



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112014008873-0 A2



(22) Data do Depósito: 11/10/2012

(43) Data da Publicação Nacional: 15/09/2020

(54) Título: PROTEÍNA NAGLU RECOMBINANTE HUMANA E USOS DA MESMA

(51) Int. Cl.: C12N 9/26; C12N 5/07; A61K 38/47.

(30) Prioridade Unionista: 12/10/2011 US 61/546,248.

(71) Depositante(es): SYNAGEVA BIOPHARMA CORP.

(72) Inventor(es): ANTHONY QUINN; MARKLEY C LEAVITT; XIA ZHINAN; JOSEPH VICTOR RUTKOWSKI.

(86) Pedido PCT: PCT US2012059708 de 11/10/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/055888 de 18/04/2013

(85) Data da Fase Nacional: 11/04/2014

(57) Resumo: PROTEÍNA NAGLU RECOMBINANTE HUMANA E USOS DA MESMA. A presente invenção fornece composições compreendendo uma mistura isolada de proteínas NaGlu humanas recombinantes em que uma quantidade substancial das proteínas NaGlu na mistura têm níveis aumentados de manose fosforilada que conferem às proteínas serem eficientemente internalizadas nas células humanas. A presente invenção também fornece métodos para produzir essa mistura de proteínas NaGlu, vetores usados na transgênese e expressão, células hospedeiras que abrigam esses vetores e métodos para isolar e purificar a mistura de proteínas NaGlu. A invenção ainda fornece métodos para tratar doenças associadas à NaGlu.

Sequência de Aminoácidos NaGlu Humana (peptídeo sinal: 1-23, sublinhado)

```
MEAVAVAAAV GVLLLAGGGS AAQVEAREAA AVRALVARLL GFGPAADFSV SVERALAAKF 60
GLDTSLGGG GAARVTVRGS TVVAAAGGLE SYLADFOGCH VAWSGSGLRL FEPLAVPGE 120
LIRATPKRYR YQNVCTQSY SPYNDMAEM EREIDWALN GINLLAMSG QAIAWQVYL 180
ALSLTQREIN EPTTUPAFIA WGRKSLMTW DGPLPQWHT KQTLQRLVL DQNSFQKFP 240
VLPAFAGHVP EAVTVPPQV NYTNGSNHG PNCYSQSFLL LAPEDIPPI IGSLLRELI 300
KEPQTEHLYG AUTENQKQF SSEPSYLAAT TTAIVSMTA VDTAVWLLQ GWLFQHQFQF 360
WGPQIRAVLV GAVPGRLLV LGLFASSQPV YTKTASFQQ PFIMCMLHF GGNHGLFGL 420
EAVNGQPEAA ELFPNSTWVG TOMAFDSISQ NEVVYSIMAE LQWKKDPVPD LAHWYTFPA 480
KRYGVSRPDA GAWMLLARS VYNGSEACK GHRGSLVER PSIQMYSIW YKSDVFEAM 540
KALLTSAPSL ATSPAPFIDG LGLTNQAVQF LVSITTEAR SAYLSKELAS LLAGESVLY 600
ELLPALELYL ASDSFLLGS VLQQAQAAV SBASAPTEQ NERYQLTWS FGNLLQYAM 660
KQLAGLVANY YTSWELFE ALVDSVAQGI PQQWQFURN VPQLQDAPVL SKQWTFQDR 720
GDTYDLAKKI ELKYTPRWVA GSW 743
```

(SEQ ID NO:1)

PROTEÍNA NAGLU RECOMBINANTE HUMANA E USOS DA MESMA**REFERÊNCIA CRUZADA PARA PEDIDOS RELACIONADOS**

[1] Este pedido refere-se e reivindica prioridade do Pedido Provisório US 61/546.248, depositado em 12 de outubro de 2011, todo o conteúdo do qual é expressamente incorporado aqui por esta referência.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[2] Síndrome de Sanfilippo B é uma doença de depósito lisossômico autossômica recessiva (LSD) causada por uma deficiência de uma enzima lisossômica conhecida como N-acetil-alfa-D-glicosaminidase (NaGlu). NaGlu é necessária para a degradação do sulfato de heparan como parte da repartição gradual de glicosaminoglicanos (GAG) no lisossoma. A deficiência ou ausência de NaGlu leva ao acúmulo e excreção urinária de sulfato de heparan. Com mais de 70 diferentes mutações identificadas até à data, Síndrome de Sanfilippo B apresenta extensa heterogeneidade molecular e genética.

[3] Aproximadamente 1 de 200.000 nascimentos é afetado pela Síndrome de Sanfilippo B e a deficiência se manifesta principalmente em crianças pequenas. Após o intervalo inicial sem sintomas, os pacientes que sofrem da Síndrome de Sanfilippo B geralmente presente com um retardo do desenvolvimento mental e problemas comportamentais, seguidos pelo declínio intelectual progressivo resulta em grave retardo mental, demência e doença motora. A aquisição da fala é lenta e incompleta. Os pacientes profundamente afetados podem apresentar desenvolvimento psicomotor e desenvolvimento da fala atrasados tão cedo quanto aos 2 anos de idade. A doença normalmente progride para o aumento de distúrbios comportamentais e distúrbios do sono. Embora as características clínicas sejam principalmente neurológicas, os pacientes muitas vezes desenvolvem diarreia, dentes cariados, fígado e baço aumentados, articulações rígidas, hirsutismo e/ou pelos grossos e podem apresentar problemas de coagulação do sangue. No estágio

e desenvolvem dificuldades de deglutição e convulsão. O tempo de vida de uma criança afetada normalmente não se estende além do fim da adolescência até o início dos anos vinte.

[4] Abordagens diferentes foram tentadas para fornecer a enzima ausente em pacientes. Para produzir NaGlu para terapia de reposição enzimática (ERT), NaGlu humana foi expressa em diversos sistemas de cultura de células de mamíferos. No entanto, em contraste com o NaGlu de ocorrência natural que trafica para a lisossoma intracelularmente, as proteínas NaGlu recombinantes produzidas e secretadas de células de mamíferos demonstraram conter ausência ou apenas uma pequena quantidade de manose-6-fosfato (M6P). A ausência ou escassez de frações de M6P na NaGlu secretada demonstrou prevenir sua internalização eficiente em células-alvo (por exemplo, fibroblastos de pele humana), que possuem receptores de M6P na superfície de suas membranas plasmáticas (ver, Zhao et al, *Protein Expression and Purification*, 19:202-211 (2000); e Weber et al, *Protein Expression and Purification*, 21:251-259 (2001)). O baixo grau de fosforilação foi visto na NaGlu de camundongo secretada expressa em células CHO, NaGlu humana secretada expressa em células HeLa, NaGlu humana secretada expressa em fibroblastos humanos e NaGlu humana secretada expressa na linhagem celular 293 de rim embrionário humano (HEK) (ver, Zhao et al., *Protein Expression and Purification*, 19:202-211 (2000); Yogalingam et al, *Biochim Biophys. Acta* 1502: 415-425; e Weber et al, *Protein Expression and Purification*, 21 :251-259 (2001)). A fosforilação ausente ou fraca de N-glicanos nas proteínas NaGlu secretadas a partir das células de mamíferos impõe um grande obstáculo para o desenvolvimento de uma proteína NaGlu humana recombinante apropriada para terapia de reposição enzimática uma vez que todas as tentativas acima mencionadas não foram capazes de produzir uma enzima que é eficientemente absorvida pelas células alvo uma vez que a concentração das proteínas interiorizadas, se detectável, era

Protein Expression and Purification, 19:202-211 (2000)). Até à data, nenhum produto aprovado está disponível para o tratamento da Síndrome de Sanfilippo B.

[5] A administração direta da proteína NaGlu humana recombinante produzida por célula de mamíferos (rhNaGlu) contendo a sequência de aminoácidos nativa no sistema nervoso central (CNS) (por exemplo, administração intratecal no fluido cerebrospinal (CSF)) de camundongos deficientes em NaGlu é tentada, mas não demonstrou sucesso na biodistribuição da enzima para o cérebro devido à acumulação excessiva de proteína no revestimento ependimário dos ventrículos, bem como a falta de resíduos de M6P necessários para a absorção celular eficiente. Da mesma forma, a administração sistêmica (ou seja, injeção intravenosa (IV)) de rhNaGlu produzida por célula de mamíferos contendo a sequência de aminoácidos nativa também falhou em demonstrar localização bem sucedida da proteína no cérebro. Além dos riscos conhecidos associados com a administração intratecal altamente invasiva, estes obstáculos no direcionamento de rhNaGlu para o cérebro são um desafio muito grande para conseguir uma terapia eficaz para o tratamento da Síndrome de Sanfilippo B.

[6] Portanto, há uma necessidade de fornecer uma proteína NaGlu estável que é enzimaticamente ativa e tem propriedades físicas que permitem que a proteína atravesse a barreira hemato-encefálica (BBB) e para internalização efetiva da proteína para os lisossomos das células alvo. Há também uma necessidade de uma plataforma de produção de proteína robusta e de alta expressão que pode fornecer uma NaGlu humana recombinante que efetivamente atravessa a barreira hemato-encefálica e é eficientemente internalizada nas células alvo humanas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[7] A presente invenção é desenhada para composições compreendendo proteína NaGlu recombinante humana (rhNaGlu) útil para terapia, por exemplo, no tratamento da Síndrome de Sanfilippo

inesperada, que a rhNaGlu aqui descrita tem um ou mais padrões de glicosilação que permitem que a rhNaGlu atravesse de forma eficiente a barreira hemato-encefálica (BBB), e seja absorvida em células dentro do sistema nervoso central (CNS) de animais deficientes na enzima, resultando em um aumento dramático na atividade da N-acetilglicosaminidase no cérebro, bem como uma redução dos níveis de substrato. Além disso, a rhNaGlu aqui descrita é eficientemente absorvida em uma célula de mamífero (por exemplo, célula humana), resultando em uma atividade enzimática aumentada em comparação com proteínas NaGlu produzidas e secretadas de células de mamíferos não modificadas que não são projetadas para produzir glicosilação específica. A absorção celular aumentada da proteína NaGlu também fornece benefícios para o uso em terapia de reposição enzimática para um paciente humano que sofre de Síndrome de Sanfilippo B por minimizar a necessidade de um aumento da quantidade e frequência de dose e, desse modo, reduzindo o risco potencial de imunogenicidade.

[8] A proteína rhNaGlu descrita aqui contém uma quantidade suficiente de oligossacarídeos (por exemplo, manose e manose fosforilada (ou seja, M6P)) para permitir a eficiente absorção celular através da manose e/ou endocitose mediada por receptores de M6P e seja corretamente direcionada em células humanas. Em uma modalidade, a rhNaGlu contém pelo menos um mol de proteína, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 moles de M6P por mole de proteína. Em uma modalidade, rhNaGlu pode ser internalizada em uma célula humana deficiente em NaGlu de forma que a proteína internalizada totalmente (100% ou mais) restaura os níveis normais (ou seja, níveis de tipo selvagem) da atividade de NaGlu na célula deficiente em NaGlu.

[9] Também são revelados aqui métodos para produzir um aviário transgênico que expressa rhNaGlu que se beneficie da fosforilação da manose. Em particular, um aviário transgênico que expressa a proteína rhNaGlu nas células de oviduto, secreta no

aviários que contêm essa rhNaGlu também estão incluídos na presente invenção.

[10] A presente invenção também contempla vetores e células hospedeiras que contêm um transgene que codifica rhNaGlu, bem como composições farmacêuticas compreendendo rhNaGlu para ser usado na aplicação dessa rhNaGlu para o tratamento da Síndrome de Sanfilippo B.

[11] Em um aspecto, a invenção fornece uma composição compreendendo uma mistura isolada de N-acetil-alfa-D-glicosaminidase (rhNaGlu) recombinante humana compreendendo a sequência de aminoácidos 24-743 de SEQ ID NO:1, em que pelo menos 10% da rhNaGlu na mistura compreende pelo menos uma estrutura de glicano contendo manose-6-fosfato (M6P). Em uma modalidade, a rhNaGlu contendo M6P é capaz de ser absorvida em uma célula de mamífero deficiente em NaGlu de forma que rhNaGlu internalizado restaura pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% da atividade normal de NaGlu observada em uma célula de mamífero de tipo selvagem do mesmo tipo. Em outra modalidade, a estrutura de glicano é um glicano N-ligado.

[12] Em uma modalidade, a rhNaGlu contém pelo menos 1 mol de M6P por mole de proteína. Em outra modalidade, a rhNaGlu contém entre cerca de 1 e cerca de 6 moles de M6P por mole de proteína. Em outra modalidade, a rhNaGlu contém cerca de 2 moles de M6P por mole de proteína. Ainda em outra modalidade, a rhNaGlu contém cerca de 3 moles de M6P por mole de proteína. Em outra modalidade, a rhNaGlu contém cerca de 4 moles de M6P por mole de proteína. Em outra modalidade, a rhNaGlu contém cerca de 5 moles de M6P por mole de proteína. Ainda em outra modalidade, a rhNaGlu contém cerca de 6 moles de M6P por mole de proteína.

[13] Em uma modalidade, a célula mamífera deficiente em NaGlu é uma célula humana. Em outra modalidade, a célula humana deficiente em NaGlu é um fibroblasto da pele, um hepatócito ou um macrófago. Em uma modalidade, a célula humana deficiente em NaGlu

[14] Em uma modalidade, a rhNaGlu é efetivamente liberada ao cérebro de um mamífero contendo deficiência de NaGlu quando administrada sistemicamente. Em uma modalidade particular, a rhNaGlu é efetivamente liberada ao cérebro de um mamífero contendo deficiência de NaGlu quando administrada por via intravenosa. Em uma modalidade, a rhNaGlu é efetivamente liberada ao cérebro de um mamífero contendo deficiência de NaGlu quando administrada por via intratecal.

[15] Em uma modalidade, a rhNaGlu contendo M6P é internalizada por uma célula deficiente em NaGlu e restaura pelo menos 100% da atividade normal de NaGlu *in vivo*. Em uma modalidade, a rhNaGlu contendo M6P contém pelo menos 25 moles de manose por mole de proteína.

[16] Em uma modalidade, pelo menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 95% da rhNaGlu na mistura contém M6P. Em outra modalidade, pelo menos 20% da rhNaGlu na mistura contém pelo menos um M6P. Em outra modalidade, pelo menos 30% da rhNaGlu na mistura contém pelo menos um M6P. Em outra modalidade, pelo menos 40% da rhNaGlu na mistura contém pelo menos um M6P. Em outra modalidade, pelo menos 50% da rhNaGlu na mistura contém pelo menos um M6P. Em outra modalidade, pelo menos 60% da rhNaGlu na mistura contém pelo menos um M6P.

[17] Em outro aspecto, a invenção fornece uma composição compreendendo uma mistura isolada de N-acetil-alfa-D-glicosaminidase (rhNaGlu) recombinante humana compreendendo a sequência de aminoácidos 24-743 de SEQ ID NO:1, em que a mistura compreende uma quantidade suficiente de rhNaGlu contendo uma ou mais estruturas glicano compreendendo manose-6-fosfato (M6P) de forma que a rhNaGlu contendo M6P é internalizada em uma célula de mamífero contendo deficiência de NaGlu através de endocitose mediada por receptores de M6P e restaura pelo menos 50% da atividade da NaGlu observada em uma célula de tipo selvagem do mesmo tipo que expressa NaGlu endógena. Em uma modalidade, a

glicosilada O-ligada.

[18] Em uma modalidade, a rhNaGlu compreende pelo menos 1 mol de M6P por mole de rhNaGlu. Em outra modalidade, a rhNaGlu compreende cerca de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 moles de M6P por mole de rhNaGlu. Em outra modalidade, a rhNaGlu compreende cerca de 3 moles de M6P por mole de rhNaGlu. Em outra modalidade, a rhNaGlu compreende cerca de 4 moles de M6P por mole de rhNaGlu.

[19] Em uma modalidade, a rhNaGlu compreende manose. Em outra modalidade, a rhNaGlu compreende N-acetilglicosamina (GlcNAc). Em outra modalidade, a rhNaGlu compreende galactose. Em outra modalidade, a rhNaGlu compreende N-acetilgalactosamina (GalNAc). Em outra modalidade, a rhNaGlu não contém fucose. Em outra modalidade, a rhNaGlu não contém glicose. Em uma modalidade, a rhNaGlu restaura pelo menos 60, 70, 80, 90, 95 ou 100% da atividade enzimática de NaGlu normal.

[20] Em outra modalidade, a rhNaGlu é efetivamente liberada ao cérebro de um mamífero contendo deficiência de NaGlu quando administrada sistemicamente. Em uma modalidade, a rhNaGlu é efetivamente liberada ao cérebro de um mamífero contendo deficiência de NaGlu quando administrada por via intravenosa. Em uma modalidade, a rhNaGlu é efetivamente liberada ao cérebro de um mamífero contendo deficiência de NaGlu quando administrada por via intratecal.

[21] Em uma modalidade, a célula mamífera deficiente em NaGlu é uma célula humana. Em outra modalidade, a célula humana é um fibroblasto da pele, um hepatócito ou um macrófago. Em uma modalidade, a célula humana deficiente em NaGlu é uma célula neuronal.

[22] Em uma modalidade, a rhNaGlu é uma proteína de fusão compreendendo uma segunda fração. Em uma modalidade, a segunda fração é um polipeptídeo. Em outra modalidade, o polipeptídeo é selecionado do grupo que consiste em ligante do receptor de transferrina (TfRL), ligante do receptor de fator de crescimento

de baixa densidade (LDL) e resíduos de aminoácidos ácidos (AAA).

[23] Em uma modalidade, a rhNaGlu é produzida a partir de um aviário transgênico. Em uma modalidade, o aviário transgênico é uma galinha, um peru, um pato ou uma codorna. Em uma modalidade, o aviário transgênico é uma galinha. Em uma modalidade, a rhNaGlu é produzida a partir de uma célula do oviduto.

[24] Em outro aspecto, a invenção fornece uma composição compreendendo uma N-acetil-alfa-D-glicosaminidase (rhNaGlu) humana recombinante isolada compreendendo uma ou mais estruturas de glicano contendo quantidade suficiente de manose-6-fosfato (M6P) que permite a internalização da rhNaGlu em uma célula de mamífero tendo deficiência de NaGlu através de endocitose mediada por receptores de M6P, de forma que quando internalizada *in vivo*, a rhNaGlu restaura pelo menos 50% da atividade de NaGlu observada em uma célula de tipo selvagem do mesmo tipo que expressa NaGlu endógena.

[25] Em uma modalidade, a proteína rhNaGlu é glicosilada N-ligada. Em outra modalidade, a proteína rhNaGlu é glicosilada O-ligada. Em uma modalidade, a rhNaGlu compreende cerca de 2, 3, 4, 5 ou 6 moles de M6P por mole de rhNaGlu.

[26] Em uma modalidade, a rhNaGlu é efetivamente liberada ao cérebro de um mamífero contendo deficiência de NaGlu quando administrada sistemicamente. Em outra modalidade, a rhNaGlu é efetivamente liberada ao cérebro de um mamífero contendo deficiência de NaGlu quando administrada por via intravenosa. Em uma modalidade, a rhNaGlu é efetivamente liberada ao cérebro de um mamífero contendo deficiência de NaGlu quando administrada por via intratecal.

[27] Em outro aspecto, a invenção fornece um aviário transgênico compreendendo um transgene contendo um promotor operacionalmente ligado a uma sequência de ácido nucleico que codifica uma NaGlu humana recombinante (rhNaGlu), que o transgene é contido no genoma do aviário transgênico e expressa em uma

do oviduto do aviário transgênico, secretada no lúmen do oviduto e depositada na clara do ovo de um ovo do aviário transgênico.

[28] Em uma modalidade, a rhNaGlu compreende cerca de 2, 3, 4, ou 6 moles de M6P por mole de rhNaGlu. Em outra modalidade, o componente de promotor é um promotor específico de oviduto. Em outra modalidade, o promotor específico de oviduto é um promotor de ovalbumina. Ainda em outra modalidade, o aviário transgênico é selecionado do grupo que consiste em uma galinha, um peru, um pato e uma codorna.

[29] Em outro aspecto, a invenção fornece um ovo produzido pelo aviário transgênico da invenção.

[30] Ainda em outro aspecto, a invenção fornece um método para produzir uma NaGlu humana recombinante (rhNaGlu) compreendendo: a) produzir um aviário transgênico compreendendo um transgene contendo um componente de promotor operacionalmente ligado a uma sequência de ácido nucleico que codifica a rhNaGlu estabelecida na 24-743 de SEQ ID NO:1, em que o transgene é contido no genoma do aviário transgênico e expresso em uma célula do oviduto, de forma que a rhNaGlu é glicosilada na célula do oviduto do aviário transgênico, secretada no lúmen do oviduto e depositada em clara do ovo de um ovo posto pelo aviário transgênico; e b) isolar a rhNaGlu da clara do ovo.

[31] Em uma modalidade, o componente de promotor é um promotor específico de oviduto. Em outra modalidade, o promotor específico de oviduto é um promotor de ovalbumina. Em uma modalidade, o aviário é selecionado do grupo que consiste em uma galinha, um peru, um pato e uma codorna. Em uma modalidade, o aviário é galinha.

[32] Em outro aspecto, a invenção fornece um vetor compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica uma NaGlu humana operacionalmente ligada a um promotor de ovalbumina. Em outro aspecto, a invenção fornece uma célula hospedeira compreendendo o vetor da invenção. Em outro aspecto, a invenção

ácido nucleico de 5232-10248 da SEQ ID NO:4.

[33] Em um aspecto, a invenção fornece uma formulação farmacêutica compreendendo uma composição da invenção em combinação com um carreador, diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

[34] Em outro aspecto, a invenção fornece uma composição compreendendo proteína NaGlu humana recombinante que atravessa a barreira hemato-encefálica de um mamífero contendo deficiência de NaGlu quando administrada por via intravenosa.

[35] Ainda em outro aspecto, a invenção fornece um método para tratar um sujeito que sofre de deficiência de NaGlu, o método compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição da invenção.

[36] Ainda em outro aspecto, a invenção fornece um método para liberar proteína NaGlu humana recombinante para o cérebro de um sujeito que sofre de deficiência de NaGlu, o método compreendendo administrar por via intravenosa proteína NaGlu humana recombinante ao sujeito.

[37] Em outro aspecto, a invenção fornece um método para transportar uma proteína NaGlu humana recombinante da circulação através da barreira hemato-encefálica em uma quantidade terapeuticamente eficaz, o método compreendendo administrar por via intravenosa uma proteína NaGlu humana recombinante para um sujeito contendo deficiência de NaGlu.

[38] Em uma modalidade, a deficiência de NaGlu é Síndrome de Sanfilippo B. Em outra modalidade, o sujeito é um ser humano.

[39] Em outra modalidade, a proteína NaGlu recombinante humana é administrada por via intravenosa ao sujeito em uma dose de cerca de 0,5 a cerca de 50 mg/kg de peso corporal. Em outra modalidade, a proteína NaGlu humana recombinante é administrada por via intravenosa ao sujeito em uma dose de cerca de 1 a cerca de 30 mg/kg de peso corporal. Em outra modalidade, a proteína NaGlu humana recombinante é administrada por via intravenosa ao sujeito

[40] Ainda em outra modalidade, a proteína NaGlu humana recombinante é administrada por via intratecal ao sujeito. Em uma modalidade, a proteína NaGlu humana recombinante é administrada por via intratecal em uma dosagem de pelo menos cerca de 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 ou 0,9 mg/kg de peso corporal. Em outra modalidade, a proteína NaGlu humana recombinante é administrada por via intratecal em uma dosagem de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 mg/kg de peso corporal. Em outra modalidade, a proteína NaGlu humana recombinante é administrada por via intratecal em uma dosagem de cerca de 10 a cerca de 30 mg/kg de peso corporal.

[41] Em outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz é uma quantidade eficaz para reduzir os níveis de sulfato de heparan no cérebro, nos rins ou no fígado do sujeito. Em outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz é uma quantidade eficaz para aumentar os níveis de atividade de NaGlu no cérebro ou no fígado do sujeito.

[42] Em outra modalidade, o método ainda compreende administrar um segundo agente terapêutico. Em uma modalidade, o segundo medicamento é um imunossupressor.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[43] A Fig. 1 mostra a sequência de aminoácidos da NaGlu recombinante humana (resíduos de aminoácidos 1-23, peptídeo sinal).

[44] A Fig. 2 mostra a sequência de ácido nucleico (cdNA) de NaGlu recombinante humana, incluindo a sequência de ácido nucleico que codifica o peptídeo sinal.

[45] A Fig. 3 mostra a sequência de ácido nucleico de promotor de ovalbumina 1,1 kb.

[46] As Figs. 4A-D mostram a sequência de ácido nucleico do vetor pSIN-OV-1.1-I-rhNaGlu usado na transgênese de um aviário.

[47] A Fig. 5 é uma representação esquemática do vetor pSIN-OV-1.1-I-rhNaGlu.

e purificada a partir de clara do ovo de um *Gallus* transgênico.

[49] A Fig. 7 mostra a concentração média de rhNaGlu depositada na clara do ovo de *Gallus* transgênico.

[50] A Fig. 8 mostra um perfil de oligossacarídeo de rhNaGlu produzida a partir de um *Gallus* transgênico usando HPAEC-PAD.

[51] A Fig. 9 mostra a análise de absorção de rhNaGlu por fibroblastos de pele humana (MPS IIIB, deficiente em NaGlu; Normal, fibroblastos de pele humana de tipo selvagem; 1U de atividade enzimática = nmol de proteína/hr).

[52] A Fig. 10 mostra análise de inibição de absorção de rhNaGlu (*Gallus*) usando diferentes concentrações de monossacarídeo M6P (1U de atividade enzimática = 1µmol de proteína/min).

[53] A Fig. 11 mostra uma representação esquemática do vetor pTT22 contendo um constructo de fusão de NaGlu humana recombinante (AAA-NaGlu: resíduos ácidos de aminoácidos fundidos à extremidade N-terminal do NaGlu inteiro).

[54] A Fig. 12 mostra uma representação esquemática do vetor pTT22 contendo um constructo de fusão de NaGlu humana recombinante (NaGlu-TfRL: ligante de receptor de transferrina fundido ao C-terminal da NaGlu inteira).

[55] A Fig. 13 mostra a atividade enzimática da AAA-NaGlu produzida a partir de HEK293 em comparação com rhNaGlu produzida a partir de *Gallus*.

[56] A Fig. 14 mostra a atividade enzimática da NaGlu-TfRL produzida a partir de HEK293 em comparação com AAA-NaGlu produzida a partir de HEK293.

[57] A Fig. 15 mostra os níveis de absorção de rhNaGlu (*Gallus*) em uma linhagem celular de macrófagos (NR8383) ao longo do tempo (48 horas). A atividade de NaGlu celular foi medida em unidades/mg de proteína.

[58] A Fig. 16 mostra níveis de substrato sulfato de heparan (µg/mg de tecido) no rim de camundongos *naglu* (^{-/-}) após administração intravenosa de veículo (KO); rhNaGlu *gallus* em uma

concentração de dosagem de 27 mg/kg. Camundongos de tipo selvagem (WT) não foram tratados.

[59] A Fig. 17 mostra níveis de substrato sulfato de heparan ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) no cérebro de camundongos *naglu* ($^{-/-}$) após administração intravenosa de veículo (KO); rhNaGlu *gallus* em uma concentração de dosagem de 6,25 mg/kg; ou rhNaGlu *gallus* em uma concentração de dosagem de 27 mg/kg. Camundongos de tipo selvagem (WT) não foram tratados.

[60] A Fig. 18 mostra níveis de substrato sulfato de heparan ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) no fígado de camundongos *naglu* ($^{-/-}$) após administração intravenosa de veículo (KO); rhNaGlu *gallus* em uma concentração de dosagem de 6,25 mg/kg; ou rhNaGlu *gallus* em uma concentração de dosagem de 27 mg/kg. Camundongos de tipo selvagem (WT) não foram tratados.

[61] A Fig. 19 mostra níveis de substrato sulfato de heparan ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) no cérebro de camundongos *naglu* ($^{-/-}$) após administração intratecal de veículo (KO) ou rhNaGlu *gallus* em uma concentração de dosagem de 0,31 mg/kg. Camundongos de tipo selvagem (WT) não foram tratados.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[62] A presente invenção fornece composições compreendendo proteína NaGlu humana recombinante (rhNaGlu) útil para terapia, por exemplo, no tratamento de doenças associadas à NaGlu, por exemplo, Síndrome de Sanfilippo B. A presente invenção é baseada na descoberta que a proteína rhNaGlu descrita aqui contém uma quantidade suficiente de oligossacarídeos (por exemplo, manose e manose fosforilada (ou seja, M6P)) para permitir a eficiente absorção celular através da manose e/ou endocitose mediada por receptores de M6P e seja corretamente direcionada em células humanas. Uma vez que a rhNaGlu da invenção é mais eficientemente absorvida em uma célula humana, a rhNaGlu da invenção apresenta atividade enzimática aumentada em comparação com proteínas NaGlu produzidas e secretadas de células de mamíferos não modificadas

Adicionalmente, a rhNaGlu aqui descrita tem um ou mais padrões de glicosilação que permitem que a rhNaGlu atravesse de forma eficiente a barreira hemato-encefálica (BBB) quando administrada por via intravenosa. A absorção celular aumentada da proteína rhNaGlu da invenção minimiza a necessidade de dosagens grandes e frequentes, desse modo reduzindo o risco potencial de imunogenicidade.

[63] Algumas das definições e abreviaturas usadas aqui incluem as seguintes: aa, aminoácidos; bp, pares de base; CDS, sequência de codificação; cDNA, DNA complementar a um RNA; GalNAc, N-acetilgalactosamina; Gal, galactose; GlcNAc, N-acetilglicosamina; nt, nucleotídeos; kb 1.000 pares de bases; µg, micrograma; mL, mililitro; ng, nanograma; e nt, nucleotídeo.

[64] Certas definições são estabelecidas para ilustrar e definir o sentido e o escopo dos vários termos usados para descrever a invenção aqui.

[65] O termo "aviário" como usado aqui se refere a qualquer espécie, subespécie ou variedade do organismo da classe taxonômica *ava*, como, entre outros, galinha, peru, pato, ganso, codorna, faisões, papagaios, tentilhões, falcões, corvos e ratitas, incluindo avestruz, emu e casuar. O termo inclui as diversas variedades conhecidas como *Gallus gallus*, ou galinhas, (por exemplo, *White Leghorn*, *Brown Leghorn*, *Barred-Rock*, *Sussex*, *New Hampshire*, *Rhode Island*, *Ausstralorp*, *Minorca*, *Amrox*, *California Gray*, *Italian Partridge-colored*), bem como variedades de perus, faisões, codornas, pato, avestruzes e outras aves de capoeira comumente produzidas em quantidades comerciais.

[66] As frases "baseado em" e "derivado a partir de" normalmente significam obtidas a partir de, no todo ou em parte. Por exemplo, um vetor retroviral sendo baseado em ou derivado a partir de um retrovírus particular ou baseado em uma sequência de nucleotídeos de um retrovírus particular significa que o genoma do vetor retroviral contém uma parte substancial da sequência de

substancial pode ser uma sequência particular de gene ou nucleotídeos como a sequência de nucleotídeos que codifica as proteínas gag, pol e/ou env ou outras sequências de nucleotídeos estruturais ou funcionais do genoma do vírus como sequências que codificam as repetições terminais longas (LTRs) ou pode ser substancialmente o genoma completo do retrovírus, por exemplo, a maior parte (por exemplo, mais de 60% ou mais de 70% ou mais de 80% ou mais de 90%) ou a totalidade do genoma do retrovírus, como será evidente pelo contexto na especificação como o conhecimento de um especialista na técnica. Exemplos de vetores retrovirais que são baseados em ou derivados de um retrovírus são os vetores retrovirais NL (por exemplo, NLB) que são derivados do retrovírus leucose aviária ("ALV"), conforme revelado em Cosset et al , Journal of Virology (1991) vol. 65, p 3388-3394.

[67] O termo "sequência codificadora" e "região codificadora" conforme usado aqui se refere a sequências de nucleotídeos e sequências de ácidos nucleicos, incluindo o RNA e DNA, que codifica informação genética para a síntese de um RNA, uma proteína ou qualquer parte de um RNA ou proteína.

[68] Sequências de nucleotídeos que naturalmente não fazem parte do genoma de um organismo particular ou são introduzidas em um sítio não nativo no genoma do organismo são referidos como sequências de nucleotídeos "estranhas", sequências de nucleotídeos "heterólogas", sequências de nucleotídeos "recombinantes" ou sequências de nucleotídeos "exógenas". Além disso, uma sequência de nucleotídeos que foi isolada e em seguida reintroduzida do mesmo tipo (por exemplo, mesma espécie) de organismo não é considerada como sendo uma parte de ocorrência natural do genoma de um organismo particular e, portanto, é considerada exógena ou heteróloga. "Proteínas heterólogas" ou "proteínas exógenas" podem ser proteínas codificadas por sequências de nucleotídeos estranhos, heterólogos ou exógenos e, portanto, muitas vezes não são naturalmente expressas em uma célula do organismo hospedeiro.

"estranho", tendo como referência os ácidos nucleicos, como o DNA e RNA, são usados de modo intercambiável e referem-se a ácido nucleico que não ocorre naturalmente como parte de um cromossomo, um genoma ou célula em que estiver presente ou que são encontrados em locais e/ou em quantidades que diferem do locais e/ou quantidades em que ele ocorre na natureza. Pode ser ácido nucleico, cromossomo ou célula que não são endógenos ao genoma e foram exogenamente introduzidos no genoma, cromossomo ou célula. Exemplos de DNA heterólogo incluem, entre outros, DNA que codifica um produto do gene ou produtos do gene de interesse, por exemplo, para a produção de uma proteína codificada. Exemplos de DNA heterólogo incluem, entre outros, o DNA que codifica proteínas marcadoras rastreáveis, DNA que codifica proteínas terapêuticas. Os termos "heterólogos" e "exógenos" podem se referir a uma biomolécula como um ácido nucleico ou uma proteína que não é normalmente encontrada em uma determinada célula, tecido ou substância produzida por um organismo ou não é normalmente encontrada em uma determinada célula, tecido ou substância produzida pelo organismo em quantidade ou localização igual à encontrada para ocorrer naturalmente. Por exemplo, uma proteína que é heteróloga ou exógena de um ovo é uma proteína que normalmente não é encontrada no ovo.

