

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 858 726**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/47 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 9/00 (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 16179150 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2020 EP 3103469**

(54) Título: **Administración de agentes terapéuticos al SNC**

(30) Prioridad:

25.06.2010 US 358857 P
01.07.2010 US 360786 P
29.09.2010 US 387862 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:
30.09.2021

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

SHAHROKH, ZAHRA;
CALIAS, PERICLES;
MCCAULEY, THOMAS;
POWELL, JAN;
PAN, JING;
PFEIFER, RICHARD;
CHARNAS, LAWRENCE y
WRIGHT, TERESA LEAH

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 858 726 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

Administración de agentes terapéuticos al SNC

5 ANTECEDENTES

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

La barrera hematoencefálica (BBB) es un sistema estructural comprendido por células endoteliales que funciona para proteger al sistema nervioso central (SNC) de sustancias deletéreas en la corriente sanguínea, tales como bacterias, macromoléculas (p.ej., proteínas) y otras moléculas hidrofílicas, limitando la difusión de tales sustancias a través de la BBB y hacia el fluido cerebroespinal subyacente (LCR) y SNC.

Hay varias formas de eludir a la BBB para aumentar la administración de un agente terapéutico en el cerebro incluyendo inyección intracraneal directa, permeabilización transitoria de la BBB y modificación del agente activo para alterar la distribución del tejido. La inyección intracraneal directa, permeabilización transitoria de la BBB y modificación del agente activo para alterar la distribución del tejido. Por ejemplo, Lee et al. FASEB J. 21, 2520-2527 (2007) demuestran que la administración de una dosis única intracerebroventricular de galactocerebrosidasas mejora la sobrevida en un modelo murino de leucodistrofia de células globoideas. La inyección directa de un agente terapéutico en el tejido cerebral elude completamente la vasculatura, pero sufre principalmente debido al riesgo de complicaciones (infección, daño tisular, respuesta inmune) incurrido por las inyecciones intracraneales y la mala difusión del agente activo desde el sitio de administración. Hasta la fecha, la administración directa de proteínas en la sustancia cerebral no ha alcanzado un efecto terapéutico significativo debido a las barreras de difusión y el volumen limitado del agente terapéutico que puede administrarse. Se ha estudiado la difusión asistida por convección a través de catéteres colocados en el parénquima cerebral usando infusiones lentas a largo plazo (Bobo, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 91, 2076-2080 (1994); Nguyen, et al. J. Neurosurg. 98, 584-590 (2003)), pero ninguna terapia aprobada usa actualmente este enfoque para la terapia a largo plazo. Además, la colocación de catéteres intracerebrales es muy invasiva y menos deseable como una alternativa clínica.

La inyección intratecal (IT), o la administración de proteínas al fluido cefalorraquídeo (LCR), también ha sido intentada pero no ha tenido éxito terapéutico. Por ejemplo, US 2009/017005 revela la administración IT de composiciones farmacéuticas que contienen fosfato de sodio como tampón a una concentración de 10-50 mM. Un ejemplar de composición farmacéutica de 0,58 mg/ml de iduronidasa fue formulado en un tampón que contenía 100 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl y 0,001% polisorbato 80. Un reto principal en el tratamiento de inyección IT ha sido la tendencia del agente activo a unirse muy estrechamente al recubrimiento ependimario del ventrículo lo cual evitaba la difusión posterior. Actualmente, no hay productos aprobados para el tratamiento de enfermedades genéticas cerebrales por administración directa al LCR.

De hecho, muchas personas han creído que la barrera a la difusión en la superficie del cerebro, así como la falta de efectiva y métodos convenientes de administración, era un obstáculo demasiado grande para alcanzar un efecto terapéutico adecuado en el cerebro para cualquier enfermedad.

Muchos trastornos de depósito lisosomal afectan el sistema nervioso y así muestran retos únicos en el tratamiento de estas enfermedades con las terapias tradicionales. A menudo hay un gran aumento de glicosaminoglicanos (GAGs) en las neuronas y meninges de los individuos afectados, conduciendo a varias formas de síntomas en el SNC. Hasta la fecha, ningún síntoma en el SNC resultante de un trastorno lisosomal ha sido tratado con éxito por ningún medio disponible.

Así, hay aún una gran necesidad de administrar efectivamente agentes terapéuticos al cerebro. Más particularmente, hay una gran necesidad para una administración más efectiva de agentes activos al sistema nervioso central para el tratamiento de trastornos del depósito lisosomal.

60 RESUMEN

En la presente se divulga un enfoque efectivo y menos invasivo para la administración directa de agentes terapéuticos al sistema nervioso central (SNC). La presente invención está basada, en parte, en el descubrimiento inesperado que una enzima de reemplazo para una enfermedad de depósito lisosomal puede introducirse directamente en el fluido cerebroespinal (LCR) de un sujeto que necesita una concentración elevada

(p.ej., mayor de aproximadamente 10 mg/ml o más) de forma que la enzima difunda efectiva y extensamente a través de varias superficies y penetre varias regiones a través del cerebro, incluyendo las regiones cerebrales profundas. Más sorprendente, estos inventores han demostrado que puede alcanzarse la administración de una alta concentración de la proteína usando formulaciones simples de solución fisiológica o basada en tampón y sin inducir efectos adversos sustanciales, como respuesta inmune severa, en el sujeto. Por tanto, la presente invención usa un enfoque altamente eficiente, clínicamente deseable y agradable para el paciente para la administración directa al SNC para el tratamiento de enfermedades de depósito lisosomal. La presente invención representa un avance significativo en el campo de la focalización del SNC y terapia de reemplazo enzimático.

En la presente se divultan métodos de administración IT de un agente terapéutico (p.ej., una enzima de reemplazo) a un sujeto en necesidad de tratamiento. Una enzima de reemplazo puede ser una enzima recombinante, activada genéticamente o natural. Como se usa en este documento, los términos «administración intratecal», «inyección intratecal», «administración intratecal», o equivalentes gramaticales, se refieren a una inyección en el canal medular (espacio intratecal que rodea la médula espinal). En algunas realizaciones, «administración intratecal» o «suminsitro intratecal» se refiere a la administración IT a través del área o región lumbar, es decir, la administración IT lumbar o entrega. Como se expresa en este documento, el término «región lumbar» o «área lumbar» se refiere al área entre la tercera y cuarta vértebras lumbares (espalda baja) y, más específicamente, la región L2-S1 de la columna. Se contempla que la administración IT lumbar se distingue de la administración en la cisterna magna (es decir, la inyección en el espacio alrededor y debajo del cerebelo a través de la abertura entre el cráneo y la parte superior de la columna) en cuanto a que la administración IT lumbar de acuerdo con nuestra invención proporciona una administración mejor y más efectiva al canal medular distal, mientras que la administración de la cisterna magna, entre otras cosas, no alcanza bien el canal medular distal.

La invención está dirigida a una composición farmacéutica acuosa que comprende un agente de tamponamiento, un surfactante y un tonicificador y que tiene un pH de 5,5 a 6,5 para su uso en el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento lisosomal en un sujeto, en donde dicha composición comprende una enzima lisosomal a una concentración de más de aproximadamente 10 mg/ml, en donde el agente de tamponamiento es fosfato y está presente a una concentración de hasta 20 mM, y en donde la composición se administra por vía intratecal, intraventricular o intracisternal. La enzima lisosomal puede estar a una concentración de más de aproximadamente 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml o 100 mg/ml.

En algunas realizaciones, la composición se administra en un volumen de una dosis menor de 15 ml (p.ej., menos de 10 ml, 9 ml, 8 ml, 7 ml, 6 ml, 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1,5 ml, 1,0 ml, o 0,5 ml).

En algunas realizaciones, la administración intratecal de la composición no resulta en un efecto adverso sustancial en el sujeto. En ciertas realizaciones, la administración intratecal de la composición no resulta en una respuesta inmune adaptativa mediada por linfocitos T.

En algunas realizaciones, el tejido o tejidos cerebrales a los cuales se administra la enzima comprende un tejido meníngeo. En algunas realizaciones, el tejido meníngeo se selecciona del grupo consistente en piamadre, duramadre y tejido aracnoideo.

En algunas realizaciones, el tejido o tejidos cerebrales a los cuales se administra la enzima comprende un tejido del cerebro. En ciertas realizaciones, el tejido meníngeo del cerebro es una superficie o tejido superficial del cerebro. En ciertas realizaciones, la superficie o tejido superficial del cerebro se selecciona a partir del grupo consistente en los tejidos de la piamadre, tejidos de la cinta cortical cerebral, hipocampo, tejidos a 4 mm de la superficie del cerebro, espacio de 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 y proyecciones olfatorias y sus combinaciones.

En algunas realizaciones, el tejido cerebral al cual se administra la enzima es un tejido profundo del cerebro. En ciertas realizaciones, el tejido profundo del cerebro se selecciona a partir del grupo consistente en los tejidos internos a la cinta cortical cerebral, hipocampo, tejidos por debajo de 4 mm de la superficie del cerebro, tejidos debajo de 6 mm de la superficie del cerebro, tejidos debajo de 10 mm de la superficie del cerebro, el disencéfalo, el hipotálamo, tálamo, pretálamo y subtálamo, el mesencéfalo, los pedúnculos cerebrales, el núcleo rojo, el núcleo del nervio craneal III, la sustancia gris profunda, los núcleos lentiformes, los ganglios basales, el caudado, putamen, amígdala, globus pallidus y sus combinaciones.

En algunas realizaciones, el tejido o tejidos cerebrales a los cuales se administra la enzima comprenden un tejido del cerebelo. En ciertas realizaciones, el tejido del cerebro se selecciona a partir del grupo consistente en los tejidos de la capa molecular, tejidos de la capa celular de Purkinje, tejidos de la capa celular granular, pedúnculos cerebelosos, y sus combinaciones. En algunas realizaciones, el tejido del cerebelo es un tejido profundo del cerebelo. En ciertas realizaciones, el tejido profundo del cerebro se selecciona a partir del grupo consistente en los tejidos de la capa de las células de Purkinje, tejidos de la capa de células granulares, tejido de

la sustancia blanca cerebelosa profunda, y tejidos de los núcleos cerebelosos profundos.

5 En algunas realizaciones, el tejido o tejidos cerebrales a los cuales se administra la enzima comprende un tejido del tronco encefálico. En ciertas realizaciones, el tejido del tronco encefálico se selecciona a partir del grupo consistente en los tejidos de la sustancia blanca del tronco encefálico y/o tejido de los núcleos del tronco encefálico.

10 En algunas realizaciones, el tejido o tejidos de la médula espinal a los cuales se administra la enzima es una superficie o tejido superficial de la médula espinal. En ciertas realizaciones, la superficie o tejido superficial de la médula espinal se selecciona a partir del grupo consistente en la piamadre, los tractos de sustancia blanca, y el tejido a 4 mm de la superficie de la médula espinal. En algunas realizaciones, el tejido o tejidos de la médula espinal es un tejido profundo de la médula espinal. En ciertas realizaciones, el tejido profundo de la médula espinal se selecciona a partir del grupo consistente en las células de la sustancia gris y ependimarias de la médula espinal, y el tejido por debajo de 4 mm de la superficie de la médula espinal.

15 15 En algunas realizaciones, el tejido o tejidos cerebrales a los cuales se administra la enzima comprende la superficie o los tejidos superficiales. En ciertas realizaciones, la superficie o tejido superficial se selecciona a partir del grupo consistente en los tejidos de la piamadre, duramadre y tejidos aracnoideos de los tejidos meníngeos, piamadre, tejidos de la cinta cortical cerebral, tejidos dentro de 4 mm de la superficie de la superficie del cerebro, y sus combinaciones.

20 25 En algunas realizaciones, los tejidos a los cuales se administra la enzima comprenden tejidos profundos. En ciertas realizaciones, los tejidos cerebrales profundos se seleccionan a partir de la sustancia blanca profunda, del cerebro, sustancia gris profunda de la médula espinal, cuerpo calloso, tejido periventricular, tálamo, ganglios basales, disencéfalo, fimbrias, tejidos debajo de la cinta cortical cerebral, tejidos por debajo de 4 mm de la superficie del cerebro, tejidos por debajo de 6 mm de la superficie de la superficie del cerebro, tejidos debajo de 10 mm de la superficie de la superficie del cerebro, capa de células de Purkinje, tejidos de la capa de células granulares, tejido de la sustancia blanca cerebelosa profunda, y tejidos de los núcleos cerebelosos profundos, y sus combinaciones.

30 35 En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente efectiva está entre 0,005 mg/kg de peso cerebral a 100 mg/kg de peso cerebral. En ciertas realizaciones, la dosis terapéuticamente efectiva es mayor de 1 mg/kg de peso cerebral (p.ej., mayor de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 mg/kg de peso cerebral). En ciertas realizaciones, la dosis terapéuticamente efectiva es mayor de 10 mg/kg de peso cerebral. En ciertas realizaciones, la dosis terapéuticamente efectiva es mayor de 30 mg/kg de peso cerebral.

40 45 En algunas realizaciones, el intervalo de administración es de una vez cada dos semanas. En algunas realizaciones, el intervalo de administración es de una vez cada mes. En algunas realizaciones, el intervalo de administración es de una vez cada dos meses. En algunas realizaciones, el intervalo de administración es dos veces al mes. En algunas realizaciones, el intervalo de administración es de una vez cada semana. En algunas realizaciones, el intervalo de administración es de dos veces o varias veces por semana. En algunas realizaciones, la administración es continua, como a través de una bomba de perfusión continua.

50 55 En algunas realizaciones, la enzima lisosomal se administra a un tejido cerebral profundo al menos 5 mm por debajo de la superficie externa (p.ej., al menos 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm, 10 mm, 11 mm, 12 mm, o más profundo por debajo de la superficie externa). En algunas realizaciones, la enzima de reemplazo se administra a un tejido cerebral profundo al menos 10 mm por debajo de la superficie externa. En ciertas realizaciones, la enzima de reemplazo se administra específicamente a los lisosomas celulares del tejido cerebral profundo.

60 65 En algunas realizaciones, los tejidos cerebrales profundos a los cuales se administra la enzima se selecciona a partir de la sustancia blanca profunda, del cerebro, sustancia gris profunda de la médula espinal, cuerpo calloso, tejido periventricular, tálamo, fimbrias, tejidos por debajo de la cinta cortical, tejidos por debajo de 4 mm de la superficie del cerebro, tejidos por debajo de 6 mm de la superficie del cerebro, tejidos por debajo de 10 mm de la superficie del cerebro, capa de células de Purkinje, tejidos de la capa de células granulares, tejido de la sustancia blanca cerebelosa profunda, tejidos de los núcleos cerebelosos profundos, y sus combinaciones.

70 75 En algunas realizaciones, la enfermedad por depósito lisosomal se selecciona del grupo consistente en aspartilglicosaminuria, enfermedad por depósito de éster de colesterol, enfermedad de Wolman, cistinosis, enfermedad de Danon, enfermedad de Fabry, lipogranulomatosis de Farber, enfermedad de Farber, fucosidosis, galactosialidosis tipos I/II, enfermedad de Gaucher tipos I/II/III, leucodistrofia de células globoïdes, enfermedad de Krabbe, enfermedad por depósito de glucógeno II, enfermedad de Pompe, gangliosidosis GM1 tipos I/II/III, gangliosidosis GM2 tipo I, enfermedad de Tay Sachs, gangliosidosis GM2 tipo II, enfermedad de Sandhoff, gangliosidosis GM2, alfa-manosidosis tipos I/II, beta-manosidosis, leucodistrofia metacromática, mucolipidosis

5 tipo I, sialidosis tipos I/II, mucolipidosis tipos II/III, mucolipidosis tipo IV, enfermedad de célula I, mucolipidosis tipo IIIC, pseudo-polidistrofia de Hurler mucopolisacaridosis tipo I, mucopolisacaridosis tipo II, síndrome de Hunter, mucopolisacaridosis tipo IIIA, síndrome de Sanfilippo tipo A, B o D (mucopolisacaridosis tipo IIIB, mucopolisacaridosis tipo IIIC, mucopolisacaridosis tipo IIID), mucopolisacaridosis tipo IVA, síndrome de Morquio, mucopolisacaridosis tipo IVB, mucopolisacaridosis tipo VI, mucopolisacaridosis tipo VII, síndrome de Sly, mucopolisacaridosis tipo IX, deficiencia múltiple de sulfatasa, lipofuscinosis ceroide neuronal, enfermedad de Batten CLN1, enfermedad de Batten CLN2, enfermedad de Niemann-Pick tipos A/B, Enfermedad de Niemann-Pick tipo C1, enfermedad de Niemann-Pick tipo C2, picnodisostosis, enfermedad de Schindler tipos I/II, enfermedad de Gaucher y enfermedad por depósito de ácido siálico.

10 En algunas realizaciones, la enfermedad por depósito lisosomal se selecciona a partir del grupo consistente en el síndrome de Hunter, enfermedad por leucodistrofia metacromática (metachromatic leukodystrophy, MLD), síndrome de Sanfilippo tipo A, síndrome de Sanfilippo tipo B, y enfermedad por leucodistrofia de células globoideas (globoid cell leukodystrophy, GLD). En ciertas realizaciones, la enzima de reemplazo se selecciona a partir del grupo consistente de la iduronidasa-2-sulfatasa (iduronate-2-sulfatase, I2S) recombinante, arilsulfatasa A (arylsulfatase A, ASA), heparán N-sulfatasa, HNS), alfa-N-acetilglucosaminidasa (alpha-N-acetylglucosaminidase, Naglu) y beta-galactosidasa (β -galactosidase, GLC). En algunas realizaciones, la enzima de reemplazo contiene residuos de manosa-6-fosfato (mannose-6-phosphate, M6P). En algunas realizaciones, la enzima de reemplazo es una proteína de fusión que comprende una fracción dirigida a los lisosomas.

15 En algunas realizaciones, la enzima de reemplazo se administra a las neuronas, células gliales, células perivasculares y/o células meníngeas. En ciertas realizaciones, la enzima de reemplazo se administra a las neuronas en la médula espinal.

20 En algunas realizaciones, la administración intratecal resulta en la administración sistémica de la enzima de reemplazo en los tejidos periféricos diana. En ciertas realizaciones, los tejidos periféricos dianas se seleccionan a partir del hígado, riñón, y/o corazón, endotelio, médula ósea y células derivadas de la médula ósea, bazo, pulmón, ganglio linfático, hueso y cartílago, ovario y testículos.

25 En algunas realizaciones, la administración intratecal resulta en la localización lisosomal de la enzima de reemplazo en tejidos cerebrales dianas, neuronas de la médula espinal y/o tejidos periféricos dianas. En algunas realizaciones, la administración intratecal resulta en la reducción del depósito de GAG en los tejidos cerebrales dianas, neuronas de la médula espinal y/o tejidos periféricos dianas. En ciertas realizaciones, el depósito de GAG se reduce al menos en 20%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90%, 1 vez, 1,5 veces o 2 veces en comparación con el control.

30 En algunas realizaciones, la administración intratecal resulta en una vacuolización reducida en las neuronas. En algunas realizaciones, las neuronas comprenden las células de Purkinje.

35 En algunas realizaciones, la administración intratecal resulta en una mayor actividad enzimática de la enzima de reemplazo en los tejidos cerebrales dianas, neuronas de la médula espinal y/o tejidos periféricos dianas. En ciertas realizaciones, la actividad enzimática aumenta 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 el control. En ciertas realizaciones, la mayor actividad enzimática es al menos aproximadamente 10 nmol/h/mg, 20 nmol/h/mg, 40 nmol/h/mg, 50 nmol/h/mg, 60 nmol/h/mg, 70 nmol/h/mg, 80 nmol/h/mg, 90 nmol/h/mg, 100 nmol/h/mg, 150 nmol/h/mg, 200 nmol/h/mg, 250 nmol/h/mg, 300 nmol/h/mg, 350 nmol/h/mg, 400 nmol/h/mg, 450 nmol/h/mg, 500 nmol/h/mg, 550 nmol/h/mg o 600 nmol/h/mg.

40 En algunas realizaciones, la actividad enzimática se incrementa en la región lumbar. En ciertas realizaciones, la mayor actividad enzimática en la región lumbar es al menos aproximadamente 500 nmol/h/mg, 600 nmol/h/mg, 700 nmol/h/mg, 800 nmol/h/mg, 900 nmol/h/mg, 1000 nmol/h/mg, 1500 nmol/h/mg, 2000 nmol/h/mg, 3000 nmol/h/mg, 4000 nmol/h/mg, 5000 nmol/h/mg, 6000 nmol/h/mg, 7000 nmol/h/mg, 8000 nmol/h/mg, 9000 nmol/h/mg, o 10000 nmol/h/mg.

45 En algunas realizaciones, la enfermedad por depósito lisosomal se asocia con síntomas periféricos y el método comprende además administrar la enzima de reemplazo por vía intravenosa al sujeto. En ciertas realizaciones, la administración intravenosa no es más frecuente que la administración semanal (p.ej., no más frecuente que dos veces por semana, mensual, 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, como dos veces a la semana, semana, una semana sí una semana no, o dos veces al mes. En algunas realizaciones, la administración intravenosa e intratecal se realizan el mismo día. En algunas realizaciones, la administración intravenosa e intratecal no se realiza dentro de cierta cantidad de tiempo entre ellas, 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, la administración intravenosa e intratecal se realizan en un esquema alternante, como administraciones alternantes semanales, una semana sí una semana no, o dos veces al mes o mensualmente. En algunas realizaciones, una administración intratecal reemplaza una administración intravenosa en un esquema de administración, como en un esquema de administración intravenosa semanal, una semana sí una semana no, o dos veces al mes o mensualmente, cada tercera o cuarta o quinta administración en ese esquema puede remplazarse con una administración intratecal en lugar de una administración intravenosa. En algunas realizaciones, una administración intravenosa reemplaza una administración intratecal en un esquema de administración, como en un esquema de administración intratecal semanal, una semana sí una semana no, o dos veces al mes o mensualmente, cada tercera o cuarta o quinta administración en ese esquema puede remplazarse con una administración intravenosa en lugar de una administración intravenosa. En algunas realizaciones, la administración intravenosa e intratecal se realizan de forma secuencial, tal como realizar las administraciones intravenosas primero (p.ej., semanal, una semana sí una semana no, o dos veces al mes o mensualmente dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, o un año o más) seguido por las administraciones intratecales (p.ej., dosificación semanal, una semana sí una semana no, o dos veces al mes o mensualmente por más de dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, o un año o más). En algunas realizaciones, las administraciones intratecales se realizan primero (p.ej., semanal, una semana sí una semana no, o dos veces al mes, mensualmente, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, por dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, o un año o más) seguido por administraciones intravenosas (p.ej., dosificaciones semanales, una semana sí una semana no, dos veces al mes, o mensuales por más de dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, o un año o más).

En algunas realizaciones, la enfermedad por depósito lisosomal se asocia con síntomas periféricos y el método incluye administrar la enzima de reemplazo por vía intratecal pero no implica administración la enzima de reemplazo por vía intravenosa al sujeto. En ciertas realizaciones, la administración intratecal de las enzimas de reemplazo mejora o reduce uno o más de los síntomas periféricos de la deficiencia de la enzima de reemplazo del sujeto.

La presente invención puede usarse en métodos de tratamiento del sindrome de Hunter incluyendo un paso de administración por vía intratecal a un sujeto con necesidad de tratamiento una enzima I2S recombinante a una dosis terapéuticamente efectiva y a un intervalo de administración tal que al menos un síntoma o rasgo del sindrome de Hunter se reduce en intensidad, severidad o frecuencia, o tiene una instalación tardía. En algunas realizaciones, al menos un síntoma o rasgo del sindrome de Hunter es la alteración cognitiva; lesiones en la sustancia blanca; espacios perivasculares dilatados en el parénquima celular, ganglios, cuerpo calloso y/o tronco encefálico; atrofia; y/o ventriculomegalia.

La presente invención puede usarse en métodos de tratamiento de la enfermedad por leucodistrofia metacromática (MLD) que incluyen un paso de administración por vía intratecal a un sujeto con necesidad de tratamiento una enzima ASA recombinante A una dosis terapéuticamente efectiva y a un intervalo de administración tal que al menos un síntoma o rasgo de la enfermedad por MLD se reduce en intensidad, severidad o frecuencia, o tiene una instalación tardía. En algunas realizaciones, al menos un síntoma o rasgo de la enfermedad por MLD es la presión intracraneana elevada, hidrocefalia ex vacuo, glicolípidos sulfatados acumulados en las vainas de mielina en el sistema nervioso central y periférico y en órganos viscerales, desmielinización progresiva, pérdida axonal dentro del SNC y sistema nervioso periférico (Peripheral Nervous System, PNS) y/o disfunción motora y cognitiva.

La presente invención puede usarse en métodos de tratamiento del sindrome de Sanfilippo tipo A (Sanfilippo A) que incluyen un paso de administración por vía intratecal a un sujeto con necesidad de tratamiento una enzima HNS recombinante a una dosis terapéuticamente efectiva y a un intervalo de administración tal que al menos un síntoma o rasgo de la enfermedad Sanfilippo A se reduce en intensidad, severidad o frecuencia, o tiene una instalación tardía.

La presente invención puede usarse en métodos de tratamiento del sindrome de Sanfilippo tipo B (Sanfilippo B) que incluyen un paso de administración por vía intratecal a un sujeto con necesidad de tratamiento una enzima Naglu recombinante a una dosis terapéuticamente efectiva y a un intervalo de administración tal que al menos un síntoma o rasgo de la enfermedad Sanfilippo B se reduce en intensidad, severidad o frecuencia, o tiene una instalación tardía.

En algunas realizaciones, al menos un síntoma de la enfermedad Sanfilippo A o Sanfilippo B es la pérdida auditiva, desarrollo alterado del habla, déficits en las destrezas motoras, hiperactividad motora, alteración cognitiva progresiva, agresividad y/o trastornos del sueño.

En algunas realizaciones, la enzima Naglu recombinante es una proteína de fusión que comprende la Naglu y una fracción dirigida a los lisosomas. En ciertas realizaciones, la fracción dirigida a los lisosomas es la

IGF-II.

La presente invención puede usarse en método de tratamiento de la enfermedad por leucodistrofia de células globoides (GLD) que incluyen un paso de administración por vía intratecal a un sujeto con necesidad de tratamiento una enzima β -galactosidasa (GLC) recombinante a una dosis terapéuticamente efectiva y a un intervalo de administración tal que al menos un síntoma o rasgo de la enfermedad por GLD se reduce en intensidad, severidad o frecuencia, o tiene una instalación tardía. En algunas realizaciones, al menos un síntoma o rasgo de la enfermedad por GLD es la irritabilidad, convulsión, deterioro mental, sordera, ceguera, convulsiones mioclónicas, tono muscular excesivo, retardo del desarrollo, regresión de las destrezas del desarrollo, hipersensibilidad, temblor, ataxia, espasticidad, vómitos severos episódicos, leucodistrofia, atrofia cerebral, desarrollo alterado de las células globoides y/o desmielinización.

Los dispositivos para administración intratecal, pueden incluir un puerto de acceso a fluidos; un cuerpo hueco que tiene un primer orificio de fluido en comunicación con el puerto de acceso a fluidos y un segundo orificio de fluido configurado para la inserción en la médula espinal; y un mecanismo de seguridad para asegurar la inserción del cuerpo hueco en la médula espinal. El mecanismo de seguridad puede comprender uno o más nudos montados en la superficie del cuerpo hueco y un anillo suturado ajustado sobre uno o más de los nudos. El puerto de acceso al fluido puede comprender un reservorio. El puerto de acceso a fluidos puede ser implantable. El puerto de acceso a fluidos puede ser un puerto inyectable. El puerto de acceso a fluidos puede ser una bomba mecánica.

Cuando se usa en esta aplicación, los términos «casi» y «aproximadamente» se usan como equivalentes. Cualquier numeral usado en esta aplicación con o son casi/aproximadamente quiere decir que cubre cualquier fluctuación normal por alguien de destreza ordinaria en la técnica relevante.

Otros rasgos, objetos y ventajas de la presente invención están claros en la descripción detallada que sigue. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada, aunque indica los contextos de la presente invención, se da sólo por ilustración, no limitación. Varios cambios y modificaciones serán claros para los expertos en la técnica a partir de la descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los dibujos son solo para propósitos de ilustración, no para limitación.

La figura 1 ilustra un diagrama ilustrativo de un equipo de administración intratecal del medicamento (Intrathecal Drug Delivery Device, IDDD) con un mecanismo de seguridad.

La figura 2A muestra locaciones ilustrativas en el cuerpo de un paciente donde puede colocarse el IDDD; la Figura 2B muestra varios componentes de un IDDD; y la Figura 2C muestra una inserción ilustrativa de locación en el cuerpo de un paciente para inyección IT-lumbar.

La figura 3 muestra resultados ilustrativos que resumen los vehículos evaluados en monos adultos.

La figura 4 muestra resultados ilustrativos que ilustran la estabilidad de hGalC en una pantalla térmica de hGalC como función del pH.

La figura 5 muestra resultados que ilustran la estabilidad de hGalC como función del pH.

La figura 6 muestra resultados que ilustran una pantalla térmica de hGalC como función de la concentración de sal.

La figura 7 muestra resultados que ilustran las ejecuciones de velocidad de sedimentación de GalC comparando diferentes intensidades iónicas en fosfato de 5mM de Na, tampón a pH 6,0. La figura 7A muestra resultados ilustrativos usando 50mM de NaCl y hGalC. La Figura 7B muestra resultados que ilustran 150mM de NaCl y hGalC. La figura 7C muestra resultados ilustrativos usando 500mM de NaCl y hGalC. La figura 7D muestra resultados que ilustran 150mM de NaCl y GalC murino.

La figura 8 muestra resultados que ilustran el perfil del área bajo la curva (Area Under the Curve, AUC) de GalC como función de la concentración de sal (1 mg/ml GalC, fosfato de Na 5 mM, pH 6,0) (eje de Y = $s^*g(s^*)$; eje X = s^*).

La figura 9 muestra resultados que ilustran una serie de dilución de hGalC en tampón universal, pH 6,0 (eje Y = $<g(s^*)/Co>(1/svedberg)$; eje X = $s^*(svedbergs)$).

La figura 10 muestra resultados que ilustran un perfil del área bajo la curva (Area Under the Curve, AUC)

5

de GalC como función del pH (1 mg/ml 3mM de citrato, tampón de fosfato y borato con 50mM de NaCl).

10

La figura 11 muestra resultados que ilustran la lectura basal de un análisis WDA a la mayor concentración a pH 6,0 en fosfato de 5mM de Na y 150mM de NaCl.

15

La figura 12 muestra resultados que ilustran la lectura resaltada de un análisis WDA a la mayor concentración a pH 6,0 en fosfato de 5mM de Na y 150mM de NaCl.

20

La figura 13 compara gráficamente y superpone las muestras basales y resaltadas de GalC.

25

La figura 14 muestra resultados que ilustran una serie de dilución de hGalC en presencia de NaTC al 1%.

30

La figura 15 muestra resultados que ilustran una serie de dilución de hGalC en presencia de NaTC al 1% (1,0 mg/mL y 0,3 mg/mL).

35

La figura 16 muestra resultados que ilustran la fluorescencia intrínseca de hGalC (1 mg/mL) en diferentes tampones y pHs.

40

La figura 17 muestra resultados de ejemplo que ilustran el dicroísmo circular de hGalC como función del pH.

45

La figura 18 muestra resultados que ilustran la Concentración media de grupo de radiactividad en el suero, sangre y eritrocitos de ratas Sprague-Dawley machos tras una dosis intratecal de ^{125}I -hGALC.

50

La figura 19 muestra resultados que ilustran la Concentración media de grupo de radiactividad en el suero, corazón, riñones, hígado, pulmones, bazo de ratas Sprague-Dawley machos tras una dosis intratecal de ^{125}I -hGALC.

55

La figura 20 muestra resultados que ilustran la Concentración media de grupo de radiactividad en el suero, corazón, riñones, hígado, pulmones, bazo de ratas Sprague-Dawley machos tras una dosis intravenosa de ^{125}I -hGALC.

60

La figura 21 muestra resultados que ilustran la Concentración media de grupo de radiactividad en el suero, corazón, riñones, hígado, pulmones, bazo de ratas Sprague-Dawley machos tras una dosis intratecal y un bolus intravenoso ^{125}I -hGALC.

65

La figura 22 muestra resultados que ilustran la Concentración media de grupo de radiactividad en el suero y varios tejidos (tejidos adiposos (grasa renal), glándulas suprarrenales, hueso (fémur), músculo (esquelético), nervio ciático), de ratas Sprague-Dawley machos tras una dosis intratecal de ^{125}I -hGALC.

70

La figura 23 muestra resultados que ilustran las concentraciones medias de radiactividad en el suero y varios tejidos (tejidos adiposos (grasa renal), glándulas suprarrenales, hueso (fémur), músculo (esquelético), nervio ciático), de ratas Sprague-Dawley machos tras una inyección en bolus intravenoso de ^{125}I -hGALC.

75

La figura 24 muestra resultados que ilustran las concentraciones medias de radiactividad en el suero y tejidos (tejidos adiposos (grasa renal), glándulas suprarrenales, hueso (fémur), músculo (esquelético), nervio ciático), de ratas Sprague-Dawley machos tras una inyección de dosis intratecal y en bolus intravenoso de ^{125}I -hGALC.

80

La figura 25 muestra resultados que ilustran las concentraciones medias de radiactividad en el suero, LCR y otros tejidos de ratas Sprague-Dawley machos tras una dosis intratecal de ^{125}I -hGALC.

85

La figura 26 muestra resultados que ilustran las concentraciones medias de radiactividad en el suero, LCR y otros tejidos de ratas Sprague-Dawley machos tras una inyección en bolus intravenoso de ^{125}I -hGALC.

90

La figura 27 muestra resultados que ilustran las concentraciones medias de radiactividad en el suero, LCR y tejidos de ratas Sprague-Dawley machos tras una dosis intratecal y un bolus intravenoso de ^{125}I -hGALC.

95

La figura 28 muestra resultados que ilustran las concentraciones medias de radiactividad en el suero y tejidos de ratas Sprague-Dawley machos tras una dosis intratecal de ^{125}I -hGALC.

100

La figura 29 muestra resultados que ilustran las concentraciones medias de radiactividad en el suero y tejidos de ratas Sprague-Dawley machos tras una inyección en bolus intravenoso de ^{125}I -hGALC.

- La figura 30 muestra resultados que ilustran las concentraciones medias de radiactividad en el suero y tejidos ratas Sprague-Dawley machos tras una inyección de dosis intratecal y en bolus intravenoso de ^{125}I -hGalC.
- 5 La figura 31 muestra resultados que ilustran que la administración IP de rmGalC reduce los niveles cerebrales de psicosina en ratones twitcher. Los datos representan \pm SEM para ratones n=4 por grupo de tratamiento.
- 10 La figura 32 muestra resultados que ilustran la mayor sobrevida con ICV solamente y terapia con rmGalC ICV/IP.
- 15 La figura 33 muestra resultados que ilustran que la psicosina cerebral se reduce significativamente tras las inyecciones ICV e ICV/IP de rmGalC en ratones twitcher.
- 20 La figura 34 muestra resultados que ilustran mejoría en los marcadores histológicos observados en ratones twitcher tratados con 40 ug de rmGalC. Se usó proteína ácida fibrilar glial (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) como marcador de astrocitos. Se usó Iba 1 como marcador de microglia/macrófagos. Se usó proteína-1 de membrana asociada a lisosomas (Lysosomal associated membrane protein-1, LAMP-1) como marcador lisosomal.
- 25 La figura 35 muestra resultados que ilustran la reacumulación de psicosina tras una inyección ICV de rmGalC o vehículo.
- 30 La figura 36 muestra resultados que ilustran el porcentaje de sobrevida en ratones twitcher tras una inyección ICV de rmGalC a PND19/20. Los datos representan n=8 por grupo.
- 35 La figura 37 muestra resultados que ilustran el porcentaje de sobrevida en ratones tratados por vía ICV/IP con rmGalC y rhGalC.
- 40 La figura 38 muestra resultados que ilustran el análisis de la marcha de ratones tratados con una inyección ICV de rmGalC y rhGalC.
- 45 La figura 39 muestra resultados que ilustran una respuesta antigénica a rmGalC o rhGalC en ratones twitcher.
- 50 La figura 40 muestra resultados que ilustran los niveles de psicosina en el LCR de perros no tratados y tratados con rhGalC.
- 55 La figura 41 muestra resultados que ilustran la tinción con IHC de GalC inyectado por vía IT en el cerebro con anticuerpo polyclonal del Grupo 1.
- 60 La figura 42 muestra resultados que ilustran la tinción con IHC de GalC inyectado por vía IT en el cerebro con anticuerpo del Grupo 2.
- 65 La figura 43 muestra resultados que ilustran la tinción con IHC de GalC inyectado por vía IT en el cerebro con anticuerpo monoclonal de ratón.
- La figura 44 muestra resultados que ilustran la tinción con IHC de GalC inyectado por vía IT en el cerebro con anticuerpo monoclonal de ratón.
- La figura 45 muestra resultados que ilustran la tinción con IHC de GalC inyectado por vía IT en el hígado con anticuerpo monoclonal de ratón.
- La figura 46 muestra resultados que ilustran la tinción con IHC de GalC inyectado por vía IT en el hígado con anticuerpo polyclonal Grupo 2.
- La figura 47 muestra resultados que ilustran la actividad media de GalC en el cerebro.
- La figura 48 muestra resultados que ilustran la actividad media de GalC en el hígado.
- La figura 49 muestra resultados que ilustran la inmunotinción de GalC en el cerebro a 10X.
- La figura 50 muestra resultados que ilustran la inmunotinción de GalC en el cerebro a 40X.
- La figura 51 muestra resultados que ilustran la tinción con Iba de la microglia activada a 40X.

- La figura 52 muestra resultados que ilustran la tinción con LFB/PAS en el cerebro a 10X.
- 5 La figura 53 muestra la IHC ilustrativa con I2S que demostró I2S detectada en las neuronas (flechas) en la corteza cerebral y cerebelosa incluyendo una capa de células menígeas cubriendo la superficie del cerebro (puntas de flecha) tras las inyecciones intratecales de 3 dosis de I2S. La tinción de IHC con I2S en cerebros inyectados con 2 dosis fue más débil (foto no mostrada). No se observó tinción positiva para I2S para ningún tipo de células en el cerebro de los animales con vehículo control. 40X.
- 10 La figura 54 muestra la inversión ilustrativa de la patología en el cerebro de ratones IKO tras la inyección intratecal-lumbar de I2S. Los tejidos cerebrales teñidos con H&E mostraban numerosas vacuolas de almacenamiento celular (flechas) en los animales control con vehículo La vacuolización celular se redujo a través del cerebro en ratones inyectados con 2 dosis (foto no mostrada) y 3 dosis. Se encontró una reducción notable en los inyectados con 3 dosis. 40X.
- 15 La figura 55 muestra la tinción inmunohistoquímica ilustrativa de LAMP-1, hubo una notable reducción de actividad lisosomal en los cerebros tras 2 dosis (foto no mostrada) y 3 dosis de tratamiento con I2S comparados con los ratones de control con vehículo. La reducción se caracterizaba por el descenso de células positivas para LAMP-1 y una intensidad de tinción más clara en las regiones a lo largo del cerebro. 40X.
- 20 La figura 56 muestra los resultados morfométricos ilustrativos de una comparación del área media positiva para LAMP-1 entre ratones de tipo salvaje (wild-type, WT) no tratados con vehículo y I2S (2 y 3 dosis) en la corteza cerebral (Cortex), núcleo caudado (Caudate nucleus, CP), tálamo (thalamus, TH), sustancia blanca (white matter, WM) y cerebelo (Cerebellum, CBL) confirmando que hubo reducciones significativas en la tinción positiva para LAMP-1 en todas las áreas cerebrales evaluadas. Los datos se representan como la media * = $P<0,01$; ** = $P<0,001$.
- 25 La figura 57 muestra micrografías electrónicas ilustrativas de células cerebrales que evidencian mejorías patológicas a nivel ultraestructural. Las neuronas de los ratones tratados con vehículo tenían inclusiones laminares, estructuras semejantes a cuerpo de cebra, y vacuolas que contienen material de depósito granular (inserto), los cuales se redujeron en los ratones inyectados con I2S. Los oligodendrocitos de los ratones tratados con vehículo mostraban grandes vacuolas de depósito luminosas a microscopía electrónica (flecha) mientras que los oligodendrocitos de los ratones inyectados con I2S tenían una vacuolización mínima. Barra de escala: en las neuronas, 2 μ m; en los oligodendrocitos, 500 nm.
- 30 La figura 58 muestra los resultados de inmunohistoquímica ilustrativos que demuestran I2S detectado en las células sinusoidales del hígado tras las inyecciones intratecales de 3 dosis de I2S. La tinción de IHC con I2S en hígados inyectados con 2 dosis fue más débil (foto no mostrada). No se observó tinción positiva para I2S en el hígado de los animales de control con vehículo. 40X.
- 35 La figura 59 muestra tejido ilustrativo del hígado. Se revela una vacuolización celular severa y una actividad lisosomal anormalmente alta por la tinción con H&E y se encuentra una inmunotinción fuerte con LAMP-1 en los animales de control con vehículo comparados con los WT. Se encontró una notable reducción de la vacuolización celular e inmunotinción con LAMP-1 tras el tratamiento intratecal con 3 y 2 (foto no mostrada) dosis de tratamiento con I2S. La tinción con H&E reveló que la vacuolización intracitoplasmática desapareció casi por completo con una estructura celular hepática casi normal. H&E, 40X; LAMP-1, 20X.
- 40 La figura 60 muestra tejidos ilustrativos del cerebro de un animal del grupo de tratamiento con 3mg. Se observó tinción positiva para I2S en las células menígeas. 4X.
- 45 La figura 61 muestra tejidos ilustrativos del cerebro de un animal del grupo de tratamiento con 30mg. Se observó tinción positiva para I2S en las neuronas y células menígeas. 4X.
- 50 La figura 62 muestra tejidos ilustrativos del cerebro de un animal del grupo de tratamiento con 100mg. Se observó que la tinción positiva para I2S en las neuronas y células menígeas era más fuerte que en los animales tratados con 3 y 30 mg. 4X.
- 55 La figura 63 muestra tejidos ilustrativos del cerebro de un animal del grupo de tratamiento con 150mg. Se observó que una gran población de neuronas eran positivas para I2S junto con células menígeas fuertemente positivas.
- 60 La figura 64 muestra tejidos ilustrativos con neuronas y células gliales positivas para I2S, junto con células menígeas, dentro de la capa I del cerebro en un animal del grupo de tratamiento con 30 mg. 40X.

- La figura 65 muestra tejidos ilustrativos con neuronas, células gliales positivas para I2S, junto con células perivasculares, dentro de la capa III del cerebro en un animal del grupo de tratamiento con 30 mg. 40X.
- 5 La figura 66 muestra tejidos ilustrativos con neuronas y células gliales positivas para I2S, dentro de la capa VI del cerebro adyacente a la sustancia blanca en un animal del grupo de tratamiento con 30 mg. 40X.
- 10 La figura 67 muestra tejidos ilustrativos con una tinción fuertemente positiva a I2S en las neuronas (cerebro) de un animal del grupo de tratamiento con 150 mg. 100X.
- La figura 68 muestra tejidos ilustrativos de la inmunotinción con I2S de la médula espinal cervical en un grupo de tratamiento con 150mg. 4X
- 15 La figura 69 muestra tejidos ilustrativos con una inmunotinción fuerte a I2S en la médula espinal lumbar de un animal del grupo de tratamiento con 150 mg. 4X.
- La figura 70 muestra tejidos ilustrativos con una inmunotinción fuertemente positiva a I2S de las células meníngicas, células gliales y epi/peri/endoneurio (células conectivas) en la sección lumbar de un animal del grupo de tratamiento con 150mg. 40X.
- 20 La figura 71 muestra una imagen en la cual las neuronas en la médula espinal lumbar de un animal del grupo de tratamiento con 150 mg eran fuertemente positivas a I2S. 40X.
- 25 La figura 72 muestra tejidos ilustrativos del hígado de un animal del grupo de tratamiento con 3mg. Sólo las células sinusoidales eran positivas para I2S. 40X.
- La figura 73 muestra tejidos ilustrativos del hígado de un animal del grupo de tratamiento con 30mg. Las células sinusoidales y los hepatocitos eran positivos para I2S. 40X.
- 30 La figura 74 muestra tejidos ilustrativos del hígado de un animal del grupo de tratamiento con 100mg. La inmunotinción para I2S era fuerte en las células sinusoidales y los hepatocitos. 40X.
- 35 La figura 75 muestra tejidos ilustrativos del hígado de un animal del grupo de tratamiento con 150mg. Se identificó una tinción fuertemente positiva para I2S en las células sinusoidales y los hepatocitos. 40X.
- La figura 76 muestra los resultados ilustrativos de un corazón de un animal del grupo de tratamiento con 3mg. La inmunotinción para I2S fue negativa. 40X.
- 40 La figura 77 muestra los resultados ilustrativos de un corazón de un animal del grupo de tratamiento con 30mg. Las células intersticiales eran positivas para I2S. 40X.
- La figura 78 muestra los resultados ilustrativos de un corazón de un animal del grupo de tratamiento con 100mg. Se observó una tinción positiva para I2S de las células intersticiales. 40X.
- 45 La figura 79 muestra los resultados ilustrativos de un corazón de un animal del grupo de tratamiento con 150mg. Se identificó una tinción fuertemente positiva para I2S de las células intersticiales. 40X.
- 50 La figura 80 muestra los resultados ilustrativos de un riñón de un animal del grupo de tratamiento con 3mg. La inmunotinción para I2S fue negativa. 40X.
- La figura 81 muestra los resultados ilustrativos de un riñón de un animal del grupo de tratamiento con 30mg. Las células glomerulares e intersticiales eran positivos para I2S.
- 55 La figura 82 muestra los resultados ilustrativos de un riñón de un animal del grupo de tratamiento con 100 mg. Se observó una mayor tinción de las células glomerulares e intersticiales para I2S. 40X.
- La figura 83 muestra los resultados ilustrativos de un riñón de un animal del grupo de tratamiento con 150 mg. Se observó una tinción positiva para I2S de las células tubulares, glomerulares e intersticiales. 40X.
- 60 La figura 84 ilustra los resultados de los estudios de inmunohistoquímica (immunohistochemistry, IHC) evaluados los tejidos del SNC de Monos Cynomolgus que recibieron dosis semanales de I2S. Como se determina por IHC, hubo deposición celular de I2S a lo largo del SNC. En la sustancia gris se detectó I2S en las neuronas del cerebro, cerebelo, tronco encefálico y médula espinal de todos los grupos en una forma dependiente de la dosis. En la superficie de la sustancia gris de los grupos con dosis mayor

5

grandes números de neuronas cerebrales eran positivas para la tinción con I2S en la superficie de la corteza (Figura 84A). También se detectó I2S en las neuronas en el tálamo (Figura 84B), hipocampo (Figura 84C), núcleo caudado (Figura 84D) y médula espinal (Figura 84E). Las células meníngeas y perivasculares también se tiñeron de forma positivas para I2S (Figura 84F). Las barras de escalas identificadas corresponden a 25um.

10

La figura 85 compara gráficamente la depuración de I2S en los grupos craneales y medulares graficando la cantidad de I2S en tales grupos en relación con el tiempo que sigue a la administración.

15

La figura 86 ilustra la deposición dependiente de la dosis en la sustancia gris de I2S administrado por vía intratecal a primates no humanos por 6 meses. La intensidad de tinción ilustrada se corresponde con la acumulación de I2S en el tálamo. En la figura 86, los núcleos están contrateñidos por DAPI y aparecen azules y la proteína (I2S) aparece como verde.

20

La figura 87 ilustra la acumulación dependiente de I2S administrado por vía intratecal a primates no humanos tras una inyección y tras múltiples inyecciones en un período de seis meses. La intensidad de tinción ilustrada se corresponde con la acumulación de la proteína de I2S en la corteza cerebral.

25

La figura 88 demuestra la localización celular de I2S a través del cerebro de un primate.

20

La figura 88A ilustra la visión trasversal de tejido cerebral extraído del cerebro del primate, mientras que la figura 88B ilustra esas áreas particulares de la región correspondiente a tres áreas de tejido de la sustancia blanca (designadas W1, W2 y W3), los tejidos de la sustancia blanca cercana al ventrículo (VW) y la sustancia gris de la superficie (SG) de la sección identificada en la Figura 88A.

30

Las figuras 89A - D ilustran la captación neuronal y oligodendrocítica y la asociación axonal de I2S administrado por vía intratecal a primates tras múltiples inyecciones en un período de seis meses. En particular, figura 89A, figura 89B, figura 89C y figura 89D son ilustrativas de una tinción filamentosa de los tejidos cerebrales del primate al que se le administró I2S por vía intratecal y corresponden respectivamente a las tres áreas de la sustancia blanca (W1, W2 y W3), y las regiones de la sustancia gris de la superficie (SG) identificadas en la figura 87B. La figura 89a ilustra la captación por los oligodendrocitos de I2S administrado por vía intratecal en los tejidos de la sustancia blanca (W1). La figura 89B y las figuras 89C ilustran la captación por los oligodendrocitos y la asociación axonal de I2S administrado por vía intratecal en los tejidos de la sustancia blanca W2 y W3 respectivamente. La figura 89D ilustra la captación neuronal de I2D administrado por vía intratecal en los tejidos de la sustancia gris de la superficie.

35

La figura 90 ilustra la identificación celular de I2S en la sustancia blanca cerca del ventrículo (VW) de un primate no humano (flechas en la parte superior izquierda). Como se muestra en la imagen superpuesta (flecha en la parte inferior derecha), I2S no se asocia con la mielina (parte superior derecha). En la figura 90, los núcleos están contrateñidos por DAPI (parte inferior izquierda). La proteína (I2S) aparece en el recuadro superior izquierdo.

40

La figura 91 ilustra la tinción en los tejidos de perros Beagle sanos a los cuales se les administró una dosis de I2S por vía intracerebroventricular o intratecal. Como se muestra en las imágenes a-h, I2S se distribuyó ampliamente a través de la sustancia gris de los grupos IT e ICV como se ha determinado por IHC. Las imágenes a y b ilustran que en la corteza cerebral, las neuronas eran positivas para I2S en las seis capas neuronales, desde la capa molecular superficial a la capa interna profunda en los grupos IT e ICV. Las imágenes c y d ilustran que en la corteza cerebelosa de los grupos IT e ICV se detectó I2S en las neuronas, incluyendo las células de Purkinje. Similarmente, las imágenes e y f ilustran que en los grupos IT e ICV una gran población de neuronas en el hipocampo eran positivas para I2S. Finalmente, las imágenes g y h demuestran que las neuronas positivas para I2S también se encontraron en el tálamo y núcleo caudado en los grupos IT e ICV. En la figura 91, la tinción con I2S está indicada con flechas.

45

La figura 92 ilustra comparativamente los tejidos del cuerpo calloso de ratones knock-out para I2S (iduronate-2-sulfatasa knock-out, IKO) que no fueron tratados o a los que se les había administrado I2S por vía intratecal. Como se muestra, los ratones IKO tratados exhibieron una reducción de la vacuolización celular característica de ciertos trastornos por depósito lisosomal en el cuerpo calloso y tejidos del fórnix del ratón IKO tratado con I2S.

50

La figura 93A ilustra una notable reducción en la presencia de LAMP1, un biomarcador patológico de enfermedad lisosomal, en los tejidos de la corteza cerebral de la superficie del ratón IKO tratado (figura 93A) en relación con el ratón IKO control no tratado (figura 93B) bajo magnificación 20X y 40X.

55

La figura 94 muestra un dispositivo de administración de medicamento intracraneal (IDDD) ilustrativo.

60

- La figura 95 muestra un sistema de acceso intratecal implantable de bajo perfil PORT-A-CATH®.
- La figura 96 muestra un dispositivo de administración de medicamento intracraneal (IDDD) ilustrativo.
- 5 La figura 97 muestra un dispositivo de administración de medicamento intracraneal (IDDD) ilustrativo, el cual permite la administración en casa para la terapia de reemplazo enzimático en el SNC (ERT).
- 10 La figura 98 es una ilustración que muestra el efecto de la vacuolización tras una inyección intracerebral de idursulfasa en las neuronas (células de Purkinje).
- 15 La figura 99 es una ilustración que muestra la actividad de I2S en el cerebro según dosis y región.
- 15 La figura 100 es una ilustración que muestra los datos de localización inmunohistoloquímica de idursulfasa a diferentes profundidades en la corteza cerebral.
- 20 La figura 101 es una ilustración que muestra la actividad de I2S en la médula espinal del mono tras la dosificación intratecal con idursulfasa.
- 20 La figura 102 es una ilustración que muestra la actividad de I2S en el hígado, corazón y riñón del mono tras la dosificación intratecal con idursulfasa.
- 25 La figura 103 muestra un esquema ilustrativo para un programa de ensayo de escala Hunter-IT.
- 25 La figura 104 es una ilustración que muestra las mediciones de las concentraciones de I2S en varias secciones de tejido cerebral tras una dosis de 30 mg. Los diferentes gráficos corresponden a diferentes tiempos de medición.
- 30 La figura 105 es una ilustración que muestra las mediciones de las concentraciones de I2S tras la administración en el tiempo a través de varias vías de administración para varias concentraciones del producto.
- 30 La figura 106 muestra las imágenes PET de Idursulfase-IT etiquetada con ^{124}I en Monos Cynomolgus a $t=5$ horas tras la dosificación IV, IT-L o ICV.
- 35 La figura 107 es una ilustración que muestra los datos de las concentraciones de ASA en suero tras la administración intravenosa.
- 35 La figura 108 es una ilustración que muestra los datos de las concentraciones de ASA en suero tras la administración IT-lumbar.
- 40 La figura 109 es una ilustración que muestra los datos de las concentraciones de ASA en LCR tras la administración IV.
- 45 La figura 110 es una ilustración que muestra los datos de las concentraciones de ASA en LCR tras la administración IT-lumbar.
- 45 La figura 111 muestra micrografías ópticas ilustrativas de tejido cerebral, meninges, infiltrados (grupos con dosis media y alta, ambos sexos) tras el tratamiento.
- 50 La figura 112 muestra otras micrografías ópticas ilustrativas de tejido cerebral, meninges, infiltrados (grupos con dosis media y alta, ambos sexos) tras el tratamiento.
- 55 La figura 113 muestra micrografías ópticas ilustrativas de tejido cerebral, infiltrados perivasculares (machos con dosis media; hembras con dosis alta) tras el tratamiento.
- 60 La figura 114 muestra la tinción ilustrativa con azul Alcian de la médula espinal de ratones inmunotolerantes a MLD tratados con rhASA1 y los resultados que ilustran la reducción sulfatada determinada por la tinción con azul Alcian de la médula espinal cervical en los animales que recibieron inyecciones intratecales de rhASA los días 1, 8, 15 y 22 a dosis de 520 mg/kg de peso cerebral o vehículo control. Como se demostró, el tratamiento con rhASA injectado por vía intratecal resultó en la reducción de la acumulación sulfatada en la médula espinal, incluyendo la región cervical de la médula espinal.
- 65 La figura 115 ilustra el análisis morfométrico de las secciones de médula espinal teñidas con azul Alcian de ratones inmunotolerantes a MLD tratados con rhASA1 y los resultados que ilustran la densidad óptica del azul Alcian en la médula espinal total (T-Spinal Cord), sustancia gris total (T-GM), sustancia gris

5

lumbar (L-GM), sustancia gris cervical (C-GM), sustancia blanca total (T-WM), sustancia blanca lumbar (L-WM), y sustancia blanca cervical (C-WM) determinada por análisis morfométrico. Como se demostró, se observó una reducción estadísticamente significativa en la tinción con azul Alcian en los animales tratados con rhASA en comparación con un vehículo control.

10

La figura 116 muestra la reducción ilustrativa de la tinción con LAMP en la sustancia blanca (fimbrias) de ratones inmunotolerantes a MLD tratados con rhASA1 que muestra resultados que ilustran los niveles de LAMP-1 en las fimbrias determinadas por inmunohisto-química. Magnificación = 20X. Como se demostró, el tratamiento con rhASA injectado por vía intratecal resultó en la reducción de LAMP-1 en la sustancia blanca cerebral.

15

La figura 117 ilustra el análisis morfométrico de la tinción con LAMP del cerebro de ratones inmunotolerantes a MLD tratados con rhASA1 y los resultados que ilustran la intensidad de la tinción con LAMP-1 en el cuerpo calloso (CC), fimbrias (F), sustancia blanca cerebelosa (CB-WM) y tronco encefálico (BS) de animales tratados con 20 mg/kg de rhASA intravenoso, 300 mg/kg de peso cerebral de rhASA por vía intratecal, 520 mg/kg de peso cerebral de rhASA por vía intravenosa, o vehículo control.

20

La figura 118 es una ilustración que muestra la concentración de ASA en punciones cerebrales de Monos Cynomolgus juveniles dosificados con vehículo tras la dosificación intratecal una semana sí una semana no (every-other-week, EOW) por 6 meses (autopsia principal).

25

La figura 119 es una ilustración que muestra la concentración de ASA en punciones cerebrales de Monos Cynomolgus juveniles tras la dosificación intratecal EOW de rhASA1 a 1,8 mg/dosis por 6 meses (autopsia principal).

30

La figura 120 es una ilustración que muestra la concentración de ASA en punciones cerebrales de Monos Cynomolgus juveniles tras la dosificación intratecal EOW de rhASA1 a 6,0 mg/dosis por 6 meses (autopsia principal).

35

La figura 122 es una ilustración que muestra la concentración de rhASA en punciones cerebrales de Monos Cynomolgus juveniles tras la dosificación intratecal EOW (PBS-control) por 6 meses (autopsia principal).

40

La figura 123 es una ilustración que muestra la concentración de rhASA en punciones cerebrales de Monos Cynomolgus juveniles tras la dosificación intratecal EOW de vehículo por 6 meses (autopsia principal).

45

La figura 124 es una ilustración que muestra la concentración de rhASA en punciones cerebrales de Monos Cynomolgus juveniles 1 tras la dosificación intratecal EOW de rhASA1 a 1,8 mg/dosis por 6 meses (autopsia principal).

50

La figura 125 es una ilustración que muestra la concentración de rhASA en punciones cerebrales de Monos Cynomolgus juveniles tras la dosificación intratecal EOW de rhASA1 a 6,0 mg/dosis por 6 meses (autopsia principal).

55

La figura 126 es una ilustración que muestra la concentración de rhASA en punciones cerebrales de Monos Cynomolgus juveniles tras la dosificación intratecal EOW de rhASA1 a 18,6 mg/dosis por 6 meses (autopsia principal).

60

La figura 128 es una ilustración que muestra la concentración de rhASA en punciones cerebrales del área blanca profunda del cerebro para animales de control con el equipo, vehículo, y animales tratados con 1,8 mg, 6,0 mg y 18,6 mg (machos y hembras por separado, los datos control con el equipo son de la autopsia de recuperación, los otros datos son de la autopsia principal)

65

La figura 129 es una ilustración que muestra la concentración de rhASA en punciones seleccionadas del

- área gris profunda del cerebro para animales de control con el equipo, vehículo, y animales tratados con 1,8 mg, 6,0 mg y 18,6 mg (machos y hembras por separado, los datos control con el equipo son de la autopsia de recuperación, los otros datos son de la autopsia principal)
- 5 La figura 130 es una ilustración que muestra la concentración de rhASA en punciones seleccionadas de varias regiones en animales de control con el equipo, vehículo, y animales tratados con 1,8 mg, 6,0 mg y 18,6 mg (machos y hembras combinados, los datos control con el equipo son de la autopsia de recuperación, los otros datos son de la autopsia principal)
- 10 La figura 131 es una ilustración que muestra la concentración de rhASA en secciones de la médula espinal de Monos Cynomolgus juveniles tras la dosificación intratecal EOW por 6 meses (autopsia de recuperación).
- 15 La figura 132 es una ilustración que muestra la concentración de rhASA en el hígado de Monos Cynomolgus juveniles tras la dosificación intratecal EOW por 6 meses (047-021) (autopsia de recuperación).
- 20 La figura 133 es una ilustración que muestra las locaciones anatómicas de las punciones cerebrales en la WM subcortical, WM periventricular (y sustancia blanca profunda) y WM subcortical.
- 25 La figura 134 es una ilustración que muestra las locaciones anatómicas de las punciones cerebrales en el cuerpo caloso y WM subcortical pericallosal, cápsula interna - Gpi, cápsula interna - núcleo caudado, sustancia blanca profunda, WM subcortical y corteza, putamen y WM subcortical temporal y corteza.
- 30 La figura 135 es una ilustración que muestra las locaciones anatómicas de las punciones cerebrales en la sustancia gris profunda, WM profunda (periventricular y subcortical frontal), y blanca subcortical y corteza - sagital superficial.
- 35 La figura 136 es una ilustración que muestra las locaciones anatómicas de las punciones cerebrales en el cuerpo caloso y WM subcortical pericallosal, WM subcortical profunda, gris profunda, WM periventricular, WM subcortical e hipocampo.
- 40 La figura 137 es una ilustración que muestra las locaciones anatómicas de las punciones cerebrales en la WM subcortical -lóbulo occipital y sustancia blanca cerebelosa, incluyendo el núcleo dentado (WM).
- 45 Las figuras 139A-G ilustran la concentración de ASA humana recombinante en punciones tisulares extraídas de los tejidos cerebrales de Monos Cynomolgus juveniles a los cuales se les administró un vehículo, 1,8mg de rhASA o 18,6mg de rhASA. Cada una de las figuras 139A-G corresponde a una región del tejido cerebral mostrado en la figura 134.
- 50 La figura 140A y la figura 140B es una ilustración que muestra la comparación de las concentraciones de ASA humana recombinante detectada en la sustancia blanca profunda (figura 140A) o en la sustancia gris profunda (figura 140B) de los tejidos cerebrales de Monos Cynomolgus juveniles a los cuales se les administró rhASA por vía intratecal o intracerebro-ventricular (ICV).
- 55 La figura 141A es una ilustración que muestra las concentraciones de ASA detectadas en varias punciones de tejido obtenido de Monos Cynomolgus juveniles (<12 meses de edad) a los cuales se les administró por vía IT una dosis de 18,6 o una dosis de 1,8mg de rhASA. Como se ilustra en las figuras 140A-B, la concentración de ASA administrada a los tejidos estaba dentro, o excedía de la concentración terapéutica diana de 2,5ng/mg de rhASA. Las regiones anatómicas de tejido cerebral que corresponden a cada uno de los números de punción mostrados en la figura 140A y figura 140B son la: sustancia blanca subcortical (1); sustancia blanca periventricular y sustancia blanca profunda (2); sustancia blanca subcortical (3); sustancia blanca subcortical (4); cápsula interna (5); núcleo caudado de la cápsula interna (6); sustancia blanca profunda (7); sustancia blanca subcortical y corteza (8); putamen (9); sustancia blanca subcortical temporal y corteza (10); sustancia gris profunda (11); sustancia gris profunda (12); periventricular y subcortical frontal (13); sustancia blanca subcortical, perifalxiano superficial de la corteza (14); cuerpo caloso y sustancia blanca subcortical pericallosal (15); sustancia blanca subcortical profunda (16); sustancia gris profunda (17); sustancia gris profunda (18); sustancia blanca periventricular (19); sustancia blanca subcortical profunda (20); hipocampo (21); cuerpo caloso (22); sustancia blanca profunda (23); sustancia blanca subcortical, lóbulo occipital (24); y sustancia blanca cerebelosa (25).
- 60 La figura 142A ilustra el área de tejido de la sustancia blanca profunda extraída de un Mono Cynomolgus

5

al cual se le administró 1,8mg de ASA por vía IT. La figura 142B ilustra la inmunotinción del tejido de la sustancia blanca profunda y distribución de ASA en células relevantes. En la figura 142B, la proteína (ASA) se ilustra en el cuadro inferior derecho. La figura 142C ilustra que el ASA administrado por vía IT mostraba colocalización en los organelos en los tejidos de la sustancia blanca profunda del Mono Cynomolgus y en particular en los lisosomas. En la figura 142C, se ilustra la inmunotinción de la proteína (ASA) se ilustra en el cuadro superior izquierdo.

10

La figura 143 compara la distribución de ^{124}I -ASA marcada radiactivamente usando imágenes PET 24 horas después de la administración por vía IT o ICV de esta ASA marcada a un Mono Cynomolgus.

15

La figura 144 ilustra la distribución de ^{124}I -ASA marcada radiactivamente tras la administración por vía ICV a un Mono Cynomolgus, y compara la distribución de ^{124}I -ASA marcada radiactivamente administrada por vía IT dentro de 2-5 horas. Como se demostró, la administración por vía IT hizo que ^{124}I -ASA marcada radiactivamente alcanzara los mismos compartimientos iniciales (cisternas y médula proximal) que los demostrados para la administración por vía ICV.

20

La figura 145 muestra la administración ilustrativa por vía ICV e IT en un modelo murino.

25

La figura 146A muestra un resultado que ilustra las concentración de HNS en LCR como función del tiempo a las dosis de 1,5, 4,5 y 8,3 mg tras 6 meses de dosificación. La figura 146B muestra resultados que ilustra las concentraciones del anticuerpo Anti-HNS en el LCR tras 6 meses de administración por vía IT de dosis de 1,5, 4,5 y 8,3 mg en monos. Se muestran los datos para machos y hembras combinados. La figura 146C muestra resultados que ilustran las concentraciones del anticuerpo Anti-HNS en el LCR tras 6 meses de administración por vía IT de dosis de 1,5, 4,5 y 8,3 mg en monos tras 6 meses de dosificación. Se muestran los datos para machos y hembras combinados. Las dos concentraciones más altas (32,205 ng/mL y 15,467 ng/mL) post dosis por vía IT 6 a 8,3 mg de HNS se excluyeron del gráfico debido a que no se tomaron muestras de LCR antes de la dosis 6.

30

La figura 147 muestra un resultado que ilustra imágenes representativas de secciones tisulares de las meninges y parénquima del cerebro teñidas con hematoxilina y eosina. La figura 147A muestra resultados ilustrativos de una imagen de bajo poder de infiltrados neutrofílicos locales al catéter IT en un mono DC. La figura 147B muestra un resultado ilustrativo de una imagen de alto poder de infiltrados eosinofílicos en las meninges de un mono a dosis alta (8,3 mg/dosis); la severidad general de los infiltrados era similar al grupo con dosis medias (4,5 mg/dosis) (no se muestra). La figura 147C muestra un resultado que ilustra una imagen de alto poder de un mono a dosis baja (1,5 mg/dosis) mostrando eosinófilos en el espacio perivascular (parénquima cerebral). La figura 147D muestra un resultado ilustrativo de un mono a dosis baja (1,5 mg/dosis) mostrando eosinófilos en el espacio perivascular y parénquima adjunto. La figura 147E muestra un resultado que ilustra eosinófilos en el parénquima de la médula espinal (indicados por flechas) de un animal en el grupo a dosis baja; las neuronas en el área son normales. La figura 147F muestra un resultado que ilustra eosinófilos y un área de microgliosis (las flechas indican eosinófilos; el cuadro indica un área de microgliosis) en un mono a dosis baja (1,5 mg/dosis). Hay varias neuronas grandes en el área, las cuales son normales. Barras de escala: 200 um.

35

La figura 148 muestra un resultado que ilustra la actividad de la enzima HNS en las médulas espinales y cerebros del mono. Las figuras 148A/B muestran un resultado que ilustra la actividad en las médulas espinales de monos (A) machos y (B) hembras. Lámina -3 = lumbar, láminas 3, 6 = torácico, y lámina 9 = cervical; 0 = punta del catéter. Las figuras 148C/D muestran un resultado que ilustra la actividad de HNS en los cerebros de monos (C) machos y (D) hembras. Las láminas se iluminan del aspecto rostral a caudal (3 a 15). Todas las muestras tisulares se recolectaron aproximadamente 24 horas después de la última dosis o 4 semanas después de la última dosis para los animales en recuperación. DC, control de equipo. Los datos representan \pm SEM para ratones n=4 por grupo de tratamiento.

40

La figura 149 muestra un resultado que ilustra la actividad enzimática en el cerebro e hígado del mono. La figura 149A muestra un resultado que ilustra la distribución de la actividad de HNS en el cerebro del mono del grupo a dosis alta (8,3 mg/dosis). Se muestra el cambio en la actividad para las áreas superficiales, profunda y muy profunda (periventricular) del cerebro comparado con niveles endógenos (grupo DC). Todas las muestras tisulares se recolectaron aproximadamente 24 horas después de la última dosis o 4 semanas después de la última dosis para los animales en recuperación. Los datos representan \pm SEM para monos n = 6 (ambos sexos), láminas cerebrales 6 y 9. No se incluyen los datos para dos monos; en la autopsia se encontró que los catéteres no estaban permeables. La figura 149B muestra la actividad de HNS en el hígado del mono. Todas las muestras tisulares se recolectaron proximadamente 24 horas después de la última dosis o 4 semanas después de la última dosis para los animales en recuperación. DC, control de equipo. Rec, recuperación. Los datos representan \pm SEM medio para monos n = 4 por grupo de tratamiento excepto para el grupo de hembras a dosis baja (4,5 mg/dosis) (n = 3).

45

- 5 La figura 150 muestra un resultado que ilustra la localización de HNS en el cerebelo del Mono Cynomolgus juvenil: cohorte interina de 3 meses. La figura 150A muestra resultados que ilustran el cerebelo de un animal control de vehículo (0 mg/dosis) negativo para inmunotinción por HNS; magnificación de 20X. La figura 150B muestra un resultado que ilustra el cerebelo de un animal a dosis baja (1,5 mg/dosis) que muestra tinción positiva mínima limitada a la capa molecular; magnificación 20X. La figura 150C muestra un resultado que ilustra el cerebelo de un animal con dosis media (4,5 mg/dosis) que muestra tinción mínima en la capa granular externa; magnificación 20X. Las figuras 150D muestran un resultado que ilustra la tinción moderada en el cerebelo de un animal a dosis alta (8,3 mg/dosis) incluyendo la capa molecular, capa granular externa y células de Purkinje; magnificación 20X.
- 10 La figura 151 muestra un estudio ilustrativo de la concentración de HNS en la región de la cabeza graficada versus el tiempo en los primeros 20 minutos tras la dosificación IT de ^{124}I -HNS a 1 y 10 mg/kg.
- 15 La figura 152 muestra un estudio ilustrativo de la concentración de HNS en el cerebro graficada versus el tiempo tras la dosificación por vía IT de ^{124}I -HNS a 1 y 10 mg/kg.
- 20 La figura 153 muestra un estudio ilustrativo de la concentración de HNS en el cerebro graficada versus el tiempo tras la dosificación por vía IT de ^{124}I -HNS a 1 y 10 mg/kg.
- 25 La figura 154 muestra un estudio ilustrativo de la concentración de HNS en la región de la cabeza graficada versus el tiempo tras la dosificación por vía IT de ^{124}I -HNS a 1 y 10 mg/kg.
- 30 La figura 155 muestra un estudio ilustrativo de la concentración de HNS en la médula proximal graficada versus el tiempo tras la dosificación por vía IT de ^{124}I -HNS a 1 y 10 mg/kg.
- 35 La figura 156 muestra un estudio ilustrativo de la concentración de HNS en la médula media graficada versus el tiempo tras la dosificación por vía IT de ^{124}I -HNS a 1 y 10 mg/kg.
- 40 La figura 157 muestra un estudio ilustrativo de la concentración de HNS en la médula distal graficada versus el tiempo tras la dosificación por vía IT de ^{124}I -HNS a 1 y 10 mg/kg.
- 45 La figura 158 muestra un estudio ilustrativo de la concentración de HNS en el hígado graficada versus el tiempo tras la dosificación por vía IT de ^{124}I -HNS a 1 y 10 mg/kg.
- 50 La figura 159 muestra un estudio ilustrativo de la concentración de HNS en el cerebro graficada versus el tiempo tras la dosificación por vía IT de ^{124}I -HNS a 1 y 10 mg/kg, individual (parte superior) y promedio $\pm\text{SD}$ (parte inferior).
- 55 La figura 160 muestra un estudio ilustrativo de la concentración hepática graficada versus el tiempo tras la dosificación por vía IT de ^{124}I -HNS a 1 y 10 mg/kg, individual (parte superior) y promedio $\pm\text{SD}$ (parte inferior).
- 60 La figura 161 muestra un estudio ilustrativo de la concentración renal graficada de HNS versus el tiempo tras la dosificación por vía IT de ^{124}I -HNS a 1 y 10 mg/kg, individual (parte superior) y promedio $\pm\text{SD}$ (parte inferior).
- 65 La figura 162 muestra un estudio ilustrativo de la concentración cardíaca de HNS graficada versus el tiempo tras la dosificación por vía IT de ^{124}I -HNS a 1 y 10 mg/kg, individual (parte superior) y promedio $\pm\text{SD}$ (parte inferior).
- La figura 163 muestra un estudio ilustrativo de la concentración en piel de HNS graficada versus el tiempo tras la dosificación por vía IT de ^{124}I -HNS a 1 y 10 mg/kg, individual (parte superior) y promedio $\pm\text{SD}$ (parte inferior).
- La figura 164 muestra un estudio ilustrativo de la concentración cerebral de HNS graficada versus el tiempo tras la dosificación por vía IT de ^{124}I -HNS a 1 y 10 mg/kg (parte superior) y una comparación de los parámetros PK no compartimentales en el cerebro (parte inferior).
- La figura 165 muestra un estudio ilustrativo de la concentración hepática de HNS graficada versus el tiempo tras la dosificación por vía IT de ^{124}I -HNS a 1 y 10 mg/kg (parte superior) y una comparación de los parámetros PK no compartimentales en el hígado (parte inferior).
- La figura 166 muestra fibroblastos primarios ilustrativos de humanos normales que se usaron para el estudio de internalización celular de rhNaglu y Naglu-IGFII. La captación celular de rhNaglu fue mínima, mientras que la captación celular de Naglu-IGFII fue mucho más pronunciada. La curva de saturación de

- la internalización de Naglu-IGFII indicaba una captación mediada por receptor. Esta captación fue inhibida por IGFII, pero no por manosa-6-fosfato.
- 5 La figura 167 muestra los resultados de un estudio de microscopía confocal ilustrativo usando fibroblastos de un sujeto con Sanfilippo B (GM01426). Se observó una extensa internalización de Naglu-IGFII, y la colocalización de Naglu-IGFII con LAMP-1.
- 10 La figura 168 es una ilustración que muestra la actividad de Naglu en ratón de tipo silvestre, Naglu -/- (KO) y Naglu +/- (Het). Se observó deficiencia total de Naglu en el ratón Sanfilippo B en el cerebro, hígado, riñón y bazo.
- 15 La figura 169 muestra la vista superior y lateral del cerebro de ratón para indicar el sitio de la inyección intracisternal (IC) y el plano de sección para los análisis histológicos. Micrografía media, una sección trasversal del cerebro de ratón vista a magnitud 1X. El área del recuadro indica el campo para la imagen microscópica 4X en la micrografía inferior. Micrografía inferior, imagen 4X de la lámina histológica. El cuadro A y B indica el campo de la imagen microscópica 40X en la figura 170 y figura 171.
- 20 La figura 170 muestra la inmunohistoquímica ilustrativa de la corteza cerebral en ratones Sanfilippo B 7 días después de la inyección IC 40X. Tanto rhNaglu como Naglu-IGFII exhibieron una extensa captación celular en las neuronas así como en las células gliales, y los patrones de distribución y captación celulares eran muy similares entre las dos proteínas, (anticuerpo monoclonal anti Naglu humano).
- 25 La figura 171 muestra la inmunotinción ilustrativa con LAMP-1 de la corteza cerebral a 40X de magnificación. En comparación con el cerebro del ratón salvaje, se observó un elevado depósito lisosomal en el cerebro del Ratón Sanfilippo B tratado con vehículo, demostrado por la mayor cantidad de puntos de inmunotinción positiva para LAMP-1. El cerebro del ratón Sanfilippo B tratado con rhNaglu y Naglu-IGFII exhibió una reducción de depósito lisosomal que era muy similar al ratón de tipo silvestre.
- 30 La figura 172A ilustra la amplia reducción de la vacuolización celular en los tejidos de la sustancia blanca de ratones deficientes en Naglu a los cuales se les administra Naglu por vía IT en relación con los mismos ratones deficientes en Naglu a los cuales se les administró el vehículo. La figura 172B ilustra una notable reducción en la inmunotinción de LAMP1 en los tejidos de la sustancia blanca de ratones deficientes en Naglu a los cuales se les administró Naglu por vía IT en relación con los mismos ratones deficientes en Naglu a los ratones se les administró un vehículo.
- 35 La figura 173 ilustra cuantitativamente y compara la concentración de LAMP medido en la corteza cerebral, núcleo caudado y putamen (CP), tálamo (TH), cerebelo (CBL) y sustancia blanca (WM) de los ratones deficientes en Naglu a los cuales se les administró Naglu en relación con los ratones salvajes y ratones deficientes en Naglu a los cuales se les administró un vehículo. Las áreas positivas para LAMP en cada área de tejido cerebral analizado se redujeron tras la administración intratecal de tres dosis de Naglu en el curso de siete días (figura 173A) en relación con dos dosis de Naglu en el curso de dos semanas (figura 173B).
- 40 La figura 174 ilustra un diagrama anatómico sagital medio del SNC humano usado como referencia en esta figura, para demostrar el sitio de la inyección IT en la rata de tipo silvestre canulada. Las flechas indican la localización anatómica aproximada de la inyección IT en la médula espinal de la región de la corteza cerebral donde se tomaron tejidos para el estudio inmunohistoquímico.
- 45 La figura 175 ilustra la actividad Naglu en el cerebro tras la inyección IT. La actividad Naglu fue significativamente mayor en el cerebro de la rata de tipo silvestre a la cual se le inyectó Naglu-TAT y Naglu-IGFII.
- 50 La figura 176 muestra la inmunotinción ilustrativa con LAMP-1 de la corteza cerebral de la rata de tipo silvestre canulada tratada con rhNaglu, Naglu-TAT, Naglu-IGFII, Naglu-kif y Per-T-Naglu 24h después de la inyección por vía IT 20x. Naglu-IGFII fue la única proteína que mostró una extensa distribución en el parénquima del cerebro. La captación celular en las neuronas y células gliales también fue evidente en la rata tratada con Naglu-IGFII. Por otra parte, en los grupos tratados con rhNaglu, Naglu-TAT, Naglu-kif y PerT-Naglu la proteína permaneció en las meninges (M).
- 55 La figura 177 muestra una magnificación ilustrativa de alto poder de las láminas seleccionadas de la figura 176. Panel superior, en la rata de tipo silvestre canulada tratada con rhNaglu, rhNaglu permaneció en las meninges (M), no se encontró tinción positiva en el parénquima del cerebro. Panel inferior, en la rata de tipo silvestre canulada tratada con Naglu-IGFII, se observó una extensa distribución dentro del parénquima del cerebro, y se observó captación celular en las neuronas y células gliales.
- 60

5

La figura 178 ilustra la actividad Naglu en el cerebro e hígado 24h después de la última inyección IT. Entre los tres grupos tratados, la actividad Naglu en el cerebro no mostró diferencias significativas, lo mismo era cierto para la actividad Naglu en el hígado. Este resultado indicaba que la actividad Naglu detectada en el cerebro e hígado se debía principalmente a la última inyección, la cual ocurrió 24h antes del sacrificio.

10

La figura 179 ilustra el nivel GAG total en el cerebro e hígado tras la inyección IT de Naglu-IGFII. El GAG total en el cerebro de ratones Sanfilippo B tratados con vehículo exhibió aumentos progresivos, un reflejo del efecto acumulativo cuando los ratones Sanfilippo B envejecen. Se observó una reducción estadísticamente significativa de GAG en el cerebro se observó en el grupo de inyección 3x ($p<0,05$). También se observaron reducciones estadísticamente significativas de GAG en el hígado en los grupos de inyección 2x y 3x ($p<0,05$). El cambio del nivel de GAG en el hígado más rápido y drástico que en el cerebro es un fenómeno que también se ha observado en la administración de I2S por vía IT para el síndrome de Hunter.

15

La figura 180 muestra la biodistribución ilustrativa de Naglu en el cerebro de ratones Sanfilippo B tras la inyección de Naglu. La tinción inmunofluorescente de Naglu reveló la proteína Naglu-IGFII sobre las meninges (M) y parénquima del cerebro. Se observó captación celular en los grupos de inyección 2x y 3x. G: células gliales.

20

La figura 181 es una ilustración que muestra una sección coronal del cerebro de ratón. Los cuadros indican dónde se tomaron las imágenes para la inmunotinción con LAMP-1. Para demostrar la extensión de la distribución y eficacia de la proteína, se seleccionaron tejidos de la corteza cerebral y subcorticales tales como el núcleo caudado, tálamo y sustancia blanca para la inmunotinción con LAMP-1.

25

La figura 182 muestra la inmunotinción ilustrativa con LAMP-1 de la corteza cerebral a 40X de magnificación. Comparado con el cerebro del ratón salvaje, se observó un elevado depósito lisosomal en el cerebro del ratón Sanfilippo B tratado con vehículo, demostrado por la mayor cantidad de puntos de inmunotinción positiva para LAMP-1. La reducción del depósito lisosomal tras la inyección de Naglu-IGFII por vía IT se evidenció por el menor tamaño de los puntos positivos del cerebro del ratón Sanfilippo B tratado con inyección 2x, y el menor tamaño y número de puntos positivos del cerebro de ratón Sanfilippo B tratado con inyección 3x.

30

La figura 183 muestra la inmunotinción ilustrativa con LAMP-1 del núcleo caudado, un núcleo subcortical (40x). Similar a lo que se observó en la corteza cerebral, se observó mayor depósito lisosomal en el cerebro del ratón Sanfilippo B tratado con vehículo, demostrado por la mayor cantidad de puntos de inmunotinción positiva para LAMP-1. Se evidenció una reducción del depósito lisosomal tras la inyección de Naglu-IGFII por vía IT por el menor tamaño de los puntos positivos del cerebro del ratón Sanfilippo B tratado con inyección 2x, y el menor tamaño y número de puntos positivos del cerebro de ratón Sanfilippo B tratado con inyección 3x.

35

La figura 184 muestra la inmunotinción ilustrativa con LAMP-1 del tálamo, un núcleo disencefálico (40x). Se evidenció una reducción del depósito lisosomal tras la inyección de Naglu-IGFII por vía IT por el menor tamaño de los puntos positivos del cerebro del ratón Sanfilippo B tratado con inyección 2x, y el menor tamaño y número de puntos positivos del cerebro de ratón Sanfilippo B tratado con inyección 3x.

40

La figura 185 muestra la inmunotinción ilustrativa con LAMP-1 de la sustancia blanca (40x). El trato longitudinal de las fibras axonales neuronales distingue la sustancia blanca de las sustancias grises presentadas en las figuras 181 - 184. No obstante, el mismo patrón de aumentos de depósito lisosomal podría verse en el cerebro del ratón Sanfilippo B tratado con vehículo cuando se compara con el ratón salvaje. Se evidenció una reducción del depósito lisosomal tras la inyección de Naglu-IGFII por vía IT por el menor tamaño y número de puntos positivos del cerebro del ratón Sanfilippo B tratado con inyección 2x y 3x.

45

La figura 186 muestra la inmunotinción ilustrativa con LAMP-1 de la corteza cerebelosa. La morfología de la corteza cerebelosa era evidente por las neuronas granulares densamente pobladas, la capa molecular hipocelular, y la capa única de neuronas de Purkinje entre las neuronas granulares y la capa molecular. Las neuronas de Purkinje se identificaron por el gran citoplasma y dendritas ocasionales que protrújan en la capa molecular.

50

La figura 187 es una ilustración que muestra la tinción con Naglu en el cerebro, médula espinal e hígado. En el cerebro y médula espinal, se detectó Naglu inyectado en las meninges (M) sólo por IHC y no se detectó tinción positiva para Naglu en ninguna otra región. En el hígado, las células sinusoidales (S) eran positivas para Naglu y no se encontró captación de Naglu en los hepatocitos (H).

55

La figura 188 muestra la inmunotinción ilustrativa con LAMP y tinción con H & E del hígado y médula espinal. Comparados con los animales tratados con vehículo, la tinción con LAMP disminuyó a través de los hígados y médulas espinales tratadas con Naglu. La tinción con H & E demostró que la vacuolación celular en los hepatocitos se redujo en el grupo tratado comparado con los animales tratados con

60

65

vehículo.

La figura 189A y la figura 189B es una ilustración que muestra la tinción con H & E del cerebro y la mejoría en la morfología del cerebro tras 6 inyecciones EOW por vía IT de Naglu por 3 meses. En el cerebro tratado, la vacuolación celular (flechas) en las regiones examinadas disminuyó en comparación con el grupo con vehículo.

La figura 190A y la figura 190B muestran la inmunotinción con LAMP en varias regiones cerebrales tras 6 inyecciones de Naglu por vía IT por 3 meses. En comparación con el grupo tratado con vehículo, la administración de Naglu por vía IT a ratones Sanfilippo B resultó en una reducción de la actividad lisosomal en las regiones examinadas revelada por inmunotinción con LAMP. Esta reducción se caracterizaba por el descenso de células positivas para LAMP, menor tamaño celular y una tinción más clara. Se encontró una notable reducción en el cerebelo y tronco encefálico, el cual se localiza en la parte caudal del cerebro cercano a la médula espinal, comparado con otras regiones cerebrales. También se encontró una clara reducción en las regiones cerebrales profundas, incluyendo la sustancia blanca, hipocampo y tálamo.

La figura 191A y la figura 190B muestran la IHC de Iba en varias regiones cerebrales tras 6 inyecciones de Naglu por vía IT por 3 meses, lo cual reveló la activación de las células microgliales. En comparación con los animales tratados con vehículo, no se observó un descenso en el número de células positivas ni de la intensidad de tinción en el grupo tratado con Naglu. Sin embargo, la morfología celular de las células microgliales positivas cambió con un menor tamaño celular en todas las regiones cerebrales examinadas comparadas con unas grandes y vacuoladas en el grupo tratado con vehículo (insertos).

La figura 192A y la figura 192B muestran la IHC de GFAP en varias regiones cerebrales tras 6 inyecciones de Naglu por vía IT por 3 meses, lo cual reveló la activación de los astrocitos. En comparación con el grupo tratado con vehículo, la tinción positiva para GFAP se disminuyó en el cerebelo y tronco encefálico, y se disminuyó ligeramente en otras regiones examinadas.

30 DEFINICIONES

Para que la presente invención se comprenda más fácilmente, ciertos términos se definen por primera vez a continuación. Las definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos se describen a lo largo de la especificación.

35 Aproximadamente o casi: Tal y como se expresa aquí, el término «aproximadamente» o «casi», aplicados a uno o más valores de interés, se refieren a un valor que es similar a un valor establecido de referencia. En ciertas realizaciones, el término «aproximadamente» o «casi» se refiere a un rango de valores que caen dentro de 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 que o menor que) al valor establecido de referencia a menos que se especifique otra cosa u otra cosa sea evidente a partir del contexto (excepto cuando tal número excede 100% de un valor posible).

45 Mejoría: Tal y como se usa aquí, el término «mejoría» quiere decir la prevención, reducción o paliación de un estado o mejoría del estado de un sujeto. La mejoría incluye, pero no requiere la recuperación completa o la prevención completa de una condición de enfermedad. En algunas realizaciones, la mejoría incluye aumentar los niveles de una proteína relevante o su actividad que es deficiente en los tejidos de la enfermedad relevante.

50 Biológicamente activo: Tal como se usa aquí, la frase «biológicamente activa» 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 que es biológicamente activo. En contextos particulares, 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 como porción «biológicamente activa».

55 Agente volumétrico: Tal como se usa aquí, el término «agente volumétrico» se refiere a un compuesto que le agrega masa a la mezcla liofilizada y contribuye a la estructura física del pastel liofilizado (p.ej., facilita la producción de un pastel liofilizado esencialmente uniforme que mantiene una estructura de poro abierto). Ejemplos de agentes volumétricos incluyen manitol, glicina, cloruro de sodio, almidón hidroxietilo, lactosa, sacrosa, trehalosa, polietilenglicol y dextrano.

60 Receptor de manosa-6-fosfato independiente de cation [Cation-independent mannose-6-phosphate receptor (CI-MPR): Tal como se usa aquí, el término «Receptor de manosa-6-fosfato independiente de cation» (CI-MPR) se refiere a un receptor celular que se une a marcas de manosa-6-fosfato (mannose-6-phosphate, M6P) sobre precursores de hidrolasa ácida en el aparato de Golgi que están destinados para el transporte al

lisosoma. Además de a la M6P, el CI-MPR también se une a otras proteínas incluyendo el 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 lo mismo se usan de forma intercambiable aquí.

5 *Terapia inmunosupresora concomitante*: Tal como se usa aquí, el término «terapia inmunosupresora concomitante» incluye cualquier terapia inmunosupresora usada como pretratamiento, precondicionamiento o en paralelo a un método de tratamiento.

10 *Diluyente*: Tal como se usa aquí, el término «diluyente» se refiere a una sustancia diluyente farmacéuticamente aceptable (p.ej., segura y no tóxica para su administración a un humano) útil para la preparación de una formulación reconstituida. Ejemplos de diluyentes incluyen agua destilada, agua bacteriostática para inyección (bacteriostatic water for injection, BWFI), una solución tampóna de pH (p.ej., solución fisiológica tampóna de fosfato), solución fisiológica estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

15 *Forma de dosificación*: Tal como se usan aquí, los términos «forma de dosificación» y «unidad de forma de dosificación» se refieren a una unidad físicamente discreta de una proteína terapéutica para que el paciente sea tratado. Cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado. Sin embargo, se comprenderá que la dosis total de la composición será decidida por el médico tratante dentro del objetivo del juicio médico cósono.

20 *Terapia de reemplazo enzimático* (Enzyme Replacement Therapy, ERT): Tal como se usa aquí, el término «terapia de reemplazo enzimático» se refiere a cualquier estrategia terapéutica que corrige una deficiencia enzimática proporcionando la enzima perdida. En algunas realizaciones, la enzima perdida se proporciona por administración intratecal. En algunas realizaciones, la enzima perdida se proporciona por infusión en la corriente sanguínea. Una vez administrada, la enzima es captada por las células y transportada al lisosoma, donde la enzima actúa eliminando material que se ha acumulado en los lisosomas debido a la deficiencia de la enzima. Típicamente, para que la ERT lisosomal sea efectiva, la enzima terapéutica es administrada a los lisosomas en las células apropiadas en los tejidos meta donde el defecto de depósito se manifiesta.

30 *Mejorar, aumentar o reducir*: Tal como se usa aquí, los términos «mejorar», «aumentar» o «reducir», o sus equivalentes gramaticales, indican valores que son relativos a una medición basal, tal como una medición en el mismo individuo antes de iniciar el tratamiento descrito aquí, o una medición en un individuo de control (o múltiples individuos de control) en ausencia del tratamiento descrito aquí. Un «individuo de control» es un individuo afectado por la misma forma de enfermedad de depósito lisosomal que el individuo que está siendo tratado, quien tiene casi la misma edad que el individuo que está siendo tratado (para asegurar que las etapas de la enfermedad en el individuo tratado y el(s) individuo(s) de control son comparables).

40 *Individuo, sujeto, paciente*: Tal como se usa aquí, los términos «sujeto», «individuo» o «paciente» se refieren a un humano o a un sujeto mamífero no humano. El individuo (también denominado «paciente» o «sujeto») que está siendo tratado es un individuo (feto, bebé, niño, adolescente o humano adulto) que padece de una enfermedad.

45 *Administración intratecal*: Tal como se usa aquí, el término «administración intratecal» o «inyección intratecal» se refiere a una inyección en el canal medular (espacio intratecal que rodea la médula espinal). «Administración intratecal» de acuerdo con la presente invención se refiere a la administración IT a través del área o región lumbar, es decir, administración o entrega del IT lumbar. Tal como se usa aquí, el término «región lumbar» o «área lumbar» se refiere al área entre las tercera y cuarta vértebras lumbares (espalda baja) y, más específicamente, la región L2-S1 de la columna.

50 *Conejero*: Tal como se usa aquí, el término «conector» se refiere, en una proteína de fusión, a una secuencia de aminoácidos distinta a la que aparece en una posición particular en la proteína natural y que generalmente está diseñada para ser flexible o interponerse a una estructura, tal como una hélice a, entre dos fracciones proteicas. Un conector también se refiere a un espaciador.

55 *Lioprotector*: Tal como se usa aquí, el término «lioprotector» se refiere a una molécula que previene o reduce la inestabilidad química y/o física de una proteína u otra estructura a la liofilización y almacenamiento posterior. Ejemplos de lioprotectores incluyen azúcares tales como sucrosa o trehalosa; un aminoácido tal como glutamato monosódico o histidina; una metilamina tal como betaina; una sal liotrópica tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alcohol trihídrico o de azúcares superiores, p.ej., glicerina, eritritol, glicerol, arabinol, xilitol, sorbitol y manitol; propilenenglicol; polietilenenglicol; plurónico; y sus combinaciones. En algunas realizaciones, un lioprotector es un azúcar no reductor, tal como trehalosa o sucrosa.

65 *Enzima lisosomal*: Tal como se usa aquí, el término «enzima lisosomal» se refiere a cualquier enzima que es capaz de reducir materiales acumulados en lisosomas de mamíferos o que puede reducir o mejorar uno o

más síntomas de la enfermedad de depósito. Las enzimas lisosomales idóneas para la invención incluyen enzimas lisosomales salvajes o modificadas y pueden producirse usando métodos recombinantes y sintéticos o purificarse a partir de fuentes de la naturaleza. Ejemplos de enzimas lisosomales se enumeran en la Tabla 1.

5 *Deficiencia de enzima lisosomal:* Tal como se usa aquí, «deficiencia de enzima lisosomal» se refiere a un grupo de trastornos genéticos que resultan de la deficiencia en al menos una de las enzimas que se requieren para escindir macromoléculas (p.ej., sustratos de la enzima) a péptidos, aminoácidos, monosacáridos, ácidos nucleicos y ácidos grasos en los lisosomas. Como resultado, los individuos que sufren deficiencias de enzima lisosomal tienen materiales acumulados en varios tejidos (p.ej., SNC, hígado, bazo, intestino, paredes de vasos sanguíneos y otros órganos).

10 *Enfermedad por depósito lisosomal:* Tal como se usa aquí, el término «enfermedad por depósito lisosomal» se refiere a cualquier enfermedad que resulta de la deficiencia de una o más enzimas lisosomales necesarias para metabolizar macromoléculas naturales. Estas enfermedades resultan en la acumulación de moléculas no degradadas en los lisosomas, resultando en números elevados de gránulos de depósito (también denominados vesículas de depósito). Estas enfermedades y varios ejemplos se describen en más detalle más adelante.

15 *Polipéptido:* Tal como se usa aquí, un «polipéptido», en general, es una cadena de al menos dos aminoácidos unidos entre sí por un enlace peptídico. En algunas realizaciones, un polipéptido puede incluir al menos 3-5 aminoácidos, cada uno de los cuales se une a los otros por medio de al menos un enlace peptídico. Los que tienen una destreza común en la técnica apreciarán que los polipéptidos algunas veces incluyen aminoácidos «no naturales» u otras entidades que no obstante son capaces de integrarse en una cadena polipéptídica, opcionalmente.

20 *Enzima de reemplazo:* Tal como se usa aquí, el término «enzima de reemplazo» se refiere a cualquier enzima que puede actuar para reemplazar al menos en parte la enzima deficiente o perdida en una enfermedad a ser tratada. En algunas realizaciones, el término «enzima de reemplazo» se refiere a cualquier enzima que puede actuar para reemplazar al menos en parte la enzima lisosomal deficiente o perdida en una enfermedad de depósito lisosomal a ser tratada. En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo es capaz de reducir materiales acumulados en lisosomas de mamíferos o puede rescatar o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad de depósito lisosomal. Las enzimas lisosomales idóneas para la invención incluyen enzimas lisosomales salvajes o modificadas y pueden producirse usando métodos recombinantes y sintéticos o purificarse a partir de fuentes de la naturaleza. Una enzima de reemplazo puede ser una enzima recombinante, sintética, activada genéticamente o natural.

25 *Soluble:* Tal como se usa aquí, el término «soluble» se refiere a la capacidad de un agente terapéutico para formar una solución homogénea. En algunas realizaciones, la solubilidad del agente terapéutico en la solución en la cual se administra y por la cual se transporta al sitio de acción (p.ej., las células y tejidos del cerebro) es suficiente para permitir la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva del agente terapéutico al sitio de acción. Varios factores pueden impactar la solubilidad de los agentes terapéuticos. Por ejemplo, los factores relevantes que pueden impactar la solubilidad de la proteína incluyen la potencia iónica, secuencia de aminoácidos y la presencia de otros agentes cosolubilizantes o sales (p.ej., sales de calcio). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan de forma que las sales de calcio se excluyen de tales composiciones. En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos de acuerdo con la presente invención son solubles en su composición farmacéutica correspondiente. Se apreciará que, aunque generalmente se prefieren soluciones isotónicas para los medicamentos 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 175mM cloruro de sodio en 5mM fosfato de sodio a pH 7,0) y las soluciones que contienen azúcar (p.ej., hasta sucrosa 2% en 5mM fosfato de sodio 5 mM a pH 7,0) son bien toleradas en monos. Por ejemplo, la composición de la formulación en bolus aprobada para el SNC más común es solución fisiológica (150mM NaCl en agua).

30 *Estabilidad:* Tal como se usa aquí, el término «estable» se refiere a la capacidad del agente terapéutico (p.ej., una enzima recombinante) de mantener su eficacia terapéutica (p.ej., toda o la mayoría de su actividad biológica y/o integridad fisicoquímica pretendida) por períodos extensos de tiempo. La estabilidad de un agente terapéutico, y la capacidad de la composición farmacéutica de mantener la estabilidad de este agente terapéutico, puede evaluarse por períodos extensos de tiempo (p.ej., al menos por 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36 meses o más). En general, las composiciones farmacéuticas descritas aquí se han formulado de forma que son capaces de estabilizar, o alternativamente enlentecer o prevenir la degradación, de uno o más agentes terapéuticos formulados con los mismos (p.ej., proteínas recombinantes). En el contexto de una formulación una formulación estable es una en la cual el agente terapéutico esencialmente retiene su integridad física y/o química y actividad biológica con el almacenamiento y durante los procesos (tales como congelamiento/descongelamiento, mezclado mecánico y liofilización). Para la estabilidad de la proteína, puede medirse por la formación de agregados de alto peso molecular, pérdida de la actividad enzimática, generación

de fragmentos peptídicos y cambio de los perfiles de carga.

Sujeto: Tal como se usa aquí, el término «sujeto» significa cualquier mamífero, incluyendo humanos. El sujeto puede ser un adulto, un adolescente o un bebé.

5

Homología sustancial: La frase «homología sustancial» se usa aquí para referirse a una comparación entre secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la materia, 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 saben los expertos en la materia ciertos aminoácidos se clasifican como «hidrofóbicos» o «hidrofilicos», y/o por tener cadenas laterales «polares» o «no polares». La sustitución de un aminoácido por otro del mismo tipo a menudo puede considerarse una sustitución «homóloga».

10

Como se sabe, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos pueden compararse usando una variedad de algoritmos, incluyendo los disponibles en programas computarizados comerciales tales como BLASTN para las secuencias de nucleótidos y BLASTP, hueco BLAST, y PSI-BLAST para las 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., «Gapped BLAST y 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 las secuencias homólogas, los programas mencionados antes proporcionan una indicación del grado de homología. En algunas realizaciones, 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 una porción relevante de residuos. En algunas realizaciones, la porción relevante es una secuencia completa. En algunas realizaciones, la porción 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.

15

Como se sabe, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos pueden compararse usando una variedad de algoritmos, incluyendo los disponibles en programas computarizados comerciales tales como BLASTN para las secuencias de nucleótidos y BLASTP, gapped BLAST, y PSI-BLAST para las 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; y Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar las secuencias homólogas, los programas mencionados antes proporcionan una indicación del grado de homología. En algunas realizaciones, 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 una porción relevante de residuos. En algunas realizaciones, la porción relevante es una secuencia completa. En algunas realizaciones, la porción 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

Homología sustancial: La frase «homología sustancial» se usa aquí para referirse a una comparación entre amino secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos. Secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la materia, generalmente se considera que dos secuencias son «sustancialmente homólogas» si contienen residuos idénticos en las posiciones correspondientes. Como es bien sabido, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos pueden compararse usando una variedad de algoritmos, incluyendo los disponibles en programas computarizados comerciales tales como BLASTN para las secuencias de nucleótidos y BLASTP, gapped BLAST, y PSI-BLAST para las 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 y Proteins, Wiley, 1998; y Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods y Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar las secuencias idénticas, los programas mencionados antes proporcionan una indicación del grado de identidad. En algunas realizaciones, 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 una porción relevante de residuos. En algunas realizaciones, la porción relevante es una secuencia completa. En algunas realizaciones, la porción 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

Como se sabe, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos pueden compararse usando una variedad de algoritmos, incluyendo los disponibles en programas computarizados comerciales tales como BLASTN para las secuencias de nucleótidos y BLASTP, gapped BLAST, y PSI-BLAST para las 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; y Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar las secuencias idénticas, los programas mencionados antes proporcionan una indicación del grado de identidad. En algunas realizaciones, 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 una porción relevante de residuos. En algunas realizaciones, la porción relevante es una secuencia completa. En algunas realizaciones, la porción 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.

30

LCR sintético: Tal como se usa aquí, el término «LCR sintético» se refiere a una solución que tiene un pH, composición de electrolitos, contenido de glucosa y osmolalidad consistentes con el líquido cefalorraquídeo. El LCR sintético también se denomina LCR artificial. En algunas realizaciones, el LCR sintético es una solución B de Elliott.

35

Idóneo para la administración en el SNC: Tal como se usa aquí, la frase «idóneo para administración en el SNC» o «idóneo para intratecal administración» cuando se relaciona con las composiciones farmacéuticas de la presente invención generalmente se refiere a las propiedades de estabilidad, tolerabilidad y solubilidad de tales composiciones, así como a la capacidad de tales composiciones de administrar una cantidad efectiva del agente terapéutico contenido así al sitio de administración (p.ej., el LCR o el cerebro).

40

Tejidos diana: Tal como se usa aquí, el término «tejidos diana» se refiere a cualquier tejido afectado por la enfermedad de depósito lisosomal a ser tratada o cualquier tejido en el cual se expresa normalmente la enzima lisosomal deficiente. En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen los tejidos en los cuales hay una cantidad detectable o anormalmente alta de sustrato de la enzima, por ejemplo almacenado en los

5 lisosomas celulares del tejido, en los pacientes que sufren o son susceptibles a la enfermedad por depósito lisosomal. En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen los tejidos que muestran patologías, síntomas o rasgos asociados con la enfermedad. En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen los tejidos en los cuales la enzima lisosomal deficiente se expresa normalmente a un nivel elevado. Tal como se usa aquí, un tejido diana puede ser un tejido diana cerebral, un tejido diana de la médula espinal y/o un tejido diana periférico. Ejemplos de tejidos diana se describen en detalle más adelante.

10 *Fracción terapéutica:* Tal como se usa aquí, el término «fracción terapéutica» se refiere a una porción de una molécula que produce el efecto terapéutico de la molécula. En algunas realizaciones, una fracción terapéutica un polipéptido que tiene actividad terapéutica.

15 *Cantidad terapéuticamente efectiva:* Tal como se usa aquí, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de una proteína terapéutica (p.ej., enzima de reemplazo) la cual confiere un efecto terapéutico sobre el sujeto tratado, a una proporción beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible con 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 condición deseada, o exhibir un efecto terapéutico o preventivo deseable, tal como mejorar los síntomas asociados con la enfermedad, prevenir o retardar la aparición de la enfermedad y/o disminuir la severidad o frecuencia de los síntomas de la enfermedad. Una cantidad terapéuticamente efectiva comúnmente se administra en un régimen de dosis 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 efectivo) puede variar, por ejemplo, dependiendo de la vía de administración, de la combinación con otros agentes farmacéuticos. También, la cantidad terapéuticamente efectiva específica (y/o dosis unitaria) para un paciente particular puede depender de una variedad de factores incluyendo el trastorno tratado y la severidad 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, vía de administración, y/o tasa de excreción o metabolismo de la proteína de fusión específica empleada; la duración del tratamiento; y factores semejantes tal como saben los expertos en la materia.

30 *Tolerable:* Tal como se usan aquí, los términos «tolerable» y «tolerabilidad» se refieren a la capacidad de las composiciones farmacéuticas de la presente invención de no inducir una reacción adversa en el sujeto al cual se administra esa composición o alternativamente no inducir una reacción adversa severa en el sujeto al cual se administra esa composición. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención son bien toleradas por el sujeto a quien se administran tales composiciones.

35 *Tratamiento:* Tal como se usa aquí, el término «tratamiento» (también «tratar» o «tratando») se refiere a cualquier administración de una proteína terapéutica (p.ej., enzima lisosomal) que parcial o completamente alivia, mejora, inhibe, retarda la aparición de, reduce la severidad de y/o reduce la incidencia de uno o más síntomas o rasgos de una enfermedad particular, trastorno y/o condición (p.ej., sindrome de Hunters, sindrome de Sanfilippo tipo B). Este tratamiento puede ser el de un sujeto que no exhibe signos de la enfermedad, trastorno y/o condición relevante y/o de un sujeto que exhibe solo los primeros signos de la enfermedad, trastorno y/o condición. Alternativa o adicionalmente, este tratamiento puede ser el de un sujeto quien exhibe uno o más signos establecidos de la enfermedad, trastorno y/o condición relevante.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

40 En la presente se divultan, entre otras cosas, mejores métodos para la administración directa efectiva de un agente terapéutico al sistema nervioso central (central nervous system, SNC). Como se discute antes, la presente invención está basada, en el descubrimiento inesperado enzima de reemplazo para una enfermedad de depósito lisosomal puede introducirse directamente en el LCR de un sujeto con necesidad de tratamiento a una concentración elevada sin inducir efectos adversos sustanciales en el sujeto. Más sorprendentemente, los inventores encontraron que la enzima de reemplazo puede administrarse en una simple formulación en solución fisiológica o basada en tampón, sin usar LCR sintético. Aún más inesperadamente, la administración intratecal de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención no resulta en efectos adversos sustanciales, tales como una respuesta inmune severa, en el sujeto. Por tanto, En algunas realizaciones, la administración intratecal de acuerdo con la presente invención puede usarse en ausencia de terapia inmunosupresora concomitante (p.ej., sin inducir tolerancia inmune por pretratamiento o precondicionamiento).

45 60 En algunas realizaciones, la administración intratecal de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención permite una difusión eficiente a través de varios tejidos cerebrales resultando en la administración efectiva de la enzima de reemplazo en varios tejidos cerebrales dianas en regiones cerebrales superficiales, medianas y/o profundas. En algunas realizaciones, la administración intratecal de acuerdo con la presente invención resultó en una cantidad suficiente de enzimas de reemplazo entrando a la circulación

5 periférica. Como resultado, en algunos casos, la administración intratecal de acuerdo con la presente invención resultó en la administración de la enzima de reemplazo en tejidos periféricos, tales como el hígado, corazón y riñón. Este descubrimiento es inesperado y puede ser particularmente útil para el tratamiento de las enfermedades de depósito lisosomal que tienen componentes en el SNC y periféricos, los cuales requerirían la administración intratecal e intravenosa regular conjunta. Se contempla que la administración intratecal de acuerdo con la presente invención pueda permitir una dosificación y/o frecuencia reducida de la inyección iv sin comprometer los efectos terapéuticos en el tratamiento de los síntomas periféricos.

10 En la presente se divultan varios rasgos inesperados y beneficiosos que permiten una administración eficiente y conveniente de enzimas de reemplazo a varios tejidos dianas, resultando en el tratamiento efectivo de las enfermedades de depósito lisosomal que tienen indicaciones en el SNC.

15 No se pretende que el uso de las secciones limite la invención. El uso de «o» significa «y/o» a menos que se establezca otra cosa.

15 Enfermedades por almacenamiento lisosomal y enzimas de reemplazo

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente pueden usarse para tratar cualquier enfermedad de depósito lisosomal, en particular las enfermedades de depósito lisosomal que tienen etiología y/o 20 síntomas en el SNC, incluyendo, pero no limitadas a, aspartilglucosaminuria, enfermedad por depósito de éster de colesterol, enfermedad de Wolman, cistinosis, enfermedad de Danon, enfermedad de Fabry, Lipogranulomatosis de Farber, enfermedad de Farber, fucosidosis, galactosialidosis tipos I/II, enfermedad de Gaucher tipos I/II/III, leucodistrofia de células globoides, enfermedad de Krabbe, enfermedad por depósito de glucógeno II, enfermedad de Pompe, gangliosidosis GM1 tipos I/II/III, gangliosidosis GM2 tipo I, enfermedad de Tay Sachs, gangliosidosis GM2 tipo II, enfermedad de Sandhoff, gangliosidosis GM2, α-manosidosis tipos I/II, β- 25 manosidosis, leucodistrofia metacromática, mucolipidosis tipo I, sialidosis tipos I/II, mucolipidosis tipos II/III, enfermedad de célula I, mucolipidosis tipo IIIC, pseudo-polidistrofia de Hurler, mucopolisacaridosis tipo I, mucopolisacaridosis tipo II, sindrome de Hunter, mucopolisacaridosis tipo IIIA, Sindrome de Sanfilippo tipo A, B o D, (mucopolisacaridosis tipo IIIB, mucopolisacaridosis tipo IIIC, mucopolisacaridosis tipo IIID, 30 mucopolisacaridosis tipo IVA, sindrome de Morquio, mucopolisacaridosis tipo IVB, mucopolisacaridosis tipo VI, mucopolisacaridosis tipo VII, sindrome de Sly, mucopolisacaridosis tipo IX, deficiencia múltiple de sulfatasa, lipofuscinosis ceroide neuronal, enfermedad de Batten CLN1, enfermedad de Batten CLN2, enfermedad de Niemann-Pick tipos A/B, enfermedad de Niemann-Pick tipo C1, enfermedad de Niemann-Pick tipo C2, picnodisostosis, enfermedad de Schindler tipos I/II, enfermedad de Gaucher y enfermedad por depósito de ácido 35 siálico.

En algunas realizaciones, las enfermedades de depósito lisosomal a ser tratadas incluyen el sindrome de Hunters, enfermedad por leucodistrofia metacromática (metachromatic leukodystrophy, MLD), sindrome de Sanfilippo tipo A, sindrome de Sanfilippo tipo B y enfermedad por leucodistrofia de células globoides (globoid cell leukodystrophy, GLD).

Una revisión detallada de la etiología genética, manifestaciones clínicas y biología molecular de las enfermedades por depósito lisosomal se detallan en Scriver et al., eds., The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 7.sup.th Ed., Vol. II, McGraw Hill, (1995). Así, las enzimas deficientes en las enfermedades anteriores son conocidas por los expertos en la materia, algunas de éstas se ejemplifican en la Tabla a continuación:

Tabla 1

Nombre de la Enfermedad	Deficiencia de enzima	Sustancia almacenada
Enfermedad de Pompe	Ácido-a1, 4-Glucosidasa	Oligosacáridos enlazados a Glucógeno α 1-4
Gangliosidosis GM1	β-Galactosidasa	Gangliósidos GM ₁
Enfermedad de Tay-Sachs	β-Hexosaminidasa A	Gangliósido GM ₂
Gangliosidosis GM2: Variante AB	Proteína activadora GM ₂	Gangliósido GM ₂
Enfermedad de Sandhoff	β-Hexosaminidasa A A&B	Gangliósido GM ₂
Enfermedad de Fabry	α-Galactosidasa A	Globósidos
Enfermedad de Gaucher	Glucocerebrosidasa	Glucosilceramida
Leucodistrofia metacromática	Arilsulfatasa A	Sulfatidas
Enfermedad de Krabbe	Galactosilceramidasa	Galactocerebrósido
Niemann-Pick, tipos A & B	Esfingomielinasa ácida	Esfingomielina
Niemann-Pick, tipo C	Defecto de esterificación de colesterol	Esfingomielina
Niemann-Pick, tipo D	Desconocido	Esfingomielina
Enfermedad de Farber	Ceramidasa ácida	Ceramida
Enfermedad de Wolman	Lipasa ácida	Ésteres de colesterol
Síndrome de Hurler (MPS IH)	α-L-Iduronidasa	Heparán & Denatán sulfatos
Síndrome de Scheie (MPS IS)	α-L-Iduronidasa	Heparán & Denatán sulfatos
Hurler-Scheie (MPS IH/S)	α-L-Iduronidasa	Heparán & Denatán sulfatos
Síndrome de Hunter (MPS II)	Iduronato sulfatasa	Heparán & Denatán sulfatos
Síndrome de Sanfilippo tipo A (MPS IIIA)	Heparán N-sulfatasa	Heparán sulfato
Síndrome de Sanfilippo tipo B (MPS IIIB)	α-N-acetilglucosaminidasa	Heparán sulfato
Síndrome de Sanfilippo tipo C (MPS IIIC)	Acetilo-CoA-glucosaminida Acetiltransferasa	Heparán sulfato
Síndrome de Sanfilippo tipo D (MPS IIID)	N-acetilglucosamina-6-sulfatasa	Heparán sulfato
Morquio B (MPS IVB)	β-galactosidasa	Keratán sulfato
Maroteaux-Lamy (MPS VI)	Arilsulfatasa B	Denatán sulfato
Síndrome de Sly (MPS VII)	β-Glucuronidasa	
α-Manosidosis	α-□ Manosidasa	Manosa/Oligosacáridos
β -Manosidosis	β-Manosidasa	Manosa/Oligosacáridos
Fucosidosis	α-L-fucosidasa	Fucosil Oligosacáridos
Aspartilglucosaminuria	N-aspartilo- β-Glucosaminidasa	Aspartilglucosamine Asparaginas
Sialidosis (Mucolipidosis I)	α-Neuraminidasa	Sialiloligosacáridos
Galactosialidosis (síndrome de Goldberg)	Deficiencia de proteína protectora lisosomal	Sialiloligosacáridos
Enfermedad de Schindler	α-N-Acetilo- Galactosaminidasa	
Mucolipidosis II (enfermedad de célula I)	N-acetilglucosamina-1- Fosfotrasferasa	Heparán sulfato
Mucolipidosis III (Pseudo- polidistrofia Hurler)	Igual que ML II	
Cistinosis	Proteína de transporte de cistina	Cistina libre
Enfermedad de Salla	Proteína de transporte de ácido siálico	Ácido siálico y glucurónico libre
Enfermedad infantil por depósito de ácido siálico.	Proteína de transporte de ácido siálico	Ácido siálico y glucurónico libre

(continua)

Nombre de la Enfermedad	Deficiencia de enzima	Sustancia almacenada
Lipofuscinosis ceroide neuronal infantil	Palmitoílo-proteína tioesterasa	Lipofuscinas
Mucolipidosis IV	Desconocido	Gangliósidos y ácido hialurónico
Prosaposina	Saposinas A, B, C or D	

10

Enzimas de reemplazo

Tal como se usa aquí, las enzimas de reemplazo idóneas para la presente invención pueden incluir cualquier enzima que pueda actuar para reemplazar al menos la actividad parcial de la enzima deficiente o perdida en una enfermedad a ser tratada. En algunas realizaciones, una enzima lisosomal es capaz de reducir la sustancia acumulada en los lisosomas o puede rescatar o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad de depósito lisosomal.

En algunas realizaciones, se sabe que una enzima lisosomal está asociada con la enfermedad de depósito lisosomal a ser tratada. En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo idónea es una enzima seleccionada a partir de las enzimas enumeradas en la Tabla 1. En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo idónea para la presente invención es la iduronidasa-2-sulfatasa (iduronate-2-sulfatasa, I2S), arilsulfatasa A (arylsulfatase A, ASA), heparán N-sulfatasa (heparán N-sulfatasa, HNS), α-N-acetilglucosaminidasa (Naglu) o β-galactosidasa (GLC).

25

En algunas realizaciones, una enzima lisosomal adecuada para su uso en la invención puede tener una secuencia salvaje o natural. En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo idónea para la invención puede tener una secuencia modificada que tenga homología sustancial o identifique la secuencia salvaje o natural (p.ej., tener al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% de identidad de secuencia a la secuencia salvaje o natural).

Una enzima de lisosomal adecuada para su uso en la presente invención puede producirse por cualquier medio disponible. Por ejemplo, las enzimas de reemplazo pueden producirse por ingeniería recombinante utilizando un sistema de célula hospedadora creado para expresar un ácido nucleico que codifica una enzima de reemplazo. Alternativa o adicionalmente, las enzimas lisosomales pueden producirse activando genes endógenos. Alternativa o adicionalmente, las enzimas de reemplazo pueden prepararse parcial o completamente por síntesis química. Alternativa o adicionalmente, las enzimas de reemplazo también pueden purificarse a partir de fuentes naturales.

40

Donde las enzimas se producen de forma recombinante, puede usarse cualquier sistema de expresión. Para dar algunos ejemplos, los sistemas de expresión conocidos incluyen, por ejemplo, huevos, baculovirus, plantas, levaduras o células mamíferas

45

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

60

En algunas realizaciones, las enzimas lisosomales se producen a partir de células humanas. En algunas realizaciones, las enzimas lisosomales se producen a partir de células CHO.

65

En algunas realizaciones, una enzima lisosomal para su uso en la invención contiene una fracción que se une a un receptor en la superficie de las células cerebrales para facilitar la captación celular y/o la selección lisosomal. Por ejemplo, tal receptor puede ser el receptor de manosa-6-fosfato independiente de cation (cation-independent mannose-6-phosphate receptor, Ci-MPR) el cual se une a los residuos de manosa-6-fosfato

(mannose-6-phosphate, M6P). Además, el CI-MPR también se une a otras proteínas incluyendo el IGF-II. En algunas realizaciones, una enzima lisosomal adecuada para su uso en la presente invención contiene residuos de M6P en la superficie de la proteína. En algunas realizaciones, una enzima lisosomal adecuada para su uso en la presente invención puede contener oligosacáridos bifosforilados los cuales tienen mayor afinidad de unión al CI-MPR. En algunas realizaciones, una enzima idónea casi un promedio de al menos 20% de oligosacáridos bifosforilados por enzima. En otras realizaciones, una enzima puede contener cerca de 10%, 15%, 18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% de oligosacáridos bifosforilados por enzima. Aunque tales oligosacáridos bifosforilados pueden estar presentes naturalmente en la enzima, es de hacer notar que las enzimas pueden ser modificadas para poseer tales oligosacáridos. Por ejemplo, las enzimas lisosomales adecuadas pueden ser modificadas por ciertas enzimas que son capaces de catalizar la trasferencia de N-acetilglucosamina-L-fosfato del UDP-GlcNAc a la posición 6' de las manos unidas a α -1,2 en las enzimas lisosomales. Los métodos y composiciones para producir y usar tales enzimas se describen, por ejemplo, en Canfield et al. in Pat. de EE.UU. Nº 6,537.785, y Pat. de EE.UU. Nº 6,534.300.

En algunas realizaciones, las enzimas lisosomales para su uso en la presente invención pueden conjugarse o fusionarse a una fracción de selección lisosomal que es capaz de unirse a un receptor en la superficie de las células cerebrales. Una fracción de selección lisosomal puede ser IGF-I, IGF-II, RAP, p97, y variantes, homólogos y fragmentos de los mismos (p.ej., incluyendo los péptidos que tienen una secuencia al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% idéntica a una secuencia de péptidos de IGF-I, IGF-II, RAP, p97 humana madura salvaje).

En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo idónea para la presente no ha sido modificada para aumentar la administración o trasporte de tales agentes a través de la BBB y al SNC.

25 Administración Intratecal

De acuerdo con el uso de la presente invención, se administra una enzima lisosomal al SNC. En algunas realizaciones, se administra una enzima lisosomal al SNC administrándola al LCR de un sujeto en necesidad de tratamiento. La administración intratecal se usa para administrar una enzima de reemplazo deseada en el LCR. Tal como se usa aquí, la administración intratecal (también denominada inyección intratecal) se refiere a una inyección en el canal medular (espacio intratecal que rodea la médula espinal). Se conocen varias técnicas incluyendo la inyección cerebroventricular lateral a través de una trepanación o punción cisternal o lumbar o parecido. Ejemplos de métodos se describen en Lazorthes et al. Advances in Drug Delivery Systems and Applications in Neurosurgery, 143-192 y Omaya et al., Cancer Drug Delivery, 1: 169-179.

Puede inyectarse una enzima por vía intratecal a cualquier región que rodee el canal medular. En algunas realizaciones, una enzima se inyecta por vía intratecal en el área lumbar o la cisterna magna. Tal como se usa aquí, el término «región lumbar» o «área lumbar» se refiere al área entre la tercera y cuarta vértebras lumbares (espalda baja) y, más específicamente, la región L2-S1 de la columna. La inyección intratecal a través de la región lumbar o área lumbar también se denomina «administración IT lumbar». El término «cisterna magna» se refiere al espacio alrededor y por debajo del cerebelo a través del espacio entre el cráneo y la parte superior de la columna. Típicamente, la inyección intratecal a través de la cisterna magna también se denomina como «administración por la 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. Las inyecciones a través de las cavidades de los ventrículos cerebrales se denominan administración intraventricular cerebral (ICV).

En algunas realizaciones «administración Intratecal» se refiere a la administración IT lumbar, por ejemplo, administrada entre las tercera y cuarta vértebras lumbares (espalda baja) y, más específicamente, la región L2-S1 de la columna. Se contempla que la administración IT lumbar se distingue de la administración en la cisterna magna en que la administración IT lumbar de acuerdo con nuestra invención proporciona una administración mejor y más efectiva al canal medular distal, mientras que la administración en la cisterna magna, entre otras cosas, no alcanza bien el canal medular distal.

Formulaciones estables para la administración IT

En algunas realizaciones, las enzimas deseadas se administran en formulaciones estables para la administración intratecal. Ciertos contextos de la invención se basan, al menos en parte, en el descubrimiento que varias formulaciones mostradas aquí facilitan la administración y distribución efectiva de una o más enzimas lisosomales a los tejidos, células y/u organelos diana del SNC. Entre otras cosas, las formulaciones descritas aquí son capaces de solubilizar altas concentraciones de enzimas y son idóneas para la administración de tales enzimas al SNC de sujetos para el tratamiento de las enfermedades que tienen un componente y/o etiología en el SNC. Las composiciones descritas aquí se caracterizan por una mejor estabilidad y mejor tolerabilidad cuando se administran en el SNC de un sujeto (p.ej., por vía intratecal) que lo necesita aquí.

Antes de la presente invención, se usaba solución isotónica no tamponada tradicional y solución B de

Elliott, la cual es LCR artificial, para la administración intratecal. En la Tabla 2 a continuación se incluye una comparación que muestra las composiciones del LCR en relación a la solución B de Elliott. Como se muestra en la Tabla 2, la concentración de la solución B de Elliott se asemeja mucho a la del LCR. Sin embargo, la solución B de Elliott contiene una concentración de tampón muy baja y por consiguiente puede no suministrar la capacidad tampón adecuada necesaria para estabilizar los agentes terapéuticos, por ejemplo, proteínas), especialmente en períodos extensos de tiempo (p.ej., durante las condiciones de almacenamiento). Asimismo, la solución B de Elliott contiene ciertas sales que pueden ser incompatibles con las formulaciones con las que se pretende administrar algunos agentes terapéuticos, y en particular proteínas o enzimas. Por ejemplo, las sales de calcio presentes en la solución B de Elliott pueden mediar la precipitación de proteínas y reducir así la estabilidad de la formulación.

Tabla 2

Solución	Na ⁺ mEq/L	K ⁺ mEq/L	Ca ⁺⁺ mEq/L	Mg ⁺⁺ mEq/L	HCO ₃ ⁻ mEq/L	Cl ⁻ mEq/L	pH	Fósforo mg/L	Glucosa 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

20

Las formulaciones adecuadas para la administración intratecal para el uso en la presente invención no son LCR sintético o artificial.

En algunas realizaciones, las n formulaciones para la administración intratecal se han configurado de forma que puedan estabilizar, o alternativamente enlentecer o prevenir la degradación, de una o más proteínas recombinantes. Tal como se usa aquí, el término «estable» se refiere a la capacidad de una enzima recombinante de mantener su eficacia terapéutica (p.ej., toda o la mayoría de su actividad biológica pretendida y/o integridad fisicoquímica) por períodos extensos de tiempo. La estabilidad de una enzima recombinante, y la capacidad de la composición farmacéutica de mantener la estabilidad de esta enzima recombinante, puede evaluarse en períodos extensos de tiempo (p.ej., preferiblemente al menos por 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36 meses o más). En el contexto de una formulación una formulación estable es una en la cual el agente terapéutico aquí esencialmente retiene su integridad física y/o química y actividad biológica con el almacenamiento y durante los procesos (tales como congelamiento/descongelamiento, mezclado mecánico y liofilización). Para la estabilidad de la proteína, puede medirse por la formación de agregados de alto peso molecular (high molecular weight, HMW), pérdida de actividad enzimática, generación de fragmentos peptídicos y cambio de los perfiles de carga.

La estabilidad del agente terapéutico es de particular importancia. La estabilidad del agente terapéutico puede evaluarse en relación con la actividad biológica o integridad fisicoquímica del agente terapéutico por períodos extensos de tiempo. Por ejemplo, la estabilidad en un punto dado en el tiempo puede compararse contra la estabilidad en un punto de tiempo más temprano (p.ej., con la formulación día 0) o contra el agente terapéutico no formulado y expresar los resultados de esta comparación como un porcentaje. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas para su uso en 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%, 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 por un período extenso de tiempo (p.ej., medida al menos por 6-12 meses, a temperatura ambiente o bajo condiciones aceleradas de almacenamiento).

En algunas realizaciones, las enzimas lisosomales son solubles en formulaciones de la presente invención. El término «soluble» cuando se relaciona con las enzimas lisosomales para su uso en la presente invención se refiere a la capacidad de tales enzimas lisosomales de formar una solución homogénea. Preferiblemente, la solubilidad de las enzimas lisosomales en la solución en la cual se administra y por la cual es trasportada al sitio de acción (p.ej., las células y tejidos del cerebro) es suficiente para permitir la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de la enzima lisosomal al sitio de acción. Varios factores pueden impactar la solubilidad de las enzimas lisosomales. Por ejemplo, los factores relevantes que pueden impactar en la solubilidad de la proteína incluyen la potencia iónica, secuencia de aminoácidos y la presencia de otros agentes cosolubilizantes o sales (p.ej., sales de calcio). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan de forma que las sales de calcio se excluyen de tales composiciones.

60

Así, las formulaciones idóneas para la administración intratecal pueden contener una enzima lisosomal de interés a varias concentraciones. En algunas realizaciones, las formulaciones idóneas pueden contener una enzima de interés a una concentración hasta de casi 300 mg/ml (p.ej., hasta casi 250 mg/ml, hasta casi 200 mg/ml, hasta casi 150 mg/ml, hasta casi 100 mg/ml, hasta casi 90 mg/ml, hasta casi 80 mg/ml, hasta casi 70 mg/ml, hasta casi 60 mg/ml, hasta casi 50 mg/ml, hasta casi 40 mg/ml, hasta casi hasta casi 30 mg/ml, hasta

5 casi 25 mg/ml, hasta casi 20 mg/ml, hasta casi 10 mg/ml) En algunas realizaciones, las formulaciones idóneas pueden contener una enzima de interés a una concentración entre 10 y 100 mg/ml (p.ej., entre 10-80 mg/ml, entre 10-70 mg/ml, entre 1-60 mg/ml, entre 1-50 mg/ml, entre 10-150 mg/ml, entre 1-30 mg/ml). En algunas realizaciones, las formulaciones idóneas para administración intratecal pueden contener una enzima lisosomal de interés a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml o 300 mg/ml.

10 En algunas realizaciones, se usan soluciones isotónicas. Las soluciones levemente hipertónicas (p.ej., hasta 300 mM (p.ej., hasta 250 mM, 200 mM, 175mM, 150 mM, 125 mM) de cloruro de sodio en fosfato de sodio 5 mM a pH 7,0) y las soluciones que contienen azúcar (p.ej., sucrosa hasta 3% (2,4%, 2,0%, 1,5%, 1,0%) en fosfato de sodio a pH 7,0) han demostrado ser bien toleradas en monos. En algunas realizaciones, una composición para formulación en bolus idónea para el SNC es solución fisiológica (p.ej., 150mM de NaCl en agua).

15 Muchos agentes terapéuticos, y en particular las enzimas lisosomales para su uso en la presente invención requieren un pH controlado y excipientes específicos para mantener su solubilidad y estabilidad en las 20 composiciones farmacéuticas de la presente invención. La tabla 3 a continuación identifica ciertos aspectos ilustrativos de formulaciones de proteínas consideradas importantes para mantener la solubilidad y estabilidad de las enzimas.

Tabla 3

	Parámetro	Rango/Tipo Típico	Motivo
25	pH	5 a 7,5	Para estabilidad Algunas veces también para solubilidad
30	Tipo de tampón	acetato, succinato, citrato, histidina, fosfato o Tris	Para mantener el pH óptimo También puede afectar la estabilidad
35	Concentración del Tampón	5-50 mM	Para mantener el pH También puede estabilizar o agregar fuerza iónica
40	Tonicificador	NaCl, azúcares, manitol	Para producir soluciones isosmóticas o isotónicas
	Surfactante	Polisorbato 20, polisorbato 80	Para estabilizar contra interfaces y roce
	Otros	Aminoácidos (p.ej., arginina) a decenas a cientos de mM	Para una mayor solubilidad o estabilidad

45 El pH de la composición farmacéutica es un factor adicional el cual puede alterar la solubilidad de una enzima en una composición farmacéutica acuosa. Las composiciones farmacéuticas para su uso en la presente invención contienen uno o más tampones. En otras realizaciones, el tampón comprende hasta aproximadamente 20 mM (por ejemplo, aproximadamente 15 mM, 10 mM, 5 mM) de fosfato de sodio. Las concentraciones de 50 tampón adecuadas pueden ser de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 20 mM, dependiendo, por ejemplo, del tampón y de la isotonicidad deseada de la formulación. En algunas realizaciones, un agente tamponador adecuado está presente a una concentración de aproximadamente 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM o 20 mM.

55 En algunas realizaciones, las formulaciones contienen un agente de isotonicidad para mantener las formulaciones isotónicas. Cuando se usa en conexión con la administración IT, «isotónico» significa que la formulación de interés tiene esencialmente la misma osmolaridad que el LCR humano. Las formulaciones isotónicas tendrán esencialmente una osmolaridad entre 240 mOsm/kg y 350 mOsm/kg. La isotonicidad puede medirse usando, por ejemplo, un osmómetro de presión de vapor o de punto de congelamiento. Ejemplos de 60 agentes de isotonicidad incluyen, pero no se limitan a, glicina, sorbitol, manitol, cloruro de sodio y arginina. En algunas realizaciones, los agentes isotónicos idóneos pueden estar presentes en formulaciones a una concentración entre 0,01- 5 % (p.ej., 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%) por peso.

65 En algunas realizaciones, las formulaciones pueden contener un agente estabilizante para proteger a la proteína. Un agente estabilizante idóneo es un azúcar no reductor como sucrosa, raffinosa, trehalosa o aminoácidos como glicina, arginina y metionina. La cantidad de agente estabilizante en una formulación es generalmente tal que la formulación será isotónica. Sin embargo, las formulaciones hipertónicas también pueden

ser idóneas. Además, la cantidad de agente estabilizando no debe ser demasiado baja de forma que ocurra una cantidad inaceptable de degradación/agregación del agente terapéutico. Ejemplos de concentraciones de agente estabilizante en la formulación pueden estar entre casi 1 mM a casi 400 mM (p.ej., entre casi 30 mM a casi 300 mM, y entre casi 50 mM a casi 100 mM), o alternativamente, entre 0,1% to 15% (p.ej., entre 1% a 10%, entre 5% a 15%, entre 5% a 10%) por peso. En algunas realizaciones, la proporción de la cantidad de masa del agente estabilizante y el agente terapéutico es de casi 1:1. En otros contextos, la proporción de la cantidad de masa del agente estabilizante y el agente terapéutico puede ser casi 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, idóneo para la liofilización, el agente estabilizador también es un lioprotector.

10

Las composiciones farmacéuticas para su uso en la presente invención son particularmente útiles para administrar enzimas lisosomales a sujetos que padecen de trastornos del almacenamiento lisosomal.

Es deseable agregar un surfactante a las formulaciones. Ejemplos de surfactantes incluyen no iónicos surfactantes tales como Polisorbatos (p.ej., Polisorbatos 20 u 80); poloxámeros (p.ej., poloxámero 188); Triton, dodecil sulfato de sodio (SDS); laurel sulfato de sodio; octil glicósido de sodio; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sulfobetaína; laurilmiristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristil- o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linolea-midopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil-, o isostearamidopropil-betaína (p.ej., lauroamidopropil); miristami-dopropil-, palmidopropil-, o isostearamidopropil-dimetilamina; sodio metil cocoil-, o disódico metil ofeil-taurato; y la serie MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.), polietilglicol, polipropilglicol, y copolímeros de etileno y propileno glicol (p.ej., Plurónico, PF68, etc). La cantidad de surfactante añadido es tal que reduce la agregación de la proteína y minimiza la formación de particulados o efervescencias. Por ejemplo, un surfactante puede estar presente en una formulación a una concentración entre 0,001- 0,5 % (p.ej., 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.

Las formulaciones pueden incluir además uno o más agentes volumétricos, en particular, para formulaciones liofilizadas. Un «agente volumétrico» es un compuesto que le agrega masa a la mezcla liofilizada y contribuye a la estructura física del pastel liofilizado. Por ejemplo, un agente volumétrico puede mejorar la apariencia del pastel liofilizado (p.ej., pastel liofilizado esencialmente uniforme). Los agentes volumétricos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de sodio lactosa, manitol, glicina, sucrosa, trehalosa, hidroxietil almidón. Ejemplos de concentraciones de agentes volumétricos van desde casi 1% a casi 10% (p.ej., 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%).

Las formulaciones pueden evaluarse según el análisis de calidad del producto, tiempo de reconstitución (si está liofilizado), calidad de reconstitución (si está liofilizado), alto peso molecular, humedad y temperatura de transición del vidrio. El análisis de calidad de la proteína y producto incluye el análisis de la velocidad de degradación usando métodos incluyendo, pero no limitados a, HPLC por exclusión de tamaño (size exclusion HPLC, SE-HPLC), HPLC por intercambio catiónico (cation exchange-HPLC, CEX-HPLC), difracción de rayos X (X-ray diffraction, XRD), calorimetría de escaneo diferencial modulado (modulated differential scanning calorimetry, mDSC), HPLC por fase invertida (reversed phase HPLC, RP-HPLC), dispersión con luz a múltiples ángulos (multi-angle light scattering, MALS), fluorescencia, absorción ultravioleta, nefelometría, electroforesis capilar (capillary electrophoresis, CE), SDS-PAGE, y sus combinaciones. En algunas realizaciones, la evaluación del producto de acuerdo con la presente invención puede incluir un paso de evaluar la apariencia (apariencia del líquido o del pastel).

Generalmente, las formulaciones (liofilizadas o acuosas) pueden almacenarse por períodos extensos de tiempo a temperatura ambiente. La temperatura de almacenamiento puede estar entre 0 °C y 45 °C (p.ej., 4°C, 20 °C, 25 °C, 45 °C etc.). Las formulaciones pueden almacenarse por 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 pueden almacenarse directamente en el contenedor usado para la administración, eliminando los pasos de trasferencia.

Las formulaciones pueden almacenarse directamente en el contenedor de liofilización (si están liofilizadas), el cual también puede funcionar como el vaso de reconstitución, eliminando los pasos de trasferencia. Alternativamente, las formulaciones del producto liofilizado pueden medirse en incrementos menores para el almacenamiento. El almacenamiento generalmente debe evitar las circunstancias que conduzcan a la degradación de las proteínas, incluyendo pero no limitándose a la exposición a la luz solar, radiación UV, otras formas de radiación electromagnética, calor o frío excesivo, choque térmico rápido y choque mecánico.

Las formulaciones de acuerdo con la presente invención están en forma acuosa.

Las composiciones farmacéuticas para su uso en la presente invención se caracterizan por su tolerabilidad. Como se expresa en este documento, los términos «tolerable» y «tolerabilidad» se refieren a la

capacidad de las composiciones farmacéuticas de la presente invención de no inducir una reacción adversa en el sujeto a quien se administra tal composición, o alternativamente no inducir una reacción adversa severa en el sujeto a quien se administra tal composición. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención son bien toleradas por el sujeto a quien se administran tales composiciones.

5

Equipo para Administración Intratecal

Varios equipos pueden usarse para la administración intratecal de acuerdo con la presente invención.

En algunas realizaciones, un equipo para administración intratecal contiene un puerto de acceso a fluidos (p.ej., puerto inyectable); un cuerpo hueco (p.ej., catéter) que tiene un primer orificio de fluido en comunicación con el puerto de acceso a fluidos y un segundo orificio de fluido configurado para su inserción en la médula espinal; y un mecanismo de seguridad para asegurar la inserción del cuerpo hueco en la médula espinal. Como un ejemplo no militante mostrado en la figura 1, un mecanismo de seguridad idóneo contiene uno o más nudos montados en la superficie del cuerpo hueco y un anillo saturado ajustado sobre uno o más de los nudos para prevenir que el cuerpo hueco (p.ej., catéter) se separe de la médula espinal. En varios contextos, el puerto de acceso a fluidos comprende un reservorio. En algunas realizaciones, el puerto de acceso a fluidos comprende una bomba mecánica (p.ej., una bomba de infusión). En algunas realizaciones, un catéter implantado se conecta a un reservorio (p.ej., para administración en bolus), o una bomba de infusión. El puerto de acceso a fluidos puede ser implantado o externo.

20

En algunas realizaciones, la administración intratecal puede realizarse por punción lumbar (es decir, bolus lento) o a través de un sistema de administración puerto-catéter (es decir, infusión o bolus). En algunas realizaciones, el catéter se inserta entre las láminas de las vértebras lumbares y la punta se sutura al espacio tecal al nivel deseado (generalmente L3-L4) (figura 2).

25

En relación con la administración intravenosa, un volumen de dosis individual idónea para administración intratecal es típicamente pequeño. Típicamente, la administración intratecal mantiene el balance de la composición del LCR así como la presión intracraneal del sujeto. En algunas realizaciones, la administración intratecal se realiza ausente de la remoción correspondiente del LCR de un sujeto. En algunas realizaciones, un volumen de dosis idónea puede ser p.ej., menos de 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 idónea puede ser casi 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, la administración intratecal de acuerdo con la presente invención implica un paso de retirar una cantidad deseada de LCR primero. En algunas realizaciones, menos de casi 10 ml (p.ej., menos de casi 9 ml, 8 ml, 7 ml, 6 ml, 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml) de LCR se retira primero antes de la administración IT. En esos casos, un volumen de dosis idónea puede ser p.ej., más de casi 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml, o 20 ml.

40

Pueden usarse otros equipos para efectuar la administración intratecal de una composición terapéutica. Por ejemplo, formulaciones que contienen las enzimas deseadas pueden administrarse usando un reservorio Omaya el cual se usa comúnmente para administrar por vía intratecal medicamentos para carcinomatosis meníngea (*Lancet* 2: 983-84, 1963). Más específicamente, en este método, se inserta una sonda ventricular a través de un agujero formado en el cuerno anterior y se conecta a un reservorio Omaya instalado bajo el cráneo, y el reservorio es una punción subcutánea para administrar por vía intratecal la enzima particular que se está reemplazando, la cual se inyecta en el reservorio. Otros equipos para la administración intratecal de las composiciones terapéuticas o formulaciones para un individuo se describen en la Pat. de EE.UU. Nº 6.217,552, Alternativamente, el medicamento puede administrarse por vía intratecal, por ejemplo, por una inyección o infusión continua. Debe comprenderse que el tratamiento de dosis puede ser en la forma de administración de una dosis o múltiples dosis.

