, ver Martin REMINGTON'S PHARM. SCI., 15^a Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975) e Williams & Williams, (1995) e no "PHYSICIAN'S DESK REFERENCE", 52^a ed., Medical Economics, Montvale, NJ. (1998).

Um "sujeito," "indivíduo" ou "doente" é aqui utilizado independentemente, referindo-se a um vertebrado, de um modo preferido um mamífero, de um modo mais preferido, um humano. Os mamíferos incluem, mas não estão limitados a, murganhos, ratos, macacos, humanos, gado, animais de competição, e animais de estimação.

Como aqui utilizado, o termo "modula" significa fazer variar a quantidade ou intensidade de um efeito ou resultado, e. g., para estimular, aumentar, diminuir ou reduzir.

Como aqui utilizado o termo "melhorar" é sinónimo de "aliviar" e significa reduzir ou tornar mais leve. Por exemplo, pode-se melhorar os sintomas de uma doença ou distúrbio tornando-a mais suportável.

Para identificação de estruturas no cérebro humano, ver, e. g., *The Human Brain: Surface, Three-Dimensional Sectional Anatomy with MRI and Blood Supply*, 2ª ed., eds. Deuteron et al., Springer Vela, 1999; *Atlas of the Human Brain*, eds. Mai et al., Academic Press; 1997; e *Co-Planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain: 3-Dimensional Proportional System: An Approach to Cerebral Imaging*, eds. Tamarack et al., Thyme Medical Pub. 1988. Para identificação das estruturas no cérebro de murganho, ver, e. g., *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2ª ed., Academic Press, 2000.

A requerente verificou que a distribuição intraventricular no cérebro das enzimas hidrolase lisossómicas a doentes que são deficientes nas enzimas, leva a um estado metabólico melhorado do cérebro e dos órgãos viscerais (não SNC) afectados. Isto é particularmente verdade quando a taxa de distribuição é lenta, relativamente a uma distribuição de bólus. As doenças de armazenamento lisossómico causadas por uma deficiência numa enzima particular, tais como as doenças identificadas na Tabela 1 acima, podem ser deste modo tratadas ou prevenidas pela administração intraventricular da respectiva enzima. Uma enzima particularmente útil para o tratamento de Niemann-Pick A

ou B é a esfingomielinase ácida (ASM), tal como a apresentada na SEQ ID NO: 1¹. Uma enzima particularmente útil para tratar a doença de Gaucher é a glucocerebrosidase. Uma enzima particularmente útil para tratar a doença MPS I é a alfa-L-Iduronidase. Uma enzima particularmente útil para tratar a doença MPS II é iduronato-2-sulfatase. Uma enzima particularmente útil para tratar doença de Pompe, ou doença de armazenamento de glicogénio tipo II (GSDII), também denominada deficiência em maltase ácida (AMD) é a alfa-glucosidase ácida. Uma enzima particularmente útil para tratar doença de Batten infantil clássica tardia (CLN2) é a tripeptidilpeptidase. As enzimas que são utilizadas e/ou administradas de acordo com a presente invenção podem ser formas recombinantes das enzimas que são produzidas utilizando métodos que são bem conhecidos na técnica. Num dos casos, a enzima é uma enzima recombinante humana.

¹Resíduos 1-46 constituem a sequência sinal que é clivada após secreção.

A administração de enzimas lisossómicas e, mais particularmente, enzimas hidrolase lisossómicas, a doentes que são deficientes nas enzimas, pode ser realizada em qualquer um ou mais dos ventrículos do cérebro, que são cheios com fluido líquido cefalorraquidiano (CSF). O CSF é um fluido límpido que enche os ventrículos, está presente no espaço subaracnóide e rodeia o cérebro e espinal-medula. O CSF é produzido pelos plexos coróides e através da exsudação ou transmissão do fluido do tecido pelo cérebro para os ventrículos. O plexo coróide é uma estrutura que forra o chão do ventrículo lateral e o topo do terceiro e do quarto ventrículos. Certos estudos indicaram que estas estruturas são capazes de produzir 400-600 cc de fluido

por dia consistente com uma quantidade para encher os espaços do sistema nervoso central quatro vezes num dia. Nos adultos, o volume deste fluido foi calculado como estando entre 125 e 150 mL (4-5 oz). O CSF é numa formação, circulação e absorção contínuas. Certos estudos indicaram que aproximadamente 430 até 450 mL (quase 2 chávenas) de CSF podem ser produzidas a cada dia. Certos cálculos estimam que a produção iguala aproximadamente 0,35 mL por minuto em adultos e 0,15 por minuto em crianças. Os plexos coróides dos ventrículos laterais produzem a maioria do CSF. Flui através do forâmen de Monro para o terceiro ventrículo onde é adicionado para a produção do terceiro ventrículo e continua a descer através do aqueduto de Silvius para o quarto ventrículo. O quarto ventrículo adiciona mais CSF; o fluido viaja depois para o espaço subaracnóide através do forâmen de Magendie e Luschka. Depois circula através da base do cérebro, desce em volta da espinal-medula e sobe sobre os hemisférios cerebrais. O CSF é esvaziado para o sangue através das vilosidades aracnóides e sinos vasculares intracranianos, distribuindo desse modo as enzimas que são infundidas para os ventrículos não apenas para o cérebro, mas também para os órgãos viscerais que são conhecidos por serem afectados em LSD.

Embora uma sequência de aminoácidos particular seja apresentada na SEQ ID N°: 1, as variantes dessa sequência que retêm actividade, *e. g.*, variantes normais na população humana, podem também ser utilizadas. Tipicamente estas variantes normais diferem em apenas um ou dois resíduos da sequência apresentada na SEQ ID N°: 1. As variantes de SEQ ID N°: 1 que devem ser utilizadas de acordo com a presente invenção, incluindo a presente invenção, quer ocorresse naturalmente ou não, devem ser pelo menos 95%, 96%, 91%, 98% ou 99% idênticas à SEQ ID N°: 1.

Podem ser utilizadas variantes de outras enzimas de acordo com a presente invenção. No entanto, independentemente da enzima que é utilizada, as variantes que estão associadas à doença ou com actividade reduzida não devem ser utilizadas. Tipicamente, será distribuída a forma madura da enzima. No caso da SEQ ID N^o: 1, a forma madura começará com o resíduo 47, como apresentado na SEQ ID N^o: 1. Variantes que são associadas com a doença são apresentadas na FIG. 7. De um modo semelhante, as variantes normais na população humana dessas enzimas LSD como glucocerebrosidase, alfa-L-Iduronidase, iduronate-2-sulfatase, alfa-glucosidase ácida e tripeptidil peptidase que retêm actividade enzimática também podem ser utilizadas.

Kits, de acordo com a presente invenção, são montados em componentes separados. Embora possam ser empacotados num único recipiente, podem ser sub-empacotados separadamente. Mesmo um recipiente único pode ser dividido em compartimentos. Tipicamente, um conjunto de instruções irá acompanhar o kit e fornecer instruções para a distribuição das enzimas, e. g., as enzimas hidrolase lisossómicas, intraventricularmente. As instruções podem estar na forma impressa, na forma electrónica, como um vídeo ou DVD de instrução, num disco rígido, numa disquete, na internet com um endereço fornecido na embalagem, ou uma combinação destes meios. Podem ser fornecidos outros componentes, tais como diluentes, tampões, solventes, fita-cola, parafusos e manutenção das ferramentas para além da enzima, uma ou mais cânulas ou cateteres e/ou uma bomba.

As populações tratadas através dos métodos da presente invenção incluem, mas não estão limitadas a, doentes que possuem, ou que estão em risco de desenvolver, um distúrbio neurometabólico, e. g., uma LSD, tal como as doenças listadas na

Tabela 1, particularmente se essa doença afecta o SNC e os órgãos viscerais. Numa forma de realização ilustrativa, a doença é de doença Niemann-Pick do tipo A.

