



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

(11) BR 112012033216-3 B1



(22) Data do Depósito: 25/06/2011

(45) Data de Concessão: 11/10/2022

(54) Título: USO DE UMA FORMULAÇÃO ESTÁVEL COMPREENDENDO UMA PROTEÍNA ARILSULFATASE A (ASA) E FORMULAÇÃO ESTÁVEL PARA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL

(51) Int.Cl.: A61K 38/54; A61K 38/46.

(30) Prioridade Unionista: 01/07/2010 US 61/360,786; 09/06/2011 US 61/495,268; 11/02/2011 US 61/442,115; 15/04/2011 US 61/476,210; 24/01/2011 US 61/435,710; (...).

(73) Titular(es): SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC..

(72) Inventor(es): NAZILA SALAMAT-MILLER; KATHERINE TAYLOR; PAUL CAMPOLIETO; ZAHRA SHAHROKH; LAWRENCE CHARNAS; TERESA LEAH WRIGHT; JING PAN; PERICLES CALIAS.

(86) Pedido PCT: PCT US2011041926 de 25/06/2011

(87) Publicação PCT: WO 2011/163650 de 29/12/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 26/12/2012

(57) Resumo: MÉTODO E COMPOSIÇÕES PARA DISTRIBUIÇÃO NO SNC DE ARILSULFATASE A. A presente invenção fornece, entre outras coisas, composições e métodos para a entrega no SNC de enzimas de lisossomos para tratamento eficaz de doenças por armazenamento dos lisossomos. Em algumas modalidades, a presente invenção inclui uma formulação estável para administração intratecal direta no SNC, caracterizado pelo fato de que compreende uma proteína arilsulfatase A (ASA), sal, e um surfactante de polisorbato para o tratamento da doença da Leucodistrofia Metacromática.

"USO DE UMA FORMULAÇÃO ESTÁVEL COMPREENDENDO UMA PROTEÍNA ARILSULFATASE A (ASA) E FORMULAÇÃO ESTÁVEL PARA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL"

REFERÊNCIA CRUZADA PARA PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica prioridade para os pedidos de patente provisória dos Estados Unidos nº US 61/358.857 depositado em 25 de junho de 2010; 61/360.786, depositado em 1 de julho de 2010; 61/387.862, depositado em 29 de setembro de 2010; 61/435.710, depositado em 24 de janeiro de 2011; 61/442.115, depositado em 11 de fevereiro de 2011; 61/476.210, depositado em 15 de abril, 2011 e 61/495.268, depositado em 9 de junho de 2011; cuja totalidade é aqui incorporada por referência.

Este pedido se refere aos pedidos intitulados "CNS Delivery of Therapeutic Agents," depositado na mesma data; "Methods e Compositions for CNS Delivery of Heparan NSulfatase," depositado na mesma data; "Methods e compositions for CNS Delivery of Iduronate-2-Sulfatase," depositado na mesma data; "Methods e compositions for CNS Delivery of f-Galactocerebrosidase," depositado na mesma data; "Tratamento of Sanfilippo Síndrome Tipo B," depositado na mesma data; cuja totalidade é aqui incorporada por referência.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Terapia de reposição enzimática (ERT) envolve a administração sistêmica de proteínas naturais ou recombinantes derivados e/ou enzimas para um objeto. Terapias aprovadas são geralmente administradas para objetos por via intravenosa e são geralmente eficazes no tratamento dos sintomas somáticos da deficiência enzimática subjacente. Como resultado da distribuição limitada de

proteína administrada por via intravenosa e/ou enzima nas células e tecidos do sistema nervoso central (CNS), o tratamento de doenças, tendo uma etiologia do CNS tem sido especialmente desafiador porque as proteínas administradas por via intravenosa e/ou enzimas não cruzam adequadamente a barreira hemato-encefálica (BBB).

A barreira hemato-encefálica (BBB) é que um sistema estrutural composto de células endoteliais que funciona para proteger o sistema nervoso central (CNS) de substâncias deletérias no fluxo de sangue, como bactérias, macromoléculas (por exemplo, proteínas) e outras moléculas hidrofílicas, limitando a difusão de substâncias através de BBB e no fluido cerebrospinal subjacente (CSF) e CNS.

Existem várias maneiras de contornar o BBB para melhorar a entrega no cérebro de um agente terapêutico incluindo injeção direta intracraniana, permeabilização transitória de BBB e modificação do agente ativo para alterar a distribuição do tecido. Injeção direta de um agente terapêutico em tecido cerebral desvia completamente a vasculatura, mas sofre principalmente com o risco de complicações (infecção, dano tecidual, resposta imunológica) incorridas por injeções intracranianas e má difusão do agente ativo do local da administração. Até à data, a administração direta de proteínas para a substância cerebral não tem alcançado significativo efeito terapêutico devido a barreiras de difusão e o limitado volume terapêutico que pode ser administrado.

A difusão assistida por convecção tem sido estudada através de cateteres colocados no parênquima cerebral usando infusões lentas, a longo prazo (Bobo, et al., Proc.

Natl. Acad. Sci. U.S.A 91, 2076-2080 (1994); Nguyen, et al. J. Neurosurg. 98, 584-590 (2003)), mas terapias não aprovadas usam atualmente essa abordagem para a terapia de longo prazo. Além disso, a colocação de cateteres intracerebrais é muito invasiva e menos desejável como uma alternativa clínica.

A injeção de intratecal (IT) ou a administração de proteínas para o líquido cefalorraquidiano (CSF), também foi tentada, mas ainda não rendeu sucesso terapêutico. Um grande desafio neste tratamento tem sido a tendência do agente ativo de ligar o revestimento endotelial do ventrículo muito firmemente tal que impediu a difusão subsequente. Atualmente, não há nenhum produto aprovado para o tratamento da doença genética do cérebro pela administração diretamente para CSF.

De fato, muitos acreditavam que a barreira de difusão na superfície do cérebro, bem como a falta de métodos de entrega eficaz e conveniente, eram obstáculos muito grandes para alcançar o efeito terapêutico adequado no cérebro para qualquer doença.

Muitos distúrbios lisossômico afetam o sistema nervoso e assim demonstram desafios únicos no tratamento dessas doenças com terapias tradicionais. Muitas vezes há um grande acúmulo de glicosaminoglicanos (GAGs) nos neurônios e meninges de indivíduos afetados, levando a várias formas de sintomas do CNS. Até à data, nenhum sintomas de CNS resultantes de uma desordem dos lisossomos foi tratado com sucesso por qualquer meio disponível.

Assim, ainda há uma grande necessidade de efetivamente entregar agentes terapêuticos para o cérebro. Mais

particularmente, há uma grande necessidade de entrega mais eficaz dos agentes ativos para o sistema nervoso central para o tratamento dos distúrbios de armazenamento lisossomal.

5 RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece uma abordagem eficaz e menos invasiva para entrega direta de agentes terapêuticos para o sistema nervoso central (CNS). A presente invenção, em parte, baseada na descoberta inesperada que uma enzima de substituição (por exemplo, arilsulfatase A (ASA)) para
10 uma doença de armazenamento lisossomal (por exemplo, MLD) pode ser introduzida diretamente no líquido cefalorraquidiano (CSF) de um sujeito que necessita de tratamento em uma concentração elevada (por exemplo, maior
15 que 3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL ou mais) tal que a enzima difunde-se eficaz e extensivamente em várias superfícies e penetra em diversas regiões em todo o cérebro, incluindo regiões profundas do cérebro. Mais surpreendentemente, os inventores presentes demonstraram
20 que tal entrega de alta concentração de proteína pode ser feita usando simples solução salina ou formulações à base de tampão e sem induzir graves repercussões, tais como severa resposta imune, no objeto. Portanto, a presente invenção fornece uma abordagem altamente eficiente,
25 clinicamente desejável e favorável ao paciente para entrega direta do CNS para o tratamento de várias doenças e distúrbios que têm componentes do CNS, em particular, doenças por armazenamento dos lisossomos. A presente invenção representa um avanço significativo no campo da
30 terapia de reposição de direcionamento e enzima do CNS.

Conforme descrito em detalhes abaixo, os inventores presentes tem desenvolvido com sucesso formulações estáveis para administração eficaz intratecal (IT) de uma proteína de arilsulfatase A (ASA). Contempla-se, no entanto, que 5 várias formulações estáveis aqui descritas são geralmente adequadas para a entrega no CNS de agentes terapêuticos, incluindo várias outras enzimas lisossomais. Na verdade, formulações estáveis de acordo com a presente invenção podem ser usadas para a entrega do CNS através de várias 10 técnicas e rotas, incluindo, mas não limitado a administrações intraparenquimal, intracerebral, intraventricular cerebral (ICV), intratecal (por exemplo, IT-lombar, IT-cisterna magna) e outras técnicas e rotas para injeção diretamente ou indiretamente no CNS e no CSF.

15 Também está previsto que diversas formulações estáveis aqui descritas são geralmente adequadas para a entrega no CNS de outros agentes terapêuticos, tais como proteínas terapêuticas, incluindo várias enzimas de substituição para doenças por armazenamento dos lisossomos. Em algumas 20 modalidades, uma enzima de substituição pode ser uma enzima sintética, recombinante, gene ativado ou natural.

Em várias modalidades, a presente invenção inclui uma formulação estável para a administração intratecal direta no CNS composta por uma proteína arilsulfatase A (ASA), sal 25 e um surfactante de polissorbato. Em algumas modalidades, a proteína ASA está presente em concentrações que variam de cerca de 1 a 300 mg/mL (por exemplo, 1 a 250 mg/mL, 1 a 200 mg/mL, 1 a 150 mg/mL, 1 a 100 mg/mL, 1 a 50 mg/mL). Em algumas modalidades, a proteína ASA está presente no ou 30 acima de uma concentração selecionada de 2 mg/mL, 3 mg/mL,

4 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, 25 mg/mL, 30 mg/mL, 35 mg/mL, 40 mg/mL, 45 mg/mL, 50 mg/mL, 60 mg/mL, 70 mg/mL, 80 mg/mL, 90 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL, 200 mg/mL, 250 mg/mL, ou 300 mg/mL.

5 Em várias modalidades, a presente invenção inclui uma formulação estável de qualquer uma das modalidades descritas neste documento, em que a proteína da ASA é composta por uma sequência de aminoácidos de SEQ ID N°1. Em algumas modalidades, a proteína ASA compreende uma
10 sequência de aminoácidos pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 98% idêntica ao SEQ ID N°: 1. Em algumas modalidades, a formulação estável de qualquer uma das modalidades descritas neste documento inclui um sal. Em algumas modalidades, o sal é NaCl. Em algumas modalidades,
15 o NaCl está presente como uma concentração variando de aproximadamente 0 a 300 mM (por exemplo, 0 a 250 mM, 0 a 200 mM, 0 a 150 mM, 0 a 100 mM, 0 a 75 mM, 0 a 50 mM ou 0 a 30 mM). Em algumas modalidades, o NaCl está presente numa concentração que varia de aproximadamente 137 a 154 mM. Em
20 algumas modalidades, o NaCl está presente numa concentração de cerca de 154 mM.

Em várias modalidades, a presente invenção inclui uma formulação estável de qualquer uma das modalidades descritas neste documento, em que o surfactante de
25 polissorbato é selecionado do grupo constituído de polissorbato 20, polissorbato 40, polissorbato 60, polissorbato 80 e combinação destes. Em algumas modalidades, o surfactante de polissorbato é polissorbato 20. Em algumas modalidades, o polissorbato 20 está presente
30 numa concentração que varia de aproximadamente 0 a 0.02%.

Em algumas modalidades, o polissorbato 20 está presente numa concentração de cerca de 0.005%.

Em várias modalidades, a presente invenção inclui uma formulação estável de qualquer uma das modalidades
5 descritas neste documento, em que a formulação ainda compreende um agente tamponador. Em algumas modalidades, o agente tamponador é selecionado do grupo constituído por fosfato, acetato, histidina, succinate, Tris e suas combinações. Em algumas modalidades, o agente tamponador é
10 fosfato. Em algumas modalidades, o fosfato está presente em uma concentração não superior a 50 mM (por exemplo, não superior a 45 mM, 40 mM, 35 mM, 30 mM, 25 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM ou 5 mM). Em algumas modalidades, o fosfato está presente numa concentração não superior a 20 mM. Em vários
15 aspectos, a invenção inclui uma formulação estável de qualquer uma das modalidades descritas neste documento, cuja formulação tem um pH de aproximadamente 3 a 8 (por exemplo, aproximadamente 4 a 7.5, 5 a 8, 5 a 7.5, 5 a 6.5, 5 a 7.0, 5.5 a 8.0, 5.5 a 7.7, 5.5 a 6.5, 6 a 7.5, ou 6 a
20 7.0). Em algumas modalidades, a formulação tem um pH de cerca de 5.5 a 6.5 (por exemplo, 5.5, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, ou 6.5). Em algumas modalidades, a formulação tem um pH de aproximadamente 6.0.

Em várias modalidades, a presente invenção inclui
25 formulações estáveis de qualquer uma das modalidades descritas neste documento, em que a formulação é uma formulação líquida. Em várias modalidades, a presente invenção inclui uma formulação estável de qualquer uma das modalidades descritas neste documento, em que a formulação
30 é formulada como pó liofilizado.

Em algumas modalidades, a presente invenção inclui uma
formulação estável para administração intratecal,
compreendendo um arilsulfatase proteína A (ASA) em
concentrações que variam de cerca de 1-300 mg/mL, NaCl na
5 concentração de cerca de 154 mM, polissorbato 20, em uma
concentração de aproximadamente 0,005% e um pH de
aproximadamente 6.0. Em algumas modalidades, a proteína ASA
tem uma concentração de aproximadamente 10 mg/mL. Em
algumas modalidades, a proteína ASA tem uma concentração de
10 aproximadamente 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL,
150 mg/mL, 200 mg/mL, 250 mg/mL ou 300 mg/mL.

Em vários aspectos, a presente invenção inclui um
recipiente constituído por uma forma de dosagem única de
uma formulação estável em várias modalidades descritas
15 aqui. Em algumas modalidades, o contêiner é selecionado de
uma ampola, um tubo de ensaio, uma garrafa, um cartucho, um
reservatório, um lyo-ject ou uma seringa pré-cheia. Em
algumas modalidades, o recipiente é uma seringa pré-cheia.
Em algumas modalidades, a seringa pré-cheia é selecionada
20 de seringas de vidro de borosilicato com revestimento de
silicone cozido, seringas de vidro de borosilicato com
silicone pulverizado, ou seringas de resina plástica sem
silicone. Em algumas modalidades, a formulação estável está
presente em um volume de menos de cerca de 50 mL (por
25 exemplo, menos do que 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 ou 0,5 mL). Em algumas
modalidades, a formulação estável está presente em um
volume inferior a 3,0 mL.

30 Em vários aspectos, a presente invenção inclui métodos

de tratamento de Doença de Leucodistrofia Metacromática incluindo a etapa de administração intratecal em um objeto que precisa de tratamento de uma formulação de acordo com qualquer uma das modalidades aqui descritas.

5 Em algumas modalidades, a presente invenção inclui um método de tratamento da Doença de Leucodistrofia Metacromática incluindo uma etapa de administração intratecal para um objeto que precisa de tratamento de uma formulação que inclui uma proteína arilsulfatase A (ASA) em
10 concentrações que variam de cerca de 1 a 300 mg/mL, NaCl na concentração de aproximadamente 154 mM, polissorbato 20, em uma concentração de aproximadamente 0,005% e um pH de aproximadamente 6.

Em algumas modalidades, a administração intratecal
15 resulta em nenhum efeito adverso substancial (por exemplo, resposta imune grave) no objeto. Em algumas modalidades, a administração intratecal resulta em nenhuma resposta imune mediada por células T substancial adaptativa no objeto.

Em algumas modalidades, a administração intratecal de
20 formulação resulta na entrega uma proteína da arilsulfatase para vários tecidos-alvo no cérebro, a medula espinhal, e/ou órgãos periféricos. Em algumas modalidades, a administração intratecal da formulação resulta na entrega de uma proteína a arilsulfatase aos tecidos do cérebro de
25 destino. Em algumas modalidades, os tecidos-alvo do cérebro compõem matéria branca e/ou neurônios na massa cinzenta. Em algumas modalidades, uma proteína de arilsulfatase é entregue aos neurônios, células gliais, células perivasculares e/ou células meníngeas. Em algumas
30 modalidades, uma proteína de arilsulfatase ainda é entregue

para os neurônios na medula espinhal.

Em algumas modalidades, a administração intratecal da formulação ainda resulta em entrega sistêmica da proteína ASA em tecidos-alvo periféricos. Em algumas modalidades, nos tecidos-alvo periférico são selecionadas de fígado, rim, baço e tingimento.

Em algumas modalidades, a administração intratecal da formulação resulta na localização dos lisossomos nos tecidos-alvo do cérebro, neurônios da medula espinhal e/ou tecidos-alvo periféricos. Em algumas modalidades, a administração intratecal de formulação resulta em redução de armazenamento de sulfatídeos nos tecidos-alvo do cérebro, neurônios da medula espinhal e/ou tecidos-alvo periféricos. Em algumas modalidades, o armazenamento de sulfatídeo é reduzido em pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1-vezes, 1.5- vezes, ou 2- vezes, em comparação com um controle (por exemplo, o pré-tratamento de armazenamento GAG no objeto). Em algumas modalidades, a administração intratecal de formulação resulta em reduzida vacuolização nos neurônios (por exemplo, em pelo menos 20%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90%, 1-vezes, 1.5- vezes, ou 2- vezes, em comparação com um controle). Em algumas modalidades, os neurônios são composto por células de Purkinje.

Em algumas modalidades, a administração intratecal de formulação resulta em aumento da atividade enzimática de ASA em tecidos-alvo do cérebro, neurônios da medula espinhal e/ou tecidos-alvo periféricos. Em algumas modalidades, a atividade enzimática de ASA aumenta pelo menos 1-vezes, 2-vezes, 3-vezes, 4-vezes, 5-vezes, 6-vezes,

7-vezes, 8-vezes, 9-vezes ou 10-vezes em comparação com um controle (por exemplo, o pré-tratamento de atividade enzimática endógena no objeto). Em algumas modalidades, o aumento da atividade enzimático de ASA é pelo menos
5 aproximadamente de 10 nmol/hr/mg, 20 nmol/hr/mg, 40 nmol/hr/mg, 50 nmol/hr/mg, 60 nmol/hr/mg, 70 nmol/hr/mg, 80 nmol/hr/mg, 90 nmol/hr/mg, 100 nmol/hr/mg, 150 nmol/hr/mg, 200 nmol/hr/mg, 250 nmol/hr/mg, 300 nmol/hr/mg, 350 nmol/hr/mg, 400 nmol/hr/mg, 450 nmol/hr/mg, 500 nmol/hr/mg,
10 550 nmol/hr/mg ou 600 nmol/hr/mg.

Em algumas modalidades, a atividade enzimática da ASA é maior na região lombar. Em algumas modalidades, o aumento da atividade enzimática de ASA na região lombar é de pelo menos aproximadamente 2000 nmol/h/mg, 3000 nmol/h/mg, 4000
15 nmol/h/mg, 5000 nmol/h/mg, 6000 nmol/h/mg, 7000 nmol/h/mg, 8000 nmol/h/mg, 9000 nmol/h/mg ou 10.000 nmol/h/mg.

Em algumas modalidades, a administração intratecal de formulação dos resulta na reduzida intensidade, gravidade ou frequência, ou início adiado de pelo menos um sintoma ou
20 característica de MLD. Em algumas modalidades, pelo menos um sintoma ou característica de MLD é cognitivo; lesões da massa branca; espaços perivasculares dilatados do parênquima cerebral, gânglios, corpo caloso e/ou tronco cerebral; atrofia; e/ou ventriculomegalia.

25 Em algumas modalidades, a administração intratecal ocorre uma vez a cada duas semanas. Em algumas modalidades, a administração intratecal ocorre uma vez por mês. Em algumas modalidades, a administração intratecal ocorre uma vez a cada dois meses. Em algumas modalidades, a
30 administração intratecal é usada em conjunto com

administração intravenosa. Em algumas modalidades a administração por via venosa é não mais frequente do que uma vez por semana. Em algumas modalidades, a administração por via venosa é não mais frequente do que uma vez a cada 5 duas semanas. Em algumas modalidades, a administração por via venosa é não mais frequente do que uma vez por mês. Em algumas modalidades, a administração por via venosa é não mais frequente do que uma vez a cada dois meses. Em determinadas modalidades, a administração intravenosa é 10 mais frequente do que a administração mensal, como duas vezes semana, semanalmente, quinzenalmente, ou duas vezes mensais.

Em algumas modalidades, as administrações intravenosa e intratecal são realizadas no mesmo dia. Em algumas 15 modalidades, as administrações intravenosa e intratecal não são executadas dentro de um determinado período de tempo do outro, como não no prazo de pelo menos 2 dias, dentro de pelo menos 3 dias, no prazo de pelo menos 4 dias, dentro de pelo menos 5 dias, dentro de pelo menos 6 dias, dentro de 20 pelo menos 7 dias ou dentro pelo menos de uma semana. Em algumas modalidades, as administrações intravenosas e intratecal são executadas em um horário alternado, como administrações alternadas semanalmente, cada semana, duas vezes por mês ou mensal. Em algumas modalidades, uma 25 administração intratecal substitui uma administração intravenosa em um horário de administração, como em um programa de administração de intraveneous semanalmente, quinzenalmente, duas vezes mensal, ou mensal, cada terceira ou quarta ou quinta administração nessa lista pode ser 30 substituída por uma administração intratecal no lugar de

uma administração intravenosa.

Em algumas modalidades, as administrações intravenosas e intratecal são executadas sequencialmente, como realizando administrações intravenosas primeiro (por exemplo, semanalmente, quinzenalmente, duas vezes por mês, ou dosagem mensal para duas semanas, um mês, dois meses, três meses, quatro meses, cinco meses, seis meses, um ano ou mais) seguida de administrações IT (e.g., semanalmente, quinzenalmente, duas vezes por mês, ou a dosagem mensal por mais de duas semanas, um mês, dois meses, três meses, quatro meses, cinco meses, seis meses, um ano ou mais). Em algumas modalidades, as administrações intratecais são executadas primeiro (por exemplo, semanalmente, quinzenalmente, mensalmente, duas vezes mensal, uma vez a cada dois meses, uma vez cada três meses, dosagem por duas semanas, um mês, dois meses, três meses, quatro meses, cinco meses, seis meses, um ano ou mais) seguido por administrações intravenosas (e.g., semanalmente, quinzenalmente, duas vezes mensalmente, ou mensalmente a dosagem por mais de duas semanas, um mês, dois meses, três meses, quatro meses, cinco meses, seis meses, um ano ou mais).

Em algumas modalidades, a administração intratecal é usada na ausência da administração intravenosa.

Em algumas modalidades, a administração intratecal é usada na ausência de terapia imunossupressora simultânea.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 ilustra exemplares dados de concentração de arilsulfatase A (rhASA) no soro após administração IV.

A Figura 2 ilustra exemplares dados de concentração de

arilsulfatase A (rhASA) no soro após a administração IT-lombar.

A Figura 3 ilustra exemplar concentração de (rhASA) em CSF depois de administração IV.

5 A Figura 4 ilustra exemplar concentração de (rhASA) em CSF após a administração IT-lombar.

Figura 5 ilustra exemplar análise do efeito de tampão e pH sobre a estabilidade térmica de rhASA.

Figura 6 ilustra a análise exemplar de SDS-PAGE
10 (Coomassie) de rhASA depois de duas semanas a 40 ± 2 °C.

Figura 7 ilustra a análise exemplar de SDS-PAGE (Coomassie) de rhASA em formulações IT depois de 3 meses a 5 e 25 °C.

Figura 8 mostra exemplar substância da droga de rhASA
15 e aparência do produto de droga após 48 horas de agitação (painel A) e mistura (painel B).

Figura 9 mostra a exemplar aparência do produto de droga de rhASA (sem P20) com (n = 2) e sem espaço vazio (n = 1) após agitação por 48 horas.

20 Figura 10 ilustra dados exemplares, demonstrando a capacidade do tampão de substância de droga de rhASA em relação ao controle de tampão quando titulado com ácido clorídrico.

Figura 11 ilustra dados exemplares, demonstrando a
25 capacidade de tampão de substância de droga de rhASA em comparação com um controle de tampão quando titulado com solução de hidróxido de sódio 1M.

Figura 12 mostra exemplares amostras de rhASA em solução salina, pH 6.0 variando por concentração.

30 A Figura 13 ilustra a exemplar análise de SEC-HPLC de

rhASA (pH 5,5 fase móvel) em 154 mM NaCl, pH 5,9.

Figura 14 ilustra a exemplar análise de SEC-HPLC de rhASA (pH 7.0 fase móvel) em 154 mM NaCl, pH 5,9.

Figura 15 ilustra exemplares perfis de exclusão de tamanho de linha base e as amostras de estabilidade de 11 meses para rhASA em 154 mM NaCl, pH 5.

Figura 16 mostra foto-micrografias exemplares de tecido cerebral, meninges, infiltrados (grupos de doses médias e altas, ambos os sexos) após o tratamento.

Figura 17 mostra foto-micrografias exemplares de tecido cerebral, meninges, infiltrados (grupos de doses médias e altas, ambos os sexos) após o tratamento.

Figura 18 mostra foto-micrografias exemplares de tecido cerebral, perivascular, infiltrados (machos de dose média; fêmeas de alta dose) após o tratamento.

Figura 19 mostra exemplar coloração azul Alcian da medula espinhal de camundongos imunotolerantes MLD tratados com rhASA retratando resultados exemplares ilustrando a redução de sulfatideo, conforme determinado pela coloração de Alcian azul medular cervical em animais que receberam injeções intratecal de hASA recombinante nos dias 1, 8, 15 e 22 em doses de 520 mg/kg de peso cerebral e controle de veículo. Como demonstrado, o tratamento com recombinante hASA injetado intratecalmente resultou na redução da acumulação de sulfatideo na medula espinhal cervical.

Figura 20 ilustra a exemplar análise de morfometria de tingimento de seções do cordão epinhal com Alcian azul de camundongos imunotolerantes MLD tratados com rhASA, incluindo exemplares resultados que ilustram a densidade ótica de Alcian azul no total da medula espinhal (T-

medular), massa cinzenta total (T-GM), massa cinzenta lombar (L-GM), massa cinzenta cervical (C-GM), massa de branca total (T-WM), massa branca lombar (L-WM) e massa branca cervical (C-WM), conforme determinado pela análise da morfometria. Como demonstrado, uma redução estatisticamente significativa na coloração de Alcian azul foi observada em animais tratados com rhASA em comparação com um controle de veículo.

Figura 21 mostra redução exemplar de tingimento LAMP do cérebro de camundongos imunotolerantes MLD tratados com rhASA retrata resultados exemplares que ilustram os níveis de LAMP-1 na fimbria conforme determinado pela imuno-histoquímica. Ampliação = 20X. Como demonstrado, tratamento com rhASA injetado intratecalmente resultou em redução da LAMP-1 na massa branca cerebral.

Figura 22 ilustra a exemplar análise de morfometria de tingimento LAMP do cérebro de camundongos imunotolerantes MLD tratados com rhASA retrata resultados exemplares que ilustram a intensidade LAMP-1 de tingimento no corpus caloso (CC), fimbria (F), matéria branca cerebelar (CB-WM) e tronco cerebral (BS) de animais tratados com 20 mg/kg de rhASA intravenosa, 300 mg/kg de rhASA intratecal por peso do cérebro, 520 mg/kg de rhASA intravenosa por peso do cérebro, ou o controle do veículo.

Figura 23 ilustra a concentração exemplar de rhASA em punções de cérebro de macacos cinomólogos juvenis dosado por veículo seguindo dosagem de dosagem EOW IT por 6 meses - necropsia principal.

Figura 24 ilustra a concentração exemplar de rhASA em punções de cérebro de macacos cinomólogos juvenis seguindo

dosagem EOW IT de rhASA em 1,8 mg/dose por 6 meses -
necropsia principal.

Figura 25 ilustra a concentração exemplar de rhASA em
punções de cérebro de macacos cinomólogos juvenis seguindo
5 dosagem EOW IT de rhASA a 6.0 mg/dose por 6 meses -
necropsia principal.

Figura 26 ilustra a concentração exemplar de rhASA em
punções de cérebro de macacos cinomólogos juvenis seguindo
dosagem EOW IT de rhASA a 18,6 mg/dose por 6 meses -
10 necropsia principal.

Figura 27 ilustra a concentração exemplar de ASA em
punções de cérebro de macacos cinomólogos juvenis seguindo
dosagem EOW IT (PBS-controle) por 6 meses - necrópsia de
recuperação.

15 Figura 28 ilustra a concentração exemplar de rhASA em
punções de cérebro de macacos cinomólogos juvenis seguindo
dosagem EOW IT de veículo por 6 meses - necrópsia de
recuperação.

Figura 29 ilustra a concentração exemplar de rhASA em
20 punções de cérebro de macacos cinomólogos juvenis seguindo
a dosagem EOW IT de rhASA a 1,8 mg/dose por 6 meses -
necrópsia de recuperação.

Figura 30 ilustra a concentração exemplar de rhASA em
punções de cérebro de macacos cinomólogos juvenis seguido
25 dosagem EOW IT de rhASA 6,0 mg/dose por 6 meses - necrópsia
de recuperação.

Figura 31 ilustra a concentração exemplar de rhASA em
punções de cérebro de macacos cinomolgos juvenis seguindo
dosagem EOW IT de rhASA em 18,6 mg/dose por 6 meses -
30 necrópsia de recuperação.

Figura 32 ilustra a exemplar concentração de rhASA em punções selecionadas da superfície do cérebro para dispositivo de controle, veículo, animais tratados com 1,8 mg, 6,0 mg e 18,6 mg, (masculino e feminino separado, dados de controle de dispositivo são de necropsia de recuperação, todos os outros dados de necropsia principal).

Figura 33 ilustra a concentração exemplar de rhASA em punções selecionados da área profunda cinzenta do cérebro para dispositivo controle, veículo, animais tratados com 1,8 mg, 6,0 mg e 18,6 mg, (masculino e feminino separado, dados de controle de dispositivo são de necropsia de recuperação, todos os outros dados de necropsia principal).

Figura 34 ilustra exemplar concentração de rhASA em punções selecionadas da profunda área cinzenta do cérebro para dispositivo controle, veículo, animais tratados com 1,8 mg, 6,0 mg e 18,6 mg, (masculino e feminino separado, dados de controle de dispositivo são de necropsia de recuperação, todos os outros dados de necropsia principal).

Figura 35 ilustra exemplar concentração de rhASA em punções selecionados de várias regiões no dispositivo controle, veículo, animais tratados com 1.8.mg, 6,0 mg e 18,6 mg, (macho e fêmea combinado, controle de dispositivo são de dados de necropsia de recuperação, todos os outros dados de necropsia principal).

Figura 36 ilustra a concentração exemplar de rhASA nas seções de medula espinhal de macacos *Cynomolgus juvenis* seguindo dosagem EOW IT por 6 meses - necropsia de recuperação.

Figura 37 ilustra a concentração exemplar de rhASA no fígado dos macacos *Cynomolgus juvenis* seguindo dosagem EOW

IT por 6 meses - necropsia de recuperação a seguir.

Figura 38 ilustra exemplares localizações anatômicas de certas punções de cérebro.

Figura 39 ilustra exemplares localizações anatômicas de certas punções de cérebro.

Figura 40 ilustra exemplares localizações anatômicas de certas punções de cérebro.

Figura 41 ilustra exemplares localizações anatômicas de certas punções de cérebro.

Figura 42 ilustra exemplares localizações anatômicas de certas punções de cérebro.

Figura 43 ilustra exemplares localizações anatômicas de certas punções de cérebro.

Figura 44A - G ilustram a concentração de arilsulfatase A (rhASA) recombinante humana nas punções de tecido extraídas dos tecidos do cérebro de macacos *Cynomolgus* adulto e juvenil administrado um veículo, rhASA de 1,8 mg ou 18,6 mg rhASA. Cada figura 44A-g corresponde a uma região de tecido cerebral retratada na figura 39.

Figura 45A e B ilustram a comparação exemplar das concentrações de recombinante humano arilsulfatase A (rhASA) detectada na matéria branca profunda (figura 45A) ou o cinzento profundo matéria (figura 45B) tecidos de cérebro de macacos *Cynomolgus* adultos e juvenis que foram intratecalmente (IT) ou intracerebroventricularmente (ICV) administrados com rhASA.

Figura 46A ilustra concentrações de rhASA detectadas em várias punções de tecidos obtidos de macacos *cynomolgus* juvenis (<12 meses de idade) administrados com uma dose de 18,6 ou 1,8 mg de arilsulfatase A (rhASA) recombinante

humano. Conforme ilustrado em ambas as figuras 40 A-B, a concentração de rhASA entregue aos tecidos estavam dentro, ou caso contrário excederam a concentração terapêutica desejada de 2,5 mg/mg de proteína. As regiões anatômicas do tecido do cérebro que correspondem a cada um dos números de punções representadas na figura 46 A e figura 46 B são: matéria branca subcortical (1); matéria de branca periventricular e matéria branca profunda (2); matéria de branca subcortical (3); matéria de branca subcortical (4); cápsula interna (5); núcleo caudado de cápsula interna (6); matéria branca profunda (7); matéria branca subcortical e cortical (8); putâmen (9); matéria branca subcortical temporal e do córtex (10), massa cinzenta profunda (11), massa cinzenta profunda (12), periventricular & subcortical frontal (13); matéria branca subcortical, perifalxian superficial de córtex (14); corpo caloso e matéria branca pericalosal subcortical (15);profunda matéria branca subcortical (16); massa cinzenta profunda (17); massa cinzenta profunda (18); matéria branca periventricular (19); matéria branca profunda subcortical (20); hipocampo (21); corpo caloso (22); matéria branca profunda (23); matéria de branca subcortical, lóbulo occipital (24); e matéria branca cerebelar (25).

Figura 47A ilustra a área de tecido de matéria branca profunda, extraído de um macaco cynomolgus administrado IT com 1,8 mg de rhASA. Figura 47B ilustra imunotintamento do tecido matéria branca profunda e revela distribuição de rhASA em células relevantes. Figura 47C ilustra que rhASA administrado IT demonstrou co-localização de organela no tecido de matéria branca profunda do macaco cynomolgus e em

particular nos lisossomos. Na Figura 47C, imunostingimento de ASA é ilustrado na caixa superior esquerda.

Figura 48 compara a distribuição de arilsulfatase A (rhASA) marcada com ^{124}I usando varredura PET 24 horas após qualquer administração IT ou ICV de tal rhASA marcado para um macaco cynomolgus.

Figura 49 ilustra a distribuição de ASA marcado com ^{124}I imediatamente após administração ICV para um macaco cynomolgus e compara a distribuição de ASA marcado com ^{124}I administrado IT dentro de 2 a 5 horas. Como demonstrado, administração IT distribuiu ASA ^{124}I marcado para os mesmos compartimentos iniciais (cisternae e coluna vertebral proximal) como aquela para a administração ICV.

Figura 50 retrata exemplar administração ICV e IT em um modelo do camundongo.

Figura 51 mostra um exemplar dispositivo de entrega de droga intratecal (IDDD).

Figura 52 mostra um exemplar sistema de acesso implantável intratecal de baixo perfil PORT-A-CATH®.

Figura 53 mostra um exemplar dispositivo de entrega de droga intratecal (IDDD).

Figura 54 mostra um exemplar dispositivo de entrega de droga intratecal (IDDD), que permite a administração domiciliar para terapia de reposição enzimática (ERT) do CNS.

Figura 55 ilustra e diagrama exemplar de um dispositivo intratecal de entrega de drogas (IDDD) com um mecanismo de fixação.

Figura 56 mostra exemplares locais no corpo do paciente onde pode ser colocado um IDDD; Figura 56B retrata

vários componentes de um dispositivo de entrega de droga intratecal (IDDD); e a figura 56 mostra uma exemplar localização de inserção no corpo de um paciente para injeção IT-lombar.

5 DEFINIÇÕES

Para que a presente invenção seja mais facilmente compreendida, certos termos são primeiramente definidos abaixo. Definições adicionais para os seguintes termos e as demais condições estão estabelecidas em toda a especificação.

Aproximadamente ou cerca de: neste documento, o termo "aproximadamente" ou "cerca de", quando aplicado a um ou mais valores de interesse, se refere a um valor que é semelhante a um valor de referência indicado. Em determinadas modalidades, o termo "aproximadamente" ou "cerca de" refere-se a um intervalo de valores que se enquadram dentro de 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%), 6%), 5%, 4%, 3%, 2%, 1%), ou menos em qualquer direção (maior ou menor que) do valor de referência declarado, salvo indicação em contrário ou caso contrário evidente do contexto (exceto onde tal número excede 100% de um valor possível).

Melhoria: como usado aqui, o termo "melhoria" destina-se a prevenção, redução ou condição paliativa, ou melhoria do estado de um objeto. Melhoria inclui, mas não exige a completa recuperação ou prevenção completa de uma condição de doença. Em algumas modalidades, melhora inclui níveis crescentes de proteína relevante ou sua atividade que é deficiente em tecidos da doença em questão.

30 Biologicamente ativos: como usado aqui, a frase

"biologicamente ativo" refere-se a uma característica de qualquer agente que tem a atividade em um sistema biológico e particularmente em um organismo. Por exemplo, um agente que, quando administrado para um organismo, tem um efeito biológico nesse organismo, é considerado biologicamente ativo. Em particulares modalidades, onde uma proteína ou um polipeptídeo é biologicamente ativo, uma porção da proteína ou polipeptídeo que compartilha pelo menos uma atividade biológica da proteína ou polipeptídeo é normalmente referida como uma porção "biologicamente ativa".

Agente de volume: como usado aqui, o termo "agente de volume" se refere a um composto que se adiciona a massa à mistura liofilizada e contribui para a estrutura física do bolo liofilizado (por exemplo, facilita a produção de uma torta liofilizada essencialmente uniforme, que mantém uma estrutura de poros abertos). Agentes de volume exemplares incluem o manitol, glicina, cloreto de sódio, hidroxietil amido, lactose, sacarose, trealose, polietileno glicol e dextran.

Receptor de manose-6-fosfato independente de cátion (CI-MPR): como usado aqui, o termo "receptor de manose-6-fosfato independente de cátion (CI-MPR)" refere-se a um receptor celular que liga etiquetas manose-6-fosfato (M6P) nos precursores de hidrolase ácida no aparelho de Golgi que são destinados ao transporte para a lisossoma. Além de manose-6-fosfatos, a CI-MPR também se liga a outras proteínas, incluindo IGF-II. O CI-MPR é também conhecido como "receptor M6P/IGF-II," "receptor CI-MPR/IGF-II", "receptor IGF-II" ou "receptor IGF2." Estes termos e respectivas abreviaturas são usados aqui permutavelmente.

Terapia imunossupressora simultânea: como usado aqui, o termo "terapia imunossupressora simultânea" inclui qualquer terapia imunossupressora usada como pré-tratamento, pré-condicionamento ou em paralelo a um método
5 de tratamento.

Diluyente: como usado aqui, o termo "diluyente" refere-se a um substância diluyente farmacologicamente aceitável (por exemplo, segura e não tóxico para a administração em um ser humano) útil para a preparação de uma formulação
10 reconstituída. Diluentes exemplares incluem água estéril, água bacteriostática para injeção (BWFI), uma solução de pH tamponado (ex. fosfato salino), solução salina estéril, solução de Ringer ou solução de dextrose.

Formas de dosagem: como usado aqui, os termos "forma
15 de dosagem" e "forma de dosagem unitária" se refere a uma unidade fisicamente discreta de uma proteína terapêutica para o paciente a ser tratado. Cada unidade contém uma quantidade pré-determinada de material ativo calculado para produzir o efeito terapêutico desejado. Será compreendido,
20 no entanto, que a dosagem total da composição será decidida pelo médico dentro do escopo da aplicação do bom senso de médico.

Terapia de reposição enzimática (ERT): como usado aqui, o termo "terapia de reposição enzimática (ERT)"
25 refere-se a qualquer estratégia terapêutica que corrige uma deficiência enzimática, fornecendo a enzima ausente. Em algumas modalidades, a enzima ausente é fornecida pela administração intratecal. Em algumas modalidades, a enzima ausente é fornecida através da infusão na corrente
30 sanguínea. Uma vez administrados, enzima é retomada pelas

células e transportada para o lisossomo, onde a enzima age para eliminar o material acumulado em lisossomos devido à deficiência da enzima. Normalmente, para terapia de reposição enzimática dos lisossomos ser eficaz, a enzima terapêutica é entregue aos lisossomos em células adequadas em tecidos-alvo onde o defeito de armazenamento é manifesto.

Melhorar, aumentar ou reduzir: como usado aqui, os termos "melhorar", "aumentar" ou "reduzir" ou equivalentes gramaticais, indicam que são em relação a uma medida de referência, como uma medida no mesmo indivíduo antes do início do tratamento descrito neste documento, ou uma medida em um controle individual (ou de vários indivíduos de controle) na ausência de tratamento descrito neste documento. Um "indivíduo de controle" é um indivíduo afligido com a mesma forma de doença de armazenamento lisossomal como o indivíduo a ser tratado, que é quase da mesma idade do indivíduo a ser tratado (a fim de assegurar que os estágios da doença no indivíduo tratado e no indivíduo de controle são comparáveis).

Indivíduo, objeto, paciente: como usado aqui, os termos "Indivíduo" "objeto" ou "paciente" se referirem a um ser humano ou um objeto mamífero não-humano. O indivíduo (também referido como "paciente" ou "objeto") sendo tratado é um indivíduo (feto, bebê, criança, adolescente ou adulto humano) que sofre de uma doença.

Administração intratecal: como usado aqui, o termo "administração intratecal" ou "injeção intratecal" se refere a uma injeção dentro do canal espinhal (espaço intratecal ao redor da medula espinhal). Várias técnicas

podem ser utilizadas, incluindo, sem limitação, injeção cerebroventricular lateral através de um orifício de trepanação ou punção cisternal ou lombar ou coisa parecida. Em algumas modalidades, "administração intratecal" ou "5 administração intratecal " de acordo com a presente invenção refere-se a administração IT ou entrega via área ou região lombar, ou seja, a administração ou a entrega IT lombar. Como usado aqui, o termo " região lombar " ou "área lombar" se refere à área entre as terceira e quarta 10 vértebras da lombar (parte inferior das costas) e, inclusive a região da coluna vertebral L2-S1.

Ligador: como usado aqui, o termo "ligador" refere-se a, em uma proteína de fusão, uma sequência de aminoácidos diferente que aparece em uma posição particular na proteína 15 natural e geralmente é projetada para ser flexível ou interpor uma estrutura, como um a-hélice, entre duas metades de proteína. Um ligador também é referido como um espaçador.

Lioprotetor: como usado aqui, o termo "lioprotetor" 20 refere-se a uma molécula que impede ou reduz a instabilidade química e/ou física de uma proteína ou outra substância após a liofilização e armazenamento subsequente. Lioprotetores exemplares incluem açúcares como a sacarose ou trealose; um aminoácido como glutamato monossódico ou 25 histidina; uma metilamina como betaína; um sal liotropico como o sulfato de magnésio; um poliol como álcoois trihídricos ou superiores de açúcar, por exemplo, glicerina, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol e manitol; propilenoglicol; polietilenoglicol; Pluronicos; 30 e suas combinações. Em algumas modalidades, um lioprotetor

é um açúcar não redutor, tal como a trealose ou sacarose.

Enzima lisossomal: como usado aqui, o termo "enzima lisossomal" refere-se a qualquer enzima que é capaz de reduzir materiais acumulados em mamíferos lisossomos ou que
5 pode resgatar ou melhorar um ou mais sintomas de doença de armazenamento lisossomal. Enzimas lisossomais apropriadas para a invenção incluem enzimas lisossomais tipo selvagem ou modificadas e podem ser produzidas usando métodos sintéticos e recombinantes ou purificadas a partir de
10 fontes de natureza. Exemplos de enzimas lisossomais são listadas na tabela 1.

Deficiência de enzima lisossomal: como usado aqui, "deficiência da enzima lisossomal" refere-se a um grupo de doenças genéticas que resultam da deficiência em pelo menos
15 uma das enzimas que são necessárias para quebrar macromoléculas (por exemplo, substrato de enzima) até peptídeos, aminoácidos, monossacarídeos, ácidos nucleicos e ácidos graxos em lisossomos. Como resultado, indivíduos que sofrem de deficiência enzimática lisossomal acumularam
20 materiais em vários tecidos (por exemplo, CNS, fígado, baço, intestino, paredes dos vasos sanguíneos e outros órgãos).

Doença de armazenamento lisossomal: como usado aqui, o termo "doença de armazenamento lisossomal" refere-se a
25 qualquer doença resultante da deficiência de uma ou mais enzimas lisossomais necessárias para metabolizar macromoléculas naturais. Estas doenças geralmente resultam no acúmulo de moléculas não degradadas em lisossomos, resultando no aumento do número de grânulos de
30 armazenamento (também denominados vesículas de

armazenamento). Estas doenças e vários exemplos são descritos mais detalhadamente abaixo.

Polipeptídeo: como usado aqui, um "polipeptídeo" em geral é uma sequência de caracteres de pelo menos dois aminoácidos ligados entre si por uma ligação peptídica. Em algumas modalidades, um polipeptídeo pode incluir pelo menos 3-5 aminoácidos, cada um deles está ligado em outros por meio de pelo menos uma ligação peptídica. Aqueles de versados na técnica apreciarão que às vezes polipeptídeos incluem aminoácidos "não-naturais" ou outras entidades que, no entanto, são capazes de integrar uma cadeia de polipeptídeo, opcionalmente.

Enzima de substituição: como usado aqui, o termo "enzima de substituição" se refere a uma enzima que pode agir para substituir pelo menos em parte a enzima deficiente ou ausente em uma doença a ser tratada. Em algumas modalidades, o termo "enzima de substituição" refere-se a uma enzima que pode

agir para substituir pelo menos em parte, a enzima lisossômica deficiente ou ausente em uma doença de armazenamento lisossomal a ser tratada. Em algumas modalidades, uma enzima de substituição é capaz de reduzir materiais acumulados em mamíferos lisossomos ou que pode resgatar ou melhorar um ou mais sintomas de doença de armazenamento lisossomal. Enzimas de substituição apropriadas para a invenção incluem enzimas lisossomais tipo selvagem ou modificadas e podem ser produzidas usando métodos sintéticos e recombinantes ou purificado a partir de fontes de natureza. Uma enzima de substituição pode ser uma enzima recombinante sintética, gene ativado ou natural.

Solúvel: como usado aqui, o termo "solúvel" refere-se à capacidade de um agente terapêutico para formar uma solução homogênea. Em algumas modalidades, a solubilidade do agente terapêutico na solução em que é administrado e como ele é transportado para o local de destino da ação (por exemplo, as células e tecidos do cérebro) é suficiente para permitir a entrega de uma quantidade terapêuticamente eficaz do agente terapêutico para o local alvo da ação. Vários fatores podem afetar a solubilidade dos agentes terapêuticos. Por exemplo, os fatores relevantes que podem afetar a solubilidade da proteína incluem força iônica, sequência de aminoácidos e a presença de agentes ou outros sais co-solubilizantes (por exemplo, sais de cálcio). Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas são formuladas tal que sais de cálcio são excluídos de tais composições. Em algumas modalidades, agentes terapêuticos em conformidade com a presente invenção são solúveis na sua composição farmacêutica correspondente. Será apreciado que, enquanto soluções isotônicas são geralmente preferidas para drogas administradas por via parentérica, o uso de soluções isotônicas pode limitar solubilidade adequada para alguns agentes terapêuticos e, em particular algumas proteínas e/ou enzimas. Soluções ligeiramente hipertônicas (por exemplo, até 175 mM de cloreto de sódio em 5 mM de fosfato de sódio em pH 7.0) e soluções contendo açúcar (por exemplo, até 2% de sacarose em 5 mM de fosfato de sódio em pH 7.0) tem demonstrado ser bem toleradas em macacos. Por exemplo, a composição mais comum aprovada em formulação de bolus de CNS é a salina (NaCl 150 mM em água).

Estabilidade: como usado aqui, o termo "estável"

refere-se à capacidade do agente terapêutico (por exemplo, uma enzima recombinante) de manter a sua eficácia terapêutica (por exemplo, toda ou a maioria de sua integridade biológica e/ou físico-químicos pretendida da atividade) por longos períodos de tempo. A estabilidade de um agente terapêutico e a capacidade da composição farmacêutica para manter a estabilidade de tal agente terapêutico poderá ser avaliada durante longos períodos de tempo (por exemplo, de pelo menos 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36 meses ou mais). Em geral, composições farmacêuticas aqui descritas foram formuladas tal que são capazes de estabilizar, ou alternativamente retardar ou impedindo a degradação de um ou mais agentes terapêuticos formulados com isso (por exemplo, proteínas recombinantes). No contexto de uma formulação uma formulação estável é uma em que o agente terapêutico mantém essencialmente sua integridade física e/ou química e atividade biológica no armazenamento e durante os processos (como congelamento/descongelamento, mistura mecânica e liofilização). Para a estabilidade da proteína, pode ser medida pela formação de agregados de alto peso molecular (HMW), perda de atividade enzimática, geração de fragmentos de peptídeo e a mudança dos perfis de carga.

Objeto: neste documento, o termo "objeto" representa qualquer mamífero, incluindo os seres humanos. Em determinadas modalidades da presente invenção é um adulto, um adolescente ou uma criança. Também é prevista pela presente invenção a administração de composições farmacêuticas e/ou desempenho dos métodos de tratamento in-utero.

Homologia substancial: A frase "homologia substancial" é usada neste documento para se referir a uma comparação entre sequências de aminoácidos ou de ácidos nucleicos. Como será apreciado por aqueles de versados na técnica, 5 duas sequências são geralmente consideradas "substancialmente homólogas" se estas contiverem resíduos homólogos em posições correspondentes. Resíduos homólogos podem ser resíduos idênticos. Alternativamente, resíduos homólogos podem não ser resíduos idêntico adequadamente com 10 estruturais e/ou características funcionais semelhantes. Por exemplo, como é sabido por aqueles de versados na técnica, certos aminoácidos são normalmente classificados como aminoácidos "hidrofóbicos" ou "hidrófilos", e/ou como tendo cadeias laterais "polares" ou "não-polares". A 15 substituição de um aminoácido por outro do mesmo tipo, muitas vezes pode ser considerada uma substituição "homóloga".

Como é sabido, nesta técnica, sequências de aminoácidos ou de ácidos nucleicos podem ser comparadas 20 usando qualquer de uma variedade de algoritmos, incluindo aqueles disponíveis em programas de computador comerciais como BLASTN para sequências de nucleotídeos e BLASTP, gapped BLAST e PSI-BLAST para sequências de aminoácidos. Exemplos de tais programas são descritos em Altschul, et 25 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 e PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., 30 *Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes*

e *Proteins*, Wiley, 1998; e Misener, et al., (eds.), *Bioinformatics Methods e Protocols* (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Além de identificar sequências homólogas, os programas mencionados acima
5 normalmente fornecem uma indicação do grau de homologia. Em algumas modalidades, duas sequências são consideradas substancialmente homólogos se pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) ou mais de seus resíduos correspondentes são
10 homólogos ao longo de um relevante trecho de resíduos. Em algumas modalidades, o trecho relevante é uma sequência completa. Em algumas modalidades, o trecho relevante é de pelo 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,
15 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 ou mais resíduos.

Identidade substancial: A frase "identidade substancial" é usada neste documento para se referir a uma comparação entre sequências de aminoácidos ou de ácidos
20 nucleicos. Como será apreciado por aqueles de versados na técnica, duas sequências são geralmente consideradas "substancialmente idênticas" se contiverem resíduos idênticos em posições correspondentes. Como é bem conhecido nesta arte, sequências de aminoácidos ou de ácidos
25 nucleicos podem ser comparadas usando qualquer de uma variedade de algoritmos, incluindo aqueles disponíveis em programas de computador comerciais como BLASTN para sequências de nucleotídeos e BLASTP, gapped BLAST e PSI-BLAST para sequências de aminoácidos. Exemplos de tais
30 programas são descritos em 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*
5 *Genes e Proteins*, Wiley, 1998; e Misener, et al., (eds.), *Bioinformatics Methods e Protocols* (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Além de identificar sequências idênticas, os programas mencionados acima normalmente fornecem uma indicação do grau de identidade.

10 Em algumas modalidades, duas sequências são consideradas substancialmente idênticas, se pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de seus resíduos correspondentes são idênticos ao longo de um trecho relevante de resíduos. Em

15 algumas modalidades, o trecho relevante é uma sequência completa. Em algumas modalidades, o trecho relevante é de pelo 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 ou mais

20 resíduos.

CSF sintético: como usado aqui, o termo "CSF sintético" refere-se a uma solução que tem pH, composição de eletrólitos, glicose e osmolaridade consistente com o líquido cefalorraquidiano. CSF sintético é também referido

25 como CSF artificial. Em algumas modalidades, CSF sintético é uma solução B de Elliott.

Apropriado para entrega no CNS: como usado aqui, a frase "apropriado para entrega no CNS" ou "apropriado para entrega intratecal" no que se refere a composições

30 farmacêuticas da presente invenção geralmente refere-se as

propriedades de solubilidade, tolerabilidade e estabilidade de tais composições, bem como a capacidade de tais composições para entregar uma quantidade eficaz do agente terapêutico contida nelas no local alvo de entrega (por exemplo, o CSF ou o cérebro).

