

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 895 655**

(51) Int. Cl.:

**A61K 38/47** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)  
**A61K 9/19** (2006.01)  
**A61K 38/46** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2011 E 19192679 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.08.2021 EP 3626258**

---

(54) Título: **Métodos y composiciones para la administración al SNC de iduronato-2-sulfatasa**

(30) Prioridad:

**25.06.2010 US 35885710 P**  
**01.07.2010 US 36078610 P**  
**29.09.2010 US 38786210 P**  
**24.01.2011 US 201161435710 P**  
**11.02.2011 US 201161442115 P**  
**15.04.2011 US 201161476210 P**  
**09.06.2011 US 201161495268 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.02.2022**

(73) Titular/es:

**SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC.**  
(100.0%)  
**300 Shire Way**  
**Lexington MA 02421, US**

(72) Inventor/es:

**ZHU, GAOZHONG;**  
**LOWE, KRIS;**  
**SHAHROKH, ZAHRA;**  
**CHRISTIAN, JAMES;**  
**FAHRNER, RICK;**  
**PAN, JING;**  
**WRIGHT, TERESA, LEAH y**  
**CALIAS, PERICLES**

(74) Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 895 655 T3**

---

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para la administración al SNC de iduronato-2-sulfatasa

### 5 ANTECEDENTES

La terapia de reemplazo de enzimas (ERT) implica la administración sistémica de naturales o de manera recombinante derivados de proteínas y/o enzimas a un sujeto. Las terapias aprobadas se administran típicamente a sujetos por vía intravenosa y generalmente son efectivas para tratar los síntomas somáticos de la deficiencia enzimática subyacente. Como resultado de la distribución limitada de la proteína y/o enzima administrada por vía intravenosa en las células y tejidos del sistema nervioso central (SNC), el tratamiento de enfermedades que tienen una etiología del SNC ha sido especialmente difícil debido a las proteínas y/o proteínas administradas por vía intravenosa. Las enzimas no cruzan adecuadamente la barrera hematoencefálica (BBB).

15 La barrera hematoencefálica (BBB) es un sistema estructural compuesta de células endoteliales que funciona para proteger el sistema nervioso central (SNC) a partir de sustancias perjudiciales en la corriente sanguínea, tales como bacterias, macromoléculas (por ejemplo, proteínas) y otros moléculas hidrofílicas, al limitar la difusión de tales sustancias a través del BBB y hacia el líquido cefalorraquídeo subyacente (LCR) y el SNC.

20 Hay varias formas de eludir el BBB para mejorar el suministro cerebral de un agente terapéutico que incluye inyección intracraneal directa, permeabilización transitoria del BBB y modificación del agente activo para alterar la distribución del tejido. La inyección directa de un agente terapéutico en el tejido cerebral evita la vasculatura por completo, pero sufre principalmente el riesgo de complicaciones (infección, daño tisular, respuesta inmune) ocasionadas por las inyecciones intracraneales y la mala difusión del agente activo desde el sitio de administración.

25 Hasta la fecha, la administración directa de proteínas en la sustancia cerebral no ha logrado un efecto terapéutico significativo debido a las barreras de difusión y al volumen limitado de terapia que se puede administrar. La difusión asistida por convección se ha estudiado mediante catéteres colocados en el parénquima cerebral mediante infusiones lentas a largo plazo (Bobo, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91, 2076-2080 (1994); Nguyen, et al. J. Neurosurg. 98, 584-590 (2003)), pero actualmente no hay terapias aprobadas que usen este enfoque para la terapia a largo plazo.

30 Además, la colocación de catéteres intracerebrales es muy invasiva y menos deseable como alternativa clínica.

Inyección intratecal (IT), o administración de proteínas al líquido cefalorraquídeo (LCR), también se ha intentado, pero aún no ha dado el éxito terapéutico. Un desafío importante en este tratamiento ha sido la tendencia del agente activo a unir muy fuertemente el revestimiento ependimario del ventrículo, lo que evitó su posterior difusión. Actualmente, no existen productos aprobados para el tratamiento de enfermedades genéticas cerebrales mediante administración directa al LCR.

40 De hecho, muchos creyeron que la barrera a la difusión en la superficie del cerebro, así como la falta de eficaces y métodos de entrega convenientes, eran un obstáculo demasiado grande para lograr el efecto terapéutico adecuado en el cerebro para cualquier enfermedad.

45 Muchos trastornos de almacenamiento lisosomal afectan el sistema nervioso y por lo tanto demuestran desafíos únicos en el tratamiento de estas enfermedades con terapias tradicionales. A menudo hay una gran acumulación de glicosaminoglicanos (GAG) en las neuronas y meninges de las personas afectadas, lo que lleva a diversas formas de síntomas del SNC. Hasta la fecha, ningún síntoma del SNC resultante de un trastorno lisosómico se ha tratado con éxito por ningún medio disponible.

50 Por lo tanto, sigue habiendo una gran necesidad de administrar eficazmente agentes terapéuticos al cerebro. Más particularmente, existe una gran necesidad de un suministro más efectivo de agentes activos al sistema nervioso central para el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico.

### SUMARIO DE LA INVENCIÓN

55 La presente invención proporciona un enfoque eficaz y menos invasiva para la entrega directa de agentes terapéuticos para el sistema nervioso central (SNC). La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento inesperado de que una enzima de reemplazo (iduronato-2-sulfatasa (I2S)) para una enfermedad de almacenamiento lisosomal (Síndrome de Hunter) se puede introducir directamente en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de un sujeto que necesita tratamiento en una alta concentración (mayor de 10 mg/ml) de tal manera que la enzima se difunde de manera efectiva y extensa a través de varias superficies y penetra en varias regiones del cerebro, incluidas las regiones del cerebro profundo. Más sorprendentemente, los presentes inventores han demostrado que dicho suministro de alta concentración de proteínas se puede realizar usando soluciones salinas simples o formulaciones basadas en tampones y sin inducir efectos adversos sustanciales, como una respuesta inmune severa, en el sujeto. Por lo tanto, la presente invención proporciona un enfoque altamente eficiente, clínicamente deseable y amigable para el paciente para el suministro directo del SNC para el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos que tienen componentes del SNC, en particular, enfermedades de almacenamiento lisosómico. La presente invención representa un avance

significativo en el campo de la focalización del SNC y la terapia de reemplazo enzimático.

Como se describe en detalle a continuación, los presentes inventores han desarrollado con éxito formulaciones estables para la eficacia de la administración intratecal (IT) de una proteína de la iduronato-2-sulfatasa (I2S) para su uso en un método para tratar el síndrome de Hunters en un sujeto. De hecho, las formulaciones estables de acuerdo con la presente invención pueden usarse para la administración del SNC a través de administraciones intratecales (por ejemplo, IT-Lumbar, IT-cisterna magna) para inyección directamente al SNC y/o LCR.

Especificamente, la invención proporciona una formulación a base de solución salina o tampón que comprende 10 mg/ml o más de iduronato-2-sulfatasa (I2S) para su uso en un método para tratar el síndrome de Hunters en un sujeto en donde dicho método comprende administrar directamente dicha formulación en el líquido cefalorraquídeo de dicho sujeto mediante administración intraparenquimatosa, intracerebral, intraventricular cerebral (ICV) o intratecal (IT). En algunas realizaciones, la proteína I2S está presente en o hasta una concentración seleccionada de 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/ml, 45 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml o 300 mg/ml.

En diversas realizaciones, la presente invención incluye una formulación a base de solución salina o tampón de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, en donde la proteína de I2S comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la proteína de I2S comprende una secuencia de aminoácidos al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% idéntica a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la formulación a base de solución salina o tampón de cualquiera de las realizaciones descritas en la presente para su uso de acuerdo con la invención incluye NaCl presente en una concentración que varía de aproximadamente 0-300 mM (por ejemplo, 0-250 mM, 0-200 mM, 0-150 mM, 0-100 mM, 0-75 mM, 0-50 mM o 0-30 mM). En algunas realizaciones, el NaCl está presente en una concentración que varía de aproximadamente 137-154 mM. En algunas realizaciones, el NaCl está presente en una concentración de aproximadamente 154 mM.

En diversas realizaciones, la presente invención incluye una formulación a base de solución salina o tampón de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento para su uso de acuerdo con la invención, en donde el tensioactivo polisorbato se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80 y combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el tensioactivo de polisorbato es polisorbato 20. En algunas realizaciones, el polisorbato 20 está presente a una concentración de aproximadamente 0,005%.

En varias realizaciones, la presente invención incluye una formulación a base de solución salina o tampón de cualquiera de las realizaciones descritas en la presente para su uso de acuerdo con la invención, en donde la formulación comprende además un agente tampón. En algunas realizaciones, el agente tampón se selecciona del grupo que consiste de fosfato, acetato, histidina, succinato, Tris y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el agente tampón es fosfato. En algunas realizaciones, el fosfato está presente a una concentración de no más de 50 mM (por ejemplo, de no más de 45 mM, 40 mM, 35 mM, 30 mM, 25 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM o 5 mM). En algunas realizaciones, el fosfato está presente a una concentración de no más de 20 mM. En varios aspectos, la invención incluye una formulación a base de solución salina o tampón de cualquiera de las realizaciones descritas en la presente para su uso de acuerdo con la invención, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 3-8 (por ejemplo, aproximadamente 4-7,5, 5-8, 5-7,5, 5-6,5, 5-7,0, 5,5-8,0, 5,5-7,7, 5,5-6,5, 6-7,5 o 6-7,0). En algunas realizaciones, la formulación tiene un pH de aproximadamente 5,5-6,5 (por ejemplo, 5,5, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 o 6,5). En algunas realizaciones, la formulación tiene un pH de aproximadamente 6,0.

En algunas realizaciones, la presente invención incluye una formulación a base de solución salina o tampón para la administración intratecal para su uso de acuerdo con la invención que comprende una proteína iduronato-2-sulfatasa (I2S) a una concentración que varía de aproximadamente 10-300 mg/ml, NaCl a una concentración de aproximadamente 154 mM, polisorbato 20 en una concentración de aproximadamente 0,005% y un pH de aproximadamente 6,0. En algunas realizaciones, la proteína de I2S está a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml. En algunas realizaciones, la proteína I2S está a una concentración de aproximadamente 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml o 300 mg/ml.

En varios aspectos, la presente invención incluye un recipiente que comprende una única forma de dosificación de una formulación a base de solución salina o tampón en diversas realizaciones descritas en el presente documento para su uso de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, el recipiente se selecciona de una ampolla, un vial, una botella, un cartucho, un depósito, un lyo-ject o una jeringa precargada. En algunas realizaciones, el recipiente es una jeringa precargada. En algunas realizaciones, el recipiente es una jeringa precargada. En algunas realizaciones, la jeringa precargada se selecciona de jeringas de vidrio de borosilicato con recubrimiento de silicona, jeringas de vidrio de borosilicato con silicona, o jeringas de resina plásticas. En algunas realizaciones, la formulación a base de solución salina o tampón está presente en un volumen de menos de aproximadamente 50 ml (por ejemplo, menos de aproximadamente 45 ml, 40 ml, 35 ml, 30 ml, 25 ml, 20 ml, 15 ml, 10 ml, 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2,5 ml, 2,0 ml, 1,5 ml, 1,0 ml o 0,5 ml). En algunas realizaciones, la formulación a base de solución salina o tampón está presente en un volumen de menos de aproximadamente 3,0 ml.

La presente invención incluye métodos para tratar el síndrome de Hunters que incluyen la etapa de administrar por vía intratecal a un sujeto con necesidad de tratamiento una formulación de acuerdo con cualquiera de las realizaciones descritas en este documento.

5 En algunas realizaciones, la presente invención incluye una formulación que comprende una proteína de la iduronato-2-sulfatasa (I2S) a una concentración que varía de aproximadamente 10-300 mg/ml, NaCl a una concentración de aproximadamente 154 mM, polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0,005%, y un pH de aproximadamente 6 para su uso de acuerdo con la invención.

10 En algunas realizaciones, los resultados de la administración intratecal en ausencia de efectos adversos sustanciales (por ejemplo, severa respuesta inmune) en el sujeto. En algunas realizaciones, la administración intratecal no da como resultado una respuesta inmune mediada por células T adaptativa sustancial en el sujeto.

15 En algunas realizaciones, la administración intratecal de los resultados de formulación en la entrega de la proteína de I2S a diversos tejidos diana en el cerebro, la médula espinal, y/o los órganos periféricos. En algunas realizaciones, la administración intratecal de la formulación da como resultado el suministro de la proteína I2S a los tejidos cerebrales diana. En algunas realizaciones, los tejidos diana del cerebro comprenden materia blanca y/o neuronas en la materia gris. En algunas realizaciones, la proteína I2S se administra a neuronas, células gliales, células perivasculares y/o células meníngeas. En algunas realizaciones, la proteína I2S se administra adicionalmente a las 20 neuronas en la médula espinal.

25 En algunas realizaciones, la administración intratecal de la formulación resulta aún más en la administración sistémica de la proteína de I2S en los tejidos diana periféricos. En algunas realizaciones, los tejidos diana periféricos se seleccionan de hígado, riñón, bazo y/o corazón.

30 En algunas realizaciones, la administración intratecal de los resultados de formulación en la localización lisosomal en el cerebro los tejidos diana, neuronas de la médula espinal y/o tejidos diana periféricos. En algunas realizaciones, la administración intratecal de los resultados de formulación en la reducción de almacenamiento de sulfatida en los tejidos diana del cerebro, las neuronas de la médula espinal y/o periféricos tejidos diana. En algunas 35 realizaciones, el almacenamiento de sulfatida se reduce al menos en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1 vez, 1,5 veces o 2 veces en comparación con un control (por ejemplo, el almacenamiento de GAG previo al tratamiento en el sujeto). En algunas realizaciones, la administración intratecal de la formulación da como resultado una vacuolización reducida en las neuronas (por ejemplo, en al menos 20%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90%, 1 vez, 1,5 veces o 2 veces en comparación con un control). En algunas realizaciones, las neuronas comprenden células de Purkinje.

40 En algunas realizaciones, la administración intratecal de los resultados de formulación en actividad aumentada enzimática I2S en los tejidos diana del cerebro, neuronas de la médula espinal y/o tejidos diana periféricos. En algunas realizaciones, la actividad enzimática I2S se incrementa en al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 doble en comparación con un control (por ejemplo, la actividad enzimática endógena previa al tratamiento en el sujeto). En algunas realizaciones, la actividad enzimática I2S aumentada es al menos aproximadamente 10 nmol/hr/mg, 20 nmol/hr/mg, 40 nmol/hr/mg, 50 nmol/hr/mg, 60 nmol/hr/mg, 70 nmol/hr/mg, 80 nmol/hr/mg, 90 nmol/hr/mg, 100 nmol/hr/mg, 150 nmol/hr/mg, 200 nmol/hr/mg, 250 nmol/hr/mg, 300 nmol/hr/mg, 350 nmol/hr/mg, 400 nmol/hr/mg, 450 nmol/hr/mg, 500 nmol/hr/mg, 550 nmol/hr/mg o 45 600 nmol/hr/mg.

50 En algunas realizaciones, la actividad enzimática I2S se incrementa en la región lumbar. En algunas realizaciones, el aumento de la actividad enzimática I2S en la región lumbar es al menos aproximadamente 2000 nmol/hr/mg, 3000 nmol/hr/mg, 4000 nmol/hr/mg, 5000 nmol/hr/mg, 6000 nmol/hr/mg, 7000 nmol/hr/mg, 8000 nmol/hr/mg, 9000 nmol/hr/mg, o 10.000 nmol/hr/mg.

55 En algunas realizaciones, la administración intratecal de los resultados de formulación en la intensidad reducida, la gravedad o la frecuencia, o retraso en la aparición de al menos un síntoma o característica de Síndrome de Hunter. En algunas realizaciones, al menos un síntoma o característica de la Síndrome de Hunter es el deterioro cognitivo; lesiones de la sustancia blanca; espacios perivasculares dilatados en el parénquima cerebral, ganglios, cuerpo calloso y/o tronco encefálico; atrofia; y/o ventriculomegalia.

60 En algunas realizaciones, la administración intratecal se realiza una vez cada dos semanas. En algunas realizaciones, la administración intratecal tiene lugar una vez al mes. En algunas realizaciones, la administración intratecal tiene lugar una vez cada dos meses. En algunas realizaciones, el intervalo de administración es dos veces por mes. En algunas realizaciones, el intervalo de administración es una vez por semana. En algunas realizaciones, el intervalo de administración es dos o varias veces por semana. En algunas realizaciones, la administración es continua, tal como a través de una bomba de perfusión continua. En algunas realizaciones, la administración intratecal se usa junto con la administración intravenosa. En algunas realizaciones, la administración intravenosa no es más frecuente que una vez por semana. En algunas realizaciones, la administración intravenosa no es más frecuente que 65

una vez cada dos semanas. En algunas realizaciones, la administración intravenosa no es más frecuente que una vez al mes. En algunas realizaciones, la administración intravenosa no es más frecuente que una vez cada dos meses. En ciertas realizaciones, la administración intravenosa es más frecuente que la administración mensual, tal como dos veces por semana, semanalmente, cada dos semanas o dos veces al mes.

- 5 En algunas realizaciones, las administraciones intravenosas y intratecales se realizan en el mismo día. En algunas realizaciones, las administraciones intravenosas e intratecales no se realizan dentro de una cierta cantidad de tiempo entre sí, tal como no dentro de al menos 2 días, dentro de al menos 3 días, dentro de al menos 4 días, dentro de al menos 5 días, dentro de al menos 6 días, dentro de al menos 7 días, o dentro de al menos una semana.
- 10 10 En algunas realizaciones, las administraciones intravenosas e intratecales se realizan en un horario alterno, tal como administraciones alternas semanalmente, cada dos semanas, dos veces al mes o mensualmente. En algunas realizaciones, una administración intratecal reemplaza una administración intravenosa en un programa de administración, tal como en un programa de administración intravenosa semanal, cada dos semanas, dos veces al mes o mensualmente, cada tercera o cuarta o quinta administración en ese programa puede reemplazarse con una administración intratecal en lugar de una administración intravenosa.

15 En algunas realizaciones, las administraciones intravenosas y intratecales se realizan secuencialmente, tales como la realización de las administraciones intravenosas primero (por ejemplo, semanal, cada dos semanas, dos veces al mes, o dosificación mensual durante dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año o más) seguidos de administraciones de IT (por ejemplo, semanalmente, cada dos semanas, dos veces al mes o dosificación mensual durante más de dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año o más). En algunas realizaciones, las administraciones intratecales se realizan primero (por ejemplo, semanalmente, cada dos semanas, dos veces al mes, mensualmente, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, dosificación durante dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año o más) seguidos de administraciones intravenosas (p. ej., semanalmente, cada dos semanas, dos veces al mes o dosificación mensual durante más de dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año o más).

- 20 20 En algunas realizaciones, la administración intratecal se utiliza en ausencia de la administración intravenosa.
- 25 En algunas realizaciones, la administración intratecal se utiliza en ausencia de terapia inmunosupresora concurrente.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 30 35 Los dibujos son para fines de ilustración solamente, y no para limitación.
- 40 Figura 1 es una ilustración ejemplar que muestra el I2S administrado por IT detectado en las neuronas (flechas) de la corteza cerebral y la corteza cerebelosa, que incluye I2S en una capa de células meníngreas que cubren la superficie del cerebro (puntas de flecha) después de inyecciones intratecales de 3 dosis. de I2S. La tinción de I2S IHC en cerebros inyectados con 2 dosis fue más débil (foto no mostrada). No se observó tinción I2S positiva para ningún tipo de células en el cerebro de animales de control de vehículos. 40X.
- 45 Figura 2 es una ilustración a modo de ejemplo que muestra la reversión de la patología en el cerebro de ratones con I2S knock-out (IKO) después de la inyección intratecal-lumbar de I2S. Los tejidos cerebrales teñidos con H&E mostraron numerosas vacuolas de almacenamiento celular (flechas) en los animales de control del vehículo. La vacuolación celular se redujo en todo el cerebro tanto en 2 dosis (foto no mostrada) como en 3 dosis inyectadas en ratones. Se encontró una reducción marcada en las 3 dosis inyectadas. 40X.
- 50 Figura 3 es una ilustración ejemplar que muestra la tinción inmunohistoquímica de LAMP-1, donde hay una marcada reducción de la actividad lisosómica en los cerebros después de 2 dosis (foto no mostrada) y 3 dosis de tratamiento con I2S en comparación con ratones controlados por vehículo. La reducción se caracterizó por la disminución en el número de células positivas para LAMP-1 y una intensidad de tinción más ligera en las regiones de todo el cerebro. 40X.
- 55 Figura 4 es una ilustración ejemplar que muestra los resultados de la morfometría de una comparación del área positiva media de LAMP-1 entre ratones de tipo salvaje (WT), vehículos no tratados e I2S (2 y 3 dosis) en la corteza cerebral (Cortex), núcleo caudado (CP), el tálamo (TH), la sustancia blanca (WM) y el cerebelo (CBL) confirmaron que hubo reducciones significativas en la tinción positiva de LAMP-1 en todas las áreas del cerebro evaluadas. Los datos se representan como la media 6 sd # P <0,05; \* P <0,01; \*\* P <0,001.
- 60 Figura 5 representa micrografías electrónicas ejemplares de células cerebrales que mostraron mejoras patológicas a nivel ultraestructural. Las neuronas de los ratones tratados con vehículo tenían inclusiones laminadas, estructuras similares a cebras y vacuolas que contenían material de almacenamiento granular (inserto), que se redujo en ratones inyectados con I2S. Los oligodendrocitos de los ratones tratados con

vehículo mostraron grandes vacuolas de almacenamiento con electroluminiscencia (flecha) mientras que los oligodendrocitos de los ratones inyectados con I2S tuvieron una mínima vacuolación. Barra de escala: en neuronas, 2  $\mu$ m; en oligodendrocitos, 500 nm.

- 5 Figura 6 representa ejemplos de resultados de inmunohistoquímica que demuestran I2S detectado en células sinusoidales del hígado después de inyecciones intratecales de 3 dosis de I2S. La tinción con 2S IHC en hígados inyectados con 2 dosis fue más débil (foto no mostrada). No hay tinción positiva de I2S en el hígado de animales controlados por vehículo. 40X.
- 10 Figura 7 representa tejido ejemplar del hígado. La tinción de H&E revela una vacuolación celular severa y una actividad lisosómica anormalmente alta y se encontró una fuerte inmunotinción de LAMP-1 en animales controlados por vehículo en comparación con los WT. Se encontró una marcada reducción de la vacuolación celular y la inmunotinción de LAMP-1 después del tratamiento intratecal con 3 y 2 dosis (foto no mostrada) del tratamiento con I2S. La tinción con H&E reveló que la vacuolización intracitoplasmática desapareció casi por completo con una estructura de células hepáticas casi normal. H&E, 40X; LÁMPARA-1, 20X.
- 15 Figura 8A-F ilustra datos ejemplares que comparan la agregación por SEC-HPLC para formulaciones de solución salina y fosfato (todos con Polisorbato-20 al 0,01%): 1 mes a  $\leq$  -65°C y 40°C.
- 20 Figura 9 ilustra datos ejemplares que comparan la agregación por SEC -HPLC método para formulaciones de solución salina y fosfato (todos con Polisorbato-20 al 0.01%): 6 meses a  $\leq$  -65°C y 25°C.
- 25 Figuras 10A - F ilustran datos ejemplares que comparan la agregación mediante el método SEC-HPLC para formulaciones de solución salina y fosfato (todos con 0.01% Polisorbato-20): 24 meses a  $\delta$  -65°C y 2 a 8°C.
- 30 Figura 11 ilustra datos ejemplares que comparan las cargas mediante el Método SAX-HPLC para formulaciones de solución salina y fosfato (todas con Polisorbato-20 al 0.01%): línea de base versus 1 mes a 40°C.
- 35 Figura 12 ilustra datos ejemplares que comparan las cargas mediante el Método SAX-HPLC para formulaciones de solución salina y fosfato (todas con Polisorbato-20 al 0.01%): línea de base versus 6 meses a 25°C.
- 40 Figura 13 ilustra datos ejemplares que comparan las cargas mediante el método SAX-HPLC para formulaciones de solución salina y fosfato (todas con 0,01% de polisorbato-20): línea de base versus 24 meses a 2 a 8°C.
- 45 Figura 14 ilustra datos ejemplares que comparan SDS-PAGE, tinción con Coomassie para formulaciones de solución salina y fosfato (todas con Polisorbato-20 al 0.01%) al inicio del estudio y 1 mes @ 40°C.
- 50 Figuras 15A y B ilustran datos ejemplares que comparan SDS-PAGE, tinción con Coomassie para formulaciones de solución salina y fosfato (todas con Polisorbato-20 al 0.01%) a los 6 meses a 25°C y durante 16 meses a 2-8°C.
- 55 Figura 16 muestra ejemplos tejidos que muestran el cerebro de un grupo de tratamiento de 3 mg de animales. Tinción positiva de 12S en células meníngreas. 4X.
- 60 Figura 17 representa tejidos ejemplares que muestran el cerebro de un animal del grupo de tratamiento de 30 mg. Tinción positiva de 12S en neuronas y células meníngreas. 4X.
- 65 Figura 18 representa tejidos ejemplares que muestran cerebro de 100 mg de grupo de tratamiento animal. Las neuronas teñidas con I2S positivas y las células meníngreas fueron más fuertes que en los animales tratados con 3 y 30 mg. 4X
- Figura 19 representa tejidos ejemplares que muestran el cerebro de un animal del grupo de tratamiento de 150 mg. Una gran población de neuronas era 12S positiva junto con células meníngreas fuertemente positivas.
- Figura 20 representa tejidos ejemplares que muestran neuronas positivas para I2S y células gliales, junto con células meníngreas, dentro de la capa I del cerebro en un animal de grupo de tratamiento de 30 mg. 40X
- Figura 21 representa tejidos ejemplares que muestran 12 neuronas positivas para S, células gliales, junto con células perivasculares, dentro de la capa III del cerebro en un animal del grupo de tratamiento de 30 mg. 40X
- La Figura 22 representa tejidos ejemplares que muestran 12 S neuronas positivas y células gliales dentro de la capa VI del cerebro adyacente a la sustancia blanca en un animal del grupo de tratamiento de 30 mg. 40X

- La Figura 23 representa tejidos ejemplares que muestran una tinción de I2S fuertemente positiva en las neuronas (cerebro) de un animal del grupo de tratamiento de 150 mg . 100X
- 5 Figura 24 representa un tejido ejemplar que muestra la inmunotinción I2S de la médula espinal cervical en un grupo de tratamiento de 150 mg . 4X
- 10 Figura 25 representa un tejido ejemplar que muestra una fuerte inmunotinción I2S en la médula espinal lumbar de un animal del grupo de tratamiento de 150 mg . 4X
- 15 Figura 26 representa un tejido ejemplar que muestra inmunotinción I2S fuertemente positiva de células meningeales, células gliales y se encontró epi/peri/endoneuro (células conectivas) en la sección lumbar de un animal del grupo de tratamiento de 150 mg. 40X
- 20 Figura 27: Las neuronas en la médula espinal lumbar de un animal del grupo de tratamiento de 150 mg fueron fuertemente positivas para I2S. 40X
- 25 Figura 28 representa resultados ejemplares de un hígado de un animal del grupo de tratamiento de 3 mg. Solo las células sinusoidales fueron positivas para I2S . 40X
- 30 Figura 29 representa resultados ejemplares de un hígado de un animal del grupo de tratamiento de 30 mg. Las células sinusoidales y los hepatocitos fueron positivos para I2S. 40X
- 35 Figura 30 representa resultados ejemplares de un hígado de un animal del grupo de tratamiento de 100 mg. La inmunotinción con I2S fue mucho más fuerte en las células sinusoidales y en los hepatocitos. 40X
- 40 Figura 31 representa resultados ejemplares de un hígado de un animal del grupo de tratamiento de 150 mg. Se identificó una tinción de I2S fuertemente positiva en células sinusoidales y hepatocitos. 40X
- 45 Figura 32 muestra resultados ejemplares de un corazón de un animal del grupo de tratamiento de 3 mg. La inmunotinción de I2S fue negativa. 40X
- 50 Figura 33 muestra resultados ejemplares de un corazón de un grupo de tratamiento con 30 mg de células animales intersticiales fueron positivas para I2S. 40X
- 55 Figura 34 representa resultados ejemplares de un corazón de un animal del grupo de tratamiento de 100 mg. Tinción celular intersticial positiva para I2S. 40X
- 60 Figura 35 muestra resultados ejemplares de un corazón de un animal del grupo de tratamiento de 150 mg. Tinción de células intersticiales fuertemente positivas para I2S. 40X
- 65 Figura 36 representa resultados ejemplares de un riñón de un animal del grupo de tratamiento de 3 mg. La inmunotinción de I2S fue negativa. 40X
- Figura 37 representa resultados ejemplares de un riñón de un animal del grupo de tratamiento de 30 mg. Las células glomerulares e intersticiales fueron positivas para I2S.
- Figura 38 representa resultados ejemplares de un riñón de un animal del grupo de tratamiento de 100 mg. Aumento de la tinción de células glomerulares e intersticiales para I2S. 40X
- Figura 39 representa resultados ejemplares de un riñón de un animal del grupo de tratamiento de 150 mg. Tinción I2S positiva de células tubulares proximales, glomerulares e intersticiales. 40X
- Figura 40 ilustra los resultados de los estudios de inmunohistoquímica (IHC) que evalúan los tejidos del SNC de monos cynomolgus a los que se administraron dosis semanales de iduronato-2-sulfatasa (I2S). Según lo determinado por (IHC), hubo una deposición celular generalizada de I2S en todo el SNC. En la materia gris, se detectó I2S en las neuronas del cerebro, el cerebelo, el tronco encefálico y la médula espinal de todos los grupos de manera dependiente de la dosis. En la materia gris superficial de los grupos de dosis más altas, un gran número de neuronas cerebrales fueron positivas para la tinción de I2S en la corteza superficial (Figura 40A). También se detectó I2S en neuronas del tálamo (Figura 40B), hipocampo (Figura 40C), núcleo caudado (Figura 40D) y médula espinal (Figura 40E). Las células meningeales y perivasculares también se tiñeron positivamente con I2S (Figura 40F). Las barras de escala identificadas corresponden a 25 µm.
- Figura 41 compara gráficamente el aclaramiento de iduronato-2-sulfatasa (I2S) en las agrupaciones craneales y espinales al trazar la cantidad de I2S en dichas agrupaciones en relación con el tiempo posterior a la

administración.

Figura 42 ilustra la deposición de materia gris dependiente de la dosis de iduronato-2-sulfatasa (I2S) administrada intratecalmente a primates no humanos durante seis meses. La intensidad de tinción ilustrada corresponde con la acumulación de iduronato-2-sulfatasa en el tálamo. En la presente Figura 42, los núcleos están contrarrestados por DAPI y aparecen en azul y la proteína (I2S) aparece en verde.

Figura 43 ilustra la acumulación dependiente de la dosis de iduronato-2-sulfatasa (I2S) administrada intratecalmente a primates no humanos después de una inyección única y después de inyecciones múltiples durante un período de seis meses. La intensidad de tinción ilustrada corresponde con la acumulación de proteína I2S en la corteza cerebral.

Figura 44 demuestra la localización celular de iduronato-2-sulfatasa (I2S) en todo el cerebro del primate no humano. La Figura 44A ilustra la vista en sección transversal del tejido cerebral extraído del cerebro del primate no humano, mientras que la Figura 44B ilustra esas áreas particulares de la región correspondientes a tres áreas de tejido de materia blanca (designadas W1, W2 y W3), el sustancia blanca cerca del ventrículo (VW) y los tejidos superficiales de materia gris (SG) de la sección identificada en la Figura 44A.

Figura 45A - D ilustra la captación neuronal y de oligodendrocitos y la asociación axonal de iduronato-2-sulfatasa (I2S) administrada intratecalmente a primates no humanos después de inyecciones mensuales durante un período de seis meses. En particular, la Figura 45A, la Figura 45B, la Figura 45C y la Figura 45D son ilustrativas de una tinción de filamento de los tejidos del cerebro de los primates no humanos administrados por vía intratecal-2-sulfatasa (I2S) y corresponden respectivamente a las tres áreas del blanco materia (W1, W2 y W3) y las regiones de materia gris superficial (SG) identificadas en la Figura 44B. La Figura 45A ilustra la captación de oligodendrocitos de I2S administrado intratecalmente en los tejidos de la sustancia blanca (W1). La Figura 45B y la Figura 45C ilustran la captación de oligodendrocitos y la asociación axonal del I2S administrado intratecalmente en los tejidos de la sustancia blanca W2 y W3 respectivamente. La figura 45D ilustra la captación neuronal del I2S administrado intratecalmente en los tejidos de la sustancia gris superficial (SG).

Figura 46 ilustra la identificación celular de iduronato-2-sulfatasa en la sustancia blanca cerca del ventrículo (VW) de un primate no humano. Como se muestra en la imagen superpuesta, iduronato-2-sulfatasa no está asociada con la mielina (roja). En la presente Figura 46, los núcleos están contra-teñidos por DAPI (abajo a la izquierda). La proteína (I2S) aparece en el cuadro superior izquierdo.

Figura 47 ilustra la tinción en los tejidos de perros Beagle sanos que se les administró por vía intracerebroventricular (ICV) o intratecal (IT) una sola inyección de iduronato-2-sulfatasa (I2S). Como se representa en las Figuras 47A-47H, I2S se distribuyó ampliamente en toda la materia gris de los grupos IT e ICV según lo determinado por inmunohistoquímica (IHC). Las Figuras 47A y 47B ilustran que en la corteza cerebral, las neuronas fueron positivas para I2S en las seis capas neuronales, desde la capa molecular superficial hasta la capa interna profunda en los grupos IT e ICV. Las Figuras 47C y 47D ilustran que en la corteza cerebelosa de los grupos IT e ICV se detectó I2S en neuronas, incluidas las células de Purkinje. De manera similar, las Figuras 47E y 47F ilustran que tanto en los grupos IT como en los ICV, una gran población de neuronas en el hipocampo fue positiva para I2S. Finalmente, las imágenes g y h demuestran que las neuronas positivas para I2S también se encontraron en el núcleo tálamo y caudado en los grupos IT e ICV. En la presente Figura 47, la tinción de I2S se indica con flechas.

Figura 48 ilustra comparativamente los tejidos del cuerpo calloso de ratones inactivados con iduronato-2-sulfatasa (IKO) que no se trataron o se les administró I2S intratecalmente (abreviatura V = vacuola). Como se muestra, los ratones IKO tratados mostraron una reducción de la vacuolación celular característica de ciertos trastornos de almacenamiento lisosómico en el cuerpo calloso y los tejidos fornix del ratón IKO tratado con I2S.

Figura 49A ilustra una marcada reducción en la presencia de la proteína de membrana asociada al lisosoma 1 (LAMP1), un biomarcador patológico de la enfermedad lisosómica, en los tejidos de la corteza cerebral superficial del ratón IKO tratado (Figura 49A) en relación con el ratón de control IKO no tratado (Figura 49B) con un aumento de 20X y 40X.

Figura 50 representa un ejemplo de dispositivo de administración de fármacos intratecales (IDDD).

Figura 51 representa un ejemplo de sistema de acceso implantable intratecal de bajo perfil PORT-A-CATH®.

Figura 52 representa un ejemplo de dispositivo de administración de fármacos intratecales (IDDD).

Figura 53 representa un dispositivo de administración de fármacos intratecales (IDDD) ejemplar, que permite

la administración en el hogar para la terapia de reemplazo de enzimas del SNC (ERT).

Figura 54 ilustra el efecto ejemplar de la vacuolización después de una única inyección intracerebral de idursulfasa en neuronas (células de Purkinje).

Figura 55 ilustra la actividad ejemplar de I2S en el cerebro por dosis y región.

Figura 56 ilustra datos ejemplares de localización inmunohistoquímica de idursulfasa a diferentes profundidades de la corteza cerebral.

Figura 57 ilustra la actividad ejemplar de I2S en la médula espinal de mono después de la dosificación intratecal con idursulfasa.

Figura 58 ilustra la actividad ejemplar de I2S en hígado, corazón y riñón de mono después de la dosificación intratecal con idursulfasa. La Figura 59 muestra un esquema ejemplar para un programa de prueba de escalamiento Hunter-IT.

Figura 60 ilustra medidas ejemplares de concentraciones de I2S en diversas secciones de tejido cerebral después de una dosis de 30 mg. Las diferentes parcelas corresponden a diferentes tiempos de medición.

Figura 61 ilustra medidas ejemplares de la concentración de I2S después de la administración a lo largo del tiempo a través de diversas vías de administración para diversas concentraciones de producto.

Figura 62 es una ilustración ejemplar de la imagen PET de la idursulfasa-IT marcada con <sup>124</sup>I en monos cynomolgus a t = 5 horas después de la dosificación IV, IT-L o ICV.

Figura 63 ilustra un diagrama a modo de ejemplo de un dispositivo de administración de fármacos intratecal IDDD.

Figura 64 muestra varias características de un IDDD tanto dentro del cuerpo de un sujeto (Figura 64A) como en una superficie plana (Figura 64B)

## DEFINICIONES

A fin de que la presente invención se comprenda más fácilmente, ciertos términos se definen primero a continuación. Las definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos se establecen a lo largo de la especificación.

*Aproximadamente o alrededor de:* Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" o "alrededor de", como se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. El término "aproximadamente" o "alrededor de" se refiere a un rango de valores que se encuentran dentro del 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o menos en cualquier dirección (mayor o menor que) del valor de referencia indicado a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto (excepto donde dicho número excedería el 100% de un valor posible).

*Mejoría:* como se usa en el presente documento, el término "mejoría" se refiere a la prevención, reducción o paliación de un estado o mejora del estado de un sujeto. La mejora incluye, pero no requiere la recuperación completa o la prevención completa de una enfermedad. En algunas realizaciones, la mejora incluye niveles crecientes de proteína relevante o su actividad que es deficiente en tejidos de enfermedad relevantes.

*Biológicamente activo:* como se usa en el presente documento, la frase "biológicamente activo" se refiere a una característica de cualquier agente que tiene actividad en un sistema biológico, y particularmente en un organismo. Por ejemplo, un agente que, cuando se administra a un organismo, tiene un efecto biológico sobre ese organismo, se considera biológicamente activo. Donde una proteína o polipéptido es biológicamente activo, una porción de esa proteína o polipéptido que comparte al menos una actividad biológica de la proteína o polipéptido se denomina típicamente una porción "biológicamente activa".

*Agente de carga:* Como se usa en el presente documento, el término "agente de carga" se refiere a un compuesto que agrega masa a la mezcla liofilizada y contribuye a la estructura física de la torta liofilizada (por ejemplo, facilita la producción de una torta liofilizada esencialmente uniforme que mantiene una estructura de poros abiertos). Ejemplos de agentes de carga incluyen manitol, glicina, cloruro de sodio, hidroxietilalmidón, lactosa, sacarosa, trehalosa, polietilenglicol y dextrano.

*Receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes (CI-MPR):* como se usa en el presente documento,

el término "receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes (CI-MPR)" se refiere a un receptor celular que se une a la manosa-6-fosfato (M6P) en los precursores de la hidrolasa ácida en el aparato de Golgi que están destinados al transporte al lisosoma. Además de manosa-6-fosfatos, el CI-MPR también se une a otras proteínas, incluido IGF-II. El CI-MPR también se conoce como "receptor M6P/IGF-II", "receptor CI-MPR/IGF-II", "receptor IGF-II" o "receptor IGF2". Estos términos y abreviaturas de los mismos se usan indistintamente en el presente documento.

**Terapia inmunsupresora concurrente:** Como se usa en el presente documento, el término "terapia inmunsupresora concurrente" incluye cualquier terapia inmunsupresora utilizada como pretratamiento, preacondicionamiento o en paralelo a un método de tratamiento.

**Diluyente:** Como se usa en el presente documento, el término "diluyente" se refiere a una sustancia diluyente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, segura y no tóxica para la administración a un humano) útil para la preparación de una formulación reconstituida. Los diluyentes ejemplares incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución tamponada con pH (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

**Forma de dosificación:** Como se usa en el presente documento, los términos "forma de dosificación" y "forma de dosificación unitaria" se refieren a una unidad físicamente discreta de una proteína terapéutica para el paciente a tratar. Cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado. Sin embargo, se entenderá que la dosificación total de la composición será decidida por el médico tratante dentro del alcance del buen juicio médico.

**Terapia de reemplazo de enzimas (ERT):** Como se usa en el presente documento, el término "terapia de reemplazo de enzimas (ERT)" se refiere a cualquier estrategia terapéutica que corrige una deficiencia de enzimas proporcionando la enzima faltante. La enzima faltante se proporciona mediante administración intratecal. La enzima faltante se proporciona mediante infusión en el vapor de sangre. Una vez administrada, la enzima es absorbida por las células y transportada al lisosoma, donde la enzima actúa para eliminar el material que se ha acumulado en los lisosomas debido a la deficiencia enzimática. Típicamente, para que la terapia de reemplazo de la enzima lisosómica sea efectiva, la enzima terapéutica se administra a los lisosomas en las células apropiadas en los Tejidos diana donde se manifiesta el defecto de almacenamiento.

**Mejorar, aumentar o reducir:** como se usa en el presente documento, los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir", o equivalentes gramaticales, indican valores relativos a una medición de referencia, como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito aquí, o una medición en un individuo de control (o individuos de control múltiple) en ausencia del tratamiento descrito aquí. Un "individuo de control" es un individuo afectado con la misma forma de enfermedad de almacenamiento lisosómico que el individuo que está siendo tratado, que tiene aproximadamente la misma edad que el individuo que está siendo tratado (para asegurar que las etapas de la enfermedad en el individuo tratado y el control individuo(s) son comparables).

**Individuo, sujeto, paciente:** como se usa en el presente documento, los términos "sujeto", "individuo" o "paciente" se refieren a un sujeto humano o un mamífero no humano. El individuo (también denominado "paciente" o "sujeto") que se está tratando es un individuo (feto, bebé, niño, adolescente o adulto humano) que padece una enfermedad.

**Administración intratecal:** como se usa en el presente documento, el término "administración intratecal" o "inyección intratecal" se refiere a una inyección en el canal espinal (espacio intratecal que rodea la médula espinal). Se pueden usar diversas técnicas, que incluyen, sin limitación, inyección cerebroventricular lateral a través de un agujero de perforación o punción cisternal o lumbar o similares. "Administración intratecal" o "administración intratecal" según la presente invención se refiere a administración o administración de IT a través del área o región lumbar, es decir, administración o administración de IT lumbar. Como se usa en el presente documento, el término "región lumbar" o "área lumbar" se refiere al área entre la tercera y cuarta vértebras lumbares (parte inferior de la espalda) y, más inclusivamente, la región L2-S1 de la columna vertebral.

**Enlazador:** Como se usa en el presente documento, el término "enlazador" se refiere, en una proteína de fusión, a una secuencia de aminoácidos distinta de la que aparece en una posición particular en la proteína natural y generalmente está diseñada para ser flexible o para interponer una estructura, como una a-hélice, entre dos restos proteicos. Un enlazador también se conoce como espaciador.

**Lioprotector:** Como se usa en el presente documento, el término "Lioprotector" se refiere a una molécula que previene o reduce la inestabilidad química y/o física de una proteína u otra sustancia tras la liofilización y el almacenamiento posterior. Los ejemplos de lioprotectores incluyen azúcares tales como sacarosa o trehalosa; un aminoácido tal como glutamato monosódico o histidina; una metilamina como la betaina; una sal liotrópica tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alcoholes trihidroxilados o de azúcar superior, por ejemplo, glicerina, eritritol, glicerol, arabinol, xilitol, sorbitol y manitol; propilenglicol; polietilenglicol; Pluronics; y combinaciones de los mismos. Un lioprotector es un azúcar no reductor, tal como trehalosa o sacarosa.

**5** *Enzima lisosómica:* Como se usa en el presente documento, el término "enzima lisosómica" se refiere a cualquier enzima que sea capaz de reducir los materiales acumulados en los lisosomas de mamíferos o que pueda rescatar o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad de almacenamiento lisosómico. Las enzimas lisosómicas incluyen enzimas lisosómicas tanto de tipo salvaje como modificadas y pueden producirse usando métodos recombinantes y sintéticos o purificarse de fuentes naturales. Ejemplos de enzimas lisosomales se enumeran en la Tabla 1.

**10** *Deficiencia de enzimas lisosomales:* Como se usa en el presente documento, "deficiencia de enzimas lisosomales" se refiere a un grupo de trastornos genéticos que resultan de la deficiencia en al menos una de las enzimas que se requieren para romper macromoléculas (p. ej., sustratos enzimáticos) hasta péptidos, aminoácidos, monosacáridos, ácidos nucleicos y ácidos grasos en los lisosomas. Como resultado, las personas que padecen deficiencias de enzimas lisosómicas han acumulado materiales en varios tejidos (p. ej., SNC, hígado, bazo, intestino, paredes de los vasos sanguíneos y otros órganos).

**15** *Enfermedad de almacenamiento lisosómico:* Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad de almacenamiento lisosómico" se refiere a cualquier enfermedad resultante de la deficiencia de una o más enzimas lisosómicas necesarias para metabolizar las macromoléculas naturales. Estas enfermedades típicamente resultan en la acumulación de moléculas no degradadas en los lisosomas, lo que resulta en un mayor número de gránulos de almacenamiento (también llamados vesículas de almacenamiento). Estas enfermedades y varios ejemplos se describen con más detalle a continuación.

**20** *Polipéptido:* Como se usa en el presente documento, un "polipéptido", en general, es una cadena de al menos dos aminoácidos unidos entre sí por un enlace peptídico. Un polipéptido puede incluir al menos 3-5 aminoácidos, cada uno de los cuales está unido a otros por medio de al menos un enlace peptídico. Aquellos de experiencia ordinaria en la técnica apreciarán que los polipéptidos a veces incluyen ácidos "no naturales" de aminoácido o de otras entidades que, sin embargo son capaces de la integración en una cadena polipeptídica, opcionalmente.

**25** *Enzima de reemplazo:* Como se usa en el presente documento, el término "enzima de reemplazo" se refiere a cualquier enzima que pueda actuar para reemplazar al menos en parte la enzima deficiente o faltante en una enfermedad a tratar. El término "enzima de reemplazo" se refiere a cualquier enzima que puede actuar para reemplazar al menos en parte la enzima lisosómica deficiente o faltante en una enfermedad de almacenamiento lisosomal a tratar. Una enzima de reemplazo es capaz de reducir los materiales acumulados en los lisosomas de mamíferos o que puede rescatar o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad de almacenamiento lisosómico. Las enzimas de reemplazo adecuadas para la invención incluyen enzimas lisosómicas tanto de tipo salvaje como modificadas y pueden producirse usando métodos recombinantes y sintéticos o purificarse de fuentes naturales. Una enzima de reemplazo puede ser una enzima recombinante, sintética, activada por genes o natural.

**30** *Soluble:* Como se usa en el presente documento, el término "soluble" se refiere a la capacidad de un agente terapéutico para formar una solución homogénea. La solubilidad del agente terapéutico en la solución en donde se administra y por la cual se transporta al sitio de acción objetivo (p. ej., las células y los tejidos del cerebro) es suficiente para permitir la administración terapéutica. cantidad efectiva del agente terapéutico en el sitio de acción objetivo. Varios factores pueden afectar la solubilidad de los agentes terapéuticos. Por ejemplo, los factores relevantes que pueden afectar la solubilidad de la proteína incluyen la fuerza iónica, la secuencia de aminoácidos y la presencia de otros agentes o sales co-solubilizantes (por ejemplo, sales de calcio). Las composiciones farmacéuticas se formulan de tal manera que las sales de calcio se excluyen de tales composiciones. El agente terapéutico de acuerdo con la presente invención es soluble en su composición farmacéutica correspondiente. Se apreciará que, aunque las soluciones isotónicas se prefieren generalmente para fármacos administrados por vía parenteral, el uso de soluciones isotónicas puede limitar la solubilidad adecuada para algunos agentes terapéuticos y, en particular, algunas proteínas y/o enzimas. Se ha demostrado que las soluciones ligeramente hipertónicas (p. ej., hasta 175 mM de cloruro de sodio en fosfato de sodio 5 mM a pH 7,0) y las soluciones que contienen azúcar (p. ej., hasta sacarosa al 2% en fosfato de sodio 5 mM a pH 7,0) son bien toleradas en los monos. Por ejemplo, la composición de formulación de bolo aprobada por el SNC más común es la solución salina (NaCl 150 mM en agua).