45

Para inyección, las formulaciones de la invención se preparan en soluciones líquidas. La inyección puede ser, por ejemplo, en la forma de una inyección en bolus o infusión continua (p.ej., usando bombas de infusión) de la enzima.

55

En una realización de la invención, la enzima se administra por inyección cerebroventricular lateral en el cerebro de un sujeto. La inyección puede hacerse, por ejemplo, a través de un trépano hecho en el cráneo del sujeto, o a través de una derivación insertada quirúrgicamente en el ventrículo cerebral de un sujeto. Por ejemplo, la inyección puede hacerse en los ventrículos laterales, los cuales son más grandes, o también puede hacerse en el tercer y cuarto ventrículos más pequeños.

60

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

65

En otra realización, la formulación farmacéuticamente aceptable proporciona administración sostenida, p.ej., «liberación lenta» de la enzima u otra composición farmacéutica usada en la presente invención, a un sujeto al menos por una, dos, tres, cuatro semanas o períodos más largos de tiempo luego que se administra la formulación farmacéuticamente aceptable al sujeto.

5 Tal como se usa aquí, el término «administración sostenida» se refiere a la administración continua de una formulación farmacéutica para su uso en la invención en vivo por un período de tiempo posterior a la administración, preferiblemente al menos varios días, una semana o varias semanas. La administración sostenida de la composición puede demostrarse, por ejemplo, por el efecto terapéutico continuo de la enzima en el tiempo (p.ej., la administración sostenida de la enzima puede demostrarse por una cantidad reducida continua de gránulos de depósito en el sujeto). Alternativamente, la administración sostenida de la enzima puede demostrarse detectando la presencia de la enzima in vivo en el tiempo.

10 ***Administración a tejidos diana***

15 Como se discute antes, uno de los rasgos sorprendentes e importantes de la divulgación que los agentes terapéuticos, en particular, las enzimas de reemplazo y las composiciones divulgadas en la presente pueden difundirse efectiva y extensamente a través de la superficie cerebral y penetrar varias capas o regiones del cerebro, incluyendo las regiones cerebrales profundas. Además, las composiciones para su uso en la presente invención pueden administrar cantidades suficientes de las enzimas lisosomales al torrente sanguíneo y varios órganos y tejidos periféricos.

20 La enzima lisosomal se administra al sistema nervioso central de un sujeto. En algunas realizaciones, se administra una enzima de reemplazo a uno o más tejidos dianas del cerebro, médula espinal y/u órganos periféricos. Tal como se usa aquí, el término «tejidos diana» se refiere a cualquier tejido afectado por la enfermedad de depósito lisosomal a ser tratada o cualquier tejido en el cual se expresa normalmente la enzima lisosomal deficiente. En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen los tejidos en los cuales hay una cantidad detectable o anormalmente alta de sustrato de la enzima, por ejemplo almacenado en los lisosomas celulares del tejido, en los pacientes que sufren o son susceptibles a la enfermedad de depósito lisosomal. En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen los tejidos que muestran patología, síntoma, o rasgos asociados con la enfermedad. En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen los tejidos en los cuales la enzima lisosomal deficiente normalmente se expresa normalmente a un nivel elevado. Tal como se usa aquí, un tejido diana puede ser un tejido diana cerebral, un tejido diana de la médula espinal y/o un tejido periférico diana. Ejemplos de tejidos diana se describen en detalle más adelante.

30 **Tejidos diana cerebrales**

35 En general, el cerebro puede dividirse en diferentes regiones, capas y tejidos. Por ejemplo, el tejido meníngeo es un sistema de membranas que rodea el sistema nervioso central, incluyendo el cerebro. Las meninges contienen tres capas, incluyendo la duramadre, aracnoides y piamadre. En general, la función primaria de las meninges y del líquido cefalorraquídeo es proteger al sistema nervioso central. En algunas realizaciones, una proteína terapéutica de acuerdo con la presente invención se administra a una o más capas de las meninges.

40 45 El cerebro tiene tres subdivisiones primarias, incluyendo el cerebro, cerebelo y tronco encefálico. Los hemisferios cerebrales están situados por encima de muchas otras estructuras cerebrales y están cubiertos con una capa cortical. Debajo del cerebro yace el tronco encefálico, el cual se asemeja a un tallo sobre el cual está unido el cerebro. En la parte trasera del cerebro, debajo del cerebro y delante del tronco encefálico, está el cerebelo.

50 55 El disencéfalo, el cual se localiza cerca de la línea media del cerebro y por encima del mesencéfalo, contiene el tálamo, metatálamo, hipotálamo, epítálamo, pretálamo y pretecto. El mesencéfalo, también llamado el cerebro medio, contiene el tecto, tegumento, mesocielo ventricular y pedúnculos cerebrales, el núcleo rojo, y el núcleo del III nervio craneal. El mesencéfalo se asocia con la visión, audición, control motor, sueño/vigilia, alerta, y regulación de la temperatura.

Las regiones de los tejidos del sistema nervioso central, incluyendo el cerebro, pueden caracterizarse según la profundidad de los tejidos. Por ejemplo, los tejidos del SNC (p.ej., cerebro) pueden caracterizarse como tejidos superficiales, tejidos de profundidad media y/o tejidos profundos.

60 De acuerdo con la presente invención, una enzima de reemplazo puede administrarse a cualquier tejido cerebral diana apropiado asociado con una enfermedad particular a ser tratada en un sujeto. En algunas realizaciones, una enzima para su uso con la presente invención se administra a un tejido cerebral diana superficial. En algunas realizaciones, una enzima lisosomal para su uso con la presente invención se administra a un tejido cerebral diana de profundidad media. En algunas realizaciones, una enzima lisosomal para su uso con la presente invención se administra a un tejido cerebral diana profundo. En algunas realizaciones, una enzima lisosomal para su uso con la presente invención se administra a una combinación de tejido cerebral diana superficial, tejido cerebral diana de profundidad media y/o tejido cerebral diana profundo. En algunas realizaciones, una enzima lisosomal para su uso en la presente invención se administra a un tejido cerebral

profundo al menos a 4 mm, 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm, 10 mm, o más por debajo (o interno) de la superficie externa del cerebro.

5 En algunas realizaciones, las enzimas lisosomales se administran a uno o más tejidos superficiales del cerebro. En algunos contextos, los tejidos superficiales dianas del cerebro se localizan a 4 mm de la superficie de la superficie del cerebro. En algunas realizaciones, los tejidos superficiales dianas del cerebro se seleccionan a partir de los tejidos de la piamadre, tejidos de la cinta cortical cerebral, hipocampo, espacio de Virchow Robin, vasos sanguíneos dentro del espacio VR, el hipocampo, porciones del hipotálamo en la superficie interna del cerebro, los nervios y tractos ópticos, el bulbo olfatorio y sus proyecciones, y sus combinaciones.

10 En algunas realizaciones, las enzimas se administran a uno o más tejidos profundos del cerebro. En algunas realizaciones, los tejidos superficiales dianas del cerebro se localizan a 4 mm (p.ej., 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm o 10 mm) por debajo (o interno) de la superficie del cerebro. En algunas realizaciones, los tejidos profundos dianas del cerebro incluyen la cinta cortical cerebral. En algunas realizaciones, los tejidos profundos dianas del cerebro incluyen uno o más del disencéfalo (p.ej., el hipotálamo, tálamo, pretálamo, subtálamo, etc.), metencéfalo, núcleos lenticiformes, los ganglios basales, el caudado, putamen, amígdala, globo pálido y sus combinaciones.

15 En algunas realizaciones, las enzimas lisosomales se administran a uno o más tejidos del cerebelo. En ciertas realizaciones, el o los tejidos dianas del cerebelo se seleccionan a partir del grupo consistente en los tejidos de la capa molecular, tejidos de la capa celular de Purkinje, tejidos de la capa celular granular, pedúnculos cerebelosos, y sus combinaciones. En algunas realizaciones, las enzimas se administran a uno o más tejidos profundos del cerebelo incluyendo, pero no limitados a, tejidos de la capa de células de Purkinje, tejidos de la capa de células granulares, tejido de la sustancia blanca cerebelosa profunda (p.ej., profundos en 20 relación con la capa de células granulares, y tejidos de los núcleos cerebelosos profundos).

25 En algunas realizaciones, las enzimas lisosomales se administran a uno o más tejidos del tronco encefálico. En algunas realizaciones, el tejido o tejidos dianas del tronco encefálico incluyen el tejido de la sustancia blanca del tronco encefálico y/o los tejidos de los núcleos del tronco encefálico.

30 En algunas realizaciones, las enzimas lisosomales se administran a uno o más tejidos cerebrales incluyendo, pero no limitados a, la sustancia gris, sustancia blanca, áreas periventriculares, pia-aracnoides, meninges, neocorteza, cerebelo, tejidos profundos en la corteza cerebral, capa molecular, región del caudado/putamen, mesencéfalo, regiones profundas del puente o médula, y sus combinaciones.

35 En algunas realizaciones, las enzimas lisosomales se administran a varias células en el cerebro incluyendo, pero no limitadas a, las neuronas, células gliales, células perivasculares y/o células meníngeas. En algunas realizaciones, una proteína terapéutica se administra a los oligodendrocitos de la sustancia blanca profunda.

Médula espinal

40 En general, las regiones o tejidos de la médula espinal pueden caracterizarse según la profundidad de los tejidos. Por ejemplo, los tejidos de la médula espinal pueden caracterizarse como tejidos superficiales, tejidos de profundidad media y/o tejidos profundos.

45 En algunas realizaciones, las enzimas lisosomales se administran a uno o más tejidos superficiales de la médula espinal. En algunas realizaciones, un tejido superficial diana de la médula espinal se localiza a 4 mm de la superficie de la médula espinal. En algunas realizaciones, un tejido superficial diana de la médula espinal contiene piamadre y/o los tractos de la sustancia blanca.

50 En algunas realizaciones, las enzimas lisosomales se administran a uno o más tejidos profundos de la médula espinal. En algunas realizaciones, un tejido profundo diana de la médula espinal se localiza a 4 mm de la superficie de la médula espinal. En algunas realizaciones, un tejido profundo diana de la médula espinal contiene sustancia gris de la médula espinal y/o células ependimarias.

55 En algunas realizaciones, las enzimas lisosomales se administran a neuronas de la médula espinal.

Tejidos diana periféricos

60 Tal como se usa aquí, los órganos o tejidos periféricos se refieren a cualquier órgano o tejido que no sea parte del sistema nervioso central (central nervous system, SNC). Los tejidos periféricos dianas pueden incluirse, pero no se limitan a, el sistema sanguíneo, hígado, riñón, corazón, endotelio, médula ósea y células derivadas de la médula ósea, bazo, pulmón, ganglio linfático, hueso, cartílago, ovario y testículos. En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo de acuerdo con la presente invención se administra a uno o más de los

tejidos periféricos dianas.

Biodistribución y biodisponibilidad

5 En varias realizaciones, una vez administrada al tejido diana, una enzima lisosomal se localiza a nivel intracelular. Por ejemplo, una enzima lisosomal puede localizarse en los exones, axones, lisosomas, mitocondrias o vacuolas de una célula diana (p.ej., neuronas tales como las células de Purkinje). Por ejemplo, En algunas realizaciones las enzimas administradas por vía intratecal demuestran dinámicas de traslocación de forma que la enzima se mueve dentro del espacio perivascular (p.ej., por mecanismos convectivos asistidos por pulsación). Además, mecanismos de transporte axonal activo relacionados con la asociación de la proteína o enzima administrada con los neurofilamentos también pueden contribuir o de otra forma facilitar la distribución de las proteínas administradas por vía intratecal a los tejidos más profundos del sistema nervioso central.

10 15 En algunas realizaciones, una enzima lisosomal administrada de acuerdo con la presente invención puede lograr niveles terapéutica o clínicamente efectivos o actividades en varios tejidos dianas descritos aquí. Tal como se usa aquí, un nivel o actividad terapéutica o clínicamente efectivo 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 efectivo puede ser un nivel o actividad enzimática que es suficiente para mejorar los síntomas asociados con la enfermedad en el tejido diana (p.ej., depósito de GAG).

20 25 En algunas realizaciones, una enzima lisosomal administrada de acuerdo con 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 lisosomal correspondiente en el tejido diana. En algunas realizaciones, una enzima lisosomal administrada de acuerdo con la presente invención puede alcanzar un nivel o actividad enzimática que aumenta al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces comparada con un control (p.ej., niveles o actividades endógenas sin el tratamiento). En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo de acuerdo con la presente invención puede alcanzar un nivel o actividad enzimática aumentada al menos aproximadamente 10 nmol/h/mg, 20 nmol/h/mg, 40 nmol/h/mg, 50 nmol/h/mg, 60 nmol/h/mg, 70 nmol/h/mg, 80 nmol/h/mg, 90 nmol/h/mg, 100 nmol/h/mg, 150 nmol/h/mg, 200 nmol/h/mg, 250 nmol/h/mg, 300 nmol/h/mg, 350 nmol/h/mg, 400 nmol/h/mg, 450 nmol/h/mg, 500 nmol/h/mg, 550 nmol/h/mg o 600 nmol/h/mg en un tejido diana.

30 35 En algunas realizaciones, las composiciones para su uso con la presente invención son particularmente útiles para alcanzar la región lumbar. En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo de acuerdo con la presente invención puede alcanzar un nivel o actividad enzimática en la región lumbar de al menos aproximadamente 500 nmol/h/mg, 600 nmol/h/mg, 700 nmol/h/mg, 800 nmol/h/mg, 900 nmol/h/mg, 1000 nmol/h/mg, 1500 nmol/h/mg, 2000 nmol/h/mg, 3000 nmol/h/mg, 4000 nmol/h/mg, 5000 nmol/h/mg, 6000 nmol/h/mg, 7000 nmol/h/mg, 8000 nmol/h/mg, 9000 nmol/h/mg, o 10,000 nmol/h/mg.

40 45 En general, las enzimas lisosomales administradas según la presente invención tienen una vida media suficientemente larga en el LCR y tejidos diana del cerebro, médula espinal y órganos periféricos. En algunas realizaciones, una enzima lisosomal administrada de acuerdo con 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, una enzima lisosomal administrada de acuerdo con la presente invención puede retener un nivel o actividad detectable en el LCR o la corriente sanguínea luego 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 50 una semana después de la administración. El nivel o actividad detectable puede determinarse usando varios métodos conocidos en la técnica.

55 60 En ciertas realizaciones, una enzima lisosomal administrada de acuerdo con la presente invención resultó alcanza una concentración de al menos 30 µg/ml en los tejidos del SNC y células del sujeto tras la administración (p.ej., 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, tras la administración intratecal de la composición farmacéutica al sujeto). En ciertas realizaciones, una enzima lisosomal administrada de acuerdo con la presente invención alcanza 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 2,5 µg/ml, al menos 1,0 µg/ml o al menos 0,5 µg/ml en los tejidos o células dianas del sujeto (p.ej., tejidos o neuronas cerebrales) tras la administración a tal sujeto (p.ej., 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 tras la administración intratecal de tales composiciones farmacéuticas al sujeto).

Tratamiento de las enfermedades por almacenamiento lisosomal por administración intratecal

65

5 Las enfermedades de depósito lisosomal representan un grupo de trastornos metabólicos hereditarios relativamente raros que resultan de defectos en la función lisosomal. Las enfermedades lisosomales se caracterizan por la acumulación de macromoléculas no digeridas, incluyendo esos sustratos de enzimas, dentro de los lisosomas (véase Tabla 1), lo cual resulta en un aumento en el tamaño y número de tales lisosomas y finalmente en disfunción celular y anormalidades clínicas.

10 10 Los métodos descritos aquí pueden facilitar ventajosamente la administración de una o más enzimas de reemplazo a los organelos dianas. Por ejemplo, debido a que los trastornos de depósito lisosomal tales como el sindrome de Hunter se caracterizan por una acumulación de glicosaminoglicanos (GAG) en los lisosomas de las células afectadas, los lisosomas representan un organelo diana deseado para el tratamiento de los trastornos del depósito lisosomal.

15 15 Las composiciones para su uso en la presente invención son particularmente útiles para tratar esas enfermedades que tienen una etiología o componente en el SNC. Las enfermedades de depósito lisosomal que tienen una etiología o componente en el SNC, incluyen por ejemplo y sin limitación el sindrome de Sanfilippo tipo A, sindrome de Sanfilippo tipo B, enfermedad de Hunter, leucodistrofia metacromática y leucodistrofia de células globoideos. Antes de la presente invención, las terapias tradicionales eran limitadas en cuanto a que se le administraban a los sujetos por vía intravenosa, y generalmente eran efectivas sólo en el tratamiento de los síntomas somáticos de la deficiencia enzimática subyacente. Las composiciones para su uso en la presente invención pueden administrarse ventajosa y directamente en el SNC de un sujeto que sufre de una enfermedad que tiene tal etiología en el SNC alcanzando así una concentración terapéutica dentro de las células y tejidos afectados del SNC (p.ej., el cerebro), venciendo así las limitaciones asociadas con la administración sistémica tradicional de tales agentes terapéuticos.

20 25 En algunas realizaciones, las composiciones para su uso en la invención son útiles para tratar las secuelas o síntomas neurológicos y somáticos de los trastornos del depósito lisosomal. Por ejemplo, algunas realizaciones de la invención usan composiciones para el tratamiento del SNC o secuelas y manifestaciones neurológicas de una enfermedad de depósito lisosomal, mientras que también tratan las manifestaciones sistémicas o somáticas de esa enfermedad de depósito lisosomal. Por ejemplo, algunas composiciones para su uso en 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, acoplada con la administración intravenosa de uno o más agentes terapéuticos para administrar tales agentes terapéuticos a las células y tejidos de la circulación sistémica (p.ej., células y tejidos del corazón, pulmones, hígado, riñón o ganglios linfáticos) para tratar así las secuelas somáticas. Por ejemplo, a un sujeto que tenga o que esté afectado por una enfermedad por depósito lisosomal (p.ej., sindrome de Hunter) puede administrársele una composición farmacéutica que comprenda uno o más agentes terapéuticos (p.ej., iduronato-2-sulfatasa) por vía intratecal al menos una vez a la semana, dos veces por semana, mensualmente, cada dos meses o más para tratar las secuelas neurológicas, mientras que se administra un agente terapéutico diferente al sujeto por vía intravenosa de forma más frecuente (p.ej., una vez al día, un día sí un día no, tres veces a la semana o semanalmente) para tratar las manifestaciones sistémicas o somáticas de la enfermedad.

30 35 40 45 Por ejemplo, los pacientes que sufren del sindrome de Hunter exhiben cambios histológicos en el cerebro los cuales pueden incluir atrofia, edema neuronal cortical, reducción de la sustancia blanca cerebral, espacios perivasculares dilatados y edema de las dendritas de las células de Purkinje. Los estudios con imágenes por resonancia magnética/espectroscopia han demostrado que las lesiones difusas severas que afectan a la sustancia blanca, atrofia cerebral e hidrocefalia eran más comunes en los pacientes con alteración cognitiva comparados con los que no tenían alteración. (Vedolin, L., et al., AJNR Am J Neuroradiol (2007) 28, 1029-1033). Incluso se ha demostrado que los pacientes sin secuelas neurológicas extremas tales como retardo mental o retardos del desarrollo tienen anormalidades cerebrales que incluyen atrofia, ventriculomegalia y crecimiento de los espacios perivasculares. (Matheus, MG, et al., Neuroradiology (2004) 46, 666-672.)

50 55 Como ejemplo no limitante, la mucopolisacaridosis tipo IIIA (MPS IIIA; sindrome de Sanfilippo tipo A) es la más severa forma del sindrome de Sanfilippo tipo A y afecta aproximadamente a 1 de cada 100,000 personas en todo el mundo. El sindrome de Sanfilippo tipo A (Sanfilippo A) se caracteriza por una deficiencia de la enzima heparán-N-sulfatasa (HNS), una exosulfatasa involucrada en el catabolismo lisosomal del glicosaminoglicano (GAG) heparán sulfato (Neufeld EF, et al. The Metabolic y Molecular Bases of Inherited Disease (2001) pp. 3421-3452). En ausencia de esta enzima, el GAG heparán sulfato se acumula en los lisosomas de las neuronas y células gliales, con menos acumulación fuera del cerebro.

60 Como ejemplo no limitante, la mucopolisacaridosis tipo IIIB (MPS IIIB; sindrome de Sanfilippo tipo B) es un trastorno autosómico recesivo que se caracteriza por una deficiencia de la enzima α-N-acetilo-glucosaminidasa (Naglu). En ausencia de esta enzima, el GAG heparán sulfato se acumula en los lisosomas de las neuronas y células gliales, con menos acumulación fuera del cerebro.

65 Como ejemplo no limitante, la leucodistrofia de células globoides (GLD) es un raro trastorno del depósito

5 lisosomal autosómico recesivo causado por la función defectuosa de la galactocerebrosidasa (GALC). La GALC es una enzima hidrolasa ácida lisosomal soluble que degrada la galactosilceramida, un componente normal de la mielina, en galactosa y ceramida, y la psicosina (galactosilesfingosina), un subproducto tóxico de la síntesis de la galactosilceramida, en galactosa y esfingosina. La deficiencia de GALC conduce a la lesión neurológica de los sistemas nerviosos central y periférico (SNC y PNS respectivamente) en dos rutas relacionadas, pero distintas.

10 La primera ruta conduce a una acumulación excesiva de psicosina con apoptosis resultante de las células mielinizantes. En la segunda ruta, la galactosilceramida se acumula y es fagocitada en la microglia activada, produciendo la célula globoide característica por la cual la enfermedad tiene su nombre. En contraste con otras enfermedades por depósito lisosomal en las cuales se acumula el sustrato no degradado, generalmente no hay aumento en la galactosilceramida en el tejido neural.

15 Un rasgo clínico definitorio de este trastorno es la degeneración del SNC, la cual resulta en la pérdida o falla en alcanzar las metas mayores del desarrollo. El descenso cognitivo progresivo culmina en demencia y mortalidad prematura. La enfermedad puede manifestarse en los niños pequeños (GLD de inicio temprano), o en individuos de cualquier edad (GLD de inicio tardío). El tiempo de vida de un individuo afectado con GLD de inicio temprano no se extiende más allá de los dos años de edad. La GLD de inicio tardío puede aparecer en individuos de cualquier edad y la progresión de la enfermedad puede variar mucho.

20 La Enfermedad por Leucodistrofia Metacromática (MLD) es un trastorno autosómico recesivo que resulta de una deficiencia de la enzima arilsulfatasa A (ASA). La ASA, la cual es codificada por el gen ARSA en los humanos, es una enzima que escinde el cerebrósido-3-sulfato o el esfingolípido 3-O-sulfogalactosilceramida (sulfatida) en cerebrósido y sulfato. En ausencia de la enzima, las sulfatidas se acumulan en el sistema nervioso (p.ej., vainas de mielina, neuronas y células gliales) y en menor grado en los órganos viscerales. La consecuencia de estos eventos moleculares y celulares es la desmielinización progresiva y pérdida axonal dentro del SNC y PNS, lo cual se acompaña clínicamente de disfunción motora y cognitiva severa.

25 Un rasgo clínico definitorio de este trastorno es la degeneración del SNC, la cual resulta en alteración cognitiva (p.ej., retardo mental, trastornos nerviosos, y ceguera, entre otros).

30 Como ejemplo no limitante, la MLD puede manifestarse en niños pequeños (forma infantil tardía), en la cual los niños afectados comienzan a mostrar síntomas justo después del primer año de vida (p.ej., a los 15-24 meses), y generalmente no sobreviven más allá de los 5 años de edad. La MLD puede manifestarse en niños (forma juvenil), en la cual los niños afectados muestran alteración cognitiva a los 3-10 años de edad, y el período de vida puede variar (p.ej., en el rango de 10-15 años después del inicio de los síntomas). La MLD puede manifestarse en los adultos (forma de inicio en el adulto), y puede aparecer en individuos de cualquier edad (p.ej., a los 16 años de edad y más) y la progresión de la enfermedad puede variar mucho.

35 Así, en algunas realizaciones, las composiciones administran una o más enzimas de reemplazo a uno o más organelos (p.ej., los lisosomas) de los tejidos y células dianas del cerebro, médula espinal y/u órganos periféricos para efectuar el tratamiento de varias enfermedades por depósito lisosomal. Tal como se usa aquí, los términos «tratar» o «tratamiento», se refieren a la mejoría de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, prevención o retardo del inicio de uno o más síntomas de la enfermedad y/o disminución de la severidad o frecuencia de uno o más síntomas de la enfermedad.

40 45 En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere al alivio, mejoría, inhibición retraso de la instalación, reducción de la severidad y/o incidencia parcial o completa de la alteración neurológica en un paciente que sufre o es susceptible a una enfermedad lisosomal. Tal como se usa aquí, el término «alteración neurológica» incluye varios síntomas asociados con la alteración del sistema nervioso central (p.ej., el cerebro y médula espinal). Los síntomas de la alteración neurológica pueden incluir, por ejemplo, retardo del desarrollo, alteración cognitiva progresiva, pérdida auditiva, desarrollo alterado del habla, déficits en las destrezas motoras, hiperactividad, agresividad y/o trastornos del sueño, entre otros.

50 55 60 En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere al menor almacenamiento lisosomal (p.ej., macromoléculas almacenadas tales como GAG) en varios tejidos. En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la disminución del almacenamiento lisosomal en los tejidos cerebrales dianas, neuronas de la médula espinal y/o tejidos periféricos dianas. En ciertas realizaciones, el almacenamiento lisosomal disminuye en casi 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 el control. En algunas realizaciones, el almacenamiento lisosomal disminuye al menos en 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces comparada con un control. En algunas realizaciones, lisosoma almacenamiento se mide por la presencia de gránulos de almacenamiento lisosomal (p.ej., morfología en manchas de cebra).

65 En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la vacuolización reducida en las neuronas (p.ej., neuronas que contienen Purkinje células). En ciertas realizaciones, la vacuolización en las neuronas se reduce al menos en 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, la vacuolización disminuye 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces en comparación con el control.

En ciertas realizaciones, el tratamiento de acuerdo con la presente invención resulta en una reducción (p.ej., en casi un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 97,5%, 99% o mayor reducción) o una eliminación completa de la presencia, o alternativamente la acumulación, de uno o más marcadores patológicos o biológicos los cuales están asociados con las enfermedades de depósito lisosomal. Tal reducción o eliminación puede ser particularmente evidente en las células y tejidos del SNC (p.ej., neuronas o oligodendrocitos). Por ejemplo, En algunas realizaciones, la administración a un sujeto de las composiciones farmacéuticas de la presente invención demuestra o consigue una reducción en la acumulación del biomarcador proteína 1 de la membrana asociada lisosomal (LAMP1) en las células y tejidos del SNC del sujeto (p.ej., en la corteza cerebral, cerebelo, núcleo caudado y putamen, sustancia blanca y/o tálamo). LAMP1 es una glicoproteína altamente expresada en las membranas lisosomales y su presencia se eleva en muchos pacientes con un trastorno del almacenamiento lisosomal. (Meikle, et al. Clin Chem. (1997)43:1325-1335.) La presencia o ausencia de LAMP1 en los pacientes (p.ej., determinada por tinción de LAMP) con una enfermedad por depósito lisosomal por tanto puede proporcionar un indicador útil de actividad lisosomal y un marcador para el diagnóstico y monitorización de las enfermedades por depósito lisosomal.

Por consiguiente, algunas realizaciones de la presente invención reducen o eliminan la presencia o acumulación de uno o más marcadores patológicos o biológicos asociados con una enfermedad (p.ej., una enfermedad por depósito lisosomal). Similarmente, algunas realizaciones de la presente invención se relacionan con los métodos de aumentar la degradación (o la velocidad de degradación) de uno o más marcadores patológicos o biológicos (p.ej., LAMP1) asociados con las enfermedades de depósito lisosomal.

En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la menor progresión de la pérdida de capacidad cognitiva. En ciertas realizaciones, la progresión de la pérdida de capacidad cognitiva se reduce al menos en 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 una disminución del retardo del desarrollo. En ciertas realizaciones, el retardo del desarrollo disminuye en casi 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 el control.

En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la mayor sobrevida (p.ej., tiempo de sobrevida). Por ejemplo, el tratamiento puede resultar en una mayor expectativa de vida de un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento de acuerdo con la presente invención resulta en una mayor expectativa de vida de un paciente en más de casi 5%, casi 10%, casi 15%, casi 20%, casi 25%, casi 30%, casi 35%, casi 40%, casi 45%, casi 50%, casi 55%, casi 60%, casi 65%, casi 70%, casi 75%, casi 80%, casi 85%, casi 90%, casi 95%, casi 100%, casi 105%, casi 110%, casi 115%, casi 120%, casi 125%, casi 130%, casi 135%, casi 140%, casi 145%, casi 150%, casi 155%, casi 160%, casi 165%, casi 170%, casi 175%, casi 180%, casi 185%, casi 190%, casi 195%, casi 200%, o más, en comparación con la expectativa de vida promedio de uno o más individuos de control con enfermedad similar sin tratamiento. En algunas realizaciones, el tratamiento de acuerdo con la presente invención resulta en una mayor expectativa de vida de un paciente en más de casi 6 meses, casi 7 meses, casi 8 meses, casi 9 meses, casi 10 meses, casi 11 meses, casi 12 meses, casi 2 años, casi 3 años, casi 4 años, casi 5 años, casi 6 años, casi 7 años, casi 8 años, casi 9 años, casi 10 años o más, en comparación con la expectativa de vida promedio de uno o más individuos de control con enfermedad similar sin tratamiento. En algunas realizaciones, el tratamiento de acuerdo con la presente invención resulta en una sobrevida a largo plazo de un paciente. Tal como se usa aquí, el término «sobrevida a largo plazo» se refiere a un tiempo de sobrevida o expectativa de vida mayor de casi 40 años, 45 años, 50 años, 55 años, 60 años o más.

Los términos «mejorar», «aumentar» o «reducir», tal como se usan aquí, indican valores que son relativos a un control. En algunas realizaciones, un control idóneo es una medición basal, tal como una medición en el mismo individuo antesde iniciar el tratamiento descrito aquí, o una medición en un individuo de control (o múltiples individuos de control) en ausencia del tratamiento descrito aquí. Un «individuo de control» es un individuo afectado con la misma enfermedad, quien tiene casi la misma edad y/o sexo que el individuo que está siendo tratado (para asegurar que las etapas de la enfermedad en el individuo tratado y el (los) individuo(s) de control (es) son comparable(s)).

El individuo (también denominado «paciente» o «sujeto») que está siendo tratado es un individuo (feto, bebé, niño, adolescente o adulto humano) que tiene la enfermedad o tiene el potencial de desarrollar la enfermedad. El individuo puede tener una expresión y/o actividad residual de la enzima lisosomal endógena, o ninguna actividad medible. Por ejemplo, el individuo que tiene sindrome de Sanfilippo tipo A puede tener niveles de expresión de HNS que son menores de casi 30-50%, menores de casi 25-30%, menores de casi 20-25%, menores de casi 15-20%, menores de casi 10-15%, menores de casi 5-10%, menores de casi 0.1-5% de los niveles normales de la expresión de la HNS.

Tolerancia Inmune

5 Generalmente, la administración intratecal de una enzima lisosomal para su uso en la presente invención no resulta en efectos adversos severos en el sujeto. Tal como se usa aquí, los efectos adversos severos inducen, pero no se limitan a, respuesta inmune sustancial, toxicidad o muerte. Tal como se usa aquí, el término «respuesta inmune sustancial» se refiere a respuestas inmunes severas o serias, tales como respuestas inmunes adaptativas del linfocito T.

10 Así, en muchas realizaciones, la presente invención no implica la terapia inmunosupresora concomitante (es decir, cualquier terapia inmunosupresora usada como pretratamiento/precondicionamiento o en paralelo con el método). En algunas realizaciones, la presente invención no implica una inducción de tolerancia inmune en el sujeto tratado. En algunas realizaciones, la presente invención no implica un pretratamiento o precondicionamiento del sujeto usando un inmunosupresor de linfocitos T.

15 En algunas realizaciones, la administración intratecal de enzimas puede montar una respuesta inmune contra estos agentes. Así, En algunas realizaciones, puede ser útil hacer que el sujeto que recibe la enzima de reemplazo se haga tolerante a la terapia de reemplazo de la enzima. La tolerancia inmune puede ser inducida usando varios métodos conocidos por los por los expertos en la materia. Por ejemplo, puede usarse un régimen inicial de 30-60 días de un inmunosupresor de linfocitos T como ciclosporina A (CsA) y un antiproliferativo, como azatioprina (Aza), combinado con infusiones intratecales semanales de dosis bajas de una enzima de reemplazo deseada.

20 Cualquier inmunosupresor conocido por los expertos en la materia puede emplearse junto con una combinación de terapias de la invención. Estos inmunosupresores incluyen pero no se limitan a ciclosporina, FK506, rapamicina, CTLA4-Ig, y agentes anti-TNF como etanercept (ver p.ej., Moder, 2000, Ann. Allergy Asthma Immunol. 84, 280-284; Nevins, 2000, Curr. Opin. Pediatr. 12, 146-150; Kurlberg et al., 2000, Scand. J. Immunol. 51, 224-230; Ideguchi et al., 2000, Neuroscience 95, 217-226; Potteret et al., 1999, Ann. N.Y. Acad. Sci. 875, 159-174; Slavik et al., 1999, Immunol. Res. 19, 1-24; Gaziev et al., 1999, Bone Marrow Transplant. 25, 689-696; Henry, 1999, Clin. Transplant. 13, 209-220; Gummert et al., 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10, 1366-1380; Qi et al., 2000, Transplantation 69, 1275-1283). El anticuerpo del receptor Anti-IL2 (.alfa.-subunidad) declizumab (p.ej., Zenapax.TM.), el cual ha demostrado ser efectivo en pacientes trasplantados, también puede usarse como un inmunosupresor (véase p.ej., Wiseman et al., 1999, Drugs 58, 1029-1042; Beniaminovitz et al., 2000, N. Engl. J. Med. 342, 613-619; Ponticelli et al., 1999, Drugs R. D. 1, 55-60; Berard et al., 1999, Phannacotherapy 19, 1127-1137; Eckhoff et al., 2000, Transplantation 69, 1867-1872; Ekberg et al., 2000, Transpl. Int. 13, 151-159). Inmunosupresores adicionales incluyen pero no se limitan a anti-CD2 (Branco et al., 1999, Transplantation 68, 1588-1596; Przepiorka et al., 1998, Blood 92, 4066-4071), anti-CD4 (Marinova-Mutafchieva et al., 2000, Arthritis Rheum. 43, 638-644; Fishwild et al., 1999, Clin. Immunol. 92, 138-152), y ligando anti-CD40 (Hong et al., 2000, Semin. Nephrol. 20, 108-125; Chinnule et al., 2000, J. Virol. 74, 3345-3352; Ito et al., 2000, J. Immunol. 164, 1230-1235).

40 Administración

45 La presente invención contempla administraciones únicas así como múltiples de una cantidad terapéuticamente efectiva de las enzimas lisosomales descritas aquí. Las enzimas lisosomales pueden administrarse a intervalos regulares, dependiendo de la naturaleza, severidad y extensión de la enfermedad por depósito lisosomal del sujeto. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva de las enzimas lisosomales de la presente invención puede administrarse por vía intratecal periódicamente a intervalos regulares (p.ej., una vez al año, una vez cada seis meses, una vez cada cinco meses, una vez cada tres meses, bimensual (una vez cada dos meses), mensual (una vez al mes), bisemanal (una vez cada dos semanas), semanal).

50 50 En algunas realizaciones, la administración intratecal puede usarse en conjunto con otras vías de administración(p.ej., intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, trasdérmica o trasmucosal (p.ej., oral o nasal)). En algunas realizaciones, esas otras vías de administración (p.ej., administración intravenosa) pueden realizarse no más frecuente que bisemanal, mensual, 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, anualmente.

60 Tal como se usa aquí, el término «cantidad terapéuticamente efectiva» se determina según la cantidad total del agente terapéutico contenido en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Generalmente, una cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para alcanzar un beneficio significativo para el sujeto (p.ej., tratando, modulando, curando, previniendo y/o mejorando la enfermedad o condición subyacente). Por ejemplo, cantidad terapéuticamente efectiva puede ser una cantidad suficiente para alcanzar un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, tal como una cantidad suficiente para modular a los receptores de las enzimas lisosomales o su actividad para tratar así a esta enfermedad por depósito lisosomal o sus síntomas (p.ej., una reducción o eliminación de la presencia o incidencia de los «cuerpos de cebra» o vacuolización celular tras la administración de las composiciones de la presente invención a un sujeto). Generalmente, la cantidad de

5 un agente terapéutico (p.ej., una enzima lisosomal recombinante) administrada a un sujeto en necesidad del mismo dependerá de las características del sujeto. Tales características incluyen la condición, severidad de la enfermedad, salud general, edad, sexo y peso corporal el sujeto. Los expertos en la materia podrán determinar rápidamente las dosis apropiadas dependiendo de éstos y otros factores relacionados. Además, opcionalmente pueden emplearse ensayos objetivos y subjetivos para identificar las dosis óptimas.

10 Una cantidad terapéuticamente efectiva comúnmente se administra en un régimen de dosis que puede comprender multiples dosis. Para cualquier proteína terapéutica particular, una cantidad terapéuticamente efectiva (y/o una dosis apropiada dentro de un régimen de dosificación efectivo) puede variar, por ejemplo, dependiendo de la vía de administración, en combinación con otros agentes farmacéuticos. También, la cantidad terapéuticamente efectiva específica (y/o dosis unitaria) para cualquier paciente particular puede depender de una variedad de factores incluyendo el trastorno tratado y la severidad 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, vía de administración, y/o tasa de excreción o metabolismo de la proteína de fusión específica empleada; la duración del tratamiento; y factores semejantes tal como saben bien los expertos en la materia

15 En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente efectiva está entre 0,005 mg/kg de peso cerebral a 500 mg/kg de peso cerebral, e.g., entre 0,005 mg/kg de peso cerebral a 400 mg/kg de peso cerebral, entre 0,005 mg/kg de peso cerebral a 300 mg/kg de peso cerebral, e.g., entre 0,005 mg/kg de peso cerebral a 200 mg/kg de peso cerebral, entre 0,005 mg/kg de peso cerebral a 100 mg/kg de peso cerebral, entre 0,005 mg/kg de peso cerebral a 90 mg/kg de peso cerebral, entre 0,005 mg/kg de peso cerebral a 80 mg/kg de peso cerebral, entre 0,005 mg/kg de peso cerebral a 70 mg/kg de peso cerebral, entre 0,005 mg/kg de peso cerebral a 60 mg/kg de peso cerebral, entre 0,005 mg/kg de peso cerebral a 50 mg/kg de peso cerebral, entre 0,005 mg/kg de peso cerebral a 40 mg/kg de peso cerebral, entre 0,005 mg/kg de peso cerebral a 30 mg/kg de peso cerebral, entre 0,005 mg/kg de peso cerebral a 25 mg/kg de peso cerebral, entre 0,005 mg/kg de peso cerebral a 20 mg/kg de peso cerebral, entre 0,005 mg/kg de peso cerebral a 15 mg/kg de peso cerebral, entre 0,005 mg/kg de peso cerebral a 10 mg/kg de peso cerebral.

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

25 En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente efectiva también puede definirse por mg/kg peso corporal. Como saben los expertos en la materia, los pesos cerebrales y 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. Así, En algunas realizaciones, las dosis pueden convertirse como se muestra en la Tabla 4.

30

Tabla 4 Conversión de dosis		
Correlación entre pesos cerebrales, pesos corporales y edades de varones		
	Edad (año)	Peso cerebral (kg)
40	3 (31-43 meses)	1,27
45	4-5	1,30
50		15,55
		19,46

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

55 Se comprende que para un paciente particular, los regímenes específicos de dosis deben ajustarse en el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de la terapia de reemplazo enzimático y que los rangos de dosis establecidos aquí son solo de ejemplo.

Paquetes

5 También se divultan paquetes u otros artículos de fabricación los cuales contienen la formulación divulgada en la presente y proporcionan instrucciones para su reconstitución (si está liofilizada) y/o uso. Los paquetes u otros artículos de fabricación pueden incluir un contenedor, un IDDD, un catéter y otros artículos, equipos o aparatos útiles en la administración intratecal y cirugía asociada. Idóneas contenedores incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas (p.ej., jeringas prellenadas), ampollas, cartuchos, reservorios, o lioinyectores. El contenedor puede estar formado a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. En algunas 10 realizaciones, un contenedor es una jeringa prellenada. Las jeringas prellenadas idóneas incluyen, pero no se limitan a, jeringas de vidrio de borosilicato con cubierta horneada de silicona, jeringas de vidrio de borosilicato con silicona dispersa o jeringas de resina plástica sin silicona.

15 El contenedor puede tener formulaciones y una etiqueta sobre, o asociada con, el contenedor que puede indicar las direcciones para su reconstitución y/o uso. Por ejemplo, la etiqueta puede indicar que la formulación se reconstituye a las concentraciones de proteínas descritas antes. La etiqueta puede indicar que la formulación es útil o se pretende para administración intravenosa. Un contenedor puede contener una sola dosis de una formulación estable que contiene una enzima de reemplazo. Una dosis única de la formulación estable 20 está presente en un volumen menor de casi 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 contenedor con la formulación puede ser un vial multiuso, el cual permite administraciones repetidas (p.ej., 2-6 administraciones) de la formulación. Los paquetes u otros artículos de 25 fabricación pueden incluir también un segundo contenedor que comprende un diluyente idóneo (p.ej., BWFI, solución fisiológica, solución fisiológica tamponada). Al mezclar el diluyente y la formulación, la concentración final de proteína en la formulación reconstituida generalmente será al menos 1 mg/ml (p.ej., 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 paquetes u otros artículos de fabricación pueden incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, IDDDs, catéteres, jeringas e insertos del paquete con instrucciones para su uso.

30 La invención se comprenderá más completamente por referencia a los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplos de administración de proteína GalC por vía intratecal

35 **EJEMPLO 1: CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LA FORMULACIÓN DE GALC PARA ADMINISTRACIÓN INTRATECAL**

40 El presente Ejemplo describe la caracterización fisicoquímica de GalC para comprender su conducta y estabilidad bajo diferentes condiciones de solución durante la administración intratecal (IT) de la proteína.

Entre otras cosas, el presente Ejemplo describe una formulación de GalC la cual es importante para la administración IT exitosa de GalC. En algunas realizaciones, esta formulación incluye 5 mM fosfato de Na + 150 mM NaCl, pH 6,0 + 0,005% polisorbato 20. En algunas realizaciones, esta formulación incluye <5 mM, <10 mM, 45 <15 mM y <20 mM fosfato de Na. En algunas realizaciones, esta formulación incluye un pH ≥ 5,5 y ≤ pH 7,0 con 150 mM NaCl.

50 Se evaluaron vehículos de administración PBS administración de molaridad variable de fosfato y pH en Monos Cynomolgus adultos (figura 3). 5 mM fosfato en un rango de pH de 5,5-7,0 no mostró efecto adverso mientras que 20 mM de fosfato entre pH 7,0-7,5 y 10-20 mM de fosfato entre pH 7,5-8,0 mostró un efecto 55 adverso en los monos (figura 3). Se investigó la estabilidad térmica de hGalC (Img/ml) en un tampón 3 mM citrato, fosfato y borato con 50 mM NaCl, como función del pH dentro del rango de pH 5,0-8,0 (figura 4). La actividad específica de hGalC se midió de forma basal (20-25°C) y a 2 semanas a 40°C reteniendo la mayor actividad específica entre pH 6,0-6,5 (figura 4). La actividad específica de hGalC se midió adicionalmente a los 3 meses a 5°C reteniendo la mayor actividad específica entre pH 6,0-6,5 (figura 5). La temperatura de fusión de hGalC se midió como función del pH (Tabla 5) y también se midió de forma independiente en diferentes formulaciones (Tabla 6).

60

65

Tabla 5: Temperatura de fusión de hGalC (1 mg/mL) como función del pH

pH del tampón universal	Tm (°C)
4,5*	61,6
5,0*	63,0
6,0	60,8
6,5	58,9
7,0	57,3
7,5	56,5

*[GalC]<1 mg/mL debido a precipitación

Tabla 6: Temperatura de fusión de hGalC (1mg/ml) en diferentes formulaciones

Formulación (pH 6,0)	Tm (°C)
5 mM fosfato, 50 mM NaCl	61,6
5 mM fosfato, 150 mM NaCl	60,2
5 mM fosfato, 500 mM NaCl	59,5
5 mM fosfato, 5% dextrosa	63,8
5 mM fosfato, 150 mM NaCl, 1%NaTC	56,8

- 5 Estabilidad térmica de hGalC, determinada por retención de la actividad específica de hGalC a ~3 semanas a 5°C y 2 semanas a 40°C, también se evaluó como función de la concentración de sal (figura 6). Los resultados demostraron que hGalC retuvo una alta actividad específica luego de 3 semanas a 5°C en una variedad de concentraciones de sal entre 5 mM fosfato + 50 mM NaCl (abreviado aquí como 5+50) a 50 mM fosfato + 150 mM NaCl (abreviado aquí como 50+150), a pH 6,5 (figura 6).
- 10

Análisis de sedimentación de hGalC

- 15 La velocidad de sedimentación es un método de ultracentrifugación analítica (analytical ultracentrifugation, AUC) que mide la velocidad a la cual las moléculas se mueven en respuesta a fuerzas centrífugas generadas en una centrifuga y es una técnica útil para determinar el estado de asociación de la proteína en solución. La primera corrida de velocidad de sedimentación fue una serie de dilución de GalC humana en 5 mM fosfato de Na, pH 6,0 con 150 mM NaCl (figura 7) para evaluar la autoasociación y/o no idealidad de la muestra. La serie de dilución se graficó como curvas normalizadas $g(s^*)$ ($g(s^*)$) vs s^* a cada concentración. El cambio general en las curvas a valores menores de s con la dilución indica disociación, y éste es un sistema autoasociante rápidamente reversible. Comparado las diferentes fuerzas iónicas (figura 7A, B y C), está claro que el grupo de curvas cambian a valores s menores al elevar la fuerza iónica indicando que las interacciones iónicas también están involucradas en el proceso de asociación y que la autoasociación disminuye con las concentraciones mayores de sal.
- 20

- 25 La GalC murina también se corrió al mismo tiempo a 150 mM NaCl para comparar con la hGalC. Comparando las fuerzas iónicas correspondientes (150 mM NaCl), está claro que la energía libre de autoasociación de la mGalC es menor que la hGalC. Las curvas en la figura 7 se cortaron a 20S para mostrar la disociación más claramente; sin embargo, cuando estas corridas se analizan usando los análisis de distribución amplia (wide distribution analyses, WDA) y los resultados se grafican en una escala logarítmica, claramente pueden verse agregados mayores ($s^*>20S$). La agregación a oligómeros altos (figura 8) es especialmente visible a 50 mM NaCl, disminuye algo en 10 mM NaCl y se reduce significativamente, pero está presente, en 500 mM NaCl a pH 6,0. La curva WDA desde la mayor concentración de cada una de las fuerzas iónicas se grafica en la figura 8.

35 Autoasociación en tampón universal a pH 6,0

- Bajo estas condiciones en el tampón universal, la autoasociación parece ser casi de la misma magnitud que en el tampón de fosfato, pH 6,0, como se ve en la figura 9. También se investigó el efecto del pH sobre la energética de la autoasociación de hGalC en el tampón universal. Las series de dilución se realizaron a pH 4,5, 5,0, 6,0, 6,5, 7,0 y 7,5. Las muestras a pH 4,5 y 5,0 eran insolubles habiendo precipitado esencialmente 100% de la hGalC dejando nada para medir en el sobrenadante.
- 40

El efecto del pH se muestra claramente en la figura 10 donde la mínima cantidad de autoasociación se observa a pH 7,5 y se observa una considerable autoasociación a pH 6,0. La tendencia es similar a la que se ve con las variaciones en la fuerza iónica con un pH mayor. Aumentar la fuerza iónica y el pH cambia el equilibrio para favorecer los oligómeros más pequeños a la mayor concentración (todo casi a 1,0 mg/mL). El descenso en la concentración por 1/3 de diluciones seriales (véase figura 7) cambia el equilibrio hacia la especie más pequeña la cual parece tener un coeficiente de concentración de casi 5.2S. El pico que ocurre a casi 10-13S probablemente representa un tetrámero de la especie 5S. Los esfuerzos por ajustar estos datos a un modelo de autoasociación hasta ahora no han tenido éxito y probablemente se debe a la microheterogeneidad inherente que surge a partir de los grados variables de glicosilación.

Autoasociación en tampón universal a pH 6,0

Las muestras presionadas y basales de GalC en 5 mM fosfato de Na, pH 6,0, con 150 mM NaCl se compararon en un experimento de serie de dilución (rojo→azul→verde→negro). Los resultados para la menor concentración (negro) ~0,03mg/mL se han alisado y por eso la curva parece tener menos ruido. En la muestra presionada hay un agregadoalrededor de $\ln(s^*) = 3,0$ (~20S) que está presente en una concentración mucho mayor que en la muestra basal. Representa una fracción casi constante de la muestra evidenciada por su persistencia a la dilución en los gráficos normalizados (figura 11, figura 12, figura 13). Por tanto es un agregado irreversible con una masa molar de al menos 500 kg/mol.

hGalC con taurocolato de sodio en solución

En taurocolato de sodio (NaTC)(1%), la autoasociación se reduce significativamente. El límite principal se cambia a valores menores de s y la mayor oligomerización se suprime (figura 14).

hGalC con dextrosa 5%

La adición de dextrosa 5% a GalC en 5 mM fosfato de Na, pH 6,0 resultó en la formación de grandes agregados (figura 15). El pico a 18S corresponde a una masa molar mínima de casi 440 kDa y el pico a 56S corresponde a una masa molar mínima de 2.4 MDa con una cola que se extiende más allá de 150S, correspondiendo a masas molares mayores de 10,0 MDa. Hay muy poco cambio en este patrón con la dilución de 1,0 a 0,3 mg/mL indicando que estos oligómeros son mayormente irreversibles en la escala de tiempo del experimento de sedimentación, un período de 5-6 horas

Fluorescencia intrínseca de hGalC

Los estudios de fluorescencia intrínseca de hGalC (usando 23 Trp) se realizaron para evaluar el papel del pH y la concentración de sal sobre las interacciones moleculares (figura 16 y figura 17). Las interacciones moleculares fueron las menores (fluorescencia relativa mayor entre 330nm-350nm) en 500mM NaCl o NaTC 1% (figura 16). Se observó un pequeño cambio en la estructura secundaria como función del pH. Se observó precipitación a pH 4,5 y 5,0 (figura 17).

Resumen

Para evaluar la solubilidad relativa de hGalC y mGalC, se usó un enfoque de fase sólida inducida en polietilenglicol (PolyEthylene Glycol, PEG) Middaugh et al., J. Biol. Chem. 1979, 254, 367-370). Este enfoque permite que se mida la solubilidad relativa de las proteínas de forma cuantificable. Las mediciones de solubilidad se realizaron introduciendo soluciones tamponadas (5 mM fosfato de sodio con 150 mM NaCl, pH 6,0) de cada GalC a las diferentes concentraciones de PEG (10kDa). Los gráficos de solubilidad de proteína log vs concentraciones de PEG produjeron una tendencia lineal. Se hizo una extrapolación de la solubilidad aparente a concentración cero de PEG para obtener la solubilidad relativa de cada proteína. La solubilidad relativa de mGal vs hGalC no mostró ninguna diferencia. En los experimentos de solubilidad de hGalC, no se observó precipitación o pérdida de actividad luego de 3 semanas a 2-8°C (en 5mM fosfato de sodio con diferentes concentraciones de sal, pH 6,0-6,5). Se consiguió la solubilidad a ~30 mg/mL con la formulación 5 mM fosfato de Na + 150 mM NaCl, pH 6,0, y no se observó precipitación luego de 50 días a 2-8°C.

Los datos de AUC sugieren que el estado «nativo» de GalC es una asociación reversible dependiente de la concentración a oligómeros de orden mayor. Los datos biofísicos sugieren que puede haber una importancia funcional y estructural para los oligómeros de orden mayor. A valores elevados de pH, hay menos retención de actividad, valores menores de Tm y un Sistema más homogéneo determinado por el AUC. En 5 mM fosfato de sodio con 150 mM NaCl, pH 6,0, probablemente hay un equilibrio entre el monómero, tetramero y otras especies de orden mayor. Asimismo, el pH no afecta dramáticamente los perfiles de AUC en el rango de pH 6,5-7,5. En general, el sistema GalC es un sistema altamente autoasociante rápidamente reversible en los tampones evaluados.

EJEMPLO 2: FARMACOCINÉTICA Y DISTRIBUCIÓN TISULAR DE RADIACTIVIDAD EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY TRAS UNA INYECCIÓN EN BOLUS INTRATECAL O UN BOLUS INTRAVENOSO DE ^{125}I - HGALC

El presente Ejemplo muestra un resultado que ilustra la farmacocinética y distribución tisular de ^{125}I -hGALC en ratas Sprague-Dawley machos tras una dosis intratecal o un bolus intravenoso. La concentración y contenido de radiactividad de sangre completa, suero, eritrocitos, líquido cefalorraquídeo (LCR) y tejidos se midieron y se realizaron análisis farmacocinéticos no compartimentales sobre los datos resultantes. Se seleccionaron las vías intratecal e intravenosa ya que son las vías pretendidas de administración en los humanos. Los niveles de dosis se seleccionaron en base a la exposición humana potencial, toxicidad existente y datos farmacocinéticos y limitaciones impuestas por el artículo en evaluación. La rata fue seleccionada para el estudio debido a que es una especie aceptada para su uso en estudios farmacocinéticos y de distribución tisular. El número de animales usados en este estudio fue el mínimo necesario para evaluar adecuadamente la variabilidad esperada en cada punto de tiempo y cubrir los objetivos experimentales.

15 **Materiales y métodos**

Sistema de la prueba

20 Se recibieron 82 ratas Sprague-Dawley (*Rattus norvegicus*) machos de Charles River Canada Inc. (St. Constant, Québec, Canadá) el 15 de abril de 2009. Al inicio del tratamiento, los animales tenían aproximadamente 10-11 semanas de edad. 9 animales adicionales se recibieron de parte de Charles River Canadá el 28 de abril de 2009; estos animales tenían aproximadamente 9 semanas de edad al llegar y se requirió asegurar que disponíamos de suficientes animales canulados para completar la dosificación del estudio.

25 Los pesos corporales de las ratas macho estaban entre 342 y 453 g al inicio del tratamiento. Los pesos corporales de todos pero una de las ratas macho a la dosificación era mayor que el rango establecido en el protocolo (250-350 g), sin embargo no se consideró que esta desviación menor hubiera afectado el estudio o los datos obtenidos debido a que los animales estaban sanos y el peso corporal real se usó para la administración de la dosis.

30 **Manejo del animal**

35 Luego de llegar a PCS-MTL, todos los animales fueron sometidos a un examen físico general por un calificado miembro del personal de veterinarios. No se detectaron anomalías significativas en los animales recibidos. Los animales fueron confinados individualmente a jaulas de acero inoxidable con un suelo con un fondo de malla de alambre y una válvula de hidratación automatizada. El programa de mejoramiento ambiental concordaba con el SOP apropiado. Cada jaula estaba claramente etiquetada con una tarjeta codificada con colores que indicaba el estudio, el grupo, los números del animales y su sexo. Cada animal estaba identificado de forma única usando el sistema de tatuaje AIMS ®. Las condiciones ambientales durante la conducción del estudio se controlaron a una temperatura meta y humedad relativa de 19 a 25°C y 30 a 70%, respectivamente. El fotoperíodo fue de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad excepto cuando era interrumpido debido a las actividades programadas.

40 **Dieta**

45 Todos los animales tenían libre acceso a una dieta de laboratorio comercial en pellets certificado estándar (PMI Certified Rodent Dieta 5002: PMI Nutrition International Inc.) excepto durante los procedimientos designados. Las concentraciones máximas permitidas de contaminantes en la dieta (p.ej., metales pesados, aflatoxina, organofosfatos, hidrocarburos clorados, PCBs) son controlados y analizados de rutina por los fabricantes. Los animales disponían de agua municipal por cañería, adecuada para el consumo humano (filtrada a través de un filtro policarbonado bacteriostático de 0,5 mm) ad libitum excepto durante los procedimientos designados. Se consideró que no habían contaminantes conocidos en los materiales de dieta que pudieran interferir con los objetivos del estudio.

55 **Aclimatación y aleatorización**

60 Al menos 6 días (para los animales recibidos el 15 de abril de 2009) o 3 días (para los 9 animales adicionales recibidos el 28 Abril 2009) se permitieron entre la recepción de los animales y la cirugía para colocar la cánula intratecal, para permitir que los animales se aclimataran a las condiciones físicas y ambientales. Durante el período de aclimatación, todos los animales fueron pesados y aleatorizados, usando un procedimiento de aleatorización computarizado. La aleatorización se realizó luego de una estratificación usando el peso corporal como el parámetro. Los animales en los extremos del rango de peso corporal no fueron asignados a los grupos.

65 Los animales fueron asignados a los grupos de estudio del siguiente modo:

Tabla 7

5	Grupo	Vía de administración y dosis	Volumen de dosis proyectada		Números de animales	
			Número	Intravenoso	Intratecal	
10	1	-	60 µg	-	0,02	1001-1024
	2	1 mg/kg	-	3,33	-	2001-2024
	3 ^a	1 mg/kg	60 µg	3,33	0,02	3001-3024

a: La dosis IV se administró dentro de los 5 minutos posteriores a la dosis intratecal.

15 Cada rata en los Grupos 1 y 2 recibió una dosis radioquímica nominal de aproximadamente 3 µCi/animal. Cada rata en el Grupo 3 recibió una dosis radioquímica nominal de aproximadamente 6 µCi/animal.

Formulación de la dosis intratecal

20 La formulación de la dosis intratecal se preparó el día de la primera administración de la dosis intratecal. Se midió y agregó suficiente solución ¹²⁵I-hGALC a una solución medida y no marcada suficiente de hGALC. Un volumen medido de vehículo se agregó y todo se mezcló cuidadosamente. Se preparó una solución de concentración 3 mg/mL a un nivel de radiactividad meta de aproximadamente 150 µCi/mL. La formulación resultante se filtró a través de un filtro de baja unión a proteína (unidad de filtro de 0,22 µm GV PVDF) en un vaso estéril y se mantuvo refrigerada (2-8°C), protegida de la luz, pendiente para su uso para la dosificación.

Formulación de la dosis intravenosa

30 La formulación de la dosis intravenosa se preparó el día de la primera administración de la dosis intravenosa. Se midió suficiente solución ¹²⁵I-hGALC y se agregó a una solución medida y no marcada suficiente de hGALC. Un volumen medido de vehículo se agregó y todo se mezcló cuidadosamente. Se preparó una solución de concentración 0,3 mg/mL a un nivel de radiactividad meta de aproximadamente 3 µCi/mL. La formulación resultante se filtró a través de un filtro de baja unión a proteína 0,22 µm GV PVDF) en un vaso estéril y se mantuvo refrigerada (2-8°C), protegida de la luz, pendiente para su uso para la dosificación.

Análisis de las formulaciones de dosis

40 Cada formulación de dosis radiomarcada fue analizada a PCS-MTL cada día de dosificación por espectroscopía por escintilación líquida para determinar la concentración de radiactividad antes y después del tratamiento. La concentración de radiactividad se determinó preparando diluciones apropiadas de la formulación de dosis en vehículo y se analizaron alícuotas duplicadas de cada dilución. Las formulaciones de dosis restantes se descartaron luego de completar el análisis (incluyendo el análisis repetido).

Cálculo de la actividad específica del artículo en estudio

45 La actividad específica del artículo en estudio en las formulaciones de dosis se calculó a partir de la media (pre y post dosis) de los niveles medidos de radiactividad y la masa total del artículo en estudio (según las concentraciones proporcionadas) en las formulaciones de dosis.

Observaciones clínicas

50 Todos los animales fueron examinados dos veces al día buscando mortalidad y signos de enfermedad y reacción al tratamiento a lo largo de los períodos de aclimatación y estudio, excepto los días de llegada y culminación del estudio, en los cuales los animales fueron examinados solo una vez. Se realizó un examen detallado semanalmente.

Peso corporal

55 Los pesos corporales individuales se midieron una vez durante la aclimatación, antes de la cirugía y el día antes de la administración de la dosis. Solo se reportaron los pesos corporales registrados el día antes de la administración de la dosis.

Cirugía

60 Se permitió un mínimo de 6 días (o 3 días para los 9 animales adicionales) entre la recepción de los

animales y la cirugía para permitir que los animales se acostumbraran a las condiciones ambientales del laboratorio. Todos los animales, incluyendo los animales extra, recibieron una inyección por vía intramuscular de penicilina G benzatínica + penicilina G procaínica el día de la cirugía y otra vez 2 días después de la cirugía. En general, se administró Buprenorfina 0,05 mg/kg por vía subcutánea antes de la cirugía y aproximadamente 8 horas posterior a la primera administración, y cuando se consideró necesario luego. Para algunos animales, se administró Buprenorfina aproximadamente 6 horas posterior a la primera administración en vez de 8-12 horas. Considerando la vida media de Buprenorfina en las ratas, esta desviación del protocolo no afectó la salud de estos animales, y así no tuvo impacto en la validez o datos obtenidos en el estudio.

Los animales fueron preparados para la cirugía afeitando desde el cráneo hasta la región dorso-torácica del cuello. Los animales fueron anestesiados con isofluorano/oxígeno antes de la cirugía y mantenido bajo anestesia con isofluorano a lo largo del procedimiento quirúrgico. Antes de la cirugía, y al final del procedimiento quirúrgico, mientras estaban anestesiados se administró un agente oftálmico lubricante blanco en cada ojo. Antes de la cirugía, y en otras 2 ocasiones aproximadamente a intervalos de 24 horas luego de la primera administración, cada animal recibió un antinflamatorio (Carprofena 5mg/kg) por inyección subcutánea

El animal se posicionó en la mesa estereotáctica. Se hizo una incisión en la piel, de aproximadamente 2 cm, desde el borde caudal del cráneo al cuello. Los músculos dorsales del cuello se separaron para exponer la membrana atlanto-occipital. Se usó un retractor para facilitar el acceso a la membrana. Se hizo una incisión en la membrana atlanto-occipital y se insertó lentamente el catéter intratecal de forma caudal hasta que el catéter estaba localizado en la región lumbar. El exceso de fluido se retiró usando hisopos de algodón y se secó la membrana atlanto-occipital. Inmediatamente después, se usó adhesivo para anclar el bulbo del catéter a la membrana. Una vez que se hubo secado el pegamento y el catéter estaba anclado de forma sólida, se retiraban los retractores. Se hizo un pequeño nudo con el catéter en el cráneo y el bulbo se adhirió usando una sutura de material no absorbible. Una vez que se aseguró el catéter, se pasó a la región torácica dorsal donde se hizo una incisión para colocar un puerto de acceso. Éste se suturó en el lugar usando material no absorbible.

Antes de cerrar los músculos del cuello, se hizo una descarga de 2 mL de solución fisiológica tibia (es decir, aproximadamente 37,5°C) en la herida. Los músculos se cerraron usando suturas simples interrumpidas de material absorbible. El sitio del puerto de acceso se descargó con 2 mL de solución fisiológica tibia y la piel se cerró usando una sutura subcuticular continua de material de sutura absorbible. Se administró un ungüento antibiótico tópico en los sitios quirúrgicos post-cirugía y una vez al día después de ello hasta que se consideró innecesario

El volumen muerto del catéter y puerto de acceso se determinó al momento de la cirugía. Se realizó un chequeo de permeabilidad una vez al día durante el período pretratamiento entre el día de la cirugía y el día del tratamiento.

Tratamiento

Se permitió un período de al menos 7 días entre la implantación quirúrgica del catéter/puerto de acceso y el inicio del tratamiento para permitir una recuperación adecuada. Antes de la dosificación intratecal, se afeitó el área del puerto de acceso si era necesario. El sitio de la punción se limpió usando gluconato de clorhexidina y agua, y se secó el sitio con una gasa impregnada en agua estéril seguida por 3 pasos de yoduro de povidona 10%. El puerto de acceso se pinchó con una aguja conectada a la jeringa de dosificación y se administró lentamente el artículo en estudio. Tras la dosificación, el sitio se limpió con yoduro para limitar la contaminación.

El Día 1 del estudio, a los animales del Grupo 1 se les administró el ¹²⁵I-hGALC formulado por inyección de un bolus lento intratecal en el puerto de acceso lumbar subcutáneo seguido por una descarga de solución fisiológica de 0,04 mL para administrar un nivel de dosis meta de 60 µg/animal y una dosis de radiactividad de aproximadamente 3 µCi/animal.

El Día 2 del estudio, a los animales del Grupo 3 se les administró el ¹²⁵I-hGALC formulado por inyección de un bolus lento intratecal en el puerto de acceso lumbar subcutáneo seguido por una descarga de solución fisiológica de 0,04 mL para administrar un nivel de dosis meta de 60 µg/animal y una dosis de radiactividad de aproximadamente 3 µCi/animal. Dentro de los 5 minutos posteriores a la inyección intratecal del bolus lento los animales del Grupo 3 también recibieron una inyección intravenosa a través de un catéter intravenoso en la vena de la cola (3,33 mL/kg) seguido por una descarga de 0,6 mL de solución fisiológica para administrar un nivel de dosis meta de 1 mg/kg, con un nivel de radiactividad aproximado de 3 µCi/animal.

El Día 3 del estudio, a los animales del Grupo 2 se les administró el ¹²⁵I-hGALC formulado por inyección intravenosa a través de un catéter intravenoso en la vena de la cola (3,33 mL/kg) seguido por una descarga de 0,6 mL de solución fisiológica para administrar un nivel de dosis meta de 1 mg/animal y una dosis de radiactividad de aproximadamente 3 µCi/animal.

El volumen administrado se basó el el peso corporal práctico más reciente de cada animal. Se registraron los pesos de las jeringas llenadas con ^{125}I -hGALC formulado y vacías luego de administrarlo a los animales. La dosis administrada a cada animal se calculó según el peso neto de la formulación de la dosis expulsada desde la jeringa y la concentración de radiactividad medida en la dosis formulada.

5

Durante la dosificación, se disponía de gases para absorber cualquier cantidad pequeña de reflujo de la formulación de dosis y la pérdida del artículo en estudio se evaluó por conteo de escintilación líquida de acuerdo con un procedimiento específico del proyecto. Se retuvieron las jeringas y los catéteres intravenosos usados para la administración del artículo en estudio formulado. En los catéteres intravenosos y puertos de acceso intratecal/catéteres seleccionados se analizó el nivel de radiactividad de acuerdo con un procedimiento específico del proyecto.

10

Recolección de Muestras

15

Sangre/suero y tejidos

20

Se recolectó una muestra de sangre terminal (máximo volumen posible) a los 10 minutos, 30 minutos y 1, 3, 6, 24, 48 y 96 h posteriores a la dosis de 3 animales/punto de tiempo para los Grupos 1 a 3. La administración intratecal precedió a la intravenosa en el Grupo 3, y el momento para la muestra de sangre terminal se basó en el tiempo de la administración intravenosa. Las muestras de sangre terminal se recolectaron a partir de la aorta abdominal de las ratas (Grupos 1, 2 y 3, y 3 animales extra) sacrificados bajo anestesia con isofluorano por exsanguinación a partir de la aorta abdominal. Aproximadamente 3 mL de sangre (Grupos 1, 2 y 3) se trasfirieron a un tubo idóneo que contenía K₃-EDTA, para proveer muestras de sangre completa y, se mantuvieron sobre hielo húmedo pendiente su procesamiento. Para los Grupos 2 y 3, y los animales extra, se trasfirieron 1,5 mL adicionales de sangre en tubos que contenían citrato de sodio para el análisis del tiempo de protrombina (PTT), tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) y fibrinógeno. Las muestras de sangre se almacenaron sobre hielo húmedo, pendiente la centrifugación a 2700 RMP y 4°C por 15 minutos. Las muestras de plasma se almacenaron congeladas a aproximadamente -80°C, antes del envío y análisis en un laboratorio designado por el Aplicante. El plasma de los animales extra iba a servir como muestras en blanco para el análisis de PTT, APTT y fibrinógeno. Donde se obtuviera un volumen de sangre insuficiente para realizar todos los análisis (Grupos 1, 2 y 3), entonces la sangre para el análisis de radiactividad tenía la prioridad.

25

La sangre restante (Grupos 1, 2 y 3, y 3 animales extra) se trasfirió en tubos que contenían activador de coagulación para la producción de suero y se le permitió que coagulara, a temperatura ambiente, por un período de aproximadamente 30 minutos antes de la centrifugación. Las muestras recolectadas de los animales extra se usaron para evaluar la coagulación de las muestras de sangre de los animales no tratados.

30

Después de la exsanguinación, se recolectaron los siguientes tejidos de 3 animales/punto de tiempo de los Grupos 1 a 3, tal como se indica: Tejido adiposo (grasa renal), Glándulas suprarrenales, Hueso (fémur), Cerebro, Ojos, Corazón, Riñones, Intestino delgado, Contenido del Intestino delgado, Hígado, Pulmones, Músculo (esquelético), Nervio ciático, Intestino grueso, Contenido del intestino grueso, Médula espinal (lumbar, torácica, cervical), Bazo, Estómago, Contenido gástrico, Glándula tiroides/paratiroides, Contenido de la vejiga urinaria.

35

Después de la recolección, los tejidos se pesaron y luego se procesaron y se analizó la radiactividad total. Todos los tejidos mencionados antes, así como la sangre terminal y el suero, también se recolectaron a partir de un animal extra y se usaron para determinar los niveles de fondo de radiactividad. Las carcasas restantes se mantuvieron congeladas (-10°C a -20°C) en el congelador designado para permitir la desintegración radiactiva antes de desecharse como desperdicio biológico. La carcasa del primer animal en cada punto de tiempo de los Grupos 1 y 3 se recuperaron del congelador, se descongelaron y se retiraron el puerto de acceso y catéter se enjuagaron con agua y se verificó su radiactividad residual.

40

Líquido cefalorraquídeo

45

Se recolectaron muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) de todos los animales en la autopsia inmediatamente antes de la eutanasia. Tres animales/punto de tiempo de los Grupos 1 a 3 fueron sacrificados a los 10 minutos, 30 minutos y 1, 3, 6, 24, 48 y 96 h post dosis. Se retiró una muestra (volumen máximo posible) de LCR a través de la cisterna magna, usando una mesa estereotáctica para mantener la cabeza alineada. El LCR fue transferido en un tubo liso y colocado en hielo húmedo. Se procesó una porción (aproximadamente 20 µL) y se analizó el contenido de radiactividad total. También se recolectó el LCR de un animal extra y se usó para determinar los niveles de fondo de radiactividad.

Determinación de los niveles de fondo de radiactividad

50

La sangre, suero y tejidos recolectados del animal extra se usaron para la determinación de los niveles

de fondo de radiactividad para la sangre, suero y tejidos de los animales en los Grupos 1, 2 y 3. El LCR recolectado del animal extra, se usó para la determinación de los niveles de fondo de radiactividad para el LCR.

Procesamiento de las muestras para las mediciones de radiactividad

5

Todas las muestras se pesaron luego de la recolección, excepto para la sangre, plasma, suero y LCR. Para todos los grupos, se tomaron alícuotas duplicadas pesadas de 100 µL de sangre completa recolectadas en K₃-EDTA, para el análisis de radiactividad. Proteína precipitación usando ácido tricloroacético (TCA) de sangre completa se realizó como sigue: se añadió un volumen equivalente de una solución acuosa de 15% de TCA a alícuotas duplicadas pesadas de 100 µL de sangre completa. Las muestras (100 µL de sangre completa + 100 µL TCA) se mezclaron de forma circular y luego se centrifugaron a 4°C por aproximadamente 15 minutos a 10000 rpm, y el sobrenadante se decantó en un tubo separado. En el sobrenadante y en el pellet se analizó el contenido de radiactividad.

10

La sangre para la recolección de suero se mantuvo a temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos, para permitir la coagulación, antes de centrifugarse a 4°C a 2700 rpm (1250 ref) por aproximadamente 10 minutos para separar el suero. Muestras de suero mantuvieron sobre hielo húmedo pendiente la toma de alícuotas para el análisis de radiactividad (2 x 100 µL de alícuotas pesadas). Los concentrados eritrocitarios (obtenidos luego de la separación del suero) se mantuvieron sobre hielo húmedo pendiente su procesamiento para el análisis radiactivo. El suero restante se almacenó congelado (-10°C a -20°C). Las alícuotas duplicadas pesadas de 100 µL de sangre completa y eritrocitos (obtenidas luego de la separación del suero, mezcladas con un volumen igual de agua desionizada p/v) y homogenizadas con un Emulsificador Polytron) se solubilizaron en Solueno-350, se decolorizaron con peróxido de hidrógeno (30% p/v), y se mezclaron con fluido de escintilación líquida para el análisis de radiactividad.

15

El pellet del precipitado de sangre TCS se solubilizó en 35% de tetraetilamonio hidróxido (TEAH), se decolorizó con peróxido de hidrógeno (30% p/v), y se mezcló con fluido de escintilación líquida para la medición de radiactividad. Los contenidos de la vejiga urinaria, el sobrenadante de sangre TCS, las alícuotas duplicadas pesadas de las formulaciones de dosis (diluidas) y suero se mezclaron directamente con fluido de escintilación líquida para la medición de radiactividad. Las alícuotas duplicadas pesadas de LCR (aproximadamente 10 µL/alícuota) se solubilizaron en 35% TEAH antes de mezclar con fluido de escintilación líquida para la medición de radiactividad.

20

Las muestras de tejido se solubilizaron in toto en 35% TEAH. Las alícuotas duplicadas se mezclaron luego con fluido deescintilación líquida para la medición de radiactividad. Los contenidos del intestino delgado se homogenizaron en un volumen conocido de agua. Las alícuotas duplicadas y pesadas de los homogenizados del contenido del intestino delgado (LINC), los contenidos gástricos (STC) y los contenidos del intestino grueso (SINC) se solubilizaron en 35% TEAH y se mezclaron con fluido de escintilación líquida para la medición de radiactividad.

25

Mediciones de radiactividad

30

Las mediciones de radiactividad se condujeron por espectroscopía por escintilación líquida de acuerdo con los Procedimientos Operativos Estándar (SOP). Cada muestra se contó por 5 minutos o a un error dos-sigma de 0,1%, lo que ocurriera primero. Todas las cuentas se convirtieron a radiactividad absoluta (DPM) por corrección automática de la extinción basada en el cambio del espectro para el estándar externo. Los valores apropiados de DPM de fondo se sustrajeron de todos los valores de DPM de la muestra. Después de la sustracción del fondo, las muestras que exhibían una radiactividad menor o igual a los valores de fondo se consideraron como cero para todas las manipulaciones posteriores.

35

Análisis de datos

Concentración de radioactividad

40

Todas las mediciones de radiactividad se introdujeron en un programa de base de datos computarizados estándar (Debra Version 5.2) para el cálculo de las concentraciones de radiactividad (dpm/g y masa eq/g) y porcentaje de radiactividad administrada en la muestra. Las concentraciones de radiactividad en dpm/g y masa eq/g en sangre, suero, tejidos y LCR se calcularon según la actividad específica medida (dpm/g o unidad de masa apropiada) de artículo en estudio radiomarcado en las soluciones de dosis. La concentración de radiactividad en las muestras de sangre se convirtió a masa eq/mL según la densidad de la sangre de rata. El contenido tisular total se calculó para los pesos de órganos totales.

Farmacocinética

45

El perfil farmacocinético (PK) de radiactividad total en sangre, suero, LCR y tejidos se caracterizaba por

un análisis no compartimental de los datos de concentración versus tiempo usando un software computarizado validado (WinNonlin, version 3,2, Pharsight Corp., Mountain View, California, USA). Los modelos fueron seleccionados según las vías intravenosa y extravascular de administración. Los valores de concentración reportados como no detectables o cuantificables no fueron estimados; fueron tratados como muestras ausentes.

5 Los datos de concentración se obtuvieron a partir de diferentes animales en cada punto de tiempo, y los valores promedio se usaron para generar un perfil farmacocinético compuesto. La muestra de 10 minutos para el Grupo 1 (Animal Nos. 1001, 1002, 1003) y Grupo 2 (Animal Nos. 2001, 2002, 2003), y las 48 horas para Grupo 1 (Animal Nos. 1019, 1020) se desviaron en más de 10% o 6 minutos del punto de tiempo nominal. Esta desviación del protocolo no afectó la validez del estudio ni los datos obtenidos, debido a que el tiempo promedio se calculó y usó en los análisis farmacocinéticos.

10

El área bajo la curva concentración de radiactividad vs. tiempo (AUC) se calculó usando el método lineal trapezoidal (interpolación lineal). Cuando era práctico, la fase de eliminación terminal del perfil PK se identificó según la línea de mejor ajuste (R^2) usando al menos los tres valores de concentración observados finales. La pendiente de la fase de eliminación terminal se calculó usando regresión logística lineal usando los datos de concentración no ponderada. Los parámetros basados en la determinación de k_{e1} no se reportaban si el coeficiente de determinación (R^2) era menor de 0,8, o si la extrapolación del AUC al infinito representaba más de 20% del área total.

20 Resultados

Análisis de las Formulaciones de Dosis (Tabla 8)

En cada día de dosificación, las alícuotas de cada formulación se analizaron por espectroscopía de escintilación líquida antes y después de la administración de la dosis a todos los grupos, y se calculó la actividad específica del artículo en estudio a partir de estos análisis. La concentración de radiactividad promedio global (6S.D.) en la formulación para administración intratecal fue $345,4 \times 10^6 \pm 4,92 \times 10^6$ dpm/g (155,60 µCi/g) para el Grupo 1 y $334,4 \times 10^6 \pm 5,87 \times 10^6$ dpm/g (150,62 µCi/g) para el Grupo 3. La concentración de radiactividad promedio global en la formulación para administración intravenosa fue $4,4 \times 10^6 \pm 4,22 \times 10^5$ dpm/g (1,97 µCi/g) para el Grupo 2 y $4,7 \times 10^6 \pm 2,31 \times 10^5$ dpm/g (2,11 µCi/g) para el Grupo 3. La actividad específica del artículo en estudio en la formulación intratecal se calculó como 51,16 µCi/mg para la dosis del Grupo 1 y 49,53 µCi/mg para la Dosis del Grupo 3. La actividad específica del artículo en estudio en la formulación intravenosa se calculó como 6,53 µCi/mg para la dosis del Grupo 2 y 6,99 µCi/mg para la dosis del Grupo 3.

35 Tabla 8: Resumen de resultados de la concentración de radiactividad en las formulaciones de dosificación por espectroscopía por escintilación liquida

Nº de grupo	Vía de Administración	Ocasión	Concentración promedia de radioactividad		
			(dpm/g)		(µCi/g)
			Media ± SD	CV	Media
1	Intratecal	Pre-dosis	348445137 ± 3391878	0,97%	156,96
		Post-dosis	342426851 ± 4484476	1,31%	154,25
		Global	345435994 ± 4924300	1,43%	155,60
2	Inyección intravenosa de bolus	Pre-dosis	4091887 ± 61669	1,51%	1,84
		Post-dosis	4672629 ± 430335	9,21%	2,10
		Global	4382258 ± 421765	9,62%	1,97
3	Intratecal	Pre-dosis	332418463 ± 3013337	0,91%	149,74
		Post-dosis	336332353 ± 7582128	2,25%	151,50
		Global	334375408 ± 5868250	1,75%	150,62
3	Inyección intravenosa de bolus	Pre-dosis	4827255 ± 92785	1,92%	2,17
		Post-dosis	4545578 ± 247903	5,45%	2,05
		Global	4686417 ± 231271	4,93%	2,11

Pesos corporales animales y dosis administradas (Tabla 9)

Los pesos corporales medios de las ratas en los Grupos 1, 2 y 3 el día antes de la dosificación eran 405 g (rango 373 g a 452 g), 410 g (rango 367 g a 453 g), y 395 g (rango 342 g a 444 g), respectivamente. La dosis media calculada de ^{125}I -hGALC administrada por vía intratecal a los animales del Grupo 1 fue $41 \pm 0,014$ $\mu\text{g}/\text{animal}$, esto era equivalente a una dosis radioquímica de $2,12 \pm 0,72$ $\mu\text{Ci}/\text{animal}$. La dosis promedio de ^{125}I -hGALC administrada por la vía intravenosa a los animales del Grupo 2 fue $1,00 \pm 0,02$ mg/kg ($2,69 \pm 0,14$ $\mu\text{Ci}/\text{animal}$). Para el Grupo 3, la dosis media calculada de ^{125}I -hGALC administrada por vía intratecal e intravenosa fue $1,08 \pm 0,04$ mg/kg ($5,72 \pm 0,31$ $\mu\text{Ci}/\text{animal}$).

Tabla 9: Peso corporal medio del grupo y especificaciones e la dosis de ^{125}I -hALF administrada a ratas Sprague-Dawley macho

Grupo	Peso corporal (kg)	Vías de administración	Radioactividad ^a					mg/kg	$\mu\text{g}/\text{animal}$
			DPM/Animal	$\mu\text{C}/\text{animal}$	$\mu\text{C}/\text{Kg}$	mg/animal			
1	0,405± 0,022	IT	4,715,057 ± 1,600,366	2.12 ± 0.72	5.26 ± 1.86	0.041 ± 0.014	0.102 ± 0.014	41	-
2	0,410± 0,021	IV	5,961,365 ± 306,654	2.69 ± 0.14	6.55 ± 0.15	0.411 ± 0.022	0.411 ± 0.022	-	-
3	0,393± 0,027	IT y IV	12,698,351 ± 686,160	5.72 ± 0.31	14.5 ± 0.62	0.425 ± 0.034	0.425 ± 0.034	-	-

La dosis química media y la dosis radioquímica administrada a las ratas en el Grupo 1 fueron menores (aproximadamente 32% y 29%, respectivamente) que los niveles meta de dosis y esto constituyó una desviación del protocolo. Sin embargo, debido a que las dosis reales administradas a los animales se usaron a lo largo de los cálculos, se consideró que estos valores menores no afectaron la validez del estudio ni los datos obtenidos.

Observaciones clínicas

No se observaron signos clínicos relacionados con el tratamiento en ninguna de las ratas tras la administración de ^{125}I -hGALC por vía intratecal a 60 $\mu\text{g}/\text{animal}$ y/o intravenosa a 1 mg/kg.

Evaluación de la coagulación

En los primeros puntos de tiempo (10 minutos a 6 horas post dosis) se notó que la sangre recolectada de los animales tratados no coaguló completamente dentro de los 30 minutos permitidos. Sin embargo, la sangre recolectada de 3 ratas extra no tratadas coaguló rápidamente, sugiriendo una interferencia del artículo en estudio con el proceso de coagulación. Los tiempos de coagulación de menos o más de 30 minutos constituían una desviación del protocolo. Sin embargo, se requirieron tiempos de coagulación más largos para algunas muestras para suministrar algo de suero para el análisis. Una revisión de los resultados obtenidos no reveló correlación entre los valores de concentración obtenidos en el suero y el tiempo que le tomó a la sangre coagularse. Por tanto, este tiempo extendido o acortado de coagulación no afectó la validez del estudio ni los datos obtenidos.

Farmacocinética de la radioactividad total en sangre, suero, eritrocitos, LCR y tejidos**Concentraciones de radioactividad total en sangre, suero y eritrocitos (Tabla 10, Tabla 11, Tabla 12, figuras 18-21)**

Las concentraciones medias de material radiomarcado en el suero de las ratas macho luego de las dosis intratecales y/o intravenosas de ^{125}I -hGALC se dan en la Tabla 10. Las concentraciones medias de material radiomarcado en sangre completa y en los eritrocitos se presentan en la Tabla 11. Los datos promedio se presentan gráficamente en la figura 18. El porcentaje medio de radioactividad recuperado en el sobrenadante y pellet de sangre luego de la precipitación de TCA se presentan en la Tabla 12.

Grupo 1 (dosis media intratecal de 41 $\mu\text{g}/\text{animal}$)

Tras la dosificación intratecal, la mayor concentración media (C_{max}) de material radiomarcado en el suero y la sangre se observó a las 3 horas después de la dosis ($0,108 \pm 0,026$ $\mu\text{g eq/g}$ y $0,093 \pm 0,023$ $\mu\text{g eq/g}$ respectivamente). Los niveles de radioactividad en la sangre permanecieron relativamente constantes entre 3 y 6 horas post dosis mientras que los niveles de radioactividad en suero declinaron ligeramente. Después, las concentraciones de radioactividad en suero y sangre declinaron y estaban por debajo del límite de cuantificación

(LOQ) a las 48 horas post dosis. Para los eritrocitos, la C_{max} se observó a las 6 horas post dosis y fue (el tiempo al cual ocurrió la mayor concentración de radiactividad), $0,089 \pm 0,024 \mu\text{g eq/g}$. Luego, las concentraciones de radiactividad de los eritrocitos declinaron y estaban por debajo del LOQ a las 48 horas post dosis. Las proporciones medias de sangre a suero luego de la dosis intratecal eran menores a 1 a lo largo del período del estudio (rango de 0,7 a 0,9), indicando que el material radiomarcado no se asociaba particularmente con los eritrocitos. Los valores de las proporciones de eritrocito a suero (entre 0,8 y 0,9) también apoyaban que la radiactividad no se asociaba sustancialmente con los elementos formes de la sangre. Se estimó el porcentaje de la dosis encontrada en la sangre, usando un volumen sanguíneo/peso corporal estándar (es decir, 64,0 mL/kg). A t_{max} aproximadamente 6% de la dosis administrada se asociaba con la sangre.

10 **Grupo 2 (dosis media intravenosa de 1,00 mg/kg)**

Tras la dosificación intravenosa, la mayor concentración media (C_{max}) de material radiomarcado en el suero y ($14,864 \pm 0,853 \mu\text{g eq/g}$) y sangre ($10,228 \pm 0,447 \mu\text{g eq/g}$) se observaron a los 10 minutos después de la dosificación (es decir, el primer punto de tiempo analizado). Despues, las concentraciones de radiactividad en suero y sangre declinaron lentamente pero aún eran detectables a las 96 horas post dosis (suero: $0,088 \pm 0,006 \mu\text{g eq/g}$, 0,59% de C_{max} ; sangre: $0,051 \pm 0,002 \mu\text{g eq/g}$, 0,50% de C_{max}), disminuyendo el porcentaje estimado de la dosis en sangre de 68,4% a 0,3%. Para los eritrocitos, una C_{max} de $5,136 \pm 1,529 \mu\text{g eq/g}$ se observó a los 10 minutos post dosis. Luego, las concentraciones de radiactividad de los eritrocitos declinaron y estaban por debajo del LOQ a las 96 horas post dosis. Las proporciones medias de sangre a suero luego de la dosis intravenosa eran menores a 1 a lo largo del período del estudio (rango de 0,6 a 0,8), indicando que el material radiomarcado no se asociaba particularmente sustancialmente con los elementos formes de la sangre. Los valores de las proporciones de eritrocito a suero (entre 0,4 y 0,6) también apoyaban que la radiactividad no se asociaba sustancialmente con los elementos formes de la sangre.

Grupo 3 (Dosis intratecal seguida por la intravenosa: 1,08 mg/kg (dosis combinada))

Luego de la dosis intratecal (meta 60 $\mu\text{g/animal}$) y la dosis intravenosa (1 mg/kg), la mayor concentración media (C_{max}) de material radiomarcado en el suero ($14,675 \pm 0,810 \mu\text{g eq/g}$) y sangre ($9,974 \pm 0,558 \mu\text{g eq/g}$) se observaron a los 10 minutos después de la dosificación (es decir, el primer punto de tiempo analizado). Luego, las concentraciones de radiactividad en suero y sangre declinaron lentamente pero aún eran a las 96 horas post dosis (suero: $0,077 \pm 0,010 \mu\text{g eq/g}$, 0,52% de C_{max} ; sangre: $0,037 \pm 0,033 \mu\text{g eq/g}$, 0,37% de C_{max}), con el porcentaje extrapolado de dosis en sangre disminuyendo de 32,6% a 0,1%. Para los eritrocitos, una C_{max} de $6,113 \pm 1,748 \mu\text{g eq/g}$ se observó a los 10 minutos post dosis. Luego, las concentraciones de radiactividad de los eritrocitos declinaron y estaban por debajo del límite de cuantificación a las 96 horas post dosis. El material radiomarcado no se asociaba particularmente con los elementos formes de la sangre como lo demuestra la proporción media de sangre a suero y de eritrocito a suero menor de 1 (entre 0,7 y 0,8 y 0,4 a 0,7, respectivamente).

40 Tabla 10a - Concentración media de grupo de radiactividad en el suero de ratas Sprague-Dawley machos tras una dosis intratecal de $^{125}\text{I-hGALC}$

Grupo 1: A una dosis media de 41 $\mu\text{g/animal}$

45	Punto de tiempo	Concentración de radioactividad ^a	
		DPM/g	$\mu\text{g eq/g}$
	10 min	504 ± 462	$0,004 \pm 0,004$
	30 min	4125 ± 2337	$0,036 \pm 0,020$
	1 h	5705 ± 1535	$0,050 \pm 0,014$
	3 h	12311 ± 2960	$0,108 \pm 0,026$
	6 h	11473 ± 2596	$0,101 \pm 0,023$
	24 h	834 ± 122	$0,008 \pm 0,001$
	48 h	0 ± 0	$0,000 \pm 0,000$
	96 h	0 ± 0	$0,000 \pm 0,000$

Tabla 10b - Concentración media de grupo de radiactividad en el suero de ratas Sprague-Dawley macho tras una única inyección de bolus intravenoso de ^{125}I -hGALC

5

Grupo 2: A una dosis media de 1,00 mg/kg

Concentración de radioactividad^a			
	Punto de tiempo	DPM/g	ug eq/g
10	10 min	215632 ± 12377	14,864 ± 0,853
	30 min	157259 ± 14339	10,840 ± 0,988
	1 h	106804 ± 6790	7,362 ± 0,468
	3 h	47009 ± 3754	3,240 ± 0,259
15	6 h	31898 ± 2417	2,199 ± 0,167
	24 h	6584 ± 194	0,454 ± 0,013
	48 h	3523 ± 503	0,243 ± 0,035
	96 h	1278 ± 86	0,088 ± 0,006

20

Tabla 10c - Concentración media de grupo de radiactividad en el suero de ratas Sprague-Dawley macho tras una única inyección intratecal y de bolus intravenoso de ^{125}I -hGALC

25

Grupo 3: A una dosis media de 1,08 mg/kg

Concentración de radioactividad^a			
	Punto de tiempo	DPM/g	ug eq/g
30	10 min	227675 ± 12574	14,675 ± 0,810
	30 min	171721 ± 10165	11,069 ± 0,655
	1 h	127621 ± 7785	8,226 ± 0,502
	3h	66561 ± 1164	4,290 ± 0,075
35	6 h	54374 ± 4044	3,505 ± 0,261
	24 h	8894 ± 686	0,573 ± 0,044
	48 h	3622 ± 458	0,233 ± 0,030
	96 h	1199 ± 157	0,077 ± 0,010

40

Tabla 11a - Concentración media de grupo y contenido de radiactividad en sangre y proporciones de sangre a suero de ratas Sprague-Dawley machos tras una única dosis intratecal de ^{125}I -hGALC

Grupo 1: A una dosis media de 41 $\mu\text{g}/\text{animal}$

Concentración de radioactividad^a						
	Punto de tiempo	DPM/g	ug eq/g	ug eq/mL	Proporción Sangre a suero	Porcentaje de Dosis
50	10 min	210 ± 364	0,002 ± 0,003	0,002 ± 0,003	0,696 ^b	0,074 ± 0,128
	30 min	3579 ± 1918	0,032 ± 0,017	0,033 ± 0,018	0,878 ± 0,029	1,822 ± 0,351
	1 h	4933 ± 1446	0,043 ± 0,013	0,046 ± 0,013	0,860 ± 0,027	3,890 ± 0,253
	3 h	10617 ± 2586	0,093 ± 0,023	0,098 ± 0,024	0,862 ± 0,006	5,582 ± 0,554
55	6 h	10530 ± 2507	0,093 ± 0,022	0,097 ± 0,023	0,917 ± 0,035	4,664 ± 0,576
	24 h	677 ± 118	0,006 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,764 ± 0,032	0,600 ± 0,114
	48 h	0 ± 0	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	n/a	0,000 ± 0,000
	96 h	0 ± 0	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	n/a	0,000 ± 0,000

60

Tabla 11b - Concentración media de grupo de radiactividad en sangre y proporciones de sangre a suero de ratas Sprague-Dawley machos tras una única inyección en bolus intravenoso de ^{125}I -hGALC
Grupo 2: A una dosis media de 1,00 mg/kg

		Concentración de radioactividad²			Proporción sangre a suero	Porcentaje de Dosis	
		Punto de tiempo	DPM/g	$\mu\text{g eq/g}$	$\mu\text{g eq/mL}$		
10	10 min	148373 \pm 6480		10,228 \pm 0,447	10,739 \pm 0,469	0,688 \pm 0,012	68,393 \pm 3,453
	30 min	107195 \pm 5739		7,389 \pm 0,396	7,759 \pm 0,415	0,683 \pm 0,036	49,317 \pm 1,788
	1 h	77163 \pm 694		5,319 \pm 0,048	5,585 \pm 0,051	0,724 \pm 0,040	36,460 \pm 0,174
	3 h	35469 \pm 3124		2,445 \pm 0,215	2,567 \pm 0,226	0,754 \pm 0,007	16,335 \pm 1,166
15	6 h	24364 \pm 1639		1,679 \pm 0,113	1,763 \pm 0,119	0,764 \pm 0,007	11,184 \pm 0,612
	24 h	4794 \pm 160		0,330 \pm 0,011	0,347 \pm 0,011	0,729 \pm 0,030	2,218 \pm 0,076
	48 h	2259 \pm 233		0,156 \pm 0,016	0,163 \pm 0,017	0,644 \pm 0,028	1,042 \pm 0,141
	96 h	738 \pm 29		0,051 \pm 0,002	0,053 \pm 0,003	0,579 \pm 0,052	0,341 \pm 0,011

Tabla 11c - Concentración media del grupo y contenido de radiactividad en sangre y proporciones de sangre a suero de ratas Sprague-Dawley macho tras una única inyección de dosis intratecal y en bolus intravenoso de ^{125}I -hGALC

Grupo 3: A una dosis de 1,08 mg/kg

		Concentración de Radioactividad^a			Proporción sangre a suero	Porcentaje de Dosis	
		Punto de tiempo	DPM/g	$\mu\text{g eq/g}$	$\mu\text{g eq/mL}$		
30	10 min	154742 \pm 8651		9,974 \pm 0,558	10,473 \pm 0,586	0,680 \pm 0,009	32,599 \pm 1,331
	30 min	117563 \pm 4922		7,578 \pm 0,317	7,957 \pm 0,333	0,685 \pm 0,018	24,596 \pm 1,523
	1 h	92086 \pm 2812		5,936 \pm 0,181	6,233 \pm 0,191	0,723 \pm 0,022	19,132 \pm 1,432
	3 h	52419 \pm 244		3,379 \pm 0,016	3,548 \pm 0,016	0,788 \pm 0,017	11,283 \pm 0,344
35	6 h	43097 \pm 4071		2,778 \pm 0,262	2,917 \pm 0,276	0,792 \pm 0,019	9,263 \pm 0,836
	24 h	6561 \pm 78		0,423 \pm 0,005	0,444 \pm 0,006	0,740 \pm 0,054	1,345 \pm 0,080
	48 h	2362 \pm 398		0,152 \pm 0,026	0,160 \pm 0,027	0,650 \pm 0,029	0,465 \pm 0,083
	96 h	581 \pm 513		0,037 \pm 0,033	0,039 \pm 0,035	0,684 \pm c	0,124 \pm 0,109

Tabla 11d - Concentración media de grupo de radiactividad en sangre y contenido de radiactividad en eritrocitos y proporciones de eritrocitos a suero de ratas Sprague-Dawley machos tras una única dosis intratecal de ^{125}I -hGALC

Grupo 1: A una dosis media de 41 $\mu\text{g}/\text{animal}$

		Concentración de radioactividad^a			Prop. de eritrocitos a suero	Porcentaje de dosis
		Punto de tiempo	DPM/g	$\mu\text{g eq/g}$	Prop. de eritrocitos a suero	
50	10 min	0 \pm 0		0,000 \pm 0,000	n/a	0,000 \pm 0,000
	30 min	3044 \pm 1261		0,027 \pm 0,011	0,793 \pm 0,148	0,213 \pm 0,067
	1h	4454 \pm 1396		0,039 \pm 0,012	0,773 \pm 0,059	0,357 \pm 0,336
	3h	9768 \pm 2664		0,086 \pm 0,023	0,789 \pm 0,031	0,734 \pm 0,300
	6 h	10086 \pm 2682		0,089 \pm 0,024	0,876 \pm 0,083	0,616 \pm 0,200
	24 h	287 \pm 497		0,003 \pm 0,004	0,841 b	0,044 \pm 0,075
	48 h	0 \pm 0		0,000 \pm 0,000	n/a	0,000 \pm 0,000
	96 h	0 \pm 0		0,000 \pm 0,000	n/a	0,000 \pm 0,000

Tabla 11e - Concentración media de grupo de radiactividad en sangre y contenido de radiactividad en eritrocitos y proporciones de eritrocitos a suero de ratas Sprague-Dawley machos tras una única inyección en bolus intravenoso de f¹²⁵I-hGALC

Grupo 2: A una dosis media de 1,00 mg/kg

		Concentración de radioactividad a				
		Punto de tiempo	DPM/g	μg eq/g	Prop. de eritrocitos a suero	Porcentaje de dosis
10	10 min	74506 ± 22185	5,136 ± 1,529	0,350 ± 0,119	4,110 ± 2,794	
	30 min	59201 ± 14694	4,081 ± 1,013	0,377 ± 0,086	2,600 ± 1,087	
	1 h	52799 ± 23155	3,639 ± 1,596	0,487 ± 0,196	3,229 ± 2,403	
	3 h	28039 ± 3432	1,933 ± 0,237	0,599 ± 0,083	1,709 ± 0,734	
15	6 h	19662 ± 2540	1,355 ± 0,175	0,616 ± 0,057	1,143 ± 0,315	
	24 h	3714 ± 292	0,256 ± 0,020	0,564 ± 0,040	0,164 ± 0,111	
	48 h	1619 ± 482	0,112 ± 0,033	0,453 ± 0,082	0,076 ± 0,064	
20	96 h	0 ± 0	0,000 ± 0,000	n/a	0,000 ± 0,000	

Tabla 11f - Concentración media de grupo de radiactividad en sangre y contenido de radiactividad en eritrocitos y proporciones de eritrocitos a suero en Ratas Sprague-Dawley machos tras una única inyección de dosis intratecal y en bolus intravenoso de ¹²⁵I- hGALC

Grupo 3: A una dosis media de 1,08 mg/kg

		Concentración de radioactividad a				
		Punto de tiempo	DPM/g	μg eq/g	Prop. de eritrocitos a suero	Porcentaje de dosis
30	10 min	94843 ± 27122	6,113 ± 1,748	0,414 ± 0,104	3,640 ± 1,162	
	30 min	65477 ± 23687	4,220 ± 1,527	0,378 ± 0,117	2,266 ± 1,583	
	1 h	61906 ± 14623	3,990 ± 0,943	0,489 ± 0,130	2,253 ± 1,300	
	3 h	38985 ± 8524	2,513 ± 0,549	0,586 ± 0,128	0,992 ± 0,458	
35	6 h	37327 ± 4497	2,406 ± 0,290	0,685 ± 0,038	1,479 ± 0,417	
	24 h	5250 ± 334	0,338 ± 0,022	0,591 ± 0,032	0,139 ± 0,070	
	48 h	2109 ± 319	0,136 ± 0,021	0,581 ± 0,022	0,060 ± 0,017	
	96 h	0 ± 0	0,000 ± 0,000	n/a	0,000 ± 0,000	

Tabla 12a - Porcentaje de radiactividad media recuperada en el sobrenadante y pellet de sangre de ratas Sprague-Dawley machos tras una única dosis intratecal de ¹²⁵I-hGALC

Grupo 1: A una dosis media de 0,10 mg/kg

		Porcentaje de recuperación de radiactividad a		
		Punto de tiempo	Pellet	Sobrenadante
50	10 min	100 ± 0		0 ± 0
	30 min	75,1 ± 10,7		24,9 ± 10,7
	1 h	71,8 ± 11,7		28,2 ± 11,7
	3 h	81,2 ± 2,38		18,8 ± 2,38
55	6h	67,3 ± 13,5		32,7 ± 13,5
	24 h	100 ± 0		0 ± 0
	48 h	100 ± 0		0 ± 0
	96 h	100 ± 0		0 ± 0

Tabla 12b - Porcentaje de radiactividad media recuperada en el sobrenadante y pellet de sangre de ratas Sprague-Dawley machos tras una única inyección en bolus intravenoso de ^{125}I -hGALC
Grupo 2: A una dosis media de 1,00 mg/kg

Porcentaje de recuperación de radiactividad ^a			
	Punto de tiempo	Pellet	Sobrenadante
5	10 min	99,2 ± 0,03	0,85 ± 0,03
	30 min	97,5 ± 0,32	2,48 ± 0,32
	1 h	95,8 ± 0,56	4,23 ± 0,56
	3 h	92,5 ± 0,17	7,49 ± 0,17
	6 h	90,7 ± 0,45	9,26 ± 0,45
	24 h	100 ± 0	0 ± 0
	48 h	100 ± 0	0 ± 0
10	96 h	100 ± 0	0 ± 0

20 Tabla 12c - Porcentaje de radiactividad media recuperada en el sobrenadante y pellet de sangre de ratas Sprague-Dawley machos tras una única inyección de dosis intratecal y en bolus intravenoso de ^{125}I -hGALC
Grupo 3: A una dosis media de 1,08 mg/kg

Porcentaje de recuperación de radiactividad ^a			
	Punto de tiempo	Pellet	Sobrenadante
25	10 min	99,0 ± 0,11	1,02 ± 0,11
	30 min	95,9 ± 0,49	4,07 ± 0,49
	1 h	94,5 ± 0,56	5,55 ± 0,56
	3 h	88,1 ± 5,34	11,9 ± 5,34
	6h	88,9 ± 1,03	11,1 ± 1,03
	24 h	90,7 ± 3,48	9,33 ± 3,48
	48 h	100 ± 0	0 ± 0
30	96 h	100 ± 0	0 ± 0

^{125}I -Precipitable en sangre completa

40 (Tabla 12)

Los valores medios para la recuperación de la radiactividad en el pellet y sobrenadante luego de la precipitación en sangre completa por ácido tricloroacético (TCA) para los Grupos 1, 2 y 3 se resumen en la Tabla 12. Cuando se usó una solución acuosa al 15% de TCA para precipitar las proteínas en la sangre completa, la radiactividad se recuperó principalmente en el pellet de la sangre (de 100% a 67% en el Grupo 1; 100% a 91 % en el Grupo 2; 100% a 88% en el Grupo 3) sugiriendo que la mayoría de la radiactividad circulante se asoció con la proteína y por tanto no reflejaba el ^{125}I yoduro libre.

50 Concentración de radiactividad en tejidos y líquido cefalorraquídeo (LCR)

50 (Tabla 13, Tabla 14, Tabla 15, Figuras 19 - 30)

55 Las concentraciones medias de radiactividad en los tejidos y LCR de las ratas tras una dosis intratecal y/o intravenosa de ^{125}I -hGALC se dan en la Tabla 13. Los datos promedio se presentan gráficamente en la figura 19-30. Las proporciones medias de tejido a suero se presentan en la Tabla 14 y la recuperación de la dosis administrada en los tejidos, LCR y contenidos gastrointestinales y de la vejiga urinaria se dan en la Tabla 15.

60

65

Tabla 13a - Concentración media del grupo de radiactividad en los tejidos, líquido cefalorraquídeo de ratas de Sprague-Dawley machos después de una única dosis intratecal de ^{125}I -hGALC

Grupo 1: en una dosis media de 41 $\mu\text{g}/\text{animal}$

5

Muestra	Concentración de radioactividad, $\mu\text{g eq/g}^{\text{a}}$			
	10 min	30 min	1 h	3 h
Tejido adiposo (grasa del riñón)	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,005 ± 0,004
Glándulas suprenales	0,000 ± 0,000	0,014 ± 0,006	0,017 ± 0,006	0,021 ± 0,005
Hueso del fémur	0,000 ± 0,000	0,011 ± 0,006	0,016 ± 0,005	0,040 ± 0,012
Cerebro	0,000 ± 0,000	0,003 ± 0,003	0,004 ± 0,004	0,005 ± 0,001
Líquido cefalorraquídeo (LCR)	0,000 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b	0,000 ± 0,000
Ojos	0,000 ± 0,000	0,006 ± 0,004	0,011 ± 0,003	0,027 ± 0,006
Corazón	0,001 ± 0,002	0,014 ± 0,006	0,017 ± 0,005	0,028 ± 0,006
Riñones	0,004 ± 0,004	0,042 ± 0,023	0,052 ± 0,014	0,096 ± 0,018
Intestino grueso	0,000 ± 0,000	0,009 ± 0,004	0,011 ± 0,003	0,024 ± 0,010
Hígado	0,000 ± 0,000	0,012 ± 0,007	0,015 ± 0,006	0,029 ± 0,008
Pulmones	0,002 ± 0,003	0,020 ± 0,010	0,027 ± 0,008	0,058 ± 0,014
Músculo (esquelético)	0,000 ± 0,000	0,007 ± 0,003	0,010 ± 0,002	0,014 ± 0,003
Nervio ciático	0,000 ± 0,000	0,008 ± 0,008	0,012 ± 0,011	0,043 ± 0,017
Intestino delgado	0,000 ± 0,000	0,011 ± 0,005	0,016 ± 0,005	0,046 ± 0,013
Médula espinal (lumbar, torácico, cervical)	0,000 ± 0,000	0,004 ± 0,004	0,006 ± 0,002	0,009 ± 0,001
Bazo	0,000 ± 0,000	0,014 ± 0,008	0,019 ± 0,006	0,040 ± 0,010
Estómago	0,003 ± 0,002	0,022 ± 0,010	0,037 ± 0,017	0,203 ± 0,101
Tiroide (glándula paratiroidal)	0,020 ± 0,019	0,149 ± 0,083	0,278 ± 0,147	2,031 ± 1,228

Muestra	Concentración de radioactividad, $\mu\text{g eq/g}^{\text{a}}$			
	6 h	24 h	48 h	96 h
Tejido adiposo (grasa del riñón)	0,006 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Glándulas suprenales	0,020 ± 0,002	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Hueso del fémur	0,041 ± 0,007	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Cerebro	0,004 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Líquido cefalorraquídeo (LCR)	0,000 ^b	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Ojos	0,024 ± 0,003	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Corazón	0,026 ± 0,004	0,001 ± 0,002	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Riñones	0,082 ± 0,012	0,012 ± 0,001	0,008 ± 0,002	0,005 ± 0,001
Intestino grueso	0,024 ± 0,003	0,002 ± 0,002	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Hígado	0,030 ± 0,008	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Pulmones	0,055 ± 0,012	0,004 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Músculo (esquelético)	0,012 ± 0,002	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Nervio ciático	0,050 ± 0,013	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Intestino delgado	0,041 ± 0,015	0,004 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Médula espinal (lumbar, torácico, cervical)	0,008 ± 0,003	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Bazo	0,036 ± 0,007	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Estómago	0,163 ± 0,060	0,008 ± 0,001	0,003 ± 0,000	0,002 ± 0,001
Tiroide (glándula paratiroidal)	2,453 ± 0,554	4,126 ± 1,073	4,127 ± 1,635	1,927 ± 1,585

Tabla 13b - Concentración media del grupo de radiactividad en los tejidos, líquido cefalorraquídeo de ratas de Sprague-Dawley machos después de una única inyección intravenosa en bolus de ^{125}I -hGALC

Grupo 2: en una dosis media de 1,00 mg/kg

5

Muestra	Concentración de radioactividad, $\mu\text{g eq/g}^{\text{a}}$			
	10 min	30 min	1 h	3 h
Tejido adiposo (grasa del riñón)	0,138 ± 0,054	0,158 ± 0,019	0,128 ± 0,007	0,092 ± 0,008
Glándulas suprarrenales	8,827 ± 2,435	7,090 ± 0,547	4,360 ± 0,574	1,873 ± 0,070
Hueso del fémur	1,568 ± 0,013	1,584 ± 0,223	1,286 ± 0,166	0,887 ± 0,090
Cerebro	0,252 ± 0,041	0,236 ± 0,017	0,195 ± 0,018	0,083 ± 0,002
Líquido cefalorraquídeo (LCR)	0,137 ± 0,238	0,000 ± 0,000	0,000 ^b	0,210 ± 0,363
Ojos	0,110 ± 0,010	0,307 ± 0,016	0,406 ± 0,027	0,344 ± 0,049
Corazón	1,215 ± 0,122	1,108 ± 0,039	0,999 ± 0,052	0,558 ± 0,093
Riñones	3,027 ± 0,330	2,872 ± 0,139	2,288 ± 0,149	1,657 ± 0,190
Intestino grueso	0,328 ± 0,072	0,467 ± 0,110	0,492 ± 0,203	0,397 ± 0,031
Hígado	11,335 ± 1,436	8,688 ± 0,788	5,904 ± 0,367	3,590 ± 0,192
Pulmones	11,584 ± 0,906	20,629 ± 2,125	18,436 ± 3,906	8,526 ± 0,815
Músculo (esquelético)	0,128 ± 0,011	0,261 ± 0,039	0,275 ± 0,025	0,189 ± 0,007
Nervio ciático	0,173 ± 0,023	0,336 ± 0,108	0,584 ± 0,059	0,689 ± 0,056
Intestino delgado	0,424 ± 0,004	0,691 ± 0,031	0,786 ± 0,125	0,832 ± 0,166
Médula espinal (lumbar, torácico, cervical)	0,293 ± 0,028	0,272 ± 0,000	0,277 ± 0,008	0,142 ± 0,010
Bazo	6,595 ± 0,625	5,952 ± 1,316	4,187 ± 0,311	2,010 ± 0,333
Estómago	0,433 ± 0,088	0,939 ± 0,204	1,430 ± 0,076	2,404 ± 0,139
Tiroide (glándula paratiroidal)	4,485 ± 1,194	22,335 ± 2,598	37,990 ± 11,900	147,644 ± 56,596

Muestra	Concentración de radioactividad, $\mu\text{g eq/g}^{\text{a}}$			
	6 h	24 h	48 h	96 h
Tejido adiposo (grasa del riñón)	0,077 ± 0,007	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Glándulas suprarrenales	1,213 ± 0,031	0,339 ± 0,033	0,142 ± 0,013	0,074 ± 0,010
Hueso del fémur	0,726 ± 0,053	0,106 ± 0,016	0,034 ± 0,030	0,000 ± 0,000
Cerebro	0,066 ± 0,009	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Líquido cefalorraquídeo (LCR)	0,185 ± 0,321	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Ojos	0,336 ± 0,080	0,033 ± 0,006	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Corazón	0,440 ± 0,032	0,075 ± 0,011	0,040 ± 0,002	0,000 ± 0,000
Riñones	1,418 ± 0,108	0,337 ± 0,021	0,199 ± 0,009	0,099 ± 0,010
Intestino grueso	0,376 ± 0,077	0,054 ± 0,009	0,026 ± 0,003	0,000 ± 0,000
Hígado	3,179 ± 0,188	1,020 ± 0,091	0,506 ± 0,046	0,126 ± 0,014
Pulmones	3,187 ± 0,079	2,958 ± 1,012	0,325 ± 0,114	0,069 ± 0,003
Músculo (esquelético)	0,153 ± 0,018	0,008 ± 0,014	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Nervio ciático	0,643 ± 0,063	0,025 ± 0,043	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Intestino delgado	0,691 ± 0,121	0,094 ± 0,025	0,041 ± 0,012	0,000 ± 0,000
Médula espinal (lumbar, torácico, cervical)	0,128 ± 0,017	0,014 ± 0,013	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Bazo	1,667 ± 0,091	0,565 ± 0,046	0,250 ± 0,038	0,111 ± 0,009
Estómago	1,688 ± 0,310	0,180 ± 0,057	0,047 ± 0,005	0,015 ± 0,013
Tiroide (glándula paratiroidal)	267,423 ± 177,568	280,829 ± 84,988	294,521 ± 52,953	218,917 ± 45,098

Tabla 13c - Concentración media del grupo de radiactividad en los tejidos, líquido cefalorraquídeo de ratas de Sprague-Dawley machos después de una única dosis intratecal e inyección intravenosa en bolus de ^{125}I -hGALC

Grupo 3: en una dosis media de 1,08 mg/kg

5

Muestra	Concentración de radioactividad, $\mu\text{g eq/g}^{\text{a}}$			
	10 min	30 min	1 h	3 h
Tejido adiposo (grasa del riñón)	0,140 \pm 0,029	0,176 \pm 0,051	0,188 \pm 0,020	0,161 \pm 0,008
Glándulas suprarrenales	9,567 \pm 1,678	5,487 \pm 1,129	4,868 \pm 0,930	2,010 \pm 0,311
Hueso del fémur	1,227 \pm 0,137	1,707 \pm 0,160	1,571 \pm 0,071	1,261 \pm 0,030
Cerebro	0,283 \pm 0,062	0,276 \pm 0,010	0,230 \pm 0,008	0,153 \pm 0,023
Líquido cefalorraquídeo (LCR)	2,087 \pm 2,912	0,380 \pm 0,371	0,598 \pm 1,035	0,105 \pm 0,182
Ojos	0,110 \pm 0,018	0,372 \pm 0,042	0,539 \pm 0,019	0,611 \pm 0,079
Corazón	1,034 \pm 0,049	1,315 \pm 0,156	1,188 \pm 0,028	0,845 \pm 0,039
Riñones	2,864 \pm 0,353	3,324 \pm 0,265	3,390 \pm 0,183	2,822 \pm 0,020
Intestino grueso	0,261 \pm 0,026	0,567 \pm 0,051	0,716 \pm 0,098	0,681 \pm 0,102
Hígado	10,181 \pm 0,600	8,475 \pm 0,204	6,237 \pm 0,341	3,740 \pm 0,055
Pulmones	3,133 \pm 0,350	5,162 \pm 0,564	5,305 \pm 0,194	2,727 \pm 0,198
Músculo (esquelético)	0,119 \pm 0,006	0,297 \pm 0,011	0,411 \pm 0,009	0,298 \pm 0,015
Nervio ciático	0,244 \pm 0,037	0,558 \pm 0,023	0,994 \pm 0,096	1,043 \pm 0,057
Intestino delgado	0,304 \pm 0,093	0,778 \pm 0,037	1,149 \pm 0,110	1,401 \pm 0,152
Médula espinal (lumbar, torácico, cervical)	0,327 \pm 0,062	0,319 \pm 0,025	0,285 \pm 0,044	0,227 \pm 0,019
Bazo	5,042 \pm 0,902	4,721 \pm 0,302	3,740 \pm 0,406	2,186 \pm 0,218
Estómago	0,465 \pm 0,068	1,028 \pm 0,175	2,450 \pm 0,569	4,454 \pm 1,455
Tiroide (glándula paratiroidal)	3,191 \pm 1,542	21,727 \pm 8,873	30,411 \pm 18,766	139,771 \pm 37,999

Muestra	Concentración de radioactividad, $\mu\text{g eq/g}^{\text{a}}$			
	6 h	24 h	48 h	96 h
Tejido adiposo (grasa del riñón)	0,131 \pm 0,005	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
Glándulas suprarrenales	1,412 \pm 0,137	0,301 \pm 0,014	0,118 \pm 0,013	0,069 \pm 0,016
Hueso del fémur	1,165 \pm 0,066	0,148 \pm 0,012	0,029 \pm 0,026	0,000 \pm 0,000
Cerebro	0,098 \pm 0,012	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
Líquido cefalorraquídeo (LCR)	0,000 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b	0,000 \pm 0,000
Ojos	0,574 \pm 0,085	0,064 \pm 0,006	0,010 \pm 0,009	0,000 \pm 0,000
Corazón	0,723 \pm 0,057	0,101 \pm 0,008	0,038 \pm 0,007	0,006 \pm 0,011
Riñones	2,046 \pm 0,229	0,515 \pm 0,019	3,249 \pm 0,029	0,124 \pm 0,005
Intestino grueso	0,726 \pm 0,173	0,074 \pm 0,014	0,027 \pm 0,004	0,000 \pm 0,000
Hígado	3,156 \pm 0,143	0,996 \pm 0,035	0,418 \pm 0,036	0,137 \pm 0,018
Pulmones	1,830 \pm 0,133	0,223 \pm 0,007	0,076 \pm 0,020	0,033 \pm 0,008
Músculo (esquelético)	0,253 \pm 0,029	0,032 \pm 0,002	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
Nervio ciático	1,039 \pm 0,133	0,056 \pm 0,098	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
Intestino delgado	1,102 \pm 0,101	0,136 \pm 0,027	0,033 \pm 0,008	0,000 \pm 0,000
Médula espinal (lumbar, torácico, cervical)	0,202 \pm 0,032	0,026 \pm 0,003	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
Bazo	1,648 \pm 0,109	0,395 \pm 0,017	0,152 \pm 0,009	0,083 \pm 0,009
Estómago	4,242 \pm 1,361	0,463 \pm 0,357	0,064 \pm 0,014	0,031 \pm 0,005
Tiroide (glándula paratiroidal)	182,099 \pm 38,422	296,957 \pm 57,793	199,316 \pm 26,285	43,962 \pm 23,164

Tabla 14a - Tejido medio de grupo, relaciones de fluido cefalorraquídeo a radioactividad de suero de ratas de Sprague-Dawley machos después de una única dosis intratecal de ^{125}I -hGALC

Grupo 1: en una dosis media de 41 $\mu\text{g}/\text{animal}$

5

Muestra	Tejido, Relación LCR a suero ^a			
	10 min ^b	30 min	1 h	3 h
Tejido adiposo (grasa del riñón)	n/a	n/a	n/a	0,071 ^b
Glándulas suprarrenales	n/a	0,421 \pm 0,116	0,324 \pm 0,033	0,196 \pm 0,012
Hueso del fémur	n/a	0,308 \pm 0,010	0,319 \pm 0,038	0,369 \pm 0,028
Cerebro	n/a	0,097 ^b	0,110 \pm 0,018	0,045 \pm 0,006
Líquido cefalorraquídeo (LCR)	n/a	n/a	n/a	n/a
Ojos	n/a	0,177 \pm 0,032	0,216 \pm 0,020	0,253 \pm 0,007
Corazón	0,333	0,412 \pm 0,076	0,329 \pm 0,008	0,265 \pm 0,012
Riñones	0,976	1,157 \pm 0,040	1,036 \pm 0,062	0,895 \pm 0,058
Intestino grueso	n/a	0,249 \pm 0,027	0,220 \pm 0,023	0,220 \pm 0,048
Hígado	n/a	0,351 \pm 0,028	0,302 \pm 0,036	0,265 \pm 0,015
Pulmones	0,576	0,565 \pm 0,050	0,533 \pm 0,034	0,532 \pm 0,003
Músculo (esquelético)	n/a	0,197 \pm 0,032	0,192 \pm 0,011	0,134 \pm 0,021
Nervio ciático	n/a	0,249 ^b	0,317 ^b	0,382 \pm 0,074
Intestino delgado	n/a	0,318 \pm 0,035	0,312 \pm 0,035	0,426 \pm 0,018
Médula espinal (lumbar, torácico, cervical)	n/a	0,144 ^b	0,117 \pm 0,017	0,082 \pm 0,010
Bazo	n/a	0,395 \pm 0,036	0,382 \pm 0,013	0,368 \pm 0,007
Estómago	0,577	0,627 \pm 0,072	0,723 \pm 0,252	1,801 \pm 0,619
Tiroide (glándula paratiroidal)	4,443	4,035 \pm 0,750	5,680 \pm 2,612	17,423 \pm 8,215

Muestra	Tejido, Relación LCR a suero ^a			
	6 h	24 h	48 h	96 h
Tejido adiposo (grasa del riñón)	0,057 \pm 0,012	n/a	n/a	n/a
Glándulas suprarrenales	0,197 \pm 0,026	n/a	n/a	n/a
Hueso del fémur	0,407 \pm 0,022	n/a	n/a	n/a
Cerebro	0,040 \pm 0,005	n/a	n/a	n/a
Líquido cefalorraquídeo (LCR)	n/a	n/a	n/a	n/a
Ojos	0,245 \pm 0,023	0,284 ^b	n/a	n/a
Corazón	0,258 \pm 0,022	0,343 ^b	n/a	n/a
Riñones	0,821 \pm 0,066	1,491 \pm 0,128	n/a	n/a
Intestino grueso	0,250 \pm 0,074	0,395 ^b	n/a	n/a
Hígado	0,293 \pm 0,029	n/a	n/a	n/a
Pulmones	0,547 \pm 0,009	0,489 \pm 0,105	n/a	n/a
Músculo (esquelético)	0,115 \pm 0,013	n/a	n/a	n/a
Nervio ciático	0,496 \pm 0,030	n/a	n/a	n/a
Intestino delgado	0,400 \pm 0,059	0,550 \pm 0,021	n/a	n/a
Médula espinal (lumbar, torácico, cervical)	0,079 \pm 0,09	n/a	n/a	n/a
Bazo	0,357 \pm 0,009	n/a	n/a	n/a
Estómago	1,604 \pm 0,478	1,085 \pm 0,155	n/a	n/a
Tiroide (glándula paratiroidal)	24,297 \pm 0,831	527,002 \pm 100,186	n/a	n/a

Tabla 14b - Tejido medio de grupo, relaciones de fluidocefalorraquídeo a radioactividad de suero de ratas de Sprague-Dawley machos después de una única inyección de bolus intravenoso de ^{125}I -hGALC

Grupo 2: en una dosis media de 1,00 mg/kg

5

Muestra	Tejido, Relación LCR a suero ^a			
	10 min	30 min	1 h	3 h
Tejido adiposo (grasa del riñón)	0,009 ± 0,003	0,015 ± 0,003	0,017 ± 0,001	0,028 ± 0,003
Glándulas suprarrenales	0,589 ± 0,133	0,654 ± 0,010	0,594 ± 0,089	0,580 ± 0,039
Hueso del fémur	0,106 ± 0,006	0,146 ± 0,019	0,174 ± 0,012	0,273 ± 0,008
Cerebro	0,017 ± 0,002	0,022 ± 0,003	0,027 ± 0,002	0,026 ± 0,002
Líquido cefalorraquídeo (LCR)	0,028 ^b	n/a	n/a	0,188 ^b
Ojos	0,007 ± 0,001	0,028 ± 0,002	0,044 ± 0,008	0,106 ± 0,009
Corazón	0,082 ± 0,004	0,103 ± 0,006	0,136 ± 0,007	0,171 ± 0,016
Riñones	0,203 ± 0,011	0,266 ± 0,019	0,311 ± 0,015	0,512 ± 0,043
Intestino grueso	0,022 ± 0,004	0,043 ± 0,009	0,067 ± 0,012	0,123 ± 0,019
Hígado	0,766 ± 0,119	0,802 ± 0,026	0,805 ± 0,085	1,110 ± 0,055
Pulmones	0,781 ± 0,070	1,903 ± 0,100	2,496 ± 0,452	2,642 ± 0,316
Músculo (esquelético)	0,008 ± 0,001	0,024 ± 0,004	0,037 ± 0,002	0,059 ± 0,004
Nervio ciático	0,012 ± 0,002	0,032 ± 0,012	0,080 ± 0,009	0,213 ± 0,007
Intestino delgado	0,029 ± 0,002	0,064 ± 0,007	0,107 ± 0,019	0,255 ± 0,032
Médula espinal (lumbar, torácico, cervical)	0,019 ± 0,002	0,024 ± 0,002	0,038 ± 0,001	0,044 ± 0,007
Bazo	0,443 ± 0,016	0,547 ± 0,090	0,571 ± 0,075	0,618 ± 0,065
Estómago	0,029 ± 0,004	0,086 ± 0,013	0,194 ± 0,012	0,743 ± 0,028
Tiroide (glándula paratiroidal)	0,305 ± 0,092	2,074 ± 0,319	5,106 ± 1,355	46,707 ± 21,839

Muestra	Tejido, Relación LCR a suero ^a			
	6 h	24 h	48 h	96 h
Tejido adiposo (grasa del riñón)	0,035 ± 0,003	n/a	n/a	n/a
Glándulas suprarrenales	0,554 ± 0,045	0,747 ± 0,061	0,593 ± 0,104	0,845 ± 0,120
Hueso del fémur	0,330 ± 0,004	0,234 ± 0,030	0,225 ^b	n/a
Cerebro	0,030 ± 0,002	n/a	n/a	n/a
Líquido cefalorraquídeo (LCR)	0,232 ^b	n/a	n/a	n/a
Ojos	0,152 ± 0,024	0,073 ± 0,012	n/a	n/a
Corazón	0,200 ± 0,010	0,165 ± 0,024	0,167 ± 0,025	n/a
Riñones	0,649 ± 0,086	0,741 ± 0,025	0,833 ± 0,169	1,118 ± 0,086
Intestino grueso	0,171 ± 0,035	0,119 ± 0,020	0,109 ± 0,008	n/a
Hígado	1,449 ± 0,096	2,245 ± 0,142	2,109 ± 0,302	1,440 ± 0,229
Pulmones	1,453 ± 0,071	6,505 ± 2,210	1,345 ± 0,431	0,780 ± 0,033
Músculo (esquelético)	0,069 ± 0,005	0,052 ^b	n/a	n/a
Nervio ciático	0,292 ± 0,011	0,169 ^b	n/a	n/a
Intestino delgado	0,316 ± 0,065	0,207 ± 0,057	0,175 ± 0,070	n/a
Médula espinal (lumbar, torácico, cervical)	0,058 ± 0,003	0,047 ^b	n/a	n/a
Bazo	0,762 ± 0,084	1,247 ± 0,134	1,030 ± 0,098	1,263 ± 0,069
Estómago	0,774 ± 0,176	0,397 ± 0,129	0,197 ± 0,047	0,263 ^b
Tiroide (glándula paratiroidal)	124,616 ± 86,507	615,613 ± 169,527	1231,684 ± 285,895	2484,660 ± 471,907

Tabla 14c - Tejido medio de grupo, relaciones de fluido cefalorraquídeo a radioactividad de suero de ratas de Sprague-Dawley machos después de una única dosis intratecal e inyección de bolus intravenoso de ^{125}I -hGALC

Grupo 3 en una dosis media de 1,08 mg/kg

5

Muestra	Tejido, Relación LCR a suero ^a			
	10 min	30 min	1 h	3 h
Tejido adiposo (grasa del riñón)	0,010 ± 0,002	0,016 ± 0,005	0,023 ± 0,003	0,037 ± 0,002
Glándulas suprarrenales	0,649 ± 0,076	0,493 ± 0,072	0,589 ± 0,077	0,468 ± 0,069
Hueso del fémur	0,083 ± 0,006	0,155 ± 0,012	0,191 ± 0,013	0,294 ± 0,005
Cerebro	0,019 ± 0,003	0,025 ± 0,001	0,028 ± 0,003	0,035 ± 0,005
Líquido cefalorraquídeo (LCR)	0,204 ^b	0,053 ^b	0,221 ^b	0,072 ^b
Ojos	0,007 ± 0,001	0,034 ± 0,005	0,066 ± 0,007	0,143 ± 0,021
Corazón	0,071 ± 0,001	0,119 ± 0,015	0,145 ± 0,011	0,197 ± 0,012
Riñones	0,195 ± 0,013	0,302 ± 0,041	0,413 ± 0,022	0,658 ± 0,016
Intestino grueso	0,018 ± 0,002	0,051 ± 0,005	0,087 ± 0,011	0,159 ± 0,023
Hígado	0,694 ± 0,007	0,768 ± 0,061	0,759 ± 0,023	0,872 ± 0,024
Pulmones	0,214 ± 0,030	0,465 ± 0,025	0,646 ± 0,045	0,635 ± 0,036
Músculo (esquelético)	0,008 ± 0,001	0,027 ± 0,002	0,050 ± 0,003	0,070 ± 0,005
Nervio ciático	0,017 ± 0,003	0,050 ± 0,004	0,122 ± 0,018	0,243 ± 0,012
Intestino delgado	0,021 ± 0,007	0,071 ± 0,007	0,140 ± 0,016	0,326 ± 0,029
Médula espinal (lumbar, torácico, cervical)	0,022 ± 0,005	0,029 ± 0,001	0,035 ± 0,007	0,053 ± 0,004
Bazo	0,342 ± 0,044	0,427 ± 0,036	0,455 ± 0,044	0,510 ± 0,049
Estómago	0,032 ± 0,005	0,094 ± 0,020	0,300 ± 0,078	1,039 ± 0,348
Tiroide (glándula paratiroidal)	0,217 ± 0,108	1,960 ± 0,776	3,781 ± 2,521	32,561 ± 8,787

Muestra	Tejido, Relación LCR a suero ^a			
	6 h	24 h	48 h	96 h
Tejido adiposo (grasa del riñón)	0,038 ± 0,003	n/a	n/a	n/a
Glándulas suprarrenales	0,405 ± 0,059	0,527 ± 0,029	0,514 ± 0,108	0,918 ± 0,317
Hueso del fémur	0,333 ± 0,006	0,258 ± 0,026	0,183 ^b	n/a
Cerebro	0,028 ± 0,001	n/a	n/a	n/a
Líquido cefalorraquídeo (LCR)	n/a	n/a	n/a	n/a
Ojos	0,163 ± 0,012	0,113 ± 0,019	0,068 ^b	n/a
Corazón	0,206 ± 0,001	0,177 ± 0,018	0,164 ± 0,008	0,246 ^b
Riñones	0,583 ± 0,022	0,900 ± 0,037	1,071 ± 0,104	1,623 ± 0,270
Intestino grueso	0,207 ± 0,044	0,131 ± 0,031	0,116 ± 0,018	n/a
Hígado	0,902 ± 0,028	1,744 ± 0,121	1,815 ± 0,316	1,770 ± 0,023
Pulmones	0,522 ± 0,009	0,391 ± 0,040	0,321 ± 0,044	0,428 ± 0,084
Músculo (esquelético)	0,072 ± 0,011	0,056 ± 0,008	n/a	n/a
Nervio ciático	0,296 ± 0,016	0,293 ^b	n/a	n/a
Intestino delgado	0,314 ± 0,008	0,239 ± 0,063	0,140 ± 0,019	n/a
Médula espinal (lumbar, torácico, cervical)	0,057 ± 0,007	0,046 ± 0,009	n/a	n/a
Bazo	0,471 ± 0,033	0,692 ± 0,067	0,661 ± 0,104	1,087 ± 0,230
Estómago	1,206 ± 0,373	0,807 ± 0,616	0,274 ± 0,032	0,405 ± 0,112
Tiroide (glándula paratiroidal)	52,475 ± 13,382	525,335 ± 143,883	854,144 ± 52,674	571,341 ± 305,367

Tabla 15a - Contenido de radiactividad media de grupo en los tejidos, líquido cefalorraquídeo, tracto gástricointestinal y contenido de la vejiga urinaria de ratas de Sprague-Dawley machos después de una única dosis intratecal de ^{125}I -hGALC

5

Grupo 1: en una dosis media de 41 $\mu\text{g}/\text{animal}$

Muestra	Porcentaje de dosis ^a			
	10 min	30 min	1 h	3 h
Glándulas suprarrenales	0,000 ± 0,000	0,002 ± 0,000	0,004 ± 0,000	0,003 ± 0,001
Cerebro	0,000 ± 0,000	0,010 ± 0,009	0,027 ± 0,024	0,023 ± 0,003
Líquido cefalorraquídeo (LCR)	0,000 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b	0,000 ± 0,000
Ojos	0,000 ± 0,000	0,003 ± 0,001	0,011 ± 0,002	0,017 ± 0,001
Corazón	0,002 ± 0,003	0,037 ± 0,003	0,066 ± 0,009	0,077 ± 0,004
Riñones	0,027 ± 0,025	0,252 ± 0,086	0,553 ± 0,057	0,632 ± 0,104
Hígado	0,000 ± 0,000	0,417 ± 0,057	0,748 ± 0,108	0,907 ± 0,181
Pulmones	0,003 ± 0,005	0,055 ± 0,009	0,122 ± 0,021	0,166 ± 0,013
Nervio ciático	0,000 ± 0,000	0,001 ± 0,001	0,002 ± 0,002	0,003 ± 0,001
Médula espinal (lumbar, torácico, cervical)	0,000 ± 0,000	0,004 ± 0,004	0,013 ± 0,001	0,012 ± 0,000
Bazo	0,000 ± 0,000	0,024 ± 0,009	0,054 ± 0,010	0,066 ± 0,011
Glándula tiroidea/paratiroidal	0,001 ± 0,001	0,007 ± 0,002	0,024 ± 0,012	0,108 ± 0,021
Tracto gástricointestinal				
Intestino delgado	0,000 ± 0,000	0,193 ± 0,054	0,364 ± 0,069	0,763 ± 0,107
Contenido de intestino delgado	0,000 ± 0,000	0,399 ± 0,062	0,778 ± 0,084	2,611 ± 0,291
Intestino grueso	0,000 ± 0,000	0,090 ± 0,018	0,165 ± 0,037	0,238 ± 0,070
Contenido de intestino grueso	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,598 ± 0,114
Estómago	0,008 ± 0,007	0,086 ± 0,009	0,216 ± 0,094	0,836 ± 0,336
Contenido de estómago	0,000 ± 0,000	0,489 ± 0,052	1,774 ± 0,326	5,004 ± 0,346
Contenido de vejiga urinaria	0,003 ± 0,003	0,110 ± 0,030	0,156 ± 0,077	1,207 ± 1,029

Muestra	Porcentaje de dosis ^a			
	6 h	24 h	48 h	96 h
Glándulas suprarrenales	0,002 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Cerebro	0,015 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Líquido cefalorraquídeo (LCR)	0,000 ^b	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Ojos	0,013 ± 0,003	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Corazón	0,056 ± 0,006	0,005 ± 0,008	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Riñones	0,452 ± 0,115	0,130 ± 0,034	0,059 ± 0,007	0,029 ± 0,006
Hígado	0,775 ± 0,078	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Pulmones	0,132 ± 0,019	0,019 ± 0,005	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Nervio ciático	0,003 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Médula espinal (lumbar, torácico, cervical)	0,009 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Bazo	0,048 ± 0,007	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Glándula tiroidea/paratiroidal	0,125 ± 0,037	0,348 ± 0,013	0,195 ± 0,075	0,086 ± 0,023
Tracto gástricointestinal				
Intestino delgado	0,571 ± 0,165	0,117 ± 0,027	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Contenido de intestino delgado	1,740 ± 0,925	0,385 ± 0,045	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Intestino grueso	0,199 ± 0,022	0,029 ± 0,025	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Contenido de intestino grueso	0,864 ± 0,100	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Estómago	0,557 ± 0,117	0,059 ± 0,023	0,015 ± 0,002	0,009 ± 0,007
Contenido de estómago	3,996 ± 1,013	0,758 ± 0,167	0,122 ± 0,107	0,000 ± 0,000
Contenido de vejiga urinaria	0,525 ± 0,264	0,178 ± 0,130	0,014 ^b	0,021 ± 0,028

Tabla 15b - Contenido de radiactividad media de grupo en los tejidos, líquido cefalorraquídeo, tracto gástricointestinal y contenido de la vejiga urinaria de ratas de Sprague-Dawley machos después de una única inyección de bolus intravenoso de ^{125}I -hGALC

5

Grupo 2: en una dosis media de 1,00 mg/kg

Muestra	Porcentaje de dosis ^a			
	10 min	30 min	1 h	3 h
Glándulas suprarrenales	0,113 ± 0,023	0,117 ± 0,022	0,059 ± 0,009	0,026 ± 0,002
Cerebro	0,129 ± 0,022	0,120 ± 0,011	0,098 ± 0,005	0,044 ± 0,001
Líquido cefalorraquídeo (LCR)	0,001 ± 0,002	0,000 ± 0,000	0,000 ^b	0,001 ± 0,001
Ojos	0,007 ± 0,001	0,021 ± 0,001	0,028 ± 0,007	0,024 ± 0,005
Corazón	0,382 ± 0,055	0,319 ± 0,018	0,292 ± 0,025	0,161 ± 0,024
Riñones	2,168 ± 0,172	1,966 ± 0,081	1,658 ± 0,014	1,168 ± 0,068
Hígado	41,711 ± 3,901	31,161 ± 1,934	20,702 ± 1,140	13,029 ± 0,875
Pulmones	4,024 ± 0,305	7,047 ± 0,512	6,456 ± 1,094	2,842 ± 0,248
Nervio ciático	0,001 ± 0,001	0,003 ± 0,003	0,004 ± 0,001	0,006 ± 0,003
Médula espinal (lumbar, torácico, cervical)	0,045 ± 0,005	0,042 ± 0,008	0,039 ± 0,003	0,023 ± 0,002
Bazo	1,234 ± 0,045	1,014 ± 0,093	0,784 ± 0,123	0,393 ± 0,013
Glándula tiroídal/paratiroidal	0,024 ± 0,001	0,100 ± 0,009	0,186 ± 0,050	0,947 ± 0,340
Tracto gástricointestinal				
Intestino delgado	0,749 ± 0,121	1,477 ± 0,237	1,548 ± 0,186	1,535 ± 0,191
Contenido de intestino delgado	0,530 ± 0,056	1,921 ± 0,346	3,737 ± 1,427	5,446 ± 2,102
Intestino grueso	0,327 ± 0,072	0,478 ± 0,076	0,529 ± 0,065	0,412 ± 0,008
Contenido de intestino grueso	0,000 ± 0,000	0,345 ± 0,029	0,517 ± 0,135	0,782 ± 0,083
Estómago	0,176 ± 0,032	0,437 ± 0,050	0,632 ± 0,047	0,992 ± 0,059
Contenido de estómago	0,343 ± 0,127	1,537 ± 0,287	5,330 ± 0,937	10,263 ± 1,971
Contenido de vejiga urinaria	0,100 ± 0,041	0,409 ± 0,179	0,675 ± 0,660	0,945 ± 0,571

Muestra	Porcentaje de dosis ^a			
	6 h	24 h	48 h	96 h
Glándulas suprarrenales	0,019 ± 0,002	0,005 ± 0,001	0,002 ± 0,000	0,001 ± 0,000
Cerebro	0,034 ± 0,004	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Líquido cefalorraquídeo (LCR)	0,003 ± 0,005	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Ojos	0,023 ± 0,007	0,002 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Corazón	0,121 ± 0,007	0,022 ± 0,003	0,012 ± 0,001	0,000 ± 0,000
Riñones	0,909 ± 0,076	0,251 ± 0,006	0,140 ± 0,003	0,072 ± 0,002
Hígado	10,311 ± 0,361	3,891 ± 0,283	1,980 ± 0,065	0,498 ± 0,016
Pulmones	1,027 ± 0,037	0,991 ± 0,289	0,112 ± 0,037	0,023 ± 0,001
Nervio ciático	0,004 ± 0,000	0,000 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Médula espinal (lumbar, torácico, cervical)	0,017 ± 0,002	0,002 ± 0,002	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Bazo	0,362 ± 0,028	0,100 ± 0,003	0,046 ± 0,010	0,022 ± 0,001
Glándula tiroídal/paratiroidal	1,405 ± 0,830	1,333 ± 0,115	1,440 ± 0,604	0,997 ± 0,329
Tracto gástricointestinal				
Iltestino delgado	1,537 ± 0,436	0,175 ± 0,033	0,074 ± 0,031	0,000 ± 0,000
Contenido de intestino delgado	3,051 ± 0,706	0,500 ± 0,184	0,254 ± 0,101	0,000 ± 0,000
Intestino grueso	0,380 ± 0,063	0,054 ± 0,007	0,030 ± 0,003	0,000 ± 0,000
Contenido de intestino grueso	1,055 ± 0,116	0,396 ± 0,058	0,155 ± 0,134	0,000 ± 0,000
Estómago	0,744 ± 0,196	0,078 ± 0,023	0,021 ± 0,003	0,006 ± 0,005
Contenido de estómago	8,294 ± 0,670	1,055 ± 0,057	0,296 ± 0,159	0,000 ± 0,000
Contenido de vejiga urinaria	1,531 ± 1,303	0,079 ^b	0,019 ± 0,021	0,007 ± 0,002

Tabla 15c - Concentración media del grupo de radiactividad en los tejidos, líquido cefalorraquídeo tracto gástrico-intestinal y contenido de la vejiga urinaria de ratas de Sprague-Dawley machos después de una única dosis intratecal, e inyección intravenosa en bolus de $^{125}\text{I}-\text{hGALC}$

5

Grupo 3: en una dosis media de 1,08 mg/kg

	Muestra	Porcentaje de dosis ^a			
		10 min	30 min	1 h	3 h
10	Glándulas suprarrenales	0,066 ± 0,013	0,037 ± 0,010	0,032 ± 0,009	0,015 ± 0,002
	Cerebro	0,071 ± 0,009	0,071 ± 0,007	0,058 ± 0,002	0,039 ± 0,008
	Líquido cefalorraquídeo (LCR)	0,046 ± 0,071	0,002 ± 0,002	0,010 ± 0,017	0,002 ± 0,003
	Ojos	0,004 ± 0,001	0,012 ± 0,002	0,018 ± 0,001	0,021 ± 0,003
	Corazón	0,147 ± 0,008	0,188 ± 0,020	0,165 ± 0,008	0,136 ± 0,014
	Riñones	1,005 ± 0,107	1,157 ± 0,073	1,179 ± 0,061	0,985 ± 0,006
15	Hígado	18,955 ± 0,723	14,647 ± 0,420	10,032 ± 1,037	6,754 ± 0,213
	Pulmones	0,506 ± 0,053	0,811 ± 0,104	0,871 ± 0,037	0,457 ± 0,031
	Nervio ciático	0,001 ± 0,000	0,002 ± 0,000	0,003 ± 0,001	0,003 ± 0,002
	Médula espinal (lumbar, torácico, cervical)	0,028 ± 0,007	0,025 ± 0,005	0,023 ± 0,005	0,018 ± 0,004
20	Bazo	0,468 ± 0,027	0,435 ± 0,037	0,329 ± 0,032	0,217 ± 0,007
	Glándula tiroidea/paratiroidal	0,008 ± 0,004	0,055 ± 0,019	0,073 ± 0,041	0,392 ± 0,071
<u>Tracto gástrico-intestinal</u>					
25	Intestino delgado	0,286 ± 0,046	0,641 ± 0,033	1,118 ± 0,264	1,176 ± 0,044
	Contenido de intestino delgado	0,288 ± 0,037	1,150 ± 0,013	2,414 ± 0,038	4,314 ± 1,755
	Intestino grueso	0,131 ± 0,013	0,272 ± 0,015	0,360 ± 0,032	0,335 ± 0,051
30	Contenido de intestino grueso	0,000 ± 0,000	0,212 ± 0,070	0,351 ± 0,089	0,696 ± 0,181
	Estómago	0,100 ± 0,017	0,206 ± 0,034	0,493 ± 0,124	0,931 ± 0,293
	Contenido de estómago	0,161 ± 0,029	0,806 ± 0,191	2,870 ± 1,090	8,789 ± 1,443
35	Contenido de vejiga urinaria	0,029 ± 0,021	0,182 ± 0,251	0,834 ± 0,663	0,273 ± 0,087

	Muestra	Porcentaje de dosis ^a			
		6 h	24 h	48 h	96 h
40	Glándulas suprarrenales	0,010 ± 0,002	0,002 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000
	Cerebro	0,024 ± 0,003	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
	Líquido cefalorraquídeo (LCR)	0,000 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b	0,000 ± 0,000
	Ojos	0,019 ± 0,004	0,002 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
	Corazón	0,106 ± 0,008	0,015 ± 0,001	0,005 ± 0,001	0,001 ± 0,002
	Riñones	0,689 ± 0,163	0,183 ± 0,013	0,081 ± 0,007	0,048 ± 0,002
45	Hígado	5,085 ± 0,292	1,653 ± 0,097	0,757 ± 0,043	0,281 ± 0,022
	Pulmones	0,297 ± 0,011	0,038 ± 0,001	0,012 ± 0,003	0,006 ± 0,002
	Nervio ciático	0,004 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
	Médula espinal (lumbar, torácico, cervical)	0,016 ± 0,003	0,002 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
50	Bazo	0,146 ± 0,020	0,039 ± 0,003	0,015 ± 0,003	0,009 ± 0,000
	Glándula tiroidea/paratiroidal	0,496 ± 0,064	0,973 ± 0,162	0,567 ± 0,088	0,124 ± 0,088
	Tracto gástrico-intestinal				
55	Intestino delgado	0,954 ± 0,153	0,125 ± 0,046	0,032 ± 0,007	0,000 ± 0,000
	Contenido de intestino delgado	2,054 ± 0,707	0,298 ± 0,019	0,113 ± 0,039	0,000 ± 0,000
	Intestino grueso	0,359 ± 0,097	0,036 ± 0,009	0,013 ± 0,002	0,000 ± 0,000
	Contenido de intestino grueso	0,971 ± 0,095	0,290 ± 0,115	0,041 ± 0,071	0,000 ± 0,000
55	Estómago	0,943 ± 0,323	0,102 ± 0,084	0,014 ± 0,004	0,008 ± 0,002
	Contenido de estómago	3,501 ± 3,698	0,610 ± 0,365	0,175 ± 0,053	0,000 ± 0,000
	Contenido de vejiga urinaria	0,114 ± 0,034	0,199 ± 0,266	0,003 ± 0,002	0,005 ± 0,008

Grupo 1 (dosis media intratecal de 41 µg/animal)

Después de la dosis intratecal, hubo una distribución general de material marcado con ^{125}I en todos los tejidos examinados, sin embargo, los niveles de radiactividad en el LCR estaban por debajo del LOQ. Las mayores concentraciones medias de material marcado con ^{121}I en los tejidos de las ratas macho se observaron a las 48 horas post dosis en la glándula tiroides/paratiroides ($4,127 \pm 1,635 \mu\text{g eq/g}$) y a las 3 horas post dosis en el estómago ($0,203 \pm 0,101 \mu\text{g eq/g}$), riñones ($0,096 \pm 0,014 \mu\text{g eq/g}$) y pulmones ($0,058 \pm 0,014 \mu\text{g eq/g}$). Los niveles fueron menores en los otros tejidos con valores de t_{\max} generalmente observados entre 3 y 6 horas post

5 dosis. Los menores valores de C_{max} se observaron en el cerebro ($0,005 \pm 0,001 \mu\text{g eq/g}$) la grasa renal ($0,006 \pm 0,000 \mu\text{g eq/g}$). A las 48 y 96 horas post dosis los niveles de radiactividad en la mayoría de los tejidos estaban por debajo del límite de detección, siendo las excepciones la glándula tiroides/paratiroides, riñones y estómago. A las 96 horas post dosis, la mayor concentración media se observó en la glándula tiroides/paratiroides ($1,927 \pm 1,585 \mu\text{g eq/g}$, 46,7% de C_{max}) seguido por los riñones ($0,005 \pm 0,001 \mu\text{g eq/g}$, 5,2% de C_{max}) y el estómago ($0,002 \pm 0,001 \mu\text{g eq/g}$, 1% de C_{max}).