Uma ASM ou outra enzima hidrolase lisossómica pode ser incorporada numa composição farmacêutica útil para tratar, e. g., inibir, atenuar, prevenir ou melhorar, uma condição caracterizada por um nível insuficiente de uma actividade de hidrolase lisossómica. A composição farmacêutica será administrada a um indivíduo que sofre de uma deficiência de hidrolase lisossómica ou alguém que está em risco de desenvolver a referida deficiência. As composições devem conter uma quantidade terapêutica ou profiláctica da ASM ou outra enzima hidrolase lisossómica, num veículo farmacêuticamente aceitável. O veículo farmacêutico pode ser qualquer substância compatível, não tóxica adequada para distribuir os polipéptidos ao doente. Pode ser utilizada água estéril, álcool, gorduras e ceras como o veículo. Podem também ser incorporados adjuvantes, agentes tamponantes e semelhantes farmacêuticamente aceitáveis, às composições farmacêuticas. O veículo pode ser combinado com a ASM ou outra enzima hidrolase lisossómica em qualquer forma adequada para administração por injeção intraventricular ou infusão (cuja forma é também possivelmente adequada para administração intravenosa ou intratecal) ou outra forma. Veículos adequados incluem, por exemplo, soro fisiológico, água bacteriostática, Cremophor EL.TM. (BASF, Parsippany, NJ.) ou soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS), outras soluções de soro fisiológico, soluções de dextrose, soluções de glicerol, emulsões de água e óleos, tais como aquelas produzidas com óleos de petróleo, animal, vegetal, ou de origem sintética (óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, ou óleo de sésamo). Pode ser utilizado um CSF artificial como veículo. O veículo será, de

um modo preferido, estéril e livre de pirogénicos. A concentração da ASM ou outra enzima hidrolase lisossómica na composição farmacêutica pode variar largamente, *i. e.*, desde pelo menos cerca de 0,01% em peso, até 0,1% em peso, até cerca de 1% em peso, até 20% em peso ou mais da composição total.

Para administração intraventricular de ASM ou outra enzima hidrolase lisossómica, a composição deve ser estéril e deve ser fluida. Deve ser estável nas condições do fabricante e armazenamento e deve ser protegida contra a acção contaminante de microrganismos, tais como bactérias e fungos. A prevenção da acção de microrganismos pode ser alcançada através de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal e semelhantes. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotónicos, por exemplo, açúcares, polialcoois, tais como manitol, sorbitol, cloreto de sódio na composição.

A dosagem de ASM ou outra enzima hidrolase lisossómica pode variar em certa medida de indivíduo para indivíduo, dependendo da enzima particular e da sua actividade específica *in vivo*, da via de administração, da condição médica, idade, peso ou sexo do doente, das sensibilidades do doente à ASM ou outra enzima hidrolase lisossómica ou aos componentes do veículo, e outros factores que o médico assistente será capaz de ter rapidamente em conta. Embora as dosagens possam variar dependendo da doença e do doente, a enzima é geralmente administrada ao doente em quantidades desde cerca de 0,1 até cerca de 1000 miligramas por 50 kg de doente por mês. Numa forma de realização, a enzima é administrada ao doente em quantidades desde cerca de 1 até cerca de 500 miligramas por 50 kg de doente por mês. Noutras formas de realização, a enzima é administrada ao doente em quantidades

desde cerca de 5 até cerca de 300 miligramas por 50 kg de doente por mês, ou cerca de 10 até cerca de 200 miligramas por 50 kg de doente por mês.

A taxa de administração é tal que a administração de uma dose única pode ser administrada como um bólus. Uma dose única pode também ser infundida durante cerca de 1-5 minutos, cerca de 5-10 minutos, cerca de 10-30 minutos, cerca de 30-60 minutos, cerca de 1-4 horas, ou consumir mais do que quatro, cinco, seis, sete ou oito horas. Pode durar mais do que 1 minuto, mais do que 2 minutos, mais do que 5 minutos, mais do que 10 minutos, mais do que 20 minutos, mais do que 30 minutos, mais do que 1 hora, mais do que 2 horas ou mais do que 3 horas. A requerente observou que, embora a administração intraventricular de bólus possa ser eficaz, a infusão lenta é muito eficaz. Embora a requerente não deseje estar limitada por qualquer teoria de operação particular, pensa-se que a infusão lenta é mais eficaz devido ao metabolismo do líquido cefalorraquidiano (CSF). Embora as estimativas e os cálculos na literatura variem, pensa-se que o metabolismo do líquido cefalorraquidiano esteja dentro de cerca de 4, 5, 6, 7 ou 8 horas nos humanos. Numa forma de realização, o tempo de infusão lenta da invenção deve ser medido de modo a que seja igual a, ou superior a, o tempo do metabolismo da CSF. O tempo do metabolismo pode depender da espécie, tamanho, e idade do indivíduo mas pode ser determinado utilizando métodos conhecidos na técnica. A infusão também pode ser contínua durante um período de um ou mais dias. O doente pode ser tratado uma vez, duas, ou três ou mais vezes por mês, e. g., semanalmente, e. g., a cada duas semanas. As infusões podem ser repetidas ao longo da vida de um indivíduo, consoante a re-acumulação do substrato da doença no cérebro ou nos órgãos viscerais. A re-acumulação pode ser determinada através de

qualquer uma das técnicas que são bem conhecidas na técnica para a identificação e quantificação do substrato relevante, cujas técnicas podem ser realizadas numa ou em mais amostras retiradas do cérebro e/ou de um ou mais dos órgãos viscerais. Essas técnicas incluem ensaios enzimáticos e/ou imunoensaios, e. g. radioimunoensaios ou ELISA.

O CSF esvazia-se para o sangue através das vilosidades aracnóides e dos sinos vasculares intracranianos, distribuindo, desse modo, as enzimas infundidas para os órgãos viscerais que são conhecidos por serem afectados em LSD. Os órgãos viscerais que são frequentemente afectados na doença de Niemann-Pick são os pulmões, baço, rim, e fígado. A infusão lenta intraventricular proporciona quantidades diminuídas do substrato para uma enzima administrada pelo menos ao cérebro e potencialmente aos órgãos viscerais. A redução no substrato acumulado no cérebro, pulmões, baço, rim, e/ou fígado pode ser dramática. Podem ser alcançadas reduções superiores a 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%. A redução alcançada não é necessariamente uniforme de doente para doente ou mesmo de órgão para órgão no mesmo doente. As reduções podem ser determinadas por qualquer uma das técnicas que são bem conhecidas na técnica, e. g., através de ensaios enzimáticos e/ou técnicas de imunoensaio, como aqui discutido noutro local.

Se desejado, a estrutura do cérebro humano pode estar correlacionada com estruturas semelhantes no cérebro de outro mamífero. Por exemplo, a maioria dos mamíferos, incluindo humanos e roedores, apresenta uma organização topográfica semelhante das projecções entorrinal-hipocampo, com os neurónios na parte lateral do córtex lateral e mediano entorrinal projectando a parte dorsal ou o pólo septal do hipocampo,

enquanto a projecção para o hipocampo ventral tem origem, principalmente, nos neurónios nas partes medianas do córtex entorrinal (Principles of Neural Science, 4^a ed., eds Kandel et al., McGraw-Hill, 1991; The Rat Nervous System, 2^a ed., ed. Paxinos, Academic Press, 1995). Além disso, as células da camada II do córtex entorrinal projectam-se para o giro denteado do hipocampo, e terminam nos dois terços externos da camada molecular do giro denteado. Os axónios das células da camada III projectam-se bilateralmente para as áreas do *cornu ammonis* CA1 e CA3 do hipocampo, terminando na camada *stratum lacunose* molecular.