**35** *Estabilidad:* Como se usa en el presente documento, el término "estable" se refiere a la capacidad del agente terapéutico (p. ej., Una enzima recombinante) para mantener su eficacia terapéutica (p. ej., la totalidad o la mayoría de su actividad biológica y/o integridad fisicoquímica) períodos prolongados de tiempo. La estabilidad de un agente terapéutico y la capacidad de la composición farmacéutica para mantener la estabilidad de dicho agente terapéutico pueden evaluarse durante períodos de tiempo prolongados (por ejemplo, durante al menos 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36 meses o más). En general, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se han formulado de manera que sean capaces de estabilizar, o alternativamente, ralentizar o prevenir la degradación, de uno o más agentes terapéuticos formulados con ellos (por ejemplo, proteínas recombinantes). En el contexto de una formulación de una formulación estable es una en donde el agente terapéutico retiene en ella esencialmente su físico y/o químico integridad y la actividad biológica durante el almacenamiento y durante los procesos (tales como congelación/descongelación, mezcla mecánica y liofilización). Para la estabilidad de la proteína, se puede medir

mediante la formación de agregados de alto peso molecular (HMW), pérdida de actividad enzimática, generación de fragmentos de péptidos y desplazamiento de los perfiles de carga.

5 *Sujeto:* Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" significa cualquier mamífero, incluidos los humanos. El sujeto es un adulto, un adolescente o un bebé.

10 *Homología sustancial:* la frase "homología sustancial" se usa en el presente documento para referirse a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico. Como apreciarán los expertos en la técnica, generalmente se considera que dos secuencias son "sustancialmente homólogas" si contienen residuos homólogos en las posiciones correspondientes. Los residuos homólogos pueden ser residuos idénticos. Alternativamente, los residuos homólogos pueden ser residuos no idénticos con características estructurales y/o funcionales apropiadamente similares. Por ejemplo, como es bien conocido por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica, ciertos aminoácidos se clasifican típicamente como aminoácidos "hidrófobo" o "hidrófilo", y/o como que tienen cadenas laterales "polar" o "no polares". La sustitución de un aminoácido por otro del mismo tipo a menudo puede considerarse una sustitución "homóloga".

15 Como es bien sabido en esta técnica, las secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos se pueden comparar usando cualquiera de una variedad de algoritmos, incluidos los disponibles en programas informáticos comerciales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, BLACK interrumpido y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Ejemplos de tales programas se describen en Altschul, et al., herramienta básica de búsqueda de alineación local, J. Mol. Biol., 215 (3): 403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias homólogas, los programas mencionados anteriormente típicamente proporcionan una indicación del grado de homología. Se considera que dos secuencias son sustancialmente homólogas si al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de sus residuos correspondientes son homólogos en un tramo relevante de residuos. El estiramiento relevante es una secuencia completa. El estiramiento relevante es al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más residuos.

20 *Identidad sustancial:* La frase "identidad sustancial" se usa en el presente documento para referirse a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico. Como apreciarán los expertos en la materia, generalmente se considera que dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si contienen residuos idénticos en las posiciones correspondientes. Como es bien sabido en esta técnica, las secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos se pueden comparar usando cualquiera de una variedad de algoritmos, incluidos los disponibles en programas informáticos comerciales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, BLACK interrumpido y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Ejemplos de tales programas se describen en Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; and Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias idénticas, los programas mencionados anteriormente típicamente proporcionan una indicación del grado de identidad. Se considera que dos secuencias son sustancialmente idénticas si al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de sus residuos correspondientes son idénticos en un tramo relevante de residuos. El estiramiento relevante es una secuencia completa. El estiramiento relevante es al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más residuos.

25 *LCR sintético:* Como se usa en este documento, el término "LCR sintético" se refiere a una solución que tiene pH, composición de electrolitos, contenido de glucosa y osmolaridad consistente con el líquido cefalorraquídeo. El LCR sintético también se conoce como LCR artificial. El LCR sintético es una solución B de Elliott.

30 *Adecuado para el suministro de SNC:* Como se usa en el presente documento, la frase "adecuado para el suministro de SNC" o "adecuado para el suministro intratecal" en lo que se refiere a las composiciones farmacéuticas de la presente invención generalmente se refiere a las propiedades de estabilidad, tolerabilidad y solubilidad de tales composiciones, así como la capacidad de tales composiciones para administrar una cantidad eficaz del agente terapéutico contenido en el sitio de administración diana (por ejemplo, el LCR o el cerebro).

35 *Tejidos diana:* Como se usa en el presente documento, el término "tejidos diana" se refiere a cualquier tejido afectado por la enfermedad de almacenamiento lisosomal a tratar o cualquier tejido en donde la enzima lisosomal deficiente se expresa normalmente. Los tejidos diana incluyen aquellos tejidos en los que hay una cantidad detectable o anormalmente alta de sustrato enzimático, por ejemplo almacenado en los lisosomas celulares del tejido, en pacientes que padecen o son susceptibles a la enfermedad de almacenamiento lisosómico. Los tejidos diana incluyen

aquellos tejidos que muestran patología, síntoma o característica asociada a la enfermedad. Los tejidos diana incluyen aquellos tejidos en los que la enzima lisosómica deficiente se expresa normalmente a un nivel elevado. Como se usa en el presente documento, un tejido diana puede ser un tejido diana cerebral, un tejido diana de la médula espinal y/o un tejido diana periférico. Los tejidos diana ejemplares se describen en detalle a continuación.

5           *Resto terapéutico:* Como se usa en el presente documento, el término "resto terapéutico" se refiere a una porción de una molécula que produce el efecto terapéutico de la molécula. Un resto terapéutico es un polipéptido que tiene actividad terapéutica.

10          *Cantidad terapéuticamente efectiva:* Como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de una proteína terapéutica (por ejemplo, enzima de reemplazo) que confiere un efecto terapéutico en el sujeto tratado, a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier médico tratamiento. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible por alguna prueba o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación o siente un efecto). En particular, la "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de una proteína terapéutica o composición efectiva para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección deseada, o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable, tal como al mejorar los síntomas asociados con la enfermedad, previniendo o retrasando la aparición de la enfermedad, y/o también disminuyendo la severidad o frecuencia de los síntomas de la enfermedad. Una cantidad terapéuticamente efectiva se administra comúnmente en un régimen de dosificación que puede comprender múltiples dosis unitarias. Para cualquier proteína terapéutica particular, una cantidad terapéuticamente efectiva (y/o una dosis unitaria apropiada dentro de un régimen de dosificación eficaz) puede variar, por ejemplo, dependiendo de la vía de administración, en combinación con otros agentes farmacéuticos. Además, la cantidad terapéuticamente eficaz específica (y/o dosis unitaria) para cualquier paciente particular puede depender de una variedad de factores incluyendo el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del agente farmacéutico específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, la ruta de administración y/o la tasa de excreción o metabolismo de la proteína de fusión específica empleada; la duración del tratamiento; y factores similares como es bien conocido en las técnicas médicas.

30          *Tolerable:* Tal como se usa en el presente documento, los términos "tolerable" y "tolerabilidad" se refieren a la capacidad de las composiciones farmacéuticas de la presente invención para no provocar una reacción adversa en el sujeto al que se administra dicha composición, o alternativamente no provocar una reacción grave. La reacción adversa en el sujeto al que se administra dicha composición. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención son bien toleradas por el sujeto al que se administran tales composiciones.

35          *Tratamiento:* Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" (también "tratar" o "tratamiento") se refiere a cualquier administración de una proteína terapéutica (enzima lisosómica) que alivia, mejora, inhibe, inhibe o retraza parcial o completamente la aparición de, reduce la gravedad y/o reduce la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección en particular (síndrome de Hunters). Tal tratamiento puede ser de un sujeto que no muestra signos de la enfermedad, trastorno y/o condición relevante y/o de un sujeto que exhibe solo signos tempranos de la enfermedad, trastorno y/o condición. Alternativa o adicionalmente, dicho tratamiento puede ser de un sujeto que exhibe uno o más signos establecidos de la enfermedad, trastorno y/o condición relevante.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

45          La presente invención proporciona composiciones para la administración directa eficaz de un agente terapéutico al sistema nervioso central (SNC) para su uso en un método de tratamiento del síndrome de Hunters. Como se discutió anteriormente, la presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que una proteína de I2S para tratar el Síndrome de Hunter se puede introducir directamente en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de un sujeto que necesita tratamiento a una alta concentración sin inducir efectos adversos sustanciales en el tema. Más sorprendentemente, los presentes inventores descubrieron que la enzima de reemplazo puede administrarse en una solución salina simple o formulación a base de tampón, sin usar LCR sintético. Aún más inesperadamente, el suministro intratecal según la presente invención no produce efectos adversos sustanciales, tales como una respuesta inmune severa, en el sujeto. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el suministro intratecal de acuerdo con la presente invención puede usarse en ausencia de terapia inmunosupresora concurrente (por ejemplo, sin inducción de tolerancia inmune por pretratamiento o preacondicionamiento).

60          En algunas realizaciones, la entrega intratecal de acuerdo con la presente invención permite la difusión eficiente a través de varios tejidos cerebrales resultantes en la entrega eficaz de la enzima I2S de reemplazo en varios tejidos cerebrales diana en superficie, regiones de poca profundidad y/o del cerebro profundo. En algunas realizaciones, el suministro intratecal según la presente invención dio como resultado una cantidad suficiente de enzimas de reemplazo que ingresan a la circulación periférica. Como resultado, en algunos casos, el suministro intratecal según la presente invención dio como resultado el suministro de la enzima de reemplazo en tejidos periféricos, tales como hígado, corazón, bazo y riñón. Este descubrimiento es inesperado y puede ser particularmente útil para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico que tienen componentes del SNC y

periféricos, que típicamente requerirían tanto la administración intratecal regular como la administración intravenosa. Se contempla que el suministro intratecal de acuerdo con la presente invención puede permitir una dosificación y/o frecuencia reducida de inyección iv sin comprometer los efectos terapéuticos en el tratamiento de los síntomas periféricos.

5 La presente invención proporciona varias características inesperadas y beneficiosas que permiten la administración eficiente y conveniente de las enzimas de reemplazo para diversos tejidos diana cerebro, dando como resultado un tratamiento eficaz de enfermedades de almacenamiento lisosomal que tienen indicaciones del SNC.

10 **Enzimas de reemplazo**

Proteína de iduronato-2-sulfatasa

15 En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas por la presente invención se utilizan para entregar una proteína de iduronato-2-sulfatasa (I2S) al SNC para el tratamiento de síndrome de Hunter. Una proteína I2S adecuada puede ser cualquier molécula o una porción de una molécula que pueda sustituir la actividad de la proteína Iduronato-2-sulfatasa (I2S) natural o rescatar uno o más fenotipos o síntomas asociados con la deficiencia de I2S. En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo adecuada para la invención es un polipéptido que tiene un N-terminal y un C-terminal y una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar o idéntica a la proteína I2S humana madura.

20 Típicamente, la proteína I2S humana es producida como una forma precursora. La forma precursora de I2S humano contiene un péptido señal (residuos de aminoácidos 1-25 del precursor de longitud completa), un pro-péptido (residuos de aminoácidos 26-33 del precursor de longitud completa) y una cadena (residuos 34-550 del precursor de longitud completa) que puede procesarse adicionalmente en la cadena de 42 kDa (residuos 34-455 del precursor de longitud completa) y la cadena de 14 kDa (residuos 446-550 del precursor de longitud completa). Típicamente, la forma precursora también se conoce como precursora de longitud completa o proteína I2S de longitud completa, que contiene 550 aminoácidos. Las secuencias de aminoácidos de la forma madura (SEQ ID NO: 1) que tiene el péptido señal eliminado y el precursor de longitud completa (SEQ ID NO: 2) de una proteína I2S humana natural o de origen natural típica se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Iduronato-2-sulfatasa humana**

35	<b>Forma madura</b>	SETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLFQNAFA QQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSV GKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVD VLDVPEGTLPDKQSTEQAQIQLLEKMKTTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKL YPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPGIPVDFQRK IRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWLGEHGEWAKYS NFDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLFYLPYLDPFDSASQLMEPGRQSMDLVEL VSLFPTLAGLAGLQVPPRCPVPSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNP RELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKDIKIMGYSIRTIDYRTVWVGFPNDEFL ANFSDIHAGELYFVDSDPLQDHNMYNDSDGGDLFQLLMP (SEQ ID NO:1)
40	<b>Precursor de longitud completa</b>	MPPPRTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGCY GDKLVRSPNIDQLASHSLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLYDFNSY WRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGVKFHPGISSNHTDDSPYSWSFPYHPSSE KYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLPDKQSTEQAQIQLLEKMKTSA SPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPGIPVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWLGEHGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLFYLPYLDPFDSASQLMEPGRQSMDLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCPVPSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKDIKIMGYSIRTIDYRTVWVGFPNDEFLANFSDIHAGELYFVDSDPLQDHNMYNDSDGGDLFQLLMP (SEQ ID NO:2)
45		
50		
55		

60 Por lo tanto, en algunas realizaciones, una enzima de reemplazo adecuada para su uso de acuerdo con la presente invención es la proteína de I2S humana madura (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo adecuada puede ser un homólogo o un análogo de la proteína de I2S humana madura. Por ejemplo, un homólogo o un análogo de la proteína de I2S humana madura puede ser una proteína de I2S humana madura modificada que contiene una o más sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos en comparación con una proteína de I2S natural o natural (p. ej., SEQ ID NO: 1), mientras se mantiene una actividad proteica I2S sustancial. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una enzima de reemplazo adecuada para su uso de acuerdo con la presente invención es sustancialmente homóloga a la proteína de I2S humana madura (SEQ ID NO: 1). En algunas

realizaciones, una enzima de reemplazo adecuada para su uso de acuerdo con la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homólogo a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo adecuada para su uso de acuerdo con la presente invención es sustancialmente idéntico a la proteína de I2S humana madura (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo adecuada para su uso de acuerdo con la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idénticos a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo adecuada para su uso con la presente invención contiene un fragmento o una porción de proteína de I2S humana madura.

Como alternativa, una enzima de reemplazo adecuada para su uso de acuerdo con la presente invención es la proteína de I2S de longitud completa. En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo adecuada puede ser un homólogo o un análogo de la proteína de I2S humana de longitud completa. Por ejemplo, un homólogo o un análogo de la proteína de I2S humana de longitud completa puede ser una proteína de I2S humana de longitud completa modificada que contiene una o más sustituciones, delecciones de aminoácidos,y/o inserciones en comparación con una proteína de I2S natural o de longitud completa (p. ej., SEQ ID NO: 2), mientras se mantiene una actividad proteica I2S sustancial. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una enzima de reemplazo adecuada para la presente invención es sustancialmente homóloga a la proteína de I2S humana de longitud completa (SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo adecuada para el presente la invención tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homólogo a la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo adecuada para la presente invención es sustancialmente idéntica a la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo adecuada para la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idénticos a la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo adecuada para la presente invención contiene un fragmento o una porción de proteína de I2S humana de longitud completa. Como se usa en el presente documento, una proteína de I2S de longitud completa contiene típicamente una secuencia de péptido señal.

En algunas realizaciones, una enzima I2S de reemplazo adecuada para su uso de acuerdo con la invención puede tener una secuencia de origen natural o de tipo salvaje. En algunas realizaciones, una enzima I2S de reemplazo adecuada para su uso de acuerdo con la invención puede tener una secuencia modificada que tenga una homología sustancial o se identifique con la secuencia de tipo salvaje o de origen natural (por ejemplo, que tenga por lo menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% de identidad de secuencia con la secuencia de tipo salvaje o de origen natural).

Una enzima I2S de reemplazo adecuada para su uso de acuerdo con la presente invención puede producirse por cualquier medio disponible. Por ejemplo, las enzimas de reemplazo pueden producirse de manera recombinante utilizando un sistema de células huésped diseñado para expresar un ácido nucleico que codifica una enzima de reemplazo. Alternativa o adicionalmente, pueden producirse enzimas de reemplazo activando genes endógenos. Alternativa o adicionalmente, las enzimas de reemplazo pueden prepararse parcial o totalmente mediante síntesis química. Alternativa o adicionalmente, las enzimas de reemplazo también pueden purificarse a partir de fuentes naturales.

Cuando las enzimas se producen de manera recombinante, puede usarse cualquier sistema de expresión. Para dar sólo unos pocos ejemplos, los sistemas de expresión conocidos incluyen, por ejemplo, células de huevo, baculovirus, plantas, levaduras o mamíferos.

En algunas realizaciones, las enzimas adecuadas para su uso de acuerdo con la presente invención se producen en células de mamíferos. Los ejemplos no limitativos de células de mamífero que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen la línea de mieloma de ratón BALB/c (NSO/1, ECACC Nº: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6, CruCell, Leiden, Países Bajos); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59,1977 ); línea celular de fibrosarcoma humano (por ejemplo, HT1080); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino +/- DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216, 1980 ); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251, 1980 ); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HeLa, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI ( Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383: 44-68, 1982 ); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

En algunas realizaciones, las formulaciones para su uso de acuerdo con la presente invención se usan para administrar enzimas I2S de reemplazo producidas a partir de células humanas. En algunas realizaciones, las formulaciones para su uso de acuerdo con la presente invención se usan para administrar enzimas I2S de reemplazo

producidas a partir de células CHO.

En algunas realizaciones, las enzimas I2S de reemplazo para su uso de acuerdo con la invención contienen un resto que se une a un receptor en la superficie de las células cerebrales para facilitar la captación celular y/o el direccionamiento lisosómico. Por ejemplo, tal receptor puede ser el receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes (CI-MPR) que se une a los residuos de manosa-6-fosfato (M6P). Además, el CI-MPR también se une a otras proteínas, incluyendo IGF-II. En algunas realizaciones, una enzima I2S de reemplazo adecuada para su uso de acuerdo con la presente invención contiene residuos de M6P en la superficie de la proteína. En algunas realizaciones, una enzima I2S de reemplazo adecuada para su uso de acuerdo con la presente invención puede contener oligosacáridos bis-fosforilados que tienen una afinidad de unión más alta para el CI-MPR. En algunas realizaciones, una enzima adecuada contiene hasta aproximadamente una media de aproximadamente por lo menos el 20% de oligosacáridos bis-fosforilados por enzima. En otras realizaciones, una enzima adecuada puede contener aproximadamente el 10%, 15%, 18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% de oligosacáridos bis-fosforilados por enzima. Aunque tales oligosacáridos bis-fosforilados pueden estar presentes de forma natural en la enzima, debe tenerse en cuenta que las enzimas pueden modificarse para poseer tales oligosacáridos. Por ejemplo, las enzimas de reemplazo adecuadas pueden ser modificadas por ciertas enzimas que son capaces de catalizar la transferencia de N-acetilglucosamina-L-fosfato de UDP-GlcNAc a la posición 6' de manosas enlazadas a α-1,2 en enzimas lisosomales. Los métodos y composiciones para producir y usar tales enzimas se describen, por ejemplo, por Canfield et al. en la Patente de Estados Unidos Nº 6.537.785, y la Patente de Estados Unidos Nº 6.534.300.

En algunas realizaciones, las enzimas I2S de reemplazo para su uso de acuerdo con la presente invención pueden conjugarse o fusionarse con un resto de dirección lisosómico que es capaz de unirse a un receptor en la superficie de las células cerebrales. Un resto de dirección lisosómico adecuado puede ser IGF-I, IGF-II, RAP, p97 y variantes, homólogos o fragmentos de los mismos (por ejemplo, incluyendo aquellos péptidos que tienen una secuencia por lo menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% idéntica a una secuencia de péptido de IGF-I, IGF-II, RAP, p97 humano maduro de tipo salvaje).

En algunas realizaciones, las enzimas I2S de reemplazo para su uso de acuerdo con la presente invención no se han modificado para mejorar la administración o el transporte de tales agentes a través de la BBB y hacia el SNC.

En algunas realizaciones, una proteína terapéutica incluye un resto de dirección (por ejemplo, una secuencia de dirección de lisosomas) y/o un péptido que penetra en la membrana. En algunas realizaciones, una secuencia de dirección y/o un péptido que penetra en la membrana es una parte intrínseca del resto terapéutico (por ejemplo, a través de un enlace químico, a través de una proteína de fusión). En algunas realizaciones, una secuencia de dirección contiene un resto de manosa-6-fosfato. En algunas realizaciones, una secuencia de dirección contiene un resto de IGF-I. En algunas realizaciones, una secuencia de dirección contiene un resto de IGF-II.

#### 40 **Formulaciones**

En algunas realizaciones, las enzimas deseadas se entregan en formulaciones a base de solución salina o tampón para la entrega intratecal. Varias formulaciones divulgadas en el presente documento facilitan la administración y distribución efectiva del agente terapéutico (una enzima I2S) a tejidos, células y / u orgánulos específicos del SNC. Entre otras cosas, las formulaciones descritas en el presente documento son capaces de solubilizar altas concentraciones del agente terapéutico (una enzima I2S) y son adecuadas para el suministro de dichos agentes terapéuticos al SNC de sujetos para el tratamiento de enfermedades que tienen un componente y/o etiología del SNC (Síndrome de los cazadores). Las composiciones descritas en el presente documento se caracterizan además por una estabilidad mejorada y una tolerabilidad mejorada cuando se administran al SNC de un sujeto (intratecal) que lo necesita.

Antes de la presente invención, solución salina isotónica sin báfer tradicional y la solución B de Elliott, que es artificial LCR, fueron utilizados típicamente para la entrega intratecal. En la Tabla 3 a continuación se incluye una comparación que representa las composiciones de LCR con respecto a la solución B de Elliott. Como se muestra en la Tabla 3, la concentración de la Solución B de Elliott es muy similar a la del LCR. Sin embargo, la solución B de Elliott contiene una concentración de tampón muy baja y, en consecuencia, puede no proporcionar la capacidad de tamponamiento adecuada necesaria para estabilizar los agentes terapéuticos (p. ej., Proteínas), especialmente durante períodos prolongados de tiempo (p. ej., durante las condiciones de almacenamiento). Además, la solución B de Elliott contiene ciertas sales que pueden ser incompatibles con las formulaciones destinadas a administrar algunos agentes terapéuticos, y en particular proteínas o enzimas. Por ejemplo, las sales de calcio presentes en la solución B de Elliott son capaces de mediar la precipitación de proteínas y, por lo tanto, reducir la estabilidad de la formulación.

TABLA 3

Solución	Na <sup>+</sup> mEq/L	K <sup>+</sup> mEq/L	Ca <sup>+</sup> mEq/L	Mg <sup>++</sup> mEq/L	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mEq/L	Cl <sup>-</sup> mEq/L	pH	Fosforo mg/L	Glucos a mg/L
CSF	117-137	2,3	2,2	2,2	22,9	113-127	7,31	1,2-2,1	45-80
Elliott's B Sol'n	149	2,6	2,7	2,4	22,6	132	6,0-7,5	2,3	80

10 Por lo tanto, en algunas realizaciones, las formulaciones adecuadas para la administración CNS para su uso de acuerdo con la presente invención no son LCR sintético o artificial.

15 En algunas realizaciones, las formulaciones para la entrega del SNC han sido formuladas de tal manera que son capaces de estabilizar, o alternativamente retardar o prevenir la degradación, de un agente terapéutico formulados con el mismo (un I2S enzima). Como se usa en el presente documento, el término "estable" se refiere a la capacidad del agente terapéutico (es decir, la enzima I2S) para mantener su eficacia terapéutica (por ejemplo, la totalidad o la mayoría de su actividad biológica y/o integridad fisicoquímica prevista) durante períodos prolongados de tiempo. La estabilidad de un agente terapéutico y la capacidad de la composición farmacéutica para mantener la estabilidad de dicho agente terapéutico pueden evaluarse durante períodos de tiempo prolongados (por ejemplo, preferiblemente durante al menos 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30 , 36 meses o más). En el contexto de una formulación, una formulación estable es aquella en la que el agente terapéutico en el mismo conserva esencialmente su integridad física y/o química y su actividad biológica durante el almacenamiento y durante los procesos (tales como congelación/descongelación, mezcla mecánica y liofilización). Para la estabilidad de la proteína, se puede medir mediante la formación de agregados de alto peso molecular (HMW), pérdida de actividad enzimática, generación de fragmentos de péptidos y desplazamiento de los perfiles de carga.

30 La estabilidad del agente terapéutico es de particular importancia con respecto al mantenimiento del intervalo especificado de la concentración de agente terapéutico requerido para permitir que el agente cumpla su función terapéutica pretendida. La estabilidad del agente terapéutico puede evaluarse adicionalmente en relación con la actividad biológica o la integridad fisicoquímica del agente terapéutico durante períodos prolongados de tiempo. Por ejemplo, la estabilidad en un punto de tiempo dado puede ser comparado contra la estabilidad en un punto de tiempo anterior (por ejemplo, de la formulación día 0) o en contra del agente terapéutico no formulado y los resultados de esta comparación, expresado como porcentaje. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención mantienen al menos 100%, al menos 99%, al menos 98%, al menos 97% al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, a al menos 75%, al menos 70%, al menos 65%, al menos 60%, al menos 55% o al menos 50% de la actividad biológica o integridad fisicoquímica del agente terapéutico durante un período prolongado de tiempo (por ejemplo, medido en al menos unos 6-12 meses, a temperatura ambiente o en condiciones de almacenamiento acelerado).

40 En algunas realizaciones, el agente terapéutico (una proteína I2S) es soluble en formulaciones para su uso de acuerdo con la presente invención. El término "soluble" en lo que se refiere a los agentes terapéuticos para su uso de acuerdo con la presente invención se refiere a la capacidad de dichos agentes terapéuticos para formar una solución homogénea. Preferiblemente, la solubilidad del agente terapéutico en la solución en la que se administra y por la cual se transporta al sitio de acción objetivo (por ejemplo, las células y los tejidos del cerebro) es suficiente para permitir el suministro de una cantidad terapéuticamente efectiva de El agente terapéutico para el sitio de acción diana. Varios factores pueden afectar la solubilidad de los agentes terapéuticos. Por ejemplo, los factores relevantes que pueden afectar la solubilidad de la proteína incluyen la fuerza iónica, la secuencia de aminoácidos y la presencia de otros agentes o sales co-solubilizantes (por ejemplo, sales de calcio). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan de tal manera que se excluyen las sales de calcio de tales composiciones.

50 Las formulaciones adecuadas pueden contener el agente terapéutico a diversas concentraciones. En algunas realizaciones, las formulaciones pueden contener la proteína o el agente terapéutico a una concentración en el intervalo de aproximadamente 15 mg/ml a 100 mg/ml. En algunas realizaciones, las formulaciones según la invención pueden contener un agente terapéutico a una concentración de aproximadamente 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml o 100 mg/ml.

60 Las formulaciones para su uso de acuerdo con la presente invención se caracterizan por su tolerabilidad en forma de soluciones acuosas o como soluciones liofilizadas reconstituidas. Como se usa en el presente documento, los términos "tolerable" y "tolerabilidad" se refieren a la capacidad de las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención para no provocar una reacción adversa en el sujeto al que se administra dicha composición, o alternativamente para no provocar una reacción adversa grave. en el sujeto a quien se administra dicha composición. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención son bien toleradas por el sujeto al que se administran tales composiciones.

65 La enzima I2S para su uso de acuerdo con la presente invención requiere pH controlado y excipientes

específicos para mantener su solubilidad y la estabilidad en las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención. La Tabla 4 a continuación identifica los aspectos típicos de las formulaciones de proteínas consideradas para mantener la solubilidad y la estabilidad de los agentes terapéuticos de proteínas.

5

TABLA 4

Parámetro	Rango/tipo típico	Razón fundamental o base lógica
pH	5 a 7,5	Para estabilidad A veces también para solubilidad
Tipo de tampón	acetato, succinato, citrato, histidina, fosfato o Tris	Mantener un pH óptimo también puede afectar la estabilidad.
Concentración de tampón	5-50 mM	Para mantener el pH también se puede estabilizar o agregar fuerza iónica
Tonicificador	NaCl, azúcares, manitol	Para proporcionar soluciones isoosmóticas o isotónicas.
Tensioactivo	Polisorbato 20, polisorbato 80	Para estabilizar contra interfaces y corte
Otro	Aminoácidos (por ejemplo, arginina) a decenas a cientos de mM	Para una mayor solubilidad o estabilidad

Tampones

El pH de la formulación es un factor adicional que es capaz de alterar la solubilidad de un agente terapéutico (por ejemplo, una enzima I2S o proteína) en una formulación acuosa o para una formulación de pre-liofilización. Por consiguiente, las formulaciones para su uso de acuerdo con la presente invención comprenden uno o más tampones. En algunas realizaciones, las formulaciones acuosas comprenden una cantidad de tampón suficiente para mantener el pH óptimo de dicha composición entre aproximadamente 4,0-8,0 (por ejemplo, aproximadamente 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,2, 6,4, 6,5, 6,6, 6,8, 7,0, 7,5 o 8,0). En algunas realizaciones, el pH de la formulación está entre aproximadamente 5,0-7,5, entre aproximadamente 5,5-7,0, entre aproximadamente 6,0-7,0, entre aproximadamente 5,5-6,0, entre aproximadamente 5,5-6,5, entre aproximadamente 5,0-6,0, entre aproximadamente 5,0-6,5 y entre aproximadamente 6,0-7,5. Los tampones adecuados incluyen, por ejemplo, acetato, citrato, histidina, fosfato, succinato, tris(hidroximetil)aminometano ("Tris") y otros ácidos orgánicos. La concentración de tampón y el intervalo de pH de las formulaciones farmacéuticas de la presente invención son factores para controlar o ajustar la tolerabilidad de la formulación. En algunas realizaciones, un agente tamponador está presente en una concentración que varía entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 150 mM, o entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM, o entre aproximadamente 15 mM y aproximadamente 50 mM, o entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 50 mM, o entre aproximadamente 25 mM y aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones, un agente tamponador adecuado está presente a una concentración de aproximadamente 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 125 mM o 150 mM.

Tonicidad

En algunas realizaciones las formulaciones también contienen un agente de isotonicidad para mantener las formulaciones isotónicas. Típicamente, por "isotónico" se entiende que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas generalmente tendrán una presión osmótica de aproximadamente 240 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg. La isotonicidad se puede medir utilizando, por ejemplo, una presión de vapor o osmóMs de punto de congelación. Ejemplos de agentes de isotonicidad incluyen, pero no se limitan a, glicina, sorbitol, manitol, cloruro de sodio y arginina. En algunas realizaciones, los agentes isotónicos adecuados pueden estar presentes en formulaciones acuosas y/o pre-liofilizadas a una concentración de aproximadamente 0,01 - 5% (por ejemplo, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0 o 5,0%) en peso. En algunas realizaciones, las formulaciones para liofilización contienen un agente de isotonicidad para mantener las formulaciones de pre-liofilización o las formulaciones reconstituidas isotónicas.

Mientras que las soluciones generalmente isotónicas son las preferidas para los medicamentos administrados por vía parenteral, el uso de soluciones isotónicas puede cambiar la solubilidad de algunos agentes terapéuticos y en particular algunas proteínas y/o enzimas. Se ha demostrado que las soluciones ligeramente hipertónicas (p. ej., cloruro de sodio de hasta 175 mM en fosfato de sodio 5 mM a pH 7,0) y las soluciones que contienen azúcar (p. ej., hasta sacarosa al 2% en fosfato de sodio 5 mM a pH 7,0) han sido bien toleradas. La composición de formulación de bolo aprobada por el SNC más común es la solución salina (aproximadamente 150 mM de NaCl en agua).

65

Agentes estabilizantes

En algunas realizaciones, las formulaciones pueden contener un agente estabilizante, o lioprotector, para proteger la proteína. Típicamente, un agente estabilizador adecuado es un azúcar, un azúcar no reductor y/o un aminoácido. Los azúcares ejemplares incluyen, pero no se limitan a, dextrano, lactosa, manitol, manosa, sorbitol, rafinosa, sacarosa y trehalosa. Los aminoácidos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, arginina, glicina y metionina.

5 Los agentes estabilizadores adicionales pueden incluir cloruro de sodio, hidroxietilalmidón y polivinilpirrolidona. La cantidad de agente estabilizante en la formulación liofilizada es generalmente tal que la formulación será isotónica. Sin embargo, las formulaciones reconstituidas hipertónicas también pueden ser adecuadas. Además, la cantidad de agente estabilizante no debe ser demasiado baja, de modo que se produzca una cantidad inaceptable de degradación/agregación del agente terapéutico. Las concentraciones ejemplares de agente estabilizante en la formulación pueden variar de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 400 mM (por ejemplo, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 300 mM, y de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 100 mM), o alternativamente, de 0,1% a 15% (por ejemplo, del 1% al 10%, del 5% al 15%, del 5% al 10%) en peso. En algunas realizaciones, la proporción de la cantidad en masa del agente estabilizante y el agente terapéutico es aproximadamente 1:1. En otras realizaciones, la relación de la cantidad de masa del agente estabilizante y el agente terapéutico puede ser de aproximadamente 0,1:1, 0,2:1, 0,25:1, 0,4:1, 0,5:1, 1:1, 2:1, 2,6:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10; 1 o 20:1. En algunas realizaciones, adecuadas para la liofilización, el agente estabilizante también es un lioprotector.

10

15

En algunas realizaciones, las formulaciones líquidas adecuadas para su uso de acuerdo con la presente invención contienen materiales amorfos. En algunas realizaciones, las formulaciones líquidas adecuadas para su uso de acuerdo con la presente invención contienen una cantidad sustancial de materiales amorfos (por ejemplo, formulaciones basadas en sacarosa). En algunas realizaciones, las formulaciones líquidas adecuadas para su uso de acuerdo con la presente invención contienen materiales parcialmente cristalinos/parcialmente amorfos.

Agentes de carga

25 En algunas realizaciones, las formulaciones adecuadas para la liofilización pueden incluir además uno o más agentes de carga. Un "agente de carga" es un compuesto que agrega masa a la mezcla liofilizada y contribuye a la estructura física de la torta liofilizada. Por ejemplo, un agente de carga puede mejorar la apariencia de la torta liofilizada (por ejemplo, torta liofilizada esencialmente uniforme). Los agentes de carga adecuados incluyen, pero no se limitan a, cloruro de sodio, lactosa, manitol, glicina, sacarosa, trehalosa, hidroxietilalmidón. Las concentraciones ejemplares de agentes de carga son de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% (por ejemplo, 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% y 10,0%).

Tensioactivos

35 En algunas realizaciones, es deseable añadir un tensioactivo para formulaciones. Los tensioactivos ejemplares incluyen tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20 u 80); poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); Tritón; dodecil sulfato de sodio (SDS); laurel sulfato de sodio; octilglicósido de sodio; lauril, miristil, linoleil o estearil sulfobetaína; lauril, miristil, linoleil o estearil sarcosina; linoleil, miristilo o cetil-betaína; lauroamidopropilo, cocamidopropilo, linoleamidopropilo, miristamidopropilo, palmidopropilo o isoestearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropilo); miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestearamidopropil-dimetilamina; metil cocoil - sodio o disil restaurante de metilo disódico; y la serie MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, NJ), polietilenglicol, polipropilglicol y copolímeros de etileno y propilenglicol (por ejemplo, Pluronics, PF68, etc.). Típicamente, la cantidad de tensioactivo agregado es tal que reduce la agregación de la proteína y minimiza la formación de partículas o efervescencias. Por ejemplo, un tensioactivo puede estar presente en una formulación a una concentración de aproximadamente 0,001 - 0,5% (por ejemplo, aproximadamente 0,005 - 0,05%, o 0,005 - 0,01%). En particular, un surfactante puede estar presente en una formulación a una concentración de aproximadamente 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% o 0,5%, etc. Alternativamente, o además, el se puede agregar tensioactivo a la formulación liofilizada, formulación pre-liofilizada y/o la formulación reconstituida.

40

45

50

55

60

65

Otros vehículos, excipientes farmacéuticamente aceptables o estabilizantes tales como los descritos en Remington Pharmaceutical Sciences 16<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed. (1980) pueden incluirse en la formulación (y/o la formulación liofilizada y/o la formulación reconstituida) siempre que no afecten negativamente las características deseadas de la formulación. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas e incluyen, entre otros, agentes tamponantes adicionales; conservantes codisolventes; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes como EDTA; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína Zn); polímeros biodegradables tales como poliésteres; y/o contraiones formadores de sal como el sodio.

Las formulaciones, en cualquier forma acuosa, pre-liofilizada, liofilizada o reconstituida se puede evaluar sobre la base de análisis de la calidad del producto, tiempo de reconstitución (si se liofilizan), calidad de reconstitución (si está liofilizada), alto peso molecular, humedad y temperatura de transición vítrea. Por lo general, la calidad de la proteína y el análisis del producto incluyen el análisis de la tasa de degradación del producto utilizando métodos que incluyen, entre otros, HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC), HPLC de intercambio catiónico (CEXHPLC), difracción de rayos X (XRD), calorimetría de barrido diferencial modulada (mDSC), HPLC de fase inversa (RP-HPLC),

dispersión de luz multiángulo (MALS), fluorescencia, absorción ultravioleta, nefelometría, electroforesis capilar (CE), SDS-PAGE y combinaciones de los mismos. La evaluación de un producto puede incluir una etapa de evaluar la apariencia (ya sea líquida o de torta).

5 En general, las formulaciones (liofilizados o acuosas) se pueden almacenar durante períodos prolongados de tiempo a temperatura ambiente. La temperatura de almacenamiento puede variar típicamente de 0°C a 45°C (por ejemplo, 4°C, 20°C, 25°C, 45°C, etc.). Las formulaciones pueden almacenarse durante un período de meses a un período de años. El tiempo de almacenamiento generalmente será de 24 meses, 12 meses, 6 meses, 4,5 meses, 3 meses, 2 meses o 1 mes. Las formulaciones se pueden almacenar directamente en el contenedor utilizado para la administración, eliminando los pasos de transferencia.

10 Las formulaciones pueden almacenarse directamente en el recipiente de liofilización (si está liofilizado), que también puede funcionar como el recipiente de reconstitución, eliminando los pasos de transferencia. Alternativamente, las formulaciones de productos liofilizados se pueden medir en incrementos más pequeños para el almacenamiento. El almacenamiento generalmente debe evitar circunstancias que conduzcan a la degradación de las proteínas, que incluyen, entre otras, la exposición a la luz solar, radiación UV, otras formas de radiación electromagnética, calor o frío excesivo, choque térmico rápido y choque mecánico.

#### Liofilización

20 Los métodos se puede utilizar para liofilizar cualquier material, en particular de agentes, terapéuticos. Típicamente, una formulación previa a la liofilización contiene además una elección apropiada de excipientes u otros componentes tales como estabilizadores, agentes tamponantes, agentes de carga y tensioactivos para evitar la degradación del compuesto de interés (por ejemplo, agregación de proteínas, desamidación y/u oxidación) durante liofilización y almacenamiento. La formulación para la liofilización puede incluir uno o más ingredientes adicionales que incluyen lioprotectores o agentes estabilizantes, tampones, agentes de carga, agentes de isotonicidad y tensioactivos.

25 Despues de la sustancia de interés y los componentes adicionales se mezclan entre sí, la formulación se liofiliza. La liofilización generalmente incluye tres etapas principales: congelación, secado primario y secado secundario. La congelación es necesaria para convertir el agua en hielo o algunos componentes de formulación amorfa en la forma cristalina. El secado primario es el paso del proceso cuando se elimina el hielo del producto congelado por sublimación directa a baja presión y temperatura. El secado secundario es el paso del proceso cuando se elimina el agua delimitada de la matriz del producto utilizando la difusión del agua residual a la superficie de evaporación. La temperatura del producto durante el secado secundario es normalmente mayor que durante el secado primario. Ver, 30 Tang X. et al. (2004) "Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: Practical advice," Pharm. Res., 21:191-200; Nail S.L. et al. (2002) "Fundamentals of freeze-drying," in Development and manufacture of protein pharmaceuticals. Nail S.L. editor New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp 281-353; Wang et al. (2000) "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals," Int. J. Pharm., 203:1-60; Williams N.A. et al. (1984) "The lyophilization of pharmaceuticals; A literature review." J. Parenteral Sci. Technol., 38:48-59.

35 Una etapa de recocido se puede introducir durante la congelación inicial del producto. El paso de recocido puede reducir el tiempo total del ciclo. Sin desear limitarse a ninguna teoría, se contempla que el paso de recocido puede ayudar a promover la cristalización del excipiente y la formación de cristales de hielo más grandes debido a la recristalización de los cristales pequeños formados durante el sobreenfriamiento, lo que, a su vez, mejora la reconstitución. Típicamente, un paso de recocido incluye un intervalo u oscilación en la temperatura durante la 40 congelación. Por ejemplo, la temperatura de congelación puede ser -40°C, y el paso de recocido aumentará la temperatura a, por ejemplo, -10°C y mantendrá esta temperatura durante un período de tiempo establecido. El tiempo del paso de recocido puede variar de 0,5 horas a 8 horas (por ejemplo, 0,5, 1,0 1,5, 2,0, 2,5, 3, 4, 6 y 8 horas). La temperatura de recocido puede estar entre la temperatura de congelación y 0°C.

45 50 La liofilización puede realizarse en un recipiente, tal como un tubo, una bolsa, una botella, una bandeja, un vial (por ejemplo, un vial de vidrio), una jeringa o cualquier otro recipiente adecuado. Los envases pueden ser desechables. La liofilización también se puede realizar a gran o pequeña escala. En algunos casos, puede ser deseable liofilizar la formulación de la proteína en el recipiente en donde se realizará la reconstitución de la proteína 55 para evitar una etapa de transferencia. El recipiente en este caso puede ser, por ejemplo, un vial de 3, 4, 5, 10, 20, 50 o 100 cc.

60 Muchos diferentes liofilizadores están disponibles para este propósito, como casco secador a escala piloto (SP Industries, EE.UU.), Génesis (SP Industries) de laboratorio liofilizadores, o cualesquiera liofilizadores capaces de controlar la liofilización los parámetros del proceso dados. La liofilización se realiza congelando la formulación y posteriormente sublimando el hielo del contenido congelado a una temperatura adecuada para el secado primario. La congelación inicial lleva la formulación a una temperatura inferior a aproximadamente -20°C (por ejemplo, -50°C, -45°C, -40°C, -35°C, -30°C, -25°C, etc.) típicamente en no más de aproximadamente 4 horas (por ejemplo, no más de 60 aproximadamente 3 horas, no más de aproximadamente 2,5 horas, no más de aproximadamente 2 horas). Bajo esta condición, la temperatura del producto está típicamente por debajo del punto eutéctico o la temperatura de colapso de

la formulación. Típicamente, la temperatura de almacenamiento para el secado primario variará de aproximadamente -30 a 25°C (siempre que el producto permanezca por debajo del punto de fusión durante el secado primario) a una presión adecuada, que varía típicamente de aproximadamente 20 a 250 mTorr. La formulación, el tamaño y el tipo del recipiente que contiene la muestra (p. ej., el vial de vidrio) y el volumen de líquido determinarán principalmente el tiempo requerido para el secado, que puede variar desde unas pocas horas hasta varios días. Se lleva a cabo una etapa de secado secundario a aproximadamente 0-60°C, dependiendo principalmente del tipo y tamaño del recipiente y el tipo de proteína terapéutica empleada. Nuevamente, el volumen de líquido determinará principalmente el tiempo requerido para el secado, que puede variar desde unas pocas horas hasta varios días.

5            Como una proposición general, la liofilización se traducirá en una formulación liofilizada en donde el contenido de humedad del mismo es menor que aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2%, menos de aproximadamente 1%, y menos de aproximadamente 0,5%.

10          **Reconstitución**

15          Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención están en una forma acuosa tras la administración a un. Si las composiciones farmacéuticas de la presente invención están liofilizadas, tales composiciones deben reconstituirse añadiendo uno o más diluyentes a las mismas antes de la administración a un sujeto. En la etapa deseada, típicamente en un momento apropiado antes de la administración al paciente, la formulación liofilizada puede reconstituirse con un diluyente de tal manera que sea deseable la concentración de proteína en la formulación reconstituida.

20          Varios diluyentes se pueden usar. En algunas realizaciones, un diluyente adecuado para la reconstitución es agua. El agua utilizada como diluyente puede tratarse de varias maneras, incluyendo ósmosis inversa, destilación, desionización, filtraciones (por ejemplo, carbón activado, microfiltración, nanofiltración) y combinaciones de estos métodos de tratamiento. En general, el agua debe ser adecuada para inyección, incluyendo, entre otros, agua estéril o agua bacteriostática para inyección.

25          Diluyentes ejemplares adicionales incluyen una solución de pH tamponado (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Elliot, solución de dextrosa o solución de Ringer. Los diluyentes adecuados pueden contener opcionalmente un conservante. Los conservantes ejemplares incluyen alcoholes aromáticos tales como alcohol bencílico o fenólico. La cantidad de conservante empleada se determina evaluando diferentes concentraciones de conservante para verificar su compatibilidad con la proteína y las pruebas de eficacia del conservante. Por ejemplo, si el conservante es un alcohol aromático (como el alcohol bencílico), puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,1-2,0%, de aproximadamente 0,5-1,5%, o aproximadamente 1,0-1,2%.

30          Los diluyentes adecuados pueden incluir una variedad de aditivos, incluyendo, pero no limitado a, agentes tamponantes del pH, (por ejemplo, Tris, histidina,) sales (por ejemplo, cloruro sódico) y otros aditivos (por ejemplo, sacarosa), incluyendo los descritos anteriormente (por ejemplo, agentes estabilizantes, agentes de isotonicidad).

35          Una proteína liofilizada se puede reconstituir a una concentración de al menos 25 mg/ml (por ejemplo, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/) y en cualquier intervalo entre ellos. En algunas realizaciones, la sustancia liofilizada (proteína) puede reconstituirse a una concentración que varía de aproximadamente 25 mg/ml a 100 mg/ml (por ejemplo, de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 25 mg/ml hasta aproximadamente 75 mg/ml, desde aproximadamente 25 mg/ml hasta aproximadamente 100 mg/ml, desde aproximadamente 50 mg/ml hasta aproximadamente 75 mg/ml, desde aproximadamente 50 mg/ml hasta aproximadamente 100 mg/ml). En algunas realizaciones, la concentración de proteína en la formulación reconstituida puede ser mayor que la concentración en la formulación previa a la liofilización. En algunas realizaciones, la concentración de proteína en la formulación reconstituida puede ser de aproximadamente 2-50 veces (por ejemplo, aproximadamente 2-20, aproximadamente 2-10 veces o aproximadamente 2-5 veces) de la formulación pre-liofilizada. En algunas realizaciones, la concentración de proteína en la formulación reconstituida puede ser al menos aproximadamente 2 veces (por ejemplo, al menos aproximadamente 3, 4, 5, 10, 20, 40 veces) de la formulación pre-liofilizada.

40          La reconstitución puede realizarse en cualquier recipiente. Los recipientes ejemplares adecuados para la invención incluyen, pero no se limitan a, tales como tubos, viales, jeringas (por ejemplo, de una cámara o de doble cámara), bolsas, botellas y bandejas. Los recipientes adecuados pueden estar hechos de cualquier material como vidrio, plástico, metal. Los envases pueden ser desechables o reutilizables. La reconstitución también se puede realizar a gran o pequeña escala.

45          En algunos casos, puede ser deseable liofilizar la formulación de proteína en el recipiente en donde la reconstitución de la proteína se va a llevar a cabo con el fin de evitar una etapa de transferencia. El recipiente en este caso puede ser, por ejemplo, un vial de 3, 4, 5, 10, 20, 50 o 100 cc. En algunas realizaciones, un recipiente adecuado

para la liofilización y la reconstitución es una jeringa de doble cámara (por ejemplo, jeringas Lyo-Ject, ® (Vetter)). Por ejemplo, una jeringa de doble cámara puede contener tanto la sustancia liofilizada como el diluyente, cada uno en una cámara separada, separados por un tapón (ver Ejemplo 5). Para reconstituir, se puede unir un émbolo al tapón en el lado del diluyente y presionarlo para mover el diluyente a la cámara del producto de modo que el diluyente pueda contactar con la sustancia liofilizada y la reconstitución puede tener lugar como se describe en este documento (ver Ejemplo 5).

