

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 197**

51 Int. Cl.:

A61K 38/46 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2016** **PCT/KR2016/015060**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.07.2017** **WO17116066**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2016** **E 16882018 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024** **EP 3397270**

54 Título: **Composiciones para usar en el tratamiento del síndrome de Hunter**

30 Prioridad:

30.12.2015 US 201562272843 P
02.08.2016 US 201662369970 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
06.09.2024

73 Titular/es:

GREEN CROSS CORPORATION (50.0%)
(Bojeong-dong) 107, Ihyeon-ro 30beon-gil,
Giheung-gu, Yongin-si
Gyeonggi-do 16924, KR y
MEDIGENEBIO CORPORATION (50.0%)

72 Inventor/es:

OKUYAMA, TORAYUKI;
JIN, THONG-GYU;
BYUN, HAN-YEUL;
SEO, JIN-WOOK;
LEE, BYOUNG-JU;
KIM, YONG-CHUL;
JANG, IN-YOUNG y
LEE, KYUHYUN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por la
Oficina Europea de Patentes

ES 2 978 197 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

Composiciones para usar en el tratamiento del síndrome de Hunter

Campo técnico

Esta invención se dirige a composiciones mejoradas para usar en el tratamiento del síndrome de Hunter.

5 Antecedentes de la técnica

La mucopolisacaridosis tipo II (MPS II, síndrome de Hunter) es un trastorno de almacenamiento lisosómico hereditario recesivo ligado al cromosoma X causado por una deficiencia de iduronato-2-sulfatasa, que funciona para degradar los mucopolisacáridos [1]. La deficiencia de iduronato-2-sulfatasa provoca la acumulación de glicosaminoglicanos (GAG) no degradados en las células y conduce al daño multiorgánico progresivo [2]. Entre los diversos tipos de GAG, el dermatansulfato (DS) y el heparansulfato (HS) son los principales GAG que se acumulan en la MPS II [2].

El fenotipo clínico de la MPS II se clasifica en formas atenuadas y graves. Los pacientes con la forma atenuada muestran manifestaciones somáticas, que incluyen cara gruesa, hepatoesplenomegalia, disostosis múltiple y rigidez articular sin afectación neurológica, mientras que los pacientes con la forma grave presentan deterioro neurológico y neurodegeneración progresiva, además de los síntomas somáticos. Un nivel insuficiente de IDS endógena provoca una acumulación patológica de heparansulfato y dermatansulfato en, p. ej., el corazón, hígado, sistema nervioso central (SNC), etc. Los síntomas, incluidos la neurodegeneración y el retraso mental, aparecen durante la infancia y puede producirse una muerte prematura debido a daño orgánico cerebral.

La terapia de reemplazo enzimático (ERT) implica la administración sistémica de proteínas y/o enzimas de origen natural o recombinante a un sujeto. Las terapias aprobadas se administran normalmente a los sujetos por vía intravenosa y, en general, son eficaces en el tratamiento de los síntomas somáticos de la deficiencia enzimática subyacente.

Como resultado de la distribución limitada de la proteína y/ o enzima administrada por vía intravenosa en las células y tejidos del sistema nervioso central (SNC), el tratamiento de las enfermedades que tienen una etiología del SNC ha sido especialmente difícil porque las proteínas y/o enzimas administradas por vía intravenosa no cruzan adecuadamente la barrera hematoencefálica (BBB).

La barrera hematoencefálica (BBB) es un sistema estructural compuesto por células endoteliales que funciona para proteger el sistema nervioso central (SNC) de sustancias nocivas en el torrente sanguíneo, tales como bacterias, macromoléculas (p. ej., proteínas) y otras moléculas hidrófilas, al limitar la difusión de dichas sustancias a través de la BBB y hacia el líquido cefalorraquídeo (LCR) y el SNC subyacentes.

Muchos han creído que la barrera a la difusión en la superficie del cerebro, así como la falta de métodos de administración eficaces y convenientes, eran un obstáculo demasiado grande para lograr un efecto terapéutico adecuado en el cerebro para cualquier enfermedad.

El síndrome de Hunter afecta al sistema nervioso y, por lo tanto, presenta desafíos únicos en el tratamiento de estas enfermedades con terapias tradicionales. A menudo hay una gran acumulación de glicosaminoglicanos (GAG) en las neuronas y meninges de las personas afectadas, lo que conduce a diversas formas de síntomas en el SNC.

Por lo tanto, sigue existiendo una gran necesidad de administrar eficazmente agentes terapéuticos al cerebro. Más particularmente, existe una gran necesidad de una administración más eficaz de agentes activos al sistema nervioso central para el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico tales como el síndrome de Hunter. Los documentos US 2014/271598 A1 y WO 2011/163649 A2 describen composiciones que comprenden idursulfasa-beta para usar en el tratamiento del síndrome de Hunter.

Para superar la BBB, la administración directa del fármaco mediante inyecciones intratecales o intraventriculares de enzimas recombinantes ha demostrado resultados prometedores en varios tipos de modelos animales de MPS [3-7]. Además, un ensayo clínico de fase I/II informó que la inyección intratecal (IT) de idursulfasa (IDS) reducía las concentraciones de GAG en el líquido cefalorraquídeo (LCR) en aproximadamente 8090% en niños con la forma grave de MPS II. Sin embargo, en el ensayo clínico se han descrito una gran cantidad de acontecimientos adversos, la mayoría de los cuales estuvieron relacionados con el mal funcionamiento del dispositivo de administración IT de fármacos [8].

Aunque el mecanismo celular de la neurodegeneración en la forma grave de la MPS II no se comprende completamente, varios estudios recientes han demostrado una correlación entre los disacáridos derivados del HS y el retraso mental en grandes cohortes de pacientes con MPS [9, 10]. Además, estudios en animales han demostrado que el HS posiblemente produzca trastornos neurológicos asociados con el modelo de ratones de MPS III al activar la adhesión focal basada en integrinas en astrocitos o células madre neurales [11, 12]. Akiyama et al. [13] describieron que "el GAG patológico" medido mediante el ensayo Sensi-Pro Non-Reducing End HS [14] tenía mayor sensibilidad y especificidad que los GAG totales en el tejido cerebral de ratones con MPS II [13]. Basándose en estos datos, la

cantidad de HS acumulada podría ser un biomarcador más sensible para representar la patología cerebral y la función neurológica de la MPS II que la cantidad total de GAG. Sin embargo, la medición del HS del tejido cerebral no es posible en el entorno clínico. Por lo tanto, es necesario descubrir un biomarcador clínico útil que represente el HS del tejido cerebral. Los autores de la invención plantearon la hipótesis de que la concentración de HS en el LCR podría ser uno de los biomarcadores clínicos si se correlaciona con la cantidad de GAG en el tejido cerebral, especialmente de HS.

Una sola inyección ICV (intracerebroventricular) de IDS- β según esta invención era bien tolerada y producía una reducción significativa del HS y los GAG en el cerebro y otros tejidos somáticos. También descubrieron que una correlación positiva significativa del contenido de HS en el LCR con el HS cerebral y los GAG cerebrales sugiere que la concentración de HS en el LCR podría ser un biomarcador útil para representar la patología cerebral en pacientes con MPS con implicación del SNC.

La presente invención proporciona un enfoque eficaz para la administración directa de agentes terapéuticos al sistema nervioso central (SNC). La presente invención se basa en el descubrimiento de que la idursulfasa-beta (IDS- β), una proteína iduronato-2-sulfatasa recombinante humana desarrollada como una enzima de reemplazo eficaz para el síndrome de Hunter, puede introducirse directamente en los ventrículos de un sujeto mediante administración intracerebroventricular (ICV), de manera que la enzima se difunda de manera efectiva y extensa a través de diversas superficies y penetre en varias regiones del cerebro, incluidas las regiones cerebrales profundas. Los presentes autores de la invención han demostrado que dicha administración de proteínas se puede lograr usando formulaciones simples a base de solución salina y sin inducir efectos adversos sustanciales, tales como una respuesta inmunitaria grave, en el sujeto. Por lo tanto, la presente invención proporciona un enfoque altamente eficaz, clínicamente deseable y respetuoso para el paciente para la administración directa al SNC para el tratamiento del síndrome de Hunter.

Descripción de la invención

Problema técnico

Para el tratamiento del síndrome de Hunter, sigue existiendo una gran necesidad de administrar eficazmente agentes terapéuticos al cerebro. La inyección intratecal (IT), o la administración de proteínas terapéuticas al líquido cefalorraquídeo (LCR), se ha intentado recientemente para tratar a pacientes con síndrome de Hunter, pero en un ensayo clínico se ha descrito un gran número de acontecimientos adversos [8]. Aunque la mayoría de los efectos adversos estuvieron relacionados con el mal funcionamiento del dispositivo de administración IT de fármacos, sería necesario otro enfoque, tal como la administración intracerebroventricular (ICV), para el tratamiento de pacientes con síndrome de Hunter. La administración ICV sería un enfoque eficaz para la administración directa de agentes terapéuticos a los ventrículos de los pacientes, actualmente no hay productos aprobados y/o productos en desarrollo para el tratamiento del síndrome de Hunter mediante la administración ICV.

Efectos ventajosos de la invención

La IDS- β administrada por vía intracerebroventricular según esta invención disminuía los niveles de heparansulfato (HS) y glicosaminoglicanos (GAG) en el cerebro y el líquido cefalorraquídeo (LCR) en ratones con MPS II.