Numa forma de realização ilustrativa, a administração é realizada através da infusão da enzima LSD num ou em ambos os ventrículos laterais de um indivíduo ou doente. Através da infusão nos ventrículos laterais, a enzima é distribuída ao local no cérebro em que a maior quantidade de CSF é produzida. A enzima também pode ser infundida em mais do que um ventrículo do cérebro. O tratamento pode consistir numa infusão única por local alvo, ou pode ser repetida. Podem ser utilizados múltiplos sítios de infusão/injecção. Por exemplo, os ventrículos nos quais a enzima é administrada podem incluir os ventrículos laterais e o quarto ventrículo. Em algumas formas de realização, adicionalmente ao local de administração, a composição contendo a enzima LSD é administrada a outro sítio que pode ser contralateral ou ipsilateral ao primeiro sítio de administração. As injecções/infusões podem ser únicas ou múltiplas, unilaterais ou bilaterais.

Para distribuir a solução ou outra composição contendo a enzima especificamente a uma região particular do sistema nervoso central, tal como a um ventrículo particular, e. g., aos

ventrículos laterais ou ao quarto ventrículo do cérebro, pode ser administrada por microinjecção estereotáxica. Por exemplo, no dia da cirurgia, os doentes possuirão uma base de grelha estereotáxica fixada no local (aparafusada ao crânio). O cérebro com a base de grelha estereotáxica (compatível com MRI com marcações fiduciárias) será sujeita a processamento de imagem utilizando MRI de elevada resolução. As imagens de MRI serão então transferidas para um computador que corre um software estereotáxico. Será utilizada uma série de imagens coronárias, sagitais e axiais para determinar o sítio alvo da injecção do vector, e trajectória. O software traduz directamente a trajectória em coordenadas tridimensionais apropriadas para a grelha estereotáxica. São perfurados buracos de Burr acima do local de entrada e o dispositivo estereotáxico localizado com a agulha implantada a uma dada profundidade. A solução da enzima num veículo farmacologicamente aceitável será depois injectada. Podem ser utilizadas vias de administração adicionais, e. g., aplicação cortical superficial sob visualização directa ou outra aplicação não estereotáxica.

Um modo de distribuição de uma infusão lenta é utilizando uma bomba. Essas bombas estão disponíveis comercialmente, por exemplo, de Alzet (Cupertino, CA) ou Medtronic (Minneapolis, MN). A bomba pode ser implantável. Outro modo conveniente de administrar as enzimas é utilizar uma cânula ou um cateter. A cânula ou cateter pode ser utilizado para múltiplas administrações separadas no tempo. As cânulas e os cateteres podem ser implantados estereotaxicamente. Está contemplado que as administrações múltiplas serão utilizadas para tratar o doente típico com uma doença de armazenamento lisossómico. Podem ser utilizados cateteres e bombas separadamente ou em combinação.

As doenças de armazenamento lisossômico (LSD) incluem mais de quarenta distúrbios genéticos, muitos dos quais envolvem defeitos genéticos em várias hidrolases lisossômicas. Doenças de armazenamento lisossômico representativas e as enzimas defeituosas associadas são listadas na Tabela 1.

A doença de Gaucher resulta como uma consequência de uma deficiência herdada da hidrolase glucocerebrosidase lisossômica (GC), conduzindo à acumulação do seu substrato, glucosilceramida (GL-1), nos lisossomas dos histiócitos. A acumulação progressiva de GL-1 nos macrófagos do tecido (células de Gaucher) ocorre em vários tecidos. A extensão da acumulação está dependente em parte do genótipo. Clinicamente, são reconhecidos três fenótipos de Gaucher diferentes, o não neuropático tipo 1, que é o mais comum com o início, variando desde muito cedo na adolescência até ao estado adulto, e os tipos neuropáticos 2 e 3, apresentando-se na infância e precocemente na adolescência, respectivamente. Qualquer um destes fenótipos pode ser tratado de acordo com a presente invenção. As principais manifestações clínicas comuns a todas as formas da doença de Gaucher são hepatosplenomegalia, citopenia, fracturas ósseas patológicas e, ocasionalmente, falência pulmonar. Uma discussão detalhada da doença de Gaucher pode ser encontrada em Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases, Parte 16, Capítulo 146 e 146.1 (2007). Em doentes com doença de Gaucher de tipo 2 e tipo 3 nos quais existe um envolvimento significativo do sistema nervoso central, a distribuição intraventricular da enzima LSD defeituosa conduz a um estado metabólico melhorado do cérebro e potencialmente os órgãos viscerais afectados (não SNC). A distribuição intraventricular da enzima LSD defeituosa em indivíduos com doença de Gaucher de tipo 1 conduz a um estado

metabólico melhorado dos órgãos viscerais (não SNC) afectados. Existem modelos animais da doença de Gaucher, que derivaram de modelos de murganho criados por disrupção direccionada do gene de murganho correspondente. Por exemplo, existe um modelo de murganho de Gaucher contendo a mutação D409V no locus GC do murganho (Xu, Y-H et al., (2003). *Am. J. Pathol.* 163:2093-2101). O murganho heterozigótico, *gba*D4Q9V/nulo, apresenta ~5% da actividade de GC normal em tecidos viscerais e desenvolve macrófagos com lípido ingurgitado (células de Gaucher) no fígado, baço, pulmão e medula óssea aos 4 meses de idade. Este modelo é um sistema adequado para avaliar os seus benefícios e determinar as condições para a distribuição intraventricular da enzima LSD defeituosa em indivíduos com doença de Gaucher.

A doença de Niemann-Pick (NPD) é uma doença de armazenamento lisossómico e é um distúrbio neurometabólico herdado, caracterizado por uma deficiência genética na esfingomielinase ácida (ASM; esfingomielina colinofosfo-hidrolase, EC 3.1.3.12). A falta de proteína ASM funcional resulta na acumulação de substrato de esfingomielina nos lisossomas de neurónios e na glia ao longo do cérebro. Isto conduz à formação de um grande número de lisossomas distendidos no pericário, que são a característica de marca e o principal fenótipo celular de NPD de tipo A. A presença de lisossomas distendidos está correlacionada com a perda da função celular normal e o decurso neurodegenerativo progressivo que conduz à morte do indivíduo afectado na infância precoce (The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases, eds. Scriver et al., McGraw-Hill, Nova Iorque, 2001, p. 3589- 3610). Os fenótipos celulares secundários (e. g., anormalidades metabólicas adicionais) estão também associados a esta doença, nomeadamente o nível elevado de acumulação de colesterol no compartimento lisossómico. A

esfingomielinina possui uma forte afinidade para o colesterol, que resulta no sequestro de grandes quantidades de colesterol nos lisossomas de murganhos ASMKO e doentes humanos (Leventhal *et al* (2001) *J. Biol. Chem.*, 276:44976-44983; Slotte (1997) *Subcell. Biochem.*, 28:277-293; e Viana *et al.*, (1990) *J. Med. Genet.*, 27:499-504.) Uma discussão detalhada da doença NPD pode ser encontrada em Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases, Parte 16, Capítulo 144 (2007). Existem modelos animais de NPD. Por exemplo, os murganhos ASMKO são um modelo aceite de doença de Niemann-Pick tipos A e B (Horinouchi *et al.*, (1995) *Nat. Genetics*, 10:288-293; Jin *et al.*, (2002) *J. Clin. Invest.*, 109:1183-1191; e Otterbach (1995) *Cell*, 81:1053-1061). A distribuição intraventricular da enzima LSD defeituosa conduz a um estado metabólico melhorado do cérebro e dos órgãos viscerais (não SNC) afectados.

