



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 754 776**

⑮ Int. Cl.:

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

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2011 PCT/US2011/041926**  
⑦ Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2011 WO11163650**  
⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2011 E 11799037 (4)**  
⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2585104**

⑮ Título: **Métodos y composiciones para la administración SNC de arilsulfatasa A**

⑩ Prioridad:

**24.01.2011 US 201161435710 P  
09.06.2011 US 201161495268 P  
15.04.2011 US 201161476210 P  
25.06.2010 US 358857 P  
11.02.2011 US 201161442115 P  
29.09.2010 US 387862 P  
01.07.2010 US 360786 P**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.04.2020**

⑯ Titular/es:

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

⑯ Inventor/es:

**SALAMAT-MILLER, NAZILA;  
TAYLOR, KATHERINE;  
CAMPOLIETO, PAUL;  
SHAHROKH, ZAHRA;  
PAN, JING;  
CHARNAS, LAWRENCE;  
WRIGHT, TERESA LEAH y  
CALIAS, PERICLES**

⑯ Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 754 776 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para la administración SNC de arilsulfatasa A

5 **ANTECEDENTES**

[0001] La terapia de reemplazo de enzimas (ERT) implica la administración sistémica de naturales o de manera recombinante derivados de proteínas y/o enzimas a un sujeto. Las terapias aprobadas se administran típicamente a sujetos por vía intravenosa y generalmente son efectivas para tratar los síntomas somáticos de la deficiencia enzimática subyacente. Como resultado de la distribución limitada de la proteína y/o enzima administrada por vía intravenosa en las células y tejidos del sistema nervioso central (SNC), el tratamiento de enfermedades que tienen una etiología del SNC ha sido especialmente difícil debido a las proteínas y/o enzimas administradas por vía intravenosa. Las enzimas no cruzan adecuadamente la barrera hematoencefálica (BBB). Por ejemplo, el documento US 2009/017005 describe una formulación acuosa humana  $\alpha$ -1-iduronidasa (rhIDU) para su uso en el tratamiento de mucopolisacaridosis tipo 1 (síndrome de Hurler). La composición contiene 0,58 mg/ml de iduronidasa y fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM y 0,001% de polisorbato 80 como excipientes.

[0002] La barrera hematoencefálica (BBB) es un sistema estructural compuesta de células endoteliales que funciona para proteger el sistema nervioso central (SNC) a partir de sustancias perjudiciales en la corriente sanguínea, tales como bacterias, macromoléculas (por ejemplo, proteínas) y otros moléculas hidrofílicas, al limitar la difusión de tales sustancias a través del BBB y hacia el líquido cefalorraquídeo subyacente (LCR) y el SNC.

[0003] Hay varias formas de eludir el BBB para mejorar el suministro cerebral de un agente terapéutico que incluye inyección intracraneal directa, permeabilización transitoria del BBB y modificación del agente activo para alterar la distribución del tejido. La inyección directa de un agente terapéutico en el tejido cerebral evita la vasculatura por completo, pero sufre principalmente el riesgo de complicaciones (infección, daño tisular, respuesta inmune) ocasionadas por las inyecciones intracraneales y la mala difusión del agente activo desde el sitio de administración. Hasta la fecha, la administración directa de proteínas en la sustancia cerebral no ha logrado un efecto terapéutico significativo debido a las barreras de difusión y al volumen limitado de terapia que se puede administrar. La difusión asistida por convección se ha estudiado mediante catéteres colocados en el parénquima cerebral mediante infusions lentas a largo plazo (Bobo, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91, 2076-2080 (1994); Nguyen, et al. J. Neurosurg. 98, 584-590 (2003)), pero actualmente no hay terapias aprobadas que usen este enfoque para la terapia a largo plazo. Además, la colocación de catéteres intracerebrales es muy invasiva y menos deseable como alternativa clínica.

[0004] Inyección intratecal (IT), o administración de proteínas al líquido cefalorraquídeo (LCR), también se ha intentado, pero aún no ha dado el éxito terapéutico. Un desafío importante en este tratamiento ha sido la tendencia del agente activo a unir muy fuertemente el revestimiento ependimario del ventrículo, lo que evitó su posterior difusión. Actualmente, no existen productos aprobados para el tratamiento de enfermedades genéticas cerebrales mediante administración directa al CSF.

[0005] De hecho, muchos creyeron que la barrera a la difusión en la superficie del cerebro, así como la falta de eficaces y métodos de entrega convenientes, eran un obstáculo demasiado grande para lograr el efecto terapéutico adecuado en el cerebro para cualquier enfermedad.

[0006] Muchos trastornos de almacenamiento lisosomal afectan el sistema nervioso y por lo tanto demuestran desafíos únicos en el tratamiento de estas enfermedades con terapias tradicionales. A menudo hay una gran acumulación de glicosaminoglicanos (GAG) en las neuronas y meninges de las personas afectadas, lo que lleva a diversas formas de síntomas del SNC. Hasta la fecha, ningún síntoma del SNC resultante de un trastorno lisosómico se ha tratado con éxito por ningún medio disponible.

[0007] Por lo tanto, sigue habiendo una gran necesidad de administrar eficazmente agentes terapéuticos al cerebro. Más particularmente, existe una gran necesidad de un suministro más efectivo de agentes activos al sistema nervioso central para el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico.

55 **SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

[0008] La presente invención proporciona un enfoque eficaz y menos invasiva para la entrega directa de agentes terapéuticos para el sistema nervioso central (SNC). La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento inesperado de que una enzima de reemplazo (arilsulfatasa A (ASA)) para una enfermedad de almacenamiento lisosomal (MLD) se puede introducir directamente en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de un sujeto que necesita tratamiento en una alta concentración (mayor de 10 mg/ml) de tal manera que la enzima se difunde de manera efectiva y extensa a través de varias superficies y penetra en varias regiones del cerebro, incluidas las regiones del cerebro profundo. Más sorprendentemente, los presentes inventores han demostrado que dicho suministro de alta concentración de proteínas se puede realizar usando soluciones salinas simples o formulaciones basadas en tampones y sin inducir efectos adversos sustanciales, como una respuesta inmune severa, en el sujeto. Por lo tanto,

la presente invención proporciona un enfoque altamente eficiente, clínicamente deseable y amigable para el paciente para el suministro directo del SNC para el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos que tienen componentes del SNC, en particular, enfermedades de almacenamiento lisosómico. La presente invención representa un avance significativo en el campo de la focalización del SNC y la terapia de reemplazo enzimático.

5 [0009] Como se describe en detalle a continuación, los presentes inventores han desarrollado con éxito formulaciones estables para la eficacia de la administración intratecal (IT) de una proteína de la arilsulfatasa A (ASA). De hecho, las formulaciones estables de acuerdo con la presente invención pueden usarse para la administración del SNC a través de administraciones intratecales (por ejemplo, IT-Lumbar, IT-isterna magna) para inyección directamente al SNC y/o CSF.

10 [0010] Específicamente, la invención proporciona una formulación acuosa estable para la administración intratecal comprende una proteína arilsulfatasa A (ASA) a una concentración de más de 10 mg/ml, sal y un tensioactivo polisorbato y un agente tamponador, en donde la sal es NaCl. En algunas realizaciones, la proteína ASA está presente en una concentración seleccionada o hasta de 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/ml, 45 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml o 300 mg/ml.

15 [0011] En diversas realizaciones, la presente invención incluye una formulación estable de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, en donde la proteína de ASA comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la proteína ASA comprende una secuencia de aminoácidos al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% idéntica a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el NaCl está presente como una concentración que varía de aproximadamente 30-300 mM. En algunas realizaciones, el NaCl está presente en una concentración que varía de aproximadamente 137-154 mM. En algunas realizaciones, el NaCl está presente a una concentración de aproximadamente 154 mM.

20 [0012] En diversas realizaciones, la presente invención incluye una formulación estable de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, en donde el tensioactivo polisorbato se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80 y combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el tensioactivo de polisorbato es polisorbato 20. En algunas realizaciones, el polisorbato 20 está presente a una concentración de aproximadamente 0,005%.

25 [0013] En algunas realizaciones, el agente tampón se selecciona del grupo que consiste en fosfato, acetato, histidina, succinato, Tris, y sus combinaciones. En algunas realizaciones, el agente tamponador es fosfato. En algunas realizaciones, el fosfato está presente a una concentración no mayor que 50 mM (por ejemplo, no mayor que 45 mM, 40 mM, 35 mM, 30 mM, 25 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM o 5 mM). En algunas realizaciones, el fosfato está presente a una concentración no mayor de 20 mM. En diversos aspectos, la invención incluye una formulación estable de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 3-8 (por ejemplo, aproximadamente 4-7,5,5-8, 5-7,5,5-6,5,5-7,0, 5,5-8,0, 5,5-7,7, 5,5-6,5, 6-7,5 o 6-7,0). En algunas realizaciones, la formulación tiene un pH de aproximadamente 5,5-6,5 (por ejemplo, 5,5, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 o 6,5). En algunas realizaciones, la formulación tiene un pH de aproximadamente 6,0.

30 [0014] En algunas realizaciones, la presente invención incluye una formulación estable para la administración intratecal comprende una proteína arilsulfatasa A (ASA) a una concentración que varía de aproximadamente 15-300 mg/ml, NaCl a una concentración de aproximadamente 154 mM, polisorbato 20 en una concentración de aproximadamente 0,005% y un pH de aproximadamente 6,0. En algunas realizaciones, la proteína ASA está a una concentración de aproximadamente 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml o 300 mg/ml.

35 [0015] En varios aspectos, la presente invención incluye un recipiente que comprende una única forma de dosificación de un estable formulación en diversas realizaciones descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, el recipiente se selecciona de una ampolla, un vial, una botella, un cartucho, un depósito, un lyo-ject o una jeringa precargada. En algunas realizaciones, el recipiente es una jeringa precargada. En algunas realizaciones, la jeringa precargada se selecciona de jeringas de vidrio de borosilicato con revestimiento de silicona horneada, jeringas de vidrio de borosilicato con silicona pulverizada o jeringas de resina plástica sin silicona. En algunas realizaciones, la formulación estable está presente en un volumen de menos de aproximadamente 50 ml (por ejemplo, menos de aproximadamente 45 ml, 40 ml, 35 ml, 30 ml, 25 ml, 20 ml, 15 ml, 10 ml, 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2,5 ml, 2,0 ml, 1,5 ml, 1,0 ml o 0,5 ml). En algunas realizaciones, la formulación estable está presente en un volumen de menos de aproximadamente 3,0 ml.

40 [0016] Un método de tratamiento de la enfermedad de leucodistrofia metacromática puede incluir la etapa de administrar por vía intratecal a un sujeto en necesidad de tratamiento una formulación de acuerdo con cualquiera de las realizaciones descritas en este documento.

45 [0017] En algunas realizaciones, la presente invención incluye una formulación que comprende una proteína de la arilsulfatasa A (ASA) a una concentración que varía de aproximadamente 15-300 mg/ml, NaCl a una concentración de aproximadamente 154 mM, polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0,005%, y un pH de

aproximadamente 6 para usar en un método de tratamiento de la Enfermedad de Leucodistrofia Metacromática, dicho método comprende una etapa de administrar la formulación por vía intratecal a un sujeto que necesita tratamiento.

5 [0018] En algunas realizaciones, los resultados de la administración intratecal en ausencia de efectos adversos sustanciales (por ejemplo, severa respuesta inmune) en el sujeto. En algunas realizaciones, la administración intratecal no da como resultado una respuesta inmune mediada por células T adaptativa sustancial en el sujeto.

10 [0019] En algunas realizaciones, la administración intratecal de los resultados de formulación en la entrega de la proteína de arilsulfatasa A a diversos tejidos diana en el cerebro, la médula espinal, y/o los órganos periféricos. En algunas realizaciones, la administración intratecal de la formulación da como resultado el suministro de la proteína arilsulfatasa A a los tejidos cerebrales diana. En algunas realizaciones, los tejidos diana del cerebro comprenden materia blanca y/o neuronas en la materia gris. En algunas realizaciones, la proteína arilsulfatasa A se administra a neuronas, células gliales, células perivasculares y/o células meníngeas. En algunas realizaciones, la proteína arilsulfatasa A se administra adicionalmente a las neuronas en la médula espinal.

15 [0020] En algunas realizaciones, la administración intratecal de la formulación resulta aún más en la administración sistémica de la proteína ASA en los tejidos diana periféricos. En algunas realizaciones, los tejidos diana periféricos se seleccionan de hígado, riñón, bazo y/o corazón.

20 [0021] En algunas realizaciones, la administración intratecal de los resultados de formulación en la localización lisosomal en el cerebro los tejidos diana, neuronas de la médula espinal y/o tejidos diana periféricos. En algunas realizaciones, la administración intratecal de los resultados de formulación en la reducción de almacenamiento de sulfatida en los tejidos diana del cerebro, las neuronas de la médula espinal y/o periféricos tejidos diana. En algunas realizaciones, el almacenamiento de sulfatida se reduce al menos en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1 vez, 1,5 veces o 2 veces en comparación con un control (por ejemplo, el almacenamiento de GAG previo al tratamiento en el sujeto). En algunas realizaciones, la administración intratecal de la formulación da como resultado una vacuolización reducida en las neuronas (por ejemplo, en al menos 20%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90%, 1 vez, 1,5 veces o 2 veces en comparación con un control). En algunas realizaciones, las neuronas comprenden células de Purkinje.

30 [0022] En algunas realizaciones, la administración intratecal de los resultados de formulación en aumento enzimática ASA actividad en los tejidos diana del cerebro, neuronas de la médula espinal y/o tejidos diana periféricos. En algunas realizaciones, la actividad enzimática ASA se incrementa en al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 doble en comparación con un control (por ejemplo, la actividad enzimática endógena previa al tratamiento en el sujeto). En algunas realizaciones, la actividad enzimática ASA aumentada es al menos aproximadamente 10 nmol/hr/mg, 20 nmol/hr/mg, 40 nmol/hr/mg, 50 nmol/hr/mg, 60 nmol/hr/mg, 70 nmol/hr/mg, 80 nmol/hr/mg, 90 nmol/hr/mg, 100 nmol/hr/mg, 150 nmol/hr/mg, 200 nmol/hr/mg, 250 nmol/hr/mg, 300 nmol/hr/mg, 350 nmol/hr/mg, 400 nmol/hr/mg, 450 nmol/hr/mg, 500 nmol/hr/mg, 550 nmol/hr/mg o 600 nmol/hr/mg.

40 [0023] En algunas realizaciones, la actividad enzimática ASA se incrementa en la región lumbar. En algunas realizaciones, el aumento de la actividad enzimática ASA en la región lumbar es al menos aproximadamente 2000 nmol/hr/mg, 3000 nmol/hr/mg, 4000 nmol/hr/mg, 5000 nmol/hr/mg, 6000 nmol/hr/mg, 7000 nmol/hr/mg, 8000 nmol/hr/mg, 9000 nmol/hr/mg, o 10.000 nmol/hr/mg.

45 [0024] En algunas realizaciones, la administración intratecal de los resultados de formulación en la intensidad reducida, la gravedad o la frecuencia, o retraso en la aparición de al menos un síntoma o característica de MLD. En algunas realizaciones, el al menos un síntoma o característica de la MLD es el deterioro cognitivo; lesiones de la sustancia blanca; espacios perivasculares dilatados en el parénquima cerebral, ganglios, cuerpo caloso y/o tronco encefálico; atrofia; y/o ventriculomegalia.

50 [0025] En algunas realizaciones, la administración intratecal se realiza una vez cada dos semanas. En algunas realizaciones, la administración intratecal tiene lugar una vez al mes. En algunas realizaciones, la administración intratecal tiene lugar una vez cada dos meses. En algunas realizaciones, la administración intratecal se usa junto con la administración intravenosa. En algunas realizaciones, la administración intravenosa no es más frecuente que una vez por semana. En algunas realizaciones, la administración intravenosa no es más frecuente que una vez cada dos semanas. En algunas realizaciones, la administración intravenosa no es más frecuente que una vez al mes. En algunas realizaciones, la administración intravenosa no es más frecuente que una vez cada dos meses. En ciertas realizaciones, la administración intravenosa es más frecuente que la administración mensual, tal como dos veces por semana, semanalmente, cada dos semanas o dos veces al mes.

60 [0026] En algunas realizaciones, las administraciones intravenosas y intratecales se realizan en el mismo día. En algunas realizaciones, las administraciones intravenosas e intratecales no se realizan dentro de una cierta cantidad de tiempo entre sí, tal como no dentro de al menos 2 días, dentro de al menos 3 días, dentro de al menos 4 días, dentro de al menos 5 días, dentro de al menos 6 días, dentro de al menos 7 días, o dentro de al menos una semana. En algunas realizaciones, las administraciones intravenosas e intratecales se realizan en un horario alterno, tal como administraciones alternas semanalmente, cada dos semanas, dos veces al mes o mensualmente. En algunas

realizaciones, una administración intratecal reemplaza una administración intravenosa en un programa de administración, tal como en un programa de administración intravenosa semanal, cada dos semanas, dos veces al mes o mensualmente, cada tercera o cuarta o quinta administración en ese programa puede reemplazarse con una administración intratecal en lugar de una administración intravenosa.

5 [0027] En algunas realizaciones, las administraciones intravenosas y intratecales se realizan secuencialmente, tales como la realización de las administraciones intravenosas primero (por ejemplo, semanal, cada dos semanas, dos veces al mes, o dosificación mensual durante dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año o más) seguidos de administraciones de IT (por ejemplo, semanalmente, cada dos semanas, dos veces al mes o dosificación mensual durante más de dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año o más). En algunas realizaciones, las administraciones intratecales se realizan primero (por ejemplo, semanalmente, cada dos semanas, dos veces al mes, mensualmente, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, dosificación durante dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año o más) seguidos de administraciones intravenosas (p. ej., semanalmente, cada dos semanas, dos veces al mes o dosificación mensual durante más de dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año o más).

10 [0028] En algunas realizaciones, la administración intratecal se utiliza en ausencia de la administración intravenosa.

15 [0029] En algunas realizaciones, la administración intratecal se utiliza en ausencia de terapia inmunosupresora concurrente.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 [0030]

La Figura 1 ilustra ejemplos de datos de concentración de arilsulfatasa A (rhASA) en suero después de la administración IV.

30 La Figura 2 ilustra datos de concentración de rhASA ejemplares en suero después de la administración de IT-lumbar.

La Figura 3 ilustra una concentración de rhASA ejemplar en CSF después de la administración IV.

35 La Figura 4 ilustra la concentración de rhASA a modo de ejemplo en LCR después de la administración IT-lumbar.

35 La Figura 5 ilustra un análisis ejemplar del efecto del tampón y el pH sobre la estabilidad térmica de rhASA.

40 La Figura 6 ilustra un análisis ejemplar de SDS-PAGE (Coomassie) de rhASA después de dos semanas a  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ .

45 La Figura 7 ilustra un ejemplo de análisis SDS-PAGE (Coomassie) de rhASA en formulaciones IT después de 3 meses A<sup>5</sup> y 25°C.

45 La Figura 8 representa un ejemplo de sustancia farmacológica rhASA y la apariencia del producto farmacológico después de 48 horas de agitación (Panel A) y agitación (Panel B).

50 La Figura 9 muestra el aspecto ejemplar del producto farmacológico rhASA (sin P20) con ( $n = 2$ ) y sin espacio de cabeza ( $n = 1$ ) Despues de agitarse durante 48 horas.

50 La Figura 10 ilustra datos ejemplares que demuestran la capacidad de amortiguación de la sustancia farmacológica rhASA en comparación con el control del amortiguador cuando se titula con ácido clorhídrico.

55 La Figura 11 ilustra datos ejemplares que demuestran la capacidad de amortiguación de la sustancia farmacológica rhASA en comparación con un control de amortiguación cuando se titula con hidróxido de sodio 1M.

55 La Figura 12 representa muestras ejemplares de rhASA en solución salina, pH 6,0 que varía según la concentración.

La Figura 13 ilustra un análisis ejemplar de SEC-HPLC de rhASA (fase móvil de pH 5,5) en NaCl 154 mM, pH 5,9.

60 La Figura 14 ilustra un análisis ejemplar de SEC-HPLC de rhASA (fase móvil de pH 7,0) en NaCl 154 mM, pH 5,9.

60 La Figura 15 ilustra perfiles ejemplares de exclusión por tamaño de la línea de base y 11 muestras de estabilidad meses para rhASA en 154 mM de NaCl , pH 5.

65 La Figura 16 representa ejemplos de foto-micrografías de tejido cerebral, meninges, infiltrados (Medios y grupos de dosis altas, ambos sexos) después de tratamiento.

La Figura 17 muestra fotos fotográficas ejemplares de tejido cerebral, meninges, infiltrados (grupos de dosis media y alta, ambos sexos) después del tratamiento.

5 La Figura 18 muestra fotomicrografías ejemplares de infiltrados de tejido cerebral perivasicular (hombres de dosis media; mujeres de dosis alta) después del tratamiento.

10 La Figura 19 muestra una tinción de azul de Alcian ejemplar de la médula espinal de ratones MLD inmunotolerantes tratados con rhASA y muestra resultados ejemplares que ilustran la reducción de sulfatida determinada por la tinción de azul de Alcian de la médula espinal cervical en animales que recibieron inyecciones intratecales de hASA recombinante en los días 1, 8, 15. y 22 a dosis de 520 mg/kg de peso cerebral o control del vehículo. Como se demostró, el tratamiento con hASA recombinante inyectado intratecalmente resultó en la reducción de la acumulación de sulfatida en la médula espinal cervical.