Tecidos-alvo: como usado aqui, o termo "tecido-alvo" refere-se a todo o tecido que é afetado pela doença de armazenamento lisossomal a ser tratada ou qualquer tecido em que a enzima lisossômica normalmente expressa é deficiente. Em algumas modalidades, os tecidos-alvo incluem os tecidos em que há uma quantidade detectável ou anormalmente alta de substrato, por exemplo armazenados nos lisossomos celulares do tecido, nos pacientes que sofrem de ou suscetíveis à doença de armazenamento lisossomal. Em algumas modalidades, os tecidos-alvo incluem aqueles tecidos que exibem patologia associada a doença, sintoma ou recurso. Em algumas modalidades, os tecidos-alvo incluem os tecidos em que a enzima lisossômica normalmente expressa é deficiente em um nível elevado. Como usado aqui, um tecido alvo pode ser um tecido-alvo do cérebro, um tecido-alvo medular e/ou um tecido-alvo periférico. Tecidos-alvo exemplar são descritos em detalhes abaixo.

Parte ativa terapêutica: como usado aqui, o termo "parte ativa terapêutica" refere-se a uma parte de uma molécula, que torna o efeito terapêutico da molécula. Em algumas modalidades, uma parte ativa terapêutica é um polipeptídeo com atividade terapêutica.

Quantidade terapêuticamente eficaz: como usado aqui, o termo "quantidade terapêuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de uma proteína terapêutica (por exemplo, enzima

de substituição), que confere um efeito terapêutico sobre o objeto tratado, em uma razoável relação de risco/benefício, aplicável a qualquer tratamento médico. O efeito terapêutico pode ser objetivo (isto é, mensurável por algum teste ou marcador) ou subjetivo (ou seja, objeto dá uma indicação da ou sente um efeito). Em particular, a "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de uma proteína terapêutica ou composição eficaz tratar, amenizar ou prevenir uma doença desejada ou condição, ou apresenta um efeito terapêutico ou preventivo detectável, tal como por melhorar os sintomas associados com a doença, prevenir ou retardar o aparecimento da doença, e/ou também diminuir a severidade ou a frequência dos sintomas da doença. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é geralmente administrada em um regime de dosagem que pode compreender várias unidade de dose. Para qualquer proteína terapêutica específica, uma quantidade terapeuticamente eficaz (e/ou uma apropriada unidade de dose dentro de um regime de dosagem eficaz) pode variar, por exemplo, dependendo da via de administração, em combinação com outros agentes farmacêuticos. Além disso, a quantidade terapeuticamente eficaz específica (e/ou dose unitária) para qualquer paciente particular pode depender uma variedade de fatores, incluindo o distúrbio a ser tratado e a gravidade da doença; a atividade do específico agente farmacêutico empregado; a específica composição utilizada; a idade, peso corporal, saúde geral, sexo e dieta do paciente; o tempo de administração, via de administração, e/ou taxa de excreção ou metabolismo da proteína de fusão específica empregado; a duração do

tratamento; e semelhantes fatores como é bem conhecido nas técnicas médicas.

Tolerável: como usado aqui, o termos "tolerável" e "tolerância" referem-se a capacidade das composições farmacêuticas da presente invenção de não provocar uma reação adversa no objeto para quem tal composição é administrada, ou, alternativamente, não para provocar uma reação adversa grave no objeto a quem tal composição é administrada. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas da presente invenção são bem toleradas pelo objeto para quem tais composições é administrada.

Tratamento: como usado aqui, o termo "tratamento" (também "tratar" ou "tratando") refere-se a qualquer administração de uma proteína terapêutica (por exemplo, enzima lisossomal) que parcialmente ou completamente alivia, melhora, alivia, inibe, atrasa o início de, e reduz a severidade da / reduz a incidência de um ou mais sintomas ou características de uma determinada doença, transtorno, e/ou condição (por exemplo, síndrome de Hunters, síndrome de Sanfilippo B). Esse tratamento pode ser de um objeto que não apresenta sinais da doença em questão, desordem e/ou condição e/ou de um objeto que exhibe apenas os primeiros sinais da doença, transtorno, e/ou condição. Em alternativa ou adicionalmente, esse tratamento pode ser de um sujeito que apresenta um ou mais sinais estabelecidas da doença, desordem e/ou condição em questão.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece, entre outras coisas, métodos melhorados e composições para a efetiva entrega direta de um agente terapêutico para o sistema nervoso

central (CNS). Como discutido acima, a presente invenção baseia-se na descoberta inesperada que uma enzima de substituição (por exemplo, uma proteína ASA) para uma doença de armazenamento de lisossomal (por exemplo, Doença de Leucodistrofia Metacromatica) pode ser introduzida diretamente no líquido cefalorraquidiano (CSF) de um indivíduo que necessita de tratamento em uma concentração elevada, sem induzir graves repercussões no indivíduo. Mais surpreendentemente, os presentes inventores descobriram que a enzima de substituição pode ser entregue em uma simples solução salina ou formulação tamponada, sem usar o CSF sintético. Ainda mais inesperadamente, a entrega de intratecal de acordo com a presente invenção não resulta em substanciais efeitos adversos, tais como severa resposta imune no objeto. Portanto, em algumas modalidades, a entrega intratecal de acordo com a presente invenção pode ser utilizada na ausência de terapia imunossupressora simultânea (por exemplo, sem a indução de tolerância imunológica por pré-tratamento ou pré-condicionamento).

Em algumas modalidades, entrega de intratecal de acordo com a presente invenção permite difusão eficiente em vários tecidos de cérebro, resultando na efetiva entrega da enzima substituição em vários tecidos de cérebro do alvo em regiões da superfície ou profunda do cérebro. Em algumas modalidades, entrega de intratecal de acordo com a presente invenção resultou em quantidade suficiente de enzimas de substituição entrando na circulação periférica. Como resultado, em alguns casos, entrega intratecal de acordo com a presente invenção resultou na entrega da enzima substituição em tecidos periféricos, tais como fígado,

tingimento, baço e rins. Esta descoberta é inesperada e pode ser particularmente útil para o tratamento de doenças por armazenamento dos lisossomos com CNS e componentes periféricos, o que normalmente exigiria administração intratecal regular e administração intravenosa. É contemplado que a entrega intratecal de acordo com a presente invenção pode permitir redução da dosagem e/ou frequência de injeção IV sem comprometer os efeitos terapêuticos no tratamento de sintomas periféricos.

10 A presente invenção fornece vários recursos inesperados e benéficos que permitem a entrega eficiente e conveniente de enzimas de substituição para vários tecidos-alvo do cérebro, resultando em um tratamento eficaz de doenças que têm indicações de CNS.

15 Vários aspectos da invenção são descritos em detalhes nas seções a seguir. O uso de seções não pretende limitar a invenção. Cada seção pode se aplicar a qualquer aspecto da invenção. Nesta aplicação, o uso de "ou" significa "e/ou" salvo disposição em contrário.

20 Proteínas terapêuticas

Em algumas modalidades, métodos inventivos e composições fornecidas pela presente invenção são usadas para entregar uma proteína arilsulfatase A (ASA) ao CNS para tratamento da Doença de Leucodistrofia Metacromática. Uma proteína ASA apropriada pode ser qualquer molécula ou uma parte de uma molécula que pode substituir para que ocorra naturalmente atividade de proteína arilsulfatase A (ASA) ou resgate um ou mais fenótipos ou sintomas associados com deficiência de ASA. Em algumas modalidades, uma enzima de substituição apropriada para a invenção é um

polipeptídeo tendo um N-terminal e um C-terminal e uma sequência de aminoácidos idêntica ou substancialmente similar para amadurecer a proteína ASA humana.

Normalmente, ASA humana é produzida como uma molécula precursora que é processada de uma forma madura. Este processo geralmente ocorre através da remoção do peptídeo de sinal de 18 aminoácidos. Normalmente, a forma de precursor é também referida como precursor completo ou proteína ASA completa, que contém 507 aminoácidos. Os N-terminal de 18 aminoácidos são clivados, resultando em uma forma madura que é de 489 aminoácidos de comprimento. Assim, está previsto que o N-terminal de 18 aminoácidos geralmente não é necessário para a atividade da proteína ASA. As sequências de aminoácidos de forma madura (SEQ ID nº: 1) e precursor completos (SEQ ID nº: 2) de um típico tipo selvagem ou proteína ASA humana que ocorrem naturalmente são mostrados na tabela 1.

TABELA 1. Arilsulfatase A Humana

Forma Madura	RPPNIVLIFADDLGYGDLGICYGHPSSSTTPNLDQLAAGGLRFTDF YVPVSLCTPSRAALLTGRLPVRMGMPGVLPSSRGGLPLEEVT VAEVLAARGILTMAGKWHLGVGPEGAFPPHQQGFHRFLGIPYS HDQGPCQNLTFCPPATPCDGGCDQGLVPIPLLANLSVEAOPPWL PGLARYMAFAHDLMADAQRQDRPFFLYYASHHHTHYPOFSGQSF AERSGRGPFPGDSLMELDAAVGTLMTAIGDLGLLEETLVIFTADN GPETMRMSRGGCSGLLRGKGTTYEGGVREPALAFWPGHIAPGV THELASSLDLLPTLAALAGAPLPNVTLDGFDLSPLLLGTGKSPR QSLFFYPSYPDEVRGVFAVRTGKYKAHFFTQSAHSDDTADPAC HASSSLTAHEPPLLYDLSKDPGENYNLLGGVAGATPEVLQALKQ LQLLKAQLDAAVTFGPSQVARGEDPALQICCHPGCTPRPACCHC PDPHA (SEQ ID NO:1)
Precursor completo	MGAPRSLLLALAAGLAVARPPNIVLIFADDLGYGDLGICYGHPSS TTPNLDQLAAGGLRFTDFYVPVSLCTPSRAALLTGRLPVRMGMY PGVLVPSSRGGLPLEEVTVAEVLAARGILTMAGKWHLGVGPEG AFPPHQQGFHRFLGIPYSHDQGPCQNLTFCPPATPCDGGCDQGL VPIPLLANLSVEAOPPWLPGLEARYMAFAHDLMADAQRQDRPFF LYYASHHHTHYPOFSGQSF AERSGRGPFPGDSLMELDAAVGTLMTA IGDLGLLEETLVIFTADNGPETMRMSRGGCSGLLRGKGTTYEG GVREPALAFWPGHIAPGVTHELASSLDLLPTLAALAGAPLPNVT

	LDGFDLSPLLLGTGKSPRQSLFFYPSPDEVRGVFAVRTGKYKA HFFTQGSASDSTTADPACHASSSLTAHEPPLLYDLSKDPGENYN LLGGVAGATPEVLQALKQLQLLKAQLDAAVTFGPSQVARGEDPA LQICCHPGCTPRPACCHCPDPA (SEQ ID NO:2)
--	---

Assim, em algumas modalidades, uma fração terapêutica adequada para a presente invenção é proteína ASA humana madura (SEQ ID n°: 1). em algumas modalidades, um fração terapêutica adequado pode ser um homólogo ou um análogo da

5 proteína ASA humana madura. Por exemplo, um homólogo ou um análogo da proteína ASA humana madura pode ser uma proteína ASA madura humana modificada contendo uma ou mais substituições, deleções ou inserções de aminoácidos em comparação a uma proteína ASA tipo selvagem ou que ocorrem

10 naturalmente (por exemplo, SEQ ID N°: 1), mantendo substancial atividade de proteína ASA. Assim, em algumas modalidades, uma fração terapêutica adequada para a presente invenção é substancialmente homóloga para amadurecer a proteína ASA humana (SEQ ID n°: 1). Em algumas

15 modalidades, uma fração terapêutica adequada para a presente invenção tem um série de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais homólogas para SEQ ID N°: 1. Em algumas modalidades, uma fração terapêutica

20 adequada para a presente invenção é substancialmente idêntica a proteína ASA humana madura (SEQ ID n°: 1). Em algumas modalidades, uma fração terapêutica adequada para a presente invenção tem uma sequência de aminoácido pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%,

25 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica para SEQ ID n°: 1. Em algumas modalidades, uma fração terapêutica adequada para a presente invenção contém um fragmento ou uma porção de proteína ASA humana madura.

Alternativamente, uma enzima de substituição adequada para a presente invenção é proteína ASA completa. Em algumas modalidades, uma enzima substituta adequada pode ser um homólogo ou um análogo da proteína ASA humana completa. Por exemplo, um homólogo ou um análogo da proteína ASA humana completa pode ser uma proteína ASA completa humana modificada contendo uma ou mais substituições, deleções ou inserções de aminoácidos em comparação a uma tipo selvagem ou que ocorre naturalmente completos no ASA proteína (por exemplo, SEQ ID n°: 2), mantendo substancial atividade de proteína ASA. Por isso, algumas modalidades, uma enzima de substituição adequada para a presente invenção é substancialmente homóloga à proteína ASA humana completa (SEQ ID n°: 2). Em algumas modalidades, uma enzima de substituição adequada para a presente invenção tem uma série de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais homólogas ao SEQ ID n°: 2. Em algumas modalidades, uma enzima de substituição adequada para a presente invenção é substancialmente idêntica ao SEQ ID n°: 2. Em algumas modalidades, uma enzima de substituição adequada para a presente invenção tem uma série de aminoácidos de pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idênticos ao SEQ ID n°: 2. Em algumas modalidades, uma enzima de substituição adequada para a presente invenção contém um fragmento ou uma porção de proteína ASA humana completa. Como usado aqui, uma proteína ASA completa normalmente contém a sequência de peptídeo de sinal.

Em algumas modalidades, uma proteína terapêutica inclui uma fração de direcionamento (por exemplo, um lisossoma visando a sequência) e/ou um peptídeo penetrante em membrana. Em algumas modalidades, uma sequência de direcionamento e/ou um peptídeo penetrante em membrana é uma parte intrínseca do grupo terapêutico (por exemplo, através de uma ligação química, através de uma proteína de fusão). Em algumas modalidades, uma sequência de direcionamento contém um agrupamento de manose-6-fosfato. Em algumas modalidades, uma sequência de direcionamento contém uma fração IGF-I. Em algumas modalidades, uma sequência de direcionamento contém um fração IGF-II.

Outras doenças de armazenamento dos lisossomos e enzimas de substituição

É contemplado que métodos inventivos e composições de acordo com a presente invenção podem ser usados para tratar outras doenças, em especial aquelas doenças com etiologia e/ou sintomas do CNS, incluindo, mas não limitado a, aspartilglucosaminuria, doença do armazenamento de colesterol éster, doença de Wolman, cistinose, doença de Danon, doença de Fabry, Farber lipogranulomatose, doença de Farber, fucosidose, galactosialidose tipos I/II, Doença de gaucher tipos I/II/III, Leucodistrofia de células Globóides, doença de Krabbe, doença do armazenamento de glicogênio II, doença de Pompe, Gangliosidose GM1 tipos I/II/III, Gangliosidose GM2 tipo I, doença de Tay-Sachs, Gangliosidose GM2 tipo II, doença de Sandhoff, GM2-Gangliosidose, α -mannosidose tipo I/II, beta-mannosidose, Leucodistrofia metacromática, mucopolipidose tipo I, sialidose tipos I/II, mucopolipidosis II/III, doença de

células-I, mucopolidose tipo IIIC, polidistrofia pseudo-Hurler, mucopolissacaridose tipo I, mucopolissacaridose tipo II, mucopolissacaridose tipo III A, síndrome de Sanfilippo, mucopolissacaridose tipo IIIB, 5 mucopolissacaridose tipo IIIC, mucopolissacaridose tipo IIID, mucopolissacaridose tipo IVA, síndrome de Morquio, mucopolissacaridose tipo IVB, mucopolissacaridose tipo VI, mucopolissacaridose tipo VII, síndrome de Sly, mucopolissacaridose tipo IX, múltipla deficiência de 10 sulfatase, lipofuscinose ceróide neuronal, doença de Batten CLN1, doença de Batten CLN2, doença de Niemann-Pick tipos A/B, doença de Niemann-Pick tipo C1, doença de Niemann-Pick tipo C2, picnodisostose, doença de Schindler tipos I/II, doença de Gaucher e doença do armazenamento de ácido 15 siálico.

Uma revisão detalhada da etiologia genética, manifestações clínicas e biologia molecular das doenças lisossômico é detalhada em Scriver et al., eds., The Metabolic e Molecular Basis of Inherited Doença, 7.sup.th 20 Ed., Vol. II, McGraw Hill, (1995). Assim, as deficientes enzimas nas doenças acima são conhecidas por aqueles versados na técnica, alguns destes são exemplificadas na tabela 2 abaixo:

TABELA 2

Nome da doença	Deficiência da enzima	Substancia armazenada
Doença Pompe	Acid- α 1, 4-Glucosidase	Glicogenio α .1-4 ligada Oligosaccharides
GM1 Gangliosidosis	β -Galactosidase	GM ₁ Gangliosides

Tay-Sachs Doença	β -Hexosaminidase A	GM ₂ Ganglioside
GM ₂ Gangliosidosis: AB Variant	GM ₂ Activator Protein	GM ₂ Ganglioside
Sandhoff Doença	β -Hexosaminidase A&B	GM ₂ Ganglioside
Fabry Doença	α -Galactosidase A	Globosides
Gaucher Doença	Glucocerebrosidase	Glucosilceramide
Leucodistrofia Metacromatica	Arilsulfatase A	Sulphatides
Krabbe Doença	Galactosilceramidas e	Galactocerebrosi de
Niemann Pick, Types A & B	Ácido Sphingomyelinase	Sphingomyelin
Niemann-Pick, Tipo C	Cholesterol Esterification Defect	Sphingomyelin
Niemann-Pick, Tipo D	Desconhecido	Sphingomyelin
Farber Doença	Ácido Ceramidase	Ceramide
Wolman Doença	Ácido Lipase	Cholesteril Esters
Hurler Syndrome (MPS IH)	α -L-Iduronidase	Heparan & Dermatan Sulfatos
Scheie Syndrome (MPS IS)	α -L-Iduronidase	Heparan & Dermatan, Sulfatos
Hurler-Scheie (MPS IH/S)	α -L-Iduronidase	Heparan & Dermatan Sulfatos

Hunter Sindrome (MPS II)	Iduronate Sulfatase	Heparan & Dermatan Sulfatos
Sanfilippo A (MPS IIIA)	Heparan N-Sulfatase	Heparan Sulfato
Sanfilippo B (MPS IIIB)	α -N- Acetilglucosaminida se	Heparan Sulfato
Sanfilippo C (MPS IIIC)	Acetil-CoA- Glucosaminide Acetiltransferase	Heparan Sulfato
Sanfilippo D (MPS IIID)	N-Acetilglucosamine -6-Sulfatase	Heparan Sulfato
Morquio B (MPS IVB)	β -Galactosidase	Keratan Sulfato
Maroteaux-Lamy (MPS VI)	Arilsulfatase B	Dermatan Sulfato
Sly Sindrome (MPS VII)	β -Glucuronidase	
α -Mannosidosis	α -Mannosidase	Mannose/ Oligosaccharides
β -Mannosidosis	β -Mannosidase	Mannose/ Oligosaccharides
Fucosidosis	α -L-Fucosidase	Fucosil Oligosaccharides
Aspartilglucosaminu ria	N-Aspartil- β - Glucosaminidase	Aspartilglucosam ine Asparagines
Sialidosis (Mucopolipidosis I)	α -Neuraminidase	Sialiloligosacch arides

Galactosialidosis (Goldberg Syndrome)	Lysosomal Protective Protein Deficiency	Sialiloligosacch arides
Schindler Doença	α -N-Acetil- Galactosaminidase	
Mucopolidosis II (I-Cell Doença)	N-Acetilglucosamine-1- Phosphotransferase	Heparan Sulfato
Mucopolidosis III (Pseudo- Hurler Polydystrophy)	Same as ML II	
Cystinosis	cistina Proteína de transporte	Livre cistina
Salla Doença	Ácido Sialico Proteína de transporte	Livre Ácido Sialico e Ácido glucoronico
Infantile Ácido Sialico Storage Doença	Ácido Sialico Proteína de transporte	Livre Ácido Sialico e Ácido glucoronico
Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis	Palmitoil-Protein Thioesterase	Lipofuscins
Mucopolidosis IV	Desconhecido	Gangliosides & Ácido hialuronico

Prosaposina	Saposinas A, B, C or D	
-------------	------------------------	--

Métodos inventivos de acordo com a presente invenção podem ser usados para entregar várias outras enzimas de substituição. Como usado aqui, enzimas de substituição adequadas para a presente invenção podem incluir qualquer
 5 enzima que pode agir para substituir a atividade pelo menos parcial da enzima lisossômica deficiente ou ausente em uma doença de armazenamento lisossomal a ser tratada. Em algumas modalidades, uma enzima de substituição é capaz de reduzir a substância acumulada nos lisossomos ou que pode
 10 resgatar ou melhorar um ou mais sintomas de doença de armazenamento lisossomal.

Em algumas modalidades, uma enzima de substituto adequado pode ser qualquer enzima lisossomal conhecida para ser associado com a doença de armazenamento lisossomal a
 15 ser tratada. Em algumas modalidades, uma enzima de substituto adequado é uma enzima selecionada da enzima listada na tabela 2 acima.

Em algumas modalidades, uma enzima de substituição apropriada para a invenção pode ter uma sequência do tipo
 20 selvagem ou natural. Em algumas modalidades, uma enzima de substituição apropriada para a invenção pode ter uma sequência modificada, tendo significativa homologia ou idêntica a sequência do tipo selvagem ou que ocorre naturalmente (por exemplo, ter pelo menos 50%, 55%, 60%,
 25 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% idêntica a sequência para a sequência do tipo selvagem ou que ocorre naturalmente).

Uma enzima de substituição apropriada para a presente invenção pode ser produzida por qualquer meio disponível.

Por exemplo, enzimas de substituição recombinantes podem ser produzidas utilizando um sistema de célula hospedeira projetada para expressar uma enzima de substituição codificando ácidos nucleicos. Em alternativa ou
5 adicionalmente, enzimas de substituição podem ser produzidas pela ativação de genes endógenos. Em alternativa ou adicionalmente, enzimas de substituição podem ser parcialmente ou totalmente preparadas por síntese química. Em alternativa ou adicionalmente, enzimas de substituição
10 também podem ser purificadas de fontes naturais.

Onde enzimas recombinantes são produzidas, qualquer sistema de expressão pode ser usado.

Para citar apenas alguns exemplos, sistemas de expressão conhecidos incluem, por exemplo, ovo,
15 baculovirus, planta, fungos ou células de mamíferos.

Em algumas modalidades, as enzimas adequadas para a presente invenção são produzidas em células de mamíferos. Exemplos sem limitação de células de mamíferos que podem ser utilizadas em conformidade com a presente invenção
20 incluem linhagem de mieloma de camundongo BALB/c (NSO/1, ECACC n°: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6, CruCell, Leiden, Países Baixos); linhagem CV1 de rim de macaco transformada pelo SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linhagem de rim embrionário humano (293 ou 293 células ou
25 subclonadas para o crescimento em cultura de suspensão, Graham et al, J. Gen Virol., 36:59, 1977); linhagem celular de Fibrossarcoma humana (por exemplo, HT1080); células de rim de hamster bebê (BHK, ATCC CCL 10); Células de ovário de hamster chinês +/-DHFR (CHO, Urlaub e Chasin, Proc.
30 Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216, 1980); células Sertoli de

camundongo (TM4, Mather, Biol Reprod., 23:243-251, 1980);
células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); Células de rim
de macaco africano verde (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células
de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de
5 rim canino (MDCK, ATCC CCL 34); células do fígado de
camundongo búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de
pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células do fígado humano
(Hep G2, HB 8065); tumor mamário de camundongo (MMT 060562,
ATCC CCL51); Células TRI (Mather et al, Annals N.Y. acad.
10 Sci., 383:44-68, 1982); células MRC 5; células FS4; e
linhagem de hepatoma humano (Hep G2).

Em algumas modalidades, métodos inventivos de acordo
com a presente invenção são usados para fornecer enzimas de
substituição, produzidas a partir de células humanas.
15 Algumas modalidades, métodos inventivos de acordo com a
presente invenção são usados para fornecer enzimas de
substituição, produzidas a partir de células CHO.

Em algumas modalidades, enzimas de substituição
entregues usando um método de invenção contêm um grupo que
20 se liga a um receptor na superfície das células do cérebro
para facilitar a captação celular e/ou o direcionamento dos
lisossomos. Por exemplo, um receptor de tal pode ser o
receptor de manose-6-fosfato independente de cátion (CI-
MPR) que se liga nos resíduos de (M6P)-manose-6-fosfato.
25 Além disso, o CI-MPR vincula também outras proteínas,
incluindo IGF-II. Em algumas modalidades, uma enzima de
substituição adequada para a presente invenção contêm
resíduos M6P na superfície da proteína. Em algumas
modalidades, uma enzima de substituição adequada para a
30 presente invenção pode conter oligossacarídeos bis-

fosforilados, que têm maior afinidade de ligação para o CI-MPR. Em algumas modalidades, uma enzima adequada contém até uma média de cerca de pelo menos 20% de oligossacarídeos bis-fosforilados por enzima. Em outras modalidades, uma 5 enzima adequada pode conter sobre 10%, 15%, 18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% de oligossacarídeos bis-fosforilados por enzima. Enquanto tais oligossacarídeos bis-fosforilados podem estar naturalmente presentes na enzima, refere-se que as enzimas podem ser modificadas para 10 possuir tais oligossacarídeos. Por exemplo, enzimas de substituição adequadas podem ser modificadas por certas enzimas capazes de catalisar a transferência de N-acetilglicosamina-L-fosfato de UDP-GlcNAc para a posição 6' de manoses α -1,2-ligadas em enzimas lisossomais. Métodos e 15 composições para produzir e usar tais enzimas são descritos por, por exemplo, Canfield et al. em U.S. Pat. N. ° 6.537.785 e U.S. Pat. N. ° 6.534.300, cada uma incorporada no presente por referência.

Em algumas modalidades, enzimas de substituição para 20 uso na presente invenção podem ser conjugadas ou fundidas a um agrupamento de direcionamento dos lisossomos capaz de ligação com um receptor na superfície das células do cérebro. Uma fração de direcionamento dos lisossomos apropriada pode ser IGF-I, IGF-II, RAP, p97 e variantes, 25 homólogos ou fragmentos deles (por exemplo, incluindo aqueles peptídeos tendo uma sequência pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% idêntica a uma sequência do peptídeo IGF-I, IGF-II, RAP, p97 tipo selvagem maduro humano).

Em algumas modalidades, enzimas de substituição 30 adequadas para a presente invenção não foram modificadas

para melhorar a entrega ou transporte desses agentes através de BBB e no CNS.

Em algumas modalidades, uma proteína terapêutica inclui uma fração de direcionamento (por exemplo, um lisossoma visando a sequência) e/ou um peptídeo penetrante em membrana. Em algumas modalidades, uma sequência de direcionamento e/ou de um peptídeo penetrante em membrana é uma parte intrínseca do grupo terapêutico (por exemplo, através de uma ligação química, através de uma proteína de fusão). Em algumas modalidades, uma sequência de direcionamento contém um agrupamento de manose-6-fosfato. Em algumas modalidades, uma sequência de direcionamento contém uma fração IGF-I. Em algumas modalidades, uma sequência de direcionamento contém uma fração IGF-II.

15 Formulações

Soluções aquosas de farmacêuticas e composições (ou seja, formulações) que são tradicionalmente usadas para entregar agentes terapêuticos para CNS de uma objeto incluindo uma solução isotônica salina não tamponada e a solução B de Elliott, que é CSF artificial. Uma comparação mostrando as composições de CSF em relação à solução B de Elliott é incluída na tabela 3 abaixo. Como mostrado na Tabela 3, a concentração da solução B de Elliot é estreitamente paralela a de CSF. A solução B de Elliott, no entanto, contém uma baixíssima concentração de tampão e conseqüentemente não pode fornecer a capacidade de tampão adequada necessária para estabilizar os agentes terapêuticos (por exemplo, proteínas), especialmente durante longos períodos de tempo (por exemplo, durante condições de armazenamento). Além disso, solução B de

Elliott contém alguns sais que podem ser incompatíveis com as formulações que pretende entregar alguns agentes terapêuticos e em particulares proteínas ou enzimas. Por exemplo, os sais de cálcio presentes na solução B de Elliott são capazes de mediar a precipitação de proteínas e diminuindo assim a estabilidade da formulação.

TABELA 3

Solução	Na ⁺ mEq/L	K ⁺ mEq /L	Ca ⁺⁺ mEq/L	Mg ⁺⁺ mEq/L	HCO ₃ ⁻ mEq/L	Cl ⁻ mEq/L	pH	Fósforo mg/L	Glicose mg/L
CSF	117 a 137	2.3	2.2	2.2	22.9	113 a 127	7.31	1.2 a 2.1	45 a 80
Sol. B de Elliott	149	2.6	2.7	2.4	22.6	132	6.0 a 7.5	2.3	80

A presente invenção fornece formulações, tanto na forma aquosa, pre-lioofilizada, lioofilizada ou reconstituída, para agentes terapêuticos que foram formulados de modo que eles são capazes de estabilizar, ou, alternativamente, retardar ou impedir a degradação de um ou mais agentes terapêuticos formulados com estes (por exemplo, proteínas recombinantes). Em algumas modalidades, as presentes formulações fornecem formulação de liofilização para agentes terapêuticos. Em algumas modalidades, as presentes formulações fornecem formulações aquosas de agentes terapêuticos. Em algumas modalidades, as formulações são formulações estáveis.

Formulações estáveis

Como usado neste documento, o termo "estável" refere-se à capacidade do agente terapêutico (por exemplo, uma

enzima recombinante) para manter a sua eficácia terapêutica (por exemplo, todos ou a maioria da sua pretendida atividade biológica e/ou integridade físico-química) por longos períodos de tempo. A estabilidade de um agente terapêutico e a capacidade da composição farmacêutica para manter a estabilidade de tal agente terapêutico poderá ser avaliados durante longos períodos de tempo (por exemplo, de preferência pelo menos 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36 meses ou mais). No contexto de uma formulação, uma formulação estável é uma em que o agente terapêutico mantém essencialmente sua atividade biológica e/ou integridade físico-química e sobre armazenamento e durante os processos (como congelamento/descongelamento, mecânico de mistura e liofilização). Para a estabilidade da proteína, pode ser medida pela formação de agregados de alto peso molecular (HMW), perda de atividade enzimática, geração de fragmentos de peptídeo e a mudança dos perfis de carga.

Estabilidade do agente terapêutico é de particular importância no que diz respeito a manutenção do intervalo especificado da concentração de agente terapêutico necessária para habilitar o agente da sua função terapêutica pretendida. Estabilidade do agente terapêutico poderá ser ainda avaliada em relação a atividade biológica ou integridade físico-química do agente terapêutico durante longos períodos de tempo. Por exemplo, estabilidade em um ponto determinado do tempo pode ser comparada com estabilidade em um ponto do tempo anterior (por exemplo, no dia 0 de formulação) ou contra agente terapêutico nãoformulado e os resultados desta comparação expressados em percentagem. Preferencialmente, as composições

farmacêuticas da presente invenção mantêm pelo menos 100%, pelo menos 99%, pelo menos 98%, pelo menos 97%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 65%, pelo menos, pelo
5 menos 60%, pelo menos 55%, ou pelo menos 50% da atividade biológica ou integridade físico-química do agente terapêutico durante um período prolongado de tempo (por exemplo, como medido ao longo de pelo menos cerca de 6 a 12 meses, à temperatura ambiente ou sob condições de
10 armazenamento acelerado).

Os agentes terapêuticos são preferencialmente solúveis nas composições farmacêuticas da presente invenção. O termo "solúvel", no que se refere aos agentes terapêuticos da presente invenção refere-se à capacidade desses agentes
15 terapêuticos para formar uma solução homogênea.

De preferência a solubilidade do agente terapêutico na solução em que é administrado e como ele é transportado para o local de destino da ação (por exemplo, as células e tecidos do cérebro) é suficiente para permitir a entrega de
20 uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente terapêutico para o site alvo da ação. Vários fatores podem afetar a solubilidade dos agentes terapêuticos. Por exemplo, os fatores relevantes que podem afetar a solubilidade da proteína incluem força iônica, sequência de
25 aminoácidos e a presença de agentes ou outros sais co-solubilizantes (por exemplo, sais de cálcio). Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas são formuladas tal que os sais de cálcio são excluídos de tais composições.

30 Formulações adequadas, tanto na forma aquosa, pré-

liofilizada, liofilizada ou reconstituída, podem conter um agente terapêutico de interesse em várias concentrações. Em algumas modalidades, formulações podem conter uma proteína ou um agente terapêutico de interesse em uma concentração

5 na faixa aproximadamente 0.1 mg/mL a 100 mg/mL (e.g., aproximadamente 0.1 mg/mL a 80 mg/mL, aproximadamente 0.1 mg/mL a 60 mg/mL, aproximadamente 0.1 mg/mL a 50 mg/mL, aproximadamente 0.1 mg/mL a 40 mg/mL, aproximadamente 0.1 mg/mL a 30 mg/mL, aproximadamente 0.1 mg/mL a 25 mg/mL,

10 aproximadamente 0.1 mg/mL a 20 mg/mL, aproximadamente 0.1 mg/mL a 60 mg/mL, aproximadamente 0.1 mg/mL a 50 mg/mL, aproximadamente 0.1 mg/mL a 40 mg/mL, aproximadamente 0.1 mg/mL a 30 mg/mL, aproximadamente 0.1 mg/mL a 25 mg/mL, aproximadamente 0.1 mg/mL a 20 mg/mL, aproximadamente 0.1

15 mg/mL a 15 mg/mL, aproximadamente 0.1 mg/mL a 10 mg/mL, aproximadamente 0.1 mg/mL a 5 mg/mL, aproximadamente 1 mg/mL a 10 mg/mL, aproximadamente 1 mg/mL a 20 mg/mL, aproximadamente 1 mg/mL a 40 mg/mL, aproximadamente 5 mg/mL a 100 mg/mL, aproximadamente 5 mg/mL a 50 mg/mL, ou

20 aproximadamente 5 mg/mL a 25 mg/mL). Em algumas modalidades, formulações de acordo com a invenção podem conter um agente terapêutico em uma concentração de aproximadamente 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, 25 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL, 60 mg/mL, 70

25 mg/mL, 80 mg/mL, 90 mg/mL, ou 100 mg/mL.

As formulações da presente invenção caracterizam-se por sua tolerabilidade, como soluções aquosas ou soluções liofilizadas reconstituídas. Como usado aqui, o termos "toleráveis" e "tolerância" referem-se a capacidade das

30 composições farmacêuticas da presente invenção para não

provocar uma reação adversa no objeto a quem tal composição é administrada, ou, alternativamente, não para provocar uma reação adversa grave no objeto a quem tal composição é administrada. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas da presente invenção são bem toleradas pelo sujeito em quem tais composições é administrado.

Muitos agentes terapêuticos, e em especial as proteínas e enzimas da presente invenção, exigem pH controlado e excipientes específicos para manter sua solubilidade e estabilidade nas composições farmacêuticas da presente invenção. Tabela 4 abaixo identifica aspectos típicos de formulações de proteína, consideradas-se a manter a solubilidade e estabilidade dos agentes terapêuticos da proteína da presente invenção.

15 TABELA 4

Parâmetro	Típica variação /tipo	Racional
pH	5 a 7.5	Para a estabilidade Às vezes também de solubilidade
Tampão tipo	acetato, ácido succínico, citrato, histidina, fosfato ou Tris	Para manter ideal pH Também pode afetar estabilidade
Concentração do tampão	5-50 mM	Para manter pH também pode estabilizar ou adicionar força iônica
Tonificante	NaCl, açúcares, manitol	Para processar soluções iso-osmóticas ou isotônicas

Surfactante	Polisorbato 20, polisorbato 80	Para estabilizar contra interfaces e cisalhamento
Outro	Aminoácidos (e.g. arginina) em dezenas a centenas de mM	maior solubilidade ou estabilidade

Soluções Tampão

O pH da formulação é um fator adicional, que é capaz de alterar a solubilidade de um agente terapêutico (por exemplo, uma enzima ou proteína) em uma formulação aquosa ou para uma formulação de pre-liofilização. Nesse sentido as formulações da presente invenção de preferência compõem um ou mais soluções tampão. Em algumas modalidades, as formulações aquosas compreendem uma quantidade de solução tampão suficiente para manter o pH ideal da referida composição entre cerca de 4.0 a 8.0 (por exemplo, cerca de 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.2, 6.4, 6.5, 6.6, 6.8, 7.0, 7.5 ou 8.0). Em algumas modalidades, o pH da formulação trata entre 5.0 a 7.5, entre cerca de 5,5 a 7,0, entre cerca de 6.0 a 7.0, entre cerca de 5.5 a 6.0, entre cerca de 5,5 a 6,5, entre cerca de 5.0 a 6.0, entre cerca de 5,0 a 6,5 e entre cerca de 6,0 a 7,5. Soluções tampão apropriadas incluem por exemplo acetato, citrato, histidina, fosfato, ácido succínico, tris (hidroximetil) aminometano ("Tris") e outros ácidos orgânicos. A concentração do tampão e a faixa de pH das composições farmacêuticas da presente invenção são fatores em controlar ou ajustar a tolerabilidade da formulação. Em algumas modalidades, um agente tamponador está presente em concentrações que variam entre cerca de 1 mM para cerca de 150 mM, ou entre cerca de 10 mM para cerca

de 50 mM, ou entre cerca de 15 mM para cerca de 50 mM, ou entre a cerca de 50 mM, com cerca de 20 mM ou entre a cerca de 50 mM, com cerca de 25 mM. Em algumas modalidades, um agente tamponador adequado está presente numa concentração
5 de aproximadamente 1 mM, 5 mM, 10mm, 15mm, 20mm, 25mm, 30mm, 35mm, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 125 mM ou 150 mM.

Tonicidade

Em algumas modalidades, formulações tanto na forma
10 aquosa, pré-liofilizada, liofilizada ou reconstituída, contêm um agente isotonicidade para manter as formulações isotônicas. Normalmente, por "isotônico" significa que a formulação de interesse tem essencialmente a mesma pressão osmótica como osangue humano. formulações Isotônicas
15 geralmente terão uma pressão osmótica de cerca de 240 mOsm/kg a cerca de 350 mOsm/kg. Isotonicidade pode ser medida usando, por exemplo, osmômetros do tipo uma pressão de vapor ou de ponto de congelamento. Agentes de isotonicidade exemplares incluem, mas não estão limitados
20 a, glicina, sorbitol, manitol, cloreto de sódio e arginina. Em algumas modalidades, agentes isotônicos adequados podem estar presentes em formulações aquosas e/ou pré-liofilizadas numa concentração de aproximadamente 0,01 a 5% (por exemplo, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0,75,
25 1.0, 1.25, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 ou 5,0%) por peso. Em algumas modalidades, formulações para liofilização contêm um agente de isotonicidade para manter as formulações de pre-liofilização ou formulações reconstituídas isotônicas.

Embora geralmente soluções isotônicas são preferidas
30 para drogas administradas por via parentérica, o uso de

soluções isotônicas pode alterar a solubilidade para alguns agentes terapêuticos e em particular algumas proteínas e/ou enzimas. Soluções ligeiramente hipertônicas (por exemplo, até cloreto de sódio 175 mM em fosfato de sódio 5 mM em pH 7.0) e soluções contendo açúcar (por exemplo, até 2% de sacarose em fosfato de sódio 5 mM em pH 7.0) tem demonstrado ser bem tolerado. A composição de formulação de bolus aprovadas por CNS mais comum é salina (cerca de 150 mM NaCl em água).

10 Agentes de estabilização

Em algumas modalidades, formulações podem conter um agente estabilizador, ou lioprotetor, para proteger a proteína. Normalmente, um agente estabilizador adequado é um açúcar, um açúcar não redutor e/ou um aminoácido.

15 Exemplos açúcares incluem, mas não estão limitados a, dextrano, lactose, manitol, manose, sorbitol, rafinose, sacarose e trealose. Exemplos de aminoácidos incluem, mas não estão limitados a, arginina, glicina e metionina. Agentes de estabilização adicionais podem incluir o cloreto

20 de sódio, amido hidroxietílico e polivinilpirolidona. A quantidade de agente estabilizador na formulação liofilizada é, geralmente, que a formulação isotônica. No entanto, formulações reconstituídas hipertônicas também podem ser adequadas. Além disso, a quantidade de agente

25 estabilizador não deve ser muito abaixo de uma quantidade inaceitável de ocorre degradação/agregação do agente terapêutico. Exemplos concentrações de agente estabilizador na formulação podem variar de cerca de 1 mM até cerca de 400 mM (por exemplo, de cerca de 30 mM para

30 cerca de 300 mM e de cerca de 50 mM para cerca de 100 mM),

ou alternativamente, de 0,1% a 15% (por exemplo, a partir de 1% a 10%, de 5% a 15%, de 5% a 10%) por peso. Em algumas modalidades, a relação entre a quantidade de massa do agente estabilizador e o agente terapêutico é cerca de 1:1.

5 Em outras modalidades, a relação entre a quantidade de massa do agente estabilizador e o agente terapêutico pode ser cerca de 1: 0.1, 0.2: 1, 1: 0.25, 0.4: 1, 0.5:1 1:1, 2:1, 2,6: 1, 3:1, 4:1, 5:1, 10; 1 ou 20:1. Em algumas modalidades, o agente de estabilização apropriado para a

10 liofilização é também um lioprotetor.

Em algumas modalidades, formulações líquidas apropriadas para a presente invenção contêm materiais amorfos. Em algumas modalidades, formulações líquidas apropriadas para a presente invenção contêm uma quantidade

15 substancial de material amorfo (por exemplo, formulações à base de sacarose). Em algumas modalidades, formulações líquidas apropriadas para a presente invenção contêm materiais parcialmente cristalino/parcialmente amorfos.

Agentes de volume

20 Em algumas modalidades, adicionais formulações adequadas para liofilização podem incluir um ou mais agentes de volume. Um agente de "volume" é um composto que se adiciona massa à mistura liofilizada e contribui para a estrutura física do bolo liofilizado. Por exemplo, um

25 agente de volume pode melhorar a aparência do bolo liofilizado (por exemplo, bolo liofilizado essencialmente uniforme). Agentes de volume adequados incluem, mas não estão limitados a, cloreto de sódio, lactose, manitol, glicina, sacarose, trealose, hidroxietil amido. Exemplos

30 concentrações de agentes de volume são de cerca de 1% a

cerca de 10% (por exemplo, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0%, 8,5%, 9,0%, 9,5% e 10,0%).

Surfactantes

5 Em algumas modalidades, convém adicionar um surfactante nas formulações.

Surfactantes exemplares incluem surfactantes não iônicos como polissorbatos (por exemplo, polissorbatos 20 ou 80); poloxameros (por exemplo, Poloxâmero 188); Triton; 10 Dodecil sulfato de sódio (SDS); laurel sulfato de sódio; glicosídeo de octilo de sódio; Lauril, miristil, linoleil, ou estearil sulfobetaina; Lauril, miristil, linoleil ou estearil sarcosina; linoleil, miristil ou cetil betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, 15 miristamidopropil, palmidopropil, ou isostearamidopropil-betaína (por exemplo, lauroamidopropil); miristamidopropil, palmidopropil ou isostearamidopropil-dimetilamina; sódio metil cocoil- ou taurato-ofeíl de metila de dissódico; e a série MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, NJ), 20 polietil glicol, polipropil glicol e copolímeros de etileno e propileno glicol (por exemplo, Pluronic, PF68, etc.). Normalmente, a quantidade de surfactante adicionado é tal que reduz a agregação da proteína e minimiza a formação de partículas ou efervescências. Por exemplo, um surfactante 25 pode estar presente em uma formulação em concentrações de aproximadamente 0,001 a 0,5% (por exemplo, cerca de 0,005 a 0,05%, ou 0,005 a 0,01%). Em particular, um surfactante pode estar presente em uma formulação em concentrações de aproximadamente 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 30 0,4%, ou 0,5%, etc. Como alternativa, ou além, o

surfactante pode ser adicionado a formulação liofilizada, formulação pré-liofilizada e/ou formulação reconstituída.

Outros transportadores, excipientes ou estabilizadores farmacologicamente aceitáveis como os descritos em Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) pode ser incluída na formulação (formulação liofilizada ou formulação reconstituída) desde que eles não prejudiquem as características desejadas da formulação. Transportadores, excipientes ou estabilizadores aceitáveis são atóxicos para destinatários em dosagens e concentrações utilizadas e incluem, mas não estão limitados a, agentes tamponadores adicionais; conservantes; co-solventes; antioxidantes, incluindo o ácido ascórbico e metionina; agentes quelantes como o EDTA; complexos metálicos (por exemplo, complexos de Zn-proteína); polímeros biodegradáveis como poliésteres; e/ou counterions como sódio formando sal.

Formulações tanto na forma aquosa, pré-liofilizada, liofilizada ou reconstituída, em conformidade com a presente invenção podem ser avaliadas com base na análise de qualidade de produto, tempo de reconstituição (se liofilizado), qualidade de reconstituição (se liofilizado), alto peso molecular, umidade e temperatura de transição vítrea. Normalmente, a análise de qualidade e produtos de proteína incluem análise de taxa de degradação do produto usando métodos, incluindo, mas não limitado a, HPLC de exclusão por tamanho (SE-HPLC), HPLC de troca de cátion (CEX-HPLC), difração de raios x (XRD), calorimetria de varredura diferencial modulada (mDSC), HPLC de fase reversa (RP-HPLC), espalhamento de luz multi-ângulo (MALS),

fluorescência, absorção ultravioleta, nefelometria, eletroforese capilar (CE), SDS-PAGE e suas combinações. Em algumas modalidades, a avaliação do produto em conformidade com a presente invenção pode incluir uma etapa de avaliação da aparência (aparência de bolo ou de líquido).

Geralmente, formulações (liofilizadas ou aquosas) podem ser armazenadas por longos períodos de tempo em temperatura ambiente. Temperatura de armazenamento normalmente pode variar de 0°C a 45°C (por exemplo, 4°C, 20°C, 25°C, 45°C etc.). Formulações podem ser armazenadas por um período de meses a anos. Tempo de armazenamento geralmente será 24 meses, 12 meses, 6 meses, 4,5 meses, 3 meses, 2 meses ou 1 mês. Formulações podem ser armazenadas diretamente no recipiente usado para administração, eliminando etapas de transferência.

Formulações podem ser armazenadas diretamente em liofilização recipiente (se liofilizado), o que também pode funcionar como a embarcação de reconstituição, eliminando etapas de transferência. Alternativamente, podem-se medir produto liofilizado formulações em incrementos menores para armazenamento. Armazenamento geralmente deve evitar circunstâncias que levam a degradação das proteínas, incluindo mas não limitado a exposição à luz solar, radiação UV, outras formas de radiação eletromagnética, calor ou frio excessivo, choque térmico rápido e choques mecânicos.

Liofilização

Métodos inventivos em conformidade com a presente invenção podem ser utilizados para liofilizar todos os materiais, em particular, agentes terapêuticos.

Normalmente, uma formulação de pre-liofilização ainda contém uma escolha adequada para evitar que o composto de interesse da degradação (por exemplo, agregação de proteínas, desamidação, e/ou oxidação) durante a 5 liofilização e armazenamento de excipientes ou outros componentes, como estabilizadores, solução tampão, agentes, agentes de volume e surfactantes. A formulação para liofilização pode incluir um ou mais ingredientes adicionais incluindo lioprotetors ou estabilização agentes, 10 soluções tampão, agentes de volume, agentes isotonicidade e surfactantes.

Depois que a substância de interesse e quaisquer componentes adicionais são misturados, a formulação é liofilizada. Liofilização geralmente inclui três estágios 15 principais: congelamento, secagem primária e secagem secundária. O congelamento é necessário para converter a água em gelo ou alguns componentes de formulação amorfo para a forma cristalina. Secagem primária é a etapa do processo, quando o gelo é removido do produto congelado por 20 sublimação direta em baixa pressão e temperatura. Secagem secundária é a etapa do processo, quando água limitada é retirada da matriz de produto utilizando a difusão da água residual na superfície de evaporação. Temperatura do produto durante a secagem secundária é normalmente maior do 25 que durante a secagem primária. Tang X. et al. (2004) "Design of congelamento-drying processes for pharmaceuticals: Practical advice," *Pharm. Res.*, 21:191-200; Nail S.L. et al. (2002) "Fundamentals of congelamento-drying," in *Development e manufacture of protein* 30 *pharmaceuticals*. Nail S.L. editor New York: Kluwer

Academic/Plenum Publishers, pp 281-353; Wang et al. (2000) "Lyophilization e development of solid protein pharmaceuticals," *Int. J. Pharm.*, 203:1-60; Williams N.A. et al. (1984) "The lyophilization of pharmaceuticals; A literature review." *J. Parenteral Sci. Technol.*, 38:48-59. Geralmente, qualquer processo de liofilização pode ser usado em conexão com a presente invenção.

Em algumas modalidades, uma etapa de recozimento pode ser introduzida durante o congelamento inicial do produto. A etapa de recozimento pode reduzir o tempo total do ciclo. Sem querer ser limitado por todas as teorias, está previsto que a etapa de recozimento pode ajudar a promover a cristalização do excipiente e formação de cristais de gelo maiores devido a re-cristalização de pequenos cristais formados durante o super-resfriamento, que, por sua vez, melhora a reconstituição. Normalmente, uma etapa de recozimento inclui um intervalo ou a oscilação da temperatura durante o congelamento. Por exemplo, a temperatura de congelamento pode ser de -40°C , e a etapa de recozimento irá aumentar a temperatura para, por exemplo, -10°C e manter esta temperatura por um período de tempo. A etapa de recozimento tempo pode variar de 0,5 horas a 8 horas (por exemplo, 0,5, 1,0, 1.5, 2.0, 2.5, 3, 4, 6 e 8 horas). A temperatura do recozimento pode ser entre a temperatura de congelamento e 0°C .

Liofilização pode ser realizada em um recipiente, como um tubo, um saco, uma garrafa, uma bandeja, um tubo de ensaio (por exemplo, um frasco de vidro), seringa ou quaisquer outros recipientes adequados. Os recipientes podem ser descartáveis. Liofilização também pode ser

realizada em uma escala grande ou pequena escala. Em alguns casos, pode ser desejável para liofilizar a formulação de proteína no recipiente no qual reconstituição da proteína é a fim de evitar uma etapa de transferência. O contêiner neste caso poderá, por exemplo, um frasco de 3, 4, 5, 10, 20, 50 ou 100 cc.

Muitos liofilizadores diferentes estão disponíveis para esta finalidade como secador de escala de piloto de casco (SP Industries, USA), secadores de congelamento de laboratório Genesis (SP Industries), ou qualquer liofilizadores capazes de controlar a liofilização os determinados parâmetros do processo. Liofilização é realizada congelando a formulação e posteriormente sublimação do gelo do conteúdo congelado a uma temperatura adequada para secagem primária. O congelamento inicial traz a formulação a uma temperatura inferior aproximadamente -20°C (por exemplo, -50°C, °-45°C, -40°C, °-35°C, -30°C, -25°C, etc.) normalmente não mais de cerca de 4 horas (por exemplo, não mais do que cerca de 3 horas, não mais de cerca de 2,5 horas, não mais de cerca de 2 horas). Nestas condições, a temperatura é normalmente abaixo do ponto eutético ou a temperatura de colapso da formulação. Normalmente, a temperatura de prateleira para a secagem primária vai desde cerca de -30 a 25°C (desde que o produto permanece abaixo do ponto de fusão durante a secagem primária) a uma pressão adequada, variando normalmente de cerca de 20 a 250 mTorr. A formulação, o tamanho e o tipo de recipiente contendo a amostra (por exemplo, o frasco de vidro) e o volume de líquido principalmente ditará o tempo necessário para a secagem, que pode variar de algumas horas

a vários dias. Um estágio secagem secundária é realizado em cerca de 0 a 60°C, dependendo principalmente do tipo e tamanho do recipiente e o tipo de proteínas terapêuticas empregadas. Novamente, o volume de líquido principalmente
5 vai ditar o tempo necessário para a secagem, que pode variar de algumas horas a vários dias.

Como uma proposição geral, liofilização resultará em uma formulação liofilizada em que o teor de umidade dela é inferior a 5%, inferior a 4%, inferior a 3%, inferior a 2%,
10 inferior a 1% e inferior a 0,5%.

Reconstituição

Enquanto as composições farmacêuticas da presente invenção são geralmente na forma aquosa para a administração para um objeto, em algumas modalidades as
15 composições farmacêuticas da presente invenção são liofilizadas. Tais composições devem ser reconstituídas adicionando um ou mais diluentes, antes da administração a um objeto. Na fase desejada, normalmente em um tempo apropriado antes da administração ao paciente, a formulação
20 liofilizada pode ser reconstituída com um diluente tal que a concentração de proteína na formulação reconstituída é desejável.

Diversos diluentes podem ser utilizados em conformidade com a presente invenção. Em algumas
25 modalidades, um diluente apropriado para reconstituição é água. A água utilizada como o diluente pode ser tratada em uma variedade de maneiras, incluindo osmose reversa, destilação, deionização, filtrações (por exemplo, carvão ativado, micro filtração, nano filtração) e combinações
30 destes métodos de tratamento. Em geral, a água deve ser

apropriada para injeção incluindo, mas não limitado a, água estéril ou água bacteriostática para injeção.

Exemplares diluentes adicionais incluem uma solução de pH tamponado (por exemplo, fosfato salino), solução salina estéril, solução de Elliot, solução de Ringer ou solução de dextrose. Diluentes adequados opcionalmente podem conter um conservante. Exemplares conservantes incluem álcoois aromáticos como benzílico ou álcool fenol. A quantidade de conservante empregado é determinada através da avaliação de diferentes concentrações de conservantes para compatibilidade com a proteína e o teste de eficácia de conservante. Por exemplo, se o preservativo é um álcool aromático (tais como álcool benzílico), pode ser presente em um montante de cerca de 0,1 a 2,0%, de cerca de 0,5 a 1,5%, ou cerca de 1,0 a 1,2%.