As mucopolissacaridoses (MPS) são um grupo de distúrbios de armazenamento lisossómico causadas por deficiências das enzimas que catalisam a degradação de glicosaminoglicanos (mucopolissacáridos). Existem 11 deficiências de enzima conhecidas que dão origem a 7 MPS distintas, incluindo MPS I (Síndromes de Hurler, Scheie, e Hurler-Scheie) e MPS II (Síndrome de Hunter). Qualquer MPS pode ser tratada de acordo com a presente invenção. Uma discussão detalhada de MPS pode ser encontrada em Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases, Parte 16, Capítulo 136 (2007). Existem vários modelos animais de MPS, que derivaram de mutações que ocorrem naturalmente em cães, gatos, ratos, murganhos e cabras, assim como modelos de murganhos criados por disrupção direccionada do gene de murganho correspondente. As características bioquímicas e metabólicas destes modelos animais são, geralmente, muito semelhantes aos encontrados em humanos; todavia, as

apresentações clínicas podem ser mais moderadas. Por exemplo, os modelos aceites para MPS I incluem um modelo de murino [Clark, LA *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* (1997), 6:503] e um modelo de canino [Menon, KP *et al.*, *Genomics* (1992), 14:763. Por exemplo, modelos aceites para MPS II incluem um modelo de murganho [Muenzer, J. *et al.*, (2002), *Acta Paediatr. Suppl.*; 91(439):98-9]. Nos MPS que possuem o envolvimento do Sistema nervosa central, tal como se encontra em doentes com MPS I e MPS II, a distribuição intraventricular da enzima LSD defeituosa conduz ao estado metabólico melhorado do cérebro e potencialmente os órgãos viscerais (não SNC) afectados.

A doença de Pompe ou doença de armazenamento de glicogénio tipo II (GSDII), também denominada deficiência da maltase ácida (AMD) é um distúrbio herdado do metabolismo do glicogénio resultando de defeitos na actividade da hidrolase lisossómica alfa-glucosidase ácida em todos os tecidos de indivíduos afectados. A deficiência enzimática resulta na acumulação intralisossómica de glicogénio da estrutura normal em numerosos tecidos. A acumulação é mais acentuada no músculo cardíaco e esquelético e em tecidos hepáticos de crianças com o distúrbio generalizado. Na GSDII de início tardio, a acumulação intralisossómica de glicogénio está virtualmente limitada ao músculo-esquelético e é de menor magnitude. Anormalidades electromiográficas sugestivas do diagnóstico incluem descargas pseudomiotónicas e irritabilidade, mas em doentes com um início juvenil e adulto, as anormalidades podem variar em músculos diferentes. Os rastreios por TAC podem divulgar o(s) sítio(s) dos músculos afectados. A maioria dos doentes tem níveis elevados de cinase de creatina (CK) no plasma sanguíneo e podem ser encontrados aumentos das enzimas hepáticas, particularmente em doentes com início no estado adulto. Existem vários modelos

animais que ocorrem naturalmente da doença com início infantil e tardio. Existe um modelo de murganho desactivado [Bijvoet AG *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* (1998); 7:53-62.]. Os efeitos de melhoria da terapia enzimática foram descritos em murganhos com o gene desactivado [Raben, N *et al.*, *Mol. Genet. Metab.* (2003); 80: 159-69] e num modelo de codorniz. A distribuição intraventricular da enzima LSD defeituosa conduz ao estado metabólico melhorado do cérebro e potencialmente os órgãos viscerais (não SNC) afectados.

As lipofuscinoses ceróides neuronais (NCL) são um grupo de distúrbios neurodegenerativos que se distinguem de outras doenças neurodegenerativas pela acumulação de material autofluorescente ("pigmento de envelhecimento") no cérebro e outros tecidos. As principais características clínicas incluem tonturas, deterioração psicomotora, cegueira e morte prematura. Foram reconhecidos subgrupos distintos de NCL que diferem na idade do início dos sintomas e o aparecimento do material de armazenamento por microscopia electrónica. Três grupos principais - infantil (INCL), clássica infantil tardia (LINCL), e juvenil (JNCL3 também referida como doença de Batten) - são causadas por mutação autossómica recessiva nos genes CLN1 CLN2, e CLN3, respectivamente. As proteínas produtos dos genes CLN1 (proteína palmitoil-tioesterase) e CLN2 (tripeptidilpeptidase ou pepinase) são enzimas lisossómicas solúveis, enquanto a proteína CLN3 (batenina) é uma proteína lisossómica da membrana, como é (tentativamente) a proteína CLN5. A identificação das mutações em genes que codificam as proteínas lisossómicas em várias formas de NCL levou ao reconhecimento das lipofuscinoses como verdadeiros distúrbios lisossómicos. Qualquer subgrupo do NCL pode ser tratado de acordo com a presente invenção. Uma detalhada discussão da doença NCL pode ser encontrada na Online

Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases, Parte 16, Capítulo 154 (2007). Os distúrbios NCL que ocorrem naturalmente foram descritos nos modelos em ovelha, cão, e murganhos foram derivados por ruptura dirigida de um gene de murganho correspondente [ver e. g., Katz, ML et al., *J. Neurosci. Res.* (1999); 57:551-6; Cho, SK et al., *Glicobiology* (2005); 15:637-48] A distribuição intraventricular da enzima deficiente da LSD leva a estados metabólicos melhorados do cérebro e possivelmente dos órgãos viscerais (não-SNC) afectados.

Uma discussão detalhada dos distúrbios do armazenamento lisossômico adicional divulgada na Tabela 1, em que a distribuição intraventricular da enzima deficiente LSD na doença, pode ser encontrada em Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases, Parte 16 (2007).

A descrição acima descreve geralmente a presente divulgação.

As referências aqui divulgadas são expressamente incorporadas por referência. Um entendimento mais completo pode ser obtido por referência com os exemplos específicos que se seguem aqui proporcionados apenas com o propósito de ilustração, e não se pretende que limite o âmbito da invenção.

EXEMPLO 1

Modelo animal

Os murganhos ASMKO são um modelo aceite para os tipos A e B da doença de Niemann-Pick (Horinouchi et al., (1995) *Nat.*

Genetics, 10:288-293; Jin et al., (2002) *J. Clin. Invest.*, 109:1183-1191; e Otterbach (1995) *Cell*, 81:1053-1061). A doença de Niemann-Pick (NPD) é classificada como uma doença de armazenamento lisossômico e é um distúrbio neurometabólico hereditário caracterizado por uma deficiência genética na esfingomielinase ácida (ASM; esfingomielina colinefosfo-hidrolase, EC 3.1.3.12). A falta de proteína ASM funcional resulta na acumulação do substrato esfingomielina nos lisossomas de neurónios e glia no cérebro. Isto leva à formação de um grande número de lisossomas distendidos no pericário, que são uma característica específica e o fenótipo celular primário do tipo A de NPD. A presença de lisossomas distendidos correlaciona com a perda da função celular normal e um percurso neurodegenerativo progressivo que leva a morte do indivíduo afetado precocemente na infância (The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases, eds. Scriver et al., McGraw-Hill, Nova Iorque, 2001, p. 3589-3610). Os fenótipos celulares secundários (e. g., anormalidades metabólicas adicionais) são também associados com esta doença, notavelmente o elevado nível de acumulação de colesterol no compartimento lisossômico. A esfingomielina possui uma afinidade forte para o colesterol, que resulta no sequestro de grandes quantidades de colesterol nos lisossomas de murghanos ASMKO e doentes humanos (Leventhal et al. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276:44976-44983; Slotte (1997) *Subcell. Biochem.*, 28:277-293; e Viana et al. (1990) *J. Med. Genet.*, 27:499-504.)