10 Las proporciones de tejido a suero generalmente eran menores de 1 para los tejidos hasta 24 horas post-dosis intratecal. Las excepciones fueron la glándula tiroides/paratiroides, riñones y estómago. Las mayores proporciones se observaron en la glándula tiroides/paratiroides. A las 48 y 96 horas post dosis, las proporciones de tejido a suero no podían calcularse debido a que las concentraciones en suero estaban por debajo del LOQ.

15 Los niveles de radiactividad recuperados en todos los tejidos eran menores de 1% de la dosis administrada con las proporciones mayores observadas en el hígado (0,91%) a las 3 horas post dosis. A 1 hora post dosis, proporciones mayores de 1% de la dosis administrada se encontraron solo en los contenidos gástricos (1,8%). A 3 horas post-dosificación, las proporciones mayores de 1% de la dosis administrada se detectaron en los contenidos del intestino grueso (2,6%), contenidos gástricos (5,0%) y contenidos de la vejiga urinaria (1,2%). A 6 horas post-dosificación, las proporciones mayores de 1% de la dosis administrada se encontraron en los contenidos del intestino grueso (1,7%) y contenidos gástricos (4,0%). A 96 horas post dosis, aún se recuperaban pequeñas cantidades de radiactividad derivada de ^{125}I -hGALC (menos de 0,1%) en los riñones, glándula tiroides/paratiroides, contenidos gástricos y de la vejiga urinaria, observándose la mayor recuperación en la glándula tiroides/paratiroides (0,09%).

25 Grupo 2 (dosis media intravenosa de 1,00 mg/kg)

Tras la administración intravenosa, la mayor concentración media (C_{max}) de material radiomarcado en los tejidos de las ratas del Grupo 2 se observó en la glándula tiroides/paratiroides ($294,521 \pm 52,953 \mu\text{g eq/g}$; a las 48 horas post dosis), seguida por los pulmones ($20,629 \pm 2,125 \mu\text{g eq/g}$; 30 minutos post dosis), hígado ($11,335 \pm 1,436 \mu\text{g eq/g}$; 10 minutos post dosis), glándulas suprarrenales ($8,827 \pm 2,435 \mu\text{g eq/g}$; 10 minutos post dosis), bazo ($6,595 \pm 0,625 \mu\text{g eq/g}$; 10 minutos post dosis), y riñones ($3,027 \pm 0,330 \mu\text{g eq/g}$; 10 minutos). Los valores de t_{max} para los tejidos ocurrieron entre 10 minutos y 3 horas post dosis excepto para las glándulas tiroides/paratiroides (48 horas post dosis). Los menores valores medios de radiactividad C_{max} se observaron en grasa renal ($0,158 \pm 0,019 \mu\text{g eq/g}$), LCR ($0,210 \pm 0,363 \mu\text{g eq/g}$), cerebro ($0,252 \pm 0,041 \mu\text{g eq/g}$), músculo esquelético ($0,275 \pm 0,025 \mu\text{g eq/g}$) y médula espinal ($0,293 \pm 0,028 \mu\text{g eq/g}$). A las 96 horas post-dosificación, aún se detectaba radiactividad en 7 de los 18 tejidos analizados, siendo detectadas las mayores concentraciones medias en las glándulas tiroides/paratiroides ($218,917 \pm 45,098 \mu\text{g eq/g}$, 74,3% de C_{max}) seguidas por el hígado ($0,126 \pm 0,014 \mu\text{g eq/g}$, 1,1% de C_{max}), bazo ($0,111 \pm 0,009 \mu\text{g eq/g}$, 1,7% de C_{max}) y riñones ($0,099 \pm 0,010 \mu\text{g eq/g}$, 33% de C_{max}).

40 A los 10 minutos post dosis, las proporciones medias de tejido a suero eran menores de 1 para todos los tejidos analizados. A los 30 minutos y a 1 hora post dosis, las proporciones medias tejido a suero eran mayores de 1 para los pulmones y glándula tiroides/paratiroides. A las 3 y 6 horas post dosis, las proporciones medias tejido a suero eran mayores de 1 para el hígado, pulmones y glándula tiroides/paratiroides. A las 24 y 48 horas post dosis, el hígado, pulmones y glándula tiroides/paratiroides tenían proporciones medias de tejido a suero mayores de 1. A las 96 horas post dosis, las proporciones medias de tejido a suero eran mayores de 1 para los riñones, hígado, bazo y glándula tiroides/paratiroides. Las mayores proporciones tejido a suero se observaron en las glándulas tiroides/paratiroides (2485 a las 96 horas), pulmones (6,5 a las 24 horas) e hígado (2,2 a las 24 horas).

50 En términos de proporción de la radiactividad administrada, los mayores valores medios en los tejidos se observaron en el hígado (41,7% a los 10 minutos post dosis), pulmones (7,0% a los 30 minutos), riñones (2,2% a los 10 minutos), intestino grueso (1,5% a 1 hora) y glándulas tiroides/paratiroides (1,4% a las 48 horas). En los contenidos del tracto gastrointestinal, los mayores valores medios fueron 10,3% de la dosis en los contenidos gástricos (a las 3 horas post dosis), 5,4% en los contenidos del intestino grueso (a las 3 horas post dosis) y 1,1% en los contenidos del intestino delgado (6 horas). A las 96 horas post dosificación, las mayores proporciones de la dosis administrada se detectaron en las glándulas tiroides/paratiroides (1,0%), hígado (0,5%) y riñones (0,1%). En este punto de tiempo post dosis, menos de 0,01% de la dosis administrada permanecía en los contenidos gástricos y de la vejiga urinaria.

60 Grupo 3 (Dosis intratecal seguida por la intravenosa: 1,08 mg/kg (dosis combinada))

Después de la dosis intratecal y la intravenosa, la mayor concentración media (C_{max}) de material radiomarcado en los tejidos de las ratas del Grupo 3 se observó en las glándulas tiroides/paratiroides ($296,957 \pm 57,793 \mu\text{g eq/g}$; a las 24 horas post dosis), seguidas por el hígado ($10,181 \pm 0,600 \mu\text{g eq/g}$; 10 minutos post dosis), glándulas suprarrenales ($9,567 \pm 1,678 \mu\text{g eq/g}$; 10 minutos post dosis), pulmones ($5,305 \pm 0,194 \mu\text{g eq/g}$;

1 hora post dosis), bazo ($5,042 \pm 0,902 \mu\text{g eq/g}$; 10 minutos post dosis), estómago ($4,454 \pm 1,455 \mu\text{g eq/g}$; 3 horas, post dosis, riñones ($3,390 \pm 0,183 \mu\text{g eq/g}$; 1 hora) y LCR ($2,087 \pm 2,912 \mu\text{g eq/g}$; 10 minutos). Los valores de t_{\max} para los tejidos ocurrieron entre 10 minutos y 3 horas post máx dosis excepto para el intestino delgado (6 horas post dosis) y las glándulas tiroides/paratiroides (24 horas post dosis). Los menores valores medios de C_{\max} radiactividad se observaron en grasa renal ($0,188 \pm 0,020 \mu\text{g eq/g}$), cerebro ($0,283 \pm 0,062 \mu\text{g eq/g}$, médula espinal ($0,327 \pm 0,062 \mu\text{g eq/g}$) y músculo esquelético ($0,411 \pm 0,009 \mu\text{g eq/g}$). A las 96 horas post-dosificación, aún se detectaba radiactividad en 8 de los 18 tejidos analizados, siendo detectadas las mayores concentraciones medias en las glándulas tiroides/paratiroides ($43,962 \pm 23,164 \mu\text{g eq/g}$, 14,8% de C_{\max}) seguidas por el hígado ($0,137 \pm 0,018 \mu\text{g eq/g}$, 1,3% de C_{\max}), riñones ($0,124 \pm 0,005 \mu\text{g eq/g}$, 3,7% de C_{\max}), bazo ($0,083 \pm 0,009 \mu\text{g eq/g}$, 1,6% de C_{\max}), y glándulas suprarrenales ($0,069 \pm 0,016 \mu\text{g eq/g}$, 0,7% de C_{\max}).

A los 10 minutos post dosis, las proporciones medias de tejido a suero eran menores de 1 para todos los tejidos analizados. A los 30 minutos y a 1 hora post dosis, las proporciones medias de tejido a suero eran mayores de 1 para la glándula tiroides/paratiroides. A las 3 y 6 horas post dosis, las proporciones medias de tejido a suero eran mayores de 1 para el estómago y glándula tiroides/paratiroides. A las 24 horas post dosis, el hígado y glándula tiroides/paratiroides tenían proporciones medias de tejido a suero mayores de 1. A las 48 y 96 horas post dosis, las proporciones medias de tejido a suero eran mayores de 1 para los riñones, hígado, y glándula tiroides/paratiroides y para el bazo (96 horas). Las mayores proporciones tejido a suero se observaron en las glándulas tiroides/paratiroides (854 a las 48 horas), hígado (1,8 a las 48 horas) y riñones (1,6 a las 96 horas).

En términos de proporción de la radiactividad administrada, los mayores valores medios en los tejidos se observaron en el hígado (19,0% a los 10 minutos post dosis), riñones (1,2% a los 1 minutos), e intestino grueso (1,2% a las 3 horas). En los contenidos del tracto gastrointestinal, los mayores valores medios fueron 8,8% de la dosis en los contenidos gástricos (a las 3 horas post dosis), 4,3% en los contenidos del intestino grueso a las 3 horas post dosis) y 1,0% en los contenidos del intestino delgado (6 horas). A las 96 horas post dosificación, las mayores proporciones de la dosis administrada se detectaron en el hígado (0,3%), glándulas tiroides/paratiroides (0,1%) y riñones (0,1%). (0,05%). En este punto de tiempo post dosis, menos de 0,01% de la dosis administrada permanecía en las glándulas suprarrenales, corazón, pulmones, bazo, contenidos gástricos y de la vejiga urinaria.

Farmacocinética de la radiactividad total en sangre, suero, eritrocitos, LCR y tejidos

(Tabla 16 y Tabla 17)

Los parámetros farmacocinéticos para la radiactividad en sangre, suero, eritrocitos, LCR y tejidos de las ratas tras una dosis intratecal y/o intravenosa de ^{125}I -hGALC se dan en la Tabla 16 y Tabla 17.

Tabla 16: Cinética de disposición de la radioactividad total en suero, sangre y eritrocitos de ratas de Sprague-Dawley machos después de una única dosis intratecal de ^{125}I -hGALC

Suero

Grupo 1: en una dosis media de 41 $\mu\text{g/animal}$

t_{\max} (h)	C_{\max}	$t_{\text{último}}$ (h)	$AUC_{0-\text{túltimo}}$ ($\mu\text{g eq}^{\cdot}\text{h/g}$)	k (h^{-1})	R^2	$t_{\%}$ (h)	$AUC_{0-\text{inf}}$ ($\mu\text{g eq}^{\cdot}\text{h/g}$)	%Extrapolación $AUC_{0-\text{inf}}$
3	0,108	24	1,48	0,130	0,988	5,34	1,54	4,00
Sangre								
t_{\max} (h)	C_{\max}	$t_{\text{último}}$ (h)	$AUC_{0-\text{túltimo}}$ ($\mu\text{g eq}^{\cdot}\text{h/g}$)	k (h^{-1})	R^2	$t_{\%}$ (h)	$AUC_{0-\text{inf}}$ ($9\mu\text{g eq}^{\cdot}\text{h/g}$)	%Extrapolación $AUC_{0-\text{inf}}$
3	0,093 0	24	1,33	0,138	0,983	5,02	1,37	3,16
Eritrocitos								
t_{\max} (h)	C_{\max}	$t_{\text{último}}$ (h)	$AUC_{0-\text{túltimo}}$ ($\mu\text{g eq}^{\cdot}\text{h/g}$)	k (h^{-1})	R^2	$t_{\%}$ (h)	$AUC_{0-\text{inf}}$ ($9\mu\text{g eq}^{\cdot}\text{h/g}$)	%Extrapolación $AUC_{0-\text{inf}}$
6	0,089 0	24	1,24	0,170	0,980	4,08	1,25	1,41

Tabla 16b: Cinética de disposición de la radioactividad total en suero, sangre y glóbulos rojos de ratas de Sprague-Dawley machos después de una única inyección de bolus intravenoso de ^{125}I -hGALC

Suero

Grupo 2: a una dosis media de 1,00 mg/kg

t _{max} (h)	C _{max} ($\mu\text{g eq/g}$)	t _{ultimo} o (h)	AUC _{0-túltimo} ($\mu\text{g eq·h/g}$)	k (h^{-1})	R ²	t _% (h)	AUC _{0-inf} ($\mu\text{g eq·h/g}$)	%Extrapolació n AUC _{0-inf}	V _x ($\text{mL}/\text{k g}$)	CL (mL/h/k g)	
0	20,1	96	71,1	0,02		0,99	30,7	75,0	5,21	591	13,3
Sangre											
0	14,0	96	51,2	0,02		0,99	27,1	53,2	3,75	735	18,8
Eritrocitos											
0	6,40	48	33,9	0,06		0,94	10,9	35,7	4,94	441	28,0

Tabla 16c: Cinética de disposición de la radioactividad total en suero, sangre y glóbulos rojos de ratas de Sprague-Dawley machos después de una única dosis intratecal y inyección de bolus intravenoso ^{125}I -hGALC

Suero**Grupo 3: a una dosis media de 1,08 mg/kg**

t _{max} (h)	C _{max} (μg eq/g)	t _{ultimo} (h)	AUC _{0-t_{ultimo}} (μg eq·h/g)	k (h^{-1})	R ²	t _% (h)	AUC _{0-inf} (μg eq·h/g)	%Extrapolació n AUC _{0-inf}	V _x (mL/kg)	CL (mL/h/kg)
0	16,9	96	89,8	0,02	0,98	25,5	92,6	3,06	429	11,7
Sangre										
t _{max} (h)	C _{max} (μg eq/g)	t _{ultimo} (h)	AUC _{0-t_{ultimo}} (μg eq·h/g)	k (h^{-1})	R ²	t _% (h)	AUC _{0-inf} (μg eq·h/g)	%Extrapolació n AUC _{0-inf}	V _x (mL/kg)	CL (mL/h/kg)
0	11,4	96	66,9	0,03	0,99	20,9	68,0	1,64	478	15,9
Eritrocitos										
t _{max} (h)	C _{max} (μg eq/g)	t _{ultimo} (h)	AUC _{0-t_{ultimo}} (μg eq·h/g)	k (h^{-1})	R ²	t _% (h)	AUC _{0-inf} (μg eq·h/g)	%Extrapolació n AUC _{0-inf}	V _x (mL/kg)	CL (mL/h/kg)
0	7,36	48	49,2	0,07	0,94	9,61	51,0	3,69	293	21,2

Tabla 17a: Cinética de disposición de la radioactividad total en tejidos y fluido cefalorraquídeo de ratas de Sprague-Dawley machos después de una única dosis intratecal de ^{125}I -hGALC

5

Grupo 1: en una dosis media de 41 $\mu\text{g}/\text{animal}$

Muestras	t_{\max} (h)	C_{\max} (μg eq/g)	$t_{\text{último}}$ (h)	$AUC_{0-\text{último}}$ (μg eq·h/g)	k (h^{-1})	R^2	$t_{\%}$ (h)	$AUC_{0-\text{inf}}$ (μg eq·h/g)	%Extrapolación ($AUC_{0-\text{inf}}$)
Tejido adiposo (grasa renal)	6	0,0060	6	0,0215	a	a	a	a	a
Glándulas suprarrenales	3	0,0210	6	0,109	a	a	a	a	a
Hueso (fémur)	6	0,0410	6	0,186	a	a	a	a	a
Cerebro	3	0,0050	6	0,0247	a	a	a	a	a
Líquido cefaloespinal (CFS)	b	0,000	b	0,000	b	b	b	b	b
Ojos	3	0,0270	24	0,345	0,164	0,990	4,23	0,351	1,74
Corazon	3	0,0280	24	0,379	0,167	0,987	4,16	0,385	1,56
Riñones	3	0,0960	96	1,84	0,0118	0,979	58,6	2,27	18,6
Intestino grueso	3	0,0240	24	0,347	0,125	0,983	5,54	0,363	4,40
Hígado	6	0,0300	6	0,141	a	a	a	a	a
Pulmones	3	0,0580	24	0,801	0,134	0,987	5,18	0,831	3,60
Músculo (esqueleto)	3	0,0140	6	0,0683	a	a	a	a	a
Nervio ciático	6	0,0500	6	0,201	a	a	a	a	a
Intestino delgado	3	0,0460	24	0,606	0,121	0,992	5,74	0,639	5,18
Médula espinal (lumbar, torácica, cervical)	3	0,0090	6	0,0436	a	a	a	a	a
Bazo	3	0,0400	6	0,183	a	a	a	a	a
Estómago	3	0,203	96	2,60	0,0177	0,831	39,1	2,71	4,16
Tiroide/Glándula paratiroides	48,1	4,13	96	313	c	0,892	c	c	35,2

a Sin resultados verificables, ya que la fase terminal no podía identificarse.

b Parámetros PK no estimados, al ser las muestras < LLOQ.

c Valores no se verifican porque la $AUC_{0-\text{inf}}$ se extrapoló por más de 20% o R^2 es < 0,8.

Tabla 17b: Cinética de disposición de la radioactividad total en tejidos y fluidocefalorraquídeo de ratas de Sprague-Dawley machos después de una única inyección de bolus intravenoso de ^{125}I -hGALC

5

Grupo 2: en una dosis media de 1,00 mg/kg

Muestras	t_{\max} (h)	C_{\max} (μg eq/g)	$t_{\text{último}}$ (h)	$AUC_{0-\text{túltimo}}$ (μg eq·h/g)	k (h^{-1})	R^2	$t_{\%}$ (h)	$AUC_{0-\text{inf}}$ (μg eq·h/g)	%Extrapolación ($AUC_{0-\text{inf}}$)
Tejido adiposo (grasa renal)	0,5	0,158	6	0,617	a	0,920	a	a	56,0
Glándulas suprarrenales	0	10,9	96	43,1	0,0201	0,927	346	46,8	7,89
Hueso (fémur)	0,5	1,58	48	15,3	0,0777	0,965	8,92	15,7	2,79
Cerebro	0	0,268	6	0,735	a	0,897	a	a	26,8
Líquido cefaloespinal (CFS)	3	0,210	6	0,854	b	b	b	b	b
Ojos	1	0,406	24	5,35	0,113	0,981	6,15	5,64	5,19
Corazon	0	1,33	48	10,2	0,0726	0,909	9,54	10,8	5,12
Riñones	0	3,18	96	40,7	0,0167	0,988	41,6	46,7	12,7
Intestino grueso	1	0,492	48	7,30	0,0658	0,938	10,5	7,70	5,14
Hígado	0	14,6	96	100	0,0290	1,00	23,9	105	4,15
Pulmones	0,5	20,6	96	165	0,0497	0,939	13,9	167	0,832
Músculo (esqueleto)	1	0,275	24	2,64	0,154	0,996	4,50	2,69	1,93
Nervio ciático	3	0,689	24	9,62	0,166	0,987	4,18	9,77	1,54
Intestino delgado	3	0,832	48	13,2	0,0693	0,932	10,0	13,8	4,29
Médula espinal (lumbar, torácica, cervical)	0	0,315	24	2,39	0,115	0,991	6,04	2,51	4,87
Bazo	0	7,27	96	56,1	0,0218	0,964	31,8	61,2	8,33
Estómago	3	2,40	96	31,9	0,0330	0,945	21,0	32,3	1,41
Tiroide/Glándula paratiroidea	48	295	96	24989	b	b	b	b	b

a Valores no se verifican porque la $AUC_{0-\text{inf}}$ se extrapoló por más que 20% o R^2 es < 0,8.

b Sin resultados verificables, ya que la fase terminal no podía identificarse.

Tabla 17c: Cinética de disposición de la radioactividad total en tejidos y fluido cefalorraquídeo de ratas de Sprague-Dawley machos después de una única dosis intratecal e inyección de bolus intravenoso de ^{125}I -hGALC

Grupo 3: en una dosis media de 1,08 mg/kg

	Muestras	t_{\max} (h)	C_{\max} (μg eq/g)	$t_{\text{último}}$ (h)	$AUC_{0-\text{túltimo}}$ (μg eq·h/g)	k (h^{-1})	R^2	$t_{\%}$ (h)	$AUC_{0-\text{inf}}$ (μg eq·h/g)	%Extrapolación ($AUC_{0-\text{inf}}$)
5	Tejido adiposo (grasa renal)	1	0,188	6	0,954	a	0,999	a	a	65,6
10	Glándulas suprarenales	0	12,6	96	43,9	0,0354	0,835	19,6	45,8	4,25
15	Hueso (fémur)	0,5	1,71	48	21,9	0,0869	0,985	7,98	22,3	1,50
20	Cerebro	0	0,287	6	1,03	a	0,992	a	a	36,1
25	Líquido cefaloespinal (CFS)	0	4,89	3	1,94	a	0,775	a	a	5,95
30	Ojos	3	0,611	48	9,88	0,0947	0,988	7,32	9,99	1,06
35	Corazon	0,5	1,32	96	15,7	0,0391	1,00	17,7	15,9	0,967
40	Riñones	1	3,39	96	57,9	0,0190	0,960	36,4	64,4	10,1
45	Intestino grueso	6	0,726	48	12,4	0,0764	0,911	9,07	12,8	2,77
50	Hígado	0	11,2	96	96,5	0,0269	0,986	25,7	102	5,00
55	Pulmones	1	5,31	96	44,1	0,0252	0,932	27,5	45,4	2,88
	Músculo (esqueleto)	1	0,411	24	4,37	0,110	0,997	6,31	4,66	6,25
	Nervio ciático	3	1,04	24	15,6	0,147	0,983	4,71	16,0	2,38
	Intestino delgado	3	1,40	48	20,2	0,0851	0,974	8,14	20,6	1,88
	Médula espinal (lumbar, torácica, cervical)	0	0,331	24	3,52	0,105	0,994	6,58	3,77	6,55
	Bazo	0	5,21	96	46,9	0,0347	0,860	20,0	49,3	4,85
	Estómago	3	4,45	96	72,1	0,0557	0,858	12,4	72,6	0,766
	Tiroide/Glándula paratiroides	24	297	96	16776	0,0272	0,982	25,4	18390	8,78
	a Valores no se verifican porque la $AUC_{0-\text{inf}}$ se extrapoló por más que 20% o R^2 es < 0,8.									

Sangre, suero y eritrocitos

Después de la dosis intratecal (Grupo 1: 41 $\mu\text{g}/\text{animal}$), las áreas medias calculadas bajo las curvas de concentración de radiactividad vs. tiempo desde el tiempo cero al último punto de tiempo medible $AUC_{0-\text{last}}$) para suero, sangre completa y eritrocitos fueron 1,48 μg eq·h/g, 1,33 μg eq·h/g y 1,24 μg eq·h/g, respectivamente. Los valores aparentes de $t_{1/2}$ reportados para la radiactividad en suero, sangre completa y eritrocitos fueron 5,34, 5,02 y 4,08 horas, respectivamente. La constante de tasa de eliminación, k, se calculó como 0,130 h^{-1} , 0,138 h^{-1} ,

5 y 0,170 h⁻¹ en suero, sangre completa y eritrocitos, respectivamente. El AUC se calculó como 1,54 µg eq·h/g, 1,37 µg eq·h/g y 1,25 µg eq·h/g en suero, sangre completa y eritrocitos, respectivamente. Las fases de eliminación para la radiactividad en suero, sangre completa y eritrocitos estaban bien definidas, como lo evidencian los valores de extrapolación de porcentaje muy bajos (4,0, 3,2 y 1,4%, respectivamente) requeridos para el cálculo del AUC_{0-inf}.

10 Después de la dosis intravenosa (Grupo 2: 1,00 mg/kg), los valores medios de AUC_{0-túltimo} para suero, sangre completa y eritrocitos fueron 71m1 µg eq·h/g, 51,2 µg eq·h/g y 33,9 µg eq·h/g, y los valores terminales aparente de t_{1/2} eran 30,7, 27,1 y 10,9 horas, respectivamente. El valor de k se calculó como 0,0226 h⁻¹, 0,0256 h⁻¹, y 0,0635 h⁻¹ en suero, sangre completa y eritrocitos, respectivamente. Las fases de eliminación para la radiactividad a partir del suero, sangre completa y eritrocitos estaban bien definidas y el AUC_{0-inf} se calculó como 75,0 µg eq·h/g (extrapolación 5,21%), 53,2 µg eq·h/g (extrapolación 3,75%) y 35,7 µg eq·h/g (extrapolación 4,94%) en suero, sangre completa y eritrocitos, respectivamente. El volumen aparente de distribución (V_d) fue mayor en sangre completa (735 mL/kg) seguido por suero (591 mL/kg) y eritrocitos (441 mL/kg). La depuración del artículo en estudio se estimó en 13,3 mL/h/kg a partir del suero y 18,8 mL/h/kg para sangre completa.

15 20 Después de la dosis intratecal y dosis intravenosa (1,08 mg/kg combinado) a los animales del Grupo 3, los valores medios de AUC_{0-túltimo} para suero, sangre completa y eritrocitos fueron 89,8 µg eq·h/g, 66,9 µg eq·h/g y 49,2 µg eq·h/g, respectivamente. Los valores terminales aparentes de t_{1/2} reportados para la radiactividad en suero, sangre completa y eritrocitos fueron 25,5, 20,9 y 9,61 horas, respectivamente, con k como 0,0272 h⁻¹, 0,0332 h⁻¹ y 0,0721 h⁻¹. Una vez más, las fases de eliminación para las tres matrices estaban bien definidas, con AUC_{0-inf} calculado como 92,6 µg eq·h/g, 68,0 µg eq·h/g y 51,0 µg eq·h/g (extrapolación de 3,06%, 1,64% y 3,69%) en suero, sangre completa y eritrocitos, respectivamente. La V_d fue mayor en sangre completa (478 mL/kg) seguida por suero (429 mL/kg) y eritrocitos (293 mL/kg). Los valores de depuración fueron 15,9 mL/h/kg para sangre completa y 11,7 mL/h/kg para suero.

Tejidos

30 35 El mayor valor de AUC_{0-túltimo} en los tejidos de las ratas, tras una dosis intratecal de ¹²⁵I-hGALC (Grupo 1: 41 µg/animal), se observó en la glándula tiroides/paratiroides (313 µg eq·h/g), seguida por el estómago (2,60 µg eq·h/g) y riñones (1,84 µg eq·h/g). Para varios tejidos, no fue posible estimar k o ningún parámetro derivado de k (es decir, t_{1/2} y AUC_{0-inf}) debido a que el % de extrapolación al infinito era mayor de 20% o debido a la falta de datos en la fase terminal. Para esos tejidos donde pudo estimarse (ojos, corazón, riñones, intestino delgado, pulmones, intestino grueso y estómago), k fluctuó entre 0,01 a 0,17 h⁻¹ y la t_{1/2} generalmente fluctuó entre 4 a 6 h, siendo las excepciones 58,6 h para los riñones y 39,1 h para el estómago.

40 45 Después de la dosis intravenosa (Grupo 2: 1,00 mg/kg), los mayores valores para AUC_{0-túltimo} se observaron en glándula tiroides/paratiroides (24989 µg eq·h/g), seguida por los pulmones (165 µg eq·h/g), hígado (100 µg eq·h/g), bazo (56,1 µg eq·h/g), glándulas suprarrenales (43,1 µg eq·h/g) y riñones (40,7 µg eq·h/g). Los menores valores de AUC_{0-túltimo} se observaron para grasa renal (0,617 µg eq·h/g) y cerebro (0,735 µg eq·h/g). Los parámetros derivados de k no se reportaron para los tejidos donde la fase de eliminación estaba mal definida (glándula tiroides/paratiroides y LCR), o donde la extrapolación a la AUC_{0-inf} era mayor del 20% (grasa renal y cerebro). Solo los valores de AUC_{0-inf} para el hígado y los pulmones eran mayores que el del suero (75 µg eq·h/g). El mayor valor reportado de AUC_{0-inf} fue para los pulmones (167 µg eq·h/g; extrapolación 0,832%), seguidos por hígado (105 µg eq·h/g; extrapolación 4,15%), bazo (61,2 µg eq·h/g; extrapolación 8,33%), glándulas suprarrenales (46,8 µg eq·h/g; extrapolación 7,89%) y riñones (46,7 µg eq·h/g; extrapolación 12,7%).

50 55 El menor valor reportado para el valor del AUC_{0-inf} se calculó para la médula espinal (2,51 µg eq·h/g; extrapolación 4,87%) seguida por el músculo (2,69 µg eq·h/g; extrapolación 1,93%) y ojos (5,64 µg eq·h/g; extrapolación 5,19%). El mayor t_{1/2} calculable en los tejidos fue 41,6 horas para los riñones, seguidos por 34,6 horas para las glándulas suprarrenales y 31,8 horas para el bazo. El menor t_{1/2} reportado fue 4,18 horas para el nervio ciático.

60 65 Para el Grupo 3, tras una dosis intratecal y una dosis intravenosa (1,08 mg/kg, dosis combinada), los mayores valores para el AUC_{0-túltima} se observaron en la glándula tiroides/paratiroides (16776 µg eq·h/g), seguida por el hígado (96,5 µg eq·h/g), estómago (72,1 µg eq·h/g), riñones (57,9 µg eq·h/g), bazo (46,9 µg eq·h/g), pulmones (44,1 µg eq·h/g) y glándulas suprarrenales (43,9 µg eq·h/g). Los menores valores de AUC_{0-túltimo} se observaron para la grasa renal (0,954 µg eq·h/g) y cerebro (1,03 µg eq·h/g). Los parámetros derivados de k no se reportaron para los tejidos donde la extrapolación al AUC_{0-inf} era mayor de 20% (grasa renal y cerebro) o R² menor de 0,8 (LCR). Solo los valores del AUC_{0-inf} para la glándula tiroides/paratiroides e hígado fueron mayores que del suero (92,6 µg eq·h/g). El mayor valor reportado de AUC_{0-inf} fue para la glándula tiroides/paratiroides (18390 µg eq·h/g; extrapolación 8,78%), seguido por el hígado (102 µg eq·h/g; extrapolación 5,0%), estómago (72,6 µg eq·h/g; extrapolación 0,766%), riñones (64,4 µg eq·h/g; extrapolación 10,1 %), bazo (49,3 µg eq·h/g; extrapolación 4,85%), glándulas suprarrenales (45,8 µg eq·h/g; extrapolación 4,25%) y pulmones (45,4 µg eq·h/g; extrapolación 2,88%). El menor valor reportado para el AUC se calculó para la médula espinal (3,77 µg eq·h/g;

extrapolación 6,55%) seguido por músculo (4,66 µg eq·h/g; extrapolación 6,25%). El mayor $t_{1/2}$ calculable en los tejidos fue 36,4 horas para los riñones, seguidos por 27,5 horas para los pulmones, 25,7 horas para el hígado y 25,4 horas glándula tiroides/paratiroides. El $t_{1/2}$ más corto reportado fue 4,71 horas para el nervio ciático.

5 Discusión

Tras la dosificación intratecal, las mayores concentraciones medias de radiactividad en suero y sangre completa se observaron a las 3 horas post dosis sugiriendo una distribución relativamente rápida del material relacionado con la dosis a la circulación sistémica. Tras la administración intravenosa, las mayores concentraciones medias de radiactividad en suero y sangre completa se observaron en el primer punto de tiempo analizado. Las concentraciones en el suero fueron siempre mayores que las de sangre completa, reflejadas por proporciones sangre a suero menores de 1. Esto indicaba que el material relacionado con la dosis no se asociaba particularmente con los elementos formes de la sangre de ningún grupo en ningún tiempo post dosis. Luego del precipitado de las proteínas sanguíneas por TCA, la radiactividad se recuperó principalmente en el pellet sugiriendo que la mayoría de la radiactividad circulante estaba asociada con la proteína, indicado que la distribución de radiactividad observada no reflejaba principalmente la disposición de $^{125}\text{yoduro}$ libre.

Cuando se compara el Grupo 2 (dosis intravenosa 1,00 mg/kg) al Grupo 3 (dosis intratecal e intravenosa combinada 1,08 mg/kg), las concentraciones en suero y sangre completa del Grupo 3 parecía ser generalmente similar a las del Grupo 2. El descenso de radiactividad en ambas matrices para ambos grupos también fue muy similar, evaluado por las proporciones sangre a suero. Comparando $\text{AUC}_{0-\text{último}}$ y $\text{AUC}_{0-\text{inf}}$ para el suero y sangre del Grupo 2 y Grupo 3, indicando que la exposición al material relacionado con la dosis fue ligeramente mayor para los animales del Grupo 3.

En el Grupo 1, los niveles de radiactividad en el LCR fueron muy bajos, un hallazgo que no parece concordar con la administración del artículo en estudio directamente al espacio intratecal, aunque se observaron niveles muy bajos en el cerebro. Sin embargo, se observaba radiactividad en la circulación sistémica, y en los tejidos sistémicos, poco después de la dosificación, sugiriendo que el material relacionado con la dosis se distribuyó muy rápidamente desde el espacio intratecal tras la administración. Los altos niveles en los contenidos gástrico e intestinal sugerían que el material relacionado con la dosis se excretó a través de las heces, aunque en este estudio no se realizó la medición directa en la excreción. Además, los altos niveles en los contenidos de la vejiga urinaria también sugieren una excreción a través de la orina. Además de los altos niveles en las glándulas tiroides/paratiroides, que se consideraban reflejo de la pérdida del nivel de yoduro y la persistencia de la marca en este tejido más que la distribución/persistencia del artículo en estudio mismo, se observaron niveles de radiactividad en hígado, pulmones, glándulas suprarrenales, bazo y riñones; tejidos los cuales probablemente estaba involucrados en el metabolismo y/o excreción del artículo en estudio.

La distribución de la radiactividad era general y amplia por el primer punto post dosis en los Grupos 2 y 3. Las mayores concentraciones se asociaban generalmente con el hígado, pulmones, riñones, bazo, glándula suprarrenal, y en particular, la glándula tiroides/paratiroides. Así, el patrón de distribución de radiactividad en los tejidos de los tres grupos fue predominantemente similar. Una vez más, se observaron altos niveles de radiactividad en las glándulas tiroides/paratiroides de todos los animales, particularmente considerando el marcado aumento de concentración al aumentar el tiempo post dosis, indicó probablemente la pérdida de la marca del yoduro y la persistencia de la marca en este tejido más que la distribución/persistencia del artículo en estudio mismo. Los niveles de LCR fueron mayores en estos grupos, en comparación con el Grupo 1, en los primeros puntos de tiempo post dosis, sugiriendo que el material radiomarcado podía cruzar la barrera hematoencefálica. En esta matriz en el Grupo 3 se observaron niveles ligeramente mayores, en comparación con el Grupo 2, otra vez en los primeros puntos de tiempo post dosis, sugiriendo que esta concentración era explicada por el artículo en estudio distribuyéndose desde la dosis intravenosa y el material directamente inyectado en el espacio intratecal. Los valores por debajo del LOQ observados para el Grupo 1 por tanto pueden ser una consecuencia de concentraciones muy bajas en volúmenes de muestra muy pequeños, estando por debajo de la cuantificación posible por este método analítico.

Las proporciones tejido a suero fueron generalmente menores de 1 en la mayoría de los tejidos a las 96 horas post dosis, indicando que el material relacionado con la dosis se distribuía en los tejidos y generalmente se depuraba más rápidamente de los tejidos que del suero. Para todos los grupos, la exposición de la mayoría de los tejidos al material relacionado con la dosis (evaluado por $\text{AUC}_{0-\text{último}}$) fue menor que la del suero.

Conclusión

Tras la administración de una dosis intratecal (nominal 60 ug/animal) y/o un bolus intravenoso de ^{125}I -hGALC a ratas macho (concentraciones nominales de 1 mg/kg), se determinaron las concentraciones de radiactividad en sangre, suero, eritrocitos, LCR y tejidos.

Las mayores concentraciones medias de radiactividad en suero y sangre completa ocurrieron a las 3

5 horas post dosis tras la administración intratecal, indicando una distribución relativamente rápida a la circulación sistémica, o en el primer punto de tiempo post dosis (10 minutos) tras la dosificación intravenosa. Las concentraciones en el suero fueron mayores que en la sangre, indicando que el material relacionado con el estudio no se asociaba particularmente con los eritrocitos. La distribución de radiactividad en los tejidos fue general y amplia en los primeros puntos de tiempo post dosis y, en general, el patrón de distribución a los tejidos fue similar entre los tres grupos. Para todos los grupos, la exposición de la mayoría de los tejidos al material relacionado con la dosis (evaluado por $AUC_{0-t\text{último}}$) fue menor que la del suero. Altas concentraciones en las glándulas tiroides/paratiroides para los tres grupos se consideró que indicaba pérdida de la marca de yoduro más que la distribución y persistencia del material relacionado con la dosis en este tejido. A las 96 horas post dosis intravenosa, la radiactividad aún se detectaba en algunos de los tejidos examinados.

EJEMPLO 3: ESTUDIO PRECLÍNICO DE INYECCIÓN RMGALC ICV E ICV/IP Y SOBREVIDA EXTENDIDA EN RATONES TWITCHER

15 El presente Ejemplo demuestra un contexto de un estudio preclínico que ilustra la sobrevida extendida en ratones twitcher a los cuales se les suministraron inyecciones semanales por vía IP de rmGalC. En el presente contexto, se observó una mayor mielinización en el nervio ciático, junto con niveles reducidos de psicosina y mejoría de la función motora gruesa (es decir, marcha). En algunas realizaciones, los ratones twitcher tratados con una inyección por vía ICV o ICV/IP de rmGALC exhibieron una mayor sobrevida y hasta 20 una reducción de 63% en los niveles de psicosina cerebral. Los resultados positivos en los puntos finales importantes (es decir, sobrevida, niveles cerebrales de psicosina) luego de una administración por vía ICV de rmGalC junto con la mejoría muy mínima en estos puntos finales luego de la adición de la administración sistémica (ICV/IP) sugieren que un régimen solo en el SNC es una opción clínica viable para el tratamiento de la GLD.

25 Introducción

30 La leucodistrofia de células globoides (GLD) es un trastorno del depósito lisosomal autosómico recesivo que ocurre a una incidencia de aproximadamente 1:100,000 nacimientos (1.9:100,000 nacimientos en los países escandinavos). Un trastorno progresivo del sistema nervioso periférico (PNS) y central (SNC), la GLD es el resultado de mutaciones genéticas que causan una deficiencia en la actividad enzimática de la galactocerebrosidasa (GALC) para degradar sustratos lipídicos [es decir, galactosilceramida a galactosa y ceramida; galactosilesfingosina (psicosina) a galactosa y esfingosina]. Este trastorno se caracteriza por una 35 pérdida completa de oligodendrocitos y mielina así como la presencia de macrófagos dilatados con galactosilceramida (células globoides).

40 Los rasgos clínicos de esta enfermedad se presentan en dos formas: infantil y de aparición tardía. La forma infantil de la GLD (también conocida como enfermedad de Krabbe) ocurre en 90% de los pacientes con diagnóstico de deficiencia de GALC, y los síntomas usualmente se observan a los 3-6 meses de nacimiento; hay informes de síntomas que se manifiestan a las 2-3 semanas de edad (Wenger, D.A. et al., 2001, Galactosylceramide Lipidosis: Globoid Cell Leukodystrophy (Krabbe Disease), in The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, C.R. Scriver, Beaudet, A. L., Sly, W.S., and Valle, D, Editor. 2001, 2001, McGraw-Hill. p. 3669-3687). La variante de aparición tardía de esta enfermedad usualmente se presenta clínicamente a los 10 años de edad, sin embargo, se han reportado pacientes diagnosticados a los 40 años de edad (Wenger, D.A. et al., 2001, Galactosylceramide Lipidosis: Globoid Cell Leukodystrophy (Krabbe Disease), in The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, C.R. Scriver, Beaudet, A. L., Sly, W.S., and Valle, D, Editor. 2001, McGraw-Hill. p. 3669-3687). El descenso de la función en los pacientes con aparición tardía procede gradualmente en un período de varios años.

50 La terapia de reemplazo enzimático sistémico (ERT) ha proporcionado beneficio para los pacientes que sufren trastornos del depósito lisosomal (LSDs) tales como la Enfermedad de Gaucher, Enfermedad de Fabry, y sindrome de Hunter (WENGER, D.A. et al., 2001, Galactosylceramide Lipidosis: Globoid Cell Leukodystrophy (Krabbe Disease), in The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, C.R. Scriver, Beaudet, A. L., Sly, W.S., and Valle, D, Editor. 2001, McGraw-Hill. p. 3669-3687). 2004, Enzyme Replacement therapy. Lysosomal disorders of the Brain, ed. F.M.a.W. Platt, S.V. 2004: Oxford University Press. 327-338; Desnick, R.J., 2004. J. Inher. Metab. Dis., 27(3): p. 385-410). La ERT para la GLD no se ha investigado con rigor, quizá porque la enfermedad afecta al PNS y al SNC. Los tratamientos actuales para los pacientes con GLD incluyen el trasplante de células hematopoyéticas (HCT), sin embargo este procedimiento tiene sus limitaciones debido a los eventos adversos significativos (es decir, 30% de mortalidad relacionada con el tratamiento, terapia inmunosupresora de por vida) y eficacia solo en pacientes presintomáticos.

60 El ratón twitcher es el modelo de animal experimental más común usado para estudiar la GLD, y constituye grueso del trabajo experimental sobre esta enfermedad (Wenger, D.A., 2000, Mol. Med. Today, 6(11): p. 449-451), pero existen otros modelos animales de GLD que existen naturalmente con grados variables de caracterización. Existe una mutación espontánea en terriers Highland White/Cairn Terriers (Kobayashi T., et al.,

1980, Brain Res., 202:479-83), ovejas Polled Dorset (Pritchard D., et al., 1980, Vet. Pathol., 17:399-405), el gato doméstico (Johnson K., 1970, J. Am. Vet. Med. Assoc., 157:2057-64) y el primate no humano macaco Rhesus (Baskin G., et al., 1998, Lab Anim. Sci., 48:476-82).

5 Los estudios iniciales de aloinjerto de nervio demostraron que la capacidad de mejorar la función nerviosa periférica de las células de Schwann del ratón twitcher estaba mediada por el reemplazo enzimático en el aloinjerto de células twitcher *in situ* y que la recuperación a largo plazo de las células mielinizantes periféricas twitcher lesionadas era posible. Sin embargo, esta tecnología no pudo generalizarse como una terapia global del ratón twitcher (Baskin G., et al., 1998, Lab Anim. Sci., 48:476-82). En los ratones afectados, el HCT demostró 10 una mejoría significativa en el tiempo de vida y aumento de peso de los animales afectados, sin embargo se observa una eficacia variable con una viabilidad documentada entre 44 días a más de 100 días (en ratones que reciben condicionamiento mielorreductor) (Lin, D., et al., 2007, Mol. Ther., 15(1): p. 44-52; Hoogerbrugge, P.M., et al., 1998, J. Clin. Invest., 81(6): p.1790-4). La duración de vida de los ratones no tratados en estas 15 investigaciones era de aproximadamente 40 días.

15 En éstos y otros estudios, ni la tasa de remielinización ni la patología cerebral existente mejoraron en los ratones tratados versus los controles no tratados (Yeager A. et al., 1984, Science, 225:1052-4; Toyoshima, E. et al., 1986, J. Neurol. Sci., 74(2-3), p. 307-18). La inhibición del sustrato dirigida a la síntesis de esfingosina usando L-cicloserina, sola o combinada con HCT, aumenta la duración de vida del ratón twitcher (LeVine S., et al., 2000, J. Neurosci. Res., 60:231-6; Biswas S., et al., 2003, Neurosci. Lett., p347:33-6). La L-cicloserina es demasiado tóxica para su uso en el ser humano, a diferencia de su enantiómero D-cicloserina, la cual está indicada para el tratamiento de la ansiedad. Los experimentos con geneterapia han demostrado la capacidad de generar la enzima en células trasfectadas y aumentar la duración de vida en ratones twitcher, sea en monoterapia o combinada con HCT (Lin, D., et al., 2007, Mol. Ther., 15(1): p. 44-52). La reducción de sustrato, 20 HCT y geneterapia proporcionan la eficacia más significativa cuando se usan en animales presintomáticos, con ninguno o limitado impacto sobre la enfermedad en los animales sintomáticos. Por tanto, La ERT puede proporcionar una opción viable en el tratamiento de la GLD, especialmente cuando se administra a pacientes 25 presintomáticos.

30 Resultados

35 La terapia de reemplazo enzimático administrado por vía sistémica usando una GALC murina derivada de HEK 293 (rmGALC; 5 mg/kg), de forma periférica como múltiples inyecciones intraperitoneales (IP), mejoró la duración de vida de los ratones twitcher y disminuyó la acumulación de psicosina en 15% cuando se comparó contra animales tratados con vehículo (Tabla 18, figura 31).

Tabla 18: La administración IP de rmGalC mejora la sobrevida en ratones twitcher

	Grupo de dosis	Media	Sobrevida (días)		Analises de Mann-Whitney (vs. Vehículo)
			Rango		
			Min	Max	
40	No tratados	42,6	39	45	0,49
	Vehículo	43,2	37	48	n/a
	1 mg/kg	43,0	40	46	0,61
45	5 mg/kg	48,9	46	54	0,0003
	10 mg/kg	49,2	47	54	0,0003

50 Los ratones tratados por vía IP con rmGALC se desempeñaron mejor en la prueba de marcha, y la histopatología del nervio ciático mejoró en comparación con los animales no tratados o tratados con vehículo. La rmGALC administrada periféricamente (vía IP) se administró mínimamente al cerebro resultando en un ligero descenso en la psicosina cerebral. Sin embargo, no parecía haber cambio en la histopatología cerebral. Por tanto, los resultados observados en ratones twitcher tratados con una administración sistémica repetida semanal (IP) de rmGALC (5 mg/kg) resultó en un beneficio en la sobrevida, un ligero descenso en los niveles de psicosina cerebral y una mejoría en la función motora gruesa.

55 *mGALC de ICV única e ICV/IP combinada en ratones twitcher*

60 Los resultados indican que el grupo de tratamiento con dosis altas ICV/IP sobrevivió en promedio 50 días (120 µg/5 mpk) sobreviviendo los animales tratados con vehículo sólo 36 días (figura 32). Los ratones tratados con rmGALC ICV solo mostraron un tiempo de sobrevida media en respuesta a la dosis de 42 días (40 µg) y 48 días (120 µg). Una sola inyección ICV de 120 µg redujo el nivel cerebral de psicosina (63%) mientras que una sola inyección ICV de 40 µg rmGALC resultó en un descenso del 39% en la psicosina (figura 33). Aunque la administración ICV/IP no proporcionó un beneficio adicional en la reducción de psicosina comparada con ICV solamente, la reducción observada del 48% en los niveles de psicosina observada con el régimen combinado fue significativamente menor que la observada con los tratamientos IP semanales solamente (15%).

Además, se observó una mejoría en la histología cerebral en los sitios distales al sitio de inyección con los tratamientos ICV al nivel de 40 µg (figura 34). Estos resultados confirmaron la actividad y biodistribución en el cerebro de rmGALC tras la inyección ICV directa. Sin embargo, los ratones tratados con nnGALC ICV solamente no mostraron restauración de la morfología o mielinización de la fibra del nervio ciático y solo mejorías leves en la función motora gruesa (p.ej., análisis de la marcha). La mejoría significativa en los puntos finales clave (es decir, sobrevida, niveles cerebrales de psicosina) luego de una sola administración ICV de nnGALC sugiere una falta de suficiente concentración de la enzima en la circulación sistémica.

Parámetros de dosificación clínica: Tasa de reacumulación de psicosina en ratones twitcher

Se realizaron los siguientes estudios en el modelo del ratón twitcher en un esfuerzo por definir un rango de dosis clínico apropiado:

- Tasa de reacumulación de psicosina cerebral en ratones twitcher tras una inyección ICV en PND19.
- Estudios de hallazgo de dosis usando inyecciones intraperitoneales (IP) + intracerebroventriculares (ICV) combinadas de rmGALC en ratones twitcher

Para evaluar la tasa de reacumulación de psicosina en el sistema nervioso central, ratones twitcher se tratados con una inyección ICV de 12 µg o 40 µg de rmGALC en PND19. Se sacrificaron grupos de ratones ($n = 3$) 24 h después de la inyección (PND20) y luego cada tres días posteriormente. Se retiró el tejido cerebral y se sometió a análisis de psicosina, histopatología y análisis de actividad enzimática. Se monitorizó la sobrevida en un subgrupo de animales ($n = 8$), y se analizó la función motora (análisis de la marcha) a PND 40.

Los niveles de psicosina en el homogenado cerebral tras una inyección ICV se analizaron a través de espectrometría de masa (LCMS Ltd., North Carolina), y sugiere un rápido descenso en la psicosina dentro de las 24 horas de la administración de rmGALC (figura 35). La tendencia de la reducción de psicosina se mantuvo por un período de 24 días post administración de la enzima. Además, el descenso en la concentración de psicosina parecía depender de la dosis en este período en comparación con los animales tratados con vehículo: Tratados con vehículo (promedio: 4,5 ng/ml psicosina) vs 12 µg nnGALC (promedio: 2,5 mg/ml psicosina) vs. 40 µg/ml nnGALC (promedio: 1.6 ng/ml psicosina). De interés, los niveles elevados de psicosina observados en ambos grupos de dosis al final del estudio (días 28-32 post-tratamiento) sugiere que la ERT puede no ser exitosa si se administra mensualmente. Puede requerirse un esquema de dosificación más frecuente. Debido al pequeño número de animales en cada punto de tiempo, la variabilidad en los resultados fue evidente. Sin embargo, según estos resultados, es evidente que la reacumulación de psicosina ocurre aproximadamente en un esquema de 4 semanas (28 días).

Cuando se analizó el tiempo de sobrevida, los resultados indicaban que los grupos de tratamiento con 12 µg/mL y 40 µg/mL nnGALC tuvieron una sobrevida media de 48 días (12 µg/mL) y 50,5 días (40 µg/mL) sobreviviendo los animales tratados con vehículo 40 días (figura 36). Inesperadamente, los ratones tratados con 40 µg de GALC humana (rhGALC) mostraron un beneficio de sobrevida de solo 42 días comparados con los animales tratados con vehículo que sobrevivieron 40 días. Las razones para esta eficacia reducida con rhGALC no se conocen, pero se discutirán en una sección posterior. Sin embargo, a partir de los resultados de este estudio, es aparente que incluso a dosis menores de rmGALC son efectivas demostrando un beneficio en la sobrevida en el modelo del ratón twitcher.

Parámetros de dosificación clínica: estudio de rango de dosis de rmGALC y rhGalC en ratones twitcher

Resultados previos indicaban que ratones twitcher tratados con rmGALC ICV/IP (120 µg y 5 mpk) vivieron 14 días mayor que los animales tratados con vehículo. Sin embargo, los ratones twitcher tratados solo con inyecciones directas en el SNC mostraron una mejoría en respuesta a la dosis en la sobrevida media de 12 días (120 µg ICV) y 6 días (40 µg ICV). Una dosis de 120 µg en el cerebro murino se traduce a una dosis de 300 mg/kg cerebro en los pacientes; por tanto era importante investigar la eficacia de dosis menores de rmGALC. Además, se examinó la eficacia de un lote temprano de rhGALC en el ratón twitcher. Grupos de ratones fueron tratados con inyecciones IP semanales (5 mg/kg) de nnGALC comenzando en PND10 más una inyección ICV de 12 µg (30 mg/kg de peso cerebral) o 26 µg (60 mg/kg de peso cerebral) de nnGALC o rhGALC en PND19. En PND39, un subgrupo de ratones ($n=3$ /grupo) fueron sacrificados para recolectar tejido (cerebro, nervio ciático, hígado, sueros). El tejido cerebral fue sometido a análisis de psicosina, histopatología y cuantificación de actividad enzimática. En la sobrevida de los animales restantes ($n = 8$) fue monitorizada la sobrevida y el análisis de la marcha.

Discusión

Los resultados de este estudio de hallazgo de dosis muestran un beneficio de sobrevida para la administración de rmGALC con una tendencia hacia dependencia de dosis (figura 37). Las dosis de combinación

de 12 µg/5 mpk y 26 µg/5 mpk de nnGALC extendieron la duración de vida media del ratón twitcher a 44,5 y 45,5 días respectivamente en comparación con 40,5 días para los animales tratados con vehículo. No hubo beneficio de sobrevida para las dosis de 12 µg/5 mpk (38 días) y 26 µg/5 mpk (39,5 días) de rhGALC. La dosis de 26 µg/5 mpk rhGALC extendió la duración de la vida de los ratones twitcher afectados por 1,5 días, sin embargo ninguna dosis de rhGALC alcanzó los días de sobrevida para los animales tratados con vehículo (figura 37). Como se observó previamente con animales sistemáticamente tratados (IP) con nnGALC, se observó una mejoría en el análisis de la marcha para todos los animales recibiendo la administración ICV/IP combinada de rmGALC, mientras que los animales tratados con una inyección ICV mostró menos beneficio en la función motora (figura 38). Como se observó para el beneficio en la duración de vida, no se observó beneficio en el análisis de la marcha en los ratones tratados con rhGALC. Sin embargo, se encontró que la actividad específica de rhGALC era aproximadamente 33% de la actividad in vitro de nnGALC (Tabla 19). Por tanto, estos resultados sugieren que incluso a dosis menores de rmGALC, hay un beneficio en la sobrevida y función motora y refuerza la oportunidad para la ERT para el tratamiento de la GLD. Es evidente que la reacumulación de psicosina ocurre aproximadamente en un esquema de 4 semanas (28 días).

15

Tabla 19: Actividad de rmGALC y rhGalCy

Lote	Actividad Media (µmol/hr/mg)	% rmGALC
rmGALC R5 (3,44mg/mL)	154,48 ± 87,5	n/a
rhGALC Lote 73 (8,74mg/mL)	51,35 ± 16,2	33

Es de esperarse la antigenicidad de nnGALC y rhGALC ya que el ratón twitcher es un modelo nulo [es decir, son negativos para el material inmunológico de reactividad cruzada (CRIM)]. En general, el título máximo de anticuerpo sérico en los ratones tratados con rhGALC (Régimen ICV/IP) fue significativamente mayor que los ratones tratados con un régimen ICV/IP comparable de rmGALC (figura 39). Aunque los anticuerpos también estaban presentes en los ratones tratados con inyecciones directas en el SNC, el título máximo fue varias veces menor que los animales que recibieron el tratamiento ICV/IP. Existe la posibilidad que se hayan podido generar anticuerpos neutralizantes.

Se inició un estudio con caninos deficientes en GALC para caracterizar la antigenicidad de rhGALC. En este estudio, los animales afectados (6 semanas después del nacimiento) fueron tratados con 2 mg/kg semanal IV y/o 2,25 mg (30 mg/kg de peso cerebral) administrados por vía IT de GALC humana o vehículo solamente. Se administraron tratamientos adicionales a las 8 semanas y mensualmente por el resto del estudio (hasta ~ 16 semanas después del nacimiento). Se retiró el LCR antes de la eutanasia y se analizó la formación de anticuerpos y niveles de psicosina (figura 40).

Estudios previos con heparán-N-sulfatasa humana recombinante en el modelo en el perro Huntaway de MPSIIIA demostraron una respuesta de anticuerpo marcada a la enzima exógena, resultando en la necesidad de tolerización de los animales en el estudio. Sin embargo, resultados preliminares examinando el LCR de perros naïve y tratados con rhGALC mostraron una reducción aparente en los niveles de psicosina en comparación con los controles no tratados (figura 40).

EJEMPLO 4: HISTOLOGÍA CEREBRAL Y HEPÁTICA/MARCAJE DE GALC INYECTADO POR VÍA IT EN LOS RATONES

El presente Ejemplo describe una realización de hGalC y mGalC inyectados por vía IT en los ratones y la detección y localización correspondiente del anticuerpo de GalC en varios tejidos.

Diseño experimental

Diseño experimental:

Grupo	N	Tratamiento	Dosis (µg)	Volum. Inyección (µL)	Ruta	Frecuencia	Sacrificio
A	6	Control de Vehiculo	0				
B	6	hGalC (investigación)		10 µL	IT	Tres inyecciones semanales	24hr post inyección final
C	6	hGalC (PD)					
D	6	mGalC					

Recolección de tejido y tinción histológica

Hubo solo tres animales disponibles para el análisis histológico del Grupo B y C, respectivamente. Las muestras de los cerebros e hígados se fijaron en formalina tamponada neutral al 10% para la inclusión posterior en parafina. Se prepararon secciones de parafina de cinco μm para la inmunohistoquímica (IHC) de I2S para detectar las proteínas inyectadas. Se usaron tres anticuerpos anti-GalC para la tinción IHC de GalCA.

1. Anticuerpo monoclonal de ratón (generado por el laboratorio de Dr. Eckman)
2. Anticuerpo policlonal de conejo (generado por el Grupo 1)
3. Anticuerpo policlonal de conejo (generado por el Grupo 2)

Se usó un método de amplificación por fluorescencia altamente sensible de ABC + Tiramida para marcar la proteína. Los resultados de tinción mostraron células positivas para GalC como verdes, con los núcleos como contrateñidos con azul DAPI, y las áreas de fondo como negras.

Resultados

El anticuerpo policlonal del Grupo 1 tuvo una fuerte reacción cruzada con proteínas endógenas en los cerebros de ratón. Incluso en cerebros con control vehículo, todas las células del SNC se tiñeron fuertemente positivas. Las proteínas inyectadas no se identificaron con un fondo tan fuerte (figura 41). El anticuerpo policlonal del Grupo 2 tuvo una reacción cruzada más débil con las proteínas endógenas en los cerebros de ratón, pero las células del SNC en los cerebros del control vehículo aún eran positivas. Las proteínas inyectadas no se detectaron por encima del fondo (figura 42). El anticuerpo monoclonal de ratón tuvo una especificidad aceptable, con señales mucho menores en los cerebros de control vehículo (datos no mostrados). Tras la inyección IT, todas las proteínas se detectaron en las meninges en la superficie del cerebro. La hGalC del Grupo 1 y Grupo 2 se detectaron en las células del SNC (neuronas y células gliales) en las regiones por debajo de las meninges, con señales relativamente más fuertes en la hGalC de los animales tratados del Grupo 1. No se detectaron neuronas y células gliales en los cerebros tratados con mGalC (figura 43). En el cerebelo, la hGalC produjo tinción en las meninges y en la superficie de la zona granular, mientras que la mGalC no (figura 44). El anticuerpo monoclonal de ratón funcionó en el cerebro murino pero mostró una fuerte reactividad cruzada con las células sinusoidales en el hígado y no pudo usarse para evaluar la captación celular de las proteínas inyectadas por vía IT en el hígado (figura 45). El anticuerpo policlonal del Grupo 2 mostró especificidad en los tejidos hepáticos con señales mucho menores en los cerebros de control vehículo. Las proteínas inyectadas por vía IT se detectaron en las células sinusoidales y hepatocitos en los hígados tras el tratamiento, con menos células positivas y señales más débiles en la hGalC de los animales tratados del Grupo 1 (figura 46). Aunque no se encontró una mayor actividad de GalC en ningún grupo tratado, se encontró tinción positiva en las meninges y células del SNC en las regiones circundantes, indicando que la IHC es sensible detectando la proteína inyectada que ha sido captada a nivel celular (figura 47). En el hígado, la mGalC mostró una mayor actividad, sin embargo la IHC a través del Ab del Grupo 2 detectó muy poca diferencia entre mGalC y hGalC (figura 48). La baja actividad detectable con el Ab del Grupo 1 en hGalC fue consistente con los bajos niveles observados de IHC.

Resumen

Tras la inyección IT, todas las proteínas inyectadas se detectaron en las meninges del cerebro a través de IHC. La captación celular de hGalC inyectada del Grupo 1 y Grupo 2 se detectaron en las células del SNC (neuronas y células gliales), con señales relativamente más fuertes en la hGalC de los cerebros tratados del Grupo 1. No se detectaron neuronas y células gliales positivas en los cerebros tratados con mGalC. En el cerebelo, además de la señal positiva en las meninges, la hGalC inyectada del Grupo 1 y Grupo 2 se encontró en una capa de células en la superficie de la zona granular. En los hígados de los grupos tratados, las proteínas inyectadas se detectaron en las células sinusoidales y hepatocitos sugiriendo una captación eventual de I2S intratecal en el sistema circulatorio. La mGalC y hGalC del Grupo 2 tuvieron señales de tinción fuertes similares versus la hGalC del Grupo 1.

EJEMPLO 5: HISTOLOGÍA CEREBRAL/MARCAJE DE GALC INYECTADO POR VÍA IT EN PERROS

El presente Ejemplo describe un contexto de GalC inyectado por vía IT en los perros y la detección correspondiente y localización correspondiente del anticuerpo de GalC en el cerebro. En este contexto, la proteína inyectada por vía IT se detectó en las meninges y en las regiones de la corteza superficial debajo de las meninges. Se encontró proteína inyectada por vía ICV en las regiones periventriculares (figura 49). La IHC de GalC mostró un patrón de tinción extracelular difusa en la corteza tras la inyección por vía IT, con señal negativa en las neuronas (círculo) (figura 50). Se observó un descenso limitado de las células microgliales activadas con tinción positiva para Iba en las regiones periventriculares inyectadas por vía ICV y corteza inyectada por vía IT

(figura 51). No se encontró cambio morfológico (células globoides) en la corteza con LFB/PAS en el grupo con vehículo y no se observaron diferencias a través de los grupos. Las células globoides (flecha) marcadas por tinción con Iba disminuyeron tras el tratamiento ICV en 4 áreas limitadas de las regiones periventriculares (figura 52).

Ejemplos de administración de proteína I2S por vía intratecal

EJEMPLO 6: BIODISTRIBUCIÓN DE I2S ADMINISTRADA POR VIA IT

El mayor objetivo de este estudio consistió en determinar si podía administrarse I2S humano recombinante al cerebro de ratones MPS II adultos por la ruta intratecal-lumbar

Tabla 20: SEIS GRUPOS DE RATONES MACHOS DE 8-12 SEMANAS DE EDAD SE TRATARON DEL SIGUIENTE MODO:

Grupo	N	Cepa	Tratamiento	Volumen	Dosis	Dosis/Peso cerebral	Via
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	No tratados	N/A	N/A	N/A	N/A
D	1	IKO	I2S	10 µL	260 µg	520 mg/kg	IT-lumbar
E	3	IKO	No tratados	N/A	N/A	N/A	N/A
F	3	C57BL/6	No tratados	N/A	N/A	N/A	N/A

Programa de Inyacción: Los animales reciben más de 3 inyecciones de idursulfasA (10µL) via la ruta intratecal-lumbar:

- Grupos A y D: Administradas 3 dosis de I2S en días 1, 8 y 15
- Grupo B: Administradas 2 dosis de I2S en días 1 y 8
- Grupos C y E: Control de ratón sin tratamiento (IKO)
- Grupo F: Control de ratón de tipo salvaje sin tratar

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales:

Los ratones se mantuvieron en grupos de 4 por jaula en una sala de colonia bajo un ciclo luz-oscuridad de 12 horas. La dieta de roedores (LabDiet-5001, St Louis, MO) y agua (Lexington, MA agua municipal purificada por ósmosis inversa) estaban disponibles adlibitum por la duración del experimento. El cuidado de los animales se condujo de acuerdo con las guías descritas en la Guía para la Atención y Uso de Animales de Laboratorio (National Academy Press, Washington D.C., 1996). La colonia De cría IKO se estableció a partir de cuatro ratones hembra portadores heterocigotos para la mutación IKO obtenidos a partir del Dr. Joseph Muenzer (Universidad de North Carolina). Las hembras portadoras se cruzaron con ratones machos de la cepa C57BL/6 (C57BL/6NTac, Taconic, Hudson, NY), produciendo hembras heterocigotas y ratones knock-out machos hemicigotos, así como littennates machos y hembras salvajes. Toda la descendencia fue genotipeada por análisis de PCR del ADN del tejido. Todos los ratones usados en este experimento eran machos identificados como IKO hemicigoto (-/0) o ratones littennate salvajes (WT) (+/0) entre 8 y 12 semanas de edad.

Idursulfasa:

Veintidós mL de I2S [idursulfasa humana recombinante] se dializaron contra cuatro cambios de 2L de solución fisiológica tamponada con fosfato (PBS). La I2S luego se concentró por columna Vivaspin y se resuspendió en un volumen final de 1 mL de PBS, seguido por esterilización con filtro usando un filtro de 0,2 µm. La concentración final fue 51 mg/mL.

Inyecciones intratecales-lumbares:

Se anestesiaron ratones adultos usando 2,2,2 tribromoetanol 1,25% (Avertin) a 200-300 µL/10 gramos de peso corporal (250-350 mg/kg) por inyección intraperitoneal. Se removió el cabello dorsal entre la base de la cola y los hombros las hojillas y el área afeitada se frotó con una gasa de povidine/betadine seguido por alcohol isopropílico. Se hizo una pequeña incisión en la línea media de la piel (1-2 cm) sobre la columna lumbosacra y la intersección de la línea media dorsal y la cara craneal de las crestas ilíacas (ileon singular) identificadas. El músculo en la fossa ilíaca (gluteus medius) es un músculo en forma de corazón y los dos lados de la porción superior del «corazón» se aproximan a la locación de las crestas de la ilea. Se insertó una aguja calibre 32 unida a una jeringa Hamilton de vidrio estrecha a gas de 10-20 µL hasta que se sintió resistencia desde el hueso

subyacente. Se realizó la inyección de 10 µL de artículo en estudio a una tasa aproximada de 2 µL/20 segundos (10 µL/2 minutos). La incisión en la piel se cerró usando clips de herida cuando era apropiado y al animal se le permitió recuperarse en una cámara de recuperación antes de devolverlo a la jaula apropiada.

5 **Procedimientos histológicos:**

Los animales fueron sacrificados una hora después de la inyección final.

10 Los tejidos de cerebro e hígado se recolectaron y fijaron en formalina tamponada neutral al 10%, luego se procesaron e incrustaron en parafina. Se prepararon secciones de cinco µm para tinción con hematoxilina/eosina (H&E) e inmunohistoquímica.

Tinción con hematoxilina y eosina:

15 Las secciones de cerebro e hígado se tiñeron con H&E. Los resultados de la tinción mostraban los núcleos púrpura y el citoplasma rosado a rojo. Las láminas teñidas con H&E se usaron para la evaluación de la morfología histopatológica.

20 Inmunohistoquímica

25 Para la evaluación de la biodistribución de I2S, se incubaron secciones de cerebro e hígado desparafinadas y rehidratadas toda la noche con anticuerpo monoclonal de ratón 2C4-2B2 (Maine Biotechnology Services, Portland, ME) contra I2S humano recombinante para detectar la I2S inyectada (o una IgG de ratón irrelevante como anticuerpo control negativo; Vector Laboratories, Burlingame, CA). Después de una incubación toda la noche a 2-8°C, se añadió una IgG secundaria de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano. Luego de 30 minutos adicionales de incubación a 37°C, se añadió una solución de etiquetado Tiramida-Alexa Flúor 488 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) por 10 minutos más. Las secciones se cubrieron usando un medio de montaje antiesfumado (VectaShield; Vector Laboratories) que contenía 1,5 µg/ml 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) como contratinación nuclear y se observaron con un microscopio fluorescente Nikon de múltiples canales.

30 Los resultados de la tinción mostraban las células positivas para I2S como verdes, con los núcleos azules, y las áreas de fondo como negras.

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

40 Brevemente, las secciones desparafinadas se rehidrataron e incubaron con el anticuerpo primario. Luego de la incubación toda la noche a 2-8°C, se añadió una IgG de conejo anti-rata biotinilada secundaria (Vector Labs, Burlingame, California) y se incubó por 30 minutos a 37°C, luego las muestras se lavaron y trataron con complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vector Laboratories) por 30 minutos. Para el desarrollo del color, se usó tetrahidrocloruro de 3,3-diaminobencidina (DAB) como el cromágeno. Las secciones fueron luego contrateñidas con hematoxilina y cubiertas. Los resultados de la tinción resultaban las células positivas para LAMP-1 como marrones y los núcleos como azules.

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

50 Método de microscopía electrónica:

55 Los tejidos cerebrales de animales tratados con 3 dosis de I2S se fijaron en PFA 2,5%/glutaraldehído 2,5% en tampón de cacodilato de sodio 0,1 M pH 7,4 a 4 grados toda la noche. Luego las muestras se lavaron en tampón de cacodilato (0,1 M, pH 7,4) y se post-fijaron en tetróxido de osmio, se deshidrataron en alcohol y óxido de propileno y se incluyeron en resina Epon. Se cortaron secciones ultradelgadas a 100 nm, se tiñieron con citrato de plomo y se examinaron en un microscopio Tecnai™ G² Spirit BioTWIN de transmisión electrónica.

60 Resultados

65 En el cerebro, determinado por inmunohistoquímica (IHC), no se encontró I2S en los animales con vehículo control. Por el contrario, las células meníngeas, neuronas del cerebro y cerebelo estaban positivamente teñidas para I2S en animales a los cuales se les inyectó I2S. La señal de la tinción era más fuerte en los animales a los cuales se les administraron 3 dosis (figura 53).

En los tejidos cerebrales de los ratones IKO tratados con vehículo, se encontró vacuolación celular, una marca histopatológica de las enfermedades de depósito lisosomal, a lo largo de los cerebros comparados con los animales salvajes. En los ratones IKO tratados con I2S, hubo una amplia reducción de la vacuolación celular desde la corteza cerebral superficial, n úcleo caudado, tálamo, cerebelo, a la sustancia blanca comparados con los no tratados (figura 54). Se encontró una actividad lisosomal anormalmente alta por tinción con proteína-1 de membrana asociada a lisosomas (LAMP-1), un indicador de actividad lisosomal y estado de la enfermedad, en las células microgliales, meníngeas y perivasculares de los ratones IKO tratados con vehículo cuando se compararon con los animales salvajes (figura 55). Los ratones tratados con I2S intratecal tuvieron reducciones notables en la inmunotinción con LAMP-1. Esta reducción se caracterizó por el descenso en el número de células positivas para LAMP-1 y tinción más clara. La reducción se encontró a lo largo de todo el cerebro desde la corteza cerebral superficial, n úcleo caudado, tálamo, cerebelo, a la sustancia blanca (figura 56) en la dosis 2 y 3 de los animales tratados con I2S. El análisis morfométrico de la inmunotinción con LAMP-1 de varias regiones cerebrales confirmó que hubo reducciones significativas en la tinción positiva para LAMP-1 en todas las áreas cerebrales evaluadas (figura 56).

El examen por microscopía electrónica de las células cerebrales en ratones IKO tratados con vehículo reveló las vacuolas alargadas que contienen material de depósito granular amorf o e inclusiones con estructuras laminares y semejantes al cuerpo de cebra. Estos rasgos patológicos típicos de depósito lisosomal a nivel ultraestructural se redujeron en los ratones a los cuales se les inyectó I2S intratecal-lumbar (figura 57).

En el hígado, no hubo tinción positiva para I2S en los animales tratados con vehículo. En los ratones inyectados con I2S intratecal se encontró claramente una gran cantidad de I2S inyectado en las células sinusoidales (figura 58), lo cual indicaba que el I2S inyectado dentro del espacio intratecal circuló con el LCR y luego fue absorbido a través de las granulaciones aracnoides en el sistema circulatorio.

En los tejidos hepáticos de los ratones IKO tratados con vehículo, una vacuolización celular severa y una actividad lisosomal anormalmente alta demostrada por tinción con H&E y una fuerte inmunotinción para LAMP-1 se encontraron en comparación con los ratones WT. Se encontró una notable reducción de la vacuolización celular e inmunotinción con LAMP-1 en los hígados tras el tratamiento intratecal con I2S. La tinción con H&E reveló una vacuolización intracitoplasmática que desapareció casi por completo con una estructura celular hepática casi normal (figura 59).

En los ratones IKO, se administró I2S humana recombinante al cerebro por vía intratecal-lumbar y la I2S inyectada causó una amplia mejoría histopatológica en una variedad de regiones en el cerebro.

- Se detectó I2S inyectada en las células meníngeas y neuronas en el cerebro.
- Vacuolación celular reducida a lo largo del cerebro a nivel de microscopía óptica y electrónica.
- Reducción del marcador lisosomal LAMP-1 a lo largo del cerebro.
- La I2S inyectada intratecal entró a la circulación periférica y mejoró la morfología hepática y el marcador histológico.

EJEMPLO 7: TOXICOLOGÍA DE LA I2S ADMINISTRADA POR VÍA IT

Este ejemplo ilustra los signos clínicos asociados con la idursulfasa a través de dosis lumbares mensuales en bolus intratecal en monos Cynomolgus. Para conseguir esto, 14 Monos Cynomolgus machos fueron asignados al azar a cinco grupos de tratamiento como se muestra en la siguiente Tabla 21.

Tabla 21: Diseño experimental

	Grupo	Número de Animales	Dosis Nominal (mg)	Volumen de dosis (ml)
55	1	3	0	1
	2	3	3	1
	3	3	30	1
	4	3	150	1
	5	2	100	1

A los animales en todos los grupos se les dosificó tres veces a intervalos mensuales por vía IT a nivel de la columna lumbar. El volumen de dosis de 1 ml se enjuagó del catéter con 0,3 ml de PBS. Uno a dos días

5 antes de cada dosificación, se recolectaron aproximadamente 2 ml de LCR a partir de una punción lumbar IT a nivel de la cisterna magna. También se recolectaron muestras de sangre (2 ml) en este punto de tiempo. Se recolectó sangre (2 ml) y LCR (0,1 ml) de los animales del Grupo 5 predosis, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, y 48 horas post dosis luego de la primera dosis. Los signos clínicos se registraron al menos dos veces al día. Se realizó una autopsia aproximadamente 24 horas después de la tercera dosis y se extrajeron y guardaron los tejidos seleccionados.

10 El Día 1 los tres animales del Grupo 4 (150 mg) exhibían mínima tensión en las patas traseras a los 3-12 minutospost dosis, que duraba 5-15 minutos; este signo se consideró relacionado con el artículo en estudio. No hubo cambios en el peso corporal, consumo de comida y parámetros del examen neurológico/físico que se consideraran relacionados con el artículo en estudio.

15 Se presenta el análisis de las muestras de suero y LCR y los análisis de la solución de dosificación. Se observaron variaciones en la actividad de la idursulfasa endógena en los diferentes tejidos del Mono Cynomolgus; el cerebro y la médula espinal tuvieron una mayor actividad endógena que otros órganos periféricos examinados, incluyendo el hígado, corazón y riñón. La administración de idursulfasa se asoció con aumentos dependientes de la dosis en la actividad de la idursulfasa en varias regiones cerebrales, así como en el tronco encefálico y en la médula espinal. La administración IT no resultó en una diferencia observable en la distribución entre el hemisferio cerebral derecho e izquierdo. Hubo un claro aumento dependiente de la dosis en la actividad de la idursulfasa en los siguientes órganos: 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 una tinción de células meníngeas y limitada tinción de células gliales por debajo de las meninges; no se evidenció tinción neuronal en los animales del grupo de tratamiento con 3 mg. La tinción para idursulfasa fue positiva y dependiente de la dosis en la médula espinal, con la mayor intensidad de la tinción en la región lumbar, donde ocurrió la administración IT de idursulfasa. La intensidad de la tinción para idursulfasa en el hígado, riñón y corazón era dependiente de la dosis y consistente con una mayor actividad de idursulfasa en estos órganos.

30 En conclusión, la administración de idursulfasa por vía IT a dosis hasta 150 mg a intervalos mensuales no tuvo efectos adversos. Así, se interpretó que el nivel de no efecto adverso observado (NOAEL) era 150 mg, la mayor dosis evaluada en este estudio. La administración de idursulfasa se asoció con aumentos dependientes de la dosis en la actividad de la idursulfasa en el SNC y resultó en niveles sistémicos en el hígado, riñón y corazón.

35 El artículo en estudio, idursulfasa, se suplió en soluciones de dosis en NaCl 154 mM, 0,005% Polisorbato 20, pH 5,3 - 6,1. Las concentraciones nominales de las soluciones de dosificación suplidadas eran 0, 3, 30 o 150 mg/ml. El artículo en evaluación se almacenó en un congelador a -82° a -79°C. Se usó solución fisiológica tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2 como agente de enjuague luego que se administraban las dosis y luego de las recolecciones seriadas de LCR. La PBS se obtuvo de Gibco, Invitrogen Corporation.

40 Preparación de la dosificación del artículo en estudio

45 El primer día de la dosificación para cada intervalo de tiempo, se retiraba un vial de cada concentración del congelador horizontal a -80°C y se le permitía descongelarse en la encimera a temperatura ambiente. Una vez descongelados, los viales para los Grupos 1, 2 y 3 se etiquetaban, pesaban y se retiraba 1 ml a través de un filtro de 0,22 µm para cada animal programado para la dosificación. Luego que todas las dosis se administraron, los viales fueron pesados de nuevo y colocados en el refrigerador.

50 El siguiente día (día de la dosificación para el Animal 003, Grupo 4, y Grupo 5) se retiraban las soluciones de dosificación para los Grupos 1 y 4 del refrigerador y se colocaban en la encimera para alcanzar la temperatura ambiente. Una vez que se obtenía la temperatura ambiente los viales para los Grupos 1 y 4 se pesaban, el vial del Grupo 4 se etiquetaban y se extraía 1 ml a través del filtro para cada animal programado para la dosificación en los Grupos 1 y 4. Luego se preparaba la solución de dosificación para el Grupo 5 inyectando la cantidad apropiada de solución de dosificación del Grupo 4 y 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 2 dosis de 1 ml a través del filtro para los animales en el Grupo 5. Los viales para los Grupos 1 y 4 se pesaron de nuevo al completar la dosificación y todos los viales (Grupos 1-5) se colocaron en un congelador.

60 Catorce animales fueron asignados al azar a los grupos de tratamiento como se describe en la Tabla 21.

65 La vía IT de administración de la dosis se seleccionó porque ésta es una vía pretendida para la administración en humanos. Las dosis de idursulfasa que se seleccionaron para este estudio (3, 30, 100 y 150 mg/ml) se escogieron para evaluar la biodistribución de niveles de dosis variables de la enzima dentro del sistema nervioso central (central nervous system, SNC) del primate no humano luego de tres inyecciones

mensuales consecutivas de bolus IT lumbar.

Observaciones clínicas

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

10 El Día 1 los tres animales (012-014) del Grupo 4 (150 mg) exhibían mínima tensión en las patas traseras a los 3-12 minutos post dosis, que duraba 5-15 minutos. Este signo se consideró relacionado con el artículo en estudio y no se observó en ninguno de los grupos con dosis menor. No hubo otros signos clínicos inmediatamente después de la primera dosis o en los días inmediatamente posteriores a la administración del artículo en estudio. El otro signo observado para los animales del Grupo 4 fue un episodio de emesis para el animal 013 el Día 35.

15 20 25 La administración del artículo en estudio como un bolus intratecal mensual no asoció con ningún cambio adverso grande o microscópico cuando se consideraron los cambios inherentes con un equipo implantado de administración del fármaco. Todos los grupos, incluyendo el grupo control, tuvieron cambios microscópicos en las meninges indicando reacciones inflamatorias al sistema de administración del fármaco. En los animales que recibieron dosis del artículo en estudio de 30 mg y más, hubo una tendencia a que la reacción inflamatoria en las meninges tuviera un componente eosinofílico más pronunciado pero se consideró que esta diferencia no era biológicamente significativa.

30 Debido a que las diferencias entre los animales tratados con control y con el artículo en estudio eran tan leves, se interpretó que el nivel de no efecto adverso observado (NOAEL) era 150 mg, la mayor dosis evaluada evaluada en este estudio.

35 40 45 La reacción inflamatoria global en las meninges en todos los grupos (incluyendo los controles) era ligeramente más pronunciada que la generalmente encontrada en un estudio intratecal de esta duración en los monos. Sin embargo, se consideró que esto posiblemente se relacionó con alguna característica del vehículo o con el acto de dosificar 24 horas antes de la autopsia.

50 La tinción cerebral para idursulfasa fue positiva en todos los animales tratados excepto un animal en el grupo de 3 mg, encontrándose la mayor intensidad de la tinción en el grupo con 150 mg (Figuras 60, 61, 62 y 63). En el grupo con 3 mg, solo las células menígeas y unas pocas células gliales debajo de las meninges fueron positivas; no se detectó idursulfasa inyectada en las neuronas. En los grupos de dosis mayores (30, 100 y 150 mg), grandes poblaciones de neuronas cerebrales eran fuertemente positivas para la tinción con idursulfasa, junto con células menígeas, células gliales y células perivasculares. La inmunotinción para idursulfasa reveló una amplia distribución de idursulfasa inyectada en las neuronas cerebrales desde las neuronas dentro la capa I en la superficie cerca de las meninges, a las que están dentro de la capa VI más profunda adyacente a la sustancia blanca (Figuras 64, 65 y 66). También se observó una marcada tinción de las neuronas para el grupo con la dosis de 150 mg (figura 67). En todos los animales (grupo de dosis de 30 - 150 mg), no se encontraron diferencias notables en la tinción neuronal para idursulfasa entre las secciones frontal, media y posterior del cerebro.

55 La tinción para idursulfasa fue positiva en la médula espinal de todos los animales, con la mayor intensidad de la tinción en la región lumbar (Figuras 68 y 69). La inmunotinción para idursulfasa también era dependiente de la dosis. Las neuronas, células menígeas, células gliales, células perivasculares y epi/peri/endoneurio (células conectivas) que rodeaban a las fibras nerviosas fueron fuertemente positivas para la tinción para idursulfasa en el grupo con 150 mg (Figuras 70 y 71).

60 65 En el hígado, se encontró tinción positiva para idursulfasa en las células sinusoidales (células de Kupffer y células endoteliales) de todos los animales. Sin embargo, no se detectó idursulfasa en los hepatocitos del grupo de tratamiento con 3 mg (figura 72), mientras que se encontró tinción positiva para idursulfasa en los hepatocitos en los grupos con dosis mayores, con la mayor intensidad de la tinción en el grupo de tratamiento con 150 mg (Figuras 73, 74 y 75).

60 65 No se evidenció tinción positiva para idursulfasa en los animales del grupo de tratamiento con 3 mg (figura 76). Por el contrario, las células intersticiales estaban teñidas positivamente para idursulfasa en los grupos con 30, 100 y 150 mg observándose una tinción marcada en el grupo con 150 mg - en términos del número de células positivas e intensidad de la tinción (Figuras 77, 78 y 79).

Riñón

65 Poca o ninguna idursulfasa se detectó en los animales del grupo de dosis de 3 mg (figura 80). Sin

embargo, se encontró tinción positiva para idursulfasa en las células glomerulares y células intersticiales en los grupos con 30 y 100 mg (Figuras 81 y 82) En el grupo con 150 mg, la inmunotinción con idursulfasa reveló adicionalmente la tinción con idursulfasa de las células tubulares proximales, junto con una marcada tinción de las células glomerulares e intersticiales (figura 83).

5

DISCUSIÓN

No hubo signos clínicos o efectos relacionados con el artículo en estudio sobre el peso corporal, consumo de alimento, hallazgos al examen físico ni hallazgos al examen neurológico. El Día 1 los animales del Grupo 4 (150 mg) exhibían mínima tensión en las patas traseras a los 3-12 minutos post-dosificación, que duraba 5-15 minutos; se juzgó que este signo estaba relacionado con el artículo en estudio.

La administración de idursulfasa se asoció con aumentos dependientes de la dosis en la actividad de la idursulfasa en varias regiones cerebrales, así como en el tronco encefálico y médula espinal. El mayor nivel de intensidad de la tinción en la médula espinal fue en la región lumbar, donde ocurrió la administración IT de idursulfasa. La administración de idursulfasa por vía IT también resultó en la exposición sistémica con intensidad de la tinción dependiente de la dosis en el hígado, riñón y corazón. Los animales que recibieron dosis del artículo de ensayo de 30 mg y más tenían la tendencia a que la reacción inflamatoria en las meninges tuviera un componente eosinofílico más pronunciado.

20

La administración de idursulfasa por vía IT a dosis hasta 150 mg a intervalos mensuales no tuvo efectos adversos. Así, se interpretó que el nivel de no efecto adverso observado (NOAEL) era 150 mg, la mayor dosis evaluada en este ejemplo. La administración de idursulfasa se asoció con aumentos dependientes de la dosis en la actividad de la idursulfasa en el SNC y resultó en niveles sistémicos en el hígado, riñón y corazón.

25

EJEMPLO 8: PK (Suero y LCR) de I2S administrada por vía IT

Este ejemplo proporciona un análisis del suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) asociado con un estudio de toxicidad a 6 meses de idursulfasa administrada a través de inyecciones mensuales de bolus intratecal lumbar e inyecciones intravenosas semanales en bolus en Monos Cynomolgus para la concentración del artículo en estudio (Test Article, TA).

DISEÑO EXPERIMENTAL

El objetivo de t consistió en evaluar la administración por vía intratecal (IT) de dosis repetidas de idursulfasa (12s) a partir de una perspectiva de toxicología y farmacología de seguridad en un período de seis meses. El diseño del estudio se muestra en la Tabla 22.

Tabla 22: Diseño del estudio

Nº de Grupo	Nº. de animales	Dosis IV (mg/kg)	Nº. de dosis IV	Dosis IT (mg)	Nº. de dosis IT
1	6	DC (salina)	23	DC (PBS)	6
2	12	0 (Vehículo IV)	23	0 (Vehículo IT)	6
3	12	0,5	23	3	6
4	6	0,5	23	30	6
5	12	0,5	23	100	6
Control del dispositivo DC: Animales en el grupo 1 no dosificados con vehículo o el artículo en estudio					

Artículo en evaluación

Identificación: Dosificación IV de idursulfasa - Lote Nº FDC06-001 (2,0 mg/mL)
 Dosificación IT - idursulfasa (0 mg/mL)
 idursulfasa (3 mg1mL)
 idursulfasa (30 mg/ml)
 idursulfasa (100mg/ml)

Métodos de ensayo:

Los análisis se condujeron usando un ELISA [Ensayo de Inmunoabsorción Unido a Enzima (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)] para determinar la concentración de idursulfasa. El límite de detección (Limit Of Detection, LOD) = 1.25 ng/mL antes de multiplicar por el factor de dilución. Las muestras fueron

evaluadas a una dilución 1:50, por tanto la sensibilidad del ensayo es 62,5 ng/mL. Las muestras que caían más allá del extremo superior de la curva de calibración se diluían de nuevo y se reevaluaron a una dilución apropiada que resultaba en un valor dentro del rango de la curva. Las muestras seleccionadas se analizaron adicionalmente usando un ensayo de actividad enzimática. El LOD para este ensayo es 0,18 mU/mL a una dilución mínima de muestra de 1:150.

Los animales en los grupos 1 y 2 que fueron dosificados con solución fisiológica o vehículo, respectivamente, tenían niveles séricos de idursulfasa entre 138 ng/mL y <62,5 ng/mL (o <LOD) a lo largo del período de la dosificación IV e IT. De 200 muestras de LCR evaluadas de los animales del grupo 1 y 2, 62 demostraron niveles de I2S por encima del LOD del ensayo. De éstos, 7 valores eran altos (>1,000 ng/mL). Otra muestra de LCR recolectada antes de la dosis IT resultó por encima de 1,000 ng/mL de I2S. A continuación las muestras se evaluaron para su actividad de idursulfasa. En cada caso los resultados de la actividad indicaban la presencia de I2S y cuando se calculó la concentración aproximada de I2S según los niveles de actividad, los resultados estaban dentro del 20% de los obtenidos por el antígeno ELISA. (Véase Tabla 23) Las muestras adicionales de LCR escogidas al azar con resultados de antígeno ELISA <LOD también fueron evaluadas usando el ensayo de actividad enzimática para descartar cualquier actividad inespecífica.

Tabla 23: Resultados de investigación de muestras de LCR

Nº de animal	Grupo	Dosis	Nº de dosis	Modo de dosis	Punto de tiempo	Resultado ELISA (mg/mL)	Resultado de actividad (mU/mL)	ng/mL calculado basado en 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 h post	17045	62,1	15527	110%
006	1	Salina	6	IT	4 h post	16435	70,7	17682	93%
006	1	Salina	1	IT	Predosis	1320	5,3	1319	100%
0016	2	Vehículo	1	IT	2 h post	3070	11	2743	112%
017A	2	Vehículo	mo. 3	IV	4 h post	2236	8,8	2194	102%
046	5	100 mg/kg	3	IT	Predosis	2086	7	1750	119%

En este estudio, se analizó la concentración de idursulfasa en las muestras de suero y LCR. Las muestras de suero se recolectaron de acuerdo con el siguiente esquema:

Dosis IV: predosis y 2 horas post dosis 1 a 10, predosis y 4 horas post dosis 11 a 23, y en la Autopsia.

Dosis IT: predosis y 2 horas post dosis 1 a 2, predosis y 4 horas post dosis 3 a 6, y en la autopsia.

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

Dosis IV: predosis y 2 horas post dosis 1, y 4 horas post dosis 3 y 6.

Dosis IT: predosis y 2 horas post dosis 1 y 2, predosis y 4 horas post dosis 3 a 6, y en la autopsia.

Generalmente, la idursulfasa sérica parecía depurarse más rápidamente que la idursulfasa del LCR. Los niveles séricos de idursulfasa en los grupos 1 y 2 que fueron dosificados con solución fisiológica o vehículo, respectivamente, fueron menores o iguales a 138 ng/mL en todos los puntos de tiempo evaluados. Algunos animales tenían niveles por debajo del límite de detección (LOD) del ensayo.

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

Las muestras que dieron estos resultados fuera de tendencia fueron reevaluadas y confirmadas.

Además, en estas muestras se evaluó 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 en masa de idursulfasa (Tabla 23).

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

EJEMPLO 9. BIODISTRIBUCIÓN DE I2S ADMINISTRADA POR VÍA IT

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

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

Tabla 24

Grupo	n	Dosis IV (mg/kg) ^a	Dosis IT (mg) ^a	Último día de estudio (número 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

^aIdursulfasa a menos que se especifique otra cosa. DC (control de equipo); IT (intratecal); IV (intravenoso); NS (solución fisiológica normal); PBS (solución fisiológica tamponada con fosfato, pH 7,2).

La administración mensual repetida de I2S a los primates no humanos por seis meses fue bien tolerada a la mayor dosis evaluada y no se asoció con ningún evento toxicológico adverso significativo. Veinticuatro horas después de la administración de la sexta y última dosis de I2S, los primates no humanos fueron sacrificados y se examinaron los tejidos del SNC de estos primates no humanos.

Como se determinó por inmunohistoquímica (IHC), hubo una amplia deposición celular de I2S a lo largo de las células y tejidos del SNC. La proteína I2S se detectó en todos los tejidos del cerebro por IHC, con un gradiente de deposición desde la corteza cerebral a la sustancia blanca ventricular. En la sustancia gris se detectó I2S en las neuronas del cerebro, cerebelo, tronco encefálico y médula espinal de todos los grupos en una forma dependiente de la dosis. En la superficie de la sustancia gris de los grupos con dosis mayor, grandes números de neuronas cerebrales eran positivas para la tinción con I2S en la superficie de la corteza (figura 84A). La I2S también se detectó en las neuronas en el tálamo (figura 84B), hipocampo (figura 84C), núcleo caudado (figura 84D) y médula espinal (figura 84E). Las células meníngeas y perivasculares también fueron positivas para la tinción con I2S (figura 84F).

Como se muestra en la figura 85 y figura 86, la distribución de I2S administrado por vía IT en los tejidos del SNC y en particular la deposición en la sustancia gris, tálamo y corteza cerebral de los primates no humanos es evidente. Asimismo, la figura 86 y figura 87 ilustran que la I2S administrada por vía IT se acumula en los tejidos mostrados del SNC de los primates no humanos de forma dependiente de la dosis. La tinción por colocalización también reveló que la administración de I2S por vía IT se asocia con las neuronas y los oligodendrocitos. La I2S administrada por vía IT también se distribuye y localiza a lo largo del cerebro de los primates no humanos como lo evidencia la figura 88. En particular, las figuras 89A-D ilustran la captación neuronal y asociación axonal de la I2S tras la administración por vía IT a los primates no humanos, como lo demuestra la tinción de los filamentos. También es particularmente interesante que los estudios presentes ilustran que la I2S es selectiva para las células neuronales y tales células neuronales facilitan la distribución de la I2S administrada por vía intratecal en los tejidos profundos del cerebro y parece asociarse con las estructuras axonales, indicando un transporte axonal anterógrado de I2S.

La Tabla 25 a continuación presenta los datos farmacocinéticos de varias vías de administración

5 y dosis para un estudio separado en animal.

Tabla 25

	Dosis	AUClast	Peso corporal	Peso cerebral	Dosis	
	unidad	hr*ng/mL	kg	kg	mg/kg BW	mg/kg Br wt
10	0,5 mg/kg	8331	2,7	0,1	0,5	5
	1 mg, IT	1933	3,1	0,1	0,32	10
15	10 mg, IT	31316	2,7	0,1	3,66	100
	30 mg, IT	140345	2,9	0,1	10,34	300

20 Se administró ¹²⁴I-I2S a los animales del estudio como se muestra en la Tabla 26 a continuación y se muestran los resultados de las imágenes PET en la figura 106

Table 26

Grupo	Animales/ Grupo	Via	Art. en estudio	Dosis
1	1	ICV	[1241]-idursulfasa	3 mg
2	4	IT-L	[1241]-idursulfasa	3 mg
3	4	IV	[1241]-idursulfasa	0,1 mg/kg
4	4	IV	[1241]-idursulfasa	1 mg/kg

30 The Los presentes estudios también demostraron la identificación celular de la I2S administrada por vía IT en el tejido cerebral de la sustancia blanca cerca de los ventrículos de los primates no humanos tras la administración por vía IT. Aunque la densidad de tinción de la I2S en la sustancia blanca generalmente fue menor que la sustancia gris, se detectó I2S dentro de los oligodendrocitos (figura 90). En particular, la figura 90 ilustran la identificación celular de la I2S en los tejidos cerebrales de la sustancia blanca y demuestra que la I2S no parece asociarse con la mielina.

40 Además de demostrar la distribución de la I2S administrada por vía IT en los tejidos del cerebro, estos estudios también confirmaron la localización de la I2S en los organelos dianas, y la localización de la I2S en los lisosomas los cuales son los organelos afectados en las enfermedades por depósito lisosomal, como el síndrome de Hunter. En particular, la I2S se localizó dentro de los lisosomas y también se detectó dentro de los axones. La figura 90 ilustra la localización de la I2S administrada por vía IT De I2S dentro de los lisosomas de los oligodendrocitos del primate no humano, confirmando así que la I2S administrada por vía IT puede distribuirse en los tejidos profundos del cerebro y que hay localización celular.

45 Para discernir si la I2S administrada retenía actividad biológica, se midieron los niveles de I2S en el cerebro utilizando un ensayo de actividad específico. La actividad en el cerebro del grupo con tratamiento IT de 3 mg 24 horas después de la última dosis no era aparentemente diferente de los niveles basales en los animales con control de equipo y control de vehículo. La actividad enzimática en el cerebro de los animales dosificados con 30 mg y 100 mg por vía IT estaban por encima del basal en la autopsia (24 horas post-dosis).

55 Las pruebas en los animales para discernir la locación de la administración de I2S en el cerebro se muestra en la figura 104 y en la Tabla 27 a continuación.

Tabla 27: Locación de las muestras

Muestra Nº	Estructura	Segmento Nº	Muestra Nº	Estructura	Segmento Nº
5	1 Corteza cerebral-superficial (L)	4	14	Tálamo (L)	8
10	2 Corteza cerebral-superficial (R)	4	15	Tálamo (R)	8
15	3 Núcleo caudado (R)	6	16	Hipotálamo (L)	8
20	4 Núcleo caudado (L)	6	17	Hipotálamo (R)	8
25	5 Cuerpo calloso	6	18	Hipocampo (L)	8
30	6 Corteza cerebral (frontal)-superficial (L)	8	19	Hipocampo (R)	8
35	7 Corteza cerebral (frontal)-superficial (R)	8	20	Sustancia blanca (L)	10
	8 Sustancia blanca-superficial (L)	8	21	Sustancia blanca superficial (R)	10
	9 Sustancia blanca-superficial (R)	8	22	Cuerpo calloso	10
	10 Sustancia blanca- profunda (L)	8	23	Sustancia blanca- profunda (L)	12
	11 Sustancia blanca- profunda (R)	8	24	Sustancia blanca- profunda (R)	12
	12 Corteza cerebral (temporal)-superficial (L)	8	25	Cerebelo (R)	14
	13 Corteza cerebral (temporal)-superficial (R)	8			

EJEMPLO 10. BIODISTRIBUCIÓN DE ADMINISTRACIÓN POR VÍA IT EN PERROS BEAGLE

40 Los patrones de distribución de I2S observados en el ejemplo anterior también se recapitulan en perros Beagle sanos que recibieron una dosis por vía IT o ICV. Se aleatorizaron perros Beagle machos 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 subaracnoideo en la columna lumbar o en el ventrículo cerebral lateral izquierdo (para dosificación) y en la cisterna magna (para muestras). Todos los catéteres terminaban en un puerto de acceso subcutáneo de titanio. Se usó un perro adicional como control quirúrgico no dosificado.

50 Se administró una inyección de 1 ml de I2S (30 mg/ml en 20 mM fosfato de sodio, pH 6,0; 137 mM cloruro de sodio; polisorbato-20 0,02%), por vía IT o ICV, seguida por una purga de 0,3 ml con solución fisiológica tamponada con fosfato (PBS; pH 7,2). Se monitorizaron los signos clínicos y el sacrificio ocurrió 24 horas después de la dosis. Se recolectaron muestras de tejido cerebral y de médula espinal para análisis cuantitativos de I2S determinados por ELISA, actividad enzimática de I2S e IHC, y se compararon entre los grupos del estudio.

55 I2S La I2S se distribuyó ampliamente a través de la sustancia gris de los grupos IT e ICV como se determinó por IHC. En corteza cerebral, las neuronas eran positivas para I2S en las seis capas neuronales, desde la capa molecular superficial a la interna profunda en los grupos IT e ICV, como ilustra la figura 91 (imágenes a y c). En la corteza cerebelosa de los grupos IT e ICV se detectó I2S en las neuronas, incluyendo las células de Purkinje, como ilustra la figura 91 (imágenes c y d). En los grupos IT e ICV una gran población de neuronas en el hipocampo eran positivas para I2S, como lo demuestra La figura 91 (imágenes e y f). También se encontraron neuronas positivas para I2S en el tálamo y núcleo caudado en ambos grupos, como ilustra la figura 91 (imágenes g y h).

65 Los estudios por tanto confirman la capacidad de las enzimas de administradas por vía IT de distribuirse en las células profundas por depósito lisosomal, en un modelo murino IKO por ingeniería genética, confirmando la capacidad de las enzimas administradas por vía IT tales como la I2S de tratar las manifestaciones en el SNC

asociadas con las enfermedades por depósito lisosomal, como el síndrome de Hunter.

EJEMPLO 11. EFICACIA EN VIVO DE I2S ADMINISTRADA POR VÍA IT

5 *Modelo de ratón deficiente en iduronato-2-sulfatasa*

Habiendo demostrado que la I2S administrada por vía IT puede distribuirse en los tejidos profundos del cerebro y localización celular de I2S, se condujeron estudios adicionales para determinar la eficacia terapéutica de la I2S administrada por vía IT. Se desarrolló un modelo de ratón knock-out para iduronato-2-sulfatasa (IKO) de síndrome de Hunter para estudiar la capacidad de la I2S administrada por vía IT para alterar la progresión de la enfermedad. El modelo de ratón knock-out de I2S se desarrolló usando una disrupción dirigida del locus de la I2S lo cual resulta en una acumulación de glicosaminoglicanos (GAG) en los tejidos y órganos. El modelo murino IKO exhibe muchas de las características físicas del síndrome de Hunter vistas en los humanos, incluyendo los rasgos toscos característicos y defectos esqueléticos. Además, el modelo murino IKO demuestra niveles elevados de glicosaminoglicanos (GAG) en orina y en los tejidos a lo largo del cuerpo, así como una vacuolización celular generalizada lo cual se observó histopatológicamente.

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

Luego de la tercera inyección hubo una amplia reducción de la vacuolación celular en la superficie cerebral corteza, núcleo caudado, tálamo y el cerebelo en los ratones tratados con I2S comparados con los ratones tratados con vehículo. También se encontraron reducciones en la vacuolación celular en la sustancia blanca tras el tratamiento por vía intratecal. La distribución de la I2S en los tejidos cerebrales del ratón IKO era evidente tras la administración por vía IT.

Tres administraciones semanales por vía IT de I2S en los ratones IKO también demostraron una marcada reducción en el SNC celular vacuolación a nivel de microscopía óptica y electrónica. Tras la administración de I2S por vía IT, se evidenció una reducción de la vacuolación celular en relación con los ratones IKO no tratados, sugiriendo que la I2S administrada por vía IT puede alterar la progresión de la enfermedad. Como ilustra la figura 92, se evidencia una reducción de la vacuolación celular en el cuerpo calloso y fórrix de los ratones IKO tras la administración de I2S por vía IT.

Adicionalmente, la microscopía electrónica demostró una reducción en la presencia de inclusiones de depósito en las neuronas en la sustancia gris y vacuolación en los oligodendrocitos en la sustancia gris. En particular, los ratones IKO a los cuales se les administró I2S por vía IT también mostraron una reducción en los cuerpos laminares en empalizada («cuerpos de cebra») los cuales son característicos de ciertas enfermedades por depósito lisosomal. En particular, la figura 57 representa una imagen por microscopio electrónico que ilustra una reducción de los característicos cuerpos de cebra en las neuronas del ratón IKO al cual se le administró I2S, en relación con el Ratón IKO no tratado. Similarmente, la figura 57 ilustra una imagen por microscopio electrónico de oligodendrocitos en el cuerpo calloso.

Además, las administraciones por vía IT de I2S en los ratones IKO también demostraron una marcada reducción en el lisosomal inmunotinción por el biomarcador patológico de la enfermedad proteína-1 de membrana lisosomal asociada (LAMP1), un indicador de actividad lisosomal y estado de la enfermedad, en la corteza cerebral superficial, núcleo caudado, tálamo, cerebelo y sustancia blanca. Como ilustra la figura 93A, se evidenció una reducción notable en la inmunotinción de LAMP1 en el tejido de la superficie externa de la corteza cerebral en relación con el tejido de la superficie de la corteza cerebral del ratón IKO control no tratado ilustrado en la figura 93B, reflejando una mejoría en la patología de la enfermedad.

La figura 56 ilustra cuantitativamente y compara la concentración de LAMP1 medida en áreas de µm² de tejido cerebral. El análisis morfométrico de la inmunotinción con LAMP-1 de varias regiones cerebrales confirmó que hubo reducciones significativas en la tinción positiva para LAMP-1 en todas las áreas cerebrales evaluadas. Como muestra la figura 56, en cada área de tejido cerebral evaluado (la corteza, núcleo caudado y putamen (CP), tálamo (TH), cerebelo (CBL) y sustancia blanca (WM)) el área positiva para LAMP se redujo en los ratones IKO tratados en relación con los ratones IKO control no tratados, y se acercaba al área positiva para LAMP de los ratones salvajes. Particularmente notable es que las áreas positivas para LAMP en cada área de tejido cerebral analizado se redujeron con la duración del tratamiento continuo.

5 La reducción de la actividad lisosomal anormalmente alta se correlacionó con las dramáticas mejorías morfológicas en todas las áreas del cerebro. Estos resultados confirman que la I2S administrada por vía OT puede alterar la progresión de las enfermedades por depósito lisosomal, en un modelo murino IKO por ingeniería genética, confirmando la capacidad de las enzimas administradas por vía IT tales como la I2S de tratar las manifestaciones en el SNC asociadas con las enfermedades por depósito lisosomal, como el síndrome de Hunter

EJEMPLO 12 - TRATAMIENTO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE HUNTER

10 [0380] La administración directa al SNC a través, p.ej., de la vía IT puede usarse para tratar efectivamente los pacientes con enfermedad de Hunter. Este ejemplo ilustra un estudio multicéntrico de escalamiento de dosis diseñado para evaluar la seguridad de hasta 3 niveles de dosis una semana sí una semana no (every other week, EOW) por un total de 40 semanas de I2S administrada a través de un equipo de administración intratecal (IDDD) a pacientes con enfermedad de Hunter infantil tardía. Varios equipos de administración intratecal de medicamentos idóneos para tratamiento en humanos se ilustran en las figuras 89-92.

15 Se reclutarán hasta 20 pacientes:

20 Cohorte 1: 5 pacientes (Dosis mínima)

25 Cohorte 2: 5 pacientes (dosis intermedia)

Cohorte 3: 5 pacientes (dosis máxima)

30 5 pacientes serán asignados al azar a ningún tratamiento.

35 Los pacientes son seleccionados para el estudio según los siguientes criterios de inclusión: (1) aparición de los primeros síntomas antes de los 30 meses de edad; (2) caminar al momento de la evaluación (definido como la capacidad de pararse solo y caminar hacia delante 10 pasos tomado de una mano); (3) presencia de signos neurológicos al momento de la evaluación. Los pacientes con historia de trasplante de células madres hematopoyéticas son excluidos.

40 Se determina la seguridad de las dosis ascendentes de I2S administrada por inyección IT por 40 semanas en niños con enfermedad de Hunter Infantil tardía. Además, se evalúa la actividad clínica de la I2S sobre la función motora gruesa y la farmacocinética con dosis única y repetida en el suero y las concentraciones en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

Administración por vía IT de proteína rhASA

EJEMPLO 13: ESTUDIO TOXICOLÓGICO DE ASA RECOMBINANTE ADMINISTRADA POR VÍA IT

45 Para evaluar la capacidad de otras enzimas recombinantes administradas por vía intratecal de distribuirse en las células y tejidos del SNC, se condujo un estudio GLP para evaluar la administración por vía intratecal a dosis repetidas de arilsulfatasa A humana recombinante (rhASA) desde una perspectiva toxicológica y de farmacología de seguridad en un período de un mes en Monos Cynomolgus jóvenes (menos de 12 meses de edad). La formulación de rhASA se preparó y formuló en un vehículo de 154 mM NaCl, polisorbato 20 0,005% a un pH de 6,0.

50 Para conseguir esto, nueve Monos Cynomolgus machos y nueve Monos Cynomolgus hembras fueron asignados al azar según el peso corporal a uno de tres grupos de tratamiento como se muestra en la siguiente Tabla 28. Los animales (con la excepción de un animal macho para la Dosis 1) recibieron 0,6 mL de infusión a corto plazo por vía IT de 0, 3 o 31 mg/mL de rhASA (dosis total de 0, 1,8 o 18,6 mg) una semana sí una semana no por un total de tres dosis por animal. Se monitorizó el peso corporal, las observaciones clínicas, los exámenes neurológicos y físicos la patología clínica, los exámenes oftalmológicos y las muestras toxicocinéticas. Los animales fueron autopsiados el Día 29, 30 o 31 (~24 horas después de la última dosis IT). Los tejidos seleccionados fueron extraídos, guardados y examinados microscópicamente.

Tabla 28

60	Grupo	Número de Animales	Concentración de Dosis Nominal (mg/mL)	Volumen de Dosis (mL)	Dosis administrada (mg)
	1	3M, 3F	0	0,6	0
65	2	3M, 3F	3	0,6	1,8
	3	3M, 3F	31	0,6	18,6

5 Las concentraciones de rhASA detectadas en los tejidos del SNC de los Monos Cynomolgus fueron analizadas por ELISA y comparadas con un diana terapéutico de 10% de las concentraciones humanas normales de rhASA, correspondientes a aproximadamente 2,5 ng/mg de tejido. Se extrajeron muestras de tejido de diferentes áreas de los cerebros de los Monos Cynomolgus y luego se analizó la presencia de rhASA. La figura 133 - figura 138 ilustra los tejidos a partir de los cuales se extrajeron las muestras. Las muestras de tejido reflejaron un aumento en las concentraciones de rhASA, como se refleja en la figura 139A-G, con un gradiente de deposición desde la corteza cerebral a la sustancia blanca profunda y sustancia gris profunda.

10 15 Las concentraciones de rhASA detectadas usando la misma muestra de las vías IT e ICV de administración paraseis monos que recibieron la dosis de 18,6 mg de rhASA se ilustran en la figura 140A-B. Las concentraciones de rhASA detectadas en los tejidos cerebrales de la sustancia blanca profunda (figura 140A) y en la sustancia gris profunda (figura 140B) de Monos Cynomolgus adultos y jóvenes que recibieron rhASA por vía intratecal (IT) o intracerebroventricular (ICV) eran comparables.

20 25 Las muestras de tejido extraídas de los cerebros de los Monos Cynomolgus adultos y jóvenes fueron luego analizadas para determinar la concentración de rhASA depositada en la muestra de tejido extraída, y comparar tales concentraciones con la concentración terapéutica diana de 2,5 ng rhASA por mg de proteína (correspondiente a 10% de la concentración normal de rhASA en un sujeto sano). Como ilustra la figura 141A, en cada muestra de tejido analizada la dosis de 18,6 mg de rhASA administrada por vía IT resultó en una concentración de rhASA la cual excedía la concentración terapéutica diana de 2,5 ng/mg de proteína. Similarmente, cuando se administraba una dosis de 1,8 mg de rhASA por vía IT a Monos Cynomolgus jóvenes cada muestra de tejido analizada demostraba una concentración de rhASA dentro o excediendo la concentración terapéutica de 2,5 ng/mg de proteína y la mediana de las concentraciones de rhASA estaban por encima del diana terapéutico para todas las muestras de tejido evaluadas (figura 141B).

30 35 Para determinar si la rhASA administrada por vía IT se estaba distribuyendo a las células relevantes, se analizó el tejido de la sustancia blanca profunda de un Mono Cynomolgus que recibió por vía IT 1,8 mg de rhASA, a partir del área ilustrada en la figura 142A. La inmunotinción del tejido de la sustancia blanca profunda reveló la distribución de rhASA en el Mono Cynomolgus en las células oligodendrocíticas, como ilustra la figura 142B. Similarmente, la figura 142C ilustra que la rhASA administrada por vía IT demostraba colocalización en los tejidos de la sustancia blanca profunda del Mono Cynomolgus. En particular, bajo colocalización de tinción en los organelos dianas, como el lisosoma, es evidente (figura 142C), apoyando la conclusión de que la rhASA administrada por vía IT puede distribuirse a las células, tejidos y organelos relevantes del SNC, incluyendo los lisosomas de los oligodendrocitos.

EJEMPLO 14. ADMINISTRACIÓN POR VÍA ICV-VS.IT

40 Se preparó rhASA marcada con el emisor de positrones ¹²⁴I en un vehículo de 154 mM NaCl, polisorbato 20 0,005% a un pH de 6,0. Se administró un volumen de la formulación equivalente a 3 mg de rhASA (correspondiente a aproximadamente 3,8 mg/kg de cerebro) a Monos Cynomolgus adultos a través de las vías intracerebroventricular (ICV) e intratecal (IT) de administración. Los Monos Cynomolgus fueron sometido a estudios imágicos de PET de alta resolución (microPET P4) Para determinar la distribución del ¹²⁴I-rhASA.

45 50 Los datos de imágenes PET (figura 143) ilustran que el ¹²⁴I-rhASA administrado por vía ICV e IT efectivamente se distribuyó a los tejidos del SNC, y en particular la ¹²⁴I-rhASA administrada a través del catéter IT-lumbar se dispersó inmediata y uniformemente en el LCR por todo lo largo de la columna. En particular, como se muestra en la figura 143, tras la administración por vía ICV e IT, se detectaron concentraciones terapéuticas de ¹²⁴I-rhASA en los tejidos del LCR del Mono Cynomolgus, incluyendo el cerebro, médula espinal y LCR. Las concentraciones de rhASA detectada en tales tejidos del SNC, y en particular en los tejidos del cerebro excedían la concentración terapéutica de 2,5 ng/mg de proteína.

55 Aunque la distribución de proteína de rhASA era comparable para las vías IT e ICV de administración, la ICV resultó en una deposición menos notable dentro de la médula espinal, como se evidencia en la figura 143.

Veinticuatro horas después de la administración de la formulación, el ¹²⁴I-rhASA administrado por vía ICV e IT se distribuyó efectivamente a los tejidos del SNC. En particular, veinticuatro horas después de la administración por vía IT 12,4% de la dosis administrada estaba en la región craneal, comparado con 16,7% de la dosis administrada por vía ICV. Por consiguiente, las concentraciones de rhASA detectada en tales tejidos del SNC, y en particular en los tejidos del cerebro, cuando la rhASA se administró por vía IT se aproximan a las concentraciones detectadas tras la administración por vía ICV de la misma dosis.

60 65 La inyección por vía ICV de ¹²⁴I-rhASA en la transferencia inmediata del volumen injectado a la cisterna magna, cisterna pontis, cisterna interpeduncularis y columna proximal, como ilustra la figura 144. Como también ilustra la figura 144, a las 2-5 h la administración por vía IT hizo llegar la ¹²⁴I-rhASA a los mismos

compartimientos iniciales (cisternas y columna proximal) que los demostrados para la administración por vía ICV. Veinticuatro horas después de la administración por vía ICV e IT la distribución de la ^{124}I -rhASA era comparable en el área cisternal y columna proximal como ilustra la figura 145.

5 Estos resultados confirman que la rhASA puede administrarse a un sujeto usando la vía de administración IT menos invasiva y así alcanzar concentraciones terapéuticas en las células y tejidos dianas.

10 Las enfermedades por depósito lisosomal representan una familia de trastornos genéticos causados por enzimas perdidas o defectuosas que resultan en acumulación anormal del sustrato. Aunque los síntomas periféricos asociados con varias de estas enfermedades pueden mitigarse efectivamente con la administración intravenosa de enzimas recombinantes, no se espera que la administración intravenosa de tales enzimas recombinantes impacte significativamente en las manifestaciones en el SNC asociadas con una mayoría de la enfermedad por depósito lisosomal. Por ejemplo, la iduronato-2-sulfatasa (Idursulfasa, Elaprase®; Shire Human Genetic Therapies, Inc. Lexington, MA) está aprobada para el tratamiento de los síntomas somáticos del sindrome de Hunter pero no hay terapia farmacológica para el tratamiento de las manifestaciones neurológicas del sindrome de Hunter, las cuales pueden incluir el retardo del desarrollo y la alteración mental progresiva. Esto se debe en parte a la naturaleza de la I2S, la cual es una gran enzima altamente glicosilada con un peso molecular de aproximadamente 76 kD y que no atraviesa la barrera hematoencefálica tras la administración intravenosa.

20 Los inventores por tanto han llevado a cabo un programa para investigar la administración intratecal (IT) de las formulaciones de enzimas humanas recombinantes, como por ejemplo, la iduronato-2-sulfatasa (I2S), arilsulfatasa A (rhASA) y α -N-acetilglucosaminidasa (Naglu). Los resultados presentados aquí representan los primeros que demuestran que la administración por vía IT-lumbar de una proteína lisosomal recombinante resulta en la administración de una fracción significativa de la proteína administrada al cerebro y en particular resulta en la deposición amplia de tales proteínas en las neuronas del cerebro y médula espinal en los Monos Cynomolgus y perros. Los análisis inmunohistoquímicos de los tejidos del SNC demostraron que la proteína se dirige al lisosoma, el sitio de la acumulación en las enfermedades por depósito lisosomal. Asimismo, las mejoras morfológicas demostradas en el modelo murino IKO del sindrome de Hunter, el modelo murino deficiente en Naglu del sindrome de Sanfilippo tipo B y el modelo murino knock-out ASA de leucodistrofia metacromática (MLD) refuerza la observación que la enzima administrada por vía IT se distribuye a los tejidos apropiados y es transportada a los compartimientos celulares y organelos apropiados.

35 [¶]Las similitudes observadas en los patrones de distribución cerebral detectados tras la administración por vía IT-lumbar e ICV de la I2S sugieren un flujo masivo y remezcla activa del LCR. Así en una situación clínica, las vías IT e ICV de administración sin potencialmente factibles, sin embargo, la deposición observada de I2S en la médula espinal tras la administración IT proporciona una clara ventaja abordando las secuelas medulares y los componentes de las enfermedades por depósito lisosomal como El Sindrome de Hunter. Asimismo, los puertos de inyección medular son menos invasivos y se esperan que sean más idóneos para el uso crónico, especialmente en los pacientes pediátricos.

45 La evidencia de la tinción de células perivasculares y la dinámica de la traslocación de proteínas observada por los estudios de imágenes con PET indican que la enzima se mueve dentro del espacio perivascular presumiblemente por mecanismos convectivos asistidos por pulsación. Un mecanismo adicional de transporte es sugerido por la asociación observada de la I2S con los neurofilamentos, indicativa de transporte axonal activo. Esto último presumiblemente comienza con la interacción de la proteína con receptores neuronales de manosa-6-fosfato (M6P), los cuales se expresan en las células de la médula espinal y cerebro y bajo administración directa al parénquima cerebral pueden usar que la enzima I2S sea absorbida por las células diana. (Begley, et al., Curr Phann Des (2008) 14: 1566-1580).

50 Mientras que el transporte axonal de las enzimas lisosomales ha sido implicado previamente por métodos indirectos *in vivo* y por imágenes *in vitro*, los estudios actuales proporcionan la primera evidencia directa de transporte axonal de enzimas no virales o expresadas administradas a través del LCR. Así, la administración de proteínas desde el LCR a la superficie del cerebro y profundamente a los tejidos cerebrales parece depender de procesos de transferencia activa, ninguno de los cuales han sido previamente descrito o aclarado para la administración de proteínas o enzimas a las células, tejidos y organelos del cerebro.

60 Contrario al punto de vista prevaleciente que la dinámica de flujo del parénquima, intersticio y LCR prevendría la distribución de las proteínas administradas por vía IT-lumbar a la sustancia blanca del cerebro, estos estudios claramente demuestran que la administración por vía IT de una enzima lisosomal resulta en la distribución y acumulación de la proteína en todos los tejidos cerebrales y la deposición en el compartimiento lisosomal de las células diana las cuales son el sitio de la acumulación patológica del glicosaminoglicano. (Ver, p.ej., Fenstennacher et al., Ann N Y Acad Sci (1988) 531:29-39 y Dicroico et al., Neurology (1976) 26:1-8.) Junto con la naturaleza menos invasiva de la administración por vía IT-lumbar, esta vía ofrece un medio clínicamente relevante de administrar terapéuticos biológicos al cerebro, particularmente en los niños.

EJEMPLO 15 - TOXICOLOGÍA

Este ejemplo ilustra la administración por vía intratecal (IT) de dosis repetidas de rhASA desde una perspectiva de toxicología y de farmacología en un período de seis meses. El artículo por vía IT para este estudio fue rhASA. Treinta y seis Monos Cynomolgus machos y 36 hembras fueron asignados al azar a cinco grupos de tratamiento. Los animales en el Grupo 1 eran controles del implante no tratados (puerto y catéter) y no se les dosificó el vehículo o el artículo en estudio; sin embargo, a estos animales se les dosificó con 0,6 mL de PBS en esquema apareable con el esquema de dosificación del artículo en estudio. Los animales en los Grupos 2-5 recibieron 0,6 mL de infusión por vía IT de 0, 3, 10 o 31 mg/mL de rhASA (dosis total de 0, 1,8, 6,0 o 18,6 mg) una semana sí una semana no (es decir, un total de 12 dosis). Los animales fueron autopsiados a los 6 meses (24 horas después de la última dosis IT), y los 4 animales/sexo/grupo restantes fueron autopsiados al final de un período de recuperación de 4 semanas. Los tejidos seleccionados fueron extraídos, guardados y examinados microscópicamente.

En general, los cambios relacionados con el artículo en estudio podían categorizarse en dos tipos mayores y estaban presentes en todos los niveles de dosis (1,8, 6,0 y 18,6 mg/dosis). Aumento de infiltrados (de leucocitos, usualmente con un componente eosinofílico prominente) en las meninges, el parénquima cerebral, el parénquima de la médula espinal, ganglio trigémino y ocasionalmente las raíces/ganglios de los nervios espinales (o el epineurio que rodea esas estructuras). Se interpretó que este aumento se debía a la presencia del artículo en estudio (una proteína) en el espacio intratecal y en los tejidos del sistema nervioso. Ligero aumento focal de células microgliales en la médula espinal y cerebro en animales ocasionales (no se observó microgliosis en ninguno de los animales a dosis altas). Se interpretó que ambas categorías de cambios morfológicos eran una respuesta a la presencia del artículo en estudio. No hubo evidencia de necrosis neuronal en ningún animal. Ninguno de los cambios relacionados con el artículo en estudio se relacionó con reacciones biológicamente adversas en el cerebro, médula espinal, raíces o ganglios de los nervios espinales. Específicamente, no hubo evidencia de necrosis neuronal o una respuesta glial biológicamente importante. No hubo lesiones relacionadas con el artículo en estudio en los tejidos que no eran del sistema nervioso.

Después de un período de recuperación de un mes (un período libre de dosificación), los cambios relacionados con el artículo en estudio se habían resuelto por completo o se limitaban a remanentes del aumento previo en la respuesta inflamatoria asociada con la presencia del artículo en evaluación. No hubo efectos morfológicos adversos en los animales en recuperación. Como se basó en un microscópico a ciegas el examen asignando una puntuación semicuantitativa a la tinción, la tinción inmunohistoquímica para la Arilsulfatasa A (rhASA; el artículo en estudio) era elevada en el cerebro y médula espinal en varios tipos celulares, excepto las neuronas, para todos los grupos tratados con el artículo en estudio en el sacrificio terminal. Este aumento también era aparente en las células de Kupffer del hígado. Luego del período de recuperación de un mes la tinción con rhASA en los animales tratados con el artículo en estudio (todos los grupos de dosis) habían returned a los niveles control (equipo y/o vehículo control). En un macho en recuperación a dosis baja, hubo múltiples focos de astrocitosis y pérdida neuronal, indicando múltiples áreas de isquemia previa, en la corteza cerebral. Aunque la patogénesis exacta de estas lesiones en este animal no era clara, la falta de lesiones similares en otros animales tratados con el artículo en estudio, incluyendo los animales a dosis altas que recibieron 10X la dosis, indicaba que estas lesiones no se relacionaban con el artículo en estudio.

El artículo en estudio por vía IT para este estudio fue rhASA. Treinta y seis Monos Cynomolgus machos y 36 hembras fueron asignados al azar a cinco grupos de tratamiento. Los animales en el Grupo 1 eran controles del implante no tratados (puerto y catéter) y no se les dosificó el vehículo o el artículo en estudio; sin embargo, a estos animales se les dosificó con 0,6 mL de PBS en un esquema apareable con el esquema de dosificación del artículo en estudio. Los animales en los Grupos 2-5 recibieron 0,6 mL de infusión IT de 0, 3, 10 o 31 mg/mL de rhASA (dosis total de 0, 1,8, 6,0 o 18,6 mg) una semana sí una semana no (es decir, un total de 12 dosis). Los animales fueron autopsiados a los 6 meses (24 horas después de la última dosis IT), y los 4 animales/sexo/grupo restantes fueron autopsiados al final de un período de recuperación de 4 semanas. Los tejidos seleccionados fueron extraídos, guardados y examinados microscópicamente. La tabla a continuación refleja el diseño del estudio en lo pertinente al aspecto patológico de este estudio.

Al momento del sacrificio, el cerebro se cortó en una matriz cerebral aproximadamente a 3mm de grosor de lámina coronal. La primera lámina y cada segunda lámina luego de eso se fijaron en formalina para la evaluación histopatológica y análisis inmunohistoquímico. El cerero se procesó como secciones coronales completas. Estas secciones incluyeron como mínimo las siguientes secciones cerebrales.

- Neocorteza (incluyendo corteza frontal, parietal, temporal y occipital): secciones cerebrales 1 a 8 (y lámina 9 cuando estaba presente)
- Paleocorteza (bulbos olfatorios y/o lóbulo piriforme): secciones cerebrales 1 a 3
- Ganglios basales (incluyendo caudado y putamen): secciones cerebrales 3 y 4

- Sistema límbico (incluyendo hipocampo y giro cingulado): secciones cerebrales 4 y 5
- Tálamo/hipotálamo y regiones del mesencéfalo incluyendo la sustancia nigra: secciones cerebrales 4 y 5
- Cerebelo, puente y médula oblonga: secciones cerebrales 6 a 8 (y lámina 9 cuando estaba presente).

5 Las secciones cerebrales se enumeran en las tablas de datos como secciones 1 a 8/9 (una sección 9 fue proporcionada por la instalación en estudio para algunos animales). El seccionamiento varió ligeramente entre los animales. Las secciones cerebrales (1 a 8/9) proporcionadas antes eran la locación aproximada de las varias áreas anatómicas. Las secciones cerebrales se enumeran en las tablas de datos como secciones individuales con diagnósticos pertinentes a esa sección, para facilitar la revisión adicional futura potencial de la lámina (si la hay). Durante la interpretación de los datos, se compararon los sitios anatómicos cerebrales (como se enumeran antes) para identificar algún efecto único del artículo en estudio (es decir, único en una región cerebral particular). En TPS, todas las secciones de los animales se incluyeron en parafina se hicieron secciones de 5 micrones, se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se examinaron microscópicamente. Además, los cerebros de los animales de control y con dosis altas se tiñeron con Fluoro-Jade B (una tinción que aumentaba la sensibilidad de evaluar la degeneración neuronal del cerebro) y con tinción de plata de Bielschowsky (un procedimiento que permite la visualización directa de axones, dendritas y filamentos neuronales) y se examinaron.

20 La médula espinal (cervical, torácica y lumbar) se cortó en secciones de un centímetro. La primera lámina y una lámina sí una lámina no, se fijaron en formalina para la evaluación histopatológica y análisis inmunohistoquímico. Las secciones de médula espinal (cervical, torácica (incluyendo la punta del catéter) y lumbar) de todos los animales se cortaron aproximadamente a 5 micrones, se tiñeron con H&E y se examinaron con secciones trasversas y oblicuas tomadas en cada nivel. Secciones seriadas de la médula espinal de los grupos control y con dosis altas se tiñeron adicionalmente con tinción de plata de Bielschowsky y anti-GFAP (una tinción inmunohistoquímica que permite la visualización directa de los astrocitos y sus procesos).

25 Las raíces y el ganglio del nervio espinal dorsal (tomados en la mitad cervical, torácica y lumbar) se incluyeron en parafina, tiñiendo las secciones seriadas con H&E. Además, las secciones seriadas de los grupos control y con dosis altas se tiñeron adicionalmente con tinción de plata de Bielschowsky.

30 Para las secciones del nervio ciático, tibial y sural de todos los animales: Una sección longitudinal de cada nervio se incluyó en parafina, se cortó en secciones de aproximadamente 5 micrones y se tiñó con H&E. Una sección trasversal de cada nervio se fijó en osmio, se incluyó en resina de Spurr, se cortó en secciones de aproximadamente 1 a 2 micrones y se tiñó con azul de toluidina. La fijación en osmio y la inclusión en resina proporciona una preservación superior de la mielina en los nervios periféricos y así un examen más detallado del nervio.

40 Todos los tejidos recolectados y las lesiones macroscópicas recolectadas en la autopsia de todos los animales también se incluyeron en parafina, se tiñeron con H&E y fueron examinados microscópicamente. El procesamiento histopatológico y las evaluaciones y análisis inmunohistoquímicos fueron realizados por TPS.

Métodos: Tinción para arilsulfatasa A (rhASA)

45 Las láminas de control positivo fueron suplidadas por el patrocinador del estudio. Las láminas eran secciones de hígado de los ratones a los que se les injectó con rhASA. Las láminas de control positivo mostraron amplia evidencia de rhASA en las células de Kuppfer (macrófagos sinusoidales) en el hígado. Las láminas de control positivo se guardan con las otras láminas de este estudio. Todas las evaluaciones de las secciones teñidas para rhASA se condujeron inicialmente a ciegas para el grupo de tratamiento del animal. Esto se realizó haciendo que el patólogo leyera inicialmente las láminas teñidas para rhASA con el número del animal sobre la etiqueta oculta (por un asistente con conocimiento del animal real que se estaba evaluando), dictando la puntuación (grado de severidad) durante la evaluación, y haciendo que el mismo asistente registrara inmediatamente la puntuación de tinción (grado de severidad) en las tablas de datos. La ID del animal era luego verificada por el neuropatólogo del estudio y el asistente para garantizar una entrada precisa de los datos. Este procedimiento se condujo para no introducir sesgo en el juicio de la intensidad global de tinción con la tinción inmunohistoquímica para la detección de la rhASA intracelular. El grado relativo de la tinción de las neuronas, macrófagos meníngeos, macrófagos perivasculares y células gliales (astrocitos y células microgliales pero probablemente células microgliales de forma predominante) se calificó en todas las secciones de cerebro y médula espinal. Las puntuaciones promedio de severidad a cada nivel cerebral y de médula espinal para cada grupo se totalizaron (por grupo) y se registraron como un total bajo el encabezado de tejido cerebro, general, tinción para rhASA y médula espinal general, tinción para rhASA.

55 En general, la tinción para rhASA en las neuronas del cerebro era una medida de las neuronas en la corteza cerebral y otras áreas nucleares en el cerebro. La tinción para rhASA en los macrófagos meníngeos era evidencia de captación del artículo en evaluación por los macrófagos meníngeos y/o rhASA endógena en los macrófagos meníngeos. La tinción para rhASA de los macrófagos perivasculares era una medida de la captación

5 de rhASA por los macrófagos en el cerebro/médula espinal (o rhASA endógena), aunque debe notarse que el espacio perivasculares en el cerebro y médula espinal (el espacio Virchow-Robins) es continuo con las meninges. En general, la calificación de la tinción para rhASA en las células gliales era predominantemente una medida de captación del artículo en evaluación/penetración del artículo en evaluación en la sustancia gris y/o blanca, especialmente de la corteza cerebral (la corona radiada es la sustancia blanca debajo de la corteza cerebral). La tinción para rhASA en la sustancia blanca parecía estar en los astrocitos y células microgliales.

10 El siguiente esquema de calificación se usó para calificar el grado de tinción para rhASA en los tipos celulares (neuronas, células gliales, macrófagos).

10 **Explicación del grado (% de las posibles células teñidas)**

- 1 Menos de 10%
- 2 Mayor de 10 a 25%
- 3 Mayor de 25 a 50%
- 4 Mayor de 50 a 75%
- 5 Mayor de 75%

20 Nótese que este esquema no es estrictamente cuantitativo. Se usó como un método semicuantitativo eficiente para evaluar en el cerebro y la médula espinal el grado de tinción para rhASA. El Neuropatólogo del Estudio notó que no todas las áreas neuronales tenían una tinción igual para rhASA. También se notó que hubo tinción neuronal endógena en algunos animales de control y que las células del plexo coroideo y neuronas de los ganglios de la raíz dorsal tendían a teñirse fuertemente para rhASA incluso en los animales control. La tinción del plexo coroideo y ganglios de la raíz dorsal no fue calificada pero fue notada por el neuropatólogo del estudio 25 como prominente, incluso en los animales control.

30 Nota: Todos los grupos de dosis: Dosis baja = 1,8 mg/dosis; Dosis leve = 6,0 mg/dosis; Dosis alta = 18,6 mg/dosis. No hubo lesiones relacionadas con el artículo en estudio en los tejidos que no eran del sistema nervioso excepto por una elevada tinción para rhASA en el hígado de todos los grupos de dosis (machos y hembras; véase a continuación).

ANIMALES DE SACRIFICIO TERMINAL (6 MESES DE DOSIFICACIÓN UNA SEMANA SÍ UNA SEMANA NO): SECCIONES TEÑIDAS CON rhASA

35 Hubo un aumento de tinción para rhASA en los siguientes tejidos/tipos celulares. Cuando se considera un efecto del artículo en estudio sobre el grado de tinción para rhASA en un tipo celular particular en un grupo de dosis particular, se consideraron los niveles de tinción en el control de vehículo concurrente y el control de equipo (sacrificado con los animales de sacrificio en recuperación) para la comparación.