[70] O termo "constructo" conforme usado aqui se refere a uma sequência de nucleotídeos linear ou circular como DNA que foi montada a partir de mais de um segmento da sequência de nucleotídeos que foi isolada a partir de uma fonte natural ou foi sintetizada quimicamente, ou combinações das mesmas.

[71] O termo "complementar" conforme usado aqui se refere a duas moléculas de ácido nucleico que podem formar interações específicas com outras. Nas interações específicas, uma base adenina dentro de uma fita de um ácido nucleico pode formar duas ligações de hidrogênio com timina dentro de uma segunda fita de ácido nucleico quando as duas fitas de ácidos nucleicos são de

guanina dentro de uma fita de um ácido nucleico pode formar três ligações de hidrogênio com citosina dentro de uma segunda fita de ácido nucleico quando as duas fitas de ácidos nucleicos são de polaridades opostas. Ácidos nucleicos complementares conforme referidos aqui, podem ainda compreender bases modificadas em que uma adenina modificada pode formar ligações de hidrogênio com uma timina ou uma timina modificada, e uma citosina modificada pode formar ligações de hidrogênio com uma guanina ou uma guanina modificada.

[72] O termo "expresso" ou "expressão" aqui se refere à transcrição de uma sequência codificadora para produzir uma molécula de RNA pelo menos complementar em parte a uma região de uma das duas fitas de ácido nucleico da sequência codificadora. O termo "expresso" ou "expressão" conforme usado aqui pode se referir à tradução de um mRNA para produzir uma proteína ou peptídeo.

[73] O termo "vetor de expressão" conforme usado aqui se refere a um vetor de ácido nucleico que compreende uma região de controle de expressão gênica, como um promotor ou um componente do promotor, operacionalmente ligada a uma sequência de nucleotídeos que codifica pelo menos um polipeptídeo.

[74] O termo "fragmento" conforme usado aqui pode se referir a, por exemplo, a uma parte com pelo menos cerca de 10, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 500, 1000, 2000, 5000, 6.000, 8.000, 10.000, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000 ou 60.000 nucleotídeos de tamanho de um ácido nucleico que foi construído artificialmente (por exemplo, por síntese química) ou por clivagem de um produto natural em vários pedaços, usando as endonucleases de restrição ou cisalhamento mecânico, ou enzimaticamente, por exemplo, por PCR ou qualquer outra técnica de polimerização conhecida, ou expressa em uma célula hospedeira pela tecnologia de ácido nucleico recombinante, conhecida por um especialista na técnica. O termo "fragmento" conforme usado aqui também pode se referir a, por

resíduos de aminoácidos menos do que uma sequência de aminoácidos inteira para NaGlu (ou seja, sequência de aminoácidos 24-743 da SEQ ID NO:1), cuja parte é clivada de uma sequência de aminoácidos de ocorrência natural por clivagem proteolítica por pelo menos uma protease, ou é uma parte da sequência de aminoácidos de ocorrência natural sintetizada por métodos químicos ou usando a tecnologia do DNA recombinante (por exemplo, expressa de uma parte da sequência de nucleotídeos que codifica a sequência de aminoácidos de ocorrência natural) conhecida por uma especialista na técnica. "Fragmento" pode também se referir a uma parte, por exemplo, de cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 90%, cerca de 95% ou cerca de 99% de uma sequência de aminoácidos ou sequência de nucleotídeos particular.

[75] "Parte funcional" e "fragmento funcional" podem ser usados de modo intercambiável e conforme usado aqui significa uma parte ou fragmento de um todo capaz de executar, no todo ou em parte, uma função do todo. Por exemplo, uma parte biologicamente funcional de uma molécula significa uma parte da molécula que executa uma função biológica da molécula inteira ou intacta. Partes funcionais podem ser de qualquer tamanho útil. Por exemplo, um fragmento funcional pode variar em tamanho de cerca de 20 bases de comprimento a um comprimento igual a todo o comprimento da sequência especificada menos um nucleotídeo. Em outro exemplo, um fragmento funcional pode variar em tamanho de cerca de 50 bases de comprimento a um comprimento igual a todo o comprimento da sequência especificada menos um nucleotídeo. Em outro exemplo, um fragmento funcional pode variar em tamanho de cerca de 50 bases de comprimento a cerca de 20 kb de comprimento. Em outro exemplo, um fragmento funcional pode variar em tamanho de cerca de 500 bases de comprimento a cerca de 20 kb de comprimento. Em outro exemplo, um fragmento funcional pode variar em tamanho de cerca de 1 kb de comprimento a cerca de 20 kb de comprimento. Em outro exemplo, um fragmento funcional pode variar em tamanho de cerca de 0,1 kb de

fragmento funcional pode variar em tamanho de cerca de 20 bases kb de comprimento a cerca de 10 kb de comprimento.

[76] O termo "totalmente transgênico" ou "linhagem germinativa transgênica" refere-se a um animal como um aviário que contém pelo menos uma cópia de um transgene em essencialmente todas as suas células.

[77] O termo "região de controle de expressão gênica" conforme usado aqui se refere a sequências de nucleotídeos que estão associadas com uma sequência codificadora e que regulam, no todo ou em parte, a expressão da sequência codificadora, por exemplo, regulam, no todo ou em parte, a transcrição da sequência codificadora. As regiões de controle de expressão gênica podem ser isoladas de uma fonte de ocorrência natural ou podem ser sintetizadas quimicamente e podem ser incorporadas em um vetor de ácido nucleico para permitir transcrição regulada em células apropriadas. As "regiões de controle de expressão gênica" podem preceder, mas não estão limitadas a preceder, a região de uma sequência de ácido nucleico que está na região 5' da extremidade de uma sequência codificadora que pode ser transcrita em mRNA.

[78] Conforme usado aqui, "células hospedeiras" se refere a células que abrigam os vetores construídos usando técnicas de DNA recombinante e que codificam pelo menos um gene heterólogo.

[79] O termo "ácido nucleico isolado" aqui abrange, por exemplo, (a) um DNA que tem a sequência de parte de uma molécula genômica de ocorrência natural, mas não é flanqueada por pelo menos uma das sequências que flanqueiam a parte da molécula no genoma da espécie em que ocorre naturalmente; (b) um ácido nucleico que foi incorporado em um vetor ou no DNA genômico de um procarionte ou eucarionte de forma que o vetor resultante ou DNA genômico não é idêntico ao DNA de ocorrência natural do qual o ácido nucleico foi obtido; (c) uma molécula separada como um cDNA, um fragmento genômico, um fragmento produzido pela reação em cadeia da polimerase (PCR), reação em cadeia da ligase (LCR) ou

nucleotídeos recombinante que faz parte de um gene híbrido, ou seja, um gene que codifica uma proteína de fusão e (e) uma sequência de nucleotídeos recombinante que faz parte de uma sequência híbrida que não é de ocorrência natural. Moléculas isoladas de ácido nucleico da presente invenção podem incluir, por exemplo, variantes alélicas naturais, bem como moléculas de ácido nucleico modificadas por deleções, inserções, inversões ou substituições de nucleotídeos.

[80] O termo "ácido nucleico" conforme usado aqui se refere a qualquer matriz linear ou sequencial de nucleotídeos e nucleosídeos, por exemplo, cDNA, DNA genômico, mRNA, tRNA, oligonucleotídeos, oligonucleosídeos e derivados dos mesmos. Para facilitar a discussão, ácidos nucleicos de ocorrência não natural podem ser referidos aqui como constructos. Os ácidos nucleicos podem incluir vetores de plasmídeo bacteriano, incluindo vetores de expressão, clonagem, cosmídeo e de transformação, como, vetores virais animais, como, entre outros, adenovírus modificado, vírus influenza, vírus da poliomielite, vírus da varíola, retrovírus como vetor retroviral de vírus da leucose aviária (ALV), um vetor retroviral de vírus da leucemia murina (MLV) e um vetor de lentivírus e semelhantes e fragmentos dos mesmos. Além disso, o ácido nucleico pode ser uma LTR de um vetor retroviral de vírus da leucose aviária (ALV), um vetor retroviral do vírus da leucemia murina (MLV), ou um vetor de lentivírus e fragmentos dos mesmos. Ácidos nucleicos também podem incluir vetores NL como NLB, NLD e NLA e fragmentos dos mesmos e oligonucleotídeos sintéticos como DNA ou RNA quimicamente sintetizados. Os ácidos nucleicos podem incluir nucleotídeos e nucleosídeos modificados ou derivatizados como, entre outros, nucleotídeos halogenados como, entre outros, 5-bromouracil e nucleotídeos derivatizados como nucleotídeos marcados com biotina.

[81] Conforme usado aqui, os termos "glicano," "estrutura de glicano", "fração de glicano", "oligossacarídeo", "estrutura de

glicosilação" e "estrutura de glicosilação" têm essencialmente o mesmo significado e cada um se refere a uma ou mais estruturas que são formadas a partir de resíduos de açúcar e estão ligados à proteína glicosilada como NaGlu humana. Por exemplo, "N-glicano" ou "glicano N-ligado" referem-se a uma estrutura de glicano ligada a um nitrogênio de cadeias laterais de asparagina ou arginina da proteína glicosilada. "O-glicano" ou "glicano O-ligado" referem-se a uma estrutura de glicano ligada ao oxigênio da hidroxila da cadeia lateral da serina, treonina, tirosina, hidroxilisina ou hidroxiprolina da proteína glicosilada.

[82] Os termos "vetor" e "vetor de ácido nucleico" conforme usados aqui se referem a uma molécula de ácido nucleico viral ou plasmídeo de fita dupla ou simples natural ou sintético que pode ser transfectado ou transformado em células e replicar independentemente de, ou dentro do genoma da célula do hospedeiro. Um vetor de fita simples circular pode ser linearizado por tratamento com uma enzima de restrição apropriada baseado na sequência de nucleotídeos do vetor. Um ácido nucleico pode ser inserido em um vetor cortando o vetor com enzimas de restrição e ligando as peças desejadas juntas, como é entendido na técnica. Um vetor típico pode ser composto dos seguintes elementos operativamente ligados em distâncias apropriadas para permitir a expressão de gene funcional: origem de replicação, promotor, potencializador, sequência líder do mRNA 5', sítio de ligação ribossomal, cassete de ácido nucleico, sítios de poliadenilação e terminação e sequências de marcador selecionáveis. Um ou mais desses elementos podem ser omitido em aplicações específicas. O cassete do ácido nucleico pode incluir um sítio de restrição para a inserção da sequência de ácido nucleico a ser expressa. Em um vetor funcional, o cassete do ácido nucleico contém a sequência de ácido nucleico a ser expressa incluindo sítios de início e término de tradução. Um íntron opcionalmente pode ser incluído no constructo, por exemplo, 5' para a sequência codificadora. Um

situe no vetor com as sequências reguladoras apropriadas, o posicionamento e orientação da sequência codificadora em relação às sequências de controle sendo de forma que a sequência codificadora seja transcrita sob o "controle" das sequências reguladoras ou de controle. A modificação das sequências codificadoras da proteína particular de interesse pode ser desejável para atingir este fim. Por exemplo, em alguns casos, pode ser necessário modificar a sequência para que essa possa ser ligada para as sequências de controle com a orientação apropriada, ou para manter o quadro de leitura. As sequências de controle e outras sequências reguladoras podem ser ligadas à sequência codificadora antes da inserção em um vetor. Alternativamente, a sequência codificadora pode ser clonada diretamente em um vetor de expressão que já contém as sequências de controle e um sítio de restrição apropriado que está no quadro de leitura com e sob o controle regulatório das sequências de controle.

[83] O termo "operacionalmente ligado" refere-se a um arranjo de elementos em que os componentes descritos são configurados de forma a executar a sua função normal. Regiões de controle de expressão gênica ou promotores (por exemplo, componentes de promotor) operacionalmente ligados a uma sequência codificadora são capazes de efetuar a expressão da sequência codificadora. As sequências de controles ou promotor não precisam ser contíguas com a sequência codificadora, desde que eles funcionem para direcionar a expressão dos mesmos. Assim, por exemplo, sequências transcritas ainda não traduzidas de intervenção podem estar presentes entre uma sequência de promotor e a sequência codificadora e a sequência do promotor pode ainda ser considerada "operacionalmente ligada" à sequência codificadora.

[84] "Superexpressão", conforme usado aqui, refere-se à produção de um produto de gene em organismos transgênicos que excede os níveis de produção em organismos normais ou não transformados.

tecido de um oviduto aviário, como o magno, por exemplo, células da glândula tubular, onde as proteínas são produzidas com oligossacarídeos N-ligados que contêm uma quantidade aumentada de manose e manose-6-fosfato (M6P) e substancialmente reduzidas quantidades de galactose e/ou ácido siálico em relação às das proteínas produzidas em outros tecidos do aviário como tecido renal ou hepático.

[86] O termo "promotor específico para oviduto", conforme usado aqui se refere a promotores e componentes de promotor que são funcionais, ou seja, fornecem transcrição de uma sequência codificadora, em grande medida, por exemplo, primariamente (ou seja, mais de 50% do produto de transcrição produzido no animal por um tipo de promotor particular sendo produzido em células de oviduto) ou exclusivamente em células de oviduto de um pássaro. Exemplos de promotores específicos de oviduto incluem, entre outros, promotor de ovalbumina, promotor ovomucoide, promotor ovoinibidor, promotor de lisozima e promotor de ovotransferrina e partes funcionais desses promotores, por exemplo, componentes de promotor. Limitando a expressão da proteína NaGlu para o magno usando os promotores específicos de oviduto, os efeitos fisiológicos deletérios ao pássaro como resultado da expressão destas enzimas em outros tecidos do pássaro podem ser minimizados.

[87] Os termos "identidade de sequência por cento", "identidade por cento", "% de identidade", "homologia de sequência por cento", "homologia por cento", "% de homologia" e "similaridade de sequências por cento" podem cada um se referir ao grau de combinação entre duas sequências de ácidos nucleicos ou duas sequências de aminoácidos. Essa combinação de sequência pode ser determinada usando o algoritmo de Karlin & Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 2264-2268, modificado como em Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 5873-5877. Esse algoritmo é incorporado nos programas NBLAST e XBLAST de Altschul et al. (1990) T. Mol. Biol. Q15: 403-410. As pesquisas de

escore=100, wordlength=12 para obter sequências de nucleotídeos homólogas às moléculas de ácido nucleico da invenção. As pesquisas de proteína BLAST são realizadas com o programa XBLAST, escore = 50, wordlength = 3, para obter sequências de aminoácido homólogas a uma sequência de aminoácidos de referência. Para obter alinhamentos com lacunas para fins de comparação, Gapped BLAST pode ser utilizado conforme descrito em Altschul et al. (1997) Nucl: Acids Res. 25: 3389-3402. Ao utiliza os programas de BLAST, Gapped BLAST, os parâmetros padrão dos respectivos programas (por exemplo, XBLAST e NBLAST) são usados. Outros algoritmos, programas e configurações padrão também podem ser apropriados como, entre outros, o GCG-Sequence Analysis Package do Reino Unido Human Genome Mapping Project Resource Centre que inclui programas para comparações de sequência de aminoácidos ou nucleotídeo. Uma sequência pode ser pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica à outra sequência, por exemplo, a sequência da proteína NaGlu identificada aqui.

[88] O termo "derivado aviário" refere-se a uma composição ou substância produzida por ou obtida de um pássaro, aves de capoeira ou aviário. "Aviário" refere-se a aves que podem ser mantidos como animais de pecuária, incluindo, entre outros, galinhas, pato, peru, codorna e ratitas. Por exemplo, "derivado aviário" pode se referir a derivados de galinha, derivados de peru e/ou derivados de codornas.

[89] Os termos "polinucleotídeo," "oligonucleotídeo", "sequência de nucleotídeos" e "sequência de ácido nucleico" podem ser usados de modo intercambiável aqui e incluem, entre outros, sequências codificadoras, ou seja, polinucleotídeos ou sequências de ácido nucleico, que são transcritas e traduzidas em polipeptídeos *in vitro* ou *in vivo* quando colocadas sob o controle de sequências reguladoras ou de controle apropriadas; sequências controladoras, por exemplo, início de tradução e códons de parada,

poliadenilação, sítios de ligação do fator de transcrição, sequências de terminação da transcrição, domínios reguladoras a montante e a jusante, potencializadores, silenciadores, sequências de DNA para a qual uma transcrição de fator se liga e altera a atividade de um promotor de gene positivamente (indução) ou negativamente (repressão) e semelhantes. Nenhuma limitação quanto ao tamanho ou origem sintética é sugerida pelos termos aqui descritos.

[90] Conforme usado aqui, os termos "polipeptídeo" e "proteína" referem-se a um polímero de aminoácidos, por exemplo, três ou mais aminoácidos, em uma matriz serial, ligados através de ligações peptídicas. O termo "polipeptídeo" inclui proteínas, fragmentos de proteína, análogos de proteína, oligopeptídeos e semelhantes. O termo "polipeptídeos" inclui polipeptídeos conforme definido acima que são codificados pelos ácidos nucleicos, produzidos com a tecnologia recombinante (por exemplo, isolado de um pássaro transgênico), ou sintetizados. O termo "polipeptídeos" ainda contempla polipeptídeos conforme definido acima que incluem aminoácidos quimicamente modificados ou aminoácidos covalentemente ou não covalentemente ligados aos ligantes de marcação.

[91] O termo "promotor", conforme usado aqui se refere a uma sequência de DNA útil para iniciar a transcrição por uma polimerase de RNA em uma célula aviária. Um "componente de promotor" é uma sequência de DNA que pode, por si só ou em combinação com outras sequências de DNA, efetuar ou facilitar a transcrição. Componentes de promotor podem ser fragmentos funcionais dos promotores.

[92] Os termos "ácido nucleico recombinante" e "DNA recombinante" conforme usados aqui se referem a combinações de pelo menos duas sequências de ácidos nucleicos que não são encontradas naturalmente em uma célula eucarionte ou procarionte. As sequências de ácidos nucleicos podem incluir, entre outros, vetores de ácido nucleico, elementos reguladores de expressão de

quando expressas conferem resistência aos antibióticos, sequências codificadoras de proteínas e semelhantes. O termo "polipeptídeo recombinante", deve incluir um polipeptídeo produzido por técnicas de DNA recombinante de forma que é distinto de um polipeptídeo de ocorrência natural em sua localização, pureza ou estrutura. Geralmente, esse polipeptídeo recombinante estará presente em uma célula em uma quantidade diferente da normalmente observada na natureza.

[93] Conforme usado aqui, o termo sequências ou elementos "reguladores" incluem promotores, potencializadores, terminadores, códons de parada e outros elementos que podem controlar a expressão gênica.

[94] Um "retrovírus", "partícula retroviral", "partícula transdutora," ou "partícula de transdução" refere-se a um vírus de replicação defectiva ou replicação competente capaz de transduzir DNA ou RNA não viral em uma célula.

[95] Um "vetor SIN" refere-se a um vetor de autoinativação. Em particular, um vetor SIN é um vetor retroviral contendo um genoma alterado de forma que a integração no DNA genômico da célula alvo (por exemplo, células de embrião aviárias), o 5' LTR do vetor retroviral integrado não funcionará como um promotor. Por exemplo, uma parte ou o todo da sequência de nucleotídeo do vetor retroviral que resulta na região U3 do 5' LTR do vetor retroviral uma vez integrado pode ser deletada ou alterada a fim de reduzir ou eliminar a atividade de promotor do 5' LTR. Em certos exemplos, a deleção da CAAT box e/ou TAATA box de U3 de 5' LTR pode resultar em um vetor SIN, conforme é entendido na técnica.

[96] O termo "fita senso" conforme usado aqui se refere a uma molécula de DNA de fita simples do DNA genômico que pode ser transcrita em RNA e traduzida para o produto polipeptídeo natural do gene. O termo "fita antissenso" conforme usado aqui se refere à molécula de DNA de fita simples de um DNA genômico que é complementar com a fita senso do gene.

uma substância que, no todo ou em parte, torna-se uma droga. Em particular, "proteínas terapêuticas" e "proteínas farmacêuticas" incluem uma sequência de aminoácidos que, no todo ou em parte torna-se uma droga.

[98] Os termos "promotor," "sequência reguladora de transcrição" e "componente de promotor" conforme usados aqui se referem ao nucleotídeo que regula a expressão transcricional de uma sequência codificadora. Sequências reguladoras de transcrição exemplares incluem elementos potencializadores, elementos de resposta hormonal, elementos de resposta de esteroides, elementos reguladores negativos e semelhantes. A "sequência reguladora de transcrição" pode ser isolada e incorporada em um vetor para permitir transcrição regulada em células apropriada de partes do DNA vetor. A "sequência reguladora de transcrição" pode preceder, mas não apenas preceder, a região de uma sequência de ácido nucleico que está na região 5' da extremidade de uma sequência codificadora de proteína que é transcrita em mRNA. Sequência reguladora transcricional também pode ser localizada dentro de uma região codificadora de proteína, por exemplo, nas regiões de um gene que são identificadas como regiões "íntron".

[99] Os termos "transformação" e "transfecção" conforme usados aqui se referem ao processo de inserção de um ácido nucleico em um hospedeiro. Muitas técnicas são bem conhecidas para os especialistas para facilitar a transformação ou transfecção de um ácido nucleico em um organismo procarionte ou eucarionte. Esses métodos envolvem uma variedade de técnicas, como tratar as células com certas concentrações de sal, por exemplo, entre outros, sal de cálcio ou magnésio, ou expondo as células para um campo elétrico, material detergente ou lipossoma, para tornar a célula hospedeira em células competentes para a absorção das moléculas de ácido nucleico.

[100] Conforme usado aqui, um "animal transgênico" é qualquer animal não humano, como uma espécie aviária, incluindo a

nucleico heterólogo introduzido por meio de intervenção humana, como através de técnicas transgênicas conhecidas (ver, por exemplo, Publicação de Patente US 2007/0243165, publicado em 18 de outubro de 2007, cuja revelação é incorporada em sua totalidade aqui como referência) incluindo aquelas reveladas aqui. O ácido nucleico é introduzido em um animal, direta ou indiretamente pela introdução em uma célula (por exemplo, ovo ou célula de embrião), por meio de manipulação genética deliberada, como por microinjeção ou por infecção com um vírus recombinante. O termo manipulação genética não inclui cruzamentos clássico, ou fertilização *in vitro*, mas em vez disso é direcionada para a introdução de uma molécula de DNA recombinante. Esta molécula pode ser integrada dentro de um cromossoma, ou pode ser DNA de replicação extracromossomal. No animal transgênico típico, o transgene pode causar que as células expressem uma forma recombinante da proteína ou polipeptídeo alvo. Os termos "animal quimérico" ou "animal mosaico" são usados aqui para se referir a animais em que um transgene é encontrado, ou em que a sequência de nucleotídeo recombinante é expressa, em algumas, mas nem todas as células do animal. Um animal quimérico de linhagem germinativa contém um transgene em suas células germinativas e pode dar origem a uma prole de animal transgênico em que a maioria ou todas as células da prole vão conter o transgene.

[101] Conforme usado aqui, o termo "transgene" significa uma sequência de ácido nucleico (que codifica, por exemplo, uma proteína NaGlu humana) que é parcialmente ou totalmente heteróloga, ou seja, estranha para o animal ou célula em que é introduzida, ou, é total ou parcialmente homóloga a um gene endógeno do animal transgênico ou célula em que são introduzidos, mas que é projetado para ser inserido, ou é inserido no genoma animal ou da célula, de forma a alterar o genoma do organismo em que está inserido (por exemplo, está inserido em um local que difere do local do gene natural ou seus resultados de inserção em

[102] Conforme usado aqui, o termo "terapia de reposição enzimática (ERT)" refere-se a uma estratégia terapêutica para corrigir uma deficiência de enzima em um sujeito pela administração da enzima ausente para um sujeito. Para a terapia de reposição enzimática de lisossomos ser eficaz, a enzima terapêutica deve ser liberada para os lisossomos nas células apropriadas nos tecidos onde o defeito de armazenamento é manifestado. Em uma modalidade, a enzima pode ser administrada ao sujeito por via intravenosa, intratecal, intracerebral, intraventricular, ou intraparenquimal. Em uma modalidade, a enzima é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica (BBB). Sem a intenção de ser limitado pelo mecanismo, acredita-se que à medida que o sangue perfunde os tecidos do pacientes, a enzima é absorvida pelas células e transportada para o lisossomo, onde a enzima age para eliminar o material que se acumulou nos lisossomos devido à deficiência da enzima.

I. Composição da NaGlu

[103] A presente invenção fornece novas composições de NaGlu humana recombinante (rhNaGlu ou NaGlu) (sequência de aminoácidos 24-743 estabelecida na SEQ ID NO:1) contendo padrões de glicosilação que conferem uma absorção celular aumentada e uma atividade subcelular aumentada que são particularmente úteis para terapia, por exemplo, no tratamento da Síndrome de Sanfilippo B (mucopolissacaridose (MPS) IIIB).

[104] Em alguns aspectos, a composição pode ser uma mistura isolada de rhNaGlu compreendendo a sequência de aminoácidos 24-743 de SEQ ID NO:1. Em uma modalidade, a mistura contém uma quantidade suficiente de rhNaGlu contendo no mínimo uma estrutura de glicano que contém manose fosforilada (por exemplo, M6P) ou manose de forma que a rhNaGlu contendo M6P ou manose é internalizada em uma célula humana deficiente em NaGlu e restaura pelo menos 50% de atividade NaGlu observada em uma célula humana de tipo selvagem do mesmo tipo que ativamente expressa NaGlu

70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% das rhNaGlu na mistura contém pelo menos uma estrutura de glicano contendo manose fosforilada e/ou manose. Em uma modalidade, pelo menos 10% das rhNaGlu na mistura contém pelo menos uma estrutura de glicano contendo manose fosforilada e/ou manose. Em uma modalidade, pelo menos 20% das rhNaGlu na mistura contém pelo menos uma estrutura de glicano contendo manose fosforilada e/ou manose. Em uma modalidade, pelo menos 30% das rhNaGlu na mistura contém pelo menos uma estrutura de glicano contendo manose fosforilada e/ou manose. Em uma modalidade, pelo menos 30% das rhNaGlu na mistura contém pelo menos uma estrutura de glicano contendo manose fosforilada e/ou manose. Em uma modalidade, pelo menos 40% das rhNaGlu na mistura contém pelo menos uma estrutura de glicano contendo manose fosforilada e/ou manose. Em uma modalidade, pelo menos 50% das rhNaGlu na mistura contém pelo menos uma estrutura de glicano contendo manose fosforilada e/ou manose. Em uma modalidade, pelo menos 60% das rhNaGlu na mistura contém pelo menos uma estrutura de glicano contendo manose fosforilada e/ou manose.

[105] Em alguns aspectos, a NaGlu contém uma ou mais estrutura de glicano N-ligada. A NaGlu contém pelo menos uma manose fosforilada (por exemplo, M6P ou bis-M6P) que permite que a proteína seja reconhecida pelo receptor de manose-6-fosfato (M6P do receptor) e posteriormente absorvida em uma célula humana, incluindo, entre outros, um fibroblastos da pele, uma endotelial, uma célula neuronal, um hepatócito, um macrófago ou qualquer célula que expressa receptor de M6P na superfície da célula através de endocitose mediada por receptores de M6P. Em uma modalidade, a NaGlu contém pelo menos uma manose (Man). Em outra modalidade, a NaGlu contém pelo menos uma N-acetilglicosamina (GlcNAc).

[106] Em alguns aspectos, a NaGlu contém um estrutura de glicano compreendendo uma manose fosforilada (M6P). Conforme usado

inclui manose mono e bisfosforilada. Em uma modalidade, a M6P está presente em uma concentração que é cerca de 1, cerca de 2, cerca de 3, cerca de 4, cerca de 5 ou cerca de 6 moles por mole de proteína. Em uma modalidade, a NaGlu contém M6P em uma concentração que é cerca de 2, cerca de 3, cerca de 4, ou cerca de 5 moles por mole de proteína. Em uma modalidade, a NaGlu contém M6P em uma concentração que é cerca de 2 moles por mole de proteína. Em uma modalidade, a NaGlu contém M6P em uma concentração que é cerca de 3 moles por mole de proteína. Em uma modalidade, a NaGlu contém M6P em uma concentração que é cerca de 4 moles por mole de proteína. Em uma modalidade, a NaGlu contém M6P em uma concentração que é cerca de 5 moles por mole de proteína. Em uma modalidade, a NaGlu contém M6P em uma concentração que é cerca de 6 moles por mole de proteína.

[107] Em alguns aspectos, a rhNaGlu contém uma quantidade suficiente de M6P para absorção celular em uma célula humana contendo um receptor de M6P na superfície das células através de endocitose mediada por receptores de M6P. Em uma modalidade, uma quantidade suficiente de M6P para absorção em uma célula humana é cerca de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 moles por mole de proteína. A rhNaGlu pode ser internalizada em uma célula humana deficiente em NaGlu de forma que a proteína internalizada restaura totalmente (100% ou mais) um nível normal de atividade de NaGlu na célula humana deficiente em NaGlu. Em uma modalidade, a proteína rhNaGlu internalizada restaura totalmente um nível normal de atividade de NaGlu na célula humana em uma concentração que é pelo menos 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 ou 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Em uma modalidade, a proteína internalizada restaura totalmente um nível normal de atividade de NaGlu na célula humana deficiente em NaGlu em uma concentração que é pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 $\mu\text{g/mL}$. Em uma modalidade, a proteína internalizada restaura totalmente um nível normal de atividade de NaGlu na célula humana em uma concentração que é pelo menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 $\mu\text{g/mL}$.

nível de atividade de NaGlu medido em uma célula humana de tipo selvagem do mesmo tipo que expressa ativamente uma enzima NaGlu normal.

[108] Em alguns aspectos, a rhNaGlu pode ser internalizada em uma célula humana deficiente em NaGlu de forma que a proteína restaura pelo menos cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 90% ou cerca de 95% da atividade de NaGlu de uma célula humana normal do mesmo tipo. Em algumas modalidades, a rhNaGlu pode ser internalizada em uma célula humana deficiente em NaGlu de forma que a rhNaGlu internalizada fornece uma atividade enzimática maior do que a observada em uma célula humana normal do mesmo tipo. Em uma modalidade, a rhNaGlu é internalizada em uma célula humana deficiente em NaGlu de forma que a rhNaGlu internalizada fornece cerca de 2, cerca de 3, cerca de 4, cerca de 5, cerca de 6, cerca de 7, cerca de 8, cerca de 9 e cerca de 10 vezes maior atividade do que a observada em uma célula humana normal do mesmo tipo. Em uma modalidade, a rhNaGlu é internalizada em uma célula humana deficiente em NaGlu de forma que a rhNaGlu internalizada fornece cerca de 15, cerca de 20, cerca de 25, cerca de 30, cerca de 40, cerca de 50, cerca de 60, cerca de 70, cerca de 80, cerca de 90 ou cerca de 100 vezes maior atividade do que a observada em uma célula humana normal.

[109] Em uma modalidade, a célula humana deficiente em NaGlu é qualquer célula humana deficiente em NaGlu que expressa um ou mais receptores de M6P na superfície da célula. Em uma modalidade, a célula humana deficiente em NaGlu é um fibroblasto IIIB mucopolissacaridose (MPS) humano que acumula sulfato de heparan. Em uma modalidade, a célula humana deficiente em NaGlu é um hepatócito. Em uma modalidade, a célula humana deficiente em NaGlu é uma célula neuronal. Em uma modalidade, a célula humana deficiente em NaGlu é uma célula endotelial. Em uma modalidade, a célula humana deficiente em NaGlu é um macrófago.

[110] Em alguns aspectos, a absorção de rhNaGlu em uma

cerca de 3, cerca de 4, cerca de 5, cerca de 6, cerca de 7, cerca de 8, cerca de 9 ou cerca de 10 mM de monossacarídeo M6P concorrente. Em alguns aspectos, a absorção celular de rhNaGlu é inibida pela presença de cerca de 0,1, cerca de 0,2, cerca de 0,3, cerca de 0,4, cerca de 0,5, cerca de 0,6, cerca de 0,7, cerca de 0,8, cerca de 0,9 ou cerca de 1,0 mM de monossacarídeo M6P. Em uma modalidade, a absorção celular de rhNaGlu é inibida pela presença de cerca de 0,01, cerca de 0,02, cerca de 0,03, cerca de 0,04, cerca de 0,05, cerca de 0,06, cerca de 0,07, cerca de 0,08 ou cerca de 0,09 mM de monossacarídeo M6P.

[111] Em alguns aspectos, a rhNaGlu contém manose em sua estrutura de glicano em uma concentração que é cerca de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 ou 35 moles por mole de proteína. Em uma modalidade, a rhNaGlu tem manose em uma concentração que é cerca de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 moles por mole de proteína. A rhNaGlu contém manose em uma concentração que é cerca de 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 moles por mole de proteína. A rhNaGlu contém manose em uma concentração que é cerca de 24 moles por mole de proteína. A proteína rhNaGlu contém manose em uma concentração que é cerca de 25 moles por mole de proteína. A rhNaGlu contém manose em uma concentração que é cerca de 26 moles por mole de proteína. A rhNaGlu contém manose em uma concentração que é cerca de 27 moles por mole de proteína. Em uma modalidade, a rhNaGlu tem manose em uma concentração que é entre cerca de 20 e cerca de 30 moles por mole de proteína.

[112] Em alguns aspectos, a rhNaGlu compreende N-acetilglicosamina (GlcNAc). Em uma modalidade, a rhNaGlu contém GlcNAc em uma concentração que é entre cerca de 28 e cerca de 42 moles por mole de proteína. Em uma modalidade, a NaGlu tem GlcNAc em uma concentração que é entre cerca de 30 e cerca de 40 moles por mole de proteína. Em uma modalidade, a proteína NaGlu compreende GlcNAc em uma concentração que é entre cerca de 32 e

proteína NaGlu compreende GlcNAc em uma concentração que é entre cerca de 34 e cerca de 36 moles por mole de proteína. Em uma modalidade, a proteína NaGlu tem GlcNAc em uma concentração que é cerca de 35 moles por mole de proteína. Em uma modalidade, a proteína rhNaGlu contém GlcNAc em uma concentração que é cerca de 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40 moles por mole de proteína.

[113] Em alguns aspectos, a rhNaGlu contém N-acetilgalactosamina (GalNAc) e/ou galactose (Gal). A presença de GalNAc e Gal normalmente indica que a NaGlu pode conter uma ou mais estruturas de glicano O-ligada que são adicionadas à proteína no compartimento de Golgi. Nesse sentido, a presente invenção opcionalmente inclui uma composição compreendendo uma NaGlu humana recombinante que contém uma ou mais estrutura de glicano O-ligada.