### **Administración al SNC**

Se contempla que las diversas formulaciones a base de solución salina o tampón descritas en este documento sean generalmente adecuadas para la administración al SNC de agente terapéutico. Las formulaciones a base de solución salina o tampón de acuerdo con la presente invención pueden usarse para la administración del SNC a través de administraciones intratecales (por ejemplo, IT-Lumbar, IT-cisterna magna) para inyección directa o indirecta al SNC y/o LCR.

#### ***Administración intratecal***

La administración intratecal puede ser utilizada para suministrar una proteína de I2S en el LCR. Como se usa en este documento, la administración intratecal (también denominada inyección intratecal) se refiere a una inyección en el canal espinal (espacio intratecal que rodea la médula espinal). Se pueden usar diversas técnicas, que incluyen, sin limitación, inyección cerebroventricular lateral a través de un orificio de perforación o punción cistemal o lumbar o similares. Métodos ejemplares se describen en Lazorthes et al. Advances in Drug Delivery Systems and Applications in Neurosurgery, 143-192 and Omaya et al., Cancer Drug Delivery, 1:169-179.

Según la presente invención, una enzima se puede inyectar en cualquier región que rodea el canal espinal. En algunas realizaciones, se inyecta una enzima en el área lumbar o la cisterna magna o intraventricularmente en un espacio ventricular cerebral. Como se usa en el presente documento, el término "región lumbar" o "área lumbar" se refiere al área entre la tercera y cuarta vértebras lumbares (parte inferior de la espalda) y, más inclusivamente, la región L2-S1 de la columna vertebral. Típicamente, la inyección intratecal a través de la región lumbar o el área de la madera también se conoce como "suministro de IT lumbar" o "administración de IT lumbar". El término "cisterna magna" se refiere al espacio alrededor y debajo del cerebelo a través de la abertura entre el cráneo y la parte superior de la columna vertebral. Típicamente, la inyección intratecal a través de cisterna magna también se conoce como "suministro de cisterna magna". El término "ventrículo cerebral" se refiere a las cavidades en el cerebro que son continuas con el canal central de la médula espinal. Típicamente, las inyecciones a través de las cavidades del ventrículo cerebral se denominan suministro cerebral intraventricular (ICV).

En algunas realizaciones, "administración intratecal" o "entrega intratecal", de acuerdo con la presente invención se refiere a administración o entrega lumbar de IT, por ejemplo, entregado entre la tercera y cuarta lumbar (espalda baja) vértebras y, más inclusiva, la región L2-S1 de la columna vertebral. Se contempla que la administración o entrega de IT lumbar distingue sobre la entrega de cisterna magna en que la administración o entrega de IT lumbar de acuerdo con nuestra invención proporciona una entrega mejor y más efectiva al canal espinal distal, mientras que la entrega de cisterna magna, entre otras cosas, generalmente no entrega bien al canal espinal distal.

#### **Dispositivo para administración intratecal**

Diversos dispositivos se pueden utilizar para la entrega intratecal de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, un dispositivo para administración intratecal contiene un puerto de acceso de fluido (por ejemplo, puerto inyectable); un cuerpo hueco (por ejemplo, un catéter) que tiene un primer orificio de flujo en comunicación fluida con el puerto de acceso de fluido y un segundo orificio de flujo configurado para inserción en la médula espinal; y un mecanismo de fijación para asegurar la inserción del cuerpo hueco en la médula espinal. Como un ejemplo no limitativo que se muestra en la Figura 62, un mecanismo de fijación adecuado contiene uno o más nobs montados en la superficie del cuerpo hueco y un anillo suturado ajustable sobre uno o más nobs para evitar que el cuerpo hueco (por ejemplo, el catéter) se salga de la médula espinal. En diversas realizaciones, el puerto de acceso de fluido comprende un depósito. En algunas realizaciones, el puerto de acceso de fluido comprende una bomba mecánica (por ejemplo, una bomba de infusión). En algunas realizaciones, un catéter implantado está conectado a un depósito (por ejemplo, para administración de bolo) o a una bomba de infusión. El puerto de acceso de fluido puede ser implantado o externo.

En algunas realizaciones, la administración intratecal puede realizarse mediante punción lumbar (es decir, bolo lento) o mediante un sistema de administración de catéter de puerto (es decir, infusión o bolo). En algunas realizaciones, el catéter se inserta entre las láminas de las vértebras lumbares y la punta se enrosca en el espacio teCAL hasta el nivel deseado (generalmente L3-L4) (Figura 63).

En relación con la administración intravenosa, un volumen de dosis única adecuado para la administración intratecal es típicamente pequeño. Típicamente, el suministro intratecal según la presente invención mantiene el

equilibrio de la composición del LCR así como la presión intracranal del sujeto. En algunas realizaciones, el suministro intratecal se realiza en ausencia de la eliminación correspondiente de LCR de un sujeto. En algunas realizaciones, un volumen de dosis única adecuado puede ser, por ejemplo, inferior a aproximadamente 10 ml, 8 ml, 6 ml, 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1,5 ml, 1 ml o 0,5 ml. En algunas realizaciones, un volumen de dosis única adecuado puede ser de aproximadamente 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 o 0,5-1,5 ml. En algunas realizaciones, el suministro intratecal según la presente invención implica una etapa de eliminar primero una cantidad deseada de LCR. En algunas realizaciones, menos de aproximadamente 10 ml

(por ejemplo, menos de aproximadamente 9 ml, 8 ml, 7 ml, 6 ml, 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml) de LCR se eliminan primero antes de la administración de IT. En esos casos, un volumen de dosis única adecuada puede ser, por ejemplo, más de aproximadamente 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml o 20 ml.

Varios otros dispositivos pueden utilizarse para efectuar la administración intratecal de una composición terapéutica. Por ejemplo, las formulaciones que contienen las enzimas deseadas pueden administrarse utilizando un depósito Ommaya que es de uso común para la administración intratecal de fármacos para la carcinomatosis meníngea (*Lancet* 2: 983-84, 1963). Más específicamente, en este método, se inserta un tubo ventricular a través de un orificio formado en el asta anterior y se conecta a un reservorio Ommaya instalado debajo del cuero cabelludo, y el reservorio se perfora por vía subcutánea para administrar intratecalmente la enzima particular que se está reemplazando, que se inyecta en el embalse. Otros dispositivos para la administración intratecal de composiciones terapéuticas o formulaciones a un individuo se describen en la patente de EE.UU. Nº 6,217,552. Alternativamente, el fármaco puede administrarse por vía intratecal, por ejemplo, mediante una inyección única o infusión continua. Debe entenderse que el tratamiento de dosificación puede estar en la forma de una administración de dosis única o dosis múltiples.

Para la inyección, las formulaciones para su uso de acuerdo con la invención se formulan en soluciones líquidas. Además, la enzima puede formularse en forma sólida y redissolverse o suspenderse inmediatamente antes de su uso. También se incluyen formas liofilizadas. La inyección puede ser, por ejemplo, en forma de inyección en bolo o infusión continua (por ejemplo, usando bombas de infusión) de la enzima.

En una realización de la invención, la enzima se administra por inyección ventricular del cerebro lateral en el cerebro de un sujeto. La inyección se puede realizar, por ejemplo, a través de un orificio realizado en el cráneo del sujeto. En otra realización, la enzima y/u otra formulación farmacéutica se administra a través de una derivación insertada quirúrgicamente en el ventrículo cerebral de un sujeto. Por ejemplo, la inyección puede realizarse en los ventrículos laterales, que son más grandes. En algunas realizaciones, también se puede realizar la inyección en el tercer y cuarto ventrículos más pequeños.

En otra realización más, las composiciones farmacéuticas utilizadas en la presente invención se administran por inyección en la cisterna magna, o área lumbar de un sujeto.

En otra realización del método de la invención, la formulación farmacéuticamente aceptable proporciona la liberación sostenida, por ejemplo, "liberación lenta" de la enzima I2S u otra composición farmacéutica utilizada en la presente invención, a un sujeto durante al menos uno, dos, tres, cuatro semanas o períodos de tiempo más largos después de que la formulación farmacéuticamente aceptable se administra al sujeto.

Tal como se utiliza aquí, el término "liberación sostenida" se refiere a la entrega continua de una formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención *in vivo* durante un período de tiempo después de la administración, preferiblemente al menos varios días, una semana o varias semanas. El suministro sostenido de la composición puede demostrarse, por ejemplo, mediante el efecto terapéutico continuo de la enzima a lo largo del tiempo (por ejemplo, el suministro sostenido de la enzima puede demostrarse mediante una cantidad reducida continua de gránulos de almacenamiento en el sujeto). Alternativamente, el suministro sostenido de la enzima puede demostrarse detectando la presencia de la enzima *in vivo* a lo largo del tiempo.

#### ***Entrega a los tejidos diana***

Como se discutió anteriormente, una de las características sorprendentes e importantes de la presente invención es que las enzimas I2S de reemplazo administradas para su uso de acuerdo con la presente invención son capaces de difundirse con eficacia y extensivamente a través de la superficie del cerebro y penetrar en diversas capas o regiones del cerebro, incluidas las regiones del cerebro profundo. Además, las formulaciones para su uso de acuerdo con la presente invención administran efectivamente una enzima I2S a diversos tejidos, neuronas o células de la médula espinal, incluida la región lumbar, que es difícil de alcanzar mediante los métodos existentes de administración del SNC, como la inyección de ICV. Además, las formulaciones para su uso de acuerdo con la presente invención suministran una cantidad suficiente de una enzima I2S al torrente sanguíneo y a varios órganos y tejidos periféricos.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, una enzima I2S se suministra al sistema nervioso central de un sujeto. En algunas realizaciones, se suministra una enzima I2S a uno o más tejidos diana del cerebro, la médula espinal y/u

órganos periféricos. Como se usa en el presente documento, el término "tejidos diana" se refiere a cualquier tejido afectado por la enfermedad de almacenamiento lisosomal a tratar o cualquier tejido en donde la enzima lisosomal deficiente se expresa normalmente. En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen aquellos tejidos en los que hay una cantidad detectable o anormalmente alta de sustrato enzimático, por ejemplo almacenado en los lisosomas celulares del tejido, en pacientes que padecen o son susceptibles a la enfermedad de almacenamiento lisosómico. En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen aquellos tejidos que muestran patología, síntoma o característica asociada a la enfermedad. En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen aquellos tejidos en los que la enzima lisosómica deficiente se expresa normalmente a un nivel elevado. Como se usa en el presente documento, un tejido diana puede ser un tejido diana del cerebro, un tejido diana de la médula espinal y/o un tejido diana periférico. Los tejidos diana ejemplares se describen en detalle a continuación.

#### Tejidos de diana cerebral

En general, el cerebro se puede dividir en diferentes regiones, capas y tejidos. Por ejemplo, el tejido meníngeo es un sistema de membranas que envuelve el sistema nervioso central, incluido el cerebro. Las meninges contienen tres capas, que incluyen materia dura, materia aracnoidea y materia pia. En general, la función principal de las meninges y del líquido cefalorraquídeo es proteger el sistema nervioso central. En algunas realizaciones, una proteína I2Sterapéutica de acuerdo con la presente invención se administra a una o más capas de las meninges.

El cerebro tiene tres subdivisiones principales, incluyendo el cerebro, el cerebelo y el tronco cerebral. Los hemisferios cerebrales, que están situados sobre la mayoría de las otras estructuras cerebrales y están cubiertos con una capa cortical. Debajo del cerebro se encuentra el tronco encefálico, que se asemeja a un tallo al que se une el cerebro. En la parte posterior del cerebro, debajo del cerebro y detrás del tronco encefálico, se encuentra el cerebelo.

El diencéfalo, que se encuentra cerca de la línea media del cerebro y por encima del mesencéfalo, contiene el tálamo, metatálamo, el hipotálamo, epítáalamo, prethalamus, y pretectum. El mesencéfalo, también llamado mesencéfalo, contiene el tectum, tegumentum, mesocoelia ventricular y pedúnculos cerebrales, el núcleo rojo y el núcleo del nervio craneal III. El mesencéfalo se asocia con visión, audición, control motor, sueño/vigilia, estado de alerta, y regulación de la temperatura.

Las regiones de los tejidos del sistema nervioso central, incluido el cerebro, se pueden caracterizar en función de la profundidad de los tejidos. Por ejemplo, los tejidos del SNC (p. ej., El cerebro) pueden caracterizarse como tejidos superficiales o poco profundos, tejidos de profundidad media y/o tejidos profundos.

Según la presente invención, una proteína terapéutica (una enzima I2S de reemplazo) puede ser suministrada a cualquier tejido diana cerebral apropiado asociado con una enfermedad particular a tratar en un sujeto. En algunas realizaciones, una proteína terapéutica (una enzima I2S de reemplazo) para su uso de acuerdo con la presente invención se administra al tejido diana cerebral superficial. En algunas realizaciones, una proteína terapéutica para su uso de acuerdo con la presente invención se administra al tejido diana cerebral de profundidad media. En algunas realizaciones, una proteína terapéutica para su uso de acuerdo con la presente invención se administra al tejido diana cerebral profundo. En algunas realizaciones, una proteína terapéutica para su uso de acuerdo con la presente invención se administra a una combinación de tejido diana cerebral superficial, tejido diana cerebral de profundidad media, y/o tejido diana cerebral profundo. En algunas realizaciones, una proteína terapéutica para su uso de acuerdo con la presente invención se administra a un tejido cerebral profundo al menos 4 mm, 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm, 10 mm o más por debajo (o interno a) la superficie externa del cerebro.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico (enzima I2S) se entrega a uno o más tejidos superficiales o poco profundos de cerebro. En algunas realizaciones, la superficie diana o los tejidos poco profundos del cerebro se encuentran dentro de los 4 mm de la superficie del cerebro. En algunas realizaciones, la superficie diana o los tejidos poco profundos del cerebro se seleccionan de tejidos de la piamadre, tejidos de la cinta cortical cerebral, hipocampo, espacio Virchow Robin, vasos sanguíneos dentro del espacio VR, el hipocampo, porciones del hipotálamo en la superficie inferior del cerebro, los nervios y tractos ópticos, el bulbo olfativo y las proyecciones, y sus combinaciones.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico (enzima I2S) se entrega a uno o más tejidos profundos del cerebro. En algunas realizaciones, la superficie diana o los tejidos poco profundos del cerebro se encuentran a 4 mm (por ejemplo, 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm o 10 mm) debajo (o internamente) de la superficie del cerebro. En algunas realizaciones, los tejidos profundos específicos del cerebro incluyen la cinta cortical cerebral. En algunas realizaciones, tejidos profundos dirigidos del cerebro incluyen uno o más del diencéfalo (por ejemplo, el hipotálamo, tálamo, prethalamus, subtálamo, etc.), metencéfalo, núcleos lentiformes, los ganglios basales, núcleo caudado, putamen, amígdala, globo pálido y sus combinaciones.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico (por ejemplo, enzima I2S) se entrega a uno o más tejidos del cerebelo. En ciertas realizaciones, el uno o más tejidos específicos del cerebelo se seleccionan del grupo que consiste en tejidos de la capa molecular, tejidos de la capa de células de Purkinje, tejidos de la capa de células granulares, pedúnculos cerebelosos y una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el agente terapéutico (enzima

I2S) se administra a uno o más tejidos profundos del cerebelo que incluyen, pero no se limitan a, tejidos de la capa de células de Purkinje, tejidos de la capa de células granulares, tejido de materia blanca cerebelosa profunda (por ejemplo, profundo en relación con la capa de células granulares), y tejido profundo del núcleo cerebeloso.

5 En algunas realizaciones, el agente terapéutico (enzima I2S) se entrega a uno o más tejidos del tronco cerebral. En algunas realizaciones, el uno o más tejidos dirigidos del tronco encefálico incluyen tejido de sustancia blanca del tronco encefálico y/o tejido de núcleo del tronco encefálico.

10 En algunas realizaciones, el agente terapéutico (enzima I2S) se entrega a varios tejidos del cerebro incluyendo, pero no limitado a, la materia gris, la materia blanca, zonas periventriculares, pia-aracnoides, meninges, neocórtex, cerebelo, tejidos profundos en la corteza cerebral, capa molecular, región caudada/putamen, mesencéfalo, regiones profundas de la protuberancia o médula, y sus combinaciones.

15 En algunas realizaciones, el agente terapéutico (enzima I2S) se entrega a diversas células en el cerebro, incluyendo pero no limitado a, neuronas, células gliales, células perivasculares y/o células de las meninges. En algunas realizaciones, se administra una proteína terapéutica a oligodendrocitos de materia blanca profunda.

#### Médula espinal

20 En general, las regiones o los tejidos de la médula espinal pueden ser caracterizados en base a la profundidad de los tejidos. Por ejemplo, los tejidos de la médula espinal pueden caracterizarse como tejidos superficiales o superficiales, tejidos de profundidad media y/o tejidos profundos.

25 En algunas realizaciones, el agente terapéutico (enzima I2S) se administra a uno o más tejidos superficiales o poco profundos de la médula espinal. En algunas realizaciones, una superficie específica o tejido superficial de la médula espinal se encuentra dentro de los 4 mm de la superficie de la médula espinal. En algunas realizaciones, una superficie específica o tejido superficial de la médula espinal contiene materia pia y/o tractos de materia blanca.

30 En algunas realizaciones, el agente terapéutico (enzima I2S) se administra a uno o más tejidos profundos de la médula espinal. En algunas realizaciones, un tejido profundo dirigido de la médula espinal se encuentra interno a 4 mm de la superficie de la médula espinal. En algunas realizaciones, un tejido profundo dirigido de la médula espinal contiene materia gris de la médula espinal y/o células ependimarias.

35 En algunas realizaciones, el agente terapéutico (enzima I2S) se administra a las neuronas de la médula espinal.

#### Tejidos diana periféricos

40 Como se usa en este documento, los órganos o tejidos periféricos se refieren a cualquier órgano o tejido que no es parte del sistema nervioso central (SNC). Los tejidos diana periféricos pueden incluir, entre otros, sistema sanguíneo, hígado, riñón, corazón, endotelio, médula ósea y células derivadas de médula ósea, bazo, pulmón, ganglio linfático, hueso, cartílago, ovario y testículo. En algunas realizaciones, una proteína terapéutica (una enzima I2S de reemplazo) de acuerdo con la presente invención se administra a uno o más de los tejidos diana periféricos.

#### **45 *Biodistribución y biodisponibilidad***

En diversas realizaciones, una vez entregada al tejido diana, la enzima I2S se localiza intracelularmente. Por ejemplo, un agente terapéutico (enzima I2S) puede localizarse en exones, axones, lisosomas, mitocondrias o vacuolas de una célula diana (por ejemplo, neuronas como las células de Purkinje). Por ejemplo, en algunas realizaciones, las enzimas administradas intratecalmente demuestran una dinámica de translocación tal que la enzima se mueve dentro del espacio perivascular (por ejemplo, mediante mecanismos convectivos asistidos por pulsación). Además, los mecanismos activos de transporte axonal relacionados con la asociación de la proteína o enzima administrada con los neurofilamentos también pueden contribuir o facilitar la distribución de proteínas o enzimas administradas intratecalmente en los tejidos más profundos del sistema nervioso central.

55 En algunas realizaciones, una enzima I2S administrada de acuerdo con la presente invención puede alcanzar niveles o actividades terapéutica o clínicamente eficaces en diversos tejidos diana descritos en este documento. Como se usa en el presente documento, un nivel o actividad terapéutica o clínicamente eficaz es un nivel o actividad suficiente para conferir un efecto terapéutico en un tejido diana. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible por alguna prueba o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación o siente un efecto). Por ejemplo, un nivel o actividad terapéutica o clínicamente efectiva puede ser un nivel o actividad enzimática que sea suficiente para mejorar los síntomas asociados con la enfermedad en el tejido diana (por ejemplo, almacenamiento de GAG).

65 En algunas realizaciones, un agente terapéutico (una enzima I2S de reemplazo) administrado según la

presente invención puede lograr un nivel o actividad enzimática que es al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% del nivel o actividad normal de la enzima lisosómica correspondiente en el tejido diana. En algunas realizaciones, un agente terapéutico (una enzima de reemplazo) administrado de acuerdo con la presente invención puede alcanzar un nivel o actividad enzimática que se incrementa al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces,

- 5 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces en comparación con un control (por ejemplo, niveles endógenos o actividades sin el tratamiento). En algunas realizaciones, un agente terapéutico (por ejemplo, una enzima de reemplazo) administrado de acuerdo con la presente invención puede lograr un nivel o actividad enzimática aumentada de al menos aproximadamente 10 nmol/hr/mg, 20 nmol/hr/mg, 40 nmol/hr/mg, 50 nmol/hr/mg, 60 nmol/hr/mg, 70 nmol/hr/mg, 80 nmol/hr/mg, 90 nmol/hr/mg, 100 nmol/hr/mg, 150 nmol/hr/mg, 200 nmol/hr/mg, 250 nmol/hr/mg, 300 nmol/hr/mg, 350 nmol/hr/mg, 400 nmol/hr/mg, 450 nmol/hr/mg, 500 nmol/hr/mg, 550 nmol/hr/mg o 600 nmol/hr/mg en un tejido diana.
- 10

En algunas realizaciones, las formulaciones para su uso de acuerdo con la presente invención son particularmente útiles para apuntar a la región lumbar. En algunas realizaciones, un agente terapéutico (una enzima I2S de reemplazo) administrado según la presente invención puede lograr un nivel o actividad enzimática incrementada en la región lumbar de al menos aproximadamente 500 nmol/hr/mg, 600 nmol/hr/mg, 700 nmol/hr/mg, 800 nmol/hr/mg, 900 nmol/hr/mg, 1000 nmol/hr/mg, 1500 nmol/hr/mg, 2000 nmol/hr/mg, 3000 nmol/hr/mg, 4000 nmol/hr/mg, 5000 nmol/hr/mg, 6000 nmol/hr/mg, 7000 nmol/hr/mg, 8000 nmol/hr/mg, 9000 nmol/hr/mg, o 10.000 nmol/hr/mg.

- 20 En general, los agentes terapéuticos (enzimas I2S de reemplazo) administrados de acuerdo con la presente invención tienen un tiempo medio suficientemente largo en LCR y tejidos diana del cerebro, la médula espinal y los órganos periféricos. En algunas realizaciones, un agente terapéutico (una enzima de reemplazo) administrado según la presente invención puede tener una vida media de al menos aproximadamente 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, hasta 3 días, hasta 7 días, hasta 14 días, hasta 21 días o hasta un mes. En algunas realizaciones, en algunas realizaciones, un agente terapéutico de agente (por ejemplo, una enzima I2S de reemplazo) entregada de acuerdo con la presente invención puede retener nivel detectable o actividad en el LCR o el torrente sanguíneo después de 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 o una semana después de la administración. El nivel o actividad detectable puede determinarse usando varios métodos conocidos en la técnica.
- 25
- 30

35 En ciertas realizaciones, un agente terapéutico (una enzima I2S de reemplazo) administrado de acuerdo con la presente invención logra una concentración de al menos 30 µg/ml en los tejidos y células del SNC del sujeto después de la administración (por ejemplo, una semana, 3). días, 48 horas, 36 horas, 24 horas, 18 horas, 12 horas, 8 horas, 6 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos o menos, después de la administración intratecal de la composición farmacéutica al tema). En ciertas realizaciones, un agente terapéutico (una enzima de reemplazo) administrado de acuerdo con la presente invención logra una concentración de al menos 20 µg/ml, al menos 15 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 7,5 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 25 µg/ml, al menos 10 µg/ml o al menos 0,5 µg/ml en los tejidos o células diana del sujeto (p. ej., tejidos cerebrales o neuronas) después de la administración a dicho sujeto (por ejemplo, una semana, 3 días, 48 horas, 36 horas, 24 horas, 18 horas, 12 horas, 8 horas, 6 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos o menos después de la administración intratecal de tales composiciones farmacéuticas al sujeto).

40

#### **Tratamiento del Síndrome de Hunter y otras enfermedades de almacenamiento lisosómico**

- 45 Las enfermedades de almacenamiento lisosómico representan un grupo de trastornos metabólicos hereditarios relativamente raros que resultan de defectos en la función lisosómica. Las enfermedades lisosómicas se caracterizan por la acumulación de macromoléculas no digeridas, incluidos los sustratos enzimáticos, dentro de los lisosomas (ver Tabla 1), lo que resulta en un aumento en el tamaño y el número de dichos lisosomas y, en última instancia, en la disfunción celular y anomalías clínicas.
- 50

55 Las composiciones descritas en el presente documento pueden facilitar ventajosamente el suministro de los agentes terapéuticos (las enzimas I2S ) a órganulos específicos. Por ejemplo, debido a que los trastornos de almacenamiento lisosómico, como el síndrome de Hunter, se caracterizan por una acumulación de glicosaminoglicanos (GAG) en los lisosomas de las células afectadas, los lisosomas representan un órganulo objetivo deseado para el tratamiento de los trastornos de almacenamiento lisosómico.

- 60 Las formulaciones para su uso de acuerdo con la presente invención son particularmente útiles para tratar aquellas enfermedades que tienen una etiología o componente del SNC . Las enfermedades de almacenamiento lisosómico que tienen una etiología o componente del SNC, incluyen el síndrome de Hunter. Antes de la presente invención, las terapias tradicionales están limitadas porque se administran a sujetos por vía intravenosa y, en general, solo son eficaces para tratar los síntomas somáticos de la deficiencia enzimática subyacente. Las formulaciones para su uso de acuerdo con la presente invención pueden administrarse ventajosamente directamente en el SNC de un sujeto que padece una enfermedad que tiene dicha etiología del SNC, logrando así una concentración terapéutica dentro de las células y tejidos afectados del SNC (por ejemplo, el cerebro), superando así el limitaciones asociadas
- 65

con la administración sistémica tradicional de tales agentes terapéuticos.

En algunas realizaciones, las formulaciones para su uso de acuerdo con la invención son útiles para tratar las secuelas o síntomas neurológicos y somáticos del síndrome de Hunter. Por ejemplo, algunas realizaciones de la invención se refieren a composiciones para administrar el agente terapéutico al SNC de un sujeto (por vía intratecal o intraventricular) para el tratamiento del SNC o secuelas neurológicas y manifestaciones del Síndrome de Hunters, al mismo tiempo que tratan las manifestaciones sistémicas o somáticas de dicho enfermedad. Por ejemplo, las composiciones para su uso de acuerdo con la presente invención pueden administrarse a un sujeto por vía intratecal, administrando así uno o más agentes terapéuticos al SNC del sujeto y tratando las secuelas neurológicas, junto con la administración intravenosa de uno o más agentes terapéuticos para administrar dichos agentes. agentes terapéuticos tanto para las células y tejidos de la circulación sistémica (p. ej., células y tejidos del corazón, pulmones, hígado, riñón o ganglios linfáticos) para tratar de este modo Las secuelas somáticas. Por ejemplo, un sujeto que tiene o está afectado por el síndrome de Hunter puede recibir una composición farmacéutica que comprende el agente terapéutico (iduronato-2-sulfatasa) por vía intratecal al menos una vez por semana, quincenal, mensual, bimestral o más para tratar las secuelas neurológicas, mientras Se administra un agente terapéutico diferente al sujeto por vía intravenosa con mayor frecuencia (por ejemplo, una vez al día, día por medio, tres veces a la semana o semanalmente) para tratar las manifestaciones sistémicas o somáticas de la enfermedad.

El síndrome de Hunter, o mucopolisacardosis II (MPS II), es un trastorno metabólico hereditario ligado al X que resulta de una deficiencia de la enzima iduronato-2-sulfatasa (I2S). I2S se localiza en los lisosomas y juega un papel importante en el catabolismo de los glucosaminoglucanos (GAG) heparán y dermatán sulfato. En ausencia de enzima, estos sustratos se acumulan dentro de las células, lo que finalmente causa congestión, seguido de muerte celular y destrucción de tejidos. Debido a la expresión generalizada de enzimas, múltiples tipos de células y sistemas de órganos se ven afectados en pacientes con MPS II.

Una característica clínica definiendo de este trastorno es el sistema nervioso central (CNS) la degeneración, que resulta en el deterioro cognitivo (por ejemplo, disminución de IQ). Además, las imágenes por resonancia magnética de las personas afectadas han revelado lesiones de la sustancia blanca, espacios perivasculares dilatados en el parénquima cerebral, ganglios, cuerpo calloso y tronco encefálico; atrofia; y ventriculomegalia (Wang et al. Molecular Genetics and Metabolism, 2009). La enfermedad generalmente se manifiesta en los primeros años de vida con organomegalia y anomalías esqueléticas. Algunas personas afectadas experimentan una pérdida progresiva de la función cognitiva, y la mayoría de las personas afectadas mueren por complicaciones asociadas a la enfermedad en su primera o segunda década.

Las formulaciones para su uso de acuerdo con la presente invención pueden usarse para tratar eficazmente a individuos que padecen o son susceptibles a Síndrome de Hunter. Los términos "tratar" o "tratamiento", como se usan en este documento, se refieren a la mejora de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, la prevención o el retraso de la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad, y/o la disminución de la gravedad o frecuencia de uno o más síntomas de la enfermedad. Los síntomas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, presión intracraneal, hidrocefalia ex vacuo, glucolípidos sulfatados acumulados en las vainas de mielina en el sistema nervioso central y periférico y en los órganos viscerales, desmielinización progresiva y pérdida axonal dentro del SNC y el SNP, y/o disfunción motora y cognitiva.

En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a alivio parcial o completo, mejora, alivio, inhibición, inicio tardío, reducción de la gravedad y/o incidencia de deterioro neurológico en un paciente con Síndrome de Hunter. Como se usa en el presente documento, el término "deterioro neurológico" incluye varios síntomas asociados con el deterioro del sistema nervioso central (por ejemplo, el cerebro y la médula espinal). Los síntomas del deterioro neurológico pueden incluir, por ejemplo, deterioro cognitivo ; lesiones de la sustancia blanca; espacios perivasculares dilatados en el parénquima cerebral, ganglios, cuerpo calloso y/o tronco encefálico; atrofia; y/o ventriculomegalia, entre otros.

En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la disminución de la acumulación de sulfatida en diversos tejidos. En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la disminución de la acumulación de sulfatida en los tejidos diana del cerebro, las neuronas de la médula espinal y/o los tejidos diana periféricos. En ciertas realizaciones, la acumulación de sulfatida disminuye en aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% y 95% o más en comparación con un control. En algunas realizaciones, la acumulación de sulfatida disminuye al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces en comparación con un control. En algunas realizaciones, el almacenamiento lisosómico se mide por la presencia de gránulos de almacenamiento lisosómico (por ejemplo, morfología con rayas de cebra). La presencia de gránulos de almacenamiento lisosómico se puede medir por diversos medios conocidos en la técnica, como por análisis histológico.

En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la vacuolización reducida en neuronas (por ejemplo, neuronas que contienen células de Purkinje). En ciertas realizaciones, la vacuolización en las neuronas disminuye en aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% y 100% o más en comparación con un control. En algunas realizaciones, la vacuolización se reduce al menos

1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces como en comparación con un control. La presencia y la reducción de la vacuolización pueden medirse por diversos medios conocidos en la técnica, tales como por análisis histológico.

5 En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere al aumento de la actividad de la enzima I2S en diversos tejidos. En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere al aumento de la actividad de la enzima I2S en tejidos diana del cerebro, neuronas de la médula espinal y/o tejidos diana periféricos. En algunas realizaciones, la actividad de la enzima I2S aumenta en aproximadamente 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% o más en comparación a un control. En algunas realizaciones, la actividad de la enzima I2S aumenta al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10- doblar en comparación con un control. En algunas realizaciones, el aumento de la actividad enzimática I2S es de al menos aproximadamente 10 nmol/hr/mg, 20 nmol/hr/mg, 40 nmol/hr/mg, 50 nmol/hr/mg, 60 nmol/hr/mg, 70 nmol/hr/mg, 80 nmol/hr/mg, 90 nmol/hr/mg, 100 nmol/hr/mg, 150 nmol/hr/mg, 200 nmol/hr/mg, 250 nmol/hr/mg, 300 nmol/hr/mg, 350 nmol/hr/mg, 400 nmol/hr/mg, 450 nmol/hr/mg, 500 nmol/hr/mg, 550 nmol/hr/mg, 600 nmol/hr/mg o más. En algunas realizaciones, la actividad enzimática I2S aumenta en la región lumbar. En algunas realizaciones, el aumento de la actividad enzimática I2S en la región lumbar es de al menos aproximadamente 2000 nmol/hr/mg, 3000 nmol/hr/mg, 4000 nmol/hr/mg, 5000 nmol/hr/mg, 6000 nmol/hr/mg, 7000 nmol/hr/mg, 8000 nmol/hr/mg, 9000 nmol/hr/mg, 10.000 nmol/hr/mg, o más. En algunas realizaciones, la actividad enzimática de I2S aumenta en la médula espinal distal o en las células de la médula espinal distal.

20 En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la disminución de la progresión de la pérdida de la capacidad cognitiva. En ciertas realizaciones, la progresión de la pérdida de la capacidad cognitiva disminuye en aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más en comparación con un control. En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la disminución del retraso del desarrollo. En ciertas realizaciones, el retraso del desarrollo disminuye en aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más en comparación con un control.

25 En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere al aumento de la supervivencia (por ejemplo, el tiempo de supervivencia). Por ejemplo, el tratamiento puede aumentar la esperanza de vida de un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento da como resultado una mayor esperanza de vida de un paciente en más de aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 100%, aproximadamente 105%, aproximadamente 110%, aproximadamente 115%, aproximadamente 120%, aproximadamente 125%, aproximadamente 130%, aproximadamente 135%, aproximadamente 140%, aproximadamente 145%, aproximadamente 150%, aproximadamente 155%, aproximadamente 160%, aproximadamente 165%, aproximadamente 170%, aproximadamente el 175%, aproximadamente el 180%, aproximadamente 185%, aproximadamente el 190%, aproximadamente el 195%, aproximadamente el 200% o más, en comparación con la esperanza media de vida de uno o más individuos de control con enfermedad similar sin tratamiento. En algunas realizaciones, el tratamiento da como resultado una mayor esperanza de vida de un paciente en más de aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses, aproximadamente 12 meses, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 6 años, aproximadamente 7 años, aproximadamente 8 años, aproximadamente 9 años, aproximadamente 10 años o más, en comparación con la esperanza de vida promedio de uno o más individuos de control con enfermedad similar sin tratamiento. En algunas realizaciones, el tratamiento da como resultado la supervivencia a largo plazo de un paciente. Como se usa en el presente documento, el término "supervivencia a largo plazo" se refiere a un tiempo de supervivencia o esperanza de vida superior a aproximadamente 40 años, 45 años, 50 años, 55 años, 60 años o más.

30 Los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir", como se usan en el presente documento, indican valores que son relativos a un control. Un control adecuado es una medición de referencia, tal como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito aquí, o una medición en un control individual (o individuos de control múltiple) en ausencia del tratamiento descrito aquí. Un "individuo de control" es un individuo afectado con la misma forma Síndrome de Hunter (p. ej., Forma infantil tardía, juvenil o de inicio en la edad adulta), que tiene aproximadamente la misma edad y/o sexo que la persona tratada (para asegurar que las etapas de la enfermedad en el individuo tratado y el individuo o individuos de control son comparables).

35 El individuo (también denominado "paciente" o "sujeto") que está siendo tratado es un individuo (feto, bebé, niño, adolescente o adulto humano) que tiene Síndrome de Hunter o que tiene el potencial de desarrollar Síndrome de Hunter. El individuo puede tener expresión y/o actividad de I2S endógena residual, o ninguna actividad medible. Por ejemplo, el individuo que tiene Síndrome de Hunter puede tener niveles de expresión I2S que son menos de

aproximadamente 30-50%, menos de aproximadamente 25-30%, menos de aproximadamente 20-25%, menos de aproximadamente 15-20%, menos de aproximadamente 10-15%, menos de aproximadamente 5-10%, menos de aproximadamente 0,1-5% de los niveles normales de expresión de I2S.

5 En algunas realizaciones, el individuo es un individuo que ha sido diagnosticado recientemente con la enfermedad. Por lo general, el tratamiento temprano (el tratamiento comienza lo antes posible después del diagnóstico) es importante para minimizar los efectos de la enfermedad y maximizar los beneficios del tratamiento.

#### Tolerancia inmunológica

10 Generalmente, la administración intratecal de un agente terapéutico (una enzima I2S de reemplazo) según la presente invención no produce efectos adversos graves en el sujeto. Como se usa en este documento, los efectos adversos graves inducen, pero no se limitan a, una respuesta inmune sustancial, toxicidad o muerte. Como se usa en el presente documento, el término "respuesta inmune sustancial" se refiere a respuestas inmunes graves, tales como 15 respuestas inmunes adaptativas de células T.

20 Por lo tanto, en muchas realizaciones, el uso de una composición en un método de tratamiento de Síndrome de Hunter de acuerdo con la presente invención no implica una terapia inmunosupresora concurrente (es decir, cualquier terapia inmunosupresora usada como pretratamiento/preacondicionamiento o en paralelo al método). En algunas realizaciones, dicho uso no implica una inducción de tolerancia inmune en el sujeto que está siendo tratado. En algunas realizaciones, dicho uso no implica un pretratamiento o preacondicionamiento del sujeto usando agente 25 inmunosupresor de células T.

25 En algunas realizaciones, la administración intratecal de agentes terapéuticos puede generar una respuesta inmune contra estos agentes. Por lo tanto, en algunos modelos de realización, puede ser útil hacer que el sujeto que recibe la enzima de reemplazo sea tolerante a la terapia de reemplazo de enzima. La tolerancia inmune se puede inducir usando diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un régimen inicial de 30-60 días de un agente 30 inmunosupresor de células T como la ciclosporina A (CsA) y un agente antiproliferativo, como la azatioprina (Aza), combinado con infusiones intratecales semanales de dosis bajas de una enzima de reemplazo deseada puede ser usado.

35 Cualquier agente inmunosupresor conocido por el experto en la técnica puede emplearse junto con una terapia de combinación. Dichos agentes inmunosupresores incluyen, entre otros, ciclosporina, FK506, rapamicina, CTLA4-Ig y agentes anti-TNF tales como etanercept (véase, por ejemplo, Moder, 2000, Ann. Allergy Asthma Immunol. 84, 280-284; Nevins, 5 2000, Curr. Opin. Pediatr., 12, 146-150; Kurlberg et al., 2000, Scand. J. Immunol. 51, 224-230; Ideguchi et. al, 2000, Neurociencia 95, 217-226;. Potteret et al, 1999, Ann NY Acad Sci 875, 159-174;...Slavik et al, 1999, Immunol R es 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). El anticuerpo anti-receptor de IL2 (subunidad α) daclizumab (por ejemplo, Zenapax.TM.), Que se ha demostrado eficaz 40 en pacientes trasplantados, también puede usarse como un agente inmunosupresor (ver, por ejemplo, Wiseman et al., 1999, Drogas). 58, 1029-1042; Beniaminovitz et al., 2000, N. Engl J. Med. 342, 613-619; Ponticelli et al., 1999, Drugs Rd 1, 55-60; Berard et al., 1999, Farmacoterapia 19, 1127-1137; Eckhoff et al., 2000, Transplantation 69, 1867-1872; Ekberg et al., 2000, Transpl. Int. 13, 151-159). Los agentes inmunosupresores adicionales incluyen, entre otros, anti-CD2 (Branco et al., 1999, Transplantation 68, 1588-1596; Przepiorka et al., 1998, Blood 92, 4066-4071), anti-CD4 45 (Marinova-Mutafchieva et al., 2000, Arthritis Rheum. 43, 638-644; Fishwild et al., 1999, Clin. Immunol. 92, 138-152), y ligando 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).

#### Administración

50 Se contemplan administraciones tanto simples como múltiples de una cantidad terapéuticamente efectiva del agente terapéutico (enzimas I2S de reemplazo). El agente terapéutico (enzimas I2S de reemplazo) se puede administrar a intervalos regulares, dependiendo de la naturaleza, gravedad y extensión de la condición del sujeto. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva del agente terapéutico (enzimas I2S de reemplazo) de 55 la presente invención puede administrarse por vía intratecal periódicamente a intervalos regulares (por ejemplo, una vez al año, una vez cada seis meses, una vez cada cinco meses, una vez cada tres meses, bimensualmente (una vez cada dos meses), mensualmente (una vez al mes), quincenalmente (una vez cada dos semanas), semanalmente, diariamente o continuamente.

60 En algunas realizaciones, la administración intratecal puede usarse junto con otras vías de administración (por ejemplo, intravenosa, subcutánea , por vía intramuscular, parenteral, transdérmica o transmucosa (p. ej., oral o nasal). En algunas formas de realización, esas otras vías de administración (p. ej., administración intravenosa) pueden realizarse con menos frecuencia que quincenalmente, mensualmente, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses, una vez cada cinco meses, una vez cada seis meses, administración anual En 65 algunas realizaciones, el método comprende además administrar la enzima de reemplazo I2S por vía intravenosa al

sujeto. En ciertas realizaciones, la administración intravenosa no es más frecuente que la administración semanal (por ejemplo, no más frecuente que quincenalmente, mensualmente, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses, una vez cada cinco meses o una vez cada seis meses) En ciertas realizaciones, la administración intravenosa es más frecuente que la administración mensual, tal como dos veces por semana, 5 semanalmente, cada dos semanas o dos veces al mes. En algunas realizaciones, las administraciones intravenosas e intratecales se realizan el mismo día. En algunas realizaciones, las administraciones intravenosas e intratecales no se realizan dentro de una cierta cantidad de tiempo entre sí, tal como no dentro de al menos 2 días, dentro de al menos 3 días, dentro de al menos 4 días, dentro de al menos 5 días, dentro de al menos 6 días, dentro de al menos 7 días, o dentro de al menos una semana. En algunas realizaciones, las administraciones intravenosas e intratecales se 10 realizan en un horario alterno, tal como administraciones alternas semanalmente, cada dos semanas, dos veces al mes o mensualmente. En algunas realizaciones, una administración intratecal reemplaza una administración intravenosa en un programa de administración, tal como en un programa de administración intravenosa semanal, cada dos semanas, dos veces al mes o mensualmente, cada tercera o cuarta o quinta administración en ese programa puede reemplazarse con Una administración intratecal en lugar de una administración intravenosa. En algunas 15 realizaciones, una administración intravenosa reemplaza una administración intratecal en un programa de administración, tal como en un programa de administración intratecal semanal, cada dos semanas, dos veces al mes o mensualmente, cada tercera o cuarta o quinta administración en ese programa se puede reemplazar con Una administración intravenosa en lugar de una administración intratecal. En algunas realizaciones, las administraciones intravenosas e intratecales se realizan secuencialmente, tal como realizar primero las administraciones intravenosas 20 (por ejemplo, semanalmente, cada dos semanas, dos veces al mes o dosificación mensual durante dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año o más) seguidos de administraciones intratecales (por ejemplo, semanalmente, cada dos semanas, dos veces al mes o dosificación mensual durante más de dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año o más). En algunas realizaciones, las administraciones intratecales se realizan primero (por ejemplo, semanalmente, cada dos semanas, 25 dos veces al mes, mensualmente, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, dosificación durante dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año o más) seguidos de administraciones intravenosas (p. ej., semanalmente, cada dos semanas, dos veces al mes o dosificación mensual durante más de dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año o más). 30

En algunas realizaciones, el Síndrome de Hunter está asociado con síntomas periféricos y el método incluye administrar la enzima I2S de reemplazo por vía intratecal pero no implica administrar la enzima I2S de reemplazo por vía intravenosa al sujeto. En ciertas realizaciones, la administración intratecal de la enzima I2S mejora o reduce uno o más de los síntomas periféricos asociados con la deficiencia de I2S del sujeto.

Tal como se utiliza aquí, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" es la base en gran parte determinada 35 de la cantidad total de agente terapéutico contenida en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Generalmente, una cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para lograr un beneficio significativo para el sujeto (por ejemplo, tratar, modular, curar, prevenir y/o mejorar la enfermedad o afección subyacente). Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva puede ser una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, tal como una cantidad suficiente para modular los receptores de enzimas lisosomales o su actividad para tratar de ese modo la enfermedad de almacenamiento lisosómico o sus síntomas (por ejemplo, una reducción o eliminación de la presencia o incidencia de "cuerpos de cebra" o vacuolización celular después de la administración 40 de las composiciones para su uso de acuerdo con la presente invención a un sujeto). Generalmente, la cantidad de un agente terapéutico (por ejemplo, una enzima I2S recombinante) administrada a un sujeto que lo necesite dependerá de las características del sujeto. Dichas características incluyen la condición, la gravedad de la enfermedad, la salud general, la edad, el sexo y el peso corporal del sujeto. Un experto en la materia podrá determinar fácilmente las dosis apropiadas dependiendo de estos y otros factores relacionados. Además, tanto los ensayos diana como los subjetivos 45 pueden emplearse opcionalmente para identificar rangos de dosificación óptimos.

Una cantidad terapéuticamente efectiva se administra comúnmente en un régimen de dosificación que puede 50 comprender múltiples dosis unitarias. Para cualquier proteína terapéutica particular, una cantidad terapéuticamente efectiva (y/o una dosis unitaria apropiada dentro de un régimen de dosificación eficaz) puede variar, por ejemplo, dependiendo de la vía de administración, en combinación con otros agentes farmacéuticos. Además, la cantidad terapéuticamente efectiva específica (y/o dosis unitaria) para cualquier paciente en particular puede depender de una 55 variedad de factores que incluyen el trastorno que se trata y la gravedad del trastorno; la actividad del agente farmacéutico específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, la ruta de administración y/o la tasa de excreción o metabolismo de la proteína de fusión específica empleada; la duración del tratamiento; y factores similares como es bien conocido en las técnicas médicas.

En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente efectiva varía de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 500 mg/kg de peso cerebral, por ejemplo, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 400 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 300 mg/kg de peso cerebral, de 60 aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 200 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de

peso cerebral a 100 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg peso cerebral a 90 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 80 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 70 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 60 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 50 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 40 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 30 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 25 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 20 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 15 mg/kg cerebro peso, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 10 mg/kg de peso cerebral.

En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente efectiva es mayor que aproximadamente 0,1 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 0,5 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 1,0 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 3 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 5 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 10 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 15 mg/kg de peso cerebral, mayor mayor que aproximadamente 20 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 30 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 40 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 50 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 60 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 70 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 80 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 90 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 100 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 150 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 200 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 250 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 300 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 350 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 400 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 450 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 500 mg/kg de peso cerebral.

En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente efectiva también puede definirse por mg/kg de peso corporal. Como apreciaría un experto en la materia, los pesos cerebrales y los pesos corporales pueden correlacionarse. 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. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las dosis pueden convertirse como se muestra en la Tabla 5.

TABLA 5

Correlación entre los pesos cerebrales, los pesos corporales y las edades de los varones.		
Edad (año)	Peso del cerebro (kg)	Peso corporal (kg)
3 (31-43 meses)	1,27	15,55
4-5	1,30	19,46

En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente efectiva también puede definirse por mg/15 cc de LCR. Como apreciaría un experto en la materia, las dosis terapéuticamente efectivas basadas en los pesos cerebrales y los pesos corporales se pueden convertir a mg/15 cc de LCR. Por ejemplo, el volumen de LCR en humanos adultos es de aproximadamente 150 ml (Johanson CE, et al. "Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease", Cerebrospinal Fluid Res. 2008 14;5:10). Por lo tanto, las inyecciones de dosis única de 0,1 mg a 50 mg de proteína para adultos serían aproximadamente 0,01 mg/15 cc de LCR (0,1 mg) a 5,0 mg/15 cc de dosis de LCR (50 mg) en adultos.

Se ha de entender que para cualquier sujeto particular adicional, regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de la terapia de reemplazo de enzimas y que los intervalos de dosificación establecidos aquí en adelante son solo ejemplares.

#### Kits

Además, se proporcionan kits u otros artículos de fabricación que contienen la formulación para su uso de acuerdo con la presente invención y proporcionan instrucciones para su reconstitución (si está liofilizada) y/o uso. Los kits u otros artículos de fabricación pueden incluir un contenedor, un IDDD, un catéter y cualquier otro artículo, dispositivo o equipo útil en la administración intercal y la cirugía asociada. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas (por ejemplo, jeringas precargadas), ampollas, cartuchos, depósitos o lyo-jects. El contenedor puede estar formado por una variedad de materiales como vidrio o plástico. En algunas realizaciones, un recipiente es una jeringa precargada. Las jeringas precargadas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, jeringas de vidrio de borosilicato con revestimiento de silicona cocida, jeringas de vidrio de borosilicato con silicona pulverizada o jeringas de resina plástica sin silicona.