Diluentes adequados para a invenção podem incluir uma variedade de aditivos, incluindo, mas não limitado a, agentes tamponadores de pH, (Tris, histidina), sais (por exemplo, cloreto de sódio) e outros aditivos (por exemplo, sacarose), incluindo aqueles descritos acima (por exemplo, agentes estabilizadores, agentes de isotonicidade).

Em conformidade com a presente invenção, uma substância liofilizada (por exemplo, proteínas) pode ser reconstituída a uma concentração de pelo menos 25 mg/mL (por exemplo, pelo menos 50 mg/mL, pelo menos de 75 mg/mL, pelo menos 100 mg/) e em qualquer intervalo entre estes. Em algumas modalidades, uma substância liofilizada (por exemplo, proteínas) pode ser reconstituída a uma concentração que varia de cerca de 1 mg/mL a 100 mg/mL (por exemplo, de cerca de 1 mg/mL a 50 mg/mL, cerca de 1 mg/mL a

100 mg/mL, cerca de 1 mg/mL a cerca de 5 mg/mL, de cerca de
1 mg/mL, a cerca de 10 mg/mL, de cerca de 1 mg/mL a cerca
de 25 mg/mL, de cerca de 1 mg/mL para cerca de 75 mg/mL,
cerca de 10 mg/mL a cerca de 30 mg/mL, cerca de 10 mg/mL a
5 cerca de 50 mg/mL, de cerca de 10 mg/mL a cerca de 75
mg/mL, de cerca de 10 mg/mL, a cerca de 100 mg/mL, de cerca
de 25 mg/mL, a cerca de 50 mg/mL, cerca de 25 mg/mL a cerca
de 75 mg/mL, cerca de 25 mg/mL a cerca de 100 mg/mL, cerca
de 50 mg/mL a cerca de 75 mg/mL, de cerca de 50 mg/mL a
10 cerca de 100 mg/mL). Em algumas modalidades, a concentração
de proteína na formulação reconstituída pode ser maior do
que a concentração na formulação de pre-liofilização. Altas
concentrações de proteína na formulação reconstituída são
consideradas particularmente úteis onde destina-se entrega
15 subcutânea ou intramuscular da formulação reconstituída. Em
algumas modalidades, a concentração de proteína na
formulação reconstituída pode ser cerca de 2 a 50 vezes
(por exemplo, sobre 2 a 20, cerca de 2 a 10 vezes, ou cerca
de 2 a 5 vezes) da formulação pré-liofilizada. Em algumas
20 modalidades, a concentração de proteína na formulação
reconstituída pode ser pelo menos cerca de 2 vezes (por
exemplo, no mínimo cerca da 3, 4, 5, 10, 20, 40 vezes) da
formulação pré-liofilizada.

Reconstituição de acordo com a presente invenção pode
25 ser realizada em qualquer recipiente. Exemplares
recipientes adequados para a invenção incluem, mas não
estão limitados a, tais como tubos, frascos, seringas (por
exemplo, câmara única ou dupla-câmara), sacos, garrafas e
bandejas. Recipientes adequados podem ser feitos de
30 quaisquer materiais como vidro, plástico, metal. Os

recipientes podem ser descartáveis ou reutilizáveis. Reconstituição também pode ser realizada em uma grande escala ou pequena escala.

Em alguns casos, pode ser desejável para liofilizar a
5 formulação de proteína no recipiente no qual reconstituição da proteína está a fim de evitar uma etapa de transferência. O contêiner neste caso poderá, por exemplo, um frasco de 3, 4, 5, 10, 20, 50 ou 100 cc. Em algumas modalidades, um recipiente adequado para a liofilização e a
10 reconstituição é uma seringa de câmara dupla (por exemplo, seringas Lyo-Ject, ® (Vetter)). Por exemplo, uma seringa de dupla câmara pode conter tanto a substância liofilizada e o diluente, cada um em uma câmara separada, separados por uma rolha (ver exemplo 5). Para reconstituir, um êmbolo pode
15 ser anexado na rolha no lado do diluente e pressionado para mover o diluente na câmara de produto para que o diluente possa entrar em contato com a substância liofilizada e a reconstituição pode ocorrer conforme descrito neste documento (ver exemplo 5).

20 As composições farmacêuticas, formulações e métodos relacionados da invenção são úteis para a entrega de uma variedade de agentes terapêuticos para CNS de um objeto (por exemplo, MP4, intraventricularmente ou intracisternalmente) e para o tratamento das doenças
25 associadas. As composições farmacêuticas da presente invenção são particularmente úteis para a entrega de proteínas e enzimas (por exemplo, terapia de reposição enzimática) para indivíduos que sofrem de distúrbios de armazenamento lisossomal. As doenças por armazenamento dos
30 lisossomos representam um grupo de distúrbios metabólicos

herdados relativamente raros que resultam de defeitos na função dos lisossomos. As doenças lisossômicas são caracterizadas pelo acúmulo de macromoléculas não digeridas dentro de lisossomos, que resulta em um aumento no tamanho e número de tais lisossomos e, finalmente, em disfunção celular e anormalidades clínicas.

Entrega no CNS

Está previsto que diversas formulações estáveis aqui descritas são geralmente adequadas para a entrega de agentes terapêuticos no CNS. Formulações estáveis de acordo com a presente invenção podem ser usadas para entrega no CNS através de várias técnicas e rotas incluindo, mas não se limitando a, administração intraparenquimal, intracerebral, intraventricular cerebral (ICV), intratecal (por exemplo, IT-lombar, IT-cisterna magna) e quaisquer outras técnicas e rotas para injeção diretamente ou indiretamente no CNS e no CSF.

Entrega intratecal

Em algumas modalidades, uma enzima de substituição é entregue ao CNS em uma formulação aqui descrita. Algumas modalidades, uma enzima de substituição é entregue ao CNS pela administração para o líquido cefalorraquidiano (CSF) de um sujeito que precisa de tratamento. Em algumas modalidades, administração intratecal é usada para entregar uma enzima de substituição desejada (por exemplo, uma proteína ASA) no CSF. Como usado aqui, administração intratecal (também conhecida como injeção intratecal) refere-se a uma injeção dentro do canal espinhal (espaço intratecal ao redor da medula espinhal). Várias técnicas podem ser utilizadas, incluindo, sem limitação, injeção de

cerebroventricular lateral através de um trepanação ou punção cisternal ou lombar ou coisa parecida.

Exemplares métodos são descritos em Lazorthes et al. Advances in Drug Delivery Systems e Applications in Neurocirurgia, 143-192 e Omayá et al., Cancer Drug Delivery, 1: 169-179, cujo conteúdo é incorporado no presente por referência.

Em conformidade com a presente invenção, uma enzima pode ser injetada em qualquer região em torno do canal espinhal. Em algumas modalidades, uma enzima é injetada na área lombar ou da cisterna magna ou intraventricularmente em um espaço de ventrículo cerebral. Como usado aqui, o termo " região lombar " ou a "área lombar" se refere à área entre as terceira e quarta vértebras lombares (parte inferior das costas) e, inclusive, a região da coluna vertebral L2-S1. Normalmente, injeção intratecal através da região lombar ou área lombar é também conhecida como a " entrega IT lombar " ou "administração IT lombar". O termo "cisterna magna" refere-se ao espaço ao redor e abaixo do cerebelo através da abertura entre o crânio e a parte superior da coluna vertebral. Normalmente, injeção intratecal através de cisterna magna é também conhecida como " entrega cisterna magna". O termo "ventrículo cerebral" refere-se a cavidades no cérebro que são contínuas com o canal central da medula espinhal. Normalmente, as injeções através de cavidades do ventrículo cerebral são denominadas entrega intraventricular Cerebral (ICV).

Em algumas modalidades, "administração intratecal" ou " entrega intratecal " de acordo com a presente invenção

refere-se a administração ou entrega IT lombar, por exemplo, entre a terceira e quarta vértebras lombares (parte inferior das costas) e, inclusive, a região da coluna vertebral L2-S1. É contemplado que administração ou entrega lombar se distingue da entrega de magna cisterna em que administração ou entrega lombar de acordo com nossa invenção fornece melhor e mais efetiva entrega ao canal espinhal distal, enquanto a entrega de cisterna magna, entre outras coisas, normalmente não realiza uma boa entrega no canal medular distal.

Dispositivo para entrega intratecal

Vários dispositivos podem ser utilizados para entrega intratecal de acordo com a presente invenção. Em algumas modalidades, um dispositivo para administração intratecal contém uma porta de acesso de fluidos (por exemplo, porta injetável); um corpo oco (por exemplo, cateter) com um primeiro orifício de escoamento em comunicação fluida com a porta de acesso fluido e um segundo orifício de escoamento, configurado para a inserção na medula espinhal; e um mecanismo de segurança para garantir a inserção do corpo oco na medula espinhal. Como um exemplo não limitador mostrado na figura 62, um mecanismo de fixação adequado contém um ou mais orifícios montados na superfície do corpo oco e um anel suturado ajustável sobre os um ou mais orifícios para impedir que o corpo oco (por exemplo, cateter) escorregue para fora da medula espinhal. Em várias modalidades, a porta de acesso fluido compreende um reservatório. Em algumas modalidades, a porta de acesso fluido é composta por uma bomba mecânica (por exemplo, uma bomba de infusão). Em algumas modalidades, um cateter

implantado é conectado a um reservatório (por exemplo, para a entrega do bolo), ou uma bomba de infusão. A porta de acesso de fluido pode ser implantada ou externa.

Em algumas modalidades, administração intratecal pode ser realizada por qualquer punção lombar (ou seja, em bolus lento) ou através de um sistema de entrega porta-cateter (ou seja, infusão ou bolo). Em algumas modalidades, o cateter é inserido entre as lâminas das vértebras lombares e a ponta é enfiada no espaço tecal no nível desejado (geralmente L3-L4) (figura 63).

Em relação a administração intravenosa, um volume de dose única adequada para administração intratecal é normalmente pequeno. Normalmente, a entrega intratecal de acordo com a presente invenção mantém o equilíbrio da composição de CSF, bem como a pressão intracraniana do objeto. Em algumas modalidades, entrega intratecal é executada faltando a remoção correspondente de CSF de um objeto. Em algumas modalidades, um volume adequado de dose única pode ser por exemplo, menos de cerca de 10 mL, 8mL, 6 mL, 5 mL, 4 mL, 3 mL, 2 mL, 1,5 mL, 1 mL ou 0,5 mL. Em algumas modalidades, um volume adequado de dose única pode ser cerca de 0.5 a 5 mL, 0,5 a 4 mL, 0,5 a 3 mL, 0,5 a 2 mL, 0,5 a 1 mL, 1 a 3 mL, 1 a 5 mL, 1,5 a 3 mL, 1 a 4 mL ou 0,5 a 1,5 mL. Em algumas modalidades, entrega intratecal de acordo com a presente invenção envolve uma primeira etapa de remoção de uma quantidade desejada de CSF de um objeto. Em algumas modalidades, menos de cerca de 10 mL (por exemplo, menos de cerca de 9 mL, 8mL, 7 mL, 6 mL, 5 mL, 4 mL, 3 mL, 2 mL, 1 mL) de CSF é primeiro removido antes da administração IT. Nesses casos, um volume adequado de dose

única pode ser por exemplo, mais de cerca de 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8mL, 9 mL, 10 mL, 15 mL ou 20 mL.

[0185] Vários outros dispositivos podem ser utilizados para o efeito da administração intratecal de composição terapêutica. Por exemplo, formulações contendo enzimas desejadas podem ser administradas usando um reservatório de Ommaya que é comum no uso para administrar drogas intratecalmente para carcinomatose meníngea (Lancet 2:983-84, 1963). Mais especificamente, neste método, um tubo ventricular é inserido através de um buraco formado no corno anterior e está ligado a um reservatório de Ommaya instalado sob o couro cabeludo, e o reservatório é perfurado por via subcutânea para entregar intratecalmente a enzima especial sendo substituída, que é injetada no reservatório. Outros dispositivos para administração intratecal de composições terapêuticas ou formulações de um indivíduo são descritas em U.S. Pat. N ° 6.217.552, incorporadas no presente por referência. Alternativamente, a droga pode ser administrada intratecalmente, por exemplo, por uma injeção única ou infusão contínua. Deve ser entendido que o tratamento de dosagem pode ser na forma de uma administração de dose única ou múltiplas doses.

Para injeção, formulações da invenção podem ser formuladas em soluções líquidas.

Além disso, a enzima pode ser formulada na forma sólida e re-dissolvida ou suspensa imediatamente antes da utilização. Formas liofilizadas também estão incluídas. A injeção pode ser, por exemplo, sob a forma de uma injeção de bolus ou infusão contínua (por exemplo, usando bombas de infusão) da enzima.

Em uma modalidade da invenção, a enzima é administrada pela injeção ventricular lateral do cérebro no cérebro de um objeto. A injeção pode ser feita, por exemplo, através de um orifício de trepanação feito no crânio do sujeito. Em
5 outra modalidade, a enzima e/ou outra formulação farmacêutica, é administrada através de um derivador (shunt) cirurgicamente inserido no ventrículo cerebral de um objeto. Por exemplo, a injeção pode ser feita em dos ventrículos laterais, que são maiores. Em algumas
10 modalidades, injeção em terceiro e quarto ventrículos menores também pode ser feita.

Em outra modalidade, as composições farmacêuticas utilizadas na presente invenção são administradas por injeção para a cisterna magna ou área lombar de um objeto.

15 Em uma outra modalidade do método da invenção, a formulação farmacêuticamente aceitável fornece entrega sustentada, por exemplo, "liberação lenta" da enzima ou outra composição farmacêutica utilizada na presente invenção, para um objeto por pelo menos uma, duas, três,
20 quatro semanas ou longos períodos de tempo após a formulação farmacêuticamente aceitável ser administrada para o objeto.

Como usado aqui, o termo " entrega sustentada" refere-se a entrega contínua de uma formulação farmacêutica da
25 invenção *in vivo* ao longo de um período de tempo depois da administração, de preferência pelo menos vários dias, uma semana ou várias semanas. Entrega sustentada da composição pode ser demonstrada, por exemplo, pelo efeito terapêutico continuado da enzima ao longo do tempo (por exemplo,
30 entrega sustentada da enzima pode ser demonstrada por

reduzida quantidade continua de grânulos de armazenamento no objeto). Alternativamente, entrega sustentada da enzima pode ser demonstrada pela detecção da presença da enzima *in vivo* ao longo do tempo.

5 Entrega para tecidos-alvo

 Como discutido acima, uma das características importantes e surpreendentes da presente invenção é que agentes terapêuticos, em especial, enzimas de substituição administradas usando métodos inventivos e composições da
10 presente invenção são capazes de se difundirem efetivamente e amplamente em toda a superfície do cérebro penetrando várias camadas ou regiões do cérebro, incluindo regiões profundas do cérebro. Além disso, métodos inventivos e composições da presente invenção efetivamente entregam
15 agentes terapêuticos (por exemplo, uma enzima ASA) para vários tecidos, neurônios ou células da medula espinhal, incluindo a região lombar, que é de difícil destino por métodos de entrega no CNS existentes tais como a injeção de ICV. Além disso, métodos inventivos e composições da
20 presente invenção entregam uma quantidade suficiente de agentes terapêuticos (por exemplo, uma enzima ASA) para o fluxo de sangue e vários tecidos e órgãos periféricos.

 Assim, em algumas modalidades, uma proteína terapêutica (por exemplo, uma enzima ASA) é entregue ao
25 sistema nervoso central de um objeto. Em algumas modalidades, uma proteína terapêutica (por exemplo, uma enzima ASA) é entregue para um ou mais dos tecidos-alvo do cérebro, medula espinhal, e/ou órgãos periféricos. Como usado aqui, o termo "tecidos-alvo" refere-se a todo o
30 tecido que é afetado pela doença de armazenamento

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

Tecidos-alvo Cerebrais

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

O cérebro tem três subdivisões principais, incluindo o cérebro, cerebelo e tronco cerebral. Os hemisférios cerebrais se situam acima da maioria das outras estruturas do cérebro e são cobertos com uma camada cortical. Por

baixo do cérebro encontra-se o tronco cerebral, que se assemelha a uma haste na qual o cérebro está ligado. Na parte de trás do cérebro, abaixo do cérebro e atrás do tronco cerebral, está o cerebelo.

5 O diencéfalo, que está localizado perto da linha média do cérebro e acima do mesencéfalo, contém o tálamo, metatálamo, hipotálamo, epítálamo, pre tálamo e pretectum. O mesencéfalo, também chamado de mesencéfalo, contém o tecto, tegumento, mesocoelia ventricular e pedúnculus cerebrais, o núcleo vermelho e o núcleo III do nervo
10 craniano. O mesencéfalo é associado com a visão, audição, controle motor, sono/vigília, alerta e regulação da temperatura.

Regiões dos tecidos do sistema nervoso central,
15 incluindo o cérebro, podem ser caracterizadas com base na profundidade dos tecidos. Por exemplo, tecidos de CNS (por exemplo, cérebro) podem ser caracterizados como tecidos rasos ou de superfície, tecidos de meia profundidade, ou tecidos profundos.

20 Em conformidade com a presente invenção, uma proteína terapêutica (por exemplo, uma enzima de substituição) pode ser entregue a qualquer tecido(s) de destino do cérebro apropriado associado com uma determinada doença a ser tratada em um objeto. Em algumas modalidades, uma proteína
25 terapêutica (por exemplo, uma enzima de substituição) em conformidade com a presente invenção é entregue ao tecido-alvo cerebral superficial ou raso. Em algumas modalidades, uma proteína terapêutica em conformidade com a presente invenção é entregue ao tecido-alvo cerebral de meia
30 profundidade. Em algumas modalidades, uma proteína

terapêutica em conformidade com a presente invenção é entregue ao tecido alvo cerebral profundo. Em algumas modalidades, uma proteína terapêutica em conformidade com a presente invenção é entregue a uma combinação de superfície do tecido-alvo superficial do cérebro, tecido-alvo cerebral de meia profundidade ou tecido alvo cerebral profundo. Algumas modalidades, uma proteína terapêutica em conformidade com a presente invenção é entregue a um tecido de profunda do cérebro pelo menos 4mm, 5mm, 6mm, 7mm, 8mm, 9mm, 10mm ou mais abaixo (ou dentro da) da superfície externa do cérebro.

Em algumas modalidades, agentes terapêuticos (por exemplo, enzimas) são entregues a um ou mais tecidos rasos e superficiais do cérebro. Em algumas modalidades, os tecidos alvo rasos ou de superfície do cérebro estão localizados dentro de 4 mm da superfície do cérebro. Em algumas modalidades, os tecidos alvo rasos ou de superfície do cérebro são selecionados de tecidos pia-máter, tecidos de fita cortical cerebral, hipocampo, espaço de Virchow-Robin, vasos sanguíneos dentro do espaço VR, o hipocampo, partes do hipotálamo na superfície inferior do cérebro, os nervos óticos e tratos, o bulbo olfatório e projeções e suas combinações.

Em algumas modalidades, agentes terapêuticos (por exemplo, enzimas) são entregues a um ou mais tecidos profundos do cérebro. Algumas modalidades, os tecidos alvo rasos ou de superfície do cérebro estão localizados 4 mm (por exemplo, 5mm, 6mm, 7mm, 8mm, 9mm ou 10mm) abaixo (ou dentro) da superfície do cérebro. Em algumas modalidades, tecidos alvo profundos do cérebro incluem a fita cortical

cerebral. Em algumas modalidades, tecidos alvo profundos do cérebro incluem um ou mais dos diencéfalo (por exemplo, o hipotálamo, tálamo, pretálamo, subtálamo, etc.), metencefalon, núcleos lentiformes, os gânglios basais, caudado, putâmen, amígdala, globus pallidus e suas combinações.

Em algumas modalidades, agentes terapêuticos (por exemplo, enzimas) são entregues a um ou mais tecidos do cerebelo. Em determinadas modalidades, um ou mais tecidos alvo do cerebelo são selecionados do grupo constituído de tecidos da camada molecular, tecidos da camada de células de Purkinje, tecidos da camada de células granulares, pedúnculos cerebelares e combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, agentes terapêuticos (por exemplo, enzimas) são entregues a um ou mais tecidos profundos do cerebelo incluindo, mas não se limitando a, tecidos da camada de células de Purkinje, tecidos da camada celular Granular, tecidos profundos Cerebelares da matéria branca (por exemplo, profundo em relação a camada celular Granular) e tecido de núcleos Cerebelares profundos.

Em algumas modalidades, agentes terapêuticos (por exemplo, enzimas) são entregues a um ou mais tecidos do tronco cerebral. Em algumas modalidades, um ou mais tecidos alvo do tronco cerebral incluem tecidos de substância branca do tronco cerebral e/ou tecido de núcleos do tronco cerebral.

Em algumas modalidades, agentes terapêuticos (por exemplo, enzimas) são entregues para diversos tecidos de cérebro, incluindo, mas não limitado a, massa cinzenta, substância branca, áreas periventriculares, pia-aracnóide,

meninges, neocórtex, cerebelo, tecidos profundos no córtex cerebral, mesencéfalo, camada molecular, região do putâmen / caudado, regiões profundas de pontes ou medula e suas combinações.

5 Em algumas modalidades, agentes terapêuticos (por exemplo, enzimas) são entregues para várias células no cérebro, incluindo, mas não se limitando a, neurônios, células gliais, células perivasculares e/ou células meníngeas. Algumas modalidades, uma proteína terapêutica é
10 entregue a oligodendrócitos da matéria branca profunda.

Medula espinhal

Em geral, regiões ou tecidos da medula espinhal podem ser caracterizados com base na profundidade dos tecidos. Por exemplo, os tecidos da medula espinhal podem ser
15 caracterizados como tecidos rasos e de superfície, tecidos de meia profundidade, ou tecidos profundos.

em algumas modalidades, agentes terapêuticos (por exemplo, enzimas) são entregues a um ou mais tecidos superficiais ou rasos da medula espinhal. Em algumas
20 modalidades, um tecido-alvo superficial ou raso da medula espinhal está localizado dentro de 4 mm da superfície da medula espinhal. Em algumas modalidades, um tecido-alvo superficial ou raso da medula espinhal contém matéria pia e/ou tratos de matéria branca.

25 Em algumas modalidades, agentes terapêuticos (por exemplo, enzimas) são entregues a um ou mais tecidos profundos da medula espinhal. Em algumas modalidades, uma alvo profunda do tecido da medula espinhal situa-se interno de 4 mm da superfície da medula espinhal. Em algumas
30 modalidades, um tecido alvo profunda da medula espinhal

contém de matéria cinzenta da medula espinhal e/ou células
ependimárias.

Em algumas modalidades, agentes terapêuticos (por
exemplo, enzimas) são entregues aos neurônios da medula
5 espinhal.

Tecidos periféricos alvo

Como usados neste documento, órgãos ou tecidos
periféricos referem qualquer órgãos ou tecidos que não
fazem parte do sistema nervoso central (CNS). Tecidos
10 periféricos podem incluir, mas não se limitando a, sistema
sanguíneo, fígado, rins, tingimento, endotélio, medula
óssea e medula óssea derivada de células, baço, pulmão,
linfonodos, osso, cartilagem, ovário e testículo. Algumas
modalidades, uma proteína terapêutica (por exemplo, uma
15 enzima de substituição) em conformidade com a presente
invenção é entregue a um ou mais dos tecidos periféricos
alvo.

Biodistribuição e biodisponibilidade

Em várias modalidades, uma vez entregue ao tecido-
20 alvo, um agente terapêutico (por exemplo, uma enzima ASA)
está localizado intracelularmente. Por exemplo, um agente
terapêutico (por exemplo, a enzima) pode ser localizada
para exônios, axônios, lisossomos, mitocôndrias ou vacúolo
de uma célula de destino (por exemplo, os neurônios como
25 células de Purkinje). Por exemplo, em algumas modalidades
as enzimas administradas intratecalmente demonstram
dinâmica de translocação, tal que a enzima se move dentro
do espaço perivascular (por exemplo, por mecanismos de
convecção assistida por pulsação). Além disso, mecanismos
30 de transporte axonal ativo relativo à associação da enzima

ou proteína administrada com neurofilamentos podem também contribuir para ou caso contrário, facilitar a distribuição de proteínas ou enzimas administradas intratecalmente nos tecidos mais profundos do sistema nervoso central.

5 Em algumas modalidades, um agente terapêutico (por exemplo, uma enzima ASA) entregue de acordo com a presente invenção pode atingir níveis terapeuticamente ou clinicamente eficazes ou atividades em vários destinos de tecidos aqui descritos. Como usado aqui, um nível
10 terapeuticamente ou clinicamente eficaz ou atividade é um nível de atividade suficiente para conferir um efeito terapêutico em um tecido-alvo. O efeito terapêutico pode ser objetivo (isto é, mensurável por algum teste ou marcador) ou subjetivo (ou seja, objeto dá uma indicação ou
15 sente um efeito). Por exemplo, um nível terapeuticamente ou clinicamente eficaz ou atividade pode ser uma atividade ou nível enzimático que é suficiente para aliviar os sintomas associados com a doença no tecido-alvo (por exemplo, armazenamento GAG).

20 Em algumas modalidades, um agente terapêutico (por exemplo, uma enzima de substituição) entregue de acordo com a presente invenção pode alcançar um nível enzimático ou atividade que é menos de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% do nível normal ou atividade da enzima
25 lisossomal correspondente no tecido-alvo. Em algumas modalidades, um agente terapêutico (por exemplo, uma enzima de substituição) entregue de acordo com a presente invenção pode alcançar um nível enzimático ou atividade que é aumentada pela decuplicação, pelo menos, duas vezes, 3
30 vezes, quatro, 5-vezes, também, 7-vezes, 8-vezes, 9-vezes

ou 10 vezes em comparação com um controle (por exemplo, níveis endógenos ou atividades sem o tratamento). Em algumas modalidades, um agente terapêutico (por exemplo, uma enzima de substituição) entregue de acordo com a presente invenção pode atingir um aumento do nível enzimático ou atividade pelo menos cerca de 10 nmol/h/mg, 20 nmol/h/mg, 40 nmol/h/mg, 50 nmol/h/mg, 60 nmol/h/mg, 70 nmol/h/mg, 80 nmol/h/mg, 90 nmol/h/mg, 100 nmol/h/mg, 150 nmol/h/mg, 200 nmol/h/mg, 250 nmol/h/mg, 300 nmol/h/mg, 350 nmol/h/mg, 400 nmol/h/mg, 450 nmol/h/mg, 500 nmol/h/mg, 550 nmol/h/mg ou 600 nmol/h/mg em um tecido-alvo.

Em algumas modalidades, métodos criativos de acordo com a presente invenção são particularmente úteis para o direcionamento da região lombar. Em algumas modalidades, um agente terapêutico (por exemplo, uma enzima de substituição) entregue de acordo com a presente invenção pode atingir um aumento do nível enzimático ou atividade na região lombar de pelo 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, 4000 nmol/h/mg, 5000 nmol/h/mg, 6000 nmol/h/mg, 7000nmol/h/mg, 8000 nmol/h/mg, 9000 nmol/h/mg ou 10.000 nmol/h/mg.

Em geral, agentes terapêuticos (por exemplo, enzimas de substituição) entregues de acordo com a presente invenção tem suficientemente longa meia vida no CSF e tecidos alvo do cérebro, medula espinhal e órgãos periféricos. Em algumas modalidades, um agente terapêutico (por exemplo, uma enzima de substituição) entregue de acordo com a presente invenção pode ter uma meia-vida de

pelo menos cerca de 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 25 horas, 30 horas, 35 horas, 40 horas, até 5 3 dias, até 7 dias, até 14 dias, até 21 dias ou até um mês. Em algumas modalidades, um agente terapêutico (por exemplo, uma enzima de substituição) entregue de acordo com a presente invenção pode manter nível detectável ou atividade no CSF ou corrente sanguínea após 12 horas, 24 horas, 30 10 horas, 36 horas, 42 horas, 48 horas, 54 horas, 60, 66 horas, 72 horas, 78, 84 horas, 90, 96 horas, 102 ou uma semana após a administração. Nível detectável ou atividade pode ser determinada usando vários métodos conhecidos na técnica.

15 Em determinadas modalidades, um agente terapêutico (por exemplo, uma enzima de substituição) entregue de acordo com a presente invenção alcança uma concentração de pelo menos 30µg/mL no CNS tecidos e células do objeto após a administração (por exemplo, uma semana, 3 dias, 48 horas, 20 36 horas, 24 horas, 18 horas, 12 horas, 8 horas, 6 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos, ou menos, após administração intratecal da composição farmacêutica para o objeto). Em determinadas modalidades, um agente terapêutico (por exemplo, uma enzima de substituição) entregue de 25 acordo com a presente invenção alcança uma concentração de pelo menos 20µg/mL, pelo menos 15µg/mL, pelo menos 10µg/mL, pelo menos 7 µg/mL, pelo menos 5µg/mL, pelo menos 2 µg/mL, pelo menos 1 µg/mL ou pelo menos 0 µg/mL no alvo de tecidos ou células do sujeito (por exemplo, tecidos ou neurônios do 30 cérebro) após a administração de tal objeto (por exemplo,

uma semana, 3 dias, 48 horas, 36 horas, 24 horas, 18 horas, 12 horas, 8 horas, 6 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos, ou menos após a administração intratecal de tais composições farmacêuticas ao objeto).

5 Tratamento da doença de Leucodistrofia Metacromatica (MLD)

10 A Doença de Leucodistrofia Metacromatica (MLD), é uma doença autossômica recessiva resultante de uma deficiência da enzima Arilsulfatase A (ASA). ASA, que é codificada pelo gene ARSA nos humanos, é uma enzima que quebra a cerebrosídeo 3-sulfato ou sfingolípido 3-O-sulfogalactosilceramida (sulfatídeo), na cerebrosídeo e sulfato. Na ausência da enzima, sulfatídeos se acumulam no sistema nervoso (por exemplo, bainhas de mielina, neurônios e células gliais) e em menor grau em órgãos viscerais. A consequência desses eventos moleculares e celulares é progressiva desmielinização e perda axonal dentro do CNS e PNS, que é acompanhada clinicamente por grave disfunção motora e cognitiva.

20 A característica definidora de clínica desse transtorno é a degeneração do sistema nervoso central (CNS), que resulta em comprometimento cognitivo (por exemplo, retardo mental, distúrbios nervosos e cegueira, entre outros).

25 MLD pode se manifestar em crianças pequenas (forma tarde- infantil), onde crianças afetadas geralmente começam a mostrar sintomas logo após o primeiro ano de vida (por exemplo, em cerca de 15-24 meses) e geralmente não sobrevivem após 5 anos de idade. MLD pode se manifestar em crianças (forma juvenil), onde crianças afetadas

30

normalmente mostram comprometimento cognitivo por cerca de 3 a 10 anos de idade e a duração pode variar (por exemplo, na faixa de 10 a 15 anos depois do aparecimento dos sintomas). MLD pode se manifestar em adultos (forma início-adulto) e pode aparecer em indivíduos de qualquer idade (por exemplo, normalmente na idade 16 e posterior) e a progressão da doença pode variar muito.

Composições e métodos da presente invenção podem ser usados para tratar eficazmente a indivíduos que sofrem de ou suscetíveis a MLD. Os termos, "tratar" ou "tratamento", como usado aqui, se refere a melhoria de um ou mais sintomas associados com a doença, a prevenção ou atraso do início de um ou mais sintomas da doença, e/ou diminuição da gravidade ou a frequência de um ou mais sintomas da doença.

Exemplares sintomas incluem, mas não estão limitados a, pressão intracraniana, hidrocefalia ex vacuo, glicolipídios sulfatados acumulados nas bainhas de mielina no central e sistema nervoso periférico e em órgãos viscerais, progressiva desmielinização e perda axonal dentro do CNS e PNS, e/ou disfunção motora e cognitiva.

Em algumas modalidades, tratamento refere-se parcialmente ou completo alívio, melhora, alívio, inibição, atrasando o início, reduzindo a gravidade e/ou incidência de deficiência neurológica em paciente MLD. Como usado aqui, o termo "deficiência neurológica" inclui vários sintomas associados com comprometimento do sistema nervoso central (por exemplo, o cérebro e medula espinhal). Em algumas modalidades, vários sintomas do MLD estão associados com comprometimento do sistema nervoso periférico (SNP). Em algumas modalidades, deficiência

neurológica em paciente MLD caracteriza-se pelo declínio da função motora bruta. Será apreciado que a função motora bruta poderá ser avaliada por qualquer método adequado. Por exemplo, em algumas modalidades, função motora bruta é medida como a mudança de uma linha de base na função motora, usando graduação bruta total Gross Motor Function Measure-88 (GMFM-88).

Em algumas modalidades, tratamento refere-se a acumulação de sulfatideo diminuída em vários tecidos. Em algumas modalidades, tratamento refere-se à acumulação de sulfatideo diminuída em tecidos-alvo do cérebro, neurônios da medula espinhal, e/ou tecidos-alvo periféricos. Em certas modalidades, acumulação de sulfatideo é diminuída em cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% >, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% ou mais em comparação com um controle. Em algumas modalidades, acumulação de sulfatideo é diminuída por dez vezes pelo menos, duas vezes, 3 vezes, quatro, 5-vezes, também, 7-vezes, 8-vezes, 9-vezes ou dez vezes em comparação com um controle. Ele será apreciado esse armazenamento de sulfatideo poderá ser avaliado por qualquer método adequado. Por exemplo, em algumas modalidades, sulfatideo armazenamento é medido pela coloração de alcian blue. Em algumas modalidades, sulfatideo armazenamento é medido pela coloração LAMP-1.

Em algumas modalidades, tratamento refere-se à reduzida vacuolização nos neurônios (por exemplo, neurônios que contém células de Purkinje). Em determinadas modalidades, vacuolização nos neurônios é diminuiu cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%,

65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% ou mais em
comparação com um controle. Em algumas modalidades,
vacuolização é reduzida pelo menos dez vezes, 2 vezes, 3
vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes
5 ou dez vezes em comparação com um controle.

Em algumas modalidades, tratamento refere-se a maior
atividade da enzima ASA em vários tecidos. Em algumas
modalidades, tratamento refere-se a maior atividade da
enzima ASA nos tecidos-alvo do cérebro, neurônios da medula
10 espinhal e/ou tecidos-alvo periféricos. Em algumas
modalidades, atividade enzimática ASA é aumentada cerca de
5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%,
65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 200%, 300%, 400%,
500%, 600%, 700%, 800%, 900% 1000% ou mais em comparação
15 com um controle. Em algumas modalidades, atividade
enzimática ASA é aumentada pelo menos dez vezes, 2 vezes, 3
vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes
ou dez vezes em comparação com um controle. Em algumas
modalidades, atividade enzimática aumentada de ASA é pelo
20 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, 550nmol/h/mg, 600
25 nmol/h/mg ou mais. Em algumas modalidades, atividade
enzimática de ASA é maior na região lombar. Em algumas
modalidades, aumento da atividade enzimático ASA na região
lombar é pelo menos aproximadamente 2000 nmol/h/mg, 3000
nmol/h/mg, 4000 nmol/h/mg, 5000 nmol/h/mg, 6000 nmol/h/mg,
30 7000nmol/h/mg, 8000 nmol/h/mg, 9000 nmol/h/mg, 10.000

nmol/h/mg ou mais.

Em algumas modalidades, tratamento refere-se a diminuição de progressão da perda da capacidade cognitiva. Em determinadas modalidades, progressão da perda da
5 capacidade cognitiva diminuiu cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% ou mais, em comparação com um controle. Em algumas modalidades, tratamento refere-se a diminuição de atraso de desenvolvimento. Em determinadas modalidades,
10 atraso de desenvolvimento diminuiu cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% ou mais em comparação com um controle.

Em algumas modalidades, tratamento refere-se a
15 sobrevivência aumentada (por exemplo, o tempo de sobrevivência). Por exemplo, o tratamento pode resultar em um aumento da esperança de vida de um paciente. Em algumas modalidades, tratamento de acordo com os resultados de presente invenção tem um aumento da esperança de vida de um
20 paciente por mais de cerca de 5%, cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de
25 95%, cerca de 100%, cerca de 105%, cerca de 110%, cerca de 115%, cerca de 120%, cerca de 125%, cerca de 130%, cerca de 135%, cerca de 140%, cerca de 145%, cerca de 150%, cerca de 155%, cerca de 160%, cerca de 165%, cerca de 170%, cerca de 175%, cerca de 180%, cerca de 185%, cerca de 190%, cerca de
30 195%, cerca de 200% ou mais, em comparação com a

expectativa de vida média de um ou mais indivíduos controle com semelhante doença sem tratamento. Em algumas modalidades, tratamento de acordo com a presente invenção resulta em um aumento da esperança de vida de um paciente
5 por mais de cerca de 6 meses, cerca de 7 meses, cerca de 8 meses, cerca de 9 meses, cerca de 10 meses, cerca de 11 meses, cerca de 12 meses, cerca de 2 anos, cerca de 3 anos, cerca de 4 anos, cerca de 5 anos, cerca de 6 anos, cerca de 7 anos, cerca de 8 anos, cerca de 9 anos, cerca de 10 anos
10 ou mais, em comparação com a expectativa de vida média de um ou mais indivíduos controle com semelhante doença sem tratamento. Em algumas modalidades, o tratamento de acordo com a presente invenção resulta na sobrevivência de longo prazo do paciente. Como usado aqui, o termo "sobrevivência
15 o longo prazo" se refere a um tempo de sobrevivência ou a expectativa de vida maior do que cerca de 40 anos, 45 anos, 50 anos, 55 anos, 60 anos, ou mais.

Os termos, "melhorar", "aumentar" ou "reduzir", neste documento, indica que são em relação a um controle. Em
20 algumas modalidades, um controle apropriado é uma medida de referência, como uma medida na mesma individuais antes do início do tratamento descrito neste documento, ou uma medida em um controle individual (ou de vários indivíduos de controle) na ausência de tratamento descrito neste
25 documento. Um indivíduo de "controle" é o indivíduo afligido com a mesma forma MLD (por exemplo, forma de tarde-infantil, juvenil ou adulto-início), que é sobre a mesma idade e/ou gênero, como o indivíduo a ser tratado (a fim de assegurar que os estágios da doença no indivíduo tratado e
30 no indivíduo (s) controle sejam comparáveis).

O indivíduo (também referido como "paciente" ou "objeto") sendo tratadas é um indivíduo (feto, bebê, criança, adolescente ou adulto humano) com MLD, ou o potencial para desenvolver MLD. O indivíduo pode ter 5 residual expressão e/ou atividade endógena de ASA ou nenhuma atividade mensurável. Por exemplo, o individual tendo MLD pode ter níveis de expressão de ASA que são menos de cerca de 30 a 50%, menos de cerca de 25 a 30%, menos de cerca de 20 a 25%, menos de cerca de 15 a 20%, menos de 10 cerca de 10 a 15%, inferior a 5 a 10%, inferior a 0,1 a 5% 10 de níveis normais de expressão de ASA.

Em algumas modalidades, o indivíduo é um indivíduo que foi recentemente diagnosticado com a doença. Normalmente, o tratamento precoce (com início logo que possível após o 15 diagnóstico de tratamento) é importante para minimizar os efeitos da doença e maximizar os benefícios do tratamento.

Tolerância imunológica

Geralmente, administração intratecal de um agente terapêutico (por exemplo, uma enzima de substituição) de 20 acordo com a presente invenção não resulta em efeitos adversos graves no objeto. Como usado aqui, efeitos adversos graves induzem, mas não estão limitados a, resposta imune substancial, toxicidade ou morte. Como usado aqui, o termo "resposta imune substancial" refere-se a 25 severas ou graves respostas imunes, como adaptáveis respostas imunes de células T.

Assim, em muitas modalidades, métodos criativos de acordo com a presente invenção não envolvem terapia imunossupressora simultânea (isto é, qualquer terapia de 30 imunossupressor usada como pré-tratamento/pré-

condicionamento ou em paralelo ao método). Em algumas modalidades, métodos criativos de acordo com a presente invenção não envolvem uma indução de tolerância imunológica no objeto a ser tratado. Em algumas modalidades, métodos criativos de acordo com a presente invenção não envolvem um pré-tratamento ou pré-condicionamento do sujeito usando Agente imunossupressor de células T.

Em algumas modalidades, administração intratecal de agentes terapêuticos pode montar uma resposta imune contra esses agentes. Assim, em alguns embodiments, pode ser útil processar o objeto receber a enzima de substituição tolerante para a terapia de reposição enzimática. Tolerância imunológica pode ser induzida usando vários métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, pode ser utilizado um regime inicial 30 a 60 dias de um célula T imunossupressora agente como a ciclosporina A (CsA) e um agente de antiproliferativo, tais como, a azatioprina (Aza), combinado com infusões de intratecal semanal de baixas doses de uma enzima de substituição desejada.

Qualquer Agente imunossupressor conhecido para o artesão hábil pode ser empregada em conjunto com uma terapia de combinação da invenção. Tais agentes imunossupressores incluem mas não estão limitados a FK506, ciclosporina, rapamicina, CTLA4-Ig e agentes anti-TNF como etanercept (Veja, por exemplo, Moder, 2000, Ann. Allergy Asthma Immunol. 84, 280-284; Nevins, 2000, Curr. Opin. Pediatr. 12, 146-150; Kurlberg et al., 2000, Scand. J. Immunol. 51, 224-230; Ideguchi et al., 2000, Neuroscience 95, 217-226; Potteret al., 1999, Ann. N.Y. Acad. Sci. 875, 159-174; Slavik et al., 1999, Immunol. Res. 19, 1-24;

Gaziev et al., 1999, Bone Marrow Transplant. 25, 689-696; Henry, 1999, Clin. Transplant. 13, 209-220; Gummert et al., 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10, 1366-1380; Qi et al., 2000, Transplantation 69, 1275-1283). The anti-IL2 receptor (.alpha.-subunit) antibody daclizumab (e.g. Zenapax.TM.),
5 que tem demonstrado ser eficaz em pacientes de transplante, também pode ser usado como um agente imunossupressor (veja por exemplo, Wiseman et al., 1999, Drugs 58, 1029-1042; Beniaminovitz et al., 2000, N. Engl J. Med. 342, 613-619; Ponticelli et al., 1999, Drugs R. D. 1, 55-60; Berard et al., 1999, Pharmacotherapy 19, 1127-1137; Eckhoff et al., 2000, Transplantation 69, 1867-1872; Ekberg et al., 2000, Transpl. Int. 13, 151-159). Adicionais agentes imunossupressores incluem mas não estão limitados a anti-CD2
10 (Branco et al., 1999, Transplantation 68, 1588-1596; Przepiorka et al., 1998, Blood 92, 4066-4071), anti-CD4 (Marinova-Mutafchieva et al., 2000, Arthritis Rheum. 43, 638-644; Fishwild et al., 1999, Clin. Immunol. 92, 138-152) e anti-CD40 ligante (Hong et al., 2000, Semin. Nephrol. 20, 108-125; Chirmule et al., 2000, J. Virol. 74, 3345-3352; Ito et al., 2000, J. Immunol. 164, 1230-1235).

Administração

Métodos inventivos da presente invenção contemplam tanto as administrações simples quanto múltiplas de uma
25 quantidade terapêuticamente eficaz dos agentes terapêuticos (por exemplo, enzimas de substituição) aqui descritos. Agentes terapêuticos (por exemplo, enzimas de substituição) podem ser administrados em intervalos regulares, dependendo da natureza, a gravidade e a extensão da condição do
30 sujeito (por exemplo, uma doença de armazenamento

lisossomal). Em algumas modalidades, uma quantidade terapeuticamente eficaz dos agentes terapêuticos (por exemplo, enzimas de substituição) da presente invenção pode ser administrado MP4 periodicamente em intervalos regulares
5 (por exemplo, uma vez por ano, uma vez por semestre, cada cinco meses, uma vez a cada três meses, bimestral (uma vez cada dois meses), mensais (uma vez por mês), quinzenal (uma vez cada duas semanas), semanal).

Em algumas modalidades, administração intratecal pode ser usada em conjunto com outras vias de administração (por exemplo, por via intravenosa, por via subcutânea, intramuscular, por via parentérica, transdérmica, ou transmucosamente (por exemplo, por via oral ou por via nasal)). Algumas modalidades, as outras vias de
10 administração (por exemplo, administração intravenosa) podem ser executadas não mais frequente do que a quinzenal, mensal, uma vez a cada dois meses, uma vez a cada três meses, uma vez a cada quatro meses, uma vez a cada cinco meses, uma vez a cada seis meses, por ano de administração.

Neste documento, o termo "quantidade terapeuticamente eficaz" é base largamente determinada sobre o montante total do agente terapêutico contido nas composições farmacêuticas da presente invenção. Geralmente, uma quantidade terapeuticamente eficaz é suficiente para
25 alcançar um benefício significativo para o sujeito (por exemplo, tratamento, modulação, cura, impedindo e/ou melhorando a doença subjacente ou condição). Por exemplo, uma quantidade terapeuticamente eficaz pode ser um valor suficiente para conseguir um efeito terapêutico e/ou
30 profilático desejado, como um valor suficiente para modular

a receptores de enzima lisossomal ou sua atividade para assim tratar tal doença de armazenamento lisossomal os bem e sintomas (por exemplo, redução ou eliminação da incidência de "corpos de zebra" ou celular vacuolização após a administração das composições da presente invenção a um objeto ou presença). Geralmente, a quantidade de um agente terapêutico (por exemplo, uma enzima lisossomal recombinante) administrada a um objeto em necessidade dele dependerá das características do objeto. Tais características incluem a condição, gravidade da doença, saúde geral, idade, sexo e peso corporal do sujeito. Um dos especialista na técnica será prontamente capaz de determinar doses adequadas dependendo estes e outros fatores relacionados. Além disso, objetivo e subjetivos, ensaios, opcionalmente, podem ser empregados para identificar os intervalos de dosagem ideal.

Quantidade terapeuticamente eficaz de A é geralmente administrada em um regime de dosagem que pode compreender várias doses de unidade. Para qualquer proteína terapêutica específica, uma quantidade terapeuticamente eficaz (e/ou uma dose de unidade apropriada dentro de um regime de dosagem eficaz) pode variar, por exemplo, dependendo da via de administração, em combinação com outros agentes farmacêuticos. Além disso, a quantidade terapeuticamente eficaz específica (e/ou dose unitária) para qualquer paciente particular pode depender uma variedade de fatores, incluindo o distúrbio a ser tratado e a gravidade da doença; a atividade do agente específico farmacêutico empregado; a composição específica utilizada; a idade, peso corporal, saúde geral, sexo e dieta do paciente; o tempo de

administração, via de administração, e/ou taxa de excreção ou metabolismo da proteína de fusão específico empregado; a duração do tratamento; e como fatores como é bem conhecido nas artes médicas.

5 Em algumas modalidades, a dose terapêutica eficaz varia de cerca de 0.005 mg/kg peso cerebral a 500 mg/kg peso cerebral, e.g., de cerca de 0.005 mg/kg peso cerebral a 400 mg/kg peso cerebral, de cerca de 0.005 mg/kg peso cerebral a 300 mg/kg peso cerebral, de cerca de 0.005 mg/kg peso cerebral a 200 mg/kg peso cerebral, de cerca de 0.005 mg/kg peso cerebral a 100 mg/kg peso cerebral, de cerca de 0.005 mg/kg peso cerebral a 90 mg/kg peso cerebral, de cerca de 0.005 mg/kg peso cerebral a 80 mg/kg peso cerebral, de cerca de 0.005 mg/kg peso cerebral a 70 mg/kg peso cerebral, de cerca de 0.005 mg/kg peso cerebral a 60 mg/kg peso cerebral, de cerca de 0.005 mg/kg peso cerebral a 50 mg/kg peso cerebral, de cerca de 0.005 mg/kg peso cerebral a 40 mg/kg peso cerebral, de cerca de 0.005 mg/kg peso cerebral a 30 mg/kg peso cerebral, de cerca de 0.005 mg/kg peso cerebral a 25 mg/kg peso cerebral, de cerca de 0.005 mg/kg peso cerebral a 20 mg/kg peso cerebral, de cerca de 0.005 mg/kg peso cerebral a 15 mg/kg peso cerebral, de cerca de 0.005 mg/kg peso cerebral a 10 mg/kg peso cerebral.

25 Em algumas modalidades, a dose terapêutica eficaz é maior que cerca de 0.1 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 0.5 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 1.0 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 3 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 5 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 10 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 15 mg/kg peso

cerebral, maior que cerca de 20 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 30 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 40 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 50 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 60 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 70 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 80 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 90 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 100 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 150 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 200 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 250 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 300 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 350 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 400 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 450 mg/kg peso cerebral, maior que cerca de 500 mg/kg peso cerebral.

Em algumas modalidades, a dose terapêutica eficaz também pode ser definida por mg/kg de peso corporal. Como um técnico no objeto gostaria de receber, o cérebro pesos e o peso corporal pode ser correlacionado. Dekaban AS. "Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights e body weights," Ann Neurol 1978; 4:345-56. Assim, em algumas modalidades, as dosagens podem ser convertidas como mostrado na tabela 5.

TABELA 5

Correlação entre pesos cerebrais, pesos corporais, e idade dos machos		
Idade (anos)	Peso cerebral (kg)	Peso corporal (kg)
3 (31 a 43 meses)	1.27	15.55
4 a 5	1.30	19.46

Em algumas modalidades, a dose terapêutica eficaz também pode ser definida por mg/15 cc de CSF. Como seria

apreciado por um técnico no assunto, doses terapêuticamente eficazes baseados no pesos do cérebro e pesos de corpo podem ser convertidos em mg/15 cc de CSF. Por exemplo, o volume de CSF em seres humanos adultos é cerca de 150 mL (Johanson CE, et al. "Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health e doença," Cerebrospinal Fluid Res. 2008 May 14;5:10). Portanto, injeções de dose única de 0,1 mg a 50 mg de proteína para adultos seria aproximadamente 0,01 mg/15 cc de CSF (0,1 mg) 5,0 mg/15 cc de doses de CSF (50 mg) em adultos.

Deve ser ainda entendido que, para qualquer objeto particular, regimes de dosagem específica devem ser ajustados ao longo do tempo, de acordo com a necessidade individual e o julgamento profissional da pessoa administrar ou supervisionar a administração da terapia de reposição enzimática e que intervalos de dosagem aqui estabelecidos são exemplares apenas e não se destinam a limitar o escopo ou a prática da invenção reivindicada.

Kits

A presente invenção ainda fornece kits ou outros artigos de fabricação que contém a formulação da presente invenção e fornece instruções para a sua reconstituição (liofilizado) e/ou utilização. Kits ou outros artigos de fabricação podem incluir um recipiente, um IDDD, um cateter e quaisquer outros artigos, dispositivos ou equipamentos úteis em administração de intertecal e cirurgia associada. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas (por exemplo, seringas pré-preenchido), ampolas, cartuchos, reservatórios ou lio-jatos. O recipiente pode ser constituído de uma variedade de

materiais como o vidro ou plástico. Em algumas modalidades, um contêiner é uma seringa pré-cheia. Seringas pré-cheia apropriadas incluem, mas não limitado a, seringas de vidro de borossilicato com revestimento de silicone cozido, seringas de vidro de borossilicato com silicone pulverizado, ou resina plástica seringas sem silicone.

Normalmente, o recipiente pode formulações de suspensões e um rótulo de, ou associados, o recipiente que pode indicar direções para a reconstituição e/ou utilização. Por exemplo, o rótulo pode indicar que a formulação é reconstituída a concentrações de proteína, como descrito acima. O rótulo pode indicar mais que a formulação seja útil ou pretendida para, por exemplo, a administração IT. Em algumas modalidades, um recipiente pode conter uma única dose de uma formulação estável contendo um agente terapêutico (por exemplo, uma enzima de substituição). Em várias modalidades, uma dose única da formulação estável está presente em um volume de menos de cerca de 15 mL, 10 mL, 5,0 mL, 4,0 mL, 3,5 mL, 3,0 mL, 2,5 mL, 2,0 mL, 1,5 mL, 1,0 mL ou 0,5 mL. Alternativamente, um recipiente segurando a formulação pode ser um frasco multi-uso, que permite a repetição de administrações (por exemplo, 2-6 administrações) da formulação. Kits ou outros artigos de fabricação ainda podem incluir um segundo recipiente, compreendendo um diluente apropriado (por exemplo, BWFI, salina, tampão salino). Após misturar o diluente e a formulação, a concentração de proteína final na formulação reconstituída será geralmente pelo menos 1 mg/mL (por exemplo, pelo menos 5 mg/mL, pelo menos, 10 mg/mL, pelo menos 25 mg/mL, pelo menos 50 mg/mL, pelo menos

75 mg/mL, pelo menos 100 mg/mL). Kits ou outros artigos de fabrico ainda podem incluir outros materiais desejáveis de um comercial e ponto de vista do usuário, incluindo outros soluções tampão, diluentes, filtros, agulhas, IDDDs, cateteres, seringas e pacote insere com instruções de uso.

[0243] A invenção será entendida mais plenamente por referência aos exemplos a seguir. Eles não devem, contudo, ser interpretados como limitadores do escopo da invenção. Todas as citações de literatura são incorporadas por referência.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: TOXICOLOGIA DE ARILSULFATASE A ADMINISTRADA IT

Para avaliar a capacidade de outras enzimas recombinantes IT-administradas para distribuir para as células e tecidos do CNS, um estudo BPL foi conduzido para avaliar a repetição da dose intratecal (IT) de administração de arilsulfatase A humana preparada recombinantemente (rhASA) de uma perspectiva farmacologica de toxicologia e segurança sobre um prazo de um mês em juvenis macacos *Cynomolgus* (menos de 12 meses de idade). A formulação de rhASA foi preparada e formulada em um veículo de 154 mM NaCl, 0.005% polissorbato 20 a um pH de 6.0.