40 Cerebro, Meninges, Macrófagos (todos los grupos de dosis, machos y hembras)

- Cerebro, Perivasculares, Macrófagos (todos los grupos de dosis, machos y hembras)
- Cerebro, Células gliales (todos los grupos de dosis, machos y hembras)
- Médula espinal, Meninges, Macrófagos (todos los grupos de dosis, machos y hembras)
- Médula espinal, Perivasculares, Macrófagos (todos los grupos de dosis, machos y hembras)
- Médula espinal, Células gliales (dosis media y alta machos y hembras)
- Hígado, Células de Kuppfer (todos los grupos de dosis, machos y hembras)

50 Debido a la tinción endógena, los niveles de tinción para ARSA en las neuronas del cerebro y la médula espinal fueron los más difícil de definir específicamente. La tinción para rhASA demostró niveles consistentemente elevados de rhASA en los macrófagos meníngeos y perivasculares del cerebro/médula espinal y también dentro de las células gliales. No hubo diferencias detectables de la tinción para rhASA en las neuronas entre los animales tratados con control y con el artículo en estudio.

55 **ANIMALES DE SACRIFICIO DE RECUPERACIÓN (6 MESES DE DOSIFICACIÓN UNA SEMANA SÍ UNA SEMANA NO SEGUIDOS POR UN PERÍODO DE UN MES SIN DOSIFICACIÓN)**

60 En general, los cambios relacionados con el artículo en estudio se resolvieron totalmente o disminuyeron notablemente en esos animales permitió un período de un mes sin dosificación previa a la autopsia. Los siguientes cambios microscópicos estaban presentes a una incidencia y/o severidad que indicaba una posible relación con el artículo en estudio.

Cambios microscópicos relacionados con el artículo en estudio (animales en recuperación)

- 65 • Cerebro, Meninges, Infiltrados (grupos con dosis media y alta, ambos sexos) (figura 111 y figura 112)

- Cerebro, Meninges, Infiltrados, % de Eosinófilos (machos con dosis media; hembras con dosis alta)
- Cerebro, Perivascular, Infiltrados (machos con dosis media; hembras con dosis alta) (figura 113)
- Cerebro, Meninges, Infiltrados, % de Eosinófilos (machos con dosis media; hembras con dosis alta)
- Cerebro, Sustancia gris, Infiltrados (todos los grupos de dosis, ambos sexos)
- 5 • Cerebro, Infiltrados de la sustancia gris, % de Eosinófilos (machos con dosis baja)
- Cerebro, Sustancia gris, Eosinófilos, Necrosis (machos con dosis baja)
- Médula espinal, Meninges, Infiltrados (machos con dosis media y alta; hembras con dosis baja y media)
- 10 • Médula espinal, Meninges, Infiltrados, % de Eosinófilos (machos con dosis media; hembras con dosis baja)
- Médula espinal, Sustancia gris, Infiltrados (hembras con dosis baja)
- Médula espinal, Sustancia gris, Infiltrados, % de Eosinófilos (hembras con dosis baja)
- Ganglio y Raíces de la Raíz Dorsal, Epineuro, Infiltrados (hembras de dosis media)
- 15 • Raíces y Ganglios de los Nervios Espinales, Infiltrados, Eosinófilos (machos de dosis media y alta; hembras, todas las dosis)
- Ganglio trigémino, Infiltrados, Eosinófilos (machos y hembras con dosis media)

Se interpretó que todos estos cambios representaban remanentes de los elevados cambios inflamatorios notados en animales en sacrificio terminal. Como en los animales en sacrificio terminal, no hubo evidencia del aumento de infiltrados de célula inflamatoria aún presentes en algunos animales de recuperación representaban cambios morfológicos que no estaban causando efectos adversos. No hubo lesiones relacionados con el artículo en estudio en los tejidos que no eran del sistema nervioso.

ANIMALES DE SACRIFICIO DE RECUPERACIÓN (6 MESES DE DOSIFICACIÓN UNA SEMANA SÍ UNA SEMANA NO SEGUIDOS POR UN PERÍODO DE UN MES SIN DOSIFICACIÓN): TINCIÓN DE ÁREA

No hubo indicación de una elevada tinción para rhASA en los machos o hembras en recuperación en comparación con controles de equipo y/o vehículo. En el cerebro de los machos en recuperación con dosis baja, media y alta, hubo realmente una indicación de una menor tinción para rhASA en algunos tipos celulares (esto varió entre los grupos de tratamiento) en comparación con los controles de equipo y/o vehículo. La razón para esto, incluyendo si era o no un efecto real, no estaba clara. Una posible explicación sería que la administración de rhASA exógena puede causar un descenso en la producción de rhASA endógena. Un hallazgo similar no estaba presente en la médula espinal de los machos. En los machos y hembras en recuperación, la tinción en el hígado era similar a la notada en los controles.

En general, los cambios relacionados con el artículo en estudio podían categorizarse en dos tipos mayores y estaban presentes en todos los niveles de dosis (1,8, 6,0 y 18,6 mg/dosis).

Aumento de infiltrados (de leucocitos, usualmente con un componente eosinofílico prominente) en las meninges, el parénquima cerebral, el parénquima de la médula espinal, ganglio trigémino y ocasionalmente las raíces/ganglios del nervio espinal (o el epineuro que rodea esas estructuras). Se interpretó que este aumento se debía a la presencia del artículo en estudio (una proteína) en el espacio intratecal y en los tejidos del sistema nervioso.

Aumento focal leve de células microgliales en la médula espinal y cerebro en animales ocasionales (no se observó microgliosis en ninguno de los animales a dosis altas). Se interpretó que ambas categorías de cambios morfológicos eran una respuesta a la presencia del artículo en evaluación. No hubo evidencia de necrosis neuronal en ningún animal. La evaluación de las secciones teñidas para rhASA está pendiente al momento de redactar este informe interino. Ninguno de los cambios relacionados con el artículo en estudio se relacionó con reacciones biológicamente adversas en el cerebro, médula espinal, raíces o ganglios de los nervios espinales. Específicamente, no hubo evidencia de necrosis neuronal o una respuesta glial biológicamente importante. No hubo lesiones relacionados con el artículo en estudio en los tejidos que no eran del sistema nervioso central. Luego de un período de recuperación de un mes (un período libre de dosificación), los cambios relacionados con el artículo en estudio se habían resuelto por completo o se limitaban a remanentes del aumento previo en la respuesta inflamatoria asociada con la presencia del artículo en evaluación. No hubo efectos morfológicos adversos en los animales en recuperación.

Según un examen microscópico a ciegas asignando una puntuación semicuantitativa de la tinción, la tinción inmunohisto-química para Arilsulfatasa A (rhASA; el artículo en estudio) era elevada en el cerebro y médula espinal en varios tipos celulares, excepto las neuronas, para todos los grupos tratados. Este aumento también era aparente en las células de Kupffer del hígado. Luego del período de recuperación de un mes, la tinción con rhASA en los animales tratados con el artículo en estudio (todos los grupos de dosis) habían retorna a los niveles controles (control de equipo y/o vehículo). En un macho en recuperación a dosis baja, hubo múltiples focos de astrocitosis y pérdida neuronal, indicando múltiples áreas de isquemia previa, en la corteza cerebral. Aunque la patogénesis exacta de estas lesiones no era clara, la falta de lesiones similares en

5 otros animales tratados con el artículo en estudio, incluyendo los animales a dosis altas que recibieron 10X la dosis, indicaba que estas lesiones no se relacionaban con el artículo en estudio. Al momento de la emisión de este informe preliminar, y basados estrictamente en los hallazgos macro y microscópicos (en las secciones incluidas en parafina, teñidas con hematoxilina y eosina) en este estudio, el nivel de efecto adverso no observado (NOAEL) era 18,6 mg.

EJEMPLO 16 - DATOS FARMACOCINÉTICOS

10 Datos de animales de 6 meses

Este ejemplo proporciona un análisis interpretativo para las concentraciones de rhASA y anticuerpos séricos anti-rhASA en suero y LCR de Northern Biomedical Research, Inc.

15 El objetivo del ejemplo consistió en evaluar la administración por vía intratecal (IT) de dosis repetidas de rhASA a partir de una perspectiva de toxicología y farmacología de seguridad en Monos Cynomolgus jóvenes (menos de 12 meses de edad). Se administraron un total de 12 dosis en un período de 6 meses. Los animales fueron autopsiados 24 horas o un mes después de la última dosis. El diseño del estudio se muestra en la Tabla 29.

20 Tabla 29: Diseño del estudio 047-021 (rhASA 1-09-015)

Diseño de estudio					
Grupo	Nº de animales	Concentración de Dosis nominal (mg/mL)	Dosis Administrada (mg)	Nº de animales, 6 Meses de Sacrificio	Nº de animales, 1 mes Autopsia de recuperación
25	1	4M, 4F	DC	0	-
		8M, 8F	0	0	4M, 4F
		8M, 8F	3	1,8	4 M, 4 F
	4	8M, 8F	10	6,0	4 M, 4 F
	5	8M, 8F	31	18,6	4 M, 4 F

30 DC = Control de Equipo; Los animales en el Grupo 1 no fueron dosificados con vehículo o el artículo en estudio.

^a El animal en control de vehículo Nº 044 fue sacrificado temprano el Día 50 debido a una fuga del catéter - **Métodos de ensayo - Análisis del anticuerpo**

35 La cuantificación de los anticuerpos anti-rhASA en el suero y LCR de los Monos Cynomolgus se condujo usando un método validado. En resumen, el ensayo comienza bloqueando un platillo cubierto con estreptavidina MSD, seguido por incubación con rhASA marcada con biotina. Luego de un paso de lavado, se añaden las muestras diluidas, calibradores y QC al platillo y se incuban. Luego de un paso de lavado adicional, se agrega medicamento marcado con SULFO TAG y se incuba. Se realiza un paso final de lavado y se añade un tampón de lectura MSD. Los platillos se leen inmediatamente. Los datos de señal en unidades de luminiscencia relativa (RLU) se analizan usando plantillas SOFTMax Pro.

45 Concentración en suero y LCR

La cuantificación de los anticuerpos anti-rhASA en el suero y LCR de los Monos Cynomolgus se condujo usando un método validado. El método se basa en tecnología de Ensayo de Inmunoabsorción Unida a Enzima (ELISA). En resumen, se cubre un platillo de microtitulación con un anticuerpo políclonal de conejo (SH040) contra Arilsulfatasa A humana recombinante (rhASA). Luego de la incubación con los estándares de referencia de rhASA y las muestras en estudio, se detecta la proteína rhASA unida por Anticuerpo monoclonal anti-ASA conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (clon 19-16-3). El platillo se incuba luego con un sustrato para HRP, TMB peroxidasa. Esta reacción enzima-sustrato se detiene con la adición de ácido sulfúrico 2N (H_2SO_4) y la absorbancia de cada platillo se mide en la onda de luz de absorbancia de 450 nm con una onda de luz de referencia de 655 nm. Las concentraciones de rhASA en las muestras se calculan usando la curva de calibración de rhASA en el mismo platillo.

46 El resumen de las concentraciones séricas de rhASA se presenta en la Tabla 30.

50 El resumen de las concentraciones de rhASA en LCR se presentan en la Tabla 31.

55 El resumen de las concentraciones séricas de anticuerpo anti-rhASA se presentan en la Tabla 32.

60 El resumen de las concentraciones de anticuerpo anti-rhASA en LCR se presentan en la Tabla 33.

La incidencia de anticuerpos por grupo y sexo se presenta en la Tabla 36.

Tabla 30: Resumen de las concentraciones séricas de rhASA en Monos Cynomolgus

5

Grupo 1: Control de vehículo	Machos			Hembras		
	Media	SD	n	Media	SD	n
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes de la Dosis 2	0	0	4	0	0	4
Post Dosis 2	0	0	4	0	0	4
Antes de la Dosis 4	0	0	4	0	0	4
Post Dosis 4	0	0	4	0	0	4
Antes de la Dosis 6	0	0	4	0	0	4
Post Dosis 6	0	0	4	0	0	4
Antes de la Dosis 8	0	0	4	0	0	4
Post Dosis 8	0	0	4	0	0	4
Antes de la Dosis 10	0	0	4	0	0	4
Post Dosis 10	0	0	4	0	0	4
Antes de la Dosis 12	0	0	4	0	0	4
Post Dosis 12	0	0	4	0	0	4
Recuperación Med	0	0	4	0	0	4
Autopsia de recuperación	0	0	4	0	0	4
Grupo 2: 0 mg		Machos			Hembras	
	Media	SD	n	Media	SD	n
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes de la Dosis 2	0	0	8	0	0	7
Post Dosis 2	0	0	8	0	0	7
Antes de la Dosis 4	0	0	8	0	0	7
Post Dosis 4	0	0	8	0	0	7
Antes de la Dosis 6	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 6	0	0	8	0	0	8
Antes de la Dosis 8	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 8	0	0	8	0	0	8
Antes de la Dosis 10	0	0	8	0	0	7
Post Dosis 10	0	0	8	0	0	7

(continuado)

Grupo 2: 0 mg	Machos			Hembras		
	Media	SD	n	Media	SD	n
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes de la Dosis 12	0	0	8	0	0	7
Post Dosis 12 (antes de la necropsia a los 6 meses)	0	0	8	0	0	8
Recuperación Media	0	0	4	0	0	4
Necropsia de recuperación	0	0	4	0	0	4
Grupo 3: 1,8 mg	Machos			Hembras		
	Media	SD	n	Media	SD	n
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes de la Dosis 2	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 2	49,2	46,8	8	40,3	27,3	8
Antes de la Dosis 4	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 4	0	0	8	0	0	8
Antes de la Dosis 6	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 6	0	0	8	0	0	8
Antes de la Dosis 8	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 8	0	0	8	0	0	8
Antes de la Dosis 10	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 10	0	0	8	0	0	8
Antes de la Dosis 12	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 12 (antes de la necropsia a los 6 meses)	0	0	8	0	0	8
Recuperación Media	0	0	4	0	0	4
Necropsia de recuperación	0	0	4	0	0	4
Grupo 4: 6,0 mg	Machos			Hembras		
	Media	SD	n	Media	SD	n
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes de la Dosis 2	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 2	173,6	69,5	8	143,2	89,0	8
Antes de la Dosis 4	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 4	17	49	8	63,8	119,9	8
Antes de la Dosis 6	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 6	0	0	8	0	0	8
Antes de la Dosis 8	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 8	0	0	8	0	0	8
Antes de la Dosis 10	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 10	0	0	8	0	0	8
Antes de la Dosis 12	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 12 (antes de la Necropsia de 6 meses)	0	0	8	0	0	8

(continuado)

Grupo 4: 6,0 mg	Machos			Hembras		
	Media	SD	Media	Media	SD	n
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Recuperación Media	0	0	4	0	0	4
Necropsia de recuperación	0	0	4	0	0	4
Grupo 5: 18,6 mg	Machos			Hembras		
	Media	SD	n	Media	SD	n
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes de la Dosis 2	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 2	348,0	272,9	8	562,3	204,3	8
Antes de la Dosis 4	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 4	105,7	274,6	8	172,0	141,3	8
Antes de la Dosis 6	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 6	20,4	38,4	8	88,6	121,4	8
Antes de la Dosis 8	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 8	0	0	8	54,0	89,4	8
Antes de la Dosis 10	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 10	0	0	8	6	18	8
Antes de la Dosis 12	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 12 (antes de la necropsia a los 6 meses)	0	0	8	0	0	8
Recuperación Media	0	0	4	0	0	4
Autopsia de recuperación	0	0	4	0	0	4

Tabla 31: Resumen de las concentraciones de LCR en monos Cynomolgus.

Grupo 1: Vehículo de Control	Machos			Hembras		
	Media	SD	n	Media	SD	n
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes de la Dosis 2	0	0	4	0	0	4
Post Dosis 2	0	0	4	0	0	4
Antes de la Dosis 4	0	0	4	0	0	4
Post Dosis 4	0	0	4	0	0	4
Antes de la Dosis 6	0	0	4	0	0	4
Post Dosis 6	0	0	4	0	0	4
Antes de la Dosis 8	0	0	4	0	0	4
Post Dosis 8	0	0	4	0	0	4
Antes de la Dosis 10	0	0	4	0	0	4
Post Dosis 10	0	0	3	0	0	4
Antes de la Dosis 12	0	0	3	0	0	4

(continuado)

	Machos			Hembras		
	Media	SD	n	Media	SD	n
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Post Dosis 12	0	0	3	0	0	4
Recuperación Media	0	0	3	0	0	4
Autopsia de recuperación	0	0	4	0	0	4
Grupo 2: 0 mg	Machos			Hembras		
	Media	SD	n	Media	SD	n
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes de la Dosis 2	0	0	6	0	0	7
Post Dosis 2	0	0	5	0	0	7
Antes de la Dosis 4	0	0	5	0	0	6
Post Dosis 4	0	0	5	0	0	5
Antes de la Dosis 6	0	0	5	0	0	5
Post Dosis 6	0	0	5	0	0	5
Antes de la Dosis 8	0	0	5	0	0	5
Post Dosis 8	0	0	5	0	0	5
Antes de la Dosis 10	0	0	4	0	0	5
Post Dosis 10	0	0	4	0	0	5
Antes de la Dosis 12	0	0	4	0	0	5
Post Dosis 12 (antes de la necropsia a los 6 meses)	0	0	5	0	0	5
Recuperación Media	0	0	2	0	0	3
Autopsia de recuperación	0	0	4	0	0	4
Grupo 3: 1.8 mg	Machos			Hembras		
	Media	SD	n	Media	SD	n
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes de la Dosis 2	42491	59255	7	42217	47300	6
Post Dosis 2	95886	22626	7	125717	61723	6
Antes de la Dosis 4	17664	24372	6	50829	41891	6
Post Dosis 4	106783	42823	6	138400	49908	6
Antes de la Dosis 6	39400	50105	4	45817	38404	6
Post Dosis 6	95275	12836	4	104080	37423	5
Antes de la Dosis 8	25799	31589	4	58086	43821	5
Post Dosis 8	148750	34664	4	119200	66556	5
Antes de la Dosis 10	25927	31380	4	30380	30328	5
Post Dosis 10	89975	29494	4	105200	44603	5
Antes de la Dosis 12	29746	34267	4	82780	65906	5
Post Dosis 12 (antes de la necropsia a los 6 meses)	32030	39155	7	47331	49015	6
Recuperación Media	0	0	3	0	0	2

(continuado)

Grupo 3: 1,8 mg	Machos			Hembras		
	Media	SD	n	Media	SD	n
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Necropsia de recuperación	0	0	4	0	0	4
Grupo 4: 6,0 mg	Machos			Hembras		
	Media	SD	n	Media	SD	n
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes de la Dosis 2	75203	67002	8	146979	233673	6
Post Dosis 2	360000	179276	8	267667	103369	6
Antes de la Dosis 4	58064	77210	8	53285	73340	5
Post Dosis 4	369250	241251	8	305517	152232	6
Antes de la Dosis 6	77253	91407	8	97987	146762	6
Post Dosis 6	418600	200098	5	369000	232238	5
Antes de la Dosis 8	66342	80374	5	11592	23072	4
Post Dosis 8	329400	209841	5	340500	135128	4
Antes de la Dosis 10	119420	148408	5	74031	104609	2
Post Dosis 10	412000	149278	5	245500	161927	2
Antes de la Dosis 12	68651	92902	5	74577	105251	2
Post Dosis 12 (antes de la necropsia a los 6 meses)	141833	173933	7	58986	99016	4
Recuperación Media	0	0	3	0	NA	1
Necropsia de recuperación	0	0	4	0	0	4
Grupo 5: 18,6 mg	Machos			Hembras		
	Media	SD	n	Media	SD	n
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes de la Dosis 2	289917	291188	7	201339	250774	8
Post Dosis 2	734429	298352	7	920143	448409	7
Antes de la Dosis 4	150238	210302	7	169895	185675	6
Post Dosis 4	984857	570039	7	965167	425924	6
Antes de la Dosis 6	265479	252067	7	288879	226889	6
Post Dosis 6	758143	102009	7	1270000	558533	6
Antes de la Dosis 8	190529	240081	7	196021	199396	6
Post Dosis 8	1003429	538271	7	989800	585072	5
Antes de la Dosis 10	176297	272500	7	168864	191087	6
Post Dosis 10	1013000	390673	7	773400	103717	5
Antes de la Dosis 12	142334	196793	5	430542	436534	6
Post Dosis 12 (antes de la necropsia a los 6 meses)	291525	350251	7	252142	381200	6
Recuperación Media	0	0	3	0	0	2
Necropsia de recuperación	0	0	4	0	0	4

Tabla 32: Resumen de la concentración de anticuerpo anti- rhASA en suero

Grupo 1: Vehículo de Control		Machos			Hembras		
		Media	SD	n	Media	SD	n
Punto de tiempo		ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Predosis 2		0	0	4	0	0	4
Predosis 4		0	0	4	0	0	4
Predosis 6		0	0	4	0	0	4
Predosis 8		0	0	4	0	0	4
Predosis 10		0	0	4	0	0	4
Predosis 12		0	0	4	0	0	4
Recuperación Media		0	0	4	0	0	4
Necropsia de recuperación		0	0	4	0	0	4
Grupo 2: 0 mg		Machos			Hembras		
		Media	SD	n	Media	SD	n
Punto de tiempo		ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Predosis 2		0	0	8	0	0	8
Predosis 4		0	0	8	0	0	8
Predosis 6		0	0	8	0	0	7
Predosis 8		0	0	8	0	0	7
Predosis 10		0	0	8	0	0	7
Predosis 12		0	0	8	0	0	7
Necropsia (24 h después de la última dosis)		0	0	4	0	0	4
Recuperación Media		0	0	4	0	0	4
Necropsia de recuperación		0	0	4	0	0	4
Grupo 3: 1,8 mg		Machos			Hembras		
		Media	SD	n	Media	SD	N
Punto de tiempo		ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Predosis 2		0	0	8	0	0	8
Predosis 4		18409	21371	8	27648	37504	8
Predosis 6		75913	64863	8	85625	79871	8
Predosis 8		132163	95576	8	151900	97818	8
Predosis 10		392338	606626	8	290675	186213	8
Predosis 12		499438	735028	8	524438	569523	8
Necropsia (24 h después de la última dosis)		261625	157865	4	733550	928411	4
Recuperación Media		339250	265888	4	377175	218955	4
Necropsia de recuperación		712500	1107129	4	295525	174718	4

(continuado)

Grupo 4: 6,0 mg	Machos			Hembras		
	Media	SD	n	Media	SD	N
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Predosis 2	0	0	8	0	0	8
Predosis 4	30419	30561	8	64000	89510	8
Predosis 6	143693	128094	8	191750	150511	8
Predosis 8	325750	190651	8	305850	224707	8
Predosis 10	669125	515458	8	832188	846241	8
Predosis 12	946125	651530	8	1060775	1088889	8
Necropsia (24 h después de la última dosis)	713500	598812	4	1047568	1132048	4
Recuperación Media	1566000	708132	4	975500	1149734	4
Necropsia de recuperación	1113250	554510	4	793000	991450	4
Grupo 5: 18,6 mg	Machos			Hembras		
	Media	SD	n	Media	SD	N
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Cirugía	0	0	8	0	0	8
Predosis 2	56873	39107	8	39994	53411	8
Predosis 4	311638	237796	8	193263	208952	8
Predosis 6	482875	270130	8	399363	360425	8
Predosis 8	1006750	857916	8	866875	894776	8
Predosis 10	1419000	1382276	8	1341500	1373771	8
Predosis 12	165000	147463	4	407300	268570	4
Necropsia (24 h después de la última dosis)	2884250	1363128	4	2101500	2090420	4
Recuperación Media	2504250	1118042	4	1506000	1524682	4

Tabla 33: Resumen de la concentración de anticuerpo anti- rhASA en LCR

Grupo 1: Vehículo control	Machos			Hembras		
	Media	SD	n	Media	SD	n
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Cirugía	0	0	4	0	0	4
Predosis 2	0	0	4	0	0	4
Predosis 4	0	0	4	0	0	4
Predosis 6	0	0	4	0	0	4
Predosis 8	0	0	4	0	0	4
Predosis 10	0	0	4	0	0	4
Predosis 12	0	0	3	0	0	4
Recuperación media	0	0	3	0	0	4
Necropsia de recuperación	0	0	4	0	0	4

(continuado)

Grupo 2: 0 mg	Machos			Hembras		
	Media	SD	n	Media	SD	n
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Cirugia	0	0	7	0	0	6
Predosis 2	0	0	6	0	0	7
Predosis 4	0	0	5	0	0	6
Predosis 6	0	0	5	0	0	5
Predosis 8	0	0	5	0	0	5
Predosis 10	0	0	4	0	0	5
Predosis 12	0	0	4	0	0	5
Necropsia (24 h después de la última dosis)	0	0	3	0	0	2
Recuperación media	0	NA	1	0	0	3
Necropsia de recuperación	0	0	4	0	0	4
Grupo 3: 1,8 mg	Machos			Hembras		
	Media	SD	n	Media	SD	n
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Cirugia	0	0	7	0	0	8
Predosis 2	0	0	7	0	0	6
Predosis 4	0	0	6	41	101	6
Predosis 6	685	1317	4	632	1413	5
Predosis 8	2238	2596	4	2180	4875	5
Predosis 10	3393	5038	4	5560	12433	5
Predosis 12	6436	8266	4	12700	28398	5
Necropsia (24 h después de la última dosis)	14848	12401	4	21442	32382	4
Recuperación media	29307	40617	3	18700	283	2
Necropsia de recuperación	21060	30010	3	13078	7181	4
Grupo 4: 6,0 mg	Machos			Hembras		
	Media	SD	n	Media	SD	n
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Cirugia	0	0	7	0	0	8
Predosis 2	0	0	7	0	0	6
Predosis 4	99	172	7	84	187	5
Predosis 6	1117	1862	8	1473	2775	6
Predosis 8	3987	5580	5	20824	27320	4
Predosis 10	6600	9679	5	2715	1237	2
Predosis 12	5285	7279	5	955	1237	2
Necropsia (24 h después de la última dosis)	16870	16350	4	63000	63000	3
Recuperación media	66233	42238	3	16800	NA	1
Necropsia de recuperación	53600	14388	3	28880	29890	4

(continuado)

Grupo 5: 18,6 mg	Machos			Hembras		
	Media	SD	n	Media	SD	n
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Cirugia	0	0	7	0	0	6
Predosis 2	0	0	7	0	0	8
Predosis 4	102	192	7	0	0	6
Predosis 6	233	351	7	1506	3234	6
Predosis 8	3378	5931	7	6367	9865	6
Predosis 10	16327	24035	7	19567	27542	6
Predosis 12	11596	16406	5	15143	24351	6
Necropsia (24 h después de la última dosis)	5168	7427	4	12135	10341	4
Recuperación media	54700	26439	3	46315	62770	2
Necropsia de recuperación	50725	29217	4	37790	35967	4

Tabla 34: Concentraciones de rhASA en suero y LCR. machos y hembras combinados (ng/mL)

Grupo 1: Vehículo de control	RhASA en suero (ng/mL)			RhASA en LCR (ng/mL)		
	Grupo en total			Grupo en total		
Punto de tiempo	Media	SD	n	Media	SD	n
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes de la Dosis 2	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 2	0	0	8	0	0	8
Antes de la Dosis 4	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 4	0	0	8	0	0	8
Antes de la Dosis 6	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 6	0	0	8	0	0	8
Antes de la Dosis 8	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 8	0	0	8	0	0	8
Antes de la Dosis 10	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 10	0	0	8	0	0	7
Antes de la Dosis 12	0	0	8	0	0	7
Post Dosis 12	0	0	8	0	0	7
Recuperación media	0	0	8	0	0	7
Necropsia de recuperación	0	0	8	0	0	8
Grupo 2: 0 mg	RhASA en suero (ng/mL)			RhASA en LCR (ng/mL)		
	Grupo en total			Grupo en total		
Punto de tiempo	Media	SD	n	Media	SD	n
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes de la Dosis 2	0	0	16	0	0	13

(continuado)

5

Grupo 2: 0 mg		RhASA en suero (ng/mL)			RhASA en LCR (ng/mL)		
Punto de tiempo	Grupo en total			Grupo en total			
	Media	SD	n	Media	SD	n	
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL		
Post Dosis 2	0	0	16	0	0	12	
Antes de la Dosis 4	0	0	16	0	0	11	
Post Dosis 4	0	0	16	0	0	10	
Antes de la Dosis 6	0	0	15	0	0	10	
Post Dosis 6	0	0	15	0	0	10	
Antes de la Dosis 8	0	0	15	0	0	10	
Post Dosis 8	0	0	15	0	0	10	
Antes de la Dosis 10	0	0	15	0	0	9	
Post Dosis 10	0	0	15	0	0	9	
Antes de la Dosis 12	0	0	15	0	0	9	
Post Dosis 12 (antes de la necropsia a los 6 meses)	0	0	15	0	0	10	
Recuperación media	0	0	8	0	0	5	
Necropsia de recuperación	0	0	8	0	0	8	
<hr/>							
Grupo 3: 1,8 mg		RhASA en suero (ng/mL)			RhASA en LCR (ng/mL)		
Punto de tiempo	Grupo en total			Grupo en total			
	Media	SD	n	Media	SD	n	
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL		
Antes de la Dosis 2	0	0	16	42365	51844	13	
Post Dosis 2	44,7	37,3	16	109654	45639	13	
Antes de la Dosis 4	0	0	16	34247	36982	12	
Post Dosis 4	0	0	16	122592	47311	12	
Antes de la Dosis 6	0	0	16	43250	40831	10	
Post Dosis 6	0	0	16	100167	27992	9	
Antes de la Dosis 8	0	0	16	43736	40298	9	
Post Dosis 8	0	0	16	132333	53926	9	
Antes de la Dosis 10	0	0	16	28401	28890	9	
Post Dosis 10	0	0	16	98433	37220	9	
Antes de la Dosis 12 (antes de la necropsia a los 6 meses)	0	0	16	59209	58253	9	
Post Dosis 12	0	0	16	39092	42786	13	
Recuperación media	0	0	8	0	0	5	
Necropsia de recuperación	0	0	8	0	0	8	

(continuado)

Grupo 4: 6,0 mg		RhASA en suero (ng/mL)			RhASA en LCR (ng/mL)		
		Grupo en total			Grupo en total		
Punto de tiempo	Media	SD	n	Media	SD	n	
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL		
Antes de la Dosis 2	0	0	16	105964	157408	14	
Post Dosis 2	158,4	78,7	16	320429	153832	14	
Antes de la Dosis 4	0	0	16	56226	72638	13	
Post Dosis 4	40,6	91,7	16	341936	203284	14	
Antes de la Dosis 6	0	0	16	86139	113563	14	
Post Dosis 6	0	0	16	393800	206033	10	
Antes de la Dosis 8	0	0	16	42009	65286	9	
Post Dosis 8	0	0	16	334333	169995	9	
Antes de la Dosis 10	0	0	16	106452	130375	7	
Post Dosis 10	0	0	16	364429	160707	7	
Antes de la Dosis 12(antes de la necropsia a los 6 meses)	0	0	16	70344	87227	7	
Post Dosis 12	0	0	16	111707	151129	11	
Recuperación media	0	0	8	0	0	4	
Necropsia de recuperación	0	0	8	0	0	8	
Grupo 5: 18,6 mg		RhASA en suero (ng/mL)			RhASA en LCR (ng/mL)		
		Grupo en total			Grupo en total		
Punto de tiempo	Media	SD	n	Media	SD	n	
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL		
Antes de la Dosis 2	0	0	16	242676	264338	15	
Post Dosis 2	455,1	257,8	16	827286	378379	14	
Antes de la Dosis 4	0	0	16	159311	191264	13	
Post Dosis 4	138,8	213,7	16	975769	488021	13	
Antes de la Dosis 6	0	0	16	276279	231010	13	
Post Dosis 6	54,5	93,8	16	994385	453568	13	
Antes de la Dosis 8	0	0	16	193064	213058	13	
Post Dosis 8	27,0	67,1	16	997750	531567	12	
Antes de la Dosis 10	0	0	16	172866	228817	13	
Post Dosis 10	3,2	13	16	913167	319975	12	
Antes de la Dosis 12 (antes de la necropsia a los 6 meses)	0	0	16	299538	365275	11	
Post Dosis 12	0	0	16	273348	349718	13	
Recuperación media	0	0	8	0	0	5	
Necropsia de recuperación	0	0	8	0	0	8	

Tabla 35: Anticuerpo anti-rhASA en suero y LCR, machos y hembras combinados (ng/mL)

Grupo 1: Vehículo de control		Anticuerpo anti-rhASA en suero (ng/mL)			Anticuerpo anti-rhASA en LCR (ng/mL)		
		Grupo en total			Grupo en total		
		Media	SD	n	Mean	SD	n
Punto de tiempo		ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Cirugia					0	0	8
Predosis 2	0	0	8	0	0	0	8
Predosis 4	0	0	8	0	0	0	8
Predosis 6	0	0	8	0	0	0	8
Predosis 8	0	0	8	0	0	0	8
Predosis 10	0	0	8	0	0	0	8
Predosis 12	0	0	8	0	0	0	7
Recuperación media	0	0	8	0	0	0	7
Necropsia de recuperación	0	0	8	0	0	0	8
Grupo 2: 0 mg		Anticuerpo anti-rhASA en suero (ng/mL)			Anticuerpo anti-rhASA en LCR		
		Grupo en total			Grupo en total		
		Media	SD	n	Media	SD	n
Punto de tiempo		ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Cirugia					0	0	13
Predosis 2	0	0	16	0	0	0	13
Predosis 4	0	0	16	0	0	0	11
Predosis 6	0	0	15	0	0	0	10
Predosis 8	0	0	15	0	0	0	10
Predosis 10	0	0	15	0	0	0	9
Predosis 12	0	0	15	0	0	0	9
Necropsia (24h después de la última dosis)	0	0	8	0	0	0	5
Recuperación media	0	0	8	0	0	0	4
Necropsia de recuperación	0	0	8	0	0	0	8
Grupo 3: 1,8 mg		Anticuer. anti-rhASA en suero (ng/mL)			Anticuerpo anti-rhASA en LCR		
		Grupo en total			Grupo en total		
		Media	SD	Media	SD	Media	SD
Punto de tiempo		ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Cirugia					0	0	15
Predosis 2	0	0	16	0	0	0	13
Predosis 4	23028	29871	16	21	72	12	
Predosis 6	80769	70467	16	656	1284	9	
Predosis 8	142031	93979	16	2206	3796	9	
Predosis 10	341506	436656	16	4597	9386	9	

(continuado)

Grupo 3: 1,8 mg	Anticuerpo anti-rhASA en suero (ng/mL)			Anticuerpo anti-rhASA en LCR		
	Grupo en total			Grupo en total		
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Predosis 12	511938	635340	16	9916	20970	9
Necropsia (24h después de la última dosis)	497588	666122	8	18145	22972	8
Recuperación media	358213	226397	8	25064	29302	5
Necropsia de recuperación	504013	766860	8	16499	18552	7
Grupo 4: 6,0 mg	Anticuerpo anti-rhASA en suero (ng/mL)			Anticuerpo anti-rhASA en LCR		
	Grupo en total			Grupo en total		
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Cirugia				0	0	15
Predosis 2	0	0	16	0	0	13
Predosis 4	47209	66899	16	93	170	12
Predosis 6	167721	137276	16	1269	2205	14
Predosis 8	315800	201572	16	11470	19344	9
Predosis 10	750656	682110	16	5490	8143	7
Predosis 12	1003450	868860	16	4048	6328	7
Necropsia (24h después de la última dosis)	880534	857199	8	36640	45439	7
Recuperación media	1270750	938646	8	53875	42430	4
Necropsia de recuperación	953125	763122	8	39474	26274	7
Grupo 5: 18,6 mg	Anticuerpo anti-rhASA en suero (ng/mL)			Anticuerpo anti-rhASA en LCR		
	Grupo en total			Grupo en total		
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Punto de tiempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Cirugia				0	0	13
Predosis 2	0	0	16	0	0	15
Predosis 4	48433	46054	16	55	146	13
Predosis 6	252450	224723	16	821	2204	13
Predosis 8	441119	310702	16	4757	7781	13
Predosis 10	936813	849893	16	17822	24652	13
Predosis 12	1380250	1331905	16	13531	20189	11
Necropsia (24h después de la última dosis)	286150	238760	8	8652	9129	8
Recuperación media	2492875	1686472	8	51346	36819	5
Necropsia de recuperación	2005125	1347857	8	44258	31114	8

Tabla 36: Incidencia de Anticuerpos Anti- rhASA en la Autopsia

5	Grupo	Animales positivos para el anticuerpo sérico (positivos/total evaluados)				Animales positivos para el anticuerpo en LCR (positivos/total evaluados)			
		M		F		M		F	
		Autopsia 6 meses	Autopsia de Recuperaci ón	Autopsia 6 meses	Autopsia de Recuperación	Autopsia 6 meses	Autopsia de Recuperación	Autopsia 6 meses	Autopsia de Recuperación n
10	1 (DC)	NA	0/4	NA	0/4	NA	0/4	NA	0/4
15	2 (vehículo)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/3	0/4	0/2	0/4
20	3 (1,8 mg IT)	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/3	3/4	4/4
25	4 (6,0 mg IT)	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/3	2/3	4/4
30	5 (18,6 mg IT)	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4	4/4	4/4

El límite de cuantificación para rhASA en suero de los Monos Cynomolgus es 39,1 ng/mL, y todas las muestras de suero de los Grupos 1 y 2 estaban por debajo del límite de cuantificación (BLQ), véase Tabla 30. Los niveles séricos de rhASA se evaluaron antes de y a las 24 horas luego de las Dosis 2, 4, 6, 8, 10, y 12 (autopsia a los 6 meses), a mitad de camino en el período de recuperación, y antes de la autopsia de recuperación. Los niveles de rhASA eran indetectables en el Grupo 3 (1,8 mg/dosis), Grupo 4 (6,0 mg/dosis), y Grupo 5 (18,6 mg/dosis) antes de las Dosis 2, 4, 6, 8, 10, y 12, después de la Dosis 12, a mitad de camino en el período de recuperación, y antes de la autopsia de recuperación. Después de la dosis 2, los niveles de rhASA en suero estaban relacionados con la dosis. Después de la dosis 4 (Grupo 3), Dosis 6 (Grupos 3 y 4), y Dosis 8 y 10 (Grupos 3 y 4 y machos del Grupo 5), los niveles de rhASA eran indetectables. Los niveles séricos de rhASA declinaron en el Grupo 4 (6,0 mg/dosis) Despues de la dosis 4 y en el Grupo 5 (18,6 mg/dosis) luego de las Dosis 4 y 6 para los machos y Dosis 4, 6, 8 y 10 para las hembras. Este descenso aparente en los niveles séricos de rhASA puede estar relacionado con el aumento en la concentración de los anticuerpos anti-rhASA. No hubo diferencias sexuales aparentes en los niveles séricos de rhASA, dada la variabilidad de la muestra y los pequeños números de grupo en este estudio.

El límite de cuantificación para rhASA en el LCR de los Monos Cynomolgus es 19,5 ng/mL, y todas las muestras de LCR de los Grupos 1 y 2 estaban BQL, véase Tabla 31. La rhASA era detectable en el LCR antes y luego de las Dosis 2, 4, 6, 8, 10, y 12 (autopsia a los 6 meses), en todos los grupos de dosis. Los niveles eran mayores postdosis (aproximadamente 24 horas postdosis) y estaban relacionados con la dosis. Los niveles en LCR eran mucho mayores que los del suero. No hubo diferencias sexuales aparentes en los niveles de rhASA en el LCR, dada la amplia variabilidad de la muestra y los pequeños números de grupo en este estudio. La rhASA no era detectable a mitad de camino a lo largo del período de recuperación y antes de la autopsia de recuperación en todos los grupos de dosis. Los niveles de LCR en las recolecciones de la Dosis 12 (autopsia) para los grupos tratados con rhASA eran menores que los niveles postdosis 8 y 11. Las razones potenciales para los menores niveles de rhASA en la autopsia incluyen el mayor volumen tomado (~2.25 mL total para las cuentas de células, química, rhASA y anticuerpo anti-rhASA) en la autopsia vs las tomadas en un intervalo de dosificación con vida (hasta 0,5 mL pre- o postdosis para la concentración de rhASA). Adicionalmente, algunos animales no tenían catéteres permeables en la autopsia, y las muestras fueron tomadas a través de una espita CM en vez de a través del catéter. Esta vía produjo consistentemente concentraciones menores de rhASA en comparación con las muestras a través del catéter. Esto se debe probablemente a la limitada dirección rostrocaudal del flujo del LCR que ocurre en los animales que se orientan verticalmente como los monos y el hombre (p.ej., es bien conocido que los constituyentes del LCR exhiben gradientes rostro-caudales notables a lo largo de la vida de los individuos).

Los anticuerpos anti-rhASA en suero se detectaron en todos los animales tratados con RHASA en algún punto en el tiempo, véase Tabla 32. Los animales se definieron como positivos para anticuerpos anti-rhASA si el nivel de anticuerpo anti-rhASA estaba por encima del límite de cuantificación (78,1 ng/mL). Los animales permanecieron positivos para los anticuerpos anti-rhASA una vez que se seroconvirtieron. Ningún animal era positivo para los anticuerpos anti-rhASA en el punto de tiempo predosis 2. Todos los animales con rhASA excepto el Macho Nº 026 (Grupo 4; 6,0 mg/dosis) eran positivo para los anticuerpos anti-rhASA en el punto de

5 tiempo predosis 4. El Macho No. 026 era positivo para el anticuerpo sérico en el punto de tiempo predosis 6. En el Grupo 5 (18,6 mg/kg), las muestras de anticuerpos en la autopsia tenían niveles menores de anticuerpo. El aparente descenso puede deberse a la presencia de la rhASA interfiriendo con el ensayo. El título generalmente era mayor en los grupos con dosis media y alta (6,0 y 18,6 mg/dosis) que en los animales con dosis baja (1,8 mg/dosis). La presencia de anticuerpos anti-rhASA es un resultado esperado por tratar Monos Cynomolgus con una proteína humana^a recombinante dada la variabilidad en los resultados, no hay diferencias sexuales aparentes.

10 Todos los animales con anticuerpos anti-rhASA detectables en el LCR tenían anticuerpos rhASA detectables en suero también, con la excepción de las Hembras Nos. 049 (Grupo 3; 1,8 mg/dosis) y 057 (Grupo 4; 6,0 mg/dosis). La variabilidad en la concentración de anticuerpo y la incidencia excluye la determinación de una respuesta de dosis. Los animales se definían como positivos para anticuerpos anti-rhASA si el nivel de anticuerpo anti-rhASA estaba por encima del límite de cuantificación (78,1 ng/mL).

15 Los valores combinados para los machos y las hembras para los niveles en suero y LCR de RHASA y para los anticuerpos anti-RHASA se muestra en la Tabla 34 y Tabla 35. Los resultados combinados de machos y hembras son similares a los sexos individuales, discutidos antes.

EJEMPLO 17 - EFICACIA

20 En este ejemplo, se asignaron 11 ratones salvajes control (mASA +/- hASA -/-) al Grupo A y no recibieron tratamiento. Treinta y cuatro (34) ratones hASAC69S/ASA -/- fueron asignados a cada uno de 5 grupos de dosis y recibieron vehículo (Grupo B) o rhASA a dosis de 20 mg/kg (intravenosa[IV]; Grupo C) o 0,04, 0,12, y 0,21 mg (Grupos D, E, y F, respectivamente) los Días 1, 9, 15/16 y 22. Las dosis IV se administraron a través de una vena de la cola. Las dosis intratecales (IT) se administraron como una infusión en un volumen de 12 µL a un rango aproximado de 2 µL/20 segundos (Tabla 37).

30 Tabla 37: Diseño del estudio

35 Grupo	Nº de Animales	Tipo de Animal	Tratamiento	Dosis	Vía	Nº total de Inyecciones	Sacrificio	Dosis en mg/kg peso cerebral ^a
A	11	Control de tipo salvaje (mASA +/- hASA -/-)	None	NA	NA	NA	NA	NA
B	9	hASAC69S/ ASA -/-	Control de Vehículo	Vehículo	IT lumbar	4 (Días 1, 9, 15/16 ^b , y 22)	24 horas después de la cuarta dosis	0
C	5		rhASA	20 mg/kg	IV (vena de la cola)			NA
D	5		rhASA	0,04 mg	IT lumbar			100
E	5		rhASA	0,12 mg	IT lumbar			300
F	10		rhASA	0,21 mg	IT lumbar			520

55 NA = no aplicable; IT = intratecal; IV = intravenoso.
^a El peso cerebral es aproximadamente 0,0004 kg.
^b Los Grupos C, D, y E fueron dosificados el Día 15; los Grupos B y E fueron dosificados el Día 16.

60 El ratón knockout ASA hASAC69S/ASA(-/-) es un modelo aceptado de MLD, y se ha usado para evaluar tratamientos potenciales para esta enfermedad. La vía intratecal es la vía pretendida de administración en los humanos. La vía intravenosa de administración se ha evaluado para este compuesto y un compuesto similar en ratones con MLD. Se ha añadido un grupo control intravenoso como control positivo para los cambios histológicos esperados en los órganos periféricos. Los animales recibieron 100, 300, o 520 mg/kg de peso cerebral (0,04, 0,12, 0,21 mg, respectivamente) de rhASA. Los niveles de dosis normalizados al peso cerebral seleccionados para este estudio corresponden con las dosis que se planifican para su uso en humano o se han usado en estudios de toxicología o en modelos previos de eficacia de enfermedades por depósito lisosomal. Se

espera que estas dosis no tengan ninguna toxicidad.

Recepción

5	Especies	Ratones (<i>Mus musculus</i>)
	Cepa	Ratones hASAC69S/ASA (-/-) y controles salvajes
	Edad	Aproximadamente a 14-17 meses de su llegada
10	Nº de Grupos	6
	Nº de Animales	34 ratones knockout ASA + 11 controles salvajes

Después de su llegada, cada animal era examinado para evaluar el estatus de salud.

Alojamiento

Los animales fueron alojados por grupo en jaulas de tope de filtro policarbonado a temperatura alta, con lecho de papel CareFresh y frascos de agua. Cada jaula estaba claramente etiquetada con una tarjeta de jaula que identificaba el proyecto, los números de grupo y animal, y el sexo. Cada animal estaba identificado de forma única usando un sistema de piquete en la oreja.

Las condiciones procuradas para el entorno de la habitación del animal y el fotoperíodo eran las siguientes:

25	Temperatura	22°C ± 3°C
	Humedad	50% ± 20%
30	Ciclo de luz	12 horas de luz y 12 horas de oscuridad

Todos los animales salvajes disponibles (11) fueron asignados al Grupo A y se enumeraron de 35 a 45. ASA -/- a los animales hASA (+/-) se les asignaron números consecutivos (1 a 34) cuando fueron retirados de sus jaulas, pesados, y se les pincharon las orejas durante la aclimatación. A los animales luego se les asignó a los grupos de tratamiento usando Research Randomizer (www.randomizer.org) el 3 de enero de 2011. Los primeros 9 números fueron asignados al Grupo B, los 5 siguientes al Grupo C, los 5 siguientes al Grupo D, los 5 siguientes al Grupo E, y los últimos 10 al Grupo F. Los animales fueron asignados del siguiente modo:

Tabla 38: Asignación del animal

Grupo	N	Números de Animal
A	11	35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45
B	9	7, 13, 17, 22, 23, 24, 28, 29, 30
C	5	6, 16, 19 ^a , 21, 32
D	5	5, 9, 14, 18, 27
E	5	1, 2, 4, 8, 11
F	10	3 ^b , 10, 12, 15, 20, 25, 26, 31, 33, 34

^a El Animal Nº 19 no pudo ser localizado al momento de la dosificación.
^b El Animal Nº 3 murió antes que comenzara la dosificación.

Artículo en estudio y vehículo

	Artículo en evaluación	
60	Identidad	rhASA
	Descripción	Arilsulfatasa humana recombinante A (ARSA)
	Condiciones de almacenamiento	Aproximadamente 4°C
65	Vehículo	
	Identidad	
	Vehículo de rhASA (154 mM NaCl, 0,005% polisorbato 20, pH ~6,0)	

Condiciones de Almacenamiento Aproximadamente 4°C

Preparación del vehículo

5 El vehículo se usó como se proporcionó. El vehículo se dejó reposar en la parte superior del banco (ambiente). Una vez que el vehículo se había reposado el material se mezcló haciéndolo girar suavemente e invirtiéndolo. Los frascos no se agitaron en Vortex ni se sacudieron. El frasco se secó antes de tener acceso al material. Cualquier vehículo restante se retornaba al refrigerador (1°C-8°C).

10 **Reparación de la formulación de la dosis**

15 La rhASA se diluyó con vehículo para alcanzar las concentraciones necesarias. El artículo en evaluación se dejó reposar en la parte superior del banco (ambiente). Una vez que el artículo en estudio se había reposado, el material se mezcló haciéndolo girar suavemente e invirtiéndolo. Los frascos no se agitaron en Vortex ni se sacudieron.

Tintes para trazar las inyecciones:

20 Se utilizó un tinte infrarrojo (como IRDye®, LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) para rastrear las inyecciones. Tintes como éste se han usado en las inyecciones intratecales como un procedimiento de sobrevida tras la administración intratecal. El tinte se mezcló con el artículo en estudio antes de su administración; se añadió un 1 nmol de tinte en 1 µL al artículo en estudio. Además del tinte infrarrojo, se usó 1 µL de azul FD&C #1 (0,25%) para rastrear las inyecciones. Este tinte azul es un aditivo común de los alimentos y generalmente se considera que es seguro y no tóxico.

Inyección por vía IT Lumbosacra de rhASA o vehículo

30 Los animales en los Grupos B, D, E, y F recibieron inyecciones intratecales los Días 1, 9, 15 o 16, y 22.

35 Los ratones adultos se anestesiaron usando 2,2,2 tribromoetanol 1.25% (Avertin) a 200-300 µL/10 gramos de peso corporal (250-350 mg/kg) por inyección intraperitoneal. Se removió el cabello dorsal entre la base de la cola y los hombros usando unas pinzas. El área afeitada se frotó con una gasa de povidine/betadine seguido por alcohol isopropílico. Se hizo una pequeña incisión en la la piel en la línea media (1-2 cm) sobre la columna lumbosacra y se identificó la intersección de la línea media dorsal y la cara craneal de las crestas ilíacas (ileon singular). El músculo en la fosa ilíaca (gluteus medius) es un músculo en forma de corazón. Los dos lados de la porción superior del «corazón» se aproximan a la locación de las crestas ilíacas. Se unió una aguja calibre 32 unida a una jeringa Hamilton de vidrio estrecha a gas de 10-20 µL hasta que se sintió resistencia desde el hueso subyacente. La inyección de 10 µL del artículo en en estudio, 1 µL de tinte infrarrojo y 1 µL de azul FD&C #1 (volumen de inyección total de 12 µL) se realizó a una tasa aproximada de 2 µL/20 segundos (12 µL/2 minutos). La incisión en la piel se cerró usando clips de herida. El éxito de la inyección se juzgó por imágenes para determinar si el contraste infrarrojo se había distribuido a lo largo del SNC, así como el contraste azul visible. Luego de las imágenes, al animal se le permitió recuperarse en una cámara de recuperación.

45 **Inyección por vía intravenosa de rhASA**

Los animales en el Grupo C recibieron inyecciones intravenosas los Días 1,9, 15, y 22.

50 Para las inyecciones IV, los animales fueron anestesiados usando isoflurano, si se requería, y eran colocados en un inmovilizador. La vena de la cola se dilató por reposo golpeando suavemente la cola con el dedo. El sitio de la inyección se frotó con etanol 70%. Alternativamente, el animal era colocado en una cámara caliente (40°C) por 1-1,5 minutos. Se usó una aguja calibre 28 a 30 para inyectar el material en estudio. El volumen de la inyección era de 5-10 mL/kg.

55 Aproximadamente 24 horas después de la cuarta dosis, los animales en los Grupos B-F fueron sacrificados. Los animales fueron sometidos a diferentes procedimientos de recolección de tejidos, como se detalla a continuación. Los animales en el Grupo A no fueron tratados; sin embargo, fueron sacrificados el 27 o 28 de enero de 2011, y fueron sometidos a diferentes procedimientos de recolección de tejidos, como se detalla a continuación.

60 **Suero (todos los animales)**

65 Se recolectó una muestra de sangre terminal (aproximadamente 0,5 mL) de todos los animales (Grupos A-F) a través de punción retroorbital bajo anestesia con isoflurano. Se colocó un tubo de vidrio en la órbita, penetrando suavemente el área detrás del ojo e interrumpiendo así el drenaje venoso localizado detrás del ojo.

La sangre se recolectó por acción capilar y/o gravedad. Luego de la recolección de sangre, se aplicó presión a la órbita para parar el sangrado.

5 Las muestras de sangre completa se procesaron para obtener el suero y se congelaron a <-80°C. El suero se almacenó a -80°C y se analizaron los anticuerpos.

Tejidos para investigación con microscopio óptico (Grupos A-F; 5 ratones por grupo)

10 Luego de la recolección de sangre, los animales fueron sacrificados a través de asfixia por CO₂. Se recolectó un trozo de la cola antes de la perfusión y se congeló para un posible genotipeaje. Se expuso la cavidad pericárdica. Tres (3) ratones por grupo fueron perfundidos por vía trascardíaca con solución fisiológica heparinizada (1 U/mL heparina sódica en 0.9% NaCl, filtrada y estéril) fría con hielo y luego con paraformaldehído 4% aproximadamente a 4°C. Se removió el cerebro, y se cortó el abdomen para exponer los órganos internos. El cerebro y la carcasa se colocaron en paraformaldehído, excepto por el trozo de cola que se congeló.

15 **Tejidos para análisis de lípidos (Grupos A, B, y F; 6, 4 y 5 animales, respectivamente)**

20 Luego de la recolección de sangre, los animales fueron sacrificados a través de asfixia con CO₂. Se recolectó un trozo de cola antes de la perfusión y se congeló para su posible genotipeaje. Se expuso la cavidad pericárdica. Tres (3) ratones por grupo fueron perfundidos por vía trascardíaca con solución fisiológica heparinizada (1U/mL heparina sódica en 0.9% NaCl, filtrado y estéril) fría con hielo.

Tabla 39: Tejidos recolectados para el análisis de lípidos

Tejidos recolectados para el análisis de lípidos		
	Cerebro (separado en hemisferios izquierdo y derecho y pesados)	Riñón (2)
	Médula espinal (removida de la columna espinal)	
30	Nervio ciático (2) (disecado libre de músculo)	Trozo de cola (antes de la perfusión)

35 Después de la recolección, los tejidos fueron pesados y luego congelados, sobre hielo seco o colocándolos en un congelador a -80°C. El cerebro se separó en los hemisferios izquierdo y derecho. El derecho se utilizará para análisis de lípidos por MS. El izquierdo se analizará para un posible análisis de N-acetilo-L-aspartato. Los tejidos se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

Tabla 40: Condiciones de almacenamiento de la muestra

	Tipo de muestra	Temp. de almacenamiento
	Suero	congelado a <i>circa</i> -80°C
45	Tejidos para el análisis de lípidos	congelado a <i>circa</i> -80°C
	Trozos de cola	congelado a <i>circa</i> -80°C
50	Tejidos para microscopía óptica	Aproximadamente 4°C

55 La rhASA redujo el depósito de sulfatida en la médula espinal de los ratones con MLD, particularmente en la sustancia blanca, figura 114. El análisis morfométrico de la médula espinal demostró que la densidad óptica de la tinción con azul alciano se redujo de forma estadísticamente significativa tras la dosificación con rhASA, figura 115. Los ratones MLD tratados con rhASA también exhibieron una actividad lisosomal reducida en el cerebro, figura 116. Esta reducción fue estadísticamente significativa en el grupo con dosis alta (0,21 mg - 520 mg/kg de peso cerebral) comparado con los animales tratados con vehículo, figura 117.

60 Los ratones MLD inmunitolerantes (hASAC69S/ASA(-/-)) mayores de 1 año de edad recibieron la administración por vía intratecal-lumbar de rhASA una vez a la semana por 4 semanas (un total de 4 dosis). Las dosis fueron vehículo (154 mM NaCl, 0,005% polisorbato 20, pH ~6,0), 0,04, 0,12, o 0,21 mg/dosis (las dosis normalizadas fueron 100, 300 y 520 mg/kg de peso cerebral, respectivamente). En los puntos terminales de tiempo se evaluó la eficacia por evaluación inmunohistoquímica de depuración de sulfatida y actividad lisosomal dentro del cerebro y la médula espinal. Las secciones de médula espinal y cerebro se tiñeron usando azul alciano dirigido a las sulfatidas en los tejidos. Las secciones cerebrales también se tiñeron buscando la presencia de proteína de membrana lisosomal asociada (LAMP), un indicador de procesos lisosomales.

Adicionalmente, se realizó un análisis morfométrico sobre las secciones teñidas con azul alciano y LAMP de la médula espinal (cervical, torácica y lumbar) y el cerebro.

5 Estos resultados preliminares demuestran la eficacia de la administración intratecal lumbar de rhASA. Comparados con los ratones de control con vehículo, los ratones con MLD tratados con rhASA mostraron evidencia de mejoría dentro de los marcadores histológicos de enfermedad, como un depósito reducido de sulfatida (notado por la tinción con azul alciano) y actividad lisosomal en el cerebro. Estos cambios histopatológicos se observaron cerca del sitio de administración (región lumbar de la médula espinal), en la médula espinal distal, así como en las porciones distales del cerebro.

10 EJEMPLO 18 - BIODISTRIBUCIÓN 2

Revisión

15 En este estudio, 36 Monos Cynomolgus machos jóvenes (<12 meses al inicio) y 36 hembras fueron asignados a cada uno de 5 grupos de dosis y recibieron rhASA a dosis de 0 (control del equipo; los animales fueron dosificados con 0,6 mL de PBS), 0 (vehículo control), 1,8, 6,0, o 18,6 mg (Grupos 1, 2, 3, 4, y 5, respectivamente) una semana sí una semana no por 6 meses para un total de 12 dosis. Todas las dosis fueron 20 administradas como una infusión en un volumen de 0,6 mL, seguido por una descarga de 0,5 mL de PBS en aproximadamente 10 minutos (Tabla 41).

Tabla 41: Diseño del estudio

Diseño del estudio

Grupo	Nº de animales	Concentración de dosis nominal (mg/mL)	Dosis administrada (mg)	Nº de animales, 6 meses sacrificio	Nº de animales, 1 mes sacrificio de recuperación
1	4M, 4F	DC	0	-	4M, 4F
2	8M, 8F	0	0	4 M, 3 Fa	4M, 4F
3	8M, 8F	3	1,8	4 M, 4 F	4M, 4F
4	8M, 8F	10	6,0	4 M, 4 F	4M, 4F
5	8M, 8F	31	18,6	4 M, 4 F	4M, 4F

25 DC = control del dispositivo; animales del Grupo 1 no se dosificaron con vehículo o artículo de ensayo.

30 a Animal de Control de Vehículo Nº 044 se sacrificó tempranamente en el Dia 50 debido a un catéter con fugas

40 MATERIALES Y MÉTODOS

45 Recolección de tejido

Los cerebros se cortaron en una matriz cerebral a 3mm de grosor de lámina coronal. Cada cerebro fue cortado en completo láminas coronales incluyendo: neocorteza (incluyendo corteza frontal, parietal, temporal y occipital); paleocorteza (bulbos olfatorios y/o lóbulo piriforme), ganglios basales (incluyendo caudado y putamen), sistema límbico (incluyendo hipocampo y giro cingulado), tálamo/hipotálamo, regiones mesencefálicas (incluyendo la sustancia nigra), cerebelo, puente y médula oblonga. Las locaciones a partir de las cuales se obtuvieron las muestras de tejido (a través de punción biopsia de 4 mm) se muestran en las figuras 133-138. Las imágenes en las figuras 133-138 son de las Colecciones de Cerebro Mamífero Comparativo de la Universidad 50 de Wisconsin y Estado de Michigan (También el Museo Nacional de Salud y Medicina). La punción número 22 no se recolectó, ya que esta estructura no estaba presente durante la autopsia. Todas las muestras cerebrales se congelaron y almacenaron a -60°C o menos antes del análisis para rhASA usando ELISA.

55 La primera lámina y cada segunda lámina luego de ella se fijaron en formalina para la evaluación histopatológica y inmunohistoquímica. La segunda lámina y cada segunda lámina luego de ella se congelaron para el análisis de concentración del artículo en estudio. Antes del congelamiento, las muestras de cerebro se tomaron de la porción derecha de las enumeradas, artículo en estudio análisis de láminas de cerebro para análisis de biodistribución. Se fotografió la locación de las muestras de cerebro en la autopsia y se registró el número de lámina cerebral. Las muestras se obtuvieron usando un perforador circular de 4 mm o se cortaron con un bisturí para optimizar la cantidad de sustancia blanca recolectada. Todas las muestras se congelaron y almacenaron a -60°C o menos para el análisis del artículo en estudio. El resto de la lámina de cerebro se congeló y almacenó a -60°C o menos para el posible análisis del artículo en estudio.

60 La médula espinal (cervical, torácica y lumbar) se cortó en secciones de un centímetro. La primera lámina y una lámina sí segunda lámina después se fijó en formalina para la evaluación histopatológica y

análisis inmunohistoquímico. La segunda lámina de médula espinal y cada segunda lámina después de esto se congelaron y almacenaron a -60°C o menos para el análisis del artículo en estudio. La distribución de las láminas se ajustó de forma que la lámina con la punta del catéter intratecal (Lámina 0) se fijó en formalina y se analizó para histopatología.

5

Preparación de los extractos de cerebro, hígado y médula y determinación de la concentración de rhASA

Los fragmentos de cerebro, médula espinal e hígado se analizaron usando un método validado en cumplimiento con las Regulaciones de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos regulaciones 21 CFR, Parte 58 y con los procedimientos operativos estándar de Midwest BioResearch cuando aplicaba. Las muestras de tejido se homogenizaron en tampón de lisis, se centrifugaron para retirar cualquier desecho de tejido, y se almacenaron a -80°C hasta su estudio. La concentración de rhASA en las fracciones solubles de los homogenados se determinó con un ELISA usando anticuerpo de conejo policlonal SH040 como el anticuerpo de captura y Anticuerpo monoclonal anti-ASA conjugado con HRP (peroxidasa de rábano picante) 19-16-3 como el anticuerpo de detección. Luego de un paso de lavado para retirar los materiales no unidos, la solución del sustrato de tetrametilbenzidina (TMB) reaccionó con el peróxido en presencia del anticuerpo conjugado con HRP para producir una señal colorimétrica que era proporcional a la cantidad de rhASA unida por el anticuerpo anti-ASA en el paso inicial. La cantidad resultante de rhASA en cada homogenado tisular se interpoló a partir de una curva estándar.

20

Las muestras también fueron analizadas con un ensayo de determinación de proteína de ácido bicinconínico (BCA) para obtener la concentración de proteína en la muestra. La concentración de proteína para cada muestra se determinó por interpolación de una curva estándar de albúmina. Los resultados de la concentración de rhASA se normalizaron a proteína total en los extractos de tejido, determinada por estándar de albúmina. Los resultados de la concentración de rhASA se normalizaron a proteína total en los extractos de tejido, determinada por la prueba de ácido bicinconínico.

25

Los niveles de rhASA de todos los fragmentos para los grupos con vehículo, 1,8 mg/dosis, 6,0 mg/dosis y en la figura 118, figura 119, figura 120, y figura 121, respectivamente. Los niveles de rhASA de todos los fragmentos para los animales en recuperación para los grupos control de equipo, vehículo, 1,8 mg/dosis, 6,0 mg/dosis y 18,6 mg/dosis se muestran en la figura 122, figura 123, figura 124, figura 125, y figura 126, respectivamente.

30

Los niveles de rhASA para los fragmentos seleccionados tomados cerca de la superficie (meninges) del cerebro se muestran en figura 127. Los niveles de rhASA para los fragmentos seleccionados que se consideran contienen principalmente sustancia blanca profunda se muestran en la figura 128. La sustancia blanca está compuesta por haces de procesos celulares nerviosos mielinizados (o axones). Los fragmentos seleccionados que contienen principalmente material de la sustancia gris profunda se muestran en la figura 129. La sustancia gris contiene cuerpos celulares, en contraste con la sustancia blanca. Los valores de rhASA en los fragmentos seleccionados de la superficie, sustancia blanca profunda y sustancia gris profunda se muestran para cada grupo de dosis en la figura 130.

Los datos de concentración en la médula espinal se muestran en la figura 131.

35

Los datos de concentración en el hígado se muestran en la figura 132.

Los niveles de concentración de rhASA en el hígado, médula espinal y cerebro de los grupos control de equipo y vehículo eran en algunos casos medibles. Los niveles en hígado y médula espinal eran menores que en cualquiera de los grupos tratados con rhASA. tejidos control y vehículo no representan valores cuantitativos para rhASA en los Monos Cynomolgus en los tejidos, porque el grado de reactividad cruzada entre el anticuerpo y el ASA Cynomolgus no se conoce, y el hecho que los estándares del ensayo usan rhASA. Sin embargo, la variación en los niveles de rhASA medidos en los tejidos de los animales con control de equipo y vehículo puede interpretarse como la demostración de la variabilidad en las cantidades relativas de rhASA Cynomolgus en diferentes tejidos y regiones anatómicas.

40

Los niveles de rhASA en las láminas de médula espinal fluctuaron entre 160-2352, 1081-6607, y 1893-9252 ng/mg proteína en los machos y 0-3151, 669-6637, y 1404-16424 ng/mg proteína en las hembras para los grupos con 1,8, 6,0, y 18,6 mg/dosis, respectivamente (figura 127). Los niveles de rhASA eran mayores en la región lumbar de la médula que en la región cervical. Los niveles de proteína rhASA detectados en el hígado respondían a la dosis en los grupos tratados con rhASA y eran muy bajos en el grupo con vehículo. Los niveles medios de rhASA eran 88, 674, y 2424 en los machos y 140, 462, y 1996 ng/mg proteína en las hembras para los grupos con 1,8, 6,0, y 18,6 mg/dosis, respectivamente (figura 128).

45

En general, el nivel de rhASA parecía estar relacionado con la dosis en las muestras preparadas a partir de las láminas de médula espinal y hígado de los grupos dosificados con rhASA. Muchas de las regiones

cerebrales evaluadas demostraron una clara relación de dosis entre los niveles de rhASA y la administración de rhASA, mientras que otras eran más equívocas. En general, los niveles de rhASA en el cerebro aumentaron con la dosis de rhASA.

5 EJEMPLO 19: FARMACOCINÉTICA (PK) Y BIODISTRIBUCIÓN DE rhASA ADMINISTRADA IT VS IV

El objetivo de este estudio es evaluar la farmacocinética y biodistribución de varias enzimas de reemplazo terapéutico tras la administración por vía intratecal (IT) e intravenosa (IV) a monos Cynomolgus.

10 En este estudio, un total de doce Monos Cynomolgus machos y doce hembras con catéteres intratecales-lumbares (IT-L) fueron asignados al azar por peso corporal en cuatro grupos de tratamiento para la Fase 1a (administración de I2S) y Fase 1b (administración de rhASA).

15 Se recolectó sangre y LCR (del catéter IT-CM) a intervalos específicos post dosificación para ambas fases. Luego que se recolectaron las últimas muestras de la Fase 1a, a los animales se les permitió un período de lavado de 7 días antes de Iniciar la Fase 1b.

20 Luego que se recolectaron las últimas muestras de la Fase 1b, a los animales se les permitió un período de lavado de 7 días entre el inicio de la Fase 2. Un total de 12 Monos Cynomolgus machos y hembras de la Fase 1b fueron asignados al azar peso corporal en 12 grupos de tratamiento de I2S (Grupos 1a-6a) y rhASA (Grupos 1b-6b).

25 La biodisponibilidad absoluta de rhASA en suero tras la administración por vía IT-L es ~30 a 40%. Por el contrario, solo 0,5% de la dosis IV es biodisponible en el LCR.

La exposición a la rhASA en suero aumenta en una forma más que proporcional tras la administración por vía IT-L.

30 Tras la administración por vía IT-L, la exposición a la rhASA en LCR aumenta en una forma menos que proporcional al aumentar la dosis.

Tabla 42 - Resumen de parámetros PK de rhASA en suero de Monos Cynomolgus

35 Media (CV%)	Arilsulfatasa A en suero			
	Arilsulfatasa A (Fase 1b: IV 1 mg/kg)	Arilsulfatasa A (Fase 1b: IT-L 1.8 mg)	Arilsulfatasa A (Fase 1b: IT-L 6 mg)	Arilsulfatasa A (Fase 1b: IT-L 18.6 mg)
N	8	6	8	8
AUC _{0-t} (ng·h/mL)	10505 (16,9)	2219 (41,9)	10352 (31,9)	17583 (28,2)
AUC _{0-∞} (ng·h/mL)	11069 (17,2)	NC (NC)b	9634 (28,9)c	20789 (27,8)d
C _{max} (ng/mL)	11911 (20,0)	363 (40,4)	1160 (29,9)	1621 (25,1)
T _{maxa} (h)	0,08 (0,08, 0,08)	4,00 (2,00, 4,00)	4,00 (1,00, 4,00)	3,00 (1,00, 4,00)
t _{1/2} (h)	6,55 (31,8)	NC (NC)b	6,77 (21,4)c	7,40 (32,8)d
CLor CL/F (mL/h)	261 (17,0)	NC (NC)b	654 (25,0)c	944 (25,4)d
V _z o V _z /F (mL)	2418 (32,4)	NC (NC)b	6523 (41,3)c	9686 (25,8)d

Tabla 43 - Resumen de parámetros PK de rhASA en LCR de monos Cynomolgus

Media (CV%)	CSF Arilsulfatasa A			
	Arilsulfatasa A (Fase 1b: IV 1 mg/kg)	Arilsulfatasa A (Fase 1b: IT-L 1,8 mg)	Arilsulfatasa A (Fase 1b: IT-L 6 mg)	Arilsulfatasa A (Fase 1b: IT-L 18,6 mg)
N	4	6	8	8
AUC0-t (ng·h/mL)	1629 (179,8)	1267266 (86,6)	5334329 (68,8)	8028775 (71,2)
AUC0-∞ (ng·h/mL)	8221 (NC)b	1595942 (79,1)c	4291829 (84,2)d	9406664 (64,5)e
Cmax (ng/mL)	69,3 (94,2)	345167 (48,7)	1039079 (73,6)	1841125 (62,8)
Tmaxa (h)	6,00 (1,00, 8,00)	0,08 (0,08, 4,00)	0,29 (0,08, 4,00)	2,04 (0,08, 4,00)
t1/2 (h)	37,6 (NC)b	23,6 (68,3)c	17,1 (31,3)d	13,4 (29,3)e
CLor CL/F (mL/h)	392 (NC)b	1,95 (74,1)c	38,1 (214,8)d *	3,04 (66,1)e
Vz or Vz/F (mL)	21237 (NC)b	80,6 (110,4)c	1090 (215,1)d	67,6 (81,2)e

Tabla 44 - Biodisponibilidad de rhASA en suero y LCR

	Comparación de biodisponibilidad absoluta		
	Arilsulfatasa A (Fase 1b: IT-L 1,8 mg)	Arilsulfatasa A (Fase 1b: IT-L 6 mg)	Arilsulfatasa A (Fase 1b: IT-L 18,6 mg)
Fabs (%)	NC	39,9	27,3

La biodisponibilidad absoluta de rhASA en suero tras la administración por vía IT-L es ~30 a 40%. Por el contrario, solo 0,5% de la dosis administrada por vía IT es biodisponible en LCR.

Tabla 45 - Partición LCR:Suero

LCR: Partición de plasma			
Arilsulfatasa A (Fase 1b: IV 1 mg/kg)	Arilsulfatasa A (Fase 1b:IT-L 1,8 mg)	Arilsulfatasa A (Fase 1b: IT-L 6 mg)	Arilsulfatasa A (Fase 1b:IT-L 18,6 mg)
0,74	NC	445	452

EJEMPLO 20 - TRATAMIENTO DE PACIENTES CON MLD

La administración directa al SNC a través, p.ej., de la vía IT puede usarse para tratar efectivamente los pacientes con MLD. Este ejemplo, ilustra un estudio multicéntrico de escalación de dosis para evaluar la seguridad hasta 3 niveles de dosis una semana sí una semana no (every other week, EOW) por un total de 40 semanas de rhASA administrada a través de un equipo de administración intratecal (IDDD) a pacientes con MLD infantil tardía. Varios equipos de administración intratecal de medicamentos idóneos para tratamiento en humanos se ilustran en la figura 94, figura 95, figura 96 y figura 97.

Se reclutarán hasta 20 pacientes:

Cohorte 1: 5 pacientes (Dosis mínima)

Cohorte 2: 5 pacientes (dosis intermedia)

Cohorte 3: 5 pacientes (dosis máxima)

5 pacientes serán asignados al azar a ningún tratamiento.

5 Los pacientes son seleccionados para el estudio según la inclusión de los siguientes criterios: (1) aparición de los primeros síntomas antes de los 30 meses de edad; (2) caminar al momento de la evaluación (definido como la capacidad de pararse solo y caminar hacia delante 10 pasos tomado de una mano); (3) presencia de signos neurológicos al momento de la evaluación. Los pacientes con historia de trasplante de células madres hematopoyéticas son excluidos.

10 Se determina la seguridad de las dosis ascendentes de rhASA administrada por inyección IT por 40 semanas en niños con MLD Infantil tardía. Además, se evalúa la actividad clínica de la rhASA sobre la función motora gruesa y la farmacocinética con dosis única y repetida en el suero y las concentraciones en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

15 **Ejemplos de administración por vía IT de HNS**

EJEMPLO 21: ADMINISTRACIÓN INTRATECAL CRÓNICA DE HEPARÁN N-SULFATASA

20 Este ejemplo demuestra que la administración intratecal puede usarse para administrar de forma efectiva una enzima lisosomal, como la heparán N-sulfatasa humana recombinante (rhHNS), en los tejidos cerebrales para el tratamiento de los síntomas neurológicos de la mucopolisacardiosis IIIA (MPS IIIA; síndrome de Sanfilippo tipo A), el rasgo clínico definitorio de este trastorno. Los experimentos descritos en este ejemplo demuestran que la administración IT crónica de rhHNS fue bien tolerada con actividad enzimática relacionada 25 con la dosis en el cerebro, médula espinal e hígado.

30 En resumen, se ha desarrollado una formulación intratecal (IT) de heparán N-sulfatasa (HNS) humana recombinante para el tratamiento de los síntomas neurológicos de la mucopolisacardiosis IIIA (MPS IIIA; síndrome de Sanfilippo tipo A) el rasgo clínico definitorio de este trastorno. Debido a que la edad promedio de los pacientes con MPS IIIA es 4,5 años, los estudios pivotales de toxicología para HNS se condujeron en Monos Cynomolgus jóvenes para evaluar los efectos sobre el cerebro en desarrollo. A los monos se les implantó un equipo de administración intratecal (IT)-lumbar de medicamento y se les dosificó una semana sí una semana no con infusión a corto plazo (1,5, 4,5 o 8,3 mg/dosis de HNS por 6 meses; 12 dosis), recibiendo los controles de equipo y vehículo solución fisiológica tamponada con fosfato o vehículo, respectivamente. Ocho animales por grupo (4/sexo) fueron sacrificados a los 3 y 6 meses (grupo control de equipo autopsiados a los 3 meses), y 8 animales del grupo con vehículo y los 3 grupos con dosis de HNS fueron autopsiados 1 mes después de la dosis IT final. No se observaron signos clínicos o lesiones del sistema nervioso central relacionados con el HNS. Comparados con los controles, había infiltrados celulares de severidad ligera a mínima en las meninges/perineurio que rodean el cerebro/médula espinal que se correlacionaban con aumentos transitorios en 35 los leucocitos del líquido cefalorraquídeo (LCR), predominantemente eosinófilos, los cuales se resolvían 1 mes post-dosis final. Estos cambios no se asociaban con ningún cambio morfológico adverso en el cerebro o la médula espinal. Parecía haber una tendencia relacionada con la dosis hacia mayores niveles medios de HNS en LCR y en los niveles de actividad de HNS en el cerebro, médula espinal e hígado. El nivel de no efecto adverso 40 observado fue 8,3 mg/dosis una semana sí una semana no, la mayor dosis administrada, indicando que la HNS puede administrarse con seguridad por vía intratecal a varias concentraciones incluyendo concentraciones 45 mayores de 8,3 mg/dosis.

Síndrome de Sanfilippo tipo A

50 La mucopolisacardiosis tipo IIIA (MPS IIIA; síndrome de Sanfilippo tipo A), un raro trastorno de depósito lisosomal que afecta aproximadamente a 1 en 100,000 personas en todo el mundo, resulta de la ausencia o función defectuosa de la heparán N-sulfatasa (HNS) (Neufeld EF, et al. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (2001) pp. 3421-3452), una exosulfatasa involucrada en el catabolismo lisosomal del glicosaminoglicano (GAG) heparán sulfato. En la ausencia de esta enzima, el GAG heparán sulfato se acumula 55 en los lisosomas de las neuronas y células gliales, con menos acumulación fuera del cerebro. El rasgo clínico definitorio de este trastorno es la degeneración del sistema nervioso central (SNC), la cual resulta en la pérdida de, o falla en alcanzar, las metas mayores del desarrollo. El descenso cognitivo progresivo culmina en demencia y mortalidad prematura.

60 **Administración de rhHNS por vía IT**

Debido a que la edad promedio de los pacientes con MPS IIIA es 4,5 años, los estudios pivotales de toxicología para la HNS se condujeron en Monos Cynomolgus jóvenes (selección de especie basada en la similitud genética y anatómica con los humanos) para evaluar los efectos sobre el cerebro en desarrollo. La equivalencia etaria de los monos con los humanos según se cita en la literatura varía entre 7.6 meses y 12.1

5 meses para los niños entre 30 y 40 meses de edad (Hood RD, Developmental and Reproductive Toxicology: A practical approach (2006) p. 276). Como parte de este esfuerzo, se condujo un estudio de toxicología por 6 meses en Monos Cynomolgus jóvenes para evaluar la administración por vía IT lumbar de HNS. Los datos obtenidos de un estudio de toxicidad previo de un mes en Monos Cynomolgus jóvenes guió la selección del nivel de dosis del estudio de 6 meses de dosis repetidas en monos jóvenes. Hasta donde sabemos, éste es el primer estudio que involucra la administración crónica por vía IT de ERT en primates jóvenes no humanos.

10 Cincuenta y seis Monos Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) jóvenes machos y 56 hembras de aproximadamente 6 a 9 meses de edad con un peso entre 0,82 y 1,81 kg se usaron en este estudio. Los monos fueron alimentados con 15 bizcochos de Dieta para Primate Certificada por PMI 5048 (Richmond, IN) diariamente. El agua se administraba ad libitum a través de un sistema automático de agua filtrada y se suspendía durante los períodos de recolección de orina. Los monos fueron alojados en grupo (dos por jaula) por 2 a 4 semanas en jaulas de acero inoxidable al llegar con la excepción de los monos de 3 meses; éstos fueron alojados individualmente en jaulas de acero inoxidable. Por la duración del estudio, todos los monos fueron alojados en jaulas individuales de acero inoxidable en cuartos con temperatura y humedad controladas con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

15 Antes de iniciar el estudio, a todos los monos se les implantaron quirúrgicamente puertos SC y catéteres IT. Se les administró succinato sódico de prednisolona (IV, 30 mg/kg) y flunixin meglumine (intramuscular[IM], 2 mg/kg) antes de la cirugía. Los monos fueron pretratados con sulfato de atropina SC (0,04 mg/kg), sedados con ketamina HCl IM; 8 mg/kg), intubados, y mantenidos aproximadamente con 1L/min de oxígeno e isoflurano 2,0%. Se hizo una incisión sobre los procesos dorsalis de la columna lumbar (L₄, L₅, o L₆), y se hizo una hemilaminectomía para la inserción de un catéter con punta de poliuretano (25 cm de largo, 0,9 mm de diámetro externo x 0,5 mm de diámetro interno, con seis agujeros laterales de 0,33 mm de diámetro) en L₃ , L₄, o L₅ . El catéter fue insertado a través de una pequeña incisión en la dura y se avanzó aproximadamente 10 cm anterógrado al área de la unión toracolumbar. Se unió un puerto SC de titanio al catéter IT y fue implantado en el tejido SC. La colocación apropiada del catéter fue confirmada por mielograma usando Isovue-300 (0.8 ml; Bracco Diagnostics, Inc., Princeton, NJ). Luego que se recuperaron de la cirugía, los monos recibieron tartrato de butorfanol (IM, 0,05 mg/kg) y ceftiofur sódico (IM, 5,0 mg/kg dos veces al día por 2 días).

20 En este ejemplo, la HNS se proporcionó en un vehículo de formulación IT incluyendo 5 mM fosfato de sodio, 145 mM cloruro de sodio y polisorbato 20 0,005% (pH 7,0). Se administraron dosis una semana sí una semana no de HNS como infusión a corto plazo en aproximadamente once minutos: 0,6 mL (4 minutos) seguidos con una descarga de 0,5 mL de solución fisiológica tamponada con fosfato (PBS) (7 minutos). Los monos en el grupo de control de vehículo recibieron solamente la formulación IT; los monos DC recibieron PBS (pH 7.2) IT.

Morbilidad y mortalidad

25 40 No hubo muertes o sacrificios tempranos relacionados con la HNS. No se notaron signos clínicos relacionados con la HNS en la dosificación o durante las observaciones diarias. La colocación errónea, prurito, temblores y ataxia observados durante y después de la dosificación se resolvieron en pocos minutos a aproximadamente 4 horas de la administración, y se consideraron una respuesta relacionada con el volumen más que una reacción a la HNS o al vehículo. Los signos clínicos observados durante e inmediatamente después de la dosificación se vieron a una incidencia comparable en los grupos control (DC y/o grupo dosificado con vehículo); no hubo evidencia de una respuesta de dosis. En general, la incidencia de signos clínicos al momento de la dosificación disminuyeron con cada dosis posterior. No hubo cambios relacionados con la HNS en el peso corporal, consumo de comida y hallazgos físicos y neurológicos, o alteraciones en el EKG o los exámenes oftalmológicos.

30 45 50 Patología clínica

55 55 No hubo cambios que se consideraran relacionados con la HNS en los parámetros de hematología, química sérica, coagulación u orina en ningún intervalo.

60 65 Cuenta celular y química en el LCR

Hubo aumentos relacionados con la dosis en la cuenta media de leucocitos en el LCR para todos los grupos, incluyendo los grupos DC y 0 mg/dosis 24 horas post dosis. Hubo un aumento general en la cuenta leucocitaria con cada dosis administrada. Recolección de LCR de aproximadamente la mitad de los monos antes de la dosificación demostró que estos efectos habían desaparecido en las 2 semanas desde la dosis previa. Despues de la dosis 5, además de un aumento en los leucocitos, se observó una mayor proteína y albúmina total media en LCR para los machos dosificados con HNS en los grupos con 4,5 y 8,3 mg/dosis (hasta 4 a 5 veces) comparados con la media predosis ($P \leq 0,05$ versus el grupo DC y 0 mg/dosis); se evidenció menos que una tendencia en los grupos de dosificados con HNS.

Concentraciones de HNS y análisis de anticuerpos

Los niveles medios de HNS en suero eran < límite de detección (LOD) para todos los grupos en estudio para todos los puntos de tiempo. La concentración de HNS en el LCR de los monos en el grupo DC y control dosificado con vehículo generalmente estaba por debajo del límite de cuantificación (LOQ). Aunque no se realizaron análisis estadísticos, parecía haber una tendencia relacionada con la dosis hacia mayores niveles medios de HNS en LCR en los grupos con 1,5, 4,5, y 8,3 mg/dosis. Los niveles medios de HNS predosis en LCR eran significativamente menores que los niveles postdosis en LCR. Las concentraciones medias de HNS para la cohorte de 6 meses (ambos sexos) al terminar el estudio (principal y autopsia a la recuperación) se resumen en la Tabla 46. A un nivel dado de dosis, las concentraciones medias de HNS en el LCR parecían mantenerse en el mismo rango (figura 146A) a pesar de los niveles de anticuerpo anti-HNS en el suero y LCR, los cuales continuaron aumentando a lo largo del estudio.

15 Tabla 46: Concentraciones de HNS en LCR al terminar el estudio (principal y autopsia a la recuperación).

	Autopsia principal			Autopsia tras la recuperación	
Grupo	n	Media ± SD ^a (ng/mL)		n	Media ± SD (ng/mL)
Vehículo	8	-		8	NA
1,5 mg IT	8	516.366 ± 1.024.084		8	NA
4,5 mg IT	7	377.460 ± 304.996		7	NA
8,3 mg IT	8	419.492 ± 345.975		8	NA

LCR, líquido cefalorraquídeo; HNS, heparán N-sulfatasa humana; n = número de muestras por encima del LOQ; IT, intratecal; SD, desviación estándar.

^a = muestras recolectadas aprox. 24 horas postdosis.

NA = no había muestras disponibles para el análisis o las muestras estaban por debajo del LOQ.

En la cohorte de 6 meses/recuperación, ninguno de los monos en el grupo de control de equipo (solo PBS) ni los dosificados con vehículo desarrollaron anticuerpos anti-HNS en suero o LCR en ningún punto de tiempo evaluado. Todos los monos en los grupos con 1,5, 4,5 y 8,3 mg/dosis resultaron negativos (<LOD) para los anticuerpos anti-HNS en las muestras de suero y LCR recolectadas preestudio (para LCR) y en la predosis 2. Al final del estudio, todos los monos resultaron positivos para los anticuerpos anti-HNS en el suero.

Todos los monos en los grupos con 1,5 mg/dosis y 8,3 mg/dosis y seis de ocho monos en el grupo con 4,5 mg/dosis resultaron positivos para los anticuerpos anti-HNS en el LCR en uno o más puntos de tiempo. Debido a que en dos menos en el grupo con 4,5 mg no tenían muestras recolectadas en ningún punto de tiempo incluyendo la autopsia, estos resultados parecerían indicar que todos los monos dosificados con HNS produjeron una respuesta de anticuerpo.

En los tres niveles de dosis, se detectaron concentraciones de anticuerpo anti-HNS en suero. Despues de la dosis 2, y los niveles aumentaron notablemente. Despues de la dosis 4. Aunque no se realizaron análisis estadísticos, parecía haber una tendencia relacionada con la dosis hacia una mayor concentración sérica de anticuerpo; al final del estudio, los niveles eran comparables a través de los 3 grupos de dosis de HNS (figura 146B). Los niveles de anticuerpo anti-HNS en el suero fueron siempre mayores que en el LCR por el curso de tiempo de este estudio (concentraciones de anticuerpo suero/LCR de 9 a 236 veces); las mayores proporciones de las concentraciones de suero a LCR (98 y 236 veces) se vieron en el nivel de dosis de 8,3 mg al principio del curso de dosificación (6 y 10 semanas).

Las concentraciones de anticuerpo anti-HNS en el suero aumentaron 9, 16 y 16 veces en los niveles de 1,5 mg, 4,5 mg y 8,3 mg/dosis, respectivamente, al principio del tiempo de la dosificación (de la semana 6 a la semana 14). Durante el mismo período de tiempo, las concentraciones de anticuerpo en LCR aumentaron 30, 41 y 52 veces en los niveles de 1,5 mg, 4,5 mg y 8,3 mg/dosis, respectivamente (figura 146B); los niveles sustanciales permanecieron Despues de la fase de recuperación libre de dosis de 1 mes (Tabla 47).

Tabla 47: Concentraciones de anticuerpo anti-HNS en LCR al terminar el estudio (necropsias principal y de recuperación).

5	Grupo	Necropsia principal ^a		Necropsia de recuperación	
		n	Media + SD(ng/mL)	n	Media + SD(ng/mL)
10	Vehículo	8	-	8	-
15	1,5 mg IT	8	351.456+244.171	8	299.512+ 226.654
	4,5 mg IT	7	147.187+213.095	7	193.045+ 157.896
	8,3 mg IT	8	185.227+315.858	8	238.727+185.785

LCR, líquido cefalorraquídeo; HNS, N-sulfatasa de heparano humano; IT, intratecal; n, número de muestra por encima del límite de cuantificación; SD, desviación estándar.

^aMuestras recogidas aproximadamente una semana antes de la dosificación

20 Los anticuerpos anti-HNS aparecieron más tarde en el LCR que en el suero (figura 146C). No se observaron diferencias relacionadas con la dosis aparentes de concentraciones de anticuerpo en el suero o LCR (no se realizó análisis estadístico debido al pequeño tamaño de las muestras); no hubo una diferencia observable entre machos y hembras en las respuestas a los anticuerpos.

25 En presencia del anticuerpo anti-HNS en el LCR, las concentraciones medias de HNS en el LCR parecían mantenerse, sugiriendo que la presencia de anticuerpos anti-HNS en el suero y LCR no alterada la concentración de la HNS dosificada por vía IT. Los análisis de la cohorte de 6 meses/recuperación de la administración de dosis repetida en 6 meses de HNS indicaron que las concentraciones de anticuerpo anti-HNS para los monos de sacrificio en el ínterin de 3 meses y la cohorte de 6 meses eran comparables (figura 146C).

Hallazgos ópticos e histopatológicos

35 A todos los niveles de dosis (aunque no a todos los intervalos de sacrificio, específicos de sexo, tampoco en una forma relacionada con la dosis), se evidenciaron infiltrados eosinofílicos (figura 147A) en el parénquima del cerebro (predominantemente sustancia gris), médula espinal (sustancia gris y blanca), raíces/ganglios de los nervios espinales dorsales y los ganglios trigeminales (solo los machos con dosis media) (figura 247B-D). Se interpretó que los infiltrados eran secundarios a los infiltrados meníngeos/perineurio y/o a la presencia de (penetración por) HNS dentro del parénquima del tejido. Aunque hubo numerosos cambios de tipo inflamatorio, los monos parecían tolerar la administración de HNS y ninguno de los infiltrados se consideraron relacionados o causantes de cambios morfológicos adversos en el parénquima del sistema nervioso. Específicamente, no hubo evidencia de necrosis/degeneración neuronal ni respuesta glial relacionada con la administración de HNS.

40 45 La microgliosis en la sustancia gris del cerebro y médula espinal, en asociación con los infiltrados celulares, predominantemente eosinofílicos, era relativamente común en un estudio de toxicidad en monos jóvenes de un mes; estos cambios eran relativamente raros para el sacrificio ínterin a los 3 meses en el estudio de 6 meses, pero aún podía verse evidencia residual de tal respuesta en la cohorte de 6 meses (figura 147F). Las reacciones microgliales tienden a ser un evento relativamente temprano en la reacción a algunos artículos en estudio (basados en proteína) administrados por vía central (o que reaccionan centralmente). Los infiltrados eosinofílicos se correlacionaban con un número elevado de eosinófilos en el LCR de los monos dosificados con HNS, aunque las células no estaban presentes en números suficientes para inducir una reacción adversa.

50 55 60 A todos los niveles de dosis, se observaron infiltrados eosinofílicos en las raíces/ ganglios de los nervios espinales dorsales para la mayoría de los grupos dosificados con HNS, independientemente del sexo. Se interpretó que los infiltrados en los tejidos del sistema nervioso eran secundarios a los infiltrados meníngeos/del perineurio y/o a la presencia de (penetración por) HNS dentro del parénquima del tejido. En los monos en sacrificio en recuperación, los efectos relacionados con la HNS generalmente estaban ausentes o reducidos a los niveles control. Algunos cambios, como la microgliosis en la médula espinal, estaban completamente resueltos luego del período de recuperación. Ninguno de los cambios relacionados con la HNS parecían asociados con cambios microscópicos estructurales adversos en el cerebro o médula espinal. No se notó necrosis neuronal en el cerebro, médula espinal o ganglios.

Actividad enzimática de la HNS

En las cohortes de 6 meses/recuperación, la actividad enzimática de la HNS en la médula espinal y cerebro del grupo dosificado con vehículo (0,0-0,154 nmol/hr/mg proteína) eran similares a los niveles mostrados en los tejidos de la cohorte interina a los 3 meses (0,0-0,0,154 nmol/hr/mg proteína). Los niveles de actividad enzimática en la médula eran mayores (aproximadamente un orden de magnitud mayor en la médula lumbar) que los niveles medidos en el cerebro o hígado, teniendo los grupos con 4,5 mg y 8,3 mg/dosis niveles similares. La actividad enzimática de HNS en las láminas de médula espinal fluctuaron entre 3,9-18,6, 13,1-67,1, y 3,6-69,2 nmol/hr/mg proteína en los machos (figura 148A) y 1,8-16,2, 4,5-61,2, y 21,1-66,0 nmol/hr/mg proteína en las hembras (figura 148B) para los grupos con 1,5, 4,5, y 8,3 mg/dosis, respectivamente. En el tejido de la médula cerebral después de un período de recuperación de 1 mes, los niveles de actividad enzimática retornaron a los niveles consistentes con los valores de vehículo control.

La actividad enzimática de HNS en las láminas de cerebro fluctuó entre 0,03-16,0, 0,30-55,7, and 0,15-21,2 nmol/hr/mg proteína en los machos (figura 148C) y 0,04-5,1, 0,0-14,4 y 0,9-33,2 nmol/hr/mg proteína en las hembras (figura 148D) para los grupos con 1,5, 4,5, y 8,3 mg/dosis, respectivamente. En el tejido cerebral después de un período de recuperación, los niveles de actividad enzimática retornaron a los niveles consistentes con los valores control.

El cambio en la actividad para las diferentes áreas del cerebro comparadas con los niveles endógenos (grupo DC) se muestra en la figura 149A. Aunque se notó una tendencia hacia una mayor distribución en las muestras superficiales, pudo demostrarse que la administración lumbar-IT la HNS penetraba a las áreas periventriculares del cerebro.

En la cohorte de 6 meses/cohortes de recuperación, los niveles medios de actividad en el hígado eran 0,50,2,41, y 6,65 nmol/hr/mg proteína y 1,04, 4,15, y 7,62 nmol/hr/mg proteína en las hembras para los grupos con 1,5, 4,5, y 8,3 mg/dosis, respectivamente (figura 149B). Los niveles en los monos de control de vehículo eran 0,089 nmol/hr/mg proteína para los machos and 0,083 nmol/hr/mg proteína) para las hembras. Después del período de recuperación, los niveles de actividad de HNS en el hígado eran comparables con los niveles control basales para todos los grupos de dosis.

30 Inmunohistoquímica

La administración de HNS al SNC a través de inyección IT en bolus en las cohortes interina a 3 meses y 6 meses/recuperación resultó en la llegada del artículo en estudio inmunorreactivo a los tejidos de la pia-aracnoides de la médula espinal y cerebro. En los monos que recibieron HNS por vía IT, el material inmunorreactivo estaba consistentemente presente en los macrófagos meníngeos y perivasculares (cerebro/médula espinal) y variablemente presente en las poblaciones de células gliales y neuronales adyacentes. La falta de tinción en los monos control dosificados con vehículo (figura 150A) demostró la especificidad del anticuerpo contra la HNS humana. Generalmente, la inmunorreactividad estaba relacionada con la dosis (es decir, usando una escala de calificación semicuantitativa, se notó una mayor tinción inmunohistoquímica en una forma generalmente dependiente de la dosis). La administración de HNS al SNC a través de inyección IT en bolus resultó en inmunotinción positive en la corteza cerebral y cerebelo (figura 150B-D); sin embargo, la inmunorreactividad no era consistentemente evidente en la región del caudado/putamen, mesencéfalo o regiones más profundas del puente o médula. La inmunorreactividad era evidente en el hígado (en las células del borde sinusoidal incluyendo las células de Kupffer, pero no en los hepatocitos) de todos los monos que recibieron HNS. La inmunorreactividad no era evidente en la hembra sacrificada tempranamente (grupo de 4,5 mg/dosis) debido a una fuga de catéter que no pudo repararse.

En el grupo de 1,5 mg/dosis, se evidenció una recuperación esencialmente completa con la excepción del hígado y las meninges del cerebro y la médula espinal donde se evidenció una inmunorreactividad residual. A dosis mayores (4,5, y 8,3 mg/dosis), la intensidad e incidencia de la inmunorreactividad eran menores que al final de la dosificación. A todos los niveles de dosis, los niveles de HNS en la médula espinal, cerebro e hígado se aproximaban a los vistos en los controles dosificados con vehículo. Despues del período de recuperación de 1 mes.

En este estudio, la administración una semana sí una semana no de HNS por vía IT por 6 meses fue generalmente bien tolerada. No se observaron cambios notables en el peso corporal, estatus clínico, exámenes oftalmológicos/neurológicos/físicos, EKG, pesos de órganos o apariencia macroscópica de los órganos. Los hallazgos se limitaron a cambios transitorios en la patología clínica del LCR acompañados por infiltrados meníngeos ligeros a leves e inflamación epidural, con un retorno casi completo en todos los grupos excepto el de mayor dosis. Despues del período de recuperación. Se observó una amplia distribución de HNS a lo largo del cerebro y la médula espinal.

La administración de HNS por vía IT una semana sí una semana no indujo una respuesta infamatoria caracterizada por infiltración leucocitaria residual y derrame de albúmina notados a las 24 horas postdosis y en la autopsia. Sin desear comprometernos con ninguna teoría en particular, esto presumiblemente refleja una

5 apertura transitoria, localizada e incompleta de la BBB relacionada con cambios en las uniones estrechas cerca de la punta del catéter, resultando en la entrada de leucocitos y proteínas plasmáticas en el LCR (Simard JM, et al. Lancet Neurol. (2007) 6, 258-268; Stamatovic SM, et al. Curr. Neuropharmacol. (2008) 6, 179-192). Esto puede ser el resultado de dos componentes: uno relacionado con los procedimientos de la administración de la dosis o el volumen y otro relacionado con la administración por vía IT de una proteína.

10 Los cambios transitorios en la permeabilidad de la BBB (sin diferencias significativas entre los grupos de dosis y los controles 24 horas postdosis en la autopsia principal), no se acompañaron con signos clínicos.

15 Parecía haber una tendencia relacionada con la dosis para niveles medios mayores de HNS en el LCR; a un nivel de dosis dado, las concentraciones medias de HNS en el LCR parecían mantenerse en el mismo rango a pesar de los niveles de anticuerpo anti-HNS en aumento en el suero y LCR.

20 Se observó una infiltración celular meníngea de severidad media ligera a mínima en el cerebro y en la médula espinal de los monos jóvenes dosificados con HNS. Este cambio microscópico también se notó en los controles dosificados con vehículo, indicando que algo de la respuesta estaba relacionada con la colocación del catéter IT, así como con una respuesta inflamatoria inespecífica a proteínas extrañas. La introducción de un biológico/proteína en el espacio IT, especialmente uno que penetra al SNC, casi siempre induce algún grado de respuesta inflamatoria (Hovland DN, et al. Toxicol. Pathol. (2007) 35, 1013-1029; Butt MT, Toxicol. Pathol. (2011) 39, 213-219), la cual, si se presenta en un número que dañe el tejido adyacente, representaría un efecto adverso. Sin embargo, en el presente estudio estas células (predominantemente eosinófilos) parecían representar un marcador de reacción/penetración tisular y no se encontraron en cantidades suficientes para calificar como un efecto adverso. Ninguno de los cambios relacionados con la HNS parecían asociados con cambios microscópicos estructurales adversos en el cerebro o médula espinal. No hubo necrosis neuronal en el cerebro, médula espinal o ganglios.

25 La evaluación de los anticuerpos anti-artículo en estudio es un aspecto importante de los estudios de toxicología debido al impacto potencial de los anticuerpos neutralizantes o de unión sobre la depuración o biodistribución del artículo en estudio (Ponce RP, et al. Regul. Toxicol. Pharmacol. (2009) 54, 164-182). En este estudio, debido a que se notaron niveles relacionados con la dosis y cuantitativamente similares de actividad enzimática de la HNS en el cerebro y médula espinal de las cohortes interina a los 3 meses y 6 meses, y las concentraciones medias de HNS en el LCR parecían mantenerse en el mismo rango a pesar de los niveles de anticuerpo anti-HNS en aumento en suero y LCR, sugerían que no hubo actividad neutralizante.

30 35 Parecía haber una tendencia relacionada con la dosis hacia mayores niveles de actividad enzimática de la HNS en la médula espinal, cerebro e hígado, que era mayor cerca del sitio de inyección en la región lumbar de la médula espinal y uniforme en el cerebro, sin diferencias significativas rostrales a caudales y entre los hemisferios derechos e izquierdos. No se evidenció acumulación de la HNS en el tejido del cerebro y médula espinal de la cohorte a los 6 meses en comparación con la cohorte interina a los 3 meses. Aunque se notó una tendencia hacia una mayor distribución en las muestras superficiales, la HNS administrada por vía lumbar-IT penetró a las áreas periventriculares profundas del cerebro. La actividad enzimática de HNS en el hígado sugería que la HNS se redistribuyó sistemáticamente tras la administración por vía IT; no se observaron efectos adversos relacionados con la HNS en el hígado después de la evaluación de los parámetros clínicos y patológicos en los estudios pivotales de toxicidad.

40 45 50 55 En general, los resultados inmunohistoquímicos corroboraron la actividad encimática del tejido en esa dosis relativa a imunorreactividad se observó en las meninges pia-aracnoides de la médula espinal y cerebro y en los tejidos nerviosos (neuronas, células gliales) en la proximidad inmediata de las meninges. Hubo una buena penetración en la sustancia gris del cerebro y cerebelo tras la inyección del bolus IT o infusión IT a corto plazo. Aunque no se evidenció imunorreactividad en estructuras más profundas tales como los ganglios basales o las regiones centrales del tálamo/hipotálamo, mesencéfalo o el puente/médula, los resultados de actividad enzimática indican que la HNS administrada por vía lumbar-IT penetró a áreas periventriculares profundas del cerebro. Así, la inmunohistoquímica puede ser una técnica menos sensible para detectar la biodistribución de un artículo en estudio. Se evidenció imunorreactividad en las células de Kupffer y las células endoteliales (células capaces de fagocitosis) del hígado, pero no las células parenquimatosas (hepatocitos).

60 65 Los análisis de la cohorte de 6 meses/recuperación del estudio de toxicidad con dosis repetidas en 6 meses en monos jóvenes indicaron que los cambios relacionados con la HNS en los monos en el ínterin de 3 meses y sacrificio a los 6 meses eran comparables, incluyendo los parámetros en vida, patología clínica y anatómica, concentraciones de HNS y anticuerpos anti-HNS en LCR y suero, y distribución/locación subcelular de HNS en la médula espinal, cerebro e hígado. En los monos con sacrificio en la recuperación, los efectos de la HNS eran ausentes o se redujeron significativamente. Así, el nivel de no efecto adverso observado para el estudio con monos jóvenes a 6 meses fue 8,3 mg/dosis, la mayor dosis administrada.

65 70 Monitorizar los cambios en la celularidad y concentraciones de proteína en el LCR parece ser un

correlato confiable de los cambios morfológicos notados en la evaluación histopatológica y puede ser útil en los pacientes tratados con HNS por vía IT; estos cambios se consideraron una reacción esperada a una proteína administrada por vía IT y se resolvieron mayormente después del período de recuperación. Estos datos de modelos en animales proporcionan la confianza para investigar la terapia por vía IT como estrategia de tratamiento para las manifestaciones neurológicas de las enfermedades por depósito lisosomal. Este estudio de toxicología en primates jóvenes no humanos demuestra la factibilidad y tolerabilidad de administrar HNS a través de un equipo de administración por vía IT lumbar de un medicamento a pacientes pediátricos. La patología no adversa en el SNC y falta de signos clínicos adversos han apoyado la aprobación médica investigacional reciente del documento del producto e indicaban que la HNS administrada por vía IT puede tratar segura y efectivamente los síntomas en el SNC del síndrome de Sanfilippo A.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales ilustrativos y métodos usados en los experimentos descritos en estos ejemplos se proporcionan a continuación.

Diseño del estudio y dosificación de HNS

Los monos fueron asignados al azar en cinco grupos de tratamiento; el grupo 1 era de no tratados (control de equipo de implante[DC], puerto y catéter) y no se les dosificó el vehículo o el artículo en estudio. Los Grupos 2 a 5 recibieron 0,6 mL de 0, 2,5, 7,5 o 13,8 mg/mL de HNS IT (es decir, una dosis total de 0, 1,5, 4,5 o 8,3 mg) una semana sí una semana no. Cuatro monos/sexo/grupo fueron sacrificados a los 3 meses (autopsia interina; 24 horas después de la 6^a dosis), cuatro monos/sexo/grupo (excepto el grupo DC, los cuales fueron sacrificados a los 3 meses) fueron sacrificados a los 6 meses de dosificación (autopsia principal; 24 horas después de la 12^a dosis), y los cuatro monos/sexo/grupo restantes fueron sacrificados al final de un período de recuperación de 1 mes. En la autopsia, los tejidos seleccionados fueron extraídos, guardados y examinados microscópicamente.

La HNS se proporcionó en un vehículo de formulación IT consistente en 5 mM fosfato de sodio, 145 mM cloruro de sodio, y polisorbato 20 0,005% (pH 7,0). Se administraron dosis una semana sí una semana no de HNS como infusión a corto plazo en aproximadamente once minutos: 0,6 mL (4 minutos) seguidos con una descarga de 0,5 mL de solución fisiológica tamponada con fosfato (PBS) (7 minutos). Los monos en el grupo de control de vehículo recibieron solamente la formulación IT; los monos DC recibieron PBS (pH 7,2) por vía IT.

Observaciones clínicas

Los signos clínicos y las observaciones de morbilidad y mortalidad se registraron al menos dos veces al día comenzando en el primer dosis. Los pesos corporales se midieron antes de la cirugía, el día de la cirugía, semanalmente durante el el estudio y en la autopsia. El consumo de alimento se monitorizó diariamente comenzando antes de la cirugía. Los exámenes físicos (frecuencia cardíaca, respiración, temperatura corporal, auscultación, marcha, disposición, palpación abdominal, ganglios linfáticos y apariencia general) y neurológicos (nivel de conciencia, rastreo) se realizaron antes de iniciar el estudio, cada mes durante el estudio, y antes de la autopsia. Las funciones motoras, reflejos cerebrales (pupilares, parpadeo y reflejo corneal), y los reflejos espinales (sensibles pie, sacudida de la rodilla, cutáneos, propioceptivos y reflejo de la cola) también se evaluaron. Los exámenes electrocardiográficos (EKG, derivaciones I, II, y III) y oftalmológicos se completaron antes de la primera dosis de HNS y en la semana antes de la autopsia interina (3 meses) o principal (6 meses). Los exámenes oftalmológicos se realizaron por oftalmoscopia indirecta, los monos fueron sedados con ketamina HCl (IM, 8 mg/kg), y los ojos se dilataron con tropicamida 1%.

Patología clínica

Las muestras de sangre se recolectaron de los monos en ayunas para hematología y química sérica antes que iniciara el estudio, luego de las Dosis 1, 3, 5, 7, 9 y 11 por vía IT, a mitad de la recuperación y en la autopsia. Las muestras de orina se recolectaron a través del plato recolector predosis, una vez al mes durante el período de dosificación y recuperación y antes de la autopsia. Las muestras de orina se recolectaron a través del catéter lumbar para la cuenta celular total y análisis químico al momento de la cirugía, y 24 horas después de las dosis IT 1, 3, 5, 7, 9, 11, a mitad de recuperación y en la autopsia; en ocasiones, las muestras no se recolectaron debido a una obstrucción parcial del catéter. Debido a que se notaron cuentas leucocitarias mayores de las esperadas en el LCR, las muestras de LCR de la dosis 5 a los 3 meses se recolectaron de la mitad de los monos en cada grupo antes de la dosificación y de los monos restantes 24 horas después de la dosificación. La recolección de muestra predosis ocurrió al menos un día antes de la dosificación de forma de no alterar significativamente el volumen de LCR justo antes de la dosificación. Para los monos de 6 meses y recuperación, se recolectó el LCR para la cuenta celular total y química de la mitad de los monos en cada grupo antes de la dosificación y de los monos restantes 24 horas después de la dosificación. Si un mono tenía un catéter que no ofrecía muestra debido a una obstrucción, se realizaba una toma espinal (cisterna magna) en la autopsia.

Análisis de HNS

Las muestras de sangre para el análisis de HNS se recolectaron de una vena periférica antes y 24 horas post dosis IT 2, 4, 6, 8, 10, 12; a mitad de la recuperación y en la autopsia. Las muestras de LCR se recolectaron a través del catéter lumbar antes y 24 horas post dosis IT 2, 4, 6, 8, 10, 12 a mitad de la recuperación y en la autopsia. Las concentraciones de HNS se determinaron por ELISA. El anticuerpo de captura era un IgG policlonal anti-HSN de conejo y el anticuerpo de detección era un conjugado con peroxidasa de rábano picante del mismo IgG anti-HNS de conejo. El LOD era 0,22 ng/mL; así se calculó que el LOQ era 0.66 ng/mL. Los niveles séricos y en LCR se evaluaron por duplicado a diluciones de 1:100 y 1:5; las muestras que caían más allá del extremo superior de la curva de calibración eran vueltas a diluir y reevaluadas.

Análisis del Anticuerpo anti-HNS

La sangre para el análisis de anticuerpos se recolectó de una vena periférica aproximadamente 1 semana antes de las dosis IT 2, 4, 6, 8, 10, 12, a mitad de la recuperación y en la autopsia. Las muestra de LCR para el análisis del anticuerpo se recolectaron en la cirugía, y a través del catéter lumbar aproximadamente 1 semana antes de las dosis IT 2, 4, 6, 8, 10, 12 a mitad de la recuperación y en la autopsia. Se usó una prueba de puente electroquimioluminiscente tecnología Meso Scale Discovery (MSD ®) para la detección de los anticuerpos anti-HNS. El ensayo es un método de evaluación general, pero sensible, para los anticuerpos anti-HNS de cualquier especie y todos los isotipos de inmunoglobulina. El LOD fue 5 ng/mL, y las muestras fueron evaluadas por duplicado a una dilución de 1:20, resultando en una sensibilidad efectiva del ensayo de 100 ng/mL. Las muestras que caían más allá del extremo superior de la curva de calibración eran vueltas a diluir y reevaluadas.

Autopsia y preparación de los tejidos

Los monos fueron sometidos a una autopsia completa 24 horas después de la dosis IT final (autopsia principal) o al final del período de recuperación de 1 mes (autopsia de recuperación). Los monos fueron sedados con ketamina HCl (IM, 8 mg/kg), se mantuvieron con una mezcla de isoflurano/oxígeno, y recibieron un bolus de heparina sódica IV (200 UI/kg). Los monos fueron perfundidos a través del ventrículo cardíaco izquierdo con nitrito de sodio 0,001% a temperatura ambiente en solución fisiológica a una tasa de 200 ml/min por 12 min (~2400 ml). Después de la recolección, las muestras de tejido se fijaron en formalina tamponada neutral al 10% para el examen histopatológico/análisis inmunohistoquímico o se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -60°C o menos para el análisis de la actividad de la HNS.

El cerebro se cortó en una matriz cerebral (MBM-2000C, ASI Instruments, Inc., Warren, MI) a un grosor de 3-mm de lámina coronal. Las láminas fueron enumeradas, designando la más rostral como lámina 1. Las láminas 1, 4, 7, 10, 13, y 16 se procesaron para histopatología y las láminas 2, 5, 8, 11, 14, y 17 (si estaban disponibles) se procesaron para inmunohistoquímica. Las láminas 3, 6, 9, 12 y 15 se congelaron para el análisis de la actividad de la HNS. La médula espinal (cervical, torácica y lumbar) se cortó en secciones de 1 cm. La primera lámina y cada tercera lámina luego de ello se procesaron para la evaluación histopatológica y la segunda lámina y cada tercera lámina luego de ello se procesaron para el análisis inmunohistoquímico. La tercera lámina y cada tercera lámina luego de ello se congelaron para el análisis de HNS. La distribución de las láminas se ajustó de forma que la lámina que contenía la punta del catéter intratecal (Lámina 0) se fijó en formalina y se analizó para histopatología. Se tomaron muestras duplicadas de ~5 g del hígado de dos lóbulos separados y se congelaron para análisis de HNS y una muestra adicional de ~5 g se fijó para el análisis inmunohistoquímico.

Histopatología

Los cerebros, médulas espinales, raíces/ganglio del nervio espinal dorsal, nervios ciáticos, tibiales y surales, una lista tisular completa típica para los estudios preclínicos de seguridad del medicamento de esta duración en esta especie), y cualquier lesión macroscópica se recolectaron en la autopsia de todos los monos. Las secciones de tejido se incluyeron en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina (además de los procedimientos especiales de tinción/inclusión enumerados a continuación) para una amplia evaluación microscópica.

Las secciones cerebrales de los bloques de parafina preparados de los grupos control de equipo y vehículo, y los monos con dosis altas se tiñeron con Fluoro-Jade B (una tinción que aumentaba la sensibilidad de evaluar la degeneración neuronal) y Plata de Bielschowsky (un procedimiento que permite la visualización directa de axones, dendritas y filamentos neuronales). Las Láminas teñidas con Fluoro-Jade B se examinaron bajo iluminación fluorescente usando un cubo de filtro de isotiocianato de fluoresceína.

Las médulas espinales se seccionaron ministerialmente, tomando secciones trasversales y oblicuas en las regiones cervical, torácica y lumbar (una lámina examinada a cada nivel) incluyendo secciones en la punta del catéter;

se tomó una sección trasversal adicional de la región de la cauda equina. Las raíces y los ganglios espinales dorsales (mediocervical, mediotorácico y mediolumbar) se procesaron y examinaron. Los nervios periféricos (ciático, tibial y sural) se seccionaron longitudinalmente, se incluyeron en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Las secciones cruzadas se postfijaron en osmio, se incluyeron en resina de Spurr, se seccionaron (2 µm) y se tiñeron con azul de toluidina. Las secciones seriadas de médula espinal, así como las raíces y ganglios espinales dorsales, de los grupos control de equipo y vehículo y del grupo con dosis alta se tiñeron con plata de Bielschowsky. Las secciones de médula espinal de estos grupos también se tiñeron con proteína ácida fibrilar anti-glial, una tinción inmunohistoquímica que permite la visualización directa de los astrocitos y sus procesos.

10 **Preparación de los extractos tisulares para el análisis cuantitativo**

Las láminas cerebrales congeladas 3, 6, 9, 12 y 15 se disecaron separando los hemisferios izquierdo y derecho. Se tomó tejido de la Superficie midiendo 4 mm desde la superficie, y se consideró que el tejido restante en cada hemisferio era tejido profundo. Si estaban presentes (p.ej., láminas 6 y 9), se cortaba una muestra periventricular adicional de las láminas coronales. Debido a que sólo se procesó una mitad del cerebro (el lado derecho) (el lado izquierdo se mantuvo congelado), la sección resultó en dos a tres muestras por lámina: superficie derecha, profunda derecha y, si estaba presente, periventricular derecha (es decir, ventricular profunda; Vdeep) Los tejidos cerebelosos y del tronco encefálico, cuando estaban presentes, se aislaron antes de separar los hemisferios y se procesaron de forma independiente. Las secciones de médula espinal se prepararon similarmente, se pesaron y se homogenizaron.

20 Las muestras de tejido se homogenizaron en tampón de lisis (1 ml/0,25g de tejido) formulado con 10 mM Tris, 5 mM ácido etilendiamintetracético, Igepal 0,1% suplementado con minitabletas de inhibidor de proteasa Alpha Complete (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) usando tubos Teena Lysing Matrix A o tubos cónicos de polipropileno. Las muestras fueron procesadas por 40 segundos en el homogenizador automatizado Fastprep-24 (MP Biomedicals, Solon, OH) u homogenizador eléctrico PowerGen Model 125 (Omni International, Kennesaw, GA). Una vez homogenizadas, las muestras fueron sometidas a cinco ciclos de congelamiento-descongelamiento usando un baño de etanol/hielo seco y un baño de agua a 37°C y luego se centrifugaron a 4°C para los desechos de tejido; los sobrenadantes se almacenaron a -80°C hasta su evaluación. La actividad de HNS se determinó usando un sustrato específico (4-metilumbeliferil- α -D-N-sulfoglucosaminida) con una evaluación fluorométrica de 2 pasos.

30 **Procesamiento y tinción de tejido para inmunohistoquímica**

Seis láminas cerebrales coronales fijadas en formalina (números de lámina 2, 5, 8, 11, 14, y 17) de 3-mm de grosor de cada mono se enumeraron 1 a 6 de rostral a caudal. Generalmente, las láminas 1 a 4 contenían núcleos basales/tálamos/mesencéfalos y cerebro, y las dos láminas caudales contenían cerebelo y tronco encefálico (médula oblonga). Las secciones de cerebro, médula espinal e hígado (de los mismos bloques de parafina usados para la tinción con H&E y las varias tinciones especiales) fueron teñidas inmunohistoquímicamente para HNS. Se usó un anticuerpo monoclonal de ratón específico (clone 2C7; Maine Biotech, Portland, ME) para detectar la captación intracelular de HNS administrada por vía IT; este reactivo no mostró reactividad cruzada con la HNS endógena de Mono Cynomolgus. Los controles negativos se realizaron usando un IgG de ratón irrelevante. Las láminas desparafinadas se incubaron con anticuerpo anti-HNS de ratón primario toda la noche a 2 a 8°C. Se agregó una IgG biotinilada de cabra anti-ratón secundaria y se incubó por 30 minutos a 37°C. Se añadió e incubó complejo de peroxidasa de rábano picante por 30 minutos. Las láminas se incubaron en solución de diaminobenzidina de sustrato de peroxidase hasta que se desarrolló la intensidad de tinción deseada. Los núcleos se contratiñieron con hematoxilina.

Análisis estadísticos

50 Pesos corporales, cambios en el peso corporal, consumo de alimento, frecuencia respiratoria, temperatura corporal, frecuencia cardíaca, LCR cuenta celular, química del LCR, datos de patología clínica, datos de orina y pesos absolutos y relativos de los órganos se analizaron por análisis de varianza de una vía y una comparación de los grupos control de equipo y vehículo con cada grupo dosificado con HNS por la prueba de Dunnett. Además, el análisis estadístico comparó los dos grupos control entre sí. El análisis fue de doble cola para los niveles de significancia de 5% y 1%. Los datos se presentaron como la media ± desviación estándar.

55 **EJEMPLO 22: BIODISTRIBUCIÓN Y ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS DE HEPARÁN N-SULFATASA**

Los experimentos en este ejemplo se designaron para determinar la distribución tisular de HNS en ratas tras una dosis intravenosa o intratecal (1 o 10 mg/kg) de HNS. Por ejemplo, entre otras cosas, el propósito de estos experimentos eran caracterizar las propiedades de biodistribución de la HNS en ratas usando tomografía por emisión de positrones (PET); comparar los patrones de distribución de HNS cuando se administra en diferentes vías (IV o IT) y a diferentes dosis (1 o 10 mg/kg); y determinar las propiedades farmacocinéticas de la HNS en cada uno de los órganos de interés en estos regímenes de dosificación.

65 Los perfiles farmacocinéticos (PK) y de biodistribución (BD) de la ¹²⁴I-sulfamidasa (HNS) se estudiaron

con imágenes tisulares por PET en ratas tras la administración intravenosa o intratecal de 1 o 10 mg/kg de ^{124}I -HNS. Los datos de radiactividad-tiempo en la región de interés se obtuvieron a partir de las imágenes dinámicas en los primeros 20 min y de las imágenes estáticas a las 0,05 (solo para la administración IT), 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 y 192 horas post dosificación IV o IT.

5

Cuatro ratas en cada uno de cuatro grupos (1 mg/kg IV, 1 mg/kg IT, 10 mg/kg IV y 10 mg/kg IT) se usaron en este estudio. Los datos de radiactividad-tiempo se midieron en la cabeza, cerebro (incluyendo LCR), médula e hígado tras la administración por vía IT; y en la sangre, cerebro (incluyendo LCR), hígado, riñón, corazón (incluyendo pulmones) y piel tras la administración por vía intravenosa. Los datos se corrigieron para la vida media de desintegración del yoduro-124 (100,2 horas), expresado como porcentaje de la dosis inyectada (%ID) de una región de interés o %ID por gramo (%ID/g) de los tejidos en la imagen, y luego normalizado para el peso corporal de 200 gramos. Las cantidades totales (ug) o concentraciones (ug/g) de la proteína dosificada en la región de interés se calcularon a partir de los datos de %ID o %ID/g correspondientes.

10

En los primeros 20 min después de la dosificación IT, la cantidad total de HNS en la región cefálica se redujo a una tasa constante de 0,002/min - 0,011/min (λ_z) a 1 y 10 mg/kg. Las tasas de depuración y los volúmenes de distribución no se usaron para las comparaciones farmacocinéticas entre las dos dosis y las dos vías de administración en este informe (véase la sección de Resultados para más información). Las tasas constantes de eliminación del cerebro fueron esencialmente las mismas a dos dosis de estudio (λ_z : 0,016/h versus 0,014/h para 1 y 10 mg/kg, respectivamente) con una vida media similar de unos dos días determinada por imagen estática hasta 192 horas después de la dosificación IT. Los valores de Cmax y AUC (0-último o 0-infinito) eran proporcionales a las dosis administradas. Una conducta lineal de la PK estaba indicada en el rango de dosis de 1 a 10 mg/kg dado en estos regímenes de una dosis IT. Se observaron gradientes de concentración desde las secciones proximales a las distales de la médula en ambos niveles de dosis.

20

Tras la dosificación IT, la proteína de HNS era medible en el hígado hasta 96 horas a 1 mg/kg y hasta 192 horas a 10 mg/kg de HNS. Las concentraciones en el hígado alcanzaron el pico a las 2 horas a 1 mg/kg, y a las 7 horas a 10 mg/kg. La eliminación fue $0,030 \pm 0,011/\text{h}$ (λ_z media) a 1 mg/kg, la cual no fue significativamente diferente de 10 mg/kg ($\lambda_z 0,017 \pm 0/\text{h}$) ($p=0,10$), con una $t_{1/2}$ correspondiente (28 versus 42 horas a las dosis administradas de 1 y 10 mg/kg, respectivamente).

25

Tras la dosificación IV, las vidas medias de eliminación en el hígado, riñón, corazón y piel fueron 47 ± 10 y 38 ± 13 horas para el hígado, 54 ± 25 y 29 ± 16 horas para el riñón, 36 ± 15 y 42 ± 19 horas para el corazón y 40 ± 21 y 31 ± 13 horas para la piel a 1 y 10 mg/kg, respectivamente; mientras que las vidas medias en el cerebro fueron 71 ± 23 y 60 ± 53 horas. Los valores medios de Cmax para el hígado, piel, riñón, corazón y cerebro fueron 9,6, 0,30, 0,25, 0,22 y 0,08 ug/g a 1 mg/kg y 132, 7,9, 3,9, 3,7 y 1,8 ug/g a 10 mg/kg. Luego que los valores de Cmax del animal individual se normalizaron para la dosis, los valores de Cmax/dosis a 10 mg/kg fueron significativamente mayores que los de 1 mg/kg en todos estos órganos (la mayoría de los valores de $p<0,05$, $p=0,06$ para el hígado). Los valores de AUCúltima para el hígado, piel, riñón, corazón y cerebro fueron 525, 16, 14, 9 y 7 h.ug/g a 1 mg/kg; y 6747, 276, 183, 201 y 86 h.ug/g a 10 mg/kg. Después de la normalización, los valores de AUCúltima /dosis a 10 mg/kg fueron significativamente mayores que los de 1 mg/kg en la piel ($p<0,01$), marginalmente diferentes en el corazón ($p=0,06$), y no significativamente diferentes en el hígado, cerebro y riñón (todos los valores de $p>0,34$).

30

Cuando se inyectó la misma dosis de HNS, la administración intratecal resultó en una exposición cerebral tres logaritmos mayor que con la administración por vía intravenosa. La vida media de eliminación en el cerebro fue 2 días por vía IT y 3 días por Vía IV. Sin embargo, las exposiciones hepáticas tras la dosificación IT fueron similares a la IV a la misma dosis de HNS. La exposición (Cmax y AUCúltima) para el hígado por IT/IV a 1 mg/kg y 10 mg/kg estaban en un rango de 0,4 - 1,2.

40

Diseño experimental

45

El sistema nervioso central (SNC) es vulnerable en muchas enfermedades de depósito lisosomal y se daña seriamente en algunos tipos de estas enfermedades, como el síndrome de Sanfilippo tipo A o B (mucopolisacaridosis III), Leucodistrofia metacromática (MLD) y síndrome de Hunter. Como se describe aquí, se contempla que, debido a la mala penetración a través de la barrera hematoencefálica cuando se administra periféricamente, la administración directa de proteínas enzimáticas en el SNC puede aumentar sus concentraciones en los tejidos nerviosos centrales y aumentar sus efectos terapéuticos. Se investigó la administración Intratecal (IT, o cisterna magna) y se comparó con la administración IV a diferentes niveles de dosis en este estudio.

50

La PET es una tecnología no invasiva, repetible y cuantitativa para proporcionar en cambio dinámico de la concentración del medicamento en el tiempo en el órgano de interés. Los datos dinámicos de concentración-tiempo de los órganos diana (sitios activos, en vez de en en el tiempo en el órgano de interés. Los datos dinámicos de concentración-tiempo de los órganos diana (sitios activos, en vez de en circulación sanguínea) son

valiosos, y están directamente relacionados con la actividad biológica del medicamento dosificado. Asimismo, la información sobre las exposiciones tisulares a partir del estudio PET en los animales puede usarse para guiar la selección de la primera dosis en el humano.

5 *Materiales y métodos*

Artículos en estudio

10 La Heparán N-Sulfatasa (HNS) se formuló a una concentración de 20 mg/mL de HNS en 5 mM fosfato de sodio tampón con 145 mM cloruro de sodio a pH 7,0. El material se purificó por RP-HPLC y contenía 98,7% de heparina N-Sulfatasa con 99,9% del dímero. La HNS se marcó con ¹²⁴yoduro.

Fuente de la muestra

15 Las imágenes de radiactividad eran de las ratas tras la dosificación IV e IT ¹²⁴I-H-N-sulfatasa a 1 y 10 mg/kg.

Animales

20 Se adquirieron diecisésis ratas Sprague-Dawley machos en Charles River Laboratories (190 ± 60 g, n = 16), y se separaron en cuatro grupos (n = 4). A cada grupo de estas ratas (total 4 grupos) se les dio una inyección IV o IT a dos diferentes dosis (1 mg/kg y 10 mg/kg). La dosis y volumen inyectado se individualizaron con base en el peso corporal de cada animal. En dos grupos tratados por vía IV, la sedación se indujo por inyección IV de pentobarbital sódico a una dosis de 35 mg/kg. Las dosis intravenosas se inyectaron en un bolus a través de una vena de la cola. En dos grupos tratados por vía IT, los animales fueron anestesiados por administración intraperitoneal de pentobarbital sódico a una dosis de 50 mg/kg. Las dosis intratecales se administraron en 1 min a nivel de la cisterna magna a través de la membrana atlanto-occipital. La radiactividad administrada real se midió por PET, y sirvió como la dosis inyectada.

Métodos experimentales

35 Las imágenes dinámicas (cada 2 min) se obtuvieron en los primeros 20 minutos en las regiones del corazón (incluyendo los pulmones), hígado y riñones post-inyección IV; y en la región cefálica post-administración IT de ambas dosis. Se adquirieron imágenes estáticas en las regiones incluyendo el cerebro (incluyendo el líquido cefalorraquídeo, LCR), hígado, riñón, corazón (incluyendo los pulmones), músculo, piel y hueso en el grupo tratado por vía IV; y en la región cefálica, cerebro (incluyendo LCR) e hígado de los animales tratados por vía IT a las 0,05 (solo disponible para la grupos IT), 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 y 192 horas post dosificación. Las imágenes se reconstruyeron y las tres secciones corporales se fusionaron en una imagen.

Análisis de datos

40 Datos de PET se expresaron en nanocurie (nCi) por mL (para fluidos) o por gramo (para tejido). La actividad relativa fue obtenidos para el cerebro, hígado, riñones, músculo esquelético, estómago, corazón (con pulmones) y piel en las imágenes estáticas. La actividad absoluta en las regiones cefálica o cerebral se obtuvo para los animales que recibieron inyecciones por vía IT. La radiactividad por milímetro de médula espinal se determinó en los animales inyectados por vía IT en tres secciones seleccionadas: la columna proximal (cuello), media (contra el borde superior del hígado) y distal (1 cm desde el borde distal del compartimiento que contenía la proteína).

45 Los datos se corrigieron para la vida media de desintegración del ¹²⁴I (100,2 horas), y normalizados para la eficacia del registro según la calibración con una fuente de ¹²⁴I con actividad medida externamente. Los datos se expresaron como porcentaje de la dosis inyectada (%ID) de toda una región (la cabeza y cerebro) o %ID por gramo (%ID/g) de un tejido en la imagen, y luego normalizado para un peso corporal de 200 gramos [normalización de datos: (%ID o %ID/g)/peso corporal del animal x 200]. La normalización se adaptó para reducir la variabilidad de los datos, ya que solo se usaron cuatro animales en cada grupo.

50 En este ejemplo, las concentraciones o cantidad de proteína de HNS se calcularon usando la dosis de proteína inyectada a cada animal: concentración de proteína (ug/g) = (%ID/g) x (mg/kg de dosis inyectada x 1000 x 0,2); cantidad total de la proteína dosificada (ug) en una región de interés = %ID x (mg/kg de dosis inyectada x 1000 x 0,2), aquí la dosis inyectada fue 1 mg/kg o 10 mg/kg y 0,2 es el factor de normalización para el peso corporal. La media y desviación estándar del grupo de cada parámetro PK se calcularon según los datos individuales no compartimentales en cada uno de los cuatro grupos. Se realizó una prueba t de Student para comparar los valores de λ_z, t_{1/2}, Cmáx y AUC entre las dos dosis en estudio y las dos vías de administración. La significancia estadística se definió como valores de p menores de 0,05 (p<0,05).

Resultados

5 Las cantidades (ug) o concentraciones (ug/g) de HNS en las siguientes tablas, figuras y análisis PK se calcularon multiplicando la dosis de proteína inyectada (1 mg/kg o 10 mg/kg) con los valores correspondientes de %ID o %ID/g.

Tratamiento Intratecal con ^{124}I -HNS a las dosis administradas de 1 y 10 mg/kg

10 The La cantidad de la proteína dosificada (ug) en la región cefálica a partir de las imágenes dinámicas se graficó como una función del tiempo en la figura 151. La concentración (ug/g) en las regiones cefálicas a partir de las imágenes dinámicas se graficó como una función del tiempo en la figura 152. La cantidad total de proteína inyectada (ug) en el cerebro y regiones cefálicas a partir de las imágenes estáticas se graficó con el tiempo en la figura 153 y figura 154, respectivamente. Las curvas de concentración-tiempo (ug/mm) en la columna proximal, media y distal se muestra en la figura 155 a figura 157. La figura 158 muestra los cambios de la concentración de HNS (ug/g) en el hígado con el tiempo tras la administración por vía IT de ^{124}I -HNS a 1 y 10 mg/kg.

20 Los datos de cantidad total-tiempo (ug) o concentración-tiempo (ug/g) se analizaron por modelos no compartimentales (WinNonlin 5.2, Pharsight, Mountain View, CA). Los parámetros PK, tales como la tasa constante de eliminación (λ_z), concentración pico (C_{máx}) vida media terminal (t_{1/2}), área bajo la curva (AUC_{Última} y AUC_{0-inf}) y otros se estimaron a partir de los datos de cada animal individual.

25 Las tasas de depuración y los volúmenes de distribución se estimaron, sin embargo, no se usaron para las comparaciones PK entre las dos dosis y las dos vías de administración en este informe por dos razones (1) este estudio se enfocaba en la biodistribución de HNS en tejidos sólidos, en vez de la PK en sangre; y (2) la radiactividad en la región cerebral era la suma de la del tejido cerebral (sólido) y LCR (líquido), la cual no podía separarse una de la otra en el estudio. Se usó la λ_z y se usó para comparación, debido a que indicaba un porcentaje de la dosis inyectada eliminada por unidad de tiempo.

30 Las medias y desviaciones estándar (SD) del grupo se calcularon y compararon entre las dos dosis evaluadas. Estos parámetros PK se tabulan en la Tabla 48 a continuación.

Tabla 48

5	10	10mg/kg IT	Cerebro (ug/g)*		Hígado		Cerebro (ug)*		Cabeza (ug) *		Proximal		Medio		Distal		
			Parámetro	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
			λ_z	0,016	0,003	0,030	0,011	0,017	0,002	0,016	0,002	0,025	0,012	0,020	0,008	0,028	0,016
			$t_{1/2}$	45	7	28	16	42	5	45	7	32	13	39	16	30	12
			T _{máx}	0,1	0,0	2,3	1,3	2,0	4,0	0,1	0,0	0,3	0,5	1,8	1,5	1,0	0,0
			C _{máx}	257,0	89,9	4,9	1,3	68,6	8,0	200,1	0,0	0,5	0,1	0,2	0,0	0,1	0,0
			AUC _{últ.}	8393	2457	204	50	3809	622	8216	782	9	3	7	3	2	1
			AUC _{inf.}	8942	2416	216	57	4030	643	8904	1069	11	3	8	3	3	2
			MRT _{últ.}	46	6	32	13	44	5	46	5	31	17	34	20	16	5

10mg/kg IT

15	λ _z	0,014	0,001	0,017	0,000	0,014	0,001	0,010	0,001	0,018	0,008	0,014	—	0,006	—
	$t_{1/2}$	49	4	42	1	51	5	70	9	45	18	50	—	123	—
	T _{máx}	0,1	0,0	7,0	2,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,3	0,5	8,7	13,3	8,0	—
	C _{máx}	2628	265	105	41	836	117	1844	314	6	4	1	0	1	—
	AUC _{últ.}	83962	10083	7987	3276	59115	8624	128751	15723	83	67	35	20	38	—
	AUC _{inf.}	89460	12098	8345	3424	63836	9466	151405	15123	98	66	60	—	73	—
	MRT _{últ.}	56	1	51	1	58	2	65	3	31	2	32	7	61	—

10mg/kg IT

25	30	1mg/kg IT	Cerebro (ug/g)*		Hígado		Riñon		Corazón		Piel		
			λ _z	0,011	0,005	0,015	0,003	0,016	0,009	0,021	0,006	0,021	0,010
			$t_{1/2}$	71	23	47	10	54	25	36	15	40	21
			T _{máx}	7	12	5	4	10	12	2	1	5	4
			C _{máx}	0,1	0,0	9,6	1,5	0,2	0,1	0,2	0,0	0,3	0,1
			AUC _{últ.}	7	2	525	104	14	5	9	3	16	4
			AUC _{inf.}	9	3	576	138	16	6	10	3	18	5
			MRT _{últ.}	61	16	47	5	47	18	36	13	41	16

10mg/kg IT

35	λ _z	0,102	0,180	0,021	0,012	0,035	0,024	0,020	0,010	0,026	0,012
	$t_{1/2}$	60,5	53,1	37,8	13,4	28,4	16,4	41,6	18,6	31,0	12,7
	T _{máx}	13	12	2	1	12	11	16	9	3	1
	C _{máx}	1,8	0,2	131,6	26,8	3,9	0,7	3,7	0,7	7,9	2,3
	AUC _{últ.}	86	66	6747	2837	183	123	201	89	276	40
	AUC _{inf.}	118	98	7171	3029	198	131	230	110	292	43
	MRT _{últ.}	43	32	40	14	33	21	41	18	33	13

En los primeros 20 min después de la dosificación, la cantidad total (ug) de HNS en la región cefálica se redujo a una tasa constante de 0,002 - 0,011 por min (λ_z , $0,005 \pm 0,004/\text{min}$) a 1 mg/kg y $0,003 - 0,010$ por min ($0,007 \pm 0,003/\text{min}$) a 10 mg/kg. Estas tasas constantes de eliminación no eran significativamente diferentes en estos dos niveles de dosis ($p=0,57$, figura 151).

La curva concentración-tiempo (ug/g de 0,05 a 192 horas) del cerebro indicaba un perfil bifásico (figura 152). La fase temprana dura unas dos horas. La fase terminal sigue una cinética de primer orden. Las tasas constantes de eliminación del cerebro fueron muy similares en las dos dosis administradas ($0,0016 \pm 0,003$ y $0,014 \pm 0,001$ por hora) con una vida media similar de unos dos días (45 ± 7 y 49 ± 4 horas a 1 y 10 mg/kg, respectivamente). Los valores de las concentraciones pico (257 ± 90 y 2628 ± 265 ug/g) y AUC_{última} (8393 ± 2457 y 83962 ± 10083 h. $\mu\text{g/g}$ a 1 y 10 mg/kg, respectivamente) aumentan aproximadamente diez veces cuando la dosis aumentó de 1 a 10 mg/kg. Estas observaciones una conducta lineal de la PK en el rango de dosis de 1 a 10 mg/kg dado en estos regímenes de una dosis IT. La concentración pico apareció en el cerebro 3 min (T_{máx}) después de la dosificación IT.

La curva cantidad total-tiempo (ug de 0,05 a 192 horas) en las regiones cerebral y cefálica seguía el mismo patrón bifásico que se vio con las curvas de concentración-tiempo (ug/g) el cerebro (figura 153 y figura 154). Los valores de C_{máx} en la región cerebral eran significativamente menores que en la región cefálica (69 ± 8 versus 200 ± 0 a 1 mg/kg, $p<0,01$; y 836 ± 117 versus 1844 ± 314 ug, $p<0,01$ a 10 mg/kg, respectivamente). Las tasas constantes de eliminación fueron $0,017 \pm 0,002/\text{h}$ y $0,014 \pm 0,001/\text{h}$ para el cerebro y $0,016 \pm 0,002$ y $0,010 \pm 0,001/\text{h}$ para la región cefálica a 1 y 10 mg/kg, respectivamente. Los valores de tiempo medio residual fueron 42 ± 5 versus 51 ± 5 horas para el cerebro ($p=0,048$), y 45 ± 7 y 70 ± 9 horas para la cabeza ($p<0,01$) a 1 y 10 mg/kg, respectivamente. Estas observaciones sugerían que la proteína dosificada se eliminó de ambas

regiones más rápidamente a dosis menores que a dosis mayores. Las vidas medias estaban en un rango de 42 a 70 horas en estas regiones tras la dosificación IT a 1 mg/kg y 10 mg/kg de HNS.

5 Se observaron gradientes de concentración desde las secciones proximales a las medias y distales de la médula en ambos niveles de dosis (datos no mostrados). Tras la dosificación IT, el pico de concentración (ug/mm de la columna de la médula) se vio alrededor de 30 min (0 a 1 h) en la sección proximal, 1 a 4 horas en la media (excepto en una rata que fue de 24 horas) y 1 a 8 horas en la sección distal. Las vidas medias en estas secciones eran variables (media de t_{1/2}: 32 ± 13 y 45 ± 18 horas para las secciones proximales, 39 ± 16 y unas 50 horas para las medias, y 30 ± 12 y unas 123 horas para las secciones distales de la columna a 1 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente). Los valores medios de las concentraciones pico eran proporcionales a las dosis en cada una de estas tres secciones a 1 y 10 mg/kg de ¹²⁴I-HNS (0,5 versus 6,0, 0,2 versus 0,9 y 0,1 versus 0,5 ug/mm en las secciones proximales, medias y distales de la columna, respectivamente). Los valores medios de AUCúltima seguían el mismo patrón proporcional que se vio en la concentración pico (9,5 versus 83, 6,8 versus 35, y 2 versus 38 h.ug/mm en las secciones proximales, medias y distales, respectivamente).

10 15 Aunque la HNS no era detectable en la mayoría de los órganos periféricos, era medible en el hígado 1 hora (el primer punto de tiempo de imagen después de la dosificación) a 96 horas (tres de cuatro animales) a 1 mg/kg y a las 192 horas (las cuatro ratas) a 10 mg/kg tras la dosificación IT (figura 158). Las concentraciones en el hígado alcanzaron el pico a las 2 horas después de la dosificación IT de 1 mg/kg y 7 horas después de la dosificación IT de 10 mg/kg, lo cual se siguió por una fase de eliminación con cinética de primer orden. La tasa constante de eliminación fue más rápida a 1 mg/kg (λz 0,030 ± 0,011/h) que a 10 mg/kg (λz 0,017 ± 0/h) ($p=0.10$), con una t_{1/2} correspondiente más corta (28 ± 16 versus 42 ± 1 horas a las dosis de 1 y 10 mg/kg, respectivamente, $p=0.76$). El valor de AUCúltima a 1 mg/kg se redujo unas 40 veces en comparación con el de 10 mg/kg 204 ± 50 versus 7987 ± 3276 ug/g, respectivamente).