[114] Em uma modalidade, a rhNaGlu contém galactose em uma concentração que é cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 moles por mole de proteína. Em uma modalidade, a rhNaGlu tem galactose em uma concentração que é cerca de 2, 3, 4, 5 ou 6 moles por mole de proteína. Em uma modalidade, a rhNaGlu tem galactose em uma concentração que é cerca de 3 moles por mole de proteína. Em uma modalidade, a rhNaGlu tem galactose em uma concentração que é cerca de 4 moles por mole de proteína.

[115] Em uma modalidade, a NaGlu compreende pelo menos uma molécula de GalNAc por mole de proteína. Em uma modalidade, a NaGlu compreende GlcNAc em uma concentração que é cerca de 1 ou 2 moles por mole de proteína.

[116] Em uma modalidade, a NaGlu não contém fucose. Ainda em outra modalidade, a NaGlu não contém glicose. Ainda em outra modalidade, rhNaGlu não contém fucose nem glicose.

[117] A presente invenção também contempla composições de proteínas rhNaGlu modificadas produzidas a partir de sequências de ácidos nucleicos modificadas de rhNaGlu. As sequências de ácidos nucleicos modificadas incluem deleções, inserções ou substituições

codifica um polinucleotídeo ou polipeptídeo funcionalmente equivalente. A proteína codificada pode também conter deleções, inserções ou substituições de resíduos de aminoácidos que produzem uma mudança silenciosa e resultam em uma proteína ou polipeptídeo funcionalmente equivalente. Substituições de aminoácido deliberadas podem ser feitas com base na semelhança de polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofiliicidade, e/ou a natureza anfipática dos resíduos enquanto a atividade biológica de NaGlu é mantida. Por exemplo, os aminoácidos carregados negativamente podem incluir ácido aspártico e ácido glutâmico; aminoácidos carregados positivamente podem incluir lisina e arginina; e aminoácidos com grupos de cabeça polares descarregados contendo valores semelhantes de hidrofiliicidade podem incluir leucina, isoleucina e valina; glicina e alanina; asparagina e glutamina; serina e treonina; fenilalanina e tirosina.

[118] Em outros aspectos, a rhNaGlu pode ser modificada de forma que a mesma contenha uma fração adicional ou segundo peptídeo. Embora proteína NaGlu não modificada possa atravessar a barreira hemato-encefálica em uma concentração sérica elevada, as modificações da proteína podem ser realizadas para aumentar a eficiência do direcionamento para o sistema de nervoso central (CNS). Em uma modalidade, ligante do receptor de transferrina (TfRL) pode ser ligado à NaGlu humana em N- ou C-terminal da proteína NaGlu. Um exemplo não limitante de TrRL é THRPPMWSPVWP (SEQ ID NO:5). Em uma modalidade, o ligante do receptor de transferrina pode ser ligado ao C-terminal da NaGlu humana da proteína NaGlu. Em outra modalidade, a NaGlu humana é fundida ao ligante do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF2R) no N- ou C-terminal da proteína NaGlu. Ainda em outra modalidade, a proteína NaGlu está fundida ao ligante do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) no N- ou C-terminal da proteína NaGlu. Em uma modalidade, a proteína NaGlu está fundida a um trecho de cinco a dez resíduos ácidos de aminoácidos

ácido aspártico (D) ou ácido glutâmico (E).

[119] Em uma modalidade, a rhNaGlu é produzida em um aviário transgênico que contém um transgene que codifica a proteína NaGlu. Em uma modalidade, a rhNaGlu é produzida em uma célula do oviduto (por exemplo, uma célula de glândula tubular) de um aviário transgênico (por exemplo, galinha (*Gallus*)). Em uma modalidade, a rhNaGlu é glicosilada na célula do oviduto (por exemplo, célula de glândula tubular) do aviário transgênico. Em uma modalidade, a rhNaGlu tem um padrão de glicosilação resultante da rhNaGlu sendo produzida em uma célula do oviduto de um aviário transgênico. Em uma modalidade, a rhNaGlu pode ser isolada e purificada a partir do conteúdo dos ovos de casca dura posto pelo aviário transgênico. Em uma modalidade, a rhNaGlu pode ser isolada e purificada a partir da clara do ovo do aviário transgênico.

[120] A presente invenção também inclui composições de uma mistura isolada de proteínas NaGlu, como uma mistura de um ou mais fragmentos e rhNaGlu inteiro (por exemplo, 24-743 estabelecido na SEQ ID NO:1). Em uma modalidade, uma parte substancial da mistura contém M6P fosforilado. Em uma modalidade, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% de rhNaGlu na mistura contém M6P. Ainda em outra modalidade, pelo menos 50% da rhNaGlu isolada na mistura contém M6P. Ainda em outra modalidade, pelo menos 60% da rhNaGlu isolada na mistura contém M6P. Ainda em outra modalidade, pelo menos 70% da rhNaGlu isolada na mistura contém M6P. Ainda em outra modalidade, pelo menos 80% da rhNaGlu isolada na mistura contém M6P. Ainda em outra modalidade, pelo menos 90% da rhNaGlu isolada na mistura contém M6P. Ainda em outra modalidade, pelo menos 95% da rhNaGlu isolada na mistura contém M6P. Ainda em outra modalidade, pelo menos 96% da rhNaGlu isolada na mistura contém M6P. Ainda em outra modalidade, pelo menos 97% da rhNaGlu isolada na mistura contém M6P. Ainda em outra modalidade, pelo menos 98% da rhNaGlu isolada na mistura contém M6P. Ainda em outra modalidade, pelo menos 99%

[121] Opcionalmente, a proteína rhNaGlu produzida a partir de um sistema de expressão aviária ou de mamífero (por exemplo, CHO, HEK293 ou linhagem celular do fibroblasto da pele humana) pode ser ainda modificada para atingir um padrão de glicosilação favorável (ou seja, uma maior quantidade de M6P) para absorção celular mantendo a atividade biológica. M6P terminal adicional pode ser introduzido para a rhNaGlu pelos métodos gerais aplicados a outras hidrolases, conforme descrito na Patente US 6.679.165, Patente US 7.138.262, ou Patente US 2009/0022702, os ensinamentos inteiros de cada um dos quais são incorporados aqui como referência. Por exemplo, um composto oligossacarídeo manopiranosil altamente fosforilado pode ser derivatizado com um composto químico que contém um grupo reativo à carbonila, seguido de oxidação da proteína rhNaGlu para gerar o grupo carbonila (aldeído) em uma estrutura de glicano da proteína, e reagindo a proteína NaGlu oxidada com o glicano com o composto oligossacarídeo manopiranosil altamente fosforilado derivatizado para formar um novo composto contendo ligação de hidrazina.

II. Vetores

[122] Métodos que são bem conhecidos para os especialistas na técnica podem ser usados para construir os vetores da expressão contendo as sequências que codificam NaGlu e elementos de controle transcricional e traducional apropriados. Esses métodos incluem técnicas de DNA recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas e recombinação genética *in vivo*. Essas técnicas são descritas, por exemplo, em Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., e Ausubel, F. M. et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y., cujos ensinamentos totais são incorporados aqui como referência.

[123] Uma variedade de sistemas de expressão de hospedeiro/vetor pode ser utilizada para expressar sequências do ácido nucleico que codificam rhNaGlu. Estes incluem, entre outros,

expressão de DNA bacteriófagos, de plasmídeo ou cosmídeo; levedura transformada com vetores de expressão de levedura; sistemas de células de inseto infectados com vetores de expressão do vírus (por exemplo, baculovirus) ou com vetores de expressão bacteriana (por exemplo, plasmídeos Ti ou pBR322); ou sistemas de cultura de células de mamíferos (por exemplo, vetor pTT22). Exemplos não limitantes do vetor pTT22 contendo cDNA de NaGlu humana fundido a uma sequência de ácido nucleico que codifica resíduo de aminoácido ácido e TfRL são mostrados nas Figs. 11 e 12.

[124] Regiões de codificação de polinucleotídeos e ácidos nucleicos da presente invenção podem ser associados com regiões adicionais de codificação que codificam peptídeos secretores ou sinal, que direcionam a secreção de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo da presente invenção. De acordo com a hipótese do sinal, as proteínas secretadas pelas células de vertebrados (por exemplo, aviário ou mamífero) têm uma sequência de peptídeo sinal ou líder secretora que é clivada a partir da proteína madura uma vez que foi iniciada a exportação da crescente cadeia de proteína através do retículo endoplasmático rugoso (ER). Os especialistas na técnica estão cientes que os polipeptídeos produzidos no ER por células de vertebrados geralmente tem um peptídeo sinal fundido ao N-terminal do polipeptídeo, o qual é clivado do polipeptídeo completo ou "inteiro" para produzir uma forma secretada ou "madura" do polipeptídeo. Em certas modalidades, o peptídeo sinal nativo, por exemplo, o MEAVAVAAAVGVLLLAGAGGAAG (1-23 da SEQ ID NO:1) peptídeo sinal de NaGlu humana é usado, ou um derivado funcional dessa sequência que mantém a capacidade de direcionar a secreção do polipeptídeo que está operacionalmente associado com o mesmo. Alternativamente, um peptídeo sinal heterólogo (por exemplo, um peptídeo sinal heterólogo de mamífero ou aviário), ou um derivado funcional do mesmo, pode ser usado. Por exemplo, a sequência líder de tipo selvagem pode ser substituída com a sequência líder de, por

glicuronidase de camundongo.

[125] Os elementos de controle ou sequências reguladoras podem incluir as regiões não traduzidas dos potencializadores de vetor, promotores, regiões não traduzidas 5' e 3' que interagem com proteínas celulares do hospedeiro para realizar a transcrição e tradução. Esses elementos podem variar em sua força e especificidade. Dependendo do sistema de vetor e célula hospedeira utilizada, qualquer número de elementos de tradução e transcrição apropriados podem ser usados. Por exemplo, quando é clonado em sistemas bacterianos, promotores induzíveis como o promotor lac-Z híbrido do fagomídeo Bluescript™ (Stratagene, LaJolla, California) ou plasmídeo pSport1™ (Gibco BRL) e semelhantes podem ser usados. Em sistemas de células de mamíferos, os promotores de genes de mamíferos ou de vírus de mamíferos são preferenciais. Se for necessário gerar uma linhagem de células que contém várias cópias da sequência que codifica NaGlu, vetores baseados em SV40 ou EBV podem ser usados também com um marcador apropriado selecionável como puromicina e ampicilina (ver, por exemplo, as Figs. 11 e 12).

[126] Quando a rhNaGlu é produzida em um aviário transgênico, a presente invenção contempla que a sequência de rhNaGlu seja posicionada a jusante de um promotor de forma que a sequência que codifica a rhNaGlu possa ser expressa de forma específica para tecido em um aviário transgênico. Por exemplo, o promotor pode ser um promotor específico de oviduto que é amplamente, mas não inteiramente, específico para o magno, como o promotor específico de oviduto, incluindo, entre outros, promotores de ovalbumina, lisozima, conalbumina, ovomucoide, ovomucoide, ovomucina e ovotransferrina. Em uma modalidade, o promotor é um promotor de ovalbumina, um promotor de lisozima, um promotor de conalbumina, um promotor ovomucoide, um promotor de ovomucina e/ou um promotor de ovotransferrina ou qualquer parte funcional dos mesmos.

[127] Alternativamente, um promotor constitutivo pode ser

um aviário. Neste caso, a expressão não é limitada para o magno; a expressão também ocorre em outros tecidos dentro do aviário (por exemplo, sangue). O uso desse transgene, que inclui um promotor constitutivo e a sequência codificadora de NaGlu, também é apropriado para efetuar ou direcionar a expressão de uma proteína no oviduto e a subsequente secreção da proteína dentro do óvulo. Em uma modalidade, o promotor constitutivo pode ser, por exemplo, um promotor de citomegalovírus (CMV), um promotor de vírus de sarcoma de Rous (RSV), um promotor de vírus de leucemia murina (MLV) e promotor de β -actina. Em uma modalidade, o promotor é um promotor de CMV, um promotor de MDOT, um promotor de RSV, um promotor de MLV ou um promotor de vírus de tumor mamário de camundongo (MMTV) de qualquer parte funcional dos mesmos.

[128] A invenção também contempla qualquer fragmento ou componente útil dos promotores aqui descritos. O promotor pode ser pelo menos um segmento, fragmento ou componente de uma região promotora, como um segmento da região promotora de ovalbumina, lisozima, conalbumina, ovomucoide, ovomucina, ovotransferrina, CMV, RSV ou MLV. Em uma modalidade preferencial, o promotor é um segmento da região promotora específica de oviduto que contém elementos essenciais para a expressão direta da sequência codificadora nas células da glândula tubular. Por exemplo, incluídos no escopo da presente invenção estão um segmento, parte ou fragmento de um promotor específico de oviduto e/ou condensado dos elementos reguladores críticos do promotor específico de oviduto para que mantenha as sequências necessárias para expressão em células da glândula tubular do magno do oviduto. Em uma modalidade, um segmento da região promotora de ovalbumina é usado. Este segmento compreende a região de flanqueamento 5' do gene da ovalbumina.

[129] Um vetor que contém a sequência codificadora para NaGlu humana pode ser usado para transferir células da blastoderme de uma célula aviária ou de mamífero para gerar integrações

de células de mamífero ou aviário transgênico de linhagem germinativa. Um exemplo não limitante desse vetor é mostrado nas Figs. 4A-D e 5. No sistema de expressão de aviário, a sequência codificadora de NaGlu humana é operacionalmente ligada a um promotor em uma relação posicional para expressar a sequência codificadora em um aviário transgênico, particularmente na célula de glândula tubular do magno do oviduto aviário, de forma que a proteína NaGlu humana recombinante é expressa e depositada na clara do ovo de um ovo de casca dura posto pelo aviário transgênico. Vetores e métodos apropriados adicionais para preparar vetores para expressar rhNaGlu em um sistema aviário também são revelados na Patente US 6.730.822; Patente US 6.825.396; Patente US 6.875.588; Patente US 7.294.507; Patente US 7.521.591; Patente US 7.534.929; Publicação U.S. No. 2008/0064862A1; e Publicação de Patente US2006/0185024, cujos ensinamentos são incorporados aqui como referência. Exemplos não limitantes de outros promotores que também podem ser úteis na presente invenção incluem promotores Pol III (por exemplo, promotores tipo 1, tipo 2 e tipo 3 Pol III) como promotores H1, promotores U6, promotores de tRNA, promotores de RNase MPR e partes funcionais de cada um desses promotores. Normalmente, sequências de terminação funcionais são selecionadas para uso na presente invenção em conformidade com o promotor que é empregado.

[130] Em uma modalidade, o vetor é um vetor retroviral, em que a sequência codificadora e o promotor são ambos posicionados entre os LTRs 5' e 3' do vetor retroviral. Em uma modalidade útil, os LTRs ou vetor retroviral são derivados de um vírus de leucose aviária (ALV), um vírus de leucemia murina (MLV) ou um lentivirus. Um retrovírus útil para introduzir aleatoriamente um transgene no genoma do aviário é o ALV deficiente de replicação, o MLV deficiente de replicação ou o lentivirus deficiente de replicação.

[131] A presente invenção também contempla o uso de vetores de autoinativação (SIN). Vetores SIN podem ser úteis para

aviário transgênico. Este efeito pode ser ainda potencializado o vetor SIN não contém qualquer cassete marcador selecionável com um promotor funcional (vetor negativo SIN/SC). Em uma modalidade, um vetor SIN é um vetor retroviral contendo genoma alterado de forma que o 5' LTR do vetor retroviral integrado não funciona como um promotor. Em uma modalidade exemplar, uma parte ou o todo da sequência de nucleotídeo do vetor retroviral que resulta na região U3 do 5' LTR do vetor retroviral uma vez integrado pode ser deletada ou alterada a fim de reduzir ou eliminar a atividade de promotor do 5' LTR. Um exemplo não limitante do vetor SIN que contém uma região promotora de ovalbumina fundida à sequência codificadora de rhNaGlu humana é mostrado nas Figs. 4A-D e 5. Componentes funcionais do vetor também estão tabuladas na Tabela 1.

Tabela 1. Componentes funcionais em pSIN-OV-1.1kb-I-rhNaGlu

Componentes funcionais	Sequência de Nucleotídeo na SEQ ID NO:4
sítio poli A	634-639
gag parcial	692-945
LTR (RAV2)	1243-1588
LTR parcial (RAV2)	4691-4863
ALV CTE	4899-4986
Promotor de Ovalbumina 1,1 kb	5232-6363
DHS II	5334-5714
DHS I	6064-6364
Éxon L	6364-6410
Íntron 1	6411-7999
NaGlu	8017-10248

[132] Qualquer um dos vetores aqui descritos pode incluir uma sequência que codifica um peptídeo sinal que direciona a secreção da proteína expressa pela sequência codificadora do vetor a partir de, por exemplo, as células da glândula tubular do oviduto de um aviário. Onde uma proteína NaGlu humana recombinante não seria de outra forma secretada, o vetor contendo a sequência codificadora é modificado para compreender uma sequência de DNA compreendendo cerca de 60 bp que codifica um peptídeo sinal de,

peptídeo sinal é inserida no vetor de forma que está localizada no N-terminal da proteína rhNaGlu codificada pelo DNA.

[133] Além disso, as sequências codificadoras de vetores usados em qualquer um dos métodos da presente invenção podem ser fornecidas com uma região 3' não traduzida (3' UTR) para conferir estabilidade ao RNA produzido. Quando uma 3' UTR é adicionada a um vetor retroviral, a orientação do promotor, a sequência codificadora e a 3' UTR é preferencialmente invertida em relação à direção da 3' UTR, de forma que a adição da 3' UTR não interfira com a transcrição do RNA genômico inteiro. Em uma modalidade, a 3' UTR pode ser a do gene de ovalbumina, gene de lisozima ou qualquer 3' UTR que é funcional em uma célula do magno, ou seja, a região tardia SV40.

III. Aviários transgênicos

[134] Os transgenes aqui descritos podem ser introduzidos em células de blastoderme embrionário aviário para produzir uma galinha transgênico, peru transgênico, codorna transgênico e outras espécies aviárias que carregam o transgene que codifica NaGlu humana recombinante no genoma de seu tecido de linhagem germinativa. Em um aspecto da invenção, um aviário transgênico que produz rhNaGlu é criado por transdução de células embrionárias de blastoderme com partículas retrovirais defectivos de replicação ou competentes de replicação carregando o transgene entre as 5' e 3' LTRs do vetor retroviral. Por exemplo, um vetor retroviral do vírus da leucose aviária (ALV) ou um vetor retroviral do vírus da leucemia murina (MLV) podem ser usados. Uma cópia de RNA do vetor retroviral modificado empacotado em partículas virais pode ser usada para infectar blastodermes embrionários que se desenvolvem em aviários transgênicos.

[135] Pelos métodos da presente invenção, transgenes podem ser introduzidos em células embrionárias de blastoderme de várias espécies aviárias. Por exemplo, os métodos podem ser aplicados para produzir uma galinha transgênico, peru transgênico, codorna

carregam o transgene no genoma de seu tecido de linhagem germinativa para produzir proteínas da invenção. As células de blastoderme normalmente são células de fase VII-XII, conforme definido por Eyal-Giladi and Kochav (1976) ou equivalente dos mesmos. Em uma modalidade preferencial, as células de blastoderme estão na ou perto da fase X.

[136] Em um método de transfectar células de blastoderme, um vetor baseado em retrovírus empacotado pode ser usado para liberar o vetor em células embrionárias de blastoderme para que o vetor seja integrado no genoma do aviário. Essas partículas virais (ou seja, as partículas de transdução) são produzidas para o vetor e tituladas para determinar a concentração apropriada que pode ser usada para injetar os embriões. Em uma modalidade, os ovos aviários estão em janelas de acordo com o procedimento descrito na Patente US 5.897.998, cuja divulgação é incorporada aqui como referência em sua totalidade, e os ovos são injetados com partículas transdutoras na ou perto da fase X.

[137] Os aviários transgênicos da invenção que produzem rhNaGlu são desenvolvidos a partir das células de blastoderme nas quais o vetor foi introduzido. O embrião resultante se desenvolve e o filhote amadurece. Nesta fase, o aviário transgênico produzido a partir de células de blastoderme é conhecido como fundador e é quimérico com relação às células que carregam o transgene e é chamado de G0. Os aviários fundadores G0 são normalmente quiméricos para cada transgene inserido. Ou seja, apenas algumas das células do pássaro transgênico G0 contém o transgene. Alguns fundadores carregam o transgene em células da glândula tubular no magno de seus ovidutos. Estes aviários expressam a proteína rhNaGlu codificada pelo transgene em seus ovidutos. A proteína NaGlu também pode ser expressa em outros tecidos (por exemplo, sangue), além do oviduto. Alguns fundadores são fundadores de linhagem germinativa que carregam o transgene no genoma dos tecidos de linhagem germinativa e também podem carregar o

expressam a proteína exógena.

[138] O aviário transgênico pode carregar o transgene em sua linhagem germinativa fornecendo transmissão do transgene exógeno para a prole aviária estável de forma mendeliana. A geração G0 é normalmente hemizigoto para o transgene que codifica rhNaGlu. A geração G0 pode ser criada para animais não transgênicos para dar origem à prole transgênica G1 que também é hemizigota para o transgene e contém o transgene em essencialmente todas as células da ave. A prole hemizigota G1 pode ser criada para animais não transgênicos dando origem à prole hemizigota G2 ou pode ser criada juntamente para dar origem à prole homozigota G2 para o transgene. Substancialmente todas as células de aviários que são positivos para o transgene que são derivadas da prole G1 contêm o transgene. Em uma modalidade, a prole hemizigota G2 da mesma linha pode ser criada para produzir a prole homozigota G3 para o transgene. Em outra modalidade, animais hemizigotos G0 ou G1, por exemplo, são criados juntos para dar origem à prole G1 homozigota contendo duas cópias dos transgenes em cada célula do animal. Estes são apenas exemplos de certos métodos de reprodução úteis e a presente invenção contempla o emprego de qualquer método de reprodução útil como aqueles conhecidos por especialistas na técnica.

IV. Produção de rhNaGlu

[139] A rhNaGlu pode ser produzida usando um aviário transgênico que contém no genoma um transgene que codifica rhNaGlu. Em uma modalidade, o aviário transgênico é uma galinha, codorna, pato ou peru de linhagem germinativa transgênica. Em uma modalidade particularmente útil, a invenção é projetada para produzir NaGlu que pode ser produzida no oviduto de uma galinha.

[140] A produção de rhNaGlu com ou sem modificação no sistema aviário (por exemplo, no oviduto aviário) está dentro do escopo da invenção. Em uma modalidade, a rhNaGlu não modificada compreende a sequência de aminoácido de tipo selvagem (24-743 da

permite a eficiente absorção pelas células humanas. Em outra modalidade, a proteína modificada pode ser uma proteína de fusão de rhNaGlu contendo um padrão de glicosilação (ou seja, M6P) que permite a eficiente absorção pelas células humanas.

[141] Um vetor aviário apropriado que contém uma sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína NaGlu operacionalmente ligada a um promotor específico de tecido ou constitutivo que direciona a expressão da sequência codificadora no oviduto da galinha é introduzido em células embrionárias de galinha na ou perto da fase X conforme descrito aqui. As células embrionárias transformadas são incubadas sob condições que contribuem para incubação dos filhotes vivos. Os filhotes vivos são nutridos em galinhas quiméricas maduras que são acasaladas com um frango não transgênico naturalmente ou através de inseminação artificial. Um frango transgênico é identificado pela triagem da progênie para incorporação da linhagem germinativa da sequência codificadora de proteína. A progênie transgênica pode ser acasalada com outro frango transgênico ou não transgênico para produzir uma galinha transgênica totalmente de linhagem germinativa que põe ovos.

[142] A rhNaGlu pode ser produzida de forma específica de tecido. Por exemplo, a rhNaGlu pode ser expressa no oviduto, sangue e/ou outras células ou tecidos do aviário transgênico. Em uma modalidade, a NaGlu é expressa nas células da glândula tubular do magno do oviduto do aviário transgênico, secretado para o lúmen do oviduto e depositado na clara do ovo. Em uma modalidade, a clara do ovo contendo rhNaGlu é coletada e armazenada a granel em uma temperatura que varia de 4°C a -20°C. A NaGlu é, então, isolada e purificado a partir do conteúdo dos ovos usando vários métodos conhecidos na técnica.

[143] Um aspecto da presente invenção refere-se aos ovos de casca dura aviários (por exemplo, ovos de casca dura de galinha) que contêm a proteína rhNaGlu. A rhNaGlu produzida e secretada pelo aviário transgênico é glicosilada de forma

pode estar presente em qualquer quantidade útil. Em uma modalidade, a proteína está presente em uma quantidade em um intervalo de entre cerca de 0,01 µg por ovo de casca dura e cerca de 1 grama por ovo de casca dura. Em outra modalidade, a proteína está presente em uma quantidade em um intervalo de entre cerca de 1 µg por ovo de casca dura e cerca de 1 grama por ovo de casca dura. Por exemplo, a proteína pode estar presentes em uma quantidade em um intervalo de entre cerca de 10 µg por ovo de casca dura e cerca de 1 grama por ovo de casca dura (por exemplo, um intervalo de entre cerca de 10 µg por ovo de casca dura e cerca de 400 miligramas por ovo de casca dura).

[144] Em uma modalidade, a rhNaGlu está presente na clara do ovo. Em uma modalidade, a rhNaGlu está presente em quantidade em um intervalo de entre cerca de 1 ng por mililitro de clara do ovo e cerca de 0,2 grama por mililitro de clara do ovo. Por exemplo, a rhNaGlu pode estar presente em quantidade em um intervalo de entre cerca de 0,1 µg por mililitro de clara do ovo e cerca de 0,2 grama por mililitro de clara do ovo (por exemplo, a rhNaGlu pode estar presente em quantidade em um intervalo de entre cerca de 1 µg por mililitro de clara do ovo e cerca de 100 miligramas por mililitro de clara do ovo. Em uma modalidade, a rhNaGlu está presente em quantidade em um intervalo de entre cerca de 1 µg por mililitro de clara do ovo e cerca de 50 miligramas por mililitro de clara do ovo. Por exemplo, a rhNaGlu pode estar presente em quantidade em um intervalo de cerca de 1 µg por mililitro de clara do ovo e cerca de 10 miligramas por mililitro de clara do ovo (por exemplo, a rhNaGlu pode estar presente em uma quantidade em um intervalo de cerca de 1 µg por mililitro de clara do ovo e cerca de 1 miligrama por mililitro de clara do ovo). Em uma modalidade, a rhNaGlu está presente em uma quantidade de mais de 0,1 µg por mililitro de clara do ovo. Em uma modalidade, a rhNaGlu está presente em uma quantidade de mais de 0,5 µg por mililitro de clara do ovo. Em uma modalidade, a rhNaGlu está

do ovo. Em uma modalidade, a proteína está presente em uma quantidade de mais de 1,5 µg por mililitro de clara do ovo. Em uma modalidade, a rhNaGlu está presente em uma quantidade de mais de 0,5 µg por mililitro de clara do ovo. Em uma modalidade, a proteína está presente em uma quantidade de mais de 0,1 µg por mililitro de clara do ovo.

[145] Em uma modalidade, a rhNaGlu está presente em uma quantidade de 20 mg/L, 30mg/L, 40mg/L, 50 mg/L, 60 mg/L, 70 mg/L, 80 mg/L, 90 mg/L, 100 mg/L, 120 mg/L, 130 mg/L, 140 mg/L, 150 mg/L, 160 mg/L, 170 mg/L, 200 mg/L, 300mg/L, 400 mg/L, 500 mg/L, 600 mg/L, 700 mg/L, 800 mg/L, 900 mg/L, ou 1.000 mg/L de clara do ovo. Em uma modalidade, a rhNaGlu está presente em uma quantidade de cerca de 100 mg/L de clara do ovo. Em uma modalidade, a rhNaGlu está presente em uma quantidade de cerca de 200 mg/L de clara do ovo.

V. Células Hospedeiras

[146] A presente invenção também contempla rhNaGlu produzida em qualquer sistema de expressão de proteína útil, incluindo, entre outros, cultura de células (por exemplo, células aviária, células CHO, células HEK293 e células COS), leveduras, bactérias e plantas.

[147] Uma cepa de célula hospedeira pode ser escolhida por sua capacidade de modular a expressão das sequências inseridas ou para processar a NaGlu expressa da forma desejada. Essas modificações do polipeptídeo de NaGlu incluem, entre outras, glicosilação, fosforilação ou lipidação. Células hospedeiras diferentes como CHO, COS, HeLa, MDCK, HEK293 e W138, que têm maquinaria celular específica e mecanismos característicos para essas atividades pós-traducionais, podem ser escolhidas para garantir a correta modificação e processamento da proteína de fusão da presente invenção. Uma linhagem de células de tumor aviário também é contemplada como uma célula hospedeira para expressar o polipeptídeo da presente invenção. Exemplos de

célula tumoral do oviduto aviário) são descritos em na Publicação de Patente US 2009/0253176, cujos ensinamentos completos são incorporados aqui como referência.

VI. Composições Farmacêuticas

[148] A presente invenção também apresenta composições farmacêuticas compreendendo rhNaGlu isolada e substancialmente purificada ou um sal farmaceuticamente aceitável da mesma.

[149] As proteínas NaGlu humanas recombinantes podem ser administradas usando um ou mais carreadores, por exemplo, como parte de uma formulação farmacêutica, ou sem carreador. Os carreadores devem ser "aceitáveis", no sentido de serem compatíveis com os outros ingredientes da formulação e não prejudiciais ao destinatário dos mesmos. Composições compreendendo esses carreadores, incluindo moléculas compostas, são formuladas pelos métodos convencionais conhecidos (ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 14th Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa.), cujos ensinamentos completos são incorporados aqui como referência. O carreador pode incluir um diluente. Em uma modalidade, o carreador farmacêutico pode ser um líquido e a proteína pode ser sob a forma de uma solução. O carreador farmacêutico pode ser cera, gordura ou álcool. Em outra modalidade, o carreador farmaceuticamente aceitável pode ser um sólido na forma de um pó, um pó liofilizado ou um comprimido. Em uma modalidade, o carreador pode compreender um lipossoma ou uma microcápsula.

[150] Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica compreendendo proteína NaGlu humana recombinante ainda compreende um tampão. Tampões exemplares incluem tampões de acetato, fosfato, citrato e glutamato. Tampões exemplares também incluem citrato de lítio, citrato de sódio, citrato de potássio, citrato de cálcio, lactato de lítio, lactato de sódio, lactato de potássio, lactato de cálcio, fosfato de lítio, fosfato de sódio, fosfato de potássio, fosfato de cálcio, maleato de lítio, maleato de sódio,

tartarato de sódio, tartarato de potássio, tartarato de cálcio, succinato de lítio, succinato de sódio, succinato de potássio, succinato de cálcio, acetato de lítio, acetato de sódio, acetato de potássio, acetato de cálcio e misturas dos mesmos. Em algumas modalidades, o tampão é citrato trissódico dihidratado. Em algumas modalidades, o tampão é ácido cítrico mono-hidratado. Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica compreende citrato trissódico desidratado e ácido cítrico dihidratado.

[151] Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica compreendendo a proteína NaGlu humana recombinante ainda compreende um estabilizador. Estabilizadores exemplares incluem albumina, trealose, açúcares, aminoácidos, polióis, ciclodextrinas, sais como cloreto de sódio, cloreto de magnésio e cloreto de cálcio, lioprotetores e misturas dos mesmos. Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica compreende albumina de soro humano.

[152] Em algumas modalidades, é aconselhável adicionar um surfactante à composição farmacêutica. Surfactantes exemplares incluem surfactantes não iônicos como Polissorbatos (por exemplo, Polissorbatos 20 ou 80); poloxâmeros (por exemplo, Poloxâmero 188); Triton; sulfato dodecil de sódio (SDS); sulfato lauril de sódio; glicosídeo octil de sódio; lauril, miristil, linoleil ou estearilsulfobetaina; lauril, miristil, linoleil ou estearilsarcosina; linoleil, miristil ou cetilbetaina; lauroamidopropil, cocamidopropil, linoleamidopropil, miristamidopropil, palmidopropil ou isoestearamidopropilbetaina (por exemplo, lauroamidopropil); miristamidopropil, palmidopropil ou isoestearamidopropildimetilamina; sódio metil cocoil ou dissódio metil ofeitaurato; e a série MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.), polietileno glicol, polipropil glicol e copolímeros de etileno e propileno glicol (por exemplo, Pluronic, PF68, etc.). Normalmente, a quantidade de surfactante adicionada é tal que reduz a agregação da proteína e minimiza a formação de

estar presente em uma formulação em uma concentração de cerca de 0,001 - 0,5% (por exemplo, cerca de 0,005 - 0,05%, ou 0,005 - 0,01%). Em particular, um surfactante pode estar presente em uma formulação em uma concentração de aproximadamente 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, ou 0,5%, etc. Intervalos e valores intermediários aos intervalos e valores acima recitados também estão previstos para ser parte da invenção.

[153] Em algumas modalidades, composições farmacêuticas apropriadas da invenção podem ainda incluir um ou mais agentes de volume, em particular, para formulações liofilizadas. Um "agente de volume" é um composto que adiciona a massa à mistura liofilizada e contribui para a estrutura física do bolo liofilizado. Por exemplo, um agente de volume pode melhorar a aparência do bolo liofilizado (por exemplo, bolo liofilizado essencialmente uniforme). Agentes de volume apropriados incluem, entre outros, cloreto de sódio, lactose, manitol, glicina, sacarose, trealose, hidroxietil amido. Concentrações exemplares de agentes de volume são de cerca de 1% a cerca de 10% (por exemplo, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0%, 8,5%, 9,0%, 9,5% e 10,0%). Intervalos e valores intermediários aos intervalos e valores acima recitados também estão previstos para ser parte da invenção. As composições farmacêuticas podem ser na forma de um pó liofilizado estéril para injeção após reconstituição com um diluente. O diluente pode ser água para injeção, água bacteriostática para injeção ou solução salina estéril. O pó liofilizado pode ser produzido por liofilização de uma solução da proteína de fusão para produzir a proteína na forma seca. Conforme é conhecido na técnica, a proteína liofilizada em geral possui estabilidade aumentada e uma vida útil mais longa do que uma solução líquida da proteína.