La IDS- β administrada por vía intracerebroventricular según esta invención disminuía los niveles de heparansulfato (HS) y glicosaminoglicanos (GAG) en tejidos somáticos (periféricos) incluyendo corazón, pulmón, hígado, bazo y riñón en ratones con MPS II.

Según esta invención, la tendencia a la concentración de GAG en el cerebro puede predecirse a partir del nivel de heparansulfato en el LCR, lo que puede permitir un diagnóstico más seguro y fácil de la gravedad de la acumulación de GAG en el cerebro.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra los niveles de GAG en los tejidos cerebrales de ratones con IDS KO después de una única inyección ICV de IDS- β .

La figura 2 muestra los niveles de HS en el LCR y tejidos cerebrales de ratones con IDS KO después de una única inyección ICV de IDS- β .

La figura 3 muestra una correlación entre el nivel de HS en el LCR y el nivel de HS en tejidos cerebrales de ratones con IDS KO después de una única inyección ICV de IDS- β .

La figura 4 muestra los niveles de GAG en tejidos somáticos de ratones con IDS KO después de una única inyección ICV de IDS- β .

La figura 5 muestra tejidos cerebrales recogidos en diferentes puntos temporales después de inyección y visualizados con azul de tripano.

La figura 6 muestra los niveles de GAG en tejidos del corazón de ratones con IDS KO después de una única inyección ICV de IDS-β.

La figura 7 muestra los niveles de GAG en tejidos del pulmón de ratones con IDS KO después de una única inyección ICV de IDS-β.

5 La figura 8 muestra los niveles de GAG en tejidos del hígado de ratones con IDS KO después de una única inyección ICV de IDS-β.

La figura 9 muestra los niveles de GAG en los tejidos del bazo de ratones con IDS KO después de una única inyección ICV de IDS-β.

10 La figura 10 muestra los niveles de GAG en tejidos de riñón de ratones con IDS KO después de una única inyección ICV de IDS-β.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

Como se describe en detalle a continuación, los presentes autores de la invención han desarrollado con éxito formulaciones estables para la administración intracerebroventricular (ICV) eficaz de la proteína idursulfasa-beta (IDS-β). El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

15 La presente invención incluye una formulación estable para la administración intracerebroventricular (ICV) directa que comprende la proteína idursulfasa-beta (IDS-β), sal y tensioactivo polisorbato. La proteína IDS-β está presente en la formulación ICV en una concentración de 15 mg/ml.

20 En diversas realizaciones, la presente invención incluye una formulación estable de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, la IDS-β comprende proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la IDS-β comprende además proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. La SEQ ID NO: 1 es una proteína iduronato-2-sulfatasa humana recombinante. La SEQ ID NO: 2 es una proteína iduronato-2-sulfatasa humana recombinante con su cisteína 59 sustituida por una formil-glicina (G*).

25 En algunas realizaciones, la IDS-β contiene aproximadamente 35% (porcentaje en moles) o menos de proteínas que tienen la SEQ ID NO: 1 y aproximadamente 65% (porcentaje en moles) o más de proteínas que tienen la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la IDS-β contiene aproximadamente 20-35% (porcentaje en moles) de proteínas que tienen la SEQ ID NO: 1 y aproximadamente 65-80% (porcentaje en moles) de proteínas que tienen la SEQ ID NO: 2.

30 En algunas realizaciones, la IDS-β comprende proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% idéntica a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la IDS-β comprende proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% idéntica a la SEQ ID NO: 2.

Según la invención, el NaCl está presente en una concentración de 150 mM.

35 Según la invención, la formulación comprende polisorbato 20 (Tween 20) en una concentración de 0,005%, es decir, 0,05 mg/ml. En diversas realizaciones, se selecciona otro tensioactivo polisorbato del grupo que consiste en polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80 y sus combinaciones.

40 En diversas realizaciones, la presente invención incluye una formulación estable de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, en donde la formulación comprende además un agente de tamponamiento. En algunas realizaciones, el agente de tamponamiento se selecciona del grupo que consiste en fosfato en una concentración no superior a 5 mM, acetato, histidina, succinato, Tris y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el agente de tamponamiento es fosfato, pero en una concentración no superior a 5 mM. El fosfato está presente en una concentración no superior a 5 mM (p. ej., no superior a 0,25 mM o 0,12 mM).

La formulación según la invención tiene un pH de 6,0.

45 En diversas realizaciones, la presente invención incluye formulaciones estables de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, en donde la formulación es una formulación líquida. En diversas realizaciones, la presente invención incluye una formulación estable de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, en donde la formulación se formula como polvo seco liofilizado.

Según la invención, la formulación para la administración ICV comprende la proteína IDS-β en una concentración de 15 mg/ml, NaCl en una concentración de 150 mM, el polisorbato 20 en una concentración de 0,005% (0,05 mg/ml) y un pH de 6,0.

50

- En diversos aspectos, la presente invención incluye un recipiente que comprende una forma de dosis única de una formulación estable de diversas realizaciones descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, el recipiente se selecciona de una ampolla, un vial, un frasco, un cartucho, un depósito, un Lyo-Ject o una jeringa precargada. En algunas realizaciones, el recipiente es una jeringa precargada. En algunas realizaciones, la jeringa precargada se selecciona de jeringas de vidrio de borosilicato con revestimiento de silicona horneada, jeringas de vidrio de borosilicato con silicona pulverizada o jeringas de resina plástica sin silicona. En algunas realizaciones, la formulación estable está presente en un volumen de menos de aproximadamente 50 ml (p. ej., menos de aproximadamente 45 ml, 40 ml, 35 ml, 30 ml, 25 ml, 20 ml, 15 ml, 10 ml, 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2,5 ml, 2,0 ml, 1,5 ml, 1,0 ml o 0,5 ml). En algunas realizaciones, la formulación estable está presente en un volumen de aproximadamente 6,0 ml.
- En algunas realizaciones, la formulación estable está presente en un volumen de aproximadamente 3,0 ml. En algunas realizaciones, están presentes 2,0 ml de formulación estable en un vial de 6,0 ml. En algunas realizaciones, están presentes 1,5 ml de formulación estable en un vial de 5,0 ml. En algunas realizaciones, está presente 1,0 ml de formulación estable en un vial de 3,0 ml.
- La presente invención se refiere a composiciones para usar en el tratamiento del síndrome de Hunters, que incluyen la etapa de administrar una formulación por vía intracerebroventricular a un sujeto que necesite tratamiento, según la reivindicación 1.
- Según la invención, el sujeto que necesita tratamiento tiene un sistema de catéter intraventricular que tiene un depósito y un catéter, tal como el depósito Ommaya, implantados para la administración ICV. En algunas realizaciones, la administración ICV se realiza inyectando las formulaciones ICV mencionadas anteriormente con un caudal de 0,1-60 ml/minuto, en el depósito. En algunas realizaciones, el líquido cefalorraquídeo (LCR) de un sujeto se extrae del depósito con un caudal de 0,1-60 ml/minuto antes de la administración ICV de las formulaciones, de modo que no haya un aumento neto en el volumen del LCR del sujeto después de la administración ICV, para evitar el aumento de la presión en el cerebro. En algunas realizaciones, se permite que la formulación inyectada en el depósito viaje a través del catéter hasta el ventrículo de un sujeto presionando y liberando suavemente el depósito.
- En algunas realizaciones, la administración ICV no produce efectos adversos sustanciales (p. ej., una respuesta inmunitaria grave) en el sujeto. En algunas realizaciones, la administración ICV no produce una respuesta inmunitaria adaptativa mediada por células T sustancial en el sujeto.
- En algunas realizaciones, la administración ICV de la formulación da como resultado la administración de la proteína IDS- β a varios tejidos diana del cerebro, la médula espinal y órganos periféricos. En algunas realizaciones, la administración ICV de la formulación da como resultado la administración de la proteína IDS- β a los tejidos diana del cerebro. En algunas realizaciones, los tejidos diana del cerebro comprenden materia blanca y/o neuronas en la materia gris. En algunas realizaciones, la proteína IDS- β se administra a neuronas, células gliales, células perivasculares y/o células meníngeas. En algunas realizaciones, la proteína IDS- β se administra además a las neuronas de la médula espinal.
- En algunas realizaciones, la administración ICV de la formulación además da como resultado la administración sistémica de la proteína IDS- β a los tejidos diana periféricos. En algunas realizaciones, los tejidos diana periféricos se seleccionan de, pero no se limitan a, corazón, hígado, bazo, pulmón y/o riñón.
- En algunas realizaciones, la administración ICV de la formulación da como resultado la localización lisosómica celular en los tejidos diana del cerebro, neuronas de la médula espinal y/o tejidos diana periféricos. En algunas realizaciones, la administración ICV de la formulación da como resultado la reducción del almacenamiento de GAG en los tejidos diana del cerebro, neuronas de la médula espinal y/o tejidos diana periféricos. En algunas realizaciones, el almacenamiento de GAG se reduce en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1 vez, 1,5 veces o 2 veces en comparación con un control negativo (p. ej., el almacenamiento de GAG en el sujeto antes del tratamiento o después de la administración de solamente vehículo). En algunas realizaciones, la administración ICV de la formulación da como resultado una vacuolización reducida en las neuronas (p. ej., en al menos 20%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90%, 1 vez, 1,5 veces o 2 veces en comparación con un control negativo). En algunas realizaciones, las neuronas comprenden células de Purkinje.
- En algunas realizaciones, la administración ICV de la formulación da como resultado un aumento de la actividad enzimática de la IDS- β en los tejidos diana del cerebro, neuronas de la médula espinal y/o tejidos diana periféricos. En algunas realizaciones, la actividad enzimática de la IDS- β aumenta en al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces en comparación con un control negativo (p. ej., la actividad enzimática endógena en el sujeto antes del tratamiento o después de la administración de solamente vehículo). En algunas realizaciones, el aumento de la actividad enzimática de la IDS- β es de 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 algunas realizaciones, la administración ICV de la formulación da como resultado la reducción de la intensidad, gravedad o frecuencia, o retraso en la aparición de al menos un síntoma o característica del síndrome de Hunter. En algunas realizaciones, el al menos un síntoma o característica del síndrome de Hunters es el deterioro cognitivo; lesiones de la sustancia blanca; espacios perivasculares dilatados en el parénquima cerebral, ganglios, cuerpo calloso y/o tronco encefálico; atrofia y/o ventriculomegalia.