EXEMPLO 2

“Infusão Intraventricular contínua de rhASM em murganho ASMKO”

Objectivo: Determinar qual o efeito da infusão intraventricular da ASM recombinante humana (rhASM) na patologia do armazenamento (*i. e.*, armazenamento de esfingomielina e colesterol) no cérebro de murganhos ASMKO

Métodos: murganhos ASMKO foram implantados estereotaxicamente com uma cânula guia interna entre as 12 e 13 semanas de idade. Às 14 semanas de idade os murganhos foram infundidos com 0,250 mg de hASM (n=5) durante um período de 24 h (~0,01 mg/h) durante 4 dias seguidos (foi administrado 1 mg no total) utilizando uma sonda de infusão (encaixa dentro da cânula guia) que é ligada a uma bomba. A hASM liofilizada foi dissolvida em fluido espinal cerebral artificial (aCSF) antes da infusão. Os murganhos foram sacrificados 3 dias pós infusão. No sacrifício os murganhos foram sobredoseados com eutasol (>150 mg/kg) e depois perfusionados com PBS ou 4% de parformaldeído. O cérebro, fígado, pulmão e baço foram removidos e analisados quanto aos níveis de esfingomielina (SPM). O tecido do cérebro foi dividido em 5 secções antes da análise de SPM (S1 = frente do cérebro, S5 = parte anterior do cérebro; ver Fig. 1)

Tabela 2.

Grupo	Tratamento	n
ASMKO	0,0250 MG (1 mg no total)	5
ASMKO	Nenhum	4
WT	Nenhum	4

Resumo dos resultados: a infusão intraventricular de hASM a 0,250 mg/24 h durante 4 dias contínuos (1 mg no total) resultou na coloração de hASM e eliminação de filipina (*i. e.*, armazenamento de colesterol) no cérebro dos ASMKO. A análise bioquímica mostrou que a infusão intraventricular de hASM também levou a uma redução global nos níveis de SPM no cérebro. Os níveis de SPM foram reduzidos para os níveis do tipo selvagem (WT). Foi também observada uma significativa redução na SPM no fígado e baço (um tendência decrescente foi observada no pulmão).

EXEMPLO 3

“Distribuição intraventricular de hASM em Murganhos ASMKO II”

Objectivo: Determinar a menor dose eficaz durante um período de infusão de 6 h.

Métodos: murganhos ASMKO foram implantados estereotaxicamente com uma cânula guia interna entre as 12 e 13 semanas de idade. Às 14 semanas de idade os murganhos foram infundidos durante um período de 6 horas numa das seguintes

doses de hASM: 10 mg/kg (0,250 mg; n=12), 3 mg/kg (0,075 mg; n=7), 1 mg/kg (0,025 mg; n=7), 0,3 mg/kg (0,0075 mg; n=7), ou aCSF (fluido espinal cerebral artificial; n=7). Dois murganhos de cada nível de dose foram perfusionados com 4% de parformaldeído imediatamente a seguir às 6 h de infusão para avaliar se a distribuição da enzima no cérebro (o sangue foi também colhido a partir destes para determinar os níveis de hASM no soro). Os restantes murganhos de cada grupo foram sacrificados 1 semana após a infusão. Os tecidos do cérebro, fígado, e pulmão destes murganhos foram analisados quanto aos níveis de SPM como no estudo 05-0208.

Tabela 3.

Grupo	Tratamento	n
AMSKO	0,250 mg (10 mg/kg)	12
AMSKO	0,075 mg (3 mg/kg)	7
AMSKO	0,025 mg (1 mg/kg)	7
AMSKO	0,0075 mg (3 mg/kg)	7
AMSKO	aCSF	7
WT	Nenhum	7

Resumo dos resultados: hASM intraventricular por um período de 6 h levou a uma redução significativa nos níveis de SPM através do cérebro independentemente da dose. Os níveis de SPM no cérebro em murganhos tratados com as doses > 0,025 mg foram reduzidos aos níveis dos WT. Os níveis de SPM dos órgãos viscerais foram também significativamente reduzidos (mas não para os níveis dos WT) numa maneira dependente da dose. A apoiar

esta observação a proteína hASM foi também detectada no soro de murganhos ASMKO infundidos com a proteína hASM. A análise histológica mostrou que a proteína hASM foi amplamente distribuída no cérebro (de S1 a S5) após administração intraventricular de hASM.

EXEMPLO 4

"Infusão intraventricular de rhASM em murganhos ASMKO III"

Objectivo: Determinar (1) o tempo que a SPM leva para re-acumular no cérebro (e medula espinal) após uma infusão de 6 h de hASM (dose = 0,025 mg); (2) se existem diferenças conforme o sexo em resposta a administração intraventricular de hASM (experiências prévias demonstram que existem diferenças conforme o sexo na acumulação de substrato no fígado, se isto ocorre ou não no cérebro não é conhecido).

Métodos: murganhos ASMKO foram implantados estereotaxicamente com uma cânula guia interna entre as 12 e 13 semanas de idade. Às 14 semanas de idade os murganhos foram infundidos por um período de 6 h com 0,025 mg de hASM. Após distribuição intraventricular de hASM, os murganhos foram sacrificados a 1 semana pós infusão (n = 7 machos, 7 fêmeas) ou às 2 semanas pós infusão (n = 7 machos, 7 fêmeas) ou às 3 semanas pós infusão (n = 7 machos, 7 fêmeas). No sacrifício, o cérebro, medula espinal, fígado e pulmões foram removidos para análise SPM.

Tabela 4.

Grupo	Tratamento	N	Sacrifício
ASMKO macho	0,025 mg	7	1 semana pós infusão
ASMKO fêmea	0,025 mg	7	1 semana pós infusão
ASMKO macho	0,025 mg	7	2 semanas pós infusão
ASMKO fêmea	0,025 mg	7	2 semanas pós infusão
ASMKO macho	0,025 mg	7	3 semanas pós infusão
ASMKO fêmea	0,025 mg	7	3 semanas pós infusão

ASMKO macho	aCSF	7	1 semana pós infusão
ASMKO fêmea	aCSF	7	1 semana pós infusão
WT macho	Nenhum	7	1 semana pós infusão
WT fêmea	Nenhum	7	1 semana pós infusão

As amostras de tecido são preparadas para análise SPM.

EXEMPLO 5

“Efeito de infusão intraventricular de rhASM na função cognitiva em murganhos ASMKO”

Objectivo: determinar se a infusão intraventricular de rhASM alivia os défices cognitivos induzidos pela doença em murganhos ASMKO.

Métodos: murganhos ASMKO são estereotaxicamente implantados com uma cânula guia interna entre as 9 e 10 semanas de idade. Às 13 semanas de idade, os murganhos são infundidos por um período de 6 h com 0,025 mg de hASM. Às 14 e 16 semanas de

idade, os murganhos fazem um teste cognitivo utilizando o labirinto de Barnes.

EXEMPLO 6

"Distribuição da proteína hASM no SNC de ASMKO após infusão intraventricular"

Objectivo: determinar a distribuição da proteína hASM (como função do tempo) no cérebro e medula espinal de murganhos ASMKO após infusão intraventricular.

Métodos: murganhos ASMKO são implantados estereotaxicamente com uma cânula guia interna entre as 12 e 13 semanas de idade. Às 14 semanas de idade os murganhos são infundidos por um período de 6 h com 0,025 mg de hASM. Após o procedimento de infusão os murganhos são ou sacrificados imediatamente ou 1 semana ou 2 semanas ou 3 semanas mais tarde.

Tabela 5. Indica os tempos de infusão que podem ser utilizados com uma enzima particular para o tratamento da doença em que é deficiente como indicado na Tabela 1.