Para conseguir isso, nove macacos *Cynomolgus* juvenis do sexo masculinos e femininos foram aleatoriamente designados pelo peso corporal para um dos três grupos de tratamento conforme a seguinte tabela 6. Os animais (com exceção de 1 animal macho para Dose 1) receberam infusão 0,6 mL curto prazo IT de 0,3 ou 31 mg/mL de rhASA (dose total de 0,1.8 ou 18,6 mg) quinzenalmente para um total de

três doses por animal. Pesos corporais, observações clínicas, neurológicas e exames físicos, patologia clínica, exames oftalmológicos e amostragem toxicocinética foram monitoradas. Todos os animais foram autopsiados no dia 29, 30 ou 31 (~ 24 horas após a última dose IT). Tecidos selecionados foram coletados, guardados e examinados microscopicamente.

TABELA 6

Grupo	Número de Animais	Concentração da dose nominal (mg/mL)	Volume de Dose (mL)	Dose Administrada (mg)
1	3M, 3F	0	0.6	0
2	3M, 3F	3	0.6	1.8
3	3M, 3F	31	0.6	18.6

As concentrações de rhASA detectadas nos tecidos dos macacos *Cynomolgus* CNS foram analisadas por ELISA e comparadas a um alvo terapêutico de 10% das concentrações normais de rhASA humano, correspondendo a aproximadamente 2.5ng/mg de tecido. Amostras de tecido ou punções foram extraídos de diferentes áreas dos cérebros dos macacos *Cynomolgus* e mais analisados para a presença de rhASA. A Figura 24 ilustra os tecidos de onde foram extraídos as punções. As amostras de tecido perfurado refletiu um aumento nas concentrações de rhASA, que se refletem nas figuras 25 A-G, com um gradiente de deposição de córtex cerebral para a matéria branca profunda e matéria cinzenta profunda.

Concentrações de rhASA detectadas usando a mesma

punção de ambas as rotas IT e ICV de administração para seis macacos administrados a dose de 18,6 mg de rhASA, são ilustradas nas figuras. 26 A-B. As concentrações de rhASA detectadas na matéria branca profunda (Figura 25) e nos tecidos cerebrais da matéria cinzenta profunda (figura 26B) dos macacos cynomolgus adulto e juvenil administrados intratecalmente-(IT) ou intracerebroventricularmente-(ICV) com rhASA foram comparáveis.

As amostras de tecido perfurado extraído do cérebro de adulto e macacos Cynomolgus juvenis foram então analisados para determinar as concentrações de rhASA depositados na amostra extraída do tecido e comparar tais concentrações à concentração alvo terapêutico em 2.5ng rhASA por mg de proteína (correspondente a 10% da concentração normal de rhASA em um sujeito saudável). Conforme ilustrado na figura 27A, em cada punção de amostra de tecido analisado na dose de 18,6 mg de rhASA IT-administrada resultou em uma concentração de rhASA, que excedeu a concentração terapêutica de destino de 2.5ng / mg de proteína. Da mesma forma, quando uma dose de 1,8 mg de rhASA foi administrado IT para macacos Cynomolgus juvenis, cada punção de amostra de tecido analisado demonstrou uma concentração de rhASA dentro ou excedendo a concentração terapêutica de 2.5ng / mg de proteína e as concentrações de rhASA medianas foram acima o alvo terapêutico para todos os tecidos punções testados (figura 27B).

Para determinar se rhASA IT administrado se distribuía para as células relevantes, tecido foi analisado a partir da matéria branca profunda de um macaco cynomolgus IT-administrado 1,8 mg de ASA, da área ilustrada na Figura 28

A. Imunottingimento do tecido de matéria branca profunda revelou distribuição de rhASA nas células de oligodendrocito do macaco cynomolgus, conforme ilustrado pela figura 28B. Da mesma forma, a Figura 28 ilustra que o
5 rhrASA IT-administrado demonstrou co-localização nos tecidos profundos de matéria branca do macaco cynomolgus. Em particular, sob coloração co-localização em organelas de destino, como a lisossoma é evidente (Figura 28 C), apoiando a conclusão que rhASA IT-administrado é capaz de
10 distribuir para as relevantes células, tecidos e organelas do CNS, incluindo os lisossomos de oligodendrócitos. O precedente suporta a conclusão que a diferença entre entrega ICV e ele também foi encontrado para ser mínimo para entrega de rhASA.

15 EXEMPLO 2: REDISTRIBUIÇÃO COM PROTEÍNA RADIO-MARCADA

rhASA, marcado com o emissor de pósitron ^{124}I estava preparado e formulado em um veículo de 154 mM NaCl, 0.005% polissorbato 20 a um pH de 6.0. Um volume da formulação equivalente a 3 mg de rhASA (correspondente a
20 aproximadamente 38 mg/kg de cérebro) foi administrado em macacos Cynomolgus adulto por vias de administração intracerebroventricular (ICV) e intratecal (IT). Os macacos Cynomolgus estavam sujeitos a estudos de imagiologia de alta resolução PET scan (microPET P4) para determinar a
25 distribuição de administrado rhASA ^{124}I -marcado.

Dados de imageamento PET, (figura 29) ilustram que ambos o ICV e IT-administrado rhASA ^{124}I -marcado efetivamente distribuíram nos tecidos do CNS, e em particular o rhASA ^{124}I -marcado administrado através do
30 cateter de IT-lombar imediatamente e uniformemente espalhou

no líquido cefalorraquidiano (CSF) sobre o comprimento da coluna vertebral. Em particular, como ilustrado na Fig. 29, seguindo administração ICV e IT, as concentrações terapêuticas de rhASA ¹²⁴I-marcado foram detectadas nos tecidos CNS do macaco cynomolgus objeto, incluindo o cérebro, medula espinhal e CSF. As concentrações de rhASA detectados em tais tecidos do CNS e em particular nos tecidos do cérebro, excedeu a concentração alvo terapêutica de 2.5ng / mg de proteína.

10 Enquanto a distribuição de proteína de rhASA foi comparável para vias de administração IT e ICV, ICV resultou em notavelmente menos deposição dentro da coluna vertebral, como prova pela figura 29.

Vinte e quatro horas após a administração da 15 formulação, tanto o rhASA ¹²⁴I-marcado administrado ICV e IT efetivamente distribuiu nos tecidos do CNS. Em particular, vinte e quatro horas após a administração IT 12,4% da dose administrada foi na região craniana, comparado a 16,7% da dose administrada de ICV. Assim, as concentrações de rhASA 20 detectadas em tais tecidos do CNS, e em particular nos tecidos do cérebro, quando rhASA foi administrado se aproximavam as concentrações detectadas na sequência ICV-administrada da mesma dose.

Injeção ICV de rhASA ¹²⁴I-marcado resulta injeção ICV 25 resulta na transferência imediata do volume injetado à cisterna magna, cisterna pontis, cisterna interpeduncularis e espinha proximal, conforme ilustrado na Figura 30. Como também ilustrado na Figura 30, dentro de 2-5 hr administração IT entrega rhASA ¹²⁴I-marcado nos mesmos 30 compartimentos iniciais (coluna vertebral proximal e

cisternae) como mostrado para a administração ICV. Vinte e quatro horas após distribuição de ambas as administrações ICV e IT de rhASA ¹²⁴I-marcado foram comparáveis, como ilustrado na figura 31. Nesse sentido, ao contrário de 5 drogas de pequenas moléculas, os resultados anteriores sugerem que administração ICV oferece vantagens mínimas sobre administração IT de rhASA.

Estes resultados confirmam que rhASA pode ser entregue a um objeto usando a rota menos invasiva da administração 10 IT e, assim, atingir concentrações terapêuticas nas células e tecidos de destino.

As doenças por armazenamento dos lisossomos representam uma família de doenças genéticas causadas por enzimas ausentes ou defeituosas, que resultam em acúmulo de 15 substrato anormal. Embora os sintomas periféricos associados com várias destas doenças podem ser eficazmente atenuados por administração intravenosa de enzimas recombinantes não deve afetar significativamente as manifestações de CNS associadas com uma maioria das doenças 20 de armazenamento lisossomal. Por exemplo, iduronate-2-sulfatase recombinante humana (Idursulfase, Elaprase®; Shire Human Genetic Therapies, Inc. Lexington, MA) é aprovada para o tratamento dos sintomas somáticos da síndrome de Hunter, mas não há nenhuma terapia 25 farmacológica para o tratamento das manifestações neurológicas que podem incluir atraso de desenvolvimento e progressiva deficiência mental. Isso é em parte devido à natureza de I2S, que é uma enzima grande altamente glicosilada, com peso molecular de aproximadamente 76kD e 30 que não atravessa a barreira hemato-encefálica após

administração intravenosa.

Inventores presentes assumiram, portanto, um programa para investigar a entrega intratecal (IT) de formulações intratecais de enzimas humanas recombinantes, como, por exemplo, iduronate-2-sulfatase (I2S), arilsulfatase A (rhASA) e alfa-N-acetilglucosaminidase (Naglu). Os resultados aqui apresentados representam o primeiro a demonstrar que administração IT-lombar de um resultado de proteínas recombinantes lisossomal no fornecimento de uma fração significativa da proteína administrada ao cérebro e em particular resultado na deposição generalizada de tais proteínas nos neurônios do cérebro e da medula espinhal em cães e macacos cynomolgus. As análises imuno-histoquímica dos tecidos CNS demonstraram que a proteína é direcionada para a lisossoma, o site local de acumulação patológica de glicosaminoglicano nas desordens de armazenamento lisossomal. Além disso, as melhorias morfológicas demonstraram no modelo do camundongo IKO da síndrome de Hunter, o modelo de camundongo Naglu-deficiente de síndrome de Sanfilippo tipo B, e o modelo do camundongo nocaute ASA de leucodistrofia metacromática (MLD) reforça a observação dessa enzima IT-administrada é distribuída para os tecidos apropriados e transportada para apropriados compartimentos celulares e organelas.

As semelhanças observadas nos padrões de distribuição de cérebro detectadas após administração de IT-lombar e ICV da I2S é sugestiva de fluxo de massa e remistura ativa do CSF. Assim, em um ambiente clínico, tanto as vias de administração IT e ICV são potencialmente viáveis, no entanto, a observada deposição de I2S na medula espinhal

após a administração TI fornece uma clara vantagem no tratamento de sequelas da coluna vertebral e componentes de doenças como a síndrome de Hunter. Além disso, portos de injeção espinhal são menos invasivos e esperados para ser
5 mais adequado para uso crônico, especialmente nos objetos pediátricos.

Evidências da coloração de célula perivascular e dinâmica de translocação de proteína observada pelos estudos de imagem PET indicam que essa enzima se move
10 dentro do espaço perivascular, presumivelmente por mecanismos de convecção assistida por pulsação. Um mecanismo adicional de transporte é sugerido pela associação observada de I2S com neurofilamentos, indicativos de transporte axonal ativo. Este último
15 presumivelmente começa com a interação da proteína com neurônios receptores de (M6P) de manose-6-fosfato, que são amplamente expressa em células da medula espinhal e cérebro e que em cima da administração direta para o parênquima cerebral pode fazerm com que a enzima I2S seja facilmente
20 absorvida pelas células alvo. (Begley, et al, Curr Pharm Des (2008) 14:1566-1580).

Enquanto o transporte axonal de enzimas lisossomais anteriormente foi implicado por métodos indiretos *in vivo* e *in vitro*, estudos de imagem atuais fornecem a primeira
25 evidência direta de transporte axonal não-viralmente ou enzimas expressadas entregues via o CSF. Assim, a entrega de proteína do CSF para a superfície do cérebro e mais profunda para os tecidos do cérebro parece depender de processos de transferência de ativos, nenhum dos quais têm
30 sido descritos anteriormente ou elucidar a entrega de

proteína ou enzima para as células, tecidos e organelas do cérebro.

Ao contrário do ponto de vista prevalecente que a dinâmica do fluxo do CSF e parênquima interstício impediria a distribuição das proteínas de IT-lombar administradas para matéria branca do cérebro, os instantâneos estudos demonstram claramente que entrega IT de uma enzima lisossômica resulta na distribuição de proteína e acumulação em todos os tecidos do cérebro e deposição no compartimento dos lisossomos das células-alvo que são o local de acúmulo patológico de glicosaminoglicano. (Ver, por exemplo, Fenstermacher et al., Ann N Y Acad Sci (1988) 531:29-39 e DiChiro et al., Neurology (1976) 26:1-8.) Juntamente com a natureza menos invasiva de entrega de IT-lombar, esta rota oferece meios clinicamente relevantes de proporcionar terapêutica biológica para o cérebro, particularmente em crianças.

EXEMPLO 3: FORMULAÇÕES DE ARILSULFATASE A PARA ADMINISTRAÇÃO IT

Este exemplo resume o trabalho para estabelecer uma forma de dosagem de líquidos de alta concentração de rHASA (arilsulfase A) e a formulação da substância da droga e produto de droga para tratamento de Leucodistrofia Metacromatica (MLD) através da rota de administração intratecal (IT).

Os dados de estabilidade demonstram que a formulação salina da substância medicinal e do produto de droga (sem PBS 20) é estável, após 18 meses em < -65 graus °C e 18 meses a 2 a 8 graus °C. Durante o desenvolvimento farmacêutico desta proteína, a solubilidade e estabilidade

de rhASA foi investigada em condições de excipiente devido a sua entrega prevista para o CNS e solução tampão limitado. Anteriormente, estudos de desenvolvimento de formulação foram conduzidos para desenvolver uma formulação intravenosa de (IV). Com base nos resultados desses experimentos, uma formulação contendo 30 mg/mL de rhASA em 10mM citrato-tampão fosfato, pH 5,5 com 137 mM NaCl e 0,15% poloxomero 188 foi selecionado como a formulação de chumbo IV. rhASA também foi formulado para entrega IT em três formulações e dados de estabilidade para esta proteína foi investigados sob essas condições. lotes de rhASA derivados de produto material acima em um local foram utilizados. Os resultados demonstraram que rhASA encontrava-se estável em 154 mM solução cloreto de sódio com 0,005% polissorbato 20 (P20), pH 6.0 pelo menos 18 meses a 2 a 8 °C. Além disso, estudos têm sido realizados para demonstrar a estabilidade na direção de congelamento-descongelamento e degradação induzida por agitação.

Lotes de desenvolvimento foram purificados, ultrafiltração e diafiltrados (UF/DF) em 10mM citrato/fosfato, 137 mM NaCl, com subsequente UF/DF em solução salina final em uma concentração de cerca de 40 mg/mL pH de 5,5. As operações de UF/DF estão resumidas na tabela 7.

TABELA 7: formulações selecionadas para operações UF/DF de derivados Xcellerex

Formulação	Tampão inicial e UF/DF em salina	Aditivo
A	10mM citrato/fosfato, 137mM NaCl, pH 5.5. Subsequente	0.005% polissorbato

	UF/DF em 154 mM NaCl. Final pH 5.9	20*
B	10mM citrato/fosfato, 137mM NaCl, pH 5.5. Subsequente UF/DF em 5mM fosfato de sódio, 145mM NaCl, pH 6.0. Final pH 6.0	0.005% polissorbato 20*
C	10mM citrato/fosfato, 137mM NaCl, pH 5.5. Subsequente UF/DF em 10mM citrato/ fosfato, 137mM NaCl, pH 7.0, e um segundo UF/DF em 154 mM NaCl. Final pH 6.5	0.005% polissorbato 20*

rhASA

rhASA formulado em 40 mg/mL rhASA em 10mM citrato, fosfato de sódio com 137 mM NaCl, a pH 5.6 foi dializado em cinco formulações que foram utilizadas para estudos de preformulação IT (tabela 8).

TABELA 8: Soluções tampão selecionadas para varredura de formulação IT compatível

Número de formulação	Espécies de tampão	H
1	154 mM NaCl *	5.9
2	154 mM NaCl **	7.0
3	5 mM tampão de fosfato com 145 mM NaCl	6.0
4	5 mM tampão de fosfato com 145 mM NaCl	7.0
5	1 mM tampão de fosfato com 2 mM CaCl ₂ e 137 mM NaCl	7.0

Métodos

Para determinação de temperatura (T_m) por

calorimetria de varredura diferencial (DSC), um microcalorímetro capilar DSC (MicroCal) foi usado em uma taxa de varredura de 60°C/hora e temperatura na faixa de 10 a 110°C. Linhas de base do tampão foram subtraídas das varreduras de proteína. Os exames foram normalizados para a concentração de proteína de cada amostra (medida por absorvância ultravioleta em 280 nm e usando um coeficiente de extinção de 0,69 (mg/mL)⁻¹. cm⁻¹). Para experimentos iniciais da estabilidade de curto prazo, substância medicinal de rhASA foi submetida a duas semanas a 40°C ou um mês a 40°C. Amostras adicionais foram colocadas na estabilidade de curto prazo a 2 a 8°C por 3 meses. Amostras foram filtradas (Millipore, P/N SLGV033RS) e alíquotas de 0,5 mL foram dispensadas em 2 mL com rolha de Flurotec de 13 mm.

O efeito de composição de formulação (tabela 8) na T_m (ponto médio de temperatura de desnaturação induzida termicamente) foi investigado usando o DSC. Os valores de T_m para composições de formulação diferentes são mostrados na Figura 5. Os valores do T_m exibiram temperaturas desdobramento semelhantes para a maioria das formulações, exceto baixos valores de T_m foram observados para rhASA formulada tanto com fosfato de sódio 5mM com 154 mM NaCl em pH 7.0 ou fosfato de sódio 1mM com 2 mM CaCl₂ e 137 mM NaCl com pH 7.0.

Também foi investigado o efeito da degradação térmica induzida de rhASA em cinco formulações selecionadas (tabela 8). Amostras foram armazenadas por 2 semanas ou um mês a 40°C ou 3 meses a 2 a 8°C. Análise de SDS-PAGE (Coomassie) de amostras armazenadas durante 2 semanas a 40°C detectou

fragmentação de rhASA formulado em fosfato de sódio 5mM com 154 mM NaCl em pH 7.0, bem como em fosfato de sódio 1mM com 2 mM CaCl₂ e 137 mM NaCl a pH 7.0 (Figura 6). Nenhuma degradação de tal foi observada para as outras formulações.

5 A presença de produtos de degradação é consistente com o pico principal percentual inferior, observado por RP-HPLC para os mesmos pontos de tempo (tabela 10). Observou-se também que rhASA formulado em 1mM PBS com 2 mM CaCl₂ em pH 7.0 não mantém seu pH no início e após a exposição de curto
10 prazo às condições de estresse térmico.

Sistemas de HPLC de águas foram usados para análises HPLC de exclusão de tamanho e de fase reversa. Para análise inicial do SEC-HPLC, 50 µg de rhASA foi injetado em uma coluna de Agilent Zorbax GF-250 (4,6 mm x 250 mm) e
15 executar isocraticamente a 0,24 mL/min usando uma fase móvel de pH 5.5 de citrato de sódio de 100 mM (detecção de octômero) com um comprimento de onda de detecção de 280 nm. As análises foram repetidas com condições de fase móvel de citrato de sódio de 100 mM, pH 7,0 (detecção do dímero).

20 Todos os estudos de troca e de concentração de reserva foram realizados usando Centricon - Plus 20 (Millipore, kDa 10 MWCO).

Estudos de triagem de preformulação - efeito de espécies de tampão e pH

25 Devido ao número limitado de composições de solução aprovada utilizadas para administração no CNS, apenas cinco composições de solução isotônicas, conforme listado na tabela 8, foram selecionadas para a varredura.

Memória do pH

30 Antes da seleção de soluções tampão para estabilidade

de longo prazo, dois experimentos de "memórias de pH" foram realizados para investigar se a proteína solução tampão-trocada em solução salina foi capaz de manter o pH da reserva original. Na experiência inicial, rhASA em
5 aproximadamente 8 mg/mL, foi primeiro dializada em citrato-fosfato de 10mM com 137 mM NaCl, em um valor de pH de 5,5 ou 7,0, seguido por uma segunda diálise em solução salina. No segundo experimento, o rhASA foi dializada em citrato-fosfato de 10mM com 137 mM NaCl, ou valores de pH de 5,5 ou
10 7,0 e, posteriormente, trocadas de solução tampão e concentrados em soluções salinas, a cerca de 35 mg/mL.

Quando rhASA formulado em citrato-fosfato de 10mM com 137 mM NaCl em ambos valores de pH de 5,5 ou 7,0 foi dializada em solução salina, sem aumento de turbidez
15 observado. O pH da solução salina final foi semelhante ao pH do anterior do tampão citrato-fosfato ao qual foi exposto. Quando rhASA formulado em citrato-fosfato baseado em soluções tampão em valores de pH de 5,5 ou pH 7.0 foi dializada em soro fisiológico e concentrou-se então em
20 aproximadamente 35 mg/mL, usando um Centricon, o pH das soluções salinas de proteína mudaram a partir de pH 5,5 a 5,8 ou pH 7,0 a 6,8, respectivamente. Ambas as soluções em solução salina concentrada rhASA foram ligeiramente opalescentes e tinham valores OD320 na faixa de 0,064 (pH
25 6,8) a 0,080 (pH 5,5).

Seleção de excipiente

Polissorbato 20 (P20) foi incluído em todas as cinco composições de solução selecionada em uma concentração final de 0,005%. A escolha do surfactante foi feita com
30 base na experiência prévia da tolerabilidade *in vivo* de P20

em 0,005% para entrega no CNS de outras proteínas de Shire. Foi preparada uma solução de 5% P20 (v/v) e o volume apropriado foi adicionado para cada formulação de proteína para obter uma concentração final de 0,005%.

5 Estudos de robustez da formulação - estudo de estabilidade

Com base nos resultados iniciais obtidos da triagem de soluções tampão e valores de pH diferentes, três composições de solução foram selecionadas para estudos de estabilidade de longo prazo (preparação de amostra como na tabela 8. Um estudo de um ano, iniciou-se em formulações propostas (tabela 9). As amostras de estabilidade em cada ponto de tempo foram analisadas por HPLC-SEC, RP-HPLC, OD320, concentração de proteína, pH, atividade específica, 10 SDS-PAGE (Coomassie) e aparência.

15 TABELA 9 - formulações para estudos de estabilidade de longo prazo

Formulação	Composição de formulação com 0.005% Polissorbato 20	Condições de estudo
A	154 mM NaCl, pH 5.9	5°C, 25°C,
B	5mM fosfato de sódio, 145mM NaCl, pH 6.0	40°C e linha base
C	154 mM NaCl, pH 6.5	congelada em ≤ -65°C

TABELA 10: ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES SELECIONADAS APÓS 2 SEMANAS A 40±2°C

Formulação	Aparência	Conc. de Proteína (mg/mL)	OD320	SEC-HPLC (% pico principal) em pH 5.5	SEC-HPLC (% pico principal) em pH 7.0	RP-HPLC (% pico principal)	pH	Atividade específica (U/mg)
Salina , pH 5.9								
Linha base	Claro a levemente opalescente	29.9	0.044	>99.9	99.7	99.8	5.6	74
Estressada	Claro a levemente opalescente	31.1	0.062	99.8	99.6	99.9	5.7	88
Salina , pH 7.0								
Linha base	Claro a levemente opalescente	29.0	0.038	>99.9	99.6	>99.9	6.7	83
Estressada	Claro a	32.1	0.041	99.1	99.7	97.0	6.5	66

	levemente opalescente										
5 mM PBS, pH 6.0											
Linha base	Claro a levemente opalescente	29.8	0.058	>99.9	99.7	99.9	5.9	102			
Estressada	Claro a levemente opalescente	30.5	0.076	98.8	99.7	99.7	5.9	95			
5 mM PBS, pH 7.0											
Linha base	Claro a levemente opalescente	29.7	0.035	>99.9	99.7	>99.7	6.9	86			
Estressada	Levemente opalescente a opalescente	30.5	0.041	95.4	99.4	98.0	6.8	94			
1 mM PBS, pH 7.0 com 2 mM CaCl ₂ , pH 7.0											

Linha base	Claro a levemente opalescente	27.5	0.040	>99. 9	99.7	>99.9	5.6	90
Estressada	Levemente opalescente a opalescente	27.7	0.042	94.8	99.8	99.0	6.6	93

Nenhuma alteração significativa na atividade específica foi observada nas amostras de estresse (Tabela 10). Análise por exclusão de tamanho HPLC detectado alguma degradação para a amostra termicamente etressada da semana 5 2 formulada em fosfato de sódio 5mm com 154 mM NaCl com pH 7.0. A degradação foi mais evidente pela SEC-HPLC utilizando uma condição de fase móvel de pH 5.5 que induz a associação de rhASA para um octamero. Sob essas condições de fase móvel, rhASA, formulado em pH 7.0 em 1mM PBS com 2 10 mM CaCl₂ também exibiu significativa degradação.

Após exposição por 1 mês a 40°C, amostras formuladas em PBS de 5 mM, pH 7,0 e 1mM PBS, pH 7.0 com 2 mM CaCl₂ demonstraram fragmentação por SDS-PAGE (dados não mostrados). Consistente com essa observação, uma redução no 15 principal pico percentual também foi observada por RP-HPLC e SEC-HPLC para as amostras armazenadas nestes duas formulações de pH 7 (tabela 11). Em atividade específica, no entanto, foi observada uma diminuição apenas para rhASA formulado em 5mm PBS, pH 7.0.

TABELA 11: Estabilidade de formulações de IT selecionadas depois de 1 mês a 40±2°C

Formulação	Aparência	Conc. de Proteína (mg/mL)	OD320	SEC-HPLC (% pico principal) em pH 5.5	SEC-HPLC (% pico principal) em pH 7.0	RP-HPLC (% pico principal)	pH	Atividade específica (U/mg)
Salina , pH 5.9								
Linha base	Claro a levemente opalescente	29.9	0.044	>99.9	99.7	99.8	5.6	74
Estressada	Claro a levemente opalescente	28.3	0.061	>99.9	99.5	99.9	5.7	107
Salina , pH 7.0								
Linha base	Claro a levemente opalescente	29.0	0.038	>99.9	99.6	>99.9	6.7	83
Estressada	Claro a levemente	25.7	0.189	95.7	99.8	99.5	6.6	100

	opalescente								
5 mM PBS, pH 6.0									
Linha base	Claro a levemente opalescente	29.8	0.058	>99.9	99.7	99.9	5.9	102	
Estressada	Claro a levemente opalescente	28.0	0.059	>99.9	99.6	99.9	6.0	94	
5 mM PBS, pH 7.0									
Linha base	Claro a levemente opalescente	29.7	0.035	>99.9	99.7	>99.9	6.9	86	
Estressada	levemente opalescente a opalescente	27.3	0.142	91.8	89.6	97.1	6.9	48	
1 mM PBS, pH 7.0 com 2 mM CaCl ₂									
Linha base	Claro a	27.5	0.040	>99.9	99.7	>99.9	5.6	90	

	levemente opalescente								
Estressada	levemente opalescente ^a	28.3	0.053	90.6	88.7	97.9	6.7	133	

Armazenamento de meses

Depois de 3 meses de armazenamento a 2 a 8°C, rhASA manteve a sua atividade em todas as formulações (Tabela 12). Além disso, o rhASA manteve >99.8% de sua área de pico principal, avaliadas por HPLC-SEC em ambas condições de fase móvel. Os dados de estabilidade por 3 meses a

5 2 a 8 ° C são resumidos na tabela 12.

TABELA 12: ESTABILIDADE DO SOLUÇÕES TAMPÃO IT SELECIONADAS APÓS 3 MESES A 2-8°C

Formulação	Aparência	Conc. de Proteína (mg /mL)	OD320	SEC-HPLC (% pico principal) em pH 5.5	SEC-HPLC (% pico principal) em pH 7.0	RP-HPLC (% pico principal)	pH	Atividade específica (U/mg)
Salina , pH 5.9								
Linha base	Claro a levemente opalescente	29.9	0.044	>99.9	99.7	99.8	5.6	74
Estressada	Claro a levemente opalescente	29.4	0.056	99.8	>99.9	99.9	5.6	97
Salina , pH 7.0								
Linha base	Claro a levemente opalescente	29.0	0.038	>99.9	99.6	>99.9	6.7	83
Estressada	Claro a levemente	25.5	0.040	99.8	>99.9	>99.9	6.6	127

	opalescente									
5 mM PBS, pH 6.0										
Linha base	Claro a levemente opalescente	29.8	0.058	>99.9	99.7	99.9	5.9	102		
Estressada	Claro a levemente opalescente	29.9	0.045	99.8	>99.9	>99.9	5.9	109		
5 mM PBS, pH 7.0										
Linha base	Claro a levemente opalescente	29.7	0.035	>99.9	99.7	>99.9	6.9	86		
Estressada	Claro a levemente opalescente	29.0	0.038	99.8	>99.9	>99.9	6.9	110		
1 mM PBS, pH 7.0 com 2 mM CaCl ₂										
Linha base	Claro a levemente	27.5	0.040	>99.9	99.7	>99.9	5.6	90		

	opalescente									
Estressada	Claro a levemente opalescente	28.0	0.042	99.8	99.9	>99.9	6.6	105		

RhASA formulado em solução salina, pH 7,0 e 1 mM PBS, pH 7.0, com 2 mM CaCl₂ também foram avaliados após armazenamento de 3 meses na condição acelerada de 25°C. Como mostrado na Figura 7, rhASA sofre uma ligeira
5 quantidade de fragmentação nestas formulações (com intensidade aproximadamente do pico de impureza de 0,5% BSA).

Coletivamente, os estudos de preformulação demonstraram que a estabilidade do rhASA é mantida em
10 valores de pH na faixa de 5,5 a 6,0. Em todos os estudos usando soluções de formulação com pH 7.0, rhASA demonstrado fragmentação como uma de suas vias de degradação. Os resultados de estresse térmico obtidos para os candidatos de formulação IT em pH 7.0 foram semelhantes para os
15 resultados de stress térmico obtidos para as formulações de IV (citrato de sódio-fosfato 10mM com 137 mM NaCl) a pH 7,0, onde se observou, também, a fragmentação. Com base nestes estudos, três formulações seguintes, como na tabela 9, foram selecionadas para estudos de estabilidade de longo
20 prazo.

Estudos de congelamento e descongelamento

Estudos de congelamento e descongelamento foram conduzidos através da realização de três ciclos de gelo-degelo controlado, da temperatura ambiente a -50°C e
25 0,1°C/min nas prateleiras de um liofilizador Vertis Genesis 35EL. Alíquotas de 1 mL de substância medicinal, formulada em 30 mg/mL em cada uma das composições cinco solução (tabela 8) foram dispensadas em frascos de vidro de 3 mL para este estudo.

30 Substância de droga (38± 4 mg/mL) foi usada em todos

os estudos de congelamento e descongelamento. Para experimentos de congelamento e descongelamento de taxa de pequena escala controlada, alíquotas de 2 mL de substância medicinal foram dispensadas em frascos de vidro de 5 mL com 5 rolha de Flurotec de 20 mm. Nas prateleiras de um liofilizador Vertis Genesis 35EL ou nas prateleiras de um congelador de taxa controlada, foram conduzidos experimentos de estresse de congelamento-descongelamento (Tenney Jr Upright Test Chamber, Model: TUJR-A-VERV). Três 10 ciclos de congelamento até -50°C e degelo a 25°C , foram realizados no congelamento e taxa de degelo de $0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (usando um congelador de taxa controlada) ou uma taxa de congelamento da taxa de $0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e degelo de $0,03^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (usando lyophilizer). Para estudos de congelamento e 15 descongelamento a granel, 90 mL de substância medicinal foi dispensada em garrafas de policarbonato de 250 mL. Para estudos de congelamento-descongelamento em gelo seco, 3 mL de substância medicinal foi dispensada em frascos de policarbonato (Biotainer P/N 3500-05) de 5 mL com e sem 20 tampas de polipropileno. As amostras foram congeladas durante a noite a $< -65^{\circ}\text{C}$ e, em seguida, colocadas em gelo seco num balde fechado. Para estas experiências, frascos de vidro com rolha, contendo o mesmo volume de amostra foram utilizados como um controle do estudo. Para estudos de 25 congelamento e descongelamento da substância droga diluída, alíquotas de 1 mL de 1 e 5 mg/mL foram dispensadas em tubos de polipropileno de 2 mL e foram congeladas em $< -65^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, as amostras congeladas foram descongeladas na parte superior da bancada. O ciclo foi repetido até 10 30 vezes para imitar qualquer stress potencial que pode

ocorrer com a manipulação das alíquotas de padrão de referência.

O efeito de congelamento-descongelamento na qualidade de rhASA nas formulações propostas com % 0,005 P20 foi determinado após 3 ciclos de taxa controlada de congelamento e descongelamento (0.1°C/min). Não observou-se nenhuma mudança na aparência da rhASA e agregados solúveis ou degradantes não foram identificados usando métodos SEC ou RP-HPLC. Além disso, nenhuma fragmentação ou bandas de agregação foram observadas na análise reduzida de SDS-PAGE (dados não mostrados). Tabela 13 resume os resultados desses estudos.

TABELA 13: efeito de congelamento-descongelamento de pequena escala na qualidade da substancia de droga de rhASA

Formulação	Aparência	Conc. de Proteína (mg/mL)	SEC-HPLC (% pico principal) em pH 5.5	SEC-HPLC (% pico principal) em pH 7.0	RP-HPLC (% pico principal)	pH	Atividade específica (U/mg)
Salina , pH 5.9							
Linha base	Claro a levemente opalescente	29.9	NT*	NT	NT	5.6	102
Estressada	Claro a levemente opalescente	29.4	>99.9	99.6	99.4	5.5	86
Salina , pH 7.0							
Linha base	Claro a levemente opalescente	29.0	NT	NT	NT	6.7	94

Estressada	Claro a levemente opalescente	25.0	>99.9	99.6	99.2	6.6	96
5 mM PBS, pH 6.0							
Linha base	Claro a levemente opalescente	29.8	NT	NT	NT	5.9	92
Estressada	Claro a levemente opalescente	31.1	>99.9	99.7	99.5	5.9	95
5 mM PBS, pH 7.0							
Linha base	Claro a levemente opalescente	29.7	NT	NT	NT	6.9	99
Estressada	Claro a levemente opalescente	29.9	>99.9	99.6	99.0	6.9	112
1 mM PBS, pH 7.0 com 2 mM CaCl ₂							

Linha base	Claro a levemente opalescente	27.5	NT	NT	NT	5.6	90
Estressada	Claro a levemente opalescente	27.3	>99.9	99.6	99.3	6.7	103

*não testado

Os resultados dos estudos de taxa de congelamento e descongelamento de pequena escala controlada realizados em triplicado com alíquotas de 2 mL de substância medicinal estão sumarizadas na tabela 14. Não observou-se nenhuma alteração na qualidade da substância droga. A aparência da substância droga congelada e descongelada foi comparável ao aparecimento da amostra da linha de base. Não observou-se nenhuma redução na concentração da proteína ou a pureza do material.

10 TABELA 14: EFEITO DE CONGELAMENTO-DESCONGELAMENTO DE PEQUENA ESCALA SOBRE A QUALIDADE DA SUBSTÂNCIA DE DROGA DE RHASA

Taxa de congelamento/ descongelamento	Linha base	0.1 °C/min Congelamento-0.1 °C/min Descongelamento	0.1 °C/min Congelamento-0.03 °C/min DescongelamentoUsando liofilizador
		Usando congelador de taxa controlada	
Aparência	levemente opalescente a opalescente	levemente opalescente a opalescente	levemente opalescente a opalescente
Conc. de Proteína (mg/mL)	42	37	36
Densidade ótica em 320 nm	0.044	0.045	0.043
SEC-HPLC (% pico principal)	99.6%	99.7%	99.7%

RP-HPLC (% pico principal)	>99.9%	>99.9%	>99.9%
pH	5.9	5.9	5.9
Atividade específica (U/mg)	65	69	71

Todos os experimentos demonstraram que rhASA mantém seus atributos de qualidade após congelamento e descongelamento. Nota-se que uma pequena tendência decrescente foi observada na atividade e o pico principal de fase reversa percentual para amostras de 1 mg/rnL rhASA após dez ciclos de congelamento e descongelamento, conforme mostrado na tabela 15.

TABELA 15: EFEITO DE CONGELAMENTO-DESCONGELAMENTO DE PEQUENA ESCALA SUBSTÂNCIA DE DROGA DE RHASA DILUÍDA A 1 MG/ML

Amostra	Linha base	1 F/T ciclo	3 F/T ciclos	5 F/T ciclos	10 F/T ciclos
Conc. de Proteína (mg/mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Densidade ótica em 320 nm	0.013	0.005	0.010	0.006	0.017
SEC-HPLC (% pico principal)	99.5%	99.5%	99.5%	99.5%	99.6%
RP-HPLC (% pico principal)	99.2%	99.2%	99.1%	99.0%	98.9%
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
Atividade específica (U/mg)	78	76	75	69	65

Estudos de agitação

Alíquotas de 1,0 mL de proteína filtrada estéril, formulada em 30 mg/mL em cada uma das cinco composições de solução selecionada (tabela 8) com P20 foram dispensadas em 5 frascos de vidro de 3 mL com rolha de Flurotec de 13 mm. Frascos foram colocados ao seu lado em um agitador Labline Orbital Shaker e agitados por 24 horas a 100 rpm. A configuração, em seguida, foi aumentada para 200 rpm para as próximas 24 horas do período de agitação.

10 A fim de avaliar a suscetibilidade de rhASA para agitação, tremores e agitação estudos foram realizados para a substância medicinal e produto da droga em concentrações de 35,4 e 30 mg/mL, respectivamente. Para estes estudos, alíquotas de 1,0 mL de substância medicinal foram 15 dispensadas em frascos de vidro de 3 mL com rolha de Flurotec de 13 mm. Os frascos agitados foram inspecionados todas as outras horas para as primeiras 8 horas e posteriormente em 24 e 48 horas. Os frascos foram removidos ao primeiro sinal de turvação e analisados. A aparência das 20 amostras foi documentada e as amostras foram processadas usando pH, SEC-HPLC, atividade específica e OD320. Estudos de agitação de produto de droga foram conduzidos em triplicado (em 154 mM NaCl, pH 6.0 com 0,005% P20) e comparado com uma replicação de substância medicinal (em 25 154 mM NaCl, pH 6.0). Estudos de agitação também foram repetidos sem inclusão de P20 em formulação de solução salina. Para estes estudos, alíquotas de 1 mL ou 3 mL do produto de droga a 30 mg/mL foram dispensadas em frascos de 3 mL para investigar o efeito de agitação, bem como o 30 volume de espaço vazio na qualidade de rhASA. Para estes

estudos de agitação, utilizou-se uma velocidade de 220 rpm.

Iniciais estudos de agitação de rhASA para estudos de desenvolvimento de formulação IV realizados demonstraram a vantagem potencial da presença de um surfactante. Para desenvolvimento de formulações IT, 0,005% P20 foi selecionado e incluído em formulações para os estudos de agitação. Depois de 15-24 horas de agitação a 100 rpm, sem mudanças visuais foram observadas para qualquer das formulações e a velocidade de agita foi aumentada para 200 rpm. Nenhuma mudança na aparência das amostras abaladas em formulações candidato proposto observou-se depois de um total de 48 horas de agitação em 100 e 200 rpm. As amostras foram analisadas após este período e os resultados estão sumarizados na tabela 16. Sem alterações foram observadas por nenhum dos ensaios. SDS-PAGE Coomassie também não apresentou bandas de alto ou baixo peso molecular adicional para as amostras abaladas (dados não mostrados).

TABELA 16: RESULTADOS DE ESTUDOS DE AGITAÇÃO DE FORMULAÇÕES SELECIONADAS

Formulação	Aparência	Conc. de Proteína (mg /mL)	OD320	SEC-HPLC (% pico principal) em pH 5.5*	RP-HPLC (% pico principal)	Atividade específica (U/mg)
Salina , pH 5.9						
Linha base	Claro a levemente opalescente	29.9	0.044	NT**	NT	111
Estressada	Claro a levemente opalescente	28.5	0.041	>99.9	99.9	111
Salina , pH 7.0						
Linha base	Claro a levemente opalescente	29.0	0.038	NT	NT	115
Estressada	Claro a levemente	24.7	0.032	>99.9	>99.9	110

	opalescente						
5 mM PBS, pH 6.0							
Linha base	Claro a levemente opalescente	29.8	0.058	NT	NT	103	
Estressada	Claro a levemente opalescente	30.4	0.047	>99.9	99.9	116	
5 mM PBS, pH 7.0							
Estressada	Claro a levemente opalescente	29.7	0.035	NT	NT	92	
Linha base	Claro a levemente opalescente	26.5	0.029	>99.9	99.9	110	
1 mM PBS, pH 7.0 com 2 mM CaCl ₂							
Linha base	Claro a levemente	27.5	0.040	NT	NT	147	

	opalescente					
Estressada	Claro a levemente opalescente	27.0	0.038	>99.9	99.9	107

* Devido a problemas de coluna o perfil SEC de forma dimérica, na fase móvel de pH

7.0, não foi obtido.

** Não testado

Nenhuma mudança na aparência da substância medicinal (em 154 mM NaCl em pH 6.0) ou produto de droga (em 154 mM NaCl, pH 6.0, com 0,005% P20) foi observada nas primeiras 4 horas de agitação. Após 6 horas de agitação, substância medicinal e produto da droga tornaram-se um pouco turvos (dados não mostrados). A turvidez foi mais pronunciada após 48 horas de agitação quando nenhum P20 esteve presente na formulação. Além disso, substância da droga e produto da droga exposta à agitação tornou-se turva após 24 horas. Figura 8 demonstra as observações de agitação após 48 horas.

Tabela 17 e tabela 18 resumem as observações de estudo de agitação.

TABELA 17: APARÊNCIA DE SUBSTÂNCIA DE DROGA RHASA E PRODUTO DE DROGA (COM P20), APÓS AGITAÇÃO

Horas	Substância da droga agitada	Produto de droga agitado
Linha base	Incolor, opalescente, livre de partículas	Incolor, opalescente, livre de partículas
2	Sem mudanças	Sem mudanças
4	Sem mudanças	Sem mudanças
6	1-2 flocos, levemente turvo	Material fibroso, levemente turvo
8	1-2 flocos, levemente turvo	Material fibroso, levemente turvo
24	1-2 flocos, muito turvo	Material fibroso, turvo
48	1-2 flocos, muito turvo	Material fibroso, muito turvo

TABELA 18: APARÊNCIA DE SUBSTÂNCIA DE DROGA RHASA E PRODUTO DE DROGA (COM P20), APÓS AGITAÇÃO

Horas	Substância de droga agitada	Produto de droga agitada
Linha base	Incolor, opalescente, livre de partículas	Incolor, opalescente, livre de partículas
2	Nenhuma mudança	Nenhuma mudança
4	Nenhuma mudança	Nenhuma mudança
6	Nenhuma mudança	Nenhuma mudança
8	Nenhuma mudança	Nenhuma mudança
24	1-2 flocos	1-2 fibras
48	Material fibroso	1-2 fibras

As amostras agitadas também foram analisadas por OD320, pH, atividade específica, RP-HPLC e SEC-HPLC. Os resultados são apresentados na tabela 19 e 20 da tabela. Em geral, nenhuma mudança significativa foi observada na qualidade de rhASA após agitação e mistura, com exceção da aparência.

TABELA 19: EFEITO DE 48 HORAS DE AGITAÇÃO NA SUBSTÂNCIA DA DROGA E PRODUTO DA DROGA

Taxa de congelamento/descongelamento	Linha base	Substância de droga agitada por 48 hrs (n=1)	Produto de droga agitada por 48 hrs (n=3)
Densidade ótica em 320 nm	0.080	0.053	0.048
SEC-HPLC (% pico principal)	99.7%	99.7%	99.7%
RP-HPLC (% pico principal)	>99.9%	>99.9%	>99.9%

pH	6.0	6.0	5.9
Atividade específica (U/mg)	96	71	72

Com agitação do produto da droga após 6 horas, com 0,005% P20, uma das três replicas se tornou turva. Esta amostra foi removida e as outras duas amostras foram agitadas por 48 horas. Tabela 20 demonstra os dados em 5 média, para amostras duplicadas.

TABELA 20: EFEITO DE 48 HORAS DE AGITAÇÃO NA SUBSTÂNCIA DA DROGA E PRODUTO DA DROGA

Taxa de congelamento/ descongelamento	Linha base	Substância da droga agitada por 6 hrs (n=1)	Produto de droga agitada por 48 hrs (n=2)
Densidade ótica em 320 nm	0.080	0.244	0.103
SEC-HPLC (% pico principal)	99.7%	99.7%	99.7%
RP-HPLC (% pico principal)	>99.9%	>99.9%	>99.9%
pH	6.0	6.0	6.0
Atividade específica (U/mg)	69	73	73

Com base nos resultados e as observações visuais, produto de droga e substância de droga não são facilmente 10 suscetíveis à degradação induzida por agitação já que demorou ~ 4 horas de agitação contínua (ajustado em número 5) e 8 horas de agitação vigorosa contínua (a 220 rpm) para ocorrer uma mudança na aparência.

Os estudos de agitação foram repetidos com produto de

droga na ausência de P20. Para esses estudos, cada frasco foi preenchido com 1 mL ou 3 mL do produto de droga, a fim de investigar o efeito de agitação, bem como o volume de espaço livre na qualidade de rHASA. Para 1 mL preenchido em 5 frascos de 3 mL nenhuma mudança na aparência do produto de droga foi observada através de 8 horas de agitação em 220 rpm (n=2, dados não mostrados). Frascos com nenhum espaço vazio (n=1) demonstraram formação de pequenos flocos, algumas fibras e de matéria fioculenta em um ritmo mais 10 rápido quando comparado com os frascos com um maior espaço vazio. As observações de 48 horas são apresentadas na Figura 9.

Os resultados visuais também estão resumidos na tabela 21 e tabela 22.

15 TABELA 21: APARÊNCIA DO PRODUTO DE DROGA NA AUSÊNCIA DE POLISSORBATO 20 APÓS 48 HORAS DE AGITAÇÃO COM PREENCHIMENTO DE 1ML NO FRASCO DE 3 ML

Horas	Produto de droga agitada MLD-200L-001 sem P20	Produto de droga agitada MLD-200L-003 sem P20	Controle_Produto de droga agitada MLD-200L-001 com P20
Linha base	Incolor, levemente opalescente, essencialmente livre de partículas		
2	Sem mudanças	Sem mudanças	Sem mudanças
4	Sem mudanças	Sem mudanças	Sem mudanças
6	Sem mudanças	Sem mudanças	Sem mudanças
8	Sem mudanças	Sem mudanças	Sem mudanças
24	Floculento	Floculência significativa	Sem mudanças
48	Floculento	Floculência	Sem mudanças

8	significante	mudanças
---	--------------	----------

TABELA 22: APARÊNCIA DO PRODUTO DE DROGA NA AUSÊNCIA DE POLISSORBATO 20 APÓS 48 HORAS DE AGITAÇÃO COM PREENCHIMENTO DE 3ML NO FRASCO DE 3 ML

Horas	Produto de droga agitada MLD-200L-001 sem P20	Controle_Produto de droga agitada MLD-200L-001 com P20
Linha base	Incolor, levemente opalescente, essencialmente livre de partículas	
2	Sem mudanças	Sem mudanças
4	Flocos pequenos, poucas fibras e flocculento	Sem mudanças
6	Flocos pequenos, poucas fibras e flocculento	Sem mudanças
8	Flocos pequenos, poucas fibras e flocculento	Sem mudanças
24	Flocos pequenos, poucas fibras e flocculento	Sem mudanças
48	Flocos pequenos, poucas fibras e flocculento	Sem mudanças

Não foi observada alteração da concentração de proteína. Além disso, nenhum agregado solúveis foi detectado usando SEC-HPLC para volumes de preenchimento de 3 mL ou 1 mL (tabela 23 e tabela 24). Ensaio de SDS-PAGE reduzido (Coomassie) não detectou quaisquer bandas de alto ou baixo peso molecular (dados não mostrados).

10 TABELA 23: RESULTADOS DE 48 HORAS DE AGITAÇÃO NO PRODUTO DE DROGA NA AUSÊNCIA DE POLISSORBATO 20 COM 1 ML PREENCHIDO NO FRASCO DE 3 ML

Ensaio	Linha base	Produto de droga agitada depois de 24 horass (n=2) sem P20	Produto de droga agitada depois de 48 hrs (n=2) sem P20	Controle (n=1) com P20
Concentração (mg/mL)	32.3	32.9	33.8	31.8
Densidade ótica em 320 nm	0.164	0.160	0.163	0.169
SEC-HPLC (% pico principal)	99.5	99.5	99.5	99.6
pH	6.1	6.1	6.0	6.0
Atividade específica (U/mg)	64	63	62	72

TABELA 24: RESULTADOS DE 48 HORAS DE AGITAÇÃO EM PRODUTO DE DROGA NA AUSÊNCIA DE POLISSORBATO 20 COM 3 ML PREENCHIDOS NO FRASCO DE 3 ML

Ensaio	Linha base	Produto de droga agitada depois de 4 hrs (n=1) sem P20	Produto de droga agitada depois de 48 hrs (n=1) sem P20	Controle (n=1) com P20
Concentração (mg/mL)	0.02	34.4	32.1	32.6
Densidade ótica em 320 nm	0.152	0.163	0.166	0.151
SEC-HPLC (% pico principal)	99.6	99.6	99.6	99.6

pH	6.0	6.0	5.9	6.0
Atividade específica (U/mg)	70	64	65	71

Estudos de capacidade de armazenamento em solução tampão

Para a determinação da capacidade de armazenamento em solução tampão de rhASA, o produto foi titulado em 5 triplicado, com qualquer base diluída ou ácido diluído. Aliquotas de 10 mL de substância medicinal em 38 ou 30 mg/mL (o último produto a imitar droga) foram colocadas em um frasco de vidro de 20 mL ao qual foi adicionado uma micro barra de agitação. Aliquotas de 1 µL de ácido 10 clorídrico (HCl) foram adicionados à solução da proteína, o conteúdo misturado, e registrou-se o pH. O experimento continuou com a adição de picos de 1 µL HCl, sem enxaguar a sonda de pH entre as medidas para evitar qualquer diluição, até que conseguiu-se um pH aproximado de 5,5. O experimento 15 foi feito em triplicado e tampão de fosfato 5mM contendo cloreto de sódio de 150 mM, pH 6.0, foi titulado lado-a-lado para comparação. Da mesma forma, substância medicinal de ambas concentrações foi titulada com 1 M de hidróxido de sódio (NaOH) até que conseguiu-se um pH final de 20 aproximadamente 6,5. A fim de investigar a presença de qualquer fosfato residual em rhASA, substância medicinal foi analisada pelo acoplamento indutivo (ICP-MS), espectroscopia de massa plasma. A capacidade de substância tampão medicinal de rhASA diluída também foi investigada 25 para garantir que o valor de pH da solução não alterou após diluição da solução de proteínas. Amostras diluídas, que variam de 30 mg/mL a 1 mg/mL foram preparadas em tubos de

ependorf 1,5 mL e os valores de pH foram medidos no início de diluição e após uma semana de armazenamento 2-8°C.

Os resultados da titulação de base diluída e ácido diluído estuda capacidade demonstrada em tampão adequado de 5 soluções rHASA. Para estudos de titulação usando HCl, inicialmente a adição de aproximadamente 2 µl de 1M ácido não alterou o pH da substância medicinal ou solução tampão de controle. Aumento dos volumes de ácido, no entanto, demonstrou uma queda dramática no pH da reserva em relação 10 à substância da droga de rHASA. Após a adição de 13 µL de 19M HCl, o pH do controle reserva estava mais de 2 unidades de pH abaixo do pH da substância medicinal. Uma concentração de substância droga de 30 mg/mL foi também incluída neste experimento para imitar a concentração do 15 produto de droga. A Figura 10 ilustra a capacidade da substância tampão de droga rHASA comparado com tampão de fosfato de sódio de 5 mM, pH 6.3 com cloreto de sódio de 150 mM quando titulado com ácido.

A titulação de substâncias de droga rHASA com 20 hidróxido de sódio demonstrou resultados relativamente diferentes (Figura 11) no que diz respeito a manter o pH. A taxa de variação de pH não diferiu substancialmente entre substância medicinal e o controle de solução tampão.

Com base nos resultados observados e sem querer ser 25 limitado por qualquer teoria, é provável que o rHASA contribua para a capacidade tampão da solução já que ácido aspártico, ácido glutâmico, e cadeias laterais de histidina tem a capacidade de agir como aceitadores e/ou doadores do proton para manter o pH da solução. A capacidade tampão 30 desta proteína também já foi observada durante os estudos

de preformulação quando foi descoberto o efeito de "memória de pH". A manutenção do pH foi demonstrada várias vezes, tanto em escala laboratorial e as operações de grande escala. Coletivamente, os resultados destes dois

5 experimentos sugerem que a capacidade de armazenamento em solução tampão de rhASA em solução salina é mais predominante na direção ácida. Segundo a literatura, a capacidade de armazenamento em solução tampão para os valores de pH mais baixos é uma indicação direta de um

10 número maior de resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico dentro de uma determinada proteína em relação aos resíduos de histidina. Ao mesmo tempo em que não desejam ser limitado por qualquer teoria, isso pode de fato ser o caso de arilsulfatase A onde há um total de 45 resíduos

15 glutâmicos como de ácido aspártico em comparação com 18 resíduos de histidina.