[154] Formulações farmacêuticas incluem aquelas apropriados para administração oral, retal, nasal, tópica (incluindo bucal e sublingual), parenteral ou vaginal.

incluem aquelas apropriadas para administração por injeção incluindo administração intratecal, intraparenquimal intracerebral, intraventricular, intramuscular, subcutânea e venosa. Em uma modalidade, as formulações da invenção são apropriadas para administração intravenosa. Em outra modalidade, as formulações da invenção são apropriadas para administração intratecal. As formulações farmacêuticas da invenção também incluem aquelas apropriadas para administração por inalação ou insuflação. As formulações podem, eventualmente, ser convenientemente apresentadas em unidades farmacêuticas discretas e podem ser preparadas por qualquer um dos métodos conhecidos na técnica de farmácia. Os métodos de produção de formulações farmacêuticas normalmente incluem a etapa colocar as proteínas terapêuticas em associação com os carreadores líquidos ou carreadores sólidos finamente divididos ou ambos e em seguida, se necessário, transformar o produto na formulação desejada.

[155] A proteína NaGlu humana recombinante da invenção também pode ser formulada para administração parenteral (por exemplo, por injeção, por exemplo injeção em bolus ou infusão contínua) e pode ser apresentada na forma de dose farmacêutica em ampolas, seringas pré-cheias, infusão de volume pequeno ou em recipientes de doses múltiplas com um conservante adicionado. As proteínas terapêuticas podem ser injetadas por, por exemplo, injeções subcutâneas, injeções intramusculares, injeções intratecais, injeções intracerebrais, injeções intraparenquimais, injeções intraventriculares e injeções ou infusões intravenosas (IV).

[156] Em uma modalidade, a proteína NaGlu humana recombinante é administrada por via intravenosa por infusão IV por qualquer método útil. Em um exemplo, a proteína NaGlu humana recombinante pode ser administrada por infusão intravenosa através de uma linha periférica. Em outro exemplo, a proteína NaGlu humana recombinante pode ser administrada por infusão intravenosa através

a proteína NaGlu humana recombinante pode ser administrada por infusão intravenosa, facilitada por uma máquina de infusão ambulatorial conectada a uma porta de acesso vascular venoso. Em uma modalidade de infusão intravenosa, a medicação é administrada por um período de 1 a 8 horas dependendo da quantidade de medicamento a ser infundido e histórico do paciente relacionado com reação de infusão anterior, conforme determinado por um médico especialista na técnica. Em outra modalidade, a proteína NaGlu humana recombinante é administrada por via intravenosa por injeção IV. Em outra modalidade, a proteína NaGlu humana recombinante pode ser administrada através de injeção intraperitoneal ou intratecal.

[157] Em algumas modalidades, as proteínas terapêuticas são administradas por infusão, e a infusão pode ocorrer durante um período de tempo prolongado, por exemplo, 30 minutos a 10 horas. Assim, a infusão pode ocorrer, por exemplo, durante um período de cerca de 1 hora, a cerca de 2 horas, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas ou cerca de 5 horas. A infusão também pode ocorrer em várias taxas. Assim, por exemplo, a taxa de infusão pode ser cerca de 1 mL por hora a cerca de 20 mL por hora. Em algumas modalidades, a taxa de infusão é 5 mL a 10 mL por hora. Em uma modalidade, a taxa de infusão é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 mL por hora. Em uma modalidade, a taxa de infusão é de 0,1 a 5 mg/kg/hr. Em uma modalidade, a taxa de infusão é de cerca de 0,1, cerca de 0,2, cerca de 0,3, cerca de 0,5, cerca de 1,0, cerca de 1,5, cerca de 2,0 ou cerca de 3 mg/kg/hr. Intervalos e valores intermediários aos intervalos e valores acima recitados também estão previstos para ser parte da invenção.

[158] As proteínas terapêuticas podem tomar formas como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e podem conter agentes de formulação como agentes de suspensão, estabilização e/ou dispersão. A proteína NaGlu humana recombinante pode ser em forma de pó, obtida por isolamento asséptico de sólido

veículo apropriado, por exemplo, água estéril, apirógena, antes do uso.

[159] Formulações em conformidade com a presente invenção podem ser avaliadas com base na análise de qualidade de produto, tempo de reconstituição (se liofilizadas), qualidade de reconstituição (se liofilizadas), alto peso molecular, umidade e temperatura de transição vítrea. Normalmente, a análise de produtos e qualidade de proteína inclui análise da taxa de degradação de produtos usando métodos, incluindo, entre outros, HPLC de exclusão de tamanho (SE-HPLC), HPLC de troca de cátion (CEX-HPLC), difração de raios X (XRD) calorimetria de varredura diferencial modulada (mDSC), HPLC de fase reversa (RP-HPLC), espalhamento de luz multi-ângulo (MALS), fluorescência, absorção ultravioleta, nefelometria, eletroforese capilar (CE), SDS-PAGE e combinações das mesmas. Em algumas modalidades, a avaliação do produto em conformidade com a presente invenção pode incluir uma etapa de avaliação da aparência (aparência de bolo ou líquida).

[160] Geralmente, as formulações (liofilizadas ou em solução aquosas) podem ser armazenadas por longos períodos de tempo em temperatura ambiente. A temperatura de armazenamento normalmente pode variar de 0°C a 45°C (por exemplo, 4°C, 20°C, 25°C ou 45°C). As formulações podem ser armazenadas por um período de meses a um período de anos. O tempo de armazenamento geralmente será de 24 meses, 12 meses, 6 meses, 4,5 meses, 3 meses, 2 meses ou 1 mês. As formulações podem ser armazenadas diretamente no recipiente usado para administração, eliminando etapas de transferência. Intervalos e valores intermediários aos intervalos e valores acima recitados também estão previstos para ser parte da invenção.

[161] As formulações podem ser armazenadas diretamente no recipiente de liofilização (se liofilizado), o que também pode funcionar como frasco de reconstituição, eliminando etapas de transferência. Alternativamente, formulações de produto

armazenamento. O armazenamento em geral deve evitar circunstâncias que levam à degradação das proteínas, incluindo, entre outros, a exposição à luz solar, radiação UV, outras formas de radiação eletromagnética, calor ou frio excessivo, choque térmico rápido e choques mecânicos. As composições farmacêuticas de acordo com a invenção também podem conter outros ingredientes ativos como agentes imunossupressores, agentes antimicrobianos ou conservantes, discutidos em mais detalhes abaixo.

VII. Métodos de Tratamento

[162] A presente invenção também fornece métodos de tratamento de doenças associadas com NaGlu, por exemplo, Síndrome de Sanfilippo B. NaGlu recombinante empregada em conformidade com a invenção inclui NaGlu recombinante que pode ser produzida em qualquer sistema de expressão de proteínas útil incluindo, entre outros, cultura de célula (por exemplo, células CHO, células COS), bactérias como *E. coli*, animais transgênicos como mamíferos e aves (por exemplo, galinhas, patos e peru) e sistemas de planta (por exemplo, plantas daninhas de tabaco e pato). Em uma modalidade, a NaGlu recombinante é produzida em um animal transgênico, como um aviário.

[163] Em uma modalidade, o método compreende a administração ao sujeito de uma proteína NaGlu humana recombinante (rhNaGlu), por exemplo, uma proteína NaGlu humana recombinante contendo uma quantidade suficiente de oligossacarídeos (por exemplo, manose e manose fosforilada (ou seja, M6P)), em uma quantidade suficiente para tratar (por exemplo, reduzir, amenizar) ou impedir que um ou mais sintomas da deficiência de NaGlu ou doença associada à NaGlu. A proteína NaGlu humana recombinante pode ser administrada terapeuticamente ou profilaticamente, ou ambos. A proteína NaGlu humana recombinante (rhNaGlu) pode ser administrada ao sujeito, sozinha ou em combinação com outras modalidades terapêuticas conforme descrito aqui.

[164] Os termos "tratar", "tratando" e "tratamento"

ou sintoma, impedindo um sintoma adicional, atenuando ou impedindo uma causa subjacente de um sintoma, inibindo uma doença ou condição, detendo o desenvolvimento de uma doença ou condição, aliviando uma doença ou condição, causando regressão de uma doença ou condição, aliviando uma condição causada pela doença ou condição, ou parando um sintoma da doença ou condição profilaticamente e/ou após o sintoma ocorrer.

[165] "Dose terapeuticamente eficaz" conforme usado aqui se refere à dose (por exemplo, quantidade e/ou intervalo) de droga necessária para produzir uma resposta terapêutica pretendida (por exemplo, redução dos níveis de sulfato de heparan e/ou aumento da atividade de NaGlu em um tecido-alvo). Uma dose terapeuticamente eficaz refere-se a uma dose que, em comparação com um sujeito correspondente que não recebeu essa dose, resulta em tratamento melhorado, cura, prevenção ou melhora de uma doença, distúrbio, ou efeito colateral ou uma diminuição da taxa da ocorrência ou avanço de uma doença ou distúrbio. O termo também inclui no seu escopo, doses eficazes para melhorar as funções fisiológicas.

[166] Conforme usado aqui, o termo "sujeito" ou "paciente" destina-se a incluir os animais humanos e não humanos. Os animais não humanos incluem todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos e não mamíferos, como primatas não humanos, ovelhas, cães, gatos, vacas, cavalos, galinhas, anfíbios e répteis. Sujeitos preferenciais incluem seres humanos contendo uma deficiência de NaGlu ou doença associada à NaGlu.

[167] Conforme usado aqui, uma "doença associada à NaGlu" é uma doença ou condição que é mediada pela atividade de NaGlu ou está associada à expressão anormal ou atividade de NaGlu. Um exemplo de uma doença associada à NaGlu inclui, entre outras, deficiência de NaGlu como Síndrome de Sanfilippo B (também conhecida como mucopolissacaridose tipo IIIB).

[168] Os métodos terapêuticos da presente invenção incluem qualquer via de administração que facilita a absorção ou

órgãos pertinentes. Em uma modalidade, os métodos da invenção incluem liberação da proteína NaGlu humana recombinantes da invenção para o CNS (sistema nervoso central), rim, ou fígado de um sujeito para o tratamento de uma doença associada à NaGlu (por exemplo, deficiência de NaGlu). Por exemplo, a proteína NaGlu humana recombinante pode ser administrada ao paciente por via intravenosa (por exemplo, através de injeção intravenosa ou infusão intravenosa) e surpreendentemente, atravessa a barreira hemato-encefálica (BBB) do sujeito contendo deficiência de NaGlu. Em outra modalidade da invenção, a proteína NaGlu humana recombinante é administrada para o paciente por via intratecal.

A. Dispositivo para Liberação Intratecal

[169] Vários dispositivos podem ser usados para liberação intratecal de acordo com a presente invenção. Em algumas modalidades, um dispositivo para administração intratecal contém uma porta de acesso ao fluido (por exemplo, porta injetável); um corpo oco (por exemplo, cateter) contendo um primeiro orifício de fluxo em comunicação fluida com a porta de acesso ao fluido e um segundo orifício de fluxo configurado para inserção na medula espinhal; e um mecanismo de segurança para garantir a inserção do corpo oco na medula espinhal. Como um exemplo não limitante, um mecanismo de segurança apropriado contém uma ou mais cabeças montadas na superfície do corpo oco e um anel suturado ajustável sobre as uma ou mais cabeças para impedir que o corpo oco (por exemplo, cateter) escorregue para fora da medula espinhal. Em várias modalidades, a porta de acesso ao fluido compreende um reservatório. Em algumas modalidades, a porta de acesso ao fluido é compreende uma bomba mecânica (por exemplo, uma bomba de infusão). Em algumas modalidades, um cateter implantado está ligado a um reservatório (por exemplo, para a liberação de bolus), ou uma bomba de infusão. A porta de acesso ao fluido pode ser implantada ou externa.

[170] Em algumas modalidades, a administração intratecal

através de um sistema de liberação de porta-cateter (ou seja, infusão ou bolus). Em algumas modalidades, o cateter é inserido entre as lâminas das vértebras lombares e a ponta é enfiada no espaço tecal para o nível desejado (geralmente L3-L4).

[171] Em relação à administração intravenosa, um volume de dose única apropriado para administração intratecal é normalmente pequeno. Normalmente, a liberação intratecal de acordo com a presente invenção mantém o equilíbrio da composição do CSF bem como a pressão intracraniana do sujeito. Em algumas modalidades, a liberação intratecal é realizada sem a remoção correspondente do CSF de um sujeito. Em algumas modalidades, um volume apropriado de dose única pode ser, por exemplo, menos de cerca de 10 mL, 8 mL, 6 mL, 5 mL, 4 mL, 3 mL, 2 mL, 1,5 mL, 1 mL ou 0,5 mL. Em algumas modalidades, um volume apropriado de dose única pode ser cerca de 0,5-5 mL, 0,5-4 mL, 0,5-3 mL, 0,5-2 mL, 0,5-1 mL, 1-3 mL, 1-5 mL, 1,5-3 mL, 1-4 mL ou 0,5-1,5 mL. Em algumas modalidades, a liberação intratecal de acordo com a presente invenção envolve uma etapa de remoção de uma quantidade desejada de CSF primeiro. Em algumas modalidades, menos de cerca de 10 mL (por exemplo, menos de cerca de 9 mL, 8 mL, 7 mL, 6 mL, 5 mL, 4 mL, 3 mL, 2 mL, 1 mL) de CSF é primeiro removido antes da administração intratecal. Nesses casos, um volume apropriado de dose única pode ser, por exemplo, mais de cerca de 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 15 mL ou 20 mL. Intervalos e valores intermediários aos intervalos e valores acima recitados também estão previstos para ser parte da invenção.

[172] Vários outros dispositivos podem ser usados para efetuar a administração intratecal de uma composição terapêutica. Por exemplo, as formulações contendo enzimas desejadas podem ser administradas usando um reservatório Ommaya que é em comum uso para administrar por via intratecal drogas para carcinomatose meníngea (Lancet 2: 983-84, 1963). Mais especificamente, neste método, um tubo ventricular é inserido através de um buraco

instalado sob o couro cabeludo, e o reservatório é perfurado por via subcutânea para liberar por via intratecal a enzima particular sendo substituída, que é injetada no reservatório. Outros dispositivos para administração intratecal de composições ou formulações terapêuticas para um indivíduo são descritos na Patente US 6.217.552, cujo conteúdo completo, uma vez que se relacionam com estes dispositivos, é incorporado aqui como referência. Alternativamente, a droga pode ser administrada por via intratecal, por exemplo, por uma única injeção ou infusão contínua. Deve ser entendido que o tratamento de dosagem pode ser na forma de uma administração de dose única ou múltiplas doses.

[173] Para injeção, as formulações da invenção podem ser formuladas em soluções líquidas. Além disso, a enzima NaGlu pode ser formulada em forma sólida e redissolvida ou suspensa imediatamente antes do uso. As formas liofilizadas também estão incluídas. A injeção pode ser, por exemplo, sob a forma de uma injeção em bolus ou infusão contínua (por exemplo, usando bombas de infusão) da enzima NaGlu.

[174] Em uma modalidade da invenção, a enzima NaGlu é administrada por injeção cérebro-ventricular lateral no cérebro de um sujeito. A injeção pode ser feita, por exemplo, através de um orifício de trépano feito no crânio do sujeito. Em outra modalidade, a enzima e/ou outra formulação farmacêutica é administrada através de uma derivação cirurgicamente inserida no ventrículo cerebral de um sujeito. Por exemplo, a injeção pode ser feita nos ventrículos laterais, que são maiores. Em algumas modalidades, a injeção no terceiro e quarto ventrículos menores também pode ser feita.

[175] Ainda em outra modalidade, as composições farmacêuticas usadas na presente invenção são administradas através de injeção na cisterna magna ou área lombar de um sujeito.

[176] Em outra modalidade do método da invenção, a formulação farmaceuticamente aceitável fornece liberação

composição farmacêutica usada na presente invenção, para um sujeito por pelo menos uma, duas, três, quatro semanas ou períodos maiores de tempo após a formulação farmacêuticamente aceitável ser administrada ao sujeito.

[177] Conforme usado aqui, o termo "liberação sustentada" refere-se à liberação contínua de uma formulação farmacêutica da invenção *in vivo* durante um período de tempo após a administração, preferencialmente pelo menos vários dias, uma semana ou várias semanas. Liberação sustentada da composição pode ser demonstrada por, por exemplo, o efeito terapêutico continuado da enzima ao longo do tempo (por exemplo, liberação sustentada da enzima pode ser demonstrada por quantidade reduzida continuada de grânulos de armazenamento no sujeito).

[178] Alternativamente, a liberação sustentada da enzima pode ser demonstrada pela detecção da presença da enzima *in vivo* ao longo do tempo.

B. Liberação Intravenosa

[179] Conforme discutido acima, uma das características surpreendentes da presente invenção é que as proteínas NaGlu humanas recombinantes da invenção são capazes de efetivamente e amplamente difundir através da barreira hemato-encefálica (BBB) e a superfície do cérebro e penetrar em várias camadas ou regiões do cérebro, incluindo regiões profundas do cérebro, quando administradas por via intravenosa. Os métodos da presente invenção efetivamente liberam as proteínas rhNaGlu para vários tecidos, neurônios ou células do sistema nervoso central (CNS), que são dificilmente direcionadas pelos métodos existentes de liberação para o CNS. Além disso, os métodos da presente invenção liberam quantidades suficientes das proteínas NaGlu humanas recombinantes para o fluxo de sangue e vários órgãos periféricos e tecidos.

[180] "Injeção intravenosa," muitas vezes clinicamente conhecida como IV push ou injeção em bolus, refere-se a uma via de administração em que uma seringa é conectada ao dispositivo de

rapidamente e ocasionalmente até um período de 15 minutos se puder causar irritação da veia ou um efeito muito rápido. Uma vez que um medicamento foi injetado no fluxo de fluido do tubo de IV, deve haver algum meio de garantir que ele saia do tubo para o paciente. Geralmente isso é feito permitindo que o fluxo de fluido flua normalmente e, assim, leve o medicamento para a corrente sanguínea. No entanto, em alguns casos, uma segunda injeção de fluido, às vezes chamada de "flush" é usada após a primeira injeção para facilitar a entrada do medicamento na corrente sanguínea.

[181] "Infusão intravenosa" refere-se a uma via de administração em que a medicação é liberada durante um período prolongado de tempo. Por exemplo, a medicação pode ser liberada a um paciente durante um período de tempo entre 1 e 8 horas. A medicação pode também ser liberada a um paciente durante um período de cerca de 1, a cerca de 2, cerca de 3, cerca de 4, cerca de 5, cerca de 6, cerca de 7 ou cerca de 8 horas. Para realizar uma infusão intravenosa, um gotejamento por gravidade IV ou uma bomba IV pode ser usada. A infusão IV é normalmente usada quando um paciente requer medicamentos somente em determinados momentos e não necessita de fluidos intravenosos adicionais (por exemplo, soluções de água que podem conter sódio, cloreto, glicose ou qualquer combinação dos mesmos) como as que restauram eletrólitos, glicose sanguínea e a perda de água.

C. Tecidos alvo

[182] Em algumas modalidades, a rhNaGlu da invenção é liberada ao sistema nervoso central (CNS) de um sujeito. Em algumas modalidades, a rhNaGlu da invenção é liberada a um ou mais dos tecidos alvo do cérebro, medula espinhal, e/ou órgãos periféricos. Conforme usado aqui, o termo "tecido alvo" refere-se a qualquer tecido que é afetado pela doença associada à NaGlu a ser tratada ou qualquer tecido em que a NaGlu deficiente é normalmente expressa. Em algumas modalidades, os tecidos alvo

anormalmente alta de substrato da enzima, por exemplo, armazenado nos lisossomos celulares do tecido, em pacientes que sofrem de ou são suscetíveis à doença associada à NaGlu. Em algumas modalidades, os tecidos alvo incluem aqueles tecidos que exibem uma patologia, sintoma ou recurso associado à doença. Em algumas modalidades, os tecidos alvo incluem aqueles tecidos em que a NaGlu deficiente é normalmente expressa em um nível elevado. Conforme usado aqui, um tecido alvo pode ser um tecido alvo do cérebro, um tecido alvo da medula espinhal e/ou um tecido alvo periférico. Tecidos alvo exemplares são descritos em detalhes abaixo.

D. Tecidos Alvo do Cérebro

[183] Em geral, o cérebro pode ser dividido em diferentes regiões, camadas e tecidos. Por exemplo, o tecido meníngeo é um sistema de membranas que envolve o sistema nervoso central, incluindo o cérebro. As meninges contêm três camadas, incluindo a dura-máter e aracnoide-máter e pia-máter. Em geral, a principal função das meninges e do líquido cerebrospinal é proteger o sistema nervoso central. Em algumas modalidades, uma proteína terapêutica em conformidade com a presente invenção é liberada a uma ou mais camadas das meninges.

[184] O cérebro tem três subdivisões principais, incluindo o cérebro, cerebelo e tronco cerebral. Os hemisférios cerebrais, que se situam acima da maioria das outras estruturas do cérebro e são cobertos com uma camada cortical. Por baixo do cérebro encontra-se o tronco cerebral, que se assemelha a uma haste na qual o cérebro está ligado. Na parte de trás do cérebro, abaixo do cérebro e atrás do tronco cerebral, está o cerebelo.

[185] O diencéfalo, que está localizado perto da linha média do cérebro e acima do mesencéfalo, contém o tálamo, metatálamo, hipotálamo, epitálamo, pré-tálamo e pretectum. O mesencéfalo, também chamado de cérebro médio, contém o tectum, tegumento, mesocoelia ventricular e pedúnculos cerebrais, o núcleo

associado com a visão, audição, coordenação motora, sono/vigília, alerta e regulação da temperatura.

[186] As regiões dos tecidos do sistema nervoso central, incluindo o cérebro, podem ser caracterizadas com base na profundidade dos tecidos. Por exemplo, os tecidos do CNS (por exemplo, cérebro) podem ser caracterizados como tecidos superficiais ou rasos, tecidos de profundidade média, e/ou tecidos profundos.

[187] De acordo com a presente invenção, a rhNaGlu da invenção pode ser liberada a qualquer tecido alvo do cérebro apropriado com uma doença particular a ser tratada em um sujeito. Em algumas modalidades, a rhNaGlu da invenção é liberada ao tecido alvo do cérebro superficial ou raso. Em algumas modalidades, a rhNaGlu da invenção é liberada ao tecido alvo do cérebro de profundidade média. Em algumas modalidades, a rhNaGlu da invenção é liberada ao tecido alvo do cérebro profundo. Em algumas modalidades, a rhNaGlu da invenção é liberada para uma combinação de tecido alvo do cérebro de superfície ou raso, tecido alvo do cérebro de profundidade média, e/ou tecido alvo do cérebro profundo. Em algumas modalidades, a rhNaGlu da invenção é liberada a um tecido cerebral profundo pelo menos 4mm, 5mm, 6mm, 7mm, 8mm, 9mm, 10mm ou mais abaixo (ou interno a) da superfície externa do cérebro. Intervalos e valores intermediários aos intervalos e valores acima recitados também estão previstos para ser parte da invenção.

[188] Em algumas modalidades, a rhNaGlu da invenção é liberada a um ou mais tecidos do cérebro superficiais ou rasos. Em algumas modalidades, os tecidos alvo superficiais ou rasos do cérebro estão localizados dentro de 4 mm da superfície do cérebro. Em algumas modalidades, os tecidos alvo superficiais ou rasos do cérebro são selecionados de tecidos pia-máter, tecidos de fita cortical cerebral, hipocampo, espaço de Virchow-Robin, vasos sanguíneos dentro do espaço VR, o hipocampo, partes do hipotálamo

bulbo olfatório e projeções e combinações dos mesmos.

[189] Em algumas modalidades, a rhNaGlu da invenção é liberada a um ou mais tecidos do cérebro profundos. Em algumas modalidades, os tecidos alvo superficiais ou rasos do cérebro estão localizados pelo menos 4 mm (por exemplo, 5mm, 6mm, 7mm, 8mm, 9mm ou 10mm) abaixo (ou interno) a superfície do cérebro. Em algumas modalidades, os tecidos alvo profundos do cérebro incluem a fita cortical cerebral. Em algumas modalidades, os tecidos alvo profundos do cérebro incluem um ou mais do diencéfalo (por exemplo, o hipotálamo, tálamo, pré-tálamo ou subtálamo), metencéfalo, núcleos lentiforme, os gânglios basais, caudado, putâmen, amígdala, globus pallidus e combinações dos mesmos.

[190] Em algumas modalidades, a rhNaGlu da invenção é liberada a um ou mais tecidos do cerebelo. Em certas modalidades, o um ou mais tecidos alvo do cerebelo são selecionados a partir do grupo que consiste em tecidos da camada molecular, tecidos da camada de células de Purkinje, tecidos da camada de células Granulares, pedúnculos cerebelares e combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, agentes terapêuticos (por exemplo, enzimas) são liberados em um ou mais tecidos profundos do cerebelo incluindo, entre outros, tecidos da camada de células de Purkinje, tecidos da camada de células Granulares, tecido da substância branca cerebelar profundo (por exemplo, profundo em relação à camada de células Granulares) e tecidos do núcleo cerebelar profundo.

[191] Em algumas modalidades, a rhNaGlu da invenção é liberada a um ou mais tecidos do tronco cerebral. Em algumas modalidades, o um ou mais tecidos alvo do tronco cerebral incluem tecidos de substância branca do tronco cerebral e/ou tecido de núcleos do tronco cerebral.

[192] Em algumas modalidades, a rhNaGlu da invenção é liberada para vários tecidos cerebrais, incluindo, entre outros, massa cinzenta, substância branca, áreas periventriculares, pia-

córtex cerebral, camada molecular, região putâmen/caudado, mesencéfalo, regiões profundas da ponte ou medula e combinações dos mesmos.

[193] Em algumas modalidades, a rhNaGlu da invenção é liberada para várias células do cérebro, incluindo, entre outros, neurônios, células gliais, células perivasculares e/ou células meníngeas. Em algumas modalidades, uma proteína terapêutica é liberada para oligodendrócitos da substância branca profunda.

E. Tecido Alvo da Medula Espinhal

[194] Em geral, as regiões ou os tecidos da medula espinhal podem ser caracterizados com base na profundidade dos tecidos. Por exemplo, os tecidos da medula espinhal podem ser caracterizados como tecidos superficiais ou rasos, tecidos de profundidade média, e/ou tecidos profundos.

[195] Em algumas modalidades, a rhNaGlu da invenção é liberada a um ou mais tecidos da medula espinhal superficiais ou rasos. Em algumas modalidades, os tecidos alvo superficiais ou rasos da medula espinhal estão localizados dentro de 4 mm da superfície da medula espinhal. Em algumas modalidades, um tecido alvo superficial ou raso da medula espinhal contém pia-máter e/ou os tratos de substância branca.

[196] Em algumas modalidades, a rhNaGlu da invenção é liberada a um ou mais tecidos da medula espinhal profundos. Em algumas modalidades, os tecidos alvo profundos da medula espinhal estão localizados internos a 4 mm da superfície da medula espinhal. Em algumas modalidades, um tecido alvo profundo da medula espinhal contém células da substância cinzenta e/ou endimárias da medula espinhal.

[197] Em algumas modalidades, as enzimas de substituição (por exemplo, uma proteína de fusão NaGlu) são liberadas para os neurônios da medula espinhal.

F. Tecidos Alvo Periféricos

[198] Conforme usado aqui, órgãos ou tecidos periféricos

sistema nervoso central (CNS). Tecidos alvo periféricos podem incluir, entre outros, sistema sanguíneo, fígado, rim, coração, endotélio, medula óssea e células derivadas da medula óssea, baço, pulmão, linfonodos, osso, cartilagem, ovário e testículo. Em algumas modalidades, a rhNaGlu da invenção é liberada a um ou mais tecidos alvo periféricos.

G. Biodistribuição e Biodisponibilidade

[199] Em várias modalidades, uma vez que é liberada ao tecido alvo, a rhNaGlu da invenção é localizada intracelularmente. Por exemplo, a rhNaGlu da invenção pode ser localizada nos exóns, axônios, lisossomos, mitocôndrias ou vacúolos de uma célula-alvo (por exemplo, neurônios como células de Purkinje). Por exemplo, em algumas modalidades, a rhNaGlu da invenção demonstra dinâmica de translocação de forma que a rhNaGlu se move dentro do espaço perivascular (por exemplo, por mecanismos convectivos assistidos por pulsação). Além disso, mecanismos de transporte axonal ativos em relação à associação da enzima ou proteína administrada com neurofilamentos podem também contribuir para ou de outras forma facilitar a distribuição das proteínas rhNaGlu da invenção nos tecidos mais profundos do sistema nervoso central.

[200] Em algumas modalidades, a rhNaGlu da invenção liberada de acordo com a presente invenção pode alcançar níveis ou atividades eficazes terapeuticamente ou clinicamente em vários tecidos alvo aqui descritos. Conforme usado aqui, um nível ou atividade terapeuticamente ou clinicamente eficaz é um nível ou atividade suficiente para conferir um efeito terapêutico em um tecido alvo. O efeito terapêutico pode ser objetivo (ou seja, mensurável por algum teste ou marcador) ou subjetivo (ou seja, o sujeito dá uma indicação de ou sente um efeito). Por exemplo, um nível ou atividade terapeuticamente ou clinicamente eficaz pode ser um nível ou atividade enzimática que é suficiente para amenizar os sintomas associados com a doença no tecido alvo (por exemplo, armazenamento GAG).

liberada de acordo com a presente invenção pode alcançar um nível ou atividade enzimática que é pelo menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% do nível ou atividade normal da enzima NaGlu correspondente no tecido alvo. Em algumas modalidades, a rhNaGlu da invenção liberada de acordo com a presente invenção pode alcançar um nível ou atividade enzimática que é aumentada em pelo menos 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes ou 10 vezes em comparação com um controle (por exemplo, níveis ou atividades endógenas sem tratamento). Em algumas modalidades, a rhNaGlu liberada de acordo com a presente invenção pode alcançar um aumento do nível ou atividade enzimática pelo menos cerca de 10 nmol/h/mg, 20 nmol/h/mg, 40 nmol/h/mg, 50 nmol/h/mg, 60 nmol/h/mg, 70 nmol/h/mg, 80 nmol/h/mg, 90 nmol/h/mg, 100 nmol/h/mg, 150 nmol/h/mg, 200 nmol/h/mg, 250 nmol/h/mg, 300 nmol/h/mg, 350 nmol/h/mg, 400 nmol/h/mg, 450 nmol/h/mg, 500 nmol/h/mg, 550 nmol/h/mg ou 600 nmol/h/mg em um tecido alvo. Intervalos e valores intermediários aos intervalos e valores acima recitados também estão previstos para ser parte da invenção.

[202] Em algumas modalidades, os métodos inventivos de acordo com a presente invenção são particularmente úteis para o direcionamento da região lombar. Em algumas modalidades, a rhNaGlu liberada de acordo com a presente invenção pode alcançar um aumento do nível ou atividade enzimática na região lombar de pelo menos cerca de 500 nmol/h/mg, 600 nmol/h/mg, 700 nmol/h/mg, 800 nmol/h/mg, 900 nmol/h/mg, 1000 nmol/h/mg, 1500 nmol/h/mg, 2000 nmol/h/mg, 3000 nmol/h/mg, 4000 nmol/h/mg, 5000 nmol/h/mg, 6000 nmol/h/mg, 7000 nmol/h/mg, 8000 nmol/h/mg, 9000 nmol/h/mg, ou 10.000 nmol/h/mg. Intervalos e valores intermediários aos intervalos e valores acima recitados também estão previstos para ser parte da invenção.

[203] Em geral, agentes terapêuticos (por exemplo, a rhNaGlu) liberados de acordo com a presente invenção têm meia vida

espinhal e órgãos periféricos. Em algumas modalidades, a rhNaGlu liberada de acordo com a presente invenção pode ter uma meia vida de pelo menos cerca de 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 25 horas, 30 horas, 35 horas, 40 horas, até 3 dias, até 7 dias, até 14 dias, até 21 dias ou até um mês. Em algumas modalidades, a rhNaGlu liberada de acordo com a presente invenção pode manter nível ou atividade detectável no CSF ou corrente sanguínea após 12 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 42 horas, 48 horas, 54 horas, 60 horas, 66 horas, 72 horas, 78 horas, 84 horas, 90 horas, 96 horas, 102 horas ou uma semana após a administração. Nível ou atividade detectável pode ser determinada usando vários métodos conhecidos na técnica. Intervalos e valores intermediários aos intervalos e valores acima recitados também estão previstos para ser parte da invenção. Em certas modalidades, a rhNaGlu liberada de acordo com a presente invenção alcança uma concentração de pelo menos 30µg/mL nos tecidos do CNS e células do sujeito após a administração (por exemplo, uma semana, 3 dias, 48 horas, 36 horas, 24 horas, 18 horas, 12 horas, 8 horas, 6 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos, ou menos após a administração da composição farmacêutica ao sujeito). Em certas modalidades, a rhNaGlu liberada de acordo com a presente invenção alcança uma concentração de pelo menos 2 µg/mL, pelo menos 15 µg/mL, pelo menos 1 µg/mL, pelo menos 7 µg/mL, pelo menos 5 µg/mL, pelo menos 2 µg/mL, pelo menos 1 µg/mL ou pelo menos 0,5 µg/mL nos tecidos alvo ou células do sujeito (por exemplo, tecidos ou do cérebro neurônios) após a administração para esse sujeito (por exemplo, uma semana, 3 dias, 48 horas, 36 horas, 24 horas, 18 horas, 12 horas, 8 horas, 6 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos, ou menos após a administração dessas composições farmacêuticas ao sujeito). Intervalos e valores intermediários aos intervalos e valores acima recitados também estão previstos para

H. Tratamento da Síndrome de Sanfilippo

[204] Síndrome de Sanfilippo, ou mucopolissacaridose III (MPS-III), é um distúrbio genético raro caracterizado pela deficiência de enzimas envolvidas na degradação de glicosaminoglicanos (GAG). Na ausência de enzima, moléculas GAG parcialmente degradadas não podem ser removidas do corpo em se acumulam nos lisossomos de vários tecidos, resultando em disfunção somática generalizada progressiva (Neufeld e Muenzer, 2001).

[205] Quatro formas distintas de MPS III, designadas MPS IIIA, B, C e D, foram identificadas. Cada uma representa uma deficiência em uma das quatro enzimas envolvidas na degradação do sulfato de heparan GAG. Todas as formas incluem vários graus dos mesmos sintomas clínicos, incluindo características faciais grosseiras, hepatoesplenomegalia, embaçamento corneal e deformidades esqueléticas. Mais notavelmente, no entanto, é a grave e progressiva perda da capacidade cognitiva, que está vinculada não apenas ao acúmulo de sulfato de heparan nos neurônios, mas também à elevação subsequente dos gangliosídeos GM2, GM3 e GD2 causada pelo acúmulo de GAG primário (Walkley 1998).