15 La Figura 20 ilustra un análisis de morfometría ejemplar de secciones de la médula espinal teñidas con azul Alcian de ratones MLD inmunotolerantes tratados con rhASA, incluyendo resultados ejemplares que ilustran la densidad óptica del azul Alcian en la médula espinal total (médula espinal T), materia gris total (T-GM), materia gris lumbar (L-GM), materia gris cervical (C-GM), materia blanca total (T-WM), materia blanca lumbar (L-WM) y materia blanca cervical (C-WM) según lo determinado por el análisis de morfometría. Como se demostró, se observó una reducción estadísticamente significativa en la tinción de azul Alcian en animales tratados con rhASA en comparación con un control de vehículo.

20 La Figura 21 representa la reducción ejemplar de la tinción de LAMP en la sustancia blanca (fimbria) de ratones MLD inmunotolerantes tratados con rhASA representa resultados ejemplares que ilustran los niveles de LAMP-1 en fimbria según lo determinado por el inmunohistoquímica. Aumento = 20X. Como se demostró, el tratamiento con rhASA inyectado intratecalmente resultó en la reducción de LAMP-1 en la sustancia blanca cerebral.

25 La Figura 22 ilustra un ejemplo de análisis de morfometría de la tinción con LAMP del cerebro de ratones MLD inmunotolerantes tratados con rhASA y muestra resultados ejemplares que ilustran la intensidad de la tinción con LAMP-1 en el cuerpo del coloso (CC), fimbria (F), materia blanca cerebelosa (CB-WM) y tallo cerebral (BS) de animales tratados con 20 mg/kg de rhASA intravenosa, 300 mg/kg de peso cerebral rhASA intratecal, 520 mg/kg de peso cerebral rhASA intravenosa, o control del vehículo.

30 La Figura 23 ilustra la concentración ejemplar de rhASA en punciones cerebrales de monos cynomolgus juveniles dosificados con vehículo después de la dosificación EOW IT para necropsia principal de 6 meses.

35 La Figura 24 ilustra la concentración ejemplar de rhASA en punciones cerebrales de monos cynomolgus juveniles después de la dosificación EOW IT de rhASA a 1,8 mg/dosis durante 6 meses - necropsia principal.

40 La Figura 25 ilustra la concentración ejemplar de rhASA en punciones cerebrales de monos cynomolgus juveniles después de la dosificación EOW IT de rhASA a 6,0 mg/dosis durante 6 meses - necropsia principal.

45 La Figura 26 ilustra la concentración ejemplar de rhASA en punciones cerebrales de monos cynomolgus juveniles después de la dosificación EOW IT de rhASA a 18,6 mg/dosis durante 6 meses - necropsia principal.

50 La Figura 27 ilustra la concentración ejemplar de ASA en punciones cerebrales de monos cynomolgus juveniles después de la dosificación EOW IT (control PBS) durante 6 meses - necropsia de recuperación.

55 La Figura 28 ilustra la concentración ejemplar de rhASA en punciones cerebrales de monos cynomolgus juveniles después de la dosificación EOW IT del vehículo durante 6 meses - necropsia de recuperación.

60 La Figura 29 ilustra la concentración ejemplar de rhASA en punciones cerebrales de monos cynomolgus juveniles después de la dosificación EOW IT de rhASA a 1,8 mg/dosis durante 6 meses - necropsia de recuperación.

65 La Figura 30 ilustra la concentración ejemplar de rhASA en punciones cerebrales de monos cynomolgus juveniles después de la dosificación EOW IT de rhASA a 6,0 mg/dosis durante 6 meses - necropsia de recuperación.

La Figura 31 ilustra la concentración ejemplar de rhASA en punciones cerebrales de cinomolgo juvenil después de la dosificación EOW IT de rhASA a 18,6 mg/dosis durante la necropsia de recuperación de 6 meses.

La Figura 32 ilustra la concentración ejemplar de rhASA en punzones seleccionados de la superficie del cerebro para el control del dispositivo, vehículo, 1,8 mg, 6,0 mg y 18,6 mg de animales tratados. (macho y hembra separados, los datos de control del dispositivo provienen de la necropsia de recuperación, todos los demás datos de la necropsia principal).

La Figura 33 ilustra una concentración ejemplar de rhASA en punzones seleccionados del área blanca profunda del cerebro para el control del dispositivo, vehículo, 1,8 mg, 6,0 mg y 18,6 mg de animales tratados. (macho y hembra

separados, los datos de control del dispositivo provienen de la necropsia de recuperación, todos los demás datos de la necropsia principal).

5 La Figura 34 ilustra una concentración ejemplar de rhASA en punzones seleccionados del área gris profunda del cerebro para el control del dispositivo, vehículo, 1,8 mg, 6,0 mg y 18,6 mg de animales tratados. (macho y hembra separados, los datos de control del dispositivo provienen de la necropsia de recuperación, todos los demás datos de la necropsia principal).

10 La Figura 35 ilustra una concentración ejemplar de rhASA en punzones seleccionados de varias regiones en control de dispositivo, vehículo, 1,8 mg, 6,0 mg y 18,6 mg de animales tratados. (combinado masculino y femenino, los datos de control del dispositivo provienen de la necropsia de recuperación, todos los demás datos de la necropsia principal).

15 La Figura 36 ilustra la concentración ejemplar de rhASA en secciones de la médula espinal de monos cynomolgus juveniles después de la dosificación EOW IT durante 6 meses - necroscopia de recuperación.

20 La Figura 37 ilustra una concentración ejemplar de rhASA en el hígado de monos cynomolgus juveniles después de la administración de EOW IT durante 6 meses - necroscopia de recuperación.

25 La Figura 38 ilustra ubicaciones anatómicas ejemplares de ciertos golpes cerebrales.

30 La Figura 39 ilustra ubicaciones anatómicas ejemplares de ciertos golpes cerebrales.

35 La Figura 40 ilustra ubicaciones anatómicas ejemplares de ciertos golpes cerebrales.

40 La Figura 41 ilustra ubicaciones anatómicas ejemplares de ciertos golpes cerebrales.

45 La Figura 42 ilustra ubicaciones anatómicas ejemplares de ciertos golpes cerebrales.

50 La Figura 43 ilustra ubicaciones anatómicas ejemplares de ciertos golpes cerebrales.

55 Las Figuras 44A - G ilustran la concentración de arilsulfatasa A humana recombinante (rhASA) en punciones de tejido extraídas de los tejidos cerebrales de monos cynomolgus adultos y juveniles a los que se les administró un vehículo, 1,8 mg de rhASA o 18,6 mg de rhASA. Cada una de las Figuras 44A-G corresponde a una región del tejido cerebral representada en la Figura 39.

55 Las Figuras 45A y B ilustran una comparación ejemplar de las concentraciones de arilsulfatasa A humana recombinante (rhASA) detectadas en la sustancia blanca profunda (Figura 45A) o en los tejidos cerebrales de materia gris profunda (Figura 45B) de monos cynomolgus adultos y juveniles que se administraron por vía intratecal (IT) o intracerebroventricular (ICV) rhASA.

60 La Figura 46A ilustra las concentraciones de rhASA detectadas en varios golpes de tejido obtenidos de monos cynomolgus juveniles (<12 meses de edad) administrados por IT con una dosis de 18,6 o 1,8 mg de arilsulfatasa A humana recombinante (rhASA). Como se ilustra en ambas Figuras 40A-B, la concentración de rhASA entregada a los tejidos estaba dentro, o excedía de otro modo la concentración terapéutica diana de 2,5 mg/mg de proteína. Las regiones anatómicas del tejido cerebral que corresponden a cada uno de los números de punzón representados en la Figura 46A y la Figura 46B son: la sustancia blanca subcortical (1); materia blanca periventricular y materia blanca profunda (2); sustancia blanca subcortical (3); sustancia blanca subcortical (4); cápsula interna (5); núcleo caudado de la cápsula interna (6); materia blanca profunda (7); sustancia blanca subcortical y corteza (8); putamen (9); materia blanca subcortical temporal y corteza (10); materia gris profunda (11); materia gris profunda (12); periventricular frontal y subcortical (13); sustancia blanca subcortical, corteza superficial perifalxiana (14); cuerpo caloso y sustancia blanca subcortical pericallosal (15); materia blanca subcortical profunda (16); materia gris profunda (17); materia gris profunda (18); sustancia blanca periventricular (19); materia blanca subcortical profunda (20); hipocampo (21); cuerpo caloso (22); materia blanca profunda (23); sustancia blanca subcortical, lóbulo occipital (24); y sustancia blanca cerebelosa (25).

65 La Figura 47A ilustra el área de tejido de sustancia blanca profunda extraída de un mono cynomolgus administrado con IT 1,8 mg de rhASA. La Figura 47B ilustra la inmunotinción del tejido de la sustancia blanca profunda y la distribución revelada de rhASA en células relevantes. La Figura 47C ilustra que el rhASA administrado por IT demostró la ubicación conjunta de orgánulos en los tejidos profundos de la sustancia blanca del mono cynomolgus y, en particular, en los lisosomas. En la Figura 47C, la inmunotinción ASA se ilustra en el cuadro superior izquierdo.

65 La Figura 48 compara la distribución de 124 arilsulfatasa A marcada con I (rhASA) usando exploración PET 24 horas después de la administración por IT o ICV de dicha rhASA marcada a un mono cynomolgus.

65 La Figura 49 ilustra la distribución de ASA marcado con <sup>124</sup>I inmediatamente después de la administración de ICV a un mono cynomolgus, y compara la distribución de ASA marcado con <sup>124</sup>I administrado por IT dentro de 2-5 h. Como

se demostró, la administración de IT entregó el ASA marcado con <sup>124</sup>I a los mismos compartimentos iniciales (cisternas y columna proximal) que el que se muestra para la administración de ICV.

La Figura 50 muestra ejemplos de administración de ICV y IT en un modelo de ratón.

5

La Figura 51 representa un ejemplo de dispositivo de administración de fármacos intratecal (IDDD).

La Figura 52 representa un ejemplo de sistema de acceso implantable intratecal de bajo perfil PORT-A-CATH®.

10 La Figura 53 representa un dispositivo de suministro de fármaco intratecal ejemplar (IDDD).

La Figura 54 representa un dispositivo de administración de fármacos intratecal (IDDD) ejemplar, que permite la administración en el hogar para la terapia de reemplazo de enzimas del SNC (ERT).

15 La Figura 55 ilustra un diagrama ejemplar de un dispositivo de administración de fármacos intratecal (IDDD) con un mecanismo de seguridad.

20 La Figura 56 representa ubicaciones ejemplares dentro del cuerpo de un paciente donde se puede colocar un IDDD; la Figura 56B representa varios componentes de un dispositivo de administración de fármacos intratecal (IDDD); y la Figura 56C representa una ubicación de inserción ejemplar dentro del cuerpo de un paciente para inyección lumbar IT.

## DEFINICIONES

25 **[0031]** A fin de que la presente invención se comprenda más fácilmente, ciertos términos se definen primero a continuación. Las definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos se establecen a lo largo de la especificación.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Sujeto:** Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" significa cualquier mamífero, incluidos los humanos. En ciertas realizaciones, el sujeto es un adulto, un adolescente o un bebé. También se contempla la administración de las composiciones farmacéuticas y/o la ejecución de los métodos de tratamiento en el útero.

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

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

15

20

25

30

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

40

45

50

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

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

65 **Tejidos diana:** Como se usa en el presente documento, el término "tejidos diana" se refiere a cualquier tejido afectado por la enfermedad de almacenamiento lisosomal a tratar o cualquier tejido en donde la enzima

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

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

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

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

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

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

**[0032]** La presente invención proporciona, entre otras cosas, métodos mejorados y composiciones para administración directa eficaz de un agente terapéutico en el sistema nervioso central (SNC). Como se discutió anteriormente, la presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que una proteína ASA para tratar la enfermedad de leucodistrofia metacromática se puede introducir directamente en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de un sujeto que necesita tratamiento a una alta concentración sin inducir efectos adversos sustanciales en el tema. Más sorprendentemente, los presentes inventores descubrieron que la enzima de reemplazo puede administrarse en una solución salina simple o formulación a base de tampón, sin usar CSF sintético. Aún más inesperadamente, el suministro intratecal según la presente invención no produce efectos adversos sustanciales, tales como una respuesta inmune severa, en el sujeto. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el suministro intratecal de acuerdo con la presente invención puede usarse en ausencia de terapia inmunosupresora concurrente (por ejemplo, sin inducción de tolerancia inmune por pretratamiento o preacondicionamiento).

**[0033]** En algunas realizaciones, la entrega intratecal de acuerdo con la presente invención permite la difusión eficiente

a través de varios tejidos cerebrales resultantes en la entrega eficaz de la enzima de reemplazo en varios tejidos cerebrales diana en superficie, regiones de poca profundidad y/o del cerebro profundo. En algunas realizaciones, el suministro intratecal según la presente invención dio como resultado una cantidad suficiente de enzimas de reemplazo que ingresan a la circulación periférica. Como resultado, en algunos casos, el suministro intratecal según la presente invención dio como resultado el suministro de la enzima de reemplazo en tejidos periféricos, tales como hígado, 5 corazón, bazo y riñón. Este descubrimiento es inesperado y puede ser particularmente útil para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico que tienen componentes del SNC y periféricos, que típicamente requirían tanto la administración intratecal regular como la administración intravenosa. Se contempla que el suministro intratecal de acuerdo con la presente invención puede permitir una dosificación y/o frecuencia reducida de 10 inyección iv sin comprometer los efectos terapéuticos en el tratamiento de los síntomas periféricos.

[0034] La presente invención proporciona varias características inesperadas y beneficiosas que permiten la administración eficiente y conveniente de las enzimas de reemplazo para diversos tejidos diana cerebro, dando como 15 resultado un tratamiento eficaz de enfermedades de almacenamiento lisosomal que tienen indicaciones del SNC.

[0035] Se describen varios aspectos de la invención en detalle en las siguientes secciones. El uso de secciones no pretende limitar la invención. Cada sección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención. En esta aplicación, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario.

## 20 **Proteínas terapéuticas**

[0036] En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas por la presente invención se utilizan para entregar una arilsulfatasa A de proteínas (ASA) en el SNC para el tratamiento de la enfermedad de leucodistrofia metacromática. Una proteína ASA adecuada puede ser cualquier molécula o una porción de una molécula que pueda 25 sustituir a la actividad de la proteína arilsulfatasa A (ASA) natural o rescatar uno o más fenotipos o síntomas asociados con la deficiencia de ASA. En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo adecuada para la invención es un polipéptido que tiene un N-terminal y un C-terminal y una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar o idéntica a la proteína ASA humana madura.

[0037] Típicamente, ASA humano se produce como una molécula de precursor que se procesa a una forma madura. 30 Este proceso generalmente ocurre mediante la eliminación del péptido señal de 18 aminoácidos. Típicamente, la forma precursora también se conoce como precursora de longitud completa o proteína ASA de longitud completa, que contiene 507 aminoácidos. Los 18 aminoácidos N-terminales se escinden, lo que da como resultado una forma madura que tiene 489 aminoácidos de longitud. Por lo tanto, se contempla que los 18 aminoácidos N-terminales generalmente 35 no se requieren para la actividad de la proteína ASA. Las secuencias de aminoácidos de la forma madura (SEQ ID NO: 1) y precursor de longitud completa (SEQ ID NO: 2) de una de tipo salvaje típica o de proteínas de ASA humana de origen natural se muestran en la Tabla 1.

**TABLA 1. Arilsulfatasa A humana**

		RPPNIVLIFADDLGYGDLGCGYGHPSSTTPNLDQLAAGGLRFTDFYVPVSCTPS RAALLTGRLPVRMGMYPGVLVPSSRGGLPLETEVTVAEVLAARGYL TGMAGKWHLGVGPEGAFLPPHQGFHRLGIPYSHDQGPCQNLT CFPPATPCDGGCDQGLVPIP LLANLSVEAQPPWLPGLEARYMAFAHDLMADAQRQDRPFFLYASHH THY PQFS GQSFAERSGRGPFGDSL MELDAAVGTLMTAIGDLGL LEETLVIFTADNGPETMRMSRGCGSLLRCGKG TTYEGGVREP ALAFWPGHIAP GVTHE LASSLDL PTLA ALAGAPL PNV TLDGFD LSP LLGTGKSP RQSLFFYPS Y P D E V R G V F A V R T G K Y K A H F F T Q G S A H S D T T A D P A C H A S S L T A H E P P L L Y D L S K D P G E N Y N L L G G V A G A T P E V L Q A L K Q L L K A Q L D A A V T F G P S Q V A R G E D P A L Q I C C H P G C T P R P A C C H C P D P H A (SEQ ID NO: 1)
		MGAPRSLLLALAA GLAVARPPNIVLIFADDLGYGDLGCGYGHPSSTTPNLDQ LAAGGLRFTDFYVPVSCTPSRA ALLTGRLPVRMGMYPGVLVPSSRGGLPLETEVTVA EVLAARGYL TGMAGKWHLGVGPEGAFLPPHQGFHRLGIPYSHDQGPCQNLT CF PPATPCDGGCDQGLVPIP LLANLSVEAQPPWLPGLEARYMAFAHDLMADAQRQD R P F F L Y A S H H T Y P Q F S G Q S F A E R S G R G P F G D S L M E D A A V G T L M T A I G D L G L L E E T L V I F T A D N G P E T M R M S R G C G S L L R C G K G T T Y E G G V R E P A L A F W P G H I A P G V T H E L A S S L D L P T L A A L A G A P L P N V T L D G F D L S P L L G T G K S P R Q S L F F Y P Y P D E V R G V F A V R T G K Y K A H F F T Q G S A H S D T T A D P A C H A S S L T A H E P P L L Y D L S K D P G E N Y N L L G G V A G A T P E V L Q A L K Q L L K A Q L D A A V T F G P S Q V A R G E D P A L Q I C C H P G C T P R P A C C H C P D P H A (SEQ ID NO: 2)

[0038] Por lo tanto, en algunas realizaciones, un resto terapéutico adecuado para la presente invención es la proteína ASA humana madura (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, un resto terapéutico adecuado puede ser un

homólogo o un análogo de la proteína ASA humana madura. Por ejemplo, un homólogo o un análogo de la proteína ASA humana madura puede ser una proteína ASA humana madura modificada que contiene una o más sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos en comparación con una proteína ASA natural o natural (p. ej., SEQ ID NO: 1), mientras se mantiene una actividad proteica ASA sustancial. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un resto terapéutico adecuado para la presente invención es sustancialmente homólogo a la proteína ASA humana madura (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, un resto terapéutico adecuado para la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homólogo a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, un resto terapéutico adecuado para la presente invención es sustancialmente idéntico a la proteína ASA humana madura (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, un resto terapéutico adecuado para la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idénticos a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, un resto terapéutico adecuado para la presente invención contiene un fragmento o una porción de proteína ASA humana madura.

15 **[0039]** Como alternativa, una enzima de reemplazo adecuada para la presente invención es la proteína ASA de longitud completa. En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo adecuada puede ser un homólogo o un análogo de la proteína ASA humana de longitud completa. Por ejemplo, un homólogo o un análogo de la proteína ASA humana de longitud completa puede ser una proteína ASA humana de longitud completa modificada que contiene una o más sustituciones, delecciones de aminoácidos, y/o inserciones en comparación con una proteína ASA natural o de longitud completa (p. ej., SEQ ID NO: 2), mientras se mantiene una actividad proteica ASA sustancial. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una enzima de reemplazo adecuada para la presente invención es sustancialmente homóloga a la proteína ASA humana de longitud completa (SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo adecuada para el presente la invención tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homólogo a la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo adecuada para la presente invención es sustancialmente idéntica a la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo adecuada para la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idénticos a la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, una enzima de reemplazo adecuada para la presente invención contiene un fragmento o una porción de proteína ASA humana de longitud completa. Como se usa en el presente documento, una proteína ASA de longitud completa contiene típicamente una secuencia de péptido señal.

35 **[0040]** En algunas realizaciones, una proteína terapéutica incluye un resto de direccionamiento (por ejemplo, una secuencia de focalización de lisosoma) y/o un péptido penetrante de membrana. En algunas realizaciones, una secuencia de direccionamiento y/o un péptido que penetra en la membrana es una parte intrínseca del resto terapéutico (por ejemplo, a través de un enlace químico, a través de una proteína de fusión). En algunas realizaciones, una secuencia dirigida contiene un resto manosa-6-fosfato. En algunas realizaciones, una secuencia de direccionamiento contiene un resto IGF-I. En algunas realizaciones, una secuencia de direccionamiento contiene un resto IGF-II.

#### 40 **Formulaciones**

45 **[0041]** Soluciones acuosas farmacéuticas y composiciones (es decir, formulaciones) que se utilizan tradicionalmente para entregar agentes terapéuticos al SNC de un sujeto incluyen solución salina isotónica no tamponada y solución B de Elliott, que es artificial CSF. En la Tabla 3 a continuación se incluye una comparación que representa las 50 composiciones de CSF con respecto a la solución B de Elliott. Como se muestra en la Tabla 3, la concentración de la Solución B de Elliott es muy similar a la del LCR. Sin embargo, la solución B de Elliott contiene una concentración de tampón muy baja y, en consecuencia, puede no proporcionar la capacidad de tamponamiento adecuada necesaria para estabilizar los agentes terapéuticos (p. ej., Proteínas), especialmente durante períodos prolongados de tiempo (p. ej., durante las condiciones de almacenamiento). Además, la solución B de Elliott contiene ciertas sales que pueden ser incompatibles con las formulaciones destinadas a administrar algunos agentes terapéuticos, y en particular proteínas o enzimas. Por ejemplo, las sales de calcio presentes en la solución B de Elliott son capaces de mediar la precipitación de proteínas y, por lo tanto, reducir la estabilidad de la formulación.