En algunas realizaciones, la administración ICV tiene lugar una vez cada dos semanas. En algunas realizaciones, la administración ICV tiene lugar una vez cada tres semanas. En algunas realizaciones, la administración ICV tiene lugar una vez al mes. En algunas realizaciones, la administración ICV tiene lugar una vez cada dos meses. En algunas realizaciones, la administración es continua, tal como a través de una bomba de perfusión continua. En algunas realizaciones, la administración ICV se usa junto con la administración intravenosa (IV). En algunas realizaciones, la administración IV tiene lugar una vez a la semana. En algunas realizaciones, la administración IV tiene lugar una vez cada dos semanas. En algunas realizaciones, la administración IV tiene lugar una vez al mes. En algunas realizaciones, la administración IV tiene lugar una vez cada dos meses.

En algunas realizaciones, las administraciones IV e ICV se llevan a cabo el mismo día. En algunas realizaciones, las administraciones IV e ICV no se realizan en el plazo de un determinado periodo de tiempo una de otra, tal como no en el plazo de al menos 2 días, en el plazo de al menos 3 días, en el plazo de al menos 4 días, en el plazo de al menos 5 días, en el plazo de al menos 6 días, en el plazo de al menos 7 días o en el plazo de al menos una semana. En algunas realizaciones, las administraciones IV e ICV se llevan a cabo con una pauta que alterna, tal como alternando administraciones semanalmente, cada dos semanas, dos veces al mes o mensualmente. En algunas realizaciones, una administración ICV reemplaza una administración IV en una pauta de administración, tal como en una pauta de administración intravenosa semanal, cada dos semanas, dos veces al mes o mensual, cada tercera, cuarta o quinta administración de esa pauta puede reemplazarse por una administración ICV en lugar de una administración intravenosa.

En algunas realizaciones, las administraciones IV e ICV se llevan a cabo de forma secuencial, tal como llevando a cabo primero las administraciones IV (p. ej., administraciones semanales, cada dos semanas, una vez cada tres semanas, dos veces al mes, o mensuales durante dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año o más) seguidas de las administraciones ICV (p. ej., administraciones semanales, cada dos semanas, una vez cada tres semanas, dos veces al mes o mensuales durante más de dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año o más). En algunas realizaciones, se llevan a cabo primero las administraciones ICV (p. ej., administraciones semanales, cada dos semanas, una vez cada tres semanas, dos veces al mes, mensuales, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses durante dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año o más) seguidas de las administraciones IV (p. ej., administraciones semanales, cada dos semanas, una vez cada tres semanas, dos veces al mes o mensuales durante más de dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año o más).

En algunas realizaciones, la administración ICV se usa en ausencia de administración IV.

En algunas realizaciones, la administración ICV se usa en ausencia de una terapia inmunosupresora simultánea.

Ejemplos

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. Será evidente para un experto en la técnica que estos ejemplos tienen únicamente fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitativos del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

1-1: Visión general

Este estudio se realizó para investigar el efecto farmacológico y la relación dosis-respuesta de una única inyección intracerebroventricular (ICV) de idursulfasa beta (IDS- β) en ratones con MPS II. Además, se midió la concentración de HS en el LCR y se investigó la correlación entre el HS del LCR y el HS y los GAG del tejido cerebral de ratones con MPS II.

Se administraron tres dosis de inyecciones ICV de IDS- β (3, 10 y 30 μ g) y se midieron los GAG de tejidos (cerebro, corazón, pulmón, hígado, bazo y riñón) a los 7, 14 y 28 días después de la inyección. El HS se midió usando LC/MS-MS en el LCR y los cerebros de ratones. Los GAG totales en el cerebro y otros tejidos somáticos de todos los grupos tratados con IDS- β se redujo significativamente. La reducción significativa se mantuvo durante 28 días en el grupo de inyección de 30 μ g. También se demostró que se redujo el contenido de HS tanto en el LCR como en el tejido cerebral de todos los grupos tratados con IDS- β . Además, se demostró que la concentración de HS en el LCR se correlacionaba significativamente con el HS cerebral y los GAG del tejido cerebral.

Una sola inyección ICV de IDS- β según esta invención era bien tolerada y producía una reducción significativa del HS y los GAG en el cerebro y otros tejidos somáticos. También se descubrió que una correlación positiva significativa del contenido de HS en el LCR con el HS cerebral y los GAG cerebrales sugiere que la concentración de HS en el LCR podría ser un biomarcador útil para representar la patología cerebral en pacientes con MPS II con implicación del SNC.

5 1-2: Métodos

Animales

Se usaron los ratones con IDS inactivado (KO, por sus siglas en inglés *knockout*) previamente mencionados. En resumen, se eliminó del exón 2 al exón 3 del gen *Ids* [15]. Los ratones con IDS KO se criaron a partir de una cepa de fondo genético C57BL/6.129S y tenían una mutación nula en el gen *Ids*. Los ratones de control de tipo natural (WT) se criaron a partir de una cepa C57BL/B6.129S. El genotipo de todos los ratones se confirmó mediante una reacción en cadena de la polimerasa del ADN obtenido de un corte en la cola. Este estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (número de aprobación 20140925005) y se realizó de acuerdo con la política de bienestar animal del Instituto de Investigación Biomédica Samsung, Seúl (Corea).

Diseño del estudio

Los animales de 6 semanas de edad se asignaron a cinco grupos (12 animales en cada grupo) mediante aleatorización estratificada. Los ratones con IDS KO se asignaron a cuatro grupos: Ratones con IDS KO con inyección de vehículo y ratones con IDS KO con tres dosis diferentes (3 μ g, 10 μ g y 30 μ g) de inyección de IDS- β (Green Cross Corp., Yongin, Corea). Se sacrificaron cuatro animales de cada grupo cada 7, 14 y 28 días después de la inyección ICV. Se analizaron las concentraciones de GAG en varios tejidos (cerebro, corazón, pulmón, hígado, bazo y riñón) y se midieron las concentraciones de HS en el LCR y el cerebro a los 7, 14 y 28 días después de la inyección.

Preparación de IDS- β para inyección ICV

La solución de vehículo era una solución de cloruro de sodio 150 mM - Tween 20 0,05 mg/ml (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Las soluciones de fármaco concentradas de IDS- β (50 mg/ml) se diluyeron con el vehículo para preparar concentraciones de 0,6, 2 y 6 mg/ml.

25 Inyección ICV

La inyección ICV única de los ratones se hizo a las 6 semanas de edad. Cada solución de fármaco o vehículo se administró por vía ICV a ratones en un volumen total de 5 μ l. El día de la administración, los ratones se anestesiaron con una inhalación de isoflurano (Hana Pharm., Corea) y se colocaron en un instrumento estereotáctico. Después de hacer una pequeña incisión, se expuso el cráneo y se limpió. La inyección ICV se llevó a cabo de acuerdo con los métodos modificados descritos previamente [16, 17]. La IDS- β , o vehículo, se inyectó en el ventrículo lateral derecho con una aguja de calibre 31 a una velocidad de 10 ml/minuto controlada por una bomba de jeringa (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EE. UU.) utilizando las coordenadas (Benchmark, Neurolab, St. Louis, MO): 0,58 mm de caudal a bregma, 1,25 mm de sutura lateral a sagital y 1,77 mm de profundidad. Se vigiló en el sitio de la inyección la rotura de vasos o la hinchazón facial. Y luego se retiró la aguja 15 segundos después de interrumpir el movimiento del émbolo para evitar el reflujo. La incisión se cerró con clips para heridas y los ratones se colocaron en una almohadilla isotérmica a 37°C y se observaron después de la cirugía hasta su recuperación. El protocolo completo tardó 10-15 minutos para un animal. Para demostrar el éxito de la técnica de inyección ICV, se inyectó la solución de colorante por vía ICV. El cerebro se extrajo en diferentes puntos de tiempo después de la inyección y se visualizó. La inyección adecuada de uno de los ventrículos permitió la distribución del azul de tripano (0,05%) en el lado del cerebro inyectado aproximadamente 10-15 minutos después de la inyección. Una amplia distribución del azul de tripano en el hemisferio cerebral fue visible aproximadamente 1 hora después de la inyección. Las inyecciones inexactas se pueden distinguir por la falta de color azul en el hemisferio cerebral (Fig. 5).