Tempo de Infusão											
Enzima para Infusão	BÓLUS	1-5 min	5- 10 min	1-5 min	1-5 min	1-4 horas	mais do que 4 horas	mais do que 5 horas	mais do que 6 horas	mais do que 7 horas	mais do que 8 horas
Aspartilglucosaminidase	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Alfa-Galactosidase											
Protein Palmitoil Tioesterase	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Tripeptidilpeptidase	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Proteína Lisossómica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

(Continuação)

Tempo de Infusão											
Enzima para Infusão	BÓLUS	1-5 min	5- 10 min	1-5 min	1-5 min	1-4 horas	mais do que 4 horas	mais do que 5 horas	mais do que 6 horas	mais do que 7 horas	mais do que 8 horas
Transmembranar											
Transportador de Cisteína	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ceramidase ácida	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Alfa-L-fucosidase ácida	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Protein protetora/catepsina A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Beta-glucosidase ácida, ou beta-galactosidase ácida	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Iduronato-2-sulfatase	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Alfa-iduronidase	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Galactocerebrosidase	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Alfa-manosidase ácida	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Beta-manosidase	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Arilsulfatase B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Arilsulfatase A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
N-acetilgalactosamina-6-sulfato	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Beta-galactosidase ácida	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
N-acetilglucoseamina-1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Esfingomielinase ácida	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Referências

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

2) Kakkis E, McEntee M, Vogler C, Le S, Levy B, Belichenko P, Mobley W, Dickson P, Hanson S, Passage M. Intrathecal enzyme substitution therapy reduces lisosomal storage in the brain and

meninges of the canine model of MPS I. *Mol Genet Metab.* 2004; S3(1-2):163-74.

3) Bembi B, Ciana G, Zanatta M, et al. Cerebrospinal-fluid infusion of alglucerase in the treatment for acute neuronopathic Gaucher's disease. *Pediatr Res* 1995;38:A425.

4) Lonser RR, Walbridge S₅ Murray GJ, Aizenberg MR, Vortmeyer AO, Aerts JM, Brady RO, Oldfield EH. Convection perfusion of glucocerebrosidase for neuronopathic Gaucher's disease. *Ann Neurol.* 2005 Apr;57(4):542-8.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Dodge, James

Passine, Marco

Shihabuddin, Lamya

Cheng, Seng

<120> DISTRIBUIÇÃO DE ENZIMA INTRAVENTRICULAR PARA DOENÇAS DE ARMAZENAMENTO LISOSSÓMICO

<130> 003482.00036

<160> 1

<170> FastSEQ para Windows versão 4.0

<210> 1

<211>

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

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

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

Lisboa, 10 de Outubro de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Esfingomielinase ácida para utilização na prevenção ou tratamento da doença de Niemann-Pick A ou B num doente, em que a referida prevenção ou tratamento compreende a administração intraventricular de uma esfingomielinase ácida no cérebro do doente e a administração de uma dose única da esfingomielinase ácida consome mais do que seis horas.
2. Esfingomielinase ácida para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a administração de uma dose única da esfingomielinase ácida consome mais do que sete horas ou mais de oito horas.
3. Esfingomielinase ácida para utilização de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que a referida prevenção ou tratamento compreende a administração da esfingomielinase ácida aos ventrículos laterais e/ou ao quarto ventrículo do cérebro.
4. Esfingomielinase ácida para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a quantidade de esfingomielinase ácida a ser administrada ao doente é suficiente para reduzir os níveis de esfingomielina no fígado, pulmões, baço ou rins do doente.
5. Esfingomielinase ácida para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que a prevenção ou tratamento compreende a monitorização dos níveis de esfingomielina no doente e a administração de

esfingomielinase ácida adicional em resposta aos níveis de esfingomielina determinados.

6. Esfingomielinase ácida para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que a esfingomielinase ácida é uma esfingomielinase ácida humana.
7. Esfingomielinase ácida para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a esfingomielinase ácida partilha pelo menos 95% de identidade de sequência de aminoácidos, pelo menos 96% de identidade de sequência de aminoácidos, pelo menos 97% de identidade de sequência de aminoácidos, pelo menos 98% de identidade de sequência de aminoácidos, pelo menos 99% de identidade de sequência de aminoácidos, ou 100% de identidade de sequência de aminoácidos e uma esfingomielinase ácida possuindo a sequência de aminoácidos que é apresentada na SEQ ID N^o: 1.
8. Esfingomielinase ácida para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que a esfingomielinase ácida é para ser administrada utilizando um cateter interior.
9. Esfingomielinase ácida para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que a administração compreende uma pluralidade de infusões.

Lisboa, 10 de Outubro de 2014

Fig. 1

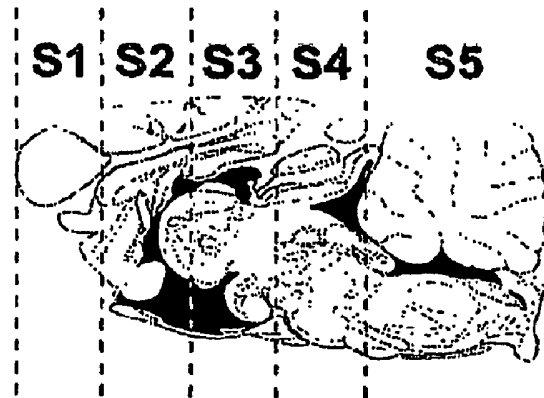


FIG. 2.

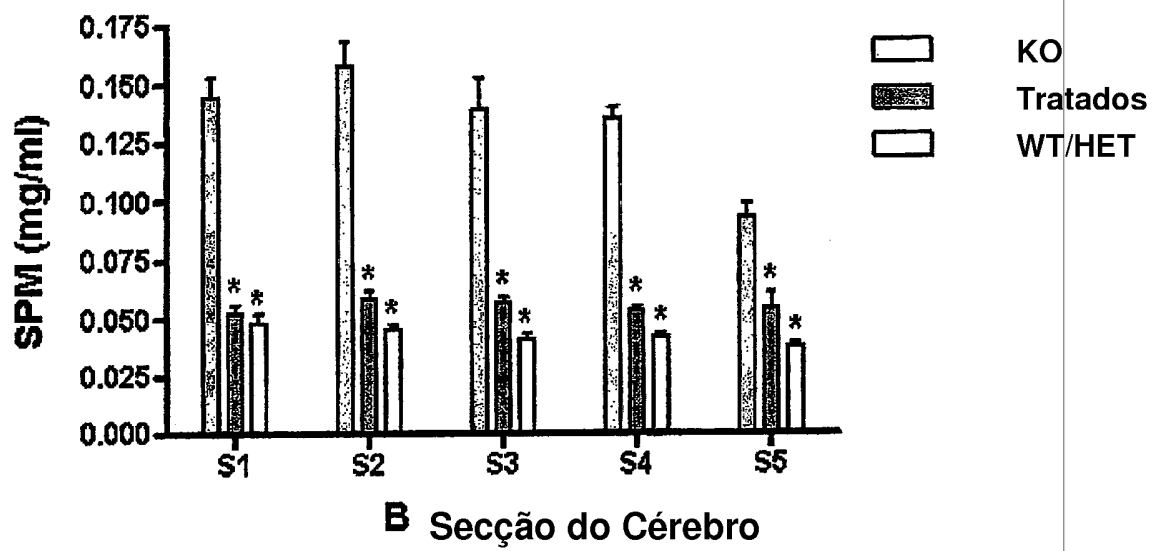


FIG. 3.

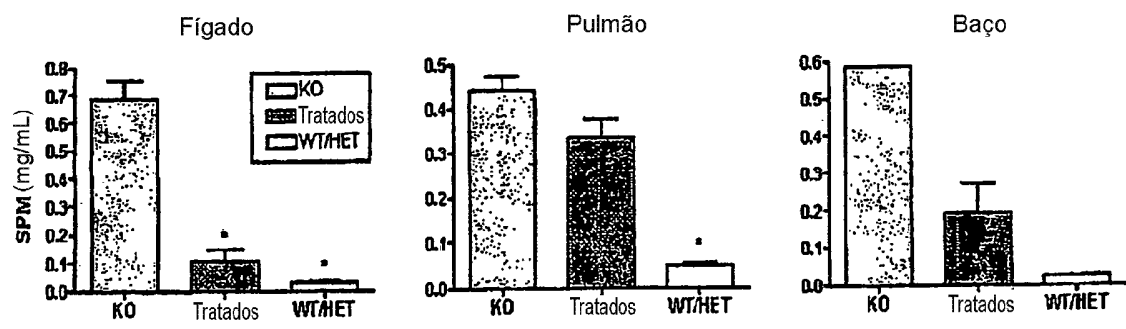


FIG. 4.