20 25 Tratamiento intravenoso con ¹²⁴I-HNS a las dosis de 1 y 10 mg/kg

30 La concentración en el cerebro, hígado, riñón, corazón (incluyendo el tejido pulmonar) y piel se graficó como función del tiempo tras la dosificación IV de 1 y 10 mg/kg de HNS como se muestra en la figura 159 a la figura 163, respectivamente. Debido a que el primer punto de tiempo de imagen estática para estos órganos fue una hora después de la dosificación, la fase inicial de estas curvas de concentración-tiempo no puede observarse en este estudio. Las curvas de concentración-tiempo para el hígado, riñón, corazón y piel mostraron una fase plana de 1 a 8 horas después de la dosificación IV. Esta fase plana duró 14 horas en el cerebro post-dosis, sugiriendo que el cerebro captó la proteína dosificada por vía IV más lentamente que los órganos periféricos. Los datos restantes indicaban una fase de eliminación terminal con una cinética aproximada de primer orden.

35 40 Las vidas medias de eliminación en el hígado, riñón, corazón y piel fueron 47 ± 10 y 38 ± 13 horas para el hígado, 54 ± 25 y 29 ± 16 horas para el riñón, 36 ± 15 y 42 ± 19 horas para el corazón y 40 ± 21 y 31 ± 13 horas para la piel a 1 y 10 mg/kg, respectivamente; mientras que las vidas medias en el cerebro fueron 71 ± 23 y 60 ± 53 horas (la Rata 3 en el grupo con 10 mg/kg fue excluida por tener datos insuficientes para determinar la t_{1/2}) a 1 y 10 mg/kg, respectivamente. No se vieron diferencias estadísticas entre las vidas medias a 1 y 10 mg/kg en estos órganos, con una excepción de un valor de $p<0.03$ para el riñón.

45 50 Los valores medios de Cmáx para el hígado, piel, riñón, corazón y cerebro fueron 9,6, 0,3, 0,25, 0,22 y 0,08 ug/g a 1 mg/kg y 132, 7,9, 3,9, 3,7 y 1,8 ug/g a 10 mg/kg. Los cocientes de Cmax a 10 mg/kg con los valores correspondientes a 1 mg/kg fueron 14, 26, 16, 17 y 23 para estos órganos. Luego que los valores de Cmax del animal individual se normalizaron para la dosis, los valores de Cmax/dosis a 10 mg/kg fueron significativamente mayores que los de 1 mg/kg en todos estos órganos (la mayoría de los valores de $p<0.05$, $p=0.06$ para el hígado). Los valores de AUCúltima para el hígado, piel, riñón, corazón y cerebro fueron 525, 16, 14, 9,3 y 7 h.ug/g a 1 mg/kg; y 6747, 276, 183, 201 y 86 h.ug/g a 10 mg/kg. Los cocientes de AUCúltima a 10 mg/kg con los valores correspondientes de AUCúltima a 1 mg/kg fueron 13, 17, 13, 22 y 12 para estos órganos, respectivamente. Después de la normalización, los valores de AUCúltima/dosis a 10 mg/kg fueron significativamente mayores que los de 1 mg/kg en la piel ($p<0.01$), marginalmente diferentes en el corazón ($p=0.06$) y no significativamente diferentes en el hígado, cerebro y riñón (todos los valores de $p>0.34$).

55 60 Estas observaciones sugerían (1) las vidas medias en la mayoría de los órganos eran unos 2 días, con la excepción del cerebro (unos 3 días); (2) la exposición por gramo en el hígado fue mayor que en la piel, corazón y riñón, las cuales fueron mayores que la del cerebro; (3) con un aumento de diez veces en la dosis (10 / 1 mg/kg), los valores de Cmáx a 10 mg/kg para todos los órganos evaluados aumentaron más de 10 veces que a 1 mg/kg.

La concentración pico en el cerebro se alcanzó 1- 24 horas (Tmax) tras la dosificación IV.

Comparación de tratamientos IV versus IT

Las curvas concentración-tiempo en el cerebro e hígado después de la administración IV e IT a 1 y 10 mg/kg se comparan en la figura 164 y figura 165, respectivamente. Los cocientes de Cmax en el cerebro por IT/IV a 1 y 10 mg/kg fueron 3212 y 1501, respectivamente. Estos cocientes de AUC0-192h fueron 1136 y 978. Estas observaciones indicaban que, cuando se injectó la misma dosis de HNS, la administración intratecal resultó en una exposición aproximadamente tres logaritmos mayor del cerebro que con la administración por vía intravenosa. La vida media de eliminación en el cerebro fue 2 días (45 y 49 días a 1 y 10 mg/kg) por administración IT y 3 días (71 y 60 horas a 1 y 10 mg/kg) por vía IV a ambos niveles de dosis.

Sin embargo, las exposiciones hepáticas tras la dosificación IT fueron similares a la IV a la misma dosis de HNS. Los cocientes de Cmax en el hígado por IT/IV a 1 y 10 mg/kg fueron 0,5 y 0,8, y los cocientes de AUCúltima fueron 0,4 y 1,2, respectivamente.

Conclusión

Los perfiles farmacocinéticos (PK) y de biodistribución (BD) de la ¹²⁴I-sulfamidasa (HNS) se estudiaron con imágenes tisulares por PET en ratas tras la administración intravenosa o intratecal de 1 o 10 mg/kg de ¹²⁴I-HNS. Los datos de Concentración-tiempo se obtuvieron dinámica (los primeros 20 min) y estáticamente en las regiones de interés a 0,05, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 y 192 horas post dosificación. Por imagen dinámica después de la dosificación IT, la cantidad total de HNS en la región cefálica se redujo a una tasa constante similar de 0,005/min - 0,007/min (λ_z media) en los primeros 20 min. Por imagen estática, las tasas de eliminación del cerebro fueron esencialmente las mismas a las dos dosis del estudio (λ_z : 0,016/h versus 0,014/h para 1 y 10 mg/kg, respectivamente) con una vida media similar de unos dos días.

Los valores de Cmax y AUCúltimo eran proporcionales a las dosis administradas, y se indicó una conducta lineal de la PK en el rango de dosis de 1 a 10 mg/kg dado en estos regímenes de una dosis IT.

Se observaron gradientes de concentración desde las secciones proximales a las distales de la médula en ambos niveles de dosis.

Tras la dosificación IT, la concentración pico se vio alrededor de 20 min en las secciones proximales, 1 a 4 horas en las medias y 1 a 8 horas en las secciones distales. La conducta lineal de la PK también se indicó en las diferentes secciones de la columna.

Tras la dosificación IT, la proteína de HNS era medible en el hígado desde un tiempo muy temprano hasta 96 horas a 1 mg/kg y 192 horas a 10 mg/kg. La tasa de eliminación fue más rápida a 1 mg/kg (λ_z 0,030/h) que a 10 mg/kg (λ_z 0,017/h), con una t_{1/2} correspondiente más corta (28 ± 16 versus 42 ± 1 horas a las dosis de 1 y 10 mg/kg, respectivamente).

Tras la dosificación IV, las vidas medias de eliminación en el hígado, riñón, corazón y piel fueron 47 ± 10 y 38 ± 13 horas para el hígado, 54 ± 25 y 29 ± 16 horas para el riñón, 36 ± 15 y 42 ± 19 horas para el corazón y 40 ± 21 y 31 ± 13 horas para la piel a 1 y 10 mg/kg, respectivamente; mientras que las vidas medias en el cerebro fueron 71 ± 23 y 60 ± 53 horas. Los valores medios de Cmax para el hígado, piel, riñón, corazón y cerebro fueron 9,6, 0,30, 0,25, 0,22, y 0,08 ug/g a 1 mg/kg y 132, 7,9, 3,9, 3,7 y 1,8 ug/g a 10 mg/kg. Despues de que los valores de Cmax del animal individual se normalizaron para la dosis, los valores de Cmax/dosis a 10 mg/kg fueron significativamente mayores que los de 1 mg/kg en todos estos órganos (la mayoría de los valores de $p<0,05$, $p=0,06$ para el hígado). Los valores de AUCúltima para el hígado, piel, riñón, corazón y cerebro fueron 525, 16, 14, 9,3 y 7 h.ug/g a 1 mg/kg; y 6747, 276, 183, 201 y 86 h.ug/g a 10 mg/kg. Despues de la normalización, los valores de AUCúltima /dosis a 10 mg/kg fueron significativamente mayores que los de 1 mg/kg en la piel ($p<0,01$), marginalmente diferentes en el corazón ($p=0,06$), y no significativamente diferentes en el hígado, cerebro y riñón (todos los valores de $p>0,34$).

EJEMPLO 23: Tratamiento de los pacientes con síndrome de Sanfilippo tipo A con HNS

La administración directa al SNC a través, p.ej., de la vía IT puede usarse para tratar efectivamente a los pacientes con Sanfilippo A. Este ilustra un estudio multicéntrico de escalación de dosis para evaluar la seguridad hasta 3 niveles de dosis una semana sí una semana no (EOW) por un total de 40 semanas de rhHNS administrada a través de un equipo de administración intratecal (IDDD) a pacientes con Sanfilippo A. Varios equipos de administración intratecal de medicamentos idóneos para tratamiento en humanos se ilustran en las figuras 94-97.

[0583] Se reclutarán hasta 20 pacientes:

Cohorte 1: 5 pacientes (Dosis Mínima)

Cohorte 2: 5 pacientes (Dosis Intermedia)

5 Cohorte 3: 5 pacientes (Dosis Máxima)

5 pacientes serán asignados al azar a ningún tratamiento.

Los pacientes son seleccionados para el estudio según la inclusión de los siguientes criterios:

10 Se determina la seguridad de las dosis ascendentes de HNS administrada por inyección IT por 40 semanas en pacientes con Sanfilippo A. Además, se evalúa la actividad clínica de la HNS sobre la función cognitiva y la farmacocinética con dosis única y repetida en el suero y las concentraciones en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

15 EJEMPLOS DE ADMINISTRACIÓN POR VÍA IT DE NAGLU-IGFII

EJEMPLO 24: Estudio in vitro de rhNaglu y Naglu-IGFII

20 El mecanismo de captación celular por cada una de las variantes de Naglu se estudió usando dos cepas de células fibroblásticas de pacientes con Sanfilippo B, GM02391 (P359L) y GM 01426 (E153K), y una línea celular fibroblástica humana normal. Atribuidas a la expresión del receptor M6P sobre la línea celular, las células fibroblásticas tradicionalmente son usadas por los investigadores para el estudio de la captación celular de enzimas lisosomales.

25 Los estudios de captación celular se hicieron por incubación de las células fibroblásticas con rhNaglu o Naglu-IGFII por cuatro horas a 37°C. Las células fueron lavadas y lisadas después de la incubación, y se midió la actividad enzimática de Naglu en los lisados celulares. La incubación de rhNaglu con células fibroblásticas resultó en cantidades apenas detectables de enzimas intracelulares. Por el contrario, la incubación de Naglu-IGFII con células fibroblásticas resultó en un nivel pronunciado de enzima intracelular (figura 166). La cantidad de Naglu-IGFII internalizado alcanzó la saturación cuando la cantidad de enzima usada para incubación aumentó. La captación saturante dependiente de la dosis es un hallazgo típico para la captación celular mediada por el receptor. Asimismo, la internalización de Naglu-IGFII no fue inhibida por la M6P exógena, pero fue inhibida por la IGFII exógena completamente (figura 166). Este resultado indicó que la internalización de Naglu-IGFII en las células fibroblásticas depende del receptor M6P/IGFII de forma independiente de la glicosilación.

35 También se realizó un experimento para estudiar el tráfico de rhNaglu y Naglu-IGFII a lisosomas. Las células de fibroblastos de pacientes de Sanfilippo B (GM01426) se usaron para este estudio. La detección de rhNaglu y Naglu-IGFII se examinó mediante tinción de las células con anticuerpo polyclonal Naglu antihumano después de la incubación inicial de las proteínas con las células. La tinción inmunofluorescente de LAMP-1 (proteína de membrana lisosómica asociada 1) se utilizó para la detección de lisosomas. La co-localización de rhNaglu y Naglu-IGFII con lisosomas se visualizó mediante microscopía confocal (Figura 167).

40 Se observó una extensa internalización de Naglu-IGFII después de 4 horas de incubación de la proteína con las células, se demostró la colocalización de Naglu-IGFII con los lisosomas. Por el contrario, rhNaglu no mostró internalización en el mismo esquema de tiempo, y no se observó colocalización con los lisosomas. Este resultado proporcionó la evidencia que Naglu-IGFII se internalizó en las células y se trasportó al compartimento celular correcto, los lisosomas. Se determinó que la vida media de la Naglu-IGFII internalizada en células fibroblásticas de un paciente con Sanfilippo B era 1,5 días (datos no mostrados).

50 EJEMPLO 25: Estudios in vivo en modelos murinos

Rata canulada de tipo salvaje (wt)

55 Además del modelo murino de Sanfilippo B, la rata de tipo silvestre canulada, un modelo en animal no deficiente, también se usó para la evaluación de la molécula in vivo. Las ratas canuladas wt tenían una cánula quirúrgicamente implantada en la región lumbar superior y torácica inferior de la médula espinal, y se administró una inyección de 35ul al LCR a través de la cánula. Los criterios evaluados para el estudio molecular usando este modelo animal fueron el ensayo de actividad de Naglu y la inmunohistoquímica del cerebro y la médula espinal.

60 Modelo murino de síndrome de Sanfilippo tipo B

65 El modelo murino de Síndrome de Sanfilippo tipo B (ratón Naglu -/-, ratón Sanfilippo B) fue generado por E. Neufeld y colegas (Li HH, et al., PNAS 96(25):14505-14510; 1999). El exón 6 del gen Naglu del ratón es alterado por la inserción de un marcador de selección, el gen resistente a neomicina. El ratón Naglu -/-

homocigoto resultante es completamente deficiente en Naglu (figura 168) y tiene acumulación total de GAG en el hígado y riñón. A pesar de la deficiencia total de Naglu, estos ratones generalmente son sanos y tienen una vida de 8-12 meses. Los cambios de la expresión de otras enzimas lisosomales ocurre alrededor de los 5 meses de edad, estos cambios incluyen el aumento compensatorio de β -galactosidasa, α -glucosidasa, β -glucuronidasa y β -hexosaminidasa en hígado y cerebro, elevación de α -L-iduronidasa en el hígado pero no en el cerebro, y la reducción de neuraminidasa en hígado y cerebro. La muerte ocurre como resultado de retención urinaria e infección urinaria. El modelo murino de Sanfilippo B se ha estudiado extensamente en la literatura para mostrar los cambios patológicos de Sanfilippo B. Se informa que el fenotipo relacionado con la patología del ratón Naglu -/- en el SNC es hipo-actividad a los 4,5 meses de edad, pero también se ha observado hiperactividad en otras edades.

Los cambios neuropatológicos en el ratón Naglu -/- se describen como vacuolas y cuerpos de inclusión en las neuronas, macrófagos y células epiteliales observados por microscopía electrónica (EM). Estos cambios patológicos comienzan a los 33 días de edad, y empeoran progresivamente al ir envejeciendo los animales. El análisis histopatológico también demostró astrocitos y células microgliales activadas. El análisis bioquímico de dos gangliósidos, GM2 y GM3, mostró un aumento de 5 y 9 veces en el cerebro. (Debido a que GM2 y GM3 no son sustratos directos de Naglu, y podría ser retardador demostrar una reducción significativa Despues de la ERT por un período corto de tiempo, no se usaron como biomarcadores finales para la POC).

El análisis bioquímico se hizo por medición de las actividades enzimáticas de Naglu y niveles de GAG, el análisis histológico se hizo por inmunohistoquímica del anticuerpo anti-Naglu humana, anticuerpo anti-LAMP-1, anticuerpo anti-Iba-1 y anticuerpo anti-GFAP. El anticuerpo anti-Naglu humana usado para este estudio era un anticuerpo monoclonal de ratón que no se une al Naglu murino endógeno en el ratón de tipo silvestre de la Naglu mutada en el ratón Sanfilippo B. La inmunotinción con LAMP-1 usó un anticuerpo que se une a la proteína de la membrana lisosomal, la proteína 1 de la membrana lisosomal asociada. La tinción para Iba-1 usó un anticuerpo que se une a la proteína adaptadora unidora de calcio que es específica para células microgliales y macrófagos. La tinción para GFAP usó un anticuerpo que se une a la proteína ácida fibrilar glial que es específica para los astrocitos.

30 *Evaluación de la actividad biológica in vivo por inyección intracranal en el ratón Sanfilippo B*

El objetivo de este estudio era evaluar la actividad biológica de las enzimas Naglu in vivo. En este estudio, las proteínas se administraron a través de inyección IC en el cerebro del ratón Sanfilippo B. Se organizó que la edad de los ratones Sanfilippo B estuviera cerca de las 8 semanas de edad. La vía de inyección IC ofrecía el mejor escenario para evaluar la eficacia de las moléculas. Se evaluó la capacidad de las proteínas Naglu de ser captadas en las células neuronales y reducir el depósito lisosomal. Se usó inmunohistoquímica para evaluar la biodistribución. Y el depósito lisosomal se caracterizó por el número y tamaño de la tinción positiva usando inmunotinción para LAMP-1

La inyección IC se hizo por inyección directa a través del cráneo del ratón Sanfilippo B en la corteza cerebral derecha. Se inyectaron dos microlitros, o 35 μ g de proteína Naglu en cada animal. El sacrificio de los animales tuvo lugar 7 días después de la inyección. El tiempo de sacrificio de los animales fue predeterminado en un estudio piloto donde los sacrificios del animal tuvieron lugar 3, 7, y 14 días después de la inyección. A partir del estudio piloto, se determinó que 7 días post-inyección es el momento óptimo para el estudio inmunohistoquímico. Las secciones cerebrales se cortaron trasversalmente (figura 169), y se realizó la inmunotinción para Naglu y Lamp-1. La captación celular en las neuronas y células gliales en el ratón Sanfilippo B tratado con rhNaglu y Naglu-IGF-II se demostró por inmunohistoquímica usando un anticuerpo anti-Naglu humana (figura 170 y figura 171). No hubo una diferencia significativa entre el ratón Sanfilippo B tratado con rhNaglu y Naglu-IGFII con respecto a la captación celular. Adicionalmente, la inmunotinción para LAMP-1 del tejido cerebral del ratón tratado con rhNaglu y Naglu-IGFII indica un nivel significativo de reducción del depósito lisosomal. El nivel de reducción del depósito lisosomal en los grupos tratados con rhNaglu y Naglu-IGFII estaba casi al mismo nivel del ratón de tipo silvestre normal.

La reducción del depósito lisosomal también se observó en los ratones Sanfilippo B evaluados con Naglu-TAT, Naglu-Kif y PerT-Naglu tras la inyección IC (datos no mostrados). Este estudio demostró la actividad biológica in vivo de todas las variantes de Naglu.

En un estudio separado, a ratones deficientes en Naglu se les administró un vehículo o alternativamente una, dos o tres dosis semanales de un constructo de proteína de fusión Naglu-IgF-II recombinante (Naglu) en PBS. Un grupo salvaje no tratado de ratones sirvieron como un control salvaje no tratado y se les administró un vehículo sin Naglu. Los ratones fueron sacrificados 24 horas después de la inyección final, seguida por preparación tisular para inmunohistoquímica (IHC) y análisis histopatológico.

La distribución de Naglu a los tejidos cerebrales de los ratones deficientes en Naglu era evidente tras la administración por vía IT de la Naglu recombinante. Como ilustra la figura 172A, la administración de Naglu

recombinante por vía IT a los ratones deficientes en Naglu resultó en una amplia reducción de la vacuolización celular en los tejidos de la sustancia blanca comparados con ratones deficientes en Naglu a los cuales se les administró el vehículo por vía IT. Similarmente, y como ilustra la figura 172B, el análisis morfométrico reveló una notable reducción en la inmunotinción de LAMP1 en los tejidos de la sustancia blanca de los ratones tratados en relación con los ratones no tratados deficientes en Naglu, reflejando así una mejoría de la patología de la enfermedad.

Como muestran las figuras 173A-B, en cada área de tejido cerebral evaluado (la corteza, núcleo caudado y putamen (CP), tálamo (TH), cerebelo (CBL) y sustancia blanca (WM)) el área positiva para LAMP se redujo en los ratones tratados con Naglu en relación con los ratones de control no tratados deficientes en Naglu, y se acercaba al área positiva para LAMP de los ratones salvajes. Particularmente notable es que las áreas positivas para LAMP en cada área de tejido cerebral analizado se redujeron tras la administración por vía IT de dos o tres dosis (figura 173B) en relación a una dosis (figura 173A) de Naglu.

Estos resultados confirman que la Naglu administrada por vía IT puede alterar la progresión de las enfermedades por depósito lisosomal tales como el síndrome de Sanfilippo B en el modelo murino deficiente en Naglu, confirmando la capacidad de las enzimas administradas por vía IT como Naglu para tratar las manifestaciones en el SNC asociadas con las enfermedades por depósito lisosomal, como el Síndrome de Sanfilippo tipo B.

Evaluación molecular por inyección intratecal (IT) en la rata canulada de tipo silvestre

Este estudio directamente se asemeja un enfoque a través de un puerto para la administración del medicamento. La proteína Naglu se administró a través de inyecciones IT en ratas canuladas wt para determinar la biodistribución en el parénquima del cerebro.

La cánula en estos animales se colocó en la porción lumbar superior y torácica inferior de la médula espinal (figura 174). A los animales se les inyectó 35 µl, o 385 1 µg de rhNaglu, Naglu-TAT, Naglu-IGFII y PerT-Naglu, a través de la cánula (debido a la limitación de la solubilidad, Naglu Kif se inyectó con solo 38,5 ug, lo cual es 10 veces menos que el resto de las Naglu). Los sacrificios ocurrieron 4 h y 24h después de las inyecciones.

Se recolectaron muestras de tejido cerebral y de médula espinal con el ensayo de actividad de Naglu. En el cerebro de los animales tratados, los animales tratados con Naglu-TAT y Naglu-IGFII exhibían mayor actividad que los animales tratados con rhNaglu y las otras variantes de Naglu (figura 175). Como tendencia general, la actividad Naglu fue significativamente mayor en la médula espinal que en el cerebro para todos los animales tratados con vehículo (datos no mostrados). Este fenómeno puede indicar que las proteínas fueron captadas más en el sitio cercano a la inyección IT.

El análisis inmunohistoquímico indicaba que la biodistribución del grupo tratado con Naglu-IGFII era más extensor en el cerebro que el grupo tratados con las otras variantes de Naglu 24 h después de las inyecciones IT (figura 176 y figura 177). En los animales tratados con rhNaglu la proteína se observó solo en las meninges del cerebro. En la sección de la médula espinal, la IHC indicaba una captación celular de rhNaglu en las neuronas de la sustancia gris, pero en mucha menor extensión que la captación de Naglu-IGFII en las neuronas de la médula espinal (datos no mostrados).

En el grupo inyectado con Naglu-TAT por vía IT se observó una actividad de Naglu aún mayor en el tejido cerebral por análisis bioquímicos, pero la IHC no indicó una penetración de Naglu-TAT en el parénquima del cerebro, además de la remanente en las meninges. Además de Naglu-IGFII, las otras variantes de Naglu no mostraron biodistribución más allá de las meninges, un fuerte testimonio de la dependencia de los receptores M6P/IGFII para la captación celular de Naglu en el cerebro después de la inyección por vía IT. Este estudio apuntó a Naglu-IGFII como la molécula líder para el desarrollo farmacológico para Sanfilippo B.

EJEMPLO 26: PRUEA DE ESTUDIO DE CONCEPTO USANDO NAGLU-IGFII

Diseño experimental

El estudio de prueba de concepto se diseñó para mostrar la biodistribución y la inversión del depósito lisosomal después de la inyección por vía IT de Naglu-IGFII en el ratón Sanfilippo B. Para este estudio, tres grupos ratones Sanfilippo B de 8 semanas de edad fueron tratados con una inyección de Naglu-IGFII por vía IT. Cada inyección IT constituía un volumen de 10 µl o 260 ug de Naglu-IGFII. Había tres grupos tratados, grupo 1x inyección, 2x inyección y 3x inyección. Para el grupo 1x inyección, se administró una dosis de proteína el día 0. Los animales fueron sacrificados 24 h después de la inyección. Para el grupo 2x inyección, se administraron dos inyecciones IT el día 0 y día 7, y los animales fueron sacrificados 24h después de la última inyección. Para el grupo 3x inyección, se administraron inyecciones IT el día 0, día 7 y día 14, y los animales fueron sacrificados 24h después de la última

inyección. También se incluyeron tres grupos de ratón tratado con vehículo. Para los grupos con control de vehículo, se injectaron ratones Sanfilippo B con vehículo al mismo intervalo de tiempo que los grupos tratados y fueron sacrificados de la misma forma que los grupos tratados.

5 Ambos análisis bioquímicos e histológicos fueron aplicados para evaluar el resultado del estudio. Los análisis bioquímicos incluyen un ensayo de actividad Naglu para medir la cantidad de enzimas en el tejido y un ensayo de GAG total para evaluar la reducción del depósito lisosomal. El hígado y cerebro fueron los dos tejidos sometidos para los análisis bioquímicos (figura 178 y figura 179). Los análisis histológicos incluyen la tinción con H&E de los tejidos para la evaluación morfológica (datos no mostrados), y la tinción inmunohistoquímica con anticuerpo anti-Naglu, LAMP, Iba y GFAP humana (no se muestran los datos para la tinción para Iba y GFAP).

10 El anticuerpo anti-Naglu humana usado para este estudio era un anticuerpo monoclonal de ratón que no se une al Naglu murino endógeno en el ratón de tipo silvestre de la Naglu mutada en el ratón Sanfilippo B. La 15 inmunotinción con LAMP-1 usó un anticuerpo que se une a la proteína de la membrana lisosomal. La tinción para Iba-1 usó un anticuerpo que se une a la proteína adaptadora unidora de calcio que es específica para células microgliales y macrófagos. La tinción para GFAP usó un anticuerpo que se une a la proteína ácida fibrilar glial que es específica para los astrocitos.

20 Las imágenes microscópicas representativas de la inmunofluorescencia de Naglu se muestran en la figura 180. La figura 181 muestra una sección representativa esquemática del cerebro. Aunque se detectó Naglu-IGFII en la corteza cerebral la cual está más cerca de las meninges, no se encontró en la región subcortical tal como el núcleo caudado, el tálamo y la sustancia blanca (datos no mostrados). Debido a que la inmunotinción de LAMP-1, Iba-1 y 25 GFAP de las mismas áreas subcorticales demostró la inversión del depósito lisosomal, se cree que la inmunotinción negativa de Naglu en las áreas cerebrales profundas probablemente se debía a la sensibilidad de la inmunofluorescencia para Naglu.

30 Las imágenes microscópicas representativas de la inmunofluorescencia de Lamp-1 se muestran en las figuras 182 a figuras 186. Para demostrar la extensión de la distribución y eficacia de la proteína, se seleccionaron la corteza cerebral y regiones subcorticales tales como el núcleo caudado, tálamo y sustancia blanca, y corteza cerebelosa para el análisis inmunohistológico. El resultado de la inmunotinción para Iba-1 y GFAP (datos no mostrados) indicaba que lo que se vio en la inmunotinción para LAMP-1 era el efecto combinado de los cambios de las 35 células microgliales y astrocitos, los dos tipos celulares que se reportaron afectados en el modelo murino de Sanfilippo B (Li 2002, Ohmi 2002) además de las neuronas. Debido a las limitaciones técnicas, la inmunotinción para LAMP-1 no pudo revertir el depósito lisosomal en las neuronas. Para observar mejor la acumulación lisosomal en las neuronas, como vacuolas e inclusiones, usualmente se utiliza la microscopía electrónica (no se incluyó la EM en el presente estudio).

40 Se apreciará que la identificación de los tipos celulares se limitó a las neuronas y células gliales. Las neuronas se identifican por el núcleo relativamente grande y pálido que contiene uno o más nucleolos densamente teñidos, y el citoplasma frecuentemente detectable. Las células gliales generalmente se 45 identificaban por el núcleo pequeño y denso y el citoplasma inadvertido. La distinción entre los diferentes tipos de células gliales, como astrocitos, células microgliales, células ependimarias y oligodendroctos, se hace mejor tiñendo con marcadores específicos de tipo celular.

50 Además de la reducción del depósito lisosomal exhibido por la inmunotinción para LAMP-1, la inmunotinción para Iba-1 indicaba la reducción del tamaño celular y el número de procesos en las células microgliales, y la inmunotinción para GFAP indicaba la reducción del tamaño celular y el número de procesos/longitud en los astrocitos, en la corteza cerebral, caudado, nucleado, tálamo, sustancia blanca y cerebro tras las inyecciones por vía IT de Naglu-IGFII (datos no mostrados). Asimismo, el análisis histopatológico por la tinción con H&E (hematoxilina y eosina) de los tejidos cerebrales de las mismas áreas examinadas por inmunohistoquímica, demostró la reducción de vacuolas en la célula glial tras la inyección 3x por vía IT de Naglu-IGFII. Todo el resultado mencionado antes también sugería el efecto relacionado con la dosis de las inyecciones de Naglu-IGFII por vía IT.

55 Los análisis bioquímicos de los ratones Sanfilippo B después de la inyección por vía IT de Naglu-IGFII detectaron la actividad de Naglu en el cerebro e hígado. La eficacia de la Naglu-IGFII se demostró por la reducción total de GAG en el cerebro e hígado. La inmunohistoquímica demostró la biodistribución de Naglu-IGFII en el parénquima del cerebro. La inmunotinción para LAMP-1, Iba-1, GFAP y el análisis histopatológico por tinción con H&E exhibieron la reducción del depósito lisosomal, la reducción de tamaño y el proceso por las 60 microglias y los astrocitos no solo en el área cortical cerebral sino también en las áreas subcorticales, sustancia blanca y corteza cerebelosa.

Conclusiones

65 Entre otras cosas, se ha demostrado que la proteína de fusión, Naglu-IGFII, exhibía actividad enzimática

in vitro hacia un sustrato que tiene una estructura similar al sustrato nativo de la Naglu. El estudio de captación celular in vitro demostró que la molécula era captada por las células por el receptor M6P/IGFII en una manera independiente de la Glicosilación de M6P. Se demostró que la Naglu-IGFII internalizada se colocalizaba con los lisosomas. Se demostró que la Naglu-IGFII reduce el depósito lisosomal in vivo tras la inyección IC en el ratón Sanfilippo B. En comparación con rhNaglu y otras fusions y modificaciones de Naglu, Naglu-IGFII las superó penetrando en el parénquima del cerebro de la rata de tipo silvestre canulada después de la inyección por vía IT. Finalmente, la inyección por vía IT de Naglu-IGFII en los ratones Sanfilippo B demostró una extensa distribución más allá de las meninges, y se observó la inversión del depósito lisosomal en la corteza cerebral así como en las regiones subcorticales. En conjunto, estos datos indican que la Naglu-IGFII es un medicamento candidato para el tratamiento de la enfermedad de Sanfilippo B.

EJEMPLO 27: TOXICIDAD, FARMACOCINÉTICA (PK) Y ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN TISULAR DE LA NAGLU-IGFII ADMINISTRADA POR VÍA IT

15 *Estudios de prueba de concepto en el ratón*

A tres grupos (n=3) de ratones Naglu (-/-) se les inyectó 10 uL que contenían 260 ug de Naglu-IGFII como una inyección IT lumbar en bolus. La dosis de 260 ug se traduce en una dosis de 520 mg/kg de peso cerebral (cerebro de ratón = 0,0005 kg). Un grupo se inyectó el Día 0 y fue sacrificado 24h post-inyección. Un segundo grupo fue inyectado los Días 0 y 7, y los animales fueron sacrificados 24 h después de la última inyección. El tercer grupo fue inyectado los Días 0, 7 y 14, y fue sacrificado 24h después de la última inyección. Cada grupo dosificado con Naglu-IGFII fue apareado con un grupo control de vehículo para controlar la edad/severidad de la enfermedad.

25 La actividad enzimática de la Naglu en el cerebro y el hígado fue similar para los tres grupos dosificados con Naglu-IGFII. Comparando la actividad enzimática de rhNaglu en el hígado con el cerebro, se encontró una actividad de enzima rhNaglu de más de 10 veces. Se contempló que debido a que los niveles de actividad enzimática de rhHNS eran comparables en el cerebro e hígado luego de 1, 3 y 6 meses de dosificación en los estudios pivotales de toxicidad en ratas y monos jóvenes, alguna porción de la dosis de rhNaglu dada a los ratones Naglu (-/-) puede no haber sido administrada por vía IT, sino más bien sistémicamente. No obstante, el nivel de GAG total en el cerebro mostraba una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,05$) luego de 3 inyecciones por vía IT. Se vio una tendencia relacionada con la dosis para la reducción total del nivel de GAG en los hígados, la cual fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en los grupos que recibieron 2 o 3 dosis.

35 La biodistribución de Naglu-IGFII tras la inyección por vía IT se observó más allá de las meninges dentro del parénquima del cerebro, pero las regiones subcorticales profundas eran negativas para la inmunotinción para el anticuerpo anti-Naglu. En los grupos que recibieron 2 o 3 dosis solamente se observó una reducción de la actividad lisosomal para la inmunotinción para la proteína de membrana asociada al lisosoma. Las áreas de reducción de la actividad lisosomal incluyeron la corteza cerebral y las regiones subcorticales profundas del núcleo caudado, tálamo y sustancia blanca. Así, la reducción de varios parámetros de inmunotinción en los animales dosificados con Naglu-IGFII sugería que los niveles terapéuticos de NAGLU podrían estar presentes a pesar de la ausencia de la inmunotinción anti-NAGLU. Se evidenció una respuesta inflamatoria atenuada por la reducción de la inmunotinción para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) inmunotinción de astrocitos y reducción de la tinción para la molécula adaptora de unión a calcio ionizado (Iba) de la microglia/macrófagos en los grupos que recibieron 2 o 3 dosis solamente. Las áreas de análisis incluyeron la corteza cerebral y las regiones subcorticales profundas del núcleo caudado, tálamo y sustancia blanca.

Estudios en la Rata

50 La rata S-D fue seleccionada como la especie de roedor para la evaluación toxicológica de Naglu-IGFII administrada por vía IT. Como resultado, diecisésis ratas (ocho por sexo) fueron dosificadas con Naglu-IGFII recombinante a la dosis máxima factible (MFD), y a aproximadamente 1/4 y 1/2 la MFD (niveles de dosis baja y media, respectivamente) cada 4 días por un total de 8 dosis.

55 El estudio de PK/biodistribución de una dosis en ratas S-D se realiza para determinar la concentración en LCR y suero, o distribución tisular, respectivamente, tras la administración por vía IT-L a animales machos y hembras.

60 Los estudios de toxicología se diseñan para evaluar la administración IT-L de Naglu-IGFII desde una perspectiva de toxicología y farmacología de seguridad (seguridad neurológica, respiratoria y cardiovascular) en animales machos y hembras. La evaluación toxicológica en estos estudios incluye las observaciones clínicas, pesos corporales, consumo de alimento, patología clínica, evaluaciones apropiadas de farmacología de la seguridad (por examen físico o electrocardiografía), evaluación macro y microscópica del tejido. Un número limitado de muestras de LCR y suero se recolectan y analizan para Naglu-IGFII, y para los anticuerpos contra el artículo en evaluación. La distribución tisular y localización subcelular de Naglu-IGFII se cuantifican por ensayo

de actividad enzimática e inmunohistoquímica, respectivamente. Adicionalmente, los estudios seleccionados incluyen un período de recuperación para evaluar la reversibilidad, o aparición potencial tardía, de cualquier hallazgo toxicológico significativa notada.

5 *Estudios en el mono*

El Mono Cynomolgus ha sido seleccionado como la especie no roedora para las evaluaciones toxicológicas de Naglu-IGFII administrado por vía IT debido a su similitud genética y anatómica con los humanos y así se cree que es la especie más relevante. Dado que la población planificada de pacientes para los estudios clínicos para el síndrome de Sanfilippo tipo B es pediátrica, se realiza un estudio de toxicología crónica a 6 meses en Monos Cynomolgus jóvenes usando la administración de Naglu-IGFII con el equipo de administración intratecal de medicamento (IDDD). Los Monos Cynomolgus jóvenes generalmente son menores de 1 año de edad al inicio del estudio (aproximadamente 7-9 meses de edad) y pesan entre 900 g y 1500 g al inicio del estudio. Los datos obtenidos de un estudio de toxicidad en Monos Cynomolgus jóvenes a dosis repetidas por 1 mes guió la selección del nivel de dosis del estudio y diseño del estudio con monos jóvenes a 6 meses. Los estudios de toxicología a dosis repetidas se diseñan para asemejar la vía clínica esperada (IT-L en bolus) y frecuencia de administración (una semana sí una semana no) por un período de 1 a 6 meses.

Como se describe anteriormente, los estudios de toxicología se diseñan para evaluar la administración IT-L de Naglu-IGFII desde una perspectiva de toxicología y farmacología de seguridad (seguridad neurológica, respiratoria y cardiovascular) en animales machos y hembras. La evaluación toxicológica en estos estudios incluye las observaciones clínicas, pesos corporales, consumo de alimento, patología clínica, evaluaciones apropiadas de farmacología de la seguridad (por examen físico o electrocardiografía), evaluación macro y microscópica tisular. Un número limitado de muestras de LCR y suero se recolectan y analizan para Naglu-IGFII y para los anticuerpos contra el artículo en evaluación. La distribución tisular y localización subcelular de Naglu-IGFII se cuantifican por ensayo de actividad enzimática e inmunohistoquímica, respectivamente. Adicionalmente, los estudios seleccionados incluyen un período de recuperación para evaluar la reversibilidad, o aparición potencial tardía, de cualquier hallazgo toxicológico significativo notado.

30 EJEMPLO 28: ADMINISTRACIÓN INTRATECAL CRÓNICA DE NAGLU-IGFII EOW

Este ejemplo se diseñó para determinar la factibilidad de la dosificación IT-lumbar EOW para 6 inyecciones (estudio de 3 meses) en el modelo murino de Naglu -/. Este régimen de dosificación puede ser clínicamente más relevante comparado con la dosificación semanal.

35 Se estudiaron ratones machos y hembras de ocho semanas de edad Naglu -/- de acuerdo con el siguiente diseño experimental:

40 Tabla 49: Diseño Experimental para la administración EOW

	Grupo A	N	Tratamiento Vehículo	Dosis N/A	Frecuencia	Sacrificio
45	B	6	Naglu-IGFII	60 mg/kg peso cerebral (30 ug)	EOW Inyección IY durante 3 meses (total 6 inyecciones)	24 h después de la última inyección
					EOW Inyección IY durante 3 meses (total 6 inyecciones)	24 h después de la última inyección

50 Se realizaron estudios fisiológicos, incluyendo el ensayo de actividad de Naglu sobre el hígado, cerebro y suero, ensayo de anticuerpo anti-Naglu sobre el suero, y ensayo de BCA sobre el hígado y cerebro. Se realizaron los estudios histológicos, incluyendo la IHC de Naglu sobre el cerebro, médula espinal e hígado, y la tinción para Lamp sobre cerebro y médula espinal.

55 Los tejidos de cerebro, médula espinal e hígado se recolectaron y fijaron en NBF al 10%. Se prepararon secciones de cinco µm para tinción histológica. Se usó la tinción inmunohistoquímica (IHC) de Naglu para detectar la captación celular de la proteína inyectada. La tinción con H&E se usó para observar los cambios morfológicos. LAMP, un indicador de actividad lisosomal y estado de enfermedad, GFAP e Iba-1, dos marcadores patológicos del SNC para astrocitos activados y células microgliales, se usaron para la evaluación de la mejoría histopatológica.

60 La tinción inmunofluorescente de Naglu de cerebro, médula espinal e hígado de vehículo y ratones tratados con Naglu-IGFII demostraron que en el cerebro y médula espinal, se detectó Naglu inyectado en las meninges (M) sólo por IHC y no se detectó tinción positiva para Naglu en ninguna otra región (figura 187). En el hígado, las células sinusoidales (S) eran positivas para Naglu y no se encontró captación de Naglu en los hepatocitos (H).

5 La inmunotinción para LAMP y tinción con H & E del hígado y médula espinal de los ratones tratados con vehículo y Naglu-IGFII demostraron que, comparados con los animales tratados con vehículo, la tinción para LAMP disminuyó en los hígados y médulas espinales tratadas con Naglu. La tinción con H&E demostró que la vacuolación celular en los hepatocitos se redujo evidentemente en el grupo tratado comparado con los animales tratados con vehículo (figura 188 y figura 189).

10 La tinción con H & E del cerebro de los ratones tratados con vehículo y Naglu-IGFII demostró una mejoría de la morfología en el cerebro tras 6 inyecciones una semana sí una semana no de Naglu-IGFII por 3 meses. En el cerebro tratado, la vacuolización celular (flechas) en las regiones examinadas disminuyó en comparación con el grupo con vehículo (figura 190)

15 La IHC para LAMP en varias regiones cerebrales tras 6 inyecciones de Naglu por vía IT por 3 meses demostró que, comparado con el grupo tratado con vehículo, la administración por vía IT de Naglu a los ratones SFB resultó en una reducción de la actividad lisosomal en todas las regiones examinadas revelada por inmunotinción para LAMP (figura 190). Esta reducción se caracterizó por el descenso en el número de células positivas para LAMP, menor tamaño celular y una tinción más clara. Se encontró una notable reducción en el cerebelo y tronco encefálico, el cual se localizaba en la parte caudada del cerebro cercano a la médula espinal, comparado con otras regiones cerebrales. También se encontró una clara reducción en las regiones cerebrales profundas, incluyendo la sustancia blanca, hipocampo y tálamo.

20 25 La IHC para Iba en varias regiones cerebrales tras 6 inyecciones de Naglu por vía IT por 3 meses reveló la activación de las células microgliales (figura 191). Comparado con el grupo tratado con vehículo, no se observó un descenso en el número de células positivas ni de la intensidad de tinción en el grupo tratado con Naglu. Sin embargo, la morfología celular de las células microgliales positivas cambió con un menor tamaño celular en todas las regiones cerebrales examinadas comparadas con grandes y vacuoladas en el grupo tratado con vehículo (insertos).

30 La IHC para GFAP en varias regiones cerebrales tras 6 inyecciones de Naglu por vía IT por 3 meses reveló la activación astrocítica (figura 192). Comparada con el grupo tratado con vehículo, la tinción positiva para GFAP disminuyó en el cerebelo y tronco encefálico, y disminuyó ligeramente en otras regiones examinadas.

35 Con respecto a la captación celular, estos datos demuestran que en el cerebro y médula espinal, se detectó Naglu en las células meníngeas solo después de 6 veces una semana sí una semana no la inyección por vía IT de Naglu IGFII por 3 meses. La Naglu era indetectable por IHC en ninguna otra región del cerebro y la médula espinal. En el hígado, se encontró tinción positiva para Naglu en las células sinusoidales.

40 45 En el cerebro y médula espinal, tras 6 inyecciones por vía IT una semana sí una semana no de Naglu-IGFII por 3 meses, se vio una mejoría histopatológica a lo largo del cerebro y médula espinal aunque la Naglu inyectada era indetectable por IHC. La tinción H&E demostró una reducción de la vacuolación celular en todas las regiones cerebrales examinadas. La tinción para LAMP disminuyó a lo largo de las médulas espinales tratadas y en todas las regiones cerebrales evaluadas incluyendo la sustancia blanca, hipocampo y tálamo las cuales son áreas cerebrales profundas, con un notable descenso en el cerebelo y tronco encefálico en el grupo tratado con Naglu-IGFII. El patrón de tinción disminuido de la tinción para GFAP para astrocitos era consistente con la tinción para LAMP aunque no tan dramáticamente disminuido como Para LAMP. La tinción para Iba-1 mostró la reducción del tamaño celular de las células microgliales en todas las regiones cerebrales examinadas. En el hígado, la tinción con H&E demostró una reducción de la vacuolación celular con una notable reducción en la tinción para LAMP en el grupo tratado con Naglu.

EJEMPLO 29: TRATAMIENTO DE PACIENTES CON SANFILIPPO B

50 55 La administración directa al SNC a través, p.ej., de la vía IT puede usarse para tratar efectivamente a los pacientes Con síndrome de Sanfilippo tipo B (Sanfilippo B). Este ejemplo ilustra un estudio multicéntrico de escalamiento de dosis diseñado para evaluar la seguridad de hasta 3 dosis cada dos semanas (every other week, EOW) por un total de 40 semanas de Naglu-IGFII y/o rhNaglu administrada a través de un equipo de administración intratecal (IDDD) a pacientes con síndrome Sanfilippo B. Varios equipos de administración intratecal de medicamentos idóneos para tratamiento en humanos se ilustran en las figuras 94-97.

60 Se reclutarán hasta 20 pacientes:

Cohorte 1: 5 pacientes (Dosis Mínima)

65 Cohorte 2: 5 pacientes (Dosis Intermedia)

Cohorte 3: 5 pacientes (Dosis Máxima)

65 5 pacientes serán asignados al azar a ningún tratamiento.

Los pacientes se seleccionan para el estudio con base en la inclusión de los siguientes criterios:

- 5 Se determina la seguridad de las dosis ascendentes de Naglu-IGFII administrada por inyección IT por 40 semanas en pacientes con Sanfilippo B. Además, se evalúa la actividad clínica de la Naglu-IGFII y/o rhNaglu sobre la función cognitiva y la farmacocinética con dosis única y repetida en el suero y las concentraciones en el líquido cefalorraquídeo (LCR).
- 10 Típicamente, una cantidad terapéuticamente efectiva de Naglu-IGFII y/o rhNaglu se administra por vía intratecal a intervalos regulares, dependiendo de la naturaleza y extensión de los efectos de la enfermedad, y de forma continua. La administración a un «intervalo», tal como se usa aquí, indica que la cantidad terapéuticamente efectiva se administra periódicamente (distinguido de una dosis de una sola vez). El intervalo puede ser determinado por las técnicas clínicas estándar. En algunas realizaciones, Naglu-IGFII y/o rhNaglu se administran por vía intratecal cada dos meses, mensual, dos veces al mes, cada 3 semanas, cada 2 semanas, semanalmente, dos veces a la semana, 15 tres veces a la semana o diariamente. El intervalo de administración para un individuo no necesita ser un intervalo fijo, sino que puede variar en el tiempo, dependiendo de las necesidades del individuo. Por ejemplo, en momentos de enfermedad física o estrés, si se presentan o aumentan los anticuerpos anti-Naglu, o si empeoran los síntomas de la enfermedad, el intervalo entre dosis puede disminuir.
- 20 Aunque ciertos compuestos, composiciones y métodos descritos aquí se han descrito con especificidad de acuerdo con ciertos contextos, los siguientes ejemplos sirven solo para ilustrar los compuestos de la invención y no se intenta limitar los mismos.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una composición farmacéutica acuosa que comprende un agente de tamponamiento, un surfactante y un tonicificante y que tiene un pH de 5,5 a 6,5 para su uso en el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento lisosomal en un sujeto, en donde dicha composición comprende una enzima lisosomal a una concentración de más de aproximadamente 10 mg/ml, en donde el agente de tamponamiento es fosfato y está presente en una concentración de hasta 20 mM, y en donde la composición se administra por vía intratecal, intraventricular o intracisternal.
- 10 **2.** La composición farmacéutica acuosa para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enzima lisosomal está a una concentración entre 10-100 mg/ml.
- 15 **3.** La composición farmacéutica acuosa para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la enzima lisosomal está a una concentración de hasta 30 mg/ml.
- 15 **4.** La composición farmacéutica acuosa para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el surfactante es un polisorbato o un poloxámero.
- 20 **5.** La composición farmacéutica acuosa para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el polisorbato es polisorbato 20 u 80.
- 20 **6.** La composición farmacéutica acuosa para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el poloxámero es poloxámero 188.
- 25 **7.** La composición farmacéutica acuosa para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el surfactante está presente a una concentración del 0,001 al 0,5%.
- 25 **8.** La composición farmacéutica acuosa para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el surfactante está presente a una concentración del 0,005-0,05%.
- 30 **9.** La composición farmacéutica acuosa para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tonicificante se selecciona de cloruro de sodio, un azúcar y manitol.
- 35 **10.** La composición farmacéutica acuosa para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición se proporciona como un volumen de dosis única de menos de 5 ml.
- 35 **11.** La composición farmacéutica acuosa para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la enzima lisosomal se selecciona de iduronato-2-sulfatasa (I2S), arilsulfatasa A (ASA), heparán N-sulfatasa (HNS), alfa-N-acetilglucosaminidasa (Naglu) y β-galactosidasa (GLC).
- 40

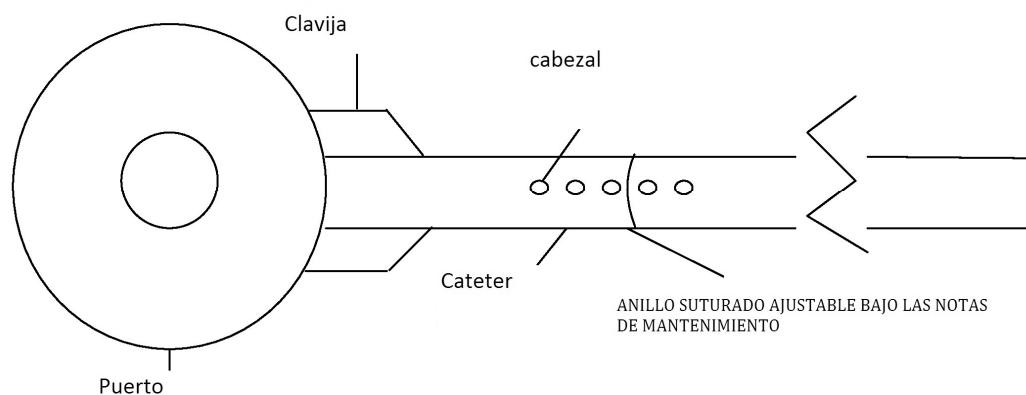


FIGURA 1



Figura 2A

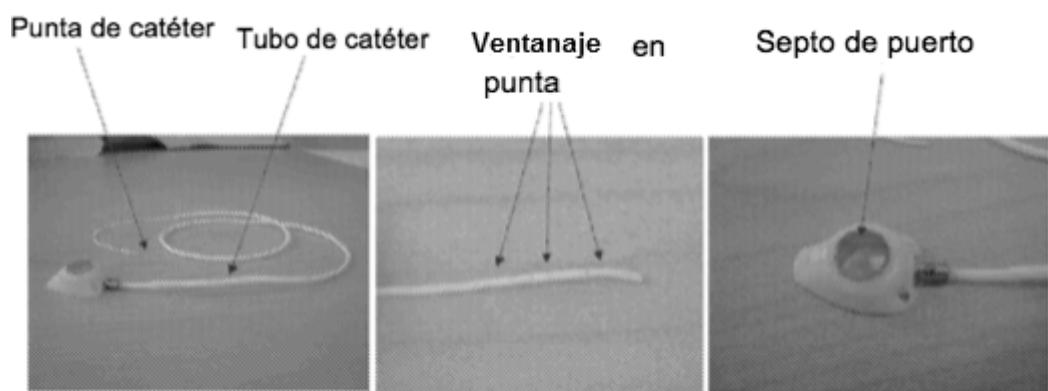


Figura 2B

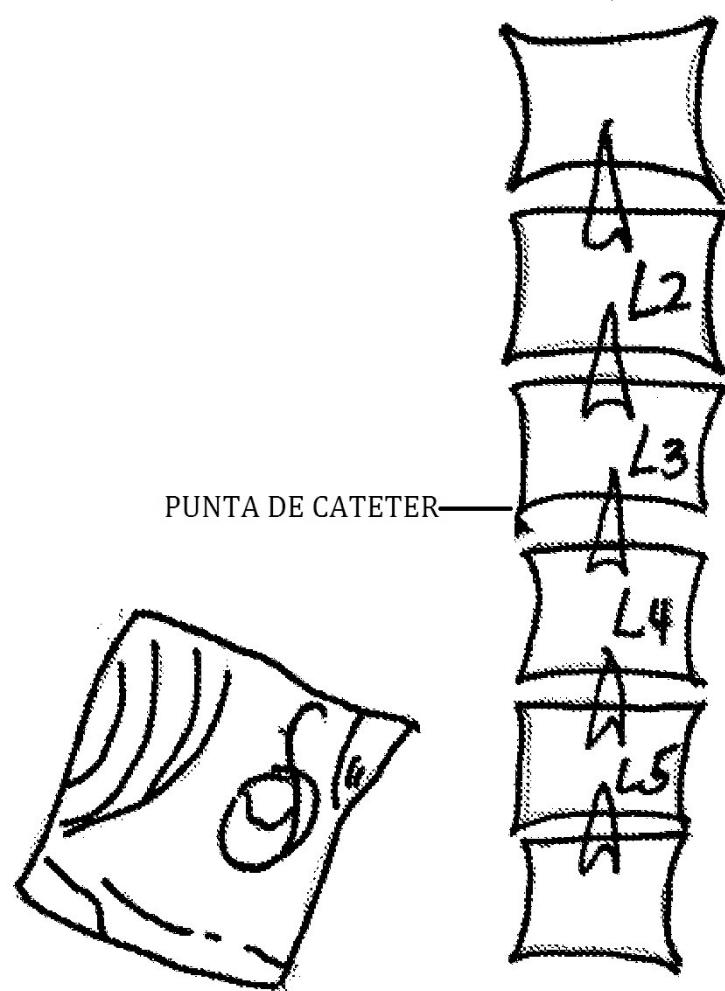


FIGURA 2C

Dibujos GalC

Resumen de vehículos ensayados en monos adultos

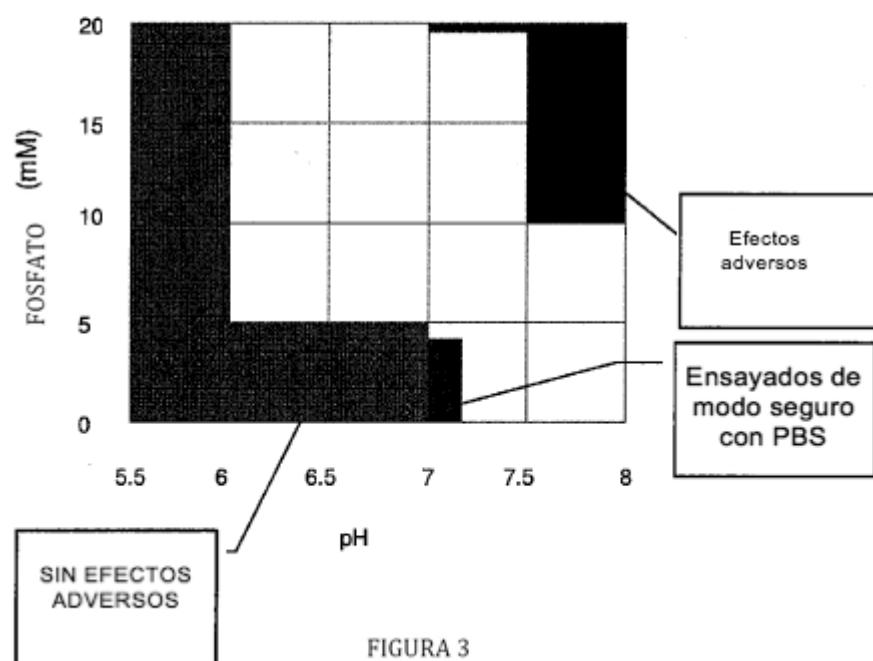


FIGURA 3

*PANTALLA TÉRMICA DE hGalC COMO UNA FUNCIÓN DE PH

1 mg/mL GalC en 3 mM de tampón de citrato, fosfato, y borato con 50 mM de NaCl

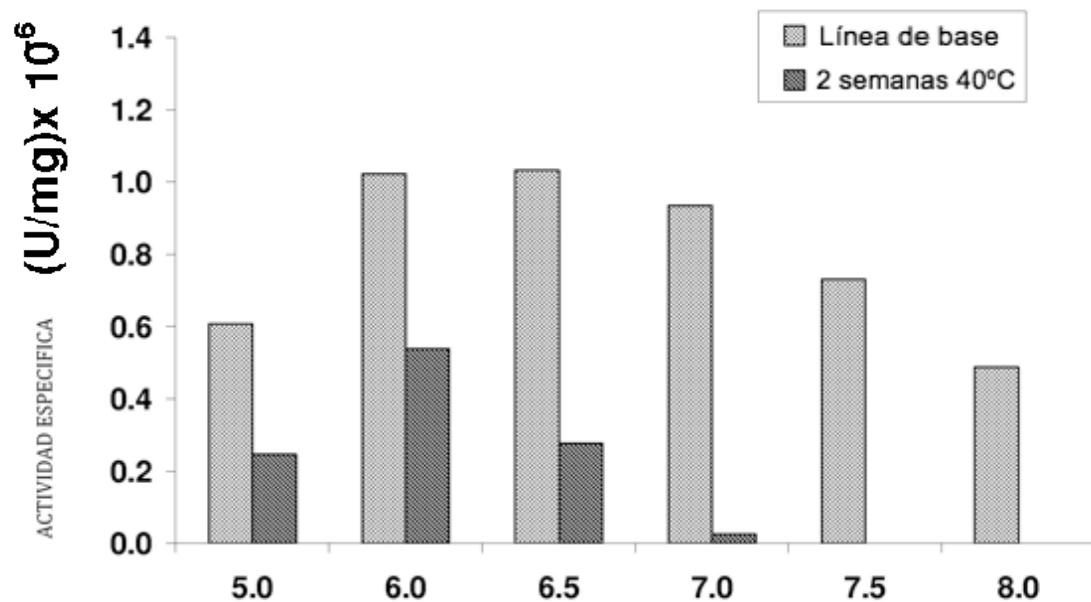


FIGURA 4

Actividad específica de hGalC como una función de pH
1 mg/mL, GalC en 3 mM de tampón de citrato, fosfato y borato con 50 mM de NaCl

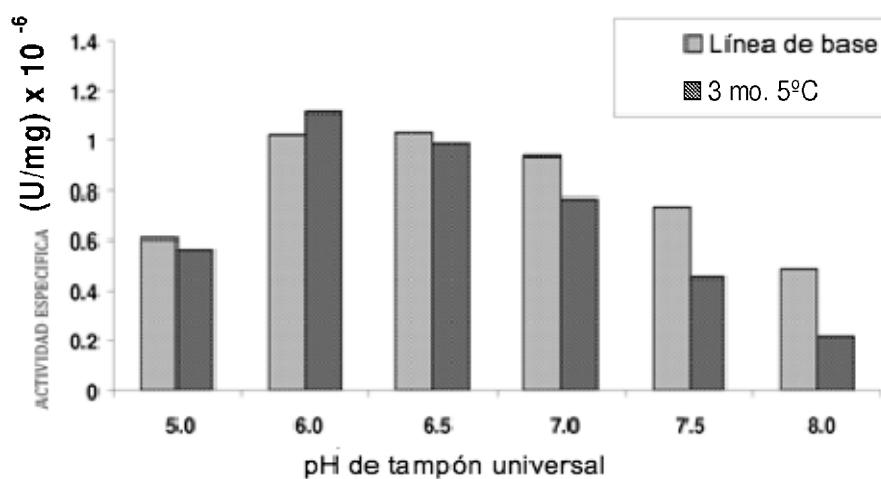


FIGURA 5

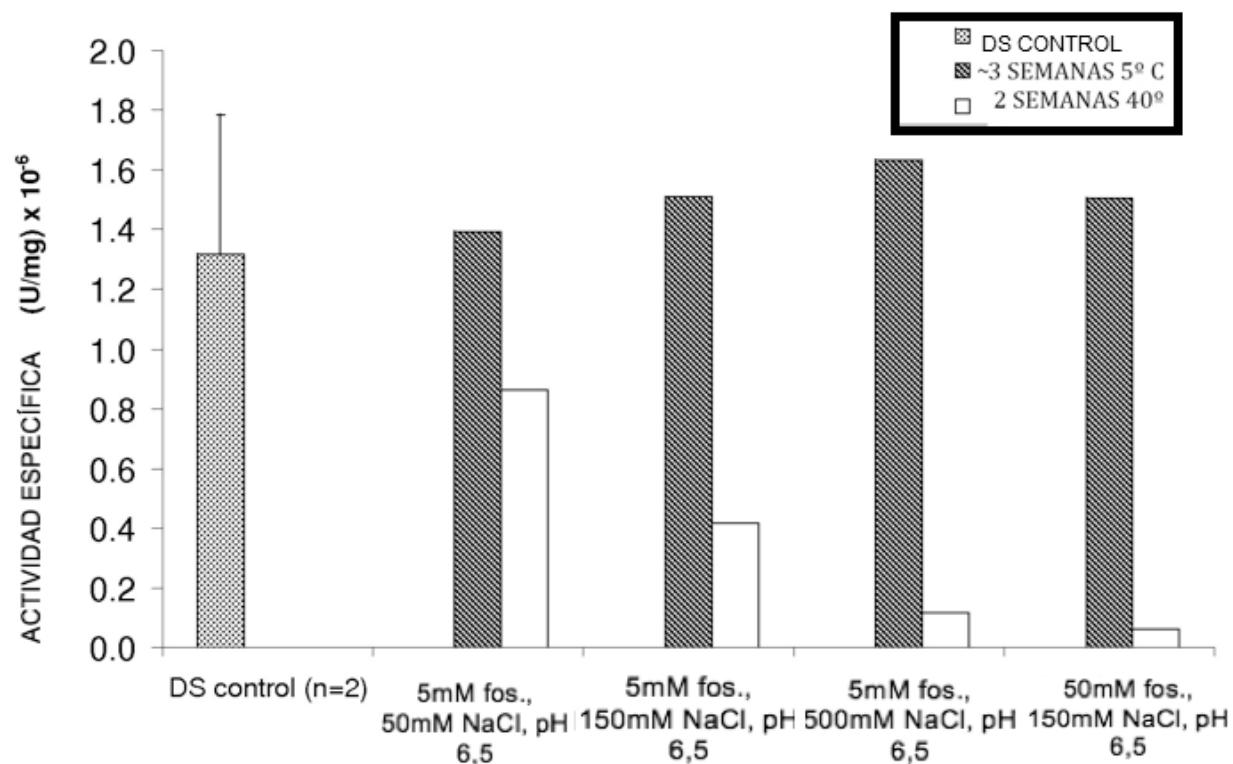
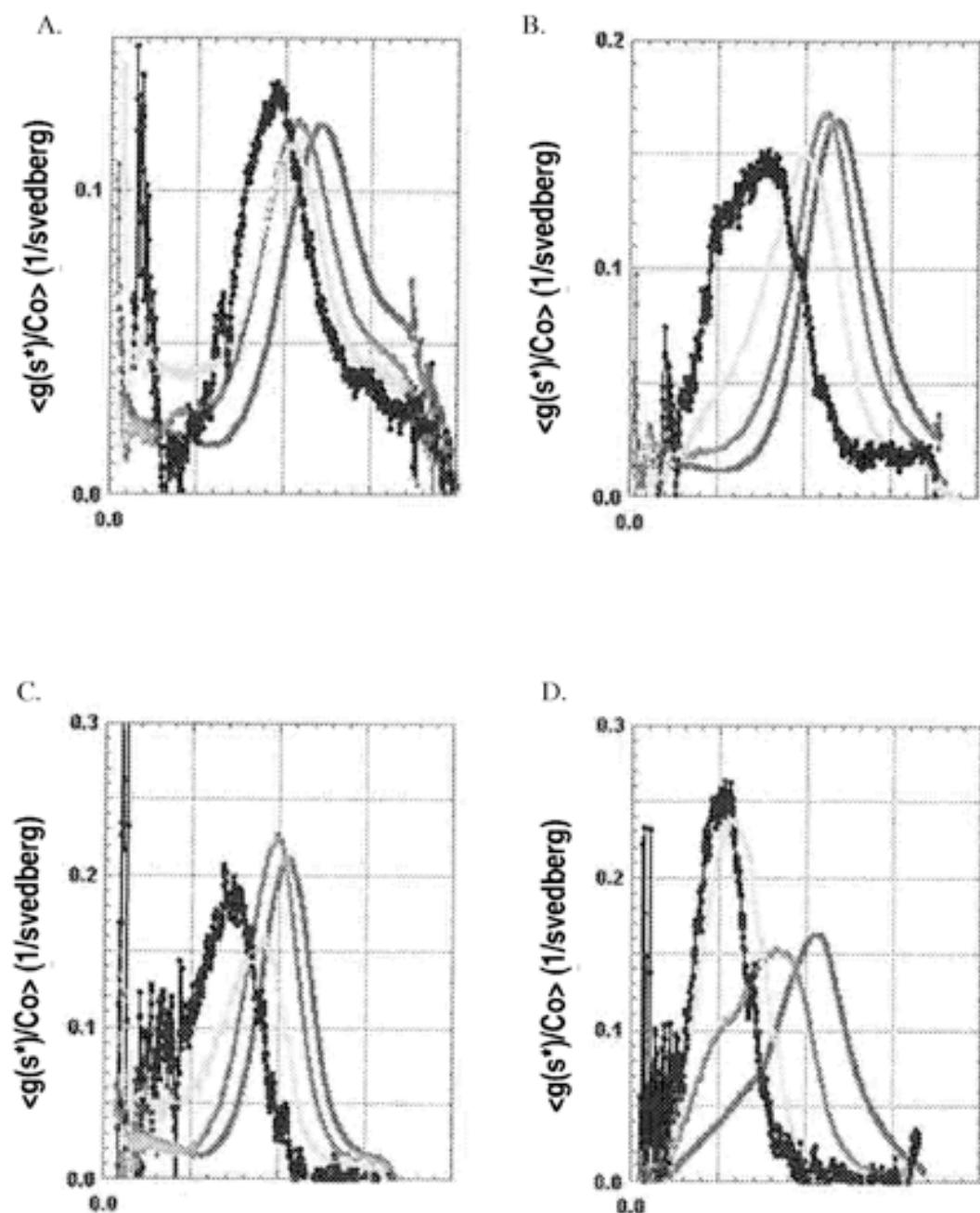


FIGURA 6

**FIGURA 7**

AUC PERFIL COMO FUNCIÓN DE CONCENTRACIÓN DE SAL
1mg/mL, 5mM Na FOSFATO, pH 6.0

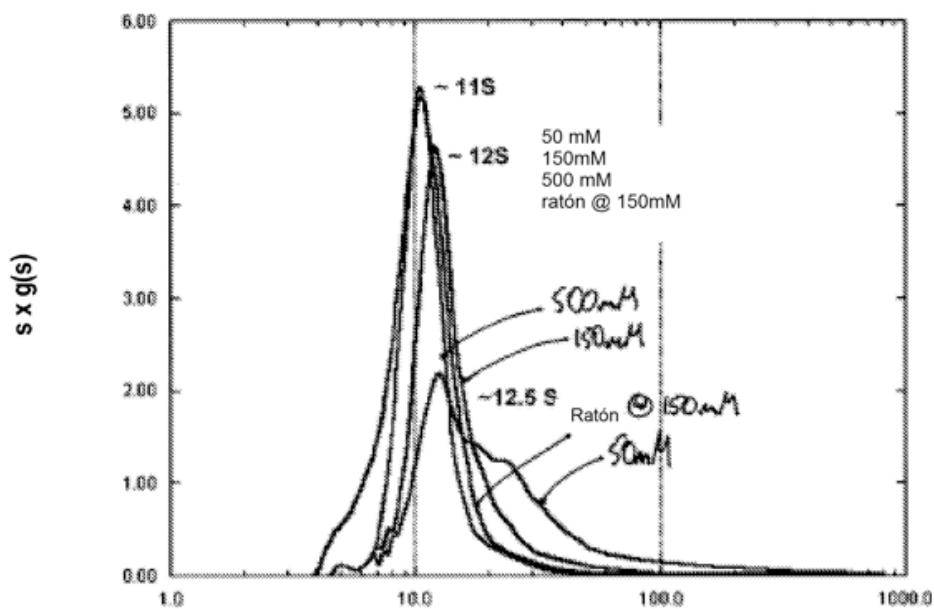


FIGURA 8

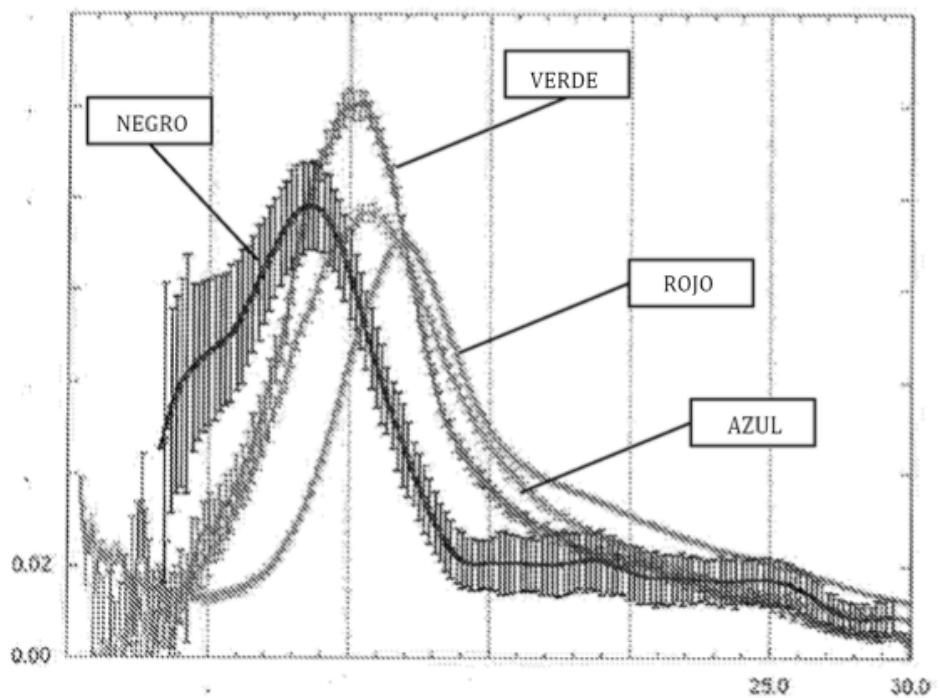


FIGURA 9

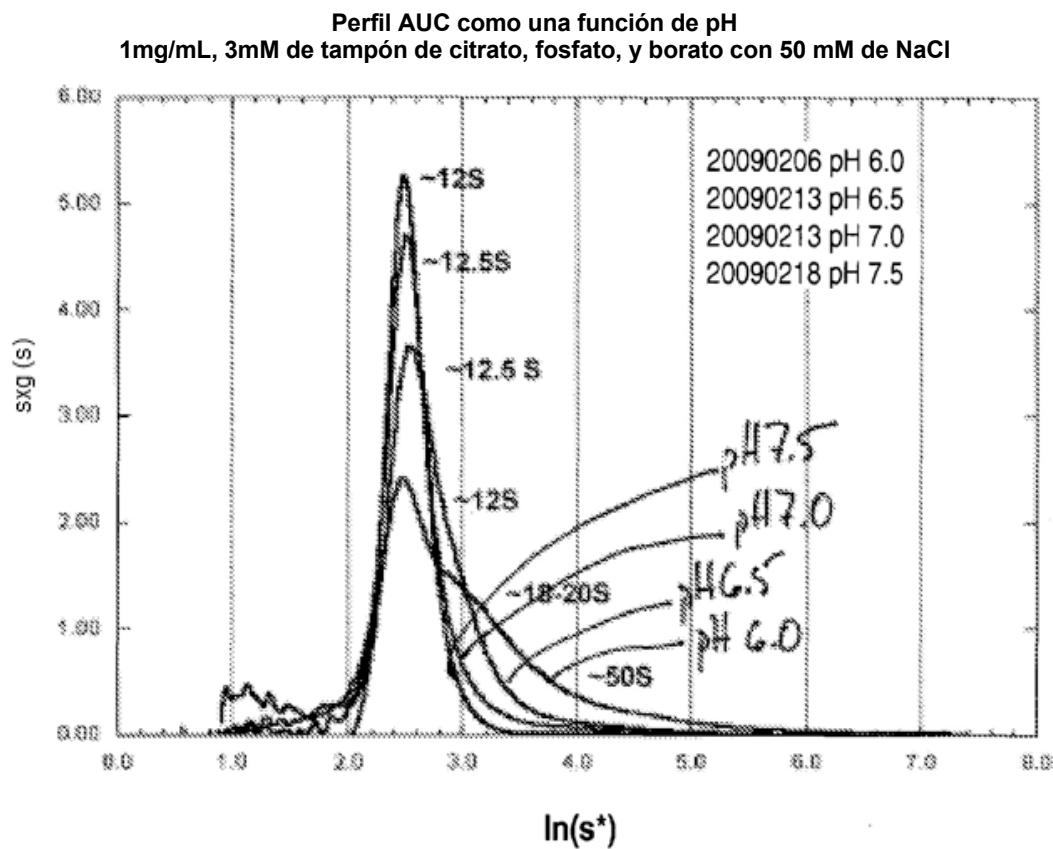


FIGURA 10

ES 2 858 726 T3

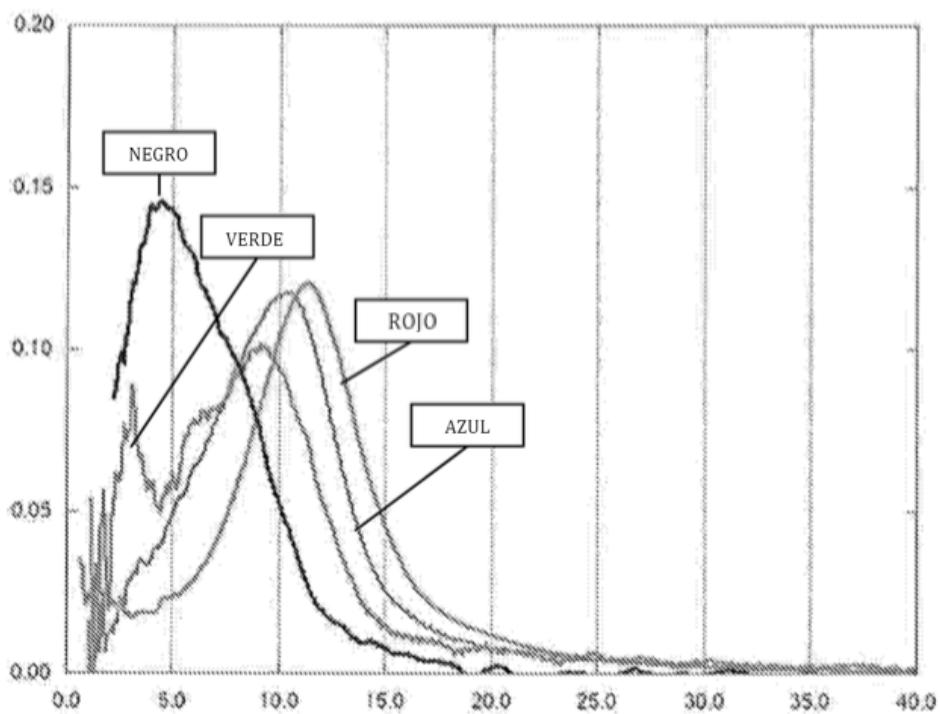


FIGURA 11

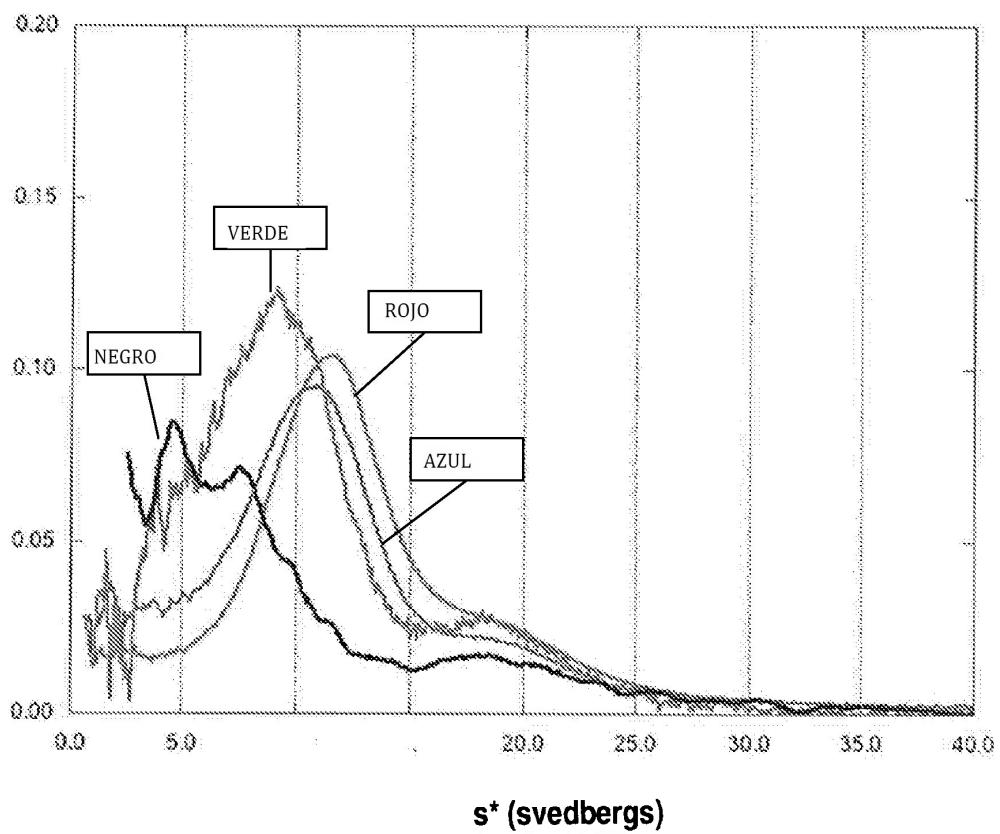


FIGURA 12

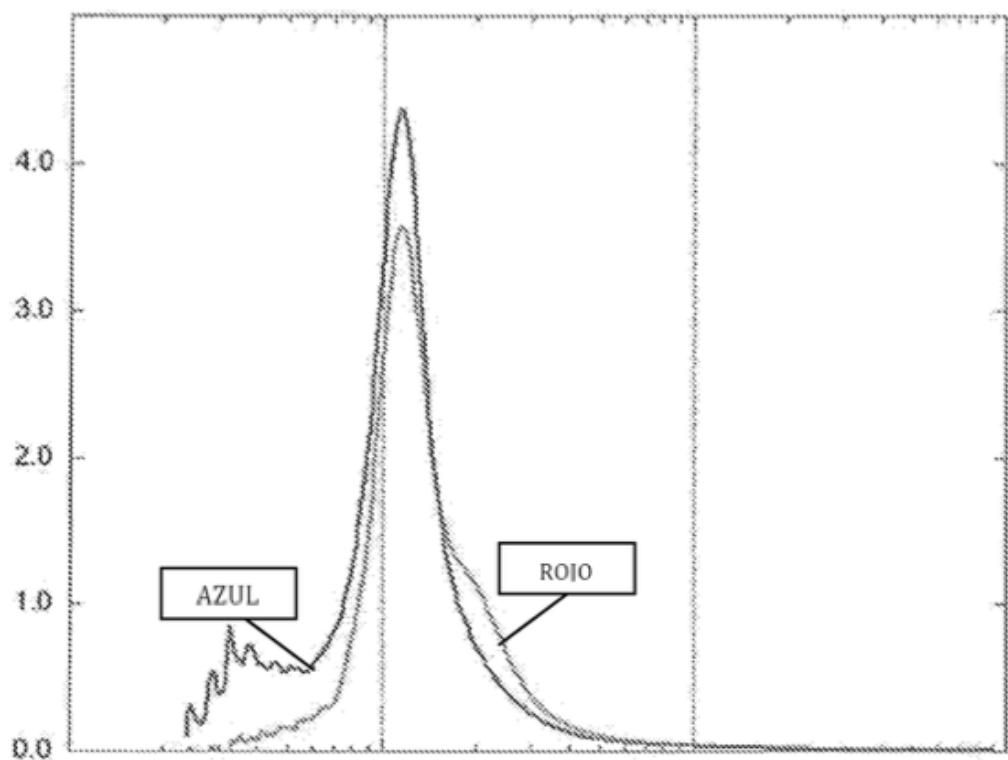


FIGURA 13

ES 2 858 726 T3

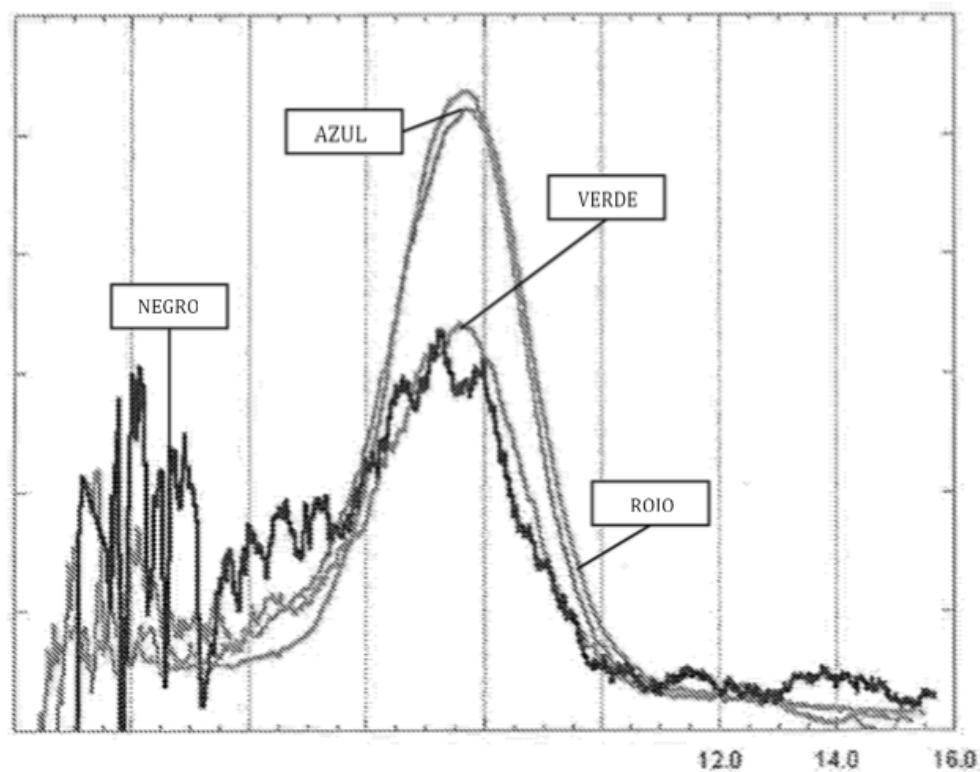


FIGURA 14

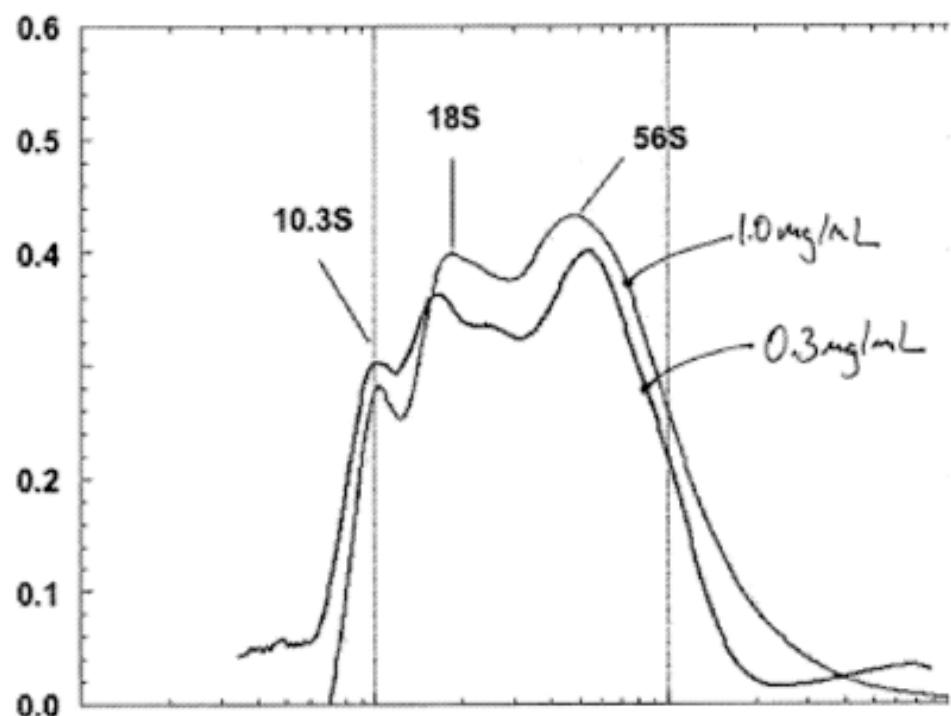


FIGURA 15

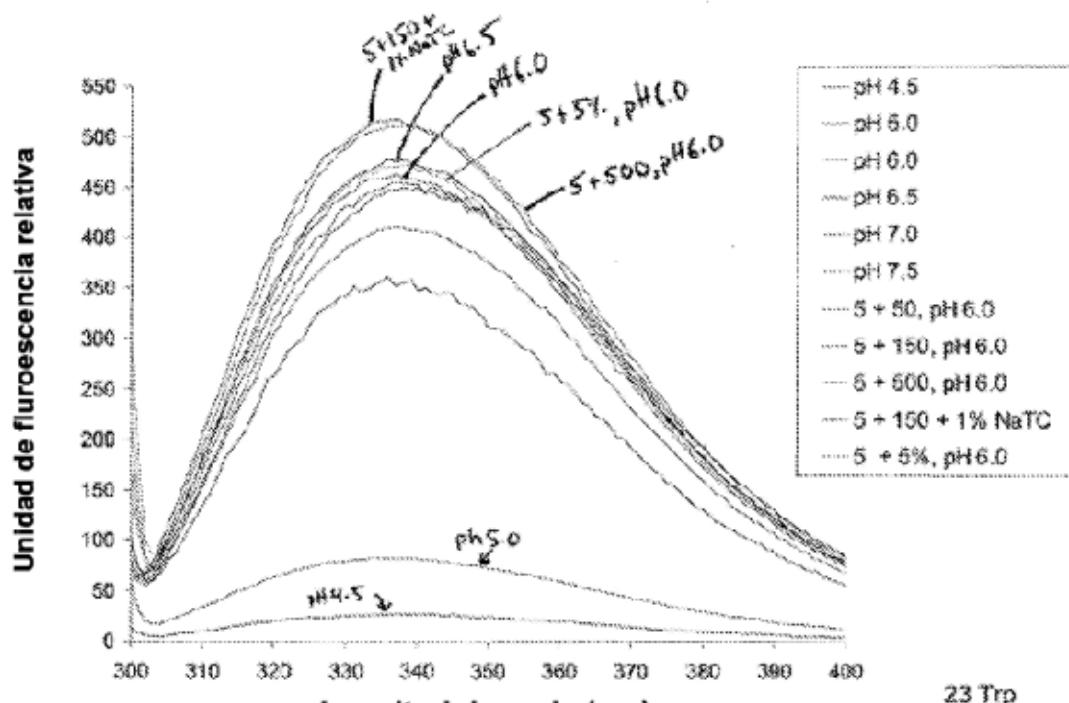
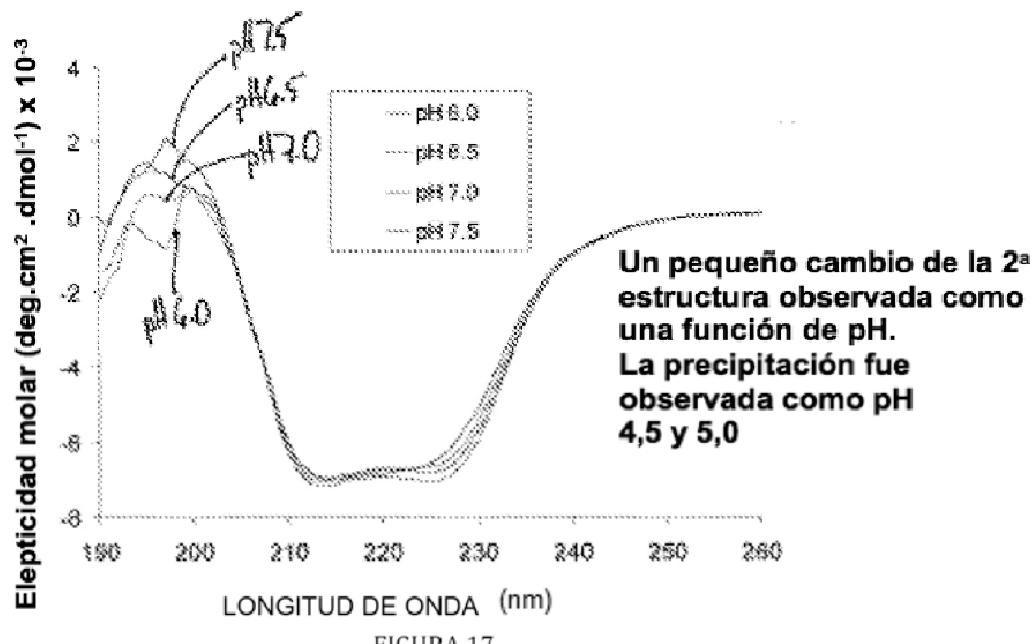


FIGURA 16

Dicroísmo circular de hGalC como una función de pH
1mg/mL de GalC en 3mM de tampón de citrato, fosfato, y borato con 50 mM de NaCl



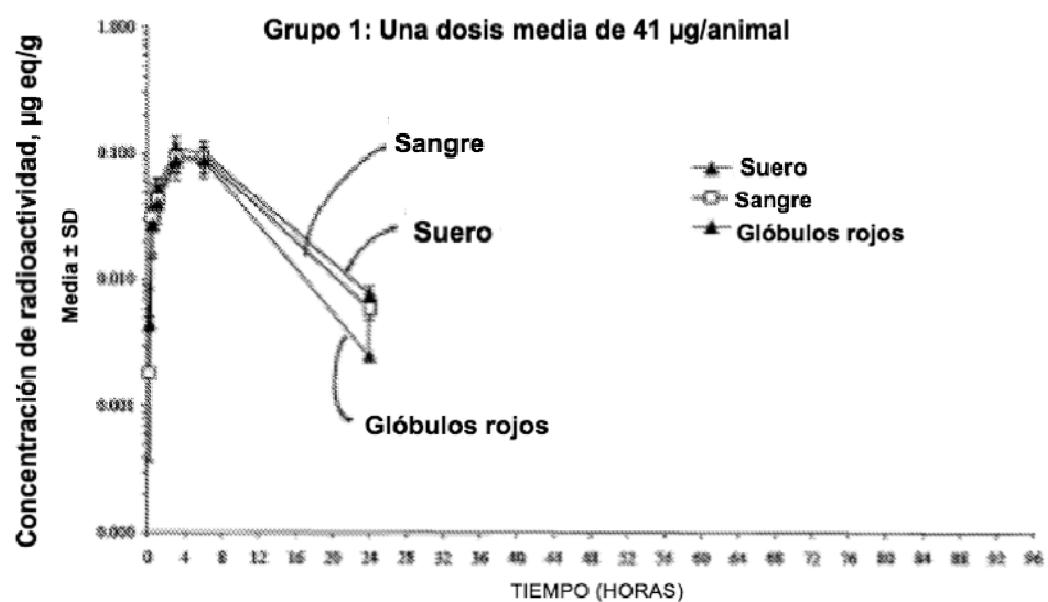


FIGURA 18

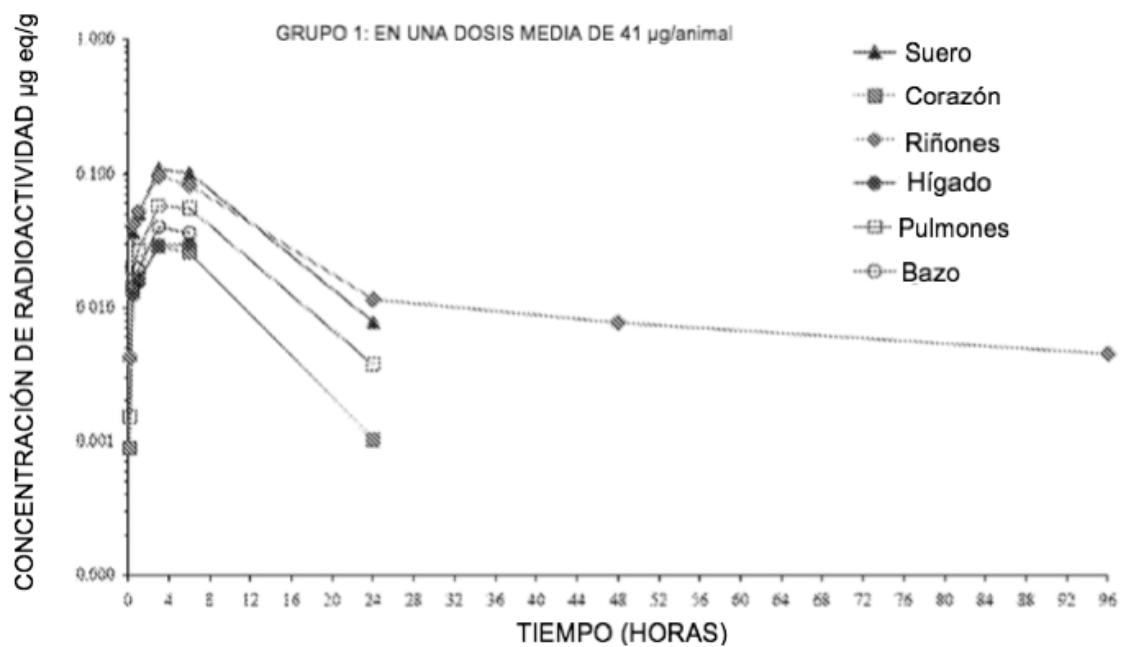


Figura 19

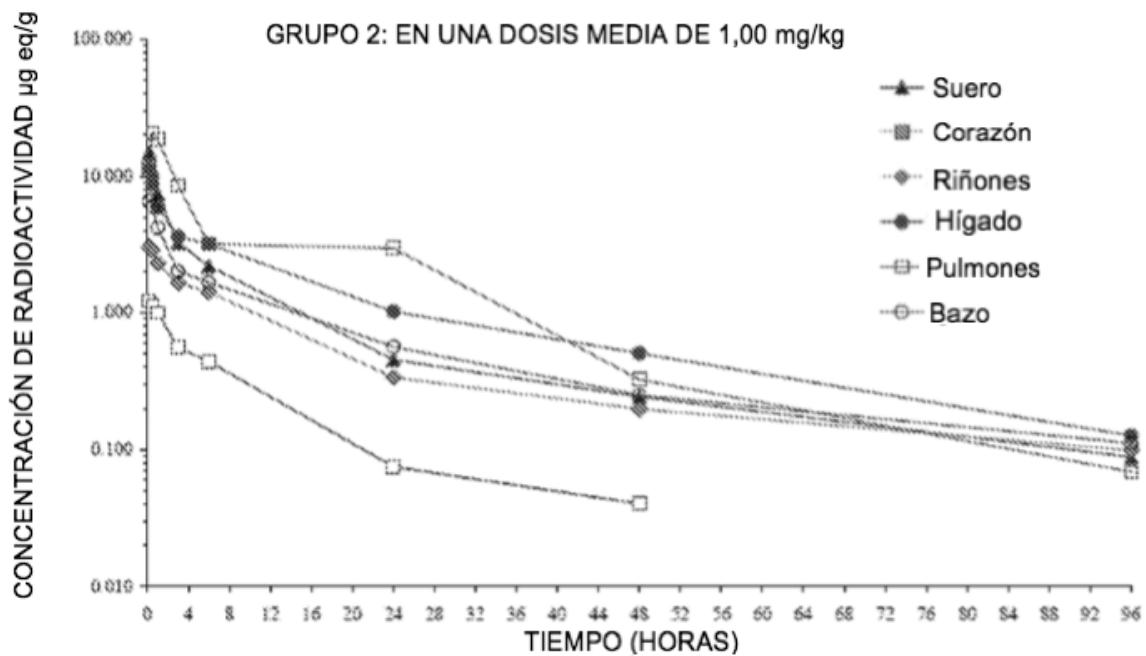


Figura 20

GRUPO 3 EN UNA DOSIS MEDIA DE 1,08 mg/animal

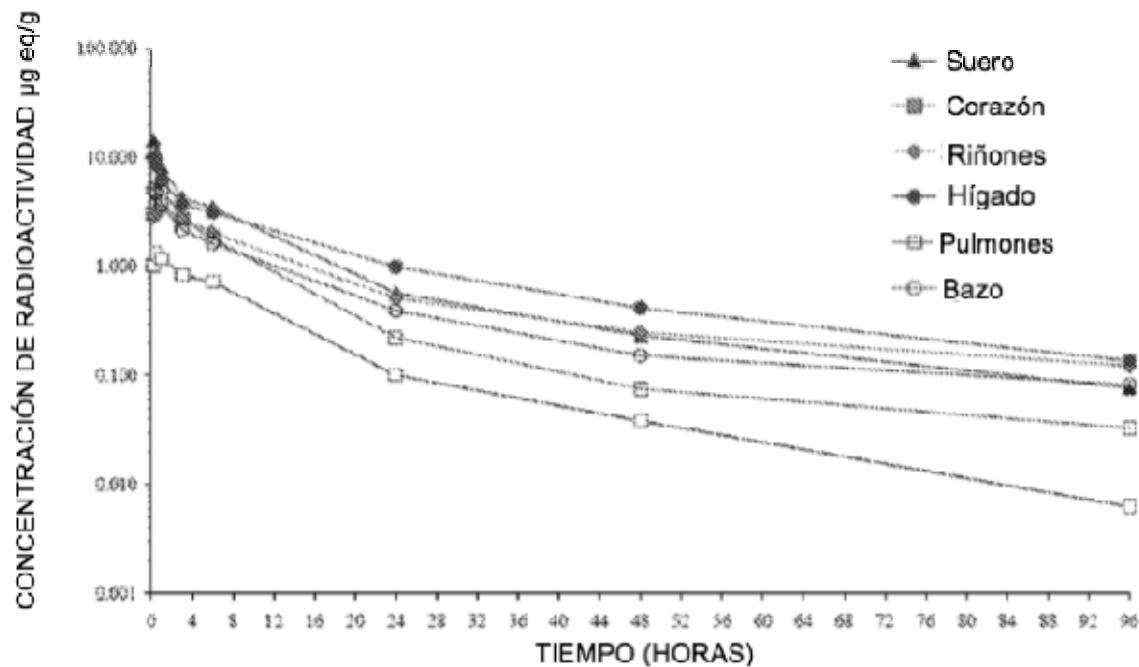
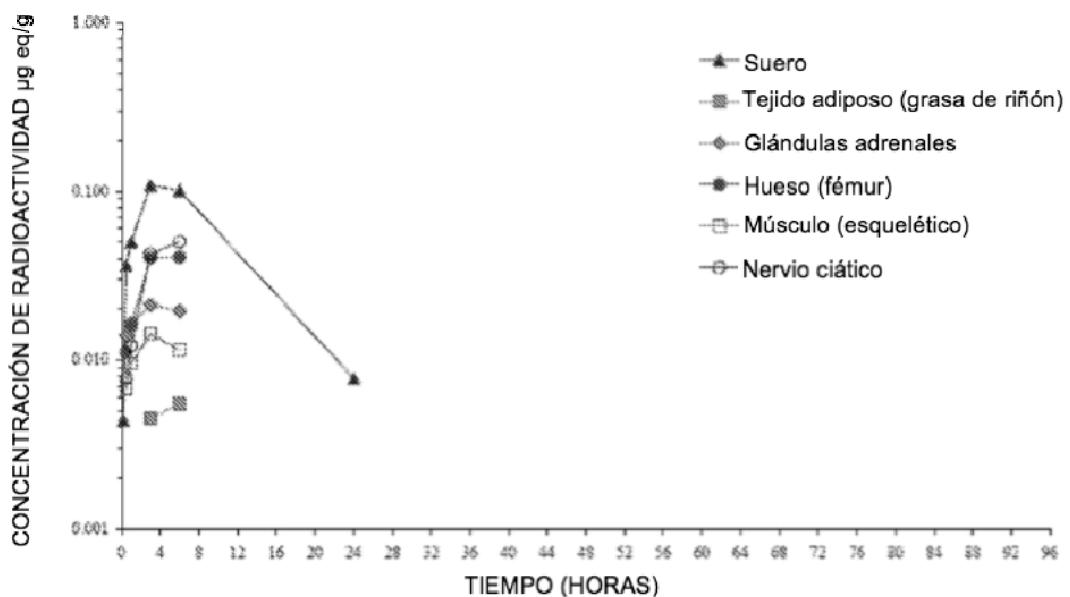
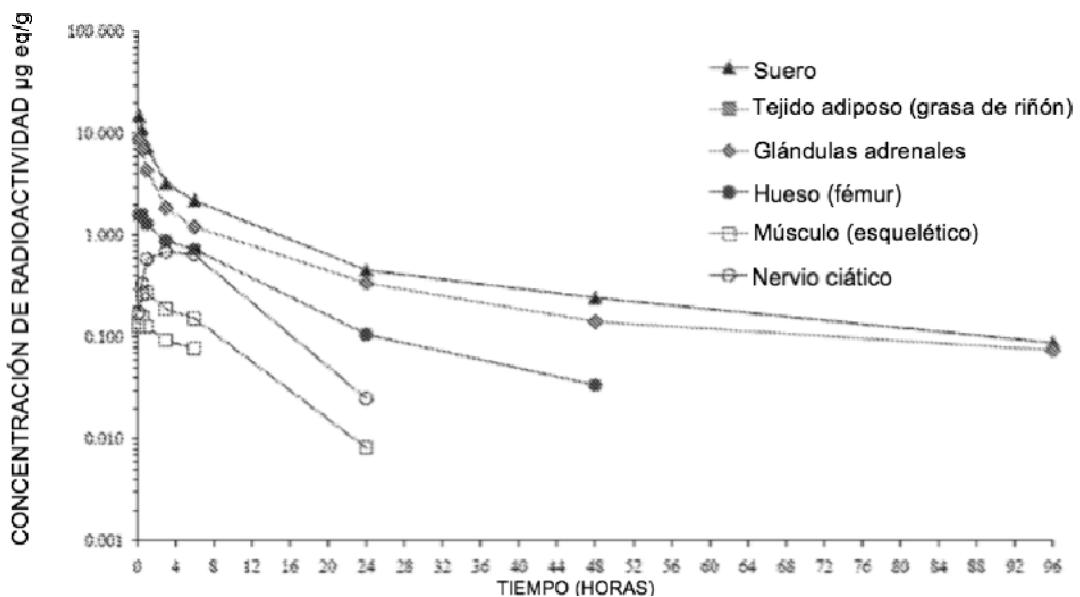
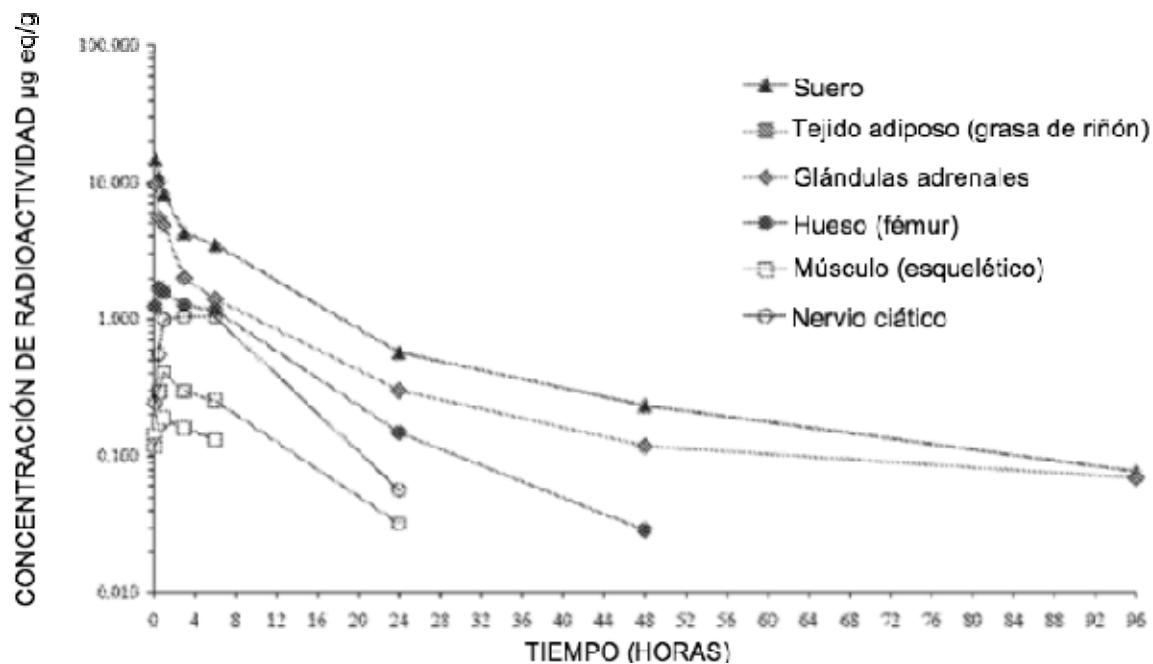


Figura 21

Grupo 1: A una dosis media de 41 µg/animal**Figura 22****Grupo 2: A una dosis media de 1,00 mg/kg****Figura 23**

Grupo 3: En una dosis de 1,08 mg/kg**Figura 24**

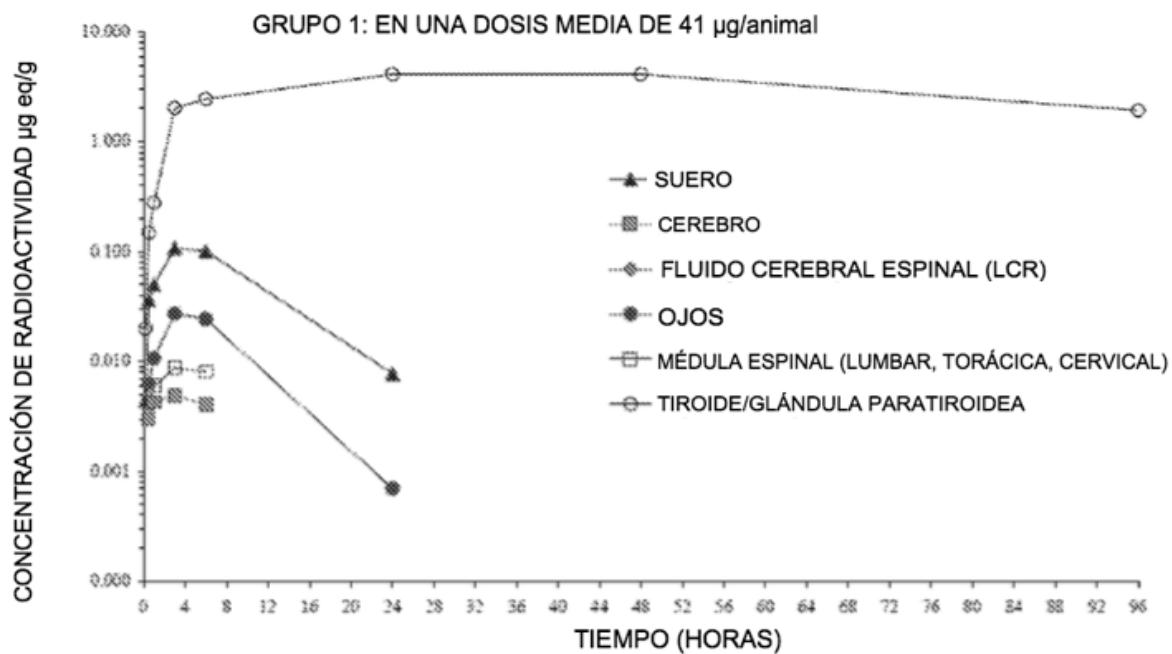


FIGURA 25

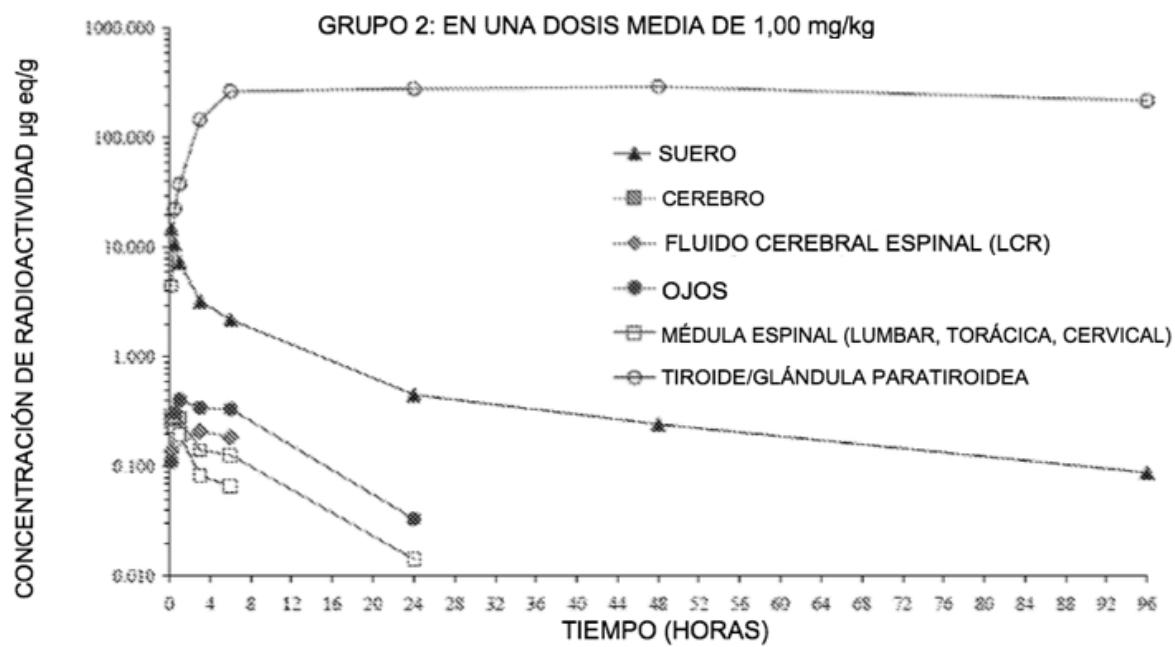


FIGURA 26

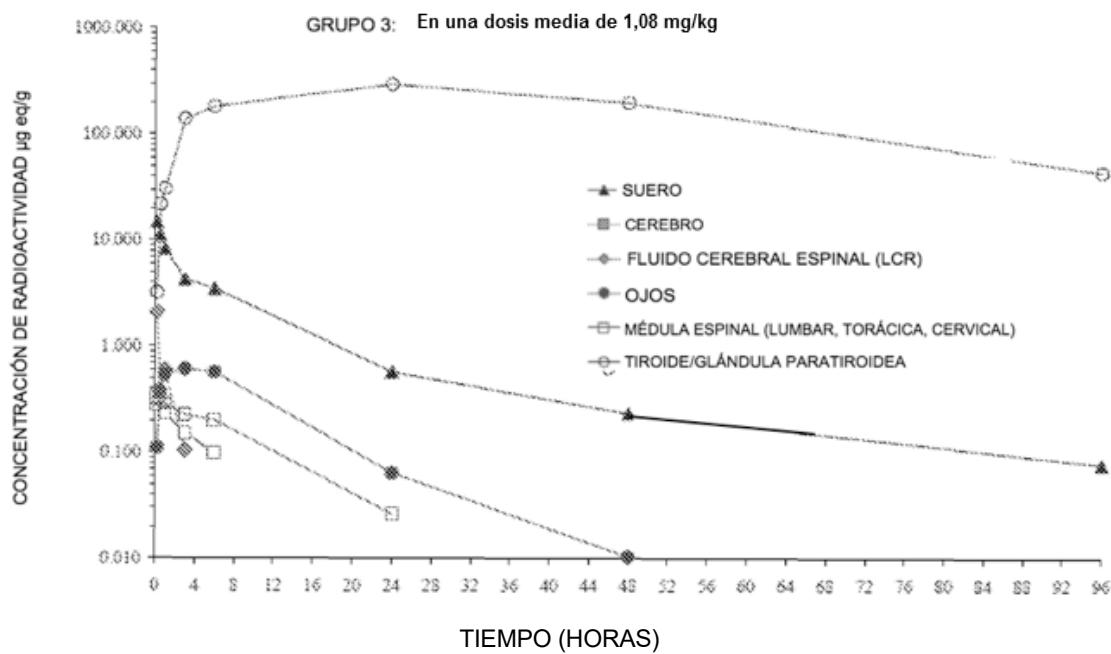


FIGURA 27

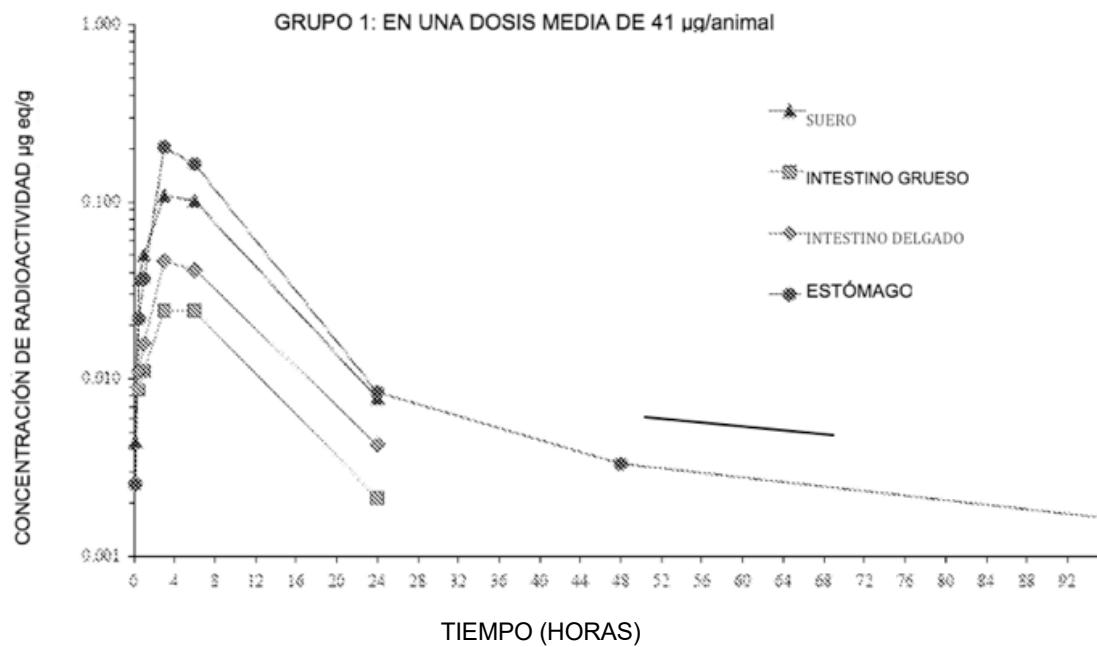


FIGURA 28

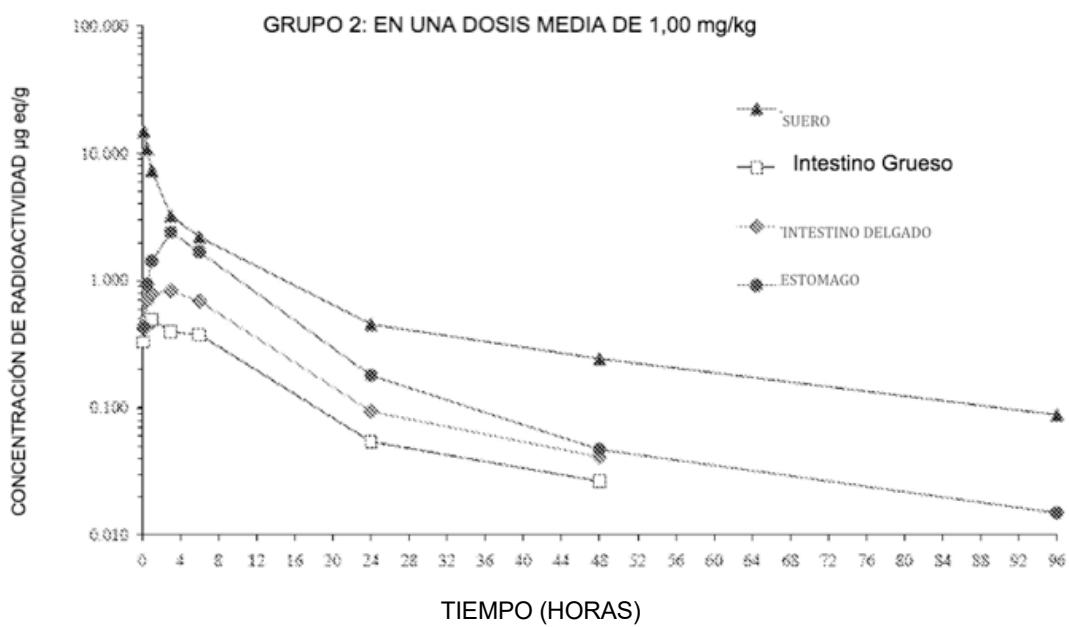


FIGURA 29

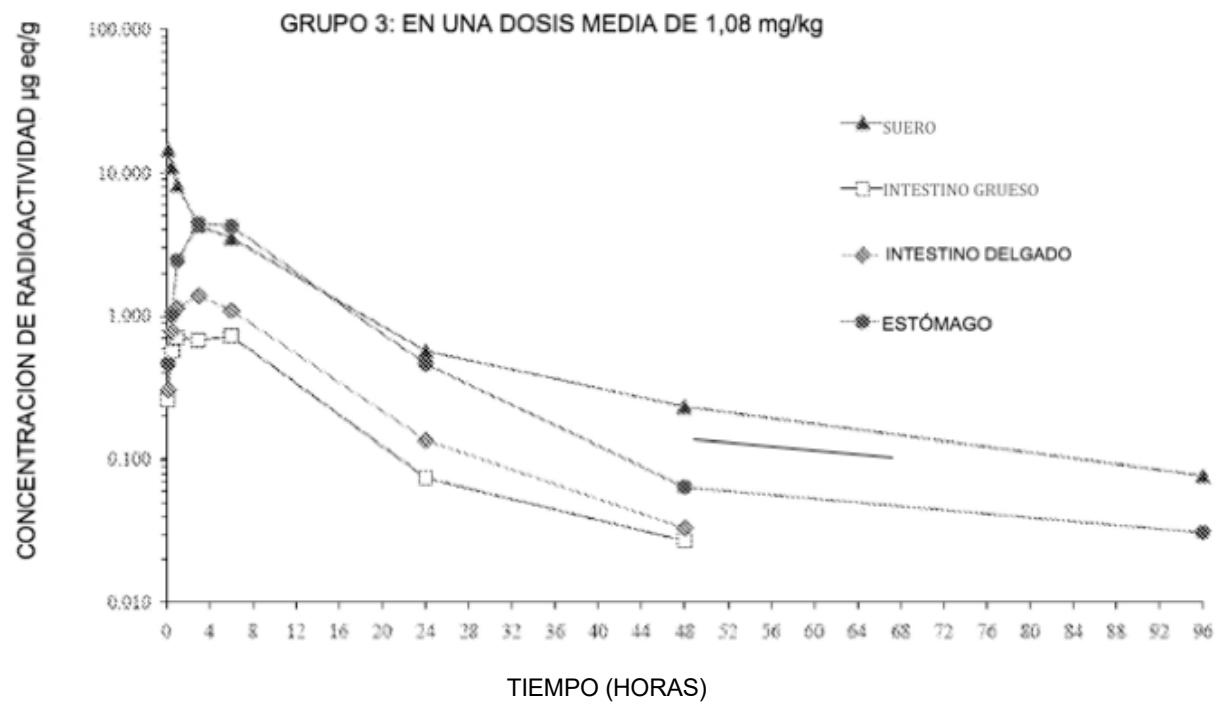
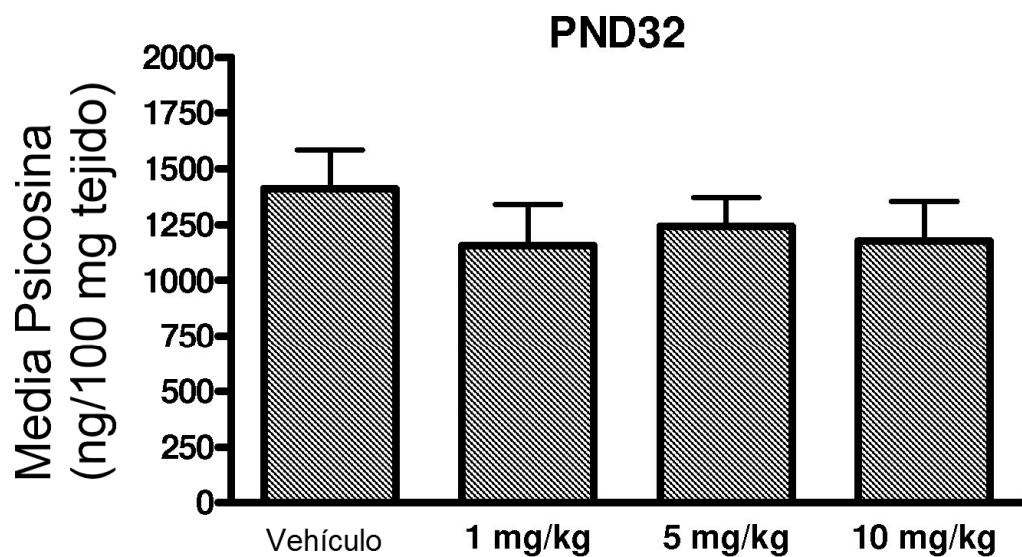


FIGURA 30



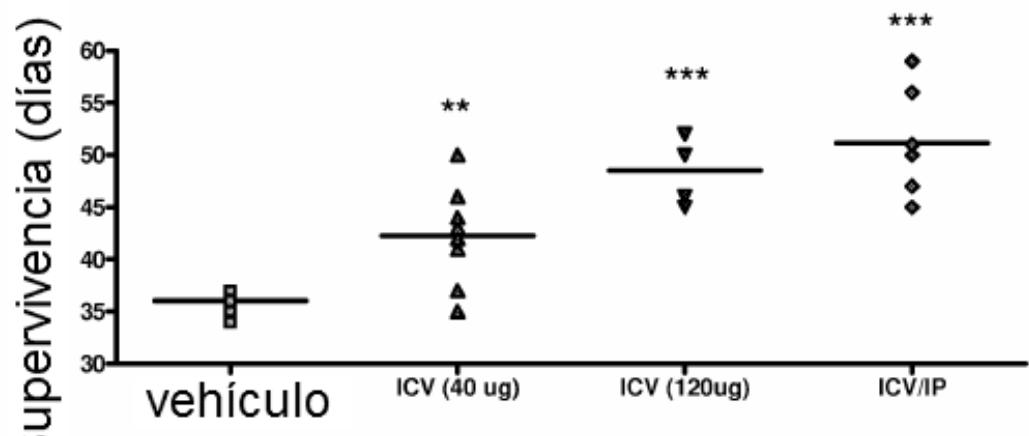


Figura 32

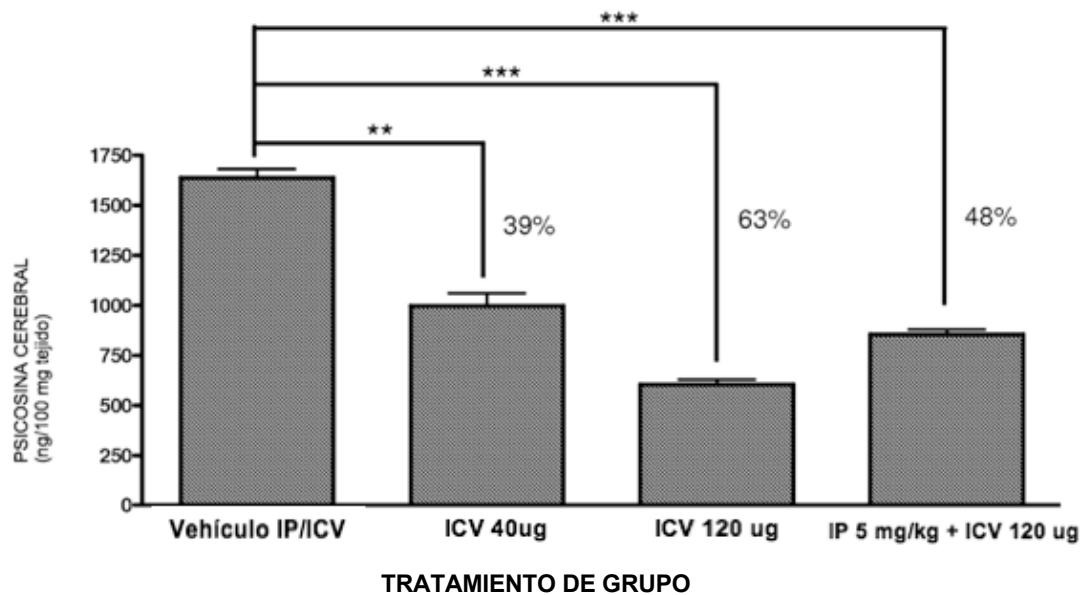


FIGURA 33

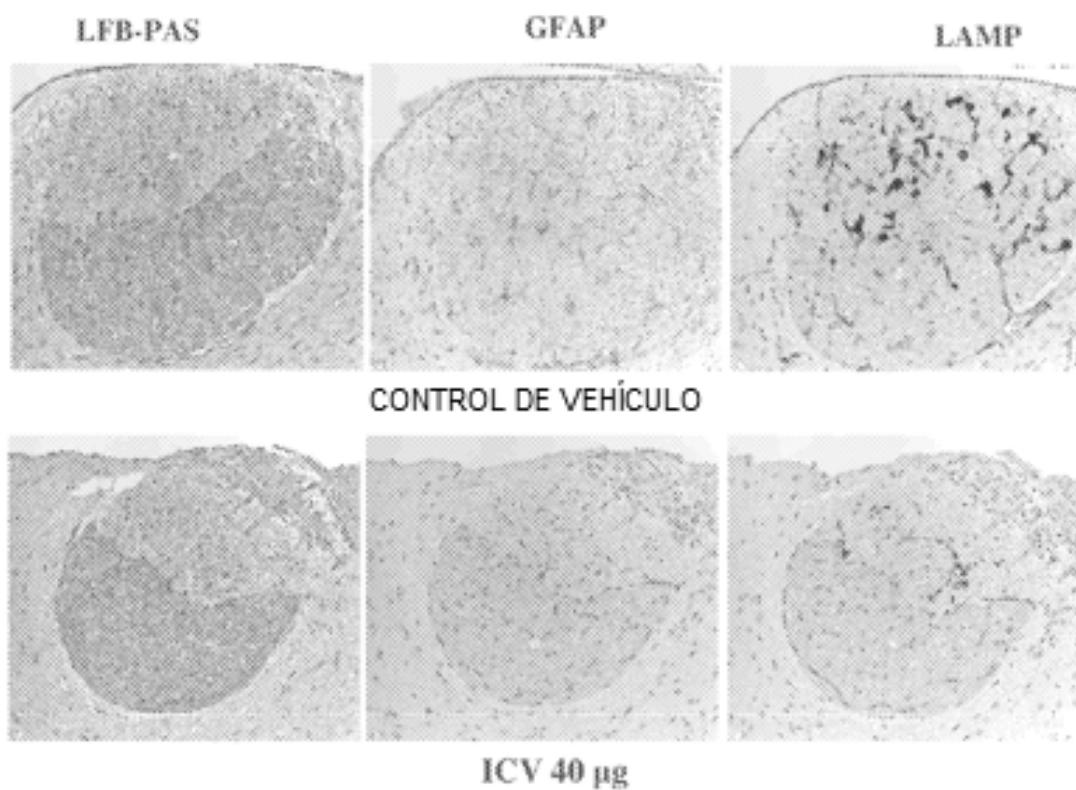


FIGURA 34

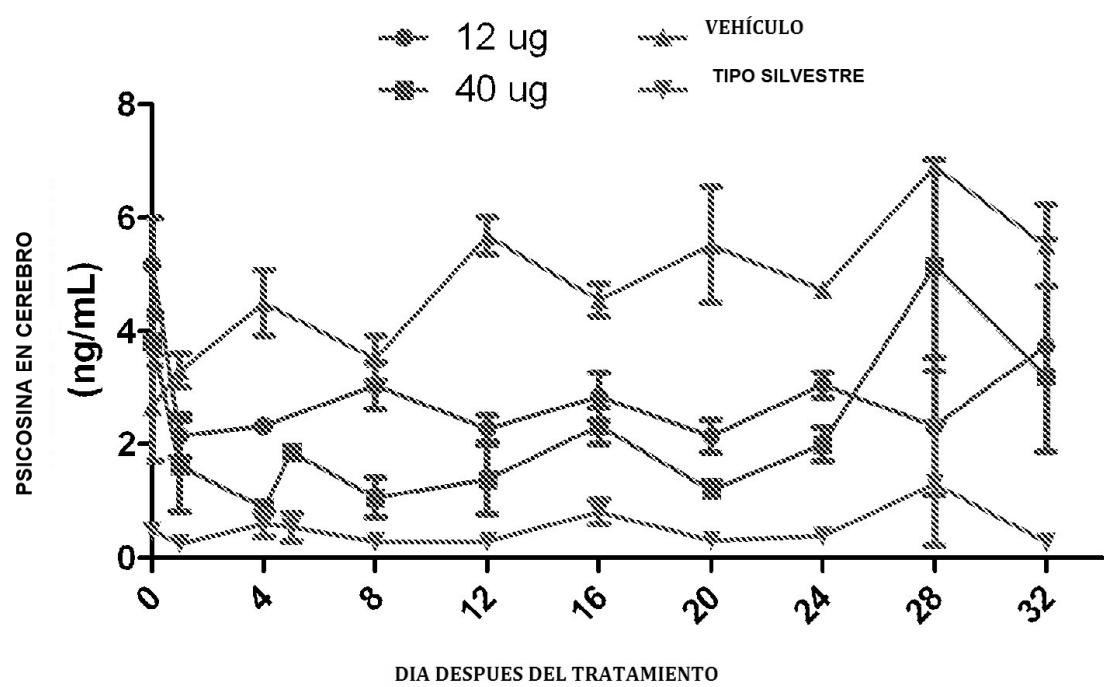
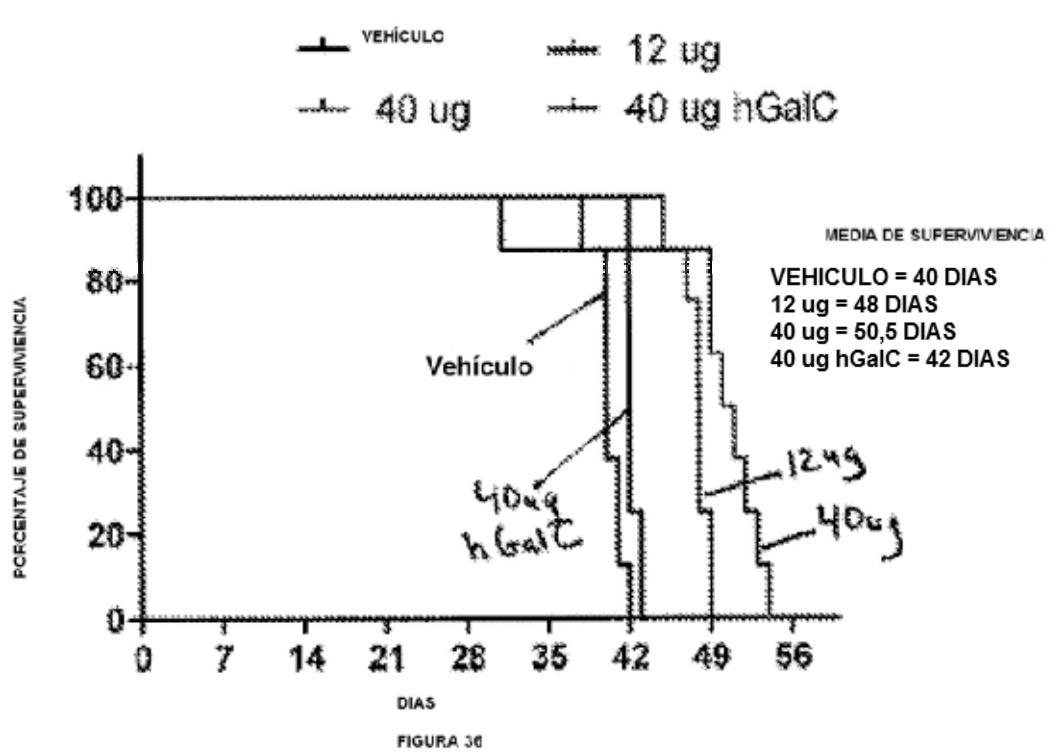


FIGURA 35



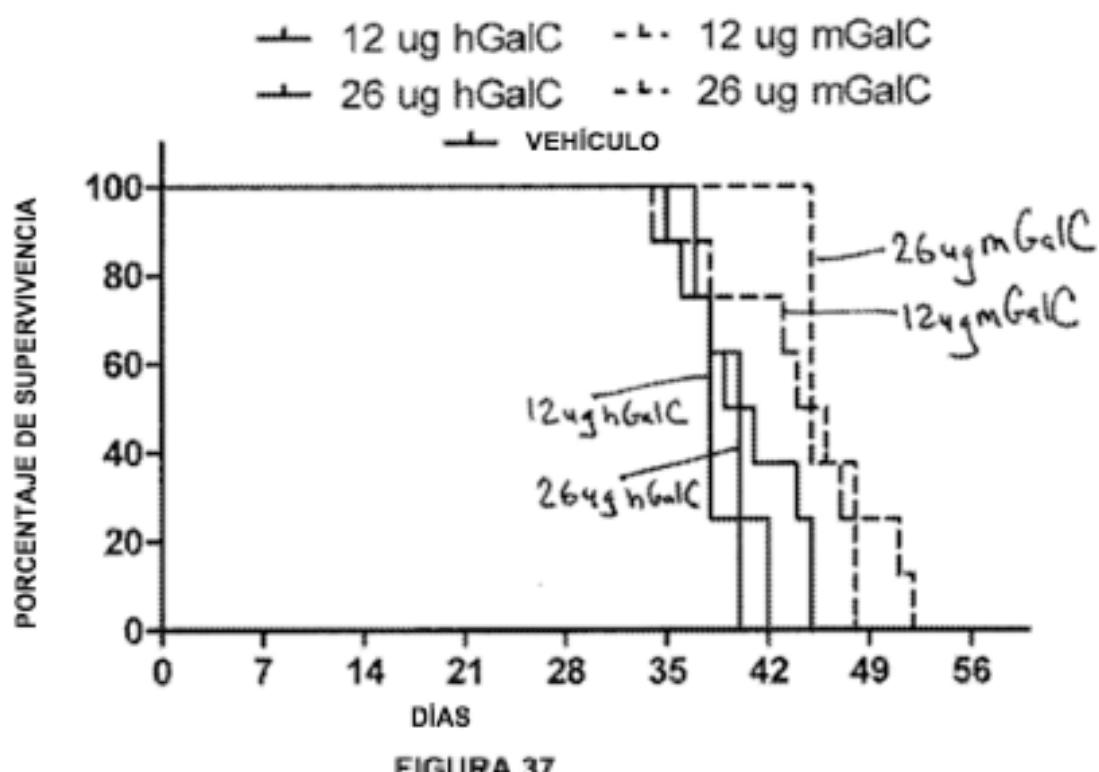


FIGURA 37

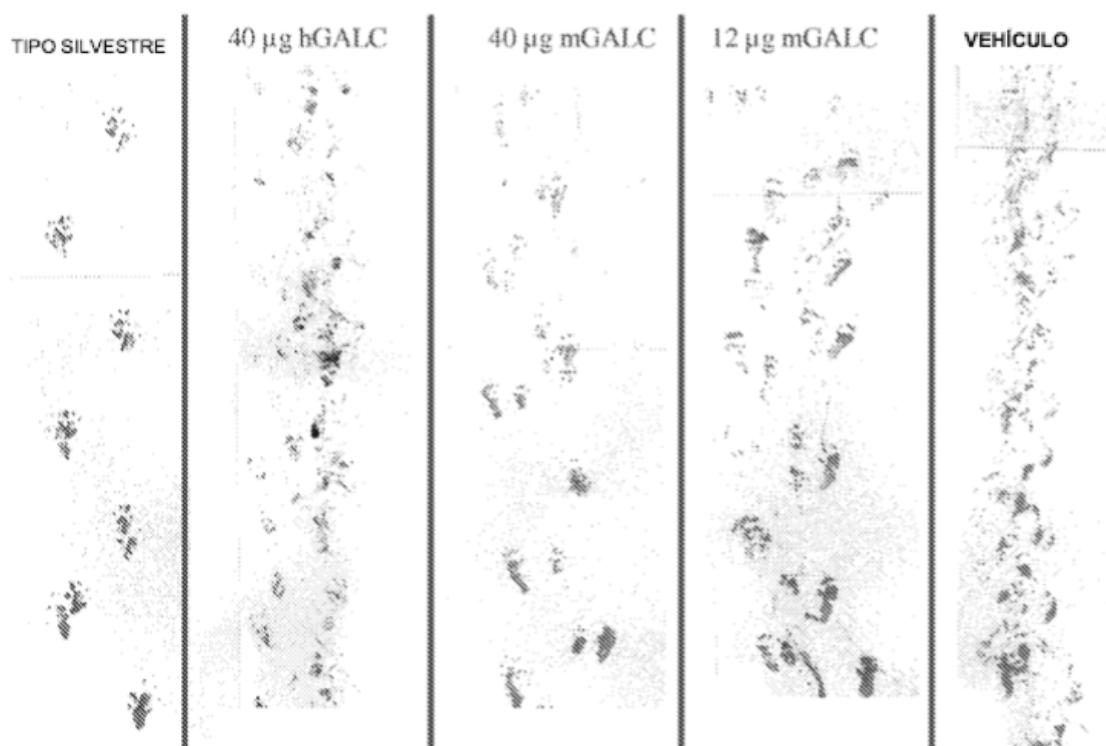


FIGURA 38

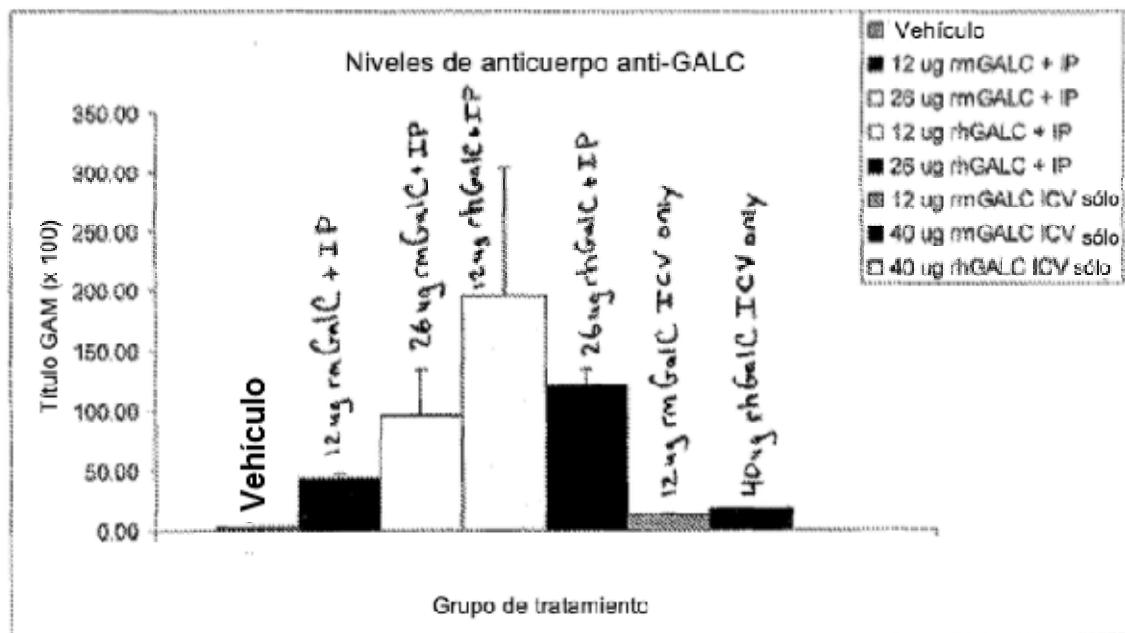


FIGURA 39

Modelo canino Krabbe de psocina en LCR (ng/ml)