Típicamente, el contenedor puede contener formulaciones y una etiqueta, o estar asociado con el contenedor,

que puede indicar instrucciones para la reconstitución y/o uso. Por ejemplo, la etiqueta puede indicar que la formulación se reconstituye a concentraciones de proteína como se describe anteriormente. La etiqueta puede indicar además que la formulación es útil o está destinada, por ejemplo, a la administración de IT. En algunas realizaciones, un recipiente puede contener una dosis única de una formulación a base de solución salina o tampón que contiene un agente terapéutico (una enzima I2S de reemplazo). En diversas realizaciones, una dosis única de la formulación estable está presente en un volumen de menos de aproximadamente 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, o 0,5 ml. Alternativamente, un recipiente que contiene la formulación puede ser un vial de usos múltiples, que permite la administración repetida (por ejemplo, de 2 a 6 administraciones) de la formulación. Los kits u otros artículos de fabricación pueden incluir además un segundo recipiente que comprende un diluyente adecuado (por ejemplo, BWFI, solución salina, solución salina tamponada). Al mezclar el diluyente y la formulación, la concentración final de proteína en la formulación reconstituida generalmente será de al menos 1 mg/ml (por ejemplo, al menos 5 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml). Los kits u otros artículos de fabricación pueden incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, IDDD, catéteres, jeringas e insertos de paquetes con instrucciones de uso.

La invención se entenderá más plenamente por referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

## 20 EJEMPLOS

### EJEMPLO 1: Biodistribución

El objetivo principal de este estudio fue determinar si el I2S humano recombinante podría administrarse al cerebro de ratones adultos MPS II por la ruta intratecal-lumbar

**TABLA 6:** Seis grupos de ratones machos de 8-12 semanas de edad se trajeron de la siguiente manera:

30	Grupo	N	Presión	Tratamiento	Volumen	Dosis	Dosis/peso cerebral	Ruta
	A	3	IKO	I2S	10 µL	260 µg	520 mg/kg	IT-lumbar
	B	3	IKO	I2S	10 µL	260 µg	520 mg/kg	IT-lumbar
	C	3	IKO	Sin tratamiento	N/A	N/A	N/A	N/A
	D	1	IKO	I2S	10 µL	260 µg	520 mg/kg	IT-lumbar
35	E	3	IKO	Sin tratamiento	N/A	N/A	N/A	N/A
	F	3	C57B1/6	Sin tratamiento	N/A	N/A	N/A	N/A
	Programa de inyección: los animales recibieron hasta 3 inyecciones de idursulfasa (10 µL) por vía intratecal-lumbar:							
40	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Grupos A y D: administraron 3 dosis de I2S los días 1, 8 y 15</li> <li>○ Grupo B: administraron 2 dosis de I2S en los días 1 y 8</li> <li>○ Grupos C y E: ratones de control sin tratar (IKO)</li> <li>○ Grupo F: ratones de control de tipo salvaje sin tratar</li> </ul>							

## MATERIALES Y MÉTODOS

45 **Animales:**

Los ratones se alojaron en grupos de hasta 4 por jaula en una sala de colonias bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. La dieta de roedores (LabDiet-5001, St Louis, MO) y el agua (agua municipal de Lexington, MA purificada por ósmosis inversa) estuvo disponible *ad libitum* durante la duración del experimento. El cuidado de los animales se realizó de acuerdo con las pautas descritas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (National Academy Press, Washington DC, 1996). La actual colonia reproductiva de IKO se estableció a partir de cuatro ratones hembra portadores heterocigotos para la mutación IKO que se obtuvieron del Dr. Joseph Muenzer (Universidad de Carolina del Norte). Las hembras portadoras se criaron con ratones machos de la cepa de fondo C57BL/6 (C57BL/6NTac, Taconic, Hudson, NY), produciendo hembras heterocigotas y hechizos hemizigotos, así como machos salvajes y hembras compañeras de camada. Todos los descendientes fueron genotipados mediante análisis de PCR de ADN tisular. Todos los ratones utilizados en este experimento eran machos identificados como ratones hemizigóticos IKO (-/0) o de tipo salvaje (WT) littermate (+/0) entre las 8 y las 12 semanas de edad.

60 **Idursulfasa:**

Veintidós ml de I2S [La idursufasa humana recombinante se dializó frente a cuatro cambios de solución salina tamponada con fosfato (PBS) 2L . El I2S se concentró luego mediante una columna Vivavspin y se resuspendió en un volumen final de 1 ml de PBS, seguido de esterilización por filtración usando un filtro de 0,2 µm. La concentración final fue de 51 mg/ml.

**Inyecciones intratecal-lumbares:**

Se anestesiaron ratones adultos usando 1,25% de 2,2,2 tribromoetanol (Avertin) a 200-300 µL/10 gramos de peso corporal (250-350 mg/kg) mediante inyección intraperitoneal. Se retiró el vello dorsal entre la base de la cola y los omóplatos y se limpió el área afeitada con un exfoliante de povidina/betadina seguido de alcohol isopropílico. Se realizó una pequeña incisión en la línea media de la piel (1-2 cm) sobre la columna lumbosacra y se identificó la intersección de la línea media dorsal y la cara craneal de las alas de la íleum (ileon singular). El músculo en la fosa ilíaca (glúteo medio) es un músculo en forma de corazón y los dos lados de la parte superior del "corazón" se aproximan a la ubicación de las alas de la íleum. Se insertó una aguja de calibre 32 unida a una jeringa Hamilton de vidrio de 10-20 µL a prueba de gas hasta que se sintió resistencia del hueso subyacente. Se realizó la inyección de 10 µL de artículo de prueba a una velocidad aproximada de 2 µL/20 segundos (10 µL/2 minutos). La incisión en la piel se cerró usando clips para heridas, según corresponda, y se permitió que el animal se recuperara en una cámara de recuperación antes de regresar a la jaula adecuada.

**Procedimientos de histología:**

Los animales se sacrificaron una hora después de la inyección final.

Se recogieron y se fijaron en formalina al 10% tamponada neutra tejidos cerebro y el hígado, a continuación, procesados y embebidos en parafina. Se prepararon secciones de 5 µm para la tinción con hematoxilina/eosina (H&E) e inmunohistoquímica (IHC).

**Hematoxilina y tinción de eosina:**

Las secciones de cerebro y el hígado se tiñeron con H & E. Los resultados de la tinción mostraron núcleos de color púrpura y citoplasma de rosa a rojo. Los portaobjetos teñidos con H&E se usaron para la evaluación de la morfología histopatológica.

**Inmunohistoquímica:**

Para evaluación biodistribución I2S, las secciones del cerebro y del hígado desparafinados y rehidratados se incubaron durante la noche con anticuerpo monoclonal de ratón 2C4-2B2 (Maine Biotechnology Services, Portland, ME) contra recombinante I2S humano para detectar inyectaron I2S (o un ratón irrelevante IgG como anticuerpo de control negativo; Vector Laboratories, Burlingame, CA). Después de una incubación durante la noche a 2-8°C, se añadió una IgG secundaria de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante. Después de 30 minutos adicionales de incubación a 37°C, se añadió la solución de etiquetado Tyramide-Alexa Fluor 488 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) durante 10 minutos adicionales. Las secciones se cubrieron con un medio de montaje antifading (VectaShield; Vector Laboratories) que contenía 1,5 µg/ml de 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) como contratinación nuclear y se observó con un microscopio fluorescente Nikon de múltiples canales. Los resultados de la tinción mostraron que las células I2S positivas eran verdes, con núcleos como azules y las áreas de fondo como negras.

Para el análisis de eficacia, las secciones de cerebro e hígado se tiñeron con una IgG de rata anti-LAMP-1 (proteína de membrana asociada a lisosoma como marcador lisosómico) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California) como el anticuerpo primario. Se usó una IgG de rata como anticuerpo irrelevante como control negativo. Se utilizó el método ABC (kits de complejo de avidina biotina de Vector Labs, Burlingame, California) para amplificar el marcador diana.

Brevemente, las secciones desparafinadas se rehidrataron y se incubaron con el anticuerpo primario. Despues de la incubación durante la noche a 2-8°C, se añadió una IgG anti-rata de conejo biotinilada secundaria (Vector Labs, Burlingame, California) y se incubó 30 minutos a 37°C, luego las muestras se lavaron y se trataron con complejo de avidina-biotina-peroxidasa (Vector Laboratories) durante 30 minutos. Para el desarrollo del color, se usó tetrahidrocloruro de 3,3-diaminobencidina (DAB) como cromógeno. Las secciones fueron luego teñidas con hematoxilina y cubreobjetos. Los resultados de la tinción mostraron LAMP 1 células positivas como marrón y núcleos como azul.

Se tomaron las fotos representativas y el área de células positivas LAMP-1 se analizaron con Imagen-Pro Plus software (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD) y estadísticas comparativas se realizaron utilizando la prueba t de Student.

**Método de microscopio de electrones:**

Los tejidos cerebrales de 3 dosis de I2S animales tratados se fijaron en 2,5% PFA/2,5% de glutaraldehído en 0,1 M de sodio tampón cacodilato pH 7,4 a 4 grados durante toda la noche. Luego, las muestras se lavaron en tampón de cacodilato (0,1 M, pH 7,4) y se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio, se deshidrataron en alcoholos y óxido

de propileno y se embebieron en resina Epon. Se cortaron secciones ultrafinas a 100 nm, se tiñeron con citrato de plomo y se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Tecnai™ G<sup>2</sup> Spirit BioTWIN.

## Resultados

- 5 En el cerebro según lo determinado por inmunohistoquímica (IHC), no se encontró I2S en animales de control de vehículo. En contraste, las células meníngicas, las neuronas del cerebro y el cerebelo se tiñeron positivamente para I2S en animales inyectados con I2S. La señal de tinción fue más fuerte en los animales que recibieron 3 dosis (Figura 1).
- 10 En los tejidos cerebrales de ratones IKO tratados con vehículo, se encontró vacuolación celular, una característica histopatológica de las enfermedades de almacenamiento lisosómico, en todo el cerebro en comparación con los animales de tipo salvaje. En ratones IKO tratados con I2S, hubo una reducción generalizada de la vacuolación celular desde la corteza cerebral superficial, el núcleo caudado, el tálamo, el cerebelo hasta la sustancia blanca en comparación con los no tratados (Figura 2). Se descubrió una actividad lisosómica anormalmente alta mediante la tinción de la proteína 1 de membrana asociada a lisosoma (LAMP-1), un indicador de la actividad lisosómica y el estado de la enfermedad, en células microgliales, meníngicas y perivasculares de ratones IKO tratados con vehículo en comparación con animales de tipo salvaje. Los ratones tratados con I2S intratecal tenían reducciones marcadas en la inmunotinción LAMP-1. Esta reducción se caracterizó por la disminución en el número de células positivas para LAMP-1 y una tinción más clara. La reducción se encontró en todo el cerebro desde la corteza cerebral superficial, el núcleo caudado, el tálamo, el cerebelo hasta la sustancia blanca (Figura 3) en 2 y 3 dosis de animales tratados con I2S. El análisis morfométrico de la inmunotinción de LAMP-1 de varias regiones del cerebro confirmó que hubo reducciones significativas en la tinción positiva de LAMP-1 en todas las áreas del cerebro evaluadas (Figura 4).
- 15 25 El examen de microscopía electrónica de las células cerebrales en ratones IKO tratados con vehículo reveló las vacuolas agrandadas que contienen material de almacenamiento granular amorfo e inclusiones con estructuras de cuerpo como lamellated y cebra. Estas características patológicas típicas del almacenamiento lisosómico a nivel ultraestructural se redujeron en ratones inyectados con I2S intratecal-lumbar (Figura 5).
- 30 35 En el hígado, no hubo tinción positiva de I2S en los animales tratados con vehículo. En los ratones inyectados intratecalmente I2S, se encontró claramente una gran cantidad de I2S inyectado en células sinusoidales (Figura 6), lo que indicaba que el I2S inyectado dentro del espacio intratecal circulaba con LCR y luego se absorbía a través de las granulaciones aracnoideas en el sistema circulatorio.
- 40 En tejidos hepáticos de ratones IKO tratados con vehículo, se encontró vacuolación celular severa y actividad lisosómica anormalmente alta demostrada por tinción con H&E y fuerte inmunotinción con LAMP-1 en comparación con ratones WT. La reducción marcada de la vacuolación celular y la inmunotinción de LAMP-1 en hígados se encontró después del tratamiento intratecal con I2S. La tinción con H&E reveló que la vacuolización intracitoplasmática desapareció casi por completo con una estructura de células hepáticas casi normal (Figura 7).
- 45 En ratones IKO, el I2S humano recombinante se suministró al cerebro por vía intratecal-lumbar y el I2S inyectado causó una mejora histopatológica generalizada en una variedad de regiones del cerebro.
- 50 • Se detectó I2S inyectado en células meníngicas y neuronas en el cerebro.
- 55 • Reducción de la vacuolación celular en todo el cerebro a nivel de microscopía de luz y electrónica.
- Marcador lisosómico LAMP-1 reducido en todo el cerebro.
- El I2S inyectado intratecal ingresó a la circulación periférica y mejoró la morfología hepática y el marcador histológico.

## Ejemplo 2: TOXICOLOGÍA

Este ejemplo ilustra los signos clínicos asociados con la idursulfasa a través de dosis mensuales de bolo intratecal lumbar en monos cynomolgus. Para lograr esto, 14 monos cynomolgus machos fueron asignados aleatoriamente a cinco grupos de tratamiento como se muestra en la siguiente tabla.

**TABLA 7: DISEÑO EXPERIMENTAL**

60	Grupo	Cantidad de animales	Dosis nominal (mg)	Dosis Volumen (ml)
	1	3	0	1
	2	3	3	1
	3	3	30	1
	4	3	150	1
65	5	2	100	1

5 Los animales en todos los grupos se dosificaron tres veces a intervalos mensuales IT a nivel de la columna lumbar. El volumen de la dosis de 1 ml se eliminó del sistema de catéter con 0,3 ml de PBS. Uno o dos días antes de cada dosificación, se recogieron aproximadamente 2 ml de LCR de una punción lumbar IT al nivel de la cisterna magna. También se recogieron muestras de sangre (2 ml) en este momento. Se recogieron sangre (2 ml) y LCR (0,1 ml) de los animales del Grupo 5 antes de la dosis, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24 y 48 horas después de la dosis después de la primera dosis. Los signos clínicos se registraron al menos dos veces al día. Se realizó una necropsia aproximadamente 10 24 horas después de la tercera dosis y se recogieron y guardaron tejidos seleccionados.

15 En el día 1, los tres animales del Grupo 4 (150 mg) exhibieron una tendencia mínima a los cuartos traseros dentro de los 3-12 minutos posteriores a la dosis, con una duración de 5-15 minutos; Este signo se consideró relacionado con el artículo de prueba. No hubo cambios en el peso corporal, el consumo de alimentos y los parámetros del examen neurológico/físico que se consideraron relacionados con el artículo de prueba.

20 Se presentan los análisis de las muestras de suero y LCR y los análisis solución de dosificación. Se observaron variaciones en la actividad endógena de idursulfasa en diferentes tejidos del mono cynomolgus; el cerebro y la médula espinal tenían una mayor actividad endógena que otros órganos periféricos examinados, incluidos el hígado, el corazón y los riñones. La administración de idursulfasa se asoció con aumentos dependientes de la dosis en la actividad de idursulfasa en varias regiones del cerebro, así como en el tronco encefálico y la médula espinal. La entrega de IT no resultó en una diferencia observable en la distribución entre los hemisferios cerebrales derecho e izquierdo. Hubo un claro aumento dependiente de la dosis en la actividad de idursulfasa en los siguientes órganos: 25 cerebro, hígado, corazón y riñón. La inmunotinción para idursulfasa en el cerebro demostró un aumento dependiente de la dosis en la intensidad de la tinción. En el grupo de 3 mg, se observó tinción de células meningeas y células gliales limitadas debajo de las meninges; La tinción neuronal no fue evidente en animales del grupo de tratamiento de 3 mg. La tinción con idursulfasa fue positiva y dependiente de la dosis en la médula espinal, con la mayor intensidad de tinción en la región lumbar, donde se produjo la administración IT de la idursulfasa. La intensidad de la tinción con idursulfasa en el hígado, los riñones y el corazón dependía de la dosis y era consistente con una mayor actividad de idursulfasa en estos órganos.

30 En conclusión, la administración IT de idursulfasa a dosis de hasta 150 mg administradas a intervalos mensuales no tuvo efectos adversos. Por lo tanto, el nivel de efectos adversos no observados (NOAEL) se interpretó como 150 mg, la dosis más alta probada en este estudio. La administración de idursulfasa se asoció con aumentos dependientes de la dosis en la actividad de idursulfasa en el SNC y resultó en niveles sistémicos de I2S y actividad en el hígado, los riñones y el corazón.

35 40 El artículo de prueba, idursulfasa, fue suministrado como soluciones de dosificación en NaCl 154 mM, 0,005% de Polisorbato 20, pH 5,3 a 6,1. Las concentraciones nominales de las soluciones de dosificación suministradas fueron 0, 3, 30 o 150 mg/ml. El artículo de prueba se almacenó en un congelador a -82° a -79°C. Se usó solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2, como agente de lavado después de que se administraron las dosis y después de las recolecciones en serie de LCR. El PBS se obtuvo de Gibco, Invitrogen Corporation.

#### Preparación de la dosificación del artículo de prueba

45 50 El primer día de dosificación para cada intervalo de tiempo, se retiró un vial de cada concentración del congelador a -80°C y se dejó descongelar en la encimera a temperatura ambiente. Una vez descongelados, los viales para los Grupos 1, 2 y 3 se marcaron, se pesaron y se extrajo 1 ml a través de un filtro de 0,22 µm para cada animal programado para la dosificación. Después de administrar todas las dosis, los viales se volvieron a pesar y se colocaron en el refrigerador.

55 60 Al día siguiente (día de dosificación para Animal 003, Grupo 4 y Grupo 5), las soluciones de dosificación para los Grupos 1 y 4 se retiraron del refrigerador y se colocaron en la encimera para alcanzar la temperatura ambiente. Una vez que se obtuvo la temperatura ambiente, se pesaron los viales para los Grupos 1 y 4, se etiquetó el vial del Grupo 4 y se extrajo 1 ml a través del filtro para cada animal programado para la dosificación en los Grupos 1 y 4. La solución de dosificación para el Grupo 5 fue entonces preparado mediante la inyección de la cantidad adecuada de solución de dosificación del Grupo 4 y el Grupo 1 (vehículo) en un vial de polipropileno estéril. Se registró la cantidad agregada de los Grupos 1 y 4. La solución se mezcló invirtiendo suavemente el vial y se extrajeron dosis de 2-1 ml a través del filtro para los animales en el Grupo 5. Los viales para los Grupos 1 y 4 se volvieron a pesar al finalizar la dosificación y todos los viales (Grupos 1-5) fueron colocados en un congelador.

Catorce animales fueron asignados aleatoriamente a grupos de tratamiento como se describe en la siguiente Tabla.

65 La ruta de administración de IT se seleccionó porque esta es una ruta prevista para la administración humana.

Las dosis de idursulfasa que se seleccionaron para este estudio (3, 30, 100 y 150 mg/ml) se eligieron para evaluar la biodistribución de dosis variables niveles de enzima dentro del sistema nervioso central de los primates no humanos (SNC) después de tres inyecciones mensuales consecutivas de bolo IT lumbar.

## 5 Observaciones clínicas

La incidencia global de signos clínicos fue mínima. Ninguno de los animales del Grupo 1 (control), Grupo 2 (3 mg), Grupo 3 (30 mg) o Grupo 5 (100 mg) tenía signos clínicos que se consideraron relacionados con el artículo de prueba en ningún momento durante el estudio.

10 En el día 1, los tres animales del Grupo 4 (150 mg) (012-014) exhibieron una tendencia mínima a los cuartos traseros dentro de 3-12 minutos después de la dosis, con una duración de 5-15 minutos. Este signo se consideró relacionado con el artículo de prueba y no se observó en ninguno de los grupos de dosis más baja. No hubo otros signos clínicos inmediatamente después de la primera dosis o en los días inmediatamente posteriores a la administración del artículo de prueba. El único otro signo observado para los animales del Grupo 4 fue un episodio único de emesis para el Animal 013 en el día 35.

15 La administración del artículo de prueba como un solo bolo intratecal mensual no se asoció con ningún cambio macroscópico o microscópico adverso al tomar en consideración los cambios inherentes a un dispositivo implantado de administración de medicamentos. Todos los grupos, incluido el grupo control, tuvieron cambios microscópicos en las meninges que indicaron reacciones inflamatorias al sistema de administración de fármacos. En los animales que recibieron dosis del artículo de prueba de 30 mg y más, hubo una tendencia a que la reacción inflamatoria en las meninges tuviera un componente eosinófilo más pronunciado.

20 25 Debido a que las diferencias entre el control y los animales tratados con el artículo de prueba fueron tan leves, el nivel de efecto adverso no observado (NOAEL) se interpretó como 150 mg, la dosis más alta probada en este estudio.

30 35 La reacción inflamatoria global en las meninges en todos los grupos (incluyendo los controles) fue ligeramente más pronunciada de lo que generalmente se encontró en un estudio intratecal de esta duración en monos. Sin embargo, esto se consideró posiblemente relacionado con alguna característica del vehículo o con el acto de dosificación 24 horas antes de la necropsia.

40 45 La tinción idursulfasa cerebro fue positivo en todos los animales tratados, excepto un animal en el grupo de 3 mg, con la intensidad de la tinción más alto encontrado en el grupo de 150 mg (Figuras 16, 17, 18 y 19). En el grupo de 3 mg, solo las células meningeas y unas pocas células gliales debajo de las meninges fueron positivas; No se detectó idursulfasa inyectada en las neuronas. En los grupos de dosis más altas (30, 100 y 150 mg), grandes poblaciones de neuronas cerebrales fueron muy positivas para la tinción con idursulfasa , junto con células meningeas, células gliales y células perivasculares. La inmunotinción con idursulfasa reveló una amplia distribución de idursulfasa inyectada en las neuronas cerebrales desde las neuronas dentro de la capa I en la superficie cerca de las meninges, hasta las dentro de la capa VI más profunda adyacente a la sustancia blanca (Figuras 20, 21 y 22). También se observó una marcada tinción de las neuronas para el grupo de dosis de 150 mg (Figura 23). En todos los animales (grupo de dosis de 30-150 mg), no se encontró una diferencia marcada en la tinción neuronal de idursulfasa entre las secciones frontal, media y posterior del cerebro.

50 55 La tinción con idursulfasa fue positiva en las médulas espinales de todos los animales, con la intensidad de tinción más alta en la región lumbar (Figuras 24 y 25). La inmunotinción con idursulfasa también fue dependiente de la dosis. Las neuronas, células meningeas, células gliales, células perivasculares y epi/peri/endoneurium (células conectivas) que rodean las fibras nerviosas fueron muy positivas para la tinción con idursulfasa en el grupo de 150 mg (Figuras 26 y 27).

60 65 En el hígado, se encontró tinción positiva para idursulfasa en células sinusoidales (células de Kupffer y células endoteliales) de todos los animales. Sin embargo, la idursulfasa no se detectó en los hepatocitos para el grupo de tratamiento de 3 mg (Figura 28), mientras que la tinción con idursulfasa positiva en los hepatocitos se encontró en los grupos de dosis más altas, con la mayor intensidad de tinción en el grupo de tratamiento de 150 mg (Figura 29, 30 y 31).

No hubo tinción positiva para idursulfasa en animales del grupo de tratamiento de 3 mg (Figura 22). Por el contrario, las células intersticiales se tiñeron positivamente para idursulfasa en los grupos de 30, 100 y 150 mg, observándose una marcada tinción en el grupo de 150 mg, en términos de número de células positivas e intensidad de tinción (Figuras 33, 34 y 35).

## Riñón

65 Se detectó poca o ninguna idursulfasa inyectada en animales del grupo de dosis de 3 mg (Figura 36). Sin

embargo, se encontró tinción positiva con idursulfasa en las células glomerulares y las células intersticiales en los grupos de 30 y 100 mg (Figuras 37 y 38). En el grupo de 150 mg, la inmunotinción con idursulfasa reveló además la tinción con idursulfasa de células tubulares proximales, junto con una marcada tinción de células glomerulares e intersticiales (Figura 39).

5

## DISCUSIÓN

No hubo signos o efectos clínicos relacionados con el artículo de prueba sobre el peso corporal, el consumo de alimentos, los hallazgos del examen físico y los hallazgos del examen neurológico. En el día 1, los animales del Grupo 4 (150 mg) exhibieron una mínima tendencia a los cuartos traseros dentro de los 3-12 minutos posteriores a la administración, con una duración de 5 a 15 minutos; Se consideró que este signo estaba relacionado con el artículo de prueba.

La administración de idursulfasa se asoció con aumentos dependientes de la dosis en la actividad de idursulfasa en varias regiones del cerebro, así como el tronco encefálico y la médula espinal. El nivel más alto de intensidad de tinción en la médula espinal fue en la región lumbar, donde se produjo la administración IT de idursulfasa. La administración de idursulfasa por IT también dio como resultado una exposición sistémica con intensidad de tinción dependiente de la dosis en el hígado, los riñones y el corazón. Los animales que recibieron dosis del artículo de prueba a 30 mg y más tuvieron una tendencia a que la reacción inflamatoria en las meninges tuviera un componente eosinófilo más pronunciado, pero esta diferencia no se consideró biológicamente significativa.

La administración IT de idursulfasa a dosis de hasta 150 mg a intervalos mensuales no tuvo efectos adversos. Por lo tanto, el nivel de efectos adversos no observados (NOAEL) se interpretó como 150 mg, la dosis más alta probada en este Ejemplo. La administración de idursulfasa se asoció con aumentos dependientes de la dosis en la actividad de idursulfasa en el SNC y dio como resultado niveles sistémicos en el hígado, los riñones y el corazón.

## EJEMPLO 3: PK (suero y LCR) de IT administrado con I2S

Este ejemplo proporciona análisis de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) asociado con un estudio de toxicidad de 6 meses de idursulfasa administrada a través de inyecciones mensuales intravenosas de bolo lumbar e inyecciones intravenosas de bolo semanales en monos *Cynomolgus* para la concentración del artículo de prueba (TA).

### DISEÑO EXPERIMENTAL

El objetivo de este estudio fue evaluar la administración intratecal (IT) de dosis repetidas de idursulfasa (12s) desde una perspectiva de toxicología y farmacología de seguridad durante un período de seis meses. El diseño del estudio se muestra en la Tabla 8.

**TABLA 8: DISEÑO DEL ESTUDIO**

Grupo Nº	Nº de animales	Dosis IV (mg/kg)	Nº de dosis IV	Dosis IT (mg)	Nº de dosis de TI
45	1	6	DC (solución salina)	23	DC (PBS)
	2	12	0 (vehículo IV)	23	0 (vehículo IT)
	3	12	0,5	23	3
	4	6	0,5	23	30
	5	12	0,5	23	100

DC = Control del dispositivo: Animales en el grupo 1 no dosificados con vehículo o artículo de prueba.

### Artículo de prueba

Identificación: Dosificación de idursulfasa IV - (2,0 mg/mL)  
Dosificación de IT –

60

idursulfasa (0 mg/mL)  
idursulfasa (3 mg/mL)  
idursulfasa (30 mg/ml)  
idursulfasa (100 mg/ml)

65

**Ensayo Métodos:**

Los análisis se realizaron usando un ELISA (Ensayo de Inmunoabsorbente Enzimado) para determinar la concentración de idursulfasa. El límite de detección (LOD) = 1,25 ng/ml antes de multiplicar por factor de dilución. Muestras w se seleccionaron a una dilución 1:50, por lo tanto, la sensibilidad del ensayo es 62,5 ng/mL. Las muestras que caen más allá del extremo superior de la curva de calibración se diluyeron y se volvieron a analizar a una dilución apropiada que dio como resultado un valor dentro del rango de la curva. Las muestras seleccionadas se analizaron adicionalmente usando un ensayo de actividad enzimática. La LOD para este ensayo es de 0,18 mU/ml a una dilución mínima de la muestra de 1:150.

- 5            Los animales en los grupos 1 y 2 que fueron dosificados con solución salina o vehículo, respectivamente, tenían niveles de idursulfasa sérica que oscilaban entre 138 ng/ml y <62,5 ng/ml (o <LOD) durante todo el período de dosificación IV e IT. De 200 muestras de LCR analizadas en animales del Grupo 1 y 2, 62 demostraron niveles de I2S 10          por encima del LOD de ensayo. De estos, 7 valores fueron altos (> 1,000 ng/mL). Otra muestra de LCR recolectada antes de la dosis 3 de IT probó por encima de 1,000 ng/mL de I2S.
- 15          Las muestras se analizaron luego para determinar la actividad de idursulfasa. En cada caso, los resultados de la actividad indicaron la presencia de I2S y cuando se calculó la concentración aproximada de I2S en función de los niveles de actividad, los resultados estuvieron dentro del 20% de los obtenidos por el ELISA de antígeno. (Ver Tabla 9) También se analizaron muestras de LCR adicionales elegidas al azar con resultados de ELISA de antígeno 20          <LOD usando el ensayo de actividad enzimática para descartar cualquier actividad no específica.

25

**TABLA 9: RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN DE MUESTRAS DE CSF**

Nº Animal	Grupo	Dosis	Nº de dosis	Modo de dosis	Punto de tiempo	Resultado de ELISA (mg/ml)	Resultado de actividad (mU/ml)	Ng/mL calculado en función de la actividad	Calculado como% de medida
003	1	Salina	5	IT	Predosis	1392	4,7	1173	119%
003	1	Salina	6	IT	Predosis	7322	29,9	7469	96%
004	1	Salina	2	IT	2 horas después	17045	62,1	15527	110%
006	1	Salina	6	IT	4 horas después	16435	70,7	17682	93%
006	1	Salina	1	IT	Predosis	1320	5,3	1319	100%
0016	2	Vehículo	1	IT	2 horas después	3070	11	2743	112%
017A	2	Vehículo	mes. 3	IV	4 horas después	2236	8,8	2194	102%
046	5	100 mg/kg	3	IT	Predosis	2086	77	1750	119%

En este estudio, las muestras de suero y LCR se analizaron para determinar la concentración de idursulfasa. Las muestras de suero se recogieron de acuerdo con el siguiente esquema:

Dosis IV: predosis y 2 horas después de las dosis 1 a 10, predosis y 4 horas después de las dosis 11 a 23, y en la necropsia.

Dosis IT: predosis y 2 horas después de las dosis 1 y 2, predosis y 4 horas después de las dosis 3 a 6, y en la necropsia.

Las muestras de LCR se recogieron de acuerdo con el siguiente esquema:

Dosis IV: predosis y 2 horas después de la dosis 1, y 4 horas después de las dosis 3 y 6.

5 Dosis IT: predosis y 2 horas después de las dosis 1 y 2, predosis y 4 horas después de las dosis 3 a través de 6, y en la necropsia.

En general, la idursulfasa sérica se eliminó más rápido que la idursulfasa del LCR.

10 Los niveles séricos de idursulfasa en los animales de los grupos 1 y 2 que se dosificaron con solución salina o vehículo, respectivamente, fueron menores o iguales a 138 ng/ml en todos los puntos de tiempo probados. Algunos animales tenían niveles por debajo del límite de detección del ensayo (LOD).

15 Menos muestras de LCR de los grupos 1 y 2 estaban por encima del LOD del ensayo, con 7 excepciones notables que dieron como resultado niveles altos (> 1,000 ng/mL). Una muestra de LCR recolectada de un animal antes de la dosis 3 de IT, también analizada por encima de 1,000 ng/mL de idursulfasa.

20 Las muestras que dan estos resultados fuera de la tendencia se ensayaron de nuevo y confirmados. Además, estas muestras se analizaron para determinar la actividad de la enzima idursulfasa. Estos resultados de actividad también confirmaron niveles altos de idursulfasa dentro del 20% de los obtenidos por el ensayo de masa de idursulfasa (Tabla 9).

25 La especificidad del ensayo de actividad se validó dentro de esta cohorte de muestra probando aleatoriamente muestras de LCR con unidades de masa de idursulfasa por debajo de LOD y confirmó que los niveles de idursulfasa en estas muestras eran de hecho LOD (datos no mostrados).

#### **EJEMPLO 4: FORMULACIÓN**

30 Este ejemplo resume los estudios de desarrollo farmacéutico realizados para establecer las formulaciones de la sustancia farmacológica Idursulfase-IT y el producto farmacológico para ensayos clínicos de fase I/II.

Debido a la limitación de los excipientes adecuados para el suministro del SNC, el esfuerzo para el desarrollo de la formulación para el suministro intratecal de idursulfasa se centró en reducir el nivel de fosfato y polisorbato 20 mientras se mantenía la estabilidad equivalente a la formulación de I2S para el suministro sistémico.

35 Se realizaron tres estudios de detección de estrés clave para examinar el efecto del nivel de fosfato y polisorbato. Estos incluyen congelación, descongelación, agitación y tensiones térmicas. Los resultados demostraron que la formulación salina es más estable contra el estrés de congelación y descongelación a baja concentración de proteína (2 mg/ml). A altas concentraciones de proteína (100 mg/ml), el estrés de congelación-descongelación no causó problemas de inestabilidad tanto para las formulaciones que contenían solución salina como fosfato. El estudio del estrés por agitación confirmó que el 0,005% de polisorbato 20 protegió a la proteína contra el estrés relacionado con la agitación. Los estudios de estabilidad térmica demostraron que la formulación salina era más estable en comparación con las formulaciones que contienen fosfato. Además, el pH de la formulación salina se puede mantener a 6,0 durante 24 meses a 2-8°C. Se encontró que la cantidad de fosfato residual asociado con la proteína, así como el aumento de la concentración de proteína, contribuyen a la estabilidad del pH en la formulación final.

#### **Métodos**

##### **Efecto del estrés de congelación/descongelación sobre la estabilidad de la idursulfasa en formulaciones de solución salina y fosfato**

50 Para examinar el efecto de congelación/descongelación sobre la estabilidad de la idursulfasa en diferentes formulaciones, el conjunto de SEC viral se intercambió/concentró usando un Centricon Plus cuatro veces en NaCl 150 mM o NaCl 137 mM con fosfato de sodio 20 mM (ambos a pH 6,0). Las concentraciones de proteína se dirigieron a 2 mg/ml y 100 mg/ml. Todas las soluciones se filtraron a través de un filtro PVDF de 0,22 micras. Las soluciones se dividieron en partes alícuotas a 1 ml cada una en viales de vidrio de borosilicato de 2 ml. Los viales se colocaron en el estante medio de una cámara de liofilizador y se rodearon con viales de placebo. Las muestras se congelaron en un ciclo programado de congelación/descongelación (mantenidas durante 1 hora a 20°C y congeladas a -50°C a 1°C/min.) Luego, se descongelaron en dos pasos a una velocidad de 0,03°C/min. de -50°C a -25°C, se mantuvo durante 24 horas a -25°C y se dejó descongelar a 2-8°C). Después de dos o tres ciclos de congelación/descongelación, las muestras se analizaron mediante ensayos de apariencia y SEC-HPLC.

##### **Efecto de la tensión de agitación/cizallamiento sobre la idursulfasa en soluciones de fosfato y salinas**

65 Se realizaron estudios de agitación sobre la idursulfasa a diferentes concentraciones de proteínas. Las

5 concentraciones de proteína se probaron a 2 mg/ml, 8 mg/ml y 90-100 mg/ml en presencia de NaCl 137 mM en fosfato 20 mM (pH 6.0) y NaCl 154 mM (pH 6.0) solo. Para ver si se necesitaba polisorbato, se añadieron varias cantidades de PS-20 a la condición de prueba. Las soluciones se dividieron en partes alícuotas a 1,2 ml cada una en viales de vidrio de 2 ml y luego se agitaron en un agitador orbital a 250 rpm en condiciones ambientales durante 24 horas. Al inicio del estudio y a las 24 horas, se examinó la apariencia y se tomaron muestras de alícuotas de 0,1 ml en congelados a menos de  $\leq -65^{\circ}\text{C}$  en tubos de polipropileno de 0,5 ml hasta el análisis por SEC-HPLC.

10 Para confirmar primero el efecto del nivel de polisorbato 20, se realizó un estudio de envío simulado utilizando un envío de material en camión de 3 horas seguido de una prueba de aire de 1 hora en el Nivel de Aseguramiento 1 usando opciones de prueba aleatorias (realizado por Lansmont (Lansing, MI)). Las muestras fueron analizadas para la apariencia de partículas y agregados solubles por SEC-HPLC.

15 Para examinar el efecto del estrés de agitación sobre la estabilidad, se rellenó una formulación salina (50 mg/ml, NaCl 154 mM y PS-20 al 0,005%) a 1,3 ml en un vial de vidrio tipo I de 3 ml y se tapó con un Tapón de 13 mm, que contenía una barra de agitación magnética recubierta de teflón (8 mm de longitud y 2 mm de diámetro). Los viales se colocaron en una placa de agitación establecida en la configuración de velocidad 6 (la elección de la configuración 6 fue la velocidad máxima sin causar espuma excesiva). La apariencia se determinó a las 0, 2, 24, 48 y 72 horas. La línea de base y las muestras agitadas de 72 horas se probaron con métodos SEC-HPLC.

## 20 Estudios de estabilidad térmica para formulaciones de plomo

25 Se compararon seis formulaciones de plomo para la estabilidad térmica. Estas formulaciones fueron elegidas en base a dos parámetros. El primer parámetro fue que la concentración de proteína debía estar dentro de los rangos terapéuticos para el suministro del SNC. El segundo parámetro fue controlar el efecto de la concentración de fosfato en la estabilidad. El conjunto de SEC viral filtrado se intercambió y se concentró utilizando el Centricon Plus-80. Se lograron concentraciones objetivo de 50 y 100 mg/ml de proteínas. Las seis formulaciones se añadieron con una solución de polisorbato 20 al 1% para una concentración final de 0,01% de PS-20. El material se filtró a través de un filtro de PVDF de 0,22 micras y se añadieron 0,5 ml a viales de borosilicato de vidrio de 2 ml. Estos viales se colocaron en estabilidad estresada ( $40^{\circ}\text{C}$ ), estabilidad acelerada ( $25^{\circ}\text{C}$ ) y almacenamiento en tiempo real ( $2\text{-}8^{\circ}\text{C}$ ) en una posición invertida. Las muestras de estabilidad en cada punto de tiempo se analizaron mediante SEC-HPLC, OD320, SAX-HPLC, SDS-PAGE (Commassie), pH y actividad.

### Comprensión del control del pH en la formulación salina

35 Para comprender cómo se mantuvo el pH en la formulación salina, se realizaron los siguientes estudios.

#### Prueba del residuo de fosfato en formulaciones salinas

40 El conjunto de SEC viral filtrado (idursulfasa 2 mg/ml, NaCl 137 mM, fosfato sódico 20 mM, pH 6.0) se concentró y se diafiltró en NaCl 150 mM usando el sistema Millipore TFF y un filtro Millipore Pellicon Biomax 30 de 50 cm<sup>2</sup>. Las muestras debían determinar la cantidad de fosfato asociada con la proteína después de 7X, 10X y 15X ciclos de diafiltración en solución salina al 0,9% (preparada en TK3). Además, también se analizaron el permeado después de la diafiltración 10X (flujo que no contiene proteínas a través de la filtración) y la solución salina utilizada en la etapa de filtración.

#### 45 Determinación del efecto de la concentración de proteínas sobre el pH

50 Para comprender mejor el control del pH sin la presencia de un tampón (fosfato), se realizaron estudios de efectos proteicos. Para determinar la contribución de la proteína al pH, el material se diluyó en NaCl 154 mM (solución salina) a 30 mg/ml, 10 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml y solución salina sola. El material se dividió en partes alícuotas en tubos de polipropileno de 2 ml con un volumen de llenado de 1 ml por tubo. Las muestras se congelaron a  $\leq -65^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora, se descongelaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y el ciclo se repitió tres veces. Se midió el pH inicial y se comparó después de 3 ciclos de congelación/descongelación. El pH también se midió después de 24 horas de exposición ambiental (al abrir las tapas de los tubos) de las muestras para determinar el efecto que la concentración de proteína puede tener sobre el cambio de pH.

55 Debido a la limitación de los excipientes adecuados para el suministro del SNC, el esfuerzo para el desarrollo de la formulación para el suministro intratecal de idursulfasa se centró en reducir el nivel de fosfato y polisorbato 20 mientras se mantenía la estabilidad equivalente a I2S formulado para administración sistémica. Se llevaron a cabo tres estudios de detección de estrés clave, que incluyen congelación, descongelación, agitación y estrés térmico.

#### Efecto de congelación/descongelación sobre la idursulfasa en formulaciones de solución salina y fosfato

60 Como se muestra en la Tabla 10, a una baja concentración de proteína de 2 mg/ml, la formulación que contiene fosfato 20 mM generó más agregados después del estrés de congelación-descongelación. La formulación

salina permaneció en el mismo nivel de agregados que la línea base. A altas concentraciones de proteína (100 mg/ml), el estrés de congelación-descongelación no pareció tener efecto sobre la estabilidad en ninguna de las formulaciones (Tabla 11). Los datos indicaron que la formulación de solución salina sola tiene mejor estabilidad contra el estrés por congelación y descongelación.

5

**TABLA 10: AGREGACIÓN SOLUBLE EN CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA BAJA**

	2 mg/ml en fosfato 20 mM, pH 6,0 *% HMW especies	2 mg/ml en solución salina, pH 6,0% HMW especies
Línea de base	0,02%	0,05%
Postcongelación	1,7%	0,04%

10

**TABLA 11: PERFIL DE LA SEC PARA DETERMINAR LA AGREGACIÓN SOLUBLE EN LA CONCENTRACIÓN DE ALTA PROTEÍNA**

15

	100 mg/ml en fosfato 20 mM, pH 6,0 *	100 mg/ml en solución salina, pH 6,0
Línea de base	0,05%	0,06%
Postcongelación	0,04%	0,07%

\* La cantidad de NaCl se ajustó a 137 mM donde la formulación contenía fosfato 20 mM para mantener una tonicidad comparable.

20

25

**Efecto de sacudir estrés en idursulfasa en solución**

30

Los estudios se realizaron con agitación a tres niveles de concentración de proteína de 2, 8, y 100 mg/mL. Los datos demostraron que sin el polisorbato 20, se produjeron precipitados a toda la concentración de proteína y también se observó un alto nivel de agregados solubles a 2 mg/ml (Tabla 12 a la Tabla 14). Sin embargo, en presencia de un nivel muy bajo de P20, como 0,005%, los precipitados y los agregados solubles se evitaron principalmente. Los datos indicaron que se requiere un bajo nivel de polisorbato para proteger la proteína contra el estrés por agitación.

35

**TABLAS 12-14: ESTUDIO DE AGITACIÓN EN UN MODELO DE LABORATORIO (ROTACIÓN A 250 RPM POR 24 HORAS EN EL AMBIENTE)**

40

**Tabla 12: ~ 2 mg/ml en NaCl 137 mM y fosfato 20 mM a pH 6**

45

Concentración P20	Apariencia	SEC (% monómero)
0%	Partículas similares a proteínas observadas	95,2%
0,0005%	Partículas similares a proteínas observadas	99,4%
0,001%	Partículas similares a proteínas observadas	99,4%
0,0025%	Partículas de polvo observadas	99,7%
0,005%	Partículas de polvo observadas	99,7%
0,01%	Partículas de polvo observadas	99,8%

50

**Tabla 13: ~ 8 mg/ml en NaCl 137 mM y fosfato 20 mM a pH 6**

55

Muestra	Apariencia	SEC (% monómero)
Sin PS-20 (agitado)	Partículas similares a proteínas observadas	99,3%
0,005%	No se observaron partículas,	99,7%

60

**Tabla 14: 90-100mg/ml en formulación salina**

Concentración P-20	Apariencia	SEC (%) monómero)
Sin PS-20	Se observaron grandes partículas similares a proteínas.	100.%
0,005%	Algunas partículas observadas	99,8
0,01%	Sin partículas	99,9

\* La muestra de control (sin agitar) tenía 99,8% de monómero.

Para confirmar aún más si el 0,005% es suficiente para la estabilidad contra el temblor, se realizó un estudio de envío simulado, que estaba cerca de la condición de envío real. realizado en la formulación salina a 100 mg/ml de proteína con diferente nivel de polisorbato 20. Los resultados confirmaron que 0,005% era suficiente (Tabla 15).

**TABLA 15: EFECTO DEL POLISORBATO 20 EN LA APARIENCIA Y AGREGADOS SOLUBLES DE 100 MG/ML EN SALINA DESPUÉS DE UN ESTUDIO DE ENVÍO SIMULADO**

Polisorbato 20	Apariencia	SEC (% monómero)
0 (control) Sin estrés de envío	Sin partículas	99,8%
0	<10 partículas pequeñas observadas	99,9%
0,005%	Sin partículas	99,8%
0,01%	Sin partículas	99,8%

El efecto de la agitación usando una barra de agitación magnética en la estabilidad de la formulación de solución salina que contiene 50 mg/ml Idursulfasa con 0,005% de polisorbato 20 se resume en Tabla 16. Como se muestra, la proteína no es susceptible a la tensión causada por agitación usando una barra de agitación magnética durante 72 horas. Los resultados confirmaron que 0,005% también era suficiente contra el estrés por agitación.

**TABLA 16: EFECTO DEL POLISORBATO 20 EN LA ESTABILIDAD DE IDURSULFASA DE 53 MG/ML SOBRE LA AGRESIÓN AGRESIVA**

Apariencia					SEC-HPLC,% de monómero	
Base	2 horas	24 horas	48 horas	72 horas	Línea de base	72 horas
sin ppt	sin ppt	sin ppt	sin ppt	sin ppt	99,96%	99,94%

#### Estabilidad térmica para los candidatos principales

Se examinaron seis formulaciones clave durante 24 meses para pruebas de estabilidad. Los resultados de estas pruebas se discuten en esta sección.

#### Apariencia

La apariencia de todas las formulaciones permaneció ligeramente opalescente y esencialmente libre de partículas bajo todas las temperaturas y puntos de tiempo probados para las seis formulaciones.

#### OD320

Para examinar los posibles aumentos en la turbidez, los valores de OD320 se determinaron y resumieron en la Tabla 17. Como se muestra, en el almacenamiento congelado, los valores de OD320 para todas las formulaciones permanecieron iguales a los valores de referencia después de 24 meses de almacenamiento. En condiciones de 2-8°C, las formulaciones de solución salina se mantuvieron igual que la línea de base después de 24 meses, pero las formulaciones que contienen fosfato tuvieron un mayor nivel en los valores de OD320. En la condición acelerada de 25°C, las formulaciones salinas también tuvieron un ligero aumento en OD320 después de 3-6 meses, pero las formulaciones que contienen fosfato mostraron un aumento más significativo. Estos resultados sugieren que la formulación salina es más estable contra el estrés térmico.

**TABLA 17: COMPARACIÓN DE OD320 PARA FORMULACIONES DE SALINA Y FOSFATO \***

5	50mg/ml, NaCl 154mM, pH 6,0	100 mg/ml, NaCl 154 mM, pH 6,0	50 mg/ml, NaCl 150 mM, NaPO4 5 mM, pH 6,5	100 mg/ml, NaCl 150 mM, NaPO4 5 mM, pH 6,5	100 mg/ml, 137 NaCl, NaPO420 mM, pH 6,0	100 mg/ml, 137 NaCl, NaPO420 mM, pH 6,5	
10	≤ -65°C						
	Línea de base	0,026	0,043	0,025	0,042	0,042	0,044
15	16 meses	0,027	0,043	0,029	0,045	0,045	0,046
	24 meses	0,023	0,046	0,024	0,068	0,045	0,046
	25°C						
	3 meses	0,043	0,076	0,065	0,116	0,124	0,137
	6 meses	0,040	0,077	0,064	0,110	0,122	0,138
20	2-8°C						
	3 meses	0,028	0,047	0,034	0,053	0,071	0,072
	6 meses	0,028	0,049	0,040	0,067	0,086	0,090
	16 meses	0,027	0,051	0,049	0,089	0,102	0,111
25	24 meses	0,033	n/A	0,056	0,099	0,110	0,113

\* Todos contienen 0,01% de polisorbato 20

### SEC-HPLC

El resumen de datos de todas las formulaciones probadas por SEC-HPLC se enumera en la Tabla. En las condiciones de almacenamiento congelado, no hubo cambios después de 24 meses en comparación con la línea de base.