[206] Mucopolissacaridose tipo IIIB (MPS IIIB; Síndrome de Sanfilippo B) é um distúrbio autossômico recessivo que se caracteriza por uma deficiência da enzima alfa-N-acetilglicosaminidase (NaGlu). Na ausência desta enzima, sulfato de heparan GAG se acumula nos lisossomos dos neurônios e células gliais, com menor acúmulo fora do cérebro.

[207] Uma característica clínica definidora da doença é a degeneração do sistema de nervoso central (CNS), que resulta em perda de, ou incapacidade de atingir, marcos avançados do desenvolvimento. O declínio cognitivo progressivo culmina em demência e mortalidade prematura. A doença manifesta-se tipicamente em crianças pequenas, e a expectativa de vida de um indivíduo afetado geralmente não se estende para além do fim da

[208] As composições e métodos da presente invenção podem ser usados para tratar de forma eficaz os indivíduos que sofrem de ou são suscetíveis a Síndrome de Sanfilippo B. Os termos, "tratar" ou "tratamento", conforme usado aqui, referem-se à melhoria de um ou mais sintomas associados com a doença, prevenção ou o atraso do início de um ou mais sintomas da doença, e/ou diminuição da gravidade ou frequência de um ou mais sintomas da doença.

[209] Em algumas modalidades, o tratamento refere-se à parcial ou total redução, melhora, alívio, inibição, atraso do início, redução da gravidade e/ou incidência de comprometimento neurológico em paciente com Síndrome de Sanfilippo B. Conforme usado aqui, o termo "comprometimento neurológico" inclui vários sintomas associados com o comprometimento do sistema nervoso central (por exemplo, o cérebro e medula espinhal). Os sintomas do comprometimento neurológico podem incluir, por exemplo, atraso de desenvolvimento, comprometimento cognitivo progressivo, perda de audição, desenvolvimento prejudicado da fala, déficits em habilidades motoras, hiperatividade, agressividade e/ou distúrbios do sono, entre outros.

[210] Assim, em algumas modalidades, o tratamento refere-se à diminuição do depósito lisossômico (por exemplo, de GAG) em vários tecidos. Em algumas modalidades, o tratamento se refere à diminuição do depósito lisossômico em tecidos alvo no cérebro, neurônios da medula espinhal, e/ou tecidos alvo periféricos. Em certas modalidades, doenças de depósito lisossômico são diminuídas em cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% ou mais em comparação com um controle. Em algumas modalidades, doenças de depósito lisossômico são reduzidas em pelo menos 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes ou 10 vezes em comparação com um controle. Em algumas modalidades, o depósito lisossômico é determinada pela coloração de LAMP-1. Intervalos e valores intermediários aos intervalos e valores acima recitados

[211] Em algumas modalidades, o tratamento refere-se à reduzida vacuolização nos neurônios (por exemplo, neurônios contendo células de Purkinje). Em certas modalidades, a vacuolização nos neurônios é diminuída em cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% ou mais em comparação com um controle. Em algumas modalidades, a vacuolização é diminuída em pelo menos 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes ou 10 vezes em comparação com um controle. Intervalos e valores intermediários aos intervalos e valores acima recitados também estão previstos para ser parte da invenção.

[212] Em algumas modalidades, o tratamento refere-se ao aumento da atividade da enzima NaGlu em vários tecidos. Em algumas modalidades, o tratamento se refere ao aumento da atividade da enzima NaGlu em tecidos alvo no cérebro, neurônios da medula espinhal, e/ou tecidos alvo periféricos. Em algumas modalidades, a atividade da enzima NaGlu é aumentada em cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% 1000% ou mais em comparação com um controle. Em algumas modalidades, a atividade da enzima NaGlu é aumentada em pelo menos 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes ou 10 vezes em comparação com um controle. Em algumas modalidades, a atividade enzimática aumentada de NaGlu é pelo menos cerca de 10 nmol/h/mg, 20 nmol/h/mg, 40 nmol/h/mg, 50 nmol/h/mg, 60 nmol/h/mg, 70 nmol/h/mg, 80 nmol/h/mg, 90 nmol/h/mg, 100 nmol/h/mg, 150 nmol/h/mg, 200 nmol/h/mg, 250 nmol/h/mg, 300 nmol/h/mg, 350 nmol/h/mg, 400 nmol/h/mg, 450 nmol/h/mg, 500 nmol/h/mg, 550 nmol/h/mg, 600 nmol/h/mg ou mais. Em algumas modalidades, a atividade enzimática NaGlu é aumentada na região lombar. Em algumas modalidades, a atividade enzimática NaGlu aumentada na região lombar é pelo menos cerca de 2000 nmol/h/mg, 3000 nmol/h/mg, 4000 nmol/h/mg, 5000 nmol/h/mg, 6000 nmol/h/mg,

ou mais. Intervalos e valores intermediários aos intervalos e valores acima recitados também estão previstos para ser parte da invenção.

[213] Em certas modalidades, o tratamento de acordo com a presente invenção resulta em uma redução (por exemplo, cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 97.5%, 99% ou mais redução) ou uma eliminação completa de presença, ou, alternativamente, o acúmulo, de um ou mais marcadores biológicos ou patológicos que estão associados com a doença associada à NaGlu. Essa redução ou eliminação pode ser particularmente evidente nas células e tecidos do CNS (por exemplo, neurônios e oligodendrócitos). Por exemplo, em algumas modalidades, a administração a um sujeito das composições farmacêuticas da presente invenção demonstra ou alcança uma redução no acúmulo da proteína de membrana associada ao biomarcador lisossomal 1 (LAMP1) nas células do CNS e tecidos do sujeito (por exemplo, no córtex cerebral, cerebelo, núcleo caudado e putâmen, substância branca e/ou tálamo). LAMP1 é uma glicoproteína altamente expressa nas membranas lisossomais e sua presença é elevada em muitos pacientes com um distúrbio de depósito lisossômico (Meikle et al, Clin. Chem. (1997) 43: 1325-1335). A presença ou ausência de LAMP 1 em pacientes (por exemplo, conforme determinado pela coloração de LAMP) com uma doença de depósito lisossômico, portanto, pode fornecer um indicador útil da atividade dos lisossomos e um marcador para o diagnóstico e monitoramento de doenças de depósito lisossômico.

[214] Nesse sentido, algumas modalidades da presente invenção referem-se aos métodos de redução ou, de outra forma, eliminação da presença ou acúmulo de um ou mais marcadores biológicos ou patológicos associados com a doença associada à NaGlu. Da mesma forma, algumas modalidades da invenção se refere aos métodos para aumentar a degradação (ou a taxa de degradação) de um ou mais marcadores patológicos ou biológicos (por exemplo,

[215] Em algumas modalidades, o tratamento refere-se à diminuição da progressão da perda da capacidade cognitiva. Em certas modalidades, a progressão da perda da capacidade cognitiva é diminuída em cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% ou mais em comparação com um controle. Em algumas modalidades, o tratamento refere-se à diminuição do atraso de desenvolvimento. Em certas modalidades, o atraso de desenvolvimento é diminuído em cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% ou mais em comparação com um controle. Intervalos e valores intermediários aos intervalos e valores acima recitados também estão previstos para ser parte da invenção.

[216] Em algumas modalidades, o tratamento refere-se à sobrevivência aumentada (por exemplo, tempo de sobrevivência). Por exemplo, o tratamento pode resultar em um aumento da expectativa de vida de um paciente. Em algumas modalidades, o tratamento de acordo com a presente invenção resulta em um aumento da expectativa de vida de um paciente em mais de cerca de 5%, cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 100%, cerca de 105%, cerca de 110%, cerca de 115%, cerca de 120%, cerca de 125%, cerca de 130%, cerca de 135%, cerca de 140%, cerca de 145%, cerca de 150%, cerca de 155%, cerca de 160%, cerca de 165%, cerca de 170%, cerca de 175%, cerca de 180%, cerca de 185%, cerca de 190%, cerca de 195%, cerca de 200% ou mais, em comparação com a expectativa de vida média de um ou mais indivíduos de controle com doença semelhante sem tratamento. Em algumas modalidades, o tratamento de acordo com a presente invenção resulta em um aumento da expectativa de vida de um paciente por mais de cerca de 6 meses, cerca de 7 meses, cerca de 8 meses, cerca de 9 meses, cerca

anos, cerca de 3 anos, cerca de 4 anos, cerca de 5 anos, cerca de 6 anos, cerca de 7 anos, cerca de 8 anos, cerca de 9 anos, cerca de 10 anos ou mais, em comparação com a expectativa de vida média de um ou mais indivíduos de controle com doença semelhante sem tratamento. Em algumas modalidades, o tratamento de acordo com a presente invenção resulta na sobrevivência de longo prazo de um paciente. Conforme usado aqui, o termo "sobrevivência de longo prazo" se refere a um tempo de sobrevivência ou expectativa de vida maior do que cerca de 40 anos, 45 anos, 50 anos, 55 anos, 60 anos, ou mais. Intervalos e valores intermediários aos intervalos e valores acima recitados também estão previstos para ser parte da invenção.

[217] Os termos, "melhorar", "aumentar" ou "reduzir", conforme usados aqui, indicam valores que são relativos para um controle. Em algumas modalidades, um controle apropriado é uma medida basal, como uma medida no mesmo indivíduo antes do início do tratamento descrito aqui, ou uma medida em um indivíduo de controle (ou vários indivíduos de controle) na ausência de tratamento descrito aqui. Um "indivíduo de controle" é um indivíduo afligido com Síndrome de Sanfilippo B, que possui aproximadamente a mesma idade e/ou gênero do indivíduo que está sendo tratado (para assegurar que as fases da doença no indivíduo tratado e nos indivíduos de controle são comparáveis).

[218] O indivíduo (também referido como "paciente" ou "sujeito") sendo tratado é um indivíduo (feto, bebê, criança, adolescente ou adulto humano) contendo Síndrome de Sanfilippo B ou com potencial para desenvolver Síndrome de Sanfilippo B. O indivíduo pode ter expressão e/ou atividade de NaGlu endógena residual ou nenhuma atividade mensurável. Por exemplo, o indivíduo contendo Síndrome de Sanfilippo B pode ter níveis de expressão de NaGlu que estão a menos de cerca de 30-50%, menos de cerca de 25-30%, menos de cerca de 20-25%, menos de cerca de 15-20%, menos de cerca de 10-15%, menos de cerca de 5-10%, menos de cerca de 0,1-5%

intermediários aos intervalos e valores acima recitados também estão previstos para ser parte da invenção.

[219] Em algumas modalidades, o indivíduo é um indivíduo que foi recentemente diagnosticado com a doença. Normalmente, o tratamento precoce (tratamento com início logo que possível após o diagnóstico) é importante para minimizar os efeitos da doença e maximizar os benefícios do tratamento.

I. Terapias de Combinação

[220] As proteínas NaGlu humanas recombinantes, por exemplo uma proteína NaGlu humana recombinante contendo uma quantidade suficiente de oligossacarídeos (por exemplo, manose e manose fosforilada (ou seja, M6P)), podem ser usadas sozinhas ou em combinação para tratar doenças associadas à NaGlu (por exemplo, Síndrome de Sanfilippo B). Deve ser entendido que as proteínas NaGlu humanas recombinantes da invenção podem ser usadas sozinhas ou em combinação com um procedimento adicional, por exemplo, procedimento cirúrgico, ou agente, por exemplo, um agente terapêutico, o procedimento adicional ou agente sendo selecionado pelo especialista na técnica para sua finalidade pretendida. Por exemplo, o procedimento adicional ou agente pode ser um procedimento terapêutico ou agente reconhecido na técnica como sendo útil para tratar a doença ou condição sendo tratada pela proteína NaGlu humana recombinante da presente invenção. O procedimento adicional ou agente também pode ser um agente que transmite um atributo benéfico à composição terapêutica, por exemplo, um agente que afeta a viscosidade da composição.

[221] Também deve ser entendido que as combinações que são incluídas dentro desta invenção são essas combinações úteis para a sua finalidade. Os agentes e os procedimentos descritos abaixo são para fins ilustrativos e não se destinam a ser um fator limitante para a presente invenção. As combinações, que fazem parte da presente invenção, podem ser as proteínas NaGlu humanas recombinantes da presente invenção e pelo menos um agente

combinação também pode incluir mais de um agente ou procedimento adicional, por exemplo, dois ou três agentes adicionais se a combinação é de forma que a composição formada pode executar sua função pretendida.

[222] A terapia de combinação pode incluir procedimentos cirúrgicos, terapia genética ou terapia de reposição enzimática. Além disso, a proteína NaGlu humana recombinante pode ser coformulada com um ou mais agentes terapêuticos adicionais, por exemplo, outras proteínas recombinantes ou anticorpos ou drogas capazes de impedir ou reduzir o acúmulo de substratos não degradados (por exemplo, terapia de redução de substrato).

[223] Em uma ou mais modalidades, a terapia de combinação pode incluir coadministração com imunossuppressores, conforme discutido em mais detalhes abaixo. Os imunossuppressores como, entre outros, anti-histamínicos, corticosteroides, sirolimus, voclosporina, ciclosporina, metotrexato, anticorpos direcionados ao receptor IL-2, anticorpos direcionados ao receptor de células T, anticorpos direcionados ao receptor TNF-alfa ou proteínas de fusão (por exemplo, infliximabe, etanercept ou adalimumab), CTLA-4-Ig (por exemplo, abatacept), anticorpos anti-OX-40 podem também ser administrados antes, durante ou após a administração de uma proteína recombinante humana, como uma proteína NaGlu humana recombinante, por exemplo, se uma resposta imune de reação anafilática ou adversa é esperada ou experimentada por um paciente.

J. Imunogenicidade

[224] As composições farmacêuticas da presente invenção são caracterizadas por suas tolerabilidades. Conforme usado aqui, os termos "toleráveis" e "tolerabilidade" referem-se à capacidade de as composições farmacêuticas da presente invenção não provocarem uma reação adversa no sujeito a quem essa composição é administrada, ou, alternativamente não provocar uma reação adversa grave no sujeito a quem essa composição é administrada. Em algumas

bem toleradas pelo sujeito a quem essas composições são administradas.

[225] Geralmente, a administração de uma proteína rhNaGlu de acordo com a presente invenção não resulta em efeitos adversos graves no sujeito. Conforme usado aqui, induzir efeitos adversos graves inclui, entre outros, resposta imune substancial, toxicidade ou morte. Conforme usado aqui, o termo "resposta imune substancial" refere-se a respostas imunes graves ou sérias, como respostas imunes de célula T adaptativas.

[226] Assim, em muitas modalidades, os métodos inventivos de acordo com a presente invenção não envolvem terapia imunossupressora simultânea (ou seja, qualquer terapia imunossupressora usada como pré-tratamento/pré-condicionamento ou em paralelo ao método). Em algumas modalidades, os métodos inventivos de acordo com a presente invenção não envolvem uma indução da tolerância imune no sujeito a ser tratado. Em algumas modalidades, os métodos inventivos de acordo com a presente invenção não envolvem um pré-tratamento ou pré-condicionamento do sujeito usando agente imunossupressor de células T.

[227] No entanto, em algumas modalidades, um sujeito monta uma resposta imune após ser administrada a rhNaGlu da invenção. Assim, em algumas modalidades, pode ser útil tornar o sujeito que recebe a rhNaGlu da invenção tolerante para a terapia de reposição enzimática. A tolerância imune pode ser induzida usando vários métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, um regime inicial de 30-60 dias de um agente imunossupressor de células T como a ciclosporina A (CsA) e um agente antiproliferativo, como, azatioprina (Aza), combinado com infusões intratecais semanais de baixas doses de uma enzima de substituição desejada pode ser usado.

[228] Qualquer agente imunossupressor conhecido pelo especialista na técnica pode ser empregado em conjunto com uma terapia de combinação da invenção. Esses agentes imunossupressores

agentes anti-TNF como etanercept (ver, por exemplo, Moder, 2000, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 84, 280-284; Nevins, 2000, *Curr. Opin. Pediatr.* 12, 146-150; Kurlberg et al., 2000, *Scand. J. Immunol.* 51, 224-230; Ideguchi et al., 2000, *Neuroscience* 95, 217-226; Potteret al., 1999, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 875, 159-174; Slavik et al., 1999, *Immunol. Res.* 19, 1-24; Gaziev et al., 1999, *Bone Marrow Transplant.* 25, 689-696; Henry, 1999, *Clin. Transplant.* 13, 209-220; Gummert et al., 1999, *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 1366-1380; Qi et al., 2000, *Transplantation* 69, 1275-1283). O anticorpo antirreceptor IL2 (a-subunidade) daclizumab (por exemplo, Zenapax™), que se demonstrou eficaz em pacientes transplantados, também pode ser usado como um agente imunossupressor (ver, por exemplo, Wiseman et al., 1999, *Drugs* 58, 1029-1042; Beniaminovitz et al., 2000, *N. Engl. J. Med.* 342, 613-619; Ponticelli et al., 1999, *Drugs R. D.* 1, 55-60; Berard et al., 1999, *Pharmacotherapy* 19, 1 127-1 137; Eckhoff et al., 2000, *Transplantation* 69, 1867-1872; Ekberg et al., 2000, *Transpl. Int.* 13, 151-159). Agentes imunossupressores adicionais incluem, entre outros, ligantes anti-CD2 (Branco et al., 1999, *Transplantation* 68, 1588-1596; Przepiorka et al., 1998, *Blood* 92, 4066-4071), anti-CD4 (Marinova-Mutafchieva et al., 2000, *Arthritis Rheum.* 43, 638-644; Fishwild et al., 1999, *Clin. Immunol.* 92, 138-152), e anti-CD40 (Hong et al., 2000, *Semin. Nephrol.* 20, 108- 125; Chirmule et al., 2000, *J. Virol.* 74, 3345-3352; Ito et al., 2000, *J. Immunol.* 164, 1230-1235).

[229] Em outras modalidades, a invenção inclui métodos compreendendo a coadministração das proteínas NaGlu da presente invenção com agentes que diminuem ou suprimem uma resposta imune para a proteína NaGlu, por exemplo, imunossupressores. Os imunossupressores como, entre outros, anti-histamínicos, corticosteroides, sirolimus, voclosporina, ciclosporina, metotrexato, anticorpos direcionados ao receptor IL-2, anticorpos direcionados ao receptor de células T, anticorpos direcionados ao

etanercept ou adalimumab), CTLA-4-Ig (por exemplo, abatacept), anticorpos anti-OX-40 podem também ser administrados antes, durante ou após a administração de uma proteína recombinante humana, como uma proteína NaGlu humana recombinante, por exemplo, se uma resposta imune de reação anafilática ou adversa é esperada ou experimentada por um paciente.

[230] Em uma modalidade, a invenção fornece um procedimento de pré-tratamento para minimizar ou impedir quaisquer reações anafiláticas potenciais que podem incorrer pela administração da proteína recombinante em conformidade com a invenção. Em uma modalidade, para impedir uma reação anafilática potencial, um antagonista dos receptores H-1, também conhecido como um anti-histamínico (por exemplo, difenidramina) é administrado ao paciente. Em uma modalidade, o antagonista de receptor de H-1 é administrado em uma dose de cerca de 1 mg a cerca de 10 mg por quilograma de peso corporal. Por exemplo, um anti-histamínico pode ser administrado em uma dose de cerca de 5 mg por quilograma. Em uma modalidade, o anti-histamínico é administrado em uma dose de entre cerca de 0,1 mg e cerca de 10 mg por quilograma de peso corporal. Em uma modalidade, o anti-histamínico é administrado em uma dose de entre cerca de 1 mg e cerca de 5 mg por quilograma de peso corporal. Por exemplo, a dose pode ser de 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg ou 5 mg por quilograma de peso corporal. O anti-histamínico pode ser administrado por qualquer método útil. Em uma modalidade, o anti-histamínico é administrado por via intravenosa. Em outra modalidade, o anti-histamínico é administrado em cápsulas farmacêuticamente aceitáveis.

[231] A administração do anti-histamínico pode ser antes da administração da NaGlu recombinante em conformidade com a invenção. Em uma modalidade, o antagonista de receptor H-1 é administrado cerca de 10 a cerca de 90 minutos, por exemplo, cerca de 30 a cerca de 60 minutos antes da administração de NaGlu recombinante. O antagonista dos receptores H-1 pode ser

acesso vascular. Em uma modalidade, o anti-histamínico é administrado cerca de 90 minutos antes da administração de NaGlu recombinante. Em uma modalidade, o anti-histamínico é administrado entre cerca de 10 e cerca de 60 minutos antes da administração de NaGlu recombinante. Em outra modalidade, o anti-histamínico é administrado entre cerca de 20 e cerca de 40 minutos antes da administração de NaGlu recombinante. Por exemplo, o anti-histamínico pode ser administrado 20, 25, 30, 35 ou 40 minutos antes da administração de NaGlu recombinante.

[232] Em uma modalidade, o anti-histamínico administrado é difenidramina. Qualquer anti-histamínico útil pode ser usado. Esses anti-histamínicos incluem, entre outros, clemastina, doxilamina, loratidina, desloratidina, fexofenadina, feniramina, cetirizina, ebastina, prometazina, clorfeniramina, levocetirizina, olopatadina, quetiapina, meclizina, dimenidrinato, embramina, dimetideno e dexclorfeniramina.

[233] Em outra modalidade, com referência à infusão intravenosa, o potencial para reações anafiláticas pode ser reduzido pela administração de infusões usando um protocolo de arranque. Neste contexto, um protocolo de arranque refere-se ao aumento lento da taxa de infusão ao longo da infusão para dessensibilizar o paciente para a infusão da medicação.

K. Administração

[234] Os métodos da presente invenção contemplam administrações únicas bem como várias de uma quantidade terapeuticamente eficaz da rhNaGlu da invenção aqui descrita. A rhNaGlu da invenção pode ser administrada em intervalos regulares, dependendo da natureza, gravidade e extensão da condição do sujeito. Em algumas modalidades, uma quantidade terapeuticamente eficaz da proteína rhNaGlu da presente invenção pode ser administrada por via intravenosa ou intratecal periodicamente em intervalos regulares (por exemplo, uma vez por ano, uma vez a cada seis meses, a cada cinco meses, uma vez a cada três meses,

quinzenal (uma vez a cada duas semanas) ou semanal).

[235] Em algumas modalidades, a administração intratecal pode ser usada em conjunto com outras vias de administração (por exemplo, por via intravenosa, subcutânea, intramuscular, parenteral, transdérmica, ou transmucosal (por exemplo, por via oral ou nasal)). Em algumas modalidades, essas outras vias de administração (por exemplo, administração intravenosa) podem ser realizadas não mais frequente do que quinzenalmente, mensalmente, uma vez a cada dois meses, uma vez cada três meses, uma vez a cada quatro meses, uma vez a cada cinco meses, uma vez a cada seis meses, administração anual.

[236] Conforme usado aqui, o termo "quantidade terapeuticamente eficaz" é largamente determinado com base na quantidade total do agente terapêutico contido nas composições farmacêuticas da presente invenção. Geralmente, uma quantidade terapeuticamente eficaz é suficiente para alcançar um benefício significativo para o sujeito (por exemplo, tratando, modulando, curando, impedindo e/ou melhorando a doença ou condição subjacente). Por exemplo, uma quantidade terapeuticamente eficaz pode ser uma quantidade suficiente para atingir um efeito terapêutico e/ou profilático desejado, como uma quantidade suficiente para modular receptores de enzima lisossômicos ou suas atividades para assim tratar essa doença de depósito lisossômico ou sintomas da mesma (por exemplo, uma redução ou eliminação da presença ou incidência de "corpos de zebra" ou vacuolização celular após a administração das composições da presente invenção a um sujeito). Geralmente, a quantidade de um agente terapêutico (por exemplo, a rhNaGlu da invenção) administrada a um sujeito em necessidade da mesma dependerá das características do sujeito. Essas características incluem a condição, gravidade da doença, saúde geral, idade, sexo e peso corporal do sujeito. Um especialista na técnica será rapidamente capaz de determinar as doses apropriadas dependendo destes e outros fatores relacionados.

opcionalmente, ser empregados para identificar os intervalos de dosagem ideais.

[237] Uma quantidade terapeuticamente eficaz é geralmente administrada em um regime de dosagem que pode compreender várias doses unitárias. Para qualquer proteína terapêutica particular, uma quantidade terapeuticamente eficaz (e/ou uma dose unitária apropriada dentro de um regime de dosagem eficaz) pode variar, por exemplo, dependendo da via de administração, em combinação com outros agentes farmacêuticos. Além disso, a quantidade terapeuticamente eficaz específica (e/ou dose unitária) para qualquer paciente particular pode depender de uma variedade de fatores, incluindo o distúrbio a ser tratado e a gravidade do distúrbio; a atividade do agente específico farmacêutico empregado; a composição específica empregada; a idade, peso corporal, saúde geral, sexo e dieta do paciente; o tempo de administração, a via de administração, e/ou taxa de excreção ou metabolismo da proteína de fusão específica empregada; a duração do tratamento; e fatores semelhantes como é bem conhecido nas técnicas médicas.

[238] Em algumas modalidades, os intervalos de dose terapêuticos eficazes variam de cerca de 0,005 mg/kg de peso corporal a 500 mg/kg de peso corporal, por exemplo, de cerca de 0,005 mg/kg de peso corporal a 400 mg/kg de peso corporal, de cerca de 0,005 mg/kg de peso corporal a 300 mg/kg de peso corporal, de cerca de 0,005 mg/kg de peso corporal a 200 mg/kg de peso corporal, de cerca de 0,005 mg/kg de peso corporal a 100 mg/kg de peso corporal, de cerca de 0,005 mg/kg de peso corporal a 90 mg/kg de peso corporal, de cerca de 0,005 mg/kg de peso corporal a 80 mg/kg de peso corporal, de cerca de 0,005 mg/kg de peso corporal a 70 mg/kg de peso corporal, de cerca de 0,005 mg/kg de peso corporal a 60 mg/kg de peso corporal, de cerca de 0,005 mg/kg de peso corporal a 50 mg/kg de peso corporal, de cerca de 0,005 mg/kg de peso corporal a 40 mg/kg de peso corporal, de cerca

cerca de 0,005 mg/kg de peso corporal a 25 mg/kg de peso corporal, de cerca de 0,005 mg/kg de peso corporal a 20 mg/kg de peso corporal, de cerca de 0,005 mg/kg de peso corporal a 15 mg/kg de peso corporal, de cerca de 0,005 mg/kg de peso corporal a 10 mg/kg de peso corporal. Os intervalos e valores intermédios aos intervalos e valores acima citados (por exemplo, 10-50 mg/kg, 1-5 mg/kg, 2-8 mg/kg, 5-10 mg/kg, 0,1-10 mg/kg, 0,3-30 mg/kg, 0,3-50 mg/kg, 0,5-10 mg/kg, 5-30 mg/kg ou 6-27 mg/kg) também estão previstos para ser parte da invenção.

[239] Em algumas modalidades, a dose terapêutica eficaz é maior que ou pelo menos cerca de 0,1 mg/kg de peso corporal, maior que ou pelo menos cerca de 0,2 mg/kg de peso corporal, maior que ou pelo menos cerca de 0,3 mg/kg de peso corporal, maior que ou pelo menos cerca de 0,4 mg/kg de peso corporal, maior que ou pelo menos cerca de 0,5 mg/kg de peso corporal, maior que ou pelo menos cerca de 1,0 mg/kg de peso corporal, maior que ou pelo menos cerca de 3 mg/kg de peso corporal, maior que ou pelo menos cerca de 5 mg/kg de peso corporal, maior que ou pelo menos cerca de 6 mg/kg de peso corporal, maior que ou pelo menos cerca de 7 mg/kg de peso corporal maior que ou pelo menos cerca de 10 mg/kg de peso corporal, maior que ou pelo menos cerca de 15 mg/kg de peso corporal, maior que ou pelo menos cerca de 20 mg/kg de peso corporal, maior que ou pelo menos cerca de 30 mg/kg de peso corporal, maior que ou pelo menos cerca de 40 mg/kg de peso corporal, maior que ou pelo menos cerca de 50 mg/kg de peso corporal, maior que ou pelo menos cerca de 60 mg/kg de peso corporal, maior que ou pelo menos cerca de 70 mg/kg de peso corporal, maior que ou pelo menos cerca de 80 mg/kg de peso corporal, maior que ou pelo menos cerca de 90 mg/kg de peso corporal, maior que ou pelo menos cerca de 100 mg/kg de peso corporal. Intervalos e valores intermediários aos intervalos e valores acima recitados também estão previstos para ser parte da invenção.

pode também ser definida por mg/kg de peso de cérebro. Como um especialista na técnica apreciaria, os pesos do cérebro e peso corporal podem ser correlacionados (ver, por exemplo, Dekaban AS. "Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights," Ann Neurol 1978; 4:345-56).

[241] Em algumas modalidades, a dose terapêutica eficaz pode também ser definida por mg/15 cc de CSF. Como um especialista na técnica apreciaria, doses terapeuticamente eficazes com base no peso do cérebro e peso corporal podem ser convertidos em mg/15 cc de CSF. Por exemplo, o volume de CSF em humanos adultos é cerca de 150 mL (Johanson CE, et al. "Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease," Cerebrospinal Fluid Res. 2008 May 14;5: 10). Portanto, injeções de dose única de 0,1 mg a 50 mg de proteína para adultos seria doses de cerca de 0,01 mg/15 cc de CSF (0,1 mg) a 5,0 mg/15 cc de CSF (50 mg) em adultos.

[242] Deve ser ainda entendido que, para qualquer sujeito particular, os esquemas de dosagem específicos devem ser ajustados ao longo do tempo de acordo com a necessidade individual e o julgamento profissional da pessoa administrando ou supervisionando a administração da terapia de reposição enzimática e que os intervalos de dosagem aqui estabelecidos são exemplares apenas e não se destinam a limitar o escopo ou prática da invenção reivindicada.

VIII. Kits

[243] A presente invenção ainda fornece kits ou outros artigos de fabricação que contêm a NaGlu humana recombinante da presente invenção e fornecem instruções para sua reconstituição (se liofilizado) e/ou uso. Kits ou outros artigos de fabricação podem incluir um recipiente, um cateter e quaisquer outros artigos, dispositivos ou equipamentos úteis na administração intratecal e cirurgia associada. Recipientes apropriados incluem,

pré-preenchidas), ampolas, cartuchos, reservatórios ou *lyo-jetcts*. O recipiente pode ser formado a partir de uma variedade de materiais como vidro ou plástico. Em algumas modalidades, um recipiente é uma seringa pré-preenchida. Seringas pré-preenchidas apropriadas incluem, entre outras, seringas de vidro de borosilicato com silicone cozido, revestimento, seringas de vidro de borosilicato com silicone pulverizado, ou seringas de resina plástica sem silicone.

[244] Normalmente, um rótulo no, ou associado com, o recipiente pode indicar instruções para uso e/ou reconstituição. Por exemplo, o rótulo pode indicar que a formulação é reconstituída para concentrações de proteína conforme descritas acima. O rótulo pode indicar ainda que a formulação é útil ou destina-se para, por exemplo, administração intravenosa ou intratecal. Em algumas modalidades, um recipiente pode conter uma única dose de uma formulação estável que contém uma enzima de substituição (por exemplo, uma proteína NaGlu recombinante). Em várias modalidades, uma dose única da formulação estável está presente em um volume menor que cerca de 15 mL, 10 mL, 5,0 mL, 4,0 mL, 3,5 mL, 3,0 mL, 2,5 mL, 2,0 mL, 1,5 mL, 1,0 mL ou 0,5 mL. Alternativamente, um recipiente mantendo a formulação pode ser um frasco multi-uso, que permite administrações repetidas (por exemplo, de 2-6 administrações) da formulação. Os kits ou outros artigos de fabricação ainda podem incluir um segundo recipiente compreendendo um diluente apropriado (por exemplo, BWFI, solução salina, solução salina tamponada). Após misturar o diluente e a formulação, a concentração final de proteína na formulação reconstituída será geralmente pelo menos 1 mg/mL (por exemplo, pelo menos 5mg/mL, pelo menos, 10 mg/mL, pelo menos 25 mg/mL, pelo menos 50 mg/mL, pelo menos 75 mg/mL, pelo menos 100 mg/mL).

[245] Os kits e outros artigos de fabricação aonde podem incluir outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial e de usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas,

valores intermediários aos intervalos e valores acima recitados também estão previstos para ser parte da invenção.

EXEMPLOS

[246] Os seguintes exemplos específicos destinam-se a ilustrar a invenção e não devem ser interpretados como limitando o escopo das reivindicações. O conteúdo de todas as figuras e todas as referências, patentes e pedidos de patente publicados citados ao longo deste pedido, bem como as Figuras, é expressamente incorporado aqui como referência em sua totalidade.

Exemplo 1

Purificação de rhNaGlu

[247] A proteína rhNaGlu foi purificada usando métodos conhecidos técnica. Clara do ovo (EW) contendo rhNaGlu foi solubilizada em pH 6 durante a noite e clarificada através de centrifugação e/ou filtração de profundidade. A EW foi ajustada com 1 M de tampão NaOAc (pH 4) para pH 6. Para o processo de filtração de profundidade, filtro T2600 (Pall™, 40 µm) foi usado como uma 1ª filtração e então PDF1 (Pall™, K200P, 15 µm + EKS, 0,22 µm) como uma 2ª etapa de filtração. Os filtros são de membrana de uso único com capacidade otimizada de 60 L EW/m² para cada filtro. O volume de espera da membrana é de 2 L/m² para T2600 e 4-5 L/m² para PDF1. No processo, o volume de espera foi descartado antes de o EW filtrado ser coletado. O tampão (20 mM Fosfato/137 mM NaCl, pH 6) equivalente ao volume de espera da membrana foi usado para captar a EW sobressalente nos filtros.

[248] Uma coluna de fenil-HIC (cromatografia de interação hidrofóbica) foi aplicada como uma etapa de captura. Uma vez que a maioria das proteínas da clara do ovo são hidrofílicas, 99% das proteínas da clara do ovo passaram através da coluna HIC pelo fluxo. rhNaGlu tem uma maior ligação de hidrofobicidade para fenil-HIC.