Recolección de LCR y tejido

A los 7, 14 y 28 días después de la inyección, los ratones se sacrificaron mediante la inyección de cantidades excesivas de solución de alfaxalona (Jurox/nombre: Alfaxan) (15 mg/kg). El LCR se recogió de la cisterna magna mediante vidrio de borosilicato (O.D.: 10 mm, I.D.: 0,75 mm) y se congeló para medir la concentración de HS. La sangre del tejido cerebral de los ratones se limpió mediante perfusión transcardiaca con solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 1520 min. El tejido cerebral se recogió y se congeló en hielo seco. Luego, las muestras se homogeneizaron y se dividieron en cuartos (la mitad se usó para la medición de GAG y la otra mitad para la medición de HS). Los otros tejidos somáticos (corazón, pulmón, hígado, bazo y riñón) también se recogieron y homogeneizaron en PBS.

Medición de la concentración de GAG totales en tejidos

Las muestras de tejido homogeneizadas se agitaron durante una noche a 4°C y se centrifugaron durante 15 min a 12.000 x g, y luego se recogieron los líquidos sobrenadantes. Los niveles totales de GAG se midieron usando el kit de ensayo sGAG (Kamiya Biochemicals, Japón). Primero, se incubaron 50 μ l de muestras homogeneizadas con 50 μ l de guanidina-HCl 8 mol/l a temperatura ambiente (TA) durante 15 min. Después, se añadieron 50 μ l de solución de STA

(H₂SO₄ al 0,3%, Triton X-100 al 0,75%) durante 15 min a TA, y se añadió una solución de azul alcian a la solución durante 15 min. Después, las muestras se centrifugaron durante 15 min a 12.000 rpm y se enjuagaron con solución de DMSO (DMSO al 40%, MgCl₂ 0,05 mol/l). Finalmente, se añadieron 500 µl de solución de Gu-prop (guanidina-HCl 4 mol/l, 1-propanol al 33%, Triton X-100 al 0,25%) a los sedimentos y se dejó que la mezcla se disolviera por completo. Alternativamente, se leyó la absorbancia en el X-Mark (Bio-Rad, Hercules, CA) a 600 nm. La concentración de GAG se normalizó con respecto a la concentración de proteína, que se midió con un kit de ensayo de proteínas BCA (ThermoFisher, Waltham, MA). La concentración de GAG se expresó como g de GAG/mg de proteína, calculada mediante la curva de calibración del sustrato de GAG, condroitín-6-sulfato. Los datos de cada muestra eran el promedio de las mediciones por duplicado.

10 Medición del HS en el LCR y el tejido cerebral

Los niveles de HS en las muestras de LCR y tejido cerebral de los ratones se determinaron usando LC-MS/MS. Se prepararon soluciones madre de 5 mg/ml de cada patrón de calibración (STD) disolviendo sal sódica de HS o DS en agua. Las soluciones madre de STD se diluyeron con un volumen apropiado de agua para preparar STD de 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10 y 20 µg/ml y muestras de control de calidad (QC) de 0,2, 2 y 15 µg/ml. Además, soluciones madre de STD de 5 mg/ml se marcaron con deuterio para preparar HS-d₆ y DS-d₆ como patrón interno (IS). Se añadieron 20 µl de soluciones de STD a un tubo de ensayo de vidrio y se evaporaron en nitrógeno. El residuo se metanolizó mezclándolo con 200 µl de metanol-d₄-cloruro de acetilo (400:64, v/v) y calentando durante 90 min a 65°C. Tras la metanólisis, el disolvente se evaporó con nitrógeno. El residuo se reconstituyó en 1 ml de agua, se diluyó con agua-metanol-ácido fórmico (950:50:1, v/v/v: tampón A) y la solución preparada se usó como solución madre del IS. La muestra de LCR de ratón se centrifugó a 2100 x g a 4°C durante 5 min y el líquido sobrenadante se diluyó con un volumen igual de PBS. El tejido cerebral del ratón se homogeneizó con hidróxido de sodio 0,01 mol/l (50 o 100 veces el volumen para el peso cerebral). El homogeneizado se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente y se añadieron 20 µl de homogeneizado a 180 µl de agua-cloroformo (4:5, v/v). Después de mezclar, la muestra se centrifugó a 10.000 x g a 4°C durante 5 min y el líquido sobrenadante se diluyó con un volumen igual de PBS. Estas muestras preparadas a partir de LCR y cerebro se usaron como muestras de ensayo para el análisis de LC-MS/MS. 4 µl de muestra de ensayo de LCR (20 µl del cerebro), STD o QC en un tubo de ensayo se evaporaron con nitrógeno. Al residuo se añadieron 50 µl de HCl-MeOH 3 M y 5 µl de 2,2-dimetoxipropano y se trató con ultrasonidos durante 3 min, se calentó durante 90 min a 65°C y se evaporó. El residuo se reconstituyó con 200 µl de solución madre de IS, se trató con ultrasonidos durante 3 min y se transfirió a un filtro centrífugo, se centrifugó a 10000 x g a 4°C durante 3 minutos y se analizó el filtrado resultante. Se inyectaron 5 µl de cada muestra en el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo API5000 (AB/MDS Sciex) equipado con un sistema ACQUITY UPLC (Waters). La muestra de ensayo y el IS se separaron en una columna ACQUITY UPLC HSS T3 (100 Å, 1,8 µm, 2,1 mm por 100 mm) calentada a 40°C. La fase móvil inicial consistía en tampón A:tampón B (v/v) [agua-metanol-ácido fórmico (500:500:1, v/v/v)] 100:0 con un gradiente de elución con un caudal de 0,4 ml/min. La elución se realizó en gradiente lineal, donde el tampón B aumentó del 0% al 45% entre 0,5 y 4 min, luego aumentó al 60% a los 4,01 min, se mantuvo al 60% durante 1 min, luego disminuyó al 0% a los 5,01 min y luego se mantuvo al 0% durante 1 min. El espectrómetro de masas se hizo funcionar con los ajustes que seleccionaron la ionización por electropulverización para el método de ionización y positiva para la polaridad iónica. Se usó nitrógeno como gas cortina (2,8 kg/cm² (40 psi)) y se usó aire como gas nebulizador (3,5 kg/cm² (50 psi)) y gas calentador (2,8 kg/cm² (40 psi)). Las condiciones de monitorización de iones se definieron como voltaje de pulverización de iones de 4,5 kV y temperatura de la sonda Turbo de 600°C. Estos ajustes para el potencial de desagrupamiento, potencial de entrada y energía de colisión fueron 110 V, 8 V y 22 eV, respectivamente. Los datos se adquirieron mediante monitorización de reacciones múltiples (MRM) utilizando la relación masa/carga (m/z) 384 → 162 para HS, m/z 426 → 236 para DS, m/z 390 → 162 para HS-d₆ y m/z 432 → 162 para DS-d₆. Las áreas de los picos, la curva de STD y las concentraciones medidas se calcularon con Analyst ver. 1.5.1 (AB Scix).

45 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante GraphPad Prism 6. La prueba U de Mann Whitney se usó para comparar las diferencias entre cada grupo tratado con fármaco y el grupo tratado con vehículo en ratones KO. Las diferencias con valores de P inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativas. Los datos se presentaron como medias y SEM. Para determinar la relación entre el HS del LCR y el HS cerebral y entre el HS del LCR y los GAG cerebrales, se evaluaron 73 muestras de LCR y tejido cerebral de ratones, y los datos se analizaron usando regresión lineal y rho de Spearman. Se calcularon los coeficientes de correlación intraclase (ICC) y los intervalos de confianza del 95%.

1-3: Resultados

Pesos corporales

Los pesos corporales de todos los grupos experimentales no cambiaron significativamente durante el período de estudio. No hubo diferencias significativas en los pesos de los ratones de los grupos de ERT ICV en comparación con los de los grupos de control (ratones WT y ratones con IDS KO no tratados). Tampoco se encontró ningún signo clínico anormal durante los experimentos en ninguno de los grupos de ERT.

Una sola inyección ICV de IDS-β reducía los GAG en el tejido cerebral de ratones con IDS KO

Los GAG totales en el tejido cerebral de los ratones KO en el grupo de inyección del vehículo fueron significativamente más altos en comparación con los de los ratones WT (Fig. 1). Los GAG totales en el tejido cerebral de todos los grupos tratados con IDS- β se redujo significativamente en comparación con los de los ratones de control de la enfermedad después de 7 días de administración de dosis (Fig. 1). Sin embargo, se observó una reacumulación de GAG 14 días después de la inyección en los grupos de inyección de 3 y 10 μ g. 28 días después de la inyección, la reducción significativa de GAG se mantenía en el grupo de inyección de 30 μ g a pesar de que el nivel total de GAG volvía a aumentar ligeramente en comparación con el del día 7 y el día 14 (Fig. 1).

Una sola inyección ICV de IDS- β reducía el HS en el LCR y tejido cerebral de ratones con IDS KO

El nivel de HS aumentó significativamente en el LCR y el tejido cerebral de los ratones con IDS KO en comparación con el de los ratones de control WT (Fig. 2). Siete días después de la inyección ICV, el contenido de HS en el LCR y el tejido cerebral disminuyó significativamente en los tres grupos tratados con IDS- β . Las reducciones significativas de HS en el tejido cerebral se mantuvieron durante los 28 días (Fig. 2). El contenido de HS en el LCR permaneció reducido 14 y 28 días después de la inyección ICV. Sin embargo, solo se encontró significación estadística en el grupo tratado con 30 μ g de IDS- β 28 días después de la inyección ICV (Fig. 2).

El contenido de HS en el LCR se correlacionaba positivamente con el HS y los GAG del tejido cerebral.