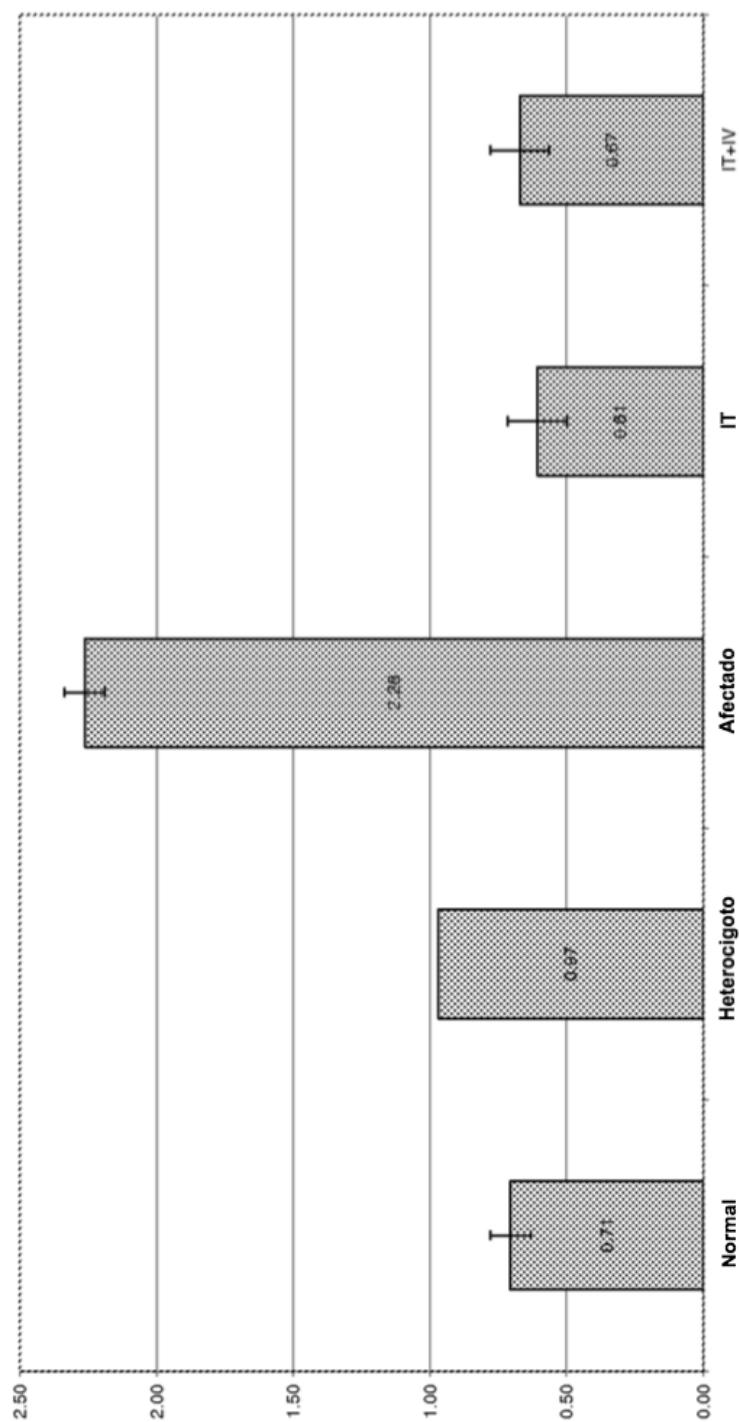


FIGURA 40

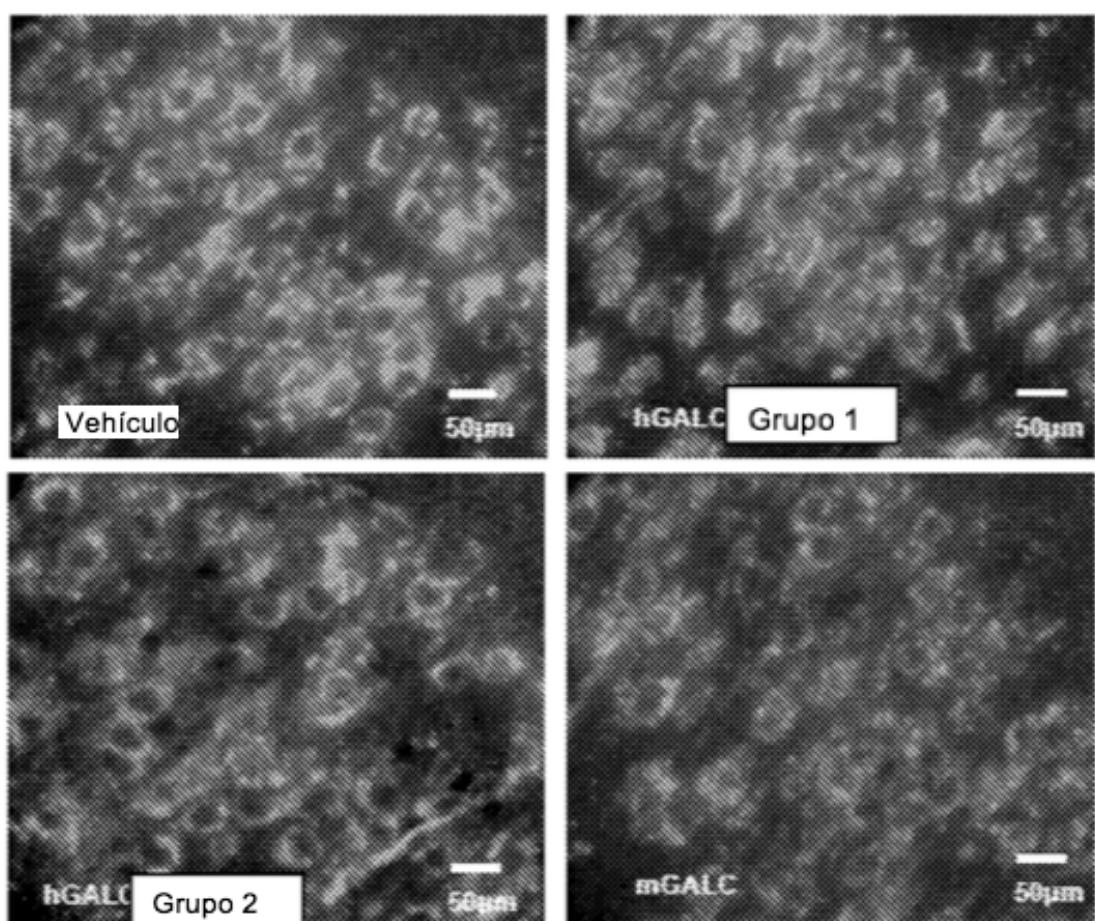


FIGURA 41

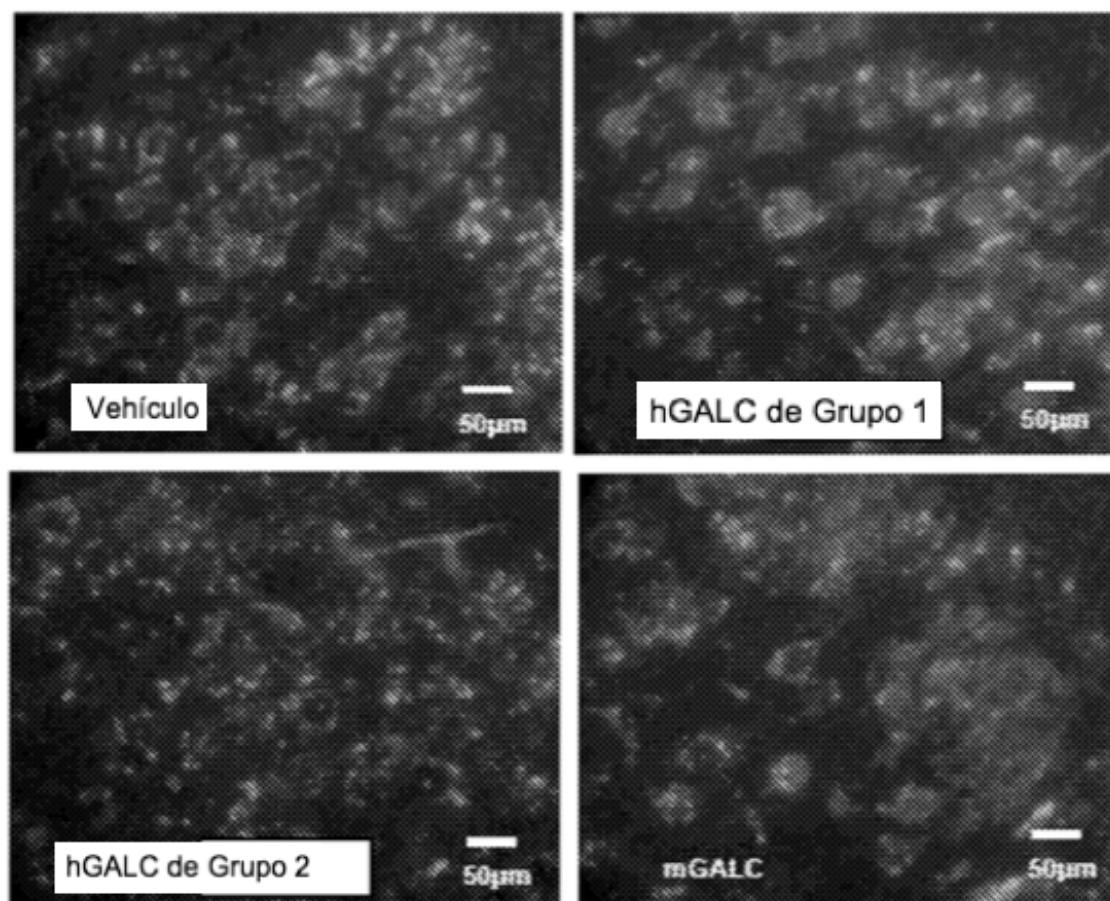


FIGURA 42

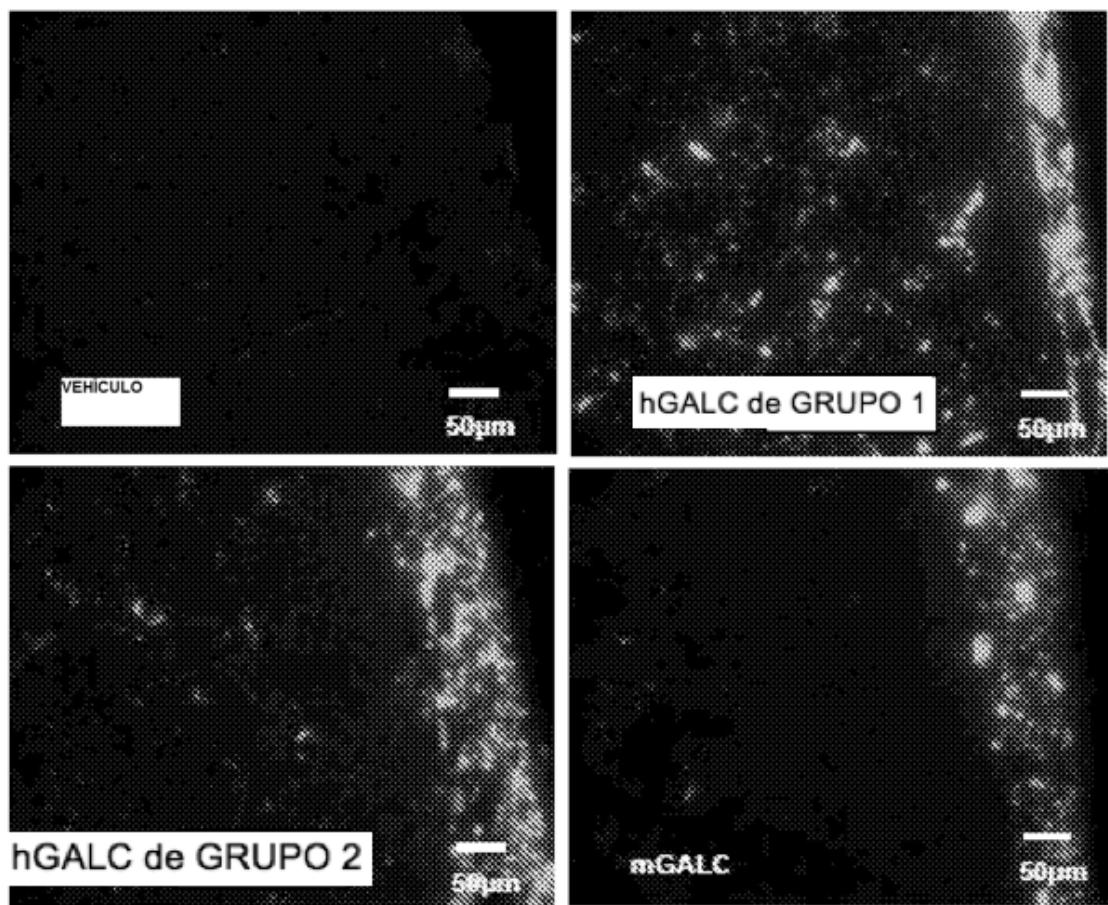


FIGURA 43

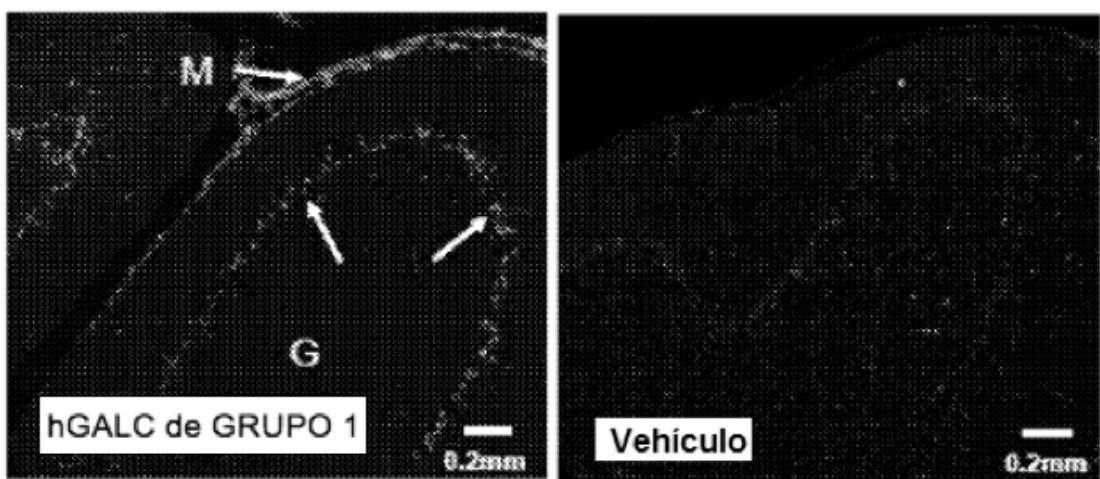


Figura 44

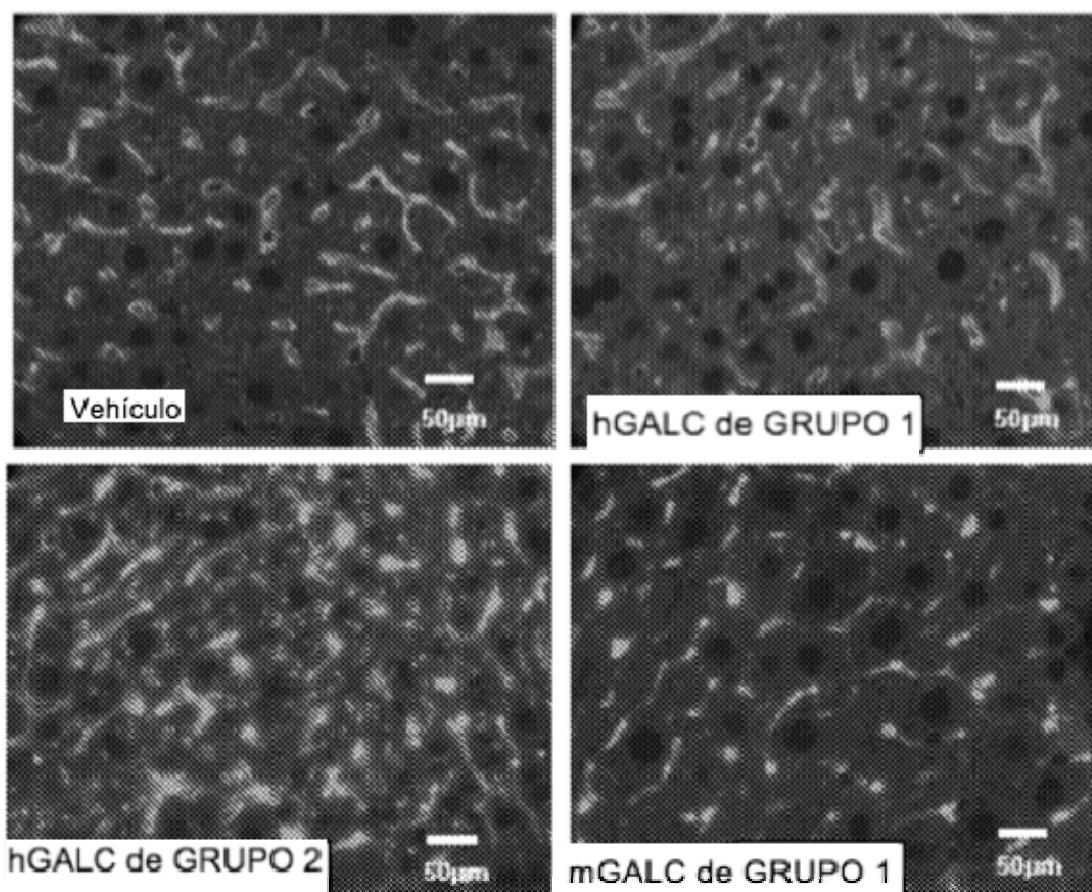


FIGURA 45

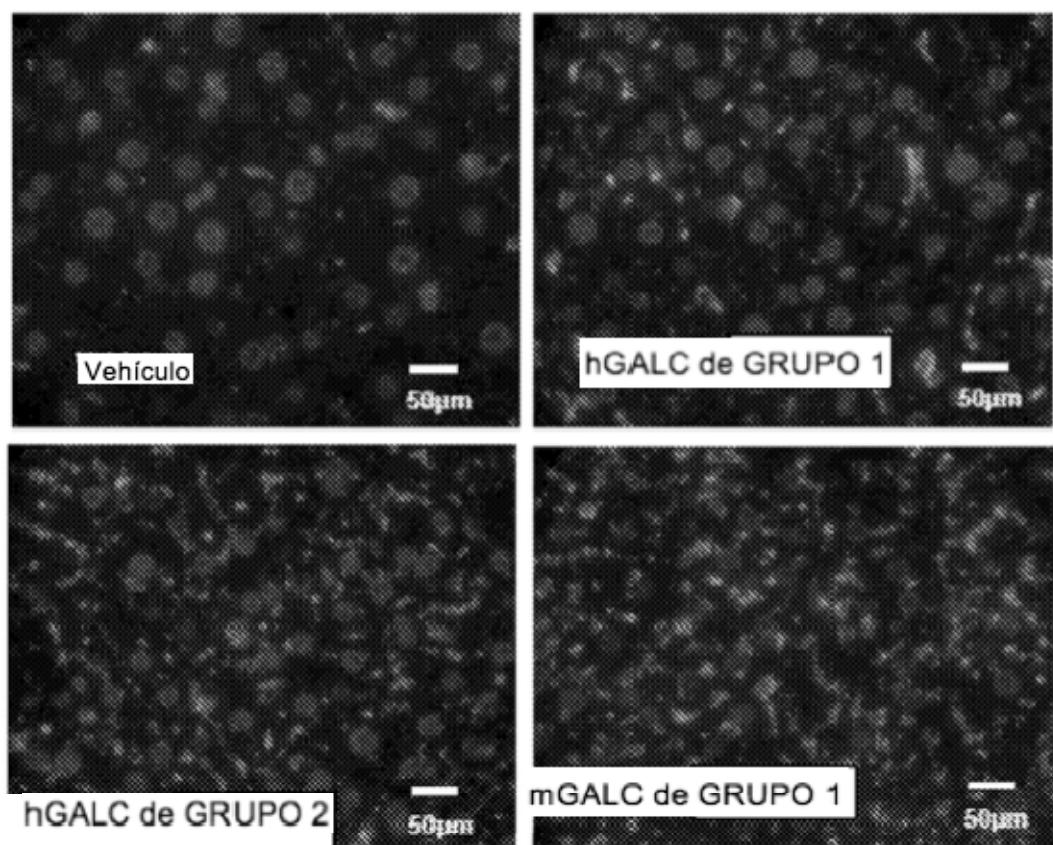


FIGURA 46

CEREBRO

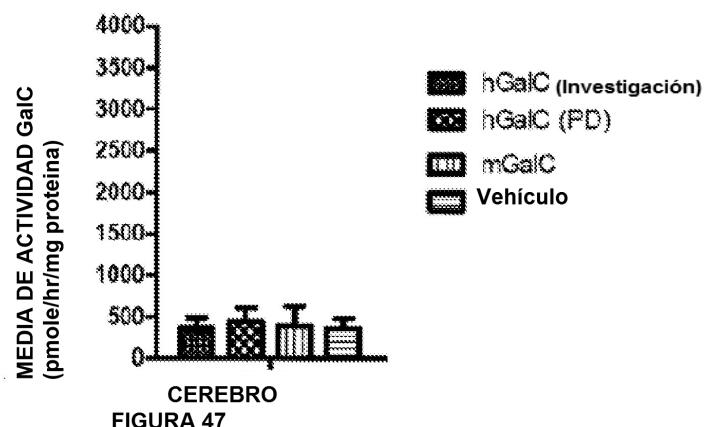


FIGURA 47

Hígado

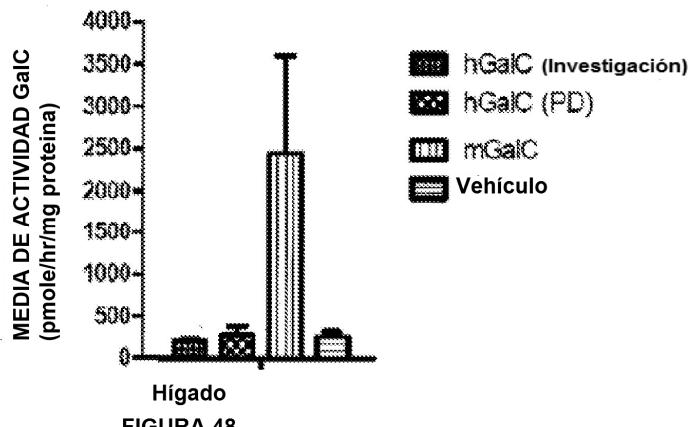


FIGURA 48

INMUNOTINCIÓN DE GALC EN EL CEREBRO 10X
CORTEZA REGIÓN PERIVENTRICULAR

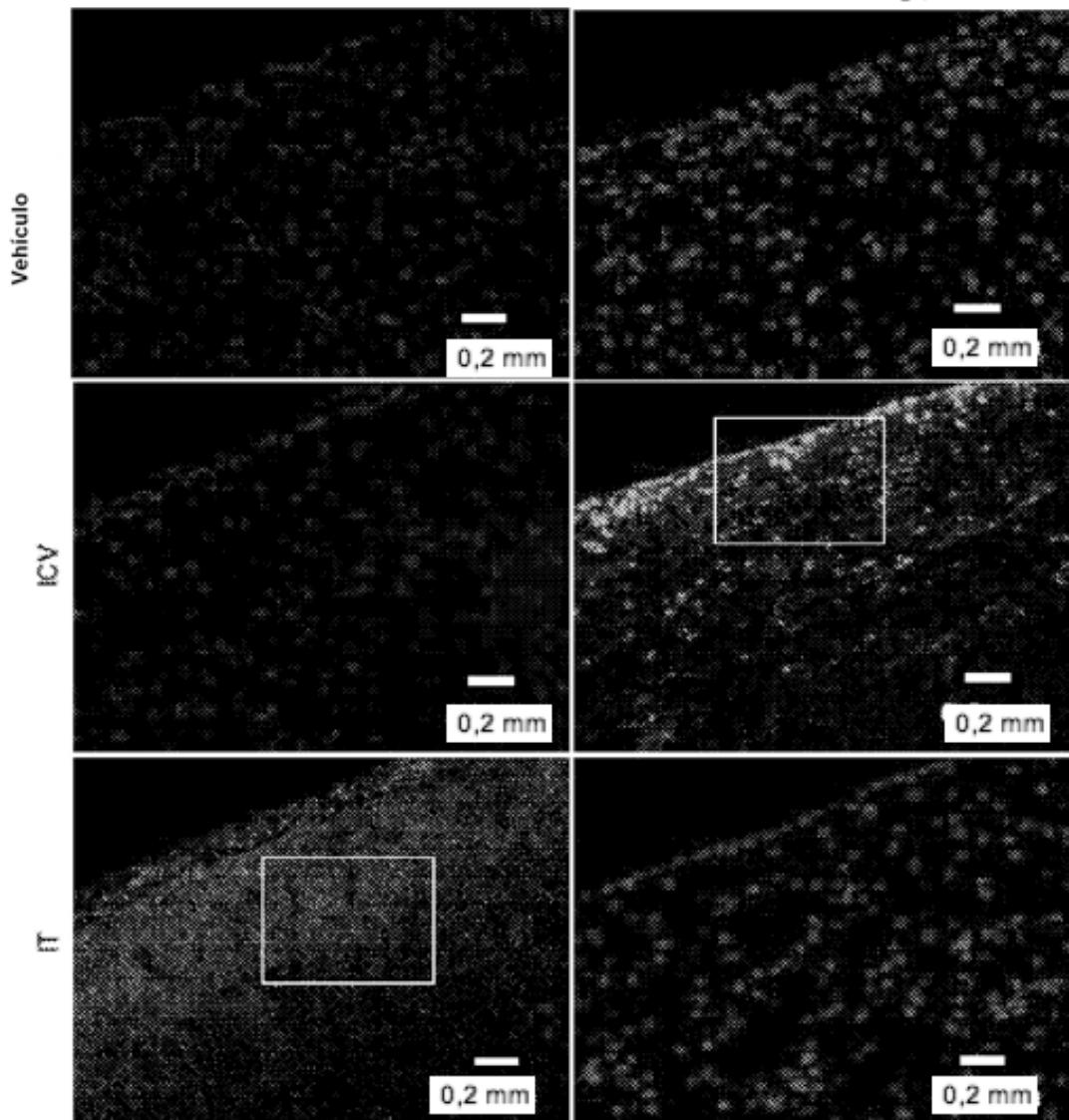
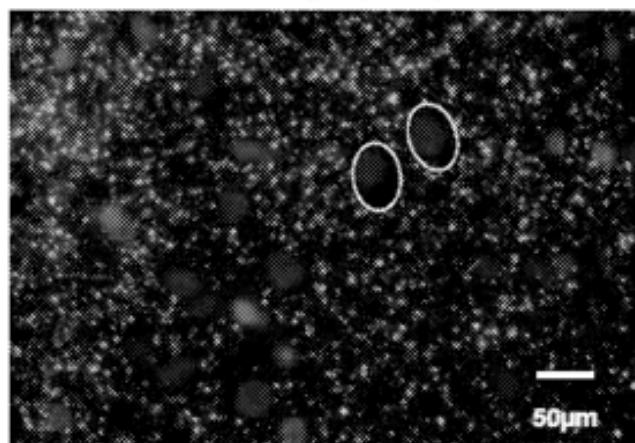


FIGURA 49

REGIÓN DE CORTEZA , INYECCIÓN IT



REGIÓN PERIVENTRICULAR INYECCIÓN ICV

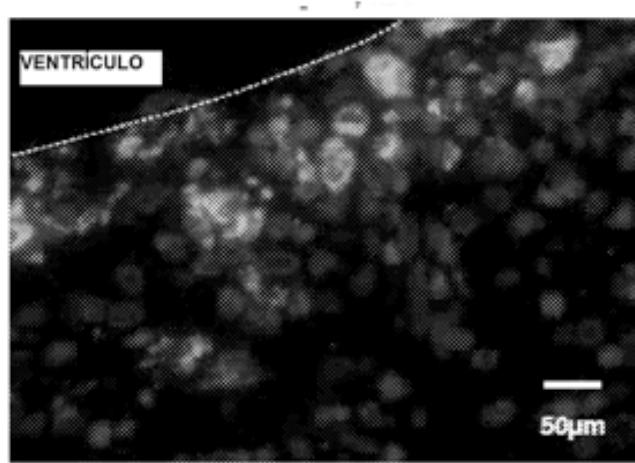


FIGURA 50

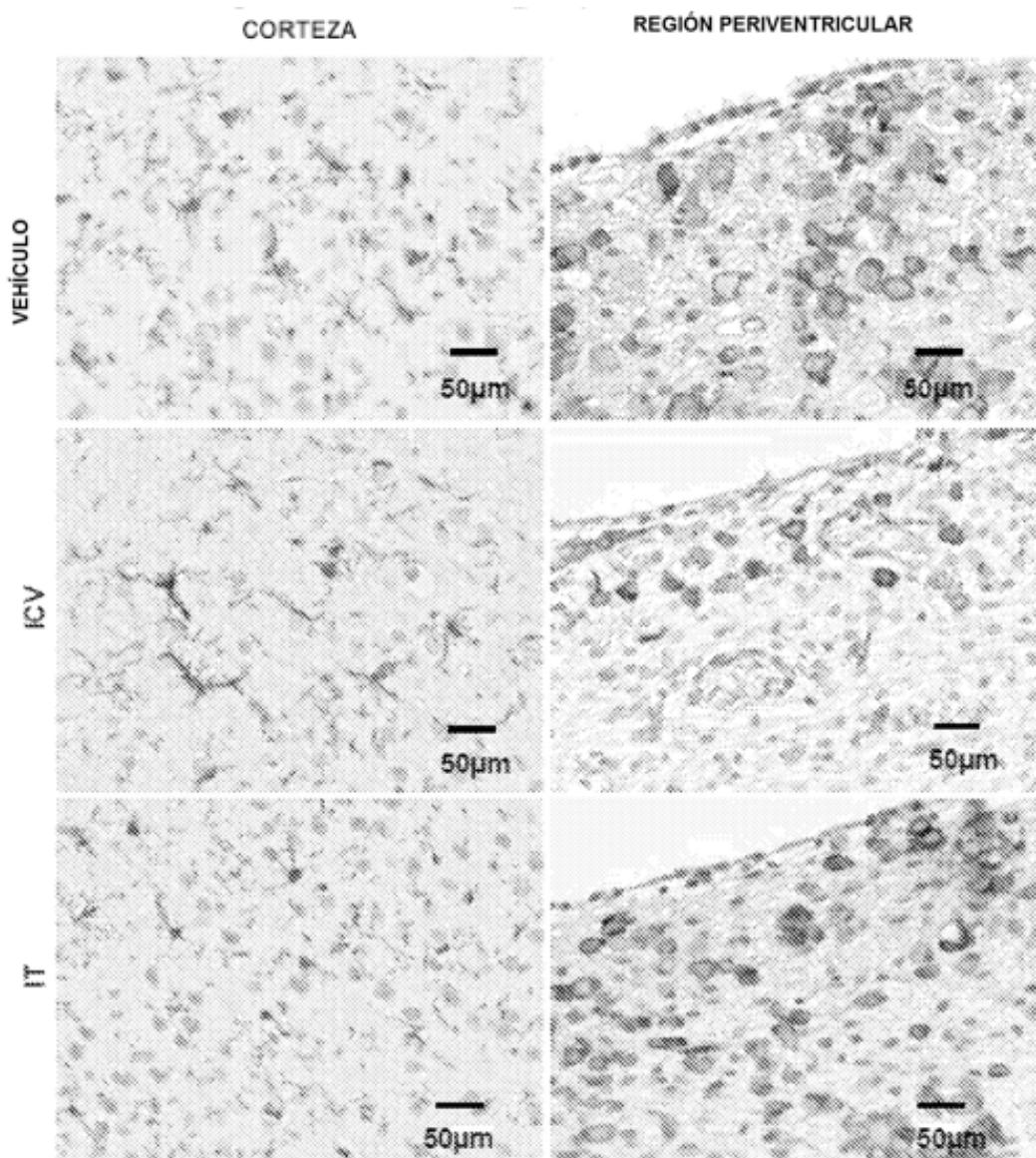


FIGURA 51

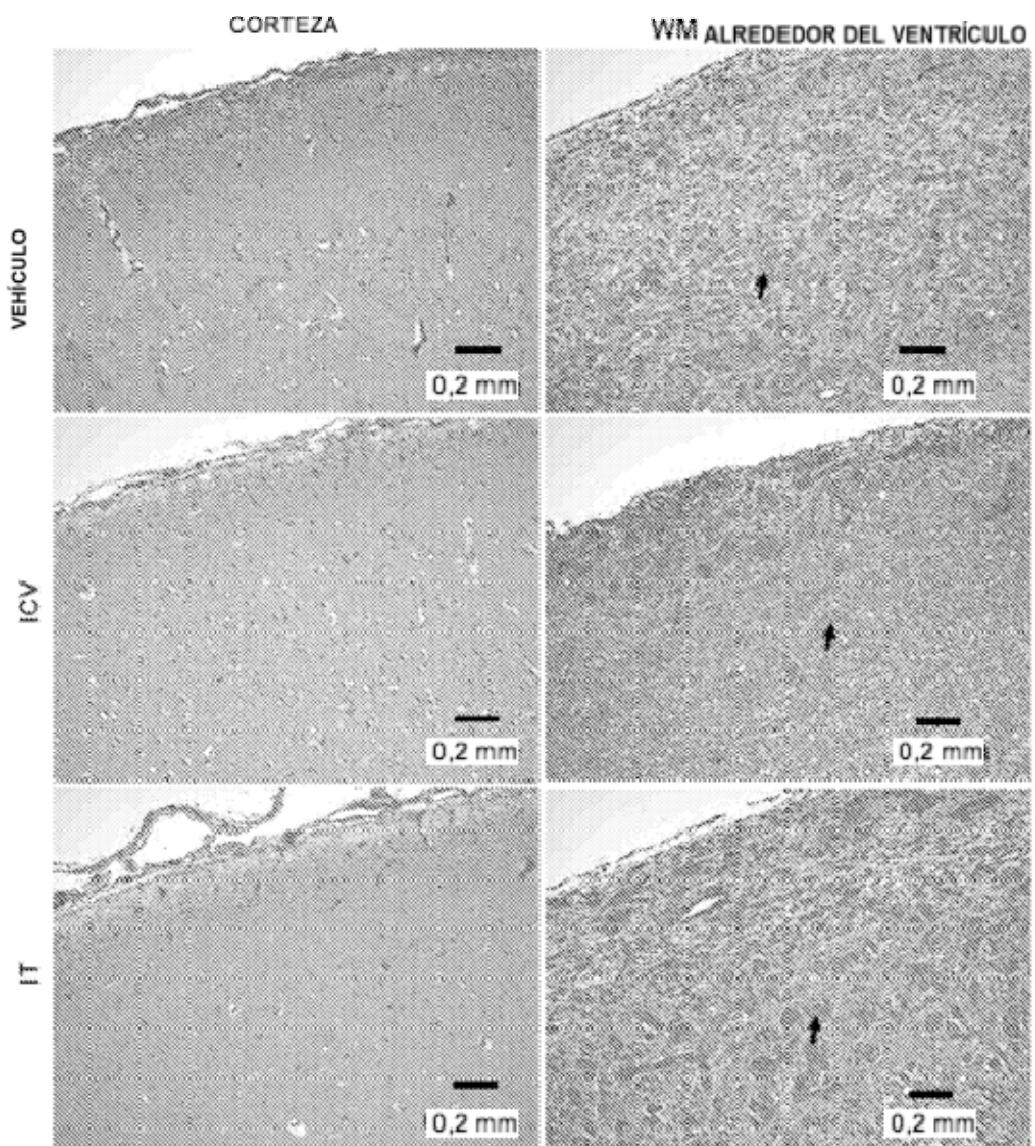
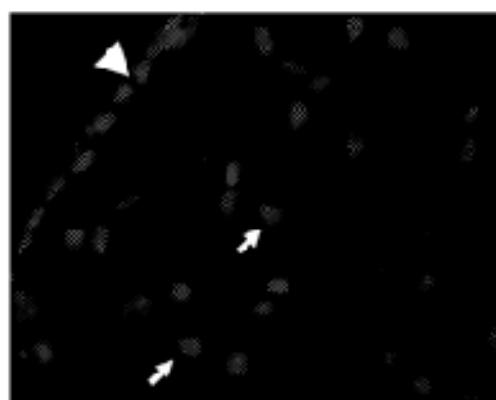


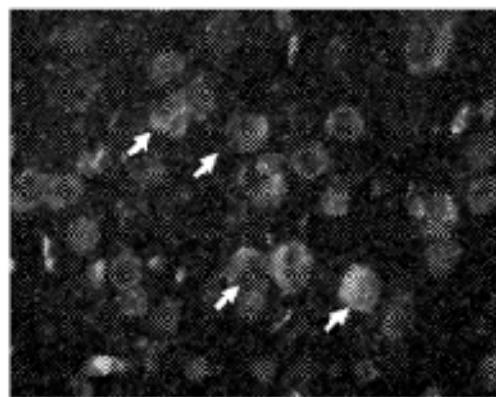
FIGURA 52

DIBUJOS I2S

VEHICULO
CORTEZA CEREBRAL



3 DOSIS I2S
CORTEZA CEREBRAL



3 DOSIS I2S
CORTEZA CEREBRAL

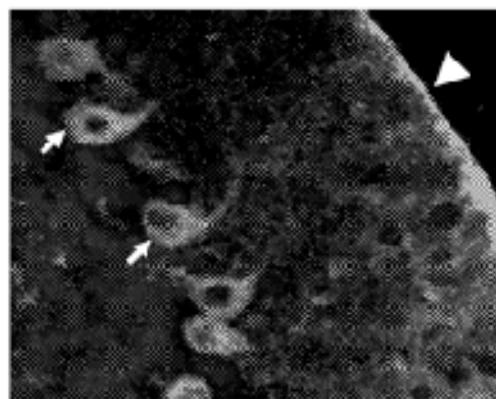


FIGURA 53

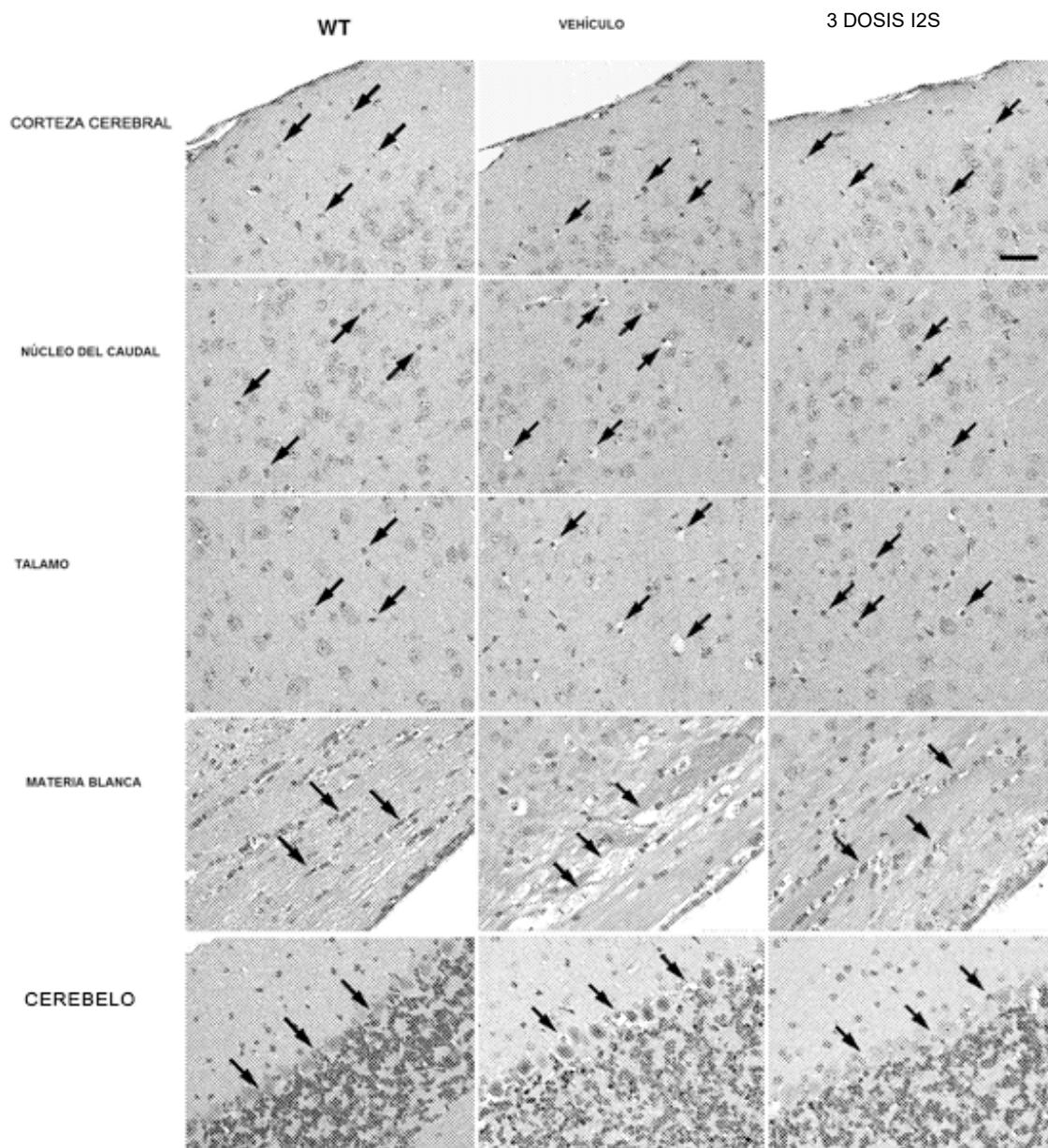


FIGURA 54

ES 2 858 726 T3

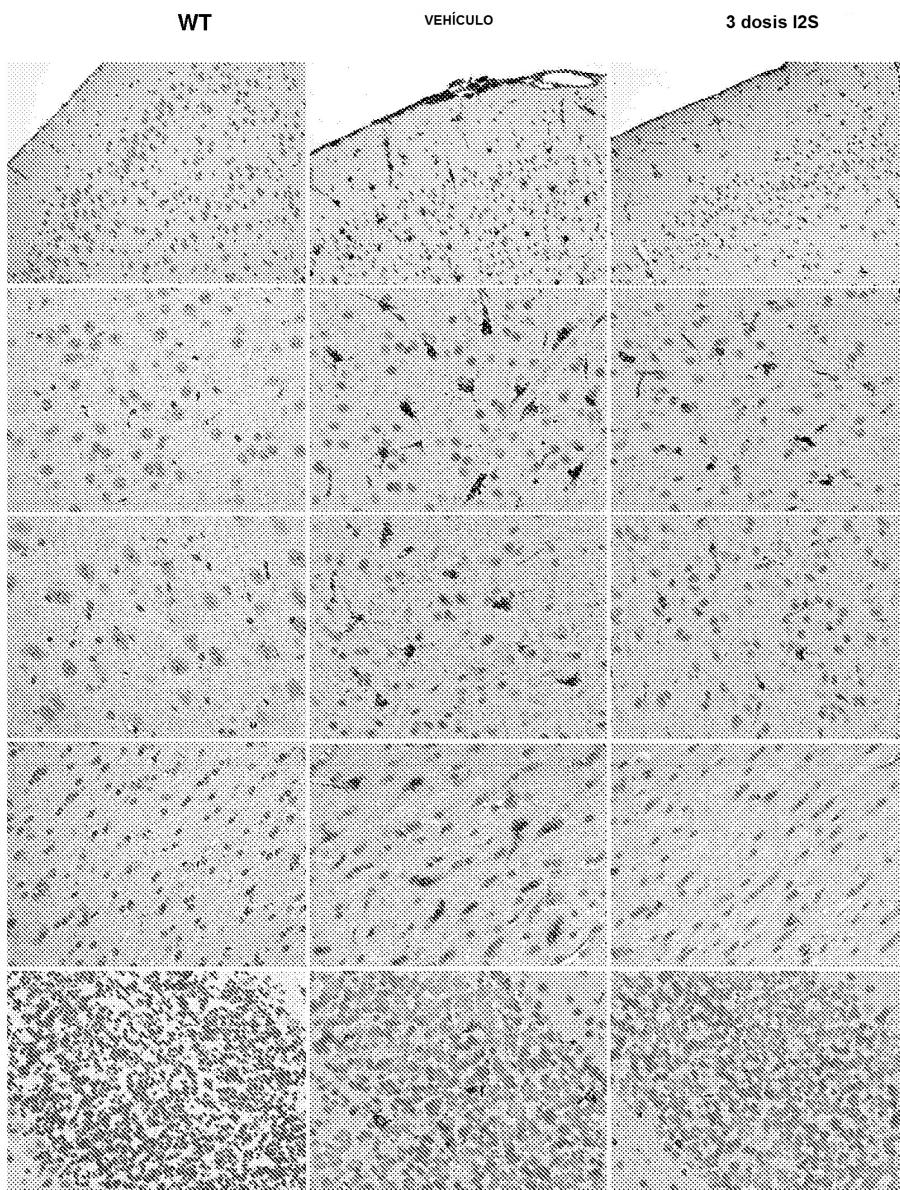


FIGURA 55

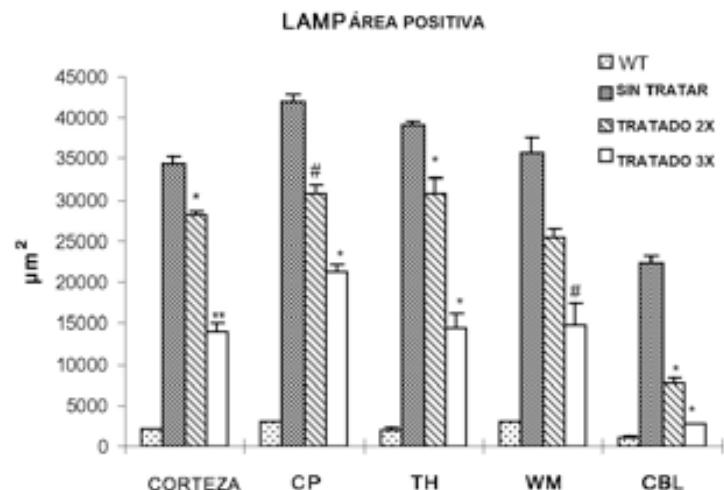


FIGURA 56

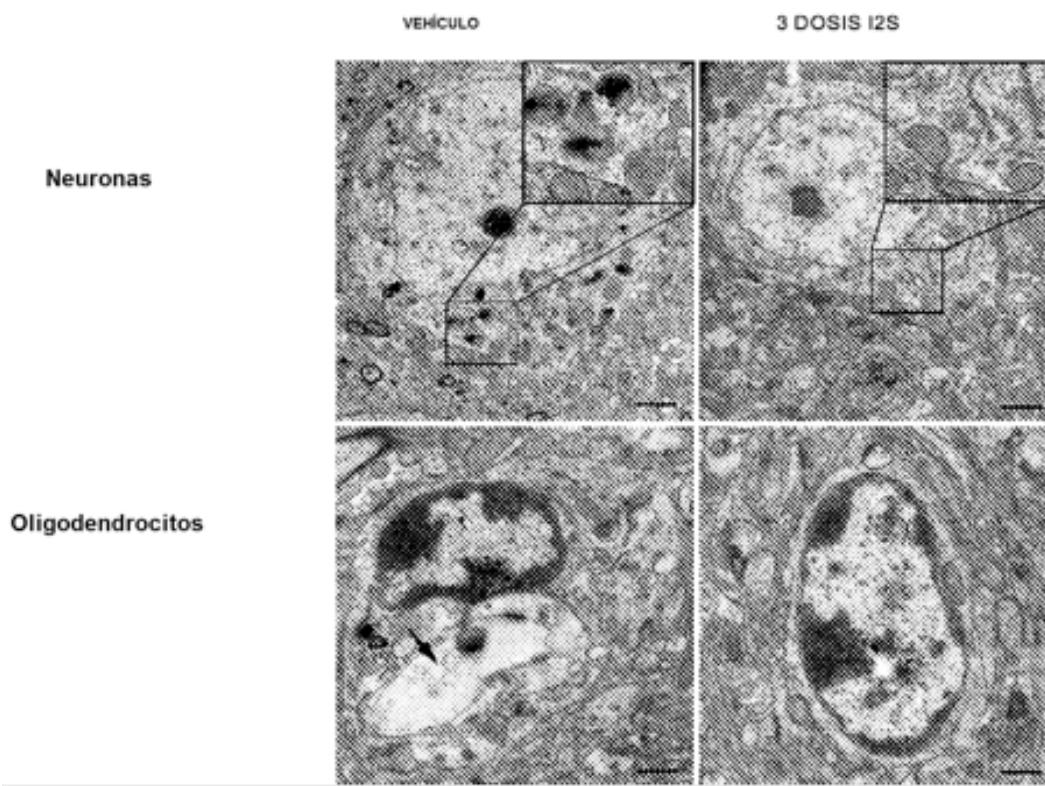


FIGURA 57

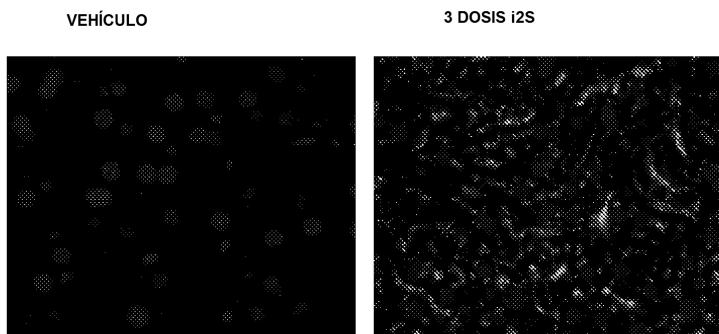


FIGURA 58

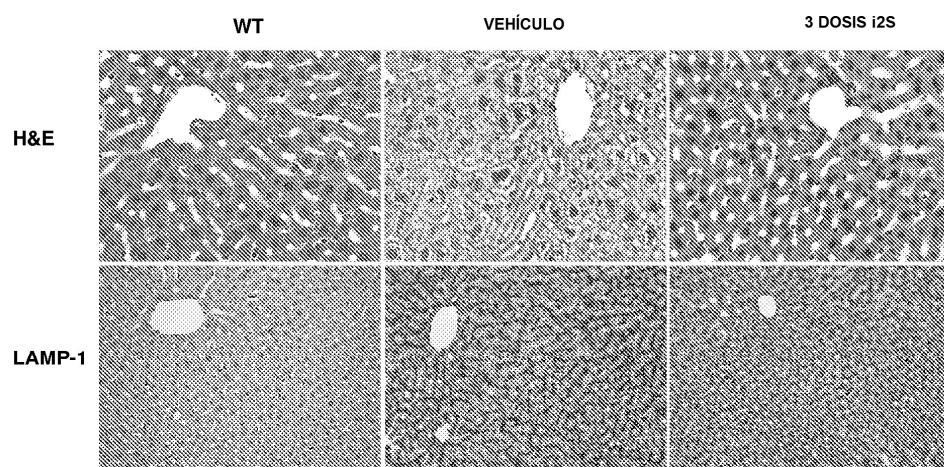


FIGURA 59



FIGURA 60



FIGURA 61

ES 2 858 726 T3



FIGURA 62

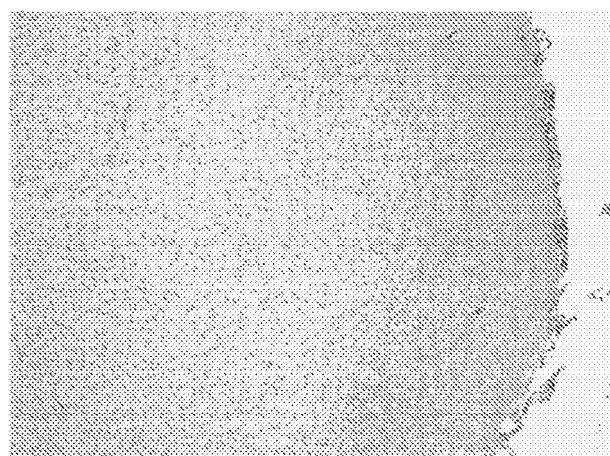


FIGURA 63

ES 2 858 726 T3

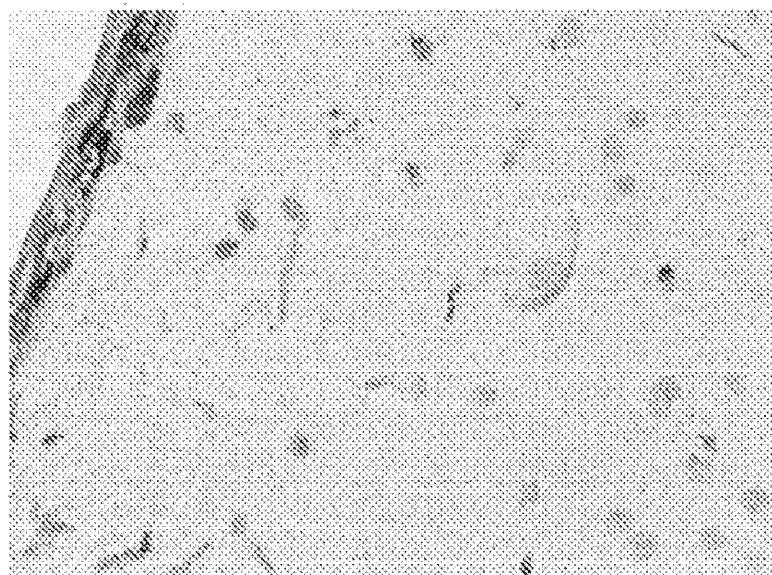


FIGURA 64

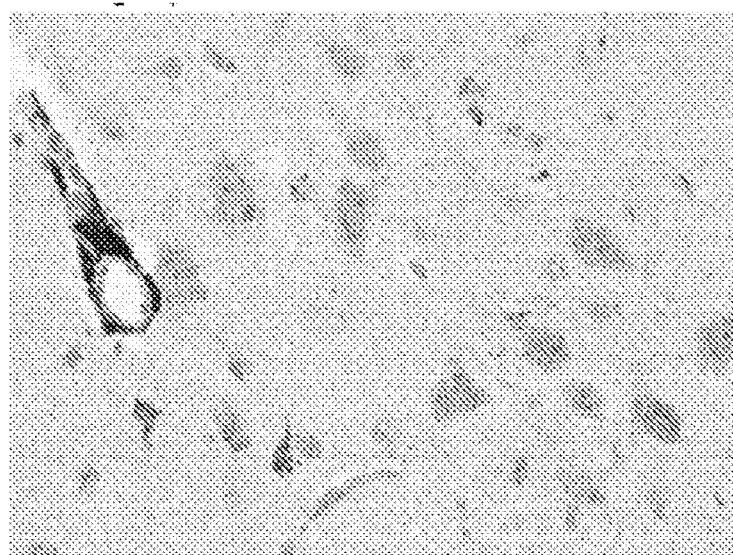


FIGURA 65

ES 2 858 726 T3

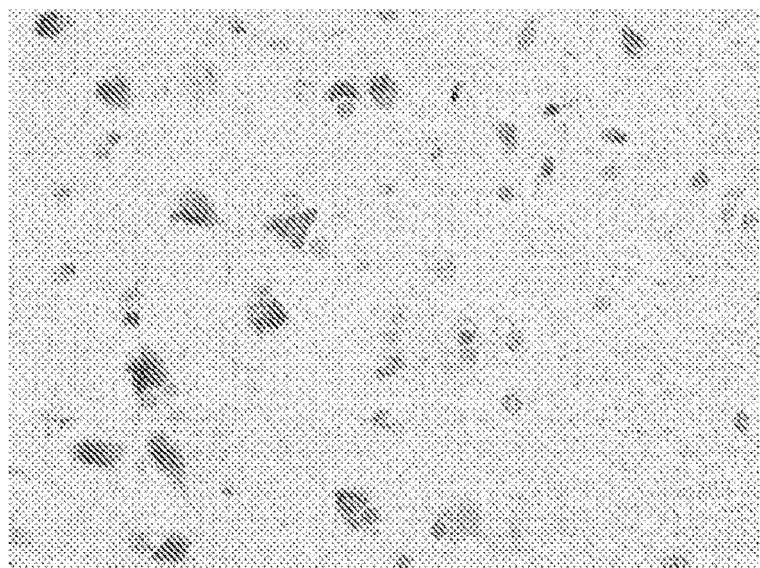


FIGURA 66

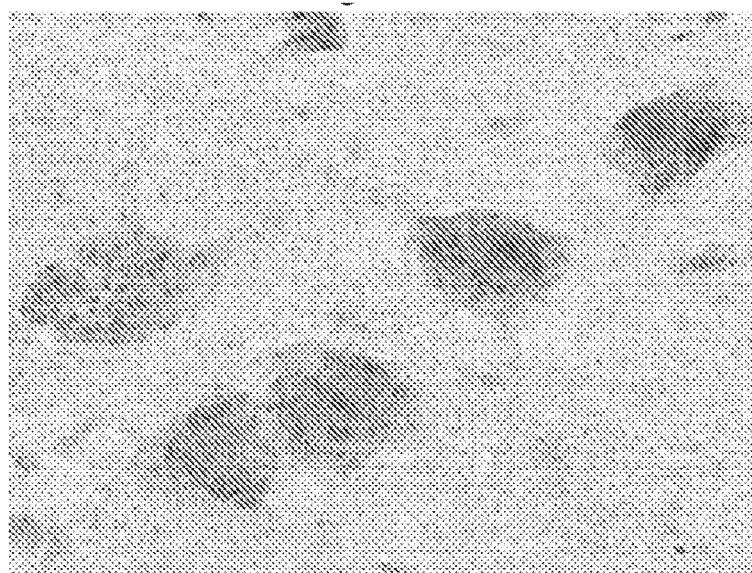


FIGURA 67

ES 2 858 726 T3

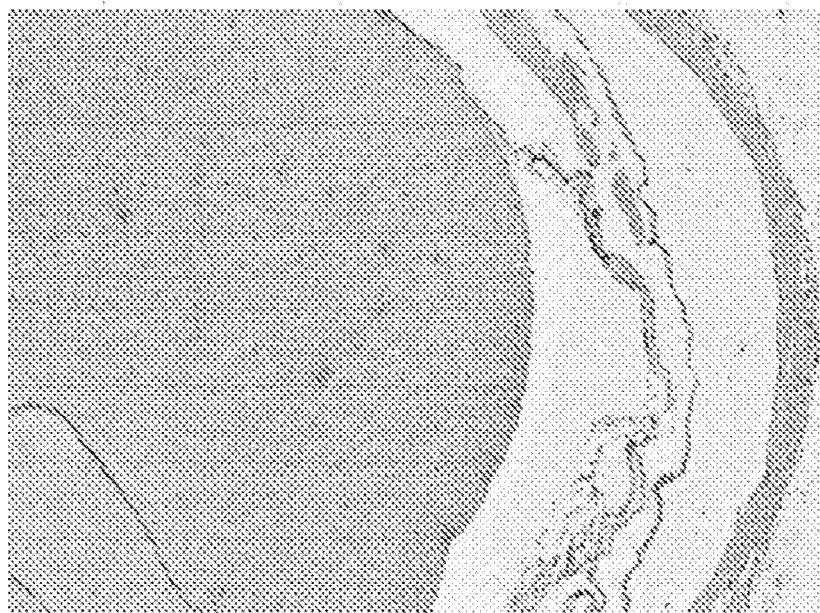


FIGURA 68

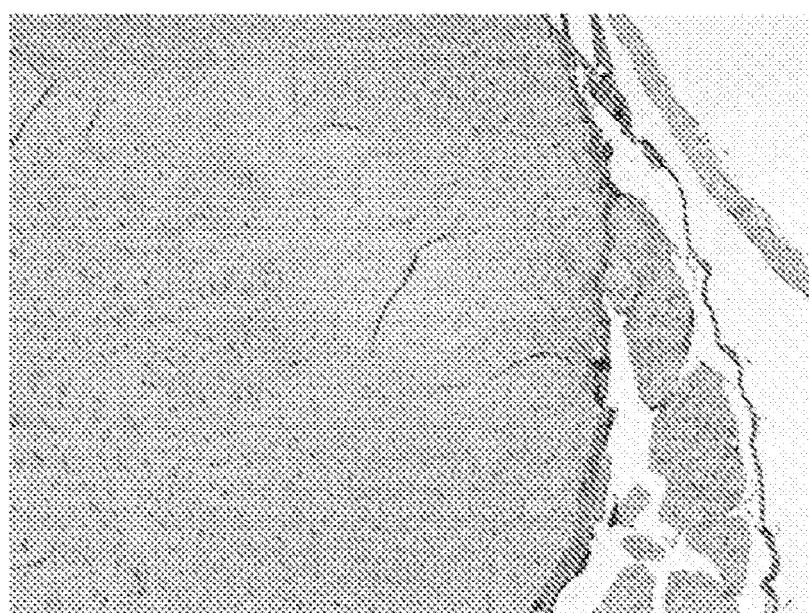


FIGURA 69

ES 2 858 726 T3

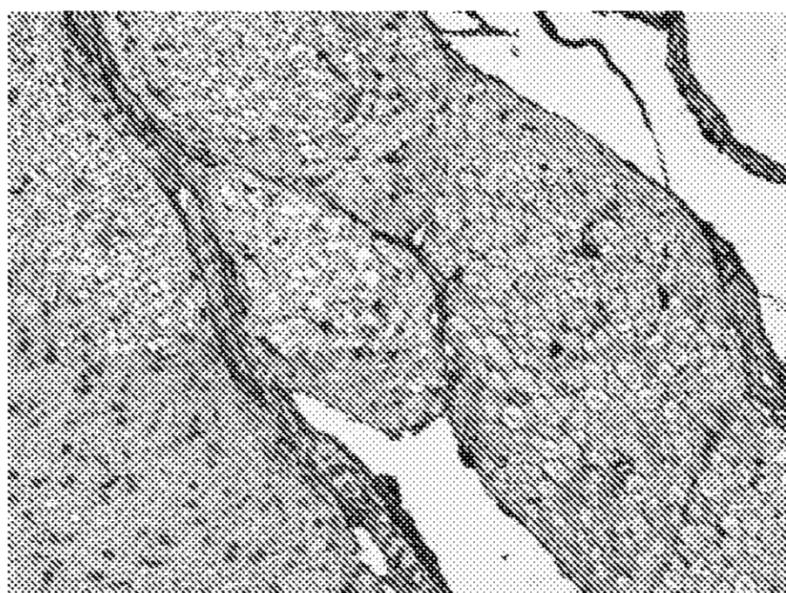


FIGURA 70

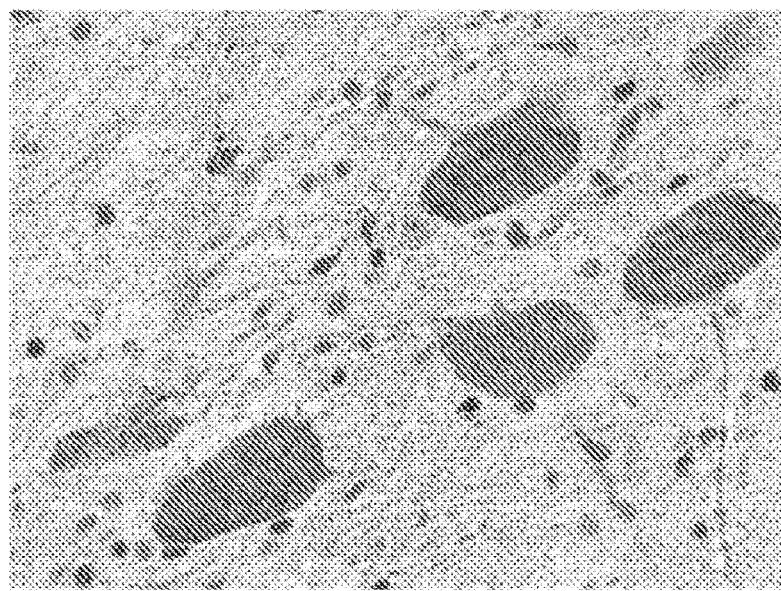


FIGURA 71

ES 2 858 726 T3

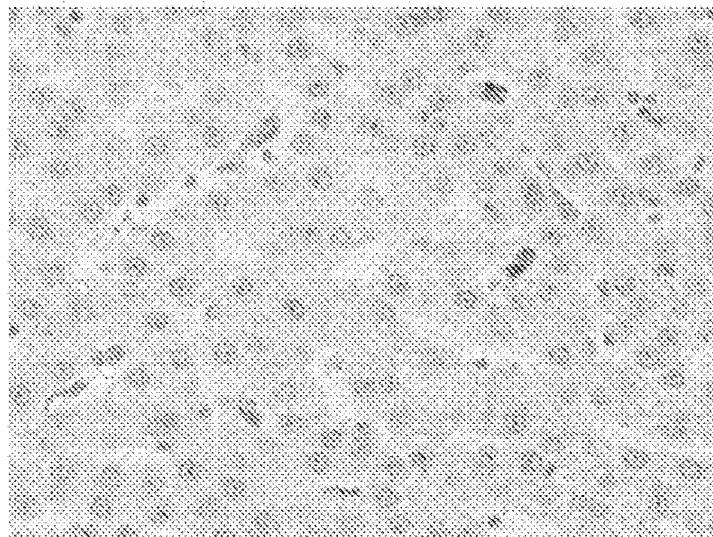


FIGURA 72

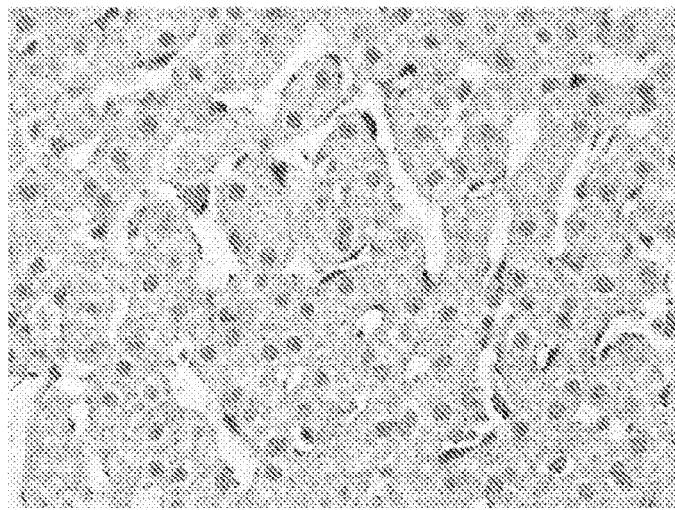


FIGURA 73

ES 2 858 726 T3

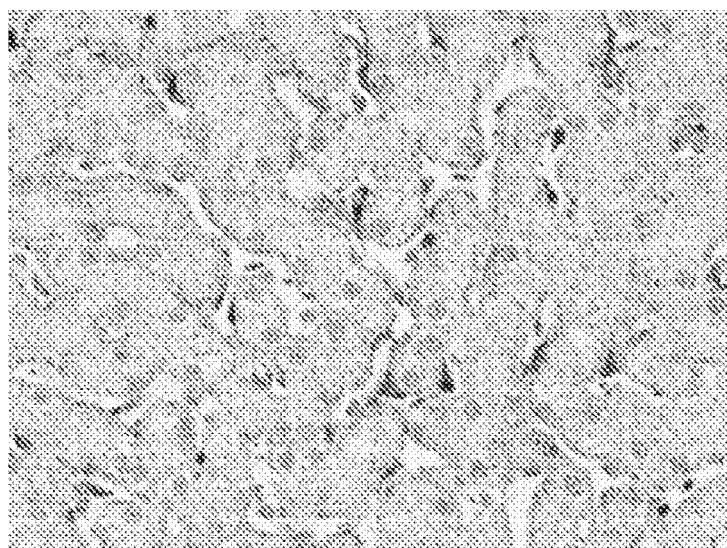


FIGURA 74

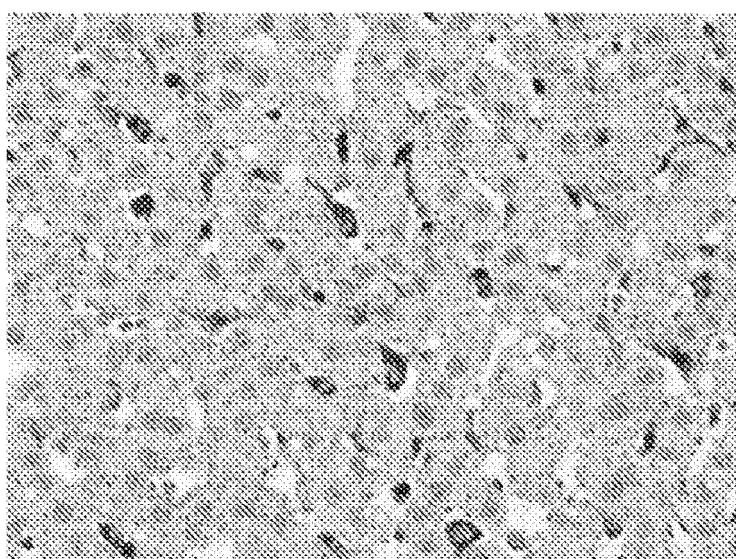


FIGURA 75

ES 2 858 726 T3

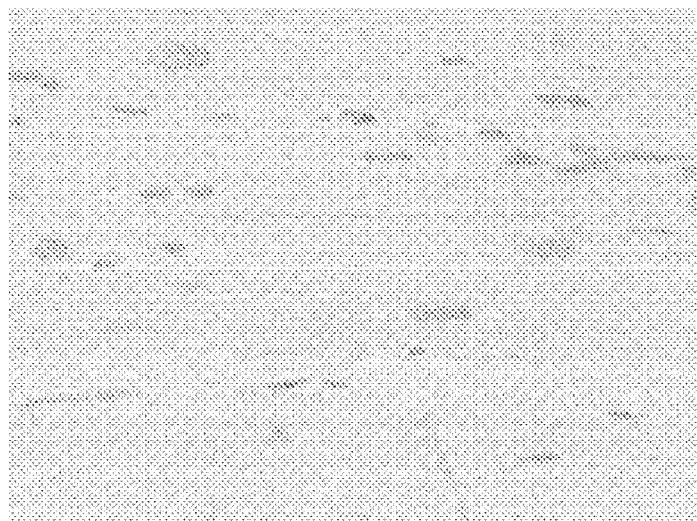


FIGURA 76

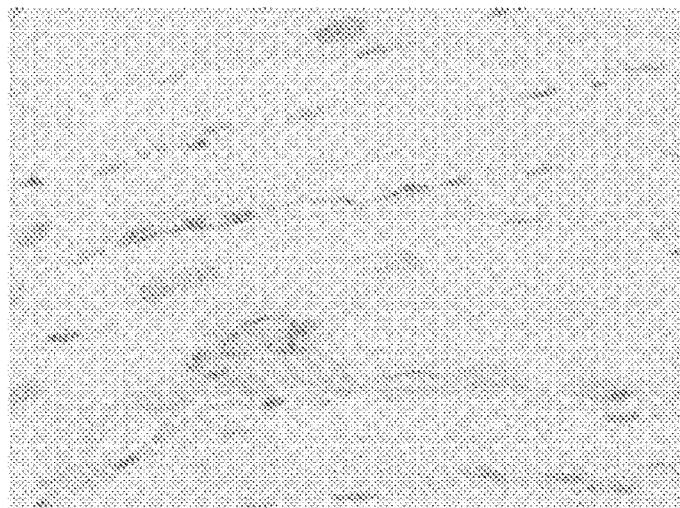


FIGURA 77

ES 2 858 726 T3

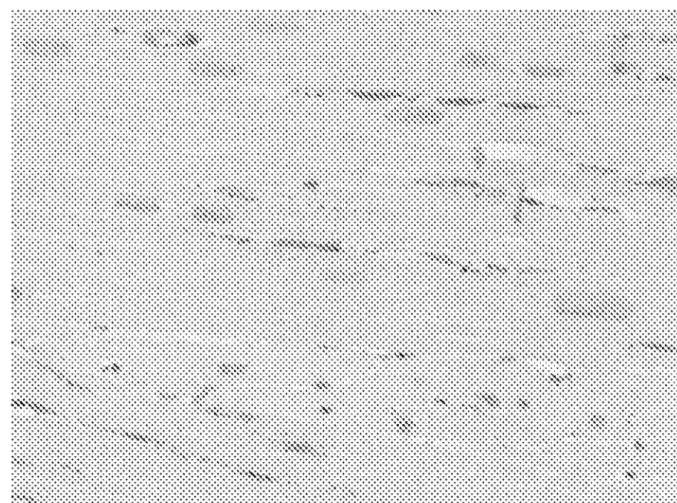


FIGURA 78

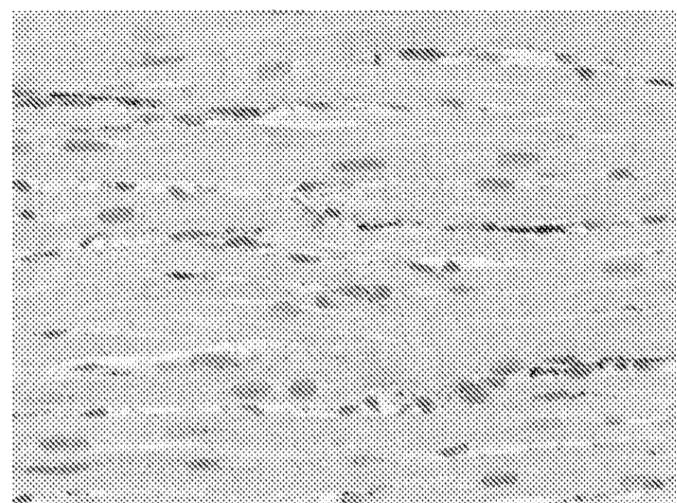


FIGURA 79

ES 2 858 726 T3

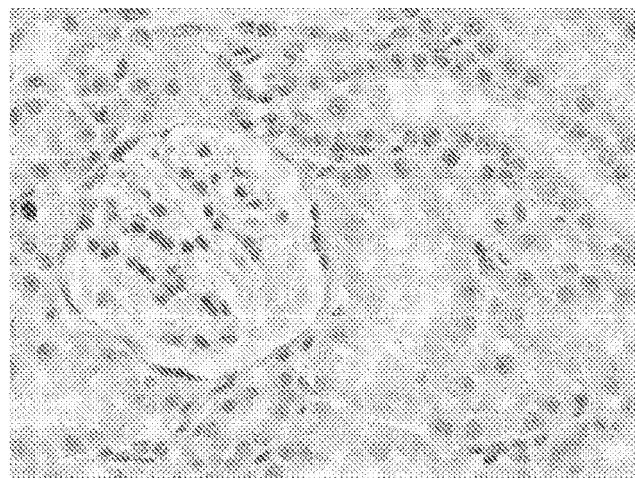


FIGURA 80

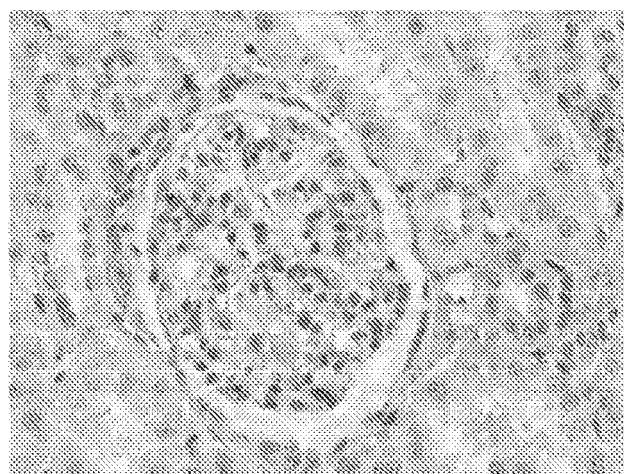


FIGURA 81

ES 2 858 726 T3

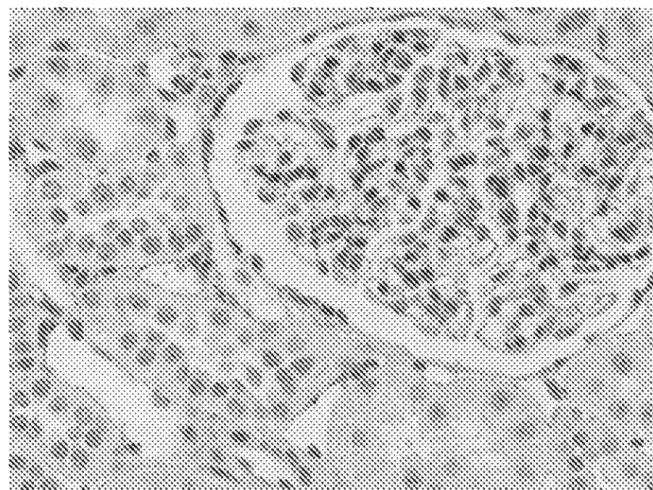


FIGURA 82

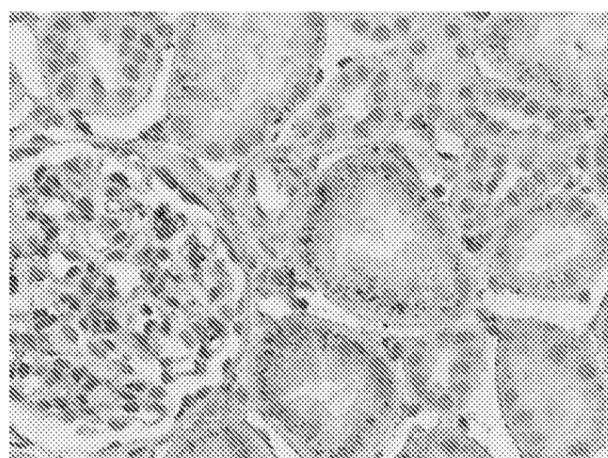


FIGURA 83

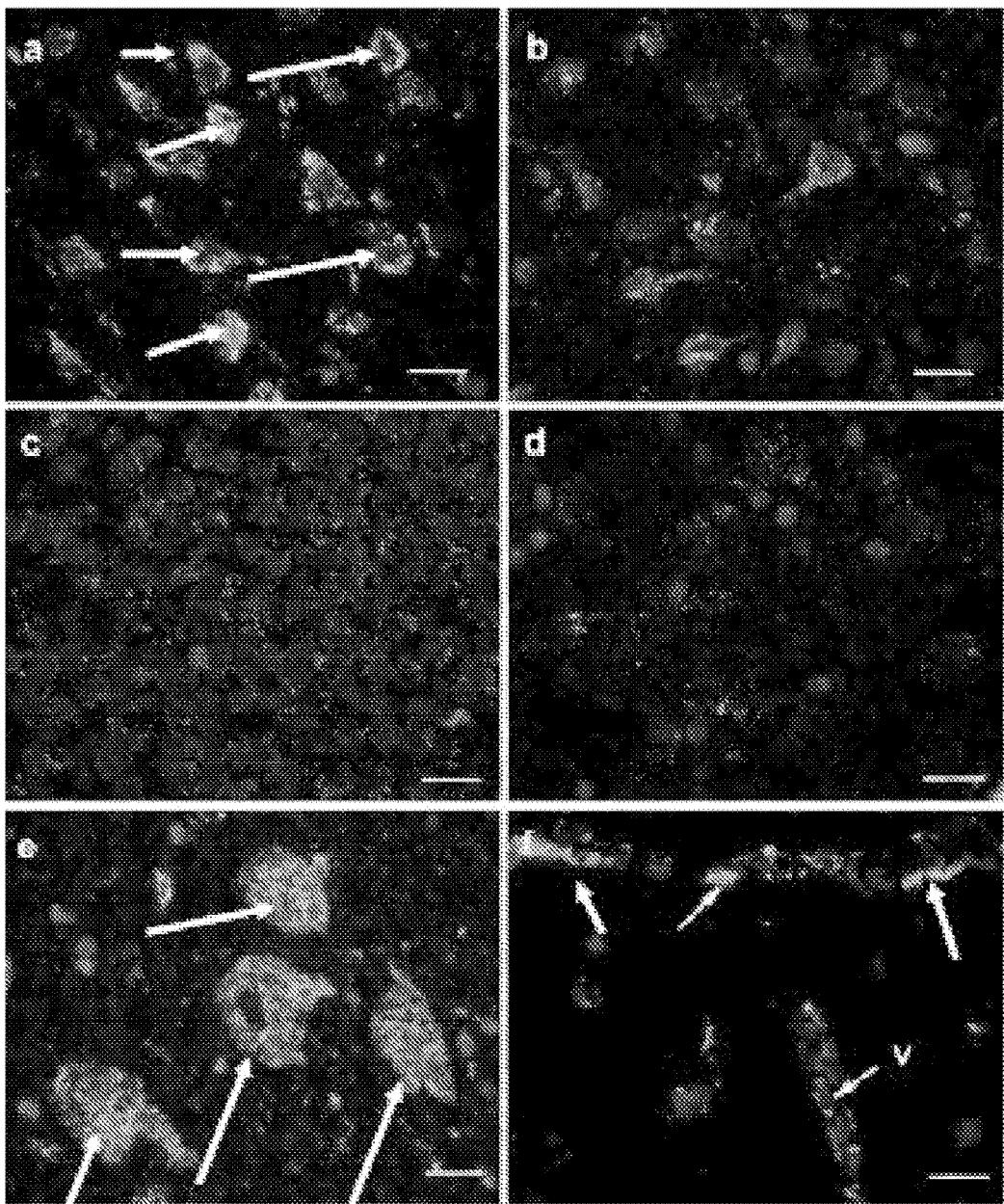


FIGURA 84

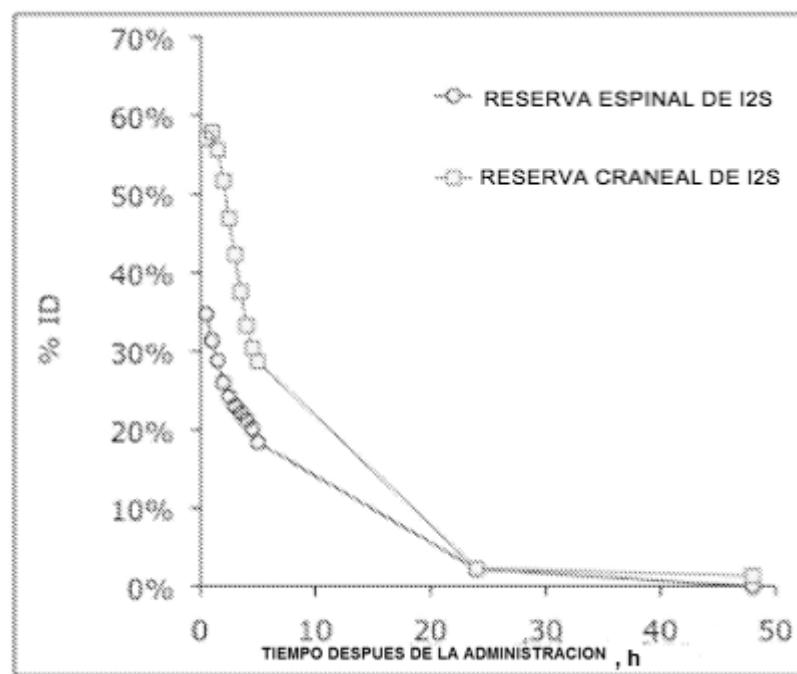


FIGURA 85

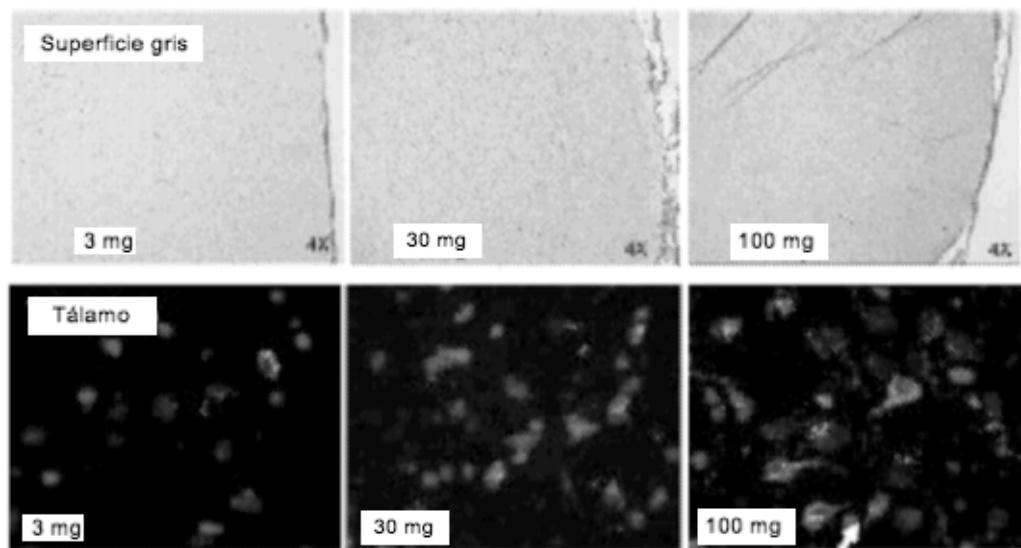


FIGURA 86

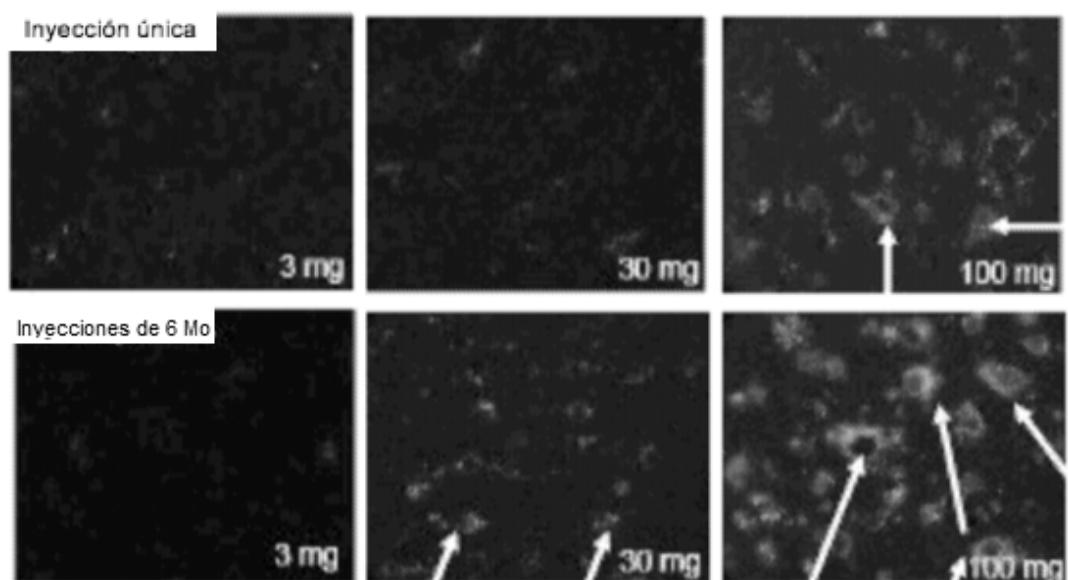


FIGURA 87

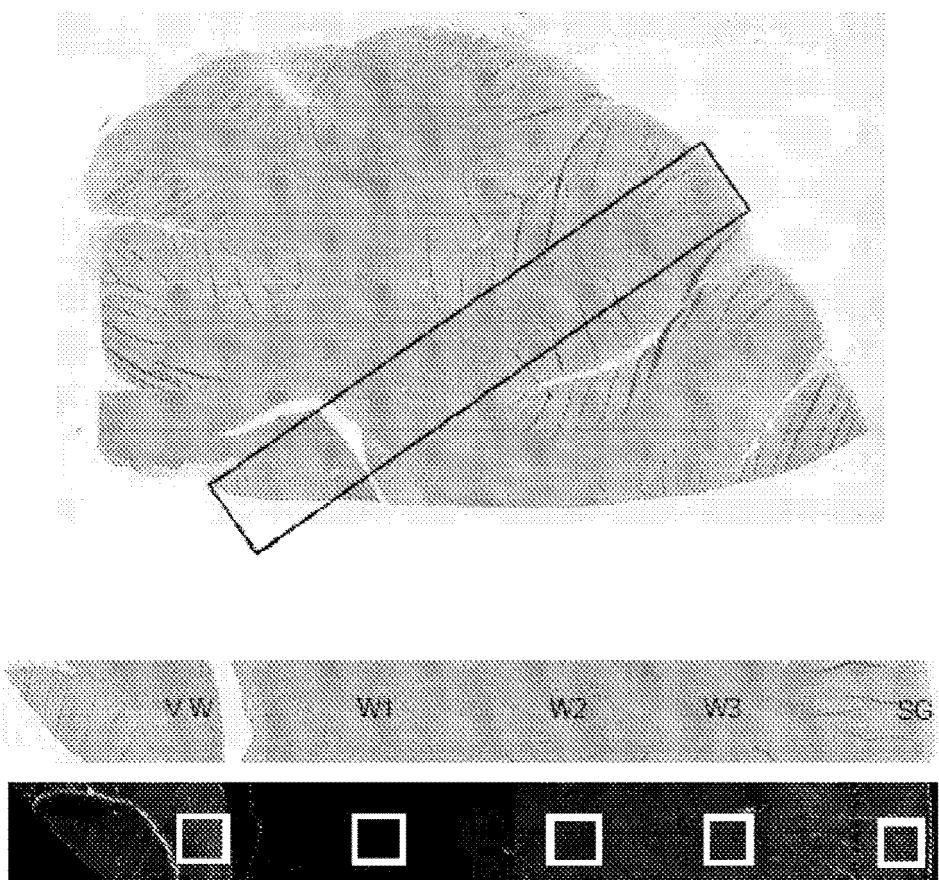


FIGURA 88

ES 2 858 726 T3

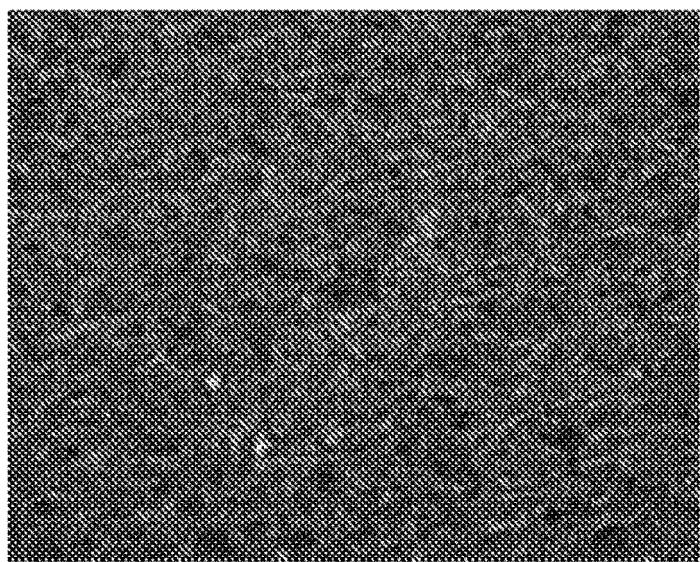


FIGURA 89A

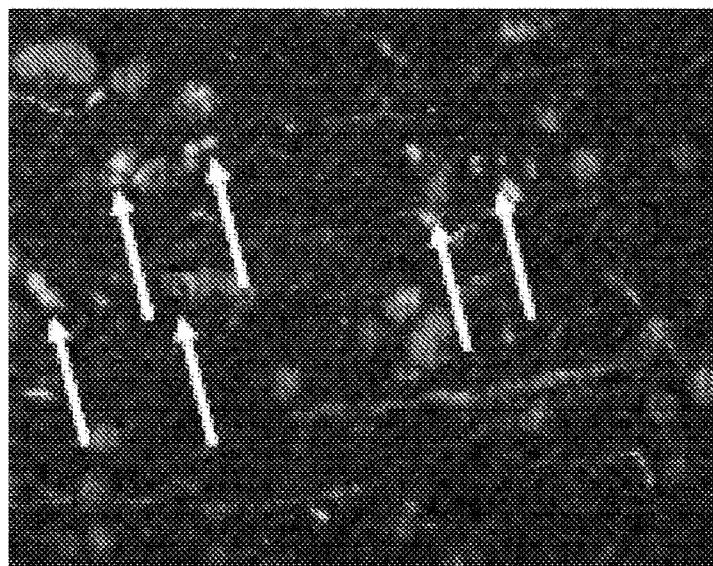


FIGURA 89B

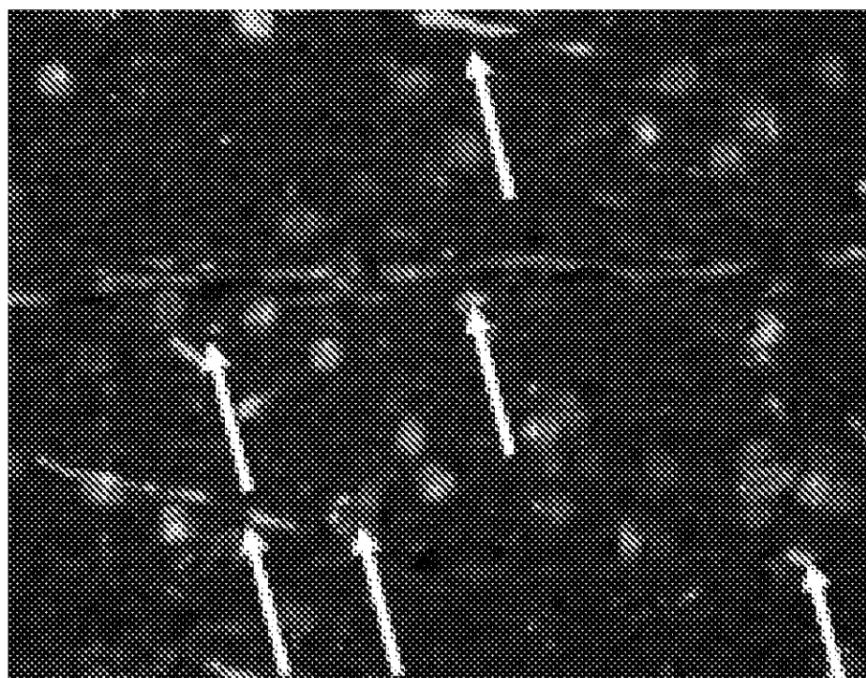


FIGURA 89C

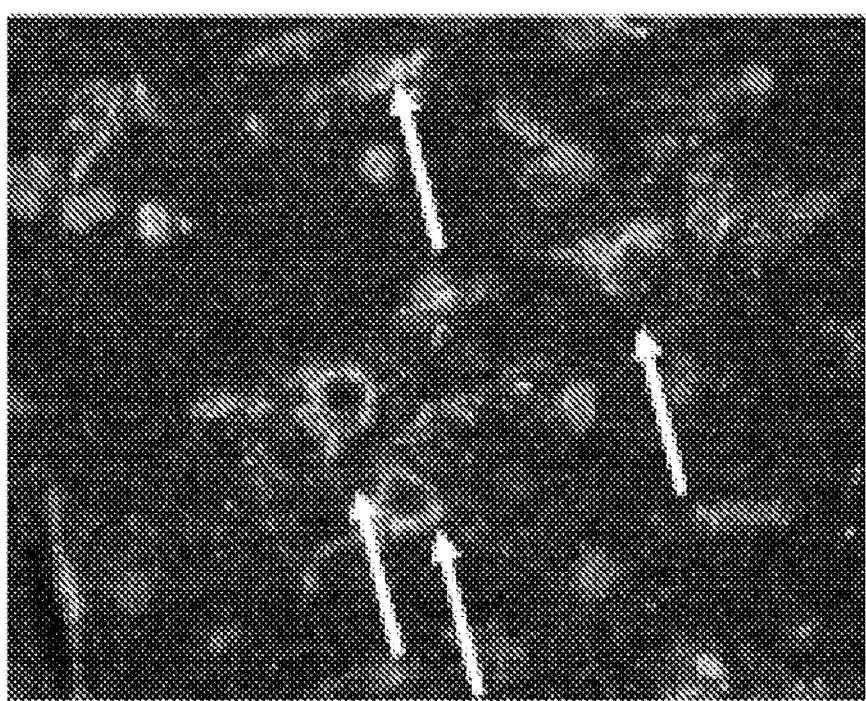


FIGURA 89D

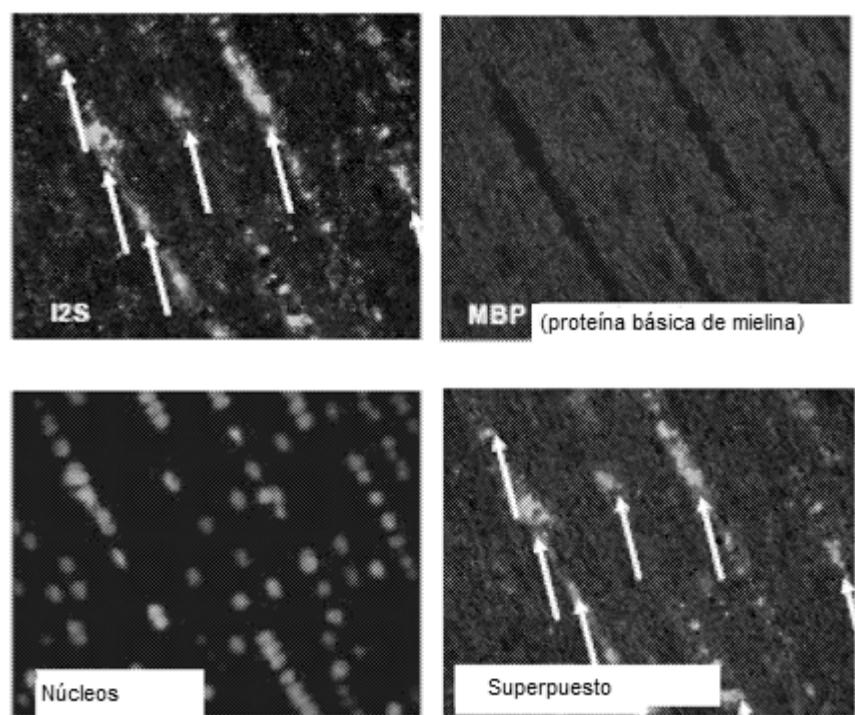


Figura 90

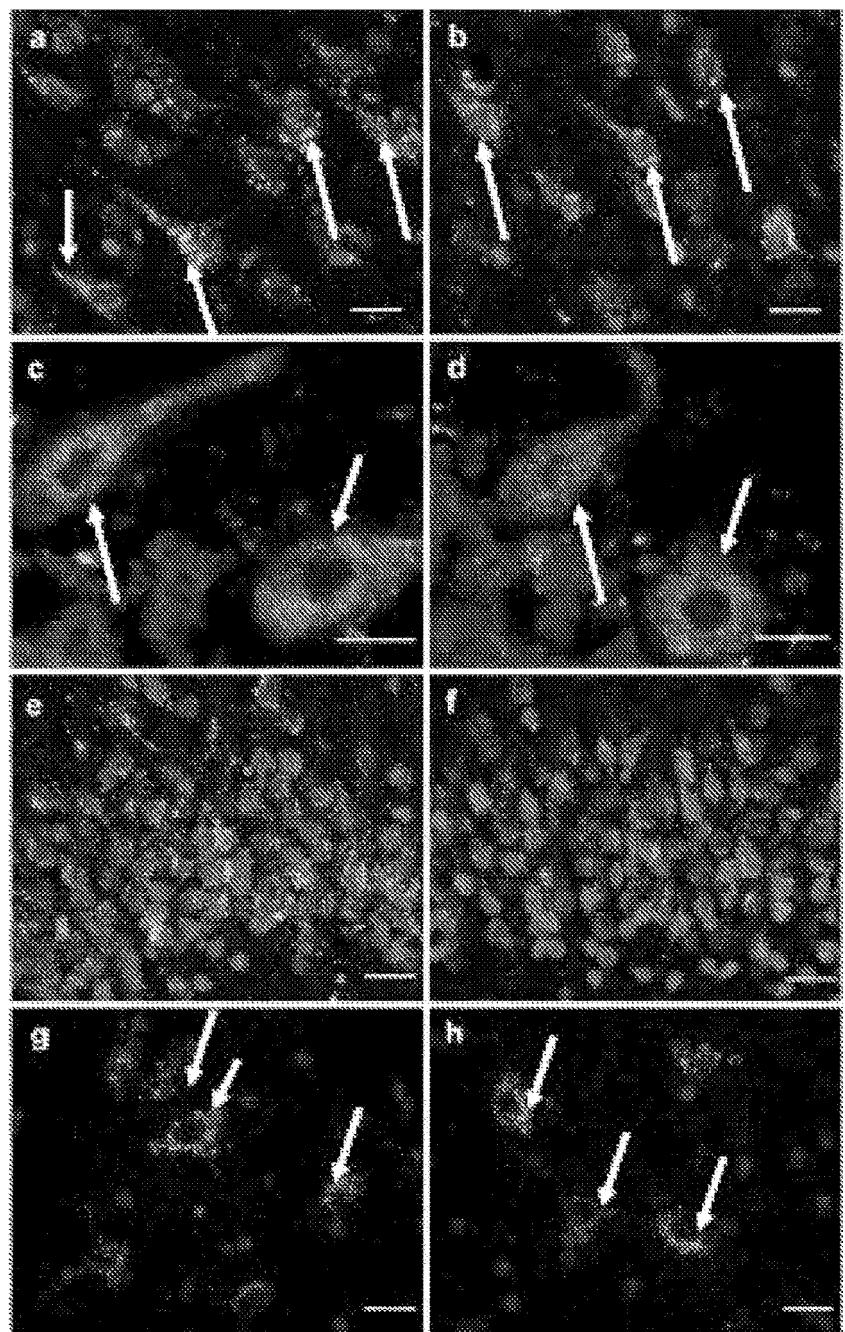


FIGURA 91

ES 2 858 726 T3

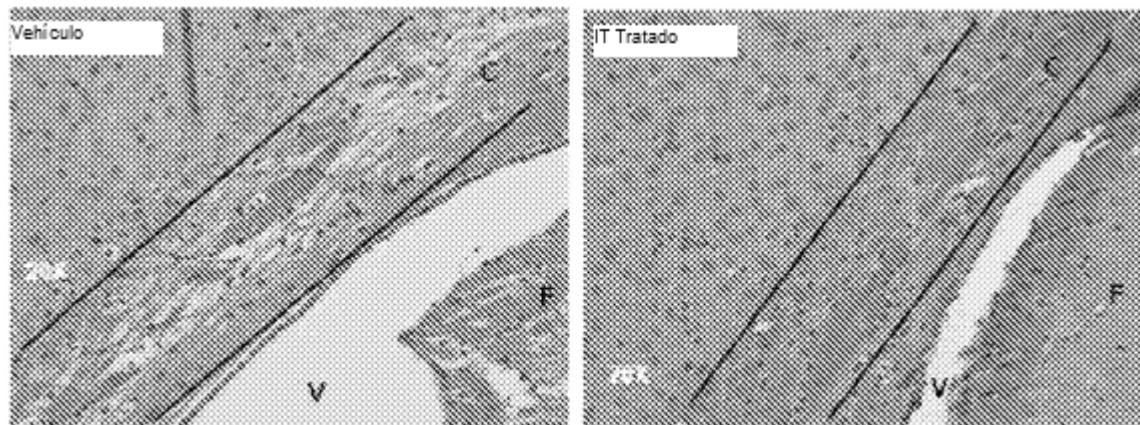


FIGURA 92

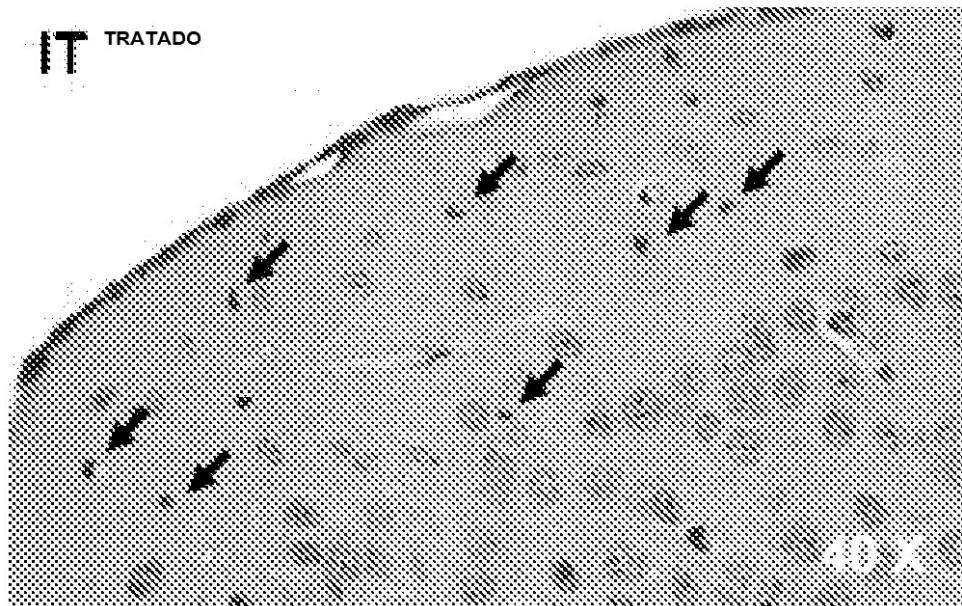
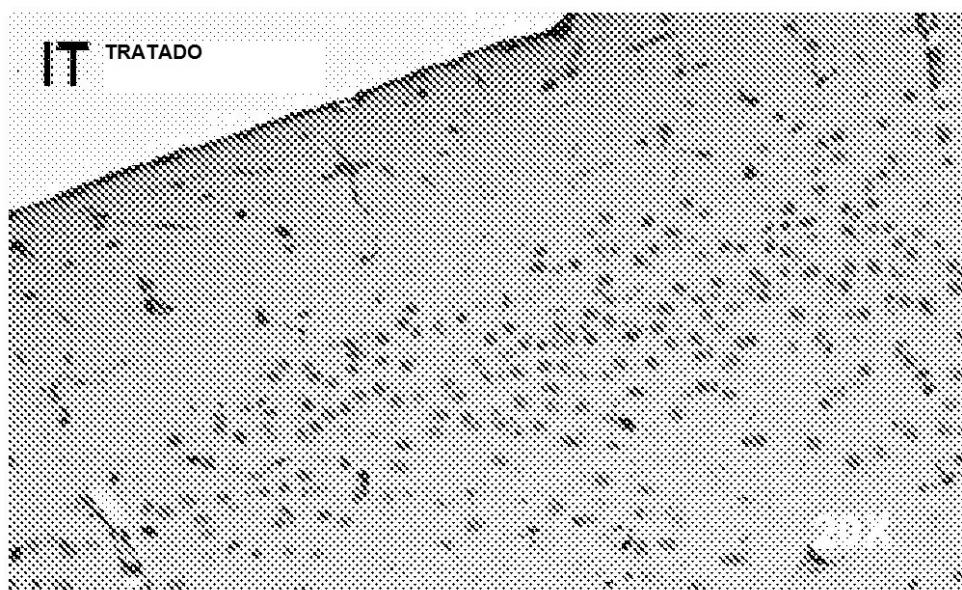


FIGURA 93 A

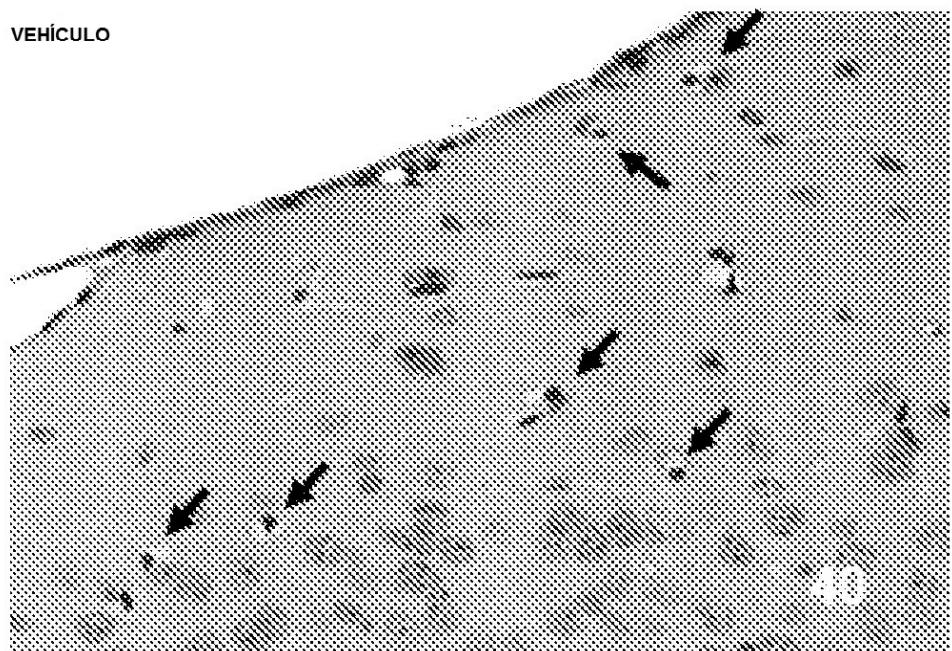
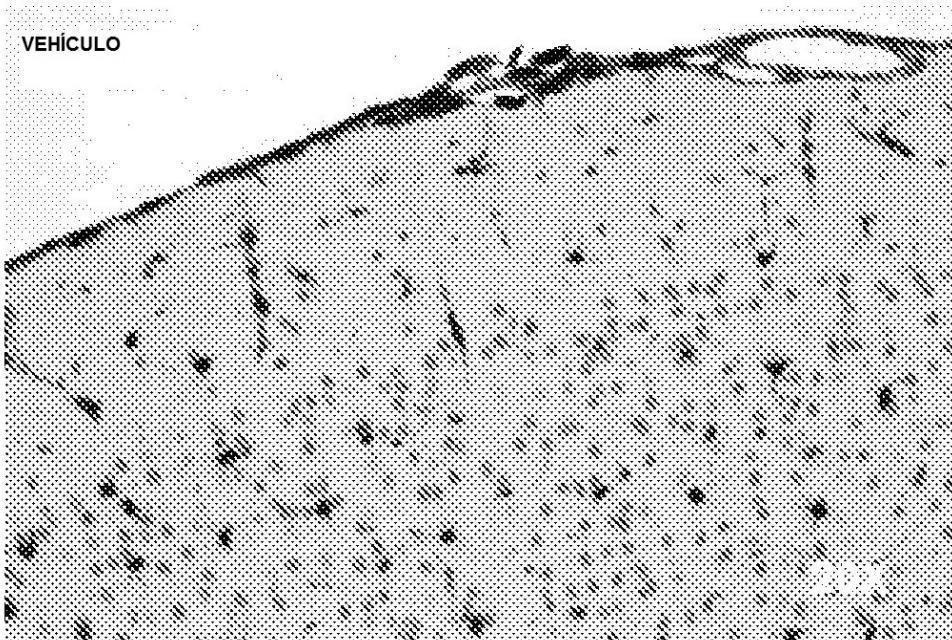
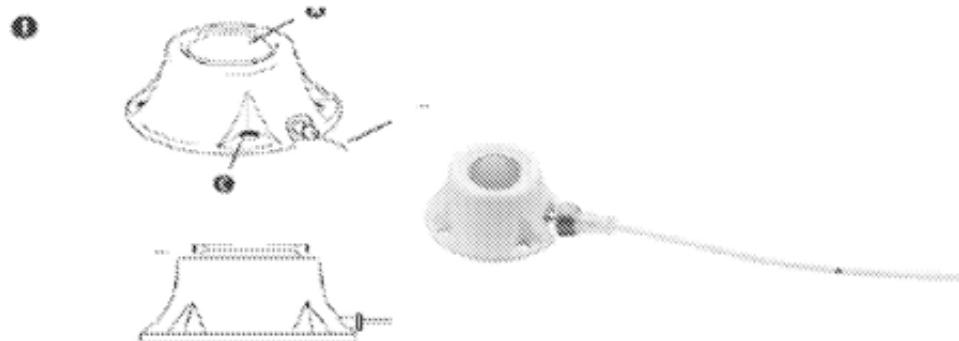


FIGURA 93 B

Componentes y dimensiones de portal
A - septo, B - tubo de salida, C - agujero de sutura



Cateter con guia

Figura 94

Sistema de acceso implantable intratecal de bajo perfil Port-A-Cath

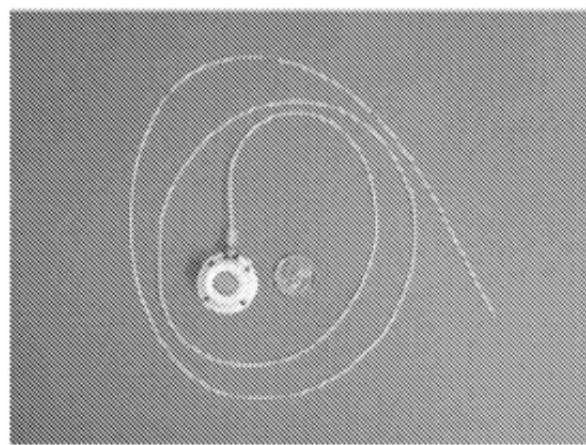


Figura 95

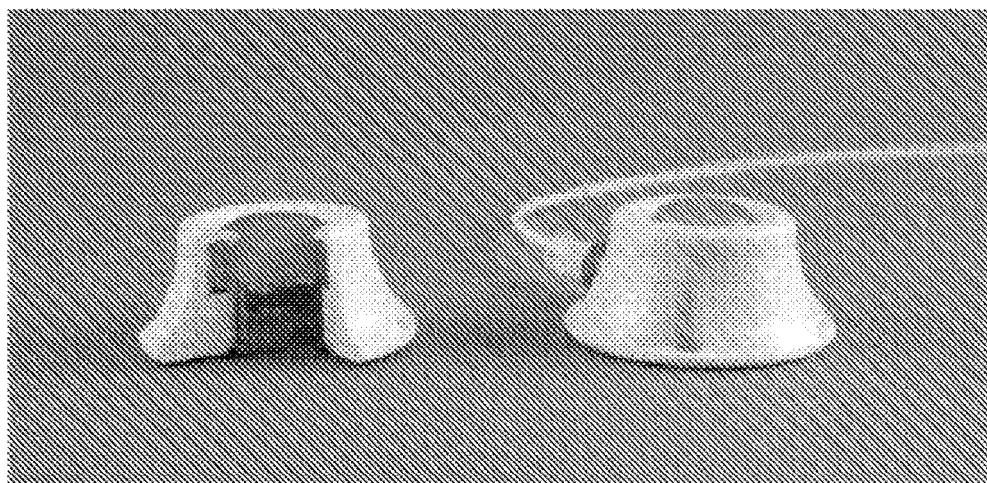


Figura 96



Figura 97

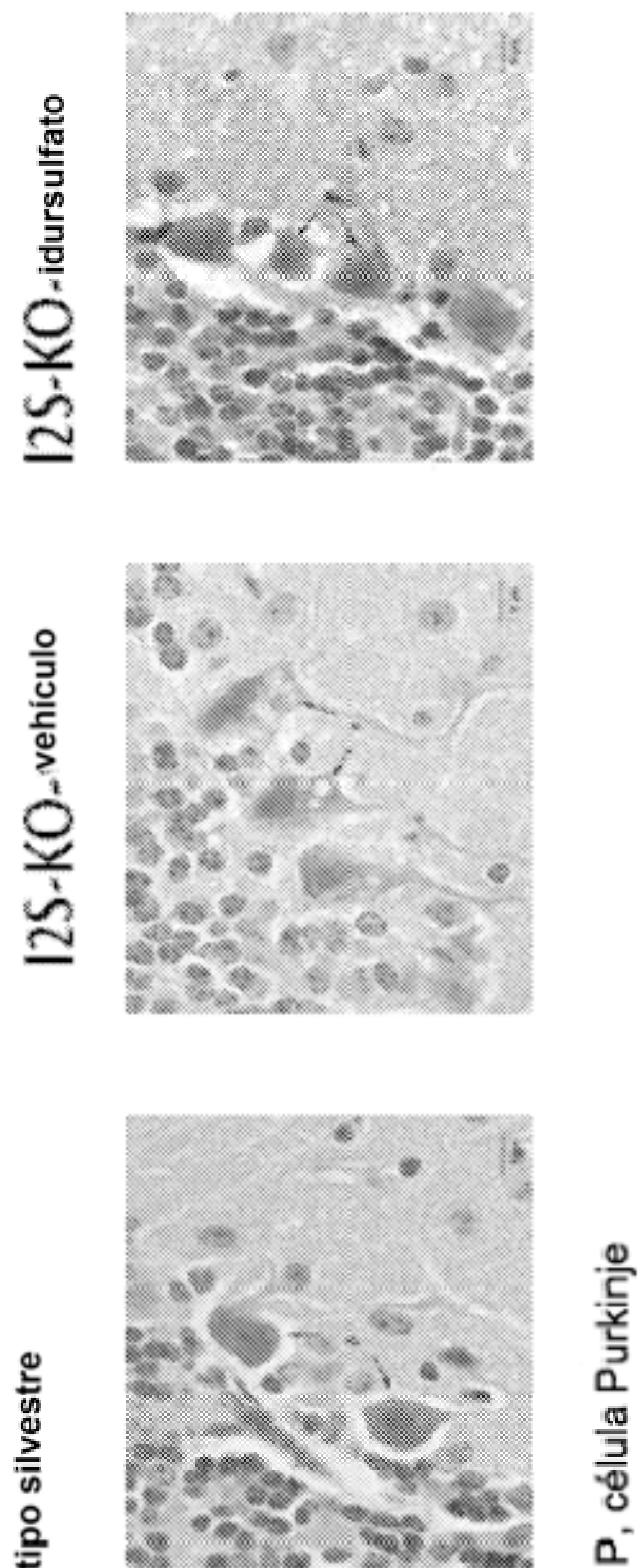


Figura 98

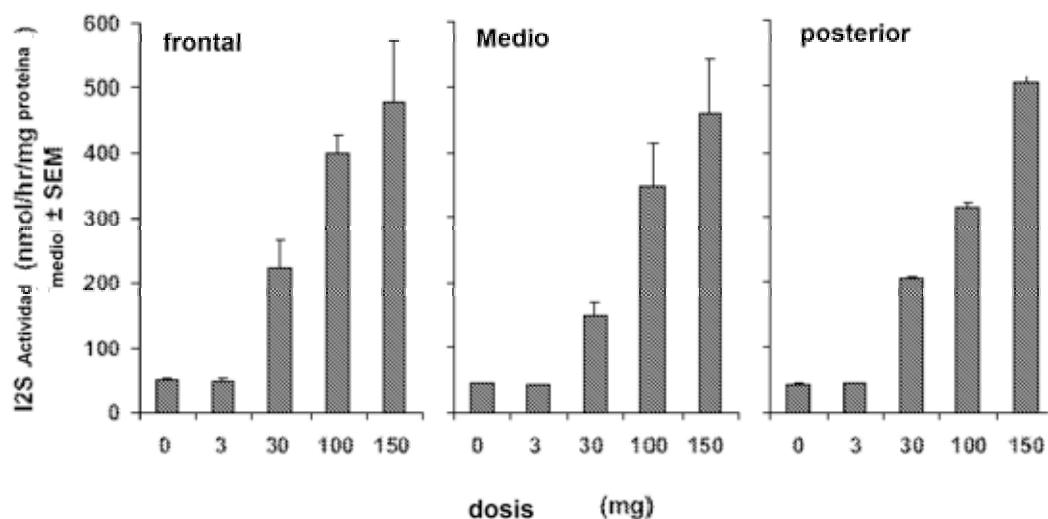
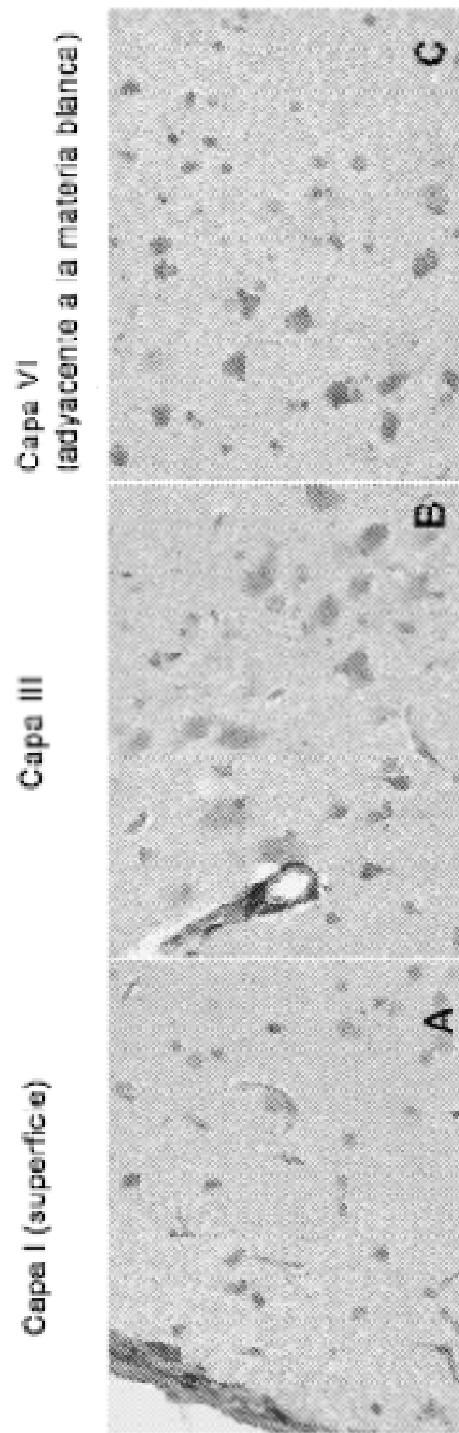


Figura 99



Neuronas positivas I2S, células gliales y células meníngeas se encontraron dentro de la capa I (Panel A), capa III (Panel B), y la capa VI (Panel C) del cerebro. Este cerebro estaba en el grupo de dosis de 30 mg. (40X amplificación)

30 mg de grupo de dosis. Amplificación original = 40X.