En la condición estresada de 40°C, después de dos semanas todas las formulaciones habían aumentado los niveles de agregados solubles. Además, las formulaciones que contienen fosfato también mostraron un pico de "12 minutos". Sin embargo, después de 1 mes, los picos de "12 minutos pico" observados en la formulación que contiene fosfato parecían desaparecer. Además, el nivel de agregado soluble no aumentó aún más para todas las formulaciones en comparación con el punto de tiempo de 2 semanas (Figura 8 y Tabla 18).

En la condición acelerada de 25°C, en comparación con la línea de base, para todas las formulaciones, el nivel aumentado de agregados solubles fue mínimo después de 6 meses. Sin embargo, todas las formulaciones que contienen fosfato mostraron el pico "12 min" (Figura 9 y Tabla 18).

En el estado de almacenamiento a largo plazo de 2-8°C, después de 24 meses, el aumento de los agregados solubles para toda la formulación también fue mínimo después de 24 meses de almacenamiento. De acuerdo con todas las condiciones, las formulaciones que contienen fosfato también tuvieron el "pico de 12 minutos", que aumentó ligeramente con el tiempo (Figura 10 y Tabla 18 Tabla). Estos resultados indican que las formulaciones salinas tuvieron los menores cambios en comparación con las formulaciones que contienen fosfato En todas las condiciones de almacenamiento.

**TABLA 18: COMPARACIÓN DE LA AGREGACIÓN POR SEC-HPLC EN FORMULACIONES DE SALINA Y FOSFATO \***

55	100 mg/ml, NaCl 154 mM, pH 6,0	50 mg/ml, NaCl 4 mm, NaPO4 5 mM, pH 6,5	100 mg/ml, 150 mM NaCl, 5 mM NaPO4, pH 6.5	100 mg/ml, 137 NaCl, 20 mM NaPO4, pH 6,0	100 mg/ml, 137 NaCl, 20 mM NaPO4, pH 6.5	100 mg/ml, NaCl 154 mM, pH 6,0	
60	≤-65°C						
	Línea de base	99,9	99,9	99,9	99,8	99,9	99,9

(continuado)

5		50mg/ml, NaCl 154mM, pH 6,0	100 mg/ml, NaCl 154 mM, pH 6,0	50 mg/ml, NaCl 4 mm, NaPO <sub>4</sub> 5 mM, pH 6,5	100 mg/ml, 150 mM NaCl, 5 mM NaPO <sub>4</sub> , pH 6,5	100 mg/ml, 137 NaCl, 20 mM NaPO <sub>4</sub> , pH 6,0	100 mg/ml, 137 NaCl, 20 mM NaPO <sub>4</sub> , pH 6,5
10	$\leq 65^{\circ}\text{C}$						
	6 meses	99,9	99,9	99,8	99,8 (0,03) <sup>a</sup>	99,8	99,8
	16 meses	99,9	99,8	99,9	99,8	99,8	99,9
15	24 meses	99,8	99,8	99,8	99,9 (0,21) <sup>a</sup>	99,8	99,8
	$40^{\circ}\text{C}$						
	2 semanas	97,9	97,8	97,9 (0,23) <sup>a</sup>	97,8 (0,20) <sup>a</sup>	97,4 (0,34) <sup>a</sup>	97,5 (0,16) <sup>a</sup>
20	1 mes	97,2	97,3	97,6	97,5	97,7	97,3
	$25^{\circ}\text{C}$						
	3 meses	99,4	99,3	99,5 (0,22) <sup>a</sup>	99,4 (0,25) <sup>a</sup>	99,4 (0,30) <sup>a</sup>	99,6 (0,04) <sup>a</sup>
25	6 meses	99,1	98,9	99,4 (0,25) <sup>a</sup>	99,2 (0,27)	99,2 (0,24) <sup>a</sup>	99,6 (0,02) <sup>a</sup>
	$2\text{-}8^{\circ}\text{C}$						
	3 meses	99,8	99,7	99,9	99,7 (0,11) <sup>a</sup>	99,7 (0,11) <sup>a</sup>	99,7 (0,02) <sup>a</sup>
30	6 meses	99,9	99,8	99,7 (0,06) <sup>a</sup>	99,7 (0,06) <sup>a</sup>	99,8 (0,09)	99,8
	16 meses	99,8	99,7	99,5 (0,46) <sup>a</sup>	99,4 (0,50) <sup>a</sup>	99,5 (0,42) <sup>a</sup>	99,8 (0,04) <sup>a</sup>
35	24 meses	99,7	n/A	99,4 (0,50) <sup>a</sup>	99,4 (0,50) <sup>a</sup>	99,3 (0,54) <sup>a</sup>	99,6 (0,25) <sup>a</sup>
	* Todas las formulaciones contienen 0,01% de polisorbato 20						
	<sup>a</sup> : Los valores representados son especies de alto peso molecular que eluyen ~ 12 minutos en el método actual de SEC HPLC, a menudo denominado "pico de 12 minutos". Se cree que este pico está fuertemente asociado con la presencia de fosfato en la formulación.						

#### SAX-HPLC

El resumen de datos para SAX-HPLC se enumera en la Tabla 19. En las condiciones estresadas/acerleradas, las formulaciones salinas aparecieron ligeramente más cambios (Figuras 11 y 12) pero en las condiciones de almacenamiento a largo plazo, no hubo cambios para todas las formulaciones después de 24 meses (Tabla 19 y Figura 13). Esto indica que las formulaciones salinas son estables durante 24 meses a  $2\text{-}8^{\circ}\text{C}$ .

**TABLA 19: COMPARACIÓN DE CAMBIOS EN LA CARGA POR EL MÉTODO SAX-HPLC PARA FORMULACIONES DE SALINA Y FOSFATO (TODAS CON 0,01% DE POLISORBATO-20) DURANTE 24 MESES**

	50mg/ml, NaCl 154mM, pH 6,0	100 mg/ml, NaCl 154 mM, pH 6,0	50 mg/ml, NaCl 150 mM, NaPO <sub>4</sub> 5 mM, pH 6,5	100 mg/ml, NaCl 150 mM, NaPO <sub>4</sub> 5 mM, pH 6,5	100 mg/ml, 137 NaCl, 20 mM NaPO <sub>4</sub> , pH 6,0	100 mg/ml, 137 NaCl, 20 mM NaPO <sub>4</sub> , pH 6,5	
55	Línea de base	A + B = 51; E + F = 18	A + B = 51; E + F = 18	A + B = 52; E + F = 18	A + B = 50; E + F = 18	A + B = 51; E + F = 17	A + B = 52; E + F = 18

(Continuación)

		40°C					
5	2 semanas	A + B = 51; E + F = 16	A + B = 52; E + F = 16	A + B = 51; E + F = 17	A + B = 51; E + F = 17	A + B = 51; E + F = 17	A + B = 49; E + F = 17
10	1 mes	A + B = 50; E + F = 17	A + B = 50; E + F = 17	A + B = 50; E + F = 17	A + B = 50; E + F = 17	A + B = 50; E + F = 17	A + B = 50; E + F = 17
15	25°C						
	3 meses	A + B = 48; E + F = 18	A + B = 48; E + F = 18	A + B = 48; E + F = 18	A + B = 47; E + F = 18	A + B = 47; E + F = 18	A + B = 47; E + F = 18
	6 meses	A + B = 45; E + F = 18	A + B = 45; E + F = 18	A + B = 44; E + F = 18	A + B = 45; E + F = 18	A + B = 45; E + F = 18	A + B = 44; E + F = 18
20	2-8°C						
	3 meses	A + B = 47; E + F = 18	A + B = 47; E + F = 18	A + B = 47; E + F = 18	A + B = 47; E + F = 18	A + B = 46; E + F = 18	A + B = 47; E + F = 18
25	6 meses	A + B = 44; E + F = 18	A + B = 44; E + F = 19	A + B = 44; E + F = 18	A + B = 44; E + F = 18	A + B = 45; E + F = 19	A + B = 44; E + F = 19
	16 meses	A + B = 51; E + F = 18	A + B = 50; E + F = 18	A + B = 51; E + F = 19	A + B = 51; E + F = 18	A + B = 49; E + F = 19	A + B = 50; E + F = 18
30	24 meses	A + B = 52; E + F = 18	A + B = 52; E + F = 18	A + B = 52; E + F = 18	A + B = 52; E + F = 18	A + B = 52; E + F = 17	A + B = 51; E + F = 18

**pH**

La Tabla 20 demuestra que el pH de todas las formulaciones permaneció comparable a la línea base durante 24 meses a 2-8°C. Para las formulaciones salinas, aunque no había tampón, el pH se mantuvo constante a 6,0 durante 24 meses.

**40 TABLA 20: COMPARACIÓN DEL PH PARA FORMULACIONES DE SALINA Y FOSFATO (TODAS CON 0,01% DE POLISORBATO-20) MÁS DE 24 MESES A 2-8°C**

		50mg/ml, NaCl 154mM, pH 6,0	100 mg/ml, 154 mM NaCl, pH 6,0	50 mg/ml, NaCl 150 mM, NaPO <sub>4</sub> 5 mM, pH 6,5	100 mg/ml, NaCl 150 mM, NaPO <sub>4</sub> 5 mM, pH 6,5	100 mg/ml, 137 NaCl, 20 mM NaPO <sub>4</sub> , pH 6,0
45	Línea de base	6,03	6,00	6,43	6,41	5,96
50	24 meses	6,06	n/A	6,42	6,44	6,01
						6,53

**Actividad enzimática**

55 En comparación con el estándar de referencia, la actividad específica para todas las formulaciones después de 24 meses a 2-8°C fue equivalente dentro de la variación del ensayo, lo que sugiere que la idursulfasa permaneció estable en la formulación salina durante 24 meses (Tabla 21).

**TABLA 21: RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO DE IONES DESPUÉS DE 24 MESES DE ESTABILIDAD EN TIEMPO REAL (2-8°C) EN FORMULACIONES DE SALINA Y FOSFATO**

5	10	100 mg/ml, NaCl 150 mM, pH 6,0	50 mg/ml, NaCl 150 mM, NaPO <sub>4</sub> 5 mM, pH 6,5	100 mg/ml, NaCl 150 mM, NaPO <sub>4</sub> 5 mM, pH 6,5	100 mg/ml, 137 NaCl, NaPO <sub>4</sub> 20 mM, pH 6,0	100 mg/ml, 137 NaCl, 20 mM NaPO <sub>4</sub> , pH 6,5
15	Actividad específica (U/mg)	43	n/A	42	51	49
* La actividad específica del estándar de referencia fue de 56 U/mg durante la prueba de muestras de 24 meses.						

#### 20 Detección de fosfato residual asociado con la proteína

El paso final UF/DF en la preparación de la formulación salina se usó para diafiltrar la solución de proteína a partir de NaCl 137 mM, Fosfato de sodio 20 mM en NaCl 150 mM. Para examinar cómo el número del ciclo de diafiltración afecta la concentración residual de fosfato en el producto final, se realizó un estudio a escala de laboratorio utilizando la sustancia farmacológica (idursulfasa de 2 mg/ml, NaCl 137 mM, fosfato de sodio 20 mM, pH 6,0). La sustancia del fármaco se concentró primero a 50 mg/ml de idursulfasa y luego se filtró por filtración en solución salina 150 mM. Se tomaron muestras en el paso de diafiltración 7x, 10x y 15x y se analizaron por ICP para determinar el contenido de fosfato. Los resultados de la prueba se resumen en la Tabla 22. Como se muestra, la solución de diafiltración salina no contiene fosfato. Después de 7 x DF, la proteína contenía aproximadamente 0,22 mM de fosfato, que era superior al valor teórico calculado. Después de 10x DF, el retenido de proteína contenía aproximadamente 0,16 mM de fosfato, mientras que el flujo a través era solo de aproximadamente 0,07 mM de fosfato, lo que indicaba que el fosfato se unía a la proteína. Después de 15x DF, el nivel de fosfato se redujo a aproximadamente 0,07 mM.

35 Los resultados del estudio indican que aproximadamente 0,2 residuo de fosfato mM permaneció en la sustancia de fármaco, que probablemente contribuyó a mantener el pH de 6,0 para la formulación de solución salina.

**TABLA 22: FOSFATO DE SODIO RESTANTE CON LA PROTEÍNA DESPUÉS DE PASOS DE DIAFILTRACIÓN MÚLTIPLES**

Muestra ID	μg/ml (ppm)	mM
Material de partida DP04-002-X	N/A	20
Solución de NaCl 150 mM (tampón DF)	* debajo de LOQ	0
Retenido de proteína después de 7x DF	21	0,22
Retenido de proteína después de 10x DF	15	0,16
Permeado (flujo) después de 10X DF	7	0,07
Retenido de proteína después de 15x DF	7	0,07
DP06-004-X	21	0,22
* Se probó el tampón salino inicial y no se detectó fosfato detectable.		

#### Efecto de concentración de proteínas sobre el mantenimiento del pH de la formulación

A partir del análisis del contenido de fosfato, aparentemente el fosfato se une a la proteína. Por lo tanto, se espera que el alto contenido de proteínas pueda unir más fosfato, lo que podría mantener mejor el pH. Para examinar esa hipótesis, la proteína en la solución salina se concentró a diferentes niveles y pH de las soluciones después de probar diferentes condiciones de procesamiento. Los resultados se resumen en la Tabla 23.

Como se muestra, el pH inicial de las soluciones se mantuvo a aproximadamente 6,0 independientemente de la concentración de proteína. Sin embargo, después de la exposición ambiental durante 24 horas o tres ciclos de congelación y descongelación, el pH de las soluciones que contenían 0,1 mg/ml de proteína o menos no mantuvo un pH constante alrededor de 6,0. El pH de las soluciones a la concentración de proteína superior a 1 mg/ml se mantuvo alrededor de 6,0. Esto confirmó que la concentración de proteína es un factor de control para mantener el pH de las soluciones salinas.

**TABLA 23: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN EL PH DE LAS FORMULACIONES DE SALINA SIN BOMBARDEO**

Concentración de proteínas (mg/ml)	pH inicial	pH después de 24 horas Exposición ambiental	pH después de tres ciclos de congelación y descongelación *
60	6,1	6,1	6,1
30	6,1	6,1	6,1
10	6,1	6,0	6,1
2	6,0	5,9	5,9
1	6,0	5,8	6,0
0,1	5,9	5,6	5,8
0,01	6,0	5,6	5,8
0 (solución salina)	6,1	5,7	5,6

\* Las muestras se almacenaron a  $\delta$ -65°C durante al menos 1 hora y se descongelaron a temperatura ambiente durante 0,5 horas, y este ciclo se repitió tres veces.

Los resultados de este estudio demostraron que la idursulfasa en la formulación salina (50 mg/ml de idursulfasa, polisorbato al 0,005%, NaCl 150 mM, pH 6,0) es estable durante al menos 24 meses cuando se almacena a 2-8°C. Esta formulación parecía ser más estable en comparación con la formulación que contiene fosfato. La selección de 0,005% de polisorbato 20 fue suficiente para proteger la proteína contra el estrés por agitación. Además, el estudio también indicó que el pH de la formulación salina se puede mantener estable a 6,0 durante 24 meses a 2-8°C, en parte debido a la concentración residual de fosfato y alta proteína en la formulación final.

#### EJEMPLO 5. BIODISTRIBUCIÓN

Después de haber demostrado con éxito que la administración intratecal es una forma eficaz de administrar I2S a los tejidos del SNC, se realizaron estudios adicionales para determinar si el I2S administrado por IT es capaz de distribuirse en los tejidos profundos del cerebro y si existe una localización celular de I2S administrado por IT. Se preparó una formulación recombinante de iduronato-2-sulfatasa humana (I2S) y se formuló en un vehículo de NaCl 154 mM, 0,005% de polisorbato 20 a un pH de 6,0.

A los primates no humanos se les administró 3 mg, 30 mg o 100 mg de I2S mensualmente por medio de un puerto intratecal implantado durante seis meses consecutivos. El diseño del estudio se resume en la Tabla 24 a continuación.

**TABLA 24**

Grupo	n	IV Dosis (mg/kg) <sup>a</sup>	IT Dosis (mg) <sup>a</sup>	Último día en estudio (nº de animales)	
				6 meses	Recuperación
1	6	DC (NS)	DC (PBS)	6	-
2	12	0 (vehículo)	0 (IT vehículo)	6	6
3	12	0,5	3	6	6
4	6	0,5	30	6	-
5	12	0,5	100	6	6

<sup>a</sup>Idursulfasa a menos que se especifique lo contrario. DC (control de dispositivo); TI (intratecal); IV (intravenoso); NS (solución salina normal); PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2).

La administración mensual repetida de I2S a primates no humanos durante seis meses fue bien tolerada con la dosis más alta probada y no se asoció con ningún evento toxicológico adverso significativo. Veinticuatro horas después de la administración de la sexta y última dosis de I2S, se sacrificaron los primates no humanos sujetos y se examinaron los tejidos del SNC de dichos primates no humanos.

Según lo determinado por inmunohistoquímica (IHC), hubo un depósito celular generalizado de I2S en todas las células y tejidos del SNC. La IHC detectó la proteína I2S en todos los tejidos del cerebro, con un gradiente de deposición desde la corteza cerebral hasta la sustancia blanca ventricular. En la materia gris, se detectó I2S en las neuronas del cerebro, cerebelo, tronco encefálico y médula espinal de todos los grupos de manera dependiente de la dosis. En la materia gris superficial de los grupos de dosis más altas, un gran número de neuronas cerebrales fueron positivas para la tinción de I2S en la corteza superficial (Figura 40A). También se detectó I2S en neuronas del tálamo

(Figura 40B), hipocampo (Figura 40C), núcleo caudado Figura 40D) y médula espinal (Figura 40E). Las células meningeales y perivasculares también fueron positivas para la tinción con I2S (Figura 40F).

Como se representa en las Figuras 41 y 42, es evidente la distribución de I2S administrado por IT en los tejidos del SNC y, en particular, el depósito en la materia gris, el tálamo y la corteza cerebral del sujeto de primates no humanos. Además, las Figuras 42 y 43 ilustran que el I2S administrado por IT se acumula en los tejidos del SNC representados de los primates no humanos sujetos de una manera dependiente de la dosis. La tinción de localización conjunta también reveló que la administración de IT de I2S se asocia con neuronas y oligodendrocitos. El I2S administrado por IT también distribuye y localiza a través del cerebro de los primates no humanos sujetos como se evidencia en la Figura 44. En particular, la Figura 45 ilustra la captación neuronal y la asociación axonal del I2S después de la administración de IT a los primates no humanos, como lo demuestra la tinción de filamentos. También de particular interés, los presentes estudios ilustran que I2S es selectivo para las células neuronales y tales células neuronales facilitan la distribución de I2S administrado intratecalmente en los tejidos profundos del cerebro y parece estar asociado con estructuras axonales, lo que indica el transporte axonal anterógrado de I2S.

La Tabla 25 a continuación presenta los datos farmacocinéticos de diversas rutas y dosis de administración para un estudio en animales por separado.

TABLA 25

Dosis	AUClast	Peso corporal	Peso del cerebro	Dosis	
unidad	h $\square$ ng/ml	kg	kg	mg/kg de peso corporal	mg/kg de peso Br
0,5 mg/kg	8331	2,7	0,1	0,5	5
1 mg, IT	1933	3,1	0,1	0,32	10
10 mg, IT	31316	2,7	0,1	3,66	100
30 mg, IT	140345	2,9	0,1	10,34	300

Se administró I2S marcado con  $I^{124}$  a animales de prueba como se muestra en la Tabla 26 a continuación y los resultados de la exploración PET se muestran en la Figura 62, Figura 63.

TABLA 26

Grupo	Animales/Grupo	Ruta	Artículo de prueba	Dosis
1	1	ICV	[124I] -idursulfasa	3mg
2	4	IT-L	[124I] -idursulfasa	3mg
3	4	IV	[124I] -idursulfasa	0,1 mg/kg
4	4	IV	[124I] -idursulfasa	1 mg/kg

Los presentes estudios también demostraron la identificación celular de I2S administrado por IT en blanco importa el tejido cerebral cerca de los ventrículos del sujeto primates no humanos después de la administración de IT. Mientras que la densidad de tinción de I2S en la sustancia blanca fue generalmente menor que la materia gris, se detectó I2S dentro de los oligodendrocitos (Figura 46). En particular, la Figura 46 ilustra la identificación celular de I2S en tejidos cerebrales de materia blanca y demuestra además que I2S no parece asociarse con mielina.

Además de demostrar la distribución de I2S administrado por IT profundamente en los tejidos del cerebro, los presentes estudios también confirmaron la localización de I2S en los órganulos objetivo y, de manera importante, la localización de I2S en los lisosomas que son afectados órganulos en el lisosoma trastornos de almacenamiento, como el síndrome de Hunter. En particular, I2S se localizó dentro de los lisosomas y también se detectó dentro de los axones. La figura 46 ilustra la localización de I2S administrado por IT dentro de los lisosomas de oligodendrocitos del primate no humano sujeto, confirmando así que I2S administrado por IT es capaz de distribuirse en los tejidos profundos del cerebro y es capaz de localización celular.

Para discernir si el I2S administrado retuvo la actividad biológica, se midieron los niveles de I2S en el cerebro utilizando un ensayo de actividad específica. La actividad en el cerebro del grupo IT de 3 mg 24 horas después de la última dosis no fue aparentemente diferente de los niveles basales en los animales de control del dispositivo y control del vehículo. La actividad enzimática en el cerebro de 30 mg y 100 mg de animales dosificados con IT fue superior al valor basal en la necropsia (24 horas después de la dosis).

En la Figura 60 se muestran más pruebas en animales para discernir la biodistribución de I2S después del

suministro de IT al cerebro y los números de muestra corresponden a la Tabla 27 a continuación.

**TABLA 27: UBICACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Numero de muestra	Estructura	Numero de muestra	Estructura
1	Corteza cerebral superficial (L)	14	Tálamo (L)
2	Corteza cerebral superficial (R)	15	Tálamo (R)
3	Núcleo caudado (R)	16	Hipotálamo (L)
4	Núcleo caudado (L)	17	Hipotálamo (R)
5	Cuerpo caloso	18	Hipocampo (I)
6	Corteza cerebral (frontal) superficial (L)	19	Hipocampo (R)
7	Corteza cerebral (frontal) superficial (R)	20	Materia blanca profunda (L)
8	Materia blanca superficial (L)	21	Materia blanca superficial (R)
9	Materia blanca superficial (R)	22	Cuerpo caloso
10	Materia blanca profunda (L)	23	Materia blanca profunda (L)
11	Materia blanca profunda (R)	24	Materia blanca profunda (R)
12	Corteza cerebral (temporal) superficial (L)	25	Cerebelo (R)
13	Corteza cerebral (temporal) superficial (R)		

#### **EJEMPLO 6. ENTREGA DE IT VS. ICV**

Los patrones de distribución de I2S observados en el ejemplo anterior también se recapitularon en perros Beagle sanos que recibieron una dosis única de IT o ICV. Los perros Beagle machos fueron asignados al azar usando números generados por computadora en dos grupos (Grupo 1 (ICV), N = 3; Grupo 2 (IT); N = 4). Todos tenían catéteres implantados en el espacio subaracnoidal en la columna lumbar o en el ventrículo cerebral lateral izquierdo (para la dosificación) y en la cisterna magna (para el muestreo). Todos los catéteres terminaron en un puerto de acceso de titanio subcutáneo. Se usó un perro adicional como control quirúrgico no dosificado.

Un único bolo 1 ml de inyección de I2S (30 mg/ml en fosfato de sodio 20 mM, pH 6,0; cloruro de sodio 137 mM; 0,02% de polisorbato-20), se administró IT o ICV, seguido de un 0,3 ml ras con solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH 7,2). Se monitorizaron los signos clínicos y se produjo el sacrificio 24 horas después de la dosis. Se recogieron muestras de tejido de cerebro y médula espinal para análisis cuantitativos de I2S según lo determinado por ELISA, actividad enzimática de I2S e IHC, y se compararon entre los grupos de estudio.

I2S se distribuyó ampliamente por toda la materia gris de los grupos IT e ICV según lo determinado por IHC. En la corteza cerebral, las neuronas fueron positivas para I2S en las seis capas neuronales, desde la capa molecular superficial hasta la capa interna profunda en los grupos IT e ICV, como se ilustra en la Figura. 47 (A y B). En la corteza cerebelosa de los grupos IT e ICV, se detectó I2S en neuronas, incluidas las células de Purkinje, como se ilustra en la Figura 47 (C y D). En los grupos IT e ICV, una gran población de neuronas en el hipocampo fue positiva para I2S, como lo demuestra la Figura 47 (E y F). También se encontraron neuronas positivas para I2S en el núcleo tálamo y caudado en ambos grupos, como se ilustra en la Figura 47 (G y H).

Por lo tanto, los presentes estudios confirman la capacidad de las enzimas administradas por IT para distribuirse en las células y tejidos profundos del cerebro y respaldan la utilidad de las enzimas administradas por IT como I2S para el tratamiento de las manifestaciones del SNC asociadas con enfermedades de almacenamiento lisosomal, como el síndrome de Hunter.

#### **EJEMPLO 7: MODELO DE RATÓN DEFICIENTE DE IDURONATO-2-SULFATASA**

Habiendo demostrado que el I2S administrado por IT es capaz de distribuirse en los tejidos profundos del cerebro y la localización celular del I2S, se realizaron estudios adicionales para determinar la eficacia terapéutica de I2S administrado por IT. Se desarrolló un modelo genéticamente modificado de ratón iduronato-2-sulfatasa (IKO) del síndrome de Hunter para estudiar la capacidad del I2S administrado por IT para alterar la progresión de la enfermedad. El modelo de ratón knock-out I2S se desarrolló utilizando una interrupción dirigida del locus I2S que resulta en una acumulación de glicosaminoglicanos (GAG) en tejidos y órganos. El modelo de ratón IKO exhibe muchas de las características físicas del síndrome de Hunter que se observan en humanos, incluidas las características gruesas características y los defectos esqueléticos. Además, el modelo de ratón IKO demuestra niveles elevados de

glicosaminoglicanos (GAG) en orina y en tejidos de todo el cuerpo, así como una vacuolización celular generalizada que se observó histopatológicamente.

En el presente estudio, I2S (Elaprase®) disponible comercialmente se concentró y se resuspendió en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Seis grupos de ratones IKO machos, de 8-12 semanas de edad, fueron tratados con I2S (10 µl ; 26 mg/ml). Los grupos A y B (N = 3) se administraron por vía intratecal tres dosis de 260 µg (en los días 1, 8 y 15) y dos dosis de 260 µg (en los días 1 y 8) de I2S, respectivamente. El grupo D también se trató con tres dosis de 260 µg administradas por vía intratecal en los días 1, 8 y 15. Los grupos C y E (N = 3) fueron grupos de control no tratados y el grupo F (N = 3) fue un control de tipo salvaje no tratado. A los ratones de control se les administró un vehículo sin I2S. Los ratones se sacrificaron después de 1 hora después de la última inyección, seguido de preparación de tejidos para inmunohistoquímica (IHC) y análisis histopatológico.

Después de la tercera inyección, hubo una reducción generalizada de la vacuolación celular en la corteza cerebral superficial, el núcleo caudado, el tálamo y el cerebelo en los ratones tratados con I2S en comparación con los ratones tratados con vehículo. También se encontraron reducciones en la vacuolación celular en la sustancia blanca después del tratamiento con IT. La distribución de I2S a los tejidos cerebrales del ratón IKO fue evidente después de la administración de IT.

Tres administraciones informáticas semanales de I2S en los ratones IKO también demostraron una marcada reducción en la vacuolación celular del SNC tanto a nivel microscópico ligero como electrónico. Después de la administración IT de I2S, fue evidente una reducción de la vacuolación celular en relación con los ratones IKO no tratados, lo que sugiere que el I2S administrado por IT es capaz de alterar la progresión de la enfermedad. Como se ilustra en la Figura 48, una reducción de la vacuolación celular fue evidente en el cuerpo caloso y el fórnix de los ratones IKO después de la administración IT de I2S. La Figura 49 ilustra una reducción marcada en la presencia de proteína de membrana asociada a lisosomas 1 (LAMP1), un biomarcador patológico de enfermedad lisosómica, en los tejidos de la corteza cerebral superficial del ratón IKO tratado.

Además, la microscopía electrónica demostró una reducción en la presencia de inclusiones de almacenamiento en neuronas en la materia gris y la vacuolación en oligodendrocitos en la sustancia blanca. En particular, el I2S administrado con IT de los ratones IKO también demostró una reducción en los cuerpos laminares empalizados ("cuerpos de cebra") que son característicos de ciertas enfermedades de almacenamiento lisosómico. En particular, la Figura 5 representa una exploración de microscopio electrónico que ilustra una reducción de los cuerpos de cebra característicos en las neuronas del ratón IKO que se administró I2S, en relación con el ratón IKO no tratado. De manera similar, la Figura 5 ilustra una exploración con microscopio electrónico de oligodendrocitos en el cuerpo caloso.

Además, las administraciones IT de I2S a los ratones IKO también demostraron una reducción marcada en la inmunotinción de la proteína 1 de la membrana del biomarcador patológico lisosomal de la enfermedad lisosómica (LAMP1), un indicador de la actividad lisosómica y el estado de la enfermedad, en la corteza cerebral superficial, núcleo caudado, tálamo, cerebelo y sustancia blanca. Como se ilustra en la Figura 49A, es evidente una reducción marcada en la inmunotinción de LAMP1 en el tejido de la corteza cerebral de la superficie del ratón IKO tratado en relación con el tejido de la corteza cerebral de la superficie del ratón control IKO no tratado ilustrado en la Figura 49B, lo que refleja una mejora en la patología de la enfermedad.

La Figura 20 ilustra cuantitativamente y compara la concentración de LAMP1 medida en µm<sup>2</sup> áreas de tejido cerebral. El análisis morfométrico de la inmunotinción de LAMP-1 de varias regiones del cerebro confirmó que hubo reducciones significativas en la tinción positiva de LAMP-1 en todas las áreas del cerebro evaluadas. Como se muestra en la Figura 4, en cada área de tejido cerebral evaluada (la corteza, el núcleo caudado y el putamen (CP), el tálamo (TH), el cerebelo (CBL) y la sustancia blanca (WM)) el área LAMP positiva se redujo en el ratones IKO tratados en relación con los ratones control IKO no tratados, y se acercaron al área positiva para LAMP de los ratones de tipo salvaje. Particularmente notable es que las áreas positivas para LAMP en cada área del tejido cerebral analizado se redujeron aún más con la duración continua del tratamiento.

La reducción de la actividad lisosómica anormalmente alta se correlacionó con mejoras morfológicas dramáticas en todas las áreas del cerebro. Estos resultados confirman que el I2S administrado por IT es capaz de alterar la progresión de las enfermedades de almacenamiento lisosomal, en un modelo de ratón IKO genéticamente modificado, lo que confirma aún más la capacidad de las enzimas administradas por IT como I2S para tratar las manifestaciones del SNC asociadas con enfermedades de almacenamiento lisosomal, como el síndrome de Hunter.

#### 60 EJEMPLO 8: TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DE HUNTER

La administración directa del SNC a través de, por ejemplo, la administración de IT se puede utilizar para tratar eficazmente a los pacientes con enfermedad de Hunter. Este ejemplo ilustra un estudio de aumento de dosis multicéntrico diseñado para evaluar la seguridad de hasta 3 niveles de dosis cada dos semanas (EOW) durante un total de 40 semanas de I2S administrado a través de un dispositivo de administración de fármacos intratecal (IDDD) a

pacientes con enfermedad de Hunter infantil tardía. En las Figuras 45-48 se representan varios dispositivos ejemplares de administración de fármacos intratecales adecuados para el tratamiento humano.

5 Serán inscritos hasta 20 pacientes:

- 5 Cohorte 1: 5 pacientes (Dosis más baja)
- Cohorte 2: 5 pacientes (Intermedio dosis)
- Cohorte 3: 5 pacientes (Dosis más alta)
- 5 pacientes serán aleatorizados a ningún tratamiento.

10 Los pacientes se seleccionan para el estudio basándose en la inclusión de los siguientes criterios: (1) aparición de los primeros síntomas antes de los 30 meses de edad; (2) ambulatorio en el momento del examen (definido como la capacidad de pararse solo y caminar 10 pasos hacia adelante con una mano); (3) presencia de 15 signos neurológicos al momento del examen. Por lo general, se excluyen los pacientes con antecedentes de trasplante de células madre hematopoyéticas.

20 Se determina la seguridad de las dosis ascendentes de 12S administradas por inyección IT durante 40 semanas en niños con enfermedad de Hunter infantil tardía. Además, se evalúa la actividad clínica de I2S sobre la función motora macroscópica y la farmacocinética de dosis únicas y repetidas en suero y las concentraciones en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

25 Una cantidad terapéuticamente efectiva de I2S se administra intratecalmente a intervalos regulares, dependiendo de la naturaleza y el alcance de los efectos de la enfermedad, y de forma continua. La administración a un "intervalo", como se usa en este documento, indica que la cantidad terapéuticamente efectiva se administra periódicamente (a diferencia de una dosis única). El intervalo puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. En algunas realizaciones, I2S se administra por vía intratecal aproximadamente cada dos semanas. El intervalo de administración para un solo individuo no necesita ser un intervalo fijo, sino que puede variar con el tiempo, dependiendo de las necesidades del individuo. Por ejemplo, en tiempos de enfermedad física o estrés, si los 30 anticuerpos antil2S están presentes o aumentan, o si los síntomas de la enfermedad empeoran, el intervalo entre las dosis puede disminuir.

#### **EJEMPLO 9: TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DEL CAZADOR**

35 La administración directa del SNC a través de, por ejemplo, la administración de IT se puede utilizar para tratar eficazmente a los pacientes con la enfermedad de Hunter. Este ejemplo ilustra un estudio de aumento de dosis multicéntrico diseñado para evaluar la seguridad de hasta 3 niveles de dosis cada mes durante un total de 6 meses de I2S administrado a través de un dispositivo de administración de drogas intratecal (IDDD) a pacientes con enfermedad de Hunter infantil tardía. En las Figuras 45-48 se representan varios dispositivos ejemplares de administración de fármacos intratecales adecuados para el tratamiento humano y en la Figura 62 se muestra un 40 esquema del ensayo.

Se inscribirán hasta 16 pacientes:

- 45 Cohorte 1: 4 pacientes (dosis más baja - 10 mg)
- Cohorte 2: 4 pacientes (dosis intermedia - 30 mg)
- Cohorte 3: 4 pacientes (dosis más alta - 100 mg)
- 4 pacientes serán asignados al azar a ningún tratamiento o uso del dispositivo.

50 Los pacientes con la enfermedad de Hunter desarrollan con frecuencia un deterioro cognitivo y del desarrollo 55 neurológico que incluye el retraso de los hitos del desarrollo temprano (por ejemplo, caminar, hablar, ir al baño), déficit intelectual, hiperactividad, agresión, discapacidad auditiva, epilepsia e hidrocefalia. Todas las indicaciones pueden ser parte de los criterios para los ensayos. Los pacientes se seleccionan para el estudio en función de la inclusión de los siguientes criterios: (1) 3 - 18 años de edad; (2) cociente de inteligencia de menos de 77 o una disminución de 15 a 30 puntos de coeficiente intelectual en los últimos 3 años; (3) sin LCR cerrado o trastorno convulsivo mal controlado y (4) sin comorbilidades que presenten anestesia y/o riesgos quirúrgicos.

60 Se determina la seguridad de las dosis ascendentes de 12S administradas por inyección IT durante 6 meses en niños con enfermedad de Hunter infantil tardía. Además, se evalúa la actividad clínica de I2S sobre la función motora macroscópica y la farmacocinética de dosis únicas y repetidas en suero y las concentraciones en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

65 Los objetivos del estudio serán evaluar la seguridad y la tolerabilidad de las dosis ascendentes de I2S, así como la seguridad, la tolerabilidad y la permeabilidad a largo plazo de la IDDD. Además, se evaluará la concentración de I2S después de dosis únicas y repetidas de IT tanto en LCR como en sangre periférica, así como los efectos de I2S en biomarcadores de FQ y GAG urinario. La evaluación adicional incluirá los efectos de I2S en parámetros clínicos

tales como evaluaciones fisiológicas y neurocognitivas, función neurológica y volúmenes de estructura cerebral. Además, se pueden evaluar los efectos del tratamiento en la vida diaria y las relaciones entre biomarcadores y síntomas.

5 El tratamiento de pacientes con la enfermedad de Hunter mediante el suministro de I2S por IT da como resultado la reducción de la acumulación de sulfatida en diversos tejidos (por ejemplo, el sistema nervioso, corazón, hígado, riñones, vesícula biliar y otros órganos).

10 Si bien ciertos compuestos, composiciones y métodos descritos en el presente documento se han descrito con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los siguientes ejemplos sirven solo para ilustrar los compuestos de la invención y no pretenden limitarlos.

15 Los artículos "un" y "una" tal como se usan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, deben entenderse que incluyen los referentes plurales. Cuando los elementos se presentan en esta descripción como listas (por ejemplo, en el grupo Markush o en un formato similar), debe entenderse que cada subgrupo de los elementos también se divulga, y cualquier elemento puede eliminarse del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando la invención, o los aspectos de la invención, se denominan/comprenden elementos, características, etc. particulares, ciertas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente en, tales elementos, características, etc. Por razones de simplicidad, esas realizaciones no se han establecido en todos los casos específicamente en tantas palabras en este documento.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> Shire Human Genetic Therapies, Inc.  
     <120> MÉTODO Y COMPOSICIONES PARA LA ADMINISTRACIÓN AL SNC DE IDURONATO-2-SULFATASA
- 30 <130> P060857EP  
     <140> EP11799036.6  
     <141> 2011-06-25
- 35 <150> PCT/US2011/041925  
     <151> 2011-06-25  
     <150> 61/358,857  
     <151> 2010-06-25
- 40 <150> 61/360,786  
     <151> 2010-07-01  
     <150> 61/387,862  
     <151> 2010-09-29  
     <150> 61/435,710  
     <151> 2011-01-24
- 45 <150> 61/442,115  
     <151> 2011-02-11  
     <150> 61/476,210  
     <151> 2011-04-15
- 50 <150> 61/495,268  
     <151> 2011-06-09  
     <160> 2
- 55 <170> PatentIn versión 3.5  
     <210> 1  
     <211> 525  
     <212> PRT

ES 2 895 655 T3

<213> Homo sapiens

<400> 1

5           Ser Glu Thr Gln Ala Asn Ser Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu  
       1                           5                           10                           15

10           Ile Ile Val Asp Asp Leu Arg Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys  
       20                           25                           30

15           Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile Asp Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu  
       35                           40                           45

20           Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln Gln Ala Val Cys Ala Pro Ser Arg Val  
       50                           55                           60

20

## ES 2 895 655 T3

Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe  
 65 70 75 80

5 Asn Ser Tyr Trp Arg Val His Ala Gly Asn Phe Ser Thr Ile Pro Gln  
 85 90 95

10 Tyr Phe Lys Glu Asn Gly Tyr Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe  
 100 105 110

15 His Pro Gly Ile Ser Ser Asn His Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp  
 115 120 125

20 Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro Ser Ser Glu Lys Tyr Glu Asn Thr Lys  
 130 135 140

25 Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly Glu Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro  
 145 150 155 160

30 Val Asp Val Leu Asp Val Pro Glu Gly Thr Leu Pro Asp Lys Gln Ser  
 165 170 175

35 Thr Glu Gln Ala Ile Gln Leu Leu Glu Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser  
 180 185 190

40 Pro Phe Phe Leu Ala Val Gly Tyr His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg  
 195 200 205

45 Tyr Pro Lys Glu Phe Gln Lys Leu Tyr Pro Leu Glu Asn Ile Thr Leu  
 210 215 220

50 Ala Pro Asp Pro Glu Val Pro Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn  
 225 230 235 240

55 Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln Arg Glu Asp Val Gln Ala Leu Asn Ile  
 245 250 255

60 Ser Val Pro Tyr Gly Pro Ile Pro Val Asp Phe Gln Arg Lys Ile Arg  
 260 265 270

65 Gln Ser Tyr Phe Ala Ser Val Ser Tyr Leu Asp Thr Gln Val Gly Arg  
 275 280 285

Leu Leu Ser Ala Leu Asp Asp Leu Gln Leu Ala Asn Ser Thr Ile Ile  
 290 295 300

Ala Phe Thr Ser Asp His Gly Trp Ala Leu Gly Glu His Gly Glu Trp  
 305 310 315 320

## ES 2 895 655 T3

Ala Lys Tyr Ser Asn Phe Asp Val Ala Thr His Val Pro Leu Ile Phe  
 325 330 335  
 5  
 Tyr Val Pro Gly Arg Thr Ala Ser Leu Pro Glu Ala Gly Glu Lys Leu  
 340 345 350  
 10 Phe Pro Tyr Leu Asp Pro Phe Asp Ser Ala Ser Gln Leu Met Glu Pro  
 355 360 365  
 15 Gly Arg Gln Ser Met Asp Leu Val Glu Leu Val Ser Leu Phe Pro Thr  
 370 375 380  
 20 Leu Ala Gly Leu Ala Gly Leu Gln Val Pro Pro Arg Cys Pro Val Pro  
 385 390 395 400  
 25 Ser Phe His Val Glu Leu Cys Arg Glu Gly Lys Asn Leu Leu Lys His  
 405 410 415  
 Phe Arg Phe Arg Asp Leu Glu Glu Asp Pro Tyr Leu Pro Gly Asn Pro  
 420 425 430  
 30 Arg Glu Leu Ile Ala Tyr Ser Gln Tyr Pro Arg Pro Ser Asp Ile Pro  
 435 440 445  
 35 Gln Trp Asn Ser Asp Lys Pro Ser Leu Lys Asp Ile Lys Ile Met Gly  
 450 455 460  
 40 Tyr Ser Ile Arg Thr Ile Asp Tyr Arg Tyr Thr Val Trp Val Gly Phe  
 465 470 475 480  
 45 Asn Pro Asp Glu Phe Leu Ala Asn Phe Ser Asp Ile His Ala Gly Glu  
 485 490 495  
 Leu Tyr Phe Val Asp Ser Asp Pro Leu Gln Asp His Asn Met Tyr Asn  
 500 505 510  
 50 Asp Ser Gln Gly Gly Asp Leu Phe Gln Leu Leu Met Pro  
 515 520 525  
 55 <210> 2  
 <211> 550  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 60 <400> 2  
 Met Pro Pro Pro Arg Thr Gly Arg Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Val  
 1 5 10 15  
 65

## ES 2 895 655 T3

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

## ES 2 895 655 T3

Arg Glu Asp Val Gln Ala Leu Asn Ile Ser Val Pro Tyr Gly Pro Ile  
 275 280 285

5 Pro Val Asp Phe Gln Arg Lys Ile Arg Gln Ser Tyr Phe Ala Ser Val  
 290 295 300

10 Ser Tyr Leu Asp Thr Gln Val Gly Arg Leu Leu Ser Ala Leu Asp Asp  
 305 310 315 320

15 Leu Gln Leu Ala Asn Ser Thr Ile Ile Ala Phe Thr Ser Asp His Gly  
 325 330 335

20 Trp Ala Leu Gly Glu His Gly Glu Trp Ala Lys Tyr Ser Asn Phe Asp  
 340 345 350

25 Val Ala Thr His Val Pro Leu Ile Phe Tyr Val Pro Gly Arg Thr Ala  
 355 360 365

30 Ser Leu Pro Glu Ala Gly Glu Lys Leu Phe Pro Tyr Leu Asp Pro Phe  
 370 375 380

35 Asp Ser Ala Ser Gln Leu Met Glu Pro Gly Arg Gln Ser Met Asp Leu  
 385 390 395 400

40 Val Glu Leu Val Ser Leu Phe Pro Thr Leu Ala Gly Leu Ala Gly Leu  
 405 410 415

45 Gln Val Pro Pro Arg Cys Pro Val Pro Ser Phe His Val Glu Leu Cys  
 420 425 430

50 Arg Glu Gly Lys Asn Leu Leu Lys His Phe Arg Phe Arg Asp Leu Glu  
 435 440 445

55 Glu Asp Pro Tyr Leu Pro Gly Asn Pro Arg Glu Leu Ile Ala Tyr Ser  
 450 455 460

60 Gln Tyr Pro Arg Pro Ser Asp Ile Pro Gln Trp Asn Ser Asp Lys Pro  
 465 470 475 480

65 Ser Leu Lys Asp Ile Lys Ile Met Gly Tyr Ser Ile Arg Thr Ile Asp  
 485 490 495

Tyr Arg Tyr Thr Val Trp Val Gly Phe Asn Pro Asp Glu Phe Leu Ala  
 500 505 510

Asn Phe Ser Asp Ile His Ala Gly Glu Leu Tyr Phe Val Asp Ser Asp

ES 2 895 655 T3

515

520

525

5 Pro Leu Gln Asp His Asn Met Tyr Asn Asp Ser Gln Gly Gly Asp Leu  
530 535 540

10 Phe Gln Leu Leu Met Pro  
545 550

**REIVINDICACIONES**

1. Una formulación a base de solución salina o tampón que comprende 10 mg/ml o más de iduronato-2-sulfatasa (I2S) para su uso en un método de tratamiento del síndrome de Hunters en un sujeto en donde dicho método comprende administrar directamente dicha formulación en el líquido cefalorraquídeo de dicho sujeto mediante administración intraparenquimatosa, intracerebral, intraventricular cerebral (ICV) o intratecal (IT).
- 5 2. La formulación a base de solución salina o tampón para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la formulación a base de solución salina o tampón comprende además un agente tampón seleccionado del grupo que consiste en fosfato, acetato, histidina, succinato, Tris y combinaciones de los mismos.
- 10 3. La formulación a base de solución salina o tampón para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el agente tampón es fosfato, opcionalmente en la que el fosfato está presente en una concentración:
- 15 (i) no mayor de 50 mM, y/o  
(ii) no mayor de 20 mM.
- 20 4. La formulación a base de solución salina o tampón para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína I2S está presente en una concentración seleccionada de 10 mg/ml, 30 mg/ml, 50 mg/ml o 100 mg/ml.
- 25 5. La formulación a base de solución salina o tampón para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína I2S comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
- 30 6. La formulación a base de solución salina o tampón para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína I2S se produce a partir de:
- (i) una línea celular humana, o  
(ii) células CHO.
- 35 7. La formulación a base de solución salina o tampón para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende NaCl en una concentración que varía de 0 a 300 mM, por ejemplo, 137-154 mM, opcionalmente en la que el NaCl está presente a una concentración de aproximadamente 154 mM.
- 40 8. La formulación a base de solución salina o tampón para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende además un tensioactivo de polisorbato.
9. La formulación a base de solución salina o tampón para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el tensioactivo de polisorbato se selecciona del grupo que consiste de polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80 y una combinación de los mismos, opcionalmente en donde el tensioactivo de polisorbato es polisorbato 20, opcionalmente en donde el polisorbato 20 está presente a una concentración que varía del 0-0,02%, opcionalmente en donde el polisorbato 20 está presente a aproximadamente un 0,005%.
- 45 10. La formulación a base de solución salina o tampón para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la formulación tiene un pH de 5,5-6,5, en donde opcionalmente la formulación tiene un pH de aproximadamente 6,0.
- 50 11. La formulación a base de solución salina o tampón para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la formulación se reconstituye a partir de una formulación liofilizada con un diluyente.
12. La formulación a base de solución salina o tampón para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la formulación comprende además un agente estabilizante seleccionado del grupo que consiste de un azúcar, un azúcar no reductor y/o un aminoácido.
- 55 13. La formulación a base de solución salina o tampón para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la administración intratecal tiene lugar:
- (i) una vez cada dos semanas,  
(ii) una vez al mes, o  
(iii) una vez cada dos meses.
- 60 14. La formulación a base de solución salina o tampón para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que se usa la administración intratecal:
- (a) junto con la administración intravenosa, opcionalmente en donde la administración intravenosa no es más

frecuente de:

- (i) una vez al mes, o
- (ii) una vez cada dos meses;

5

- (b) en ausencia de administración intravenosa; y/o
- (c) en ausencia de terapia inmunosupresora concurrente.

10 15. La formulación a base de solución salina o tampón para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la formulación a base de solución salina o tampón se proporciona en un recipiente que comprende una forma de dosificación única, opcionalmente en donde

15 (a) el recipiente se selecciona de una ampolla, un vial, un cartucho, un depósito, un lyo-ject o una jeringa precargada, en donde opcionalmente la jeringa precargada se selecciona de jeringas de vidrio de borosilicato con revestimiento de silicona horneada, jeringas de vidrio borosilicato con silicona pulverizada o jeringas de resina plástica sin silicona; y/o

(b) la formulación a base de solución salina o tampón está presente en un volumen de menos de:

- 20
- (i) aproximadamente 50,0 ml, o
  - (ii) aproximadamente 3,0 ml.