Se encontró una correlación positiva significativa entre el contenido de HS en el LCR y la concentración de HS en el tejido cerebral de las muestras de ratones ($r=0,785$, $P < 0,0001$) (Fig. 3A). Además, el contenido de HS en el LCR también tenía una correlación positiva significativa con la concentración de GAG en el tejido cerebral ($r=0,703$, $P < 0,0001$) (Fig. 3B).

La inyección ICV única de IDS- β disminuía los GAG de los tejidos somáticos de ratones con IDS KO

Se midió la concentración total de GAG después de una sola inyección ICV tanto en el tejido cerebral como en otros tejidos somáticos (corazón, pulmón, hígado, bazo y riñón). La acumulación de GAG se encontró en todos los tejidos analizados de los ratones con IDS KO con la inyección de vehículo en comparación con los ratones WT (Fig. 4). 28 días después de la inyección ICV, la administración ICV de 30 μ g de IDS- β mantenía una reducción significativa de los GAG totales en todos los tejidos examinados (Fig. 4). Las concentraciones de GAG de los tejidos somáticos a los 7 y 14 días después de la inyección ICV se muestran en las Figs. 6-10.

1-4: Discusión

La MPS II es el tipo más común de MPS en Asia, y aproximadamente el 70% de los pacientes con MPS II tienen la forma grave [18, 19]. Por lo tanto, la corrección de la patología cerebral es una de las cuestiones más importantes y desafiantes en el tratamiento de pacientes con MPS II. Se ha sugerido la inyección intratecal o intraventricular de la enzima recombinante como estrategia para administrar el fármaco terapéutico al cerebro. En este estudio, se realizaron inyecciones ICV únicas de tres dosis diferentes de IDS- β en ratones con IDS KO de 6 semanas de edad para evaluar la relación dosis-respuesta y la evolución temporal del efecto farmacológico.

Los GAG totales en el tejido cerebral de todos los grupos tratados con IDS- β se redujo significativamente, y la reducción significativa de GAG se mantuvo durante 28 días en el grupo de inyección de 30 μ g (Fig. 1). La reducción significativa de la concentración de HS en el LCR también se observó de manera consistente en el grupo tratado con 30 μ g 28 días después de la inyección ICV (Fig. 2). Por lo tanto, los autores de la invención sugieren que una inyección de 30 μ g de IDS- β en el ventrículo lateral una vez cada cuatro semanas podría ser eficaz para reducir y mantener los GAG cerebrales acumulados en ratones con MPS II. Además, estos resultados podrían servir como evidencia básica para decidir la dosis y la frecuencia de inyección en el uso clínico de inyecciones ICV de la enzima recombinante, aunque deben tenerse en cuenta el tamaño del cerebro y la tasa metabólica diferentes entre ratones y seres humanos. Sin embargo, para dilucidar aún más la eficacia de la administración ICV de la enzima para mejorar la patología del SNC en la MPS II, se necesita ampliar el estudio con inyecciones repetidas y realizar evaluaciones funcionales, incluyendo ensayos conductuales y análisis histológicos del cerebro.

Entre los diversos tipos de MPS, la implicación del SNC está presente en la forma grave de la MPS I (enfermedad de Hurler), la forma grave de la MPS II, MPS III y MPS VII. Por el contrario, los pacientes con MPS IV, MPS VI, el tipo atenuado de MPS I (síndrome de Scheie) y el tipo atenuado de MPS II no tienen deterioro cognitivo [2]. El HS es uno de los principales GAG que se acumulan en las MPS I, II, III y VII [10]. Varios informes han demostrado que el HS acumulado en el tejido cerebral es responsable de las manifestaciones neurológicas de las MPS [9-12]. Además, se ha mostrado que la concentración de HS es un biomarcador más sensible y específico en el tejido cerebral de ratones con MPS II [13, 20]. Sin embargo, la medición directa de la cantidad de HS en el tejido cerebral es imposible en el entorno clínico. Por lo tanto, se analizaron las concentraciones de HS en el LCR y se trató de encontrar una correlación entre el nivel de HS en el LCR y el tejido cerebral. Los autores de la invención demostraron que el contenido de HS era significativamente mayor tanto en el LCR como en el tejido cerebral de los ratones con IDS KO en comparación con los ratones WT y disminuía en todos los grupos tratados con IDS- β (Fig. 2). Además, este es el primer estudio para demostrar que la concentración de HS en el LCR se correlacionaba significativamente con el HS del tejido cerebral y los GAG del tejido cerebral (Fig. 3). Por lo tanto, se sugirió que el contenido de HS en el LCR podría ser uno de los posibles biomarcadores para suponer los niveles de HS o GAG en el tejido cerebral. Sin embargo, para

demostrar que el contenido de HS en el LCR realmente puede representar la patología del SNC, son necesarios estudios adicionales incluido el examen patológico del tejido cerebral, ya que la patología del SNC de la MPS II se debe no solo a la cantidad de acumulación de GAG, sino también a la acumulación secundaria de sustrato, inflamación y cambios degenerativos del SNC [12, 21, 22]. Si se demuestra la correlación, el contenido de HS en el LCR podría ser un parámetro útil para evaluar la patología del SNC en posibles ensayos clínicos futuros con pacientes con MPS II con implicación del SNC.

Además, los autores de la invención demostraron que la administración ICV de IDS- β también reducía significativamente la acumulación de GAG en los tejidos somáticos (hígado, bazo, riñón, corazón y pulmón) y en el tejido cerebral de manera dependiente de la dosis, aunque el efecto difería entre los tejidos (Fig. 4 y Figs. 6-10). Se observó que el grado de reducción de los GAG dependía de la dosis, y se indicó que la administración de 30 μ g de IDS- β podría reducir significativamente y mantener los GAG acumulados en los tejidos somáticos durante 28 días, que era igual que en el tejido cerebral. En general, estos datos demuestran el transporte fisiológico de una proteína terapéutica desde el LCR a los órganos sistémicos después de la administración ICV, lo que sugiere una ruta clínicamente factible para la administración de la enzima terapéutica tanto al cerebro como a los órganos sistémicos. Además, el LCR podría servir como depósito intermedio para una enzima inyectada desde el cual se transfieren gradualmente algunas cantidades a la circulación sistémica después de la inyección ICV. Aunque el mecanismo de suministro de enzimas desde el LCR a la circulación sistémica no está claro, se ha sugerido que el LCR que contiene iduronato-2-sulfatasa podría comunicarse con la circulación venosa sistémica a través del espacio subaracnoideo [6, 23-25].

En conclusión, una sola inyección ICV de IDS- β era bien tolerada y producía una reducción significativa de HS y GAG en el tejido cerebral y de GAG en los tejidos somáticos de los ratones con IDS KO. Además, el efecto se mantuvo 28 días después de la inyección ICV, especialmente con la dosis de 30 μ g. Además, la concentración de HS en el CSF podría ser un biomarcador útil para representar la patología cerebral, porque la concentración de HS en el LCR se correlacionaba positivamente con el HS y los GAG del tejido cerebral.

1-5: Lista de secuencias

SEQ ID NO: 1

Longitud: 525

Tipo: PRT

```

SETQANSTTD ALNVLLIIVD DLRPSLG CYG DKLVRSPNID QLASHSLLFQ
NAFAQQAVCA
PSRVSFLTGR RPDTRL YDF NSYWRVHAGN FSTIPQYFKE NGYVTMSVGK
VFHPGISSNH
TDDSPYSWSF PPYHPSSEKY ENTKTCRGPD GELHANLLCP VDVLDVPEGT
LPDKQSTEQA
IQLLEKMKTS ASPFFLA VGY HKPHIPFRYP KEFQKLYPLE NITLAPDPEV
PDGLPPVAYN
PWMDIRQRED VQALNISVPY GPIPVDFQRK IRQSYFASVS YLDTQVGRLL
SALDDLQLAN
STHAFTSDH GWALGEHGEW AKYSNFDVAT HVPLIFYVPG RTASLPEAGE
KLFPYLD PFD
SASQLMEPGR QSMDLVELVS LFPTLAGLAG LQVPPRCVP SFHVELCREG
KNLLKHFRFR
DLEEDPYLPG NPRELIAYSQ YPRPSDIPQW NSDKPSLKDI KIMGYSIRTI
DYRYTVWVGF
NPDEFLANFS DIHAGELYFV DSDPLQDHNM YNDSQCGDLF QLLMP

```

SEQ ID NO: 2

Longitud: 525

Tipo: PRT

SETQANSTTD ALNVLLIIVD DLRPSLGCYD DKLVRSPNID QLASHSLLFQ
 NAFAQQAVG*A
 PSRVSFSLTGR RPDTRRLYDF NSYWRVHAGN ESTIPQYFKE NGYVTMSVGK
 VFHPGISSNH
 TDDSPYSWSF PPYHPSSEKY ENTKTCRGPD GELHANLLCP VDVLDVPEGT
 LPDKQSTEQ
 IQLLEKMKTS ASPFFLAAGY HKPHIPFRYP KEFQKLYPLE NITLAPDPEV
 PDGLPPVAYN
 PWMDIRQRED VQALNISVPY GPIPVDFQRK IRQSYFASVS YLDTQVGRLL
 SALDDLQLAN
 STHIFTSDH GWALGEHGEW AKYSNFDVAT HVPLIFYVPG RTASLPEAGE
 KLFPYLDPEF
 SASQLMEPGR QSMDELVELVS LFPTLAGLAG LQVPPRCPPV SFHVELCREG
 KNLLKHFRFR
 DLEEDPYLPG NPRELIAYSQ YPRPSDIPQW NSDKPSLKI KIMGYSIRTI
 DYRYTVWVGF
 5 NPDEFLANFS DIHAGELYFV DSDPLQDHNH YNDSQGGDLF QLLMP

(El aminoácido 59 "G*" de la SEQ ID NO: 2 significa una formil-glicina).