[249] A clara do ovo contendo rhNaGlu foi carregada na coluna com uma razão de 30:1. Após a conclusão do carregamento, a

pH 6 e tampão Tris 5 mM, pH 7,2. rhNaGlu foi eluída com 30% de propileno glicol, pH 7,2. Após a conclusão do carregamento, a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio e tampão fosfato 5 mM (pH 6). rhNaGlu foi eluída com 30% de propileno glicol com tampão Tris 5 mM (pH 7,2). A capacidade de ligação da coluna é de aproximadamente 4,5 mg/mL. A pureza de rhNaGlu através da coluna de fenil-HIC pode ser alcançada para >95% (950 aumentos de tempo). A recuperação é de aproximadamente 80% com 30% de eluição de propileno glicol.

[250] A fração de rhNaGlu eluída foi ajustada para pH 5 com 1 M de ácido acético e então carregada em uma coluna de GigaCap S (EW: tamanho de coluna=10: 1). A coluna foi equilibrada com tampão NaOAc 50 mM (pH 5). Após a conclusão do carregamento, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio. A rhNaGlu foi eluída com 50mM NaOAc/60 mM NaCl (pH 5).

[251] A caracterização de proteínas foi realizada usando rhNaGlu purificada. O peso molecular de rhNaGlu (~90 kDa) purificada a partir da clara do ovo foi analisado em SDS-PAGE (Fig. 6). O nível de expressão média de rhNaGlu na clara do ovo é mostrado na Fig. 7. As características da rhNaGlu produzida a partir do aviário transgênico estão resumidas na Tabela 2.

Tabela 2.

	rhNaGlu (<i>Gallus</i>)
Peso Molecular Aparente	~90 kDa
pI	6,1-6,9
Estabilidade de pH	pH 5-8
Estabilidade na Clara de Ovo	> 50 dias

Exemplo 2

Estabilidade de rhNaGlu na clara do ovo

[252] Um único ovo foi rachado 7 dias após ser posto e analisado para a atividade. Os conteúdos foram divididos ao meio e cada metade foi submetida ao clareamento de clara do ovo padrão.

armazenadas a 4°C e -20°C para estabilidade da atividade enzimática. rhNaGlu na clara do ovo mostrou atividade enzimática estável pelo menos por até 50 dias.

[253] Foi avaliada a estabilidade do ciclo de congelamento/descongelamento. A rhNaGlu purificada foi congelada em nitrogênio líquido por 10 segundos e descongelada a 37 °C por 2 min. A atividade de enzima não mostrou alteração para 10 ciclos.

[254] A rhNaGlu purificada foi dialisada em diferentes tampões de pH para medir a estabilidade da enzima pura. Os resultados mostraram que rhNaGlu pura manteve-se estável entre pH 5-8 por 12 dias.

Exemplo 3

Criação de Perfil de Oligossacarídeo

[255] Manose-6-fosfato (M6P) é um monossacarídeo terminal de oligossacarídeos N-ligados que é uma parte importante da estrutura terciária da glicoproteína e, quando incorporado no oligossacarídeo final da glicoproteína, é reconhecido pelo e ligado aos receptores de M6P presentes na superfície das células, permitindo posteriormente a internalização nos lisossomos. Assim, M6P é um epítipo eficaz para o direcionamento de glicoproteínas para os lisossomos.

[256] A análise da glicosilação da proteína é uma parte importante da caracterização da glicoproteína. Os oligossacarídeos podem estar ligados a uma proteína através de uma serina ou uma treonina como glicanos O-alinhados ou através de uma asparagina como glicanos N-ligados.

[257] Para analisar a estrutura de oligossacarídeos, várias técnicas cromatográficas e espectroscópicas foram realizadas. Cromatografia de troca de ânion de alto desempenho com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) foi empregada. Usando esta técnica, os oligossacarídeos rapidamente foram separados em grupos gerais com base na carga (ou seja, neutros, levemente carregados, ou multiplamente carregados) e suas estruturas foram

[258] Todos os métodos foram baseados em protocolos descritos por Hardy e Townsend (Hardy, M. R., and Townsend, R. R., "High-pH anion-exchange chromatography of glycoprotein-derived carbohydrates", 1994, *Methods Enzymol.* 230: 208-225). As amostras purificadas de rhNaGlu derivadas de aviário transgênico foram dialisadas usando um Tubo-O-Dialisador contra água nanopura a 4°C por cerca de 24 horas para remover sais e outros contaminantes. A água nanopura foi substituída quatro vezes durante o período inteiro de diálise. Após a diálise, cada uma das amostras foi dividida em três alíquotas. A alíquota destinada para análise de açúcares neutros e amino foi hidrolisada com 2 N ácido trifluoroacético (TFA) a 100°C por 4 horas e a alíquota para a análise de manose-6-fosfato foi hidrolisada com 6,75 N TFA a 100°C por 1,5 horas. Os hidrolisados foram então secos sob N₂, redissolvidos com 50 µL H₂O, sonicados por 7 min em gelo e transferidos para um frasco de injeção.

[259] Uma mistura de padrões para açúcares neutros e amino e para manose-6-fosfato com um número conhecido de moles foi hidrolisada da mesma maneira e ao mesmo tempo que a amostra. Quatro diferentes concentrações da mistura padrão de açúcares neutros e amino e manose-6-fosfato foram preparadas para estabelecer uma equação de calibração. O número de moles de cada açúcar na amostra foi quantificado por interpolação linear da equação de calibração.

[260] O perfil de oligossacarídeo e manose-6-fosfato foram analisados separadamente por HPAEC-PAD. O controle do instrumento e aquisição de dados foram realizados usando o software Dionex chromeleon. A análise HPAEC-PAD de rhNaGlu hidrolisada detectou M6P. A quantidade medida média de M6P foi 3,8 µg (CV 3,7%) por 210 µg de proteína hidrolisada. A conversão para moles resultou em 13,4 nmol de M6P por 2,8 nmol de proteína, o que foi equivalente a uma taxa de 3,2 moles de M6P por mole de proteína.

[261] O perfil de oligossacarídeo também foi obtido para

demonstraram boa repetibilidade da reação F PNGase na amostra única. Grupos de pico foram observados em regiões correspondentes aos oligossacarídeos neutros (~10 min a ~20 min). Um grupo de picos significativamente menores de eluição entre ~25 e ~35 min também foram observados, que foram possivelmente atribuídos a espécies ligeiramente carregadas.

[262] Os resultados da análise da composição de monossacarídeos obtidos de amostras de rhNaGlu produzidos a partir de um aviário transgênico (*Gallus*) estão resumidos na Tabela 3, que tabula a razão molar média de cada monossacarídeo analisado para rhNaGlu.

Tabela 3. Razões molares de monossacarídeo em rhNaGlu (*Gallus*)

N-acetilgalactosamina (GalNAc)	1,1*
N-acetilglicosamina (GlcNAc)	35,6*
Galactose (Gal)	4*
Manose (Man)	25,5*
Manose-6-fosfato (M6P)	3,2*
Fucose	Não detectado
Glicose	Não detectado

*mole de monossacarídeo por mole de proteína

Exemplo 4

Absorção Celular em Fibroblastos

[263] Fibroblastos humanos de tipo selvagem e fibroblastos humanos com mucopolissacaridose III B (deficiente em NaGlu) foram colocados em uma placa de 24 poços ($2,5 \times 10^4$ células por poço) e incubados durante a noite a 37°C em 5% CO₂. Meio condicionado contendo meio basal do fibroblasto e kit de crescimento de fibroblasto contendo pouco soro foi usado. Várias quantidades de rhNaGlu (30, 10, 3,0, 1,0, 0,3 e 0 µg/mL) foram co-incubadas por 24 horas a 37°C com 5% de CO₂ para determinar os níveis de absorção celular de fibroblastos humanos (ver, Fig. 9). Os poços foram lavados três vezes com PBS. 100 µL de tampão de lise foram

lisado celular foi transferido em tubo de centrífuga de 1,5 mL. Um ciclo de congelamento e descongelamento foi realizado. O lisado celular foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 min. 25µL de sobrenadante foram usados para o ensaio. O tempo de ensaio foi de 2 horas. A atividade de enzima foi medida usando os métodos conhecidos na técnica e de acordo com os métodos descritos em Marsh et al., *Clinical Genetics* (1985) 27: 258-262, Chow et al., *Carbohydrate Research* (1981) 96:87-93; Weber et al., *Protein Expression and Purification*, (2001)21:251-259).

[264] Conforme mostrado na Fig. 9, o controle negativo (ou seja, MPS IIIB) não apresentou qualquer atividade NaGlu enquanto o controle positivo (ou seja, fibroblasto humano de tipo selvagem) mostrou atividade NaGlu. As células de MPS IIIB tratadas com 0,3 µg/mL de rhNaGlu apresentaram cerca de 50% do nível normal de atividade observado nas células de fibroblasto de tipo selvagem. As células de MPS IIIB tratadas com 1 µg/mL de rhNaGlu demonstraram atividade NaGlu que foi cerca de 4 vezes maior que a observada nas células de tipo selvagem. Surpreendentemente, as células de MPS IIIB tratadas com 30 µg/mL de rhNaGlu demonstraram atividade NaGlu que foi cerca de 40 vezes maior que a observada nas células de tipo selvagem. Este resultado indicou que rhNaGlu produzida a partir de um aviário transgênico (*Gallus*) foi eficientemente internalizada em fibroblastos humanos em alto nível.

[265] Para determinar se a internalização da rhNaGlu é através de endocitose mediada por receptor de M6P, ensaios de inibição de M6P foram realizados. Para os ensaios de inibição de M6P, várias concentrações de M6P livre foram adicionadas aos fibroblastos humanos MPS IIIB tratados com 30 µg/mL de rhNaGlu e a atividade enzimática foi medida conforme descrito acima. Conforme mostrado na Fig. 10, os fibroblastos humanos MPS IIIB não apresentam qualquer atividade NaGlu, sugerindo inibição eficaz de absorção de NaGlu pelo M6P livre. Em contraste, fibroblastos

apresentaram um alto nível de atividade enzimática, sugerindo que a proteína foi eficientemente internalizada nos fibroblastos deficientes em NaGlu e manteve a atividade. Esta atividade enzimática foi inibida pela presença de monossacarídeo de M6P no meio na concentração de 0,03 mM e superior. A presença de monossacarídeo 1mM de M6P em meio condicionado inibiu mais de 90% da absorção celular da proteína.

[266] Estes resultados indicaram que a rhNaGlu produzida a partir de um aviário transgênico foi eficientemente internalizada em fibroblastos MPS IIIB através de endocitose mediada por receptores de M6P e a rhNaGlu competiu com monossacarídeos M6P para o reconhecimento pelo receptor. Os resultados foram consistentes com a análise de glicano que revelou a presença das estruturas de M6P na rhNaGlu produzida a partir do aviário transgênico.

Exemplo 5

Geração de Proteínas de Fusão NaGlu Ativas

[267] Dois constructos de fusão rhNaGlu diferentes foram projetadas para validar a viabilidade de expressar proteínas de fusão rhNaGlu no sistema de expressão aviário.

[268] Em um constructo, uma sequência de ácido nucleico que codifica 8 resíduos de aspartato consecutivos (DDDDDDDD) foi fundida à sequência de ácido nucleico que codifica a proteína NaGlu na extremidade 5' da sequência de cDNA de NaGlu inteira (SEQ ID NO:2) usando a tecnologia de PCR e DNA recombinante convencional. Em outro constructo, uma sequência de ácido nucleico que codifica TfRL (ou seja, THRPPMWSPVWP; SEQ ID NO:5) foi fundida à sequência de ácido nucleico que codifica NaGlu na extremidade 3' da sequência de cDNA de NaGlu inteira. Cada constructo foi inserido no vetor de expressão pTT22 usando sítios de restrição EcoRI e HindIII. Os vetores resultantes foram cada um transfectados em células de rim humano embrionário (HEK) 293 e clones estáveis que expressam altos níveis de proteínas de fusão

resíduos de ácido aspártico consecutivos no N-terminal (AAA-NaGlu) e uma proteína rhNaGlu fundida ao ligante do receptor de transferrina (TfRL) no C-terminal (NaGlu - TfRL) foram isoladas a partir do meio condicionado.

[269] A atividade enzimática da AAA-NaGlu e NaGlu-TfRL foi medida usando os métodos conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Marsh et al., *Clinical Genetics* (1985) 27:258-262; Chow et al., *Carbohydrate Research*, (1981) 96:87-93; Weber et al., *Protein Expression and Purification* (2001) 21 :251-259; Neufeld et al., *Protein Expression and Purification* (2000) 19:202-211 ; e Weber et al., *Human Molecular Genetics* (1996) 5:771-777.

[270] Conforme mostrado nas Figs. 13 e 14, as proteínas de fusão AAA-NaGlu e NaGlu-TfRL produzidas a partir de células HEK293 mostraram altos níveis de atividade enzimática. Estes resultados confirmaram a possibilidade que esses constructos podem ser usados para produzir proteínas de fusão NaGlu que têm níveis aumentados de manose fosforilada enquanto mantêm atividade enzimática de um sistema de expressão de aviário transgênico.

Exemplo 6

Absorção Celular em Macrófagos

[271] A internalização de rhNaGlu produzida a partir de *Gallus* em células de macrófagos humanos também foi medida. Células de macrófagos NR8383 foram incubadas com 10µg/mL de rhNaGlu em meios de crescimento F12 por 0, 4, 8, 24, 32 e 48 horas a 37 °C com 5% de CO₂. As amostras foram recuperadas e lavadas com PBS antes da lise. $2,5 \times 10^5$ células foram lisadas em 1 mL de tampão de lise (10mM de Na Fosfato pH6,0, 0,05% NP40) e lisados transferidos em tubos de centrifuga de 1,5 mL e centrifugados a 10.000 rpm por 10 min. A concentração de proteína foi determinada através do ensaio de Bradford e alíquotas foram congeladas para ensaios de enzima NaGlu.

[272] A atividade enzimática foi medida usando métodos padrão. 25mM de substrato (4-metilumbeliferil 2-Acetamido-2-deoxi-

formar um estoque de substrato de trabalho. As diluições de amostras foram preparadas em tampão do ensaio (1% de albumina de soro bovino). 25µL de acetato de sódio 200mM foram distribuídos aos poços de uma placa multi-poços. 25µL do padrão e 25µL das amostras foram adicionadas aos poços designados. 50µL do estoque de substrato de trabalho foram adicionados a cada poço e a placa foi delicadamente tampada para misturar. A placa foi selada com película adesiva e incubada a 37°C por 30 minutos. A reação foi então encerrada pela adição de 50µL da solução de paragem (1M glicina pH 12,5). A placa foi colocada em um leitor de microplacas usando um fundo de fluorescência e a intensidade foi medida em uma excitação de 360nm e uma emissão de 460nm. O nível de 4-metilumbeliferona (4-MU) liberado foi medido por comparação com padrões de 4-MU em 0,25 mM, 0,125 mM, 0,0625 mM, 0,0312 mM, 0,0156 mM e 0,0078 mM.

[273] Conforme mostrado na Fig. 15, os níveis da atividade de NaGlu em macrófagos incubados com 10µg/mL de rhNaGlu aumentaram quase linearmente ao longo de um período de 48 horas: A absorção de rhNaGlu por macrófagos foi um pouco lenta, mas constante durante todo o período de tempo medido. A absorção relativamente lenta, prolongada da atividade de NaGlu (em comparação com outras enzimas lisossômicas contendo M6P e/ou manose em suas estruturas de glicosilação) foi inesperada e surpreendente. Igualmente surpreendente e inesperado foi que uma grande quantidade de proteínas rhNaGlu foi absorvida em macrófagos durante o período de tempo prolongado, resultando em níveis de atividade enzimática intracelular, pelo menos, 10, 50, 100, 200, 300, 500, ou até mesmo 1.000 vezes maiores que os níveis basais observados em macrófagos de tipo selvagem não expostos a rhNaGlu. Os resultados demonstram que rhNaGlu é extremamente estável em ambientes extracelulares, bem como intracelulares. Além disso, estes resultados sugerem que rhNaGlu pode possuir características físico-químicas que permitem maiores meias vidas séricas (por exemplo, maior circulação) e

para absorção potencializada no sistema nervoso central (CNS).

Tabela 4. Sumário das Características de NaGlu

	rhNaGlu produzida por aviário (<i>gallus</i>)	NaGlu humana natural	NaGlu humana produzida por CHO
Peso Molecular Aparente (kDa)	~85 - ~90	~86	~79 - ~89
Atividade enzimática (nmol/min/mg)	>1,000	~500	~1,057
Manose-6- fosfato	Alta	Alta	Nenhuma ou muito baixa

Exemplo 7

Administração de rhNaGlu em Camundongos Deficientes em NaGlu

[274] Camundongos nulos homozigóticos foram gerados a partir de casais da cepa B6.129S6-NaGlu^{tmlEfn}/J. Camundongos do tipo selvagem foram gerados da mesma maneira. A genotipagem foi realizada de acordo com um protocolo padrão de PCR. É descrito na técnica que no nascimento os camundongos nulos *naclu*^{-/-} homozigotos são viáveis, normais em tamanho, e não apresentam quaisquer anormalidades físicas ou comportamentais brutas, embora não apresentem NaGlu em todos os tecidos (ver, Li et al., (1999) *Proc, Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14505-14510). Em um mês de idade, os macrófagos vacuolados são encontrados na maioria dos tecidos. As células epiteliais nos rins e neurônios em algumas partes do cérebro também são afetadas. A vacuolização torna-se mais proeminente com a idade. Em 4-5 meses, os camundongos mostram comportamento anormal em um teste de campo aberto. Os animais mais velhos podem ter retenção urinária e dificuldade em andar. A expectativa de vida típica de camundongos nulos *naclu*^{-/-} homozigotos é de 8-12 meses (ver, Li et al., (1999) *Proc, Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14505-14510).

[275] A administração intravenosa do veículo e artigo de teste por injeção na veia da cauda foi realizada como segue. Antes da injeção a vasodilatação foi alcançada aquecendo suavemente o animal com uma lâmpada incandescentes ou por imersão da cauda em água quente, cerca de 43°C. O animal foi então colocado no dispositivo de retenção. A superfície da cauda foi desinfetada com isopropanol 70% antes da injeção. As veias laterais da cauda estão localizadas logo abaixo da pele e são identificadas na parte distal da cauda com a aplicação de tensão. Uma agulha 27G, bisel para cima, foi inserida na veia para 3 a 4 mm. O veículo ou artigo de teste foi então administrado como uma injeção em bolus lenta durante um período de dez segundos, conforme evidenciado pela compensação observada da veia à medida que o líquido administrado momentaneamente ocupa o espaço vascular. Após a remoção da agulha, pressão suave foi aplicada ao local de punção para fornecer hemostasia. O animal foi monitorado imediatamente após o procedimento, para garantir a atividade normal.

Administração Intratecal (IT)

[276] A administração intratecal de veículo e artigo de teste por injeção de punção lombar foi realizada da seguinte forma. Antes da injeção, os animais foram anestesiados usando isoflurano que foi mantido através do cone de nariz durante todo o procedimento. O local da injeção foi preparado pela raspagem do pelo, conforme necessário, antes de cada injeção. O animal foi colocado de bruços em uma plataforma, garantindo que os membros posteriores fossem espalhados na plataforma formando uma curva convexa nas costas dos animais. A superfície das costas foi limpa com 70% de isopropanol e seca pelo ar antes da injeção. A coluna vertebral e ossos do quadril foram palpados para localizar a margem L4-L5 ou L5-L6. Uma agulha 30G, bisel voltado cranialmente, foi inserida no espaço intervertebral. O posicionamento foi confirmado pela observação de um movimento da cauda. O veículo ou artigo de teste foi então administrado como injeção em bolus. O

após o procedimento para assegurar a atividade normal e o uso dos membros.

Resultados

[277] Aos camungondos *naglu*^{-/-} com doze semanas (B6.129S6-*Naglu*^{tmlEfn}/J) foram administrados *rhNaGlu* (*Gallus*) em níveis de dose de 6,75 ou 27 mg/kg através de injeção na veia da cauda (administração IV), uma vez em dias alternados, para um total de 5 doses (em concentrações *rhNaGlu* 1,125, ou 4,5 mg/mL, respectivamente). Da mesma forma, camungondos *naglu*^{-/-} com doze semanas foram administrados com *rhNaGlu* (*Gallus*) em uma dose de 0,31 mg/kg através de injeção de punção lombar (administração IT), em dias alternados, por um total de 5 doses em concentrações *NaGlu* de 1,54 mg/mL. O veículo (tampão de fosfato 10 mM, 150 mM NaCl e 0,02% Tween80, pH 5,5-5,8) foi administrado a camundongos nocaute *naglu*^{-/-} na mesma concentração de dose por 5 doses em dias alternados. Camundongos nocaute *naglu*^{-/-} de tipo selvagem não tratados também foram mantidos pela duração do estudo.

[278] Os animais foram sacrificados 4 horas após a quinta e última injeção. Todos os animais foram autopsiados e o fígado, cérebro, baço, coração, pulmão e rins foram extirpados. Cada órgão foi dividido sagitalmente, fornecendo amostras para armazenamento congelado (-80°C) e fixado em formalina.

[279] As amostras de tecido foram analisadas para: (1) concentração de sulfato de heparan usando um método analítico com base na análise de SAX-HPLC de dissacarídeos de sulfato de heparan; e (2) atividade da enzima α -N-acetilglicosaminidase usando um ensaio de atividade enzimática baseado em célula.

[280] A avaliação histopatológica do tecido de cérebro, fígado, rim, baço, coração e pulmão foi realizada usando amostras de tecido fixadas em formalina, incorporadas em parafina, seccionadas em 4 μ m, montadas em lâminas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E).

[281] Após a administração intravenosa repetida (5 doses

naglu^{-/-} em níveis de doses de 6,25 e 27 mg/kg de peso corporal, houve uma aparente diminuição dose-dependente da concentração de Sulfato de Heparan no cérebro, fígado e rim de camundongos naglu^{-/-} (Tabela 5; Figs. 16-18). A atividade de α -N-acetilglicosaminidase relativa foi aumentada no cérebro e no fígado após a administração intravenosa (Tabela 6). Estes resultados foram inesperados e surpreendentes, pois as atividades enzimáticas de NaGlu e depuração do substrato resultante foram observadas no cérebro dos camundongos naglu^{-/-} tratados com a administração IV, sugerindo que rhNaGlu (*Gallus*) administrada sistemicamente foi distribuída para o cérebro de camundongos naglu^{-/-} e foi eficaz para obter eficácia mesmo na presença da barreira hemato-encefálica (BBB).

[282] Após a administração intratecal (5 doses durante um período de 10 dias) de rhNaGlu (*Gallus*) para camundongos naglu^{-/-} com um nível de dose de 0,31 mg/kg, houve uma diminuição da concentração de Sulfato de Heparan no cérebro de camundongos naglu^{-/-} (Tabela 5; Fig. 19), sugerindo que rhNaGlu (*Gallus*) foi direcionada para o cérebro e é eficaz na redução do substrato acumulado no cérebro de camundongos naglu^{-/-}.

Tabela 5: Nível de Substrato no tecido (rhNaGlu *Gallus*)

	484	KO	13	veículo	0	IV	0.073	0.085875	0.009972
	487	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	0.045		
	492	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	0.044119		
	504	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	0.044	0.044373	0.000546
	481	KO	13	rhNaGlu	27	IV	0.017796		
	485	KO	13	rhNaGlu	27	IV	0.016668		
	490	KO	13	rhNaGlu	27	IV	0.028	0.020821	0.006242
	86	KO	15	veículo	0	IT	0.094521		
	91	KO	14	veículo	0	IT	0.072623	0.083572	0.015484
	94	KO	14	rhNaGlu	0.31	IT	0.038866		
	101	KO	14	rhNaGlu	0.31	IT	0.028229	0.033548	0.007521

na: Não aplicável (camundongos foram não tratados).

Tabela 6: Atividade enzimática do tecido (rhNaGlu *Gallus*; proteína U/NG)

Tecido	Número do Animal	Genótipo	Idade do Sacrifício (sem.)	Tratamento	Dose (mg/kg)	Via	Atividade Enzimática (U/ug de proteína)
CÉREBRO	253	WT	4	na	-	-	7.7
	178	KO	12	na	-	-	0
	474	KO	13	veículo	0	IV	0
	479	KO	13	veículo	0	IV	0
	484	KO	13	veículo	0	IV	0.575
	487	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	10.58
	492	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	5.066666667
	504	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	4.033333333
	481	KO	13	rhNaGlu	27	IV	87.91666667
	485	KO	13	rhNaGlu	27	IV	90.15
	490	KO	13	rhNaGlu	27	IV	17.35
FÍGADO	253	WT	4	na	-	-	36.69
	178	KO	12	na	-	-	0
	474	KO	13	veículo	0	IV	0
	479	KO	13	veículo	0	IV	0
	484	KO	13	veículo	0	IV	0
	487	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	512.92
	492	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	378.805
	504	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	607.9225
	481	KO	13	rhNaGlu	27	IV	659.6825
	485	KO	13	rhNaGlu	27	IV	654.2475
	490	KO	13	rhNaGlu	27	IV	677.8725

na: não aplicável (camundongos foram não tratados)

[283] Cada exemplo no relatório descritivo acima é

invenção. Na verdade, será evidente para os especialistas na técnica que várias modificações, combinações, adições, exclusões e variações podem ser feitas na presente invenção sem se afastar do escopo ou espírito da invenção. Por exemplo, as características ilustradas ou descritas como parte de uma modalidade podem ser usadas em outra modalidade para produzir ainda outra modalidade. Pretende-se que a presente invenção cubra essas modificações, combinações, adições, exclusões e variações.

[284] Todas as publicações, patentes, pedidos de patentes, sítios na internet, e números de acessão/sequências de bancos de dados (incluindo sequências de polinucleotídeo e polipeptídeo) aqui citados são aqui incorporados como referência em suas totalidades para todos os fins na mesma medida como se cada publicação individual, patente, pedido de patente, sítio na internet, ou números de acesso/sequências de bancos de dados fossem especificamente e individualmente indicados para serem incorporados como referência.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, **caracterizada** pelo fato de que compreende uma N-acetil-alfa-D-glicosaminidase recombinante humana (rhNaGlu) cuja sequência de aminoácidos é estabelecida em 24-743 de SEQ ID NO:1, em que dita rhNaGlu compreende uma quantidade suficiente de estruturas de glicano compreendendo manose-6-fosfato (M6P) de forma que dita rhNaGlu contendo M6P é internalizada em uma célula de mamífero tendo deficiência em NaGlu através de endocitose mediada por receptor de M6P e restaura pelo menos 50% de atividade de NaGlu observada em uma célula de tipo selvagem do mesmo tipo que expressa NaGlu endógena.

2. Composição, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que dita rhNaGlu compreende pelo menos 1 mole de M6P por mole de rhNaGlu.

3. Composição, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que dita rhNaGlu compreende manose.

4. Composição, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que dita rhNaGlu compreende N-acetilglicosamina (GlcNAc).

5. Composição, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que dita rhNaGlu compreende galactose.

6. Composição, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que dita rhNaGlu compreende N-acetilgalactosamina (GalNAc).

7. Composição, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que dita célula de mamífero deficiente em NaGlu é uma célula humana.

8. Composição, de acordo com a Reivindicação 7, **caracterizada** pelo fato de que dita célula humana é um fibroblasto da pele, uma célula neuronal, um hepatócito ou um macrófago.

5 9. Composição, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que dita rhNaGlu é produzida a partir de uma célula do oviduto de um aviário transgênico.

10 10. Composição, de acordo com a Reivindicação 1 **caracterizada** pelo fato de que quando internalizada *in vivo*, dita rhNaGlu restaura pelo menos 50% da atividade de NaGlu observada em uma célula do tipo selvagem do mesmo tipo expressando NaGlu endógena.

15 11. Composição, de acordo com a Reivindicação 1 ou 10, **caracterizada** pelo fato de que dita proteína rhNaGlu é glicosilada N-ligada.

12. Composição, de acordo com a Reivindicação 1 ou 10, **caracterizada** pelo fato de que dita proteína rhNaGlu é glicosilada O-ligada.

20 13. Composição, de acordo com a Reivindicação 1 ou 10, **caracterizada** pelo fato de que dita rhNaGlu compreende cerca de 2, 3, 4, 5 ou 6 moles de M6P por mole de rhNaGlu.

25 14. Uso de uma composição conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado** pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para o tratamento da deficiência em NaGlu.

30 15. Uso, de acordo com a Reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que o medicamento é administrado sistemicamente de tal modo que dita rhNaGlu

é efetivamente liberada ao cérebro de um mamífero tendo deficiência de NaGlu.

16. Uso, de acordo com a Reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que o medicamento é
5 administrado por via intravenosa de tal modo que dita rhNaGlu é efetivamente liberada ao cérebro de um mamífero tendo deficiência de NaGlu.

17. Vetor, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica
10 uma NaGlu humana operacionalmente ligada a um promotor de ovalbumina.

18. Célula hospedeira, **caracterizada** pelo fato de que compreende o vetor da Reivindicação 17.

19. Formulação farmacêutica, **caracterizada** pelo
15 fato de que compreende uma composição conforme definida na Reivindicação 1 a 13, em combinação com um carreador, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

20. Uso, de acordo com a Reivindicação 14 **caracterizado** pelo fato de que dita deficiência em NaGlu
20 é Sanfilippo B.

21. Uso, de acordo com a Reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que o medicamento é administrado em quantidade terapeuticamente eficaz a um
sujeito humano.

22. Uso, de acordo com a Reivindicação 21, **caracterizada** pelo fato de que o medicamento contendo a
25 dita proteína rhNaGlu humana recombinante é administrado por via intravenosa em uma dose de cerca de 1 a cerca de 30 mg/kg de peso corporal.

23. Uso, de acordo com a Reivindicação 14, **caracterizada** pelo fato de que o medicamento contendo a
30

dita proteína NaGlu humana recombinante é administrado por via intratecal ao sujeito humano.

24. Uso, de acordo com a Reivindicação 14, **caracterizada** pelo fato de que dita quantidade
5 terapêuticamente eficaz do medicamento é uma quantidade eficaz para reduzir os níveis de sulfato de heparan no cérebro, nos rins ou no fígado do sujeito.

25. Uso, de acordo com a Reivindicação 14, **caracterizada** pelo fato de que dita quantidade
10 terapêuticamente eficaz do medicamento é uma quantidade eficaz para aumentar a atividade de NaGlu no cérebro ou no fígado do sujeito.

26. Uso, de acordo com a Reivindicação 14, **caracterizada** pelo fato de que o medicamento é
15 adicionalmente administrado com um segundo agente terapêutico.

27. Uso, de acordo com a Reivindicação 26, **caracterizada** pelo fato de que o segundo agente terapêutico é um imunossupressor.