Figura 100

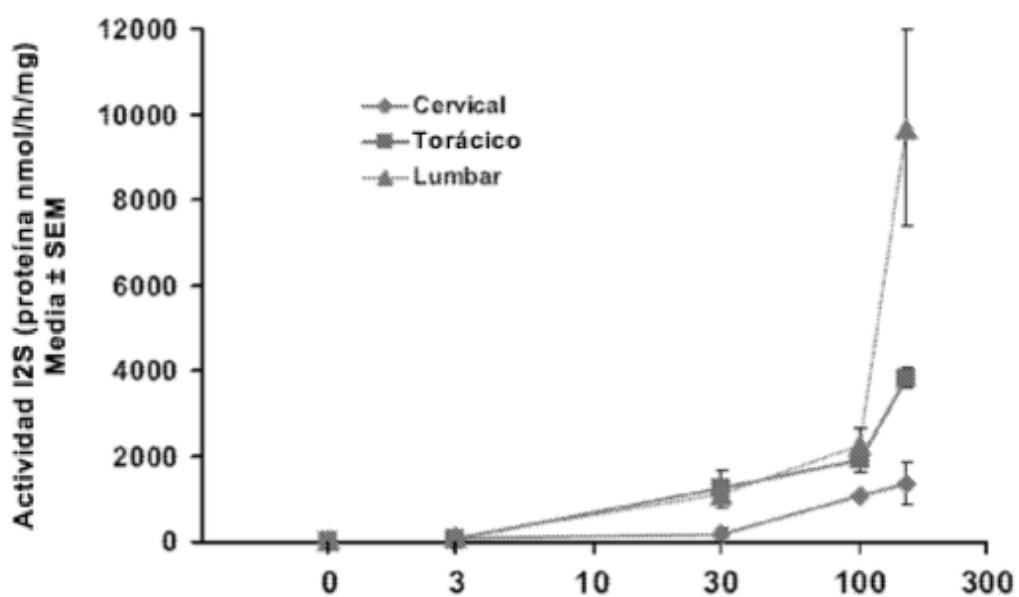


Figura 101

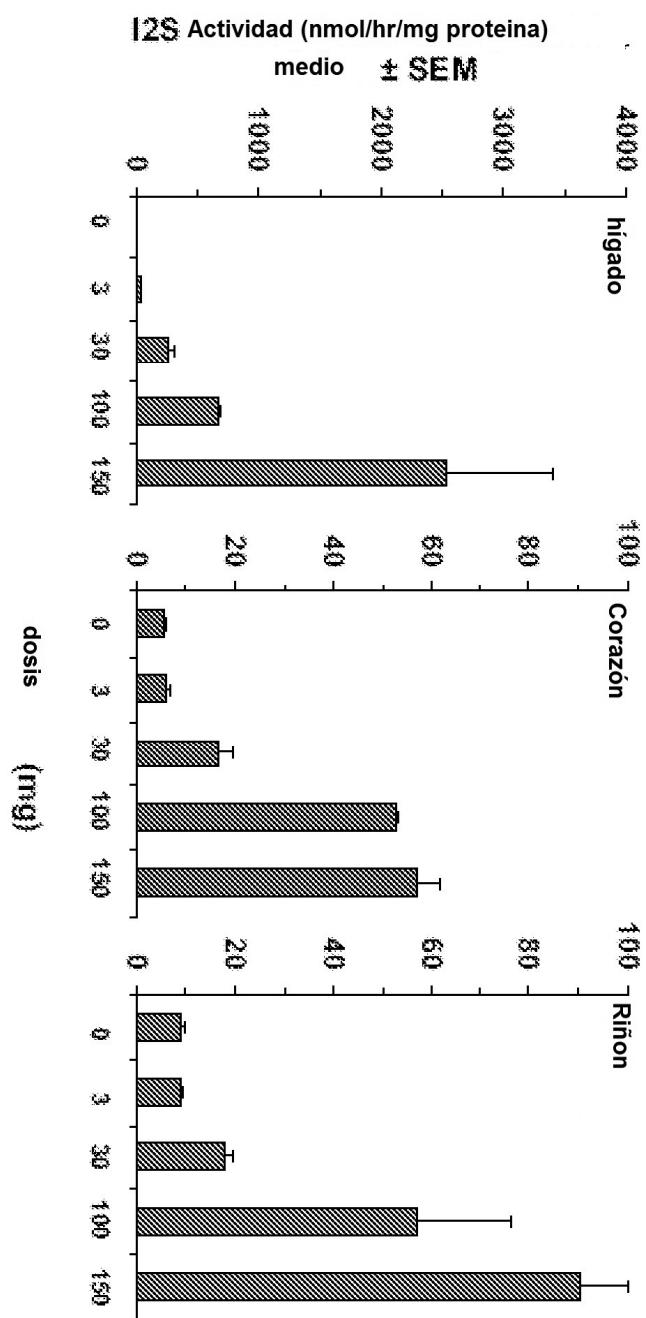


Figura 102

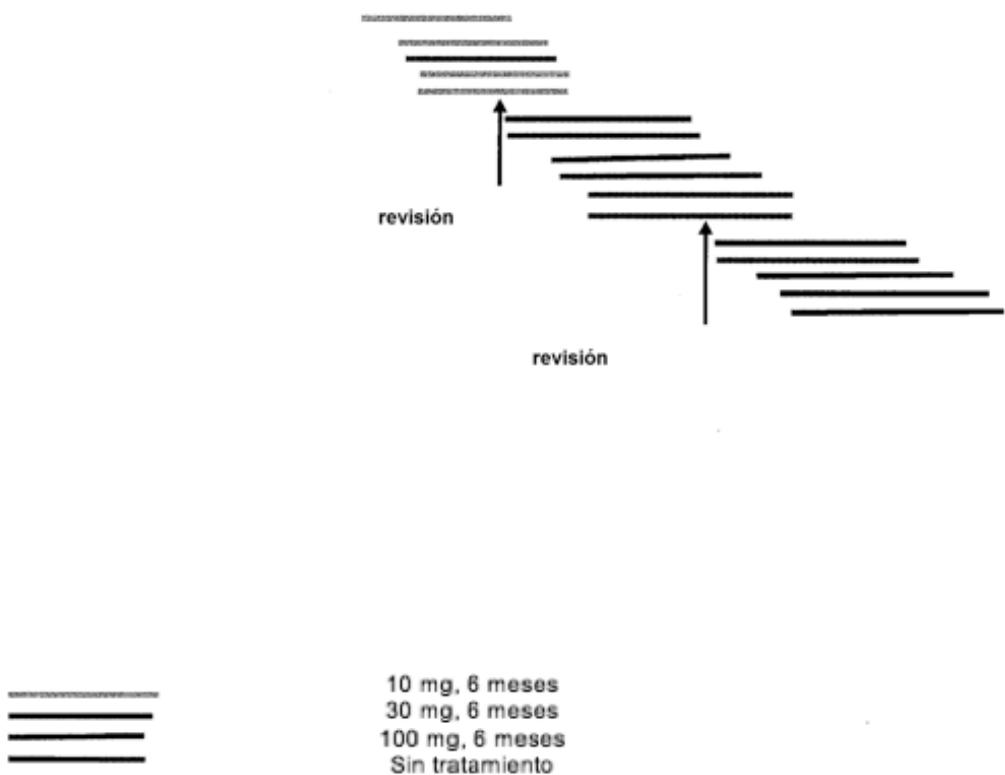


Figura 103

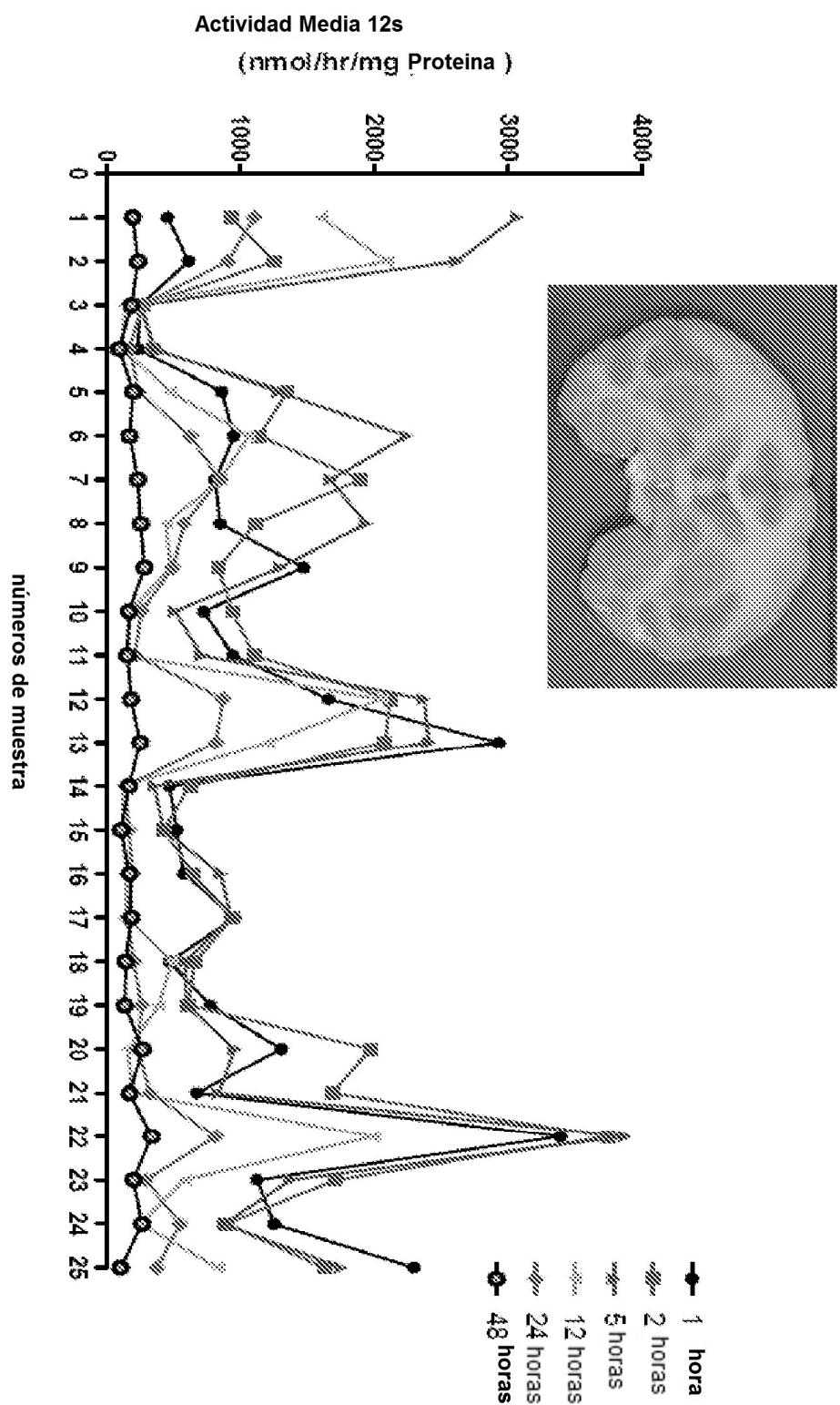


figura 104

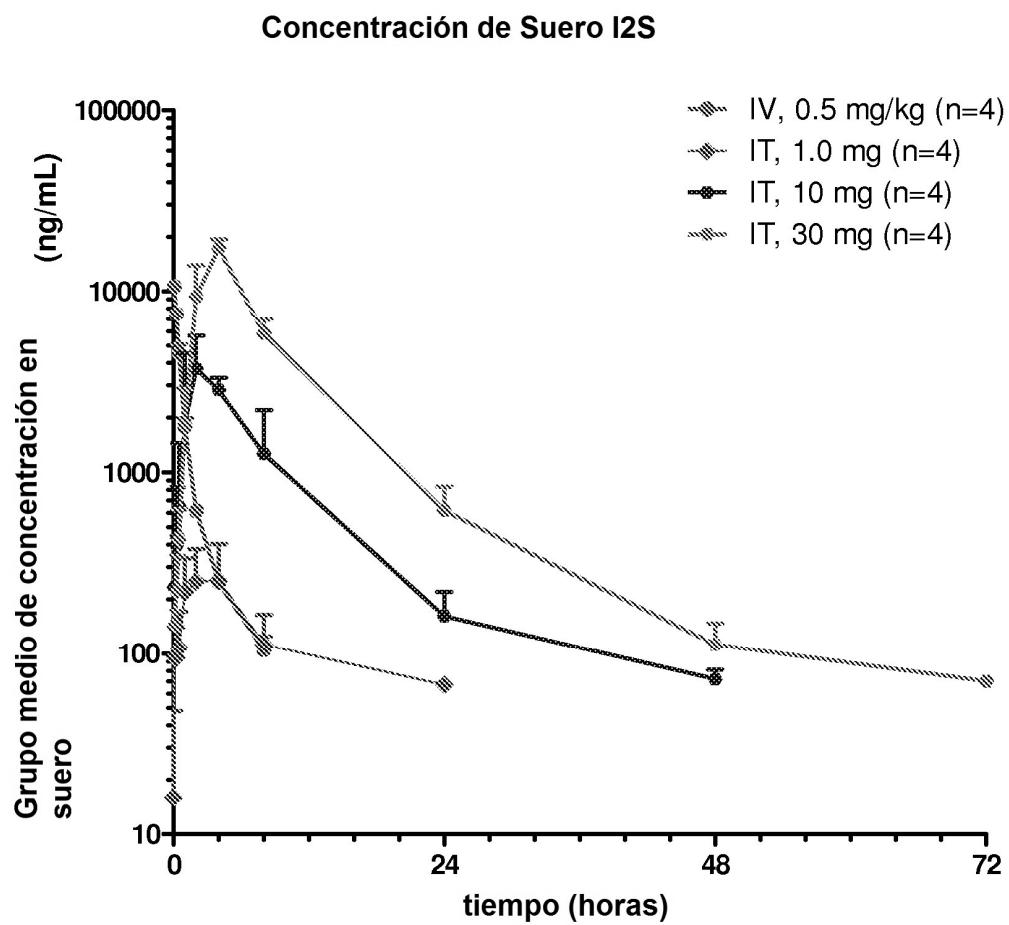


figura 105

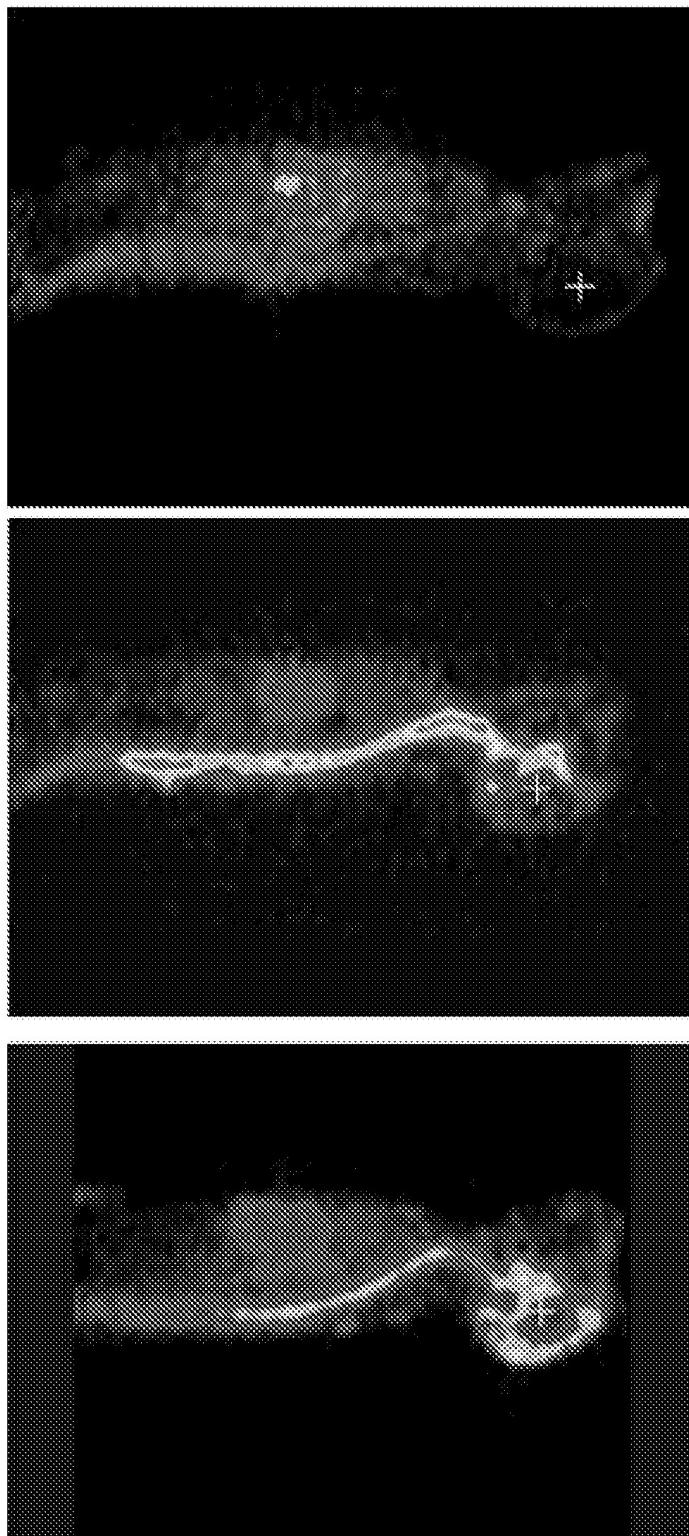


Figura 106

Dibujos ASA/MLD

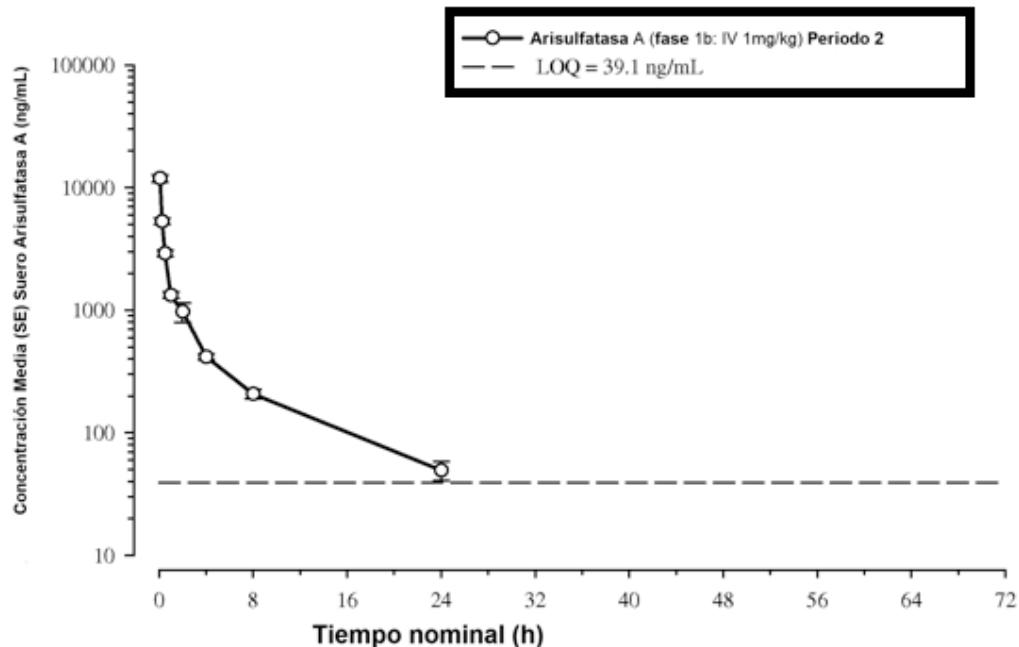
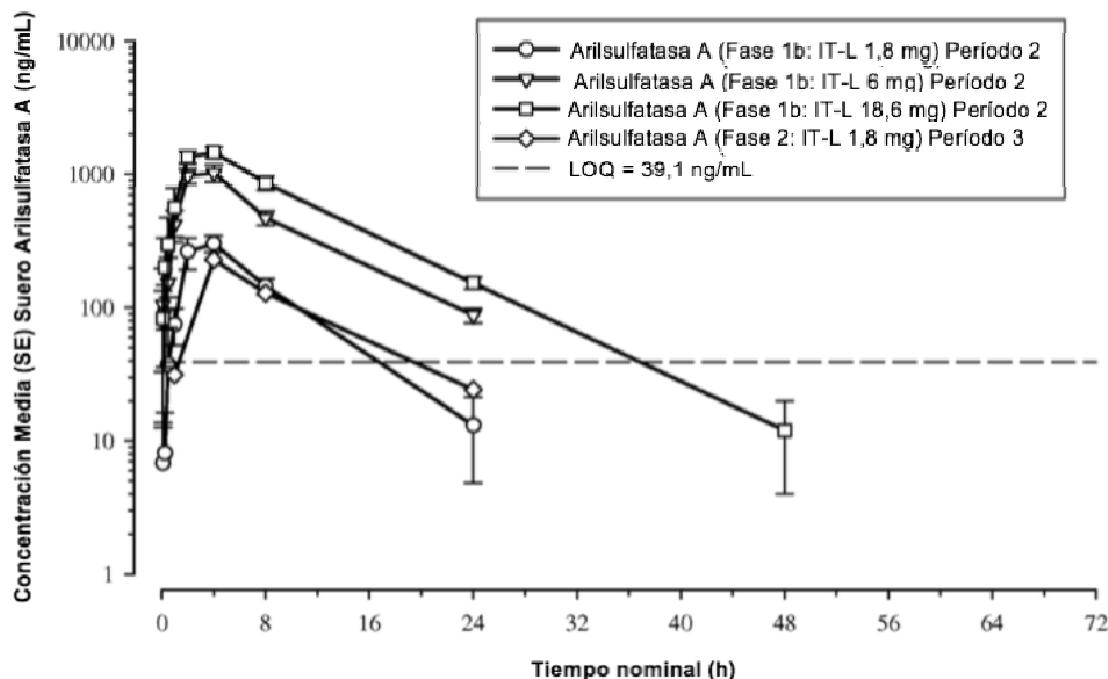


Figura 107



Regla de tamaño de muestra pequeño aplicada a cálculo de variable de resumen

Figura 108

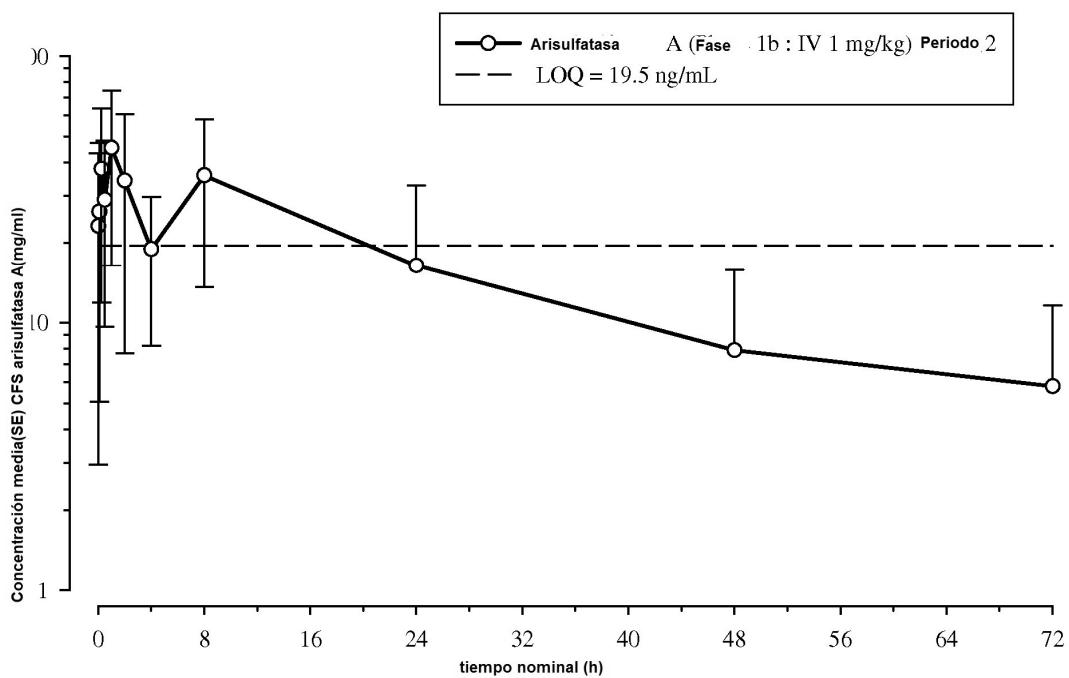


Figura 109

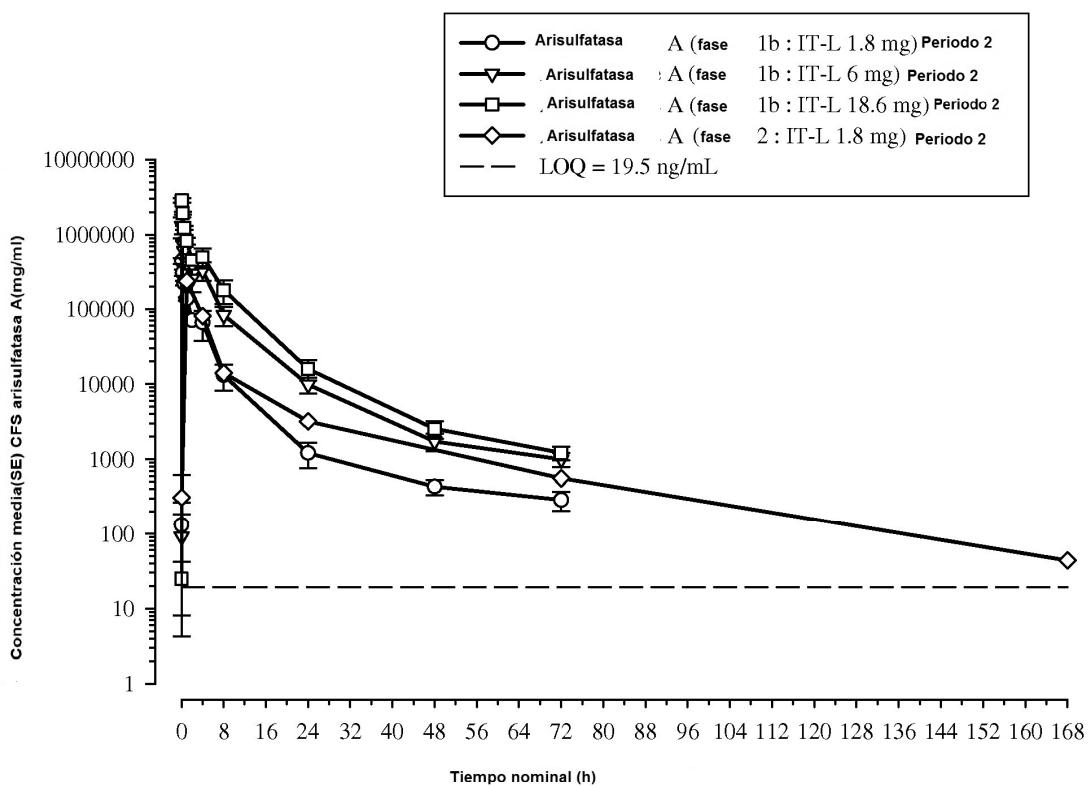


Figura 110



Figura 111

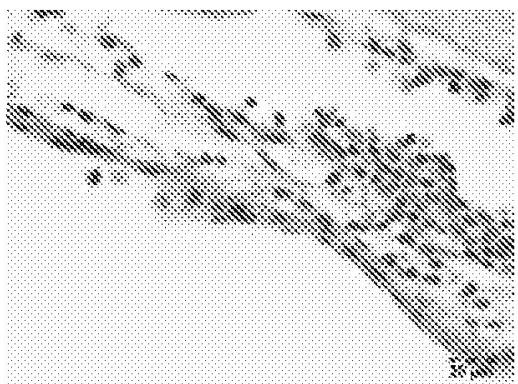


Figura 112

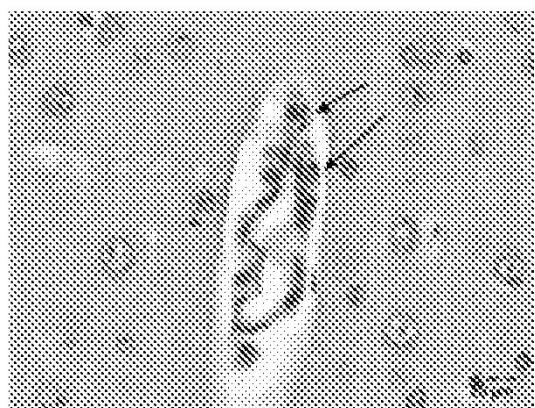
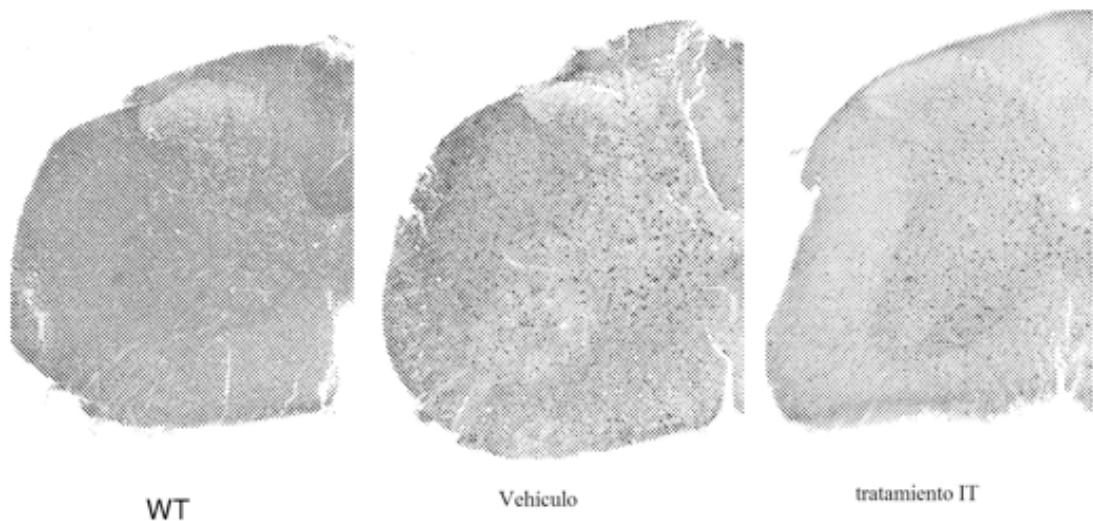
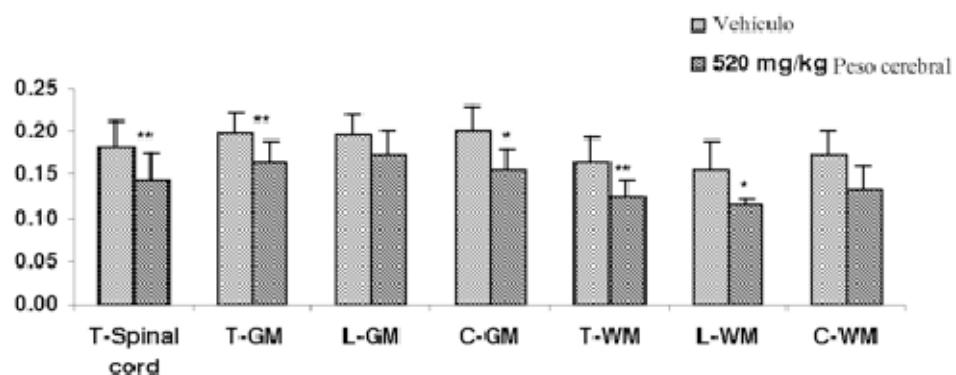


Figura 113



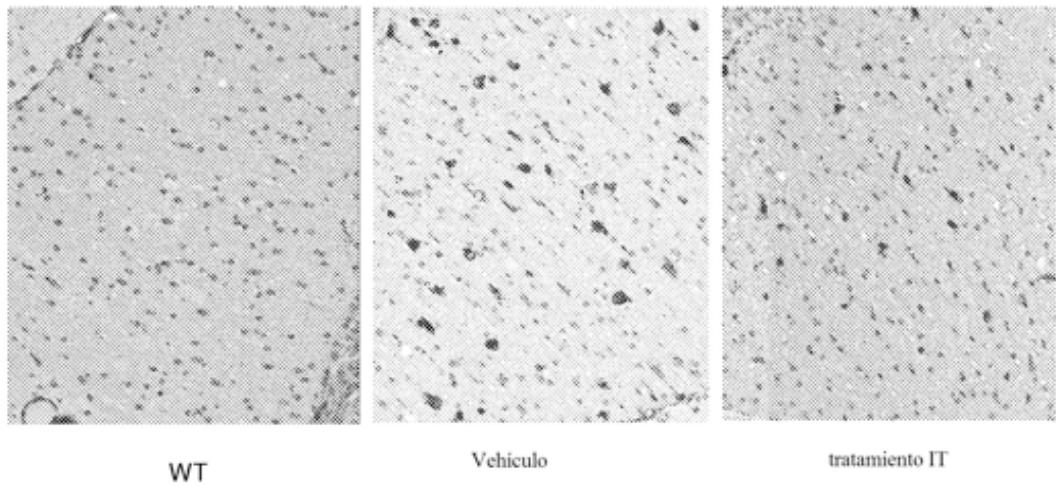
WT= tipo silvestre; ratones tratados IT recibieron 4 dosis semanales de 520 mg/kg de peso cerebral de rhASA (0,21 mg), 4X amplificación

Figura 114



** P<0.001; * P<0.05; T-Médula espinal = total médula espinal ; T-GM = total materia gris ; L-GM = Materia gris lumbar ; C-GM = Materia Gris cervical ; T-WM = total materia blanca ; L-WM = materia blanca lumbar ; C-WM = Materia Blanca cervical

Figura 115



WT= tipo silvestre; ratones tratados IT recibieron 4 dosis semanales de 520 mg/kg de HGT-1110 (0,21 mg), 20X amplificación

Figura 116

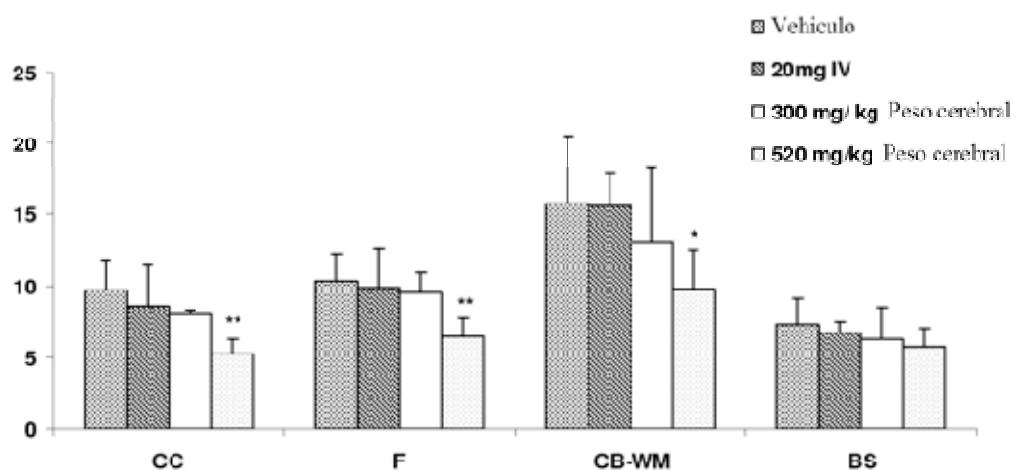


Figura 117

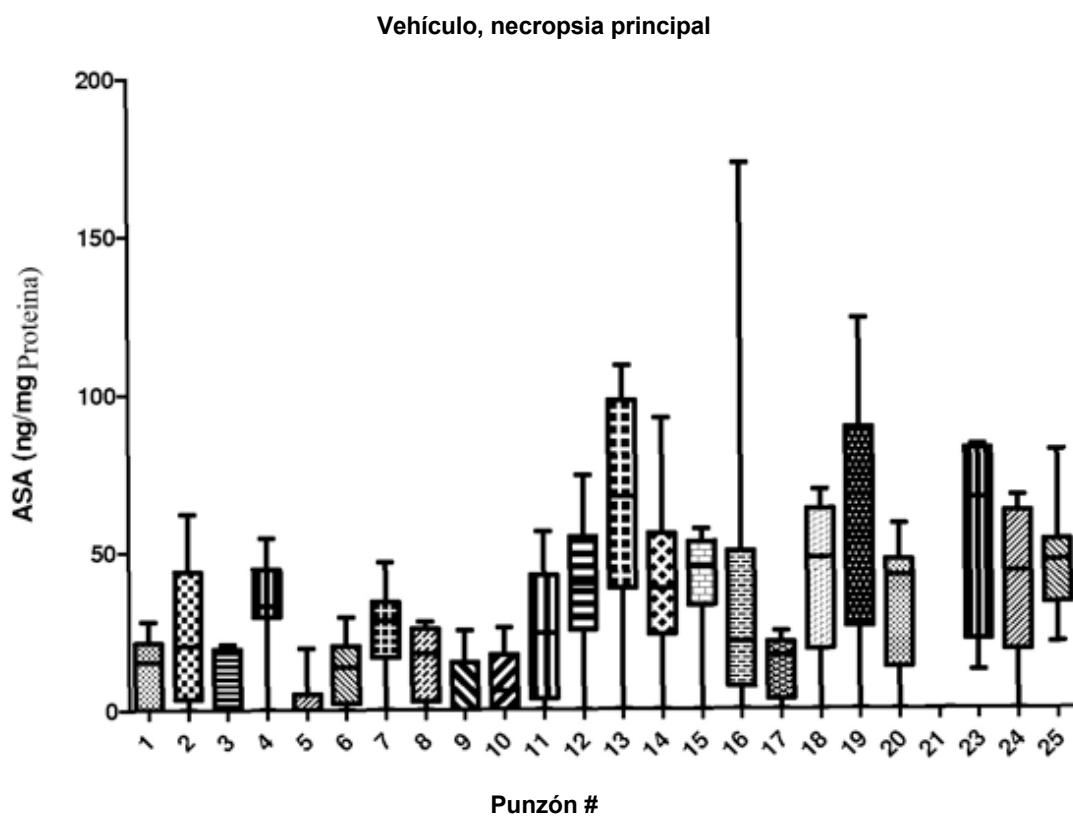


Figura 118

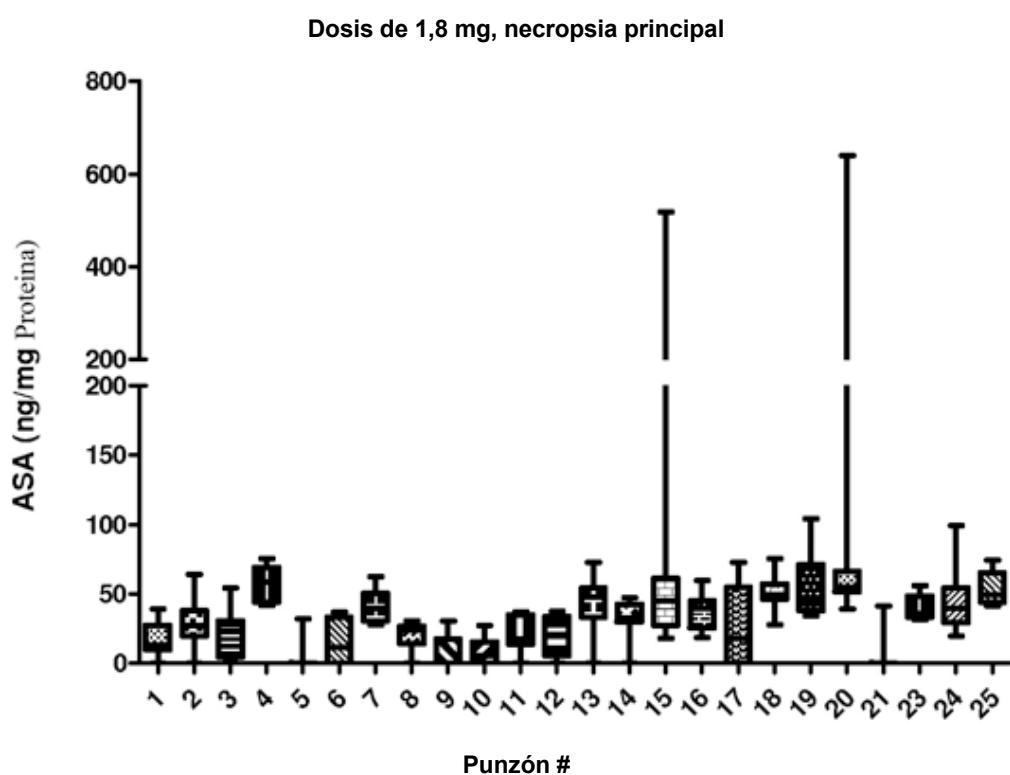


Figura 119

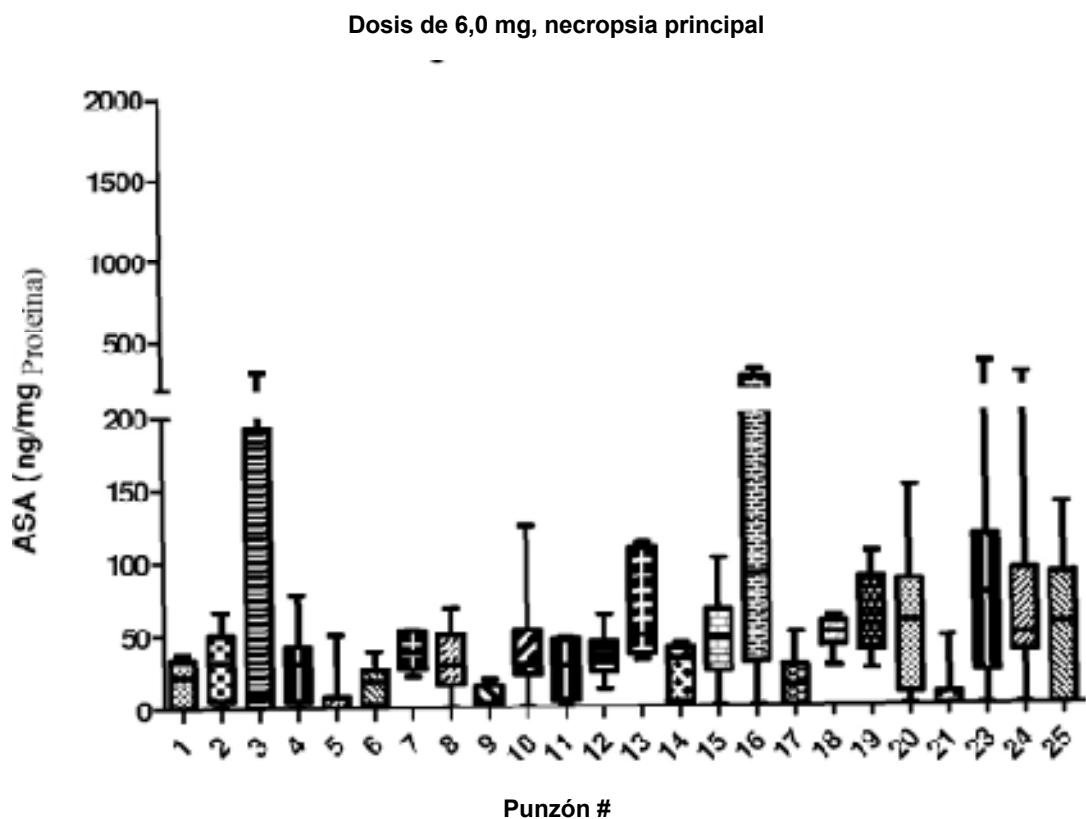


Figura 120

Dosis de 18,6 mg, necropsia principal

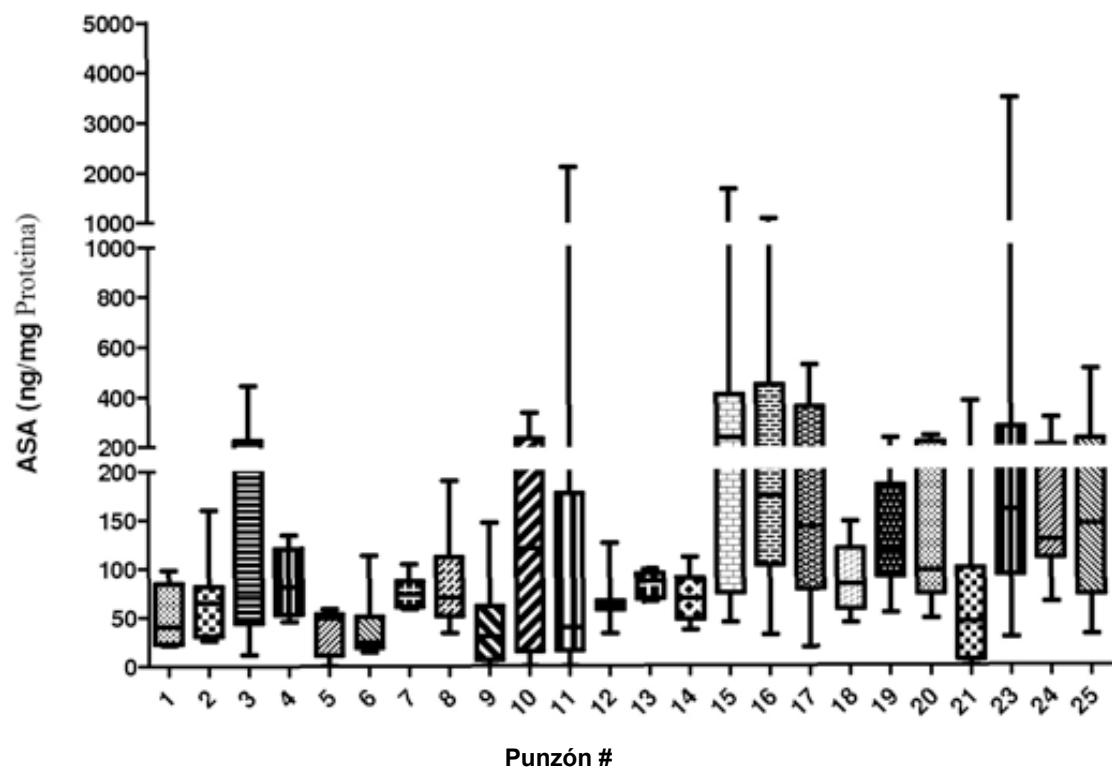


Figura 121

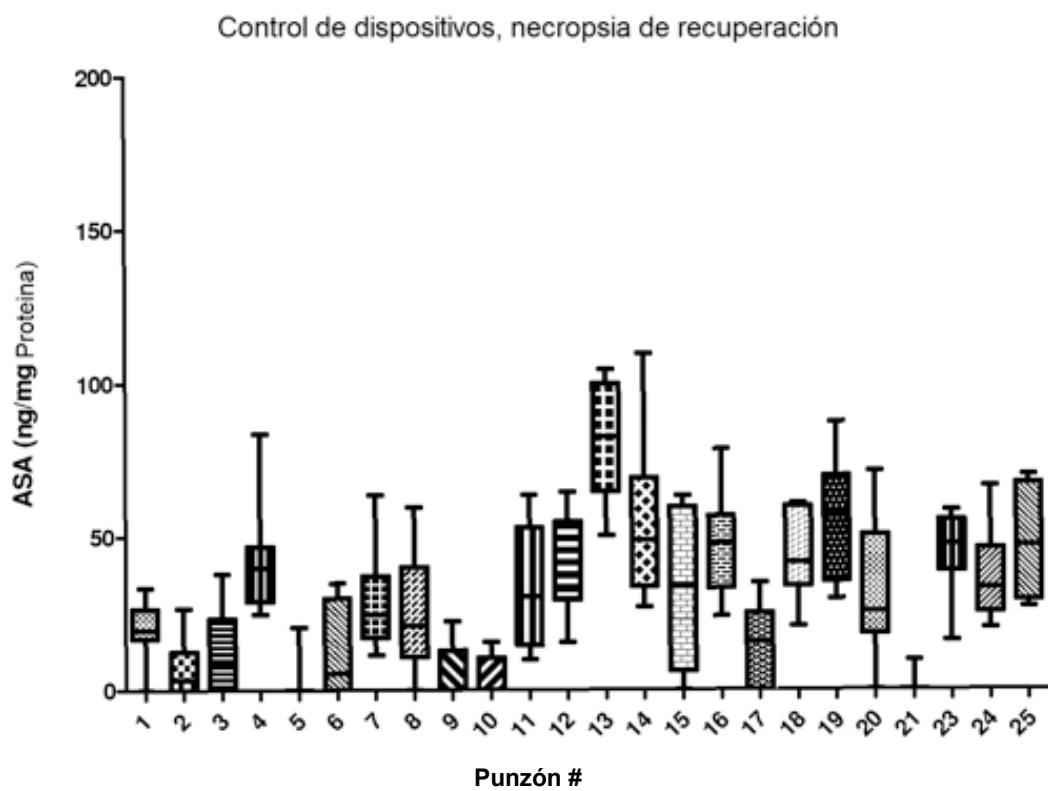


Figura 122

Vehículo, Necropsia de reversión

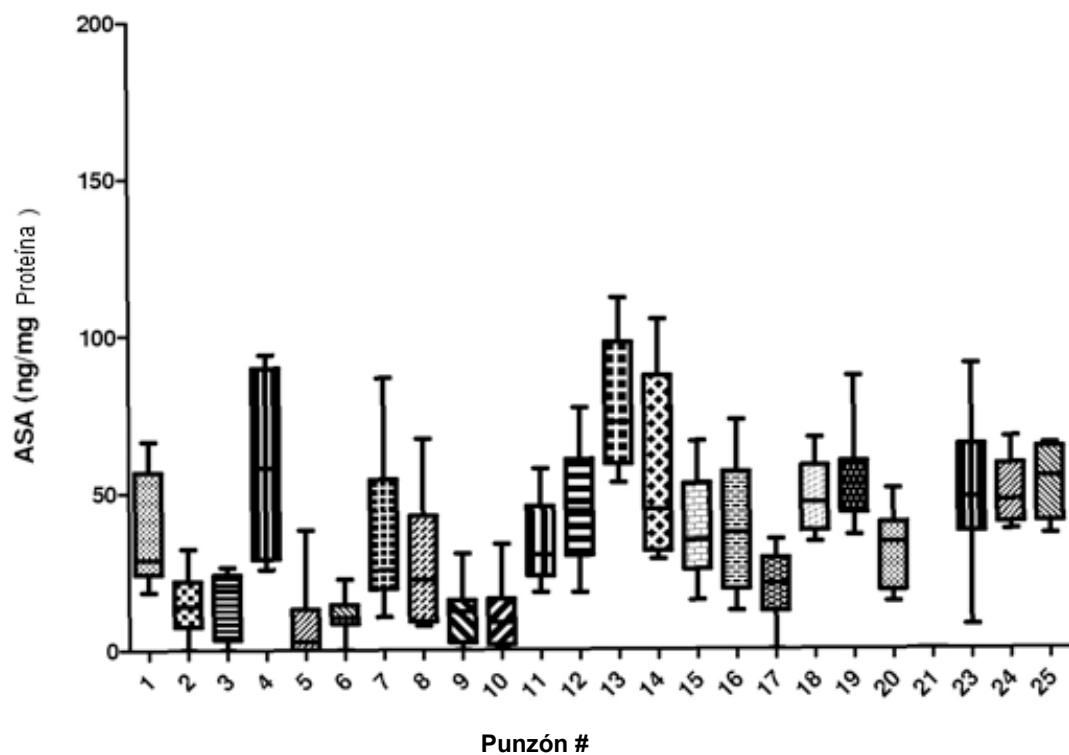


Figura 123

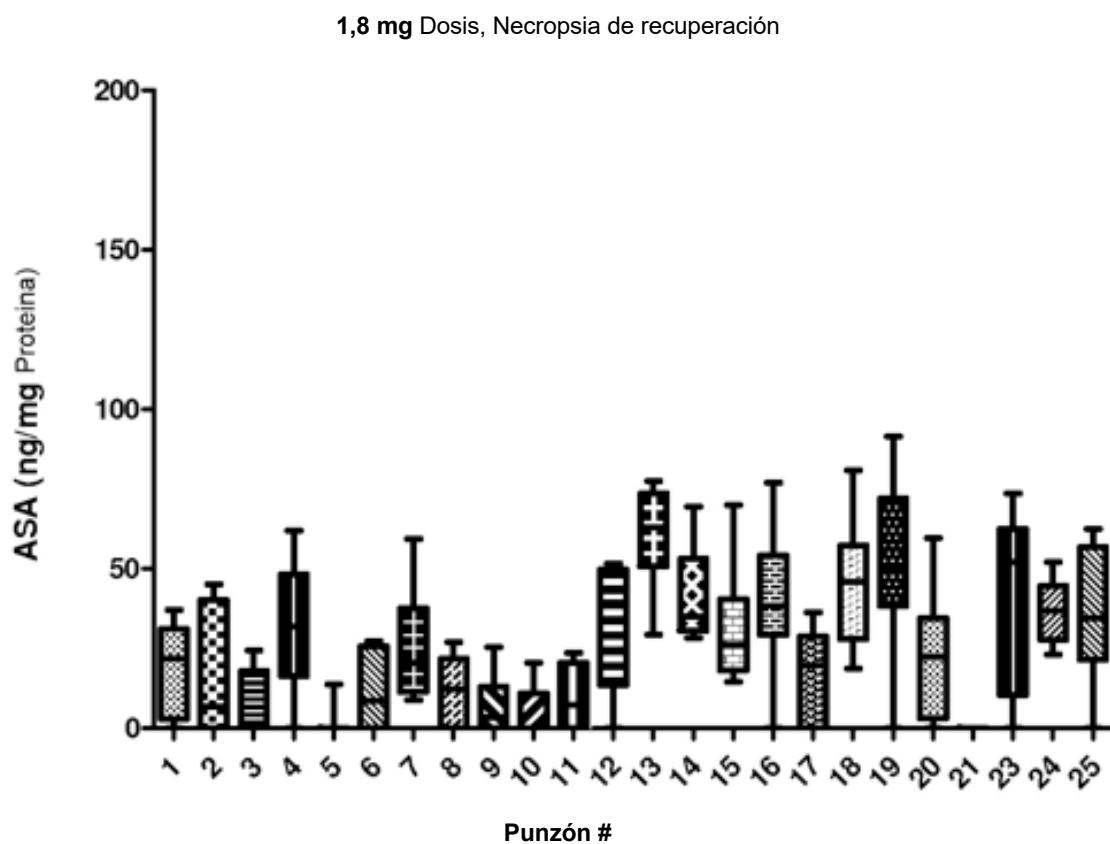


Figura 124

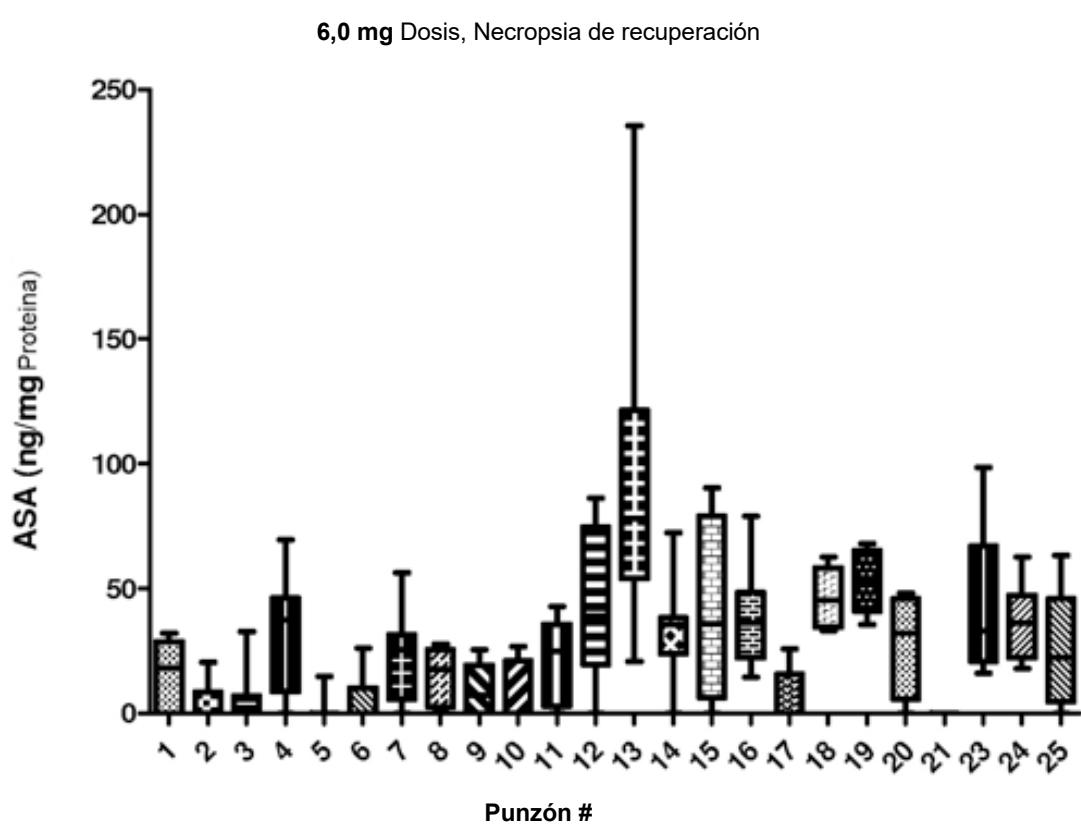


Figura 125

18,6 mg Dosis, Necropsia de recuperación

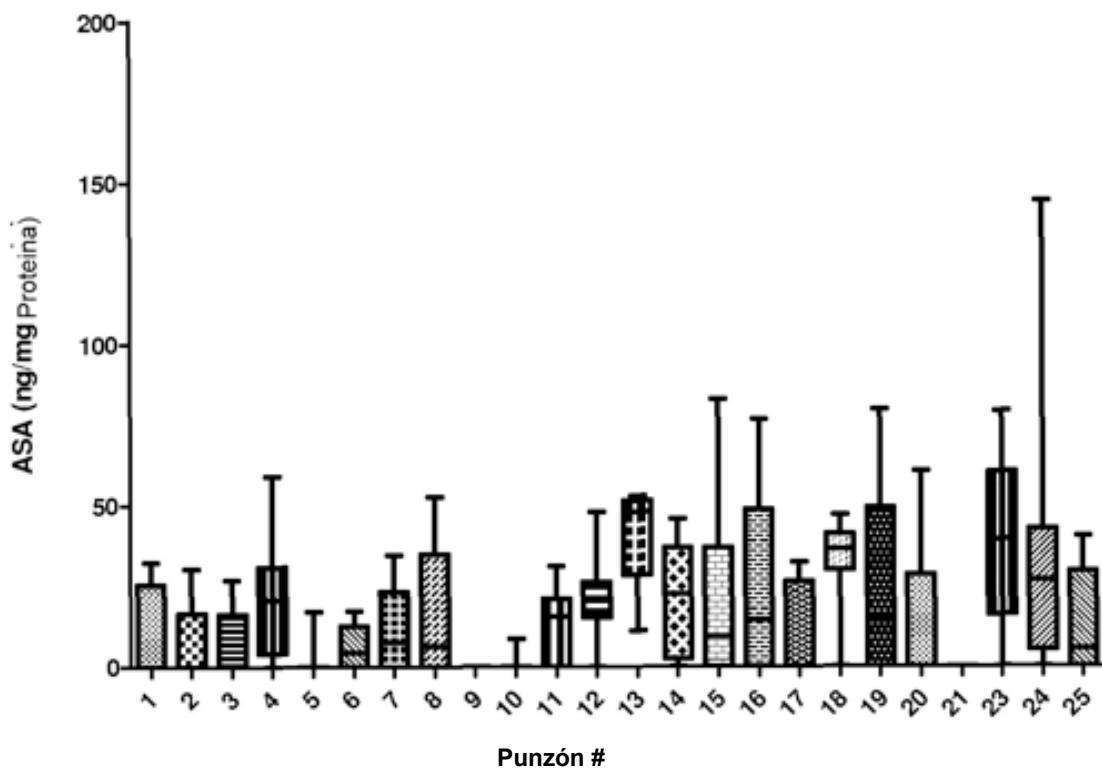


Figura 126

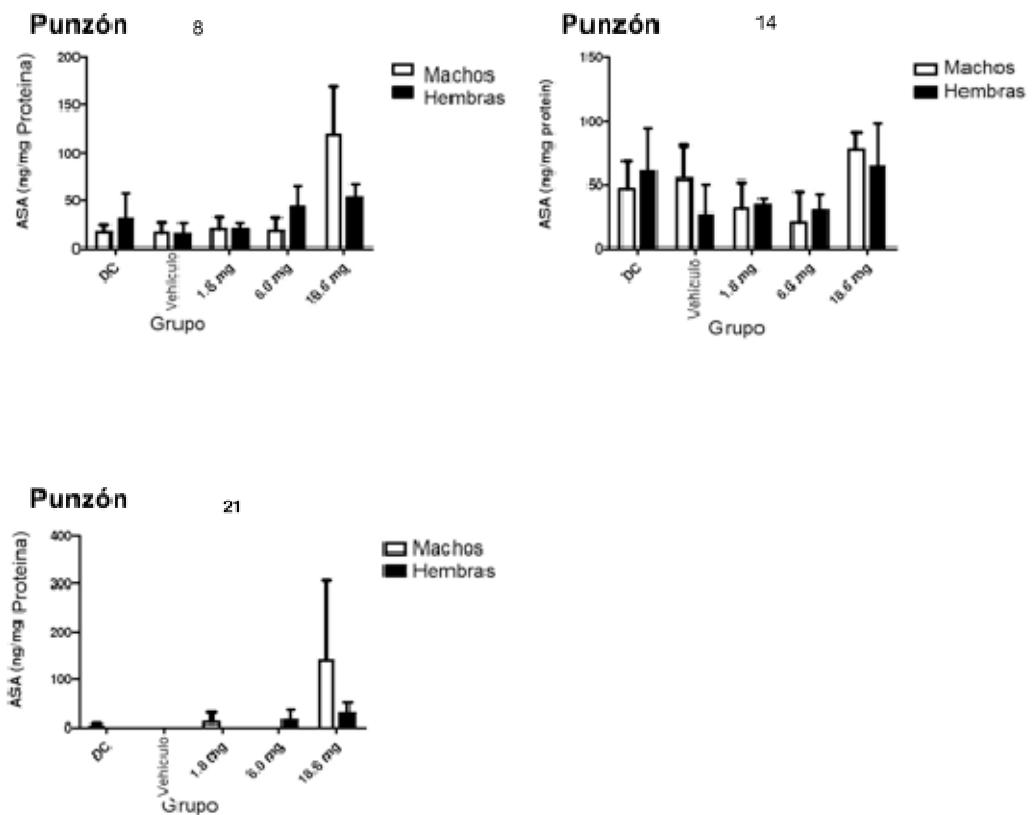


Figura 127

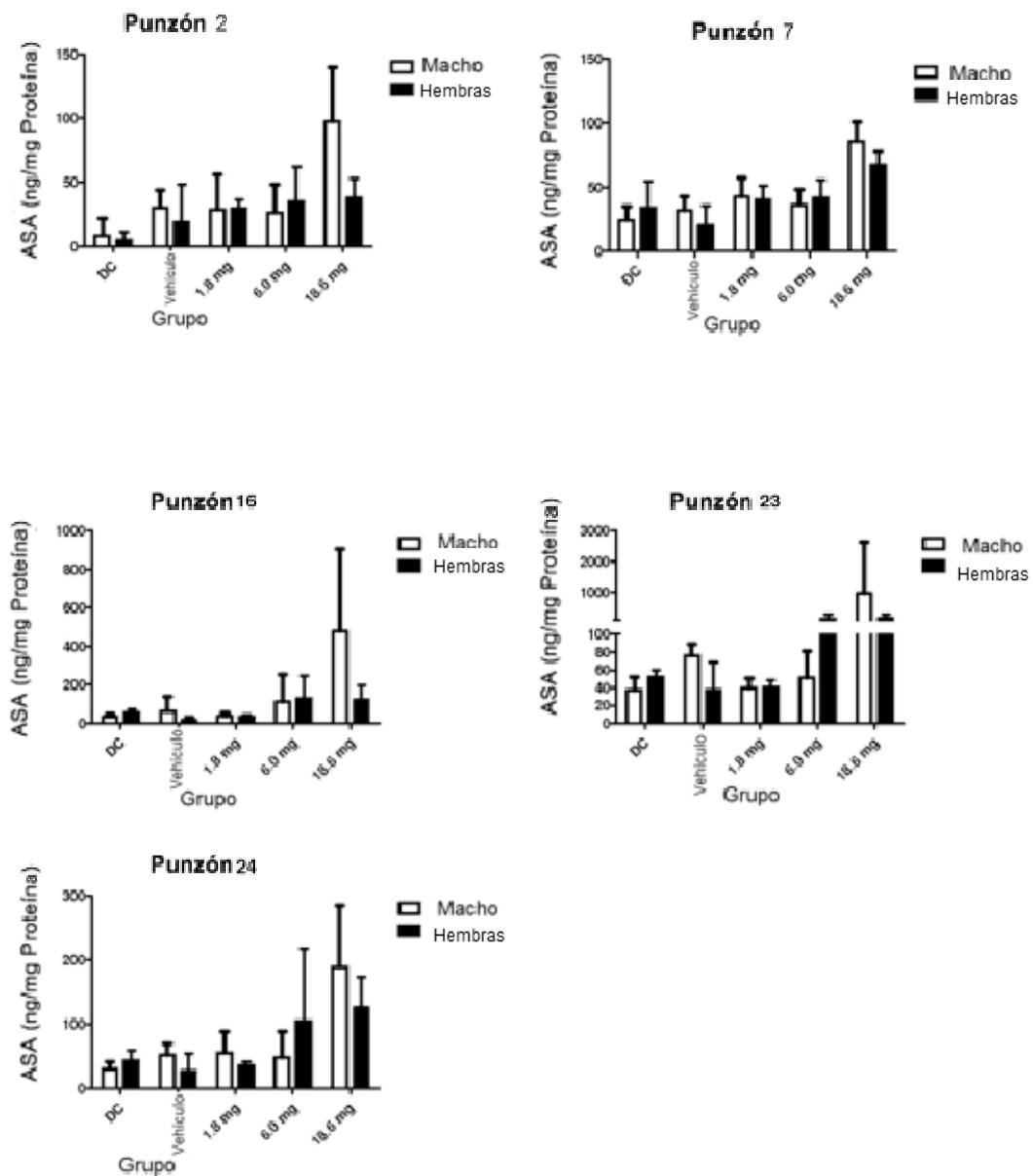


Figura 128

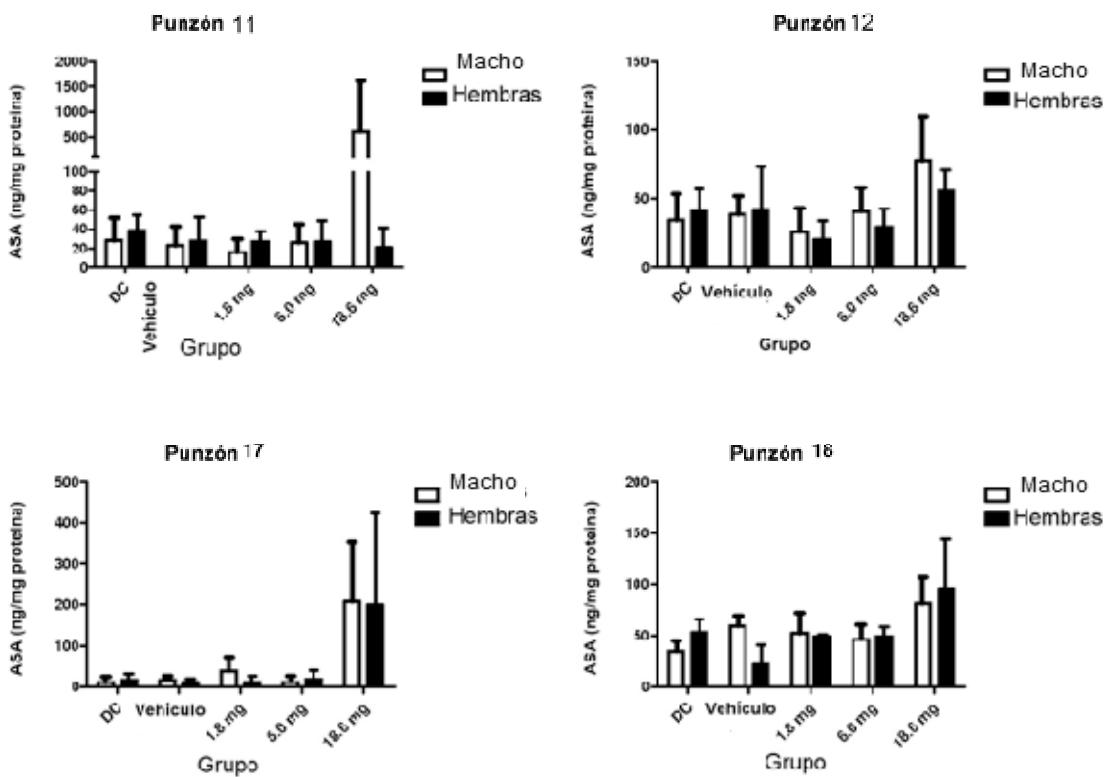


Figura 129

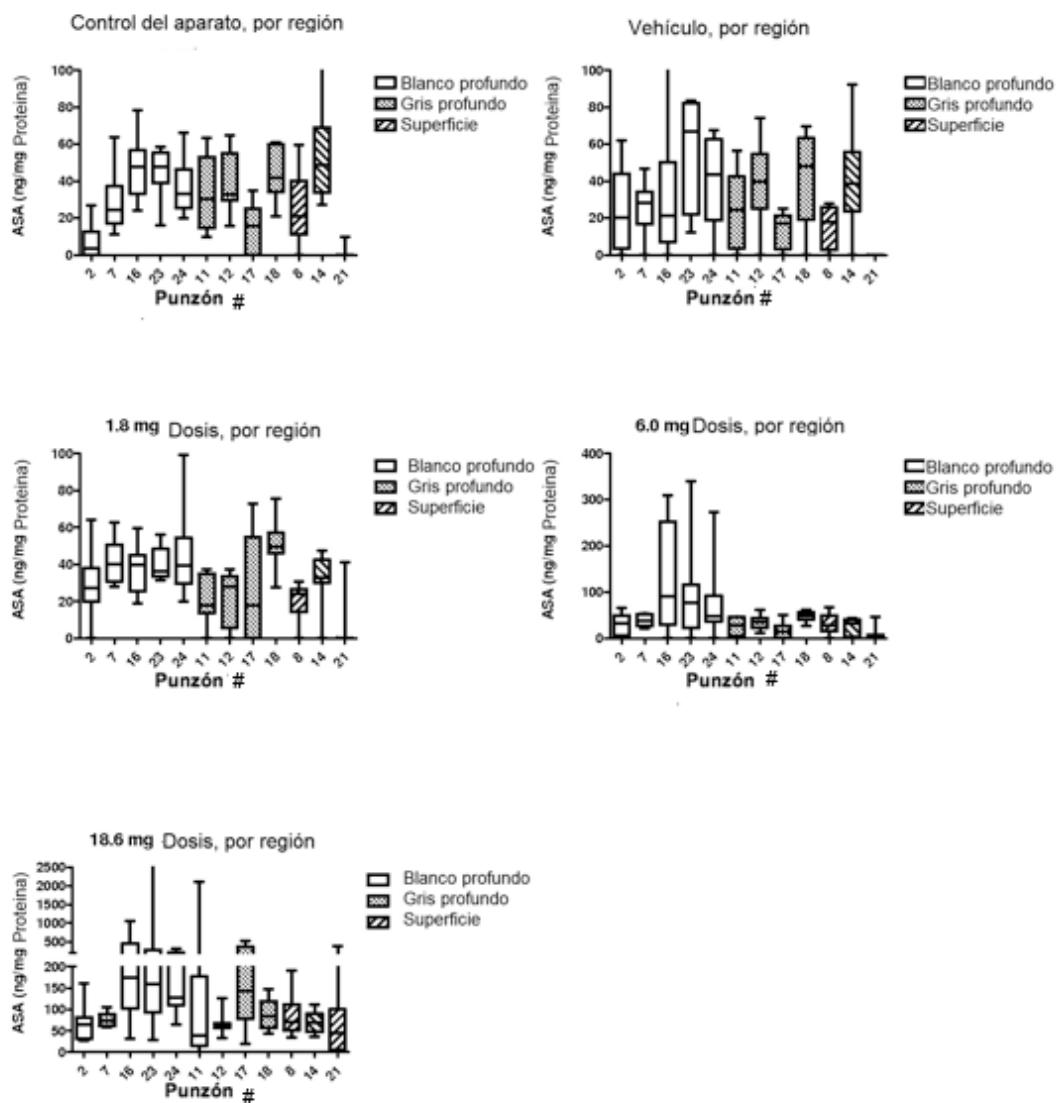


Figura 130

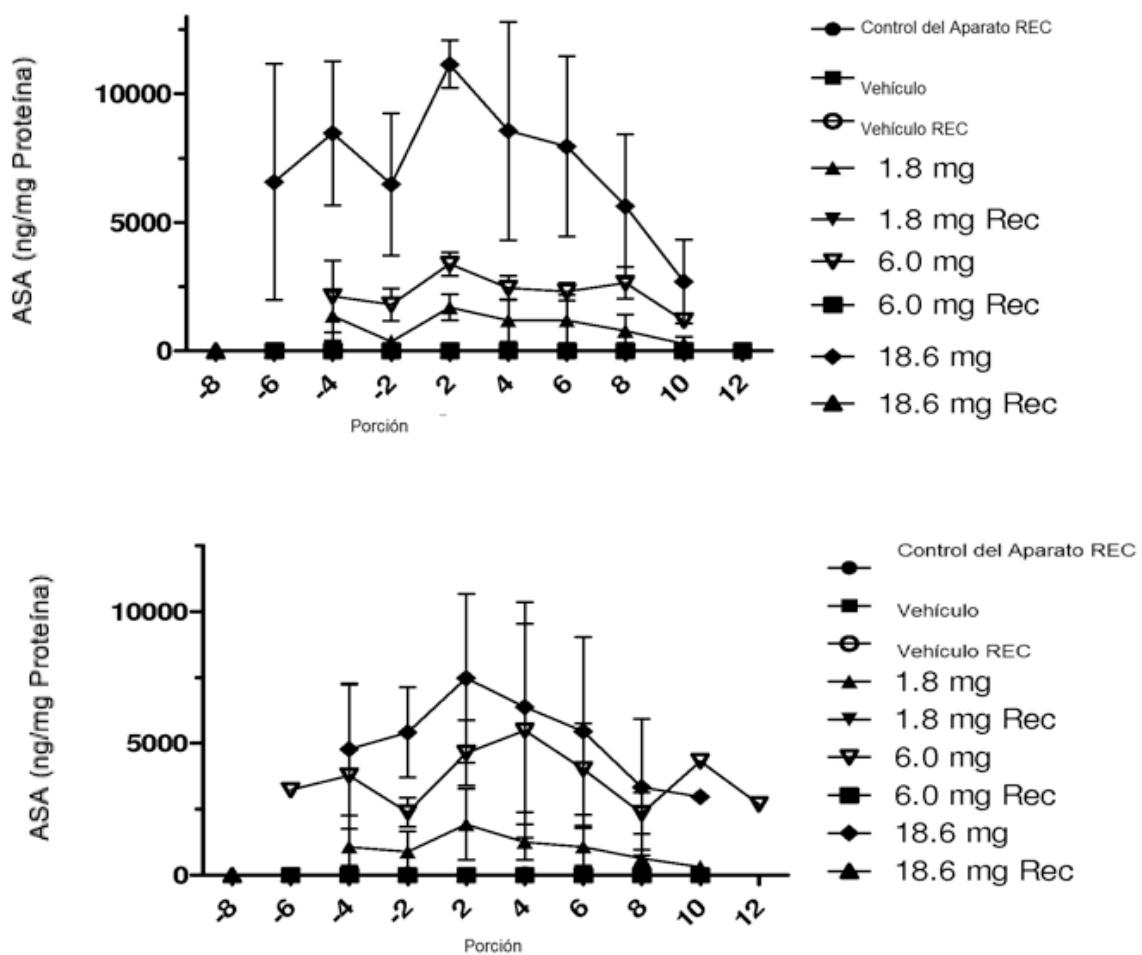


Figura 131

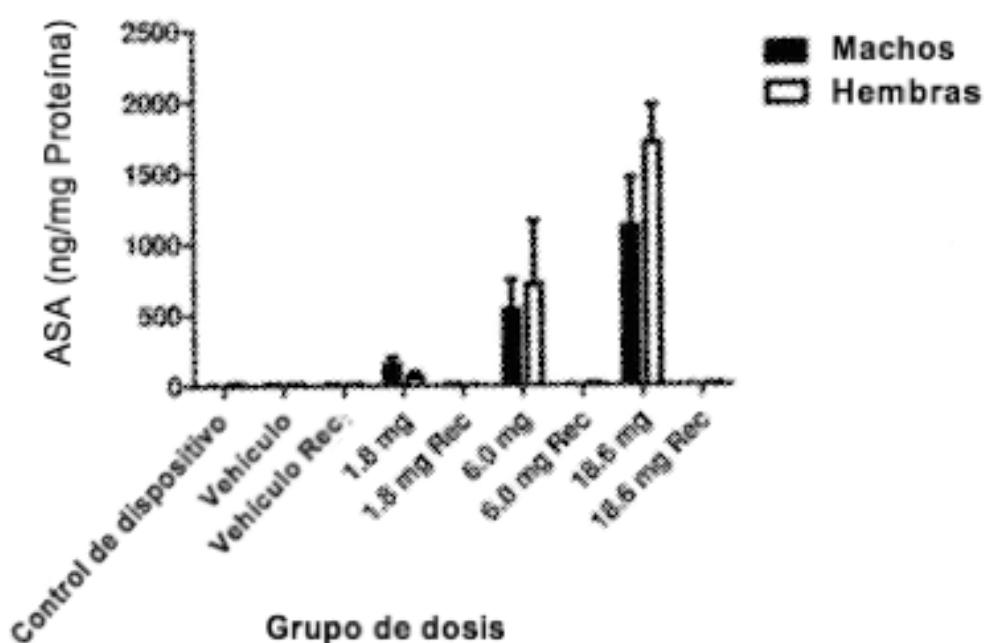
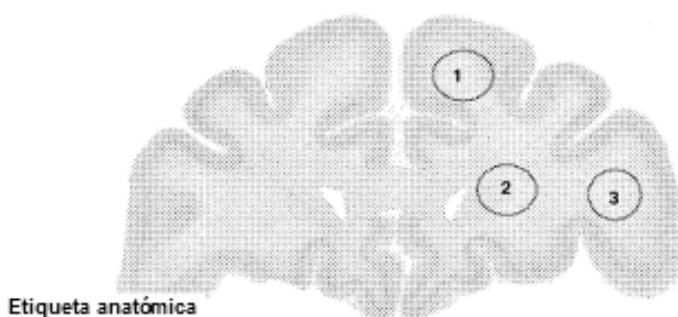


Figura 132

62-133

Porción 4

#458



Etiqueta anatómica

1. Subcortical WM
2. Periventricular WM y sustancia blanca profunda
3. Subcortical WM

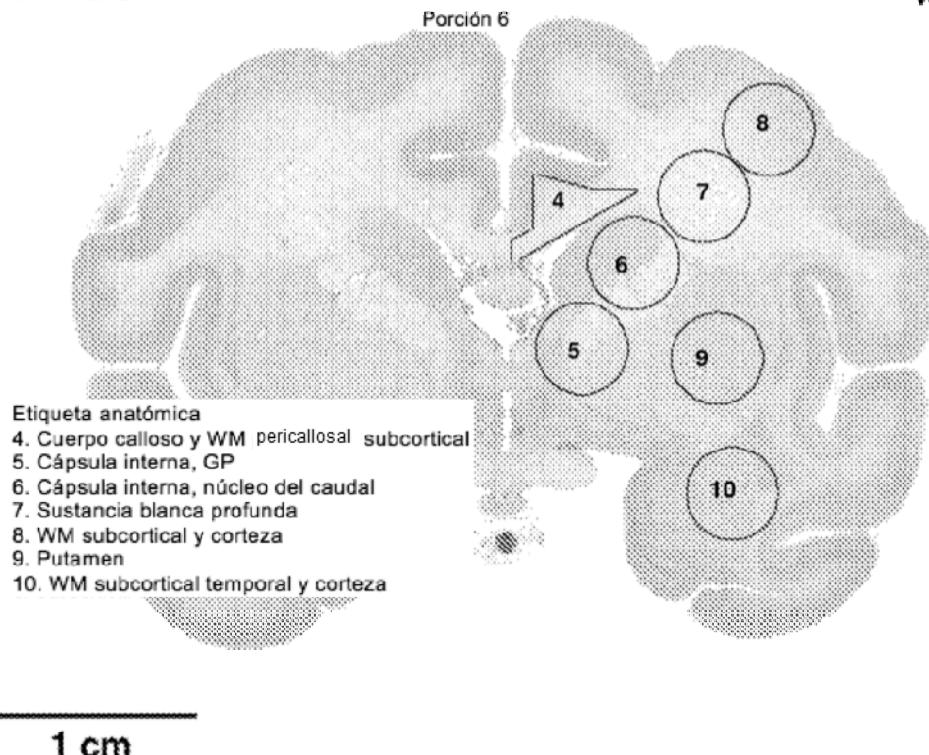
1 cm

Universidad de Wisconsin-Madison Colección de
Cerebros

Figura 133: Localización Anatómica de los pinchazos
de cerebro

62-133

#780



Universidad de Wisconsin-Madison Colección cerebral

Figura 134: Localización anatómica de punzones cerebrales

62-133

#962

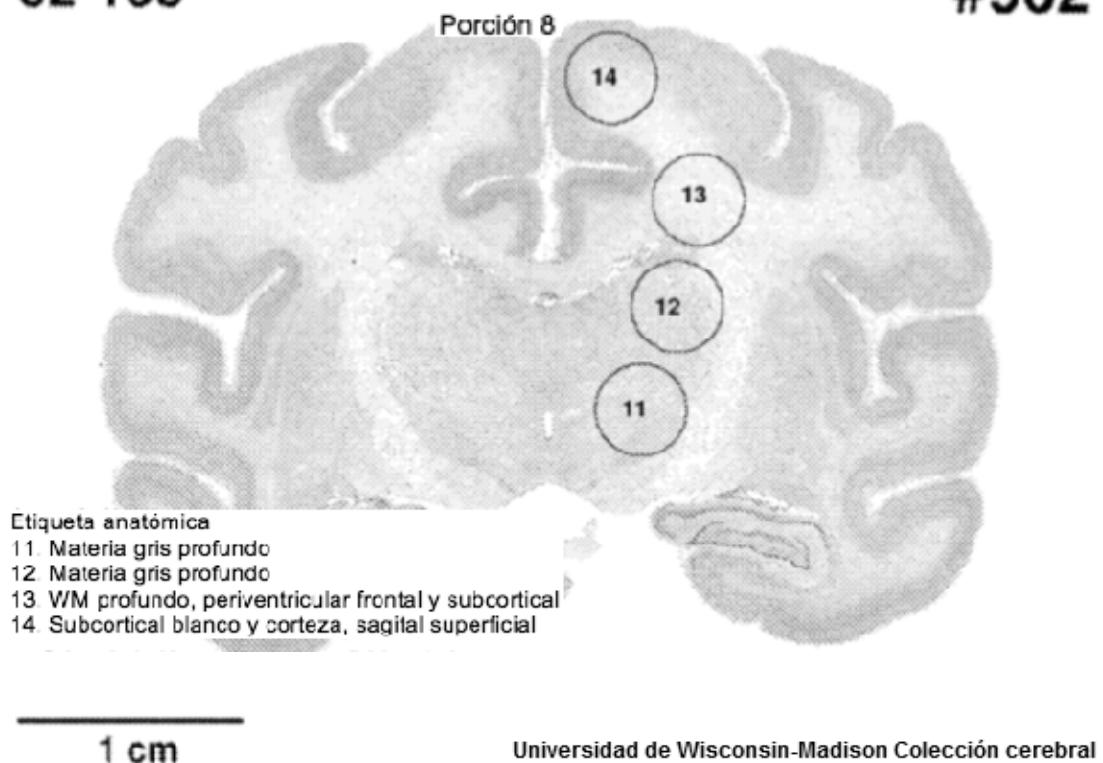
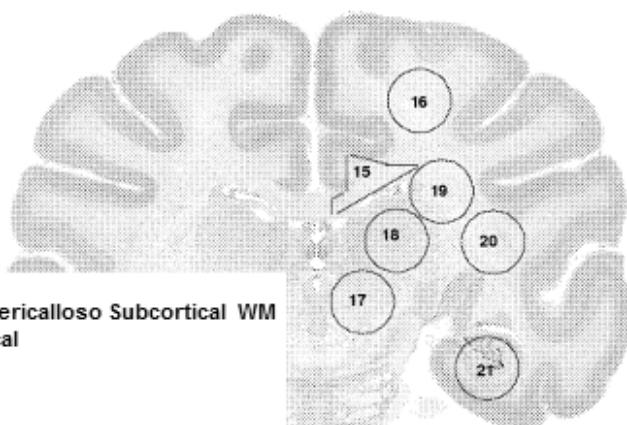


Figura 135: Localización anatómica de punzones cerebrales

62-133

Porción 10

#1102



Etiqueta anatómica

- Enqueta anatómica
 - 15.Cuerpo Calloso y Pericalloso Subcortical WM
 - 16.Profundo Subcortical
 - 17. Profundo Gris
 - 18. Profundo Gris
 - 19.Periventricular
 - 20. Subcortical WM
 - 21.Hipocampo

1 cm

Universidad de Wisconsin- Madison Colección cerebral

Figura 136

62-133

Porción 12

#1240

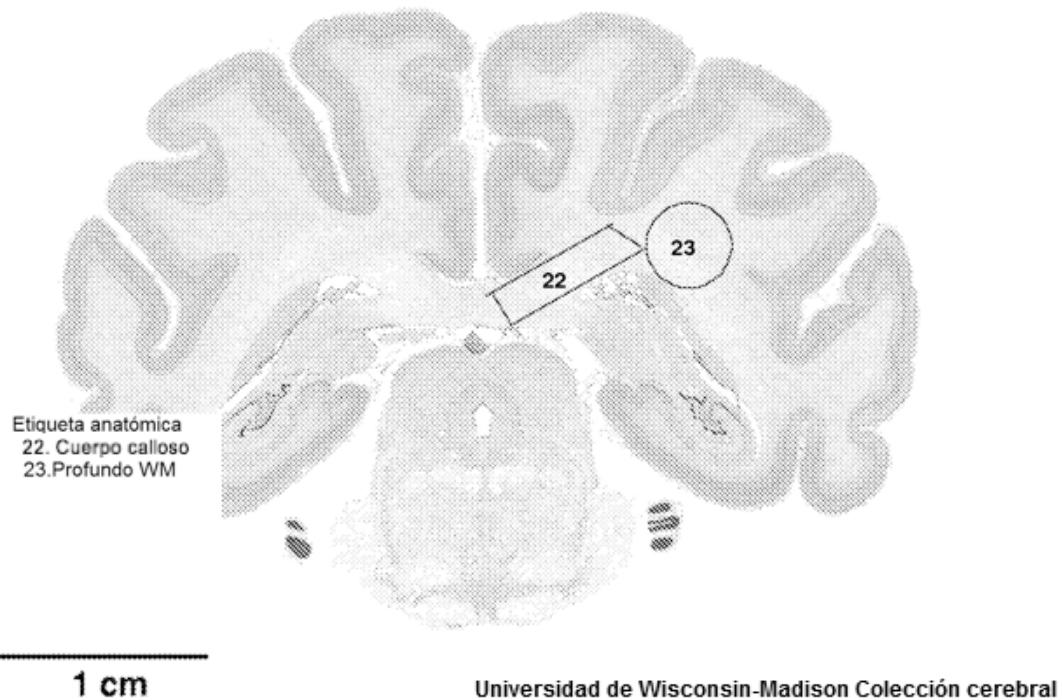


Figura 137

62-133

Porción 14

#1486

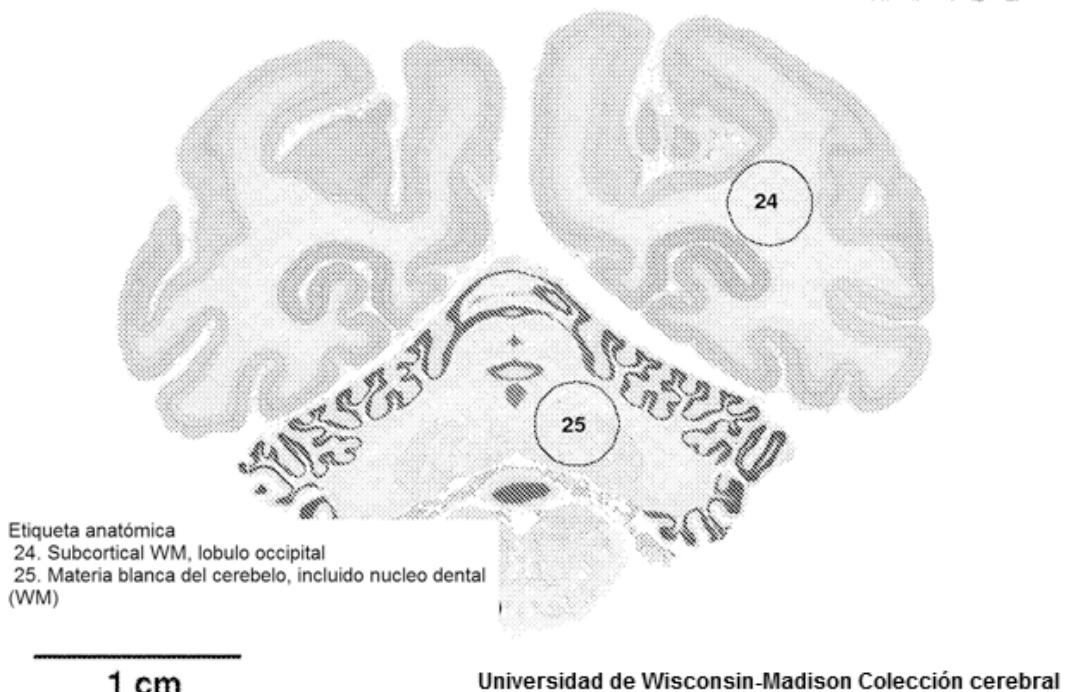


Figura 138

Punzón 4

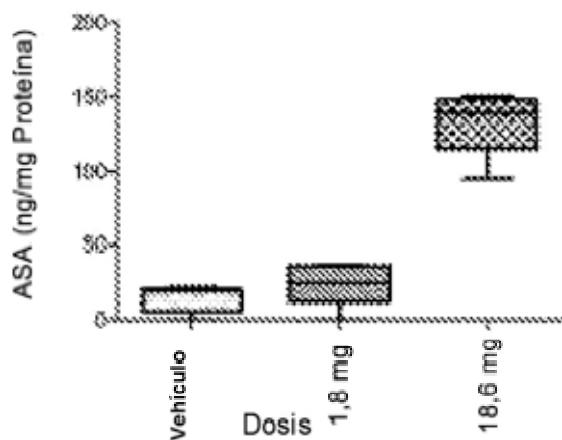


Figura 139A

Punzón 5

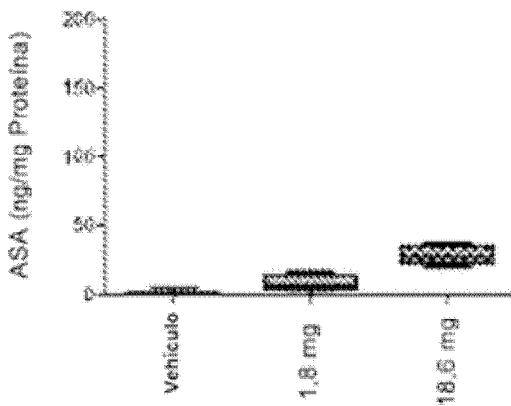


Figura 139 B

Punzón 6

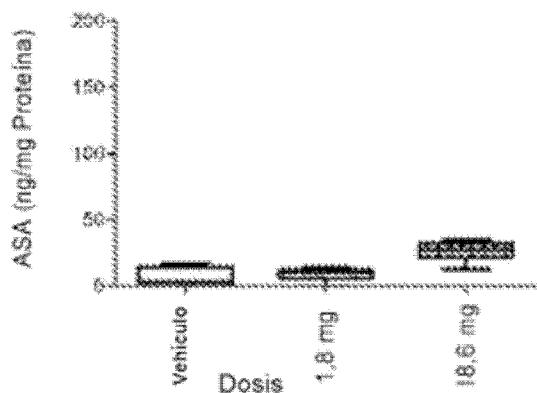


Figura 139 C

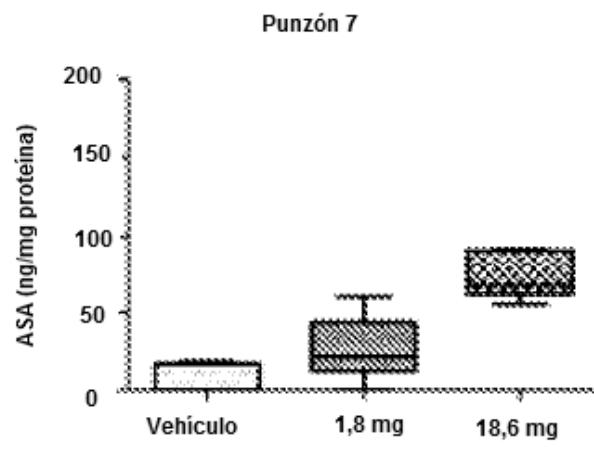


Figura 139D

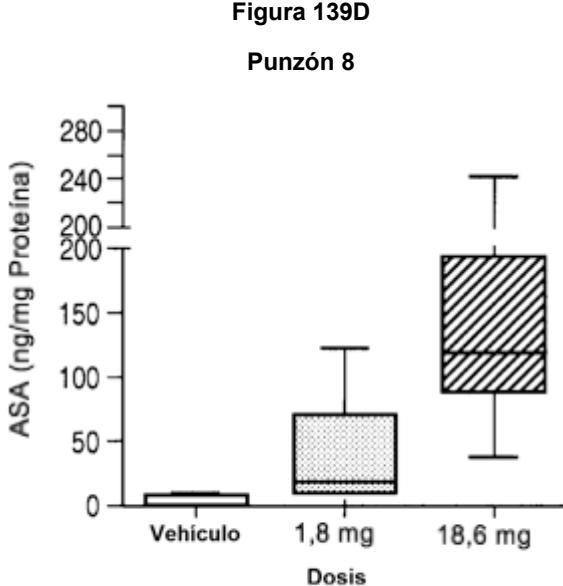


Figura 139E

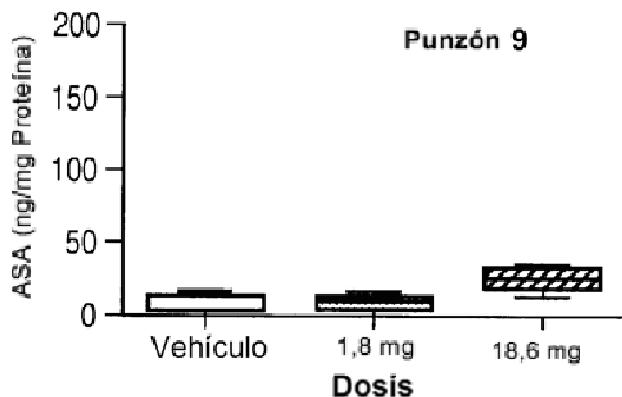


Figura 139F

Punzón 10

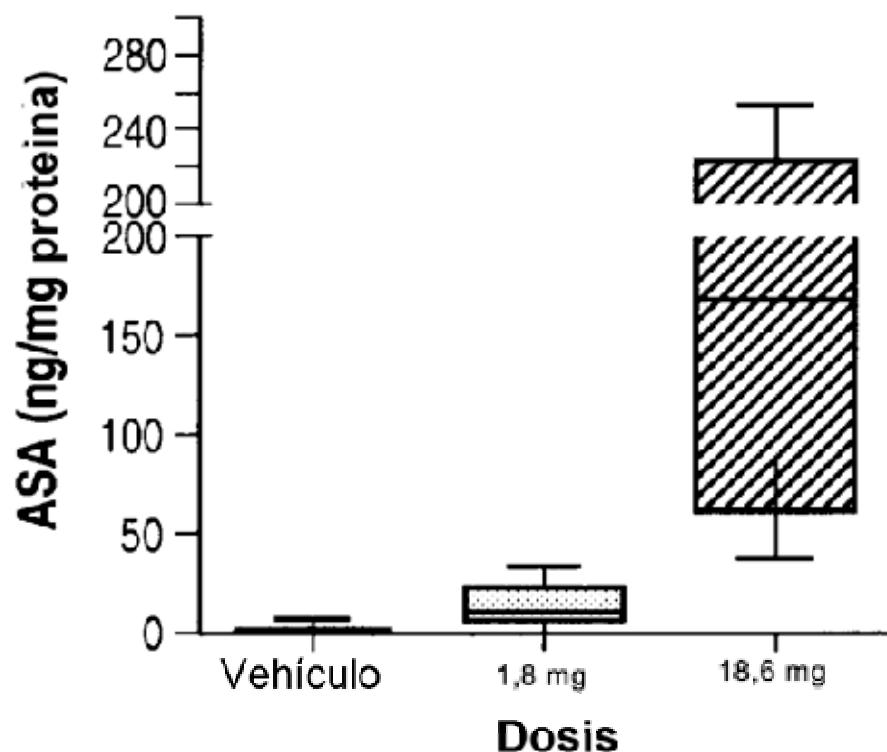


Figura 139G

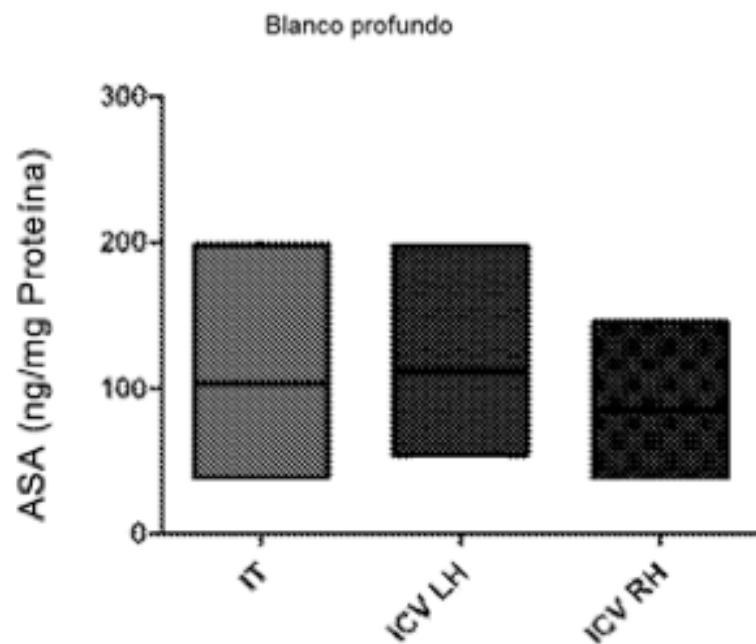


Figura 140 A

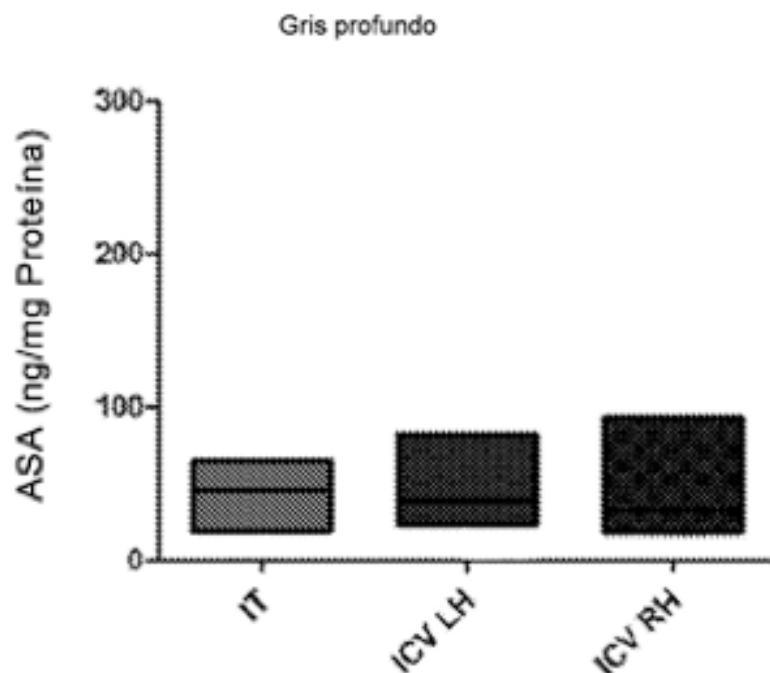
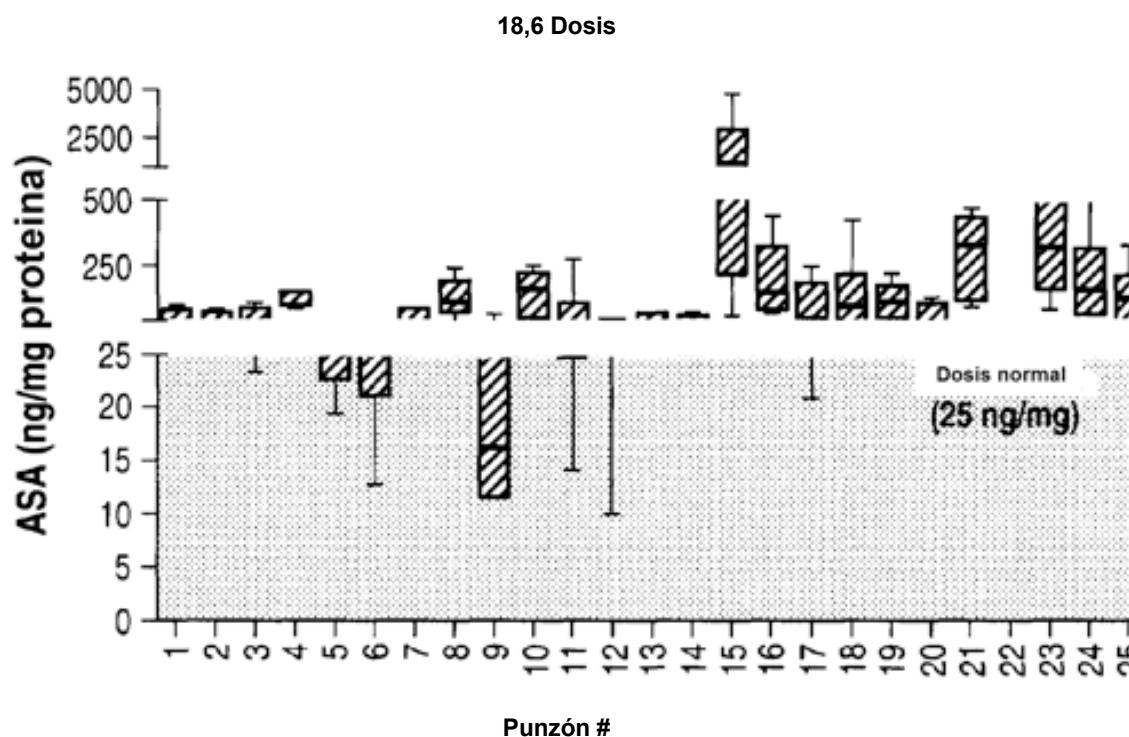
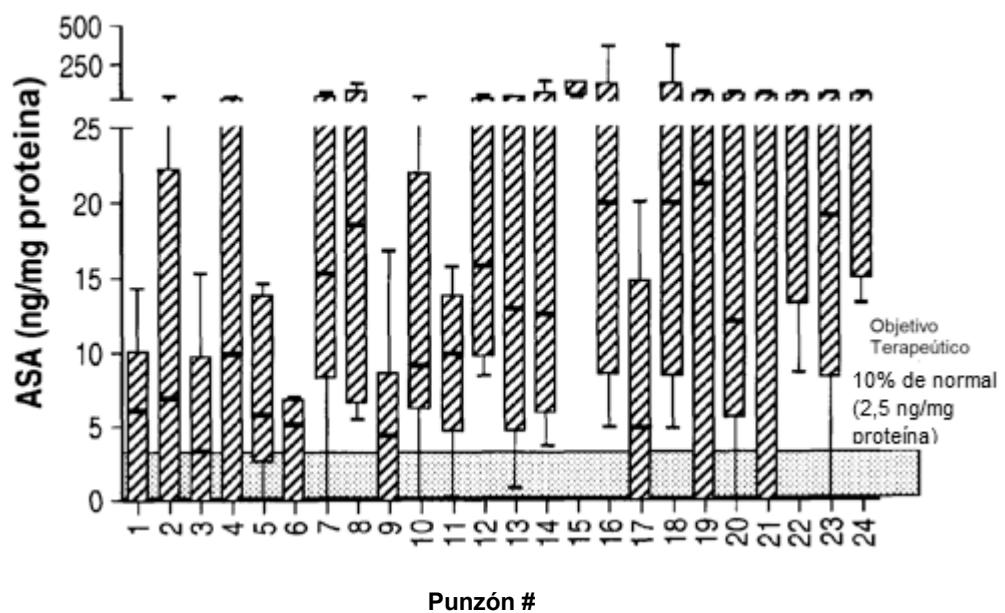
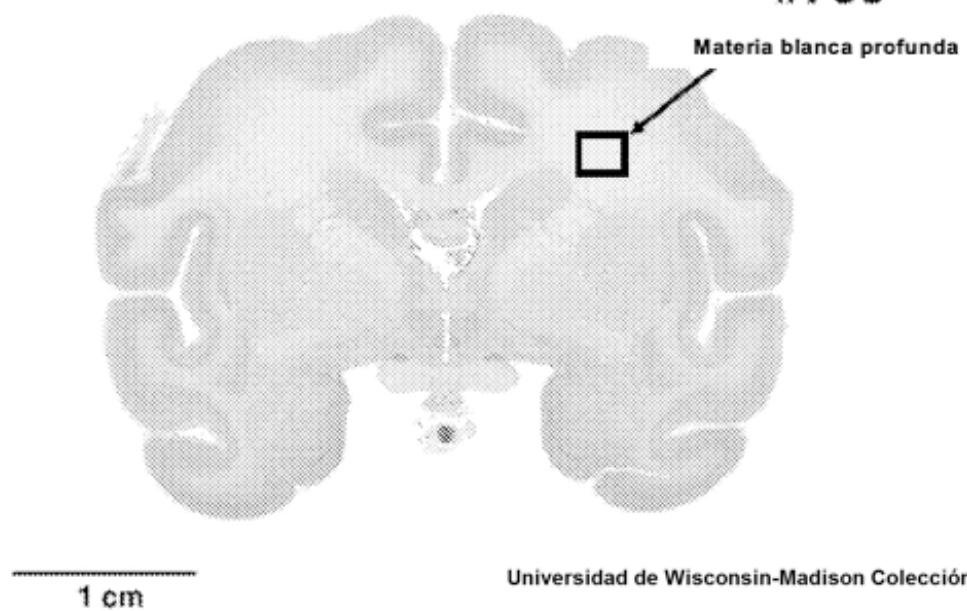


Figura 140 B

**Figura 141A****Figura 141B**

62-133

#780



Universidad de Wisconsin-Madison Colección de Cerebros

Figura 142A

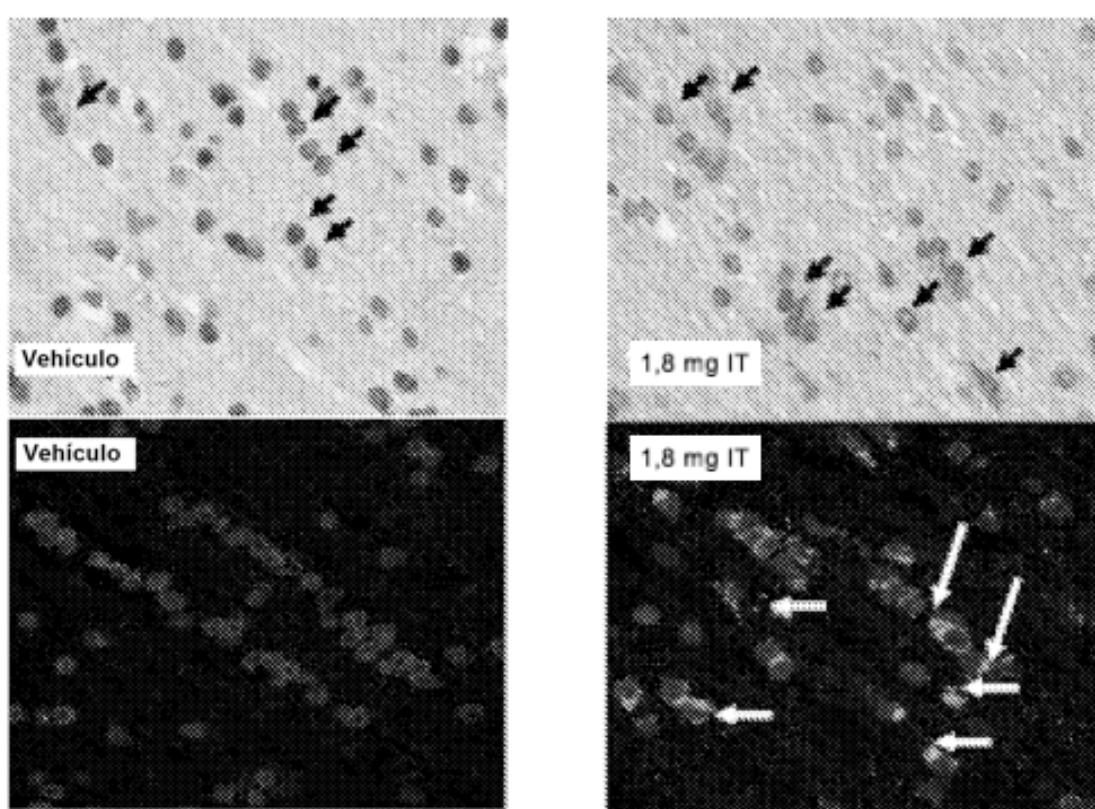


Figura 142 B

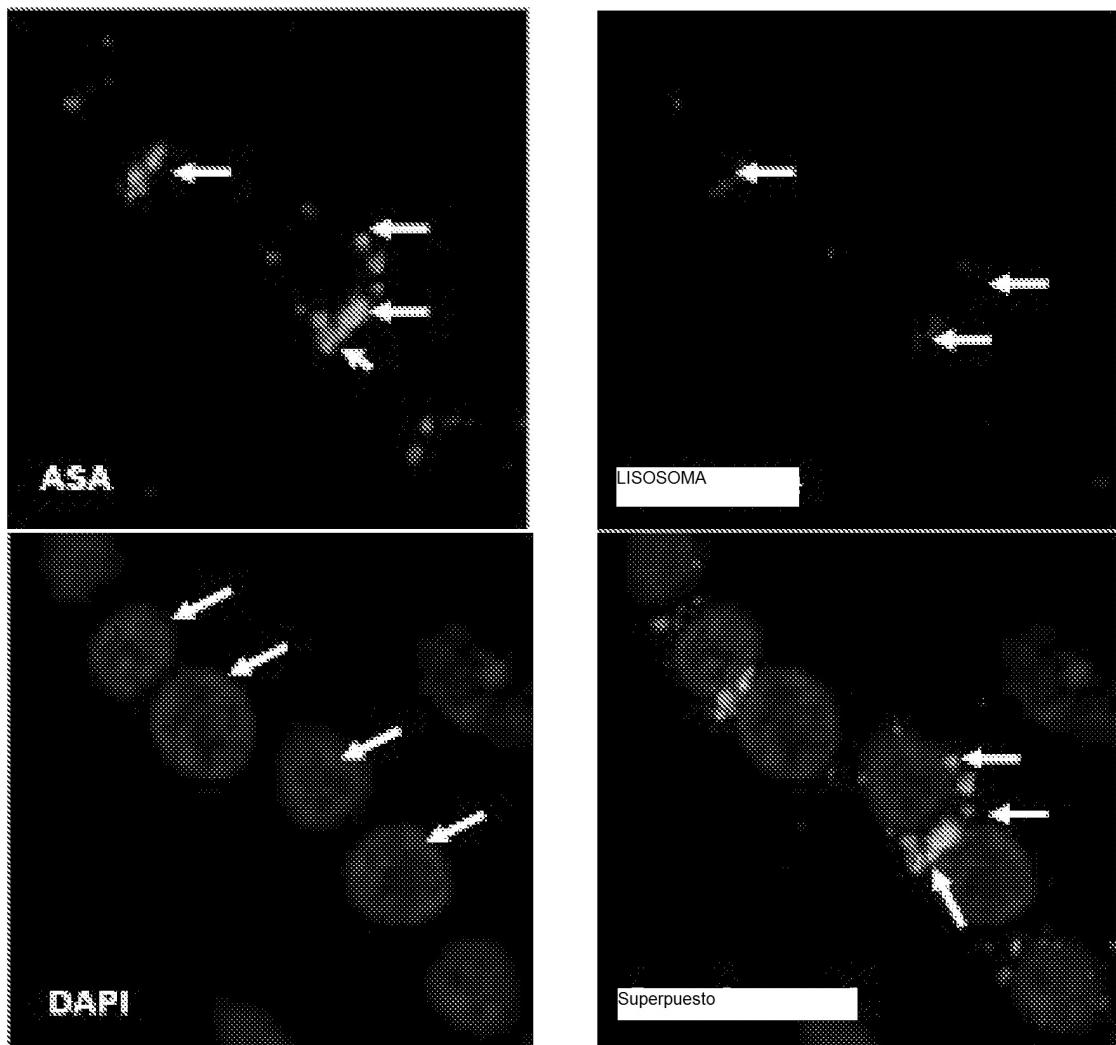


Figura 142 C

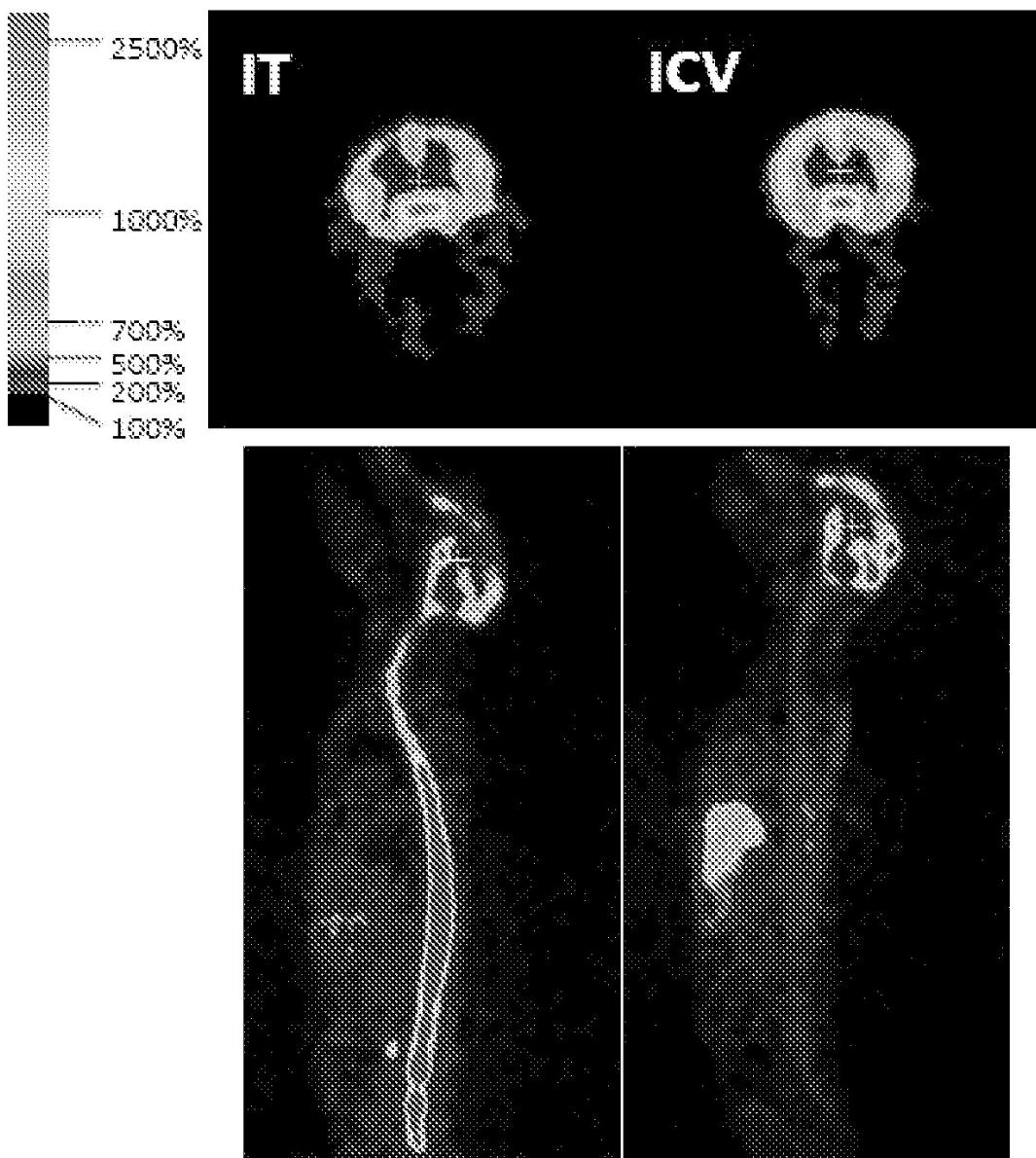


Figura 143

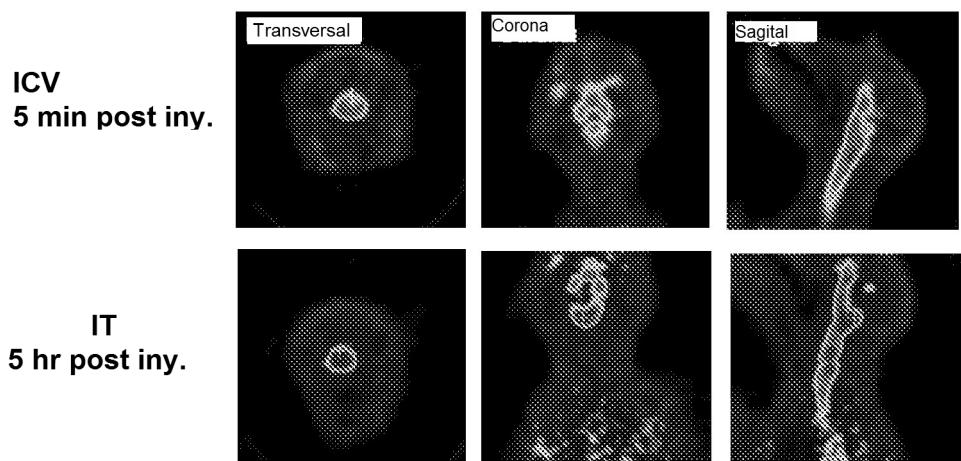


Figura 144

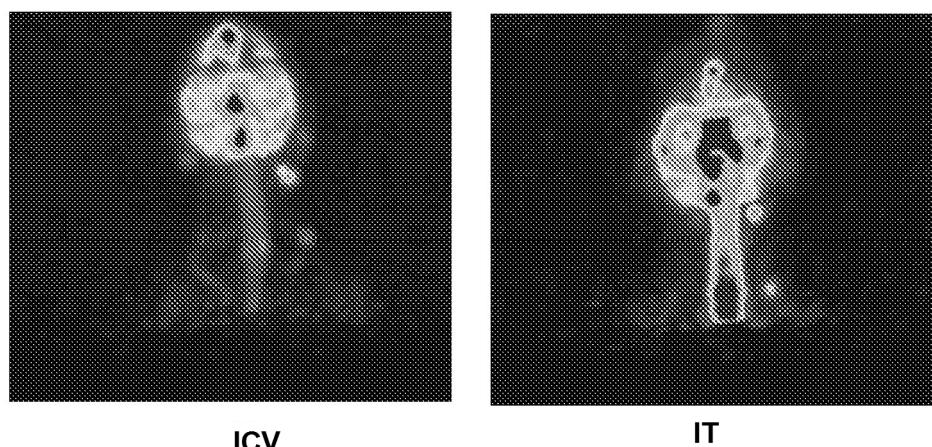


Figura 145

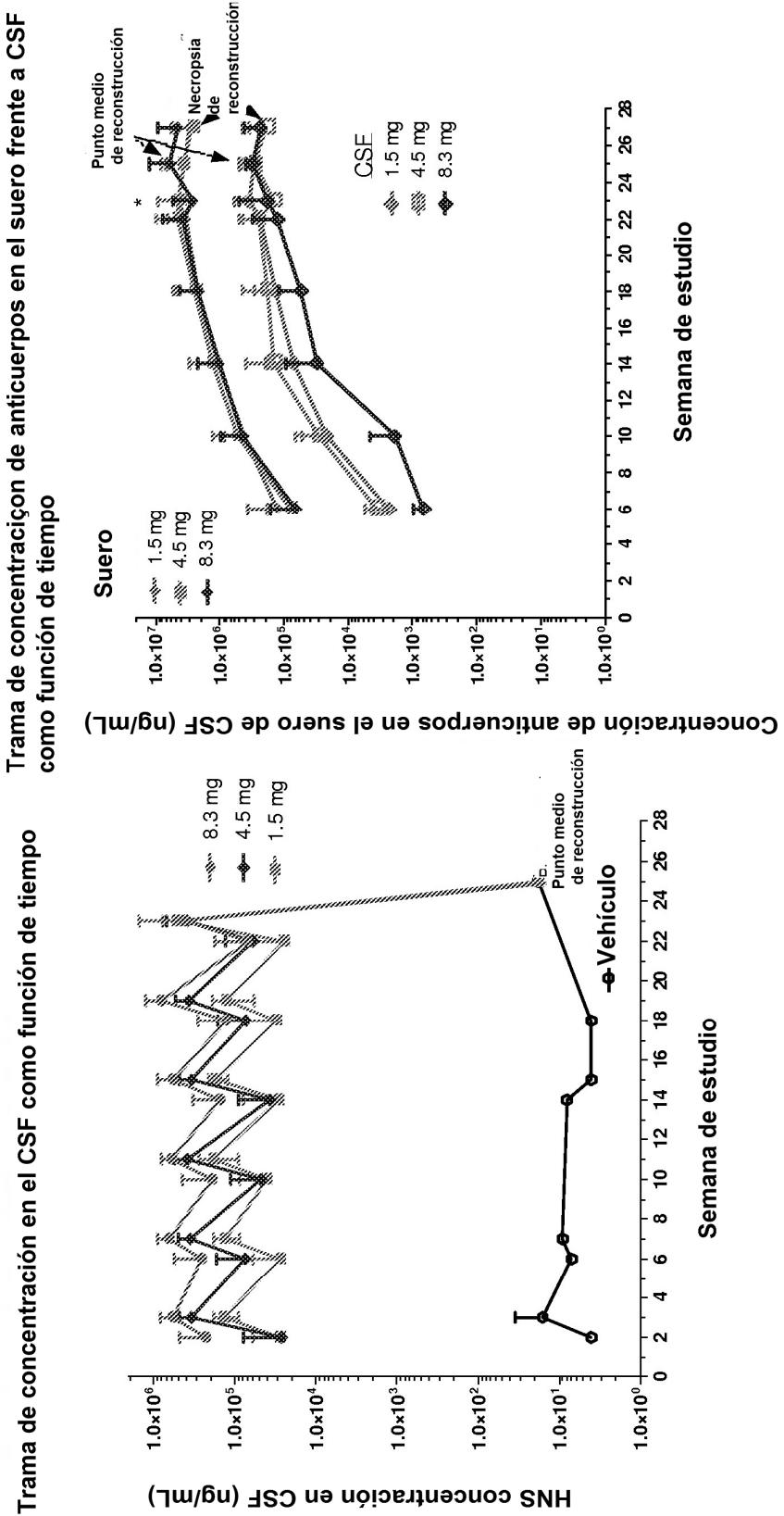


Figura 146 A y 146 B

Concentración de anticuerpos en el suero y CSF después de disifilar repetidamente IT en los tres niveles de dosis

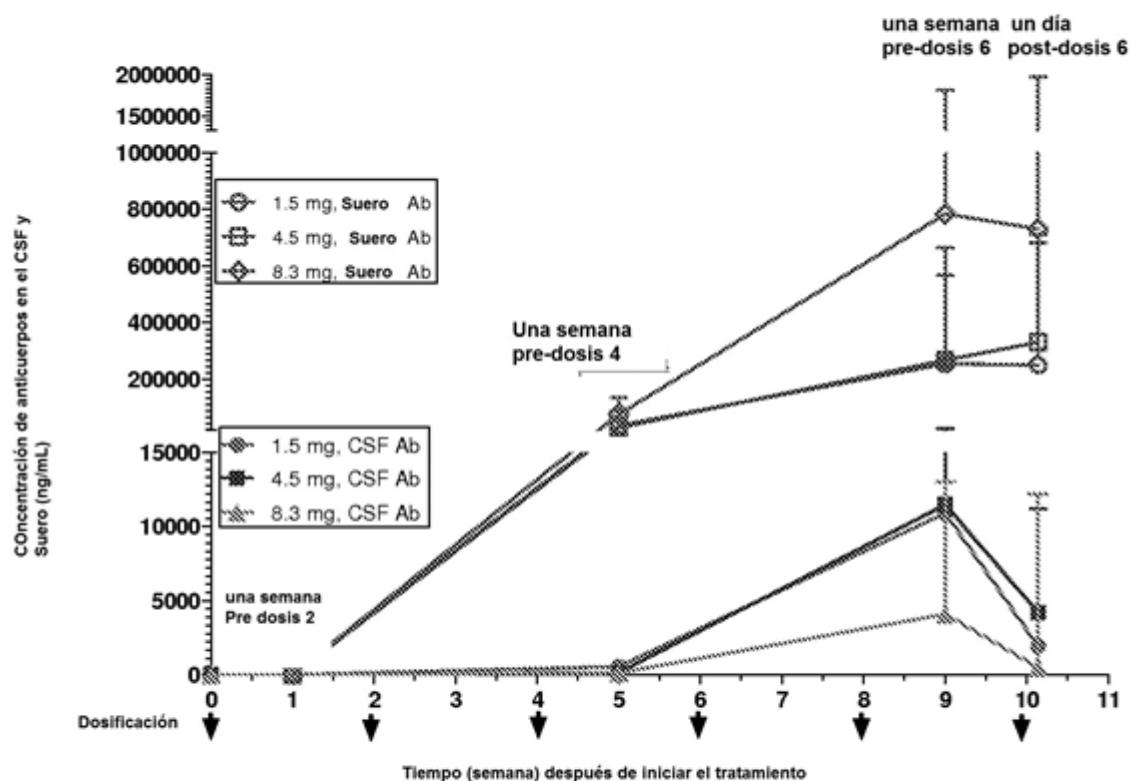


Fig. 146 C

Imágenes representativas del estudio

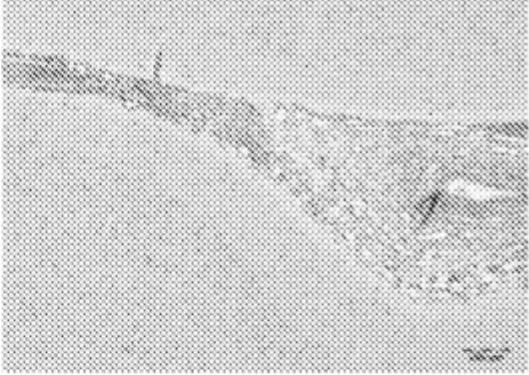
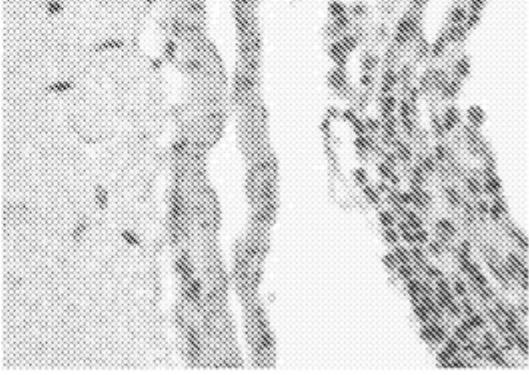
Figura	1A	
Animal	058	
Grupo	1F	
Porción	3	
Mag.	4X Tintura HE	
Tejido	MENINGES CEREBRALES	
Anotación	<p>Neutrofílos se infiltran en las meninges del control animal. La infiltración sucede variablemente en animales con catéteres intratecales</p> <p>:</p>	
Figura	1C	
Animal	046	
Grupo	5M	
Porción	2	
Mag.	40X Tintura HE	
Tejido	MENINGES CEREBRALES	
Anotación	<p>Las infiltraciones meningeas en alta dosis machos, muchas de las células son eosinófilos</p>	

Figura 147 A/B

Imágenes representativas del estudio

Figura	2A
Animal	680
Grupo	3P
Porción	6
Mag.	40X Tintura HE
Tejido	Cerebro
Anotación	La flecha indica un eosinofilo en el espacio perivascular en una baja dosis hembra
Figura	2C
Animal	023
Grupo	3M
Porción	2
Mag.	40X Tintura HE
Tejido	Cerebro
Anotación	Eosofilos en el espacio perivascular y el avance parénquima del cerebro en una baja dosis macho

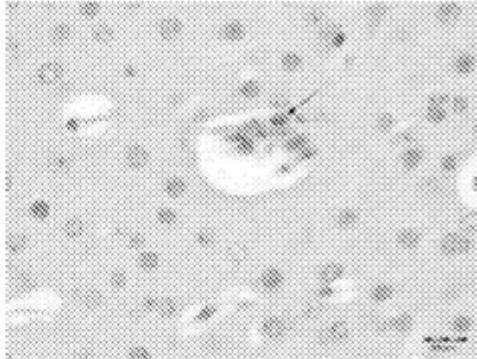
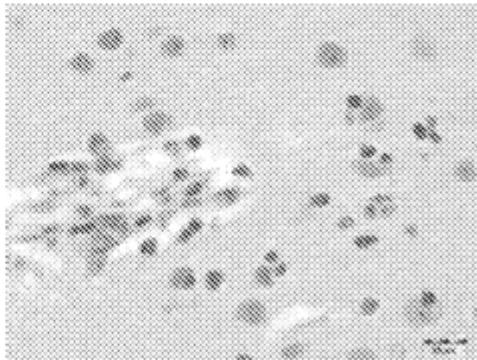



Figura 147 C/D

Imágenes representativas del estudio

Figura	3A		
Animal	023		
Grupo	3M		
Porción	?		
Mag.	40X	Tintura	HE
Tejido	Médula espinal cervical		
Anotación	<p>La flecha indica eosifilos en la médula espinal parénquima, notamos que las neuronas de alrededor son normales</p>		
Figura	3C		
Animal	024		
Grupo	3M		
Porción	8		
Mag.	40X	Tintura	HE
Tejido	Médula espinal torácica		
Anotación	<p>La flecha indica eosofilos. El cuadrado indica un área de posible microgliosis. Existen varias neuronas grandes. Todo normal.</p>		

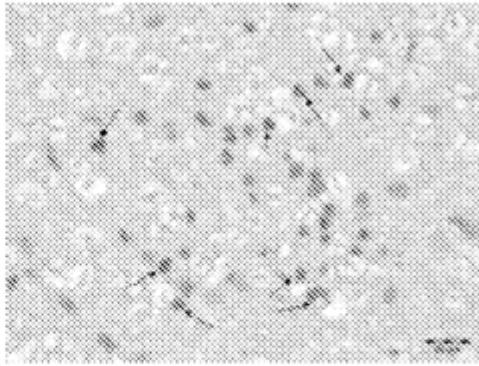
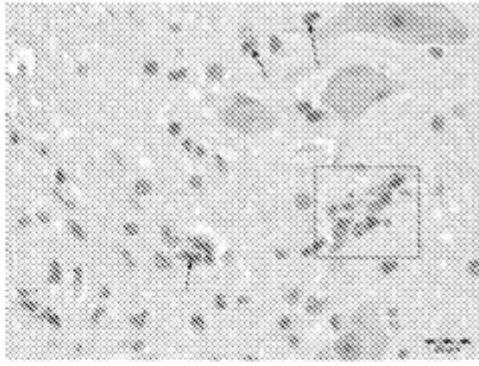
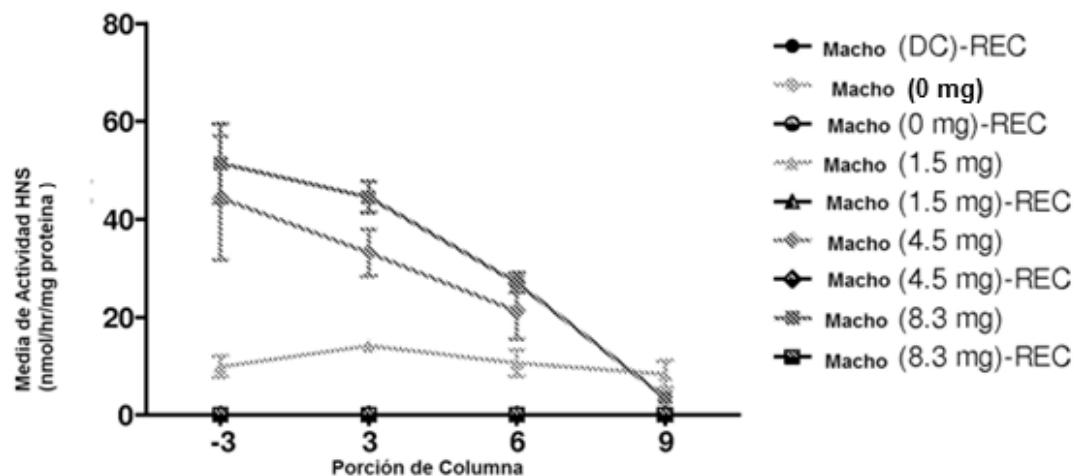



Figura 147 E/F

**Actividad enzimática de HNS en la médula espinal (nmol/h/mg Proteína)
en monos Cynomolgus machos tras 6 meses de dosis**



**Actividad enzimática de HNS en la médula espinal (nmol/h/mg Proteína)
en monos Cynomolgus hembras tras 6 meses de dosis**

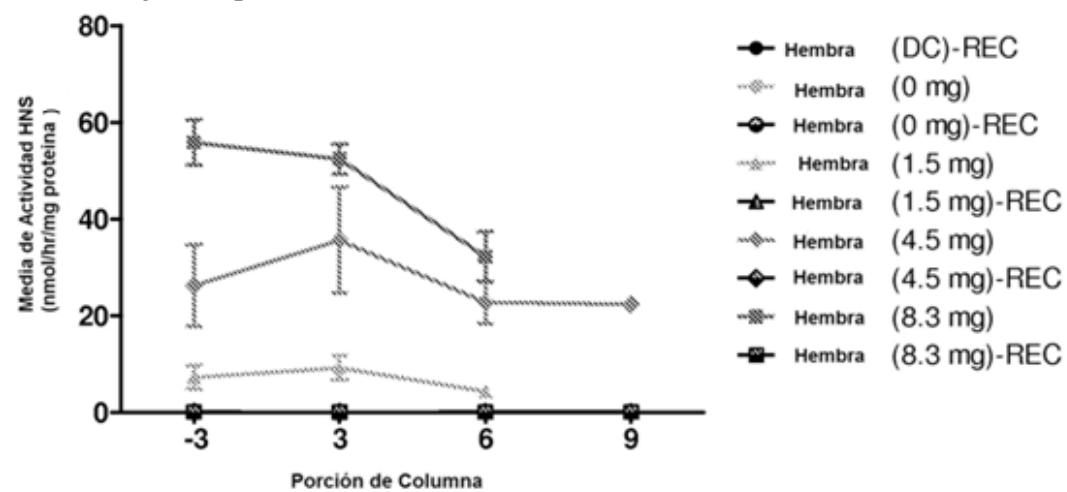
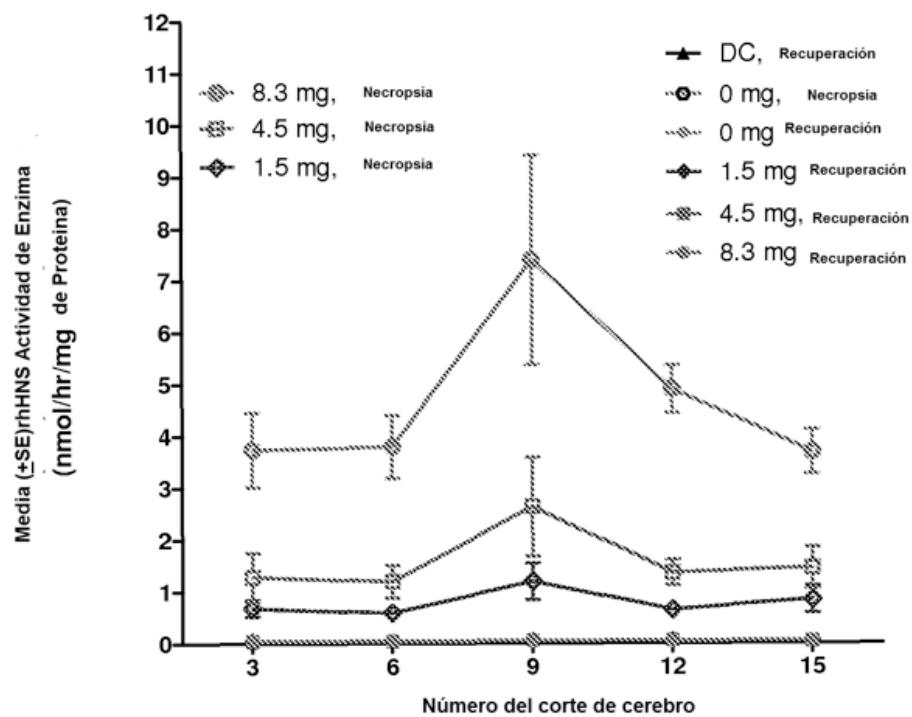
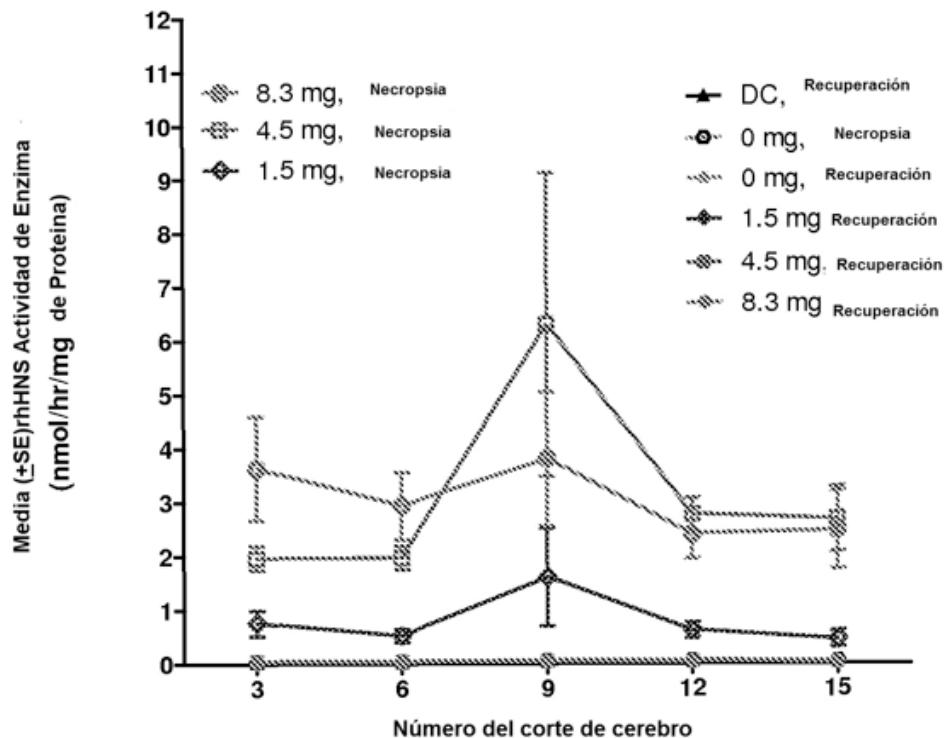


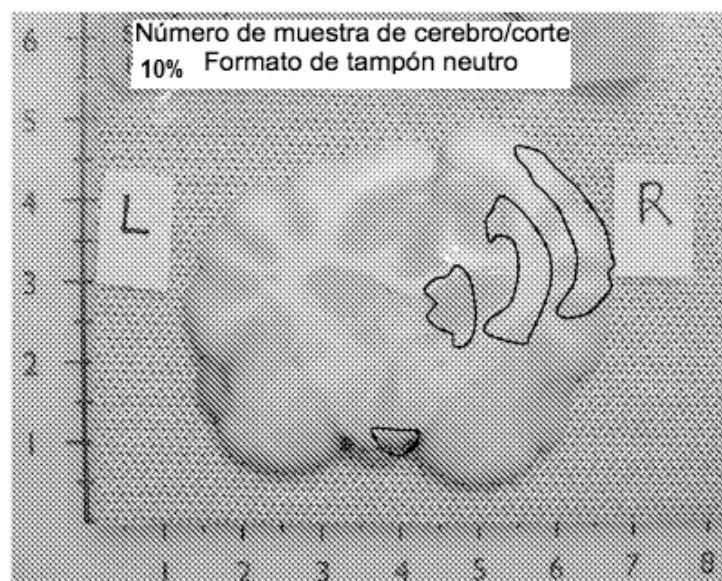
FIG. 148 A/B

**Concentraciones de rhHNS cerebral expresadas como actividad enzimática en monos
Cynomolgus machos tras 6 meses de dosificación**



**Concentraciones de rhHNS cerebral expresadas como actividad enzimática en monos
Cynomolgus hembras tras 6 meses de dosificación**

**Fig. 148C/D**



Grupo de dosis de 8,3 mg

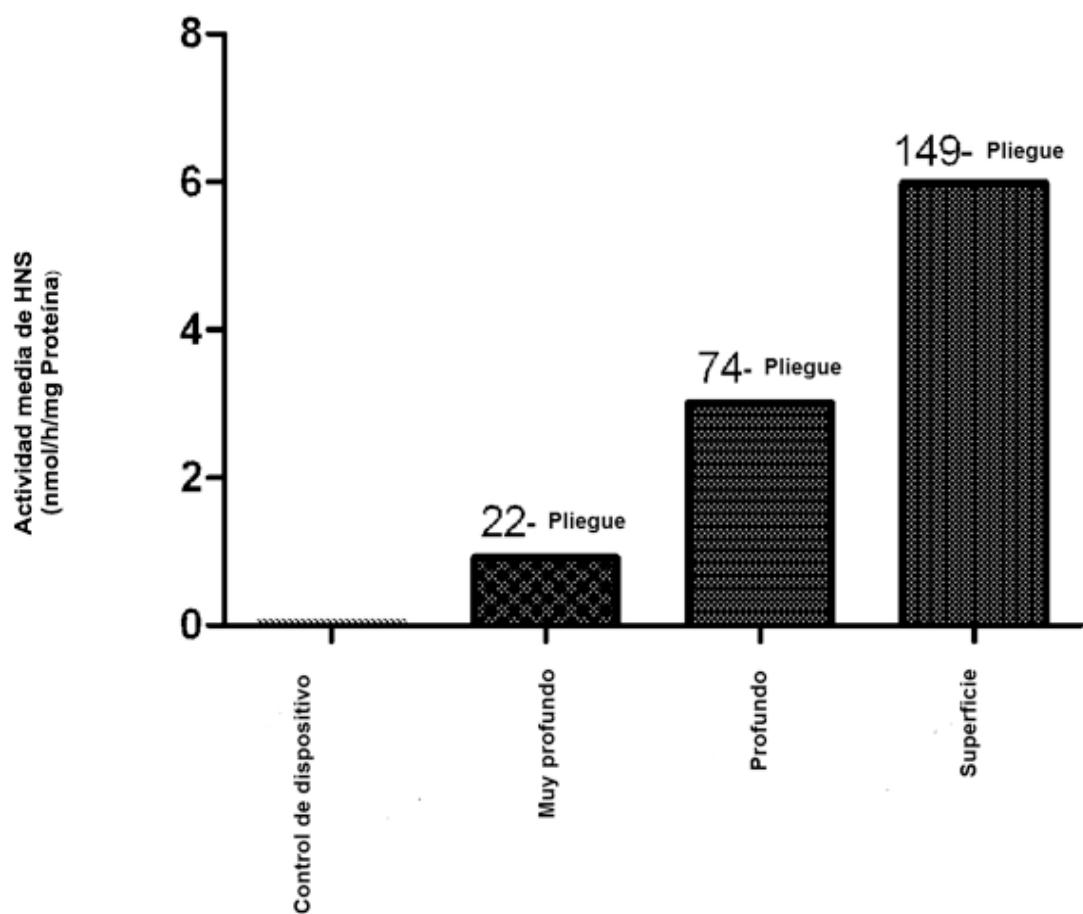


FIG. 149 A

**Media de Actividad de enzima HNS(nmol/hr/mg proteina)
en Hígado de Mono Cinomolgo despues de 6 meses y 1 mes de
periodo de recuperación**