55 **TABLA 3**

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

65 **[0042]** La presente invención proporciona formulaciones acuosas para el agente terapéutico que se ha formulado tal que es capaz de estabilizar, o alternativamente retardar o prevenir la degradación del agente terapéutico formulado con el mismo (es decir, las proteínas recombinantes ASA).

5 [0043] Tal como se utiliza aquí, el término "estable" se refiere a la capacidad del agente terapéutico (es decir, la enzima ASA recombinante) para mantener su eficacia terapéutica (por ejemplo, la totalidad o la mayor parte de su actividad biológica prevista y/o integridad fisicoquímica) durante largos períodos de tiempo. La estabilidad de un agente terapéutico y la capacidad de la composición farmacéutica para mantener la estabilidad de dicho agente terapéutico pueden evaluarse durante períodos de tiempo prolongados (por ejemplo, preferiblemente durante al menos 1, 3, 6, 10 12, 18, 24, 30, 36 meses o más). En el contexto de una formulación, una formulación estable es aquella en donde el agente terapéutico en el mismo conserva esencialmente su integridad física y/o química y su actividad biológica durante el almacenamiento y durante los procesos (tales como congelación/descongelación, mezcla mecánica y liofilización). Para la estabilidad de la proteína, se puede medir mediante la formación de agregados de alto peso molecular (HMW), pérdida de actividad enzimática, generación de fragmentos de péptidos y desplazamiento de los perfiles de carga.

15 10 [0044] La estabilidad del agente terapéutico es de particular importancia con respecto al mantenimiento del intervalo especificado de la concentración de agente terapéutico requerida para permitir que el agente cumpla su función terapéutica pretendida. La estabilidad del agente terapéutico puede evaluarse adicionalmente en relación con la actividad biológica o la integridad fisicoquímica del agente terapéutico durante períodos prolongados de tiempo. Por ejemplo, la estabilidad en un punto de tiempo dado puede ser comparado contra la estabilidad en un punto de tiempo anterior (por ejemplo, de la formulación día 0) o en contra del agente terapéutico no formulado y los resultados de esta 20 25 comparación, expresado como porcentaje. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención mantienen al menos 100%, al menos 99%, al menos 98%, al menos 97% al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, a al menos 75%, al menos 70%, al menos 65%, al menos 60%, al menos 55% o al menos 50% de la actividad biológica o integridad fisicoquímica del agente terapéutico durante un período prolongado de tiempo (por ejemplo, medido en al menos unos 6-12 meses, a temperatura ambiente o en condiciones de almacenamiento acelerado).

30 35 [0045] El agente terapéutico es soluble en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. El término "soluble" en lo que se refiere al agente terapéutico de la presente invención se refiere a la capacidad de dicho agente terapéutico para formar una solución homogénea. Preferiblemente, la solubilidad del agente terapéutico en la solución en donde se administra y por la cual se transporta al sitio de acción objetivo (por ejemplo, las células y los tejidos del cerebro) es suficiente para permitir el suministro de una cantidad terapéuticamente efectiva del agente terapéutico para el sitio de acción objetivo. Varios factores pueden afectar la solubilidad del agente terapéutico. Por ejemplo, los factores relevantes que pueden afectar la solubilidad de la proteína incluyen la fuerza iónica, la secuencia de aminoácidos y la presencia de otros agentes o sales co-solubilizantes (por ejemplo, sales de calcio). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan de tal manera que se excluyen las sales de calcio de tales composiciones.

40 45 [0046] Las formulaciones adecuadas pueden contener el agente terapéutico a diversas concentraciones. En algunas realizaciones, las formulaciones pueden contener la proteína o el agente terapéutico a una concentración en el intervalo de aproximadamente 15 mg/ml a 100 mg/ml. En algunas realizaciones, las formulaciones según la invención pueden contener un agente terapéutico a una concentración de aproximadamente 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml o 100 mg/ml.

50 [0047] Las formulaciones de la presente invención se caracterizan por su tolerabilidad en forma de soluciones acuosas o como soluciones liofilizadas reconstituidas. Como se usa en el presente documento, los términos "tolerable" y "tolerabilidad" se refieren a la capacidad de las composiciones farmacéuticas de la presente invención para no provocar una reacción adversa en el sujeto al que se administra dicha composición, o alternativamente para no provocar una reacción adversa grave, en el sujeto a quien se administra dicha composición. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención son bien toleradas por el sujeto al que se administran tales composiciones.

55 [0048] La enzima de la presente invención requiere pH controlado y excipientes específicos para mantener su solubilidad y la estabilidad en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. La Tabla 4 a continuación identifica los aspectos típicos de las formulaciones de proteínas consideradas para mantener la solubilidad y la estabilidad de los agentes terapéuticos de proteínas.

TABLA 4

	<b>Parámetro</b>	<b>Intervalo/tipo típico</b>	<b>Razón</b>
5	pH	5 a 7,5	Para estabilidad A veces también para solubilidad
10	Tipo de tampón	Acetato, succinato, citrato, histidina, fosfato o Tris	Para mantener pH óptimo También puede afectar estabilidad
15	Concentración de tampón	5-50 mM	Para mantener pH También puede estabilizar o añadir fuerza iónica
	Tonificante	NaCl, azúcares, manitol	Para producir soluciones iso-osmóticas o isotónicas
	Tensioactivo	Polisorbato 20, polisorbato 80	Para estabilizar contra interfaces y esquilar
	Otro	Aminoácidos (p. ej. arginina) en decenas a cientos de mM	Para solubilidad o estabilidad mejorada

Tampones

20 [0049] El pH de la formulación es un factor adicional que es capaz de alterar la solubilidad de un agente terapéutico (por ejemplo, una enzima o proteína) en una formulación acuosa o para una formulación de pre-liofilización. Por consiguiente, las formulaciones de la presente invención comprenden uno o más tampones. En algunas realizaciones, las formulaciones acuosas comprenden una cantidad de tampón suficiente para mantener el pH óptimo de dicha composición entre aproximadamente 4,0-8,0 (por ejemplo, aproximadamente 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,2, 6,4, 6,5, 6,6, 6,8, 7,0, 7,5 o 8,0). En algunas realizaciones, el pH de la formulación está entre aproximadamente 5,0-7,5, entre aproximadamente 5,5-7,0, entre aproximadamente 6,0-7,0, entre aproximadamente 5,5-6,0, entre aproximadamente 5,5-6,5, entre aproximadamente 5,0-6,0, entre aproximadamente 5,0- 6,5 y entre aproximadamente 6,0-7,5. Los tampones adecuados incluyen, por ejemplo, acetato, citrato, histidina, fosfato, succinato, tris(hidroximetil)aminometano ("Tris") y otros ácidos orgánicos. La concentración de tampón y el intervalo de pH de las composiciones farmacéuticas de la presente invención son factores para controlar o ajustar la tolerabilidad de la formulación. En algunas realizaciones, un agente tamponador está presente en una concentración que varía entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 150 mM, o entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM, o entre aproximadamente 15 mM y aproximadamente 50 mM, o entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 50 mM, o entre aproximadamente 25 mM y aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones, un agente tamponador adecuado está presente a una concentración de aproximadamente 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM 50 mM, 75 mM, 100 mM, 125 mM o 150 mM.

Tonicidad

40 [0050] Las formulaciones también contienen un agente de isotonicidad para mantener las formulaciones isotónicas. Típicamente, por "isotónico" se entiende que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas generalmente tendrán una presión osmótica de aproximadamente 240 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg. La isotonicidad se puede medir utilizando, por ejemplo, una presión de vapor o osmóMs de punto de congelación. Ejemplos de agentes de isotonicidad incluyen, pero no se limitan a, glicina, sorbitol, manitol, cloruro de sodio y arginina. En algunas realizaciones, los agentes isotónicos adecuados pueden estar presentes en formulaciones acuosas y/o pre-liofilizadas a una concentración de aproximadamente 0,01 - 5% (por ejemplo, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0 o 5,0%) en peso. En algunas realizaciones, las formulaciones para liofilización contienen un agente de isotonicidad para mantener las formulaciones de pre-liofilización o las formulaciones reconstituidas isotónicas.

50 [0051] Mientras que las soluciones generalmente isotónicas son las preferidas para los medicamentos administrados por vía parenteral, el uso de soluciones isotónicas puede cambiar la solubilidad de algunos agentes terapéuticos y en particular algunas proteínas y/o enzimas. Se ha demostrado que las soluciones ligeramente hipertónicas (p. ej., cloruro de sodio de hasta 175 mM en fosfato de sodio 5 mM a pH 7,0) y las soluciones que contienen azúcar (p. ej., hasta sacarosa al 2% en fosfato de sodio 5 mM a pH 7,0) han sido bien toleradas. La composición de formulación de bolo aprobada por el SNC más común es la solución salina (aproximadamente 150 mM de NaCl en agua).

Agentes estabilizantes

60 [0052] En algunas realizaciones, las formulaciones pueden contener un agente estabilizante, o lioprotector, para proteger la proteína. Típicamente, un agente estabilizador adecuado es un azúcar, un azúcar no reductor y/o un aminoácido. Los azúcares ejemplares incluyen, pero no se limitan a, dextrano, lactosa, manitol, manosa, sorbitol, rafinosa, sacarosa y trehalosa. Los aminoácidos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, arginina, glicina y metionina. Los agentes estabilizadores adicionales pueden incluir cloruro de sodio, hidroxietilalmidón y polivinilpirrolidona. La cantidad de agente estabilizante en la formulación liofilizada es generalmente tal que la formulación será isotónica. Sin embargo, las formulaciones reconstituidas hipertónicas también pueden ser adecuadas. Además, la cantidad de

5 agente estabilizante no debe ser demasiado baja, de modo que se produzca una cantidad inaceptable de degradación/agregación del agente terapéutico. Las concentraciones ejemplares de agente estabilizante en la formulación pueden variar de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 400 mM (por ejemplo, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 300 mM, y de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 100 mM), o alternativamente, de 0,1% a 15% (por ejemplo, del 1% al 10%, del 5% al 15%, del 5% al 10%) en peso. En algunas realizaciones, la proporción de la cantidad en masa del agente estabilizante y el agente terapéutico es aproximadamente 1:1. En otras realizaciones, la relación de la cantidad de masa del agente estabilizante y el agente terapéutico puede ser de aproximadamente 0,1:1, 0,2:1, 0,25:1, 0,4:1, 0,5:1, 1:1, 2:1, 2,6:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10; 1 o 20:1. En algunas realizaciones, adecuadas para la liofilización, el agente estabilizante también es un lioprotector.

10 15 [0053] En algunas realizaciones, las formulaciones líquidas adecuadas para la presente invención contienen materiales amorfos. En algunas realizaciones, las formulaciones líquidas adecuadas para la presente invención contienen una cantidad sustancial de materiales amorfos (por ejemplo, formulaciones basadas en sacarosa). En algunas realizaciones, las formulaciones líquidas adecuadas para la presente invención contienen materiales parcialmente cristalinos/parcialmente amorfos.

#### Agentes de carga

20 25 [0054] En algunas realizaciones, las formulaciones adecuadas para la liofilización pueden incluir además uno o más agentes de carga. Un "agente de carga" es un compuesto que agrega masa a la mezcla liofilizada y contribuye a la estructura física de la torta liofilizada. Por ejemplo, un agente de carga puede mejorar la apariencia de la torta liofilizada (por ejemplo, torta liofilizada esencialmente uniforme). Los agentes de carga adecuados incluyen, pero no se limitan a, cloruro de sodio, lactosa, manitol, glicina, sacarosa, trehalosa, hidroxietilalmidón. Las concentraciones ejemplares de agentes de carga son de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% (por ejemplo, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0%, 8,5%, 9,0%, 9,5% y 10,0%).

#### Tensioactivos

30 35 40 45 [0055] En algunas realizaciones, es deseable añadir un tensioactivo para formulaciones. Los tensioactivos ejemplares incluyen tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20 u 80); poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); Tritón; dodecil sulfato de sodio (SDS); laurel sulfato de sodio; octilglicósido de sodio; lauril, miristil, linoleil o estearil sulfobetaína; lauril, miristil, linoleil o estearil sarcosina; linoleil, miristilo o cetil-betaína; lauroamidopropilo, cocamidopropilo, linoleamidopropilo, miristamidopropilo, palmidopropilo o isoestearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropilo); miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestearamidopropil-dimetilamina; metil cocoil - sodio o disil restaurante de metilo disódico; y la serie MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, NJ), polietilenglicol, polipropilenglicol y copolímeros de etileno y propilenglicol (por ejemplo, Pluronics, PF68, etc.). Típicamente, la cantidad de tensioactivo agregado es tal que reduce la agregación de la proteína y minimiza la formación de partículas o efervescencias. Por ejemplo, un tensioactivo puede estar presente en una formulación a una concentración de aproximadamente 0,001 - 0,5% (por ejemplo, aproximadamente 0,005 - 0,05%, o 0,005 - 0,01%). En particular, un surfactante puede estar presente en una formulación a una concentración de aproximadamente 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% o 0,5%, etc. Alternativamente, o además, el se puede agregar tensioactivo a la formulación liofilizada, formulación pre-liofilizada y/o la formulación reconstituida.

50 55 60 65 [0056] Otros vehículos, excipientes farmacéuticamente aceptables o estabilizantes tales como los descritos en Remington Pharmaceutical Sciences 16<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed. (1980) pueden incluirse en la formulación (y/o la formulación liofilizada y/o la formulación reconstituida) siempre que no afecten negativamente las características deseadas de la formulación. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas e incluyen, entre otros, agentes tamponantes adicionales; conservantes codisolventes; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes como EDTA; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína Zn); polímeros biodegradables tales como poliésteres; y/o contraiones formadores de sal como el sodio.

70 75 80 85 [0057] Las formulaciones, en cualquier forma acuosa, pre-liofilizada, liofilizada o reconstituida se puede evaluar sobre la base de análisis de la calidad del producto, tiempo de reconstitución (si se liofilizan), calidad de reconstitución (si está liofilizada), alto peso molecular, humedad y temperatura de transición vítreo. Por lo general, la calidad de la proteína y el análisis del producto incluyen el análisis de la tasa de degradación del producto utilizando métodos que incluyen, entre otros, HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC), HPLC de intercambio catiónico (CEXHPLC), difracción de rayos X (XRD), calorimetría de barrido diferencial modulada (MDSC), HPLC de fase inversa (RP-HPLC), dispersión de luz multiángulo (MALS), fluorescencia, absorción ultravioleta, nefelometría, electroforesis capilar (CE), SDS-PAGE y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la evaluación de un producto puede incluir una etapa de evaluar la apariencia (ya sea líquida o de torta).

90 95 [0058] En general, las formulaciones (liofilizados o acuosas) se pueden almacenar durante períodos prolongados de tiempo a temperatura ambiente. La temperatura de almacenamiento puede variar típicamente de 0°C a 45°C (por ejemplo, 4°C, 20°C, 25°C, 45°C, etc.). Las formulaciones pueden almacenarse durante un período de meses a un período de años. El tiempo de almacenamiento generalmente será de 24 meses, 12 meses, 6 meses, 4,5 meses, 3

meses, 2 meses o 1 mes. Las formulaciones se pueden almacenar directamente en el contenedor utilizado para la administración, eliminando los pasos de transferencia.

**[0059]** Las formulaciones pueden almacenarse directamente en el recipiente de liofilización (si está liofilizado), que también puede funcionar como el recipiente de reconstitución, eliminando los pasos de transferencia. Alternativamente, las formulaciones de productos liofilizados se pueden medir en incrementos más pequeños para el almacenamiento. El almacenamiento generalmente debe evitar circunstancias que conduzcan a la degradación de las proteínas, que incluyen, entre otras, la exposición a la luz solar, radiación UV, otras formas de radiación electromagnética, calor o frío excesivo, choque térmico rápido y choque mecánico.

### Liofilización

**[0060]** Los métodos se puede utilizar para liofilizar cualquier material, en particular de agentes, terapéuticos. Típicamente, una formulación previa a la liofilización contiene además una elección apropiada de excipientes u otros componentes tales como estabilizadores, agentes tamponantes, agentes de carga y tensioactivos para evitar la degradación del compuesto de interés (por ejemplo, agregación de proteínas, desamidación y/u oxidación) durante liofilización y almacenamiento. La formulación para la liofilización puede incluir uno o más ingredientes adicionales que incluyen lioprotectores o agentes estabilizantes, tampones, agentes de carga, agentes de isotonicidad y tensioactivos.

**[0061]** Después de la sustancia de interés y los componentes adicionales se mezclan entre sí, la formulación se liofiliza. La liofilización generalmente incluye tres etapas principales: congelación, secado primario y secado secundario. La congelación es necesaria para convertir el agua en hielo o algunos componentes de formulación amorfa en la forma cristalina. El secado primario es el paso del proceso cuando se elimina el hielo del producto congelado por sublimación directa a baja presión y temperatura. El secado secundario es el paso del proceso cuando se elimina el agua delimitada de la matriz del producto utilizando la difusión del agua residual a la superficie de evaporación. La temperatura del producto durante el secado secundario es normalmente mayor que durante el secado primario. Ver, Tang X. et al. (2004) "Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: Practical advice," Pharm. Res., 21:191-200; Nail S.L. et al. (2002) "Fundamentals of freeze-drying," in Development and manufacture of protein pharmaceuticals. Nail S.L. editor New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp 281-353; Wang et al. (2000) "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals," Int. J. Pharm., 203:1-60; Williams N.A. et al. (1984) "The lyophilization of pharmaceuticals; A literature review." J. Parenteral Sci. Technol., 38:48-59.

**[0062]** En algunas realizaciones, una etapa de recocido se puede introducir durante la congelación inicial del producto. El paso de recocido puede reducir el tiempo total del ciclo. Sin desear limitarse a ninguna teoría, se contempla que el paso de recocido puede ayudar a promover la cristalización del excipiente y la formación de cristales de hielo más grandes debido a la recristalización de los cristales pequeños formados durante el sobreenfriamiento, lo que, a su vez, mejora la reconstitución. Típicamente, un paso de recocido incluye un intervalo u oscilación en la temperatura durante la congelación. Por ejemplo, la temperatura de congelación puede ser -40°C, y el paso de recocido aumentará la temperatura a, por ejemplo, -10°C y mantendrá esta temperatura durante un período de tiempo establecido. El tiempo del paso de recocido puede variar de 0,5 horas a 8 horas (por ejemplo, 0,5, 1,0 1,5, 2,0, 2,5, 3, 4, 6 y 8 horas). La temperatura de recocido puede estar entre la temperatura de congelación y 0°C.

**[0063]** La liofilización puede realizarse en un recipiente, tal como un tubo, una bolsa, una botella, una bandeja, un vial (por ejemplo, un vial de vidrio), una jeringa o cualquier otro recipiente adecuado. Los envases pueden ser desechables. La liofilización también se puede realizar a gran o pequeña escala. En algunos casos, puede ser deseable liofilizar la formulación de la proteína en el recipiente en donde se realizará la reconstitución de la proteína para evitar una etapa de transferencia. El recipiente en este caso puede ser, por ejemplo, un vial de 3, 4, 5, 10, 20, 50 o 100 cc.

**[0064]** Muchos diferentes liofilizadores están disponibles para este propósito, como casco secador a escala piloto (SP Industries, EE.UU.), Génesis (SP Industries) de laboratorio liofilizadores, o cualesquiera liofilizadores capaces de controlar la liofilización los parámetros del proceso dados. La liofilización se realiza congelando la formulación y posteriormente sublimando el hielo del contenido congelado a una temperatura adecuada para el secado primario. La congelación inicial lleva la formulación a una temperatura inferior a aproximadamente -20°C (por ejemplo, -50°C, -45°C, -40°C, -35°C, -30°C, -25°C, etc.) típicamente en no más de aproximadamente 4 horas (por ejemplo, no más de aproximadamente 3 horas, no más de aproximadamente 2,5 horas, no más de aproximadamente 2 horas). Bajo esta condición, la temperatura del producto está típicamente por debajo del punto eutéctico o la temperatura de colapso de la formulación. Típicamente, la temperatura de almacenamiento para el secado primario variará de aproximadamente -30 a 25°C (siempre que el producto permanezca por debajo del punto de fusión durante el secado primario) a una presión adecuada, que varía típicamente de aproximadamente 20 a 250 mTorr. La formulación, el tamaño y el tipo del recipiente que contiene la muestra (p. ej. el vial de vidrio) y el volumen de líquido determinarán principalmente el tiempo requerido para el secado, que puede variar desde unas pocas horas hasta varios días. Se lleva a cabo una etapa de secado secundario a aproximadamente 0-60°C, dependiendo principalmente del tipo y tamaño del recipiente y el tipo de proteína terapéutica empleada. Nuevamente, el volumen de líquido determinará principalmente el tiempo requerido para el secado, que puede variar desde unas pocas horas hasta varios días.