Sequência de Aminoácidos NaGlu Humana (peptídeo sinal: 1-23, sublinhado)

<u>MEAVAVAAAV</u> <u>GVLLLAGAGG</u> <u>AAGDEAREAA</u> AVRALVARLL GPGPAADFSV SVERALAACP	60
GLDTYSLGGG GAARVRVRGS TGVAAAAGLH RYLRFDFGCH VAWSGSQLRL PRPLPAVPGE	120
LTEATPNRYR YYQNVCTQSY SFVWWDWARW EREIDWMALN GINLALAWSG QEAINQRVYL	180
ALGLTQAEIN EFFTGPFLA WGRMGNLHTW DGPLPPSWHI KQLYLQHRVL DQMRSGMTP	240
VLPAPAGHVP EAVTRVFPQV NVTKMGSWGH FNCSYSCSFL LAPEDPIFPI IGSFLFLRELI	300
KEFGTDHIYG ADTFNEMQPP SSEPSYLAAA TTAVYEAMTA VDTEAVWLLQ GWLFQHQPF	360
WGPAQIRAVL GAVPRGRLLV LDLFAESQPV YTRTASFQGG PFIWCMLHNF GGNHGLFGAL	420
EAVNGGPRAA RLFPNSTMVG TGMAPGISQ NEVVYSLMAE LGWRKDPVPD LAAWVTSFAA	480
RRYGVSHPDG GAARLLLRV VYNCSGEACR GHNRSPLVRR PSLQMNTSIW YNRSDFEAW	540
RLLLTSAPSL ATSPAIFYDL LDLTRQAVQE LVSLYEEAR SAYLSKELAS LLRAGGVLAY	600
ELLPALDEVL ASDSRFLGS WLEQARAAAV SEAEADFYEQ NSRYQLTLWG PEGNILDYAN	660
KQLAGLVANY YTERWRLFLE ALVDSVAQGI PFQHQFDKN VFQLEQAFVL SKQRYPSQPR	720
GDTVDLAKKI FLKYYPRWVA GSW	743

(SEQ ID NO:1)

Fig. 1

Sequência Codificadora NaGlu Humana (cDNA)

atggaggcgg	tggcgggtggc	cgcggcggtg	ggggctccttc	tcctggccgg	ggccggggggc	60
gcggcaggcg	acgaggcccc	ggaggcggcg	gocgtgcggg	cgctcgtggc	ccggctgctg	120
gggccaggcc	ccgcggccga	cttctccgtg	tcgggtggagc	gcgctctggc	tgccaagccg	180
ggcttggaca	cctacagcct	gggcggcggc	ggcgcgcgcg	gcgtgcgggt	gcgcggctcc	240
acgggcgtgg	cagccgcgcg	ggggctgcac	cgtacctgc	gcgacttctg	tggctgccac	300
gtggcctggg	ccggctctca	gctgcgcctg	ccgcggccac	tgccagccgt	gccgggggag	360
ctgaccgagg	ccacgcccc	caggtaccgc	tattaccaga	atgtgtgcac	gcaaagctac	420
tctttcgtgt	ggtgggactg	ggcccgggtg	gagcgagaga	tagactggat	ggcgctgaat	480
ggcatcaacc	tggcaactgg	atggagcggc	caggaggcca	tctggcagcg	ggtgtacctg	540
gccttggggc	tgacccaggc	agagatcaat	gagttcttta	ctggctcctg	cttcttggca	600
tggggggcaa	tgggcaacct	gcacacctgg	gatggcccc	tgccccctc	ctggcacatc	660
aagcagcttt	atctgcagca	ccgggtcctg	gaccagatgc	gctccttcgg	catgacccca	720
gtgctgcctg	cattcgcggg	gcatgttccc	gaggtgtca	ccagggtggt	ccctcaggtc	780
aatgtcacga	agatgggcag	ttggggccac	tttaactggt	cctactcctg	ctccttcctt	840
ctggctccgg	aagaccccat	attccccatc	atcgggagcc	tcttcttgcg	agagctgac	900
aaagagtttg	gcacagacca	catctatggg	gccgacactt	tcaatgagat	gcagccacct	960
tctcagagc	cctcctatct	tgccgcagcc	accactgccg	tctatgaggc	catgactgca	1020
gtggatactg	aggtctgtgt	gctgctccaa	ggctggctct	tccagcacca	gccgcagttc	1080
tggggggccc	cccagatcag	ggctgtgctg	ggagctgtgc	ccgttggccg	cctcctgggt	1140
ctggacctgt	ttgctgagag	ccagcctgtg	tatacccgca	ctgcctcctt	ccaaggccag	1200
cccttcactc	ggtgcctgct	gcacaacttt	gggggaaatc	atggctcttt	tggagccttg	1260
gaggccgtga	acggaggccc	agaagctgcc	cgcctcttcc	ccaactccac	aatggtaggc	1320
acgggcatgg	cccccgaggg	catcagccag	aacgaagtgg	tctattccct	catggctgag	1380
ctgggctggc	gaaaggaccc	agtgccagat	ttggcagcct	gggtgaccag	ctttgcgcgc	1440
cggcggtatg	gggtctccca	cccgagccga	ggggcagcgt	ggaggctact	gctccggagt	1500
gtgtacaact	gctccgggga	ggcatgcagg	ggccacaatc	gtagcccgt	ggtcaggcgg	1560
ccgtccctac	agatgaatac	cagcatctgg	tacaaccgat	ctgatgtggt	tgaggcctgg	1620
cggctgctgc	tcacatctgc	tccctccctg	gccaccagcc	ccgccttccg	ctacgacctg	1680
ctggacctca	ctggcaggc	agtgcaggag	ctggctcagct	tgtattatga	ggaggcaaga	1740
agcgccctatc	tgagcaagga	gctggcctcc	ttgttgaggg	ctggaggcgt	cctggcctat	1800
gagctgctgc	cggcactgga	cgagggtgctg	gctagtgcac	gccgcttctt	gctgggcagc	1860
tggctagagc	aggcccgagc	agcggcagtc	agtgaggcgg	aggccgattt	ctacgagcag	1920
aacagccgct	accagctgac	cttgtggggg	ccagaaggca	acatcctgga	ctatgccaac	1980
aagcagctgg	cgggggttgg	ggccaactac	tacacccctc	gctggcgggt	tttccctggag	2040
gcgctggttg	acagtgtggc	ccagggcac	cctttccaac	agcaccagtt	tgacaaaaat	2100
gtcttccaac	tggagcaggc	cttcgttctc	agcaagcaga	ggtaccccag	ccagccgcga	2160
ggagacactg	tggacctggc	caagaagatc	tccctcaaat	attacccccg	ctgggtggcc	2220
ggctcttggg	gatt					2234

(SEQ ID NO:2)

Fig. 2

gttctgctgt	ttgctctaga	caactcagag	ttcaccatgg	aggcgggtggc	ggtggccgcg	8040
gcggtggggg	tcttctcct	ggccggggcc	gggggogcgg	caggcgacga	ggcccgggag	8100
gcggcgcccg	tgccggcgct	cgtggcccg	ctgctggggc	caggcccccgc	ggccgacttc	8160
tccgtgtcgg	tggagcgcg	tctggctgcc	aagccgggct	tggacaccta	cagcctgggc	8220
ggcgggcgcg	cgccgcgcgt	gcgggtgcgc	ggctccacgg	gcgtggcagc	cgccgcgggg	8280
ctgcaccgct	acctgcgga	cttctgtggc	tgccacgtgg	cctggtccgg	ctctcagctg	8340
cgcctgccgc	ggccactgcc	agccgtgccg	ggggagctga	ccgaggccac	gcccacagg	8400
taccgctatt	accagaatgt	gtgcacgcaa	agctactctt	tcgtgtggtg	ggactgggcc	8460
cgggtgggagc	gagagataga	ctggatggcg	ctgaatggca	tcaacctggc	actggcatgg	8520
agcggccagg	aggccatctg	gcagcgggtg	tacctggcct	tgggcctgac	ccaggcagag	8580
atcaatgagt	tctttaactgg	tcctgccttc	ttggcatggg	ggcgaatggg	caacctgcac	8640
acctgggatg	gccccctgcc	ccctcctgg	cacatcaagc	agctttatct	gcagcaccgg	8700
gtcctggacc	agatgcgctc	cttcggcatg	acccacgtgc	tgccctgcatt	cgccggggcat	8760
gttcccagg	ctgtcaccag	ggtgttccct	caggtcattg	tcacgaagat	gggcagttgg	8820
ggccacttta	actgttctta	ctcctgtctc	ttccttctgg	ctccggaaga	ccccatattc	8880
cccatcatcg	ggagcctctt	cttcgagag	ctgatcaaag	agtttggcac	agaccacatc	8940
tatggggccg	acactttcaa	tgagatgcag	ccaccttct	cagagccctc	ctatcttgcc	9000
gcagccacca	ctgccgtcta	tgaggccatg	actgcagtgg	atactgaggc	tgtgtggctg	9060
ctccaaggct	ggctcttcca	gcaccagccg	cagttctggg	ggcccgccca	gatcagggct	9120
gtgctgggag	ctgtgccccg	tggccgcctc	ctggttctgg	acctgtttgc	tgagagccag	9180
cctgtgtata	cccgcactgc	ctccttccaa	ggccagccct	tcattctggtg	catgctgcac	9240
aaactttggg	gaaatcatgg	tctttttgga	gccttggagg	ccgtgaacgg	aggcccagaa	9300
gctgcccgcc	tcttccccaa	ctccacaatg	gtaggcacgg	gcattggccc	cgagggcac	9360
agccagaacg	aagtggctta	ttccctcatg	gctgagctgg	gctggcgaaa	ggaccagtg	9420
ccagatttgg	cagcctgggt	gaccagcttt	gcgcgccggc	ggtatgggg	ctcccaccgc	9480
gacgcagggg	cagcgtggag	gctactgtct	cggagtgtgt	acaactgtct	cggggaggca	9540
tgcagggggc	acaatcgtag	cccgtctgtc	aggcggccgt	ccctacagat	gaataccagc	9600
atctggtaca	accgatctga	tgtgtttgag	gcctggcggc	tgctgctcac	atctgctccc	9660
tccctggcca	ccagccccgc	cttcgctac	gacctgtctg	acctactctg	gcaggcagtg	9720
caggagctgg	tcagcttgta	ttatgaggag	gcaagaagcg	cctatctgag	caaggagctg	9780
gcctccttgt	tgagggtctg	aggcgtctct	gcctatgagc	tgctgccggc	actggacgag	9840
gtgctggcta	gtgacagccg	cttcttctgt	ggcagctggc	tagagcaggc	ccgagcagcg	9900
gcagtcagtg	aggccgaggc	cgatttctac	gagcagaaca	gccgctacca	gctgaccttg	9960
tgggggcccag	aaggcaacat	cctggactat	gccaacaagc	agctggcggg	gttgggtggc	10020
aactactaca	ccccctcgtg	gcggcttttc	ctggaggcgc	tggttgacag	tgtggcccag	10080
ggcatccctt	tccaacagca	ccagtttgac	aaaaatgtct	tccaactgga	gcaggccctc	10140
gttctcagca	agcagaggta	ccccagccag	ccgcgaggag	acactgtgga	cctggccaag	10200
aagatcttcc	tcaaatatta	cccccgctgg	gtggccggct	cttgggtgatt	cgaagc	10256

(SEQ ID NO:4)

Fig. 4D

promotor1,1kb OV

gttaagtcc	cagacttggc	aaggagaatg	tagatttcca	cagtatatat	gttttcacaa	60
aaggaaggag	agaaacaaaa	gaaaatggca	ctgactaaac	ttcagctagt	ggtataggaa	120
agtaattctg	cttaacagag	attgcagtga	tctctatgta	tgtcctgaag	aattatgttg	180
tacttttttc	ccccattttt	aaatcaaaca	gtgctttaca	gaggtcagaa	tggtttcttt	240
actgtttgtc	aattctatta	tttcaataca	gaacaatagc	ttctataact	gaaatatatt	300
tgtctattgta	tattatgatt	gtccctcgaa	ccatgaacac	tcctccagct	gaatttcaca	360
attcctctgt	catctgccag	gccattaagt	tattcatgga	agatctttga	ggaacactgc	420
aagttcatat	cataaacaca	tttgaaattg	agtattgttt	tgcattgtat	ggagctatgt	480
tttgctgtat	cctcagaata	aaagtttggt	ataaagcatt	cacacccata	aaaagataga	540
tttaaatatt	ccaactatag	gaaagaaagt	gtgtctgctc	ttcactctag	tctcagttgg	600
ctccttcaca	tgcacgcttc	tttattttctc	ctattttgtc	aagaaaataa	taggtcaagt	660
cttgtttctca	tttatgtcct	gtctagcgtg	gtcagatgc	acattgtaca	tacaagaagg	720
atcaaatgaa	acagacttct	ggtctgttac	tacaaccata	gtaataagca	cactaactaa	780
taattgctaa	ttatgttttc	catctccaag	gttcccacat	ttttctgttt	tcttaaagat	840
ccattatct	ggttgtaact	gaagctcaat	ggaacatgag	caatatttcc	cagtcttctc	900
tcccatccaa	cagtctgat	ggattagcag	aacaggcaga	aaacacattg	ttaccagaa	960
ttaaaaacta	atatttgctc	tccattcaat	ccaaaatgga	cctattgaaa	ctaaaatcta	1020
acccaatccc	attaaatgat	ttctatgggt	tcaaagggtca	aacttctgaa	gggaacctgt	1080
gggtgggtca	caattcagac	tatatattcc	ccagggtcca	gccagtgtct	gt	1132

(SEQ ID NO:3)

Fig. 3

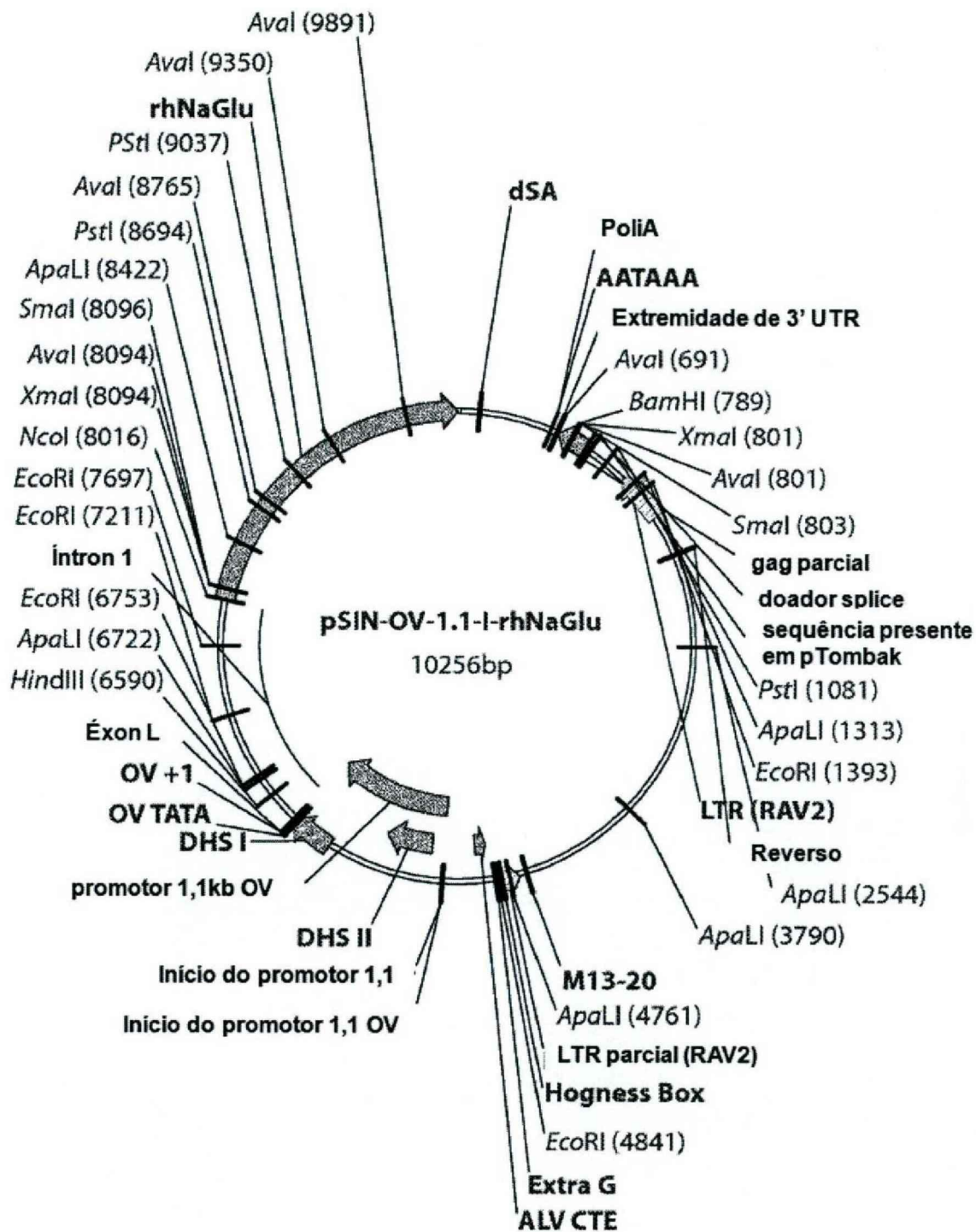


Fig. 5

pSIN-OV-1.1-l-rhNaGlu

ggcgcgaaga	agaaagctga	aaaactctgt	cccttccaac	aagaccacaga	gcactgtagt	60
atcaggggta	aatgaaaag	tatgttatct	gctgcaccca	gacttcataa	aagctggagc	120
ttaattcaga	aaaaaatca	gaaagaaatt	acactgtgag	aacaggtgca	attcaactttt	180
cctttacaca	gagtaatact	ggtaactcat	ggatgaagge	ttaaggggaat	gaaattggac	240
tcacagtact	gagtcacac	actgaaaaat	gcaacctgat	acatcagcag	aaggtttatg	300
ggggaaaaat	gcagccttcc	aattaagcca	gatatctgta	tgaccaagct	gctccagaat	360
tagtcactca	aatctctca	gattaaatta	tcaactgtca	ccaaccattc	ctatgctgac	420
aaggcaattg	cttgttctct	gtgttcctga	tactacaagg	ctcttcctga	cttcctaaag	480
atgcattata	aaaatcttat	aattcacatt	tctccctaaa	ctttgactca	atcatgggat	540
gttggcaaat	atggtatatt	actattcaaa	ttgttttctt	tgtaccata	tgtaatgggt	600
cttgtgaatg	tgtctttttg	ttcctttaat	cataataaaa	acatgtttta	gcaaacactt	660
ttcaacttgta	gtatttgaag	gtacgggac	tgcagccgcc	ttcaatgcc	ccaaaaccaa	720
tcccaggtt	tttaactctc	ccgattttcc	aagtaccata	gcccgcagag	agagcgccgc	780
ggtaatggga	tcccaggacc	ccggggaata	taagtctgag	ggggacgtaa	gcaacccttc	840
cttttgtaac	agggacaaca	tagcccctat	ttccttctta	gaaggagagg	ttttcccgca	900
ataggtctta	cacgcggacg	aaatcacctt	tatgacggct	tccatgcttg	atccaccggg	960
cgaccggaat	cacgcagagc	aaccggaatc	acgcctgggg	tggaccgctc	agtcgtcggg	1020
cttccttccc	gtcttccaac	gactctctga	gttctcggta	gggtatgttg	gcccctgca	1080
gtagggctcc	ctccgacgcc	actcagcttc	tgccttctta	agccgcagcc	ccctctacta	1140
gggtcatcgt	ccgtcccccg	aataagcgag	acggatgagg	acaggatcgc	cacgcgcct	1200
gtggccgacc	actattccct	aacgatcacg	tgggggtcac	caaataagc	cttctgcttc	1260
atgcatgtgc	tctgagtcgt	cagggaatca	acggtccggc	catcaacca	ggcgcacacc	1320
aatgtggtga	atggtcaaat	ggcgtttatt	gtatcgagct	aggcacttaa	atacaatatc	1380
tctgcaatgc	ggaattcagt	ggttcgtcca	atcgtgttta	gacccgtctg	ttgccttctt	1440
aacaaggcac	gatcatacca	cgatcatacc	accttactcc	caccaatcgg	catgcacggt	1500
gctttttctc	tccttataag	gcattgttgc	aactcactgt	tacataagca	tgttgcaaga	1560
ctacaagagt	attgcataag	actacatttc	ccccctctta	tgcaaaagcg	aaactactat	1620
atcctgaggg	gactcctaac	cgcgtacaac	cgaagcccg	cttttcgcct	aaacatgcta	1680
ttgtcccctc	agtcaagcct	tgcctgttac	aaccgatttc	gcaagccttg	ccctcccac	1740
attatccgta	gcattatttc	ctagcagta	tcagagctac	agaagatact	ctatgctgta	1800
gccaaagtcta	caagtttact	attcagcgac	ctcctatatt	ccgctgcca	gccgatcaat	1860
taccaatgcg	cgttgggcgt	aatcatggtc	atagctgttt	cctgtgtgaa	attgttatcc	1920
gtccacaatt	ccacacaaca	tacgagccgg	aagcataaag	tgtaaagcct	ggggtgccta	1980
atgagtgagc	taactcacat	taattgcgtt	gcgtcactg	cccgttttcc	agtcgggaaa	2040
cctgtcgtgc	cagctgcatt	aatgaatcgg	ccaacgcgcg	gggagaggcg	gtttgcgtat	2100
tgggcgctct	tccgttctct	cgctcactga	ctcgtcgcgc	tgggtcgttc	ggctgcggcg	2160

Fig. 4A

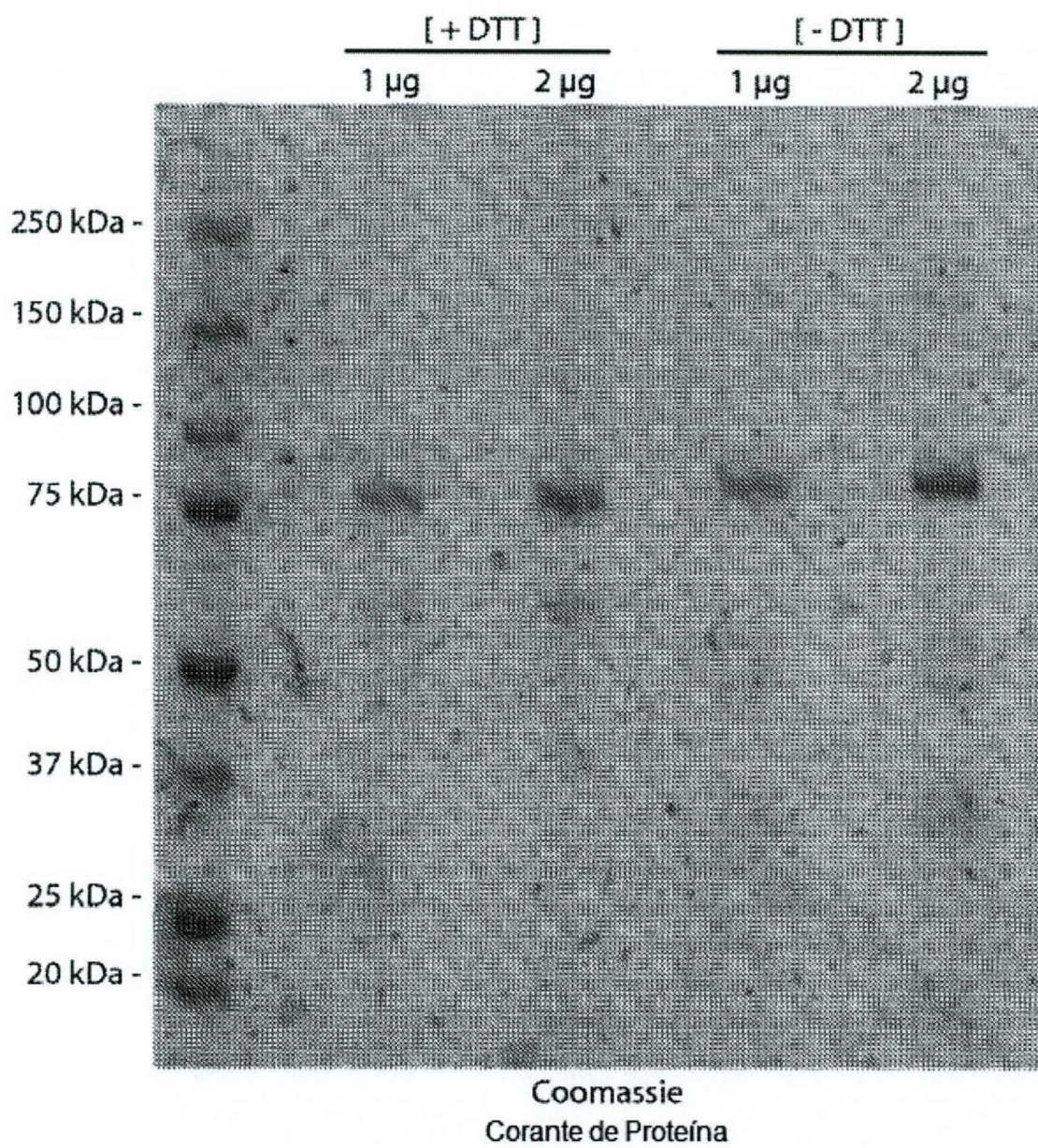
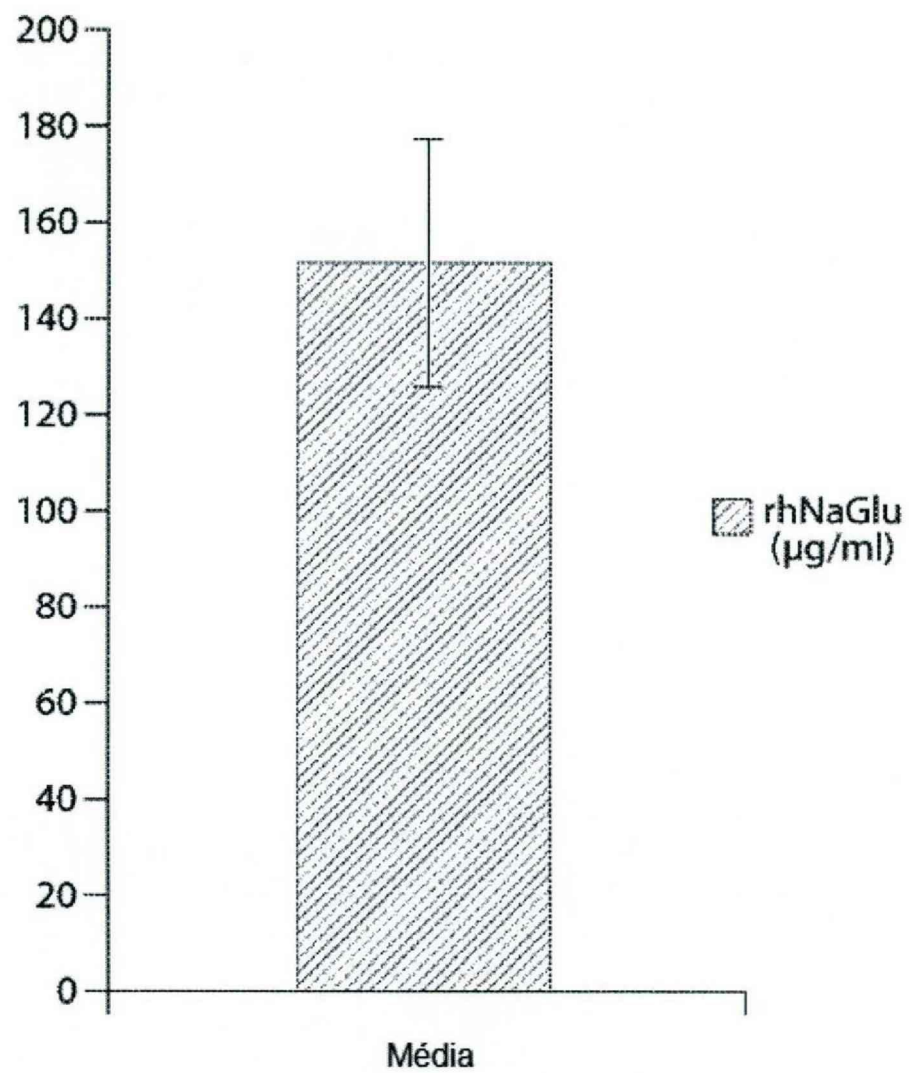


Fig. 6

agcgggtatca	gctcactcaa	aggcggtaat	acgggttatcc	acagaatcag	gggataacgc	2220
aggaaagaac	atgtgagcaa	aaggccagca	aaaggccagg	aaccgtaaaa	aggccgcgtt	2280
gctggcggtt	ttccataggc	tcggccccc	tgacgagcat	cacaaaaatc	gacgctcaag	2340
tcagaggtgg	cgaaaccgga	caggactata	aagataccag	gcgtttcccc	ctggaagctc	2400
cctcgtgccc	tctcctgttc	cgaccctgcc	gcttacccga	tacctgtccg	cctttctccc	2460
ttcgggaagc	gtggcgcttt	ctcatagctc	acgctgtagg	tatctcagtt	cggtgtaggt	2520
cgttcgctcc	aagctgggct	gtgtgcacga	acccccggtt	cagcccgacc	gctgcgcctt	2580
atccggtaac	tatcgtcttg	agtccaaccc	ggtaagacac	gacttatcgc	cactggcagc	2640
agccactggg	aacaggatta	gcagagcgag	gtatgtaggc	ggtgctacag	agttcttgaa	2700
gtgggtggcct	aactacggct	acactagaag	gacagtatct	ggatatctgc	ctctgctgaa	2760
gccagttacc	ttcggaaaaa	gagttggtag	ctcttgatcc	ggcaaacaaa	ccaccgctgg	2820
tagecgtggg	ttttttgttt	gcaagcagca	gattacgcgc	agaaaaaaag	gatctcaaga	2880
agatcctttg	atcttttcta	cgggtctga	cgctcagtg	aacgaaaact	caogttaagg	2940
gattttggct	atgagattat	caaaaaggat	cttcacctag	atccttttaa	attaaaaatg	3000
aagttttaaa	tcaatctaaa	gtatatatga	gtaaacctgg	tctgacagtt	accaatgctt	3060
aatcagttag	gcacctatct	cagcgatctg	tctatttcgt	tcattccatg	ttgcctgact	3120
ccccgtcgtg	tagataacta	cgatacggga	gggcttacca	tctggcccca	gtgctgcaat	3180
gataccgcga	gacccacgct	caccggctcc	agatttatca	gcaataaacc	agccagccgg	3240
aaggggccgag	cgcagaagtg	gtcctgcaac	tttatccgcc	tcctatccagt	ctattaattg	3300
ttgccgggaa	gctagagtaa	gtagtccgcc	agttaatagt	ttgcgcaacg	ttgttgccat	3360
tgcctacagg	atcgtgggtg	cacgctcgtc	gtttggtagg	gcttcattca	gctccggttc	3420
ccaacgatca	aggcgagtta	catgatcccc	catgttgtgc	aaaaaagcgg	ttagctcctt	3480
cgggtcctccg	atcgttgtca	gaagtaagtt	ggcgcagtg	ttatcactca	tggttatggc	3540
agcactgcat	aattctctta	ctgtcatgcc	atccgtaaga	tgcttttctg	tgaactggta	3600
gtaactcaacc	aagtcattct	gagaatagtg	tatgcggcga	ccgagttgct	cttgcccggc	3660
gtcaatacgg	gataataccg	cgccacatag	cagaacttta	aaagtgtcca	tcattggaaa	3720
acgttcttcg	gggcgaaaaa	tctcaaggat	cttaccgctg	ttgagatcca	gttcgatgta	3780
acccactcgt	gcacccaact	gatcttcagc	atcttttact	ttcaccagcg	tttctgggtg	3840
agcaaaaaca	ggaaggcaaa	atgcgcgaaa	aaagggaata	agggcgacac	ggaaatggtg	3900
aatactcata	ctcttccttt	ttcaatatta	ttgaagcatt	tatcagggtt	attgtctcat	3960
gagcggatca	atatttgaat	gtatttagaa	aaataaaca	ataggggttc	cgcgacattt	4020
tccccgaaaa	gtgccacctg	acgcgccttg	tagcggcgca	ttaagcgcgg	cgggtgtggt	4080
ggttacgcgc	agcgtgaccg	ctacacttgc	cagcgcctta	gcgcgcctc	ctttcgcttt	4140
cttcctctcc	tttctcgcca	cgttcgcggg	ctttcccggt	caagctctaa	atcgggggct	4200
ccctttaggg	ttcggattta	gtgctttacg	gcacctcgac	cccaaaaaac	ttgattaggg	4260
tgatggttca	cgtagtgggc	catcgccctg	atagaagggt	tttcgcccct	tgaogttgga	4320
gtccacgttc	tttaatatgt	gactcttggt	ccaaactgga	acaacactca	accctatctc	4380
ggtctattct	tttgatttat	aagggtattt	gccgatttcg	gcctattggt	taaaaaatga	4440
gctgatttaa	caaaaattta	acgcgaattt	taacaaaata	ttaacgctta	caatttccat	4500
tgcacattca	ggctgcgcaa	ctgttgggaa	gggcgatcgg	tgccggcctc	ttcgctatta	4560
cgccagctgg	cgaaaggggg	atgtgctgca	aggcgattaa	gttgggtaac	gccagggttt	4620
tcccagtcac	gacgttgtaa	aacgaogggc	agtgaogcgc	tattccctaa	cgatcacgct	4680
ggggtcacca	aatgaagcct	tctgcttcat	gcctgtgctc	gtagtcgtca	gggaatcaac	4740
ggtcgggcca	tcaacccagg	tgcaacacaa	tgtggtgaat	ggtcaaatgg	cgtttattgt	4800
atcgagctag	gcacttaaat	acaatatctc	tgcaatgcgg	aattcagtg	ttcgtccaat	4860
cgtccccct	ccctatgcaa	aagcgaaact	actatatcct	gaggggactc	ctaaccgcgt	4920
acaaccgaag	ccccgctttt	cgcttaacaa	tgtattgttc	ccctcagtc	agccttgccc	4980
gttacaaccc	gattcgcaag	ccttgccctc	cccacattat	cogtagcatt	atttcctagc	5040
agtcacgaga	gctacagaag	atactctatg	ctgtagccaa	gtctacaagt	ttactattca	5100

Fig. 4B

**Fig. 7**

gagacctect	atattccggg	tgccagccga	tcaattacca	atccaaccag	ctatcacacg	5160
gaatacaaga	actgccttac	gctcttcttt	cgggctgctt	ataagcctcc	tgtaattttt	5220
ttatatttct	cgtaaagtc	tcagacttgg	caaggagaat	gtagatttcc	acagtatata	5280
tgttttcaca	aaaggaagga	gagaaacaaa	agaaaatggc	actgactaaa	cttcagctag	5340
tggtatagga	aagtaattct	gcttaacaga	gattgcagtg	atctctatgt	atgtcctgaa	5400
gaattatgtt	gtactttttt	ccccattttt	taaatcaaac	agtgcctttac	agaggtcaga	5460
atgggtttct	tactgtttgt	caattctatt	atttcaatac	agaacaatag	cttctataac	5520
tgaatatatat	ttgctattgt	atattatgat	tgtccctcga	accatgaaca	ctcctccagc	5580
tgaatttcac	aattcctctg	tcattctgcca	ggccattaa	ttattcatgg	aagatctttg	5640
aggaacactg	caagttcata	tcataaacac	atthgaaatt	gagtattgtt	ttgcattgta	5700
tggaagctatg	ttttgctgta	tcctcagaat	aaaagtthgt	tataaagcat	tcacacccat	5760
aaaaagatag	atttaaatat	tcacactata	ggaaagaaag	tgtgtctgt	cttcaactta	5820
gtctcagttg	gctccttcac	atgcacgctt	ctttattttt	cctattttgt	caagaaaata	5880
ataggtcaag	tctgtttctc	atthtgctcc	tgtctagcgt	ggctcagatg	cacattgtac	5940
atacaagaag	gatcaaatga	aacagacttc	tggtctgtta	ctacaacccat	agtaataagc	6000
acactaacta	ataattgcta	attatgtttt	ccatctccaa	ggthccca	ttttctgtt	6060
ttcttaaaga	tcccattatc	tggttgtaac	tgaagctcaa	tggaacatga	gcaatatttc	6120
ccagtcttct	ctcccatcca	acagtctcga	tggaatagca	gaacaggcag	aaaacacatt	6180
gttaccacaga	attaaaaact	aatatttgct	ctccattcaa	tccaaaatgg	acctattgaa	6240
actaaaatct	aacccaatcc	cattaaatga	tttctatgg	gtcaaaagtc	aaacttctga	6300
aggggaacctg	tgggtgggtc	acaattcaga	ctatatattc	cccagggtc	agccagtgtc	6360
tgtacatata	gctagaaagc	tgtattgcct	ttagcagtc	agctcgaaag	gtaagcaact	6420
ctctggaatt	acctctctc	tatattagct	cttacttgca	cctaaacttt	aaaaatttaa	6480
caattattgt	gctatgtgtt	gtatctttaa	gggtgaagta	cctgcgtgat	acccctata	6540
aaaacttctc	acctgtgtat	gcattctgca	ctattttatt	atgtgtaaaa	gctttgtgtt	6600
tgttttcagg	aggcttattc	tttgtgctta	aaatatgttt	ttaatttcag	aacatcttat	6660
cctgtcgttc	actatctgat	atgctttgca	gtttgcttga	ttaaacttcta	gccctacaga	6720
gtgcacagag	agcaaaaatca	tggtgttcag	tgaattctgg	ggagttattt	taatgtgaaa	6780
attctctaga	agtttaattc	ctgcaaaagt	cagctgctga	tcactacaca	agataaaaaat	6840
gtgggggggtg	cataaacgta	tattcttaca	ataatagata	catgtgaact	tatatacaga	6900
aaagaaaatg	agaaaaatgt	gtgtgtgtat	actcacacac	gtggtcagta	aaaacttttg	6960
aggggttttaa	tacagaaaat	ccaatcctga	ggccccagca	ctcagtagc	atataaagg	7020
ctgggctctg	aaggacttct	gactttcaca	gattatataa	atctcaggaa	agcaactaga	7080
ttcatgctgg	ctccaaaagc	tgtgctttat	ataagcacac	tggctataca	atagttgtac	7140
agttcagctc	tttataatag	aaacagacag	aacaagtata	aatcttctat	tggtctatgt	7200
catgaacaag	aattcattca	gtggctctgt	tttatagtaa	acattgctat	tttatcatgt	7260
ctgcatttct	cttctgtctg	aatgtcacca	ctaaaattta	actccacaga	aagtttatac	7320
tacagtacac	atgcatactt	ttgagcaaag	caaaccatac	ctgaaagtgc	aatagagcag	7380
aatatgaatt	acatgcgtgt	ctttctccta	gactacatga	ccccatataa	attacattcc	7440
ttatctattc	tgccatcacc	aaaacaaagg	taaaaatact	tttgaagatc	tactcatagc	7500
aagtagtggtg	caacaaacag	atattttctt	acattttatt	ttagggaata	aaaataagaa	7560
ataaaatagt	cagcaagcct	ctgctttctc	atatatctgt	ccaaacctaa	agtttactga	7620
aatttgctct	ttgaatttcc	agttttgcaa	gcctatcaga	ttgtgtttta	atcagaggta	7680
ctgaaaagta	tcaatgaatt	ctagctttca	ctgaacaaaa	atatgtagag	gcaactggct	7740
tctgggacag	tttgctaccc	aaaagacaac	tgaatgcaaa	tacataaata	gatttatgaa	7800
tatgggtttg	aacatgcaca	tgagaggtgg	atatagcaac	agacacatta	ccacagaatt	7860
actttaaaac	tacttgtaaa	catttaattg	cctaaaaact	gtcgtgaatt	tactgttgta	7920
gcctaccata	gagtacctg	catggtacta	tgtacagcat	tccatcctta	cattttcact	7980