25

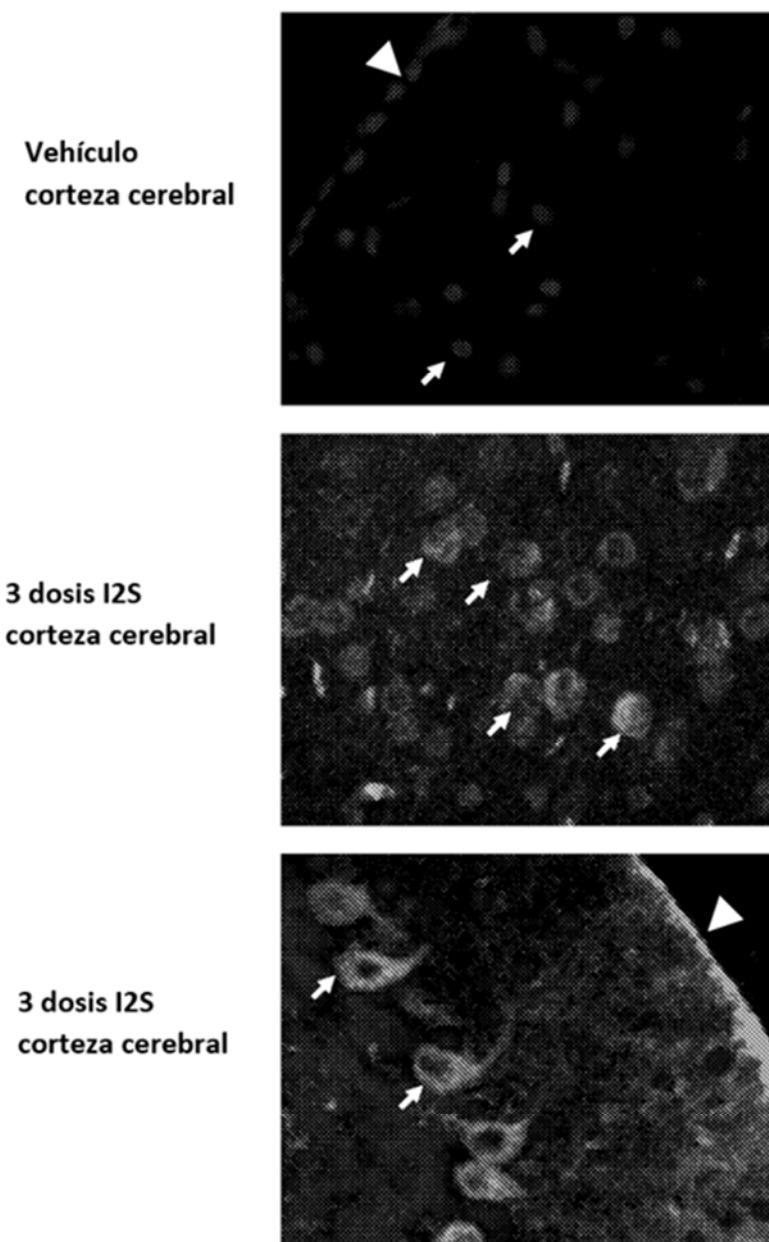


Figura 1: I2S IHC demostró I2S detectado en los neurones (flechas) en la corteza cerebral y cerebelar incluyendo una capa de células menígeas que cubren la superficie del cerebro (puntas de flechas) después de inyecciones intratecales de 3 dosis de I2S. La tinción de I2S IHC en cerebros inyectados con 2 dosis era más débil (foto no mostrada). No hubo tinción positiva por I2S en cualquier tipo de células en el cerebro de animales de control de vehículo. 40X.

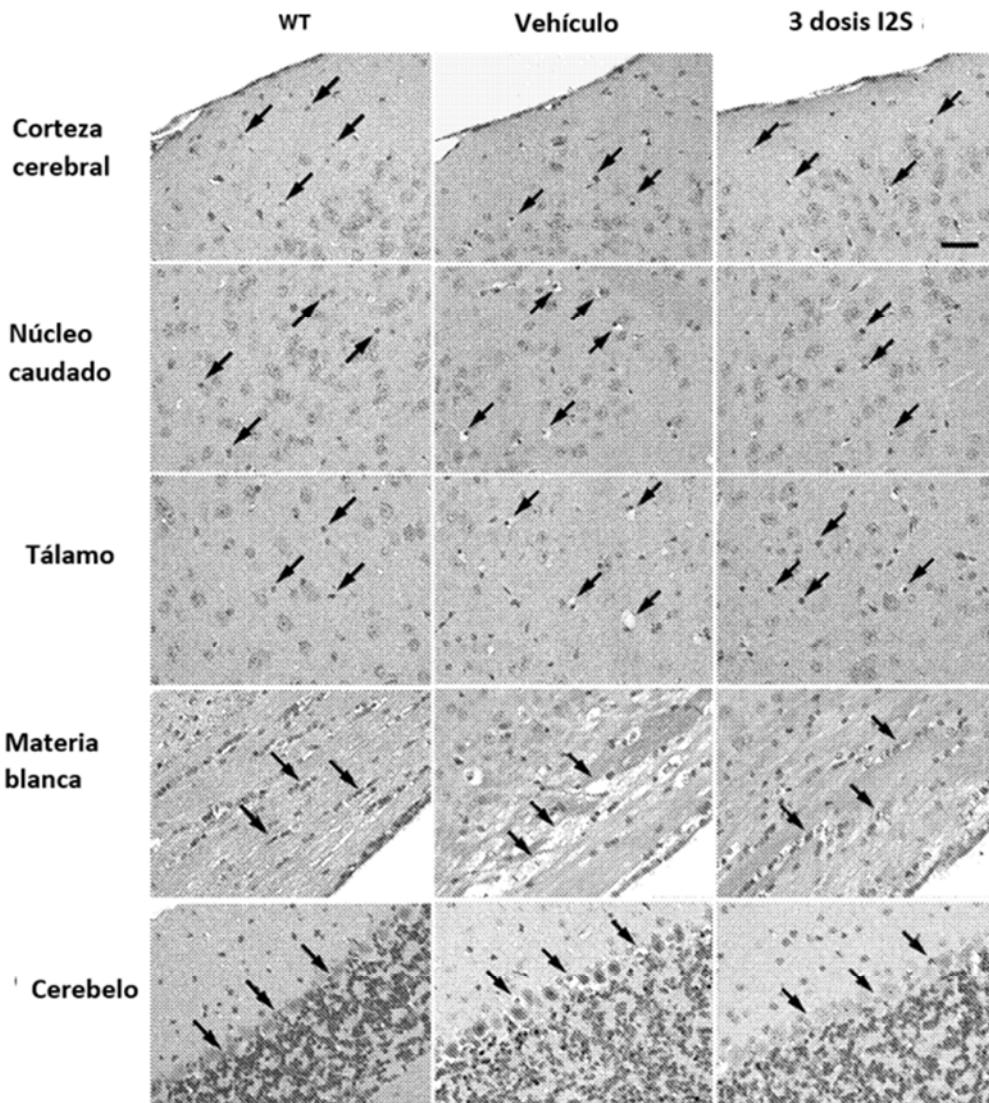
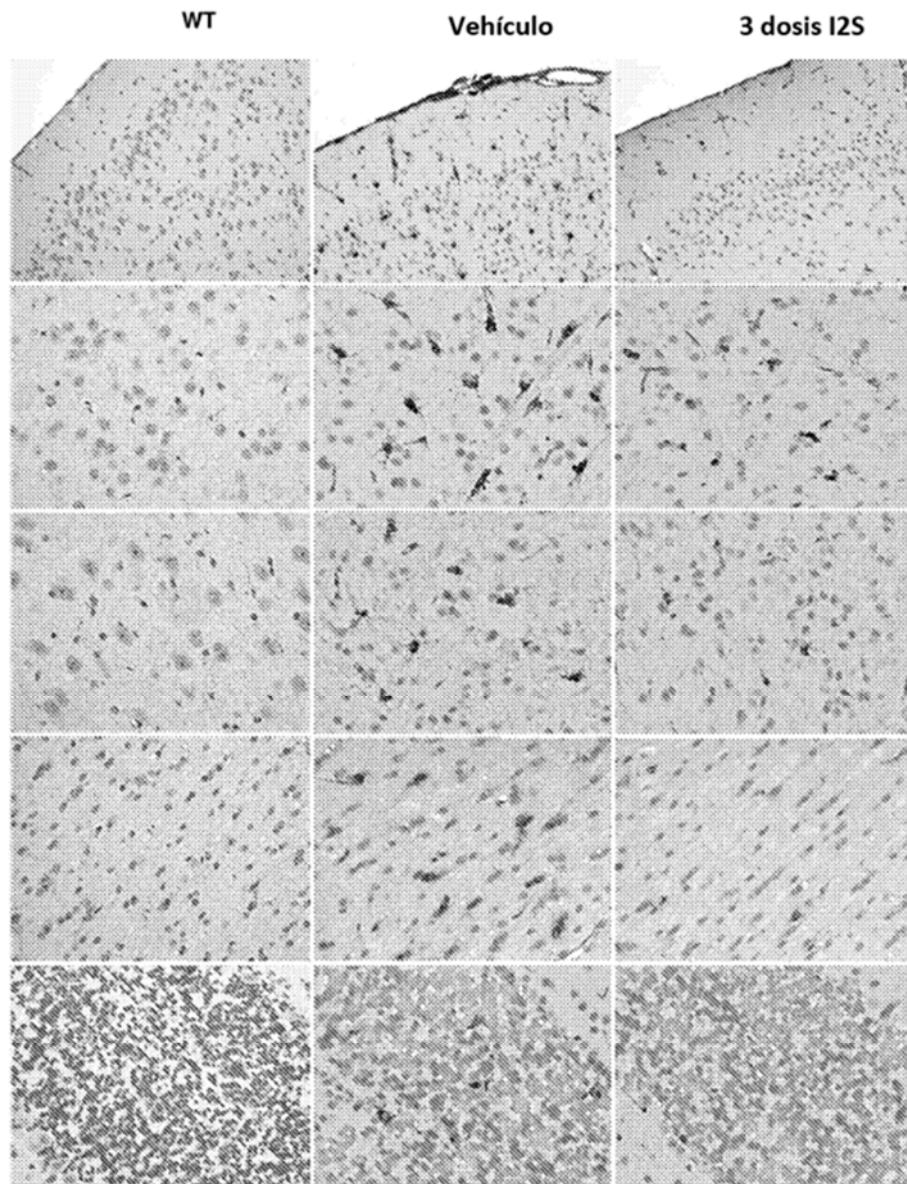
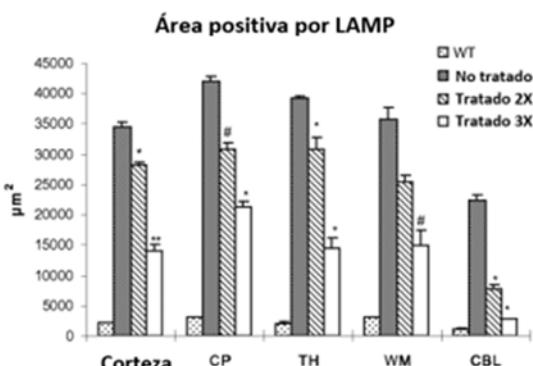


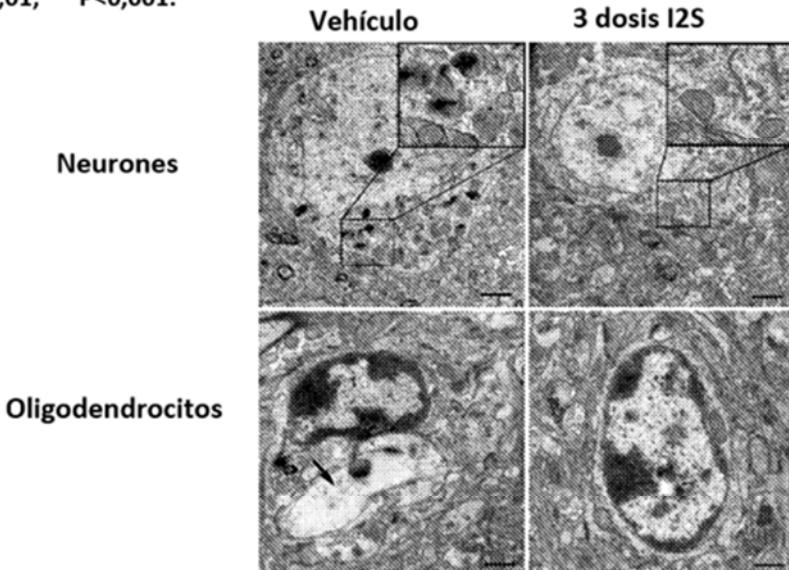
Figura 2: Inversión de la patología en el cerebro de ratones IKO después de la inyección I2S intratecal-lumbar. Tejidos de cerebros teñidos con H&E mostraron vacuolas (flechas) en animales de control de vehículo. Vacuolación celular fue reducida en todo el cerebro en ratones injectados de 2 dosis (foto no mostrada) y 3 dosis. Una reducción marcada fue encontrada en los injectados con 3 dosis. 40X.



**Figura 3:** Como se ha demostrado por tinción inmunohistoquímica de LAMP-1, hubo una marcada reducción de actividad lisosómica en los cerebros después de 2 dosis (foto no mostrada) y 3 dosis de tratamiento de I2S en comparación con ratones controlados por vehículo. La reducción se caracteriza por una disminución en el número de células positivas por LAMP-1 y una intensidad de tinción menor en las regiones en todo el cerebro. 40X



**Figura 4:** Resultado de morfometría de una comparación del área positiva media de LAMP-1 entre ratones de tipo silvestre (WT), no tratados con vehículo e I2S (2 y 3 dosis) en la corteza cerebra (corteza), núcleo caudado (CP), tálamo (TH), materia blanca (WM) y cerebelo (CBL) confirmó que hubo reducciones significativas en la tinción positiva de LAMP-1 en todas las áreas del cerebro evaluadas. Los datos se representan como la media  $\pm$  d.e. n° P<0,05; \* P<0,01; \*\* P<0,001.



**Figura 5:** Micrografías de electrones de células cerebrales mostraron mejoras patológicas en el nivel ultraestructural. Neuronas de ratones tratados con vehículo tenían inclusiones laminares, estructuras del tipo cuerpo de cebra, y vacuolos que contienen material de almacenamiento granular (inserción), el cual se había reducido en ratones inyectados con I2S. Oligodendrocitos de ratones tratados con vehículo mostraron grandes vacuolos de almacenamiento de electrones-lucent (flecha) mientras que los oligodendrocitos de ratones inyectados con I2S tenían mínima vacoulación. Barra de escala: en neuronas, 2 $\mu$ m; en

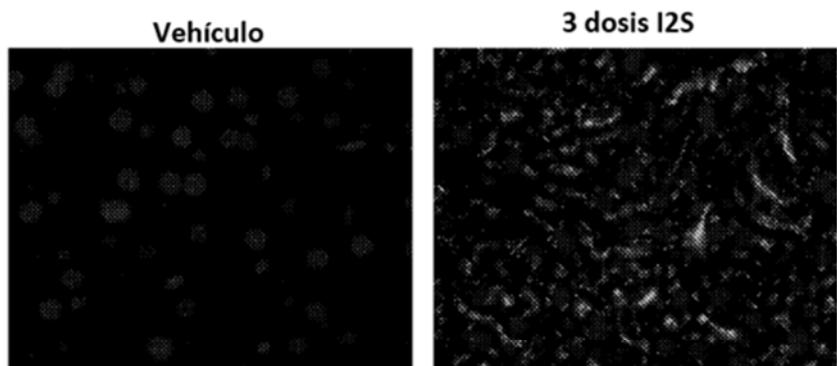


Figura 6: IHC demostró I2S detectado en células sinusoidales del hígado después de inyecciones intratecales de 3 dosis de I2S. Tinción 2S IHC en 2 hígados inyectados con dosis era más débil (foto no mostrada). No hubo tinción positiva I2S en el hígado de animales controlados por vehículo. 40X.

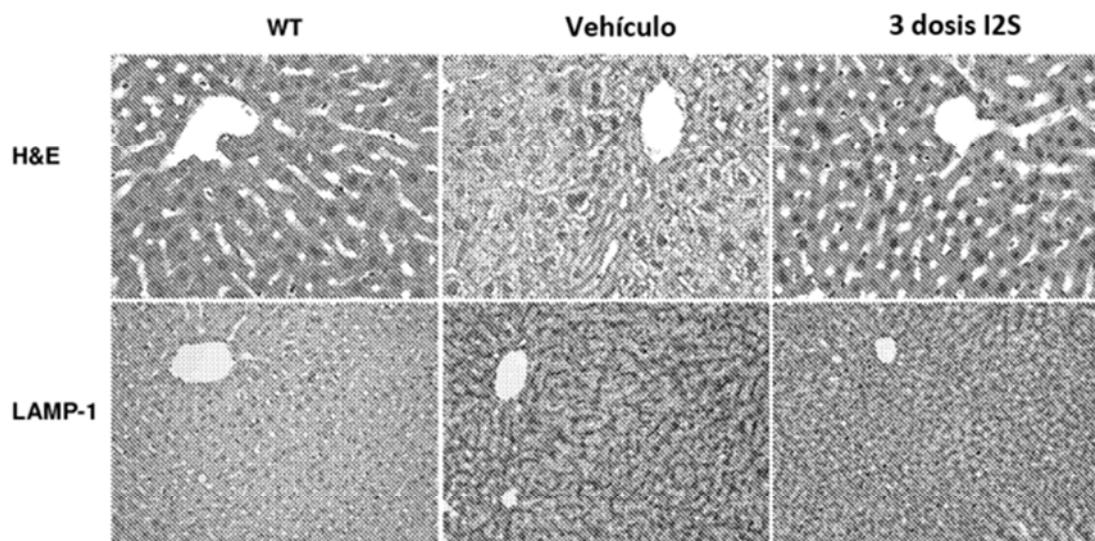
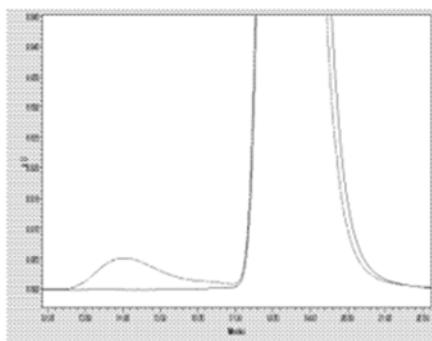
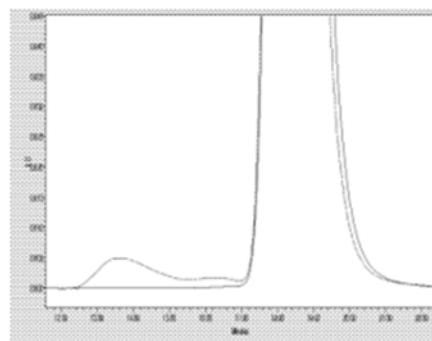


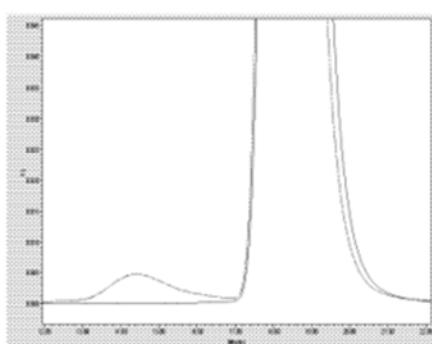
Figura 7: En el hígado, vacuolación severa celular y actividad lisosomática abnormalmente alta reveladas por tinción H&E y fuerte inmunotinción LAMP-1 fueron encontradas en animales controlados por vehículo en comparación con los WT. Una marcada reducción en vacuolación celular e inmunotinción LAMP-1 fueron encontradas después del tratamiento intratecal con 3 y 2 dosis (foto no mostrada) del tratamiento I2S. La tinción H&E reveló que vacuolación intracitoplásica desapareció casi por completo con una estructura celular de hígado sustancialmente normal. H&E, 40X; LAMP-1, 20X.



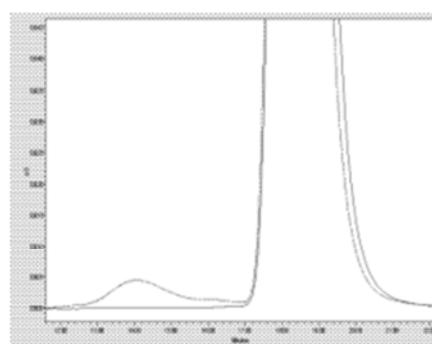
Error! No es una auto-referencia de marcador.A  
50 mg/mL, salina pH 6,0



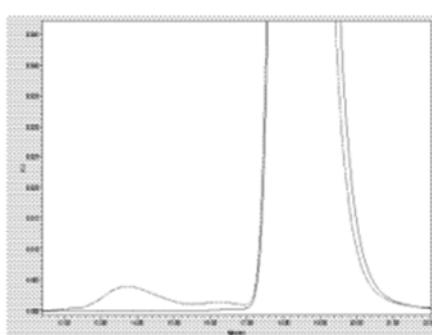
Error! No es una auto-referencia de marcador.B  
100 mg/mL, salina pH 6,0



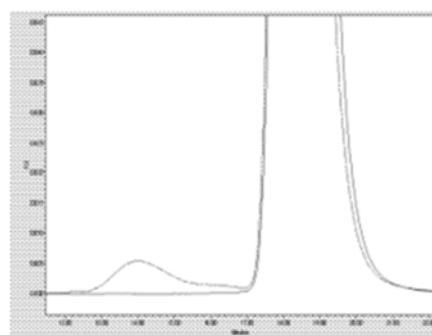
Error! No es una auto-referencia de marcador.C  
50 mg/mL, salina +5mM NaPO4 pH 6,5



Error! No es una auto-referencia de marcador.D  
100 mg/mL, salina +5mM NaPO4 pH 6,5



Error! No es una auto-referencia de marcador.E  
100 mg/mL, salina +20mM NaPO4 pH 6,0



Error! No es una auto-referencia de marcador.F  
100 mg/mL, salina +20mM NaPO4 pH 6,5

**Figura 8a -F:** Comparar agregación por SEC-HPLC para formulaciones de salina y fosfato (todas con 0,01% polisorbato-20): 1 mes a  $\leq -65^{\circ}\text{C}$  (línea negra) y  $40^{\circ}\text{C}$  (línea azul)

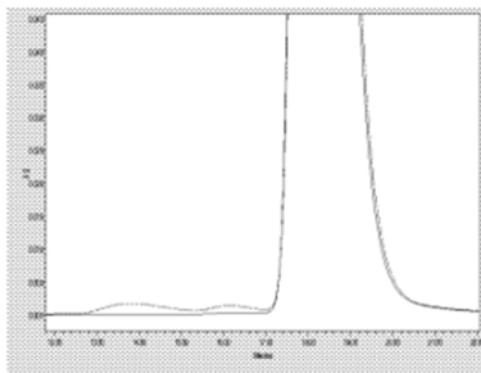


Figura 9A  
50 mg/mL, salina pH 6,0

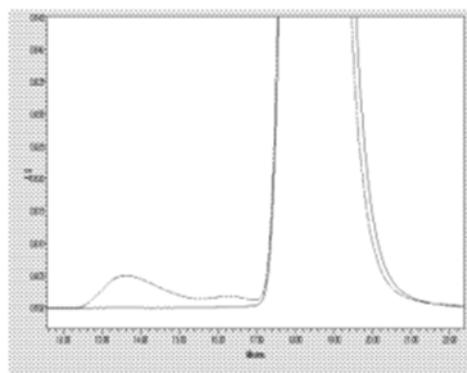


Figura 9B  
100 mg/mL, salina pH 6,0

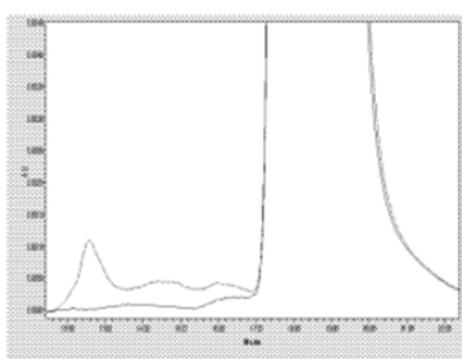


Figura 9C  
50 mg/mL, salina + 5 mM NaPO<sub>4</sub> pH 6,5

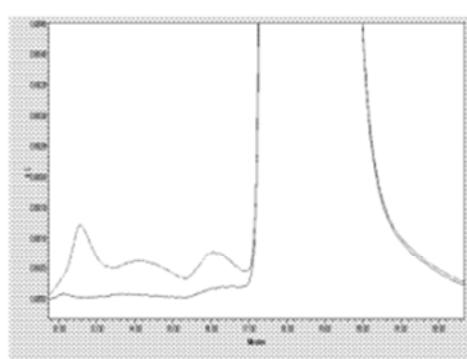


Figura 9D  
100 mg/mL, salina + 5 mM NaPO<sub>4</sub> pH 6,5

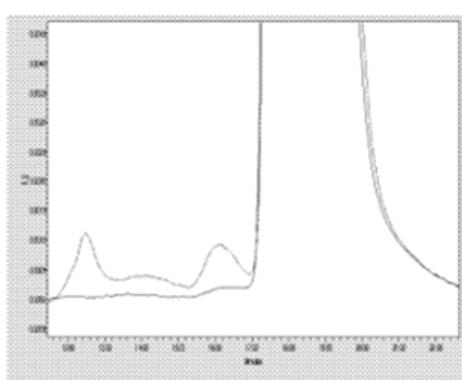


Figura 9E  
100 mg/mL, salina + 20mM NaPO<sub>4</sub> pH 6,0  
Figura 9: Comparar agregación por Método SEC-HPLC para formulaciones de salina y fosfato (todas con 0,01% de polisorbato-20): 6 meses a  $\leq -65^{\circ}\text{C}$  (línea negra) y  $25^{\circ}\text{C}$  (línea azul)

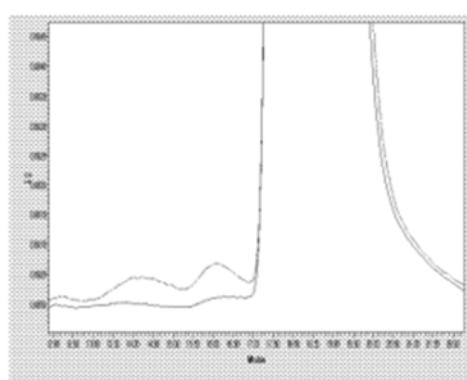


Figura 9F  
100 mg/mL, salina + 20mM NaPO<sub>4</sub> pH 6,5

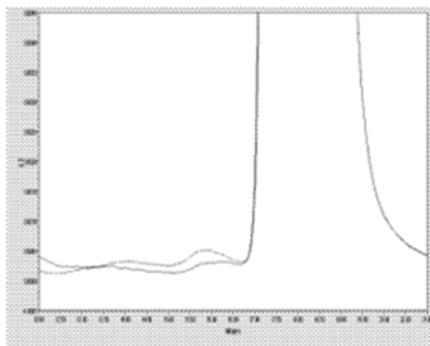


Figura 10A  
50 mg/mL, salina pH 6,0

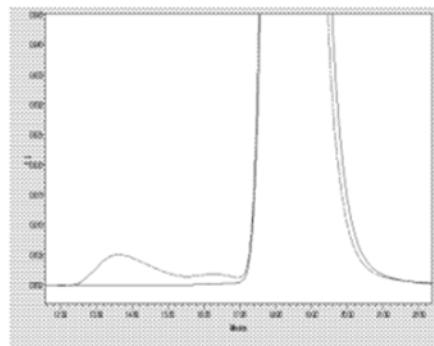


Figura 10B  
mg/mL, salina pH 6,0 (16 meses)

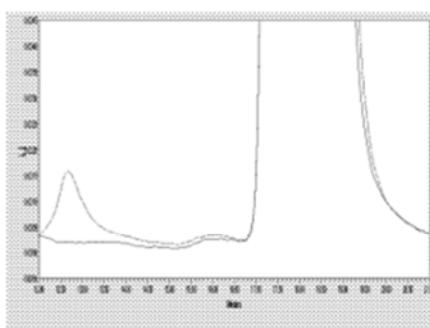


Figura 10C  
50 mg/mL, salina + 5 mM NaPO<sub>4</sub> pH 6,5

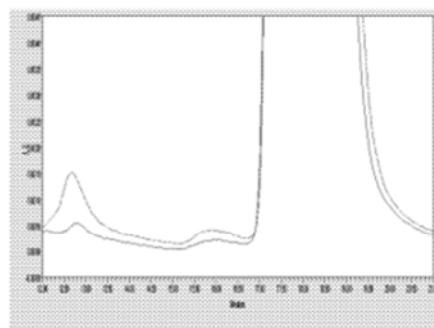


Figura 10D  
100 mg/mL, salina + 5 mM NaPO<sub>4</sub> pH 6,5

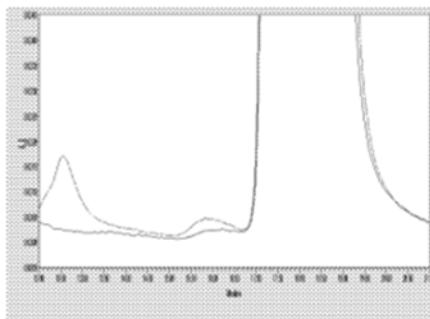


Figura 10E  
100 mg/mL, salina + 20 mM NaPO<sub>4</sub> pH 6,0

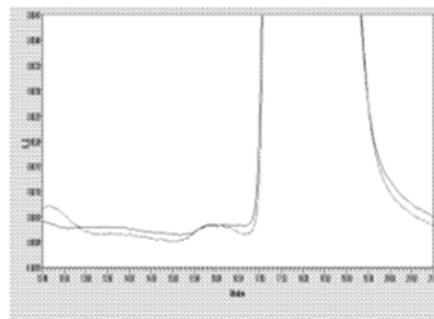
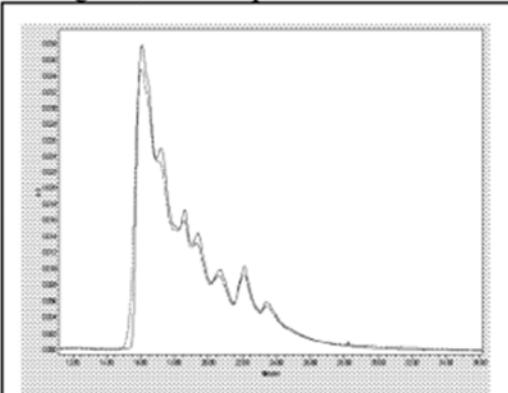


Figura 10F  
100 mg/mL, salina + 20 mM NaPO<sub>4</sub> pH 6,5

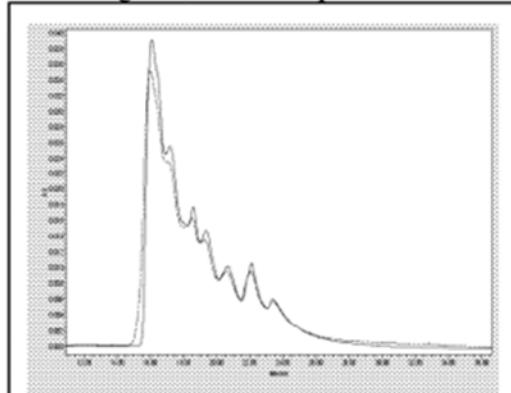
**Figuras 10A – F:** Comparar agregación por Método SEC-HPLC para formulaciones de salina y fosfato (todas con 0,01% de polisorbato-20): 24 meses a  $\leq -65^{\circ}\text{C}$  (línea negra) y 2 a  $8^{\circ}\text{C}$  (línea azul)

**Figuras 11:** Comparar cargas por Método SAX-HPLC para formulaciones de salina y fosfato (todas con 0,01% de polisorbato-20): línea de base (línea negra) frente a 1 mes a 40°C (línea azul)

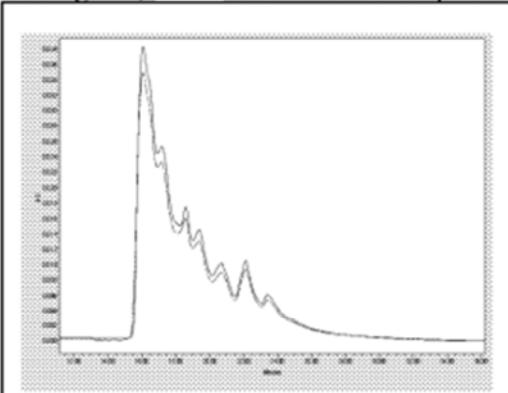
50 mg/mL, Salina pH 6.0



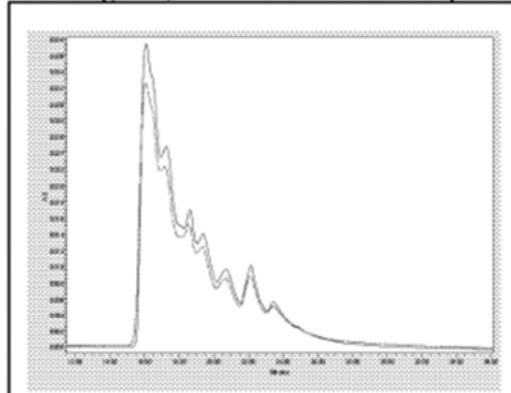
100 mg/mL, Salina pH 6.0



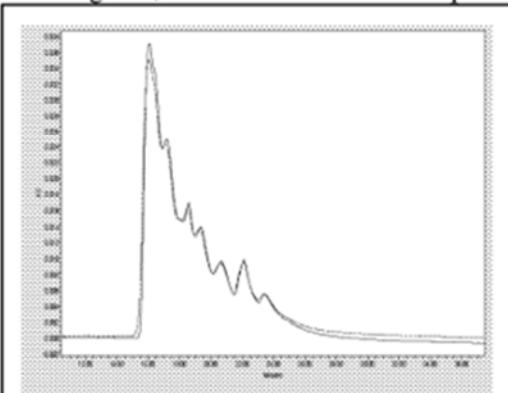
50 mg/mL, Salina + 5mM NaP04 pH 6.5



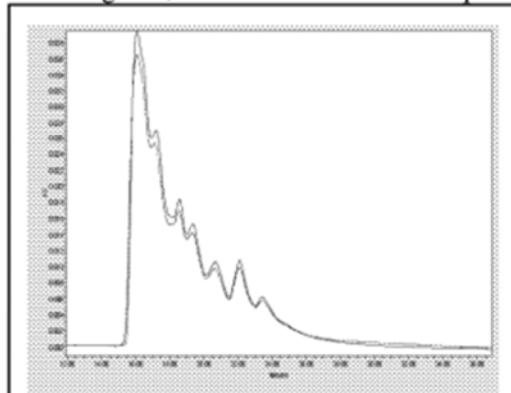
100 mg/mL, Salina + 5mM NaP04 pH 6.5



100 mg/mL, Salina + 20mM NaP04 pH 6.0

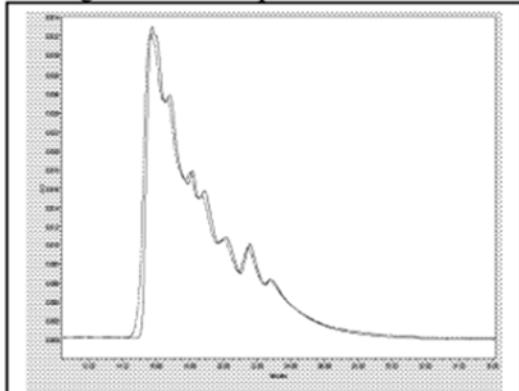


100 mg/mL, Salina + 20mM NaP04 pH 6.5

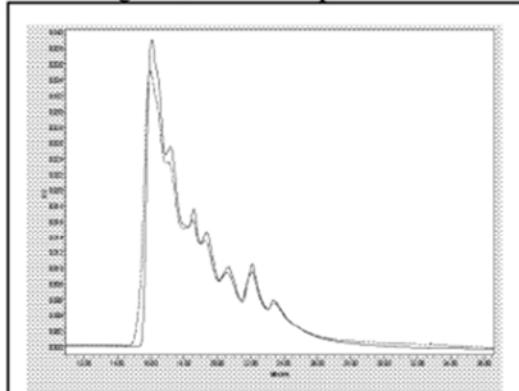


**Figuras 12:** Comparar cargas por Método SAX-HPLC para formulaciones de salina y fosfato (todas con 0,01% de polisorbato-20): línea de base (línea negra) frente a 6 meses a 25°C (línea azul)

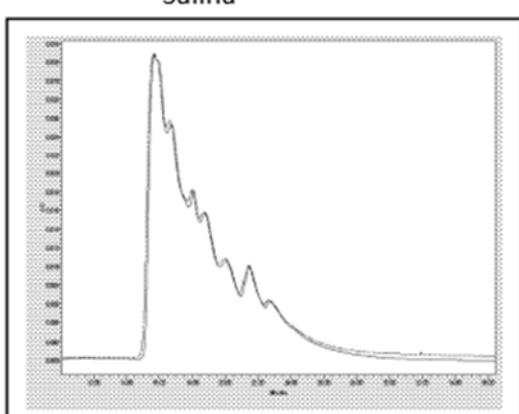
50 mg/mL, Salina pH 6.0



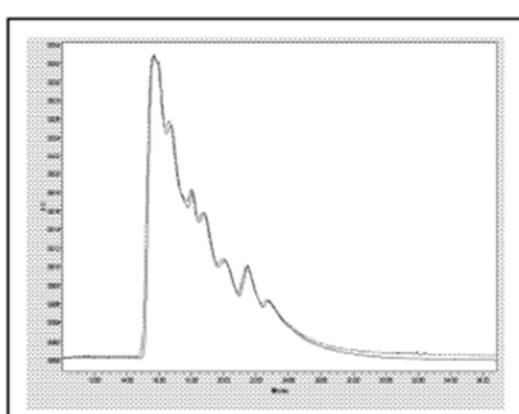
100 mg/mL, saline pH 6.0



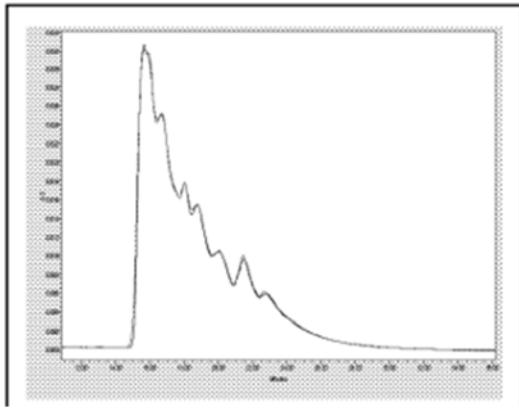
50 mg/mL, Salina + 5mM NaPO4 pH 6.5



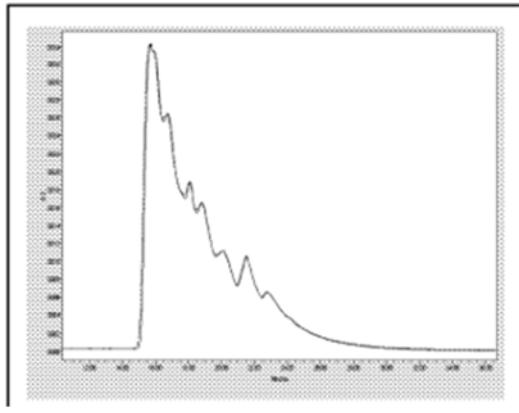
100 mg/mL, Salina + 5mM NaPO4 pH 6.5



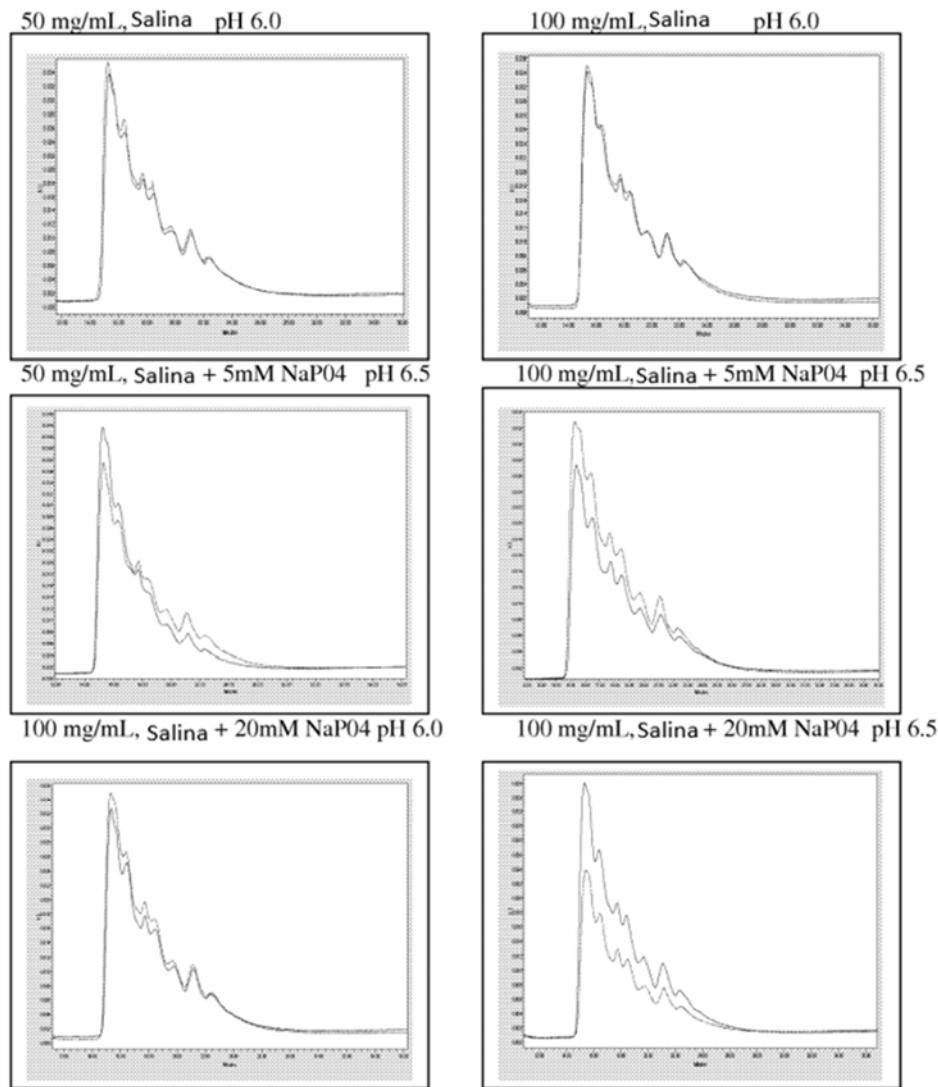
100 mg/mL, Salina + 20mM NaPO4 pH 6.0



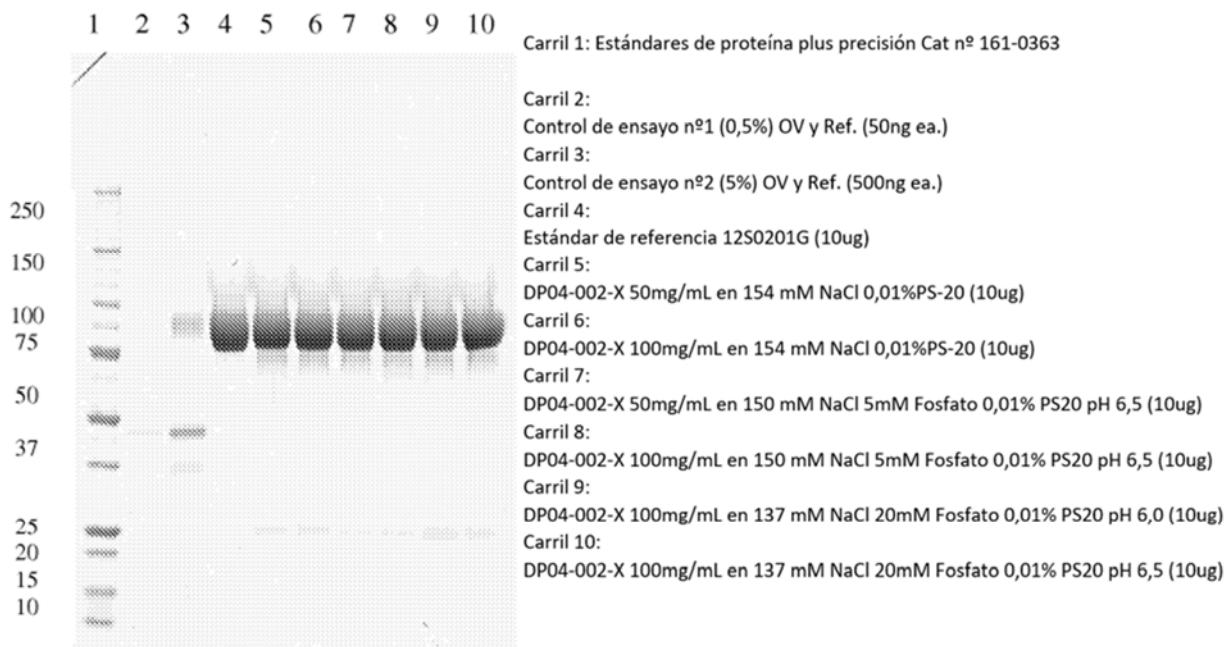
100 mg/mL, Salina + 20mM NaPO4 pH 6.5



**Figuras 13: Comparar cargas por Método SAX-HPLC para formulaciones de salina y fosfato (todas con 0,01% de polisorbato-20): línea de base (línea negra) frente a 24 meses a 2 a 8°C (línea azul)**



# ES 2 895 655 T3



**Figuras 14:** Comparar SDS-PAGE, tinción de Coomassie para formulaciones de salina y fosfato (todas con 0,01% polisorbato-20) en la línea de base y 1 mes a 40°C