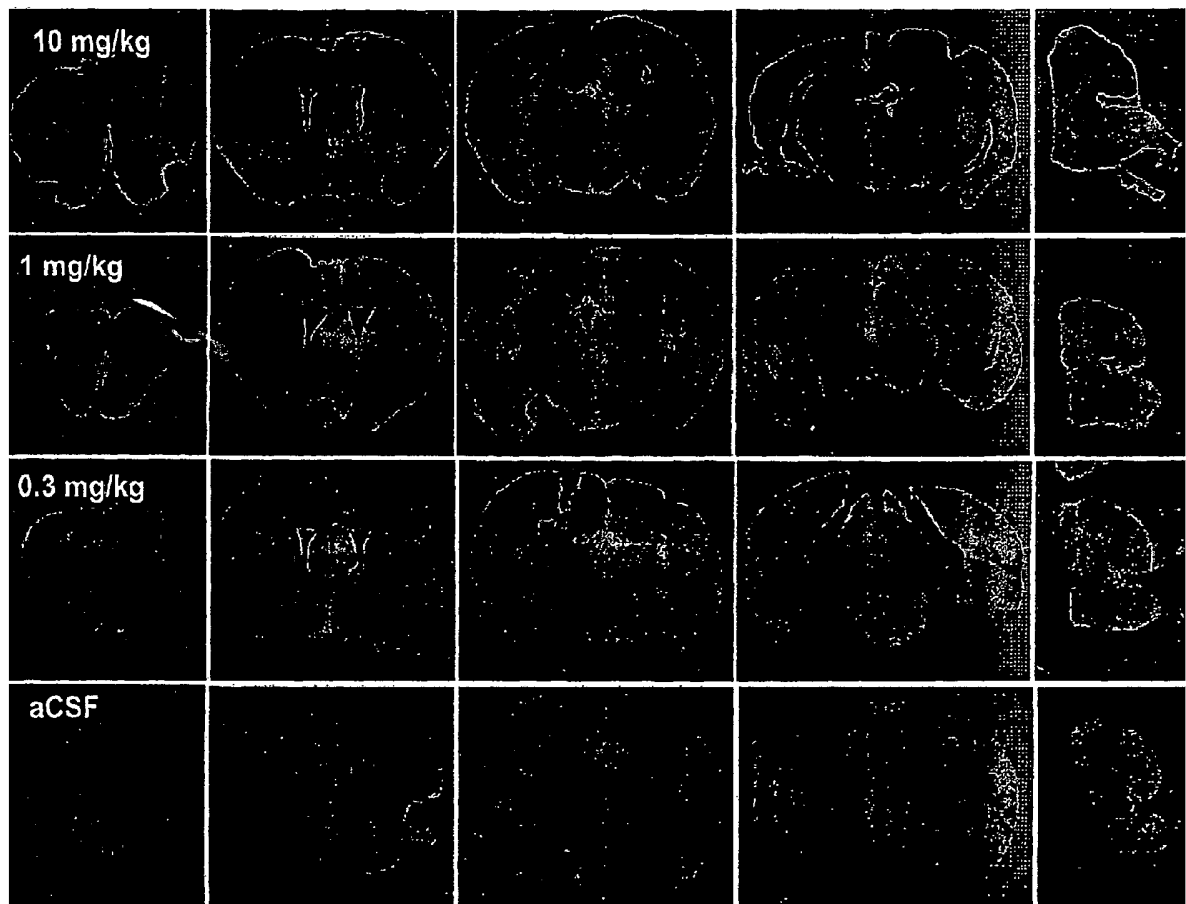
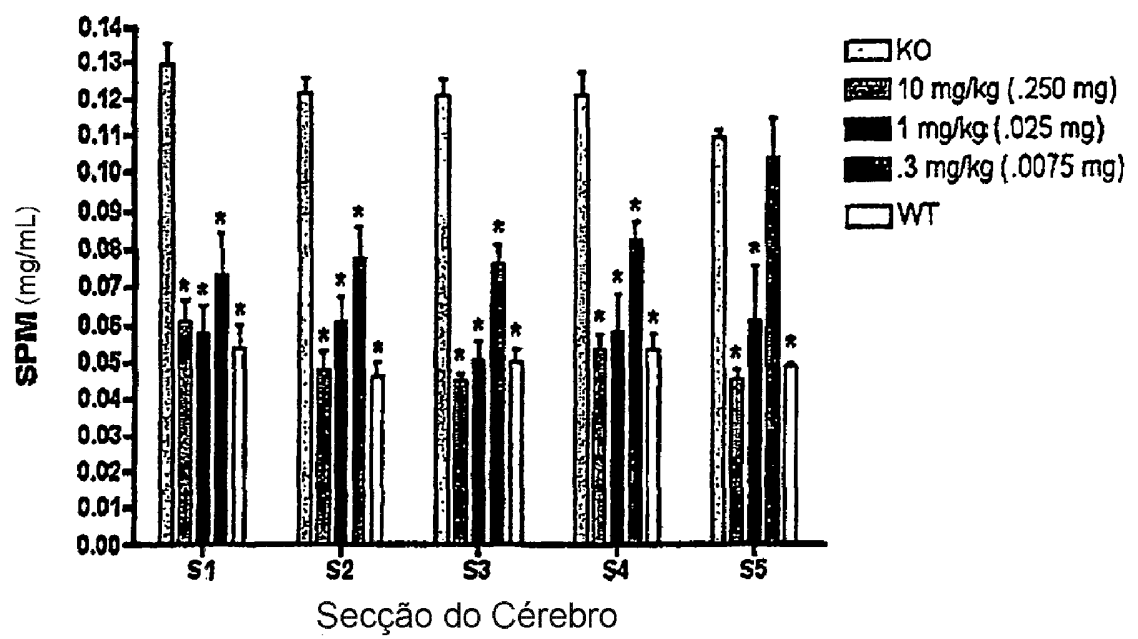