**[0065]** Como una proposición general, la liofilización se traducirá en una formulación liofilizada en donde el contenido

de humedad del mismo es menor que aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2%, menos de aproximadamente 1%, y menos de aproximadamente 0,5%.

5 Reconstitución

[0066] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención están en una forma acuosa tras la administración a un sujeto. Si las composiciones farmacéuticas de la presente invención están liofilizadas, tales composiciones deben reconstituirse añadiendo uno o más diluyentes a las mismas antes de la administración a un sujeto. En la etapa deseada, típicamente en un momento apropiado antes de la administración al paciente, la formulación liofilizada puede reconstituirse con un diluyente de tal manera que sea deseable la concentración de proteína en la formulación reconstituida.

[0067] Varios diluyentes se pueden usar. En algunas realizaciones, un diluyente adecuado para la reconstitución es agua. El agua utilizada como diluyente puede tratarse de varias maneras, incluyendo ósmosis inversa, destilación, desionización, filtraciones (por ejemplo, carbón activado, microfiltración, nanofiltración) y combinaciones de estos métodos de tratamiento. En general, el agua debe ser adecuada para inyección, incluyendo, entre otros, agua estéril o agua bacteriostática para inyección.

[0068] Diluyentes ejemplares adicionales incluyen una solución de pH tamponado (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Elliot, solución de dextrosa o solución de Ringer. Los diluyentes adecuados pueden contener opcionalmente un conservante. Los conservantes ejemplares incluyen alcoholes aromáticos tales como alcohol bencílico o fenólico. La cantidad de conservante empleada se determina evaluando diferentes concentraciones de conservante para verificar su compatibilidad con la proteína y las pruebas de eficacia del conservante. Por ejemplo, si el conservante es un alcohol aromático (como el alcohol bencílico), puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,1-2,0%, de aproximadamente 0,5-1,5%, o aproximadamente 1,0-1,2%.

[0069] Los diluyentes adecuados pueden incluir una variedad de aditivos, incluyendo, pero no limitado a, agentes tamponantes del pH, (por ejemplo, Tris, histidina,) sales (por ejemplo, cloruro sódico) y otros aditivos (por ejemplo, sacarosa), incluyendo los descritos anteriormente (por ejemplo, agentes estabilizantes, agentes de isotonicidad).

[0070] Según la presente invención, una proteína liofilizada se puede reconstituir a una concentración de al menos 25 mg/ml (por ejemplo, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml) y en cualquier intervalo entre ellos. En algunas realizaciones, la sustancia liofilizada (proteína) puede reconstituirse a una concentración que varía de aproximadamente 25 mg/ml a 100 mg/ml (por ejemplo, de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 25 mg/ml hasta aproximadamente 75 mg/ml, desde aproximadamente 25 mg/ml hasta aproximadamente 100 mg/ml, desde aproximadamente 50 mg/ml hasta aproximadamente 75 mg/ml, desde aproximadamente 50 mg/ml hasta aproximadamente 100 mg/ml). En algunas realizaciones, la concentración de proteína en la formulación reconstituida puede ser mayor que la concentración en la formulación previa a la liofilización. En algunas realizaciones, la concentración de proteína en la formulación reconstituida puede ser de aproximadamente 2-50 veces (por ejemplo, aproximadamente 2-20, aproximadamente 2-10 veces o aproximadamente 2-5 veces) de la formulación pre-liofilizada. En algunas realizaciones, la concentración de proteína en la formulación reconstituida puede ser al menos aproximadamente 2 veces (por ejemplo, al menos aproximadamente 3, 4, 5, 10, 20, 40 veces) de la formulación pre-liofilizada.

[0071] La reconstitución según la presente invención puede realizarse en cualquier recipiente. Los recipientes ejemplares adecuados para la invención incluyen, pero no se limitan a, tales como tubos, viales, jeringas (por ejemplo, de una cámara o de doble cámara), bolsas, botellas y bandejas. Los recipientes adecuados pueden estar hechos de cualquier material como vidrio, plástico, metal. Los envases pueden ser desechables o reutilizables. La reconstitución también se puede realizar a gran o pequeña escala.

[0072] En algunos casos, puede ser deseable liofilizar la formulación de proteína en el recipiente en donde la reconstitución de la proteína se va a llevar a cabo con el fin de evitar una etapa de transferencia. El recipiente en este caso puede ser, por ejemplo, un vial de 3, 4, 5, 10, 20, 50 o 100 cc. En algunas realizaciones, un recipiente adecuado para la liofilización y la reconstitución es una jeringa de doble cámara (por ejemplo, jeringas Lyo-Ject, ® (Vetter)). Por ejemplo, una jeringa de doble cámara puede contener tanto la sustancia liofilizada como el diluyente, cada uno en una cámara separada, separados por un tapón (ver Ejemplo 5). Para reconstituir, se puede unir un émbolo al tapón en el lado del diluyente y presionarlo para mover el diluyente a la cámara del producto de modo que el diluyente pueda contactar con la sustancia liofilizada y la reconstitución puede tener lugar como se describe en este documento (ver Ejemplo 5). **Administración SNC**

[0073] Se contempla que las diversas formulaciones estables descritas en este documento son generalmente adecuadas para la administración SNC de agente terapéutico. Las formulaciones estables de acuerdo con la presente invención pueden usarse para la administración del SNC a través de administraciones intratecales (por ejemplo, IT-Lumbar, IT-cisterna magna) para inyección directa o indirecta al SNC y/o LCR.

***Administración intratecal***

5 [0074] La administración intratecal puede ser utilizada para suministrar una proteína de ASA en el LCR. Como se usa en este documento, la administración intratecal (también denominada inyección intratecal) se refiere a una inyección en el canal espinal (espacio intratecal que rodea la médula espinal). Se pueden usar diversas técnicas, que incluyen, sin limitación, inyección cerebroventricular lateral a través de un orificio de perforación o punción cistemal o lumbar o similares. Métodos ejemplares se describen en Lazorthes et al. *Advances in Drug Delivery Systems and Applications in Neurosurgery*, 143-192 and Omaya et al., *Cancer Drug Delivery*, 1:169-179.

10 [0075] Según la presente invención, una enzima se puede inyectar en cualquier región que rodea el canal espinal. En algunas realizaciones, se inyecta una enzima en el área lumbar o la cisterna magna o intraventricularmente en un espacio ventricular cerebral. Como se usa en el presente documento, el término "región lumbar" o "área lumbar" se refiere al área entre la tercera y cuarta vértebras lumbares (parte inferior de la espalda) y, más inclusivamente, la 15 región L2-S1 de la columna vertebral. Típicamente, la inyección intratecal a través de la región lumbar o el área de la madera también se conoce como "suministro de IT lumbar" o "administración de IT lumbar". El término "cisterna magna" se refiere al espacio alrededor y debajo del cerebelo a través de la abertura entre el cráneo y la parte superior 20 de la columna vertebral. Típicamente, la inyección intratecal a través de cisterna magna también se conoce como "suministro de cisterna magna". El término "ventrículo cerebral" se refiere a las cavidades en el cerebro que son continuas con el canal central de la médula espinal. Típicamente, las inyecciones a través de las cavidades del ventrículo cerebral se denominan suministro cerebral intraventricular (ICV).

25 [0076] En algunas realizaciones, "administración intratecal" o "entrega intratecal", de acuerdo con la presente invención se refiere a administración o entrega lumbar de IT, por ejemplo, entregado entre la tercera y cuarta lumbar (espalda baja) vértebras y, más inclusiva, la región L2-S1 de la columna vertebral. Se contempla que la administración o entrega de IT lumbar distingue sobre la entrega de cisterna magna en que la administración o entrega de IT lumbar de acuerdo con nuestra invención proporciona una entrega mejor y más efectiva al canal espinal distal, mientras que la entrega de cisterna magna, entre otras cosas, generalmente no entrega bien al canal espinal distal.

30 **Dispositivo para administración intratecal**

35 [0077] Diversos dispositivos se pueden utilizar para la entrega intratecal de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, un dispositivo para administración intratecal contiene un puerto de acceso de fluido (por ejemplo, puerto inyectable); un cuerpo hueco (por ejemplo, un catéter) que tiene un primer orificio de flujo en comunicación fluida con el puerto de acceso de fluido y un segundo orificio de flujo configurado para inserción en la 40 médula espinal; y un mecanismo de fijación para asegurar la inserción del cuerpo hueco en la médula espinal. Como un ejemplo no limitativo que se muestra en la Figura 62, un mecanismo de fijación adecuado contiene uno o más nobs montados en la superficie del cuerpo hueco y un anillo suturado ajustable sobre uno o más nobs para evitar que el 45 cuerpo hueco (por ejemplo, el catéter) se salga de la médula espinal. En diversas realizaciones, el puerto de acceso de fluido comprende un depósito. En algunas realizaciones, el puerto de acceso de fluido comprende una bomba mecánica (por ejemplo, una bomba de infusión). En algunas realizaciones, un catéter implantado está conectado a un depósito (por ejemplo, para administración de bolo) o a una bomba de infusión. El puerto de acceso de fluido puede ser implantado o externo.

50 [0078] En algunas realizaciones, la administración intratecal puede realizarse mediante punción lumbar (es decir, bolo lento) o mediante un sistema de administración de catéter de puerto (es decir, infusión o bolo). En algunas realizaciones, el catéter se inserta entre las láminas de las vértebras lumbares y la punta se enrosca en el espacio 55 tecal hasta el nivel deseado (generalmente L3-L4) (Figura 63).

55 [0079] En relación con la administración intravenosa, un volumen de dosis única adecuado para la administración intratecal es típicamente pequeño. Típicamente, el suministro intratecal según la presente invención mantiene el equilibrio de la composición del LCR así como la presión intracranal del sujeto. En algunas realizaciones, el suministro intratecal se realiza en ausencia de la eliminación correspondiente de CSF de un sujeto. En algunas realizaciones, un volumen de dosis única adecuado puede ser, por ejemplo, inferior a aproximadamente 10 ml, 8 ml, 6 ml, 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1,5 ml, 1 ml o 0,5 ml. En algunas realizaciones, un volumen de dosis única adecuado puede ser de aproximadamente 0,5-5 ml, 0,5-4 ml, 0,5-3 ml, 0,5-2 ml, 0,5-1 ml, 1-3 ml, 1-5 ml, 1,5-3 ml, 1-4 ml o 0,5-1,5 ml. En algunas realizaciones, el suministro intratecal según la presente invención implica una etapa de eliminar primero una cantidad deseada de CSF. En algunas realizaciones, menos de aproximadamente 10 ml (por ejemplo, menos de 60 aproximadamente 9 ml, 8 ml, 7 ml, 6 ml, 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml) de CSF se eliminan primero antes de la administración de IT. En esos casos, un volumen de dosis única adecuada puede ser, por ejemplo, más de aproximadamente 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml o 20 ml.

65 [0080] Varios otros dispositivos pueden utilizarse para efectuar la administración intratecal de una composición terapéutica. Por ejemplo, las formulaciones que contienen las enzimas deseadas pueden administrarse utilizando un depósito Ommaya que es de uso común para la administración intratecal de fármacos para la carcinomatosis meníngea (*Lancet* 2: 983-84, 1963). Más específicamente, en este método, se inserta un tubo ventricular a través de

5 un orificio formado en el asta anterior y se conecta a un reservorio Ommaya instalado debajo del cuero cabelludo, y el reservorio se perfora por vía subcutánea para administrar intratecalmente la enzima particular que se está reemplazando, que se inyecta en el embalse. Otros dispositivos para la administración intratecal de composiciones terapéuticas o formulaciones a un individuo se describen en la patente de EE.UU. Nº 6,217,552. Alternativamente, el fármaco puede administrarse por vía intratecal, por ejemplo, mediante una inyección única o infusión continua. Debe entenderse que el tratamiento de dosificación puede estar en la forma de una administración de dosis única o dosis múltiples.

10 [0081] Para la inyección, las formulaciones de la invención se formulan en soluciones líquidas. Además, la enzima puede formularse en forma sólida y redissolverse o suspenderse inmediatamente antes de su uso. También se incluyen formas liofilizadas. La inyección puede ser, por ejemplo, en forma de inyección en bolo o infusión continua (por ejemplo, usando bombas de infusión) de la enzima.

15 [0082] En una realización de la invención, la enzima se administra por inyección ventricular del cerebro lateral en el cerebro de un sujeto. La inyección se puede realizar, por ejemplo, a través de un orificio realizado en el cráneo del sujeto. En otra realización, la enzima y/u otra formulación farmacéutica se administra a través de una derivación insertada quirúrgicamente en el ventrículo cerebral de un sujeto. Por ejemplo, la inyección puede realizarse en los ventrículos laterales, que son más grandes. En algunas realizaciones, también se puede realizar la inyección en el tercero y cuarto ventrículos más pequeños.

20 [0083] En otra realización más, las composiciones farmacéuticas utilizadas en la presente invención se administran por inyección en la cisterna magna, o área lumbar de un sujeto.

25 [0084] En otra realización del método de la invención, la formulación farmacéuticamente aceptable proporciona la liberación sostenida, por ejemplo, "liberación lenta" de la enzima u otra composición farmacéutica utilizada en la presente invención, a un sujeto durante al menos uno, dos, tres, cuatro semanas o períodos de tiempo más largos después de que la formulación farmacéuticamente aceptable se administra al sujeto.

30 [0085] Tal como se utiliza aquí, el término "liberación sostenida" se refiere a la entrega continua de una formulación farmacéutica de la invención *in vivo* durante un período de tiempo después de la administración, preferiblemente al menos varios días, una semana o varias semanas. El suministro sostenido de la composición puede demostrarse, por ejemplo, mediante el efecto terapéutico continuo de la enzima a lo largo del tiempo (por ejemplo, el suministro sostenido de la enzima puede demostrarse mediante una cantidad reducida continua de gránulos de almacenamiento en el sujeto). Alternativamente, el suministro sostenido de la enzima puede demostrarse detectando la presencia de la enzima *in vivo* a lo largo del tiempo.

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

40 [0086] Como se discutió anteriormente, una de las características sorprendentes e importantes de la presente invención es que la sustitución de la enzima administrada usando composiciones de la presente invención son capaces de difundirse con eficacia y extensivamente a través de la superficie del cerebro y penetrar en diversas capas o regiones del cerebro, incluidas las regiones del cerebro profundo. Además, las composiciones de la presente invención administran efectivamente una enzima ASA a diversos tejidos, neuronas o células de la médula espinal, incluida la región lumbar, que es difícil de alcanzar mediante los métodos existentes de administración del SNC, como la inyección de ICV. Además, las composiciones de la presente invención suministran una cantidad suficiente de una enzima ASA al torrente sanguíneo y a varios órganos y tejidos periféricos.

45 [0087] Por lo tanto, en algunas realizaciones, una enzima ASA se suministra al sistema nervioso central de un sujeto. En algunas realizaciones, se suministra una enzima ASA a uno o más tejidos diana del cerebro, la médula espinal y/u órganos periféricos. Como se usa en el presente documento, el término "tejidos diana" se refiere a cualquier tejido afectado por la enfermedad de almacenamiento lisosomal a tratar o cualquier tejido en donde la enzima lisosomal deficiente se expresa normalmente. En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen aquellos tejidos en los que hay una cantidad detectable o anormalmente alta de sustrato enzimático, por ejemplo almacenado en los lisosomas celulares del tejido, en pacientes que padecen o son susceptibles a la enfermedad de almacenamiento lisosómico. En 55 algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen aquellos tejidos que muestran patología, síntoma o característica asociada a la enfermedad. En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen aquellos tejidos en los que la enzima lisosómica deficiente se expresa normalmente a un nivel elevado. Como se usa en el presente documento, un tejido diana puede ser un tejido diana del cerebro, un tejido diana de la médula espinal y/o un tejido diana periférico. Los tejidos diana ejemplares se describen en detalle a continuación.

#### 60 Tejidos de diana cerebral

65 [0088] En general, el cerebro se puede dividir en diferentes regiones, capas y tejidos. Por ejemplo, el tejido meníngeo es un sistema de membranas que envuelve el sistema nervioso central, incluido el cerebro. Las meninges contienen tres capas, que incluyen materia dura, materia aracnoidea y materia pia. En general, la función principal de las meninges y del líquido cefalorraquídeo es proteger el sistema nervioso central. En algunas realizaciones, una proteína

terapéutica de acuerdo con la presente invención se administra a una o más capas de las meninges.

**[0089]** El cerebro tiene tres subdivisiones principales, incluyendo el cerebro, el cerebelo y el tronco cerebral. Los hemisferios cerebrales, que están situados sobre la mayoría de las otras estructuras cerebrales y están cubiertos con una capa cortical. Debajo del cerebro se encuentra el tronco encefálico, que se asemeja a un tallo al que se une el cerebro. En la parte posterior del cerebro, debajo del cerebro y detrás del tronco encefálico, se encuentra el cerebelo.

**[0090]** El diencéfalo, que se encuentra cerca de la línea media del cerebro y por encima del mesencéfalo, contiene el tálamo, metatálamo, el hipotálamo, epítalamo, prethalamus, y pretectum. El mesencéfalo, también llamado mesencéfalo, contiene el tectum, tegumentum, mesocoelia ventricular y pedúnculos cerebrales, el núcleo rojo y el núcleo del nervio craneal III. El mesencéfalo se asocia con visión, audición, control motor, sueño/vigilia, estado de alerta, y regulación de la temperatura.

**[0091]** Las regiones de los tejidos del sistema nervioso central, incluido el cerebro, se pueden caracterizar en función de la profundidad de los tejidos. Por ejemplo, los tejidos del SNC (p. ej., El cerebro) pueden caracterizarse como tejidos superficiales o poco profundos, tejidos de profundidad media y/o tejidos profundos.

**[0092]** Según la presente invención, una proteína terapéutica (una enzima de sustitución) puede ser suministrada a cualquier tejido diana cerebral apropiado asociado con una enfermedad particular a tratar en un sujeto. En algunas realizaciones, una proteína terapéutica (una enzima de reemplazo) de acuerdo con la presente invención se administra al tejido diana cerebral superficial. En algunas realizaciones, una proteína terapéutica de acuerdo con la presente invención se administra al tejido diana cerebral de profundidad media. En algunas realizaciones, una proteína terapéutica de acuerdo con la presente invención se administra al tejido diana cerebral profundo. En algunas realizaciones, una proteína terapéutica de acuerdo con la presente invención se administra a una combinación de tejido diana cerebral superficial, tejido diana cerebral de profundidad media, y/o tejido diana cerebral profundo. En algunas realizaciones, una proteína terapéutica de acuerdo con la presente invención se administra a un tejido cerebral profundo al menos 4 mm, 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm, 10 mm o más por debajo (o interno a) la superficie externa del cerebro.

**[0093]** En algunas realizaciones, el agente terapéutico (enzima) se entrega a uno o más tejidos superficiales o poco profundos de cerebro. En algunas realizaciones, la superficie diana o los tejidos poco profundos del cerebro se encuentran dentro de los 4 mm de la superficie del cerebro. En algunas realizaciones, la superficie diana o los tejidos poco profundos del cerebro se seleccionan de tejidos de la piamadre, tejidos de la cinta cortical cerebral, hipocampo, espacio Virchow Robin, vasos sanguíneos dentro del espacio VR, el hipocampo, porciones del hipotálamo en la superficie inferior del cerebro, los nervios y tractos ópticos, el bulbo olfativo y las proyecciones, y sus combinaciones.

**[0094]** En algunas realizaciones, el agente terapéutico (enzima) se entrega a uno o más tejidos profundos del cerebro. En algunas realizaciones, la superficie diana o los tejidos poco profundos del cerebro se encuentran a 4 mm (por ejemplo, 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm o 10 mm) debajo (o internamente) de la superficie del cerebro. En algunas realizaciones, los tejidos profundos específicos del cerebro incluyen la cinta cortical cerebral. En algunas realizaciones, tejidos profundos dirigidos del cerebro incluyen uno o más del diencéfalo (por ejemplo, el hipotálamo, tálamo, prethalamus, subtálamo, etc.), metencéfalo, núcleos lenticulares, los ganglios basales, núcleo caudado, putamen, amígdala, globo pálido y sus combinaciones.

**[0095]** En algunas realizaciones, el agente terapéutico (por ejemplo, enzima) se entrega a uno o más tejidos del cerebelo. En ciertas realizaciones, el uno o más tejidos específicos del cerebelo se seleccionan del grupo que consiste en tejidos de la capa molecular, tejidos de la capa de células de Purkinje, tejidos de la capa de células granulares, pedúnculos cerebelosos y una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el agente terapéutico (enzima) se administra a uno o más tejidos profundos del cerebelo que incluyen, pero no se limitan a, tejidos de la capa de células de Purkinje, tejidos de la capa de células granulares, tejido de materia blanca cerebelosa profunda (por ejemplo, profundo en relación con la capa de células granulares), y tejido profundo del núcleo cerebeloso.

**[0096]** En algunas realizaciones, el agente terapéutico (enzima) se entrega a uno o más tejidos del tronco cerebral. En algunas realizaciones, el uno o más tejidos dirigidos del tronco encefálico incluyen tejido de sustancia blanca del tronco encefálico y/o tejido de núcleo del tronco encefálico.