1-6: Referencias

- [1] Bach G, Eisenberg F, Jr., Cantz M, Neufeld EF: The defect in the Hunter syndrome: deficiency of sulfiduronate sulfatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973, 70:2134-2138.
- 10 [2] Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, vol. III. McGraw-Hill: New York, 2001:34213452.
- [3] Kakkis E, McEntee M, Vogler C, Le S, Levy B, Belichenko P, Mobley W, Dickson P, Hanson S, Passage M: Intrathecal enzyme replacement therapy reduces lysosomal storage in the brain and meninges of the canine model of MPS I. *Mol Genet Metab* 2004, 83:163-174.
- 15 [4] Auclair D, Finnie J, White J, Nielsen T, Fuller M, Kakkis E, Cheng A, O'Neill CA, Hopwood JJ: Repeated intrathecal injections of recombinant human 4-sulphatase remove dural storage in mature mucopolysaccharidosis VI cats primed with a short-course tolerisation regimen. *Mol Genet Metab* 2010, 99:132-141.
- [5] Hemsley KM, Hopwood JJ: Delivery of recombinant proteins via the cerebrospinal fluid as a therapy option for neurodegenerative lysosomal storage diseases. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2009, 47 Suppl ES118-123.
- 20 [6] Higuchi T, Shimizu H, Fukuda T, Kawagoe S, Matsumoto J, Shimada Y, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Morimoto H et al: Enzyme replacement therapy (ERT) procedure for mucopolysaccharidosis type II (MPS II) by intraventricular administration (IVA) in murine MPS II. *Mol Genet Metab* 2012, 107:122-128.
- [7] Calias P, Papisov M, Pan J, Savioli N, Belov V, Huang Y, Lotterhand J, Alessandrini M, Liu N, Fischman AJ et al: CNS penetration of intrathecal-lumbar idursulfase in the monkey, dog and mouse: implications for neurological outcomes of lysosomal storage disorder. *PLoS One* 2012, 7:e30341.
- 25 [8] Muenzer J, Hendriks CJ, Fan Z, Vijayaraghavan S, Perry V, Santra S, Solanki GA, Mascelli MA, Pan L, Wang N et al: A phase I/II study of intrathecal idursulfase-IT in children with severe mucopolysaccharidosis II. *Genet Med* 2015.
- [9] de Ruijter J, Ijlst L, Kulik W, van Lenthe H, Wagemans T, van Vlies N, Wijburg FA: Heparan sulfate derived disaccharides in plasma and total urinary excretion of glycosaminoglycans correlate with disease severity in Sanfilippo disease. *J Inher Metab Dis* 2013, 36:271-279.
- 30

- [10] Coppa GV, Gabrielli O, Zampini L, Maccari F, Mantovani V, Galeazzi T, Santoro L, Padella L, Marchesiello RL, Galeotti F et al: Mental retardation in mucopolysaccharidoses correlates with high molecular weight urinary heparan sulphate derived glucosamine. *Metab Brain Dis* 2015, 30:1343-1348.
- 5 [11] Bruyere J, Roy E, Ausseil J, Lemonnier T, Teyre G, Bohl D, Etienne-Manneville S, Lortat-Jacob H, Heard JM, Vitry S: Heparan sulfate saccharides modify focal adhesions: implication in mucopolysaccharidosis neuropathophysiology. *J Mol Biol* 2015, 427:775-791.
- [12] Wilkinson FL, Holley RJ, Langford-Smith KJ, Badrinath S, Liao A, Langford-Smith A, Cooper JD, Jones SA, Wraith JE, Wynn RF et al: Neuropathology in mouse models of mucopolysaccharidosis type I, IIIA and IIIB. *PLoS One* 2012, 7:e35787.
- 10 [13] Akiyama K, Shimada Y, Higuchi T, Ohtsu M, Nakauchi H, Kobayashi H, Fukuda T, Ida H, Eto Y, Crawford BE et al: Enzyme augmentation therapy enhances the therapeutic efficacy of bone marrow transplantation in mucopolysaccharidosis type II mice. *Mol Genet Metab* 2014, 111:139-146.
- [14] Lawrence R, Brown JR, Al-Mafraji K, Lamanna WC, Beitel JR, Boons GJ, Esko JD, Crawford BE: Disease-specific non-reducing end carbohydrate biomarkers for mucopolysaccharidoses. *Nat Chem Biol* 2012, 8:197-204.
- 15 [15] Jung SC, Park ES, Choi EN, Kim CH, Kim SJ, Jin DK: Characterization of a novel mucopolysaccharidosis type II mouse model and recombinant AAV2/8 vector-mediated gene therapy. *Mol Cells* 2010, 30:13-18.
- [16] Lee WC, Tsoi YK, Troendle FJ, DeLucia MW, Ahmed Z, Dicky CA, Dickson DW, Eckman CB: Single-dose intracerebroventricular administration of galactocere-brosidase improves survival in a mouse model of globoid cell leukodystrophy. *Faseb j* 2007, 21:2520-2527.
- 20 [17] Glascock JJ, Osman EY, Coady TH, Rose FF, Shababi M, Lorson CL: Delivery of therapeutic agents through intracerebroventricular (ICV) and intravenous (IV) injection in mice. *J Vis Exp* 2011.
- [18] Lin HY, Lin SP, Chuang CK, Niu DM, Chen MR, Tsai FJ, Chao MC, Chiu PC, Lin SJ, Tsai LP et al: Incidence of the mucopolysaccharidoses in Taiwan, 1984-2004. *Am J Med Genet A* 2009, 149A:960-964.
- 25 [19] Sohn YB, Choi EW, Kim SJ, Park SW, Kim SH, Cho SY, Jeong SI, Huh J, Kang IS, Lee HJ et al: Retrospective analysis of the clinical manifestations and survival of Korean patients with mucopolysaccharidosis type II: emphasis on the cardiovascular complication and mortality cases. *Am J Med Genet A* 2012, 158A:90-96.
- [20] Shimada Y, Wakabayashi T, Akiyama K, Hoshina H, Higuchi T, Kobayashi H, Eto Y, Ida H, Ohashi T: A method for measuring disease-specific iduronic acid from the non-reducing end of glycosaminoglycan in mucopolysaccharidosis type II mice. *Mol Genet Metab* 2015.
- 30 [21] Hamano K, Hayashi M, Shioda K, Fukatsu R, Mizutani S: Mechanisms of neurodegeneration in mucopolysaccharidoses II and IIIB: analysis of human brain tissue. *Acta Neuropathol* 2008, 115:547-559.
- [22] Archer LD, Langford-Smith KJ, Bigger BW, Fildes JE: Mucopolysaccharide diseases: a complex interplay between neuroinflammation, microglial activation and adaptive immunity. *J Inherit Metab Dis* 2014, 37:1-12.
- 35 [23] Chen L, Elias G, Yostos MP, Stimec B, Fasel J, Murphy K: Pathways of cerebrospinal fluid outflow: a deeper understanding of resorption. *Neuroradiology* 2015, 57:139-147.
- [24] Hladky SB, Barrand MA: Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: evaluation of the evidence. *Fluids Barriers CNS* 2014, 11:26.
- [25] Glimcher SA, Holman DW, Lubow M, Grzybowski DM: Ex vivo model of cerebrospinal fluid outflow across human arachnoid granulations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008, 49:4721-4728.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación ICV para usar en el tratamiento del síndrome de Hunter, que comprende la proteína idursulfasa-beta (IDS-β) en una concentración de 15 mg/ml, cloruro de sodio en una concentración de 150 mM, polisorbato 20 en una concentración de 0,05 mg/ml, fosfato en una concentración no superior a 5 mM y un pH de 6, en donde dicha formulación se administra por vía intracerebroventricular (administración ICV) a un sujeto que necesita tratamiento en una dosis terapéuticamente eficaz, en donde dicha administración ICV es a través de un sistema de catéter intraventricular que comprende un depósito y un catéter conectado a dicho depósito.
2. Una formulación ICV para usar según la reivindicación 1, en donde dicha dosis terapéuticamente eficaz varía de 1 mg a 30 mg, preferiblemente en donde dicha dosis terapéuticamente eficaz es de 10 mg.
3. Una formulación ICV para usar según la reivindicación 1, en donde dicha administración ICV se realiza una vez cada tres semanas o una vez al mes.
4. Una formulación ICV para usar según la reivindicación 1, que comprende además las etapas de
 - implantar quirúrgicamente dicho sistema de catéter intraventricular, en donde dicho depósito se coloca entre el cuero cabelludo y el cerebro del sujeto que necesita tratamiento y el extremo de dicho catéter se coloca dentro del ventrículo de dicho sujeto de tal manera que el espacio interior de dicho depósito está conectado con el espacio interior de dicho ventrículo a través del espacio interior de dicho catéter de modo que el líquido cefalorraquídeo fluye desde dicho ventrículo a dicho depósito para llenar dicho depósito;
 - extraer 0,1-5 ml de líquido cefalorraquídeo de dicho depósito con un caudal de 0,1-60 ml/minuto;
 - inyectar 0,1-5 ml de dicha formulación ICV en dicho depósito con un caudal de 0,1-60 ml/minuto; y
 - permitir que dicha formulación ICV fluya desde dicho depósito a través de dicho catéter hacia dicho ventrículo.
5. Una formulación ICV para usar según la reivindicación 1, en donde dicha administración ICV se realiza en combinación con al menos una forma adicional de tratamiento de terapia de reemplazo enzimático para el síndrome de Hunter.
6. Una formulación ICV para usar según la reivindicación 5, en donde dicha forma adicional de tratamiento de terapia de reemplazo enzimático para el síndrome de Hunter se selecciona de un grupo que consiste en administración intravenosa y administración subcutánea.
7. Una formulación ICF para usar según la reivindicación 6, en donde dicha administración ICV se realiza una vez al mes y dicha administración intravenosa se realiza una vez a la semana, o en donde dicha administración ICV se realiza una vez cada tres semanas y dicha administración intravenosa se realiza una vez a la semana, o en donde dicha administración ICV se realiza una vez al mes y dicha administración subcutánea se realiza una vez a la semana.
8. Una formulación ICV para usar según la reivindicación 6, en donde dicha administración ICV se realiza una vez cada tres semanas y dicha administración subcutánea se realiza una vez a la semana.
9. Una formulación ICV para usar según la reivindicación 6, en donde dicha administración ICV se realiza una vez al mes y dicha administración subcutánea se realiza dos veces por semana.
10. Una formulación ICV para usar según la reivindicación 6, en donde dicha administración ICV se realiza una vez cada tres semanas y dicha administración subcutánea se realiza dos veces por semana.
11. Una formulación ICV para usar según la reivindicación 6, en donde dicha administración ICV se realiza una vez al mes y dicha administración intravenosa y dicha administración subcutánea se realizan alternativamente en un intervalo de una semana.
12. Una formulación ICV para usar según la reivindicación 6, en donde dicha administración ICV se realiza una vez cada tres semanas y dicha administración intravenosa y dicha administración subcutánea se realizan alternativamente en un intervalo de una semana.