A capacidade de substância tampão medicinal pode ser imputável ao fosfato de limite residual que mostrou-se presente na substância medicinal usando ICP-MS. Tabela 25

20 demonstra a quantidade de fosfato residual presente em três diferentes lotes de substância de drogas LSDL. Esses dados também confirmam a consistência das etapas de ultrafiltração e diafiltração para o processo de escala-piloto.

25 TABELA 25: QUANTIDADE RESIDUAL DE FOSFATO EM SUBSTÂNCIA MEDICINAL PRODUZIDA EM LSDL

rhASA Lote N°	Concentração de Fosfato (ppm)
001	27
002	31

003	31
-----	----

A fim de entender melhor a capacidade de armazenamento em solução tampão desta proteína, o efeito de diluição no pH também foi investigada. Após a diluição da substância de droga rhASA com soro fisiológico para concentrações mais baixas de proteína, não observou-se nenhuma alteração nos valores de pH da substância medicinal. Posteriormente, as substâncias de droga diluída foram armazenadas a 2-8°C durante uma semana, após o qual foram registradas as medições de pH. Tabela 26 resume os dados. Os resultados demonstram que diluição e armazenamento a 2-8°C não têm efeito sobre os valores de pH da substância de droga diluída. Essas observações ainda apoiam a conclusão dos estudos de titulação de ácido e base, que demonstrou capacidade tampão adequada da substância de droga rhASA formulada em soro fisiológico.

TABELA 26: VALORES DE PH DA SUBSTÂNCIA DE DROGA RHASA DILUÍDA

Durante investigação de diluição de rhASA e pH, observou-se que a aparência de amostras diluídas demonstrou uma diminuição dependente de concentração em opalescência, ou seja, amostras rhASA com concentrações mais elevadas foram mais opalescentes em comparação com as amostras em concentrações inferiores que tinham uma aparência quase clara. A Figura 12 apresenta a aparência observada de rhASA diluído. 1 Mg/mL de solução de rhASA demonstrou uma aparência semelhante à água, enquanto a aparência de 30 mg/mL foi avaliada para ser entre suspensões de referência II e III ou III e IV.

Estudos de estabilidade

Para estudos de estabilidade, substância medicinal foi formulada em 38 ± 4 mg/mL em 154 mM NaCl, pH 6.0 e produto de droga foi formulada em 30 ± 3 mg/mL em 154 mM NaCl, pH 6.0 na presença e na ausência de 0.005% polissorbato 20. Alíquotas de 1 mL de substância medicinal foram dispensadas em garrafas de policarbonato de 5 mL com tampas de rosca polipropileno e armazenadas em $< -65^\circ\text{C}$, -15°C a -25°C e 2 a 8°C . Alíquotas de 1.0 a 1.1 mL do produto de droga foram dispensadas em frascos de vidro de 3 mL com rolhas de Flurotec de 13 mm e armazenadas a 2 a 8°C , $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $40 \pm 2^\circ\text{C}$. Frascos com produtos da droga foram armazenados na orientação vertical para estudos de estabilidade inicial e mudados para a orientação invertida para os último estudos usando produto de droga sem P20. Em cada ponto de tempo, estabilidade das amostras foi testada por SEC-HPLC, RP-HPLC, OD320, concentrações de proteína, pH, atividade específica, SDS-PAGE (Coomassie) e aparência. Mapa de peptídeo, mapa de glicano e formilglicina percentual foram realizados anualmente. Além disso, os últimos ensaios também foram realizados para as condições estressadoas e aceleradas.

Coletivamente, os resultados dos estudos de agitação, congelamento e descongelamento e preformulação sugerem que apenas três formulações foram adequadas para o desenvolvimento. Estudos de estabilidade de longo prazo foram iniciados nestas três formulações na presença de 0.005% P20. Tabela 27, Tabela 28 e Tabela 29 resumem os dados de estabilidade para três formulações de pontos de tempo selecionados.

TABELA 27: ESTABILIDADE A LONGO PRAZO EM 2 a 8°C PARA

RHASA EM 154 MM NAACL, PH 5,9

Teste	Linha base	3m	6m	11m
Aparência	Claro a levemente opalescente	Claro a levemente opalescente	Claro a levemente opalescente	Claro a levemente opalescente
Conc. de Proteína (mg/mL)	25.6	24.3	26.5	27.3
SEC-HPLC (% pico principal) em pH 5.5	>99.9	99.8	99.9	99.8
SEC-HPLC (% pico principal) em pH 7.0	99.1	99.0	99.4	99.7
RP-HPLC (% pico principal)	99.6	99.7	99.8	>99.9
pH	5.9	6.0	6.0	6.0
Atividade específica (U/mg)	95	79	90	87
SDS-Page (Coomassie)	Conformidade com padrão de referência com nenhuma banda nova com	Conformidade	Conformidade	Conformidade

	intensidade maior do que 1 % ensaio controle			
--	--	--	--	--

TABELA 28: ESTABILIDADE A LONGO PRAZO EM 2-8°C PARA RHASA EM 154 MM NA₂CO₃, PH 7.0

Teste	Linha base	3m	6m	11m
Aparência	Claro a levemente opalescente	Claro a levemente opalescente	Claro a levemente opalescente	Claro a levemente opalescente
Conc. de Proteína (mg/mL)	27.3	26.9	28.1	29.2
SEC-HPLC (% pico principal) em pH 5.5	99.9	97.5	99.8	>99.9
SEC-HPLC (% pico principal) em pH 7.0	99.4	99.0	99.2	99.8
RP-HPLC (% pico principal)	99.6	99.7	99.9	>99.9
pH	6.5	6.6	6.7	6.5
Atividade específica (U/mg)	112	88	98	86
SDS-Page (Coomassie)	Conformidade com padrão	Conformidade	Conformidade	Conformidade

	de referência com nenhuma banda nova com intensidade maior do que 1 % ensaio controle			
--	---	--	--	--

TABELA 29: ESTABILIDADE A LONGO PRAZO EM 2-8°C PARA
RHASA EM SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO 5MM COM 145 MM NAACL, PH 6.0

Teste	Linha base	3m	6m	11m
Aparência	Claro a levemente opalescente	Claro a levemente opalescente	Claro a levemente opalescente	Claro a levemente opalescente
Conc. de Proteína (mg/mL)	27.9	27.4	27.1	29.3
SEC-HPLC (% pico principal) em pH 5.5	99.9	97.8	99.8	99.9
SEC-HPLC (% pico principal) em pH 7.0	98.9	98.9	99.2	99.9
RP-HPLC (% pico principal)	99.7	99.6	99.8	>99.9
pH	5.9	6.0	6.0	5.9

Atividade específica (U/mg)	87	88	95	90
SDS-Page (Coomassie)	Conformidade com padrão de referência com nenhuma banda nova com intensidade maior do que 1 % ensaio controle	Conformidade	Conformidade	Conformidade

Estudos de estabilidade realizados até 11 meses em 2 a 8°C, sugeriram que a qualidade da rhASA é mantida em formulações de protótipo. Perfis de HPLC de exclusão de dimensão representativa da rhASA em solução salina, pH 5,9 são mostrados nas figuras 13 e 14. HPLC de exclusão de tamanho não detectou quaisquer alterações significativas no estado de associação de rhASA após armazenamento de 11 meses, 2 a 8°C.

Em geral, a qualidade do produto de droga em todas as formulações de três candidatos foi mantida após armazenamento de 11 meses entre 2 a 8°C

EXEMPLO 4 - TOXICOLOGIA

Este exemplo ilustra a repetição da dose intratecal (IT) de administração de rhASA de uma perspectiva da Farmacologia de toxicologia e segurança ao longo de um período de seis meses. O teste IT para este estudo foi

rhASA do artigo. 36 Macacos *Cynomolgus* machos e fêmeas foram aleatoriamente para cinco grupos de tratamento. Os animais do grupo 1 foram o controle de dispositivo de implante não tratados (porta & cateter) e não foram 5 tratados com o veículo ou teste artigo; no entanto, esses animais foram tratados com 0,6 mL de PBS em um esquema de correspondência com o esquema de administração de artigo de teste. Os animais nos grupos 2 a 5 receberam 0,6 mL de infusão de 0, 3, 10 ou 31 mg/mL de rhASA (dose total de 0, 10 1.8, 6.0 ou 18,6 mg) cada semana (ou seja, um total de 12 doses). Animais foram autopsiados em 6 meses (24 horas após a última dose IT), e os 4 animais restantes/sexo/grupo foram autopsiados no final de um período de 4 semanas de recuperação. Tecidos selecionados foram coletados, 15 guardados e examinados microscopicamente.

Em geral, as mudanças dos artigos de teste relacionados podem ser classificadas em dois tipos principais e estavam presentes em todos os níveis de dose (1.8, 6.0 e 18,6 mg/dose). Aumento de infiltrados (de 20 células brancas do sangue, geralmente com um componente eosinofílico proeminente) em meninges, no parênquima cerebral, no parênquima da medula espinhal, gânglio trigeminal e ocasionalmente nas raízes nervosas da coluna vertebral/gânglios (ou o epineuro que cercam as 25 estruturas). Sem querer ser vinculado por qualquer teoria, este aumento foi interpretado como devido à presença do artigo de teste (uma proteína) no espaço intratecal e nos tecidos do sistema nervoso. Ligeiro aumento focal de células microgliais na medula espinhal e do cérebro em 30 animais ocasionais (microgliosis não foi observada nos

animais em qualquer dose alta). Sem querer ser vinculado por qualquer teoria, ambas as categorias de alterações morfológicas foram interpretadas como uma resposta à presença do artigo de teste. Não houve evidência de necrose neuronal em qualquer animal. Nenhum artigo de teste relacionado com alterações estava relacionado com reações biologicamente adversas no cérebro, medula espinhal, raízes nervosas da coluna vertebral ou gânglios. Especificamente, não houve evidência de necrose neuronal ou uma resposta glia biologicamente importante. Não houve lesão relacionada com artigo de teste nos tecidos do sistema nervoso.

Após um período de um mês de recuperação (um período livre de dosagem), alterações relacionadas com o artigo de teste ou inteiramente resolvidas tinham ou limitavam-se aos remanescentes do aumento prévio na resposta inflamatória associada com a presença do artigo de teste. Não houveram efeitos morfológicos adversos nos animais em recuperação. Com base em um exame microscópico cego, atribuindo uma pontuação de coloração semi-quantitativa, coloração imunohistoquímica de arilsulfatase A (rhASA; o artigo de teste) foi aumentada no cérebro e medula espinhal em vários tipos de células, exceto os neurônios, para todos os grupos tratados com artigo de teste no sacrifício terminal. Este aumento também foi evidente nas células de Kupffer do fígado. Seguente ao período de um mês de recuperação, a coloração de rhASA nos animais tratados com artigo de teste (todos os grupos de dose) retornaram aos níveis de controle (controle de dispositivo e/ou veículo). Em um macho com recuperação de dose baixa, houve vários focos de astrocitose e perda neuronal, indicando várias áreas de

isquemia prévia, no córtex cerebral. Embora a patogênese exata dessas lesões neste animal não era aparente, a ausência de lesões semelhantes em quaisquer outros animais tratados com artigo de teste, incluindo os animais de alta dose que receberam 10 X a dose, indicado que essas lesões não foram relacionadas ao artigo de teste.

O artigo de teste para este estudo foi rhASA. 36 Macacos *Cynomolgus* do sexo feminino e masculino e trinta foram aleatoriamente para cinco grupos de tratamento. Os animais do grupo 1 foram o controle de dispositivo de implante não tratados (Porta & cateter) e não foram tratados com o veículo ou artigo de teste; no entanto, esses animais foram tratados com 0,6 mL de PBS em um esquema de correspondência com o esquema de administração de artigo de teste. Os animais nos grupos 2 a 5 receberam 0,6 mL de infusão de 0, 3, 10 ou 31 mg/mL de rhASA (dose total de 0, 1.8, 6.0 ou 18,6 mg) cada semana (ou seja, um total de 12 doses). Animais foram autopsiados em 6 meses (24 horas após a última dose IT), e os 4 animais restantes/sexo/grupo foram autopsiados no final de um período de 4 semanas de recuperação. Tecidos selecionados foram colhidos, salvos e examinados microscopicamente. A tabela abaixo reflete o desenho do estudo, que pertencia ao aspecto de patologia deste estudo.

No momento do sacrifício, o cérebro foi cortado em uma fatia coronal matriz de cérebro em cerca de 3 mm de espessura. A primeira fatia e a segunda fatia depois disso foram fixadas em formalina para análise histopatológica de avaliação e imuno-histoquímica. O cérebro foi processado por secções coronais completas. Estas seções incluíam, no

mínimo, as seguintes regiões do cérebro.

- Neocórtex (incluindo córtex frontal, parietal, temporal e occipital): seções do cérebro 1 a 8 (e corte 9 quando presentes)

5 • Paleocórtex (bulbos olfatórios e/ou lóbulo piriforme): seções do cérebro 1 a 3

- Gânglios basais (incluindo caudado e putâmen): seções do cérebro 3 e 4

10 • Sistema límbico (incluindo o hipocampo e cíngulos corticais): seções do cérebro 4 e 5

- Tálamo/hipotálamo e regiões mesencéfalo incluindo substantia nigra: seções do cérebro 4 e 5

- Cerebelo, ponte e medula oblonga: seções do cérebro 6 a 8 (e corte 9 quando presente).

15 As seções do cérebro estão listadas nas tabelas de dados, como seções de 1 a 8/9 (uma seção 9 foi fornecida pela facilidade de teste para alguns animais). Corte variou um pouco entre animais. As seções do cérebro (1 a 8/9) fornecidas acima foram a localização aproximada das várias

20 áreas anatômicas. As seções do cérebro são listadas nas tabelas de dados como seções individuais, com diagnósticos pertinentes para essa seção, para facilitar a avaliação de potenciais futuros slides adicionais (se houver). Durante a interpretação de dados, sites do cérebro anatômico

25 individual (como os listados acima) foram comparados a fim de identificar quaisquer efeitos de artigo de teste exclusivo (ou seja, únicos para uma região específica do cérebro). No TPS, todas as seções do cérebro de todos os animais foram incorporadas em parafina, seccionadas em 5

30 mícrons, tingidas com hematoxilina e eosina (H & E) e

examinadas microscopicamente. Além disso, cérebros do controle e animais de alta dose foram corados com Fluoro-Jade B (uma coloração aumentando a sensibilidade de avaliar a degeneração neuronal do cérebro) e coloração prata Bielschowsky (um procedimento que permite a visualização direta de axônios e dendritos, filamentos neuronais) e examinados.

A coluna vertebral (cervical, torácica e lombar) foi cortada em seções de um centímetro. A primeira fatia e cada outra fatia depois disso foram fixadas em formalina para análise de avaliação histopatológica e imuno-histoquímica. As seções de medula espinhal (cervical, torácica (incluindo a ponta do cateter) e lombar) de todos os animais foram seccionados em cerca de 5 microns, corados com H & E e examinados com seções transversais e oblíquas, tomadas a cada nível. Seções medulares em série de controle e grupos de dose alta além disso, estavam manchadas com prata Bielschowsky e anti-GFAP (uma mancha imuno-histoquímica que permite a visualização direta de astrócitos e seus processos).

Raízes nervosas da coluna vertebral dorsal e gânglio (tomadas em meso-cervical, meso-torácica e meso-lombar) foram incorporados em parafina, com seções seriais tingidas com H & E. Além disso, seções seriais do controle e grupos de dose alta foram tingidas com prata de Bielschowsky.

Para as seções do nervo isquiático, tibial e sural de todos os animais: uma secção longitudinal de cada nervo foi incorporada em parafina, seccionada em cerca de 5 microns e corada com H & E. Uma seção transversal cada nervo foi pósfixado em ósmio, em resina Spurr, seccionada em cerca de

1 a 2 microns e manchada com toluidina azul. Pós-fixação de ósmio e incorporação resina prevê preservação superior à mielina nos nervos periféricos e, assim, um exame mais detalhado do nervo.

5 Todos os tecidos coletados e lesões brutas coletadas na necropsia de todos os animais foram também incorporadas em parafina e tingidas com H & E e examinados microscopicamente. Análises histopatológicas de processamento e avaliações e imuno-histoquímica foram
10 realizadas por TPS.

Tingimento de Arilsulfatase A (rhASA)

Slides de controle positivo foram fornecidos pelo patrocinador do estudo. Os slides foram secções hepáticas de camundongos injetados com rhASA. Todos os slides de
15 controle positivo mostraram ampla evidência de rhASA nas células de Kupffer (macrófagos sinusoidais) no fígado. Os slides de controle positivo são armazenados com os outros slides deste estudo. Todas as avaliações de seções de tingimento de rhASA realizaram-se inicialmente cegas para o
20 grupo de tratamento do animal. Isso foi feito com a patologista inicialmente lendo os slides rhASA tingidos com o número de animal na etiqueta obscurecido (por um assistente com conhecimento do animal real sendo avaliado), ditando a Pontuação (grau de severidade) durante a
25 avaliação e tendo o mesmo assistente registrando imediatamente a Pontuação de coloração (grau de severidade) nas tabelas de dados. A ID animal foi verificada então tanto por estudo do neuropatologista e do assistente para garantir a entrada de dados precisos. Este procedimento foi
30 realizado de forma a não introduzir qualquer pré-conceito a

julgar da intensidade geral de coloração com a mancha imuno-histoquímica para a detecção de rhASA intracelular. O grau relativo de coloração de neurônios e células gliais, macrófagos meníngeos, macrófagos perivasculares (astrócitos e células microgliais, mas provavelmente células microgliais predominantemente) foi classificado em todas as seções do cérebro e da medula espinhal. As classificações de severidade média em cada nível do cérebro e da medula espinhal, para cada grupo foi totalizado (por grupo) e registrado como um total sob o tecido sentido cérebro, Geral, tingimento rhASA, e coloração da medula espinhal, geral, rhASA.

Em geral, coloração de rhASA nos neurônios do cérebro foi uma medida de neurônios no córtex cerebral e outras áreas nucleares no cérebro. Coloração de rhASA em macrófagos meníngeos era evidência de absorção do artigo teste de macrófagos meníngeos e/ou rhASA endógeno em macrófagos meníngeos. Coloração de rhASA de macrófagos perivasculares foi uma medida de absorção de rhASA por macrófagos na medula cérebro/espinhal (ou rhASA endógeno), embora refira-se que o espaço perivascular no cérebro e medula espinhal (o espaço de Virchow-Robins) é contínuo com as meninges. Em geral, a classificação de Coloração de rhASA nas células gliais predominantemente era uma medida de absorção/ penetração do artigo de teste para a matéria cinzenta e/ou branca, especialmente do córtex cerebral (a corona radiata é matéria branca sob o córtex cerebral). A Coloração de rhASA em matéria branca apareceu em astrócitos e células microgliais.

Utilizou-se o seguinte esquema de classificação para

classificar o grau de Coloração de rhASA nos vários tipos de células (neurônios, células gliais, macrófagos).

Explicação do grau (% das possíveis células tingidas)

1 Menos de 10 %

5 2 Maior que 10 a 25%

3 Maior que 25 a 50%

4 Maior que 50 a 75%

5 Maior que 75%

[0320] Nota este esquema não é estritamente
10 quantitativo. Ele foi usado como um método eficiente, semiquantitativo para avaliar o cérebro e a medula espinhal para o grau de coloração com rhASA. Verificou-se pelo estudo neuropatologista que nem todas as áreas neuronais tinham igual coloração rhASA. Também verificou-se que não
15 houve coloração neuronal endógena em alguns animais de controle e que células do plexo coróide e neurônios do gânglio do raiz dorsal tendem a tingir fortemente rhASA mesmo em animais de controle. Coloração do plexo coróide e gânglios das raízes dorsais não foram classificados, mas
20 observou-se pelo estudo neuropatologista ser destaque, mesmo em animais de controle.

Nota: todos os grupos de dose: Dose baixa = 1,8 mg/dose; Dose média = 6,0 mg/dose; Dose alta = 18,6 mg/dose. Não ocorreu nenhuma lesão nos tecidos do sistema
25 nervoso relacionada com os artigos de teste excepto maior tingimento de rhASA no fígado de todos os grupos de dose (macho e fêmea; Veja abaixo).

Animais de sacrifício terminal (6 meses dosagem EOW):
seções rhASA tingidas

30 Houve um aumento de tingimento de rhASA nos seguintes

tipos de tecidos/células. Ao considerar um efeito de artigo do teste do grau de tingimento de rhASA em um tipo de célula específica em um grupo de determinada dose, os níveis de coloração no controle simultâneo e do veículo de controle de dispositivo (sacrificado com os animais do sacrifício de recuperação) foram considerados para comparação.

Cérebro, Meninges, macrófagos (todos grupos de dose, machos e fêmeas)

10 • Cérebro, Perivascular, macrófagos (todos grupos de dose, machos e fêmeas)

• Cérebro, células da glia (todos grupos de dose, machos e fêmeas)

15 • Medula espinhal, Meninges, macrófagos (todos grupos de dose, machos e fêmeas)

• Medula espinhal, Perivascular, macrófagos (todos grupos de dose, machos e fêmeas)

• Medula espinhal, células da glia (grupos de médias e altas doses de machos e fêmeas)

20 • Fígado, células de Kupffer (todos grupos de dose, machos e fêmeas)

Por causa de tingimento endógeno, níveis de coloração de rhASA nos neurônios do cérebro e da medula espinhal foram os mais difíceis de definir especificamente. A coloração rhASA consistentemente demonstrou níveis elevados de rhASA nas meninges e cérebro/ medula espinhal, macrófagos perivasculares e também dentro de células gliais. Não foram observadas diferenças detectáveis de coloração de rhASA em neurônios, entre os animais de controle e tratados com artigo de teste.

30

Animais de sacrifício de recuperação (6 meses dosagem EOW seguido por 1 mês sem dosagem)

Em geral, alterações relacionadas com o artigo de teste ou foram totalmente resolvidas ou foram notavelmente diminuídas desses animais permitido um período de um mês sem dosagem antes da necropsia. As seguintes alterações microscópicas estavam presentes em uma frequência ou severidade que indicou uma possível relação para o artigo de teste.

10 alterações microscópicas relacionadas com o artigo de teste (animais de recuperação)

- Cérebro, Meninges, infiltrados (grupos doses médias e altas, ambos os sexos) (figuras 16 e 17)

- Cérebro, Meninges, infiltrados, % eosinófilos
15 (machos de dose média; fêmeas de dose alta)

- Cérebro, Perivascular, infiltrados (machos de dose média; fêmeas de dose alta) (Figura 18)

- Cérebro, Perivascular, infiltrados, % eosinófilos (machos de dose média; fêmeas de dose alta)

- Cérebro, massa cinzenta, infiltrados (todos os grupos de dose, de ambos os sexos)

- Cérebro, massa cinzenta, infiltrados, % eosinófilos (machos de dose baixa)

- Cérebro, massa cinzenta, eosinófilos, necrose
25 (machos de dose baixa)

- Medula espinhal, Meninges, infiltrados (machos de dose média e alta, fêmeas de dose baixa e alta)

- Medula espinhal, Meninges, infiltrados, % eosinófilos (machos de dose média; fêmeas de dose baixa)

- Medula espinhal, massa cinzenta, infiltra (fêmeas de
30

dose baixa)

- Medula espinhal, massa cinzenta, infiltrados, % eosinófilos (fêmeas de dose baixa)

- Gânglio de raiz dorsal e raízes, epineuro, 5 infiltrados (fêmeas de dose média)

- Raízes de nervo espinhal e gânglios, infiltrados, eosinófilos (machos de doses médias e altas; fêmeas de todas as doses)

- Gânglio trigeminal, infiltrados, eosinófilos (machos 10 e fêmeas de dose média)

Todas essas mudanças foram interpretadas para representar remanescentes das alterações inflamatórias aumentadas observadas nos animais de sacrifício terminal. Como nos animais do sacrifício terminal, não havia nenhuma 15 evidência que o aumento de infiltrados de células inflamatórias ainda presentes em alguns animais de recuperação representava alterações morfológicas que estavam causando efeitos adversos.

Não ocorreu nenhuma lesão dos tecidos do sistema 20 nervoso relacionada com artigo de teste.

Animais de sacrifício de recuperação (6 meses dosagem EOW seguido por 1 mês sem dosagem):

Coloração rhASA

Não havia nenhuma indicação de aumento coloração de 25 rhASA nos machos ou fêmeas de recuperação em comparação com os dispositivos e/ou veículos de controle. No cérebro de machos de dose baixa, média e alta de recuperação, houve realmente uma indicação de diminuição de rhASA em alguns tipos de células (isso variou entre os grupos de 30 tratamento) em comparação com os controles do dispositivo

e/ou veículo. A razão para isto, incluindo ou não isso foi um efeito real, não era aparente. Uma possível explicação seria que a administração de rhASA exógena pode causar alguma diminuição na produção de rhASA endógena. Achado semelhante não estava presente na medula espinhal dos machos e fêmeas de recuperação, a mancha no fígado foi semelhante a observada nos controles.

Em geral, alterações relacionadas com o artigo de teste podem ser classificadas em dois tipos principais de mudanças e estavam presentes em todos os níveis de dose (1,8, 6,0 e 18,6 mg/dose).

Aumento de infiltrados (de células brancas do sangue, geralmente com um proeminente componente eosinofílico) em meninges, o parênquima cerebral, o parênquima da medula espinhal, gânglio trigeminal e ocasionalmente os raízes nervosas da coluna vertebral/gânglios (ou o epineuro que cercam as estruturas). Este aumento foi interpretado como devido à presença do artigo teste (uma proteína) no espaço intratecal e nos tecidos do sistema nervoso.

Ligeiro aumento focal das células microgliais na medula espinhal e do cérebro em animais ocasionais (microgliosis não foi observada em qualquer dos animais dose alta). Ambas as categorias de alterações morfológicas foram interpretadas como uma resposta à presença do artigo de teste. Não houve evidência de necrose neuronal em qualquer animal. Nenhuma das alterações relacionadas com o artigo de teste com estava relacionadas com reações biologicamente adversas no cérebro, medula espinhal, raízes nervosas da coluna vertebral ou gânglios. Especificamente, não houve evidência de necrose neuronal ou uma resposta

glia biologicamente importante. Não ocorreu nenhuma lesão dos tecidos do sistema nervoso relacionada com artigo de teste. Após um período de um mês de recuperação (um período livre de dosagem), alterações relacionadas com o artigo de teste ou inteiramente resolvidas tinham ou limitavam-se aos remanescentes aumentos na resposta inflamatória associada com a presença do prévio artigo teste. Não houve efeitos morfológicos adversos nos animais de recuperação.

Como com base em um exame microscópico cego, atribuindo uma pontuação de coloração semi-quantitativa, imuno-histoquímica, coloração de arilsulfatase A (rhASA; o artigo de teste) foi aumentada no cérebro e medula espinhal em vários tipos de células, exceto os neurônios, para todos os grupos tratados com artigo de teste. Este aumento também foi evidente nas células de Kupffer do fígado. Após o período de recuperação de 1 mês, coloração de rhASA nos animais tratados com artigo (todos os grupos de dose) voltou-se para níveis de controle (dispositivo e/ou veículo de controle). Em um macho de recuperação de dose baixa, houve vários focos de astrocitose e perda neuronal, indicando várias áreas de isquemia prévia, no córtex cerebral. Embora a patogênese exata dessas lesões neste animal não era aparente, a ausência de lesões semelhantes em qualquer outro artigo de teste tratados animais, incluindo os animais de alta dose que receberam 10 X a dose, indicado que essas lesões não foram relacionadas ao artigo de teste. Com base estritamente nas conclusões brutas e microscópicas (seções tingidas com hematoxilina e eosina, incorporadas sobre parafina) neste estudo, o nível de efeitos adversos não observados (NOAEL) foi de 18,6 mg.

EXEMPLO 5 - DADOS FARMACOCINÉTICOS

Dados obtidos em animais de 6 meses

Este exemplo fornece análise interpretativa para soro e concentrações de CSF de rhASA e anticorpos anti-rfiASA do soro humano da Northern Biomedical Research, Inc.

O objetivo do exemplo foi avaliar administração repetida de dose intratecal (IT) de rhASA de uma perspectiva de Farmacologia de toxicologia e segurança em jovens (< 12 meses de idade) macacos cynomolgus. Um total de 12 doses foram dadas em um período de seis meses. Os animais foram necropsiados 24 horas ou um mês após a última dose. O projeto do estudo é mostrado na tabela 30.

TABELA 30: projeto do estudo

Projeto de estudo					
Grupo	N° de animais	Concentração Dose Nominal (mg/mL)	Dose Administrada (mg)	N° de animais, sacrificio 6 meses	N° de animais, sacrificio 1 mês de recuperação
1	4M, 4F	DC	0	-	4M, 4F
2	8M, 8F	0	0	4 M, 3 F ^a	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

DC = controle de dispositivo; Animais do grupo 1 não foram tratados com o veículo ou artigo de teste.

^a veículo de controle Animal n ° 044 foi sacrificado cedo no dia 50 devido a um vazamento de cateter

Métodos de ensaio - análise do anticorpo

Quantificação de anticorpos anti-rfiASA no soro e CSF de macacos *Cynomolgus* foi realizado usando um método validado. Brevemente, o ensaio começa, bloqueando uma placa de estreptavidina revestida de MSD, seguida de incubação com rhASA biotina-marcada. Após uma etapa de lavagem, QCs, calibradores e amostras diluídas são adicionados à placa e incubadas. Após uma etapa de lavagem adicional, droga SULFO TAG-marcada é adicionada e incubada. Realiza-se uma etapa de lavagem final e tampão leitor de MSD é adicionado. Placas são lidas imediatamente. Os dados de sinal em unidades de luminescência relativa (RLU) são analisados usando modelos SOFTMax Pro.

Concentração do Soro e CSF

Quantificação de rhASA no soro e CSF de macacos *Cynomolgus* foi realizada usando um método validado. O método baseia-se na tecnologia de ensaio de imunoabsorção enzima-ligado (ELISA). Brevemente, uma placa de microtitulação é revestida com um anticorpo policlonal de coelho (SH040) levantado contra arilsulfatase A recombinante humana (ASA). Após a incubação com padrões de referência da ASA e amostras de teste, proteína ASA ligada é detectada por anticorpo peroxidase de rábano (HRP)-conjugado monoclonal de anti-ASA (clone 19-16-3). A placa é então incubada com um substrato para HRP, peroxidase TMB. Esta reação enzima-substrato é interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2N (H_2SO_4) e a absorvância de cada poço é medida na absorvância do comprimento de onda de 450 nm com uma referência de comprimento de onda de 655 nm. As concentrações de ASA em amostras são calculadas utilizando a curva de calibração do rhASA no mesmo prato.

Resumos das concentrações séricas de rhASA, concentrações de CSF de rhASA, Erro! Concentrações do anticorpo do soro de origem não encontradas. Concentrações de anticorpos anti-rhASA no soro, Concentrações de anticorpos anti-rhASA no CSF e incidência de anticorpos por grupo e sexo são apresentados na tabela 33-39 abaixo.

TABELA 33: Sumário da concentração sérica de rhASA em macacos *Cynomolgus*

Grupo 1: Controle de veículo	Macho			Fêmea		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes da dose 2	0	0	4	0	0	4
Após dose 2	0	0	4	0	0	4
Antes da dose 4	0	0	4	0	0	4
Após dose 4	0	0	4	0	0	4
Antes da dose 6	0	0	4	0	0	4
Após dose 6	0	0	4	0	0	4
Antes da dose 8	0	0	4	0	0	4
Após dose 8	0	0	4	0	0	4
Antes da dose 10	0	0	4	0	0	4
Após dose 10	0	0	4	0	0	4
Antes da dose 12	0	0	4	0	0	4
Após dose 12	0	0	4	0	0	4
Recuperação média	0	0	4	0	0	4
Necropsia de	0	0	4	0	0	4

recuperação						
Grupo 2: 0 mg	Macho			Fêmea		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes da dose 2	0	0	8	0	0	7
Após dose 2	0	0	8	0	0	7
Antes da dose 4	0	0	8	0	0	7
Após dose 4	0	0	8	0	0	7
Antes da dose 6	0	0	8	0	0	8
Após dose 6	0	0	8	0	0	8
Antes da dose 8	0	0	8	0	0	8
Após dose 8	0	0	8	0	0	8
Antes da dose 10	0	0	8	0	0	7
Após dose 10	0	0	8	0	0	7
Antes da dose 12	0	0	8	0	0	7
Após dose 12 (Antes de necropsia de 6 meses)	0	0	8	0	0	8
Recuperaçã o média	0	0	4	0	0	4
Necropsia de recuperação	0	0	4	0	0	4

TABELA 33 (CONT): Sumário da concentração sérica de rhASA em macacos *Cynomolgus*

Grupo 3: 1.8 mg	Macho			Fêmea		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes da dose 2	0	0	8	0	0	8
Após dose 2	49.2	46.8	8	40.3	27.3	8
Antes da dose 4	0	0	8	0	0	8
Após dose 4	0	0	8	0	0	8
Antes da dose 6	0	0	8	0	0	8
Após dose 6	0	0	8	0	0	8
Antes da dose 8	0	0	8	0	0	8
Após dose 8	0	0	8	0	0	8
Antes da dose 10	0	0	8	0	0	8
Após dose 10	0	0	8	0	0	8
Antes da dose 12	0	0	8	0	0	8
Após dose 12 (Antes de necropsia de 6 meses)	0	0	8	0	0	8
Recuperação média	0	0	4	0	0	4
Necropsia de recuperação	0	0	4	0	0	4

Grupo 4: 6.0 mg	Macho			Fêmea		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes da dose 2	0	0	8	0	0	8

Após dose 2	173.6	69.5		143.2	89.0	8
Antes da dose 4	0	0	8	0	0	8
Após dose 4	17	49	8	63.8	119.9	8
Antes da dose 6	0	0	8	0	0	8
Após dose 6	0	0	8	0	0	8
Antes da dose 8	0	0		0	0	8
Após dose 8	0	0		0	0	8
Antes da dose 10	0	0		0	0	8
Após dose 10	0	0		0	0	8
Antes da dose 12	0	0		0	0	8
Após dose 12 (Antes de necropsia de 6 meses)	0	0		0	0	8
Recuperação média	0	0		0	0	4
Necropsia de recuperação	0	0		0	0	4

TABELA 33 (CONT): Sumário da concentração sérica de rhASA em macacos *Cynomolgus*

Grupo 5: 18.6 mg	Macho			Fêmea		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes da dose 2	0	0	8	0	0	8
Após dose 2	348.0	272.9	8	562.3	204.3	8
Antes da dose 4	0	0	8	0	0	8
Após dose 4	105.7	274.6	8	172.0	141.3	8
Antes da dose 6	0	0	8	0	0	8

Após dose 6	20.4	38.4	8	88.6	121.4	8
Antes da dose 8	0	0	8	0	0	8
Após dose 8	0	0		54.0	89.4	8
Antes da dose 10	0	0	8	0	0	8
Após dose 10	0	0		6	18	8
Antes da dose 12	0	0	8	0	0	8
Após dose 12 (Antes de necropsia de 6 meses)	0	0	8	0	0	
Recuperação média	0	0	4	0	0	4
Necropsia de recuperação	0	0	4	0	0	4

TABELA 34 : Resumo das concentrações do CSF em macacos
Cynomolgus

Grupo 1: Controle de veículo	Macho			Fêmea		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes da dose 2	0	0	4	0	0	4
Após dose 2	0	0	4	0	0	4
Antes da dose 4	0	0	4	0	0	4
Após dose 4	0	0	4	0	0	4
Antes da dose 6	0	0	4	0	0	4
Após dose 6	0	0	4	0	0	4
Antes da dose 8	0	0	4	0	0	4
Após dose 8	0	0	4	0	0	4
Antes da dose 10	0	0	4	0	0	4
Após dose 10	0	0	3	0	0	4

Antes da dose 12	0	0	3	0	0	4
Após dose 12	0	0	3	0	0	4
Recuperação média	0	0	3	0	0	4
Necropsia de recuperação	0	0	4	0	0	4

Grupo 2: 0 mg	Macho			Fêmea		
	Média	SD	n	Média	SD	n
		ng/m				
Ponto de tempo	ng/mL	L		ng/mL	ng/mL	
Antes da dose 2	0	0	6	0	0	7
Após dose 2	0	0	5	0	0	7
Antes da dose 4	0	0	5	0	0	6
Após dose 4	0	0	5	0	0	5
Antes da dose 6	0	0	5	0	0	5
Após dose 6	0	0	5	0	0	5
Antes da dose 8	0	0	5	0	0	5
Após dose 8	0	0	5	0	0	5
Antes da dose 10	0	0	4	0	0	5
Após dose 10	0	0	4	0	0	5
Antes da dose 12	0	0	4	0	0	5
Após dose 12 (Antes de necropsia de 6 meses)	0	0	5	0	0	5
Recuperação média	0	0	2	0	0	3
Necropsia de recuperação	0	0	4	0	0	4

TABELA 34 (CONT): Resumo das concentrações do CSF em macacos *Cynomolgus*

Grupo 3: 1.8 mg	Macho			Fêmea		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes da dose 2	42491	59255	7	42217	47300	6
Após dose 2	95886	22626	7	125717	61723	6
Antes da dose 4	17664	24372	6	50829	41891	6
Após dose 4	106783	42823	6	138400	49908	6
Antes da dose 6	39400	50105	4	45817	38404	6
Após dose 6	95275	12836	4	104080	37423	5
Antes da dose 8	25799	31589		58086	43821	5
Após dose 8	148750	34664	4	119200	66556	5
Antes da dose 10	25927	31380	4	30380	30328	5
Após dose 10	89975	29494	4	105200	44603	5
Antes da dose 12	29746	34267	4	82780	65906	5
Após dose 12 (Antes de necropsia de 6 meses)	32030	39155	7	47331	49015	6
Recuperação média	0	0	3	0	0	2
Necropsia de recuperação	0	0	4	0	0	4
Grupo 4: 6.0 mg	Macho			Fêmea		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes da dose 2	75203	67002	8	146979	233673	6
Após dose 2	360000	179276	8	267667	103369	6
Antes da dose 4	58064	77210	8	53285	73340	5
Após dose 4	369250	241251	8	305517	152232	6

Antes da dose 6	77253	91407	8	97987	146762	6
Após dose 6	418600	200098	5	369000	232238	5
Antes da dose 8	66342	80374	5	11592	23072	4
Após dose 8	329400	209841	5	340500	135128	4
Antes da dose 10	119420	148408	5	74031	104609	2
Após dose 10	412000	149278	5	245500	161927	2
Antes da dose 12	68651	92902	5	74577	105251	2
Após dose 12 (Antes de necropsia de 6 meses)	141833	173933	7	58986	99016	4
Recuperação média	0	0	3	0	NA	1
Necropsia de recuperação	0	0	4	0	0	4

TABELA 34 (CONT): Resumo das concentrações do CSF em macacos *Cynomolgus*

Grupo 5: 18.6 mg	Macho			Fêmea		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes da dose 2	289917	291188	7	201339	250774	8
Após dose 2	734429	298352	7	920143	448409	7
Antes da dose 4	150238	210302	7	169895	185675	6
Após dose 4	984857	570039	7	965167	425924	6
Antes da dose 6	265479	252067	7	288879	226889	6
Após dose 6	758143	102009	7	1270000	558533	6
Antes da dose 8	190529	240081	7	196021	199396	6
Após dose 8	1003429	538271	7	98980	585072	5
Antes da dose 10	176297	272500	7	168864	191087	6
Após dose 10	1013000	390673	7	773400	103717	5

Antes da dose 12	142334	196793	5	430542	436534	6
Após dose 12 (Antes de necropsia de 6 meses)	291525	350251	7	252142	381200	6
Recuperação média	0	0	3	0	0	2
Necropsia de recuperação	0	0	4	0	0	4

TABELA 35: Resumo da concentração de anticorpos Anti-rhASA no soro

Grupo 1: Controle de veículo	Macho			Fêmea		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Pré-dose 2	0	0	4	0	0	4
Pré-dose 4	0	0	4	0	0	4
Pré-dose 6	0	0	4	0	0	4
Pré-dose 8	0	0	4	0	0	4
Pré-dose 10	0	0	4	0	0	4
Pré-dose 12	0	0	4	0	0	4
Recuperação média	0	0	4	0	0	4
Necropsia de recuperação	0	0	4	0	0	4

Grupo 2: 0 mg	Macho			Fêmea		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	

Pré-dose 2	0	0	8	0	0	8
Pré-dose 4	0	0	8	0	0	8
Pré-dose 6	0	0	8	0	0	7
Pré-dose 8	0	0	8	0	0	7
Pré-dose 10	0	0	8	0	0	7
Pré-dose 12	0	0	8	0	0	7
Necropsia (24 horas depois de última dose)	0	0	4	0	0	4
Recuperação média	0	0	4	0	0	4
Necropsia de recuperação	0	0	4	0	0	4

Grupo 3: 1.8 mg	Macho			Fêmea		
	Média	SD	n	Média	SD	n
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Pré-dose 2	0	0	8	0	0	8
Pré-dose 4	18409	21371	8	27648	37504	8
Pré-dose 6	75913	64863	8	85625	79871	
Pré-dose 8	132163	95576	8	151900	97818	8
Pré-dose 10	392338	606626	8	290675	186213	8
Pré-dose 12	499438	735028	8	524438	569523	8
Necropsia (24 horas depois de última dose)	261625	157865	4	733550	928411	4
Recuperação média	339250	265888		377175	218955	4
Necropsia de recuperação	712500	1107129	4	295525	174718	4

Tabela 35 (continuação): Resumo da concentração de anticorpos Anti-rhASA no soro

Grupo 4: 6.0 mg	Macho			Fêmea		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Pré-dose 2	0	0	8	0	0	8
Pré-dose 4	30419	30561	8	64000	89510	8
Pré-dose 6	143693	128094	8	191750	150511	8
Pré-dose 8	325750	190651	8	305850	224707	8
Pré-dose 10	669125	515458	8	832188	846241	8
Pré-dose 12	946125	651530	8	1060775	1088889	8
Necropsia (24 horas depois de última dose)	713500	598812	4	1047568	1132048	4
Recuperação média	156600 0	708132	4	975500	1149734	4
Necropsia de recuperação	111325 0	554510	4	793000	991450	4

Grupo 5: 18.6 mg	Macho			Fêmea		
	Média	SD	n	Média	SD	N
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Pré-dose 2	0	0	8	0	0	8
Pré-dose 4	56873	39107	8	39994	53411	8
Pré-dose 6	311638	237796	8	193263	208952	8
Pré-dose 8	482875	270130	8	399363	360425	8
Pré-dose 10	1006750	857916	8	866875	894776	8
Pré-dose 12	1419000	1382276	8	1341500	1373771	
Necropsia (24	165000	147463	4	407300	268570	4

horas depois de última dose)					
Recuperação média	2884250	1363128	2101500	2090420	4
Necropsia de recuperação	2504250	1118042	1506000	1524682	4

TABELA 36: Resumo da concentração de anticorpos Anti-rhASA no CSF

Grupo 1: Controle de veículo	Macho			Fêmea		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Cirurgia	0	0	4	0	0	4
Pré-dose 2	0	0	4	0	0	4
Pré-dose 4	0	0	4	0	0	4
Pré-dose 6	0	0	4	0	0	4
Pré-dose 8	0	0	4	0	0	4
Pré-dose 10	0	0	4	0	0	4
Pré-dose 12	0	0	3	0	0	4
Recuperação média	0	0	3	0	0	4
Necropsia de recuperação	0	0	4	0	0	4

Grupo 2: 0 mg	Macho			Fêmea		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Cirurgia	0	0	7	0	0	6
Pré-dose 2	0	0	6	0	0	7
Pré-dose 4	0	0	5	0	0	6

Pré-dose 6	0	0	5	0	0	5
Pré-dose 8	0	0	5	0	0	5
Pré-dose 10	0	0	4	0	0	5
Pré-dose 12	0	0	4	0	0	5
Necropsia (24 horas depois de última dose)	0	0	3	0	0	2
Recuperação média	0	NA	1	0	0	3
Necropsia de recuperação	0	0	4	0	0	4

Grupo 3: 1.8 mg	Macho			Fêmea		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Cirurgia	0	0	7	0	0	8
Pré-dose 2	0	0	7	0	0	6
Pré-dose 4	0	0	6	41	101	6
Pré-dose 6	685	1317	4	632	1413	5
Pré-dose 8	2238	2596	4	2180	4875	5
Pré-dose 10	3393	5038	4	5560	12433	5
Pré-dose 12	6436	8266	4	12700	28398	5
Necropsia (24 horas depois de última dose)	14848	12401	4	21442	32382	4
Recuperação média	29307	40617	3	18700	283	2
Necropsia de recuperação	21060	30010	3	13078	7181	4

TABELA 36 (CONT): Resumo da concentração de anticorpos

Anti-rhASA no CSF

Grupo 4: 6.0 mg	Macho			Fêmea		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Cirurgia	0	0	7	0	0	8
Pré-dose 2	0	0	7	0	0	6
Pré-dose 4	99	172	7	84	187	5
Pré-dose 6	1117	1862	8	1473	2775	6
Pré-dose 8	3987	5580	5	20824	27320	4
Pré-dose 10	6600	9679	5	2715	1237	2
Pré-dose 12	5285	7279	5	955	1237	2
Necropsia (24 horas depois de última dose)	16870	16350	4	63000	63000	3
Recuperação média	66233	42238	3	16800	NA	1
Necropsia de recuperação	53600	14388	3	28880	29890	4

Grupo 5: 18.6 mg	Macho			Fêmea		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Cirurgia	0	0	7	0	0	6
Pré-dose 2	0	0	7	0	0	8
Pré-dose 4	102	192	7	0	0	6
Pré-dose 6	233	351	7	1506	3234	6
Pré-dose 8	3378	5931	7	6367	9865	6
Pré-dose 10	16327	24035	7	19567	27542	6
Pré-dose 12	11596	16406	5	15143	24351	6
Necropsia (24 horas	5168	7427	4	12135	10341	4

depois de última dose)						
Recuperação média	54700	26439	3	46315	62770	2
Necropsia de recuperação	50725	29217	4	37790	35967	4

TABELA 37: concentrações de rhASA no soro e CSF, macho e fêmea combinado

Grupo 1: Controle de veículo	RhASA do soro (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
	Grupo no total			Grupo no total		
Ponto de tempo	Média	SD	n	Média	SD	n
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes da dose 2	0	0	8	0	0	8
Após dose 2	0	0	8	0	0	8
Antes da dose 4	0	0	8	0	0	8
Após dose 4	0	0	8	0	0	8
Antes da dose 6	0	0	8	0	0	8
Após dose 6	0	0	8	0	0	8
Antes da dose 8	0	0	8	0	0	8
Após dose 8	0	0	8	0	0	8
Antes da dose 10	0	0	8	0	0	8
Após dose 10	0	0	8	0	0	7
Antes da dose 12	0	0	8	0	0	7
Após dose 12	0	0	8	0	0	7
Recuperação média	0	0	8	0	0	7
Necropsia de recuperação	0	0	8	0	0	8

Grupo 2: 0 mg	RhASA do soro	CSF rhASA
---------------	---------------	-----------

Ponto de tempo	(ng/mL)			(ng/mL)		
	Grupo no total			Grupo no total		
	Média	SD	n	Média	SD	n
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes da dose 2	0	0	16	0	0	3
Após dose 2	0	0	16	0	0	2
Antes da dose 4	0	0	16	0	0	1
Após dose 4	0	0	16	0	0	0
Antes da dose 6	0	0	15	0	0	0
Após dose 6	0	0	15	0	0	0
Antes da dose 8	0	0	15	0	0	0
Após dose 8	0	0	15	0	0	0
Antes da dose 10	0	0	15	0	0	9
Após dose 10	0	0	15	0	0	9
Antes da dose 12	0	0	15	0	0	9
Após dose 12 (Antes de necropsia de 6 meses)	0	0	15	0	0	0
Recuperação média	0	0	8	0	0	5
Necropsia de recuperação	0	0	8	0	0	8

TABELA 37 (CONT): concentrações de rhASA no soro e

CSF, macho e fêmea combinado

Grupo 3: 1.8 mg	RhASA do soro (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
	Grupo no total			Grupo no total		
Ponto de tempo	Média	SD	n	Média	SD	n
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes da dose 2	0	0	16	42365	51844	3
Após dose 2	44.7	37.3	16	109654	45639	3
Antes da dose 4	0	0	16	34247	36982	2
Após dose 4	0	0	16	122592	47311	2
Antes da dose 6	0	0	16	43250	40831	0
Após dose 6	0	0	16	100167	27992	9
Antes da dose 8	0	0	66	43736	40298	9
Após dose 8	0	0	16	132333	53926	9
Antes da dose 10	0	0	16	28401	28890	
Após dose 10	0	0	16	98433	37220	9
Antes da dose 12	0	0	16	59209	58253	9
Após dose 12 (Antes de necropsia de 6 meses)	0	0	16	39092	42786	3
Recuperação média	0	0	8	0	0	5
Necropsia de recuperação	0	0	8	0	0	8

Grupo 4: 6.0 mg	RhASA do soro (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
-----------------	--------------------------	--	--	----------------------	--	--

Ponto de tempo	Grupo no total			Grupo no total		
	Média	SD	n	Média	SD	n
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	n
Antes da dose 2	0	0	16	105964	157408	4
Após dose 2	158.4	78.7	16	320429	153832	4
Antes da dose 4	0	0	16	56226	72638	3
Após dose 4	40.6	91.7	16	341936	203284	4
Antes da dose 6	0	0	16	86139	113563	4
Após dose 6	0	0	16	393800	206033	0
Antes da dose 8	0	0	16	42009	65286	9
Após dose 8	0	0	16	334333	169995	9
Antes da dose 10	0	0	16	106452	130375	7
Após dose 10	0	0	6	364429	160707	7
Antes da dose 12	0	0	6	70344	87227	7
Após dose 12 (Antes de necropsia de 6 meses)	0	0	6	111707	151129	1
Recuperação média	0	0	8	0	0	4
Necropsia de recuperação	0	0	8	0	0	8

TABELA 37 (CONT): concentrações de rhASA no soro e CSF, macho e fêmea combinado

Grupo 5: 18.6 mg	RhASA do soro (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
	Grupo no total			Grupo no total		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Antes da dose 2	0	0	16	242676	264338	5
Após dose 2	455.1	257.8	16	827286	378379	4
Antes da dose 4	0	0	16	159311	191264	3
Após dose 4	138.8	213.7	16	975769	488021	3
Antes da dose 6	0	0	16	276279	231010	3
Após dose 6	54.5	93.8	16	994385	453568	3
Antes da dose 8	0	0	16	193064	213058	3
Após dose 8	27.0	67.1	16	997750	531567	2
Antes da dose 10	0	0	16	172866	228817	3
Após dose 10	3.2	13	16	913167	319975	2
Antes da dose 12	0	0	16	299538	365275	1
Após dose 12 (Antes	0	0	16	273348	349718	

de necropsia de 6 meses)						3
Recuperação média	0	0		0	0	5
Necropsia de recuperação	0	0		0	0	8

TABELA 38: anticorpos Anti-rhASA do Soro e CSF, macho e fêmea combinado (ng/mL)

Grupo 1: Controle de veículo	Anticorpo antirhASA no soro (ng/mL)			Anticorpo antirhASA CSF (ng/mL)		
	Grupo no total			Grupo no total		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Cirurgia				0	0	8
Pré-dose 2	0	0	8	0	0	8
Pré-dose 4	0	0	8	0	0	8
Pré-dose 6	0	0	8	0	0	8
Pré-dose 8	0	0	8	0	0	8
Pré-dose 10	0	0	8	0	0	8
Pré-dose 12	0	0	8	0	0	7
Recuperação média	0	0	8	0	0	7
Necropsia de recuperação	0	0	8	0	0	8

Grupo 2: 0 mg	Anticorpo antirhASA no soro (ng/mL)			Anticorpo antirhASA CSF (ng/mL)		
	Grupo no total			Grupo no total		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Cirurgia				0	0	13

Pré-dose 2	0	0	16	0	0	13
Pré-dose 4	0	0	16	0	0	11
Pré-dose 6	0	0	15	0	0	10
Pré-dose 8	0	0	15	0	0	10
Pré-dose 10	0	0	15	0	0	9
Pré-dose 12	0	0	15	0	0	9
Necropsia (24 horas depois de última dose)	0	0	8	0	0	5
Recuperação média	0	0	8	0	0	4
Necropsia de recuperação	0	0	8	0	0	8

TABELA 38 (CONT): anticorpos Anti-rhASA do Soro e CSF, macho e fêmea combinado (ng/mL)

Grupo 3: 1.8 mg	Anticorpo antirhASA no soro (ng/mL)			Anticorpo antirhASA CSF (ng/mL)		
	Grupo no total			Grupo no total		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Cirurgia				0	0	15
Pré-dose 2	0	0	16	0	0	13
Pré-dose 4	23028	29871	16	21	72	12
Pré-dose 6	80769	70467	16	656	1284	9
Pré-dose 8	142031	93979	16	2206	3796	9
Pré-dose 10	341506	436656	16	4597	9386	9
Pré-dose 12	511938	635340	16	9916	20970	9
Necropsia (24 horas depois)	497588	666122	8	18145	22972	8

de última dose)						
Recuperação média	358213	226397	8	25064	29302	5
Necropsia de recuperação	504013	766860	8	16499	18552	7

Grupo 4: 6.0 mg	Anticorpo antirhASA no soro (ng/mL)			Anticorpo antirhASA CSF (ng/mL)		
	Grupo no total			Grupo no total		
	Média	SD	n	Média	SD	n
Ponto de tempo	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
Cirurgia				0	0	15
Pré-dose 2	0	0	16	0	0	13
Pré-dose 4	47209	66899	16	93	170	12
Pré-dose 6	167721	137276	16	1269	2205	14
Pré-dose 8	315800	201572	16	11470	19344	9
Pré-dose 10	750656	682110	16	5490	8143	7
Pré-dose 12	1003450	868860	16	4048	6328	7
Necropsia (24 horas depois de última dose)	880534	857199	8	36640	45439	7
Recuperação média	1270750	938646	8	53875	42430	4
Necropsia de recuperação	953125	763122	8	39474	26274	7

TABELA 38 (CONT): anticorpos Anti-rhASA do Soro e CSF, macho e fêmea combinado (ng/mL)

								per ção
(DC)	NA	0/4	NA	0/4	NA	0/4	NA	0/4
2 (vef culo)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/3	0/4	0/2	0/4
3 (1.8 mg IT)	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/3	3/4	4/4
4 (6.0 mg IT)	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/3	2/3	4/4
5 (18.6 mg IT)	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4	4/4	4/4

O limite de quantificação para rhASA no soro de macaco cynomolgus é 39,1 ng/mL, e todas as amostras de soro de grupos 1 e 2 foram abaixo do limite de quantificação (BQL), ver tabela 33. Níveis séricos de rhASA foram testados antes e 24 horas após Doses 2, 4, 6, 8, 10 e 12 (necropsia de 6 meses), no meio do período da recuperação, e antes da necrópsia de recuperação. Níveis de rhASA eram indetectáveis no grupo 3 (1,8 mg/dose), grupo 4 (6,0 mg/dose), e grupo 5 (18,6 mg/dose) antes de Doses 2, 4, 6, 8, 10 e 12. Após a dose 12, no meio período de recuperação e antes da necrópsia de recuperação. Após a Dose 2, os níveis de rhASA no soro foram dose-relacionadas. Após a Dose 4 (grupo 3), Dose 6 (grupos 3 e 4) e Doses 8 e 10

(grupos 3 e 4 e 5 do grupo de machos), níveis de rhASA eram indetectáveis. Níveis séricos de rhASA diminuíram no grupo 4 (6,0 mg/dose) após Dose 4 e grupo 5 (18,6 mg/dose) após Doses 4 e 6 para machos e Doses 4, 6, 8 e 10 para fêmeas. Esta aparente diminuição nos níveis séricos de rhASA pode estar relacionada com a crescente concentração de anticorpos anti-rfiASA. Não houve diferença nos níveis séricos de rhASA, dada a variabilidade da amostra e o pequeno número de grupos neste estudo sexo aparente.