**[0097]** En algunas realizaciones, el agente terapéutico (enzima) se entrega a varios tejidos del cerebro incluyendo, pero no limitado a, la materia gris, la materia blanca, zonas periventriculares, pia-aracnoides, meninges, neocórtex, cerebelo, tejidos profundos en la corteza cerebral, capa molecular, región caudada/putamen, mesencéfalo, regiones profundas de la protuberancia o médula, y sus combinaciones.

**[0098]** En algunas realizaciones, el agente terapéutico (enzima) se entrega a diversas células en el cerebro, incluyendo pero no limitado a, neuronas, células gliales, células perivasculares y/o células de las meninges. En algunas realizaciones, se administra una proteína terapéutica a oligodendrocitos de materia blanca profunda.

**Médula Espinal.**

5 [0099] En general, las regiones o los tejidos de la médula espinal pueden ser caracterizados en base a la profundidad de los tejidos. Por ejemplo, los tejidos de la médula espinal pueden caracterizarse como tejidos superficiales o superficiales, tejidos de profundidad media y/o tejidos profundos.

10 [0100] En algunas realizaciones, el agente terapéutico (enzima) se administra a uno o más tejidos superficiales o poco profundos de la médula espinal. En algunas realizaciones, una superficie específica o tejido superficial de la médula espinal se encuentra dentro de los 4 mm de la superficie de la médula espinal. En algunas realizaciones, una superficie específica o tejido superficial de la médula espinal contiene materia pia y/o tractos de materia blanca.

15 [0101] En algunas realizaciones, el agente terapéutico (enzima) se administra a uno o más tejidos profundos de la médula espinal. En algunas realizaciones, un tejido profundo dirigido de la médula espinal se encuentra interno a 4 mm de la superficie de la médula espinal. En algunas realizaciones, un tejido profundo dirigido de la médula espinal contiene materia gris de la médula espinal y/o células ependimarias.

20 [0102] En algunas realizaciones, el agente terapéutico (enzima) se administra a las neuronas de la médula espinal.

#### Tejidos diana periféricos

25 [0103] Como se usa en este documento, los órganos o tejidos periféricos se refieren a cualquier órgano o tejido que no es parte del sistema nervioso central (SNC). Los tejidos diana periféricos pueden incluir, entre otros, sistema sanguíneo, hígado, riñón, corazón, endotelio, médula ósea y células derivadas de médula ósea, bazo, pulmón, ganglio linfático, hueso, cartílago, ovario y testículo. En algunas realizaciones, una proteína terapéutica (una enzima de reemplazo) de acuerdo con la presente invención se administra a uno o más de los tejidos diana periféricos.

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

30 [0104] En diversas realizaciones, una vez entregada al tejido diana, la enzima ASA se localiza intracelularmente. Por ejemplo, un agente terapéutico (enzima) puede localizarse en exones, axones, lisosomas, mitocondrias o vacuolas de una célula diana (por ejemplo, neuronas como las células de Purkinje). Por ejemplo, en algunas realizaciones, las enzimas administradas intratecalmente demuestran una dinámica de translocación tal que la enzima se mueve dentro del espacio perivascular (por ejemplo, mediante mecanismos convectivos asistidos por pulsación). Además, los mecanismos activos de transporte axonal relacionados con la asociación de la proteína o enzima administrada con los neurofilamentos también pueden contribuir o facilitar la distribución de proteínas o enzimas administradas intratecalmente en los tejidos más profundos del sistema nervioso central.

35 [0105] En algunas realizaciones, una enzima ASA administrada de acuerdo con la presente invención puede alcanzar niveles o actividades terapéutica o clínicamente eficaces en diversos tejidos diana descritos en este documento. Como se usa en el presente documento, un nivel o actividad terapéutica o clínicamente eficaz es un nivel o actividad suficiente para conferir un efecto terapéutico en un tejido diana. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible por alguna prueba o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación o siente un efecto). Por ejemplo, un nivel o actividad terapéutica o clínicamente efectiva puede ser un nivel o actividad enzimática que sea suficiente para mejorar los síntomas asociados con la enfermedad en el tejido diana (por ejemplo, almacenamiento de GAG).

40 [0106] En algunas realizaciones, un agente terapéutico (una enzima de reemplazo) administrado según la presente invención puede lograr un nivel o actividad enzimática que es al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% del nivel o actividad normal de la enzima lisosómica correspondiente en el tejido diana. En algunas realizaciones, un agente terapéutico (una enzima de reemplazo) administrado de acuerdo con la presente invención puede alcanzar un nivel o actividad enzimática que se incrementa al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces en comparación con un control (por ejemplo, niveles endógenos o actividades sin el tratamiento). En algunas realizaciones, un agente terapéutico (por ejemplo, una enzima de reemplazo) administrado de acuerdo con la presente invención puede lograr un nivel o actividad enzimática aumentada de al menos aproximadamente 10 nmol/hr/mg, 20 nmol/hr/mg, 40 nmol/hr/mg, 50 nmol/hr/mg, 60 nmol/hr/mg, 70 nmol/hr/mg, 80 nmol/hr/mg, 90 nmol/hr/mg, 100 nmol/hr/mg, 150 nmol/hr/mg, 200 nmol/hr/mg, 250 nmol/hr/mg, 300 nmol/hr/mg, 350 nmol/hr/mg, 400 nmol/hr/mg, 450 nmol/hr/mg, 500 nmol/hr/mg, 550 nmol/hr/mg o 600 nmol/hr/mg en un tejido diana.

45 [0107] En algunas realizaciones, los métodos inventivos de acuerdo con la presente invención son particularmente útiles para apuntar a la región lumbar. En algunas realizaciones, un agente terapéutico (una enzima de reemplazo) administrado según la presente invención puede lograr un nivel o actividad enzimática incrementada en la región lumbar de al menos aproximadamente 500 nmol/hr/mg, 600 nmol/hr/mg, 700 nmol/hr/mg, 800 nmol/hr/mg, 900 nmol/hr/mg, 1000 nmol/hr/mg, 1500 nmol/hr/mg, 2000 nmol/hr/mg, 3000 nmol/hr/mg, 4000 nmol/hr/mg, 5000 nmol/hr/mg, 6000 nmol/hr/mg, 7000 nmol/hr/mg, 8000 nmol/hr/mg, 9000 nmol/hr/mg, o 10.000 nmol/hr/mg.

50 [0108] En general, los agentes terapéuticos (enzimas de reemplazo) administrados de acuerdo con la presente

invención tienen un tiempo medio suficientemente largo en LCR y tejidos diana del cerebro, la médula espinal y los órganos periféricos. En algunas realizaciones, un agente terapéutico (una enzima de reemplazo) administrado según la presente invención puede tener una vida media de al menos aproximadamente 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 25 horas, 30 horas, 35 horas, 40 horas, hasta 3 días, hasta 7 días, hasta 14 días, hasta 21 días o hasta un mes. En algunas realizaciones, en algunas realizaciones, un agente terapéutico de agente (por ejemplo, una enzima de sustitución) entregada de acuerdo con la presente invención puede retener nivel detectable o actividad en el LCR o el torrente sanguíneo después de 12 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 42 horas, 48 horas, 54 horas, 60 horas, 66 horas, 72 horas, 78 horas, 84 horas, 90 horas, 96 horas, 102 horas o una semana después de la administración. El nivel o actividad detectable puede determinarse usando varios métodos conocidos en la técnica.

[0109] En ciertas realizaciones, un agente terapéutico (una enzima de reemplazo) administrado de acuerdo con la presente invención logra una concentración de al menos 30 µg/ml en los tejidos y células del SNC del sujeto después de la administración (por ejemplo, una semana, 3). días, 48 horas, 36 horas, 24 horas, 18 horas, 12 horas, 8 horas, 6 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos o menos, después de la administración intratecal de la composición farmacéutica al tema). En ciertas realizaciones, un agente terapéutico (una enzima de reemplazo) administrado de acuerdo con la presente invención logra una concentración de al menos 20 µg/ml, al menos 15 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 7,5 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 25 µg/ml, al menos 10 µg/ml o al menos 0,5 µg/ml en los tejidos o células diana del sujeto (p. ej., tejidos cerebrales o neuronas) después de la administración a dicho sujeto (por ejemplo, una semana, 3 días, 48 horas, 36 horas, 24 horas, 18 horas, 12 horas, 8 horas, 6 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos o menos después de la administración intratecal de tales composiciones farmacéuticas al sujeto).

#### ***Tratamiento de la enfermedad de leucodistrofia metacromática (MLD)***

[0110] La enfermedad de leucodistrofia metacromática (MLD) es un trastorno autosómico recesivo resultante de una deficiencia de la enzima arilsulfatoasa A (ASA). El ASA, que está codificado por el gen ARSA en humanos, es una enzima que descompone el 3-sulfato de cerebrósido o 3-O-sulfogalactosilceramida de esfingolípido (sulfatida) en cerebrósido y sulfato. En ausencia de la enzima, las sulfatidas se acumulan en el sistema nervioso (p. ej., vainas de mielina, neuronas y células gliales) y, en menor medida, en los órganos viscerales. La consecuencia de estos eventos moleculares y celulares es la desmielinización progresiva y la pérdida axonal dentro del SNC y el SNP, que se acompaña clínicamente de disfunción motora y cognitiva grave.

[0111] Una característica clínica que define este trastorno es la degeneración del sistema nervioso central (SNC), que resulta en el deterioro cognitivo (por ejemplo, retraso mental, trastornos nerviosos, y ceguera, entre otros).

[0112] MLD puede manifestarse en niños pequeños (de forma tardía-infantil), donde los niños afectados suelen comenzar a mostrar síntomas justo después del primer año de vida (por ejemplo, a unos 15-24 meses), y generalmente no sobreviven más allá de la edad de 5 años. La MLD puede manifestarse en niños (forma juvenil), donde los niños afectados generalmente muestran deterioro cognitivo alrededor de la edad de 3 a 10 años, y la vida útil puede variar (por ejemplo, en el rango de 10 a 15 años después del inicio de los síntomas). La MLD puede manifestarse en adultos (forma de inicio en adultos) y puede aparecer en personas de cualquier edad (p. ej., generalmente a los 16 años o más) y la progresión de la enfermedad puede variar mucho.

[0113] Las composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar eficazmente a individuos que padecen o son susceptibles a MLD. Los términos "tratar" o "tratamiento", como se usan en este documento, se refieren a la mejora de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, la prevención o el retraso de la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad, y/o la disminución de la gravedad o frecuencia de uno o más síntomas de la enfermedad. Los síntomas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, presión intracranal, hidrocefalia ex vacuo, glucolípidos sulfatados acumulados en las vainas de mielina en el sistema nervioso central y periférico y en los órganos viscerales, desmielinización progresiva y pérdida axonal dentro del SNC y el SNP, y/o disfunción motora y cognitiva.

[0114] En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a alivio parcial o completo, mejora, alivio, inhibición, inicio tardío, reducción de la gravedad y/o incidencia de deterioro neurológico en un paciente con MLD. Como se usa en el presente documento, el término "deterioro neurológico" incluye varios síntomas asociados con el deterioro del sistema nervioso central (por ejemplo, el cerebro y la médula espinal). En algunas realizaciones, varios síntomas de MLD están asociados con el deterioro del sistema nervioso periférico (SNP). En algunas realizaciones, el deterioro neurológico en un paciente con MLD se caracteriza por una disminución de la función motora gruesa. Se apreciará que la función motora gruesa puede evaluarse mediante cualquier método apropiada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la función motora gruesa se mide como el cambio desde una línea base en la función motora utilizando la puntuación bruta total de la función motora gruesa-88 (GMFM-88).

[0115] En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la disminución de la acumulación de sulfatida en diversos tejidos. En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la disminución de la acumulación de sulfatida en los tejidos diana del cerebro, las neuronas de la médula espinal y/o los tejidos diana periféricos. En ciertas realizaciones, la acumulación de sulfatida disminuye en aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%,

55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más en comparación con un control. En algunas realizaciones, la acumulación de sulfatida disminuye al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces en comparación con un control. Se apreciará que el almacenamiento de sulfatida se puede evaluar por cualquier método apropiada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el almacenamiento de sulfatida se mide por tinción con azul alciano. En algunas realizaciones, el almacenamiento de sulfatida se mide por tinción con LAMP-1.

5 [0116] En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la vacuolización reducida en neuronas (por ejemplo, neuronas que contienen células de Purkinje). En ciertas realizaciones, la vacuolización en las neuronas disminuye en aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más en comparación con un control. En algunas realizaciones, la vacuolización se reduce al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces como en comparación con un control.

10 [0117] En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere al aumento de la actividad de la enzima ASA en diversos tejidos. En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere al aumento de la actividad de la enzima ASA en tejidos diana del cerebro, neuronas de la médula espinal y/o tejidos diana periféricos. En algunas realizaciones, la actividad de la enzima ASA aumenta en aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más en comparación a un control. En algunas realizaciones, la actividad de la enzima ASA aumenta al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10- doblar en comparación con un control. En algunas realizaciones, el aumento de la actividad enzimática ASA es de al menos aproximadamente 10 nmol/hr/mg, 20 nmol/hr/mg, 40 nmol/hr/mg, 50 nmol/hr/mg, 60 nmol/hr/mg, 70 nmol/hr/mg, 80 nmol/hr/mg, 90 nmol/hr/mg, 100 nmol/hr/mg, 150 nmol/hr/mg, 200 nmol/hr/mg, 250 nmol/hr/mg, 300 nmol/hr/mg, 350 nmol/hr/mg, 400 nmol/hr/mg, 450 nmol/hr/mg, 500 nmol/hr/mg, 550 nmol/hr/mg, 600 nmol/hr/mg o más. En algunas realizaciones, la actividad enzimática ASA aumenta en la región lumbar. En algunas realizaciones, el aumento de la actividad enzimática ASA en la región lumbar es de al menos aproximadamente 2000 nmol/hr/mg, 3000 nmol/hr/mg, 4000 nmol/hr/mg, 5000 nmol/hr/mg, 6000 nmol/hr/mg, 7000 nmol/hr/mg, 8000 nmol/hr/mg, 9000 nmol/hr/mg, 10.000 nmol/hr/mg, o más.

15 [0118] En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la disminución de la progresión de la pérdida de la capacidad cognitiva. En ciertas realizaciones, la progresión de la pérdida de la capacidad cognitiva disminuye en aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más en comparación con un control. En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la disminución del retraso del desarrollo. En ciertas realizaciones, el retraso del desarrollo disminuye en aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más en comparación con un control.

20 [0119] En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere al aumento de la supervivencia (por ejemplo, el tiempo de supervivencia). Por ejemplo, el tratamiento puede aumentar la esperanza de vida de un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento da como resultado una mayor esperanza de vida de un paciente en más de aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 100%, aproximadamente 105%, aproximadamente 110%, aproximadamente 115%, aproximadamente 120%, aproximadamente 125%, aproximadamente 130%, aproximadamente 135%, aproximadamente 140%, aproximadamente 145%, aproximadamente 150%, aproximadamente 155%, aproximadamente 160%, aproximadamente 165%, aproximadamente 170%, aproximadamente el 175%, aproximadamente el 180%, aproximadamente 185%, aproximadamente el 190%, aproximadamente el 195%, aproximadamente el 200% o más, en comparación con la esperanza media de vida de uno o más individuos de control con enfermedad similar sin tratamiento. En algunas realizaciones, el tratamiento da como resultado una mayor esperanza de vida de un paciente en más de aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses, aproximadamente 12 meses, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 6 años, aproximadamente 7 años, aproximadamente 8 años, aproximadamente 9 años, aproximadamente 10 años o más, en comparación con la esperanza de vida promedio de uno o más individuos de control con enfermedad similar sin tratamiento. En algunas realizaciones, el tratamiento da como resultado la supervivencia a largo plazo de un paciente. Como se usa en el presente documento, el término "supervivencia a largo plazo" se refiere a un tiempo de supervivencia o esperanza de vida superior a aproximadamente 40 años, 45 años, 50 años, 55 años, 60 años o más.

25 [0120] Los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir", como se usan en el presente documento, indican valores que son relativos a un control. En algunas realizaciones, un control adecuado es una medición de referencia, tal como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito aquí, o una medición en un control individual (o individuos de control múltiple) en ausencia del tratamiento descrito aquí. Un "individuo de control" es un individuo afectado con la misma forma MLD (p. ej., Forma infantil tardía, juvenil o de inicio en la edad adulta), que tiene

aproximadamente la misma edad y/o sexo que la persona tratada (para asegurar que las etapas de la enfermedad en el individuo tratado y el individuo o individuos de control son comparables).

5 [0121] El individuo (también denominado "paciente" o "sujeto") que está siendo tratado es un individuo (feto, bebé, niño, adolescente o adulto humano) que tiene MLD o que tiene el potencial de desarrollar MLD. El individuo puede tener expresión y/o actividad de ASA endógena residual, o ninguna actividad medible. Por ejemplo, el individuo que tiene MLD puede tener niveles de expresión ASA que son menos de aproximadamente 30-50%, menos de aproximadamente 25-30%, menos de aproximadamente 20-25%, menos de aproximadamente 15-20%, menos de aproximadamente 10 -15%, menos de aproximadamente 5-10%, menos de aproximadamente 0,1-5% de los niveles normales de expresión de ASA.

10 [0122] En algunas realizaciones, el individuo es un individuo que ha sido diagnosticado recientemente con la enfermedad. Por lo general, el tratamiento temprano (el tratamiento comienza lo antes posible después del diagnóstico) es importante para minimizar los efectos de la enfermedad y maximizar los beneficios del tratamiento.

15 Tolerancia inmunológica

20 [0123] Generalmente, la administración intratecal de un agente terapéutico (una enzima de reemplazo) según la presente invención no produce efectos adversos graves en el sujeto. Como se usa en este documento, los efectos adversos graves inducen, pero no se limitan a, una respuesta inmune sustancial, toxicidad o muerte. Como se usa en el presente documento, el término "respuesta inmune sustancial" se refiere a respuestas inmunes graves, tales como respuestas inmunes adaptativas de células T.

25 [0124] Por lo tanto, en muchas realizaciones, el uso de una composición en un método de tratamiento de MLD de acuerdo con la presente invención no implica una terapia inmunosupresora concurrente (es decir, cualquier terapia inmunosupresora usada como pretratamiento/preacondicionamiento o en paralelo al método). En algunas realizaciones, dicho uso no implica una inducción de tolerancia inmune en el sujeto que está siendo tratado. En algunas realizaciones, dicho uso no implica un pretratamiento o preacondicionamiento del sujeto usando agente inmunosupresor de células T.

30 [0125] En algunas realizaciones, la administración intratecal de agentes terapéuticos puede generar una respuesta inmune contra estos agentes. Por lo tanto, en algunos modelos de realización, puede ser útil hacer que el sujeto que recibe la enzima de reemplazo sea tolerante a la terapia de reemplazo de enzima. La tolerancia inmune se puede inducir usando diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un régimen inicial de 30-60 días de un agente inmunosupresor de células T como la ciclosporina A (CsA) y un agente antiproliferativo, como la azatioprina (Aza), combinado con infusiones intratecales semanales de dosis bajas de una enzima de reemplazo deseada puede ser usado.

40 [0126] Cualquier agente inmunosupresor conocido por el experto en la técnica puede emplearse junto con una terapia de combinación. Dichos agentes inmunosupresores incluyen, entre otros, ciclosporina, FK506, rapamicina, CTLA4-Ig y agentes anti-TNF tales como etanercept (véase, por ejemplo, Moder, 2000, Ann. Allergy Asthma Immunol. 84, 280-284; Nevins, 5 2000, Curr. Opin. Pediatr., 12, 146-150; Kurlberg et al., 2000, Scand. J. Immunol. 51, 224-230; Ideguchi et. al, 2000, Neurociencia 95, 217-226; Potteret al, 1999, Ann NY Acad Sci 875, 159-174; Slavik et al, 1999, Immunol Res 19, 1-24; Gazlev et al., 1999, Bone Marrow Transplant. 25, 689-696; Henry, 1999, Clin. Transplant. 13, 209-220; Gummert et al., 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10, 1366-1380; Qi et al., 2000, Transplantation 69, 1275-1283). El anticuerpo anti-receptor de IL2 (subunidad  $\alpha$ ) daclizumab (por ejemplo, Zenapax.TM.), Que se ha demostrado eficaz en pacientes trasplantados, también puede usarse como un agente inmunosupresor (ver, por ejemplo, Wiseman et al., 1999, Drogas). 58, 1029-1042; Beniaminovitz et al., 2000, N. Engl J. Med. 342, 613-619; Ponticelli et al., 1999, Drugs R<sub>d</sub> 1, 55-60; Berard et al., 1999, Farmacoterapia 19, 1127-1137; Eckhoff et al., 2000, Transplantation 69, 1867-1872; Ekberg et al., 2000, Transpl. Int. 13, 151-159). Los agentes inmunosupresores adicionales incluyen, entre otros, anti-CD2 (Branco et al., 1999, Transplantation 68, 1588-1596; Przepiorka et al., 1998, Blood 92, 4066-4071), anti-CD4 (Marinova-Mutafchieva et al., 2000, Arthritis Rheum. 43, 638-644; Fishwild et al., 1999, Clin. Immunol. 92, 138-152), y ligando anti-CD40 (Hong et al., 2000, Semin. Nephrol. 20, 108-125; Chirmule et al., 2000, J. Virol. 74, 3345-3352; Ito et al., 2000, J. Immunol. 164, 1230-1235).