# ES 2 895 655 T3

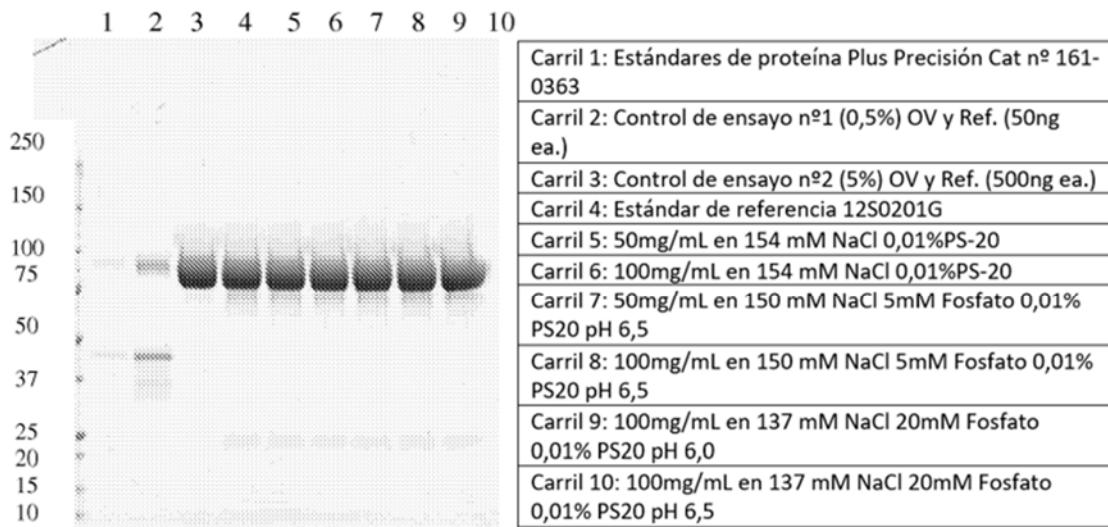


Figura 15A: 6 meses @ 25°C

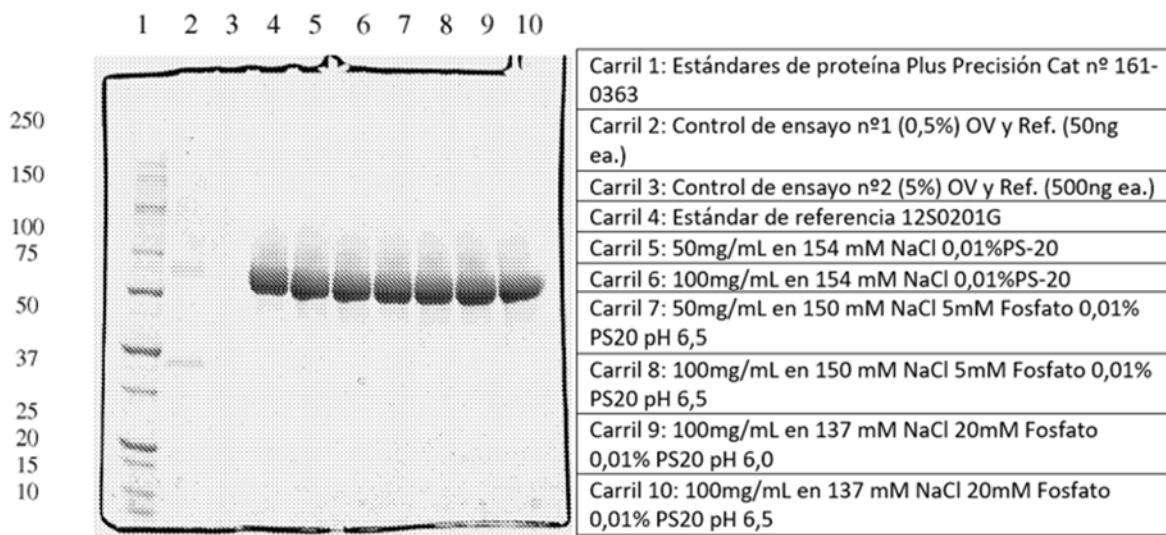
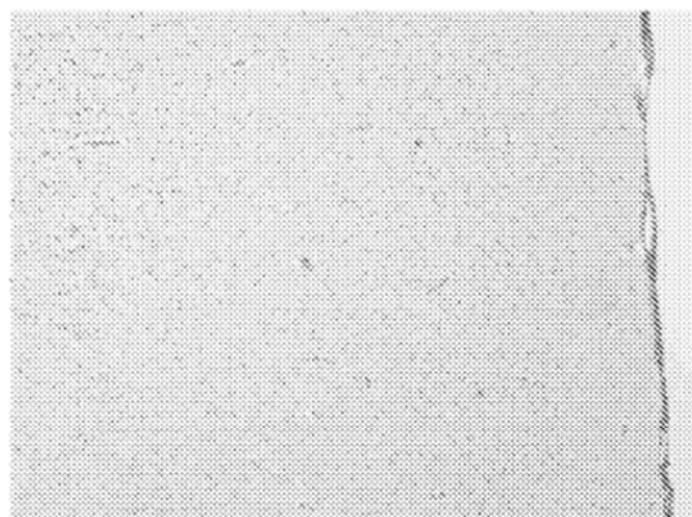
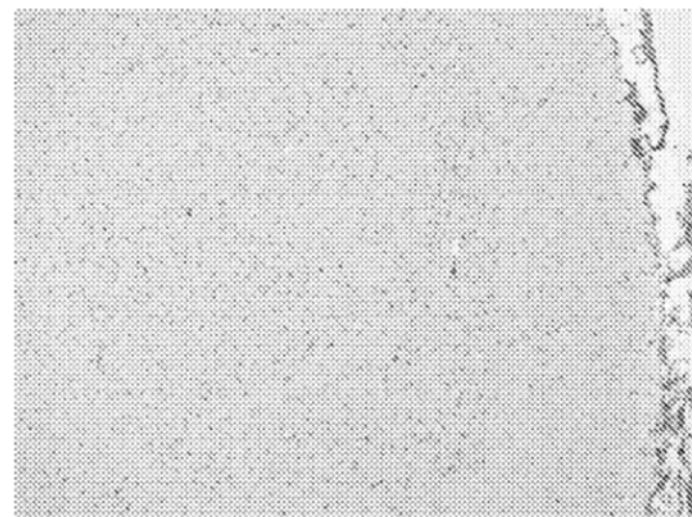


Figura 15B: 16 meses @ 2-8°C



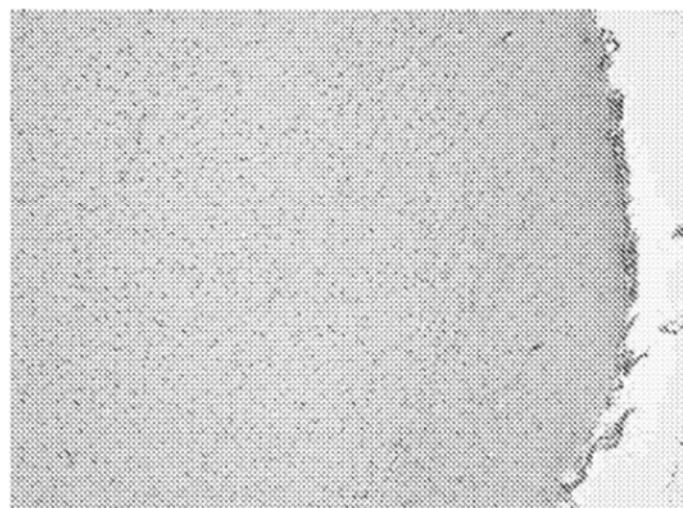
**Figura 16**



**Figura 17**



**Figura 18**



**Figura 19**

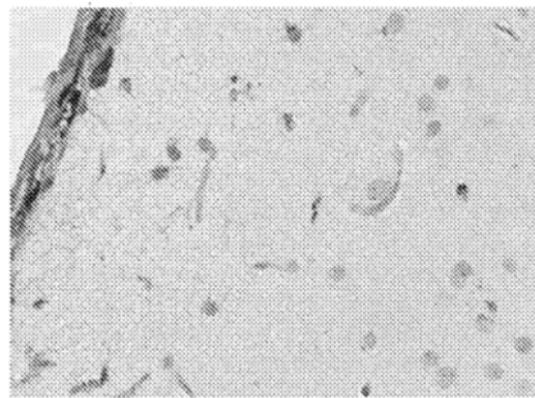


Figura 20: Neuronas positivas por I2S y células gliales, junto con células meníngicas, dentro de la capa I del cerebelo en un animal de grupo de tratamiento de 30 mg. 40X

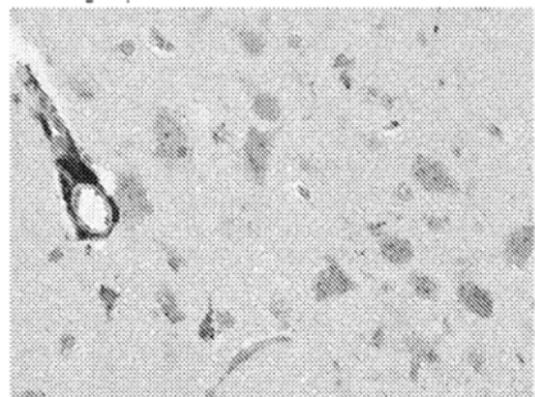


Figura 21: Neuronas positivas por I2S y células gliales, junto con células perivasculares, dentro de la capa III del cerebro en un animal de grupo de tratamiento de 30 mg. 40X

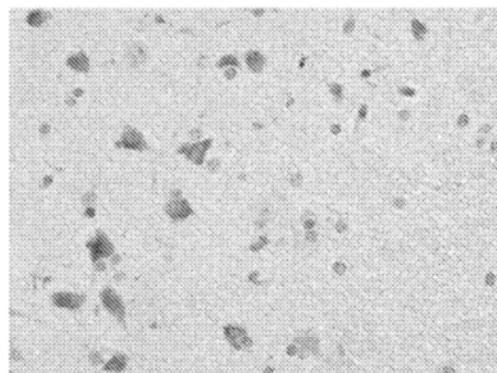


Figura 22: Neuronas positivas por I2S y células gliales, dentro de la capa VI del cerebelo junto a la materia blanca en un animal de grupo de tratamiento de 30 mg. 40X

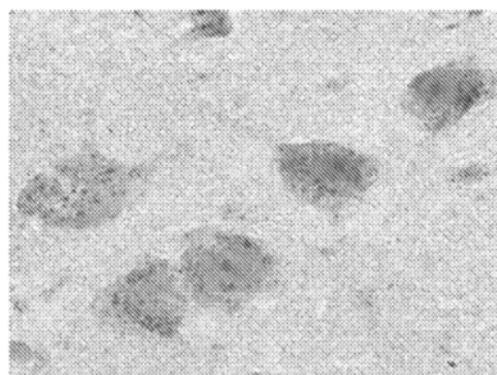


Figura 23: Tinción de I2S fuertemente positiva en los neurones (cerebro) de un animal de grupo de tratamiento de 150 mg. 100X

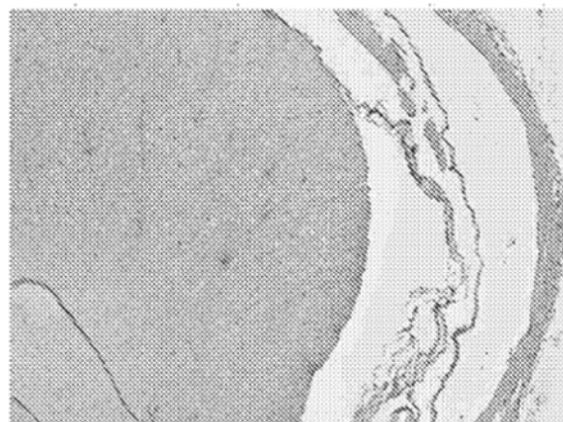


Figura 24: Inmunotinción de la médula espinal cervical en un grupo de tratamiento de 150 mg.  
4X

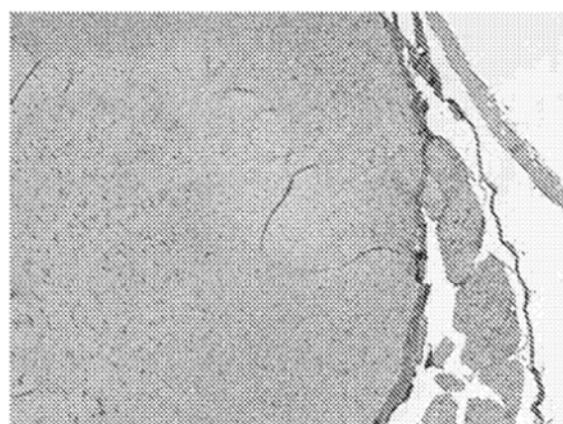


Figura 25: Inmunotinción fuerte I2S en la médula espinal lumbar de un grupo de tratamiento  
de 150 mg. 4X

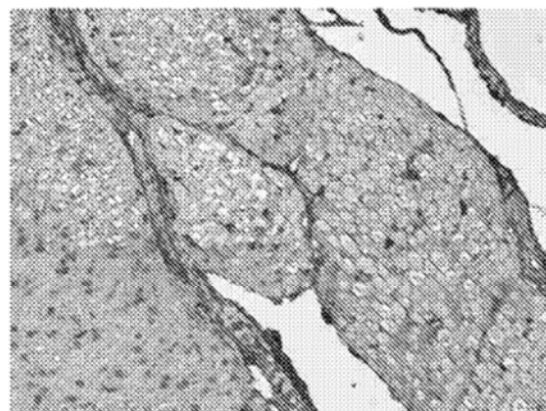


Figura 26: Inmunotinción fuertemente positivo I2S en las células menígeas, células gliales, y epi/peri/endoneurio (células conectivas) se encontró en la sección lumbar de un grupo de tratamiento de 150 mg. 40X

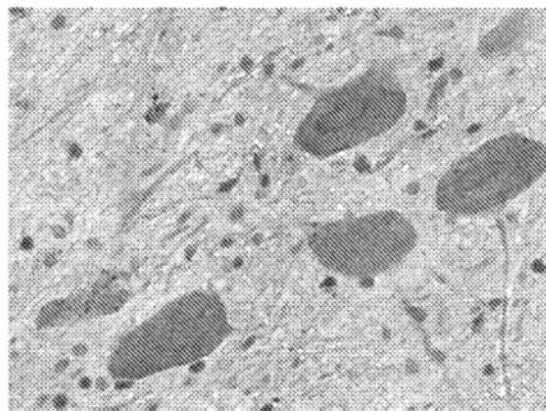


Figura 27: Los neurones en la médula espinal lumbar de un grupo de tratamiento de 150 mg fueron fuertemente positivos por I2S. 40X

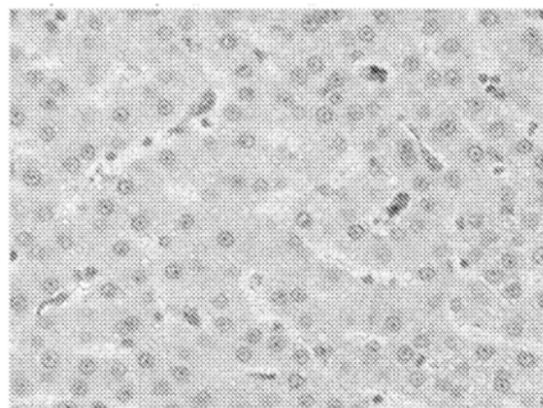


Figura 28: Hígado de un animal del grupo de tratamiento de 3 mg. Solo células sinusoidales eran positivas por I2S. 40X

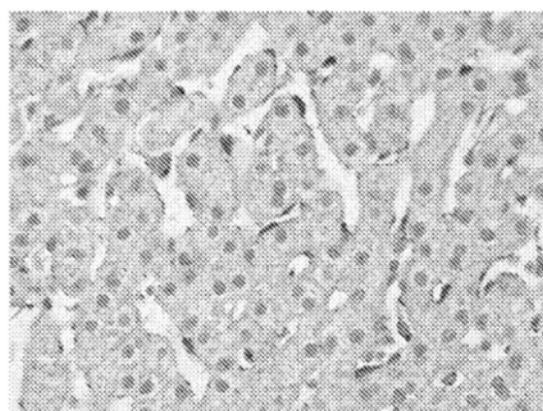


Figura 29: Hígado de un animal del grupo de tratamiento de 30 mg. Células sinusoidales y hepatocitos eran fuertemente positivas por I2S. 40X

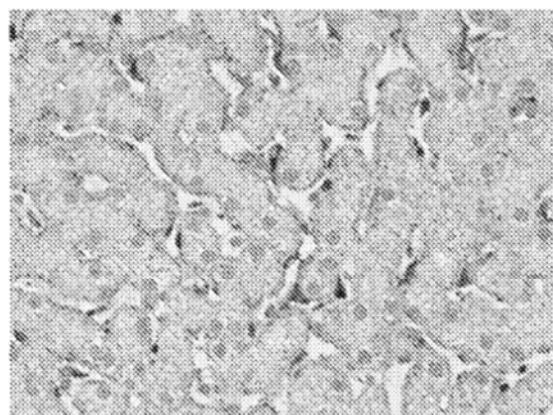


Figura 30: Hígado de un animal del grupo de tratamiento de 100 mg. La inmunotinción I2S era mucho más fuerte en las células sinusoidales y los hepatocitos. 40X

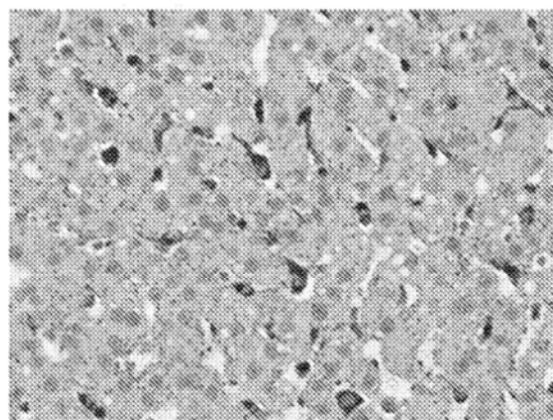


Figura 31: Hígado de un animal del grupo de tratamiento de 150 mg. La tinción I2S fuertemente positivo fue identificada en células sinusoidales y hepatocitos. 40X



Figura 32: Corazón de un animal del grupo de tratamiento de 3 mg. La inmunotinción era negativa. 40X

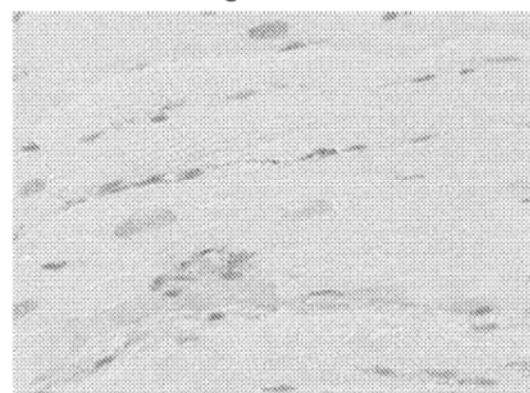


Figura 33: Corazón de un animal del grupo de tratamiento de 30 mg. Las inintersticiales eran positivas por I2S. 40X

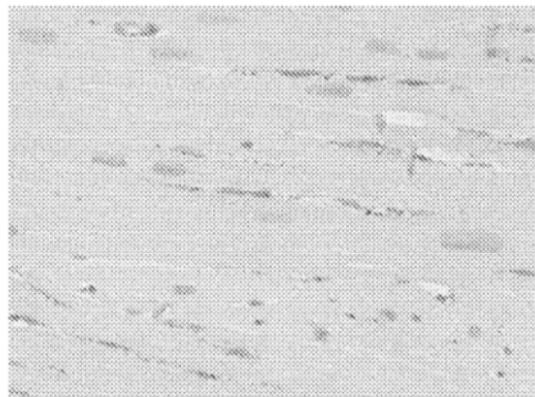


Figura 34: Corazón de un animal del grupo de tratamiento de 100 mg. Tinción positiva de células interstitiales por I2S. 40X

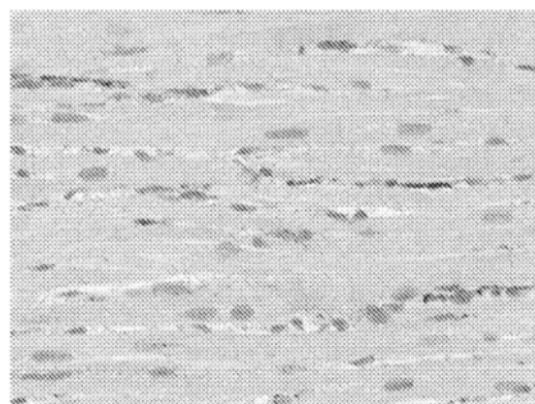


Figura 35: Corazón de un animal del grupo de tratamiento de 150 mg. Tinción fuertemente positiva de células interstitiales por I2S. 40X

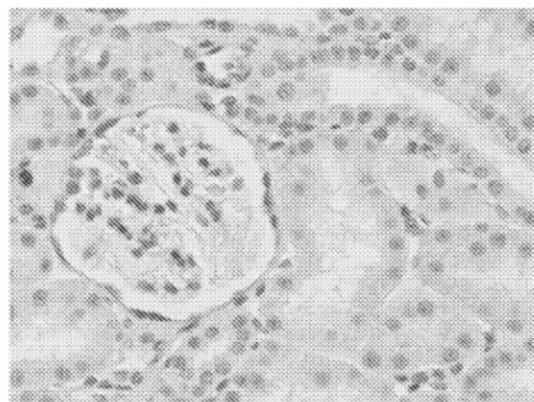


Figura 36: Riñón para animal de grupo de tratamiento de 3 mg. La inmunotinción I2S era negativa. 40X

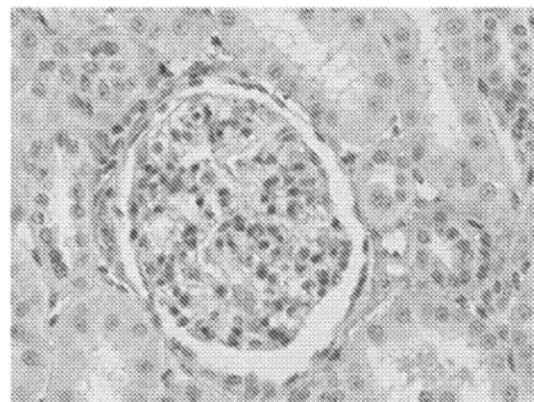


Figura 37: Riñón para animal de grupo de tratamiento de 30 mg. Las células glomerulares e intersticiales eran positivas por I2S.

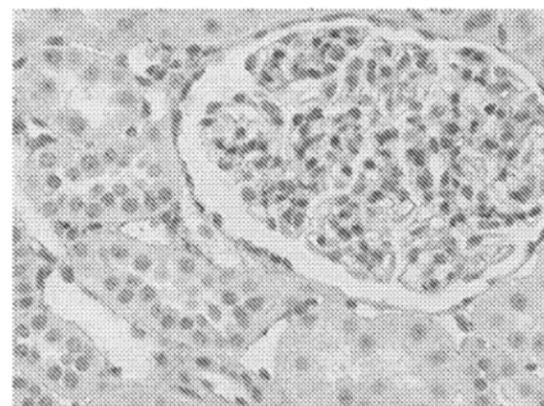


Figura 38: Riñón de un animal de grupo de tratamiento de 100 mg. Tinción aumentada de células glomerulares e intersticiales eran por I2S. 40X

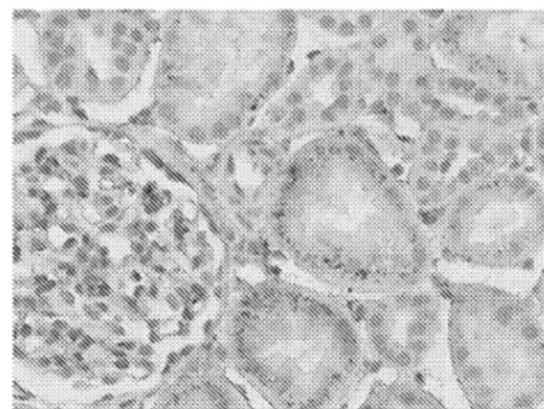
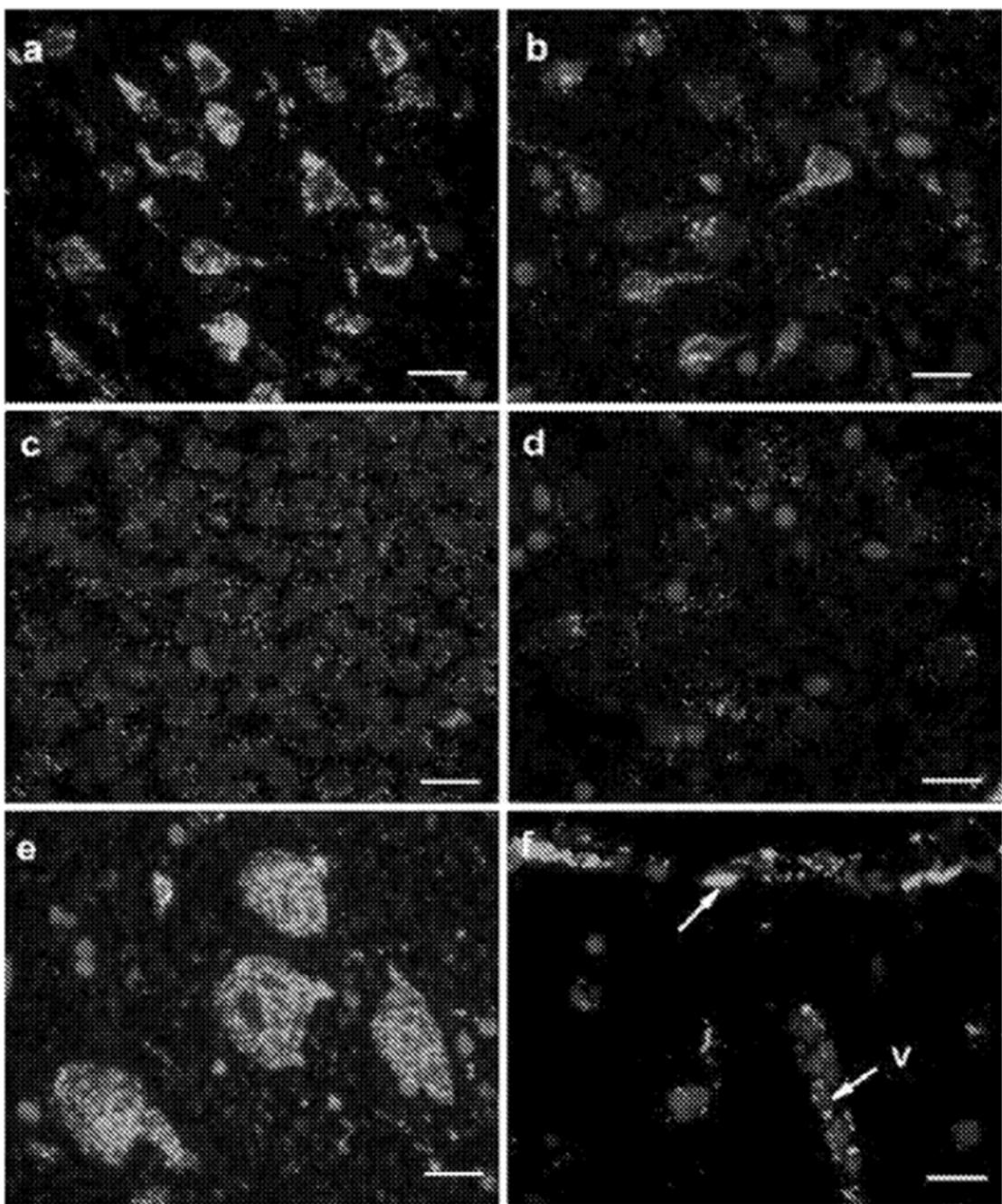
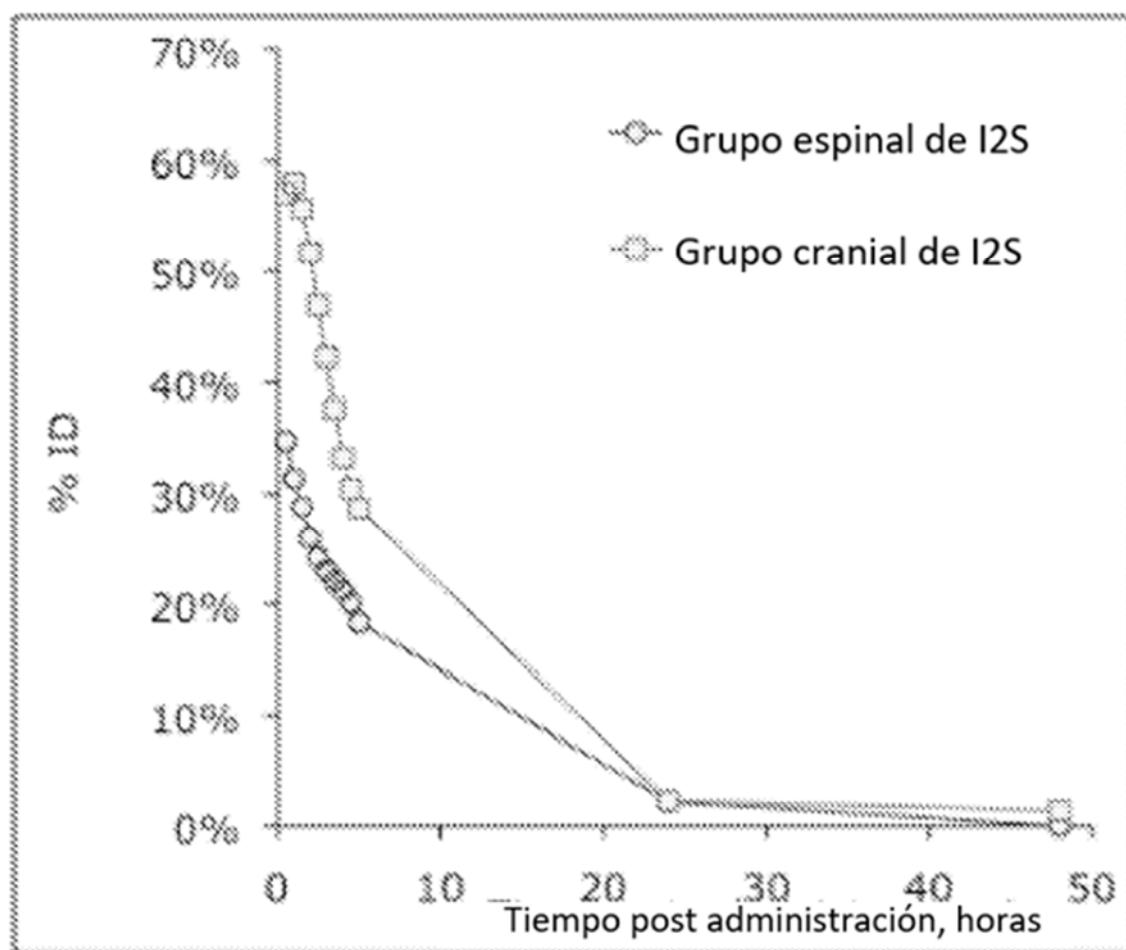


Figura 39: Riñón de un animal de grupo de tratamiento de 150 mg. Tinción positiva I2S de células proximales tubulares, glomerulares e intersticiales. 40X



**Figura:** 40



**Figura 41**

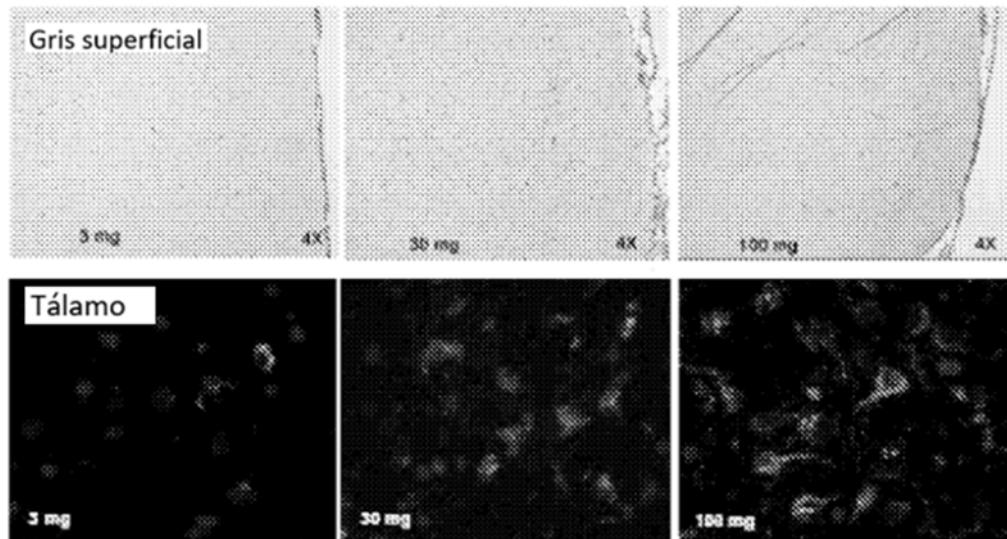


Figura 42

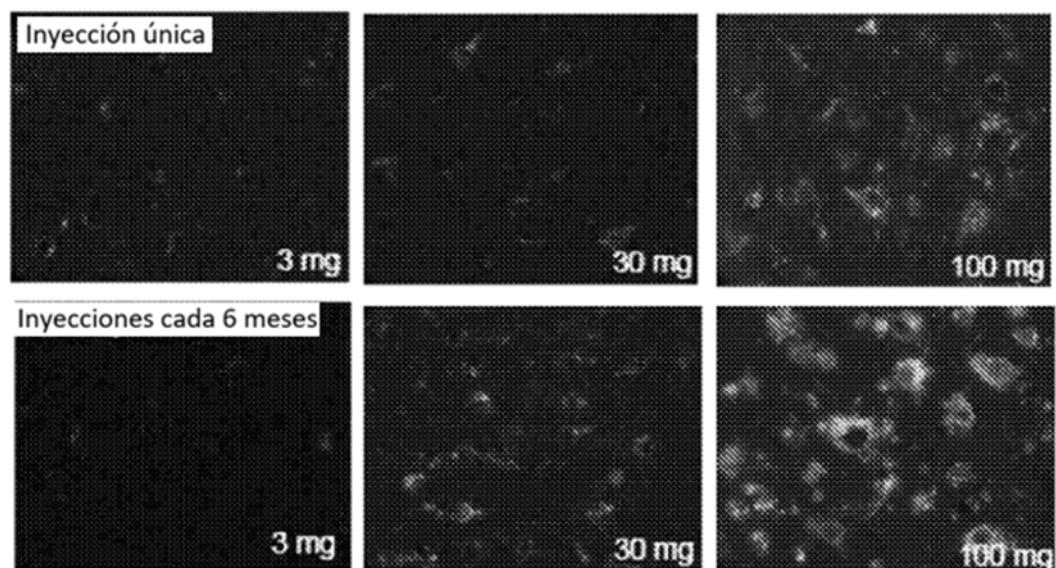


Figura 43

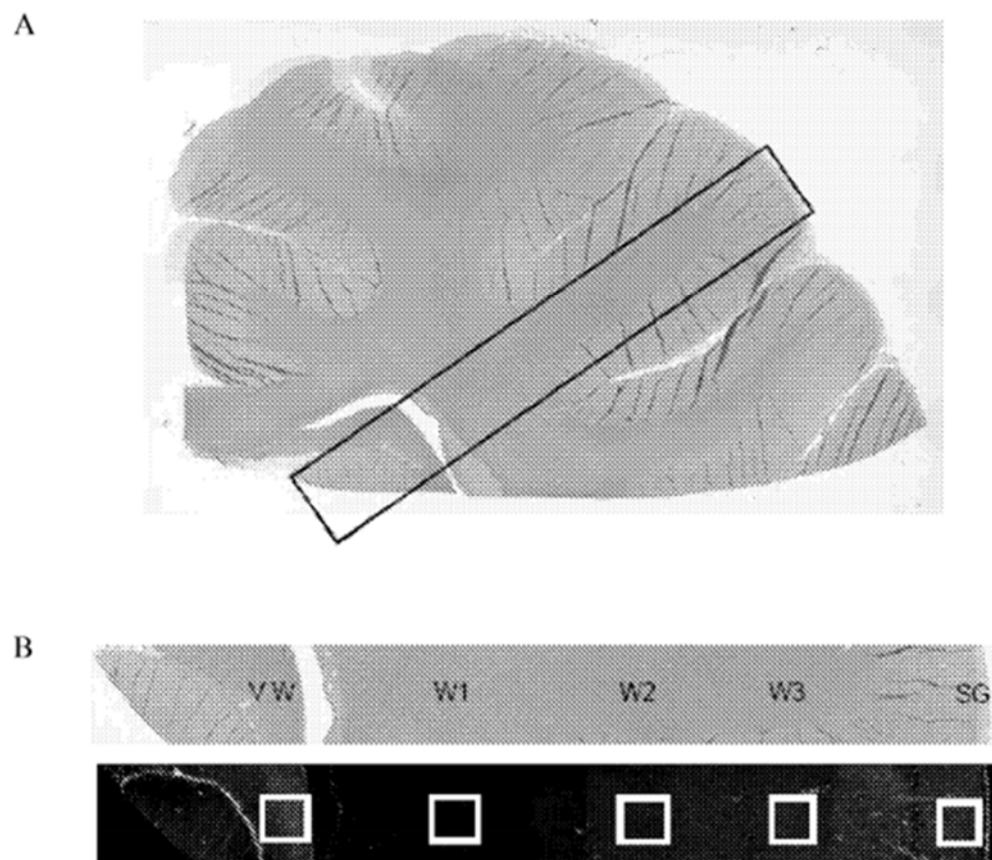
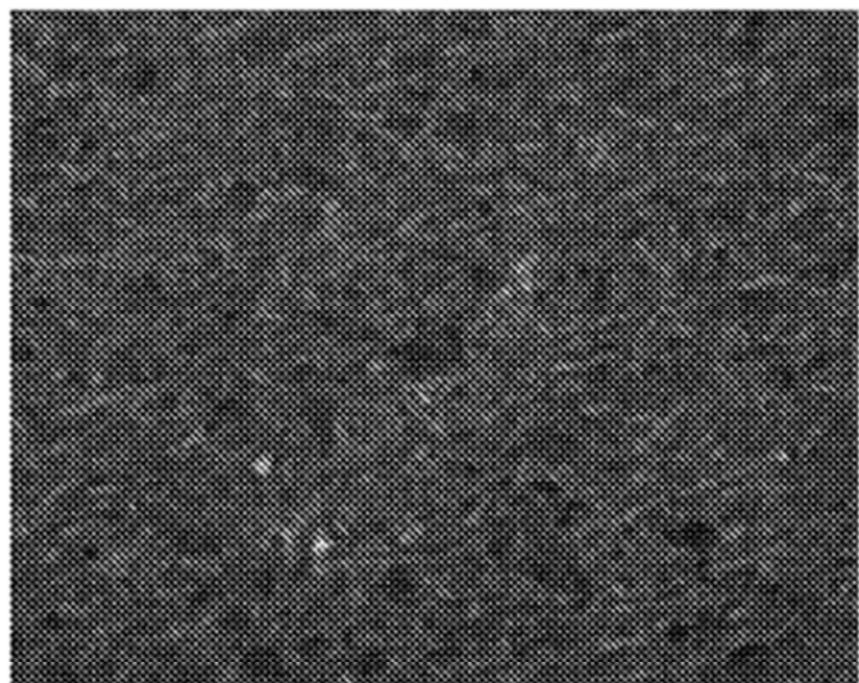
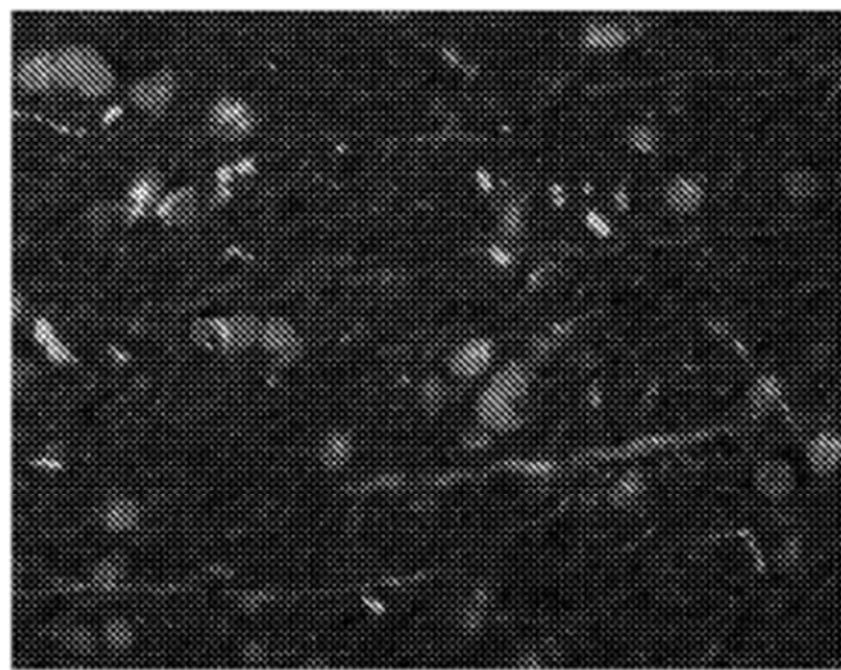


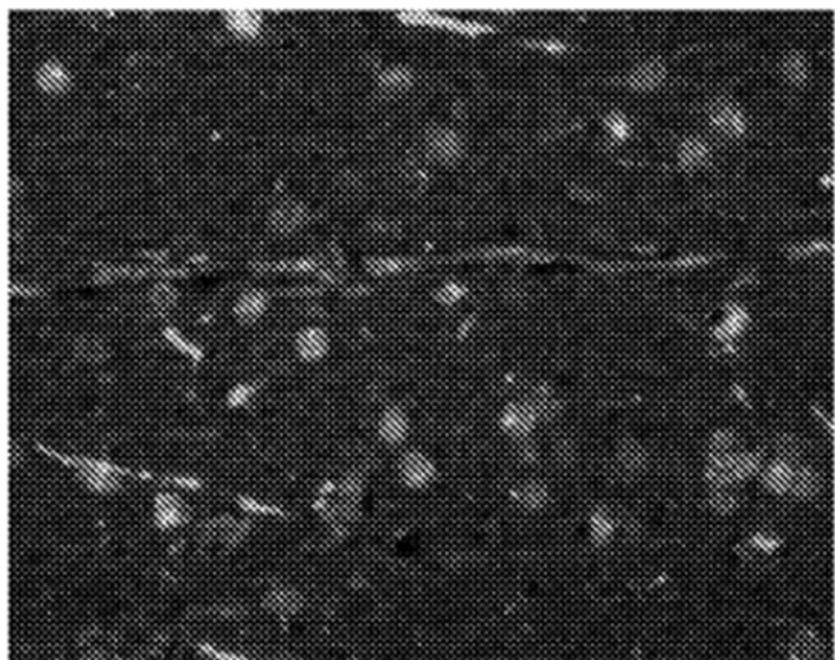
Figura 44



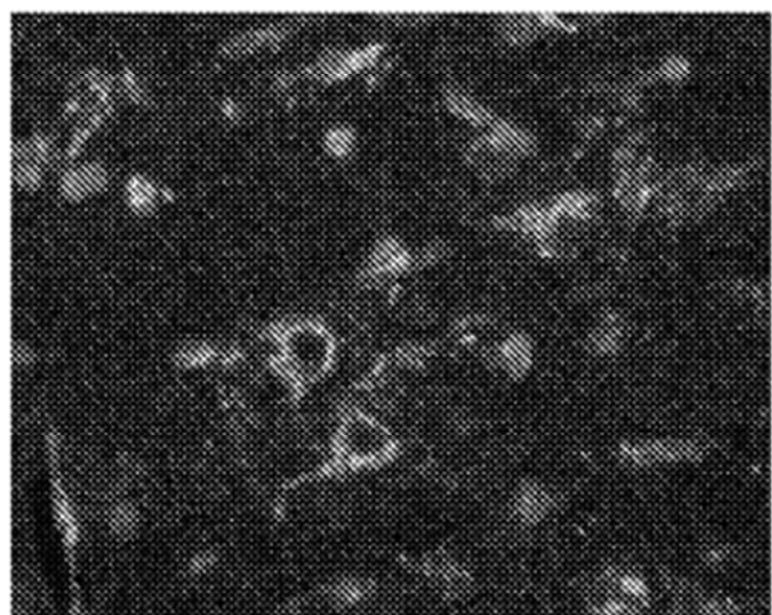
**Figura 45A**



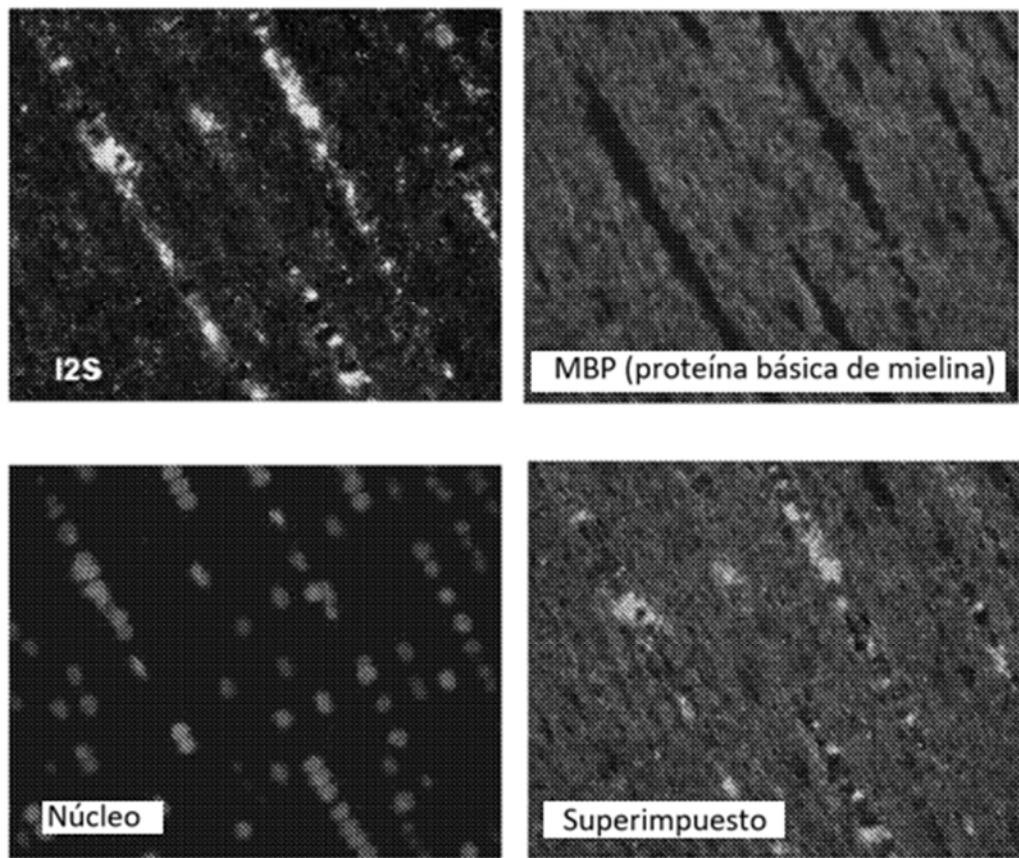
**Figura 45B**



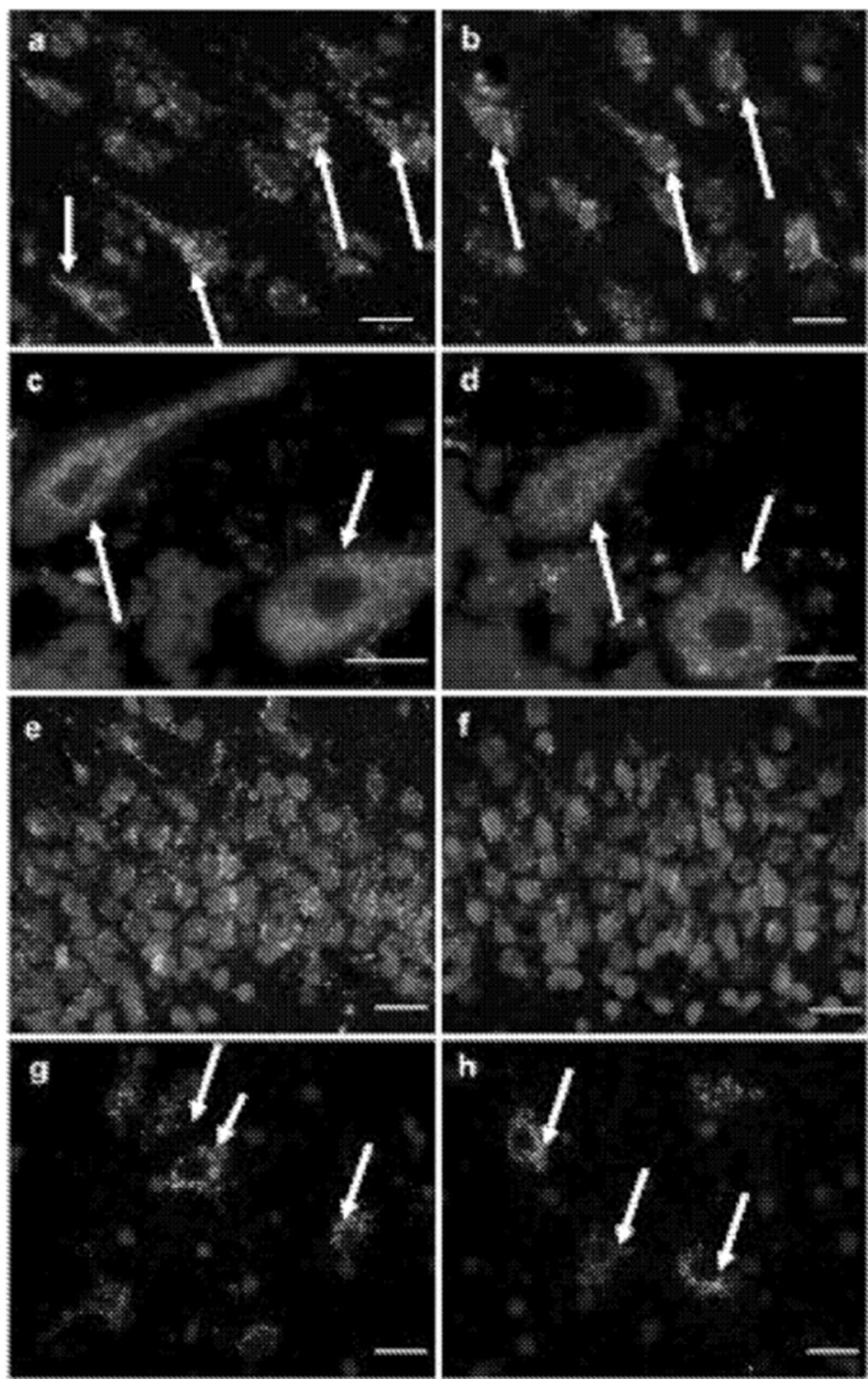
**Figura 45C**



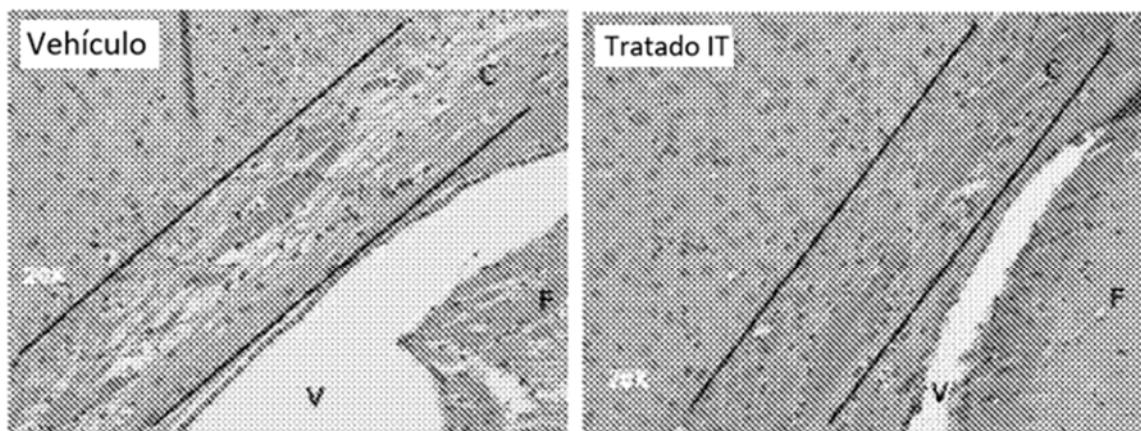
**Figura 45D**



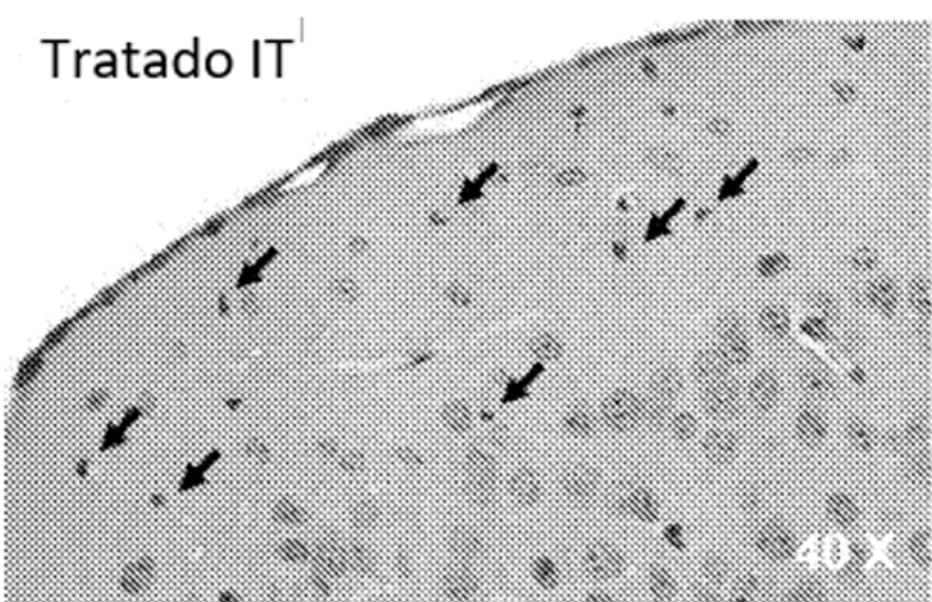
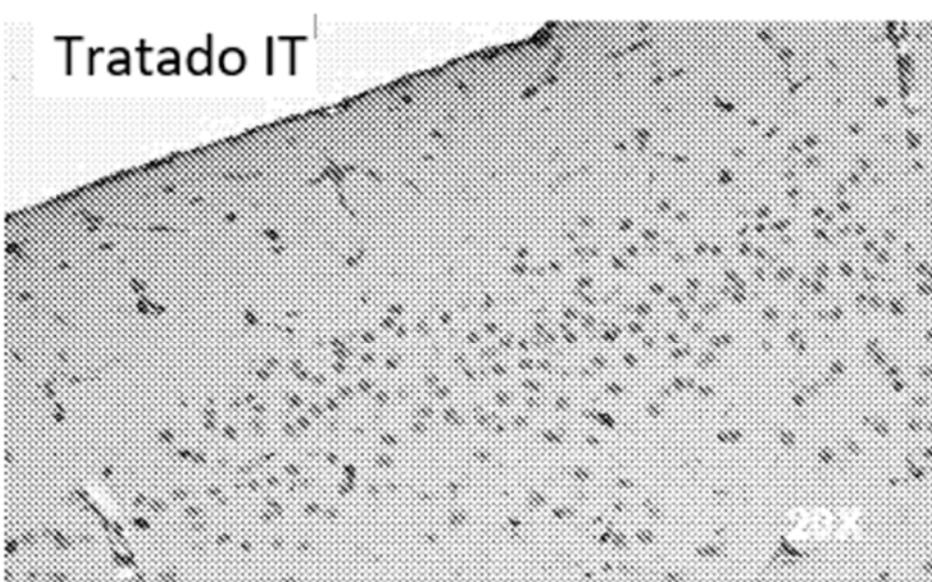
**Figura 46**