10 O limite de quantificação para rhASA no CSF de macaco cynomolgus é 19,5 ng/mL, e todas as amostras de CSF de grupos 1 e 2 foram BQL, ver tabela 34. rhASA foi detectável em CSF antes e após Doses 2, 4, 6, 8, 10 e 12 (necropsia de 6 meses) em todos os grupos dosados. Os níveis de pós-dose foram maiores (aproximadamente pós-dose de 24 horas) e foram dose-relacionados. Os níveis no fluido cefalorraquidiano foram muito maiores do que aqueles no soro. Não houve aparentes diferenças de sexos nos níveis de CSF de rhASA, dada a variabilidade da amostra e o pequeno número de grupo neste estudo. rhASA não foi detectável mediano, durante o período de recuperação e antes da necropsia de recuperação em todos os grupos dosados. Níveis de CSF coletas de Dose 12 (necropsia) para grupos tratados com rhASA eram inferiores a níveis pós-dose 8 e 11. Possíveis razões para níveis mais baixos de rhASA na necropsia incluem maior volume tomado (~2.25 mL total para contagens celulares, química, rhASA e anti-rhASA de célula) na necropsia vs. as tomadas no intervalo de dosagem em vida (até 0,5 mL pré ou pós-dose para concentração de rhASA). Além disso, alguns animais não tinham cateteres da patente na necropsia, e

foram colhidas amostras, através de uma torneira CM, em vez de através do cateter. Esta rota rendeu consistentemente mais baixas concentrações de rhASA em comparação com a amostragem através do cateter. Isto é provavelmente devido a direção rostrocaudal limitada de fluxo de massa de CSF que é reconhecido como ocorrem em verticalmente orientado de animais como macacos e homem (por exemplo, é sabido que constituintes do CSF apresentam gradientes rostrocaudal marcado durante um tempo de vida de indivíduos).

10 Anticorpos Anti-rfiASA no soro foram detectados em todos os animais tratados com rhASA em algum ponto do tempo, ver tabela 35. Animais são definidos como positivos para anticorpos anti-rfiASA se o nível de anticorpos anti-rhASA estava acima do limite de quantificação (78.1 ng/mL).
15 Animais permaneceram positivos para anticorpos anti-rhASA, uma vez que seroconvertidos. Nenhum animal foi positivos para anticorpos anti-rhASA no ponto de tempo de pré-dose 2. Todos os animais rhASA exceto macho n ° 026 (grupo 4; 6,0 mg/dose) foram positivos para anticorpos anti-rhASA no soro
20 no ponto de tempo de pré-dose 4. Macho n ° 026 foi positivo para anticorpo no soro ponto de tempo de pré-dose6. No grupo 5 (18,6 mg/kg), as amostras de anticorpo de necropsia tinham níveis mais baixos de anticorpos. Esta aparente diminuição pode ser devido à presença de rhASA interferir
25 com o ensaio. O título era geralmente superior nos grupos de dose média e alta (6,0 e 18,6 mg/dose) do que os animais de baixa dose (1,8 mg/dose). A presença de anticorpos anti-rhASA é um resultado esperado do tratamento em macacos Cynomolgus com uma proteína recombinante humana¹. Dada a
30 variabilidade nos resultados, não houve nenhuma diferença

						ções		cereb ral mg/kg a
A	11	Contro le tipo selvag em (mASA +/+ hASA - /-)	Nenhum	NA	NA	NA	NA	NA
B	9	hASAC6 9S/ ASA - /-	Control e de veículo	Veícu lo	IT lombar	4 (Dias 1, 9, 15/16 ^b , e 22)	24 horas depois da quarta dose	0
C	5		rhASA	20 mg/kg	IV (veia da cauda)			NA
D	5		rhASA	0.04 mg	IT lombar			100
E	5		rhASA	0.12 mg	IT lombar			300
F	10		rhASA	0.21 mg	IT lombar			520

NA = não aplicável; IT = intratecal; IV = intravenosa.

^a peso de cérebro de camundongos é de aproximadamente 0.0004 kg.

^b grupos C, D e E foram dosados no dia 15; Grupos B e

E foram dosados no dia 16.

O camundongo nocaute hASAC69S/ASA(-/-) é um modelo
 aceito de MLD e tem sido usado para testar potenciais
 tratamentos para esta doença. A via intratecal é a rota
 5 pretendida da administração em seres humanos. A via
 intravenosa de administração foi testada para este composto
 e um composto similar em camundongos MLD. Um grupo de
 controle intravenosa foi adicionado como um controle
 positivo para alterações histológicas esperado nos órgãos
 10 periféricos. Animais receberam 100, 300 ou 520 mg/kg de
 peso do cérebro (0,04, 0,12, 0,21 mg, respectivamente) de
 rhASA. Os níveis de dose normalizados para o peso do
 cérebro selecionado para este estudo correspondem às doses
 que são planejadas para uso em seres humanos ou que foram
 15 usados em estudos de toxicologia ou nos modelos anteriores
 de eficácia de doenças por armazenamento dos lisossomos.
 Essas doses não foram previstas tendo qualquer toxicidade.

Recebimento

Espécie Camundongos (*Mus musculus*)
 20 Cepa Camundongos controle hASAC69S/ASA (-/-) e tipo
 selvagem

Idade aproximadamente 14-17 meses na chegada

Nº de grupos 6

Nº de animais 34 camundongos nocaute ASA + 11
 25 controles tipo selvagem

Após chegada, cada animal foi examinado para avaliar o
 estado de saúde.

Habitação

Animais foram alojado em grupos em gaiolas com filtro
 30 no topo de policarbonato de alta temperatura, com papel

CareFresh e garrafas de água. Cada gaiola foi claramente identificada com um cartão de gaiola indicando projeto, grupo e número de animais e sexo. Cada animal foi identificado exclusivamente usando um sistema de perfuração de orelha. Animais foram tratados em conformidade com as diretrizes federais.

As condições específicas para o ambiente do quarto animal e fotoperíodo foram os seguintes:

Temperatura $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

10 Umidade $50 \pm 20 \%$

Ciclo de luz 12 horas de luz e 12 horas escuras

Durante e após a administração de dose, o fotoperíodo pode ter sido temporariamente interrompido por atividades regulares. Tais interrupções não são consideradas para afetar o resultado ou a qualidade da pesquisa.

Todos os animais disponíveis tipo selvagem (11) foram atribuídos ao grupo A e foram numerados de 35 a 45. Animais ASA (-/-) hASA (+/-) foram atribuídos com números consecutivos (1 a 34), conforme eles foram retirados de suas gaiolas, pesadas, e tendo a orelha perfurada durante a aclimatação. Os animais, em seguida, foram atribuídos para os grupos de tratamento usando Research Randomizer (www.randomizer.org) no dia 3 de janeiro de 2011. Os 9 primeiros números foram atribuídos ao grupo B, os próximos 5 para o grupo C, os próximos 5 para o Grupo D, os próximos 5 para o grupo E, e os últimos 10 no grupo F. Os animais foram atribuídos da seguinte forma na tabela 41:

TABELA 41: DESIGNAÇÃO ANIMAL

Grupo	N	Número de animais
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

Animal n° 19 não pôde ser localizado no momento da dosagem.

Animal n° 3 morreu antes da dosagem começar.

Veículo e artigo de teste

5 Artigo de teste

Identidade RhASA

Descrição arilsulfatase A humana recombinante (rhASA)

Condições de armazenamento aproximadamente 4°C

Veículo

10 Identidade veículo rhASA (154 mM NaCl, 0.005% polissorbato 20, pH ~6.0)

Condição de armazenamento cerca de 4°C

Preparação do veículo

O veículo foi utilizado como fornecido. O veículo era
15 aquecido na parte superior da bancada (ambiente). Uma vez
que o veículo foi aquecido, o material foi misturado
agitando suavemente e inversão. As garrafas não eram
vortexadas ou abaladas. A garrafa foi secada antes de
acessar o material. Qualquer veículo restante foi retornado
20 para o frigorífico (1°C a 8°C).

Preparação de formulação de dose

rhASA foi diluído em veículo para atingir as
concentrações necessárias. O artigo de teste foi aquecido
sobre a bancada (ambiente). Uma vez que o artigo de teste

foi aquecido, o material foi mixado por agitando suavemente e inversão. As garrafas não eram vortexadas ou abaladas.

Corantes para rastrear injeções:

Um corante infravermelho (tal como IRDye [®], LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) foi utilizado para controlar as injeções. Corantes como este têm sido usados em injeções intratecais como um procedimento de sobrevivência após administração intratecal. O corante foi misturado com o artigo de teste antes da administração; 1 nmole de tintura em 1 µL foi adicionado para o artigo de teste. Além da tintura de infravermelha, 1 µL de FD&C azul #1 (0.25%) foi usado para injeções de rastreamento. Este corante azul é um aditivo de alimento comum e é geralmente considerado seguro e não tóxico.

15 Injeção IT Lombossacra de rhASA ou veículo

Animais em grupos B, D, E e F receberam injeções intratecal em dias, 1, 9, 15 ou 16 e 22.

Camundongos adultos foram anestesiados com 1,25% 2,2,2 tribromoetanol (Avertin) a 200 a 300 µL/ 10 gramas de peso corporal (250 a 350 mg/kg) por injeção intraperitoneal. Retirou-se entre a base da cauda e as omoplatas usando uma máquina pregadores. A área raspada foi limpa com povidine/betadine, esfoliação seguida de álcool isopropílico. Uma incisão de pele de pequena a mediana (1 a 25 2 cm) foi feita ao longo da coluna vertebral lombossacra, e a interseção da linha média dorsal e o aspecto craniano das asas do íleo (singular íleo) foram identificados. O músculo na fossa ilíaca (glúteo médio) é um músculo em forma de coração. Os dois lados da parte superior do "coração" 30 aproximam a localização das asas do íleo. Uma agulha de

calibre 32 anexado a um vidro estanque a gás de 10-20 µL
seringa Hamilton foi inserida, até que sentiu-se a
resistência do osso subjacente. Injeção de 10 µI do artigo
de teste, 1 µI da tintura do infravermelha e 1 µl de FD&C
5 azul #1 (volume total de injeção de 12µl) foi realizada a
uma taxa aproximada de 2 µL/20 segundos (12 µL/2 minutos).
A incisão da pele foi fechada usando cliques de ferida. O
sucesso da injeção foi julgado por imagem para determinar
se o corante infravermelho foi distribuído por todo o CNS,
10 bem como o corante azul visível. Depois da imagem latente,
o animal foi deixado se recuperando em uma câmara de
recuperação.

Injeção intravenosa de rhASA

Animais do grupo C receberam injeções intravenosas nos
15 dias 1, 9, 15 e 22.

Para injeções IV, animais foram anestesiados com
isoflurano, se necessário e foram colocados em uma
retenção. A veia da cauda foi dilatada por aquecimento por
sacudir a cauda suavemente com o dedo. Local da injeção, em
20 seguida, foi limpo com etanol a 70%. Alternativamente, o
animal foi colocado em uma câmara quente (40°C) por 1 a 1,5
minutos. Uma agulha de 28 a 30-calibre foi usada para
injetar o material do teste. O volume de injeção foi de 5-
10 mL/kg.

25 Aproximadamente 24 horas após a quarta dose, de B a F
em grupos de animais foram sacrificados. Os animais foram
submetidos a procedimentos de coleta de tecido diferente,
conforme detalhado abaixo. Animais do grupo A, não foram
tratados; no entanto, eram sacrificados em janeiro 27 ou
30 28, 2011 e sujeitos a procedimentos de coleta de tecido,

conforme detalhado abaixo.

Soro (todos os animais)

Uma amostra de sangue terminal (cerca de 0,5 mL) foi coletada de todos os animais (Grupos A-F) via retroorbital
5 punção sob anestesia de isoflurano. Um tubo de vidro foi colocado em órbita, penetrando suavemente a área atrás do olho e assim interrompendo a drenagem venosa, localizada atrás do olho. Sangue foi coletado por ação capilar e/ou
10 fluxo de gravidade. Após a coleta de sangue, aplicou-se pressão à órbita para parar o sangramento.

Todas as amostras de sangue foram processadas para soro e congeladas a $<-80^{\circ}\text{C}$. O soro foi estocado a -80°C e analisado para pesquisa de anticorpos.

Tecidos para investigações de microscopia de luz
15 (grupos A-F; 5 camundongos por grupo)

Após coleta de sangue, os animais foram sacrificados via asfixia de CO_2 . Um recorte da cauda foi coletado antes da perfusão e congelado para genotipagem possível. Foi exposta a cavidade pericárdica. 3 Três camundongos por
20 grupo foram transcárdialmente perfundido com solução salina heparinizada (heparina de sódio 1 U/mL em 0,9% NaCl, estéril filtrada) gelada e depois com paraformaldeído 4% a aproximadamente 4°C . O cérebro foi removido, e o abdômen foi cortado para expor os órgãos internos. O cérebro e a
25 carcaça foram colocados em paraformaldeído, exceto para o recorte de cauda que estava congelado.

Tecidos para análise de lipídios (grupos A, B e F; animais, 6, 4 e 5, respectivamente)

Após a coleta de sangue, animais foram sacrificados
30 através de asfixia de CO_2 . Um recorte da cauda foi coletado

antes da perfusão e congelado para genotipagem possível. Foi exposta a cavidade pericárdica. Para análises de lipídios, 4 a 6 camundongos por grupo foram transcárdially perfundido com solução salina heparinizada (heparina de sódio 1 U/mL em 0,9% NaCl, estéril filtrada) gelada gelada. Tecidos exemplares coletados para análises de lipídios são apresentados na tabela 42.

TABELA 42: TECIDOS COLETADOS PARA ANÁLISE DE LIPÍDIOS

Tecidos coletados para análise de lipídios	
Cérebro (separado em hemisférios esquerdo e direito e pesado)	Rim (2)
Medula espinhal (removida da coluna)	
Nervo ciático (2) (dissecado livre de músculo)	Cauda (antes de perfusão)

Na coleta, tecidos foram pesados e, em seguida, congelados, colocando em um congelamento -80°C ou em gelo seco. O cérebro foi separado em hemisférios esquerdo e direito. O direito é utilizado para a análise de lipídios por MS. À esquerda será analisada para possível análise de N-acetil-L-aspartato (NAA). Tecidos foram armazenados a -80°C até análise (Ver tabela 43).

TABELA 43: CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO DE AMOSTRA

Tipo de Amostra	Temperatura de armazenamento
Soro	Congelado em <i>circa</i> -80°C
Tecidos para análise de lipídios	Congelado em <i>circa</i> -80°C
Pontas da cauda	Congelado em <i>circa</i> -80°C
Tecidos para microscopia de luz	Aproximadamente 4°C

rhASA reduziu armazenamento de sulfatideo na medula espinhal de camundongos MLD, particularmente em matéria branca, Figura 19. Análise da morfometria da medula espinhal demonstrou que a densidade óptica da coloração de alcian blue foi estatisticamente significativamente reduzida após rhASA de dosagem, figura 20. rhASA tratados MLD camundongos também exibidos reduziram atividade lisossomal no cérebro, figura 21. Esta redução foi estatisticamente significativa no grupo de alta dose (0,21 mg a 520 mg/kg de peso do cérebro) em comparação com animais tratados com o veículo, Figura 22.

Camundongos MLD Imunotolerantes (hASAC69S/ASA(-/-)) com mais de 1 ano de idade receberam administração intratecal-lombar de rhASA uma vez por semana durante 4 semanas (de um total de 4 doses). Doses foram veículos (154 mM NaCl, 0.005% polissorbato 20, pH-6.0), 0,04, 0,12, 0,21 mg/dose (normalizados doses foram 100, 300 e 520 mg/kg de peso do cérebro, respectivamente). Em pontos de tempo terminais a eficácia de sobrevivencia foi avaliada por avaliação imuno-histoquímica de afastamento de sulfatideo e atividade do lisossoma dentro do cérebro e medula espinhal. Seções do cérebro e da medula espinhal foram tingidas com coloração de alcian blue direcionamento sulftatides nos tecidos seções do cérebro foram manchadas também a presença de proteínas de membrana lisossomal associadas (LAMP), um indicador dos processos dos lisossomos. Além disso, realizou-se análise da morfometria em seções tingidas de alcian azul e LAMP do cérebro e da medula espinhal (cervical, torácica e lombar).

Estes resultados preliminares demonstram eficácia da

administração de rhASA intratecal lombar. Em comparação com camundongos do controle do veículo, camundongos MLD tratados com rhASA exibem evidências de melhora dentro os marcadores histológicos da doença, tais como armazenamento de sulfatideo reduzida (observado pela coloração de alcian blue) e atividade lisossomal no cérebro. Estas alterações histopatológicas foram observadas perto do local da administração (medula espinhal), bem como as porções distais do cérebro.

10 EXEMPLO 7 - BIODISTRIBUIÇÃO 2

Visão geral

Neste estudo, 36 machos e 36 femeas de macacos cynomolgus (< 12 meses no início) jovens foram atribuídos a cada um dos grupos de 5 doses e recebeu rhASA (rhASA) em doses de 0 (controle de dispositivo; animais foram tratados com 0,6 mL de PBS), 0 (controle de veículo), 1.8, 6.0 ou 18,6 mg (grupos 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente) quinzenalmente durante 6 meses para um total de 12 doses. Todas as doses foram administradas como uma infusão num volume de 0,6 mL, seguido de um fluxo de 0,5 mL de PBS durante cerca de 10 minutos (tabela 44).

TABELA 44: PROJETO DO ESTUDO

Projeto de estudo					
Grupo	Nº animais	Concentração Dose Nominal (mg/mL)	Dose Administrada (mg)	Nº de animais sacrificados 0 6 meses	Nº de animais, sacrificio 1 mês de recuperação
1	4M, 4F	DC	0	-	4M, 4F

2	8M, 8F	0	0	4 M, 3 F ^a	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

DC = controle de dispositivo; Animais do grupo 1 não foram tratados com o veículo ou artigo de teste.

^a veículo de controle Animal n ° 044 foi sacrificado cedo no dia 50 devido a um vazamento de cateter

5 Material e métodos

Coleta de tecidos

Os cérebros foram cortados em uma grossa fatia matriz coronal de cérebro em 3 mm de espessura. Cada cérebro foi seccionado em fatias coronais completo incluindo: neocórtex
 10 (incluindo o frontal, parietal, temporal e córtex occipital), paleocortex (bulbos olfatórios e/ou lóbulo piriforme), gânglios basais (incluindo caudado e putâmen), sistema límbico (incluindo o hipocampo e cingulados corticais), tálamo/hipotálamo, mesencéfalo regiões
 15 (incluindo substantia nigra), cerebelo, pontes e Bulbo raquidiano. Os locais de que obtiveram-se amostras de tecido individuais (através de punção de biópsia de 4 mm) são mostrados nas figuras 32 a 37. As imagens em figuras 32 a 37 são da University of Wisconsin e Michigan State
 20 Comparative Mammalian Brain Collections, (também o National Museum of Health e Medicine). Punção número 22 não foi coletada ja que esta estrutura não estava presente durante

a necropsia. Todas as amostras de cérebro foram congeladas e armazenadas a -60°C ou abaixo, antes da análise para rhASA usando um ensaio de imunoadsorção enzimática.

A primeira fatia do cérebro e a cada segunda fatia
5 depois disso foram fixadas em formalina para avaliação histopatológica e imunohistoquímica. A segunda fatia do cérebro e a cada segunda fatia depois disso foram congelados para análise de concentração de artigo de teste. Antes da congelação, foram colhidas amostras do cérebro da
10 parte direita da pares, fatias de cérebro de análise de artigo para análise biodistribuição de teste. A localização das amostras de cérebro foram fotografados na necropsia e registrou-se o número de fatias do cérebro. As amostras foram obtidas usando qualquer um soco circular de 4mm ou
15 cortar com um bisturi para otimizar a quantidade de substância branca coletada. Todos os punções foram congelados e armazenados a -60°C ou abaixo para análise de artigo de teste. O restante da fatia cerebral foi congelado e armazenado a -60°C ou abaixo para análise de artigo de
20 teste possível. Locais dos punções são mostrados no Apêndice B.

A coluna vertebral (cervical, torácica e lombar) foi cortada em seções de um centímetro. A primeira fatia e a segunda fatia foram posteriormente fixadas em formol para
25 análise histopatológica e imuno-histoquímica. A segunda fatia da medula espinhal e a cada segunda fatia depois disso foi congelado e armazenado a -60°C ou inferior para análise de artigo de teste. A distribuição de fatias foi ajustada para que a fatia com a ponta do cateter intratecal
30 (fatia 0) fosse fixada em formol e analisada para

histopatologia.

Preparação de cérebro, fígado e extratos da coluna vertebral e determinação da concentração de rhASA

Funções cerebrais, medula espinhal e amostras de fígado foram analisadas usando um método validado em conformidade com os regulamentos dos United States Food e Drug Administration (FDA) Good Laboratory Practice (GLP) 21 CFR, parte 58 e com aplicável padrão Midwest BioResearch de procedimentos habituais de funcionamento. Amostras de tecido foram homogeneizadas em tampão de lise, centrifugadas para remover os detritos de tecido e armazenadas a -80°C até analisada. concentração de rhASA em frações solúveis do homogenates foi determinada por um ELISA utilizando anticorpo policlonal de coelho SH040 como a captura de anticorpos e HRP (peroxidase de rábano)-conjugado com anticorpo monoclonal de anti-ASA 19-16-3, como o anticorpo da detecção. Após uma etapa de lavagem para remover materiais desacoplados, solução de substrato tetrametilbenzidina (TMB) reage com o peróxido na presença de anticorpo conjugado HRP para produzir um sinal colorimétrico que foi proporcional a quantidade de ASA ligado por anticorpo anti ASA na primeira etapa. O montante resultante das rhASA em cada tecido homogeneizado foi interpolado de uma curva padrão.

Amostras também foram analisadas por meio de ensaio de determinação de uma proteína de ácido bicinconinico (BCA) para obter a concentração de proteína em uma amostra desconhecida. A concentração de proteína para cada amostra foi determinada por interpolação de uma curva padrão de albumina. Resultados da concentração de rhASA foram

normalizados, em seguida, a proteína total em extratos de tecido, conforme determinado pelo ensaio de ácido bicinconinico.

Os níveis de ASA de todas as punções para o veículo, grupos 1,8 mg/dose, 6,0 mg/dose e 18,6 mg/dose são mostrados na Figura 23, figura 24, figura 25 e Figura 26, respectivamente. Os níveis ASA de todas as punções para os animais de recuperação para o controle do dispositivo, veículo, grupos de 1,8 mg/dose, 6,0 mg/dose e 18,6 mg/dose são mostrados na Figura 27, Figura 28 figura 29, figura 30 e figura 31, respectivamente.

Níveis do ASA para punções selecionadas que foram tirados perto da superfície (meninges) do cérebro são mostradas na Figura 32. Níveis ASA para punções selecionados que são considerados contendo principalmente matéria cerebral branca profunda são mostrados na figura 33. Matéria branca é composta por feixes de processos de células nervosas mielinadas (ou axônios). Selecionadas punções que contêm principalmente material de matéria cinzenta profunda do cérebro são mostrados na Figura 34. Matéria cinzenta contém corpos de celulares neurais, em contraste com a matéria branca. Os valores de ASA em punções selecionadas da superfície, materia cinza profunda e materia branca profunda são mostradas para cada grupo de dose na Figura 35.

Dados de concentração de medula espinhal são mostrados na Figura 36.

Dados de concentração do fígado são mostrados na figura 37.

Níveis de concentração de ASA no fígado, medula

espinhal e cérebro do dispositivo e grupos de controle veículo-dosado foram em alguns casos mensuráveis. Os níveis no fígado e da medula espinhal foram inferiores a nenhum dos grupos tratados com rfiASA (Figura 23 Figura 32 e 5 figura 33). O nível de rhASA medido no controle de dispositivos e animais veículo-dosado representa uma reatividade cruzada entre os anticorpos anti-rfiASA usados em ELISA com a proteína de macaco cynomolgus nativo. Os valores relatados nos tecidos dispositivo de controle e o 10 veículo não representam valores quantitativos para rhASA de macaco cynomolgus nos tecidos, pois o grau de reatividade cruzada entre o anticorpo e cynomolgus ASA não é conhecido e o fato de que as normas de ensaio usam ASA humana. No entanto, sem querer ser vinculado por qualquer teoria, a 15 variação nos níveis de ASA detectado entre controle de dispositivo e tecidos de veículo-dosado pode ser interpretada como variabilidade demonstrada nas quantidades relativas de ASA cynomolgus em tecidos diferentes e regiões anatômicas.

20 Níveis do ASA nas fatias da medula espinhal variaram de 160 a 2352, 1081 a 6607, e 1893 a 9252 ng/mg de proteína em machos e 0 a 3151, 669 a 6637 e 1404 a 16424 ng/mg de proteína nas fêmeas para grupos de dose 1.8, 6.0 e 18,6 mg, respectivamente (Figura 32). Níveis de ASA foram maiores na 25 região lombar da coluna vertebral do que na região cervical. Níveis de proteína ASA detectado no fígado foram dose responsivos nos grupos rhASA tratados e eram muito abaixo no grupo de veículo. Níveis médios de ASA foram 88, 674 e 2424 em machos e 140, 462 e 1996 ng/mg de proteína 30 nas fêmeas para grupos de 1.8, 6.0 e de 18,6 mg/dose,

respectivamente (figura 33).

Em geral, o nível de ASA parecia ser relacionado com a dose em amostras preparadas das fatias da medula espinhal e fígado dos grupos rhASA-dosados. Muitas das regiões testadas do cérebro demonstraram uma relação de dose clara entre os níveis ASA e administração de rhASA, enquanto outros foram mais ambíguos. Em geral, níveis de ASA no cérebro aumentaram com a dose de rhASA.

Exemplo 8: FARMACOCINÉTICA E ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO

O objetivo deste estudo é avaliar a biodistribuição farmacocinética (PK) e de várias enzimas de substituição terapêutica após administração intratecal (IT) e intravenosa (IV) em macacos cynomolgus.

Neste estudo, um total de doze macacos cynomolgus machos e doze fêmeas com cateteres intratecal-lombar (IT-L) e de intratecal-cisterna magna (IT-CM) da patente foram designados aleatoriamente pelo peso do corpo em quatro grupos de tratamento para a 1ª fase (administração IS2) e fase 1b (administração ASA).

Sangue e CSF (a partir de cateter IT-CM) foram coletados em intervalos especificados após dosagem para ambas as fases. Após as últimas amostras serem coletadas da fase 1a, os animais foram deixados em um período de esmaecimento de 7 dias antes do início da fase 1b.

Após as últimas amostras serem coletadas de fase 1b, os animais serão deixados em um período de esmaecimento de 7 dias entre o início da fase 2. Um total de 12 macacos Cynomolgus machos e fêmeas de fase ab foram aleatoriamente designados pelo peso do corpo em 12 grupos de tratamento de IS2 (grupos 1a-6a) e ASA (grupos 1b-6b).

A biodisponibilidade absoluta da ASA no soro após a administração de IT-L é ~30 a 40%. Em contraste, apenas 0,5% da dose IV é biodisponível no CSF.

Exposição a ASA no soro aumenta de forma mais que 5 proporcional após a administração de IT-L.

Seguindo a administração IT-L, exposição a ASA no CSF aumenta de forma menos proporcional conforme aumenta a dose. Resumos dos parâmetros de PK de rhASA no soro, parâmetros de PK de rhASA no soro em CSF e 10 biodisponibilidade são mostrados nas tabelas 45-47.

TABELA 45 - RESUMO DOS PARÂMETROS PK DE ASA EM SORO DE MACACOS CYNOMOLGUS

MÉDIA (CV%)	ARILSULFATASE A NO SORO			
	ARILSULFATASE A (FASE 1B: IV 1 MG/KG)	ARILSULFATASE A (FASE 1B: IT-L 1.8 MG)	ARILSULFATASE A (FASE 1B: IT-L 6 MG)	ARILSULFATASE 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 _{MAX} (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
CL OU CL/F (ML/H)	261 (17.0)	NC (NC)B	654 (25.0)C	944 (25.4)D
V _Z OU V _Z /F (ML)	2418 (32.4)	NC (NC)B	6523 (41.3)C	9686 (25.8)D

TABELA 46 - RESUMO DOS PARÂMETROS PK DE ASA NO CSF DE MACACOS CYNOMOLGUS

	Arilsulfatase A no CSF			
	Arilsulfatase A (FASE 1b: IV 1 mg/kg)	Arilsulfatase A (FASE 1b: IT-L 1.8 mg)	Arilsulfatase A (FASE 1b: IT-L 6 mg)	Arilsulfatase A (FASE 1b: IT-L 18.6 mg)
N	4	6	8	8
AUC _{0-t} (ng·h/mL)	1629 (179.8)	1267266 (86.6)	5334329 (68.8)	8028775 (71.2)
AUC _{0-∞} (ng·h/mL)	8221 (NC)b	1595942 (79.1)c	4291829 (84.2)d	9406664 (64.5)e
C _{max} (ng/mL)	69.3 (94.2)	345167 (48.7)	1039079 (73.6)	1841125 (62.8)
T _{max} (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)
t _{1/2} (h)	37.6 (NC)b	23.6 (68.3)c	17.1 (31.3)d	13.4 (29.3)e
CL ou CL/F (mL/h)	392 (NC)b	1.95 (74.1)c	38.1 (214.8)d *	3.04 (66.1)e

TABELA 47 - BIODISPONIBILIDADE DE ASA EM SORO E CSF

Comparação Absoluta de Biodisponibilidade			
	Arilsulfatase A (FASE 1b: IT-L 1.8 mg)	Arilsulfatase A (FASE 1b: IT-L 6 mg)	Arilsulfatase A (FASE 1b: IT-L 18.6 mg)
Fa bs (%)	NC	39.9	27.3

A biodisponibilidade da ASA no soro após a administração de IT-L é ~30 a 40%. Em contraste, apenas 0,5% da dose administrada pela rota IV é biodisponível no CSF. Partição de soro no CSF é mostrada na tabela 48.

TABELA 48 - CSF: PARTIÇÃO DE SORO

CSF: PARTIÇÃO DE PLASMA			
ARILSULFATASE A (FASE 1B: IV 1	ARILSULFATASE A (FASE 1B: IT-L	ARILSULFATASE A (FASE 1B: IT-L 6	ARILSULFATASE A (FASE 1B: IT-L 18.6

MG/KG)	1.8 MG)	MG)	MG)
0.74	NC	445	452

EXEMPLO 9 - TRATAMENTO DE PACIENTES DE MLD

Administração direta do CNS através de, por exemplo, entrega IT pode ser usada para tratar eficazmente pacientes de MLD. Este exemplo ilustra um estudo de escalonamento multicêntrico de dose para avaliar a segurança de doses de até 3 semanas alternadas (EOW) para um total de 40 semanas de rhASA administrado através de um dispositivo de entrega de droga intratecal (IDDD) para pacientes com MLD infantil tardia. Vários exemplares de dispositivos entrega intratecal droga adequados para tratamento humano são retratados nas figuras 45 a 48.

Até 20 pacientes serão inscritos:

Pacientes de coorte 1:5 (Dose menor)

Pacientes de coorte 2:5 (Dose intermediária)

15 Pacientes de coorte 3:5 (Dose máxima)

5 pacientes vão ser randomizados para nenhum tratamento.

Pacientes são selecionados para o estudo com base na inclusão dos seguintes critérios: (1) aparência dos primeiros sintomas antes de 30 meses de idade; (2) ambulatório no momento da triagem (definida como a capacidade de levantar-se sozinho e andar para frente 10 passos segurando com uma mão); (3) presença de sinais neurológicos no momento da triagem. Normalmente, histórico de pacientes de transplante de células-tronco hematopoiéticas são excluídos.

Segurança de ascensão doses de rhASA administradas por injeção IT para 40 semanas em crianças com MLD infantil

tardia é determinada. Além disso, a atividade clínica de rHASA na função motora bruta e farmacocinética única e dose repetida no soro e concentrações no líquido cefalorraquidiano (CSF) são avaliadas.

5 Enquanto certos compostos, composições e métodos aqui descritos têm sido descritos com especificidade em conformidade com determinadas modalidades, os exemplos a seguir servem apenas para ilustrar os compostos da invenção e não se destinam a limitar o mesmo.

10 Os artigos "a/o" e "um/uma" como usados aqui na especificação e na reivindicação, a menos que claramente indicado em contrário, deve ser entendidos para incluir os referentes no plural. Reivindicações ou descrições que incluem "ou" entre um ou mais membros de um grupo são
15 consideradas satisfeitos se um, mais de um ou todos os membros do grupo estão presentes em, empregados, ou caso contrário relevantes para um determinado produto ou processo, a menos que indicado em contrário ou caso contrário evidente do contexto. A invenção inclui
20 modalidades em que exatamente um membro do grupo está presente em, empregado em ou de outra forma relevante para um determinado produto ou processo. A invenção também inclui modalidades em que mais de um, ou todos os membros do grupo estão presentes em, empregados em ou de outra
25 forma relevantes para um determinado produto ou processo. Além disso, deve ser entendido que a invenção engloba todas as variações, combinações e permutações, em que uma ou mais limitações, elementos, cláusulas, termos descritivos, etc., de uma ou mais das reivindicações listadas estão
30 introduzidos em outra reivindicação dependente sobre a


mesma base de reivindicação (ou como qualquer outra reivindicação relevante) salvo indicação em contrário ou a menos que seja evidente a um especialista na técnica que surgiria uma contradição ou inconsistência. Onde os

5 elementos são apresentados como listas, (por exemplo, no grupo de Markush ou formato semelhante) deverá ser entendido que cada subgrupo dos elementos também é divulgado, e qualquer elemento(s) pode ser removido do grupo. Deve ser entendido que, em geral, onde a invenção,

10 ou aspectos da invenção, são referidos como compreendendo elementos particulares, características, etc., determinados modalidades da invenção aspectos da invenção consistem ou consistem essencialmente de tais elementos, recursos, etc. Para fins de simplicidade essas modalidades não foram em

15 todos os casos especificamente estabelecidas em muitas palavras aqui. Também deve ser entendido que qualquer personificação ou aspecto da invenção pode ser explicitamente excluído das reivindicações, independentemente se a exclusão específica é citada na

20 especificação. As publicações, sites e outros materiais de referência mencionados neste documento para descrever os fundamentos da invenção e fornecer detalhes adicionais sobre sua prática pelo presente documento são incorporados por referência.



REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma formulação estável compreendendo uma proteína arilsulfatase A (ASA) em uma concentração de 10 mg/mL ou mais, em que a formulação compreende fosfato em uma concentração que não excede 10mM **caracterizado** por ser para a preparação de um medicamento de administração intratecal para tratar a doença de leucodistrofia metacromática (MLD).

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a formulação estável compreende adicionalmente sal, surfactante de polissorbato e um agente tamponador.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que a proteína arilsulfatase A (ASA) está presente em uma concentração variando de 15 mg/ml a 300 mg/ml, opcionalmente em uma concentração selecionada de 10 mg/ml, 30 mg/ml, 50 mg/ml ou 100 mg/ml.

4. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a formulação compreende NaCl presente em uma concentração variando de 0-300 mM, opcionalmente em uma concentração variando de 137-154 mM, opcionalmente em uma concentração de 154 mM.

5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que o surfactante de polissorbato é selecionado do grupo que consiste em polissorbato 20, polissorbato 40, polissorbato

60, polissorbato 80 e uma combinação dos mesmos, e que, opcionalmente, o surfactante de polissorbato é polissorbato 20 e está presente em uma concentração variando de 0-0,02%, opcionalmente em uma concentração de 0,005%.

6. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que a formulação apresenta um pH de 3-8, 5,5-6,5 ou 6,0.

7. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que:

(i) a formulação é uma formulação líquida, ou

(ii) a formulação é formulada como um pó seco liofilizado.

8. Formulação estável para administração intratecal **caracterizada** por compreender uma proteína arilsulfatase A (ASA) em uma concentração variando de 10 a 100 mg/ml, sal, e um surfactante de polissorbato e/ou uma agente tamponador.

9. Formulação estável, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que a proteína ASA está presente em uma concentração de pelo menos 25 mg/ml.

10. Formulação estável, de acordo com a reivindicação 8 ou 9, **caracterizado** pelo fato de que a proteína ASA compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 1.

11. Formulação estável, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, **caracterizado** pelo fato de

que:

(i) a proteína ASA é produzida a partir de uma linhagem celular humana, ou

(ii) a proteína ASA é produzida de células CHO.

12. Formulação estável, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 11, **caracterizado** pelo fato de que o sal é NaCl, opcionalmente em que o NaCl está presente em uma concentração variando de 0-300 mM, opcionalmente em uma concentração variando de 137 a 154 mM, opcionalmente em uma concentração de 154 mM.

13. Formulação estável, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 12, **caracterizado** pelo fato de que o surfactante de polissorbato é selecionado do grupo consistindo em polissorbato 20, polissorbato 40, polissorbato 60, polissorbato 80 e combinação dos mesmos, opcionalmente em que o surfactante de polissorbato é polissorbato 20 e está presente em uma concentração variando de 0-0,2%, e opcionalmente em uma concentração de 0,005%.

14. Formulação estável, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 13, **caracterizado** pelo fato de que a formulação estável compreende um agente tamponador, opcionalmente em que o agente tamponador é selecionado do grupo consistindo em fosfato, acetato, histidina, succinato, citrato, Tris, e combinações dos mesmos, e opcionalmente em que o agente tamponador é fosfato e está presente em uma concentração não excedendo 50 mM, e opcionalmente em uma

concentração não excedendo 20 mM.

15. Formulação estável, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 14, **caracterizado** pelo fato de que a formulação possui um pH de 3 a 8,0, 6,0 a 6,5, ou 6,0.

16. Formulação estável, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 15, **caracterizado** pelo fato de que a formulação é:

(i) uma formulação líquida, ou

(ii) formulada como pó seco liofilizado.

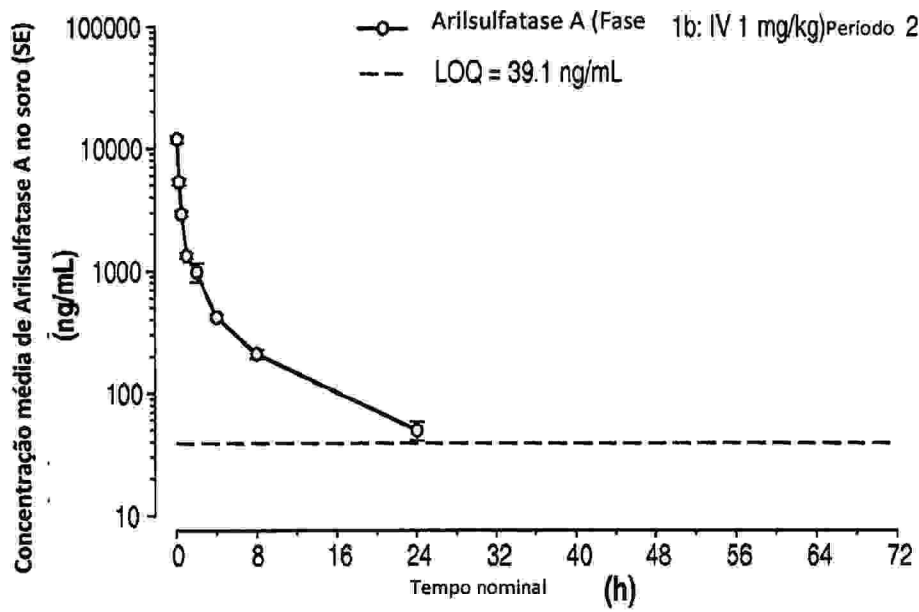
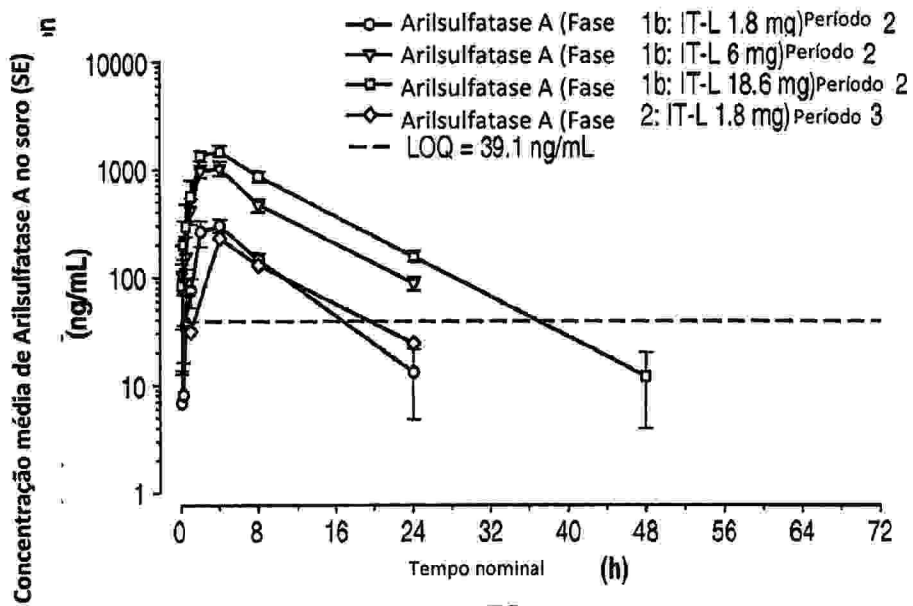
17. Formulação estável, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 16, **caracterizado** pelo fato de que a formulação compreende um surfactante de polissorbato e adicionalmente compreende um agente de estabilização, opcionalmente em que o agente de estabilização é selecionado do grupo consistindo em sacarose, glicose, manitol, sorbitol, PEG 4000, histidina, arginina, lisina, fosfolipídeos e combinação dos mesmos.

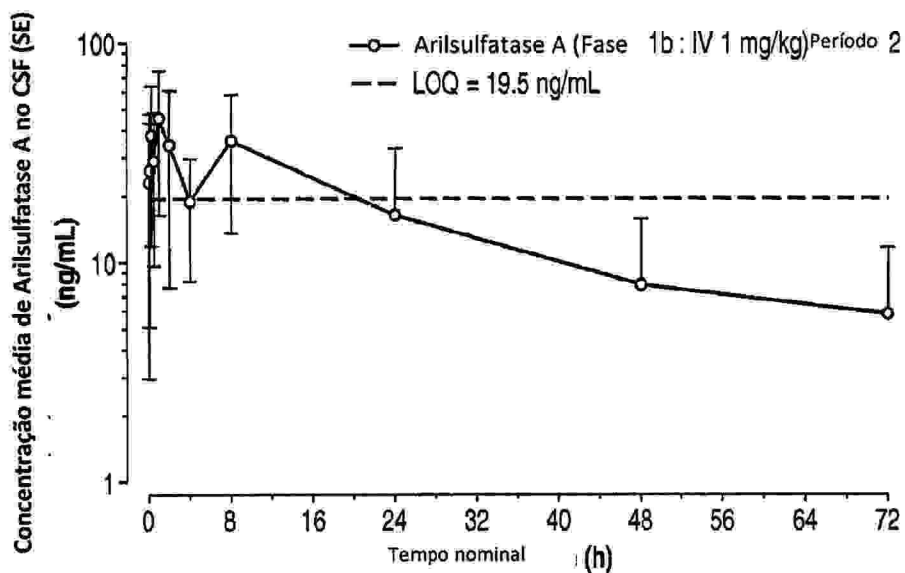
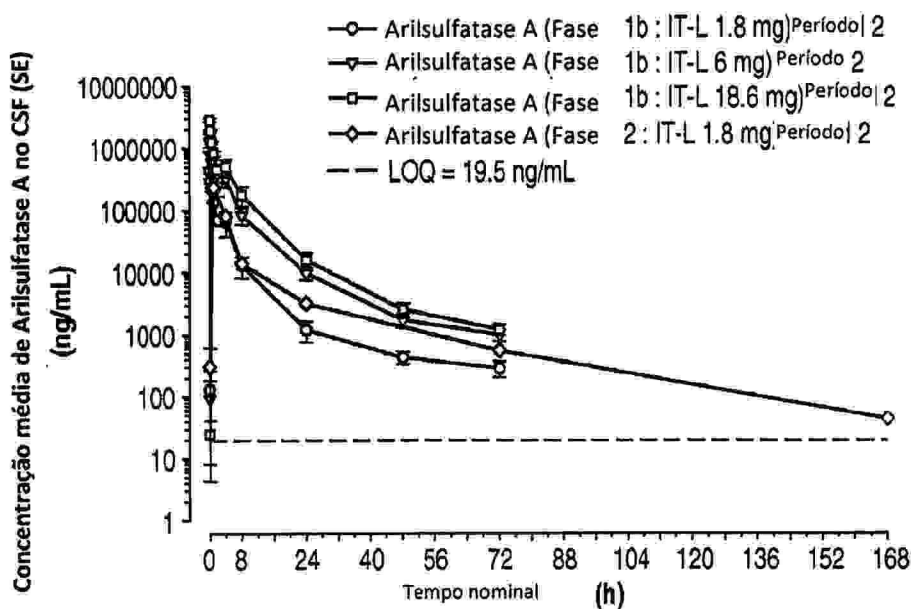
18. Recipiente **caracterizado** pelo fato de que compreende uma forma de dosagem única de uma formulação estável, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 8 a 17, opcionalmente em que:

(i) o recipiente é selecionado dentre uma ampola, um 25 frasco, um cartucho, um reservatório, um lyo-ject, ou uma seringa pré-cheia, opcionalmente em que o recipiente é uma seringa pré-cheia e é opcionalmente selecionada dentre seringas de vidro de borosilicato com

revestimento de silicone cozido, seringas de vidro de borossilicato com silicone pulverizado, ou seringas de resina plástica sem silicone; ou

(ii) a formulação estável está presente em um volume menor do que 50,0 ml, opcionalmente em que a formulação estável está presente em um volume menor do que 5,0 mL.