55 Administración

60 [0127] Se contemplan administraciones tanto simples como múltiples de una cantidad terapéuticamente efectiva del agente terapéutico (enzimas de reemplazo). El agente terapéutico (enzimas de reemplazo) se puede administrar a intervalos regulares, dependiendo de la naturaleza, gravedad y extensión de la condición del sujeto. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva del agente terapéutico (enzimas de reemplazo) puede administrarse por vía intratecal periódicamente a intervalos regulares (por ejemplo, una vez al año, una vez cada seis meses, una vez cada cinco meses, una vez cada tres meses, bimensualmente (una vez cada dos meses), mensualmente (una vez al mes), quincenalmente (una vez cada dos semanas), semanal).

65 [0128] En algunas realizaciones, la administración intratecal puede usarse junto con otras vías de administración (por

ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, transdérmica o transmucosa (por ejemplo, oral o nasal)). En algunas realizaciones, esas otras vías de administración (por ejemplo, administración intravenosa) pueden realizarse no más frecuentemente que quincenalmente, mensualmente, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses, una vez cada cinco meses, una vez cada seis meses, administración anual.

5 **[0129]** Tal como se utiliza aquí, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" es la base en gran parte determinada de la cantidad total de agente terapéutico contenida en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Generalmente, una cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para lograr un beneficio significativo para el sujeto (por ejemplo, tratar, modular, curar, prevenir y/o mejorar la enfermedad o afección subyacente). Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva puede ser una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, tal como una cantidad suficiente para modular los receptores de enzimas lisosomales o su actividad para tratar de ese modo la enfermedad de almacenamiento lisosómico o sus síntomas (por ejemplo, una reducción o eliminación de la presencia o incidencia de "cuerpos de cebra" o vacuolización celular después de la administración de las composiciones de la presente invención a un sujeto). Generalmente, la cantidad de un agente terapéutico (por ejemplo, una enzima lisosómica recombinante) administrada a un sujeto que lo necesite dependerá de las características del sujeto. Dichas características incluyen la condición, la gravedad de la enfermedad, la salud general, la edad, el sexo y el peso corporal del sujeto. Un experto en la materia podrá determinar fácilmente las dosis apropiadas dependiendo de estos y otros factores relacionados. Además, tanto los ensayos diana como los subjetivos pueden emplearse opcionalmente para identificar rangos de dosificación óptimos.

10 **[0130]** Una cantidad terapéuticamente efectiva se administra comúnmente en un régimen de dosificación que puede comprender múltiples dosis unitarias. Para cualquier proteína terapéutica particular, una cantidad terapéuticamente efectiva (y/o una dosis unitaria apropiada dentro de un régimen de dosificación eficaz) puede variar, por ejemplo, dependiendo de la vía de administración, en combinación con otros agentes farmacéuticos. Además, la cantidad terapéuticamente efectiva específica (y/o dosis unitaria) para cualquier paciente en particular puede depender de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se trata y la gravedad del trastorno; la actividad del agente farmacéutico específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, la ruta de administración y/o la tasa de excreción o metabolismo de la proteína de fusión específica empleada; la duración del tratamiento; y factores similares como es bien conocido en las técnicas médicas.

15 **[0131]** En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente efectiva varía de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 500 mg/kg de peso cerebral, por ejemplo, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 400 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 300 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 200 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 100 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 90 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 80 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 70 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 60 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 50 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 40 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 30 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 25 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 20 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 15 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 10 mg/kg de peso cerebral.

20 **[0132]** En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente efectiva es mayor que aproximadamente 0,1 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 0,5 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 1,0 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 3 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 5 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 10 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 15 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 20 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 30 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 40 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 50 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 60 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 70 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 80 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 90 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 100 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 150 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 200 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 250 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 300 mg/kg de peso cerebral, mayor de aproximadamente 350 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 400 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 450 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 500 mg/kg de peso cerebral.

25 **[0133]** En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente efectiva también puede definirse por mg/kg de peso corporal. Como apreciaría un experto en la materia, los pesos cerebrales y los pesos corporales pueden correlacionarse. Dekaban AS. "Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights", Ann Neurol 1978; 4: 345-56. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las dosis pueden convertirse como se muestra en la Tabla 5.

TABLA 5

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

[0134] En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente efectiva también puede definirse por mg/15 cc de CSF. Como apreciaría un experto en la materia, las dosis terapéuticamente efectivas basadas en los pesos cerebrales y los pesos corporales se pueden convertir a mg/15 cc de LCR. Por ejemplo, el volumen de LCR en humanos adultos es de aproximadamente 150 ml (Johanson CE, et al. "Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease", Cerebrospinal Fluid Res. 2008 14;5:10). Por lo tanto, las inyecciones de dosis única de 0,1 mg a 50 mg de proteína para adultos serían aproximadamente 0,01 mg/15 cc de CSF (0,1 mg) a 5,0 mg/15 cc de dosis de CSF (50 mg) en adultos.

[0135] Se ha de entender que para cualquier sujeto particular adicional, regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de la terapia de reemplazo de enzimas y que los intervalos de dosificación establecidos aquí en adelante son solo ejemplares.

#### *Kits*

[0136] Además, se proporcionan kits u otros artículos de fabricación que contienen la formulación de la presente invención y proporcionan instrucciones para su reconstitución (si está liofilizada) y/o uso. Los kits u otros artículos de fabricación pueden incluir un contenedor, un IDDD, un catéter y cualquier otro artículo, dispositivo o equipo útil en la administración intercal y la cirugía asociada. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas (por ejemplo, jeringas precargadas), ampollas, cartuchos, depósitos o lyo-jects. El contenedor puede estar formado por una variedad de materiales como vidrio o plástico. En algunas realizaciones, un recipiente es una jeringa precargada. Las jeringas precargadas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, jeringas de vidrio de borosilicato con revestimiento de silicona cocida, jeringas de vidrio de borosilicato con silicona pulverizada o jeringas de resina plástica sin silicona.

[0137] Típicamente, el contenedor puede contener formulaciones y una etiqueta, o estar asociado con el contenedor, que puede indicar instrucciones para la reconstitución y/o uso. Por ejemplo, la etiqueta puede indicar que la formulación se reconstituye a concentraciones de proteína como se describe anteriormente. La etiqueta puede indicar además que la formulación es útil o está destinada, por ejemplo, a la administración de IT. En algunas realizaciones, un recipiente puede contener una dosis única de una formulación estable que contiene un agente terapéutico (una enzima de reemplazo). En diversas realizaciones, una dosis única de la formulación estable está presente en un volumen de menos de aproximadamente 15 ml, 10 ml, 5,0 ml, 4,0 ml, 3,5 ml, 3,0 ml, 2,5 ml, 2,0 ml, 1,5 ml, 1,0 ml, o 0,5 ml. Alternativamente, un recipiente que contiene la formulación puede ser un vial de usos múltiples, que permite la administración repetida (por ejemplo, de 2 a 6 administraciones) de la formulación. Los kits u otros artículos de fabricación pueden incluir además un segundo recipiente que comprende un diluyente adecuado (por ejemplo, BWFI, solución salina, solución salina tamponada). Al mezclar el diluyente y la formulación, la concentración final de proteína en la formulación reconstituida generalmente será de al menos 1 mg/ml (por ejemplo, al menos 5 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml). Los kits u otros artículos de fabricación pueden incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, IDDD, catéteres, jeringas e insertos de paquetes con instrucciones de uso.

[0138] La invención se entenderá más plenamente por referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

#### EJEMPLOS

##### EJEMPLO 1: TOXICOLOGÍA DE LA ARILSULFATASA A ADMINISTRADA

[0139] Para evaluar la capacidad de otras enzimas recombinantes administradas intratecalmente para distribuirse en las células y tejidos del estudio SNC, GLP se realizó para evaluar la administración intratecal (IT) de dosis repetidas de arilsulfatasa A humana (rhASA) preparada de forma recombinante desde una perspectiva de toxicología y farmacología de seguridad durante un período de un mes en monos cynomolgus juveniles (menores de 12 meses de edad). La formulación de rhASA se preparó y formuló en un vehículo de NaCl 154 mM, 0,005% de polisorbato 20 a un pH de 6,0.

[0140] Para lograr esto, nueve monos cynomolgus machos y nueve hembras fueron asignados

aleatoriamente por peso corporal a uno de los tres grupos de tratamiento como se muestra en la siguiente Tabla 6. Los animales (con la excepción de 1 animal macho para la Dosis 1) recibieron Infusión de IT a corto plazo de 0,6 ml de 0, 3 o 31 mg/ml de rhASA (dosis total de 0, 1,8 o 18,6 mg) en semanas alternas para un total de tres dosis por animal. Se monitorearon los pesos corporales, las observaciones clínicas, los exámenes neurológicos y físicos, la patología clínica, los exámenes oftalmológicos y el muestreo toxicocinético. Todos los animales fueron necropsiados el día 29, 30 o 31 (< 24 horas después de la última dosis de IT). Los tejidos seleccionados fueron cosechados, guardados y examinados microscópicamente.

TABLA 6

Grupo	Nº de animales	Concentración nominal (mg/ml)	de dosis	Volumen de dosis (ml)	Dosis 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

[0141] Las concentraciones de rhASA detectadas en los tejidos del SNC de los monos cynomolgus se analizaron mediante ELISA y se compararon con una diana terapéutica del 10% de las concentraciones normales de rhASA humano, que corresponde a aproximadamente 2,5 ng/mg de tejido. Se extrajeron muestras de tejido o perforaciones de diferentes áreas de los cerebros de los monos cynomolgus y se analizaron adicionalmente para detectar la presencia de rhASA. La Figura 24 ilustra los tejidos de los que se extrajeron los punzones. Las muestras de tejido perforado reflejaron un aumento en las concentraciones de rhASA, como se refleja en las Figuras 25A-G, con un gradiente de deposición desde la corteza cerebral hasta la materia blanca profunda y la materia gris profunda.

[0142] Las concentraciones de rhASA detectadas usando el mismo punzón de las rutas de administración IT e ICV para seis monos a los que se les administró la dosis de 18,6 mg de rhASA, se ilustran en las Figuras. 26A-B. Las concentraciones de rhASA detectadas en la materia blanca profunda (Figura 25A) y en la materia gris profunda (Figura 26B) de los tejidos cerebrales de monos cynomolgus adultos y juveniles por vía intratecal (IT) o intracerebroventricular (ICV) administradas rhASA fueron comparables.

[0143] Las muestras de tejido perforadas extraídas de los cerebros de adultos y monos cynomolgus juveniles luego fueron analizadas para determinar las concentraciones de rhASA depositadas en la muestra de tejido extraída, y para comparar dichas concentraciones a la concentración diana terapéutica de 2,5 ng por mg de proteína rhASA (correspondiente al 10% de la concentración normal de rhASA en un sujeto sano). Como se ilustra en la Figura 27A, en cada muestra de tejido analizada, la dosis de 18,6 mg de rhASA administrado por IT dio como resultado una concentración de rhASA que excedió la concentración terapéutica diana de 2,5 ng/mg de proteína. De manera similar, cuando se administró una dosis de 1,8 mg de rhASA a monos cynomolgus juveniles, cada muestra de tejido analizada demostró una concentración de rhASA dentro o superior a la concentración terapéutica de 2,5 ng/mg de proteína y las concentraciones medias de rhASA estaban por encima de la diana terapéutica para todos las punciones de tejido probadas (Figura 27B).

[0144] Para determinar si la rhASA administrada por IT se estaba distribuyendo a las células relevantes, se analizó el tejido de la materia blanca profunda de un mono cynomolgus 1,8 mg de ASA administrado por IT, desde el área ilustrada en la Figura 28A. La inmunotinción del tejido de la sustancia blanca profunda reveló la distribución de rhASA en el mono cynomolgus en las células de oligodendrocitos, como se ilustra en la Figura 28B. De manera similar, la Figura 28C ilustra que el rhASA administrado por IT demostró la ubicación conjunta en los tejidos profundos de la sustancia blanca del mono cynomolgus. En particular, la colocación bajo coloración en los órganulos diana, como el lisosoma, es evidente (Figura 28C), lo que respalda la conclusión de que rhASA administrado por IT es capaz de distribuirse a las células, tejidos y órganulos relevantes del SNC, incluido el lisosomas de oligodendrocitos. Lo anterior respalda la conclusión de que la diferencia entre la entrega de ICV y IT también fue mínima para la entrega de rhASA.

## EJEMPLO 2: BIODISTRIBUCIÓN CON PROTEÍNA RADIOMARCADA

[0145] rhASA marcada con el emisor de positrones 124 que estaba preparado y formulado en un vehículo de NaCl 154 mM, 0,005% polisorbato 20 a un pH de 6,0. Se administró un volumen de la formulación equivalente a 3 mg de rhASA (correspondiente a aproximadamente 3,8 mg/kg de cerebro) a monos cynomolgus adultos por vía de administración intracerebroventricular (ICV) e intratecal (IT). Los monos cynomolgus fueron sometidos a estudios de imágenes PET de alta resolución (microPET P4) para determinar la distribución de la rhASA marcada con <sup>124</sup>I administrada.

[0146] Los datos de imagen PET (Figura 29) ilustran que tanto la rhASA marcada con <sup>124</sup>I administrada por ICV como IT se distribuyó efectivamente a los tejidos del SNC, y en particular la rhASA marcada con <sup>124</sup>I administrada a través del catéter lumbar IT Inmediatamente y uniformemente extendido en el líquido cefalorraquídeo (LCR) a lo largo de la columna vertebral. En particular, como se representa en la FIG. 29, después de la administración de ICV e IT, se detectaron concentraciones terapéuticas de rhASA marcadas con <sup>124</sup>I en los tejidos del SNC del mono cynomolgus

sujeto, incluidos el cerebro, la médula espinal y el LCR. Las concentraciones de rhASA detectadas en tales tejidos del SNC, y en particular en los tejidos del cerebro, excedieron la concentración terapéutica diana de 2,5ng/mg de proteína.

5 [0147] Si bien la distribución de la proteína rhASA fue comparable para vías de administración tanto IT como ICV, ICV resultó en notablemente menos deposición dentro de la columna vertebral, como evidencia en la Figura 29.

10 [0148] Veinticuatro horas después de la administración de la formulación, el ASA etiquetado <sup>124</sup>I administrado tanto ICV como IT efectivamente distribuido a los tejidos del SNC. En particular, veinticuatro horas después de la administración de IT, el 12,4% de la dosis administrada estaba en la región craneal, en comparación con el 16,7% de la dosis administrada por ICV. En consecuencia, las concentraciones de rhASA detectadas en dichos tejidos del SNC, y en particular en los tejidos del cerebro, cuando se administró rhASA, se acercaron a las concentraciones detectadas después de la administración de ICV de la misma dosis.

15 [0149] La inyección de ICV del rhASA etiquetado con <sup>124</sup>I da como resultado la transferencia inmediata del volumen inyectado a la cisterna magna, cisterna pontis, cisterna interpeduncular y espina proximal, como se ilustra en la Figura 30. Como también se ilustra en la Figura 30, dentro de 2-5 horas, la administración de IT entregó el rhASA marcado con <sup>124</sup>I a los mismos compartimentos iniciales (cisternas y columna proximal) como se muestra para la administración de ICV. Veinticuatro horas después de la distribución tanto de ICV como de IT de la rhASA marcada con <sup>124</sup>I fue comparable, como se ilustra en la Figura 31. Por consiguiente, a diferencia de los fármacos de moléculas pequeñas, los resultados anteriores sugieren que la administración de ICV ofrece ventajas mínimas sobre la administración de rhASA por IT.

20 [0150] Estos resultados confirman que rhASA puede administrarse a un sujeto usando la ruta de administración de IT menos invasiva y de ese modo lograr concentraciones terapéuticas en células y tejidos diana.

25 [0151] Las enfermedades de almacenamiento lisosómico representan una familia de trastornos genéticos causados por enzimas faltantes o defectuosas que dan como resultado una acumulación anormal de sustrato. Si bien los síntomas periféricos asociados con varias de estas enfermedades pueden mitigarse efectivamente mediante la administración intravenosa de enzimas recombinantes, no se espera que la administración intravenosa de tales enzimas recombinantes afecte significativamente las manifestaciones del SNC asociadas con la mayoría de la enfermedad de almacenamiento lisosomal. Por ejemplo, la iduronato-2-sulfatasa humana recombinante (Idursulfasa, Elaprase®; Shire Human Genetic Therapies, Inc. Lexington, MA) está aprobada para el tratamiento de los síntomas somáticos del síndrome de Hunter, pero no existe una terapia farmacológica para el tratamiento neurológico. manifestaciones que pueden incluir retraso en el desarrollo y deterioro mental progresivo. Esto se debe en parte a la naturaleza de I2S, que es una enzima grande altamente glucosilada con un peso molecular de aproximadamente 76 kD y que no atraviesa la barrera hematoencefálica después de la administración intravenosa.

40 [0152] Los presentes inventores por lo tanto, han llevado a cabo un programa para investigar la entrega intratecal (IT) de las formulaciones intratecales de enzimas humanas recombinantes, tales como, por ejemplo, iduronato-2-sulfatasa (I2S), arilsulfatasa A (Rhasa) y alfa- N-acetilglucosaminidasa (Naglu). Los resultados presentados en este documento representan el primero en demostrar que la administración IT-lumbar de una proteína lisosómica recombinante da como resultado el suministro de una fracción significativa de la proteína administrada al cerebro y, en particular, el depósito generalizado de dichas proteínas en las neuronas del cerebro. y la médula espinal tanto en monos cynomolgus como en perros. Los análisis inmunohistoquímicos de los tejidos del SNC demostraron que la proteína está dirigida al lisosoma, el sitio de acumulación de glucosaminoglicanos patológicos en los trastornos de almacenamiento lisosómico. Además, las mejoras morfológicas demostradas en el modelo de ratón IKO del síndrome de Hunter, el modelo de ratón deficiente en Naglu del síndrome de Sanfilippo tipo B y el modelo de ratón knockout ASA de leucodistrofia metacromática (MLD) refuerza la observación de que la enzima administrada por IT se distribuye a los tejidos apropiados y transportados a los compartimentos celulares y orgánulos apropiados.

50 [0153] Las similitudes observadas en los patrones de distribución cerebral detectados después de la administración IT-lumbar e ICV de I2S sugieren un flujo masivo y una remezcla activa del LCR. Así, en un entorno clínico, tanto el IT y la administración ICV rutas son potencialmente factible, sin embargo, la deposición observada de I2S en la médula espinal después de la administración de IT proporciona una clara ventaja en el tratamiento de las secuelas de la médula y los componentes de las enfermedades de almacenamiento lisosomal, tales como el síndrome de Hunter. Además, los puertos de inyección espinal son menos invasivos y se espera que sean más adecuados para el uso crónico, especialmente en sujetos pediátricos.

60 [0154] La evidencia de la tinción de células perivasculares y la dinámica de translocación de proteínas observada por los estudios de imagen PET anteriores indican que la enzima se mueve dentro del espacio perivascular, presumiblemente por mecanismos convectivos asistidos por pulsación. La asociación observada de I2S con neurofilamentos sugiere un mecanismo adicional de transporte, indicativo del transporte axonal activo. Este último presumiblemente comienza con la interacción de proteínas con los receptores neuronales de manosa-6-fosfato, que se expresan ampliamente en las células de la médula espinal y el cerebro y que tras la administración directa al parénquima cerebral, las células diana pueden absorber fácilmente la enzima 12S. (Begley, et al., Curr Pharm Des (2008) 14:1566-1580).

5 [0155] Si bien el transporte axonal de enzimas lisosomales se ha implicado previamente por métodos indirectos *in vivo* y por imágenes *in vitro*, los estudios actuales proporcionan la primera evidencia directa del transporte axonal de enzimas expresadas de forma no viral a través del LCR. Por lo tanto, el suministro de proteínas desde el LCR a la superficie del cerebro y más profundamente en los tejidos cerebrales parece depender de procesos de transferencia activos, ninguno de los cuales se ha descrito o aclarado previamente para el suministro de proteínas o enzimas a las células, tejidos y orgánulos del cerebro.

10 [0156] Contrariamente al punto de vista prevaleciente de que la dinámica de flujo del parénquima intersticial y el LCR evitaría la distribución de proteínas administradas por IT-lumbares a la sustancia blanca del cerebro, los estudios instantáneos demuestran claramente que el suministro de una enzima lisosómica por IT produce distribución y acumulación de proteínas en todos los tejidos cerebrales y deposición en el compartimento lisosómico de las células diana, que son el sitio de acumulación patológica de glucosaminoglicanos. (Ver, por ejemplo, Fenstermacher et al., Ann NY Acad Sci (1988) 531: 29-39 y DiChiro et al., Neurology (1976) 26:1-8.) Junto con la naturaleza menos invasiva del parto lumbar IT, esta ruta ofrece un medio clínicamente relevante para administrar terapias biológicas al cerebro, particularmente en niños.

### EJEMPLO 3: FORMULACIONES DE ARILSULFATASA A PARA LA ADMINISTRACIÓN DE IT

20 [0157] Este ejemplo resume el trabajo para establecer una forma de dosificación líquida de alta concentración de rhASA (arilsulfasa A) y la formulación de sustancia farmacológica y producto farmacológico para el tratamiento de leucodistrofia metacromática (MLD) a través de la vía de administración intratecal (IT).