FIG. 5



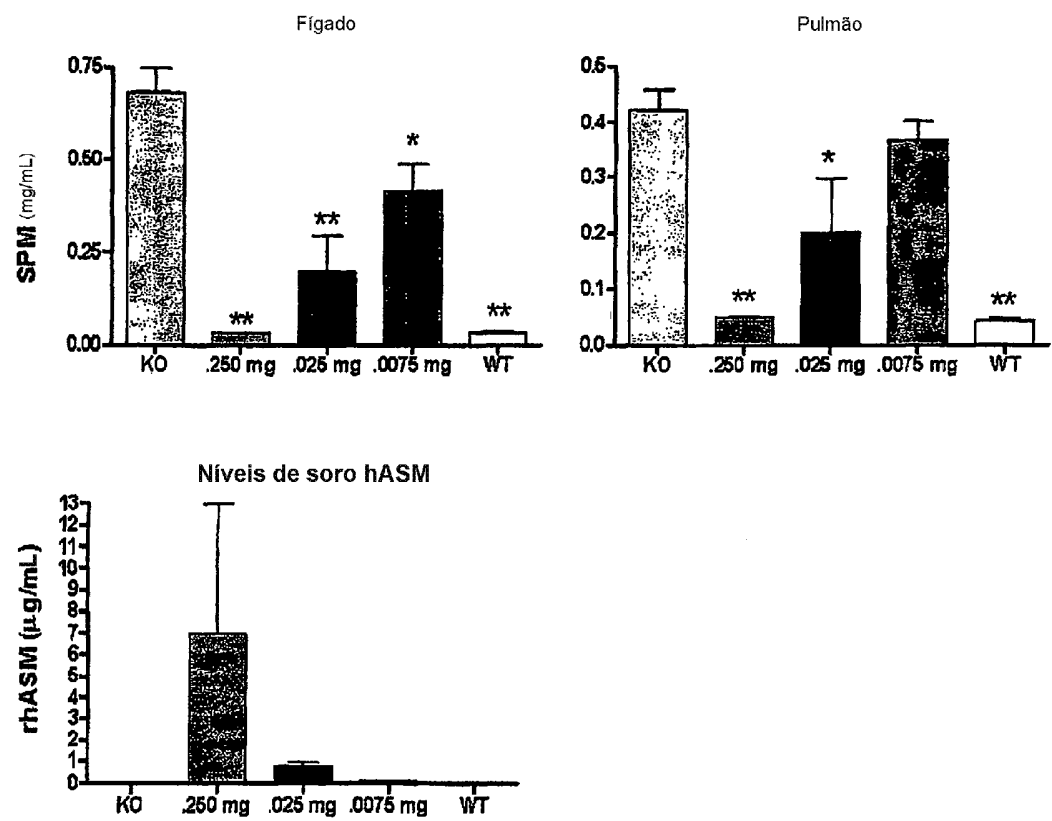
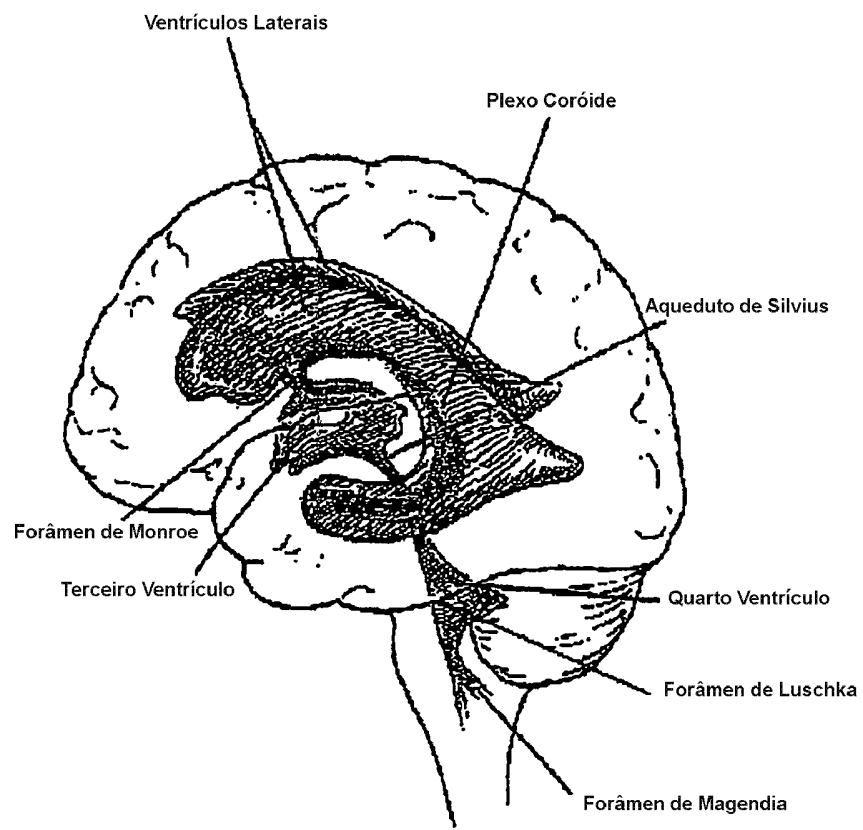


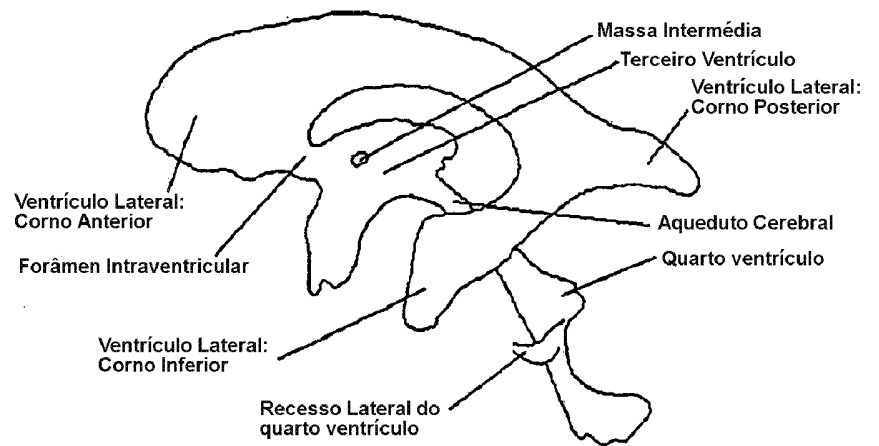
Fig. 6.

FIG. 7. Variantes Conhecidas

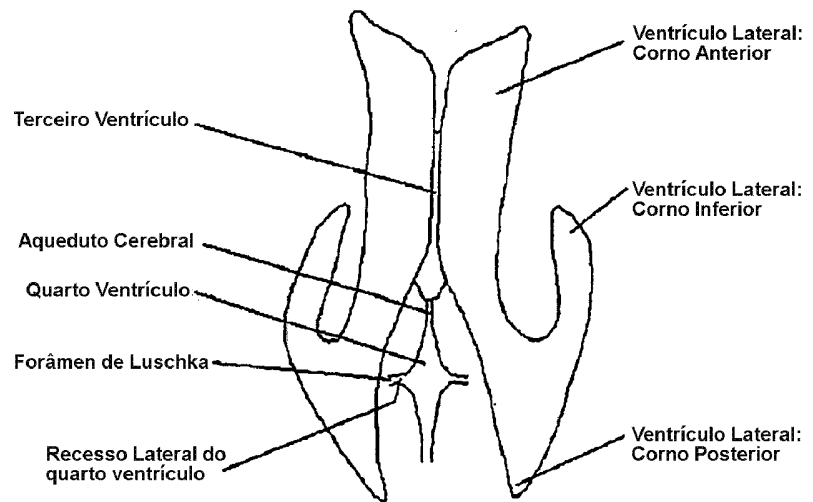
VARIANT	157	157	1	C -> R (parece ser menos activa)
VARIANT	242	242	1	G -> R (em NPB).
VARIANT	246	246	1	E -> Q (em NPA; 30% de actividade residual).
VARIANT	248	248	1	S -> R (em NPA).
VARIANT	302	302	1	L -> P (em NPA; em 23% dos doentes com Ashkenazi Jewish com NPA).
VARIANT	319	319	1	H -> Y (em NPA).
VARIANT	371	371	1	P -> S (em NPB).
VARIANT	382	382	1	M -> I (em NPA).
VARIANT	383	383	1	N -> S (em NPB).
VARIANT	389	389	1	N -> T (em NPA).
VARIANT	391	391	1	W -> G (em NPB; baixas taxas de degradação de esfingomielina).
VARIANT	421	421	1	H -> Y (em NPB).
VARIANT	436	436	1	S -> R (em NPB).
VARIANT	446	446	1	Y -> C (em NPA).
VARIANT	463	463	1	F -> S (em NPA).
VARIANT	475	475	1	P -> L (em NPA).
VARIANT	496	496	1	R -> L (em NPA; em 32% dos doentes com Ashkenazi Jewish com NPA)
VARIANT	537	537	1	Y -> H (em NPA).
VARIANT	577	577	1	G -> S (em NPA).
VARIANT	608	608	1	em falta (em NPB; prevalente entre os doentes com NPB do Magreb do Norte de África).

Fig. 8





Ventrículos do Cérebro: Vista Lateral



Ventrículos Cerebrais: Vista Superior

Fig. 9A e 9B

Fig. 10.