**Fig. 1****Fig. 2**

**Fig. 3****Fig. 4**

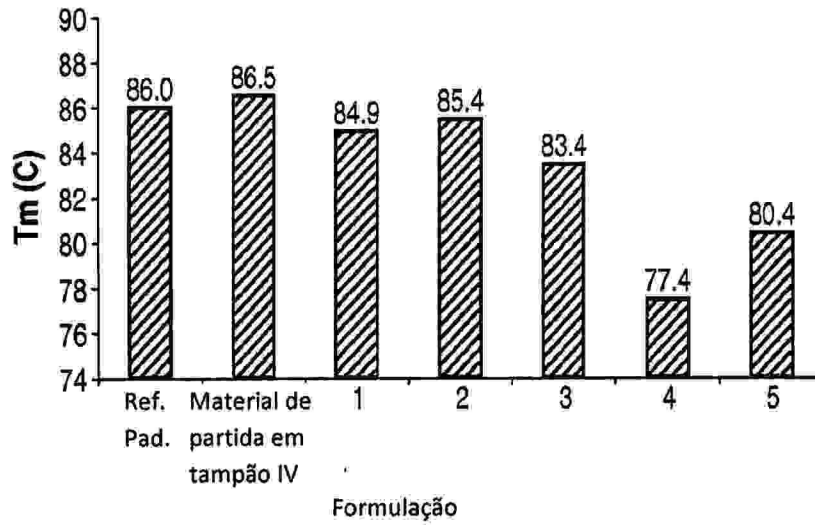


Fig. 5

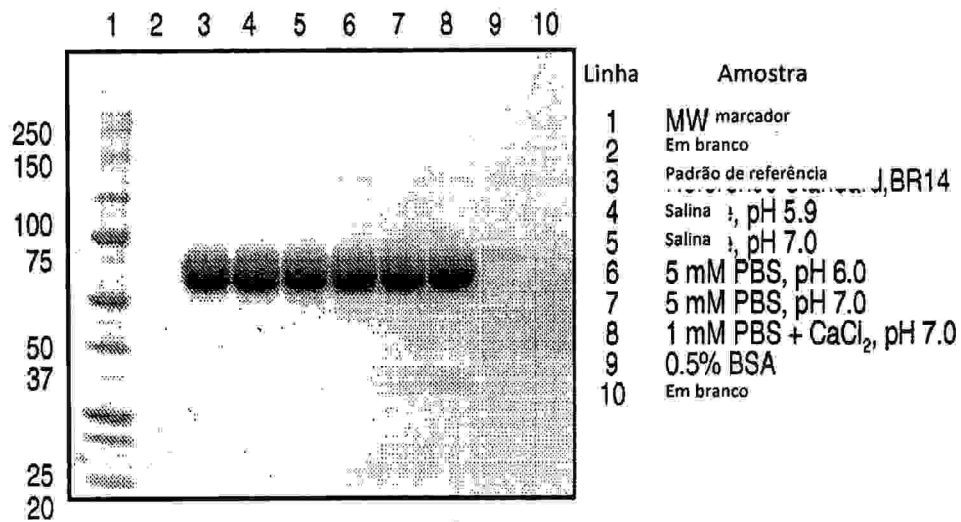
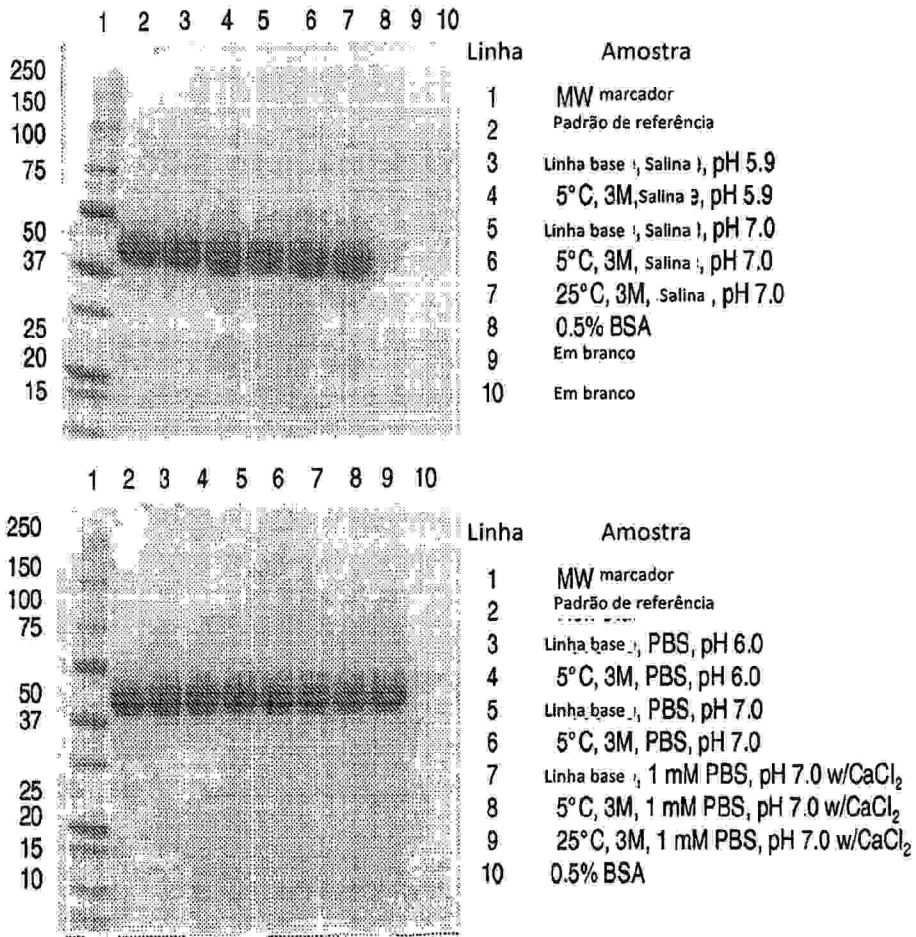


Fig. 6

**Fig. 7**

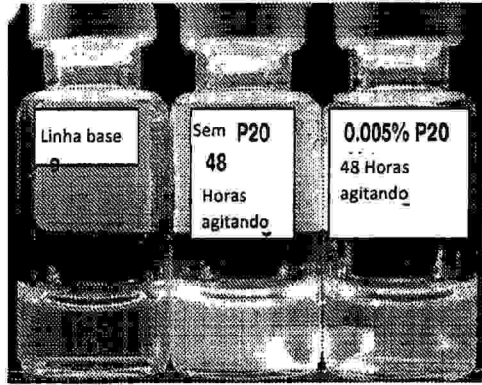


Fig. 8A

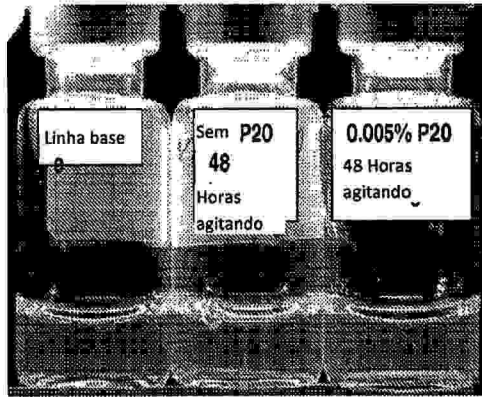


Fig. 8B

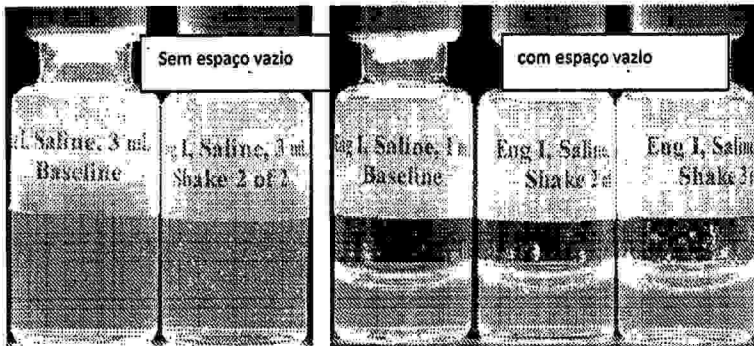
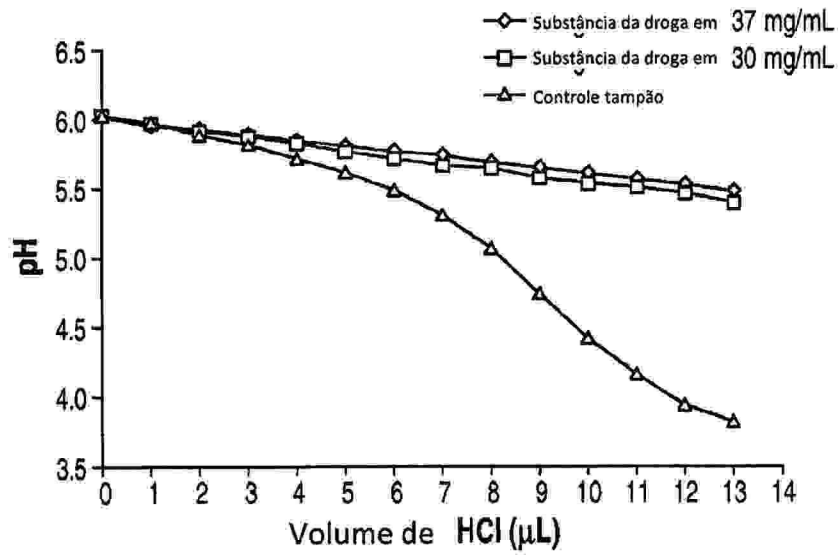
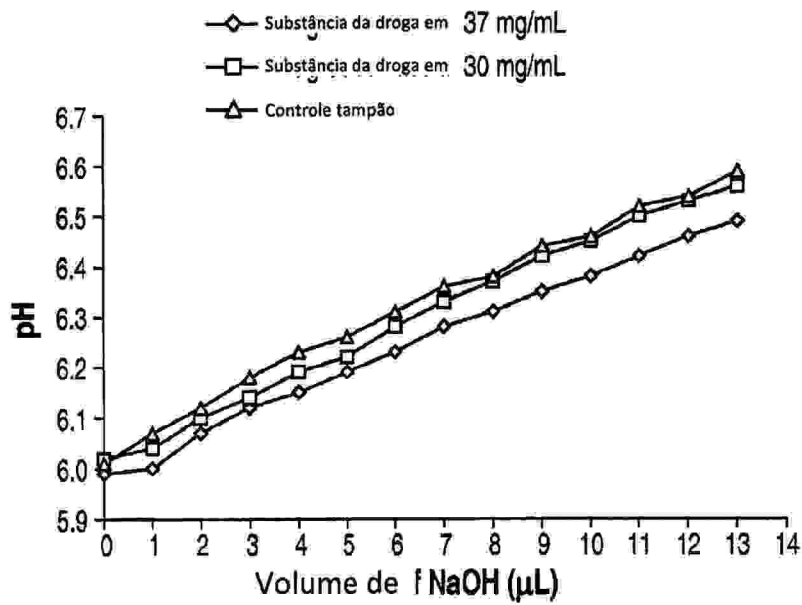
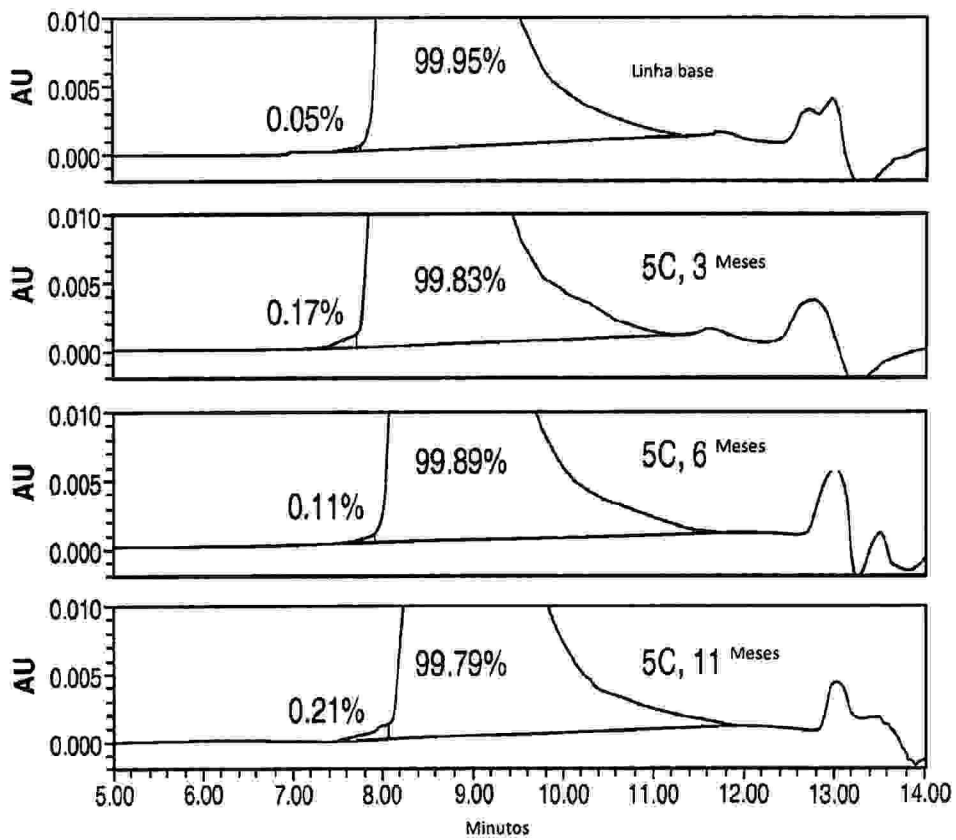
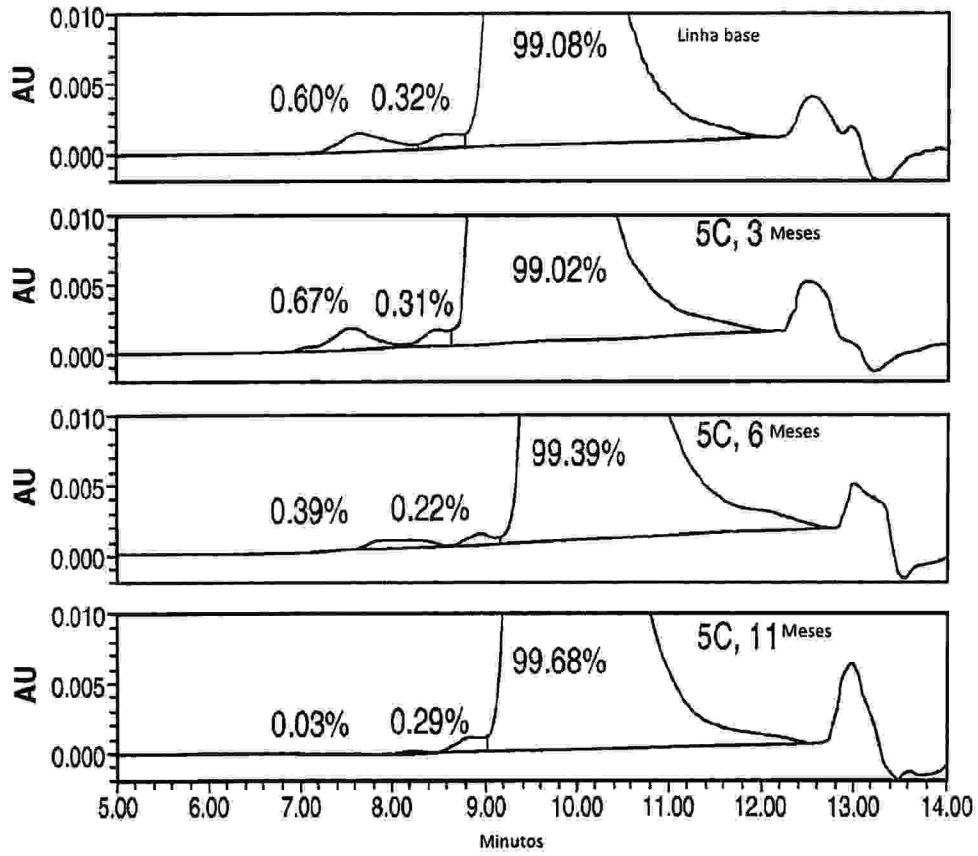


Fig. 9

**Fig. 10****Fig. 11**

**Fig. 12****Fig. 13**

**Fig. 14**

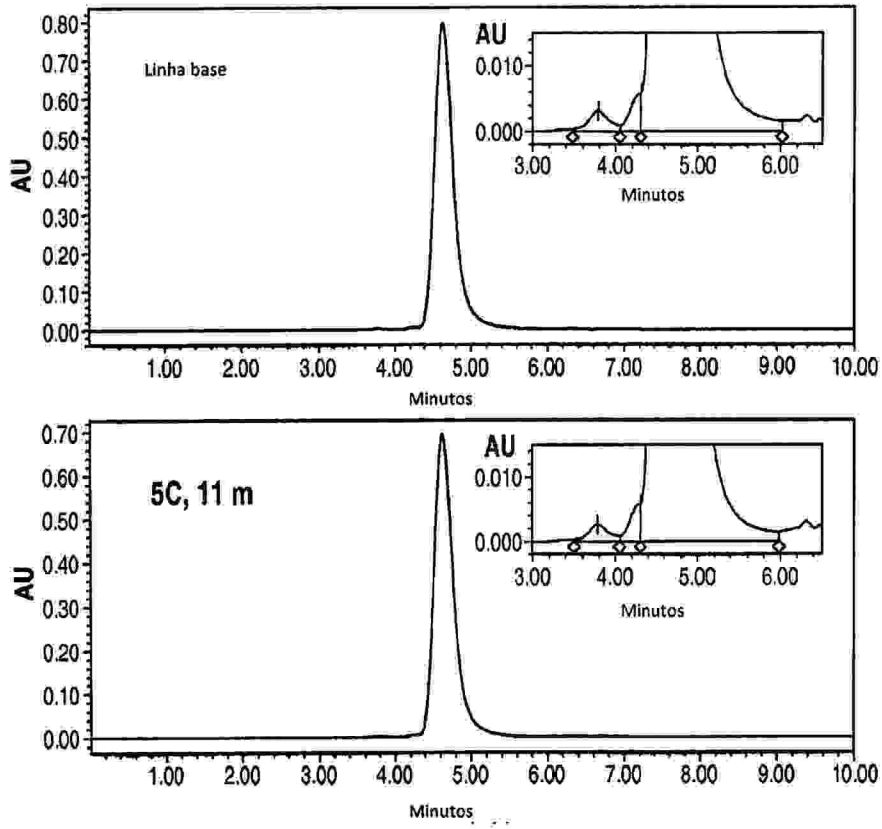


Fig. 15

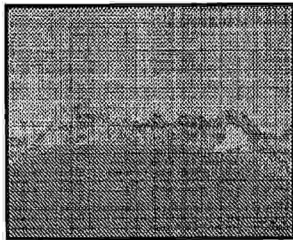


Fig. 16

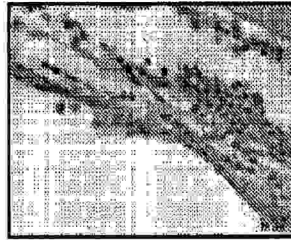


Fig. 17

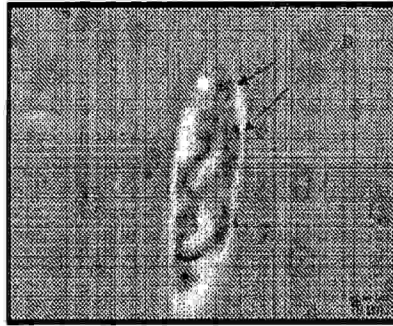
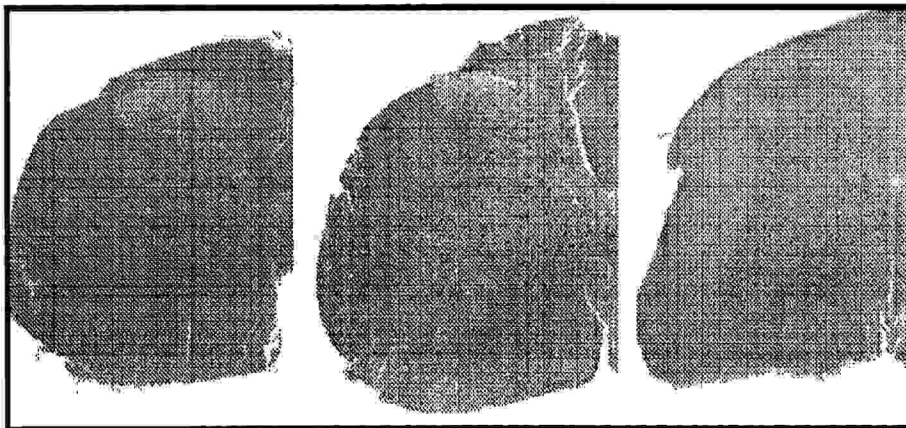


Fig. 18



WT

Veículo

IT tratado

WT = Tipo selvagem; camundongo tratado IT recebeu 4 doses semanais de 520 mg/kg do peso cerebral de rHASA1 (0,21 mg), amplificação 4x.

Fig. 19

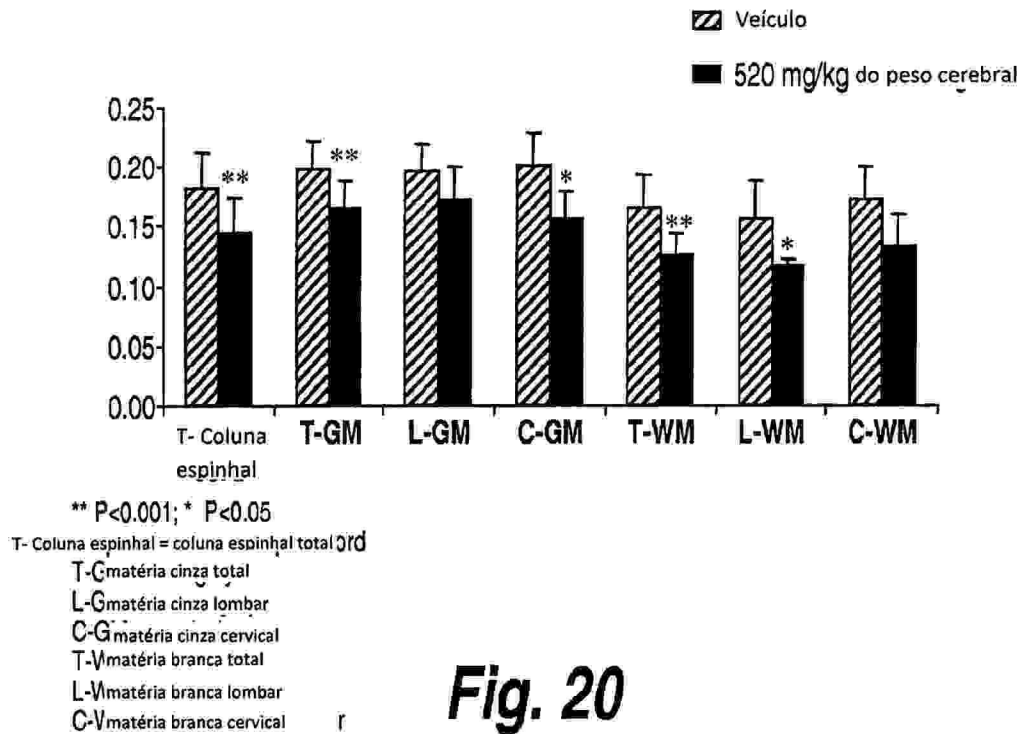
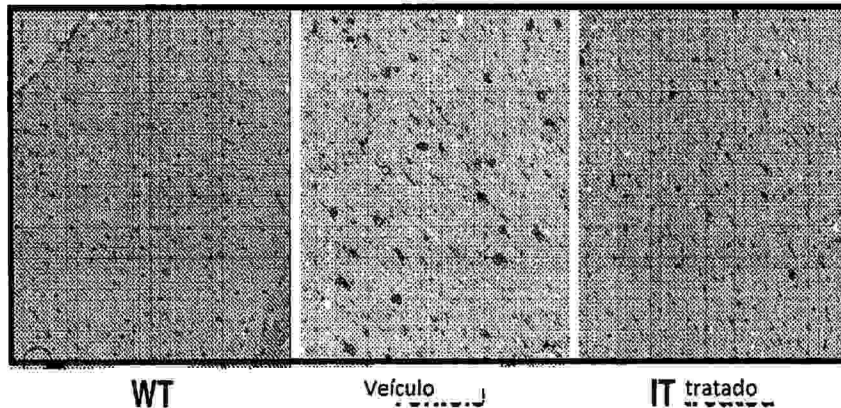


Fig. 20



WT = Tipo selvagem; camundongo tratado IT recebeu 4 doses semanais de 520 mg/kg do peso cerebral de rhASA1 (0,21 mg), amplificação 20x.

Fig. 21

12/42

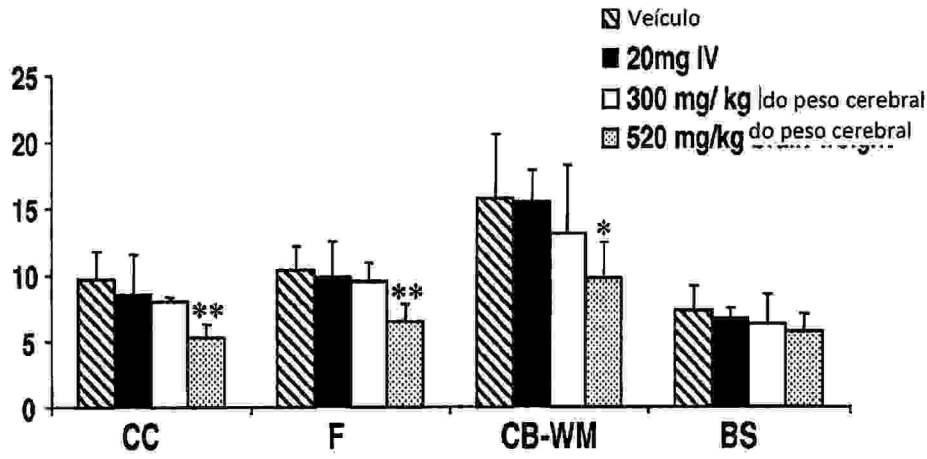


Fig. 22

Veículo , necropsia principal

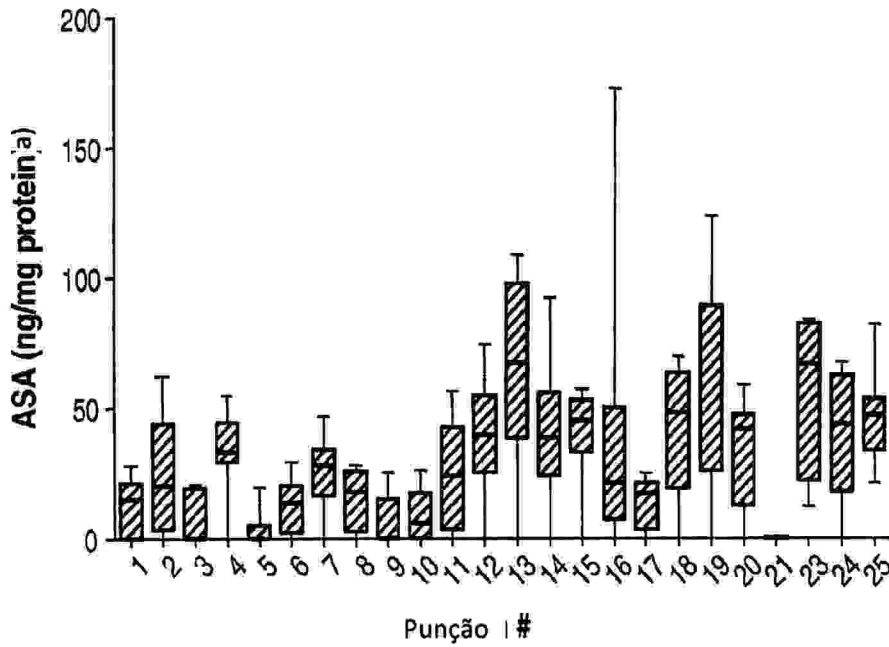


Fig. 23

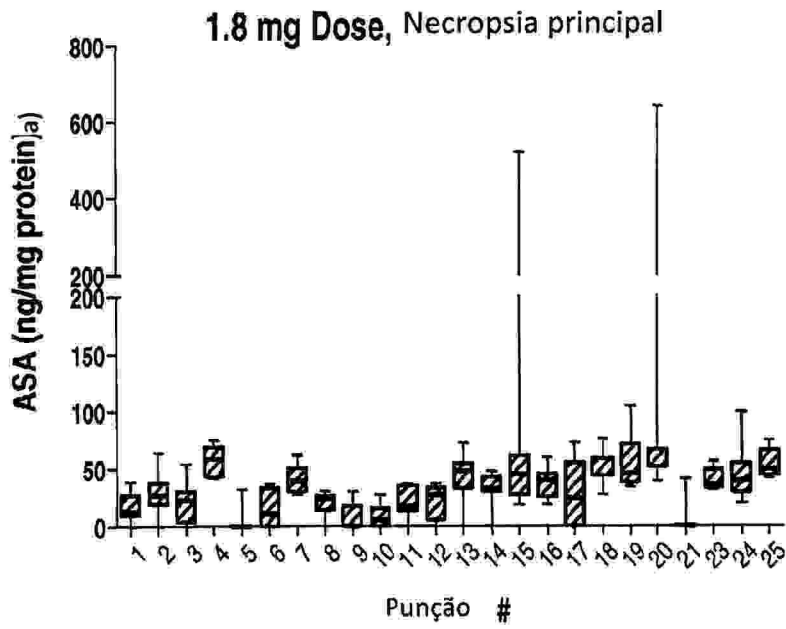


Fig. 24

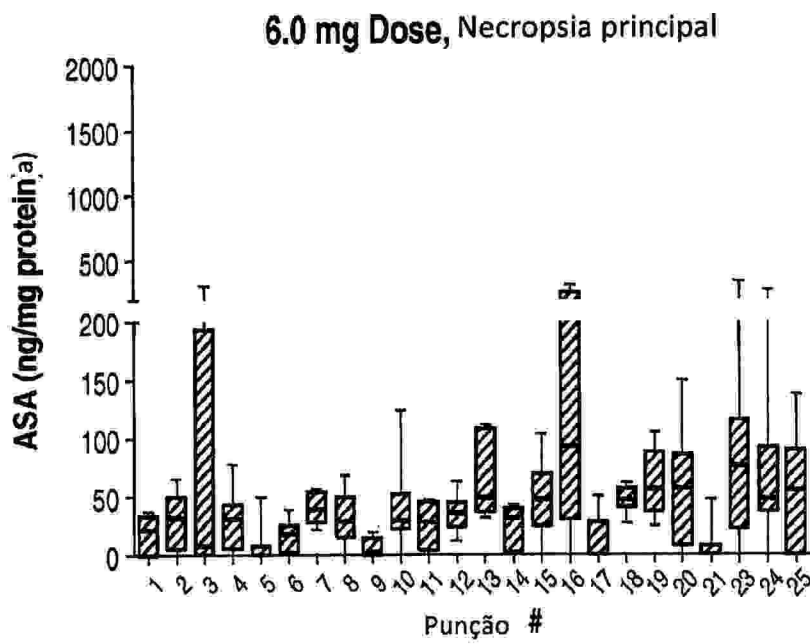


Fig. 25

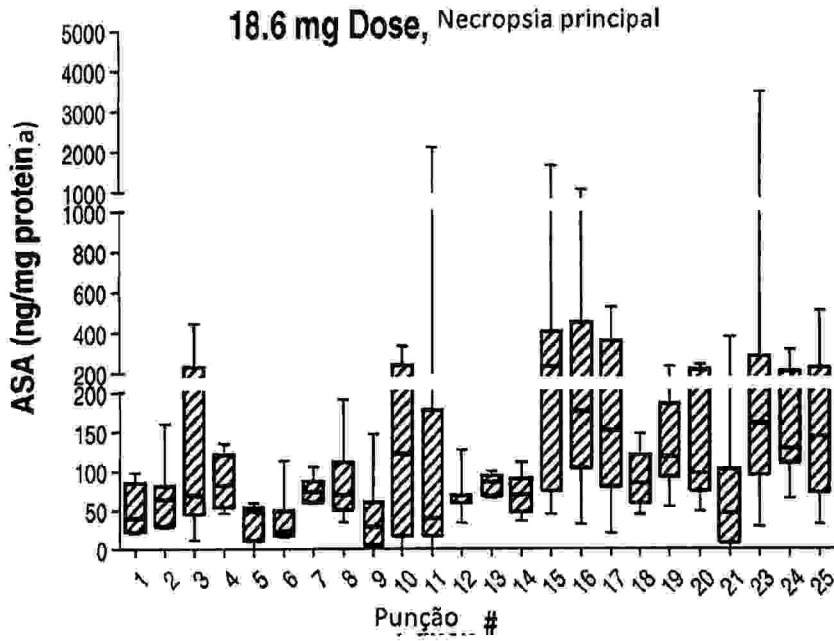


Fig. 26

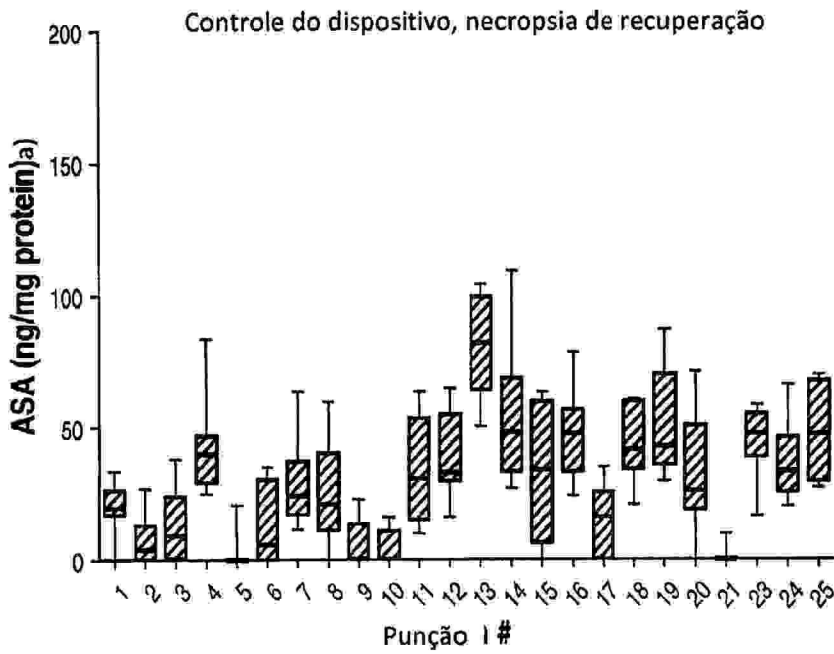
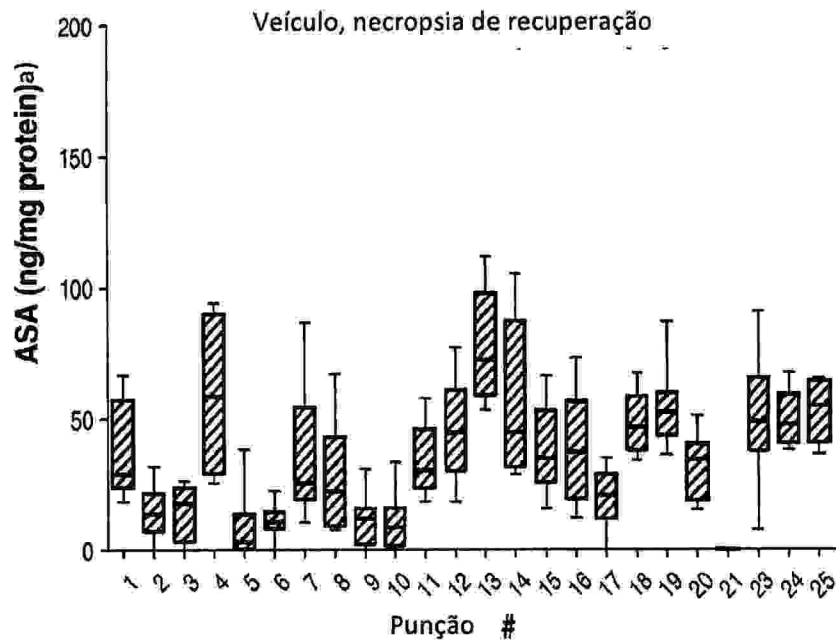
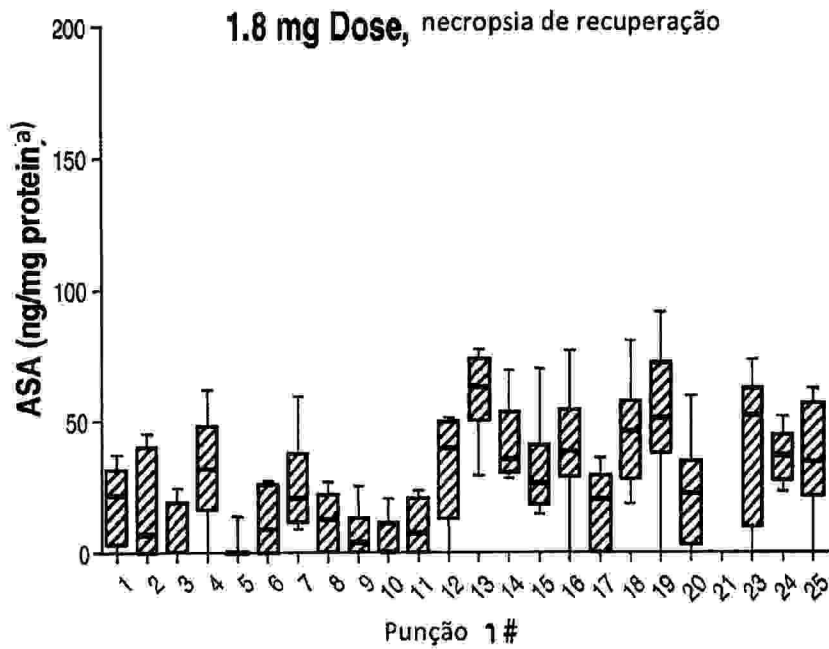
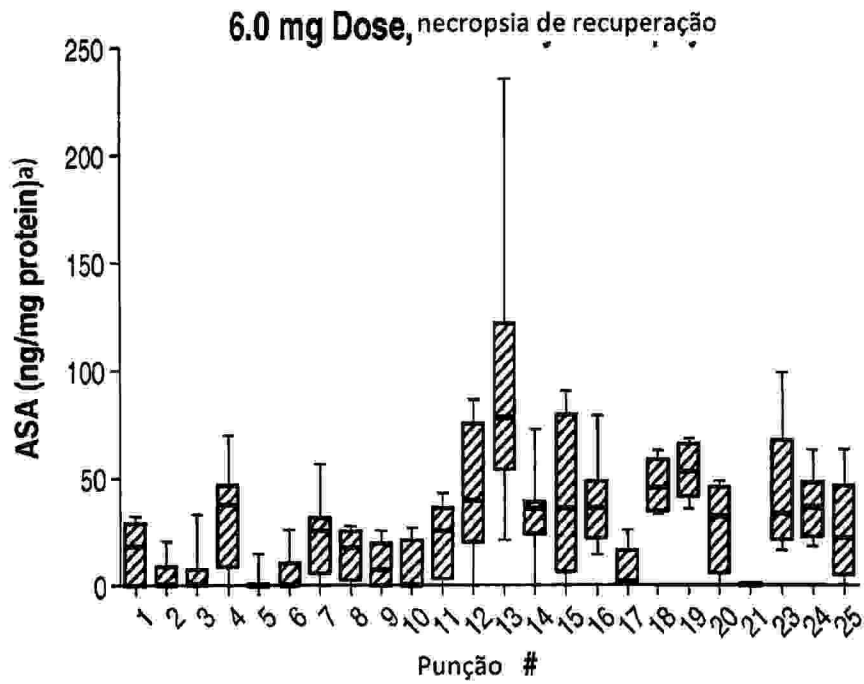
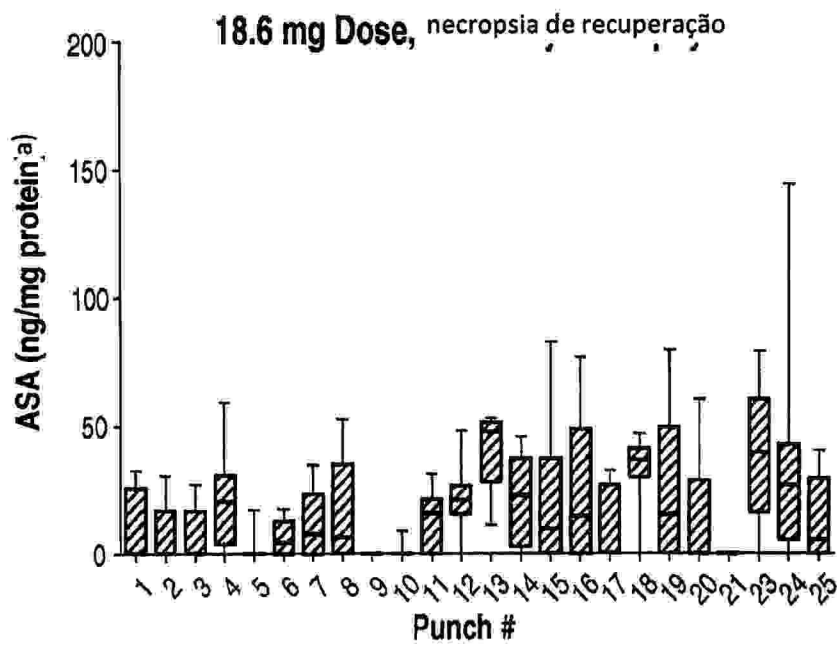
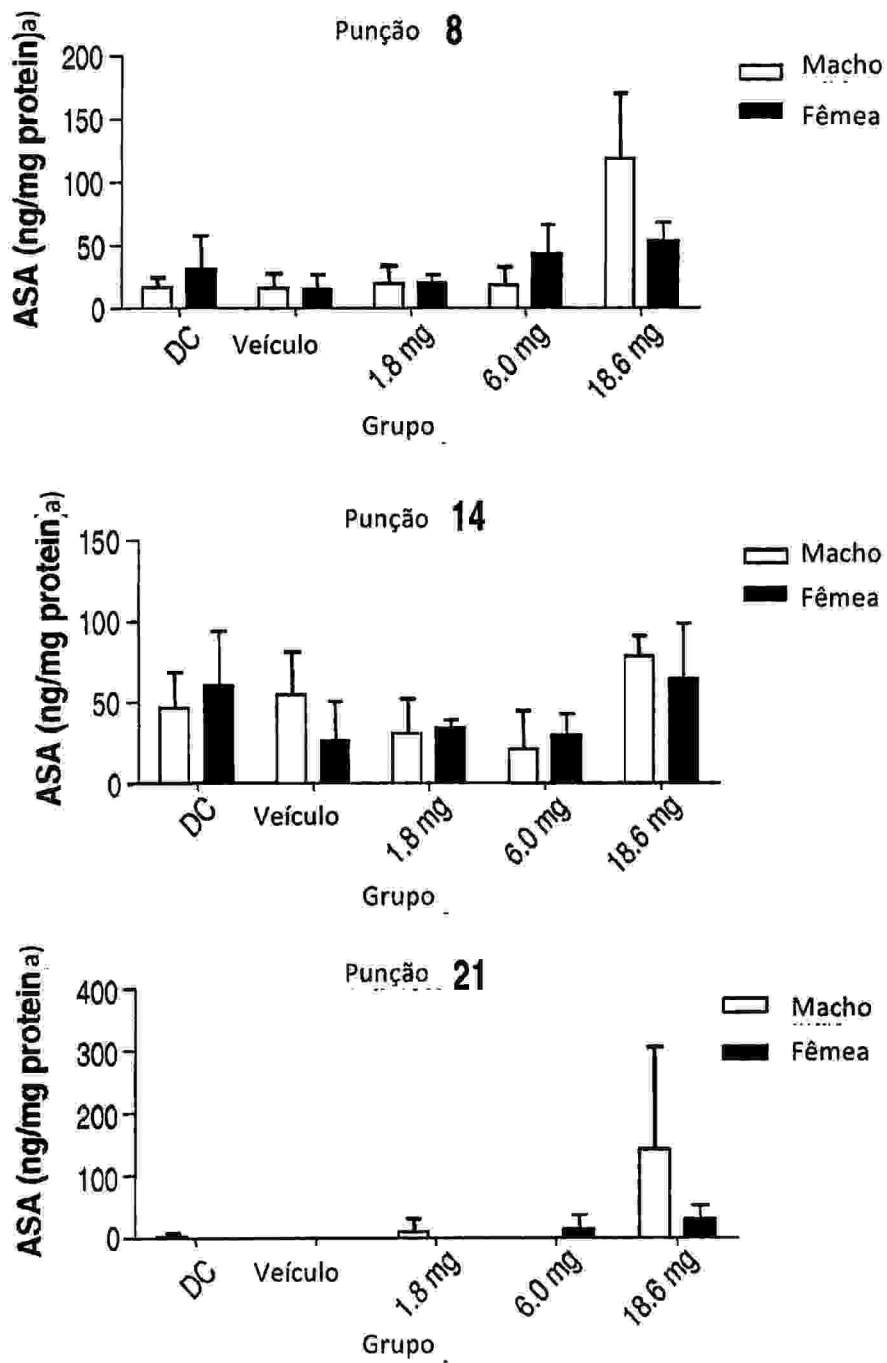


Fig. 27

**Fig. 28****Fig. 29**

**Fig. 30****Fig. 31**

**Fig. 32**

a)

Punção
Macho
Fêmea

a)

Punção
Macho
Fêmea

Veícul

o

Grupo

Veícul

o

Grupo

a)

Punção
Macho
Fêmea

a)

Punção
Macho
Fêmea

Veícul

o

Grupo

Veícul

o

Grupo

a)

Punção
Macho
Fêmea

Veícul

o

Grupo

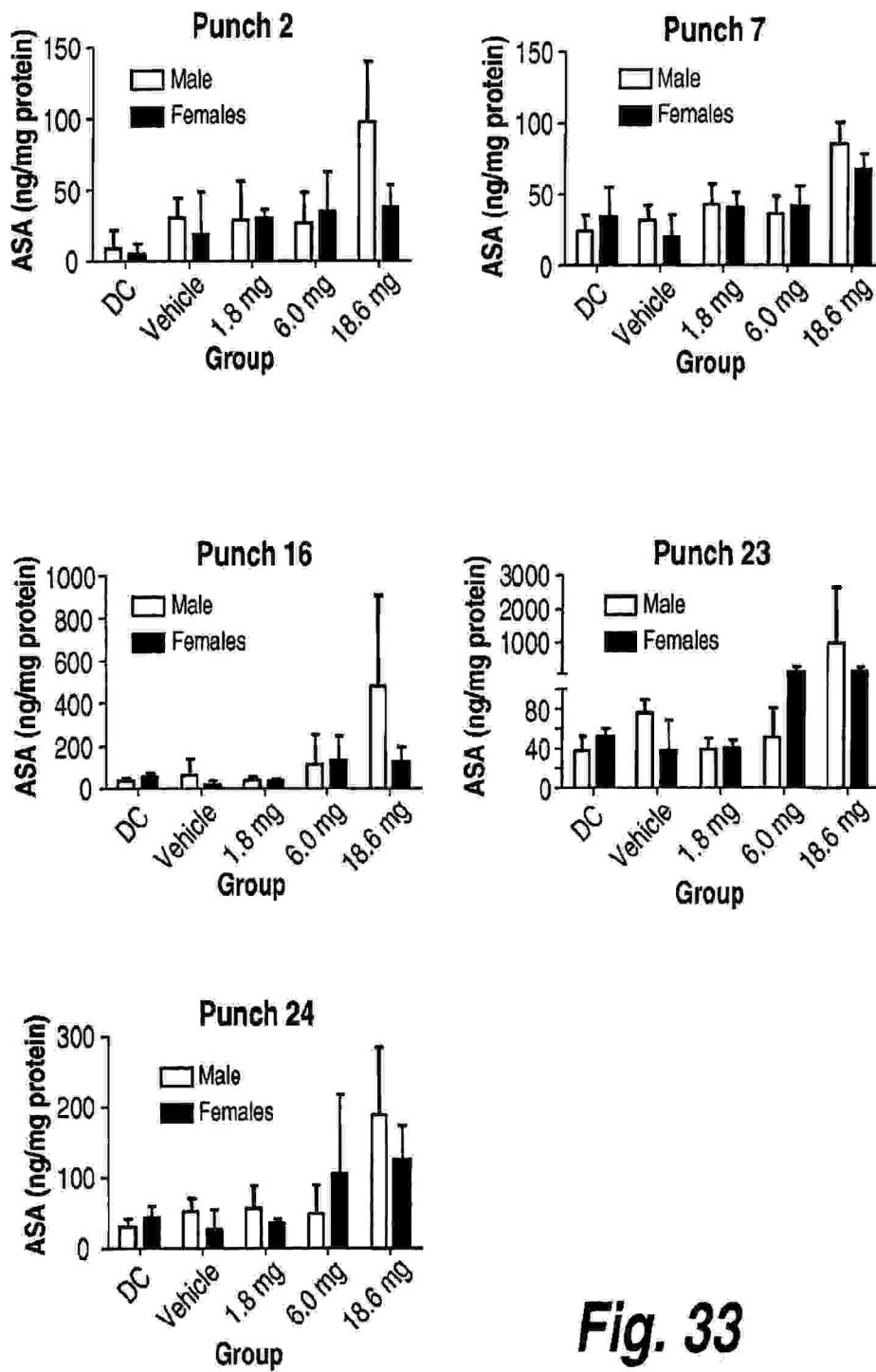


Fig. 33

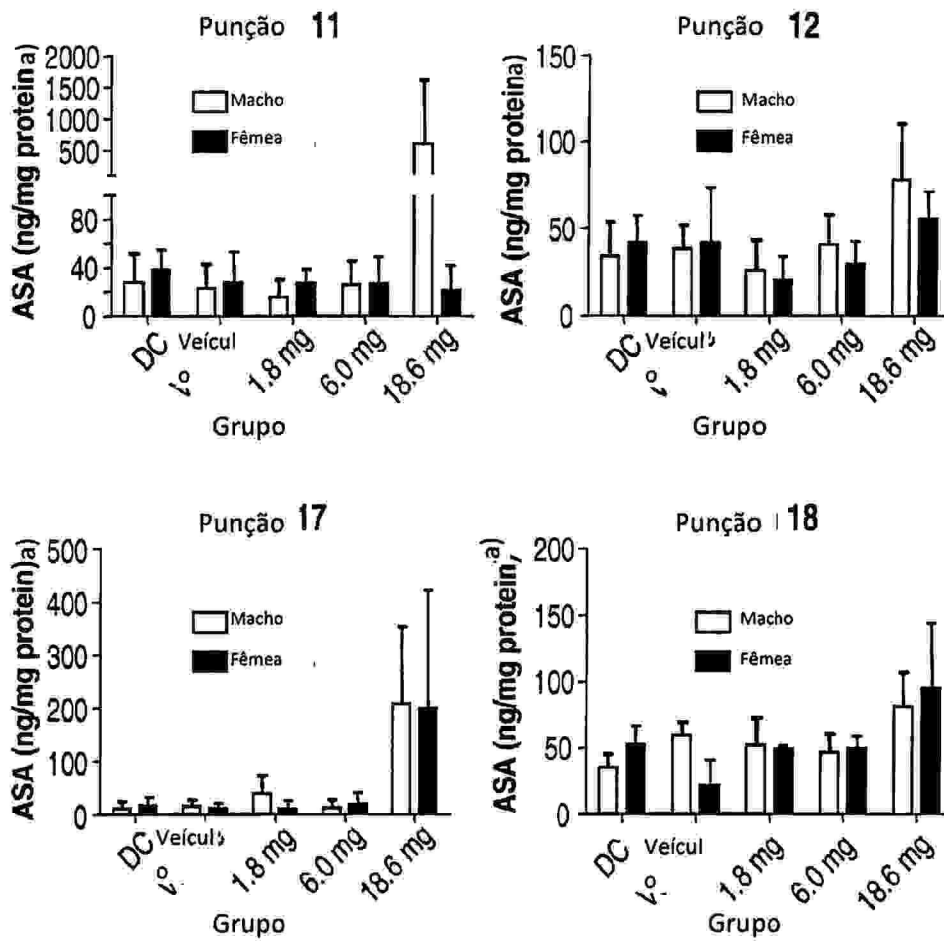


Fig. 34

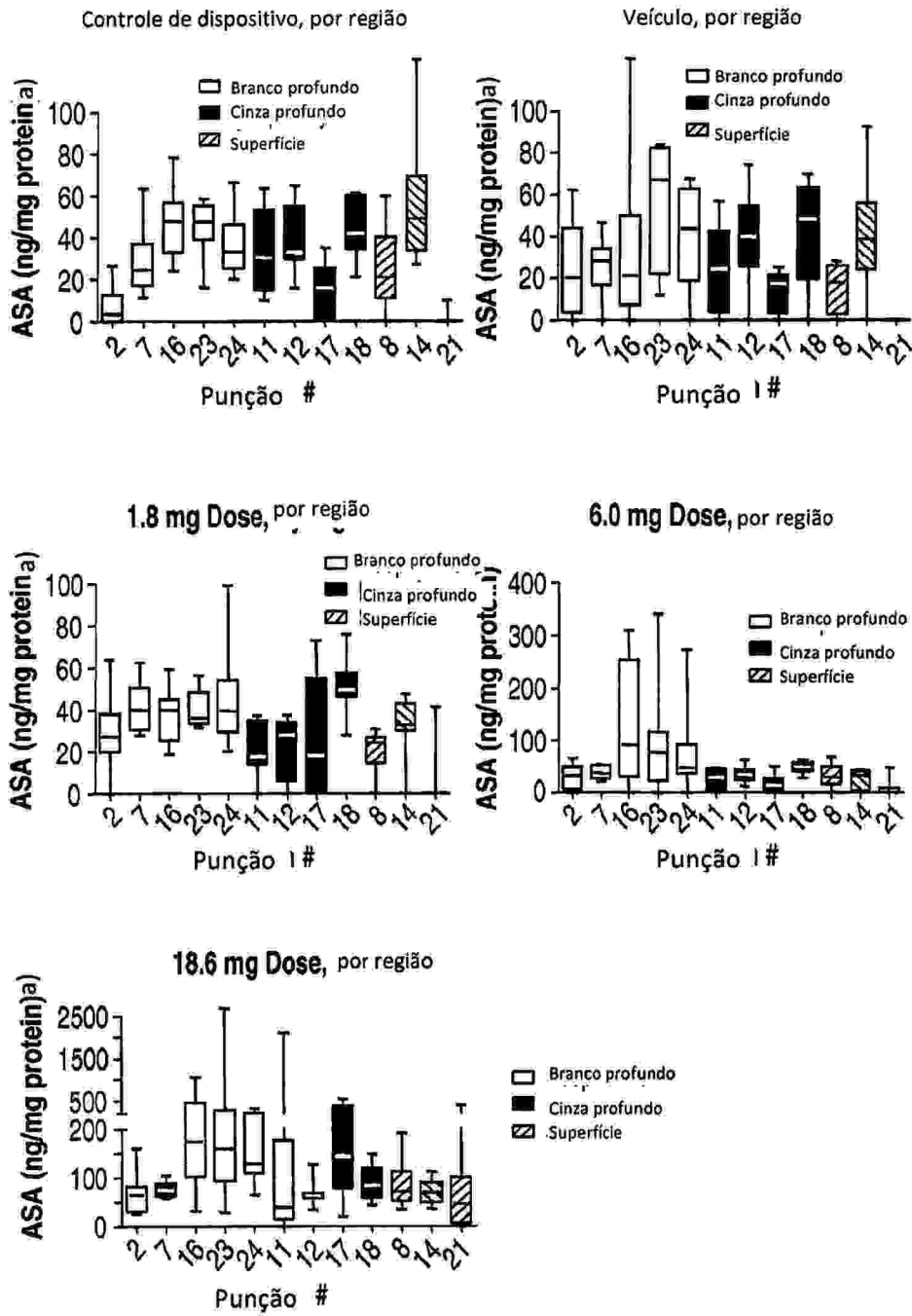


Fig. 35

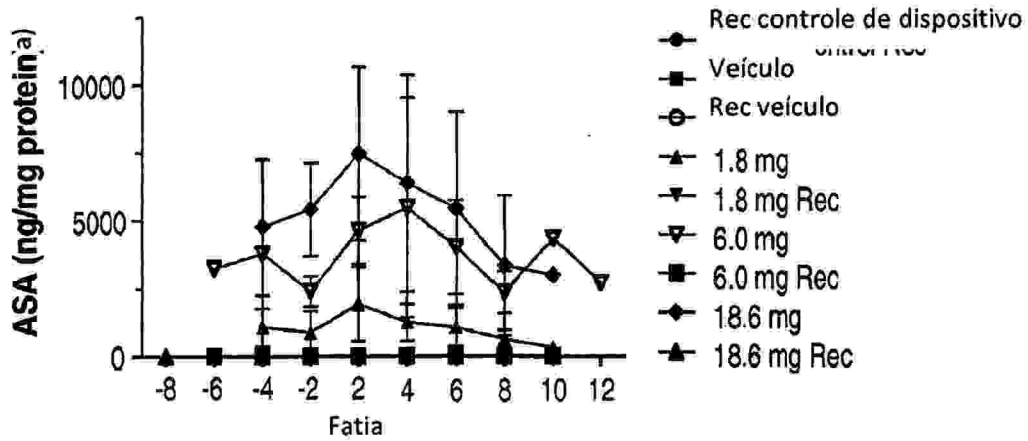
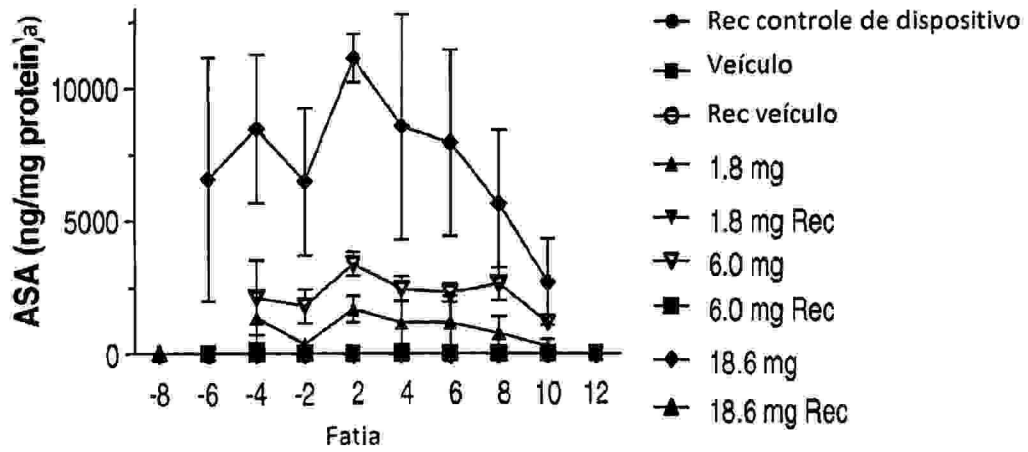