Fig. 4C

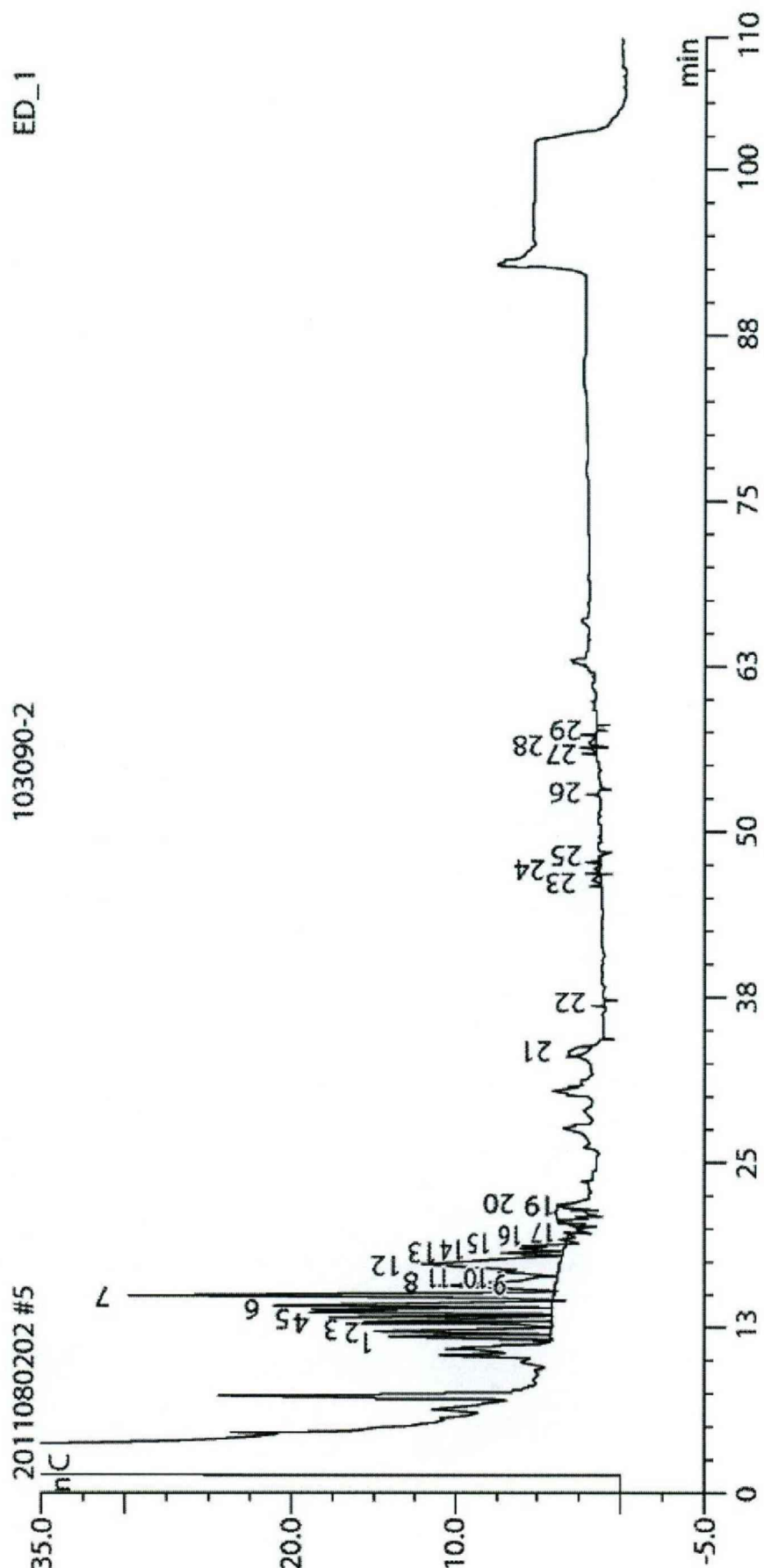
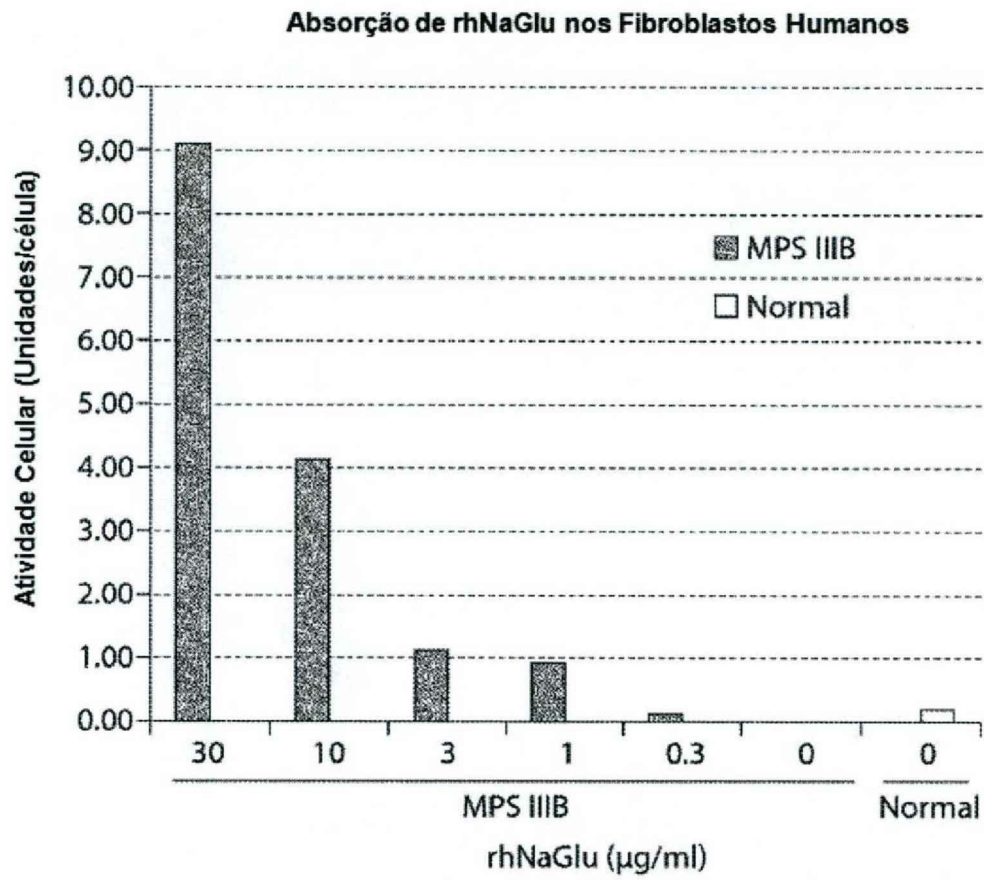


Fig. 8

**Fig. 9**

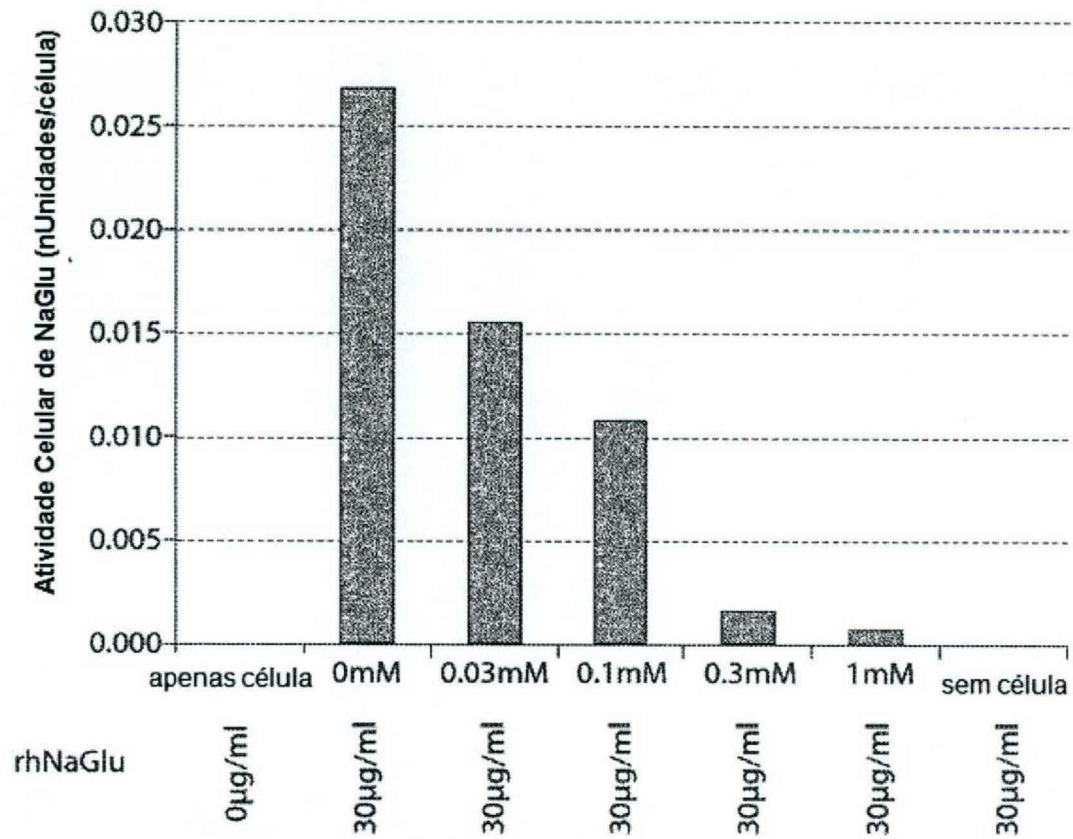


Fig. 10

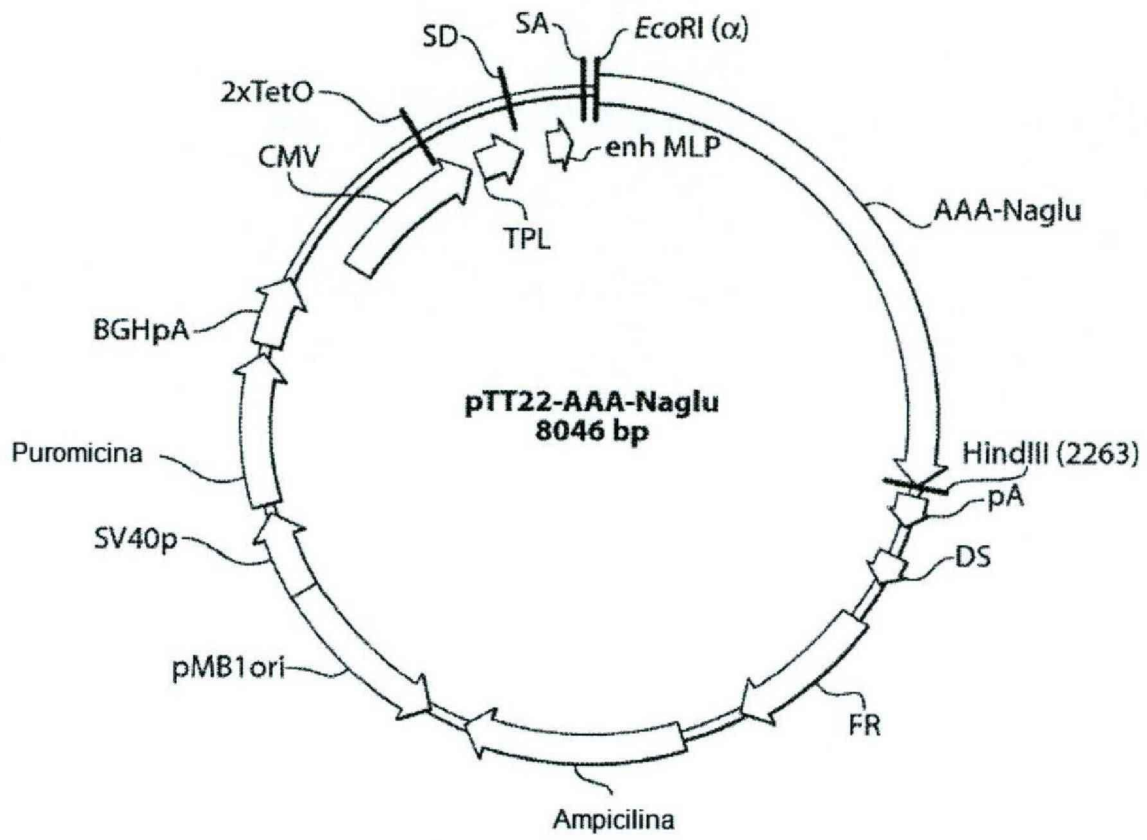
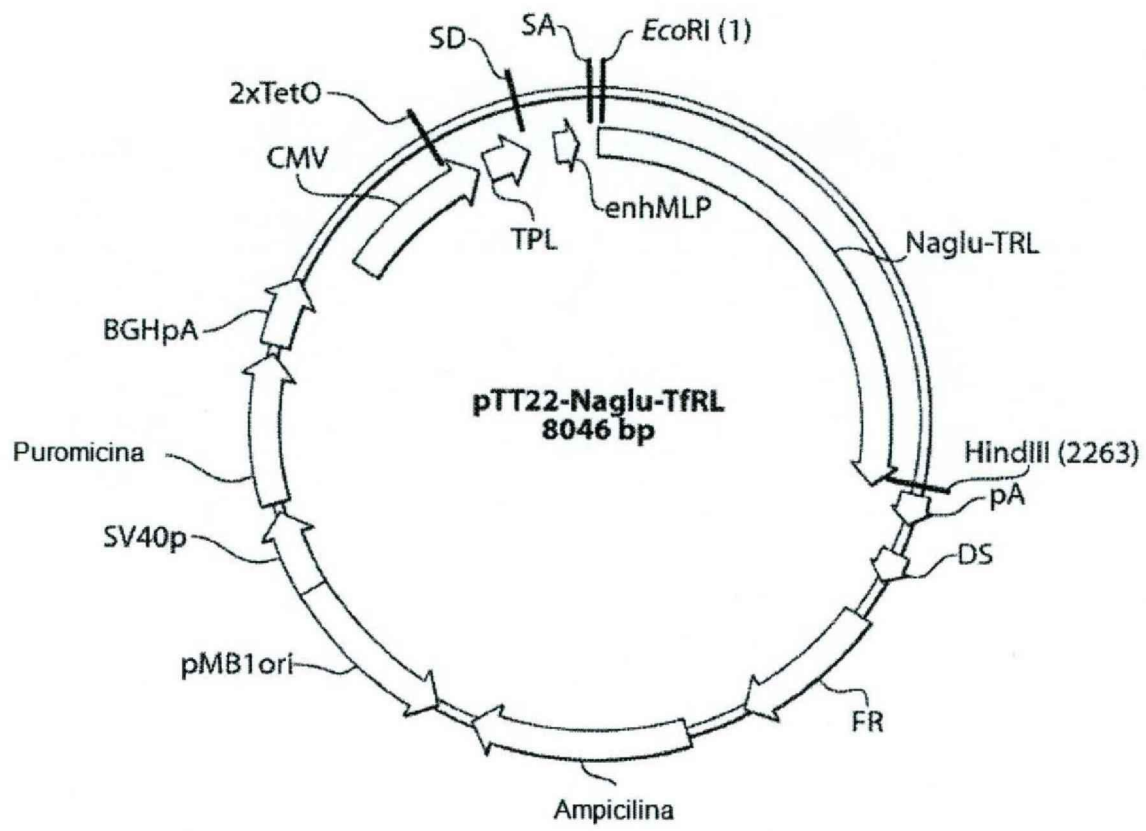


Fig. 11

**Fig. 12**

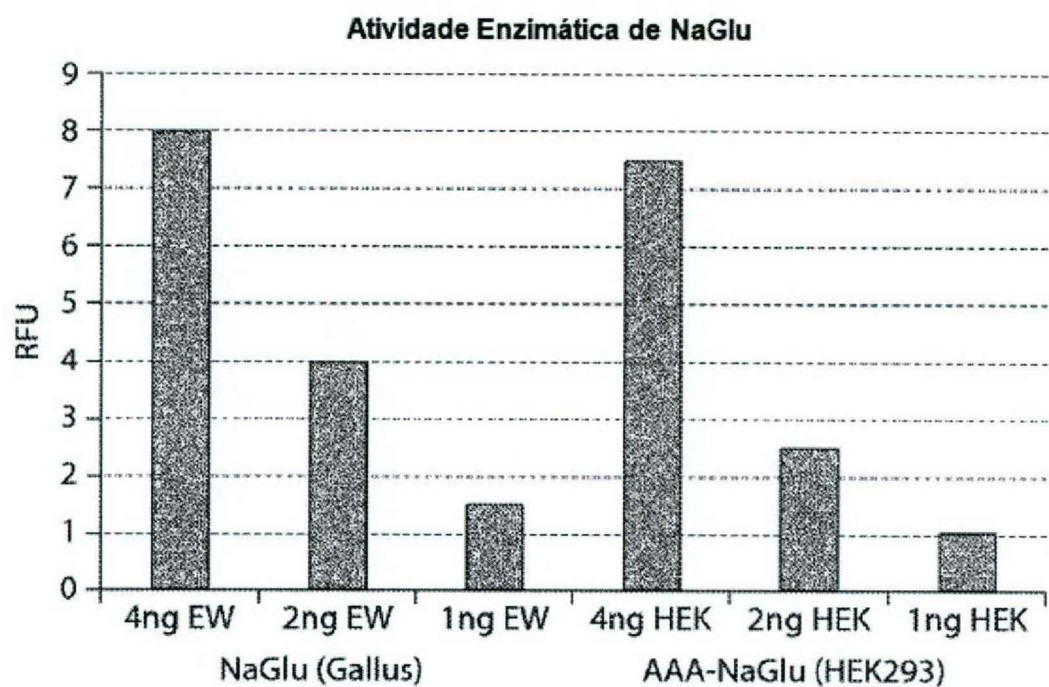


Fig. 13

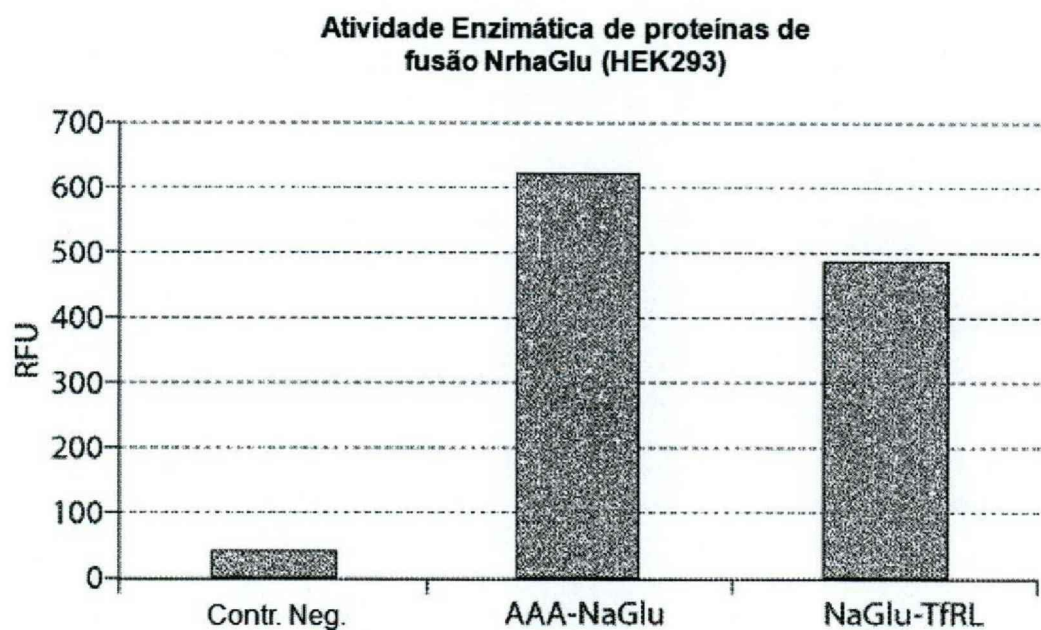


Fig. 14

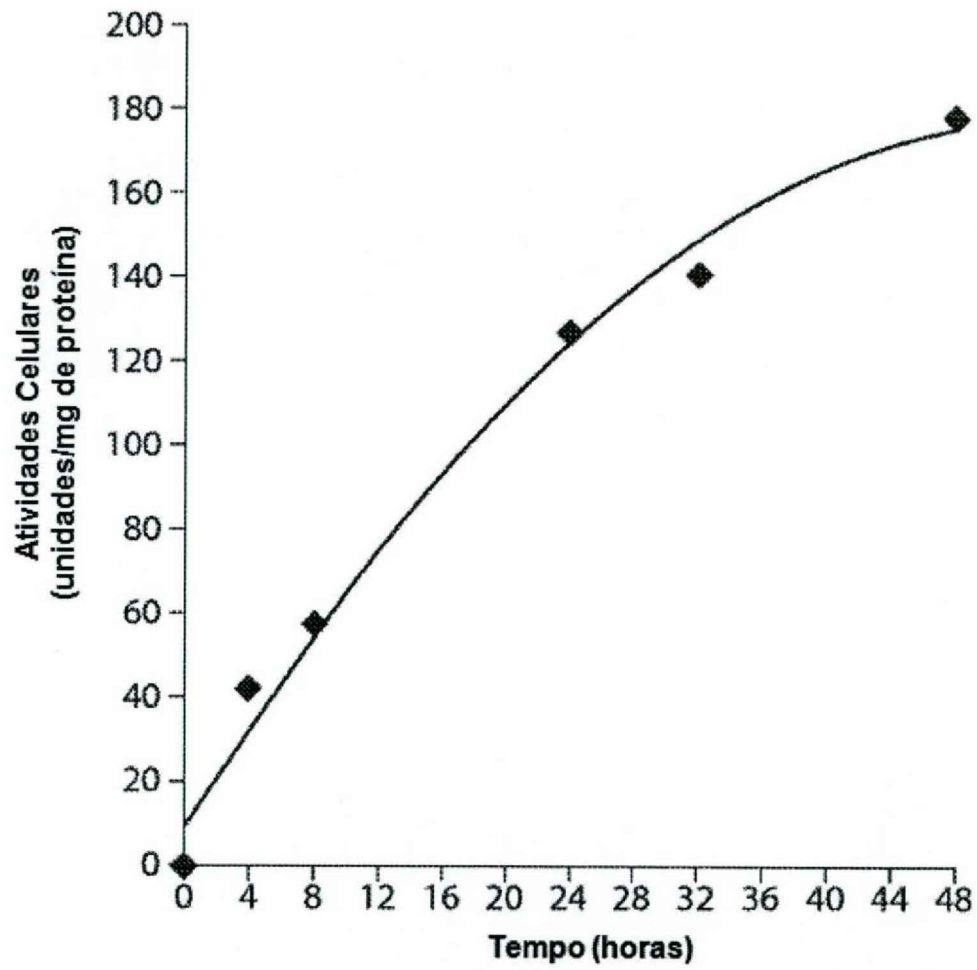


Fig. 15

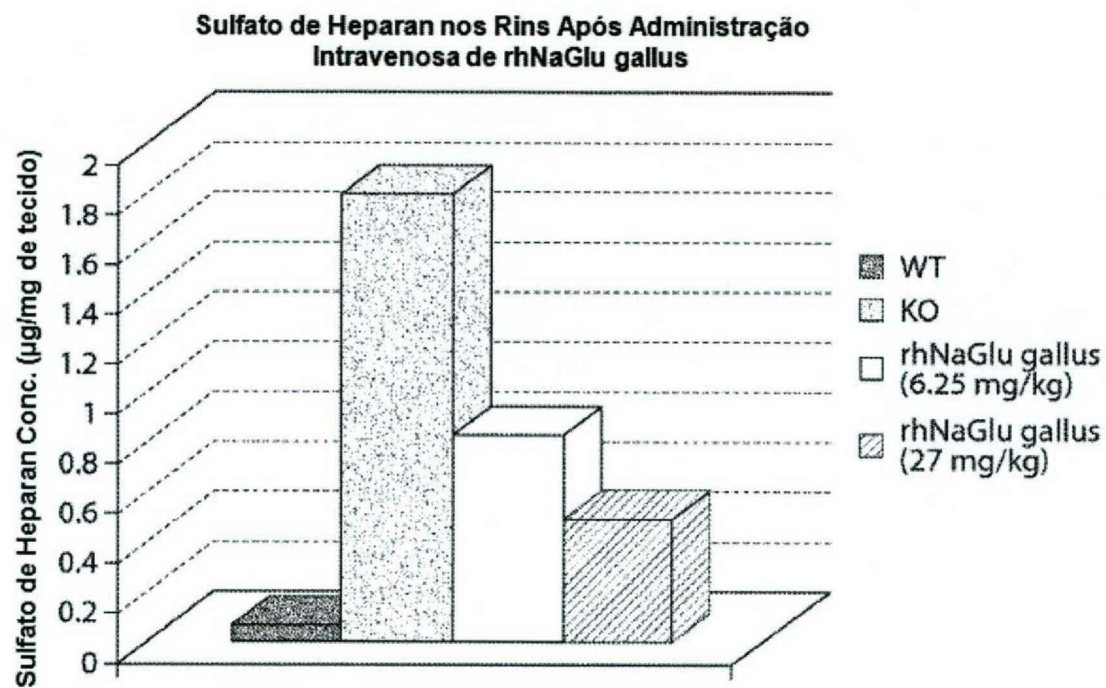


Fig. 16

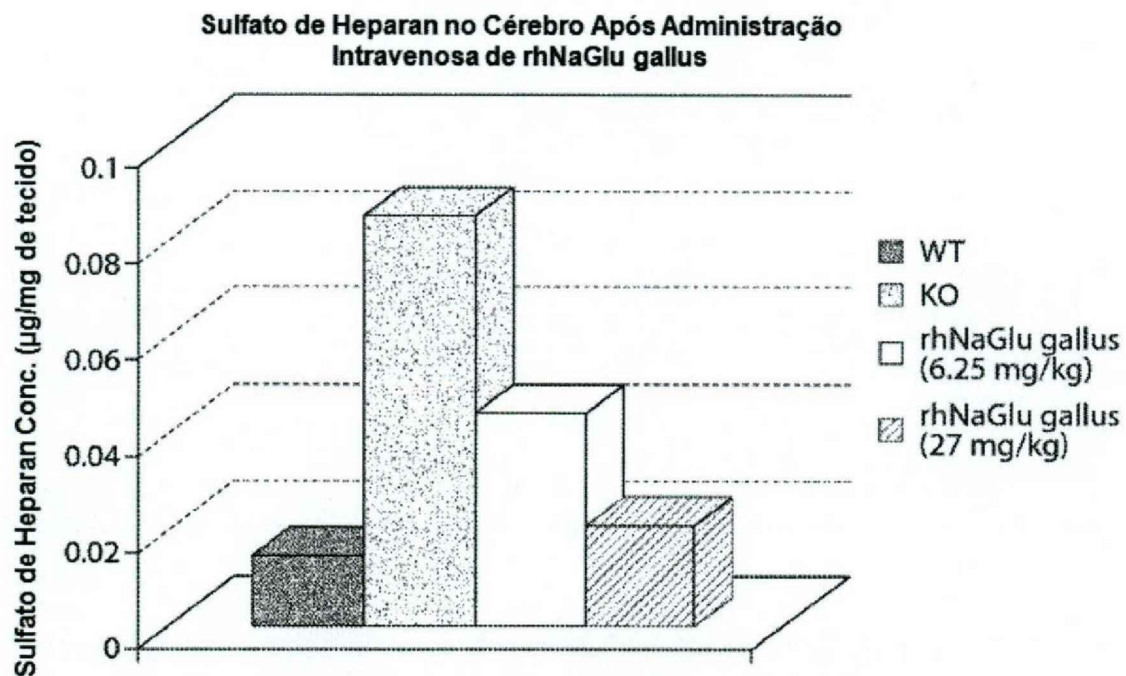


Fig. 17

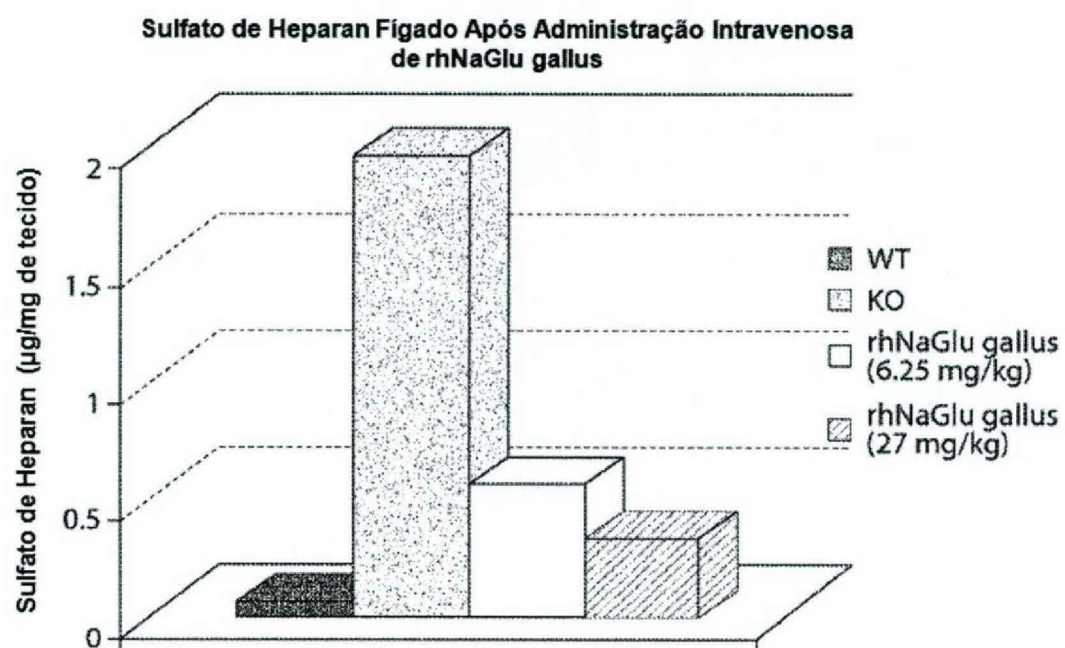


Fig. 18

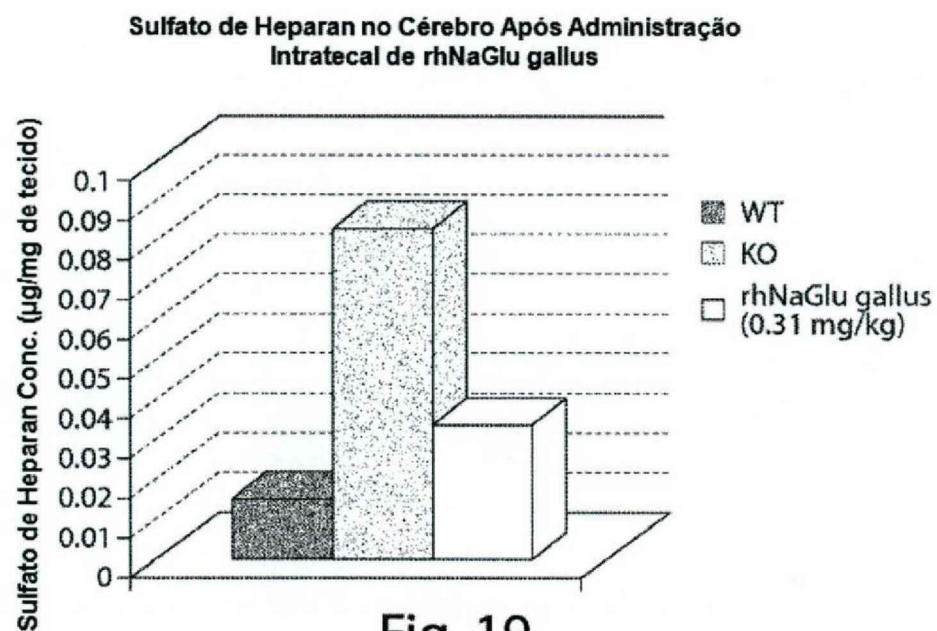


Fig. 19

RESUMO**PROTEÍNA NAGLU RECOMBINANTE HUMANA E USOS DA MESMA**

A presente invenção fornece composições compreendendo uma mistura isolada de proteínas NaGlu humanas recombinantes em que
5 uma quantidade substancial das proteínas NaGlu na mistura têm níveis aumentados de manose fosforilada que conferem às proteínas serem eficientemente internalizadas nas células humanas. A presente invenção também fornece métodos para produzir essa
mistura de proteínas NaGlu, vetores usados na transgênese e
10 expressão, células hospedeiras que abrigam esses vetores e métodos para isolar e purificar a mistura de proteínas NaGlu. A invenção ainda fornece métodos para tratar doenças associadas à NaGlu.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



24CA149C9F84952C

Campo 2



DAD2863BE89E5A1

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: PP9330_Listagem de Sequencia.txt
- Data de Geração do Código: 11-04-2014
- Hora de Geração do Código: 11:32:53
- Código de Controle:
 - Campo 1: 24CA149C9F84952C
 - Campo 2: DAD2863BE89E5A1