Fig. 1

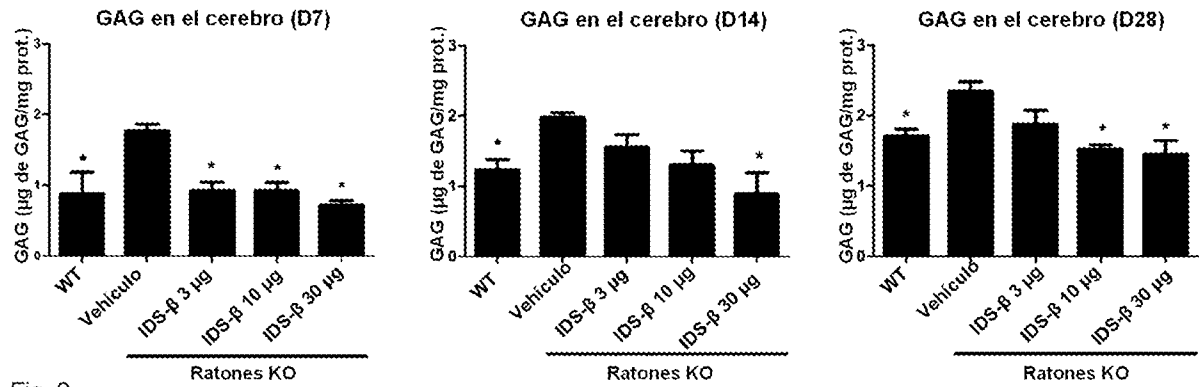


Fig. 2

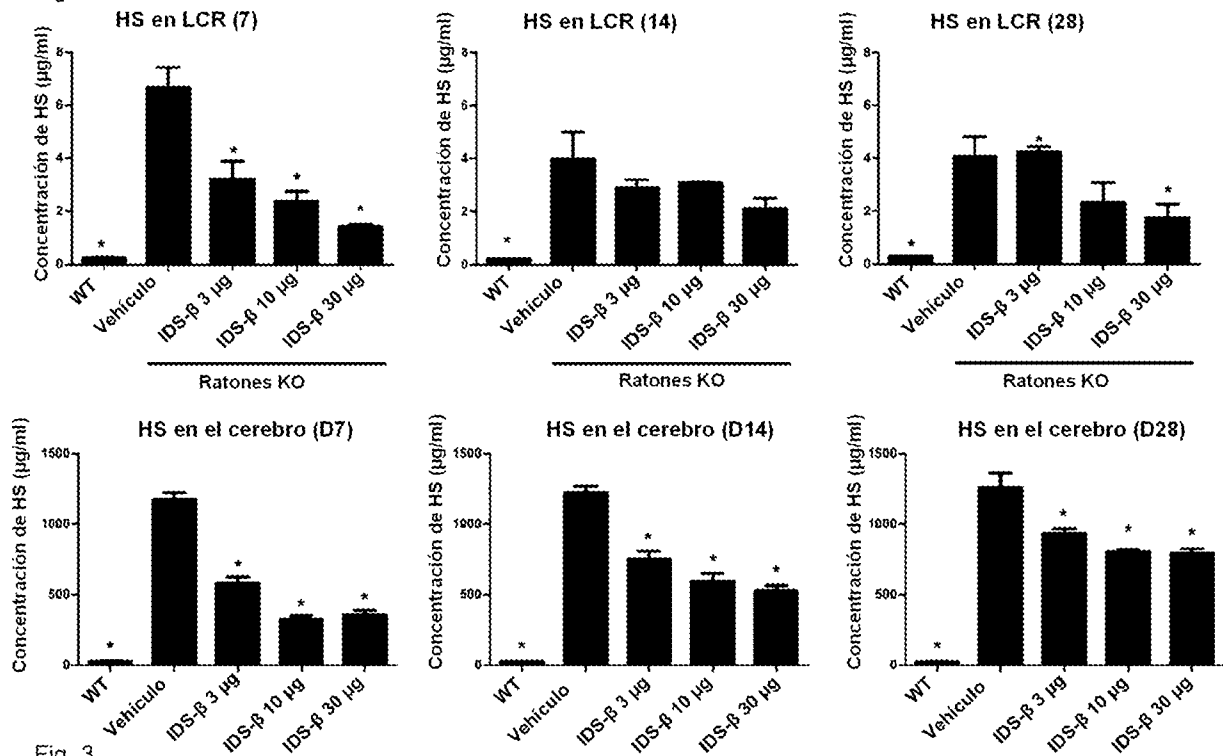


Fig. 3

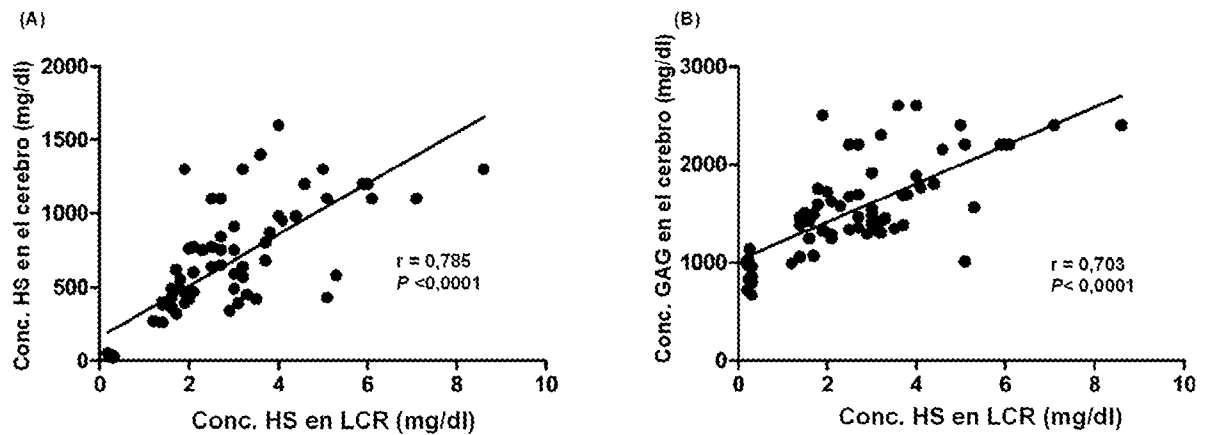


Fig. 4

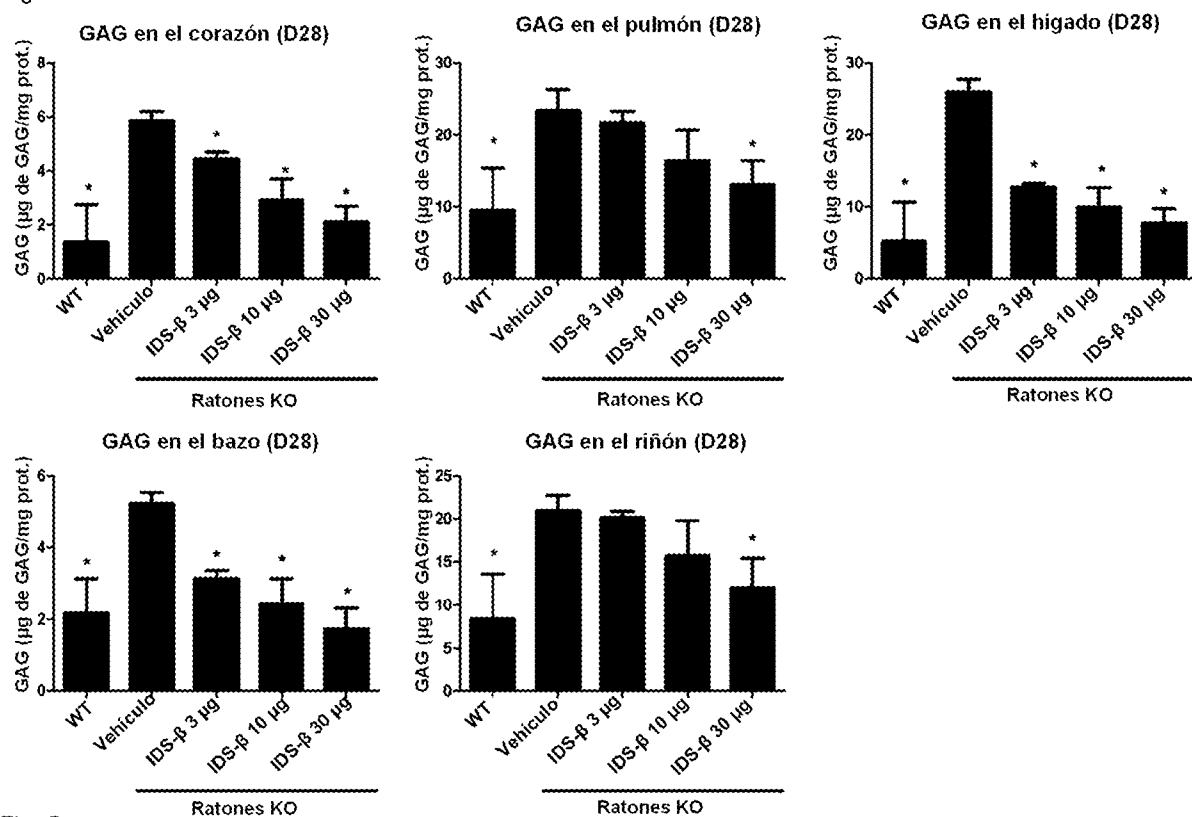


Fig. 5

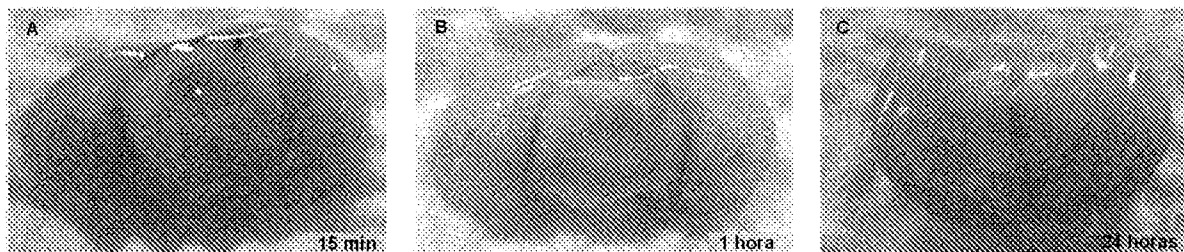