Fig. 36

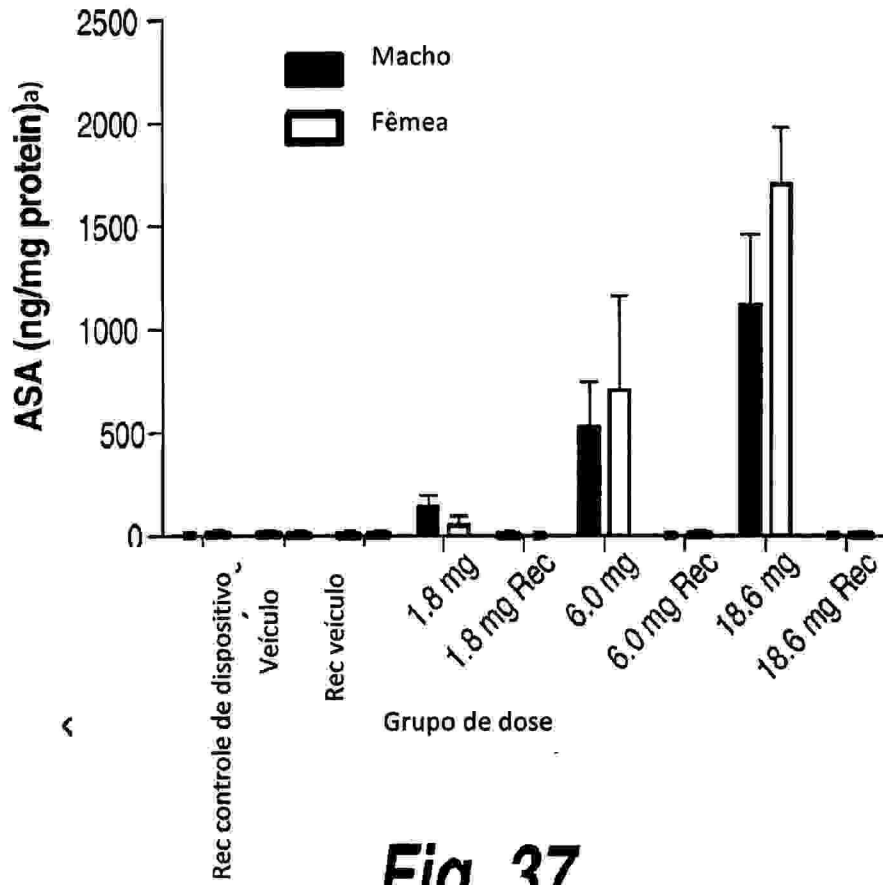
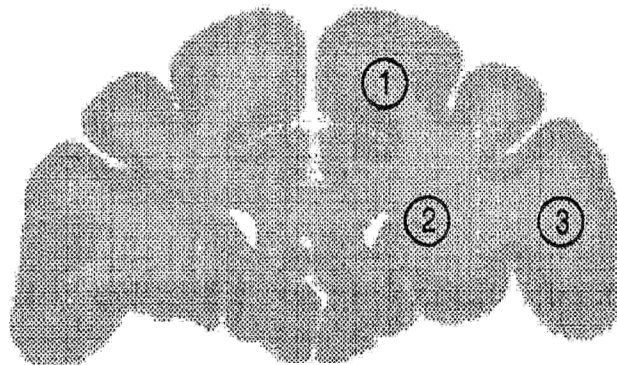


Fig. 37

62-133

#458

Fatia 4



Marcação anatômica

1. Subcortical WM
2. Periventricular WM e matéria branca profunda
3. Subcortical WM

1 cm

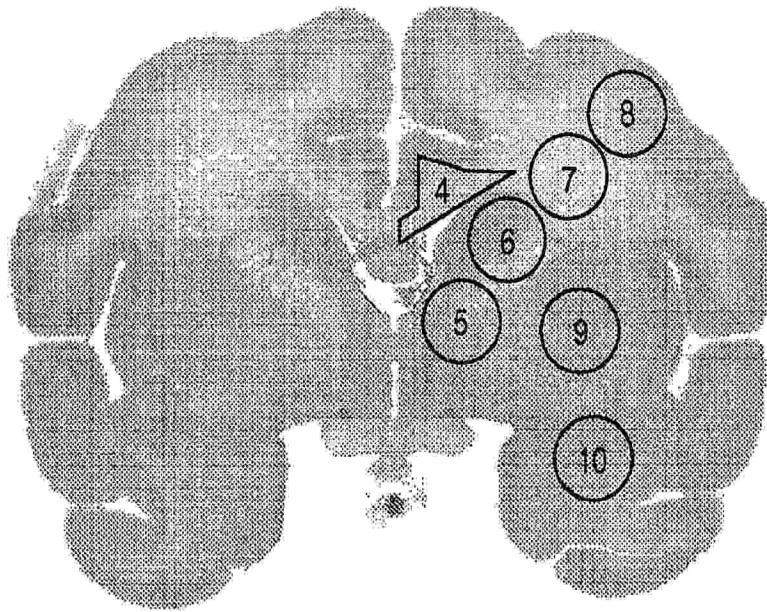
Fig. 38

Fatia

62-133

Slice 6

#780



1 cm

Marcação anatômica

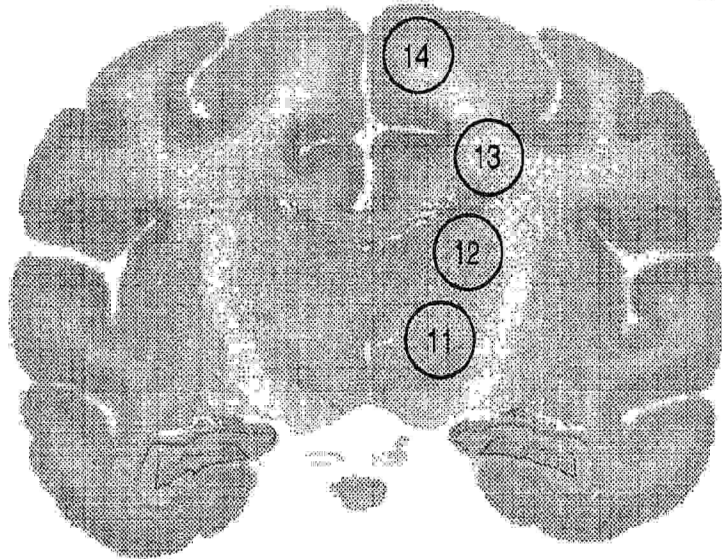
- 4. Corpo caloso e pericallosal subcortical MB
- 5. cápsula interna, GPI
- 6. cápsula interna, núcleo caudado
- 7. matéria branca profunda
- 8. subcortical MB e córtex
- 9. putamen
- 10. temporal subcortical MB e córtex

Fig. 39

62-133

Slice 8

#962



1 cm

Marcação anatômica

11. matéria cinza profunda

12. matéria cinza profunda

13. *MB* profunda I, Frontal periventricular & subcortical

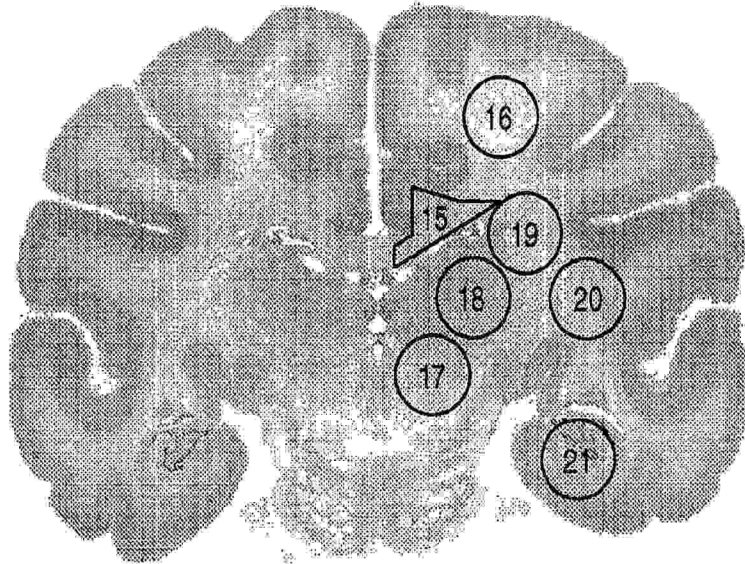
14. Subcortical branca e I cortex, superficial sagittal

Fig. 40

62-133

Slice 10

#1102



1 cm

Marcação anatômica

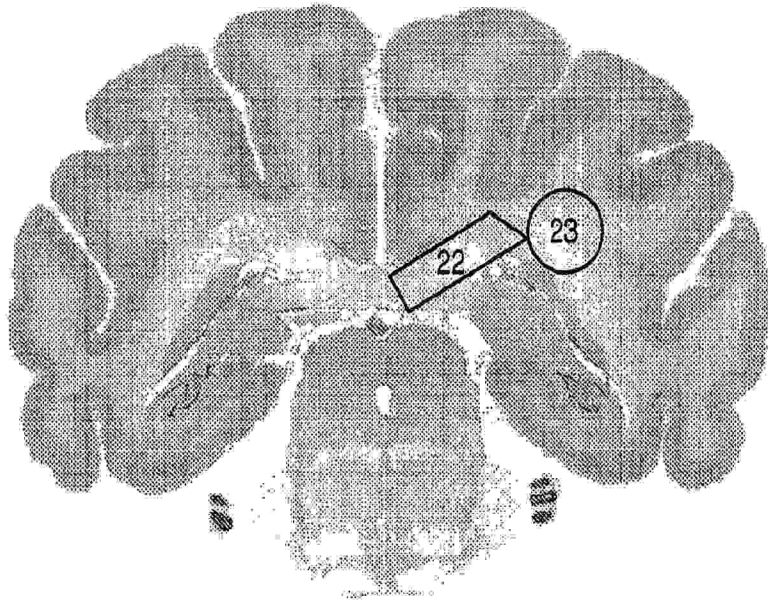
- 15. Corpo caloso e pericallosal subcortical MB
- 16. Subcortical profunda MB
- 17. Cinza profunda
- 18. Cinza profunda
- 19. Periventricular MB
- 20. Subcortical MB |
- 21. Hipocampo

Fig. 41

62-133

Slice 12

#1240



1 cm

Marcação anatômica

22. Corpo caloso

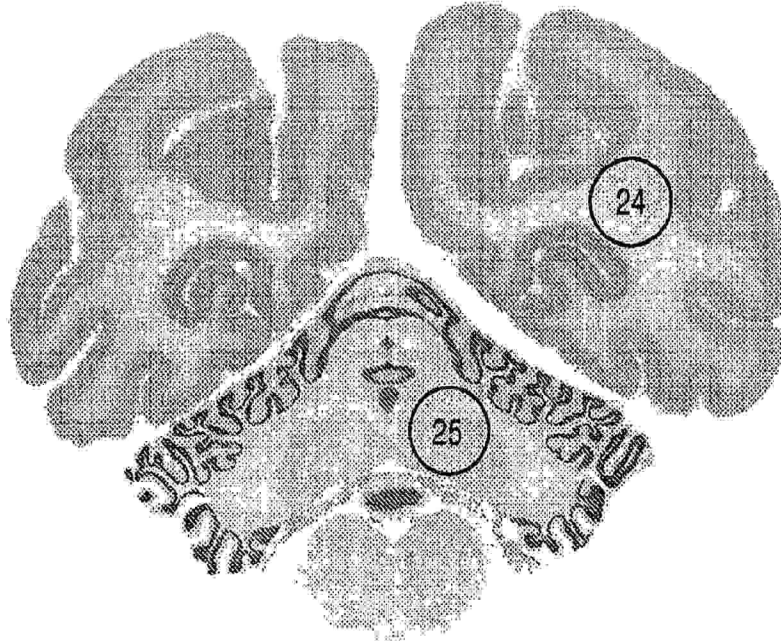
23. MB profunda

Fig. 42

62-133

Fatia : 14

#1486



1 cm

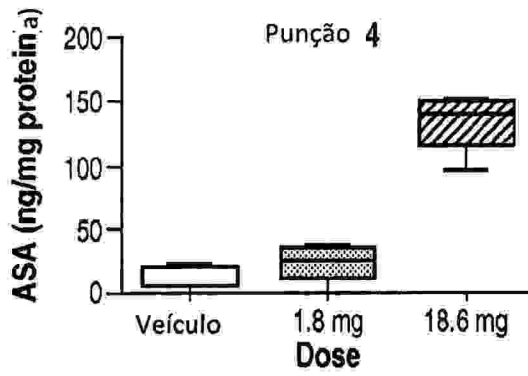
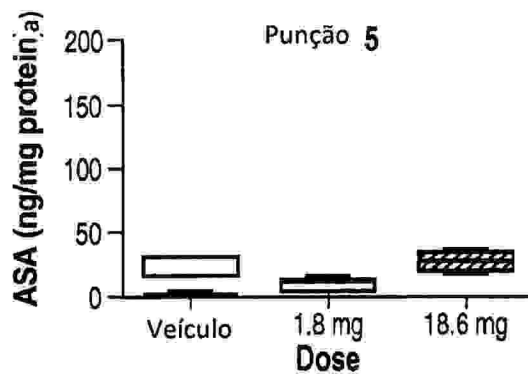
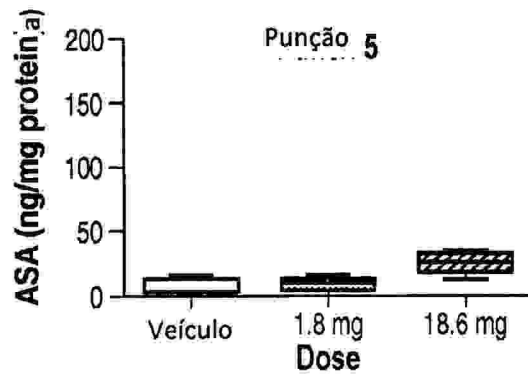
Marcação anatômica

24. Subcortical MB, lobo occipital :

25. Matéria branca cerebelar, incluindo núcleo dentato (MB)

Fig. 43

Marcação anatômica

**Fig. 44A****Fig. 44B****Fig. 44C**

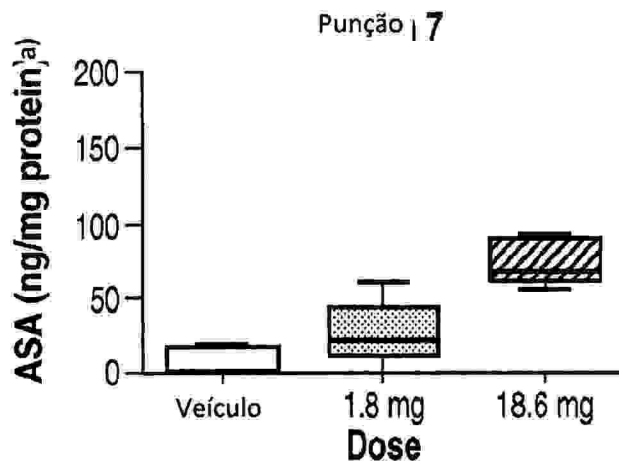


Fig. 44D

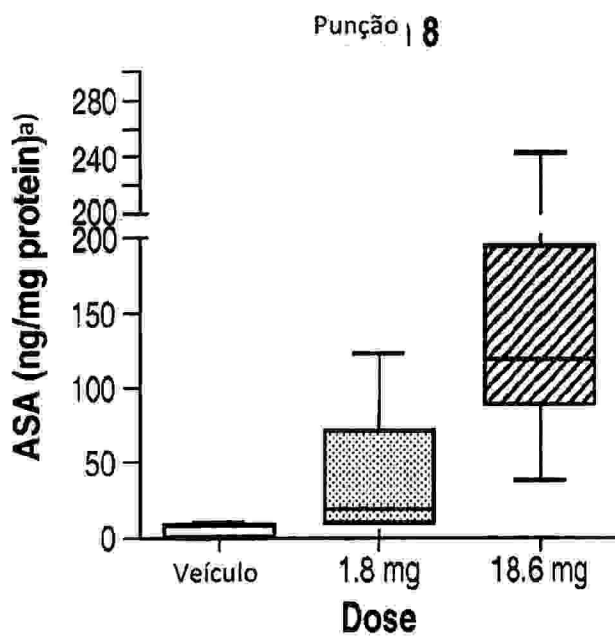
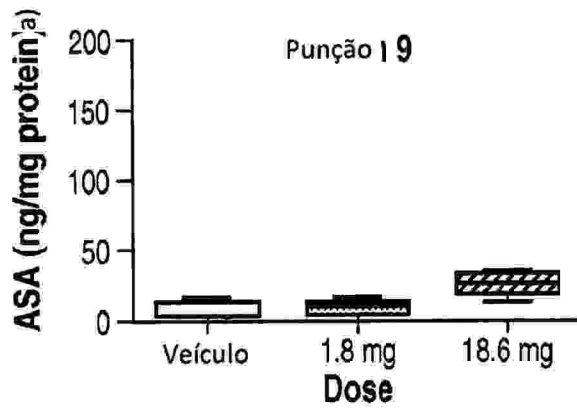
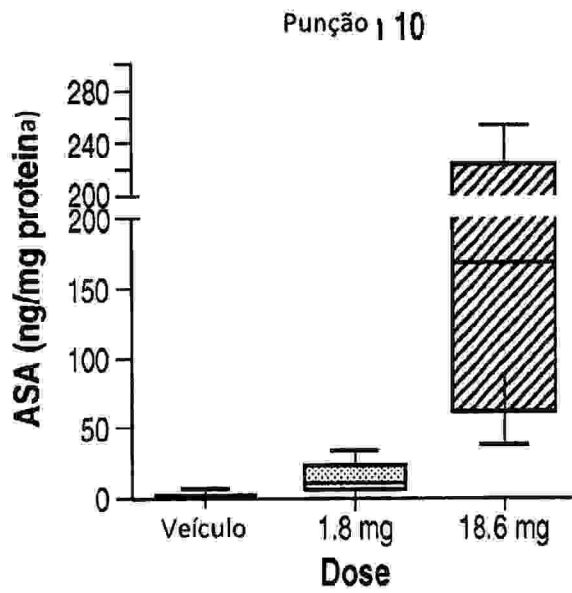


Fig. 44E

**Fig. 44F****Fig. 44G**

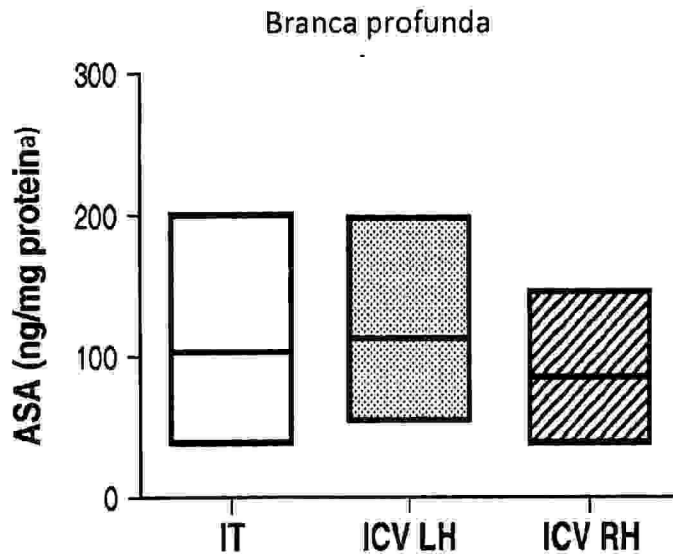


Fig. 45A

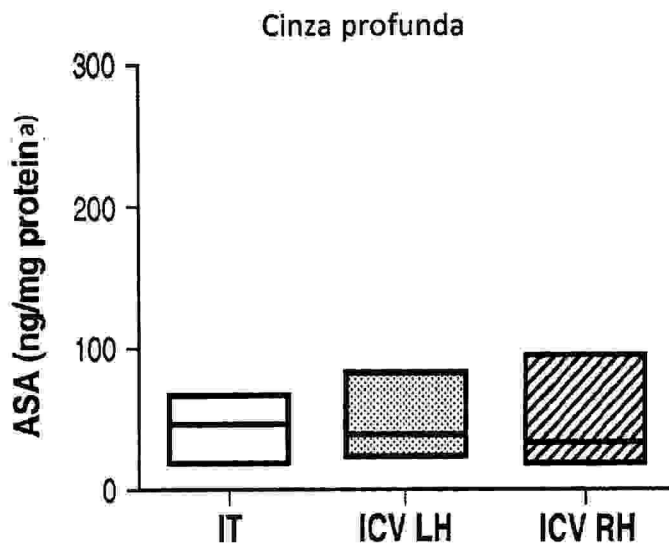


Fig. 45B

a)

Dose normal

Punção

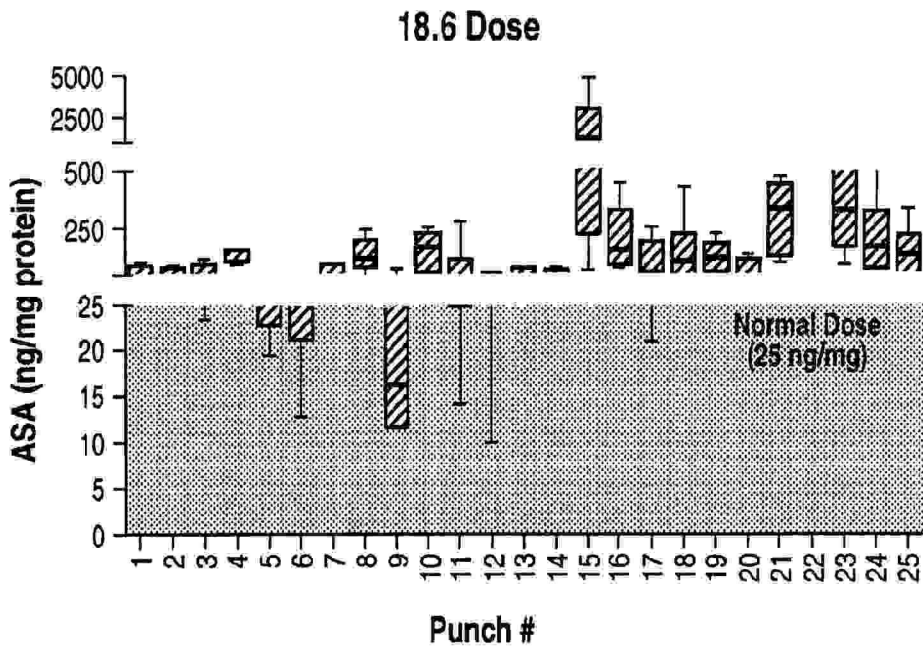


Fig. 46A

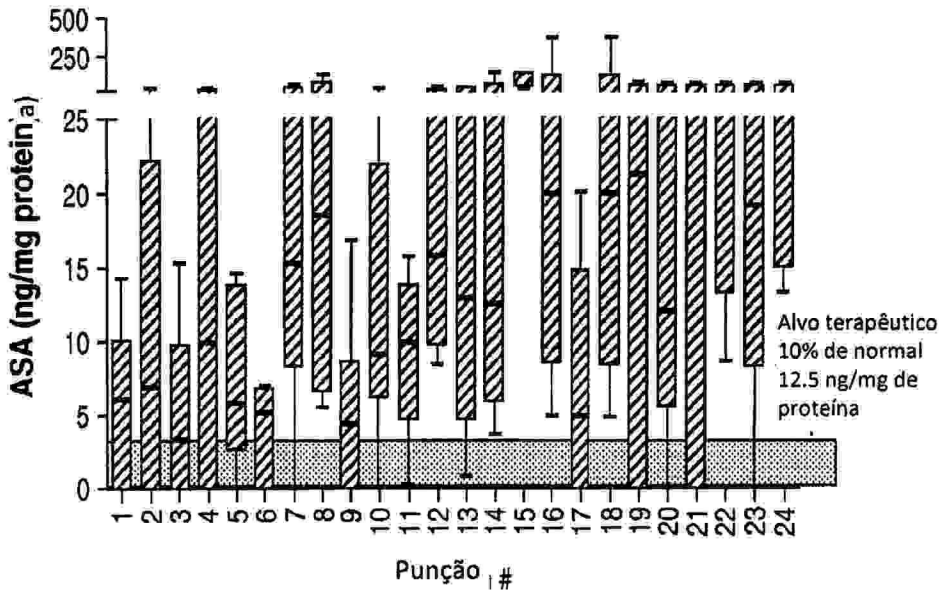
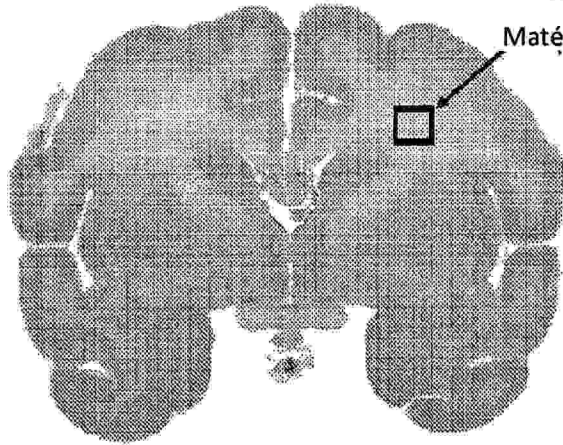


Fig. 46B

62-133

#780

Matéria branca profunda



1 cm

Fig. 47A

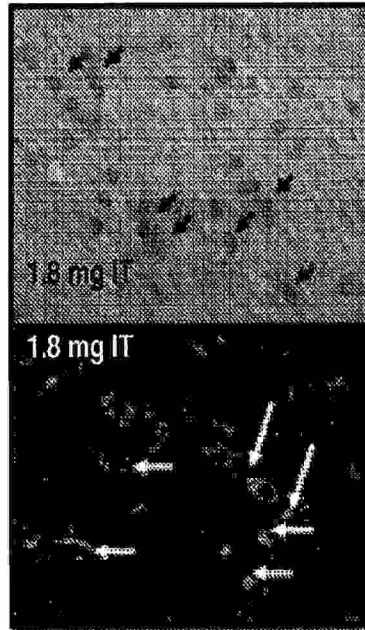
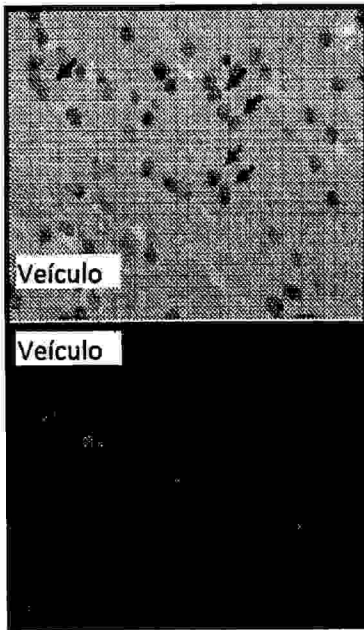


Fig. 47B

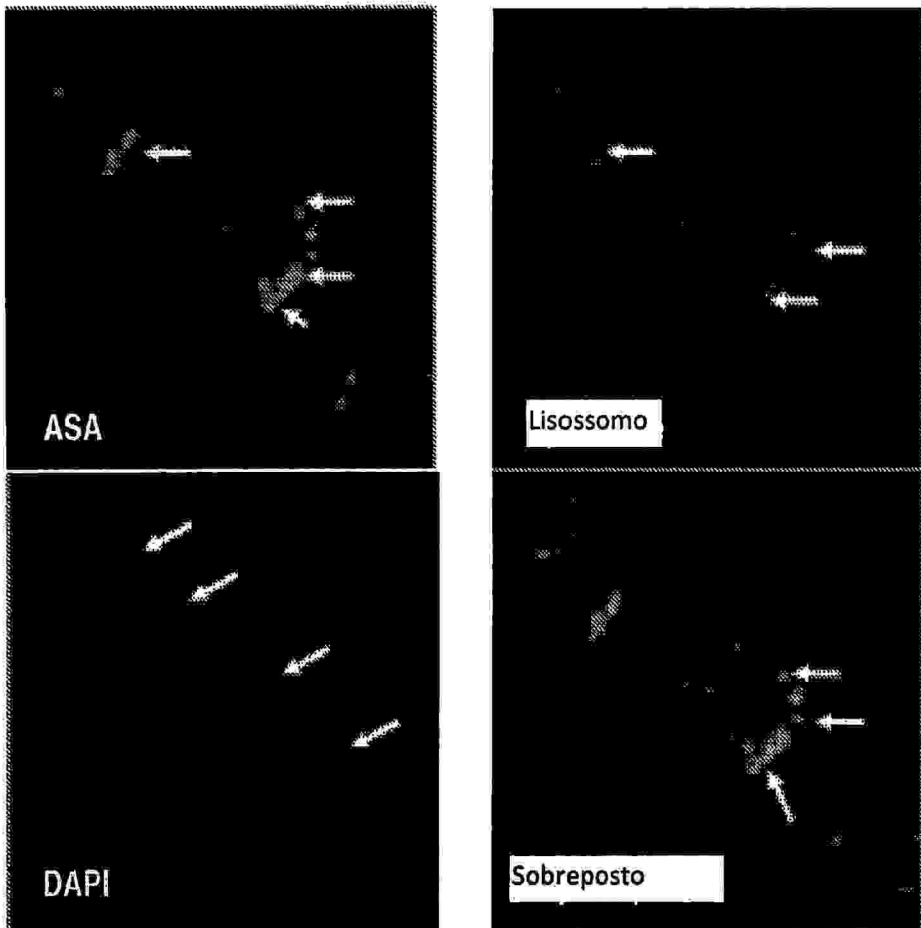


Fig. 47C

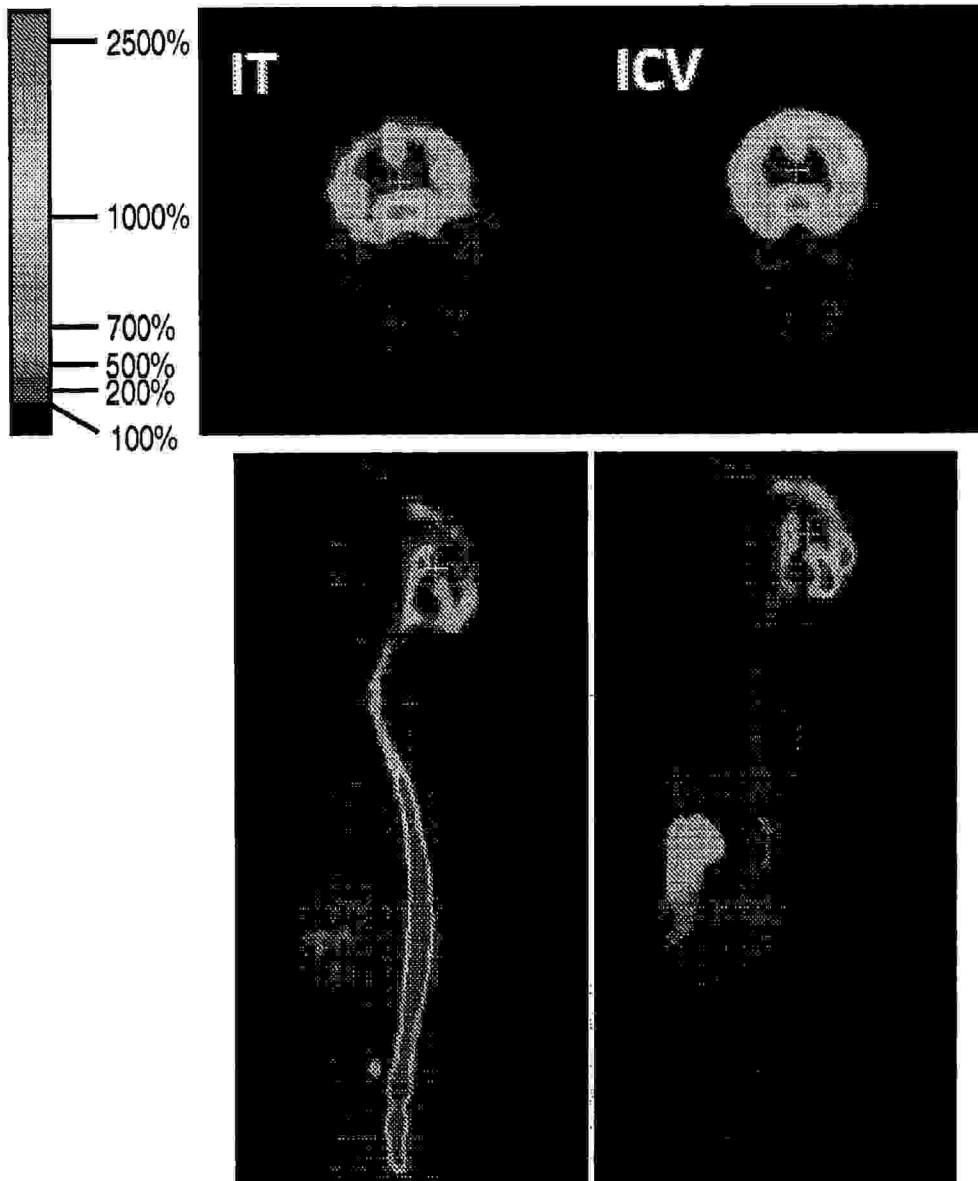


Fig. 48

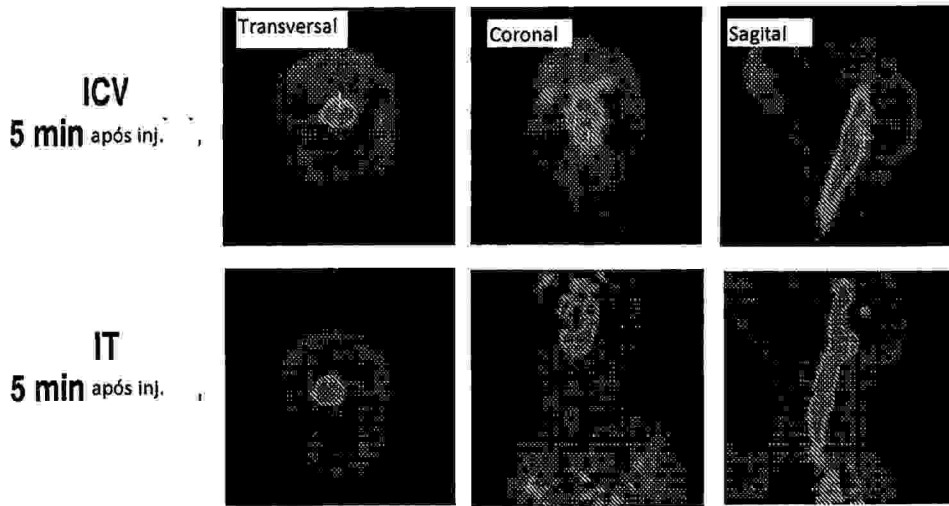


Fig. 49

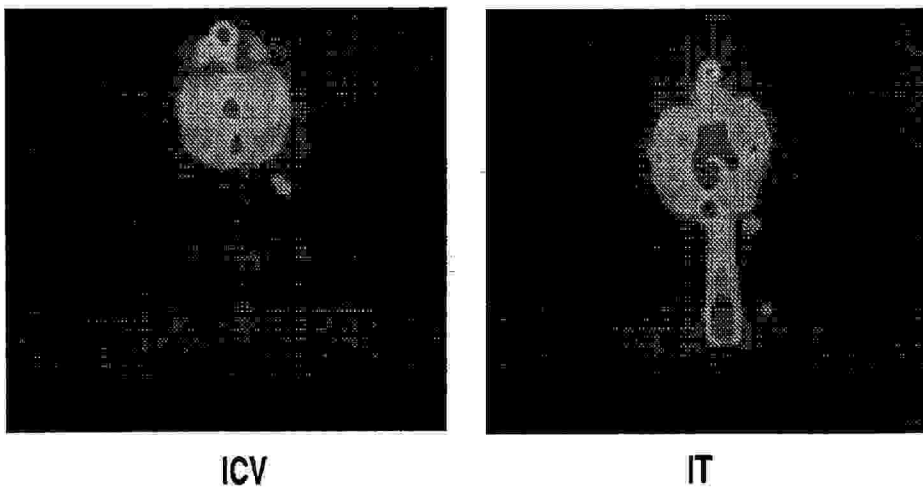


Fig. 50

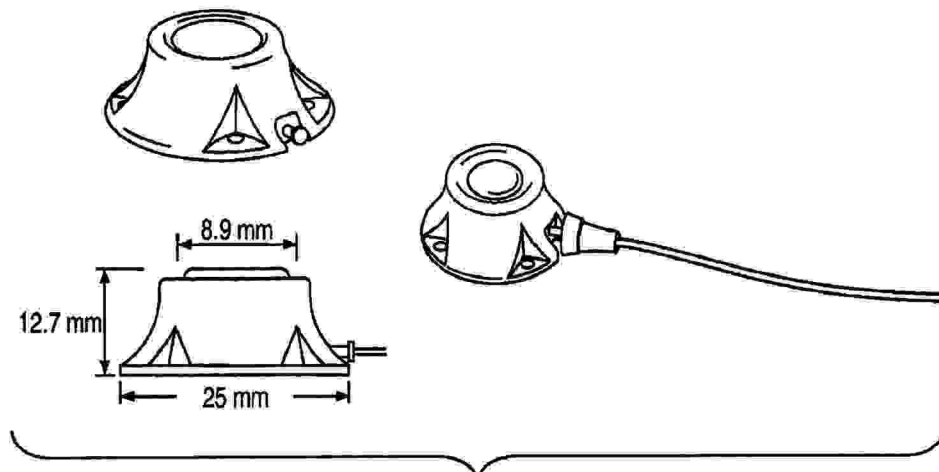


Fig. 51

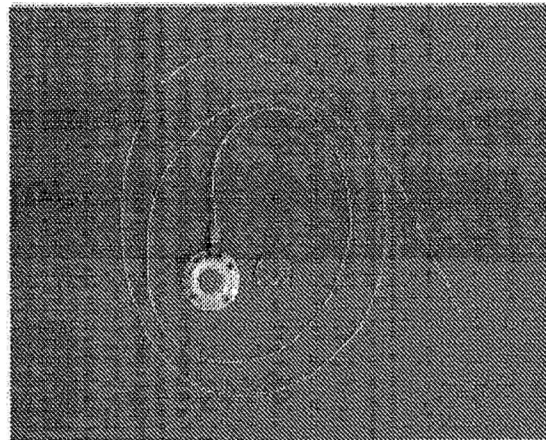


Fig. 52

Permite administração em domicílio para CNS ERT com
Desenvolvimento e Engenharia mínima

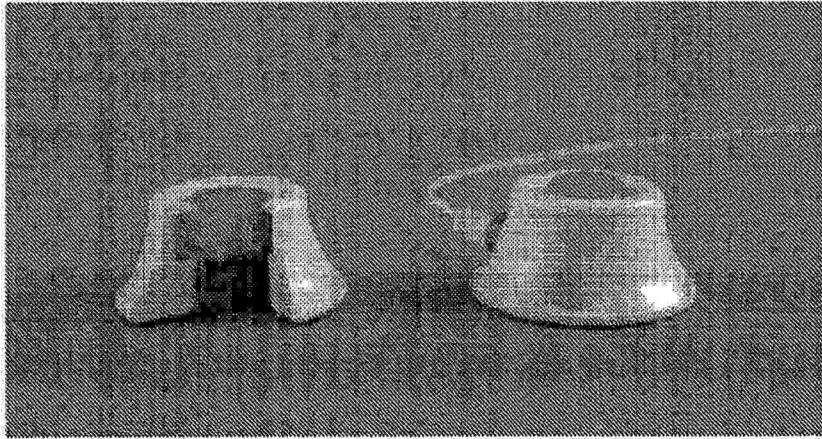


Fig. 53

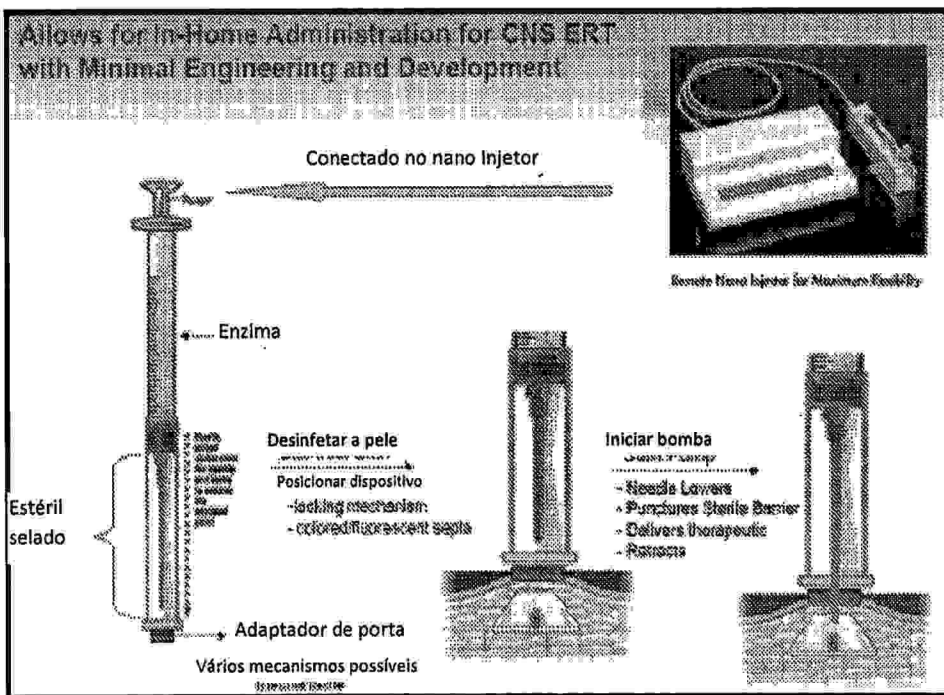


Fig. 54

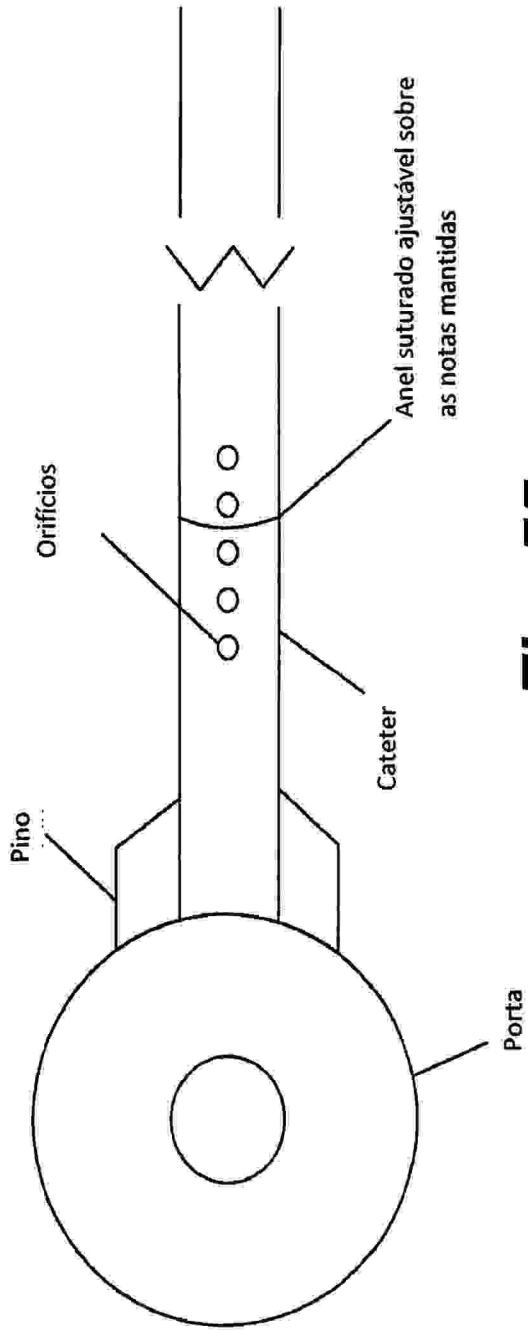
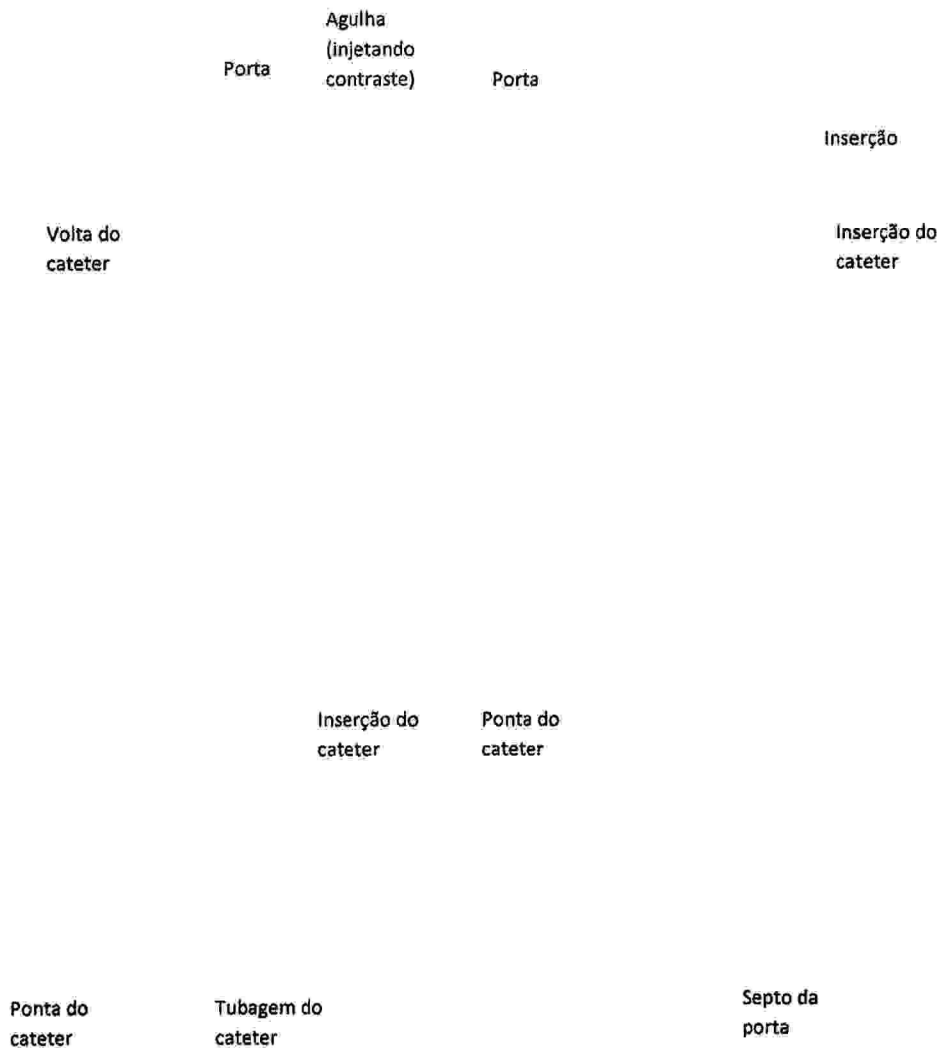


Fig. 55



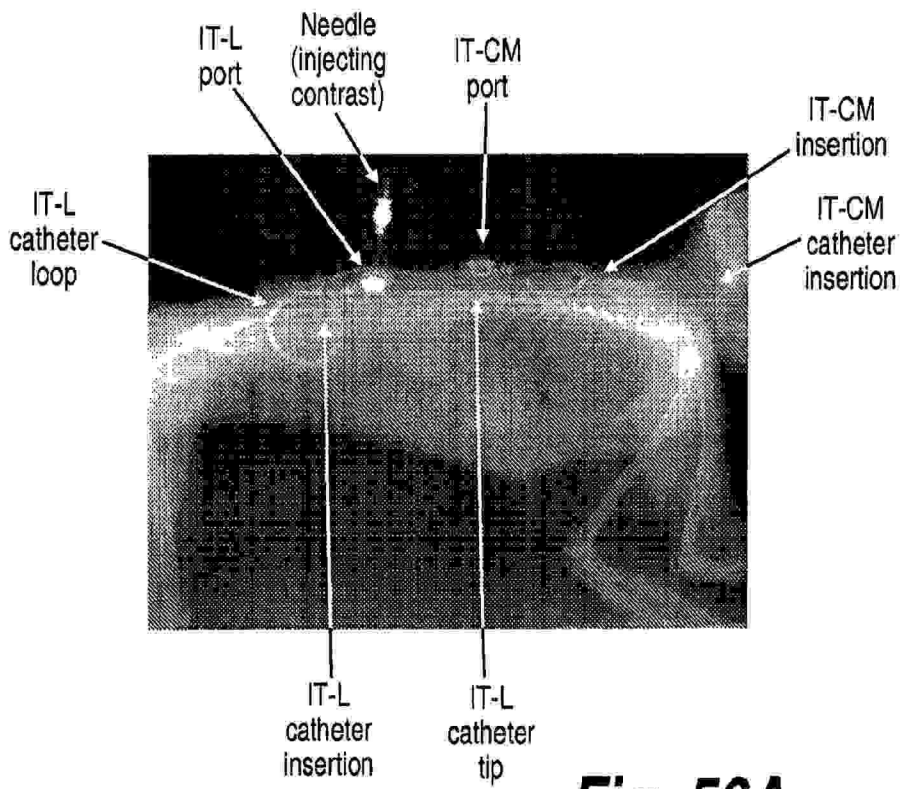


Fig. 56A

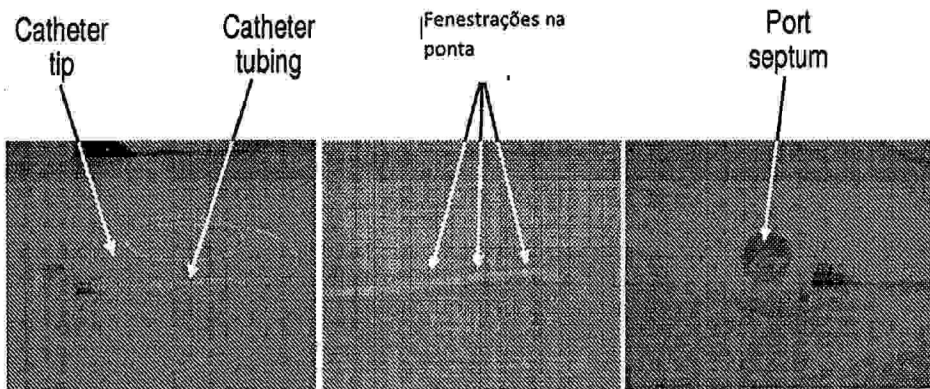


Fig. 56B

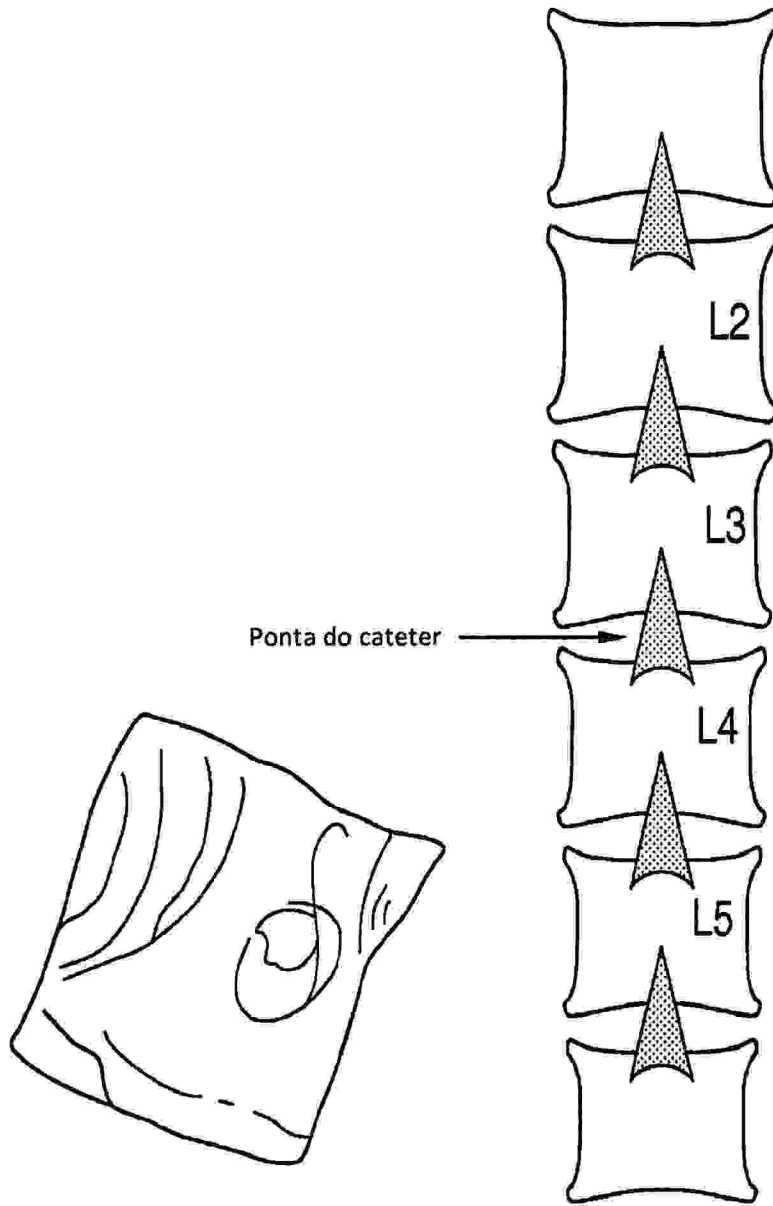


Fig. 56C