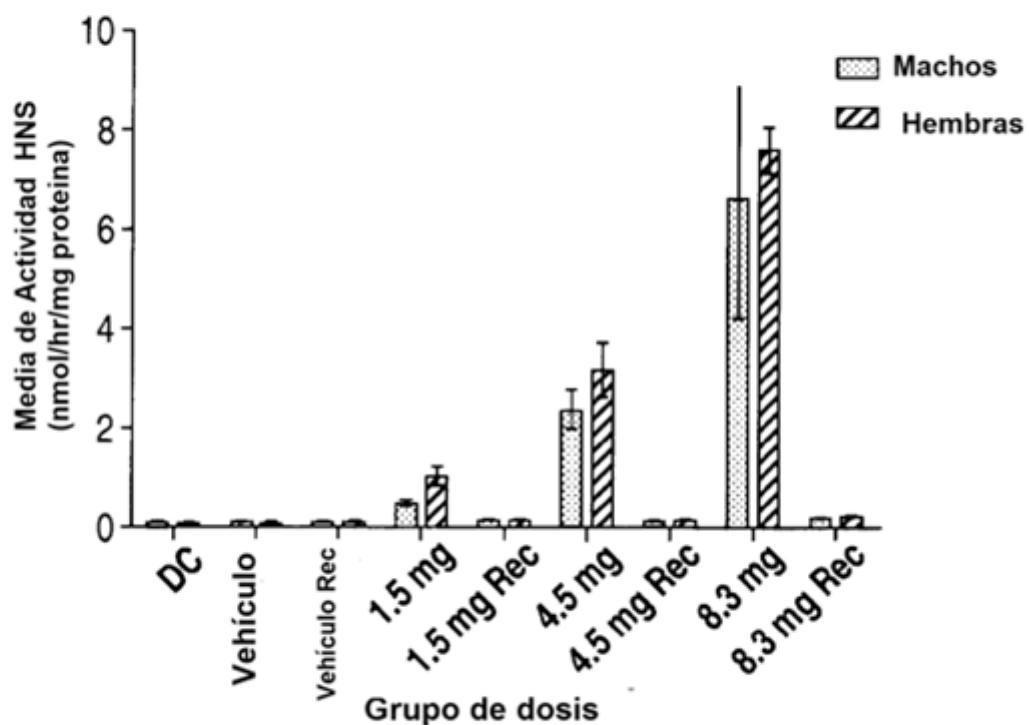


Figura 149 B

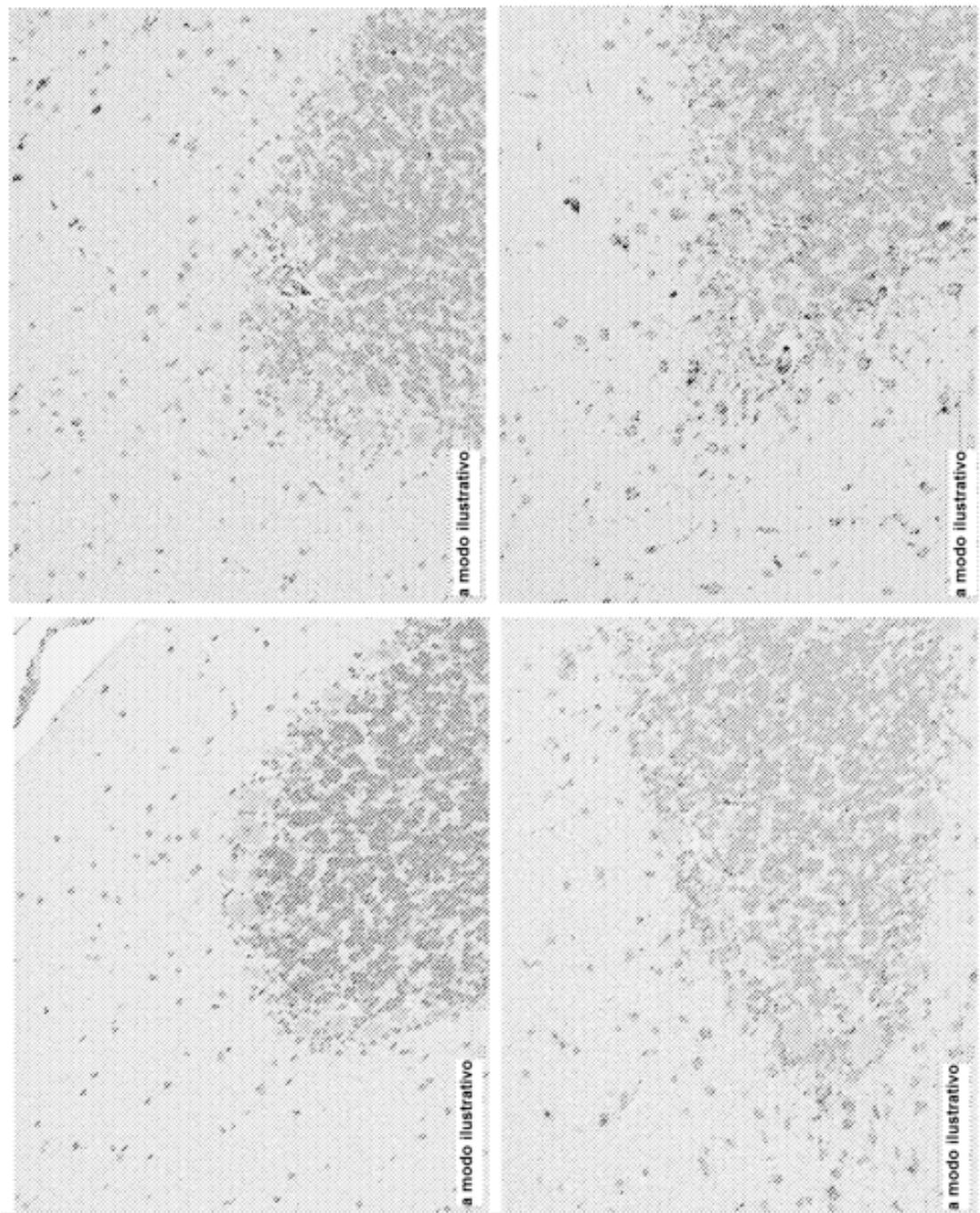


Fig. 150A/B/C/D

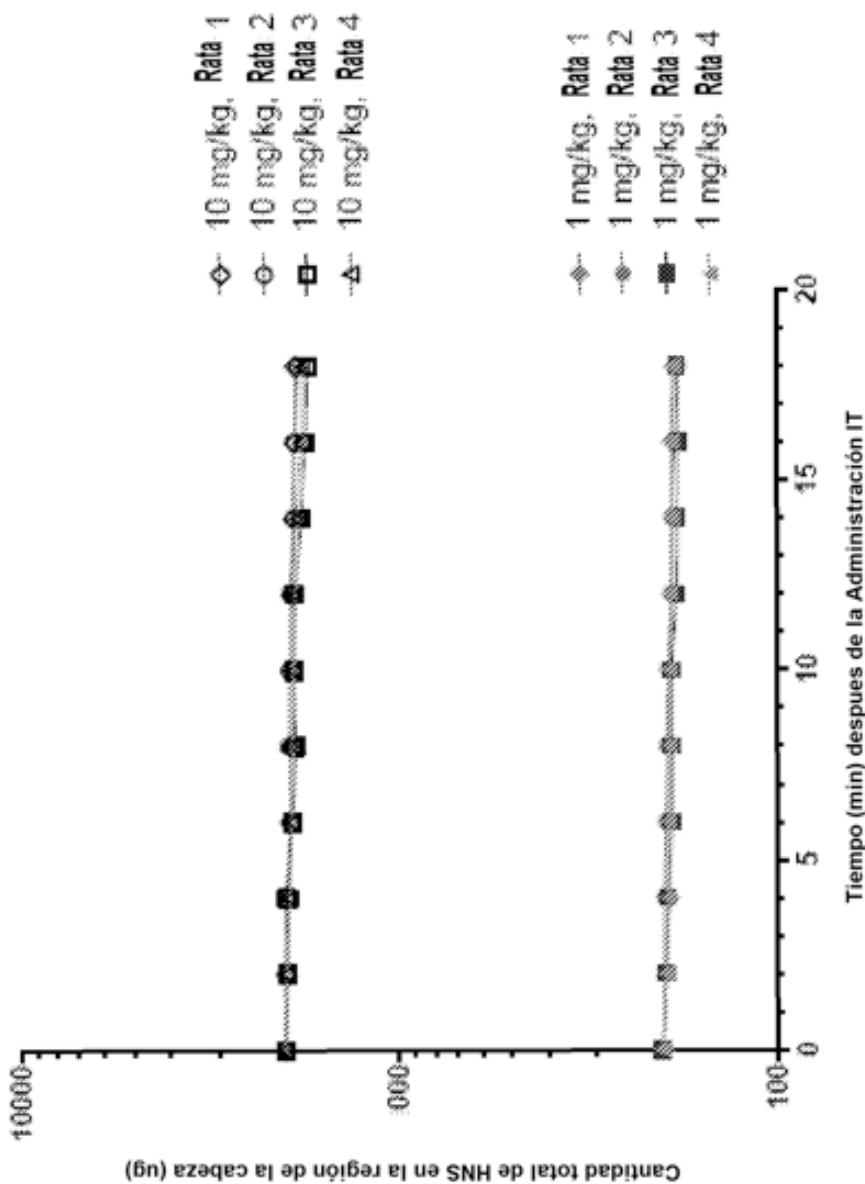


Fig. 151

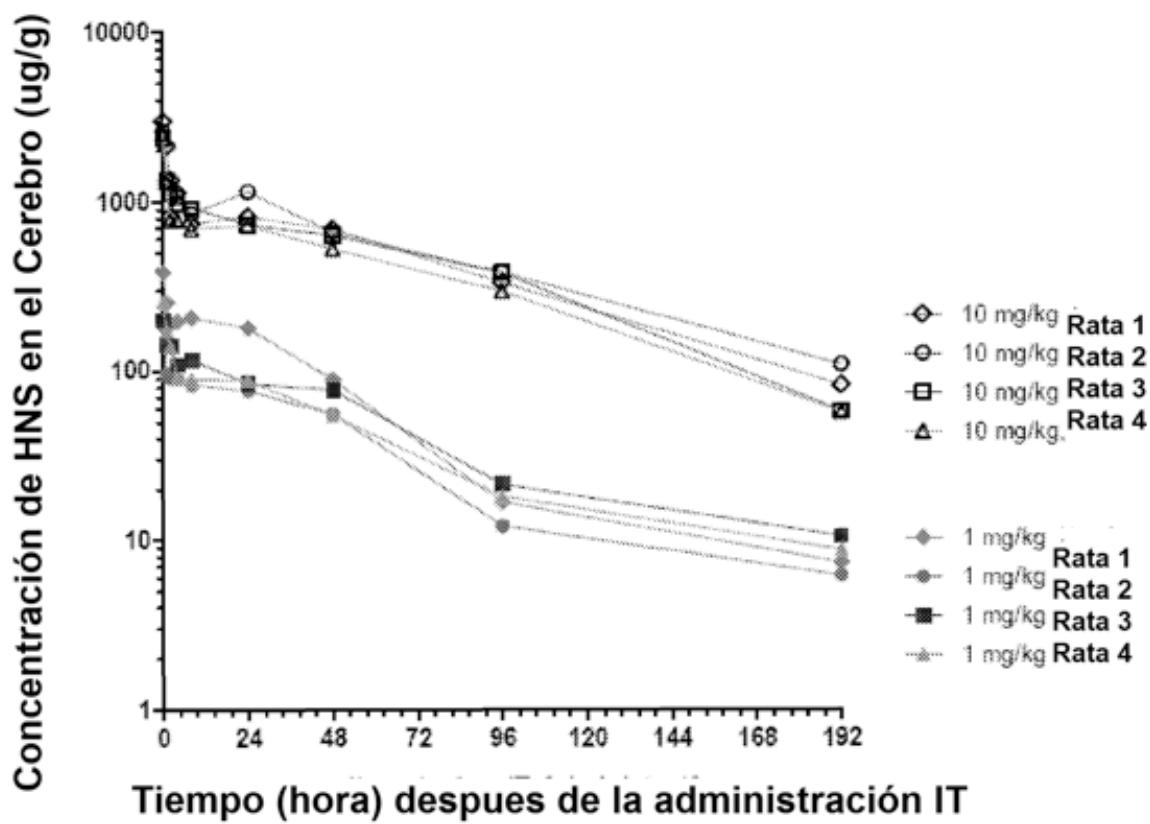


Figura 152

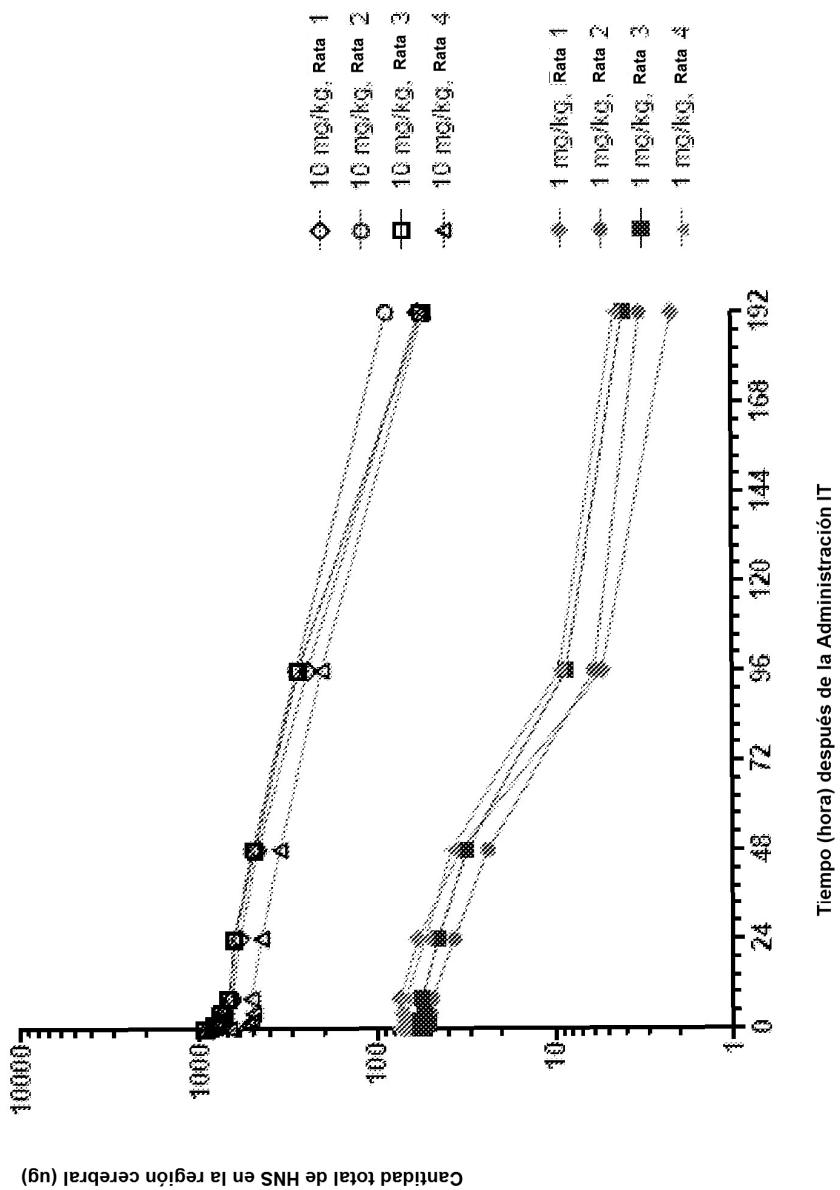


Fig. 153

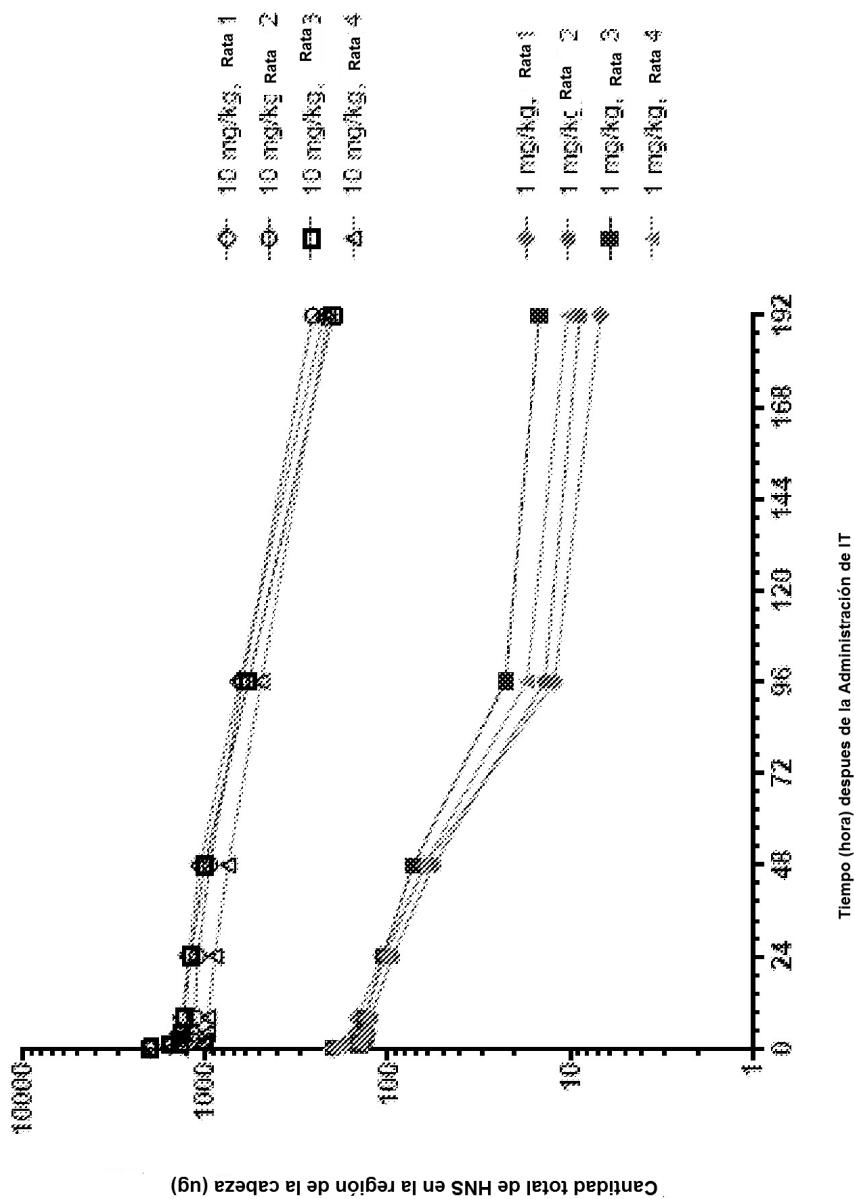


Fig. 154

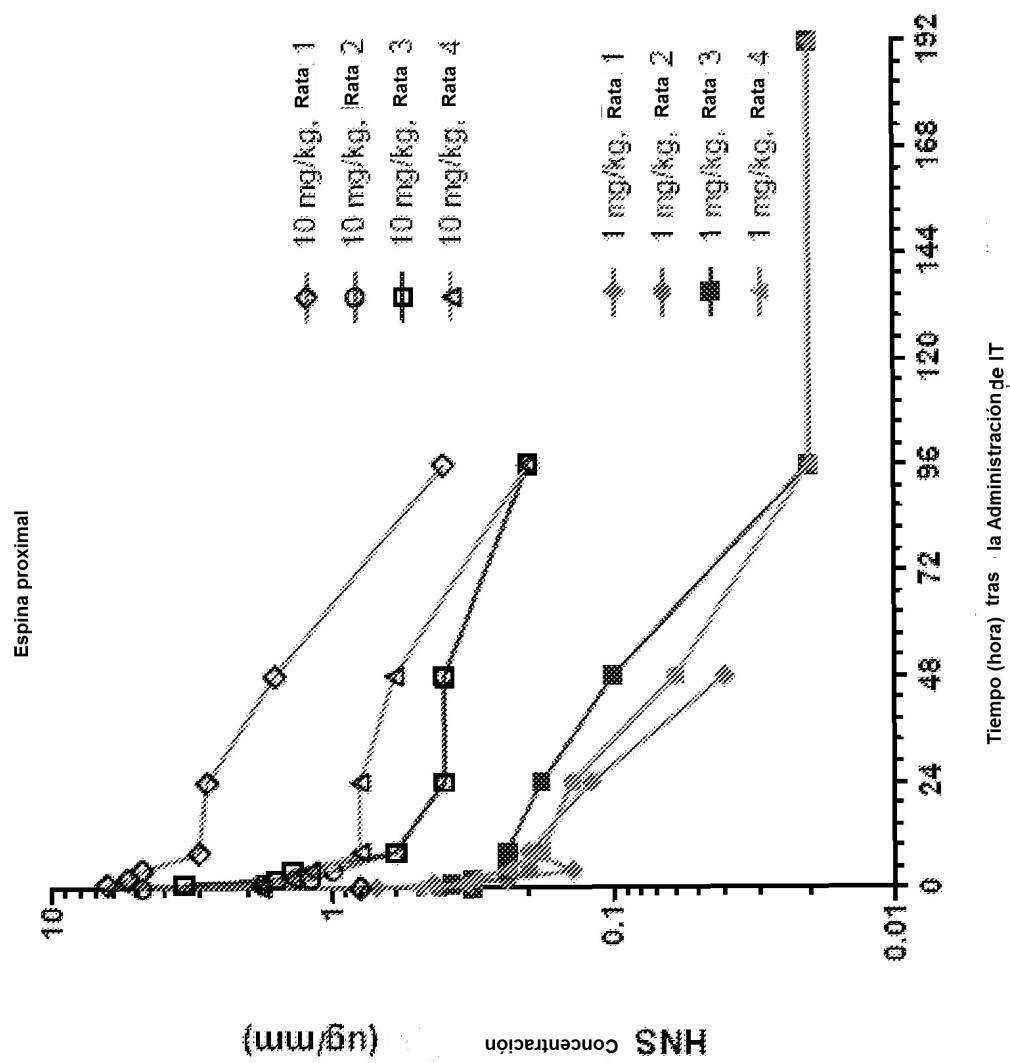
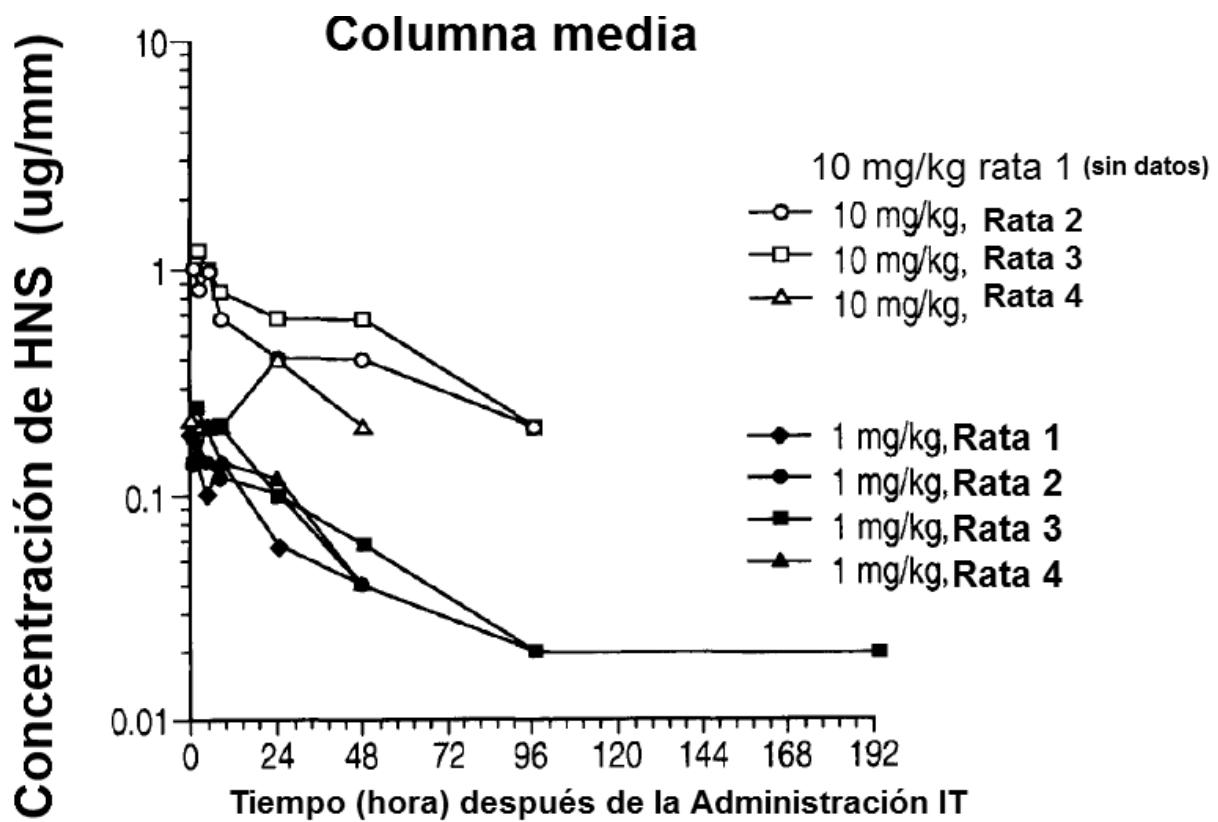


Fig. 155



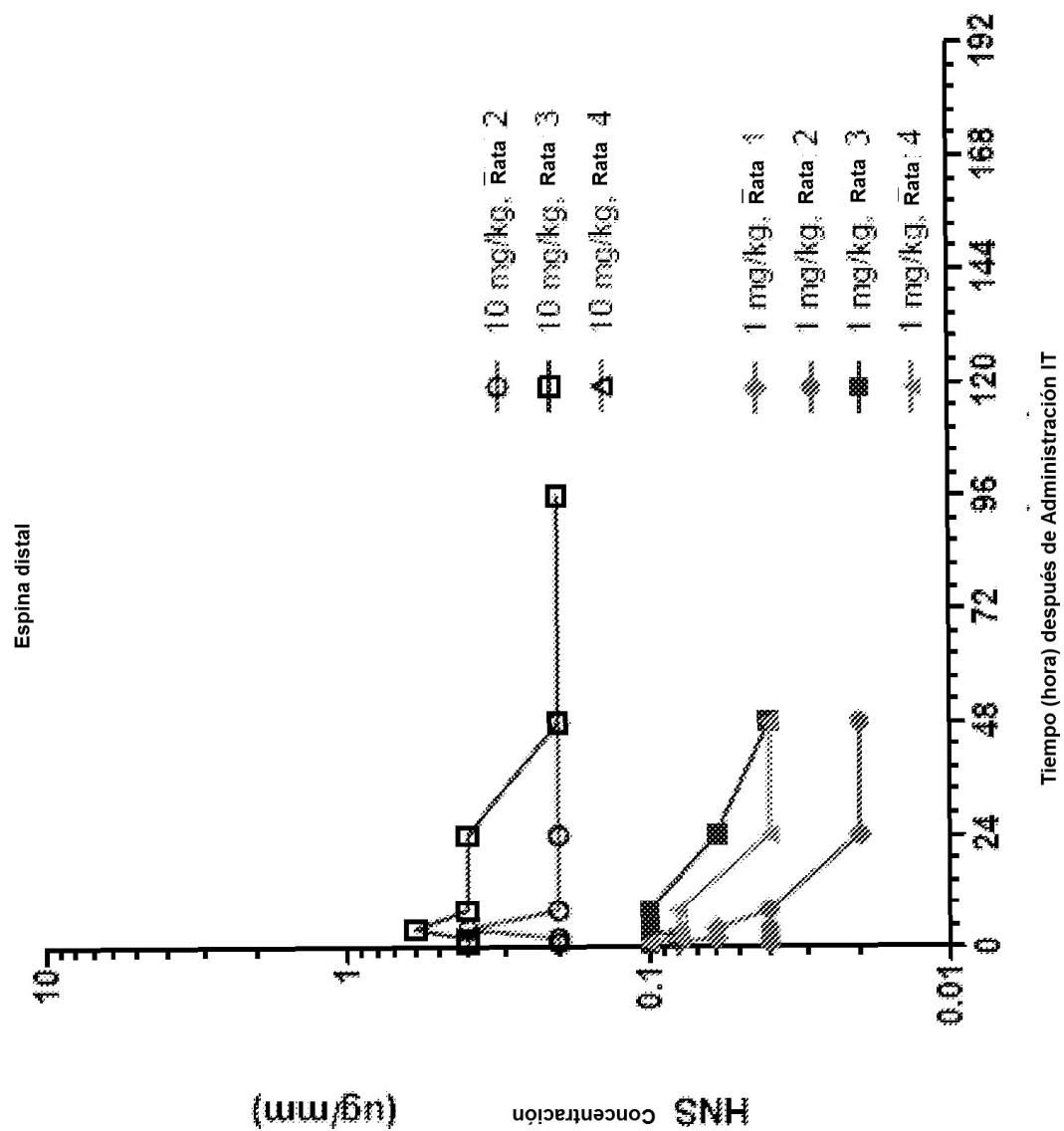


Fig. 157

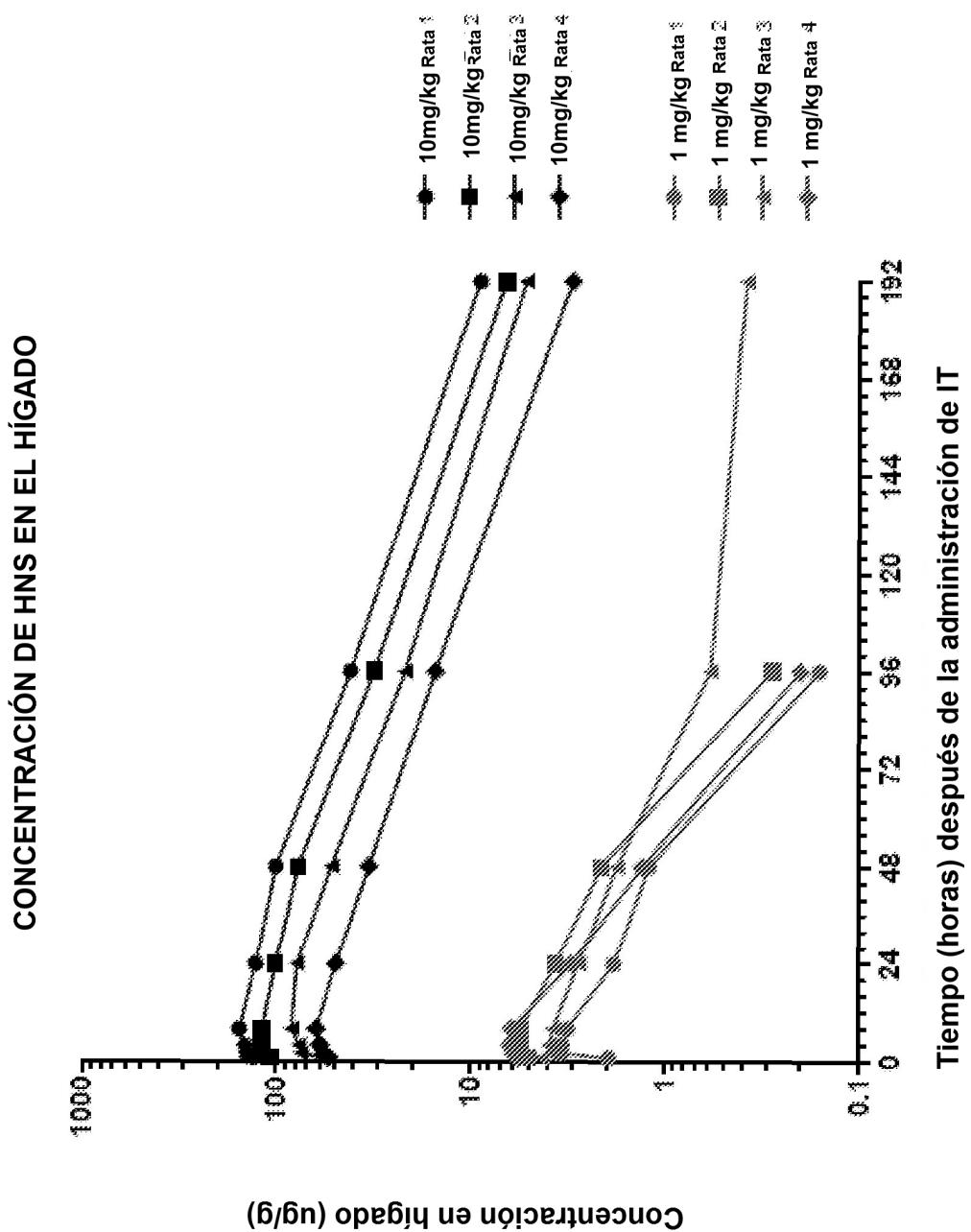


Fig. 158

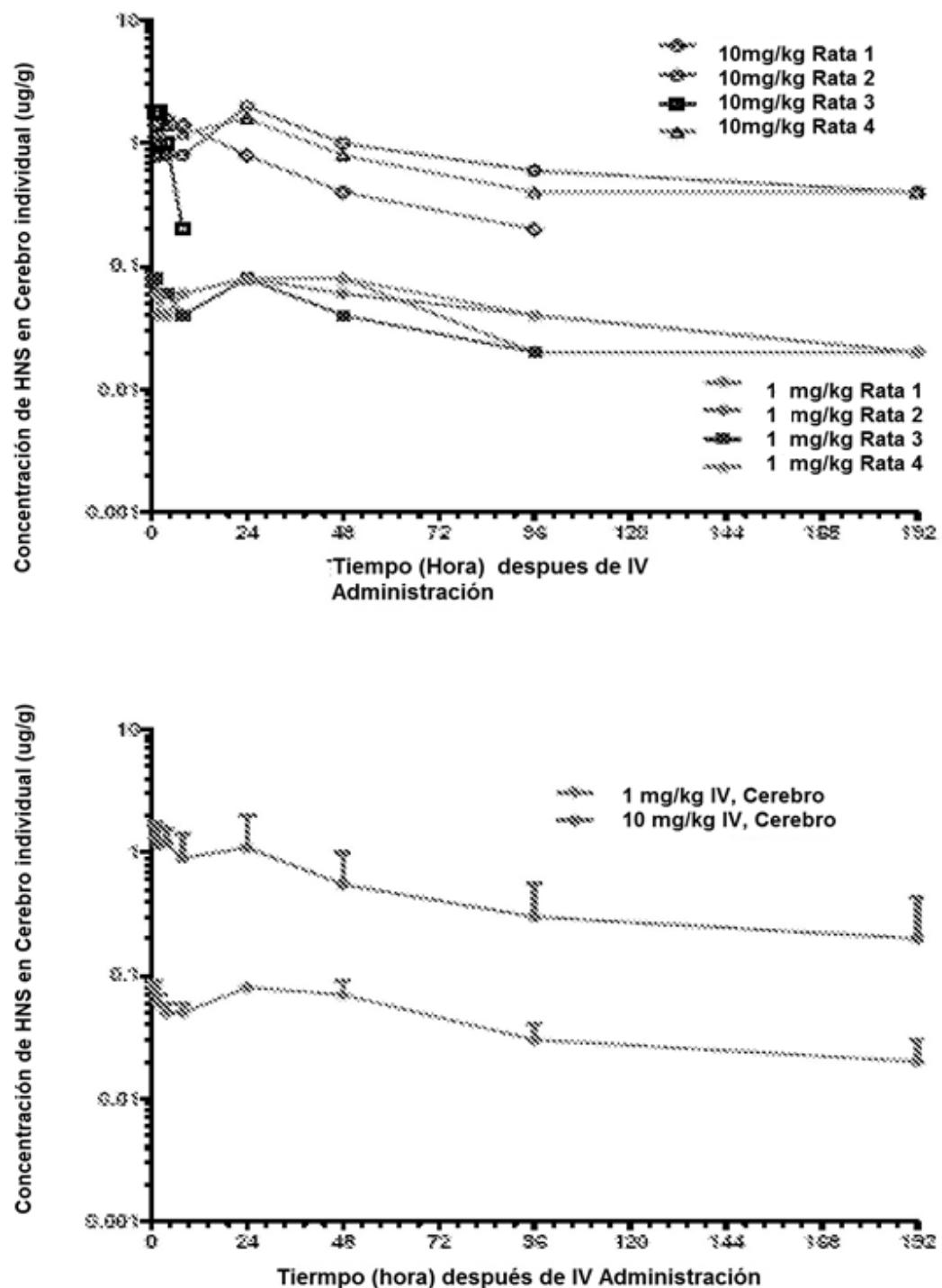


Fig. 159

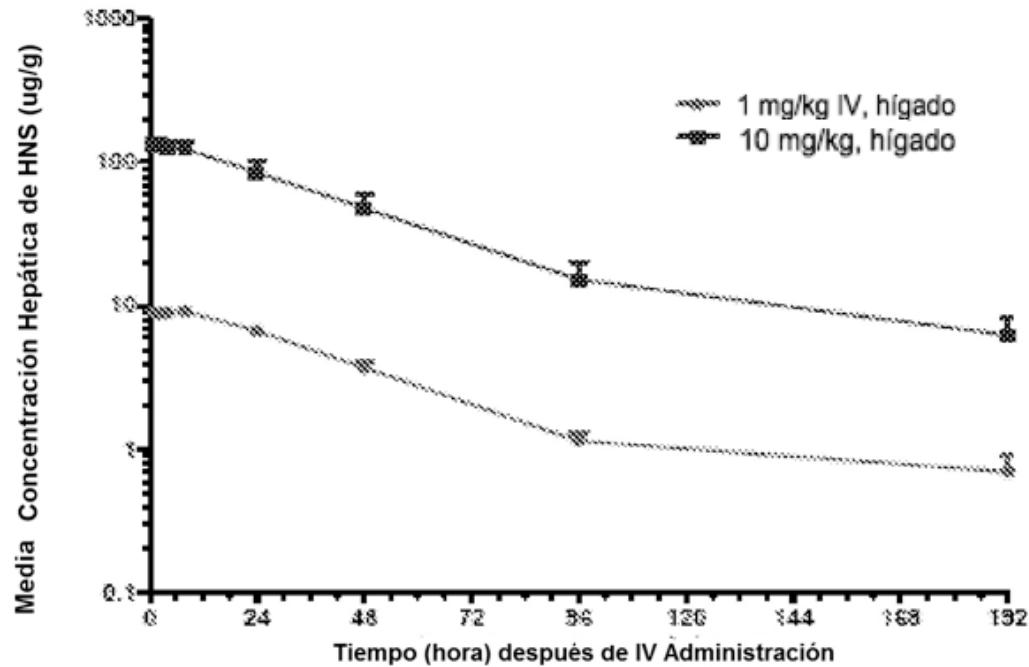
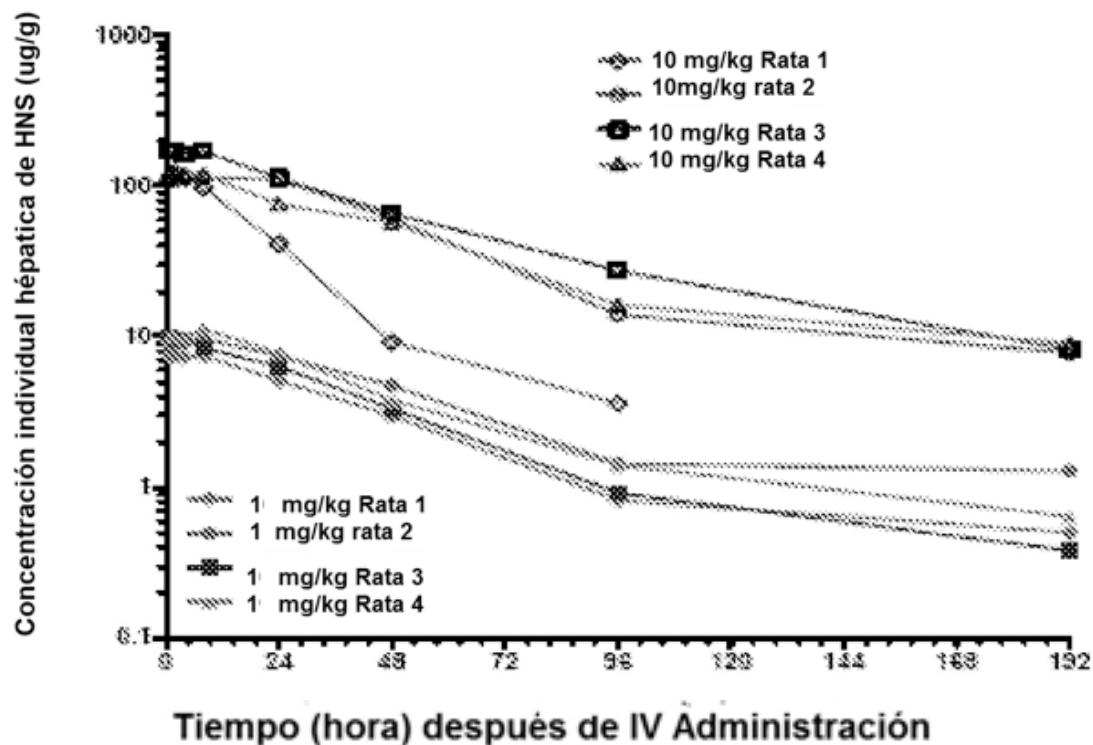


Fig. 160

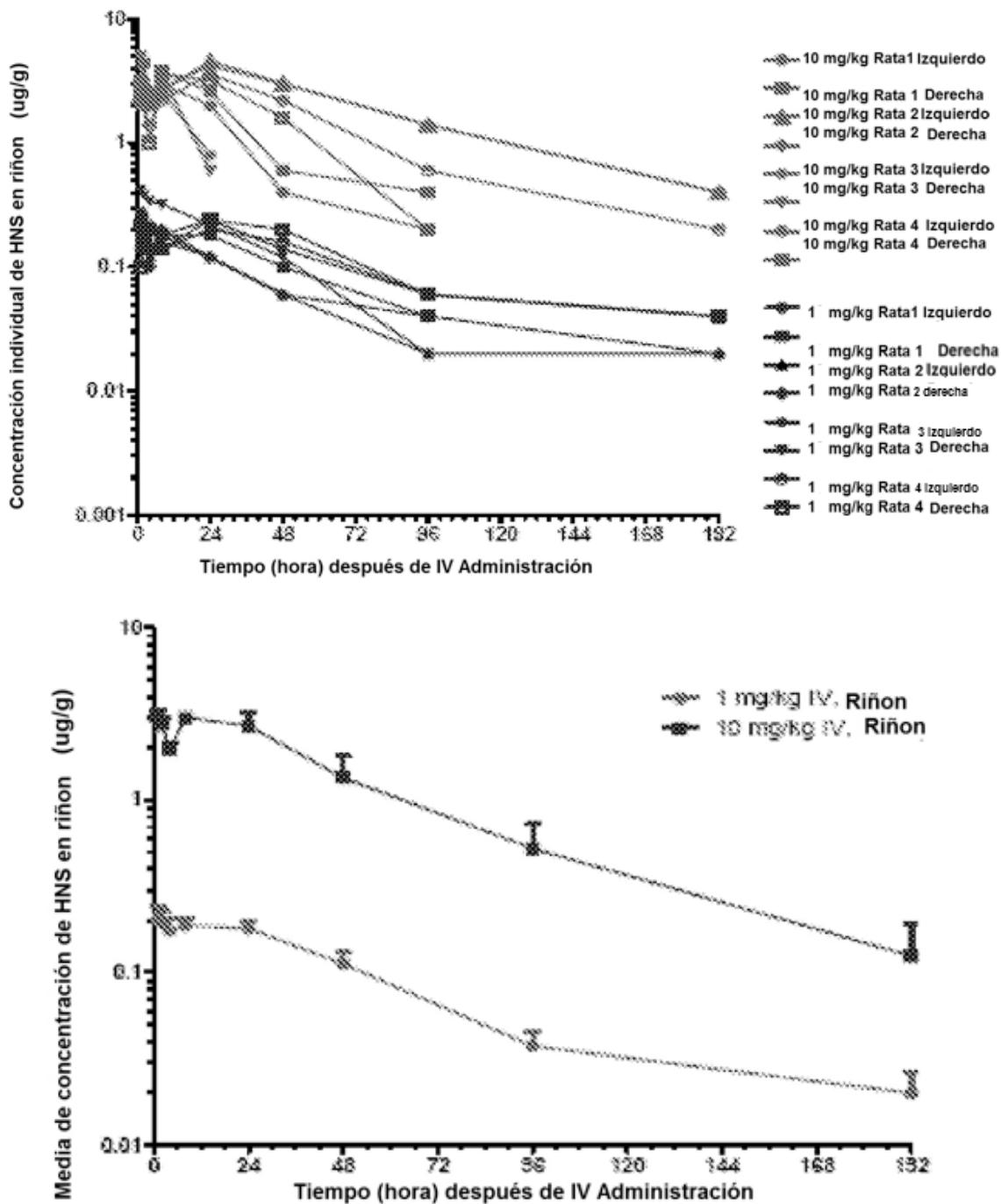


Fig. 161

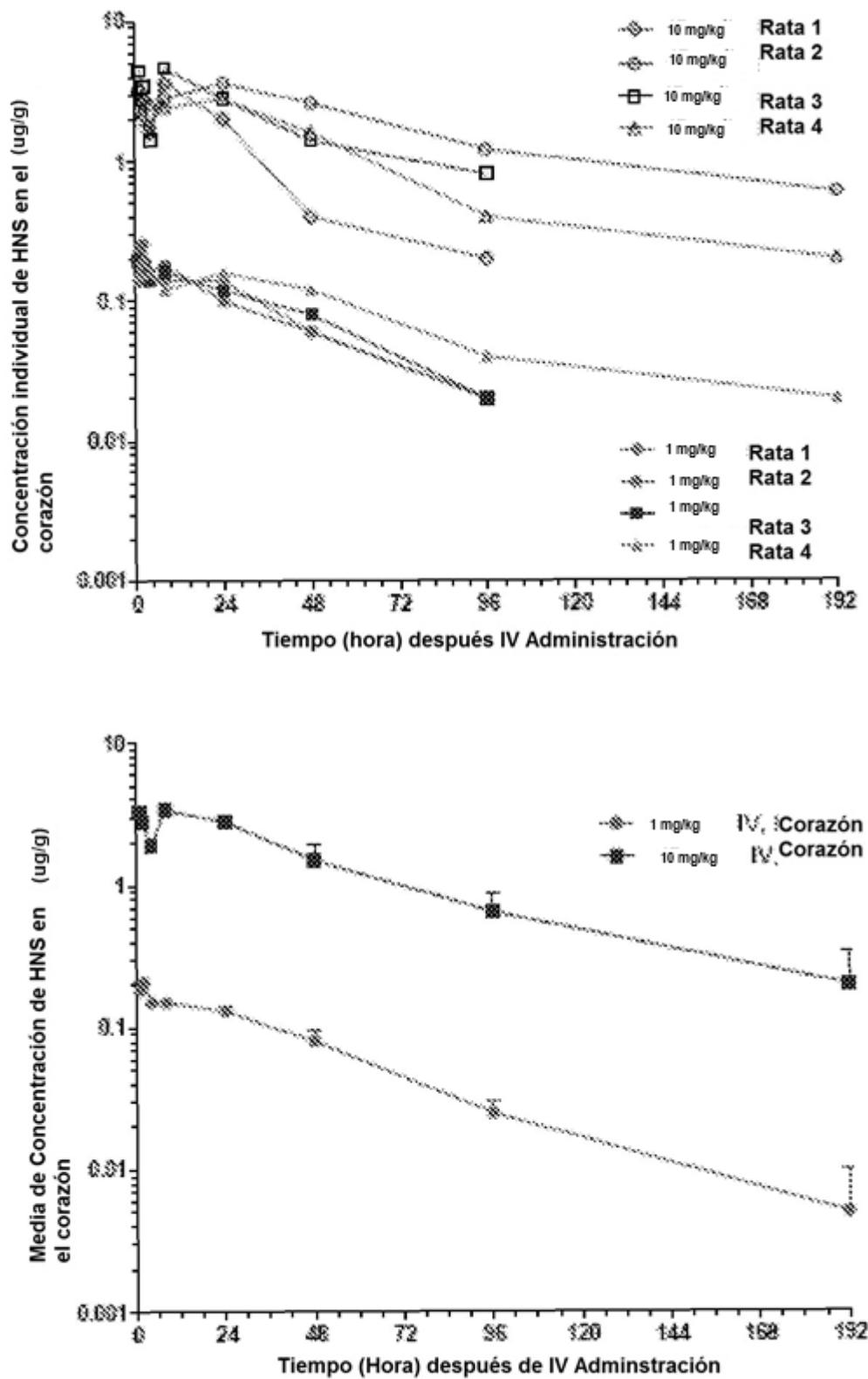
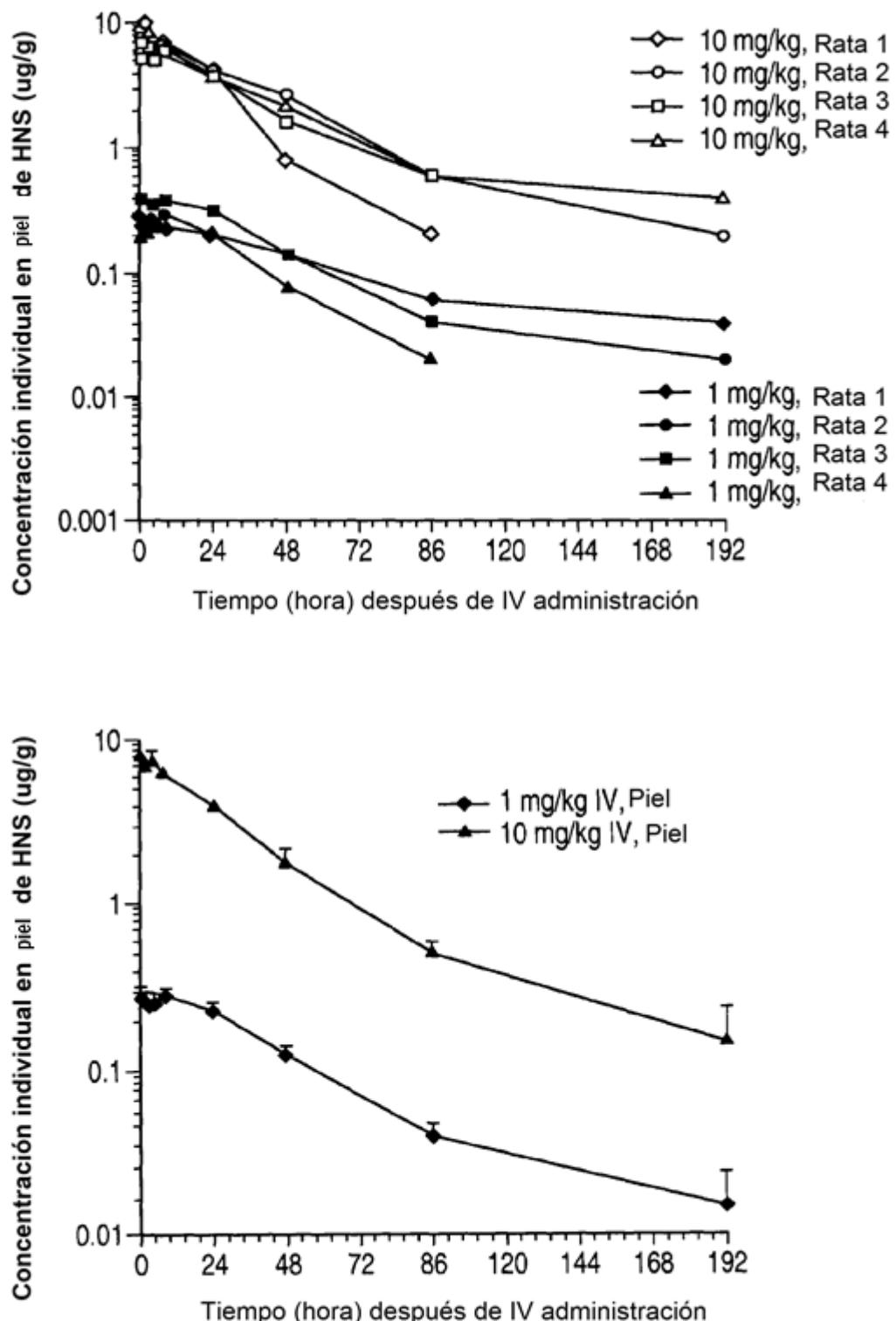
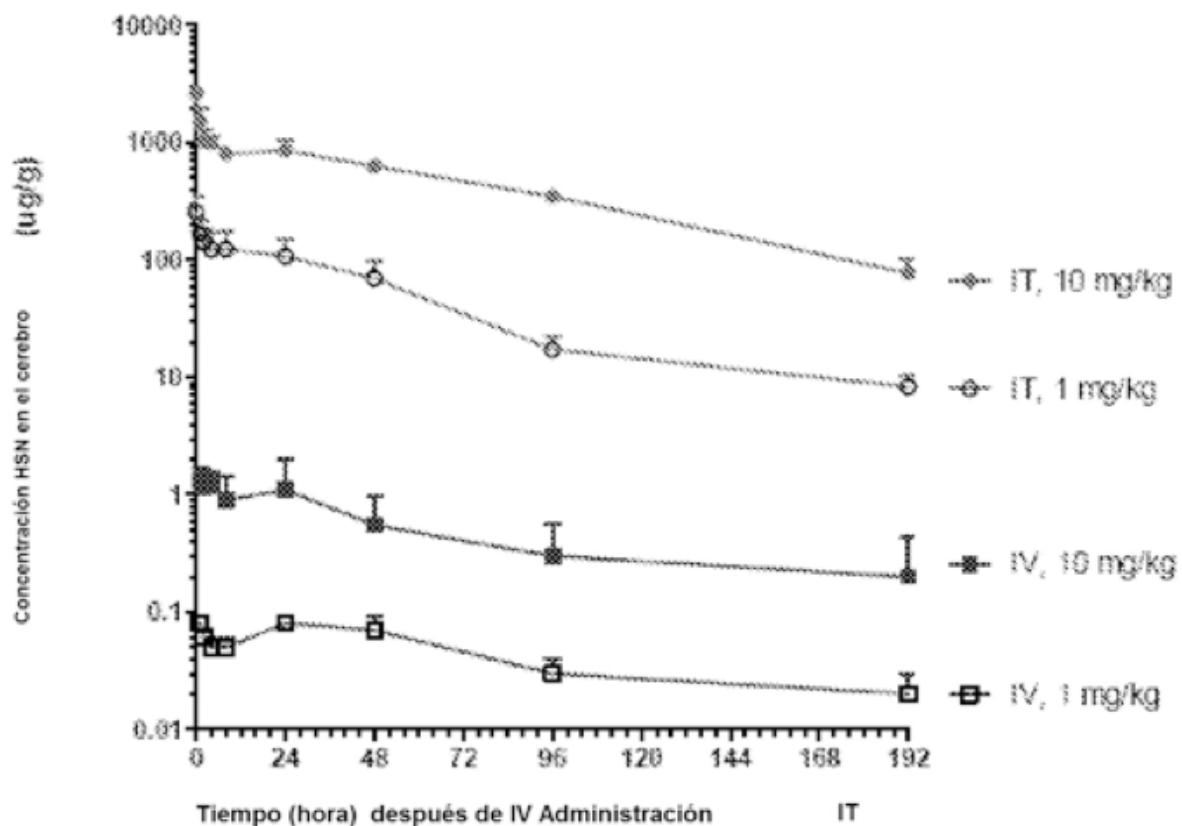


Fig. 162

**Figura 163**

ES 2 858 726 T3



Comparación de parámetros PK no compartimentales en el cerebro

			IT		IV		PROPORCIÓN IT/IV
	Parámetro	Unidad	Media	SD	Media	SD	
1 mg/kg	λz	1/hr	0,018	0,003	0,011	0,006	
	$t_{1/2}$	hr	45	7	71	23	
	C_{max}	ug/g	257	90	0,1	0,0	3212
	$AUC_{0-192hr}$	hr*ug/g	8393	2457	7	2	1138
10 mg/kg	λz	1/hr	0,014	0,001	0,102	0,180	
	$t_{1/2}$	hr	49	4	80	53	
	C_{max}	ug/g	2628	265	1,8	0,2	1501
	$AUC_{0-192hr}$	hr*ug/g	83962	10083	86	66	978

Fig. 164

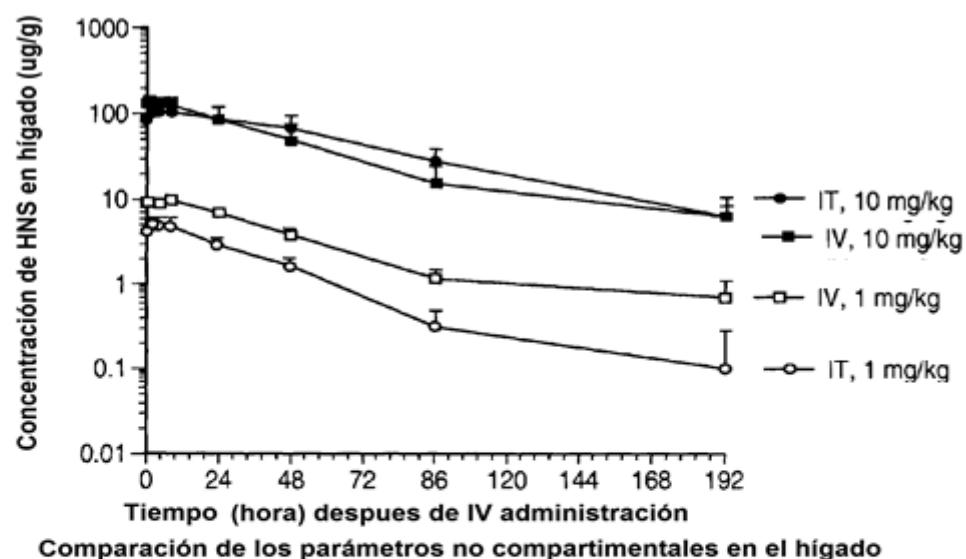


Figura 165

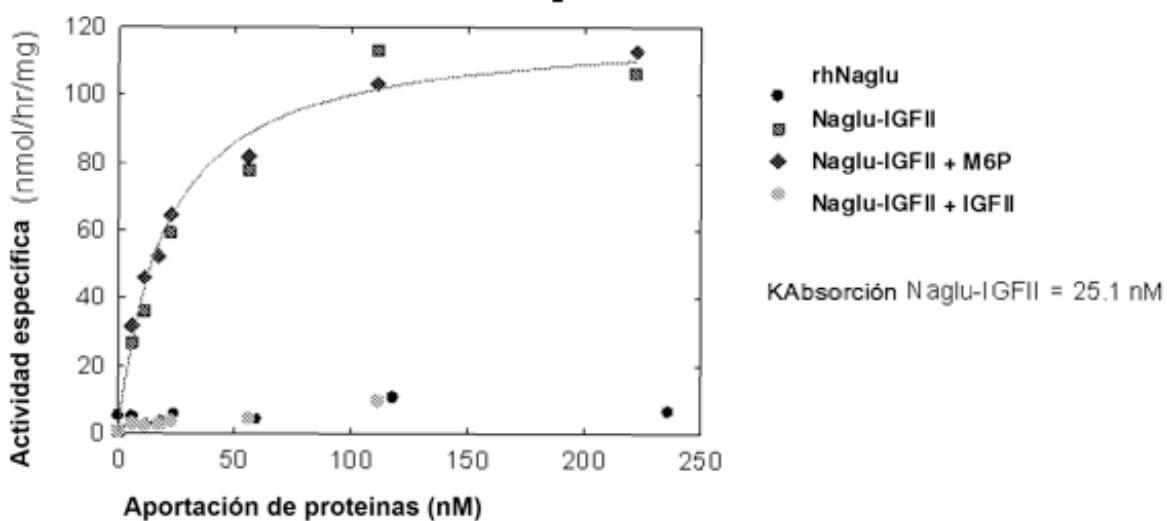


Figura 2-13 células de fibroblasto primarias de humano normal (células HF1156) fueron utilizadas para el estudio celular de internalización de rhNaglu y Naglu IGFII. Absorción celular de rhNaglu fue mínima, mientras que la absorción celular de Naglu-IGFII fue más pronunciada. La curva de saturación de Naglu-IGFII indica un receptor mediante absorción. Esta absorción estaba inhibida por IGFII, pero no manosa-6-fosfato

Figura 166

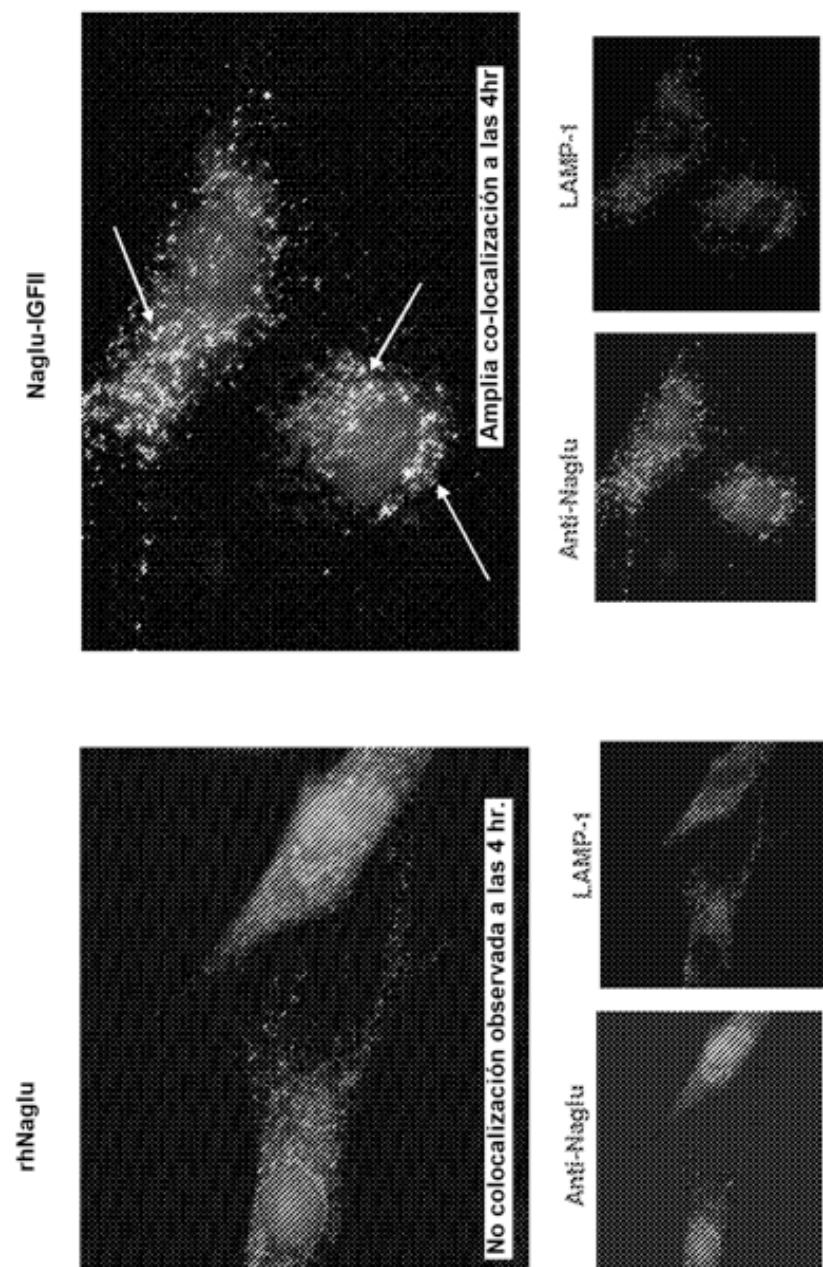


Figura 2.14. Estudio microscópico confocal utilizando células de fibroblasto del paciente SanB (GM01426). Internalización extensiva de Naglu-IGFII, y se observó la colocalización de Naglu-IGFII con Lamp-1.

Figura 167

Media de Actividad Naglu en KO, WT sin tratamiento y
Ratón het Naglu

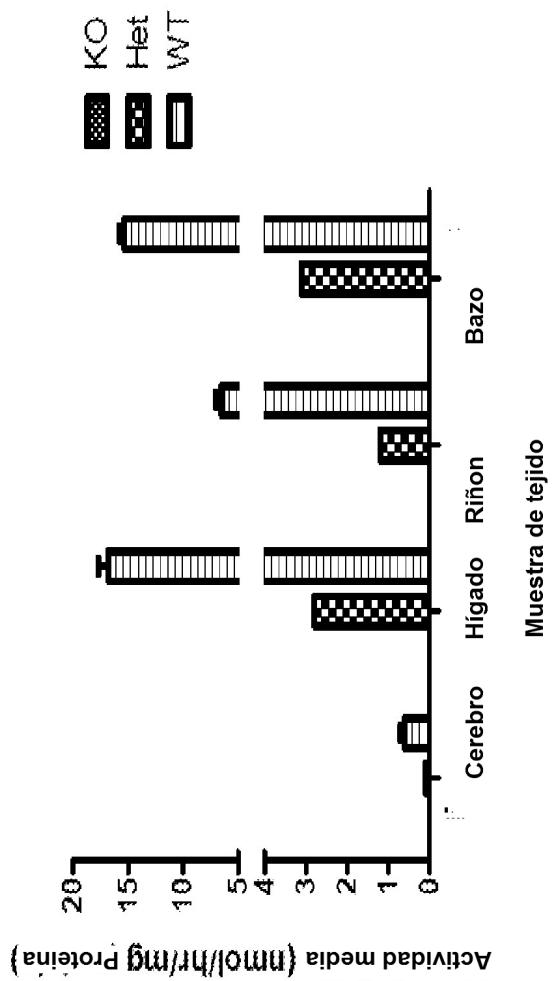


Figura 2-15. Actividad Naglu de tipo salvaje (WT), Naglu *-/-* (KO) y heterocigoto ratón Naglu *+/-* (het).
Deficiencia total en ratón Naglu en SanB fue observada
en cerebro, hígado, riñon y bazo

Figura 168

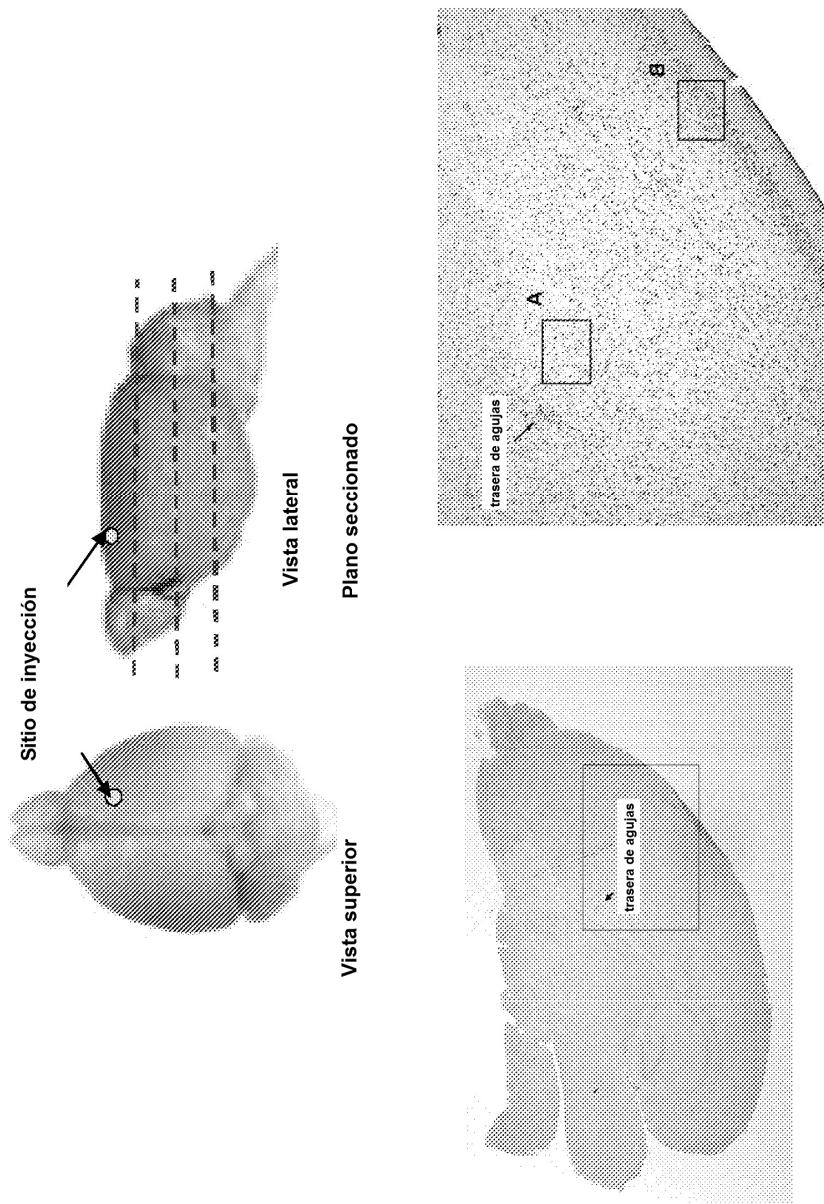


Figura 169

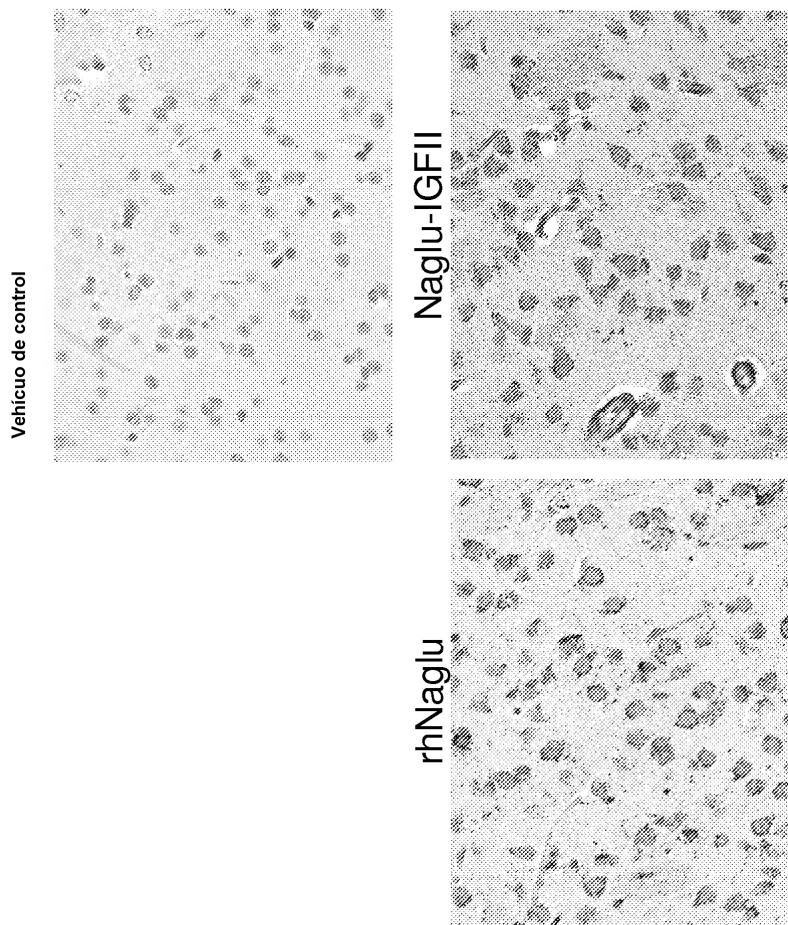


Figura 170

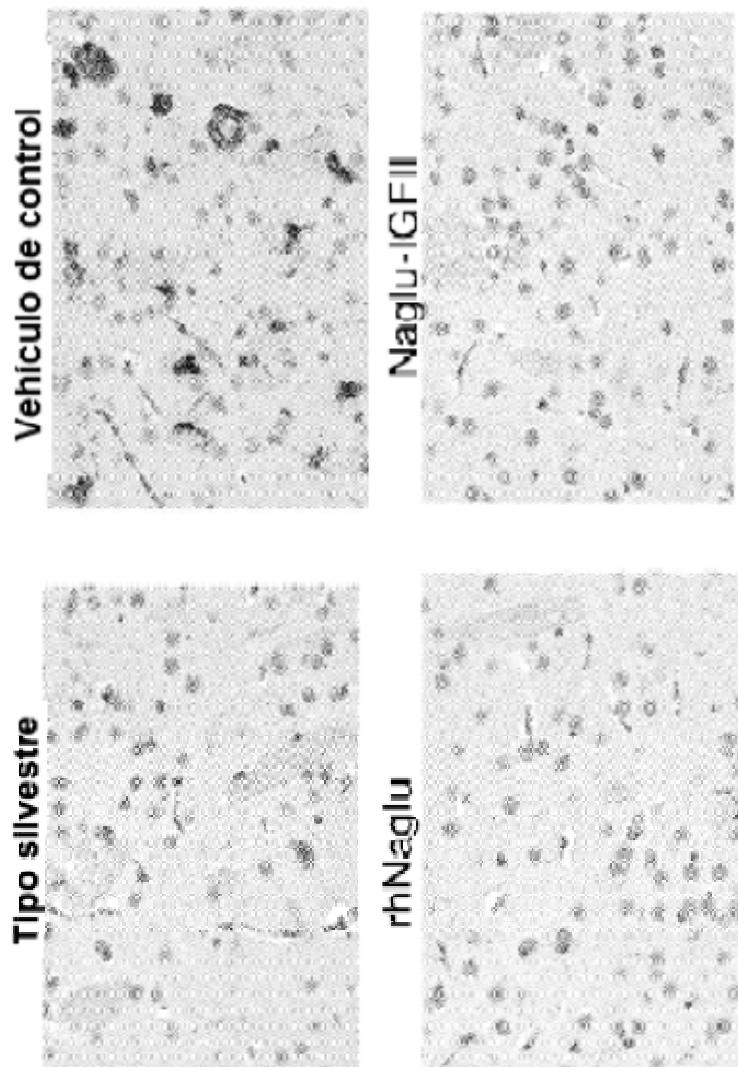
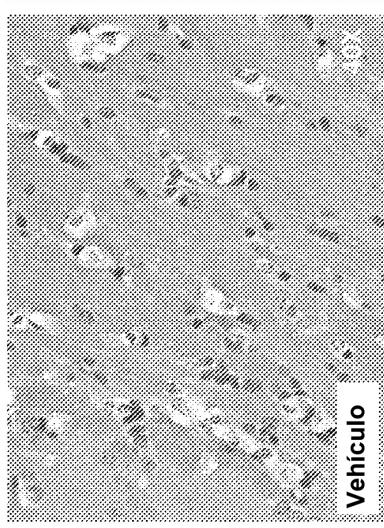
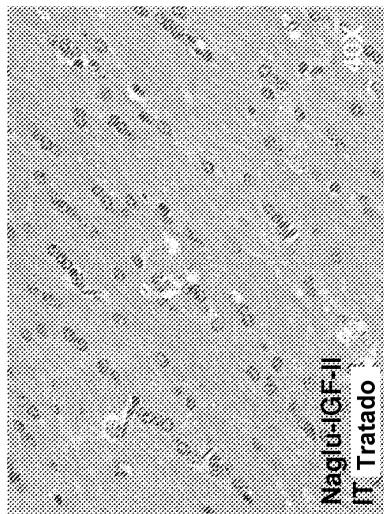
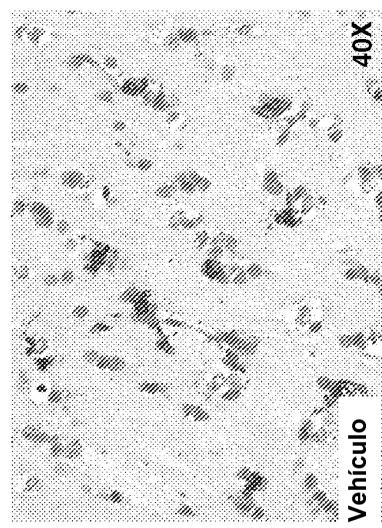
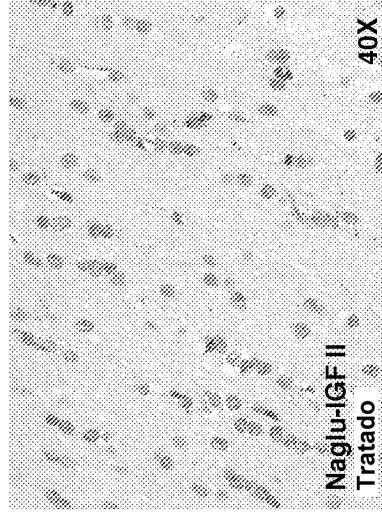


Figura 171

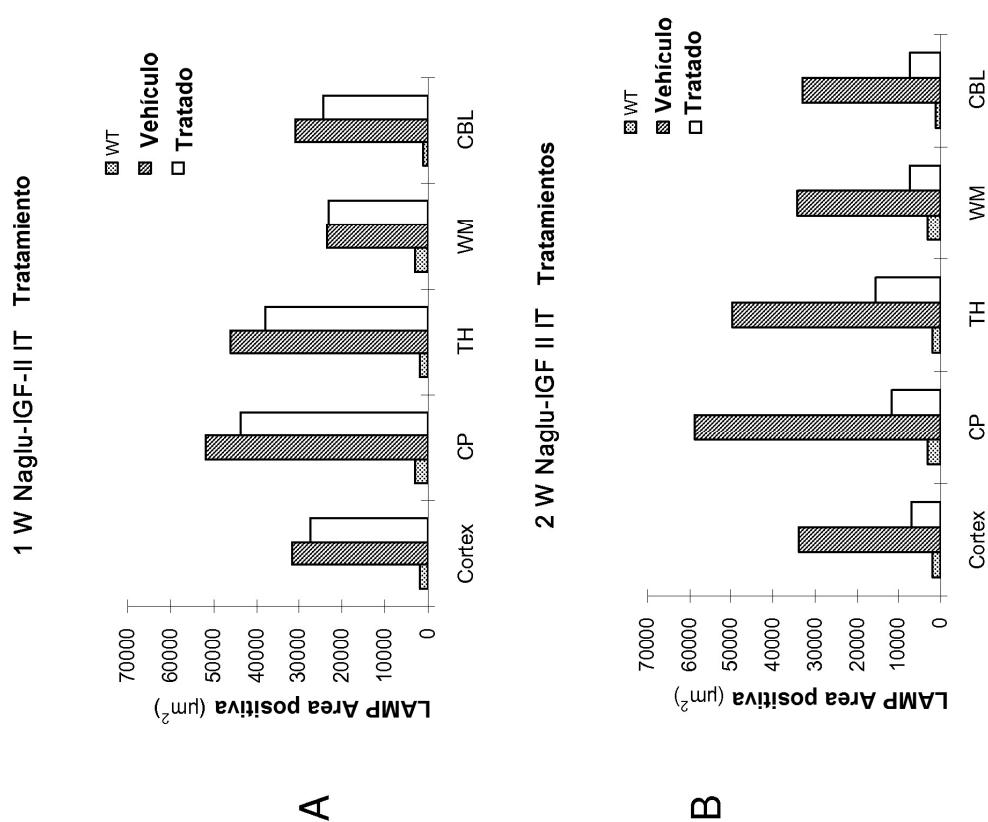


A



B

Figura 172

**Figura 173**

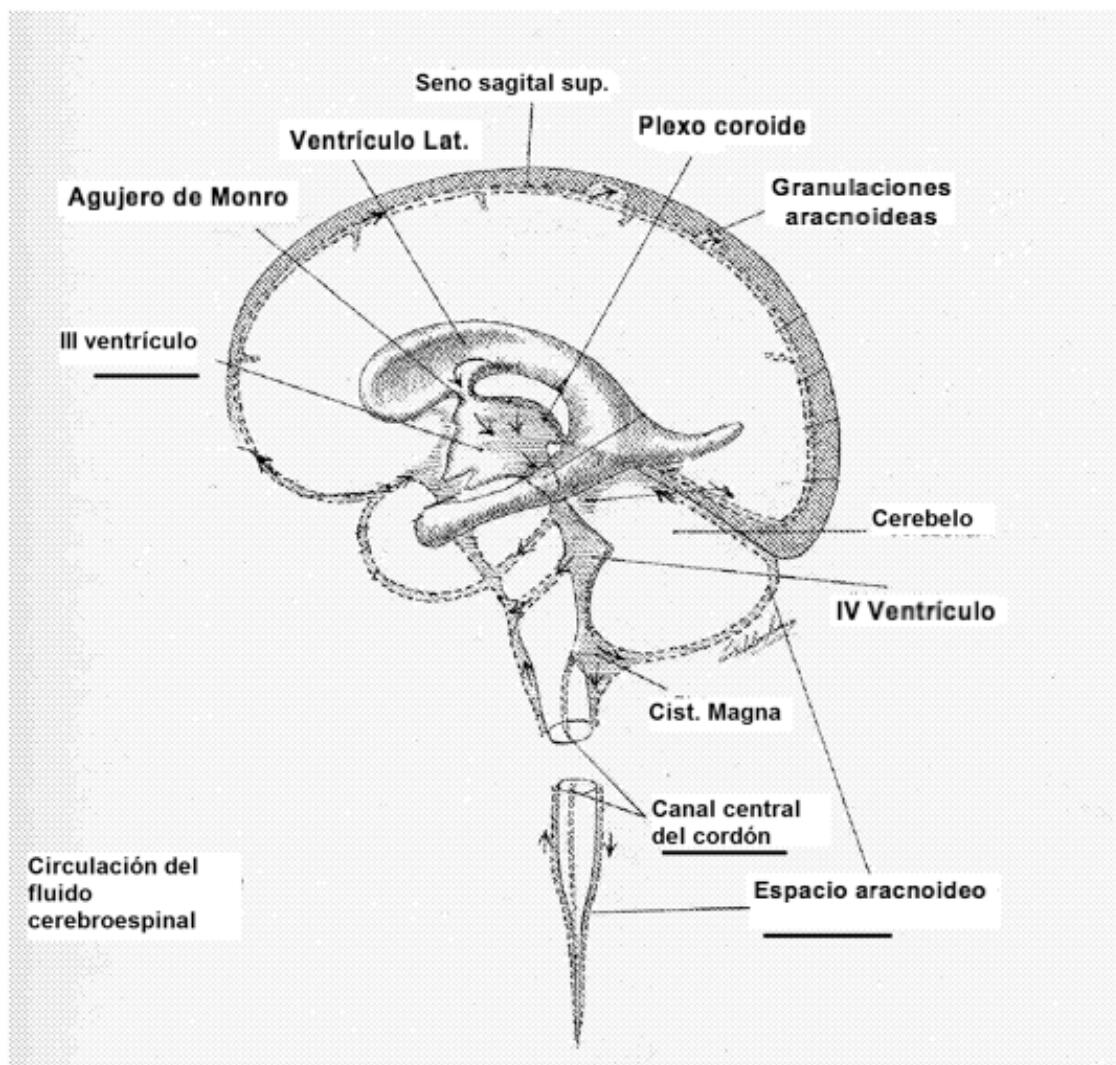


Figura 174

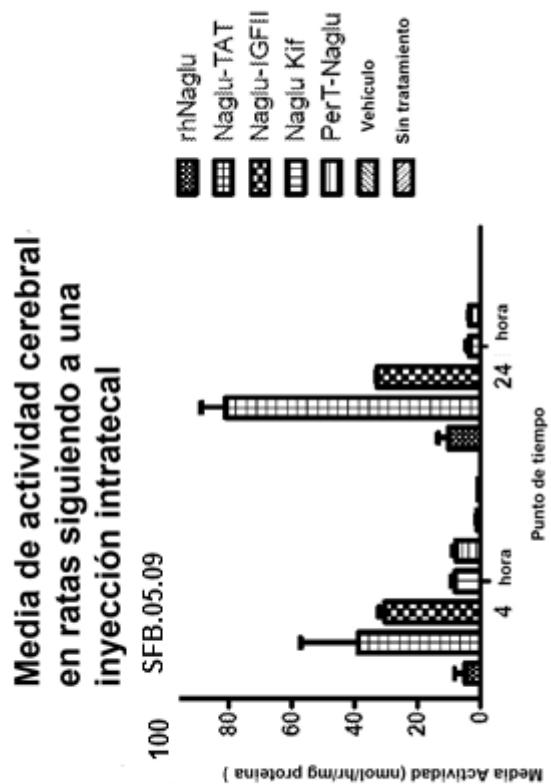


Figura 175

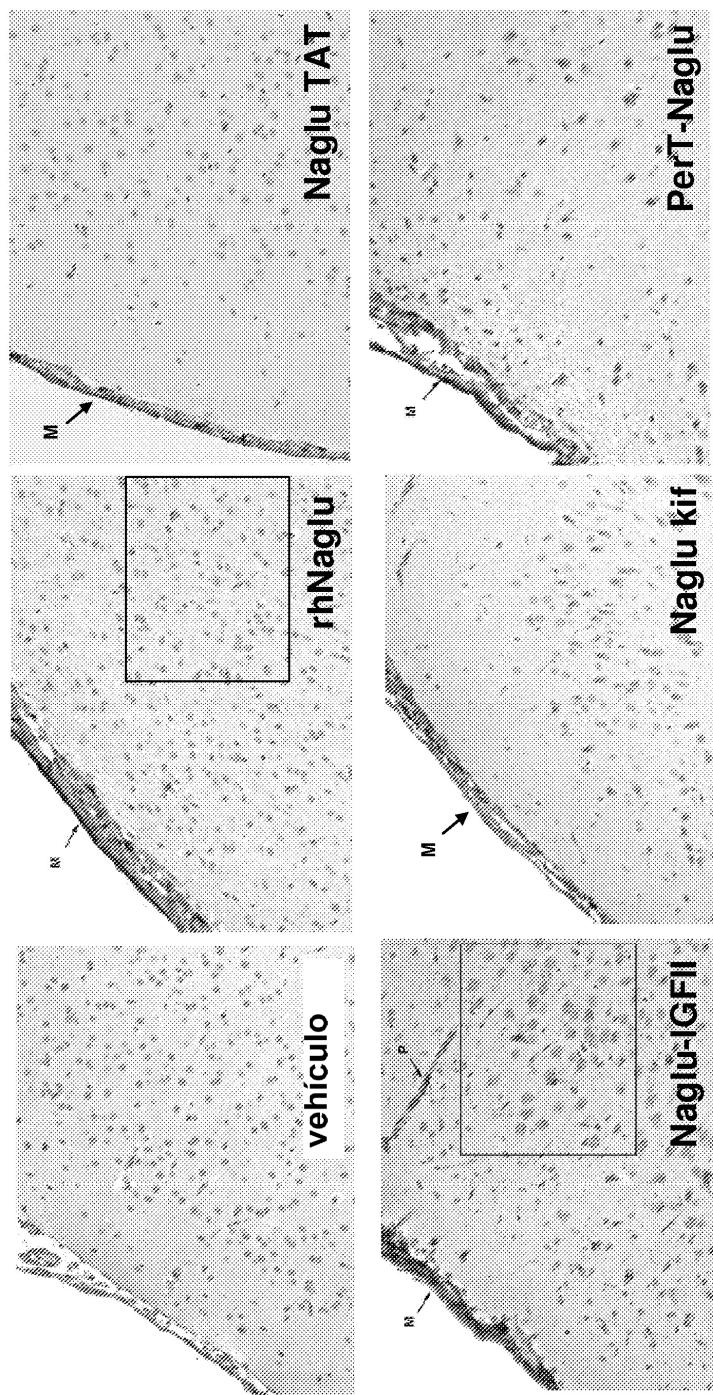


Figura 176

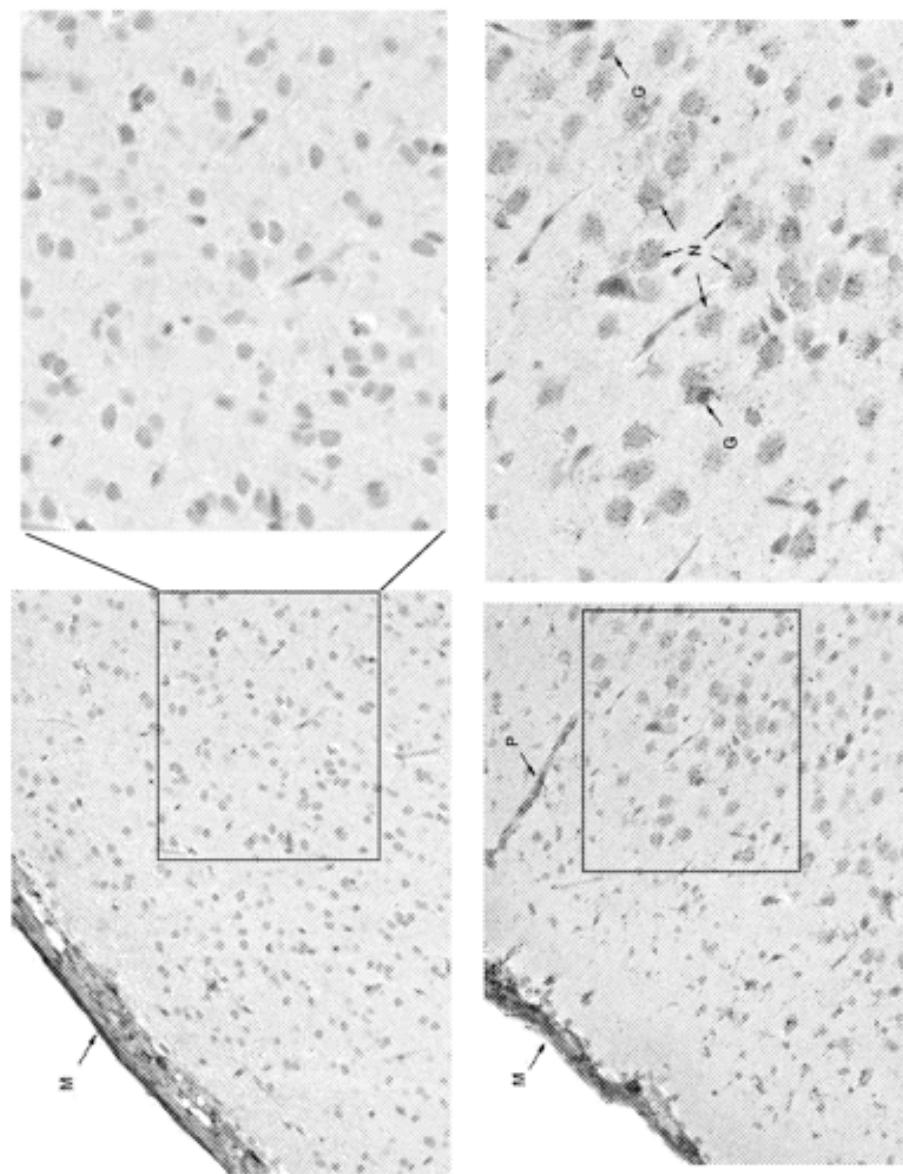


Figura 177

**Actividad media en ratón Naglu KO seguido de
inyección IT de Naglu-IGFII
SFB. 02.10**



Figura 178

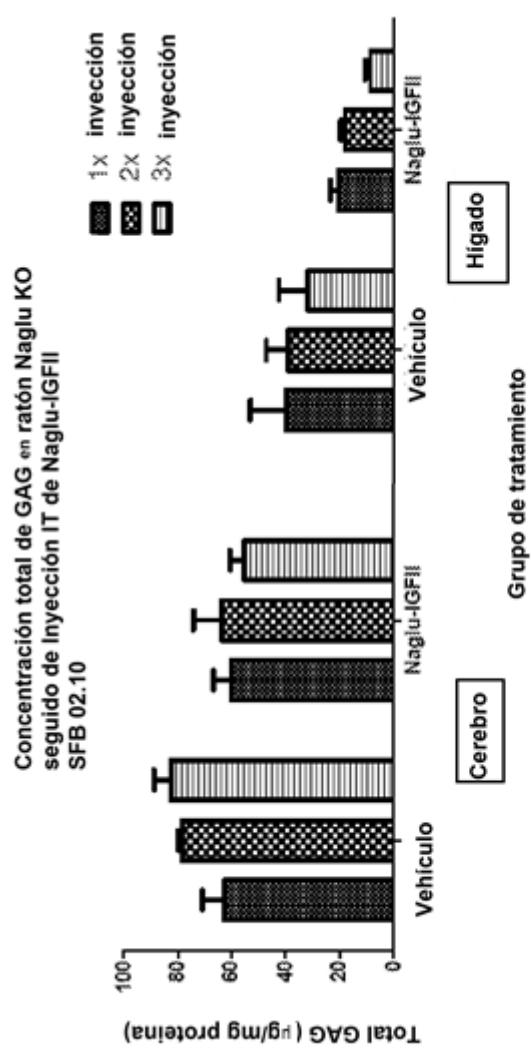


Figura 179

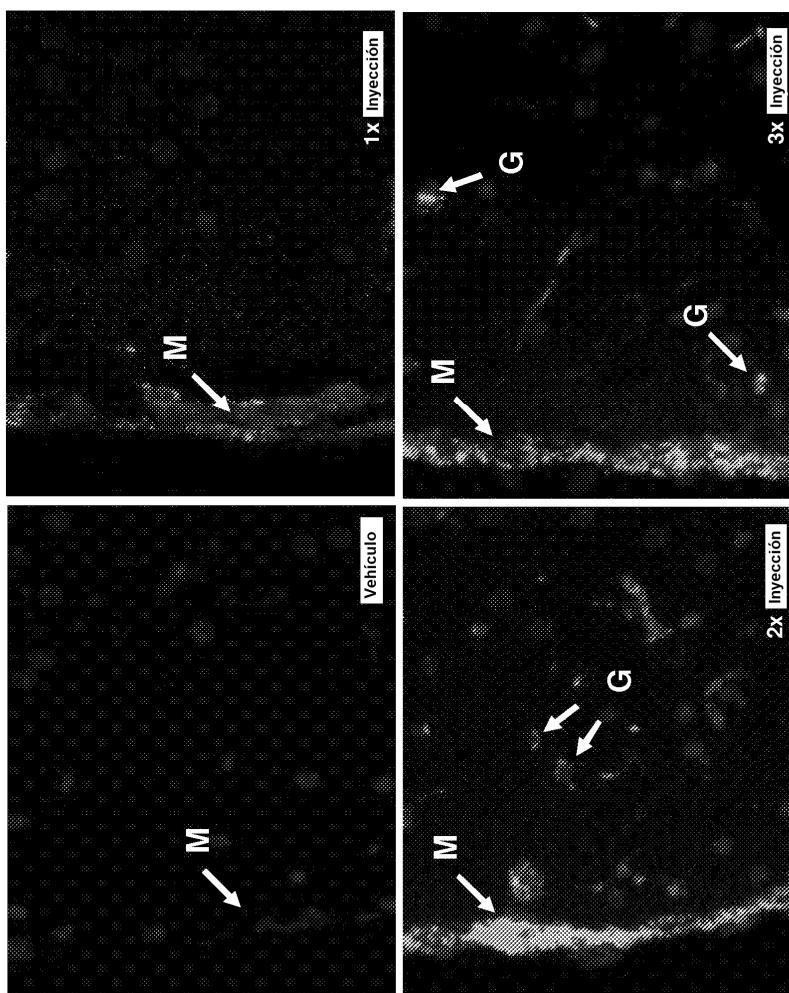


Figura 180

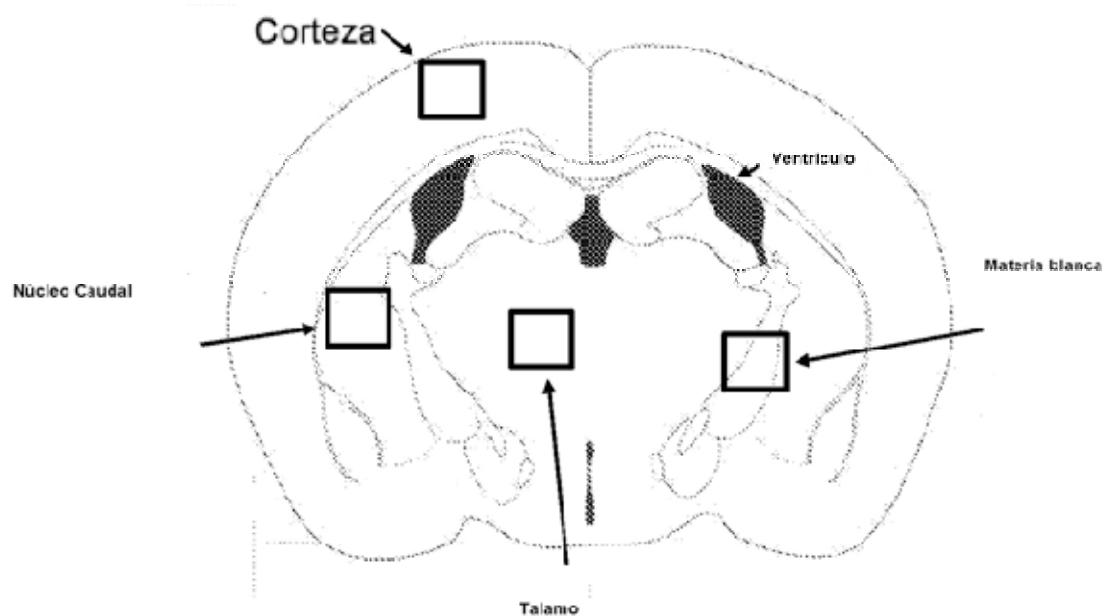


Figura 181

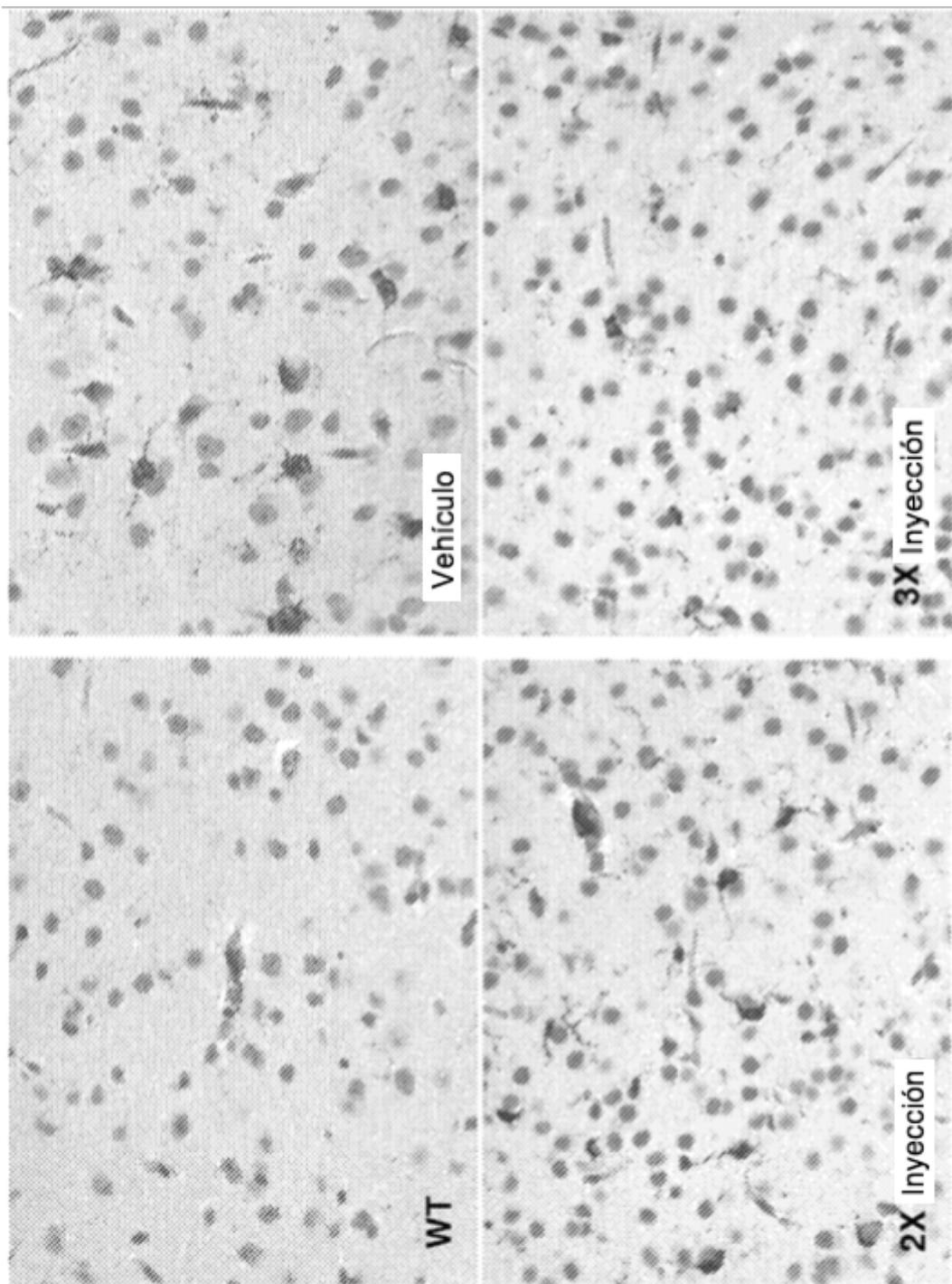


Figura 182

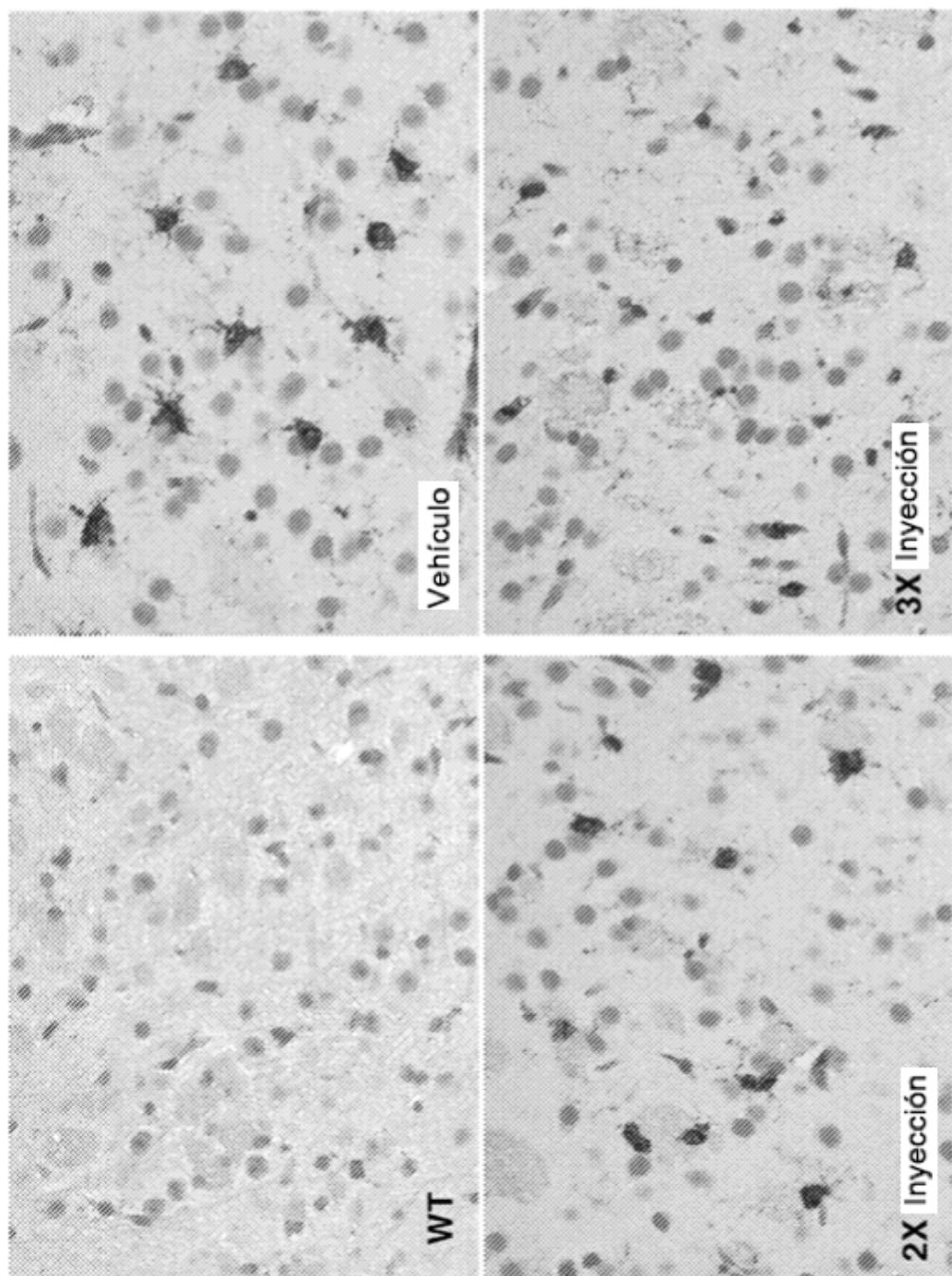


Figura 183

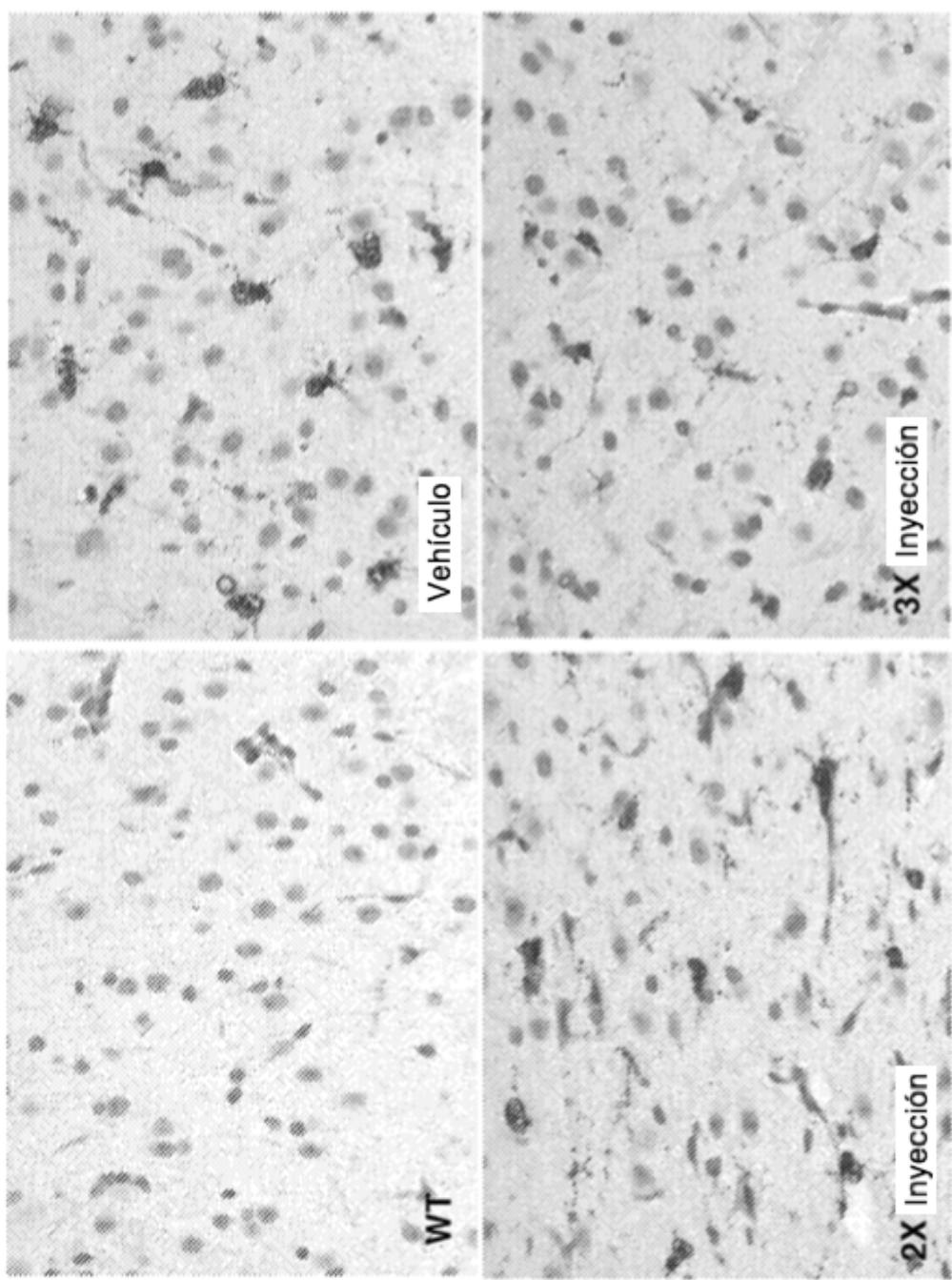


Figura 184

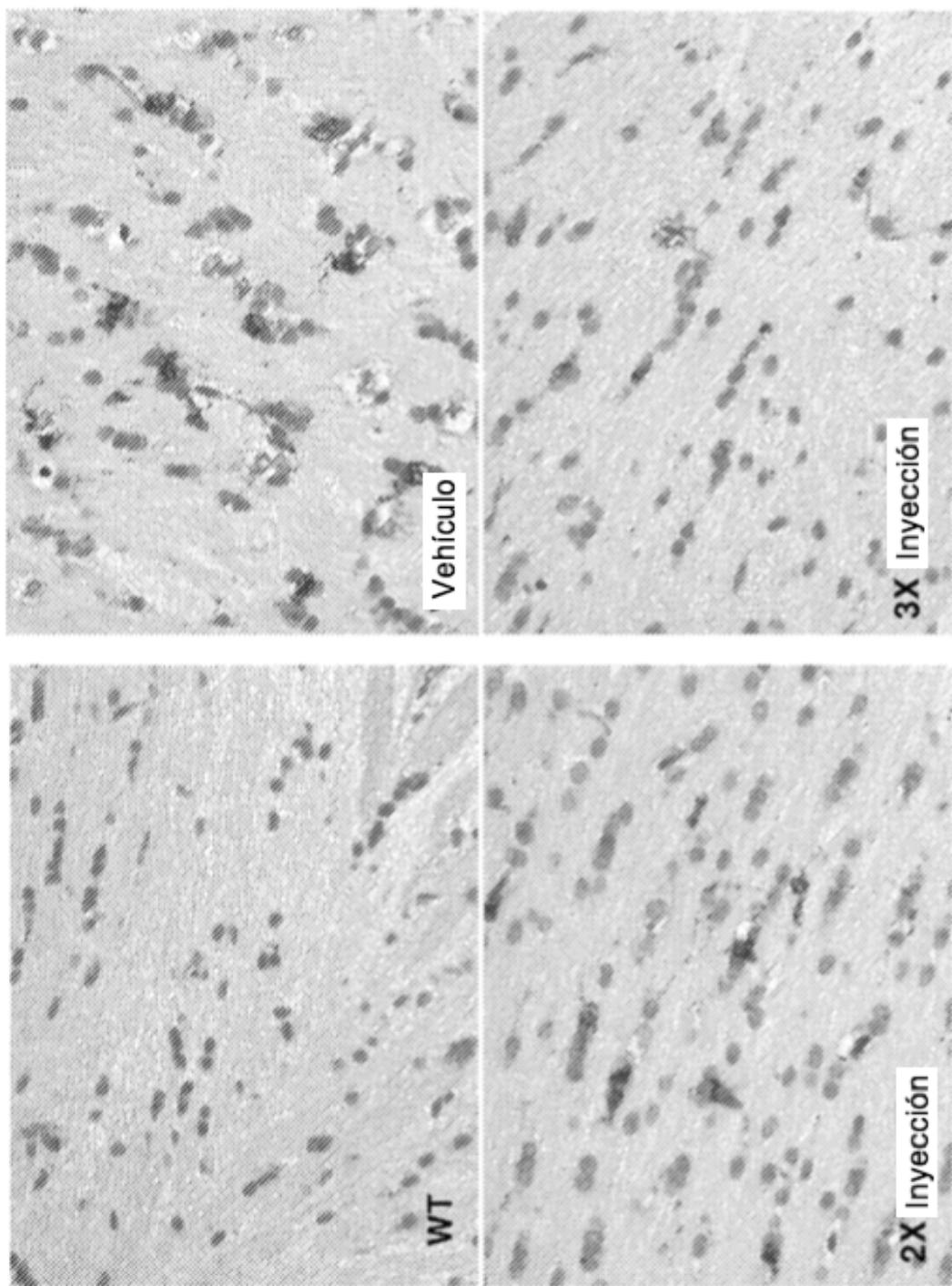


Figura 185

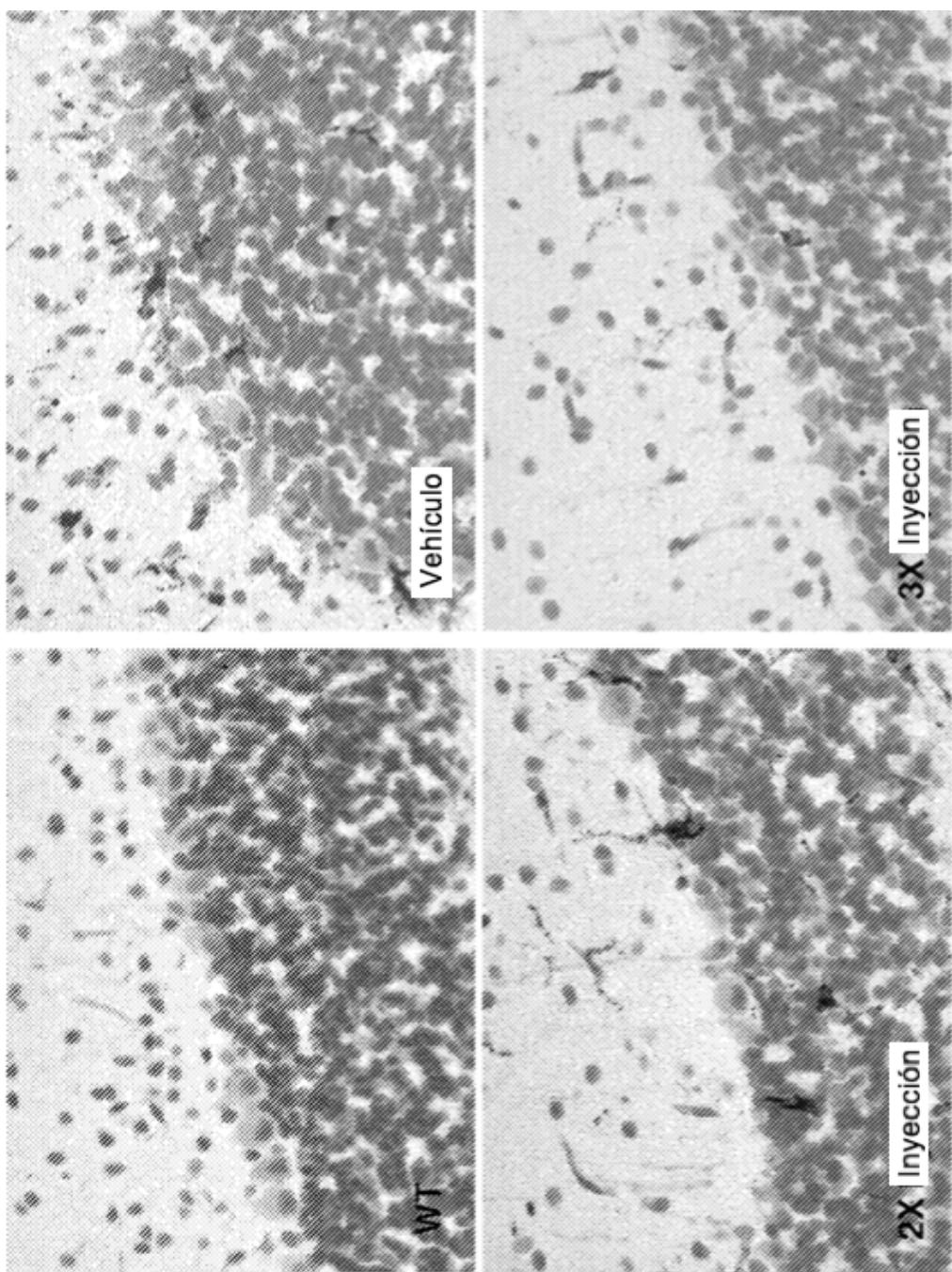


Figura 186

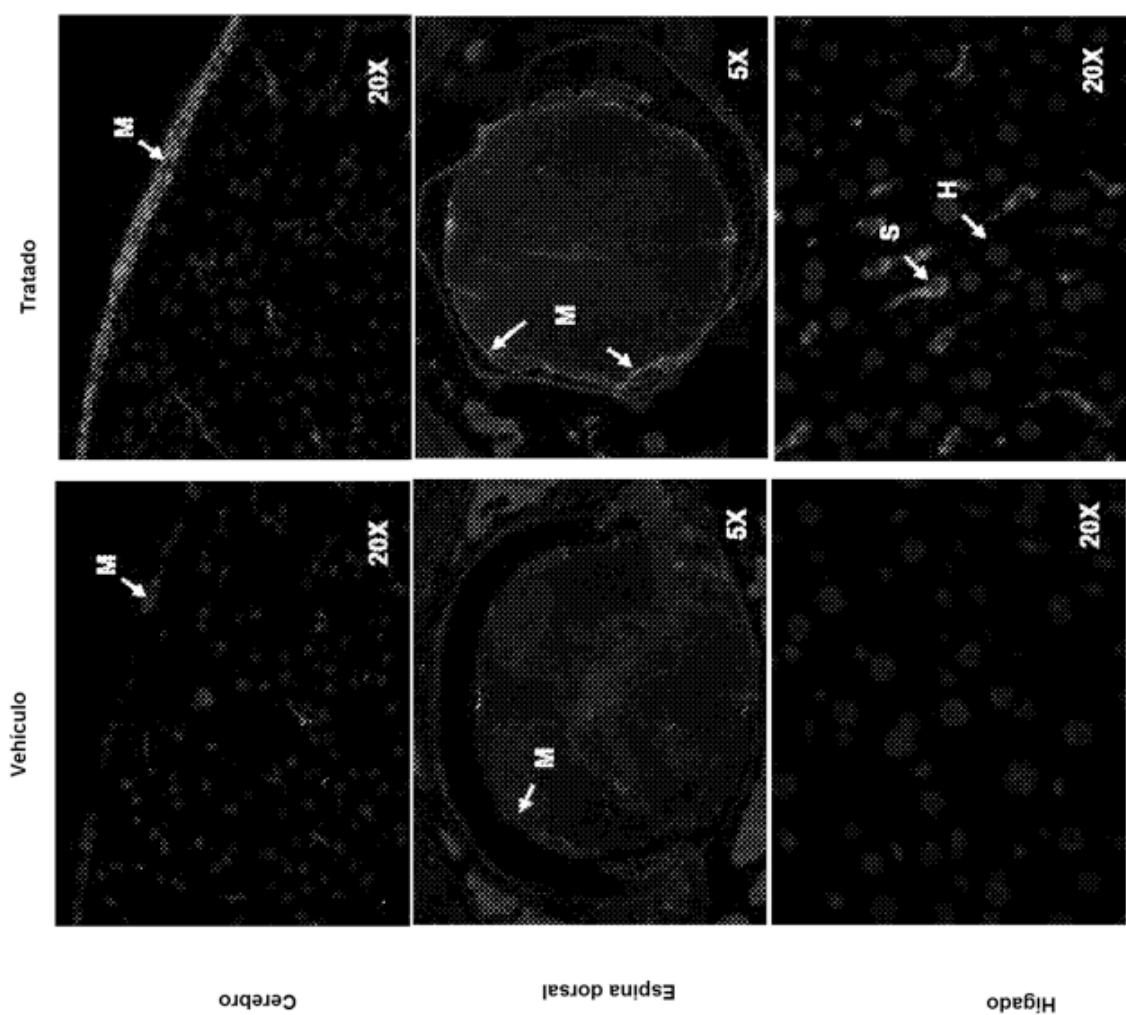


Fig. 187

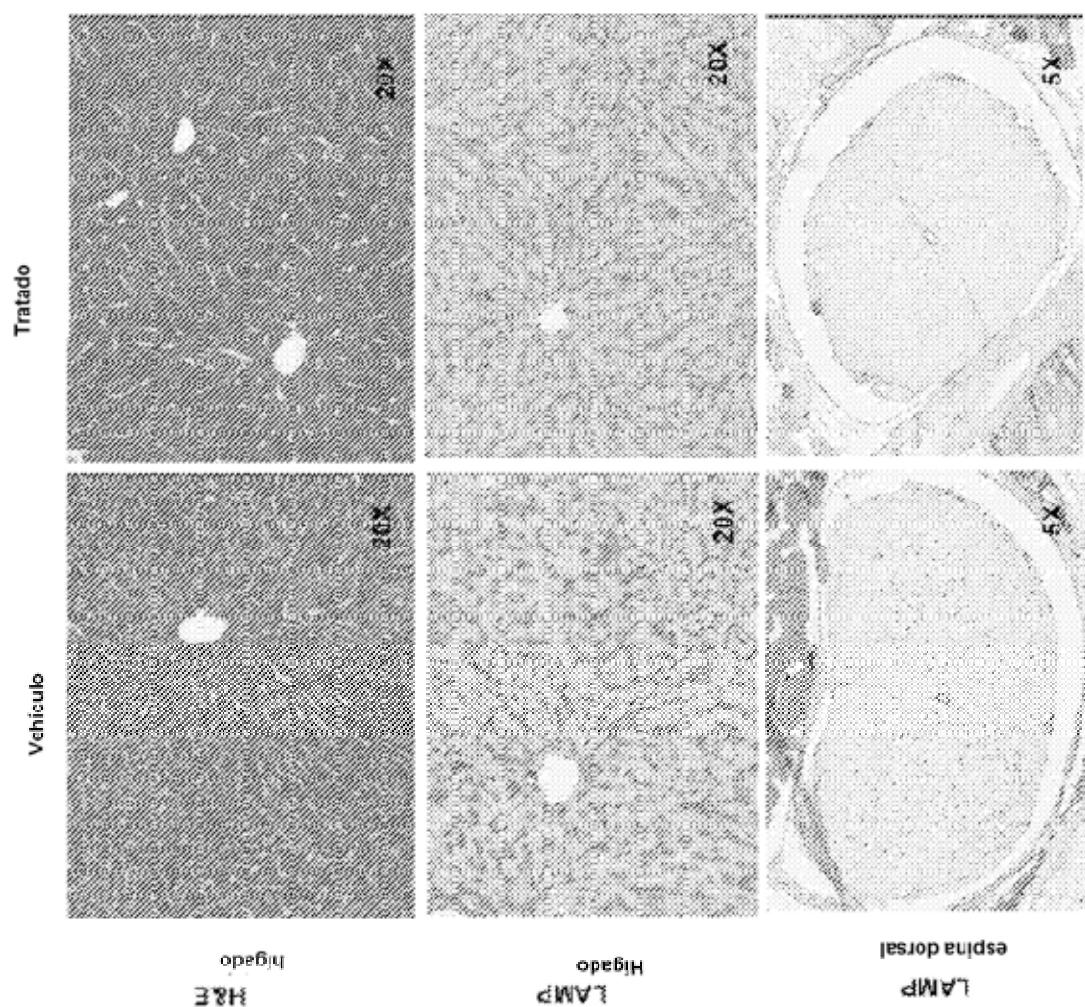


Fig. 188

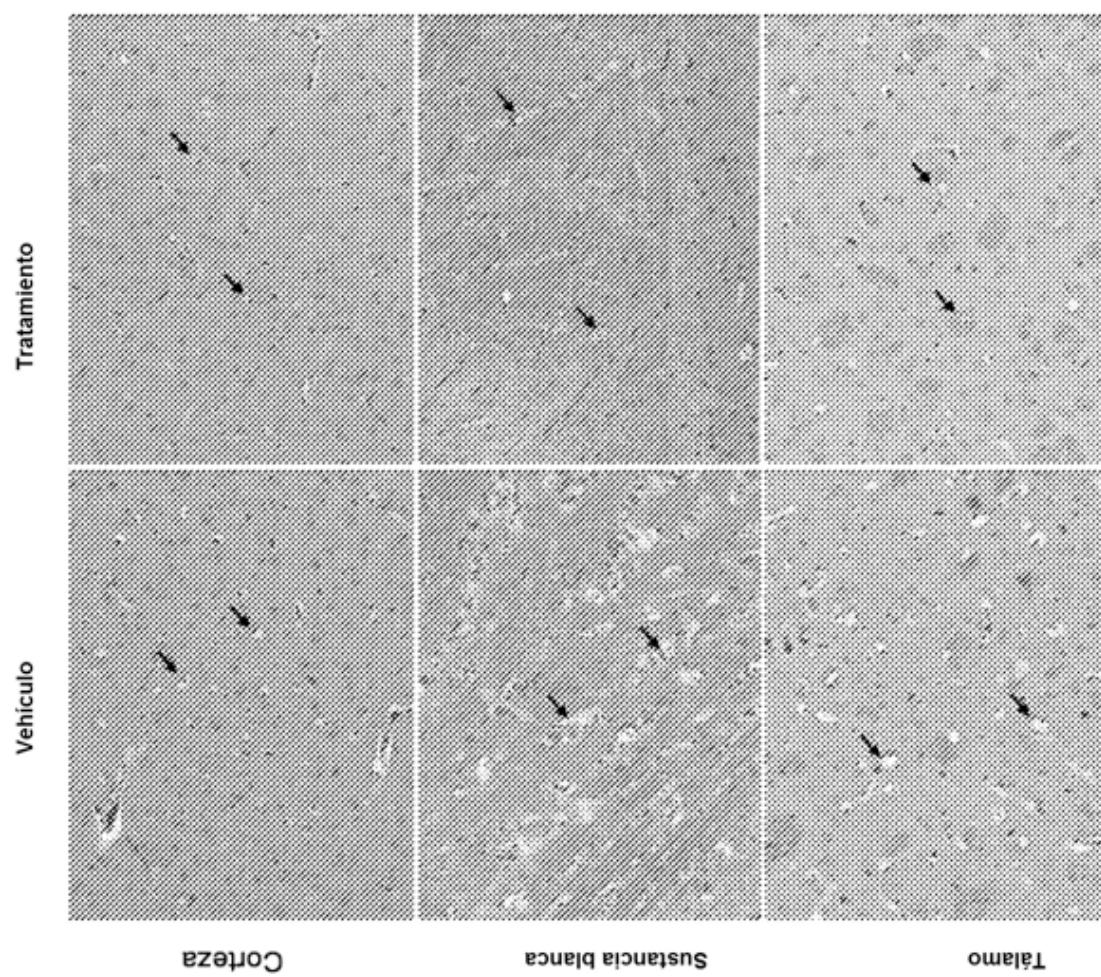


Fig. 189A

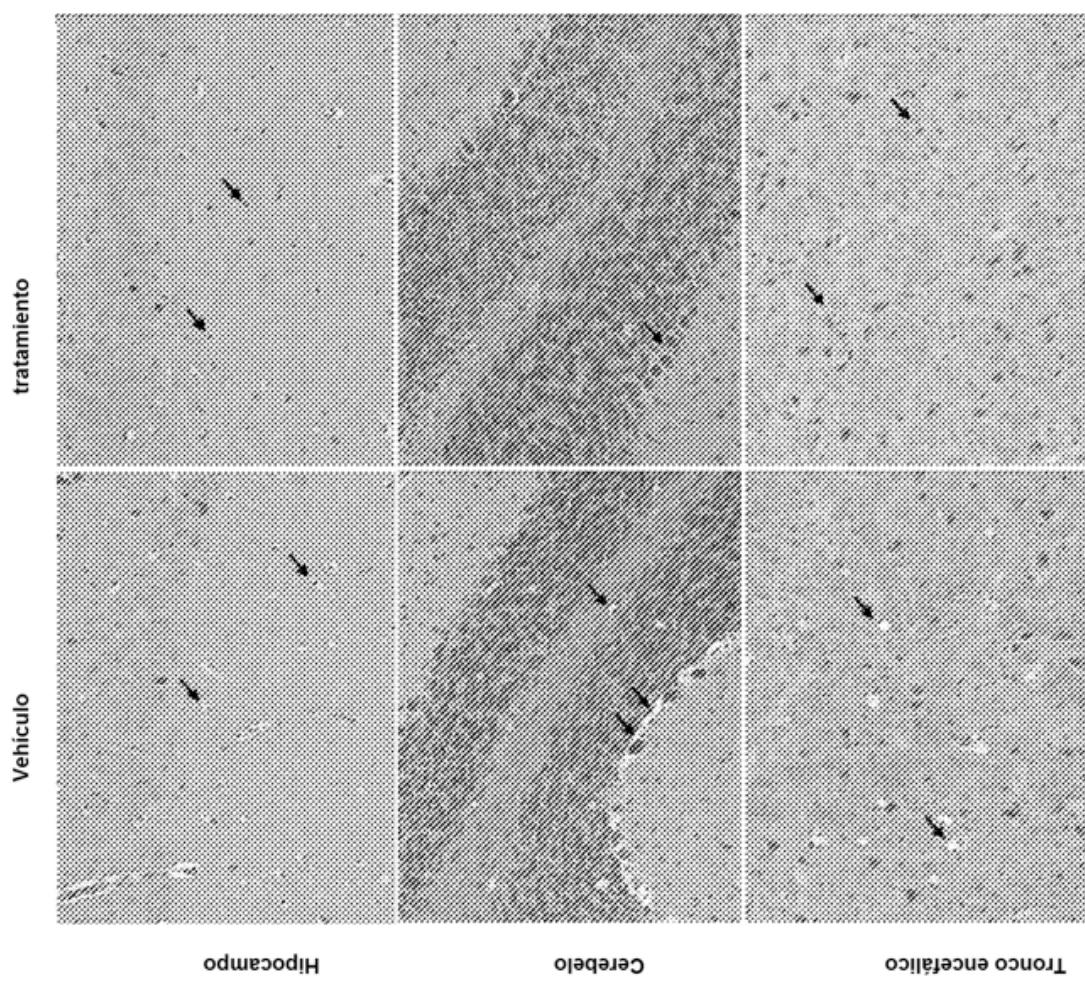


Fig. 189B

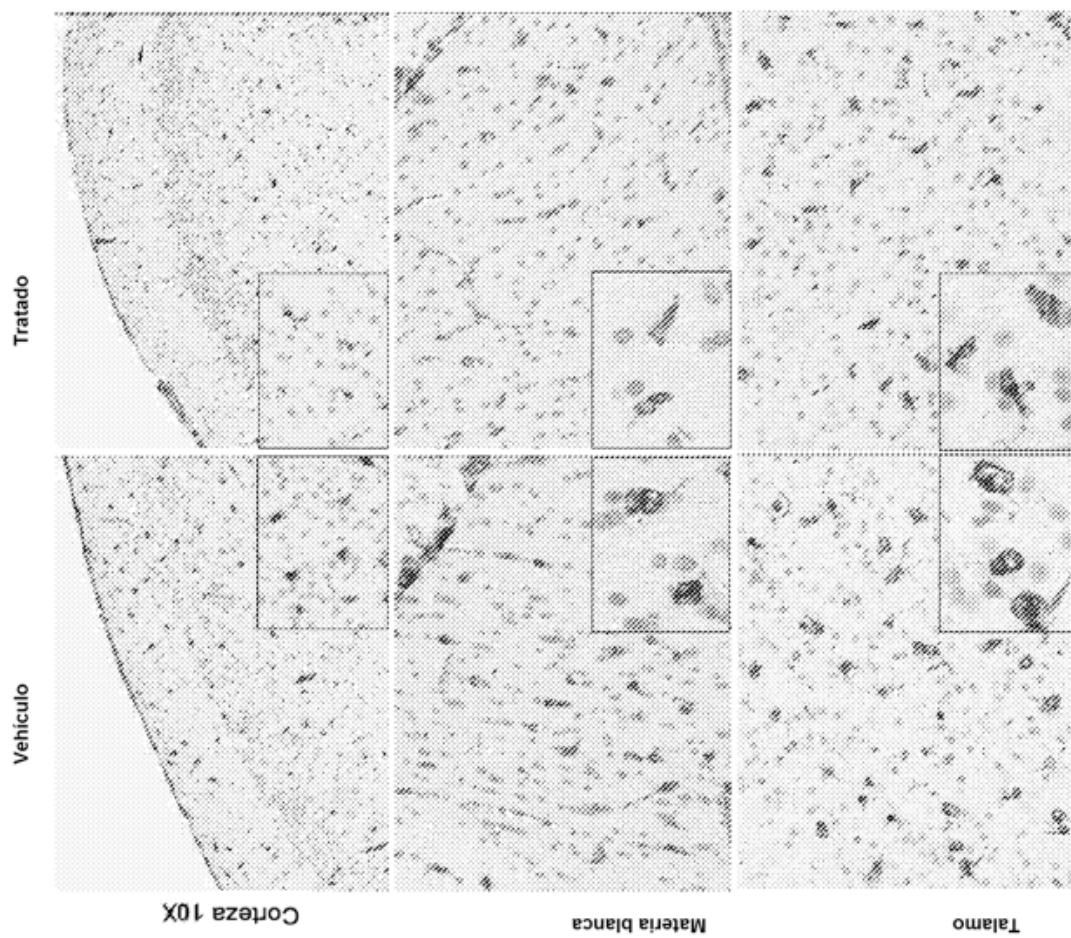


Fig. 190A

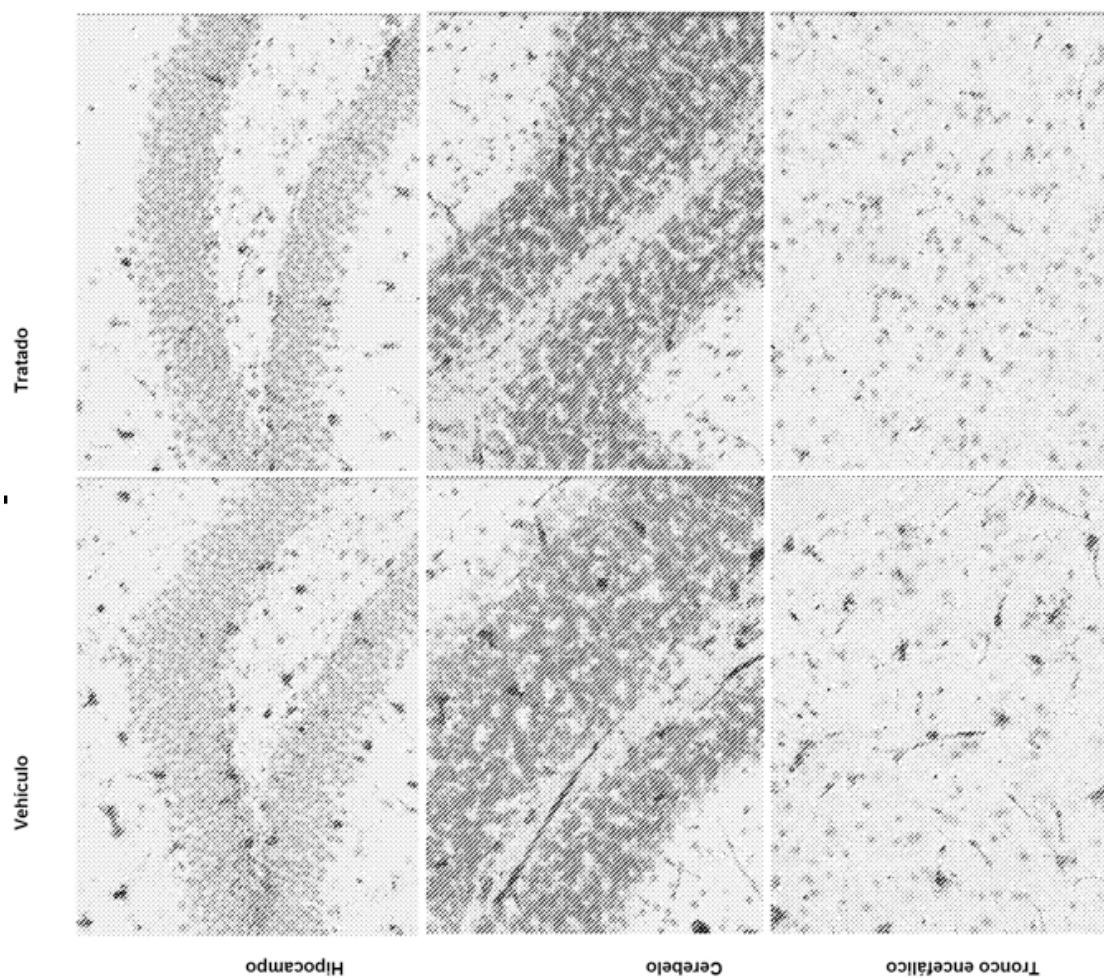


Fig. 190B

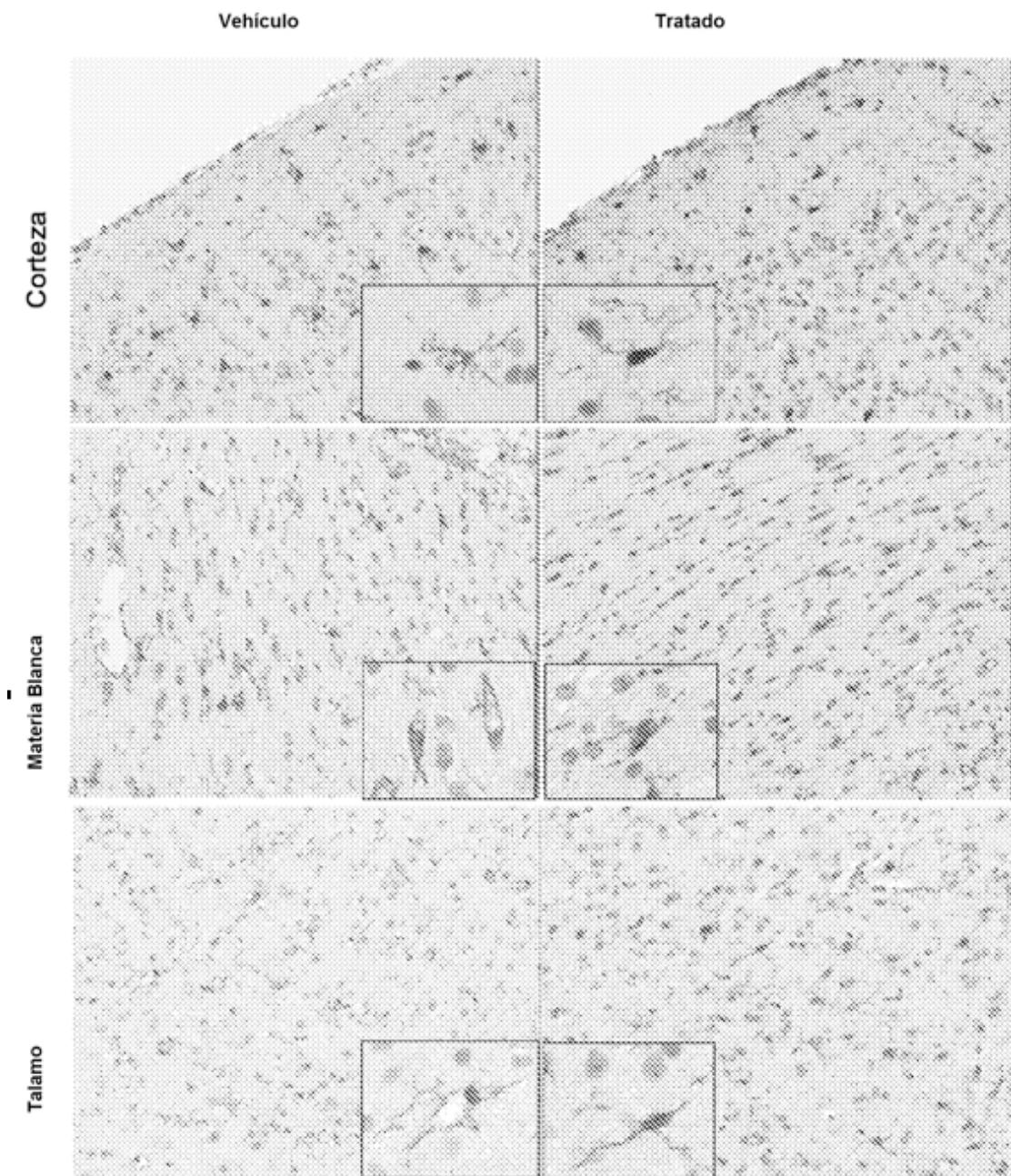


Fig. 191A

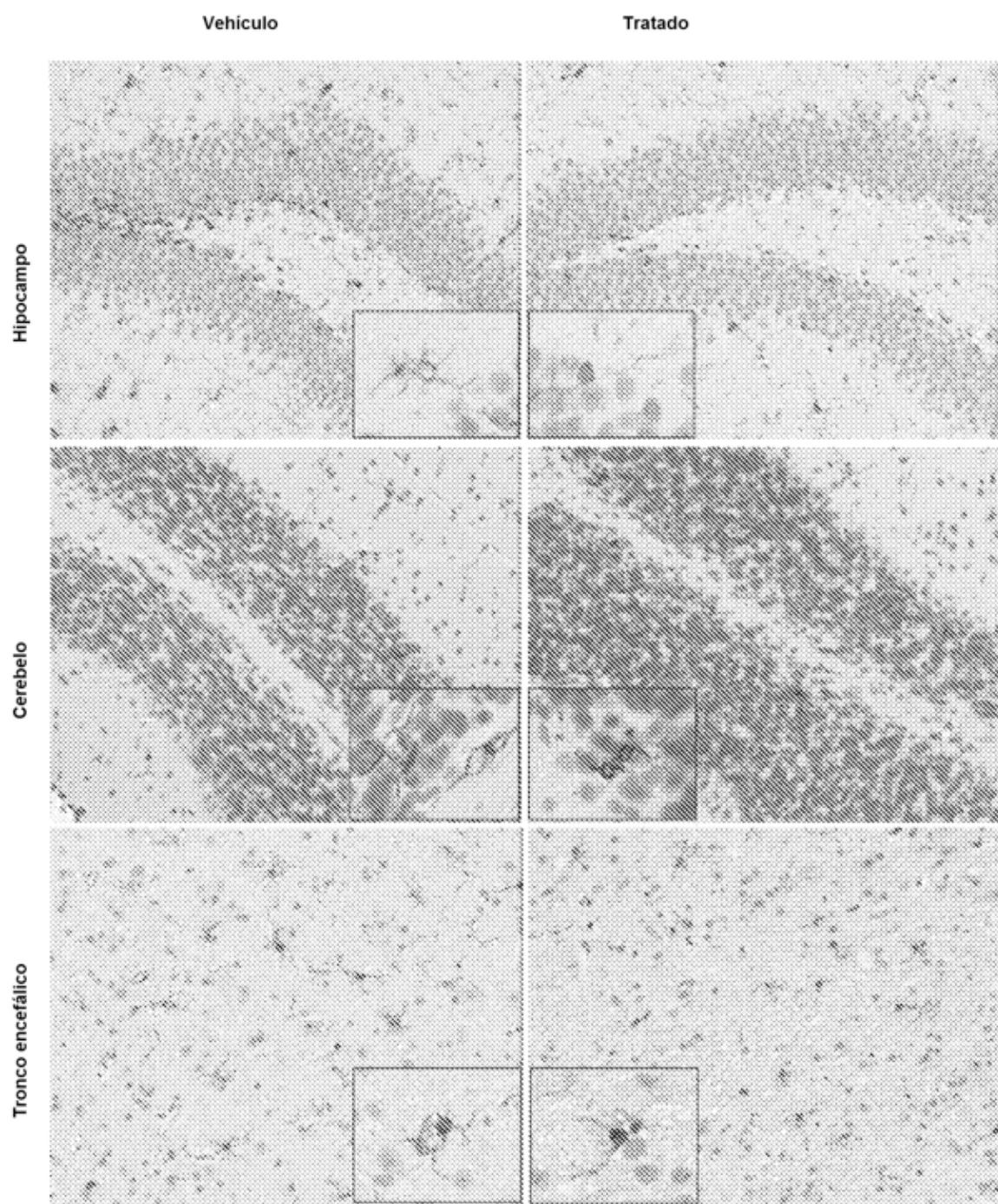


Fig. 191B

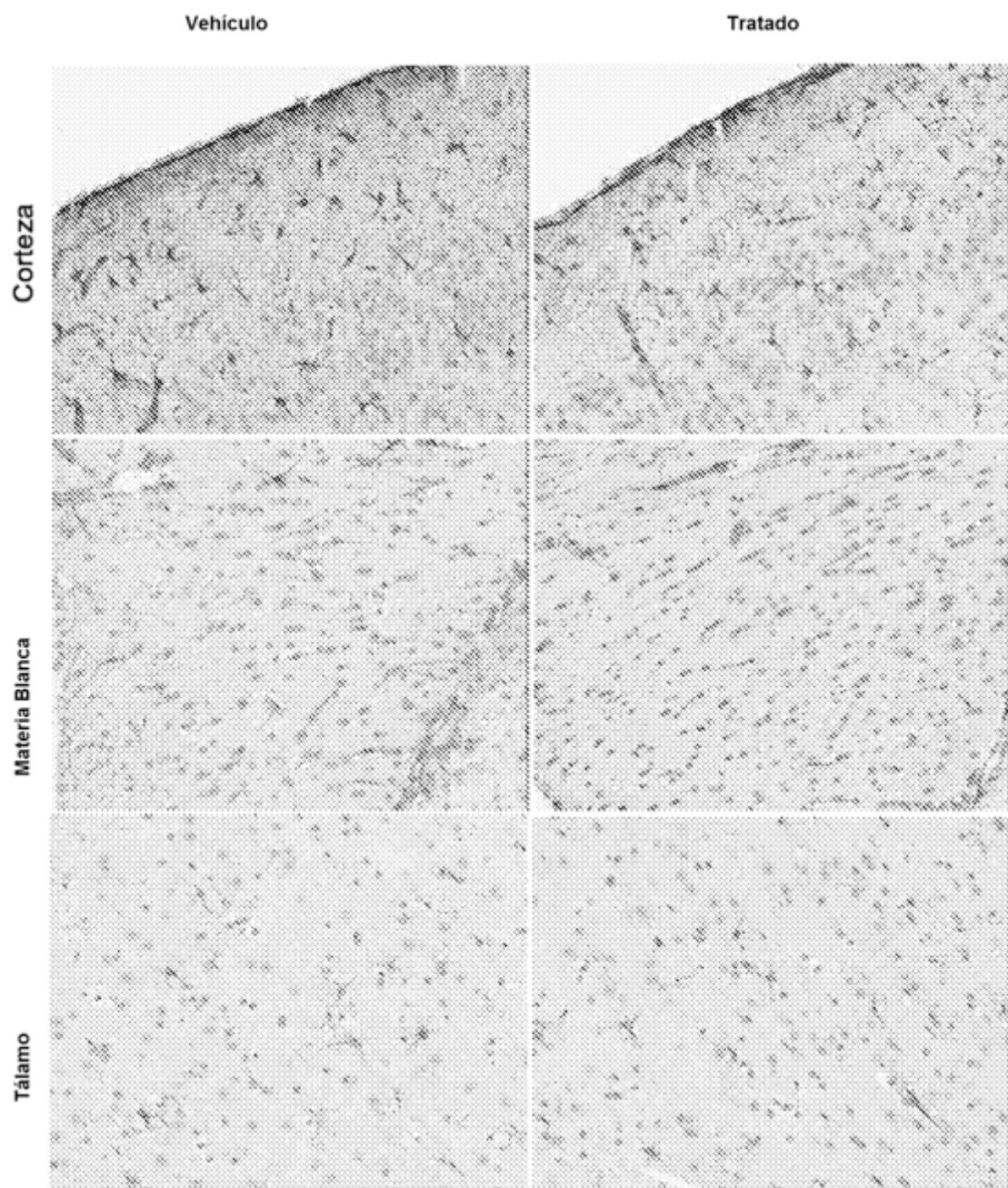


Fig. 192A

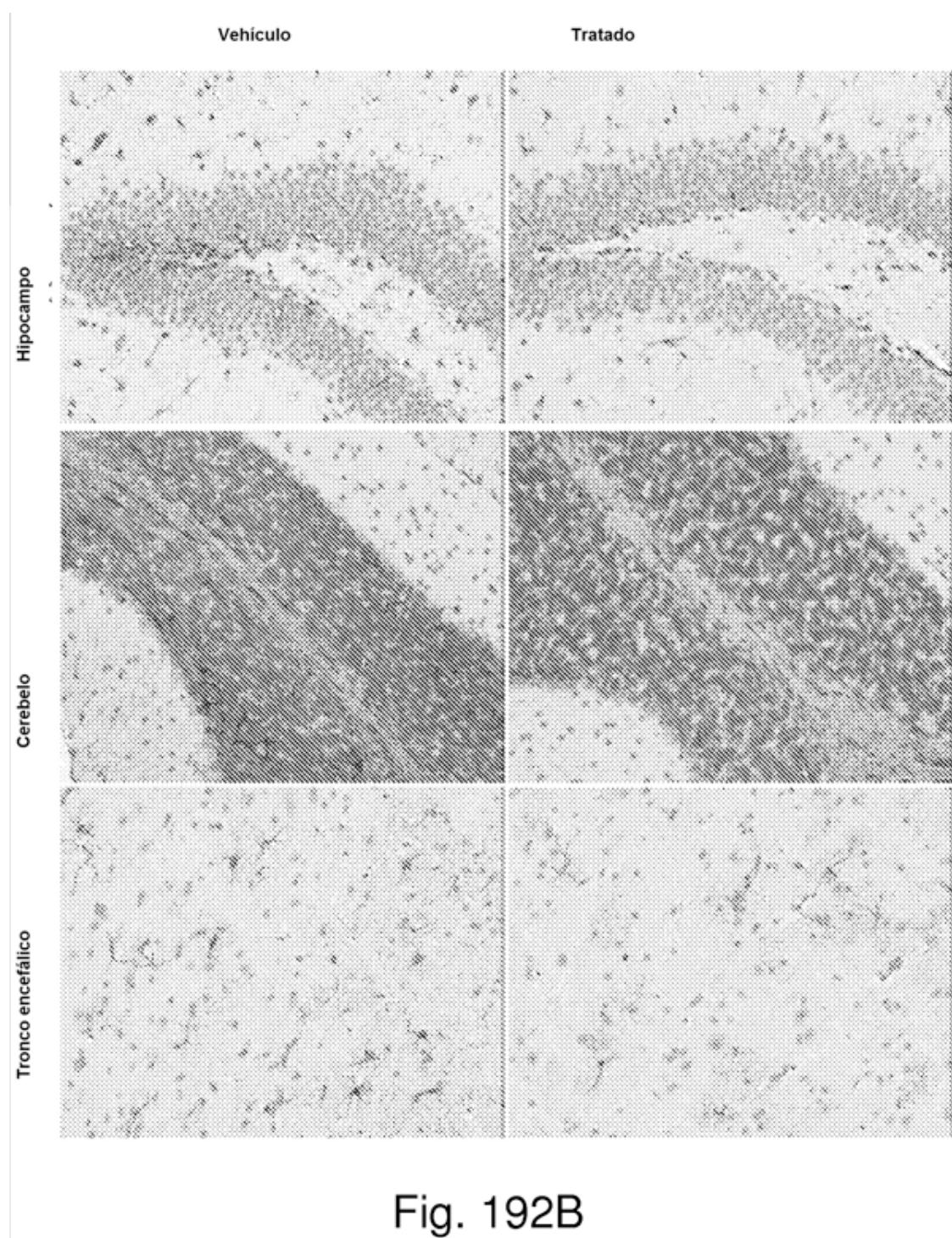


Fig. 192B