25 [0158] Los datos de estabilidad demuestran que la formulación salina de la sustancia farmacológica y el producto farmacológico (sin PBS 20) es estable después de 18 meses a <-65 grados C y 18 meses a 2-8 grados C. Durante el desarrollo farmacéutico de esta proteína, se investigó la solubilidad y estabilidad de rhASA en condiciones limitadas de tampón y excipiente debido a su entrega prevista al SNC. Anteriormente, se habían realizado estudios de desarrollo de formulación para desarrollar una formulación intravenosa (IV). En base a los resultados de estos experimentos, se seleccionó una formulación que contenía 30 mg/ml de rhASA en tampón citrato-fosfato 10 mM, pH 5,5 con NaCl 137 mM y poloxómero 188 al 0,15% como la formulación principal IV. También se formuló rhASA para la administración de IT en tres formulaciones y se investigaron los datos de estabilidad para esta proteína en estas condiciones. Se utilizaron lotes de rhASA derivados del producto material aguas arriba en un sitio. Los resultados demostraron que rhASA era estable en solución de cloruro de sodio 154 mM con 0,005% de polisorbato 20 (P20), pH 6,0 durante al menos 18 meses a 2-8 grados C. Además, se han realizado estudios para demostrar la estabilidad hacia la congelación-descongelación y degradación inducida por agitación.

35 [0159] Se purificaron los lotes de desarrollo, se ultrafiltraron y se diafiltraron (UF/DF) en 10 mM de citrato/fosfato, 137 mM NaCl , pH 5,5 con la posterior UF/DF en solución salina final en una concentración de aproximadamente 40 mg/mL. Las operaciones UF/DF se resumen en la Tabla 7.

40 TABLA 7: Formulaciones seleccionadas para operaciones UF/DF de derivados de Xcellerex

Formulación	Tampón inicial y UF/DF en solución salina	Aditivo
A	10 mM citrato/fosfato, 137 mM NaCl , pH 5,5. Posterior UF/DF en 154 mM NaCl. pH final 5,9	0,005% de polisorbato 20 *
B	10 mM citrato/fosfato, 137 mM NaCl , pH 5,5. Posteriormente UF/DF en fosfato de sodio 5 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0. pH final 6,0	0,005% de polisorbato 20 *
C	10 mM citrato/fosfato, 137 mM NaCl , pH 5,5. Posteriormente UF/DF en citrato/fosfato 10 mM, NaCl 137 mM, pH 7,0, y un segundo UF/DF en NaCl 154 mM. pH final 6,5	0,005% de polisorbato 20 *

#### rhASA

55 [0160] rhASA formulado a 40 mg/ml de rhASA en citrato de fosfato sódico 10 mM con NaCl 137 mM, a pH 5,6 se dializó en cinco formulaciones que se utilizaron para estudios de preformulación de IT (Tabla 8).

TABLA 8: Tampones seleccionados para la detección de formulación compatible con IT

Numero de formulacion	Especies de amortiguamiento	pH
1	154 mM NaCl *	5,9
2	154 mM NaCl **	7,0
3	Tampón fosfato 5 mM con NaCl 145 mM	6,0
4	Tampón fosfato 5 mM con NaCl 145 mM	7,0
5	Tampón fosfato 1 mM con CaCl <sub>2</sub> 2 mM y NaCl 137 mM	7,0

### Métodos

**[0161]** Para la determinación de la temperatura de fusión (Tm) por calorimetría diferencial de barrido (DSC), se empleó un microcalorímetro capilar DSC (MicroCal) a una velocidad de barrido de 60°C/hr y un intervalo de temperatura de 10-110°C. Las líneas de base del tampón se restaron de los escaneos de proteínas. Las exploraciones se normalizaron para la concentración de proteína de cada muestra (medida por absorbancia ultravioleta a 280 nm y utilizando un coeficiente de extinción de 0,69 (mg/ml)-1 cm<sup>-1</sup>). Para los experimentos iniciales de estabilidad a corto plazo, la sustancia farmacológica rhASA se sometió a dos semanas a 40°C o un mes a 40°C. Se colocaron muestras adicionales en estabilidad a corto plazo a 2-8°C durante 3 meses. Las muestras se filtraron (Millipore, P/N SLGV033RS) y se dispensaron alícuotas de 0,5 ml eN<sub>2</sub>ml con tapones Fluorotec de 13 mm.

**[0162]** El efecto de la composición de la formulación (Tabla 8) en la Tm (punto medio de la temperatura induce térmicamente desnaturalización) se investigó mediante DSC. Los valores de Tm para diferentes composiciones de formulación se muestran en la Figura 5. Los valores de Tm exhibieron similares despliegues de temperaturas para la mayoría de las formulaciones, excepto bajos valores de Tm fueron observados para rhASA formulado en cualquiera de fosfato de sodio 5 mM con NaCl 154 mM a pH 7,0 o fosfato de sodio 1 mM con 2 mM CaCl<sub>2</sub> y 137 mM NaCl a pH 7,0.

**[0163]** También se investigó el efecto de la degradación inducida térmicamente de rhASA en las cinco formulaciones seleccionadas (Tabla 8). Las muestras se almacenaron durante 2 semanas o un mes a 40°C o durante 3 meses a 2-8°C. El análisis de SDS-PAGE (Coomassie) de muestras almacenadas durante 2 semanas a 40°C detectó fragmentación de rhASA formulada en fosfato de sodio 5 mM con NaCl 154 mM a pH 7,0, así como en fosfato de sodio 1 mM con CaCl<sub>2</sub> 2 mM y NaCl 137 mM a pH 7,0 (Figura 6). No se observó tal degradación para las otras formulaciones.

**[0164]** La presencia de productos de descomposición es consistente con el pico principal porcentual más bajo observado por RP-HPLC para los mismos puntos de tiempo (Tabla 10). También se observó que rhASA formulado en PBS 1 mM con CaCl<sub>2</sub> 2 mM a pH 7,0 no mantuvo su pH al inicio y después de la exposición a corto plazo a condiciones de estrés térmico.

**[0165]** Los sistemas de HPLC Waters se usaron para exclusión por tamaño y análisis de HPLC de fase inversa. Para el análisis inicial de SEC-HPLC, se inyectaron 50 µg de rhASA en una columna Agilent Zorbax GF-250 (4,6 mm x 250 mm) y se ejecutó isocráticamente a 0,24 ml/min usando una fase móvil de citrato de sodio 100 mM pH 5,5 (octómero detección) con una longitud de onda de detección de 280 nm. Los análisis se repitieron usando condiciones de fase móvil de citrato de sodio 100 mM, pH 7,0 (detección de dímero).

**[0166]** Todos los estudios de intercambio de tampón y concentración se realizaron usando Centricon-Plus 20 (Millipore, 10 kDa MWCO).

### Preformulación estudios de cribado - Efecto de la especie de regulador y el pH

**[0167]** Debido al número limitado de composiciones en solución aprobadas utilizados para la administración SNC, sólo cinco isotónicas composiciones en solución, que se enumeran en la Tabla 8, se seleccionaron para el cribado.

### Memoria de pH

**[0168]** Antes de la selección de tampones para la estabilidad a largo plazo, se realizaron dos experimentos de "memoria de pH" para investigar si el tampón de proteína intercambiado en solución salina era capaz de mantener el pH del tampón original. En el experimento inicial, rhASA a aproximadamente 8 mg/ml se dializó primero en citrato-fosfato 10 mM con NaCl 137 mM, a un valor de pH de 5,5 o 7,0, seguido de una segunda diáisisis en solución salina. En el segundo experimento, rhASA se dializó en citrato-fosfato 10 mM con NaCl 137 mM, a valores de pH de 5,5 o 7,0 y posteriormente se intercambió el tampón y se concentró en soluciones salinas a aproximadamente 35 mg/ml.

**[0169]** Cuando rhASA formulado en citrato-fosfato 10 mM con NaCl 137 mM a valores de pH de 5,5 o 7,0 se dializó en solución salina, no se observó un aumento de la turbidez. El pH de la solución salina final fue similar al pH del

5 tampón de citrato-fosfato anterior al que estuvo expuesto. Cuando rhASA formulado en tampones basados en citrato-fosfato a valores de pH de 5,5 o pH 7,0 se dializaron en solución salina y luego se concentraron a aproximadamente 35 mg/ml usando un Centricon, el pH de las soluciones salinas de proteínas cambió de pH 5,5 a 5,8 o de pH 7,0 a 6,8, respectivamente. Ambas soluciones concentradas de rhASA en solución salina eran ligeramente opalescentes y tenían valores de OD320 en el rango de 0,064 (pH 6,8) a 0,080 (pH 5,5).

#### Selección de excipiente

10 [0170] Polisorbato 20 (P20) se incluyó en todas las cinco composiciones de disolución seleccionadas a una concentración final de 0,005%. La elección del tensioactivo se realizó en base a la experiencia previa de la tolerabilidad in vivo de P20 al 0,005% para el suministro del SNC de otras proteínas Shire. Se preparó una solución de P20 al 5% (v/v) y se añadió el volumen apropiada a cada formulación de proteína para obtener una concentración final de 0,005%.

#### 15 Estudios de robustez de formulación - Estudio de estabilidad

20 [0171] En base a los resultados iniciales obtenidos de la detección de diferentes tampones y valores de pH, se seleccionaron tres composiciones de solución para estudios de estabilidad a largo plazo (preparación de muestra como en la Tabla 8. Se inició un estudio de un año en las formulaciones propuestas (Tabla 9). Las muestras de estabilidad en cada punto de tiempo se analizaron por SEC-HPLC, RP-HPLC, OD320, concentración de proteína, pH, actividad específica, SDS-PAGE (Coomassie) y apariencia.

**TABLA 9 - Formulaciones para estudios de estabilidad a largo plazo**

Formulación	Composición de formulación con 0,005% de polisorbato 20	Condiciones de estudio
A	NaCl 154 mM, pH 5,9	5°C, 25°C, 40°C y línea base congelada a $\leq$ 65°C
B	Fosfato de sodio 5 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0	
C	NaCl 154 mM, pH 6,5	

**TABLA 10: ESTABILIDAD DE FORMULACIONES SELECCIONADAS DESPUÉS DE 2 SEMANAS A 40  $\pm$  2°C**

Formulación	Apariencia	Proteína Conc. (mg/ml)	OD320	SEC HPLC (% pico principal) a pH 5,5	SEC HPLC (% pico principal) a pH 7,0	RP HPLC (% pico principal)	pH	Actividad específica (U/mg)
Solución salina, pH 5,9								
Base	Claro a ligeramente opalescente	29,9	0,044	>99,9	99,7	99,8	5,6	74
Estresado	Claro a ligeramente opalescente	31,1	0,062	99,8	99,6	99,9	5,7	88
Solución salina, pH 7,0								
Base	Claro a ligeramente opalescente	29,0	0,038	>99,9	99,6	>99,9	6,7	83
Estresado	Claro a ligeramente opalescente	32,1	0,041	99,1	99,7	97,0	6,5	66
PBS 5 mM, pH 6,0								
Base	Claro a ligeramente opalescente	29,8	0,058	>99,9	99,7	99,9	5,9	102
Estresado	Claro a ligeramente opalescente	30,5	0,076	98,8	99,7	99,7	5,9	95

(Continuación)

PBS 5 mM, pH 7,0								
	Base	Claro a ligeramente opalescente	29,7	0,035	>99,9	99,7	>99,7	6,9
10	Estresado	Ligeramente opalescente a opalescente	30,5	0,041	95,4	99,4	98,0	6,8
PBS 1 mM, pH 7,0 con CaCl <sub>2</sub> 2 mM, pH 7,0								
15	Base	Claro a ligeramente opalescente	27,5	0,040	>99,9	99,7	>99,9	5,6
20	Estresado	Ligeramente opalescente a opalescente	27,7	0,042	94,8	99,8	99,0	6,6

[0172] No se observaron cambios significativos en la actividad específica para las muestras de estrés (Tabla 10). El análisis por exclusión por tamaño HPLC detectó cierta degradación para la muestra estresada térmicamente de 2 semanas formulada en fosfato de sodio 5 mM con NaCl 154 mM a pH 7,0. La degradación fue más evidente por SEC-HPLC usando una condición de fase móvil de pH 5,5 que induce la asociación de rhASA a un octámero. En estas condiciones de fase móvil, rhASA formulado a pH 7,0 en PBS 1 mM con CaCl<sub>2</sub> 2 mM también exhibió una degradación significativa.

[0173] Después de la exposición a 1 mes a 40°C, las muestras formuladas en PBS 5 mM, pH 7,0 y PBS 1 mM, pH 7,0, con CaCl<sub>2</sub> 2 mM demostraron fragmentación por SDS-PAGE (datos no mostrados). De acuerdo con esta observación, RP-HPLC y SEC-HPLC también observaron una reducción en el porcentaje del pico principal para las muestras almacenadas en estas dos formulaciones de pH 7 (Tabla 11). Sin embargo, solo se observó una disminución en la actividad específica para rhASA formulado en PBS 5 mM, pH 7,0.

TABLA 11: Estabilidad de formulaciones de IT seleccionadas después de 1 mes a 40 ± 2°C

Formulación	Apariencia	Proteína Conc. (mg/ml)	OD320	SEC-HPLC (% pico principal) a pH 5,5	SEC HPLC (% pico principal) a pH 7,0	RP HPLC (% pico principal)	pH	Actividad específica (U/mg)
Solución salina, pH 5,9								
45	Base	Claro a ligeramente opalescente	29,9	0,044	>99,9	99,7	99,8	5,6
50	Estresado	Claro a ligeramente opalescente	28,3	0,061	>99,9	99,5	99,9	5,7
Solución salina, pH 7,0								
55	Base	Claro a ligeramente opalescente	29,0	0,038	>99,9	99,6	>99,9	6,7
60	Estresado	Claro a ligeramente opalescente	25,7	0,189	95,7	99,8	99,5	6,6
PBS 5 mM, pH 6,0								
65	Base	Claro a ligeramente opalescente	29,8	0,058	>99,9	99,7	99,9	5,9
	Estresado	Claro a ligeramente opalescente	28,0	0,059	>99,9	99,6	99,9	6,0

(Continuación)

5	PBS 5 mM, pH 7,0								
10	Base	Claro a ligeramente opalescente	29,7	0,035	>99,9	99,7	>99,9	6,9	86
15	Estresado	Ligeramente opalescente a opalescente	27,3	0,142	91,8	89,6	97,1	6,9	48
PBS 1 mM, pH 7,0 con CaCl <sub>2</sub> 2 mM									
20	Base	Claro a ligeramente opalescente	27,5	0,040	>99,9	99,7	>99,9	5,6	90
25	Estresado	Ligeramente opalescente a opalescente	28,3	0,053	90,6	88,7	97,9	6,7	133

[0174] Después de 3 meses de almacenamiento a 2-8°C, rhASA retuvo su actividad en todas las formulaciones (Tabla 12). Además, rhASA mantuvo >99,8% de su área de pico principal según lo evaluado por SEC-HPLC en ambas condiciones de fase móvil. Los datos de estabilidad durante 3 meses a 2-8°C se resumen en la Tabla 12.

TABLA 12: ESTABILIDAD DE LOS TAMPONES SELECCIONADOS DESPUÉS DE 3 MESES A 2-8°C

	Formulación	Apariencia	Proteína Conc. (mg/ml)	OD320	SEC- HPLC (% pico principal) a pH 5,5	SEC- HPLC (% pico principal) a pH 7,0	RP HPLC (% pico principal)	pH	Actividad específica (U/mg)
Solución salina, pH 5,9									
30	Base	Claro a ligeramente opalescente	29,9	0,044	>99,9	99,7	99,8	5,6	74
35	Estresado	Claro a ligeramente opalescente	29,4	0,056	99,8	>99,9	99,9	5,6	97
Solución salina, pH 7,0									
40	Base	Claro a ligeramente opalescente	29,0	0,038	>99,9	99,6	>99,9	6,7	83
45	Estresado	Claro a ligeramente opalescente	25,5	0,040	99,8	>99,9	>99,9	6,6	127
PBS 5 mM, pH 6,0									
50	Base	Claro a ligeramente opalescente	29,8	0,058	>99,9	99,7	99,9	5,9	102
55	Estresado	Claro a ligeramente opalescente	29,9	0,045	99,8	>99,9	>99,9	5,9	109
PBS 5 mM, pH 7,0									
60	Base	Claro a ligeramente opalescente	29,7	0,035	>99,9	99,7	>99,9	6,9	86

(Continuación)

PBS 5 mM, pH 7,0									
5	Estresado	Claro a ligeramente opalescente	29,0	0,038	99,8	>99,9	>99,9	6,9	110
	PBS 1 mM, pH 7,0 con CaCl <sub>2</sub> 2 mM								
10	Base	Claro a ligeramente opalescente	27,5	0,040	>99,9	99,7	>99,9	5,6	90
	Estresado	Claro a ligeramente opalescente	28,0	0,042	99,8	99,9	>99,9	6,6	105

[0175] rhASA formulado en solución salina, pH 7,0 y PBS 1 mM, pH 7,0 con CaCl<sub>2</sub> 2 mM también se evaluaron después de 3 meses de almacenamiento en la condición acelerada. de 25°C. Como se muestra en la Figura 7, rhASA sufre una pequeña cantidad de fragmentación en estas formulaciones (con una intensidad aproximadamente la del pico de impurezas BSA al 0,5%).

[0176] En conjunto, los estudios de preformulación demostraron que la estabilidad de rhASA se mantiene a valores de pH en el rango de 5,5 a 6,0. En todos los estudios que utilizan soluciones de formulación a pH 7,0, rhASA demostró la fragmentación como una de sus vías de degradación. Los resultados de estrés térmico obtenidos para los candidatos a la formulación IT a pH 7,0 fueron similares a los resultados de estrés térmico obtenidos para las formulaciones IV (citrato de fosfato de sodio 10 mM con NaCl 137 mM) a pH 7,0, donde también se observó fragmentación. En base a estos estudios, se seleccionaron tres formulaciones siguientes, como en la Tabla 9, para estudios de estabilidad a largo plazo.

## 25 Estudios de congelación-descongelación

[0177] Los experimentos de congelación-descongelación se realizaron realizando tres ciclos de congelación-descongelación controlada, desde temperatura ambiente hasta -50°C a 0,1°C/min en los estantes de un liofilizador Vertis Genesis 35EL. Se dispensaron alícuotas de un ml de sustancia farmacológica formulada a 30 mg/ml en cada una de las cinco composiciones de solución (Tabla 8) en viales de vidrio de 3 ml para este estudio.

[0178] La sustancia farmacológica (38 ± 4 mg/ml) se usó para todos los estudios de congelación-descongelación. Para experimentos de congelación-descongelación de velocidad controlada a pequeña escala, se dispensaron alícuotas de 2 ml de sustancia farmacológica en viales de vidrio de 5 ml con tapones Fluorotec de 20 mm. Los experimentos de estrés por congelación y descongelación se realizaron en los estantes de un liofilizador Virtis Genesis 35EL o en los estantes de un congelador de velocidad controlada (Cámara de prueba vertical Tenney Jr, modelo: TUJR-A-VERV). Se realizaron tres ciclos de congelación a -50°C y descongelación a 25°C a una velocidad de congelación y descongelación de 0,1°C/min (usando un congelador de velocidad controlada) o una velocidad de congelación de 0,1°C/min y velocidad de descongelación de 0,03°C/min (usando liofilizador). Para los estudios de congelación y descongelación a granel, se dispensaron 90 ml de sustancia farmacológica en frascos de policarbonil de 250 ml. Para los estudios de congelación y descongelación en hielo seco, se dispensaron 3 ml de sustancia farmacológica en viales de policarbonil de 5 ml (Biotainer P/N 3500-05) con y sin tapones de rosca de polipropileno. Las muestras se congelaron durante la noche a ≤ -65°C y luego se colocaron en hielo seco en un balde cerrado. Para estos experimentos, se usaron viales de vidrio con tapón que contenían el mismo volumen de muestra como control de estudio. Para los estudios de congelación y descongelación de la sustancia farmacológica diluida, se dispensaron alícuotas de 1 ml de 1 y 5 mg/ml en tubos de polipropileno de 2 ml y se congelaron a ≤ -65°C. Las muestras congeladas se descongelaron posteriormente en el banco. El ciclo se repitió hasta 10 veces para imitar cualquier tensión potencial que pueda ocurrir con el manejo de las alícuotas estándar de referencia.

[0179] El efecto de la congelación-descongelación en la calidad de rhASA en las formulaciones propuestas con 0,005% P20 se determinó después de 3 ciclos de congelación de velocidad controlada y descongelación (0,1°C/min). No se observó ningún cambio en la apariencia de rhASA y no se identificaron agregados solubles o degradantes utilizando métodos SEC o RP-HPLC. Además, no se observaron bandas de fragmentación o agregación en el análisis SDS-PAGE reducido (datos no mostrados). La Tabla 13 resume los resultados de estos estudios.