Fig. 6

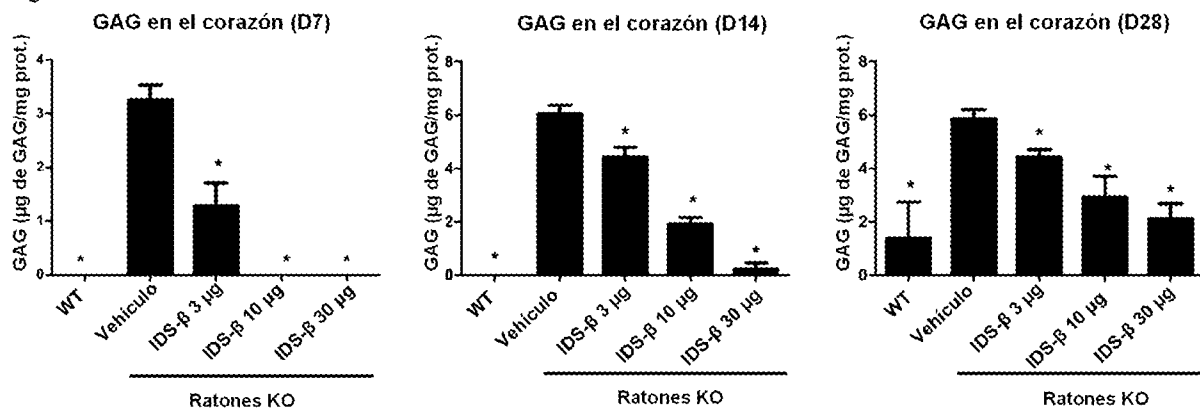


Fig. 7

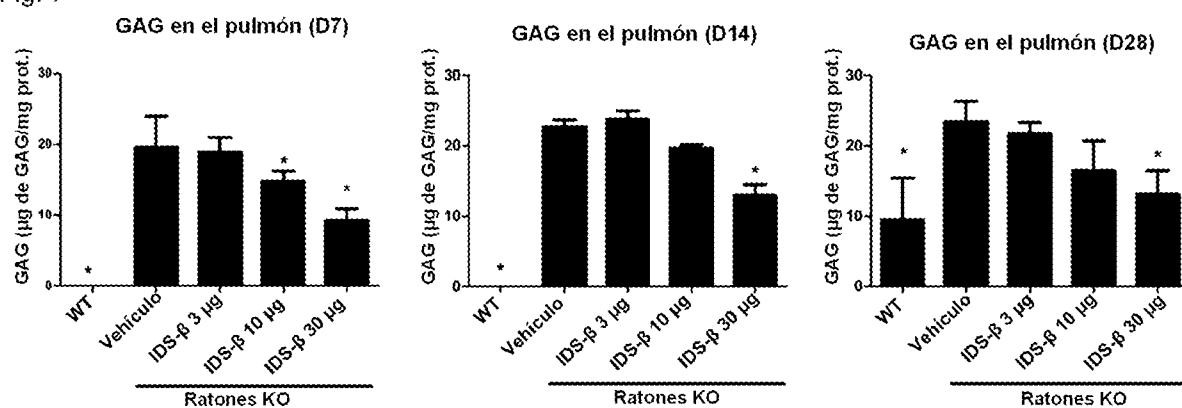


Fig. 8

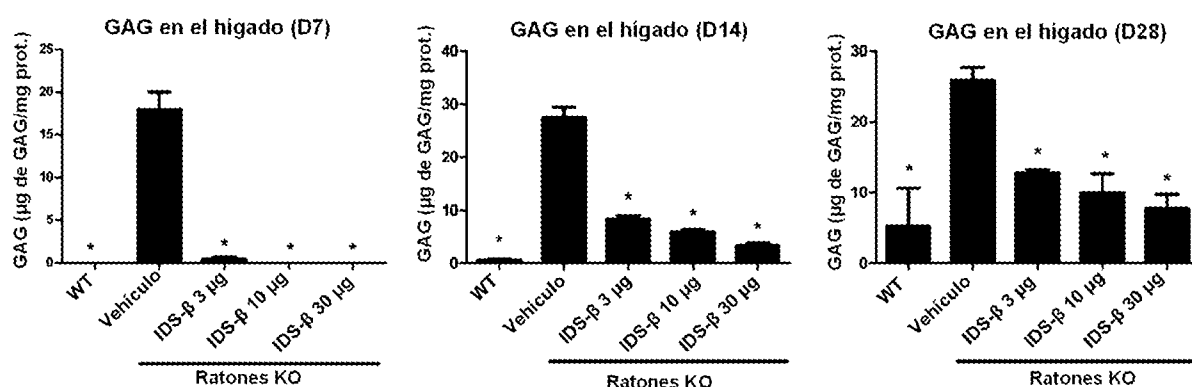


Fig. 9

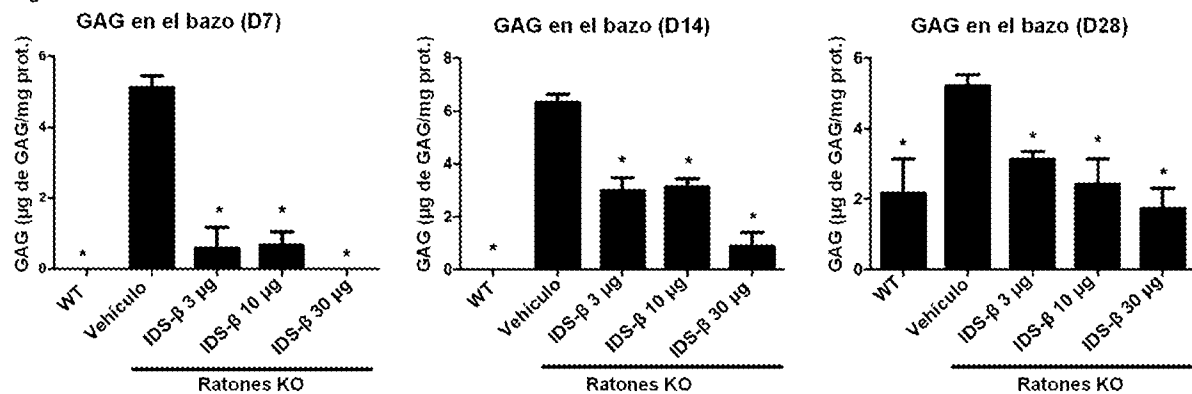


Fig. 10