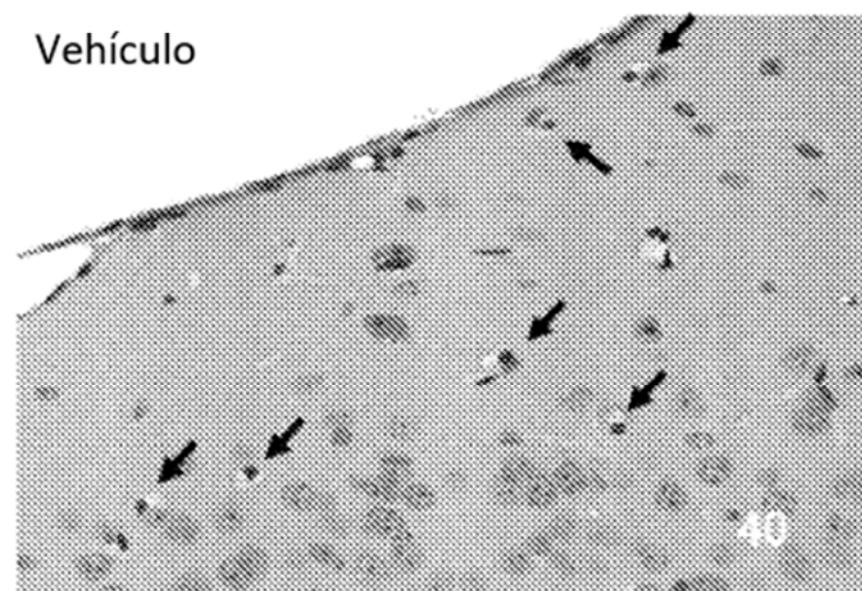
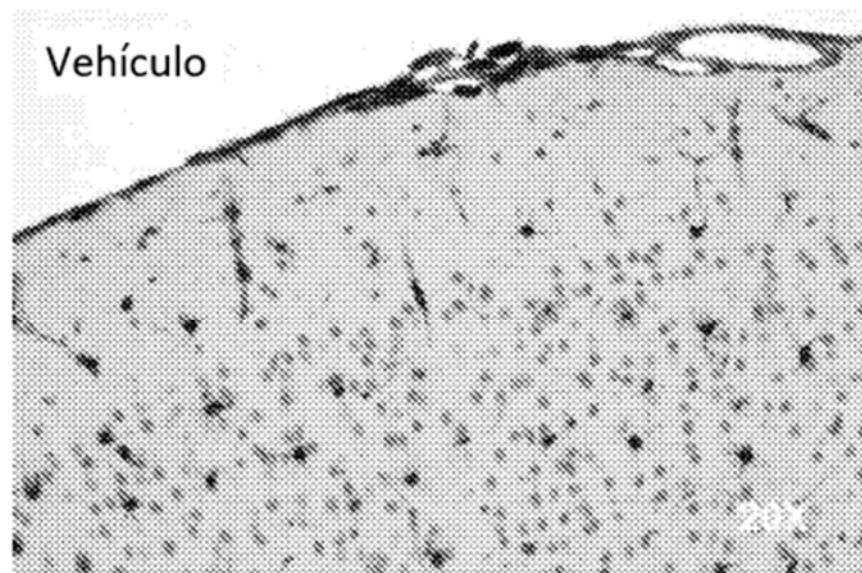
**Figura 47**



**Figura 48**



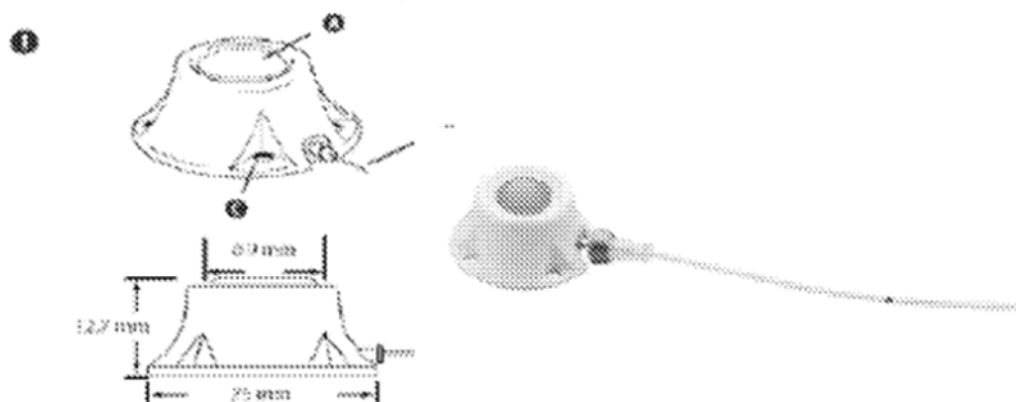
**Figura 49A**



**Figura 49B**

Componentes puerto A y dimensiones

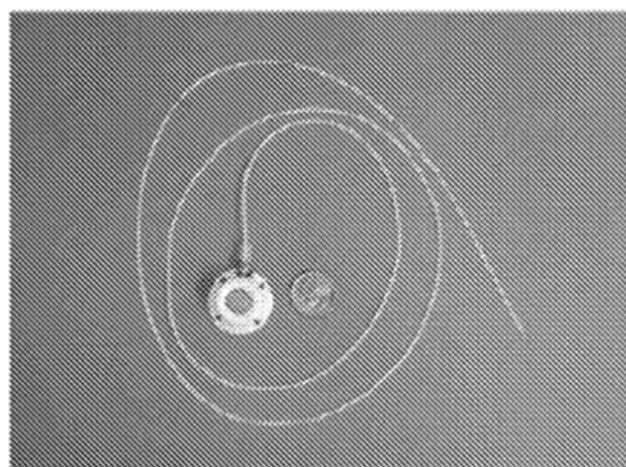
A - septa B - tubo de salida, C – agujero de sutura



Catéter con alambre de guía

**Figura 50**

Puerto-A-Cat sistema de acceso implantable intratecal de bajo perfil



**Figura 51**

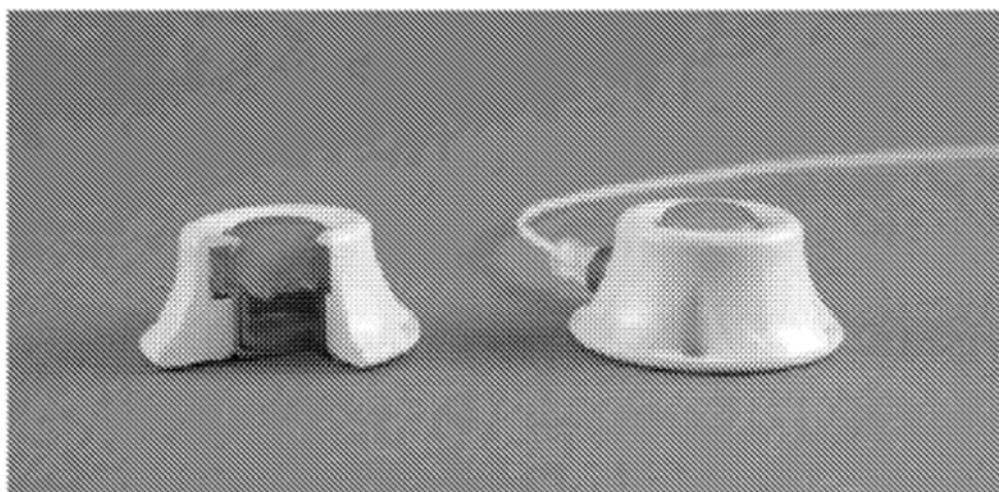


Figura 52

Permite administración en casa para CNS ERT con modificación mínima y desarrollo

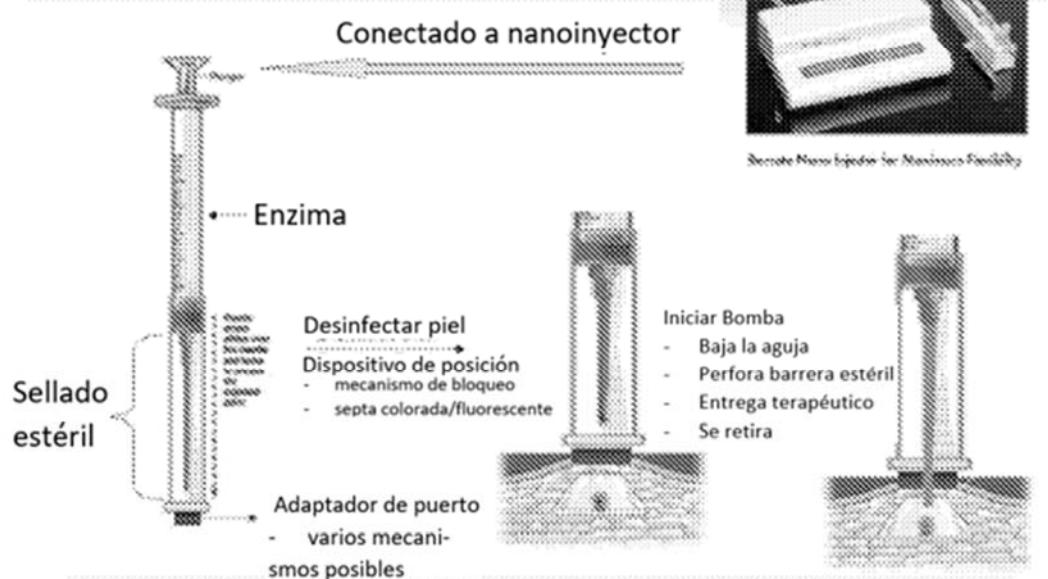


Figura 53

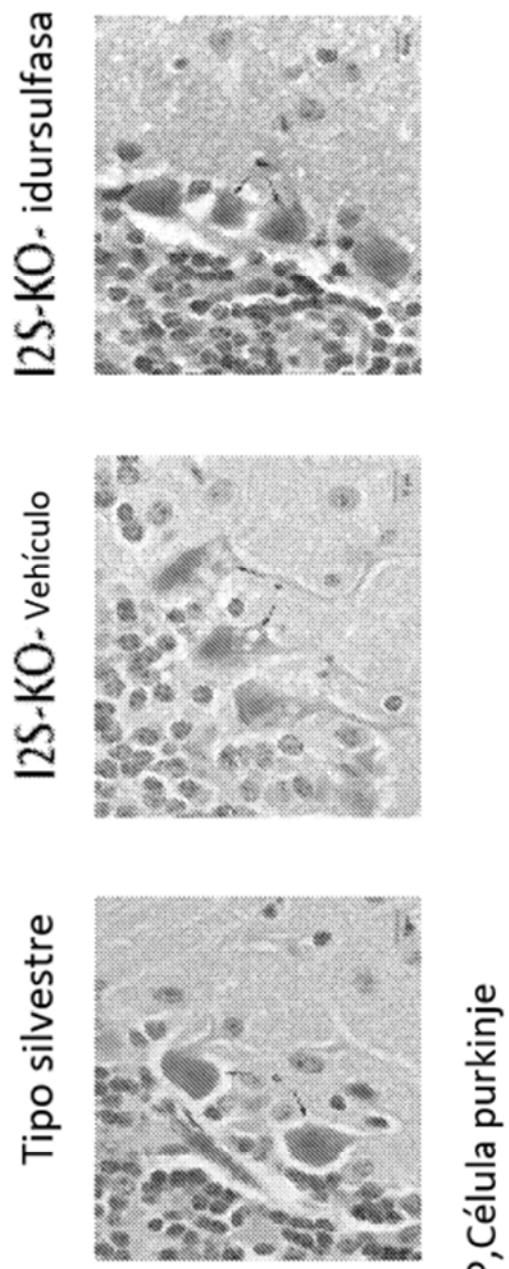


Figura 54: Efecto de vacuolización después de una sola inyección intra-cerebral de idursulfasa en neurones (células Purkinje)

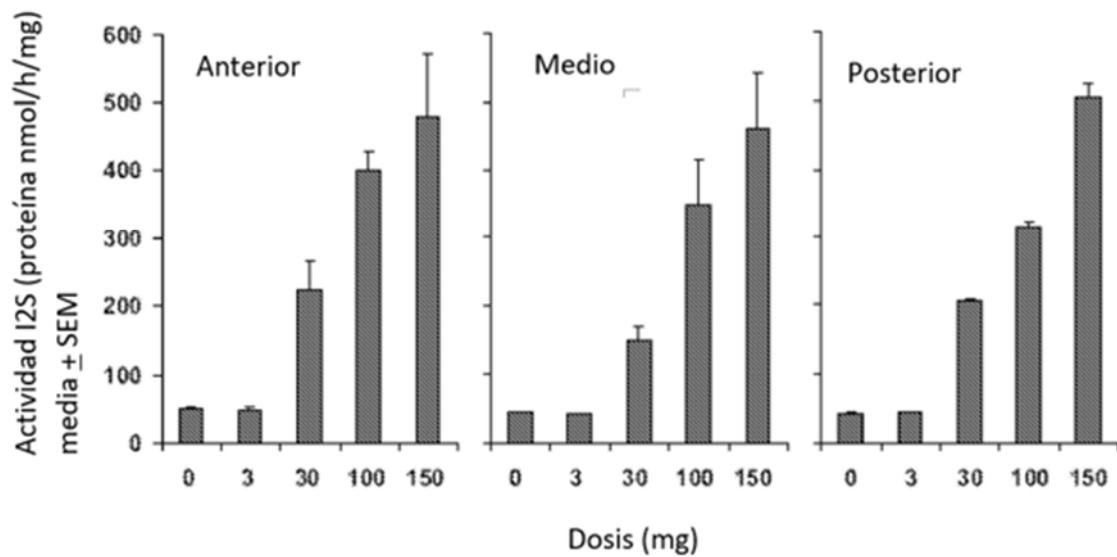
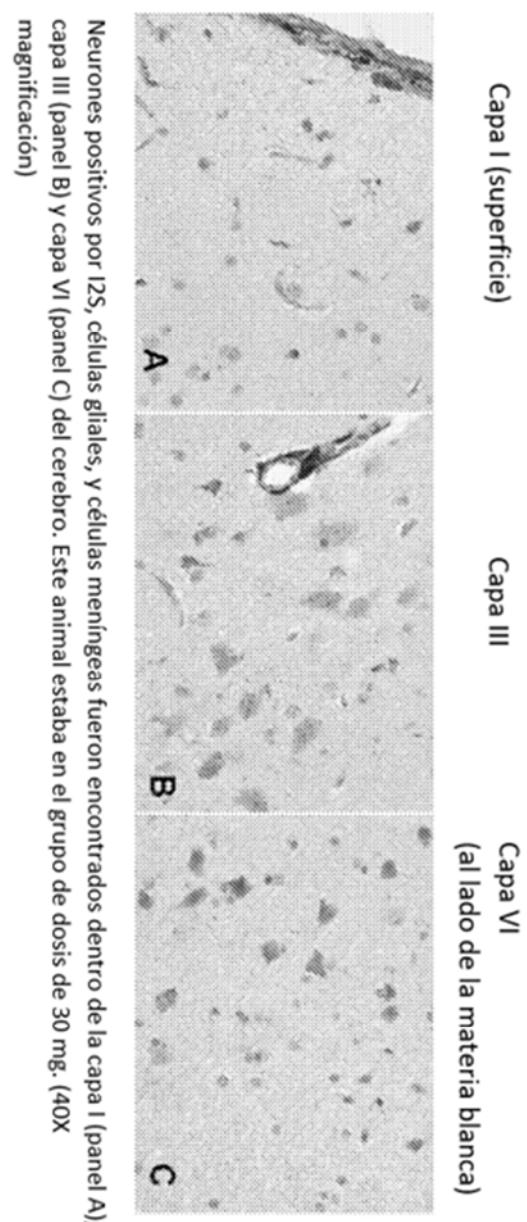


Figura 55: Actividad I2S en el cerebro por dosis y región.



Neuronas positivas por I2S, células gliales, y células meníngeas fueron encontrados dentro de la capa I (panel A), capa III (panel B) y capa VI (panel C) del cerebro. Este animal estaba en el grupo de dosis de 30 mg. (40X magnificación)

Grupo de dosis de 30 mg. Magnificación original = 40X.

Figura 56: Localización inmunohistoloquímica de idursulfasa en diferentes profundidades de la corteza cerebral

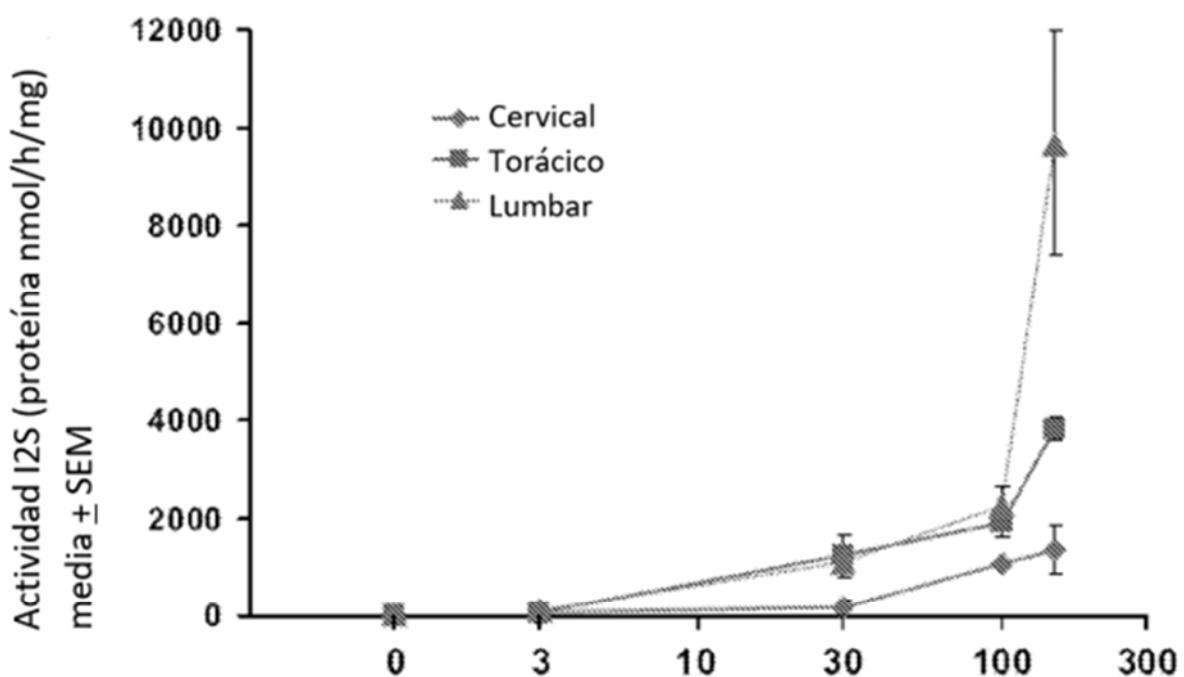


Figura 57: Actividad de I2S en la médula espinal de un mono después de la dosificación intratecal con idursulfasa.

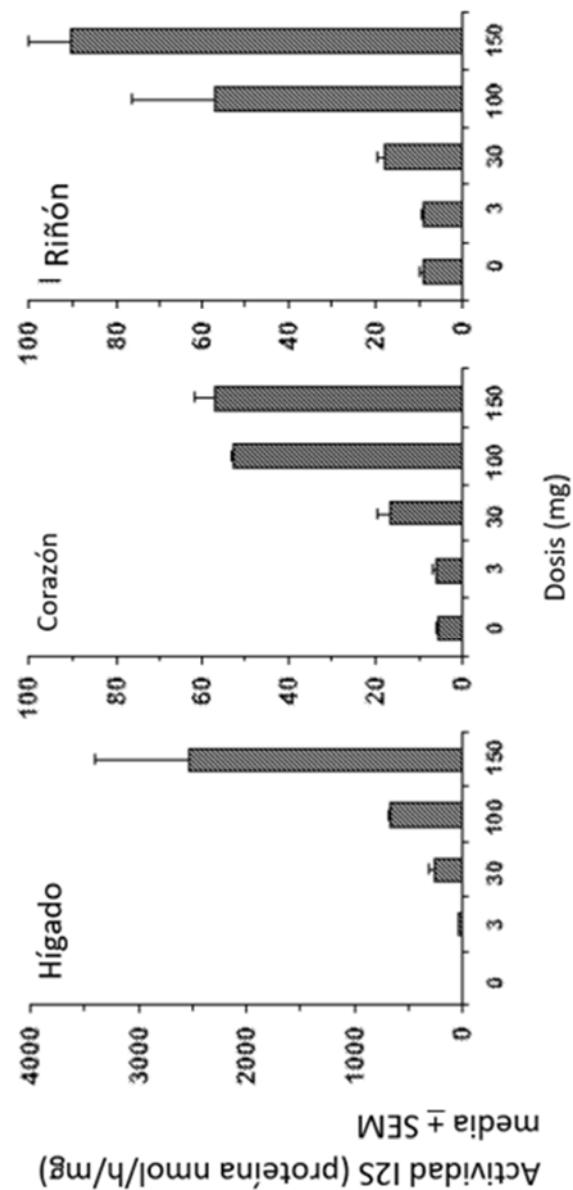


Figura 58: Actividad I2S en hígado, corazón, y riñón depusés de la dosificación con idursulfasa

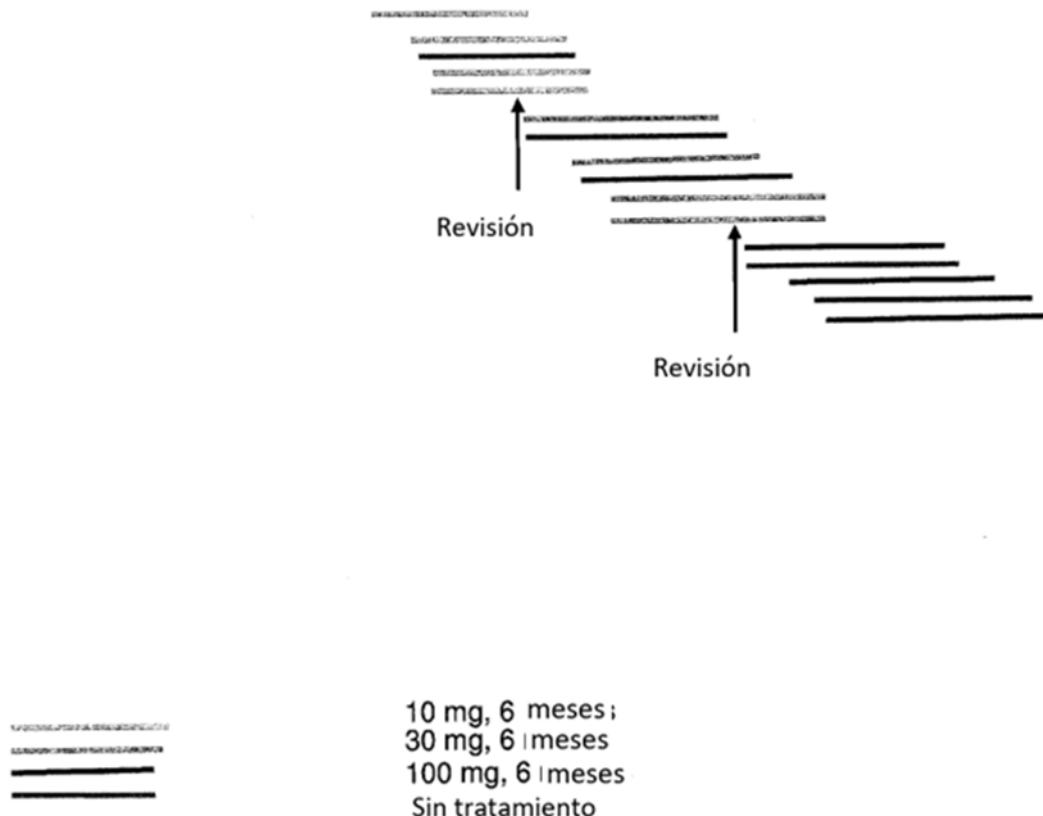
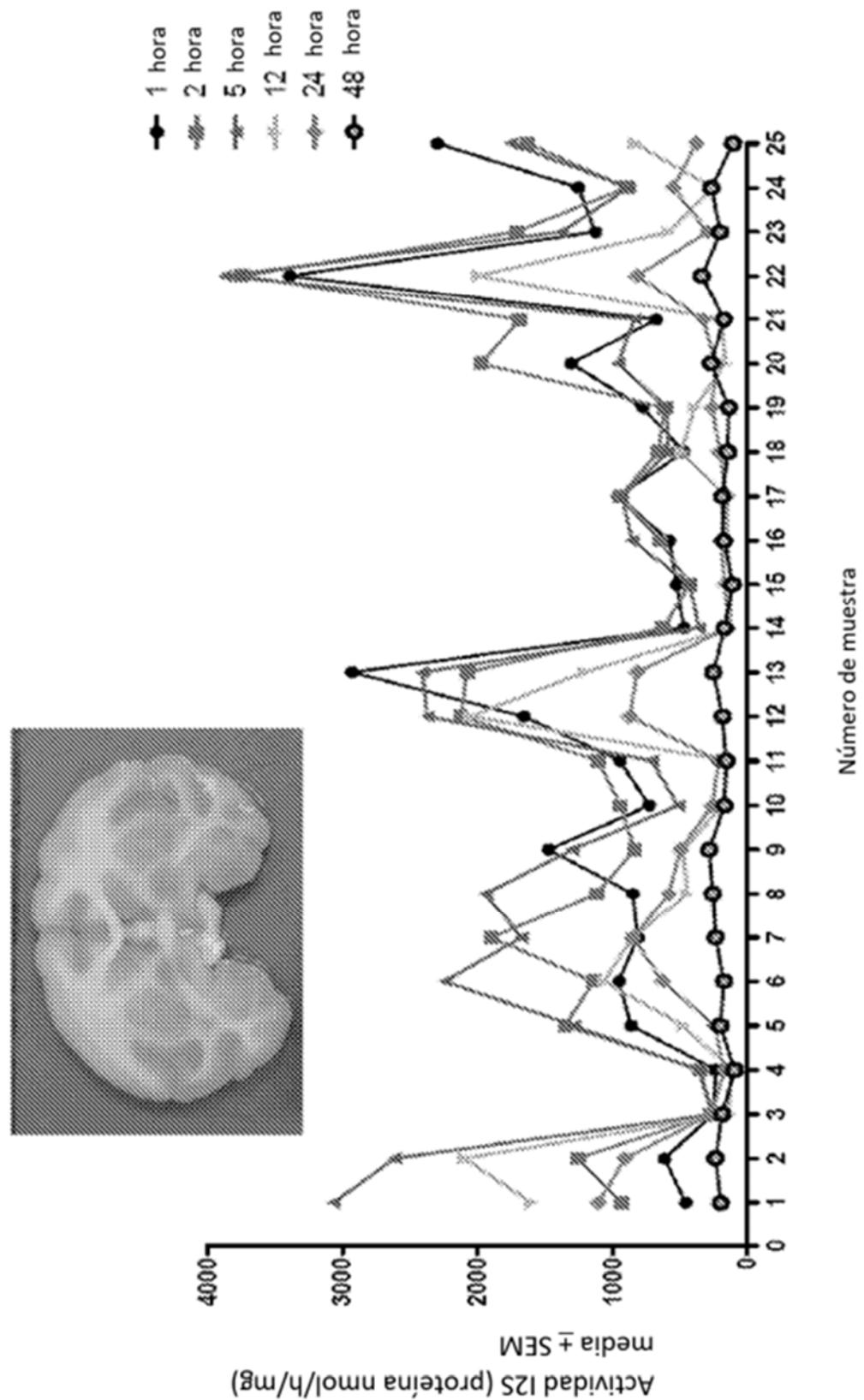
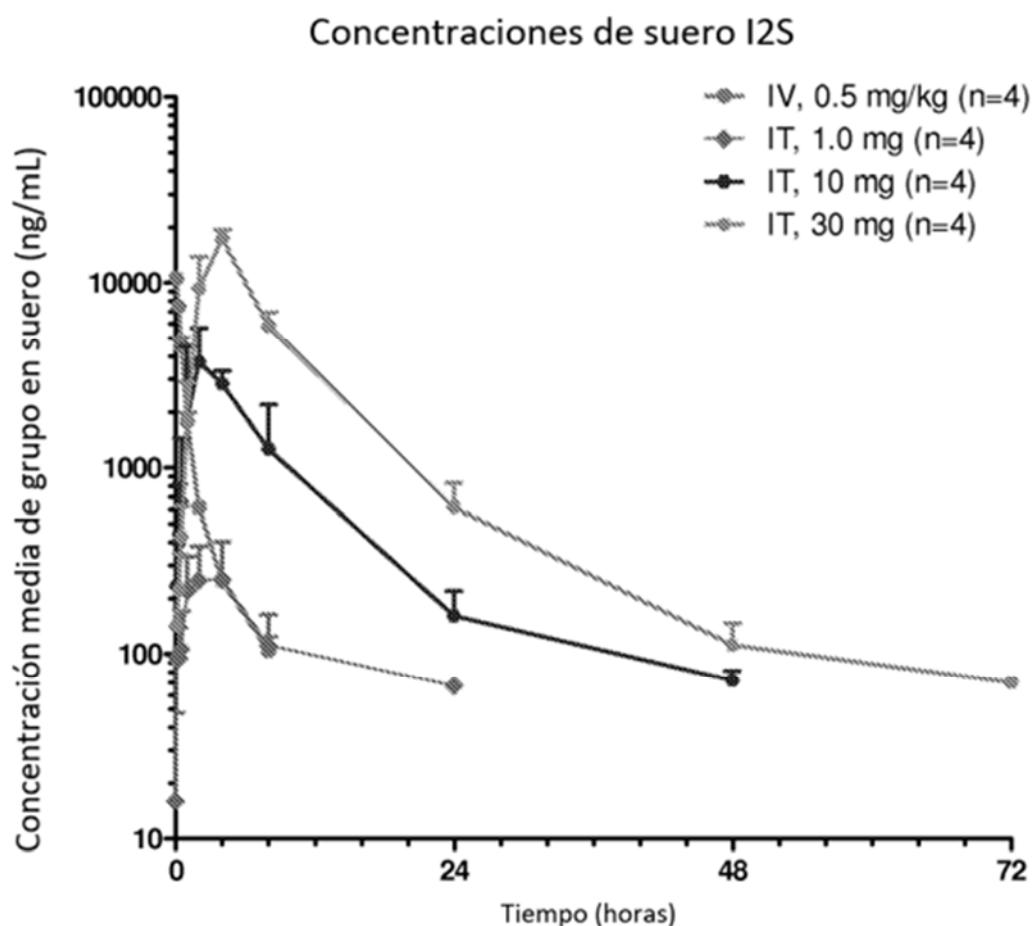
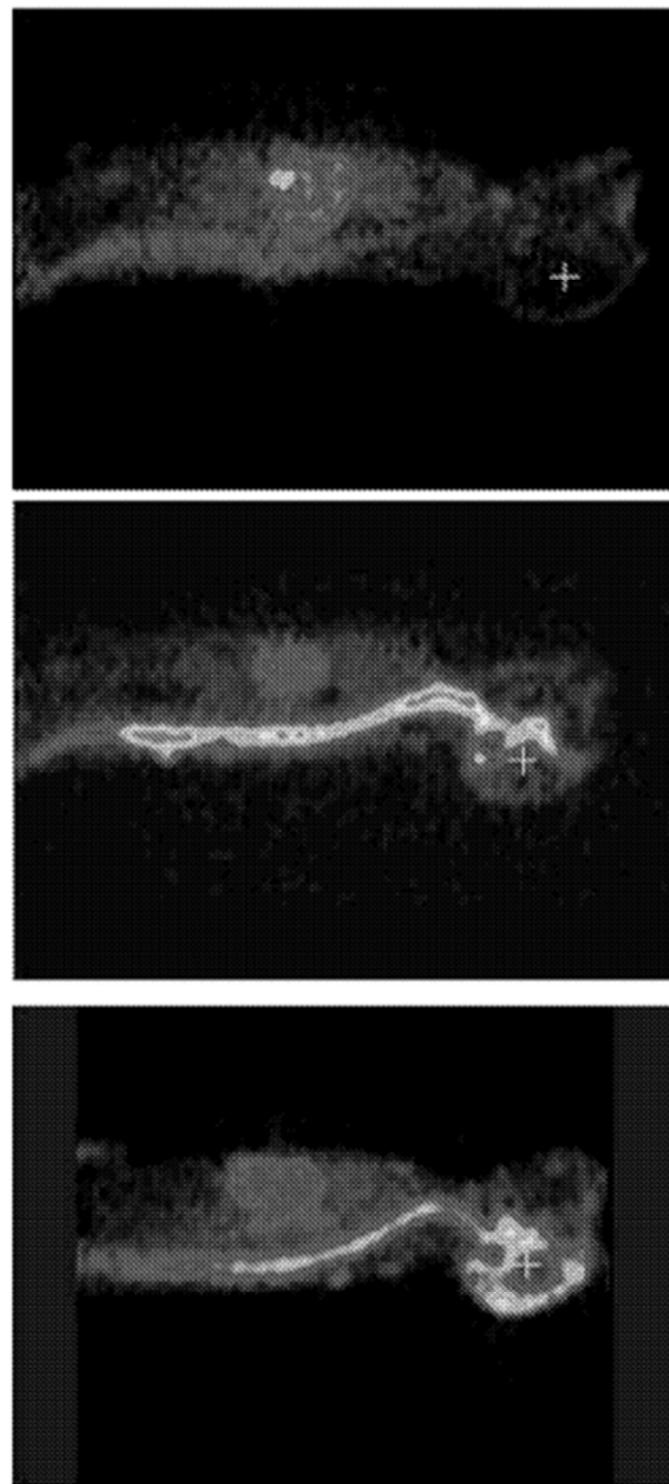


Figura 59: Incremento esquemático en un ensayo Hunter-IT

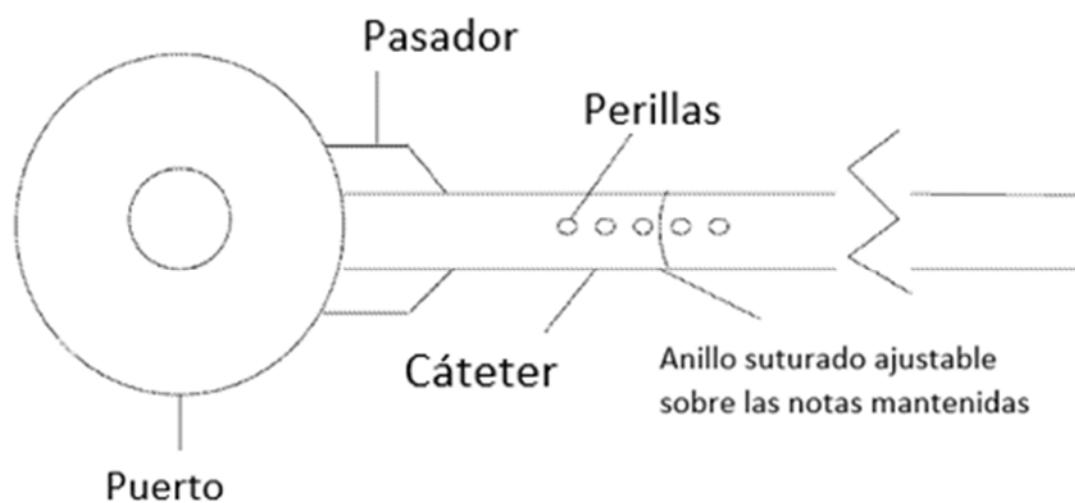
**Figura 60**



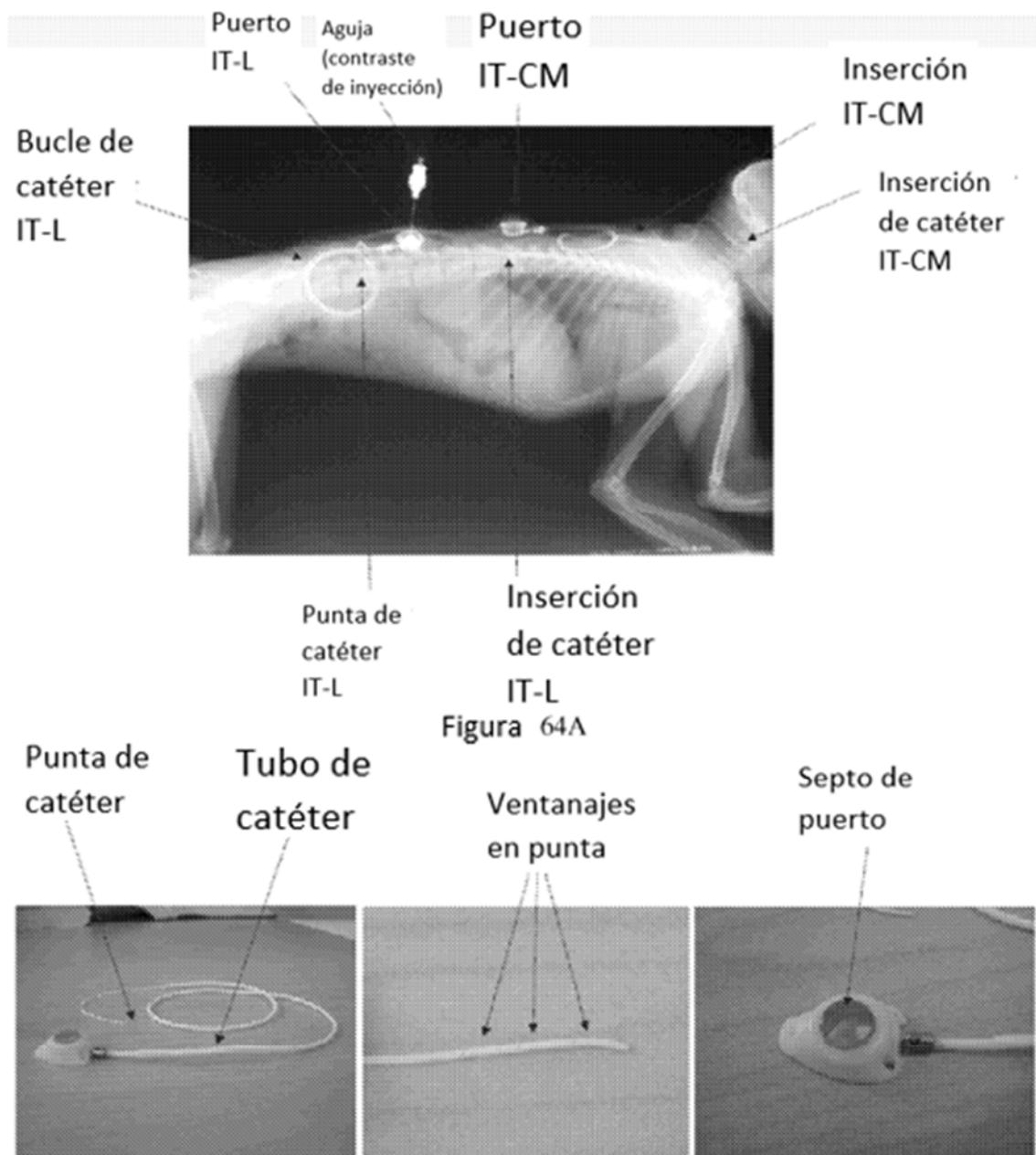
**Figura 61**

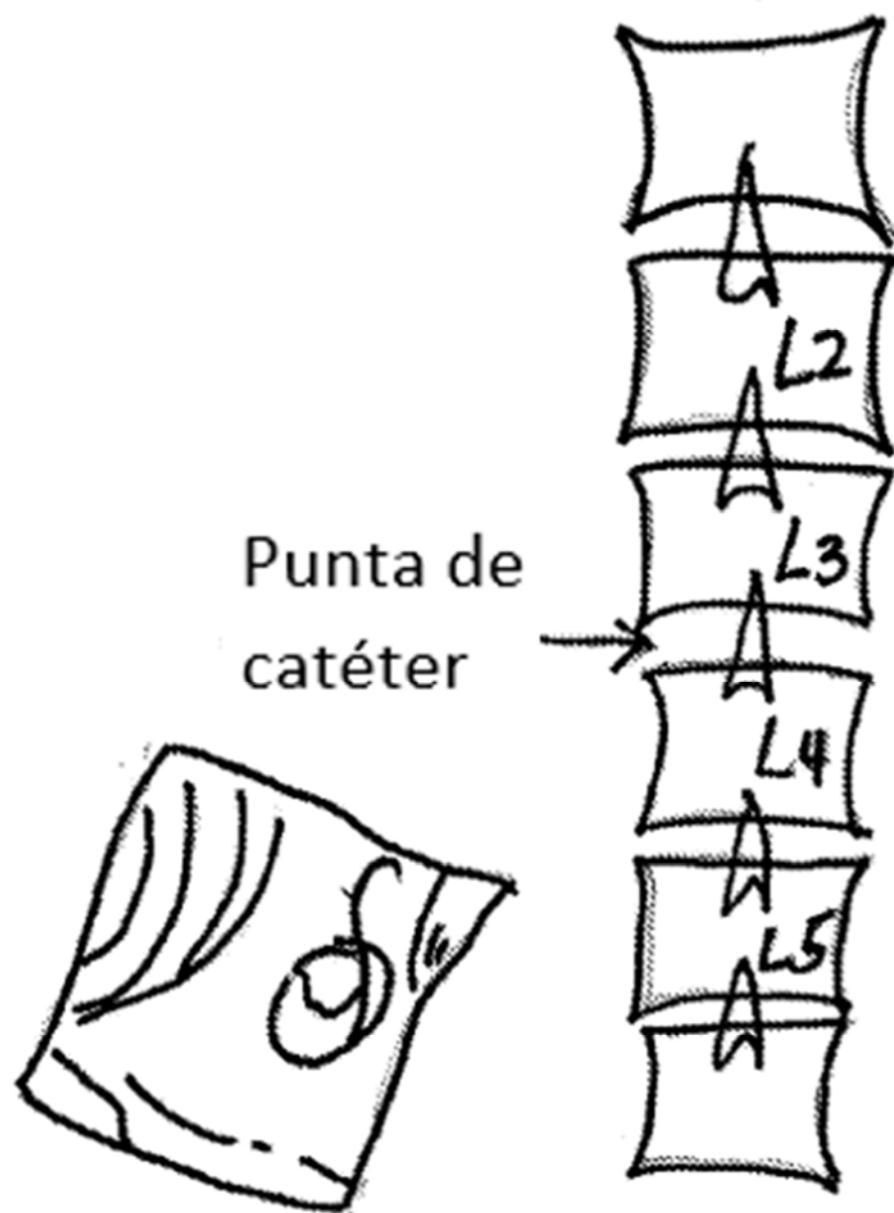


**Figura 62**



**Figura** 63





**Figura 64C**