55

60

TABLA 13: Efecto de la congelación y descongelación a pequeña escala sobre la calidad de la sustancia farmacológica rhASA

5	Formulación	Apariencia	Proteína Conc. (mg/ml)	SEC-HPLC (% pico principal) a pH 5,5	SEC-HPLC (% pico principal) a pH 7,0	RP-HPLC (% pico principal)	pH	Actividad específica (U/mg)
10	Solución salina, pH 5,9							
15	Base	Claro a ligeramente opalescente	29,9	NT*	NT	NT	5,6	102
20	Estresado	Claro a ligeramente opalescente	29,4	>99,9	99,6	99,4	5,5	86
25	Solución salina, pH 7,0							
30	Base	Claro a ligeramente opalescente	29,0	NT	NT	NT	6,7	94
35	Estresado	Claro a ligeramente opalescente	25,0	>99,9	99,6	99,2	6,6	96
40	PBS 5 mM, pH 6,0							
45	Base	Claro a ligeramente opalescente	29,8	NT	NT	NT	5,9	92
50	Estresado	Claro a ligeramente opalescente	31,1	>99,9	99,7	99,5	5,9	95
55	PBS 5 mM, pH 7,0							
60	Base	Claro a ligeramente opalescente	29,7	NT	NT	NT	6,9	99
65	Estresado	Claro a ligeramente opalescente	29,9	>99,9	99,6	99,0	6,9	112
PBS 1 mM, pH 7,0 con CaCl <sub>2</sub> 2 mM								
55	Base	Claro a ligeramente opalescente	27,5	NT	NT	NT	5,6	90
60	Estresado	Claro a ligeramente opalescente	27,3	>99,9	99,6	99,3	6,7	103
65	*No probado							

**[0180]** Los resultados de los estudios de congelación y descongelación a velocidad controlada a pequeña escala realizados por triplicado en alícuotas de 2 ml de sustancia farmacológica se resumen en la Tabla 14. Sin cambios en la calidad de la sustancia farmacológica se observó. La apariencia de la sustancia farmacológica congelada y descongelada fue comparable a la apariencia de la muestra de referencia. No se observó reducción en la concentración de proteínas o la pureza del material.

TABLA 14: EFECTO DE PEQUEÑA ESCALA CONGELADA EN LA CALIDAD DE LA SUSTANCIA DE MEDICAMENTOS DE RHASA

Velocidad de congelación/de descongelación	Línea de base	0,1°C/min Congelar-0,1°C/min Descongelar	0,1°C/min Congelar-0,3°C/min Descongelar usando liofilizador
		Usar el congelador de velocidad controlada	
Apariencia	Ligeramente opalescente a opalescente	Ligeramente opalescente a opalescente	Ligeramente opalescente a opalescente
Proteína Conc. (mg/ml)	42	37	36
Densidad óptica a 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
Actividad específica (U/mg)	65	69	71

[0181] Todos los experimentos demostraron que rhASA mantiene sus atributos de calidad después de la congelación-descongelación. Cabe señalar que se observó una pequeña tendencia decreciente en la actividad y el pico principal de porcentaje de fase invertida para muestras de rhASA de 1 mg/ml después de diez ciclos de congelación-descongelación, como se muestra en la Tabla 15.

TABLA 15: EFECTO DE LA CONGELACIÓN PEQUEÑA A ESCALA EN LA SUSTANCIA DE MEDICAMENTOS DE rhASA DILUIDA A 1 MG/ML

Muestra	Base	1 ciclo de F/T	3 ciclos de F/T	5 ciclos de F/T	10 ciclos de F/T
Proteína Conc. (mg/ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Densidad óptica a 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
Actividad específica (U/mg)	78	76	75	69	65

#### Estudios de agitación

[0182] Alícuotas de 1,0 ml de proteína filtrada estéril formulada a 30 mg/ml en cada una de las cinco composiciones de solución seleccionadas (Tabla 8) con P20 se dispensaron en viales de vidrio de 3 ml con tapones Fluorotec de 13 mm. Los viales se colocaron de lado en un agitador orbital Labline y se agitaron durante 24 horas a 100 rpm. La configuración se aumentó luego a 200 rpm durante las siguientes 24 horas de período de agitación.

[0183] Para evaluar la susceptibilidad de rhASA a la agitación, se realizaron estudios de agitación y agitación tanto para la sustancia farmacológica como para el producto farmacológico a concentraciones de 35,4 y 30 mg/ml, respectivamente. Para estos estudios, se dispensaron alícuotas de 1,0 ml de sustancia farmacológica en viales de vidrio de 3 ml con tapón Fluorotec de 13 mm. Los viales agitados se inspeccionaron cada dos horas durante las primeras 8 horas y posteriormente a las 24 y 48 horas. Los viales se retiraron a la primera señal de nubosidad y se analizaron. El aspecto de las muestras se documentó y las muestras se analizaron usando pH, SEC-HPLC, actividad específica y OD320. Los estudios de agitación del producto farmacológico se realizaron por triplicado (en NaCl 154 mM, pH 6,0 con P20 al 0,005%) y se compararon con una réplica de la sustancia farmacológica (en NaCl 154 mM, pH 6,0). Los estudios de agitación también se repitieron sin la inclusión de P20 en la formulación salina. Para estos

estudios, se dispensaron alícuotas de 1 ml o 3 ml de producto farmacológico a 30 mg/ml en viales de 3 ml para investigar el efecto de la agitación, así como el volumen del espacio superior en la calidad de rhASA. Para estos estudios de agitación, se usó una velocidad de 220 rpm.

5 [0184] Los estudios que sacuden las iniciales de rhASA para estudios de desarrollo de la formulación IV realizadas  
10 demostraron la potencial ventaja para la presencia de un tensioactivo. Para el desarrollo de la formulación de IT, se seleccionó 0,005% de P20 y se incluyó en las formulaciones para los estudios de agitación. Después de 15-24 horas de agitación a 100 rpm, no se observaron cambios visuales para ninguna de las formulaciones y la velocidad de agitación aumentó a 200 rpm. No se observó ningún cambio en la apariencia de las muestras agitadas en las formulaciones candidatas propuestas después de un total de 48 horas de agitación a 100 y 200 rpm. Las muestras se analizaron después de este período y los resultados se resumen en la Tabla 16. Ninguno de los ensayos observó cambios. SDS-PAGE Coomassie tampoco exhibió bandas adicionales de alto o bajo peso molecular para las muestras agitadas (datos no mostrados).

15 **TABLA 16: RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE AGITACIÓN DE FORMULACIONES SELECCIONADAS**

Formulación	Apariencia	Proteína Conc. (mg/ml)	OD320	SEC-HPLC (% pico principal) a pH 5,5 *	RP-HPLC (% pico principal)	Actividad específica (U/mg)
Solución salina, pH 5,9						
Base	Claro a ligeramente opalescente	29,9	0,044	NT**	NT	111
Estresado	Claro a ligeramente opalescente	28,5	0,041	>99,9	99,9	111
Solución salina, pH 7,0						
Base	Claro a ligeramente opalescente	29,0	0,038	NT	NT	115
Estresado	Claro a ligeramente opalescente	24,7	0,032	>99,9	>99,9	110
PBS 5 mM, pH 6,0						
Base	Claro a ligeramente opalescente	29,8	0,058	NT	NT	103
Estresado	Claro a ligeramente opalescente	30,4	0,047	>99,9	99,9	116
PBS 5 mM, pH 7,0						
Estresado	Claro a ligeramente opalescente	29,7	0,035	NT	NT	92
Base	Claro a ligeramente opalescente	26,5	0,029	>99,9	99,9	110
PBS 1 mM, pH 7,0 con CaCl <sub>2</sub> 2 mM						
Base	Claro a ligeramente opalescente	27,5	0,040	NT	NT	147
Estresado	Claro a ligeramente opalescente	27,0	0,038	>99,9	99,9	107
* Debido a problemas de columna, no se obtuvo el perfil SEC de forma dimérica, a pH de fase móvil de 7,0						
**No probado						

60 [0185] Ningún cambio en la apariencia de la sustancia farmacológica (en NaCl 154 mM a pH 6,0) o producto farmacológico (en NaCl 154 mM, pH 6,0, con 0,005% P20) se observó durante las primeras 4 horas de agitación. Despues de 6 horas de agitación, tanto la sustancia farmacológica como el producto farmacológico se volvieron ligeramente turbias (datos no mostrados). La turbidez fue más pronunciada despues de 48 horas de agitación cuando no había P20 presente en la formulación. Además, la sustancia farmacológica y el producto farmacológico expuestos a sacudidas se volvieron turbias despues de 24 horas. La figura 8 muestra las observaciones de agitación despues de

48 horas.

[0186] La Tabla 17 y la Tabla 18 resumen las observaciones del estudio de agitación.

5 **TABLA 17: APARIENCIA DE LA SUSTANCIA Y EL PRODUCTO FARMACOLÓGICO DE rhASA (CON P20) DESPUÉS DE AGITARSE**

Horas	Sustancia de drogas revueltas	Producto de droga agitado
Línea de base	Incoloro, opalescente, libre de partículas.	Incoloro, opalescente, libre de partículas.
2	Ningún cambio	Ningún cambio
4	Ningún cambio	Ningún cambio
6	1-2 escamas, ligeramente turbias	Material fibroso, ligeramente turbio
8	1-2 escamas, ligeramente turbias	Material fibroso, ligeramente turbio
24	1-2 escamas, muy turbias	Material fibroso, turbio
48	1-2 escamas, muy turbias	Material fibroso, muy turbio

20 **TABLA 18: APARIENCIA DE LA SUSTANCIA Y EL PRODUCTO DE DROGAS DE rhASA (CON P20) DESPUÉS DE AGITARSE**

Horas	Sustancia de drogas sacudidas	Producto farmacológico agitado
Base	Incoloro, opalescente, libre de partículas.	Incoloro, opalescente, libre de partículas.
2	Ningún cambio	Ningún cambio
4	Ningún cambio	Ningún cambio
6	Ningún cambio	Ningún cambio
8	Ningún cambio	Ningún cambio
24	1-2 escamas	1-2 fibras
48	Material fibroso	1-2 fibras

[0187] Las muestras agitadas también se analizaron por OD320, pH, actividad específica, RP-HPLC y SEC-HPLC. Los resultados se presentan en la Tabla 19 y la Tabla 20. En general, no se observaron cambios significativos en la calidad de rhASA Despues de agitarse y agitar, con la excepción de la apariencia.

40 **TABLA 19: EFECTO DE 48 HORAS DE AGITACIÓN EN SUSTANCIAS Y PRODUCTOS FARMACOLÓGICOS**

Velocidad de congelación/descongelación	Base	Sustancia farmacológica agitada durante 48 horas ( <i>n</i> = 1)	Producto farmacológico agitado durante 48 horas ( <i>n</i> = 3)
Densidad óptica a 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
Actividad específica (U/mg)	96	71	72

55 [0188] Al agitar el medicamento después de 6 horas, con 0,005% de P20, uno de los tres replicados se volvió turbio. Esta muestra se retiró y las otras dos muestras se agitaron hasta 48 horas. La Tabla 20 muestra los datos promediados para las muestras duplicadas.

60

65

TABLA 20: EFECTO DE 48 HORAS DE ESTIRAMIENTO EN LA SUSTANCIA Y PRODUCTO FARMACOLÓGICO

Velocidad de congelación/descongelación	Base	Sustancia farmacológica agitada durante 6 horas (n = 1)	Medicamento revuelto durante 48 horas (n = 2)
Densidad óptica a 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
Actividad específica (U/mg)	69	73	73

[0189] En base a los resultados y las observaciones visuales, la sustancia del fármaco y el producto del fármaco no son fácilmente susceptibles a la degradación inducida por la agitación, ya que tomó ~4 horas de agitación continua (en el ajuste número 5) y 8 horas de agitación vigorosa continua (a 220 rpm) para que ocurra un cambio en la apariencia.

[0190] Los estudios de agitación se repitieron con el producto farmacológico en ausencia de P20. Para estos estudios, cada vial se llenó con 1 ml o 3 ml de medicamento para investigar el efecto de la sacudida y el volumen del espacio superior en la calidad de rhASA. Para 1 ml de relleno en viales de 3 ml, no se observó ningún cambio en la apariencia del producto farmacológico a lo largo de 8 horas de agitación a 220 rpm (n = 2, datos no mostrados). Los viales sin espacio de cabeza (n = 1) demostraron la formación de pequeñas escamas, algunas fibras y materia floculante a un ritmo más rápido en comparación con los viales con un espacio de cabeza más grande. Las observaciones de 48 horas se presentan en la Figura 9.

[0191] Los resultados visuales también se resumen en la Tabla 21 y la Tabla 22.

TABLA 21: APARIENCIA DEL PRODUCTO FARMACOLÓGICO EN AUSENCIA DE POLISORBATO 20 DESPUÉS DE 48 HORAS DE AGITACIÓN CON LLENADO DE 1 ML EN VIAL DE 3 ML

Horas	Producto farmacológico agitado MLD- 200L-001 sin P20	Producto farmacológico agitado MLD- 200L- 003 sin P20	Control_Producto farmacológico agitado MLD-200L-001 con P20
Base	Incoloro, ligeramente opalescente, esencialmente libre de partículas		
2	Ningún cambio	Ningún cambio	Ningún cambio
4	Ningún cambio	Ningún cambio	Ningún cambio
6	Ningún cambio	Ningún cambio	Ningún cambio
8	Ningún cambio	Ningún cambio	Ningún cambio
24	Floculante	Floculante significativo	Ningún cambio
48	Floculante	Floculante significativo	Ningún cambio

TABLA 22: APARIENCIA DEL PRODUCTO FARMACOLÓGICO EN AUSENCIA DE POLISORBATO 20 DESPUÉS DE 48 HORAS DE AGITACIÓN CON LLENADO DE 3 ML EN VIAL DE 3 ML

Horas	Producto farmacológico agitado MLD- 200L- 001 sin P20	Control_Producto farmacológico agitado MLD- 200L-001 con P20
Base	Incoloro, ligeramente opalescente, esencialmente libre de partículas.	
2	Ningún cambio	Ningún cambio
4	Pequeñas escamas, pocas fibras y floculante	Ningún cambio

(Continuación)

5	Horas	Producto farmacológico agitado MLD-200L- 001 sin P20	Control_Producto farmacológico agitado MLD-200L- 001 con P20
10	Base	Incoloro, ligeramente opalescente, esencialmente libre de partículas.	
15	6	Pequeñas escamas, pocas fibras y floculante	Ningún cambio
	8	Pequeñas escamas, pocas fibras y floculante	Ningún cambio
	24	Pequeñas escamas, pocas fibras y floculante	Ningún cambio
	48	Pequeñas escamas, pocas fibras y floculante	Ningún cambio
20	No se observaron cambios en la concentración de proteínas. Además, no se detectaron agregados solubles usando SEC HPLC para los volúmenes de llenado de 1 ml O <sub>3</sub> ml (Tabla 23 y Tabla 24). El ensayo reducido de SDS-PAGE (Coomassie) no detectó ninguna banda de alto o bajo peso molecular (datos no mostrados).		

TABLA 23: RESULTADOS DE 48 HORAS DE AGITACIÓN EN PRODUCTO FARMACOLÓGICO EN AUSENCIA DE POLISORBATO 20 CON LLENADO DE 1 ML EN VIAL DE 3 ML

25	Ensayo	Base	Producto farmacológico agitado después de 24 H(n = 2) sin P20	Producto farmacológico agitado después de 48 h (n = 2) sin P20	Control (n = 1) con P20
30	Concentración (mg/ml)	32,3	32,9	33,8	31,8
	Densidad óptica a 320 nm.	0,164	0,160	0,163	0,169
	SEC-HPLC (% pico principal)	99,5	99,5	99,5	99,6
35	pH	6,1	6,1	6,0	6,0
	Actividad específica (U/mg)	64	63	62	72

TABLA 24: RESULTADOS DE 48 HORAS DE AGITACIÓN EN PRODUCTO FARMACOLÓGICO EN AUSENCIA DE POLISORBATO 20 CON LLENADO DE 3 ML EN VIAL DE 3 ML

40	Ensayo	Base	Producto farmacológico agitado después de 4 H(n = 1) sin P20	Producto farmacológico agitado después de 48 H(n = 1) sin P20	Control (n = 1) con P20
45	Concentración (mg/ml)	31,02	34,4	32,1	32,6
	Densidad óptica a 320 nm.	0,152	0,163	0,166	0,151
50	SEC-HPLC (% pico principal)	99,6	99,6	99,6	99,6
	pH	6,0	6,0	5,9	6,0
55	Actividad específica (U/mg)	70	64	65	71

#### Estudios de capacidad tamponante

[0192] Para la determinación de la capacidad tamponante de rhASA, el producto se tituló por triplicado, con ácido diluido o base diluida. Se colocaron alícuotas de 10 ml de sustancia farmacológica a 38 o 30 mg/ml (este último para imitar el producto farmacológico) en un vial de vidrio de 20 ml al que se añadió una micro barra de agitación. Se agregaron alícuotas de 1  $\mu$ l de ácido clorhídrico 1N (HCl) a la solución de proteína, se mezcló el contenido y se registró el pH. El experimento continuó con la adición de picos de HCl de 1  $\mu$ L, sin enjuagar la sonda de pH entre las mediciones para evitar cualquier dilución, hasta que se alcanzó un pH aproximado de 5,5. El experimento se realizó por triplicado y se valoró lado a lado el tampón fosfato 5 mM que contenía cloruro sódico 150 mM, pH 6,0, para comparación. De manera similar, la sustancia farmacológica a ambas concentraciones se tituló con hidróxido de sodio 1M (NaOH) hasta

que se alcanzó un pH final de aproximadamente 6,5. Para investigar la presencia de cualquier fosfato residual en rhASA, se analizó la sustancia farmacológica mediante acoplamiento inductivo de espectroscopía de masas plasmáticas (ICP-MS). La capacidad de amortiguación de la sustancia farmacológica rhASA diluida también se investigó para garantizar que el valor de pH de la solución no cambiara con la dilución de la solución de proteína. Las 5 muestras diluidas que van desde 30 mg/ml a 1 mg/ml se prepararon en tubos eppendorf de 1,5 ml y los valores de pH se midieron al inicio de la dilución y después de una semana de almacenamiento a 2-8°C.

[0193] Los resultados de ácido diluido y estudios de titulación de base de dilución demostraron capacidad de tamponamiento adecuada de soluciones de rhASA. Para los estudios de titulación con HCl, inicialmente la adición de 10 aproximadamente 2 µl de ácido 1M no alteró el pH de ninguna sustancia farmacológica ni del control del tampón. Sin embargo, el aumento de los volúmenes de ácido demostró una disminución dramática en el pH del tampón en comparación con la sustancia farmacológica rhASA. Después de la adición de 13 µl de HC1 19 M, el pH del control del tampón fue más de 2 unidades de pH más bajo que el pH de la sustancia farmacológica. También se incluyó una 15 concentración de sustancia farmacológica de 30 mg/ml en este experimento para imitar la concentración del producto farmacológico. La Figura 10 ilustra la capacidad de amortiguación de la sustancia farmacológica rhASA en comparación con el tampón de fosfato de sodio 5 mM, pH 6,3 con cloruro de sodio 150 mM cuando se titula con ácido.

[0194] La titulación de sustancia de fármaco rhASA con hidróxido de sodio demostró relativamente diferentes 20 resultados (Figura 11) con respecto a mantener el pH. La tasa de cambio de pH no difirió sustancialmente entre la sustancia farmacológica y el control del tampón.

[0195] En base a los resultados observados, y sin querer limitarse a ninguna teoría, es probable que rhASA esté contribuyendo a la capacidad de amortiguación de la solución ya que las cadenas laterales de ácido aspártico, ácido glutámico e histidina tienen la capacidad de actuar como aceptores y/o donantes de protones para mantener el pH de 25 la solución. La capacidad de amortiguación de esta proteína también se observó previamente durante los estudios de preformulación cuando se descubrió el efecto de "memoria de pH". La retención de pH se ha demostrado varias veces tanto a escala de laboratorio como a gran escala. En conjunto, los resultados de estos dos experimentos sugieren que 30 la capacidad de amortiguación de rhASA en solución salina es más predominante en la dirección ácida. Según la literatura, la capacidad de amortiguación para los valores de pH más bajos es una indicación directa de un mayor número de residuos de ácido aspártico y ácido glutámico dentro de una proteína dada en comparación con los residuos de histidina. Si bien no desea estar sujeto a ninguna teoría, este puede ser el caso de la arilsulfatasa A, donde hay un total de 45 residuos de ácido glutámico y aspártico en comparación con 18 residuos de histidina.

[0196] La capacidad de amortiguación de la sustancia farmacológica también puede ser atribuible a fosfato unido 35 residual que se muestra a estar presente en la sustancia farmacológica usando ICP-MS. La Tabla 25 muestra la cantidad de fosfato residual presente en tres lotes diferentes de sustancias farmacológicas LSDL. Estos datos también confirman la consistencia de los pasos de ultrafiltración y diafiltración para el proceso de escala piloto.

**TABLA 25: CANTIDAD RESIDUAL DE FOSFATO EN SUSTANCIA FARMACOLÓGICA PRODUCIDA EN LSDL**

rhASA Lote Nº	Concentración de fosfato (ppm)
001	27
002	31
003	31

[0197] Para comprender mejor la capacidad de amortiguación de esta proteína, también se investigó el efecto de la dilución sobre el pH. Tras la dilución de la sustancia farmacológica rhASA con solución salina para reducir las 50 concentraciones de proteína, no se observó ningún cambio en los valores de pH de la sustancia farmacológica. Posteriormente, las sustancias farmacológicas diluidas se almacenaron a 2-8°C durante una semana, después de lo cual se registraron las mediciones de pH. La Tabla 26 resume los datos. Los resultados demuestran que la dilución y el almacenamiento a 2-8°C no tienen efecto sobre los valores de pH de la sustancia farmacológica diluida. Estas observaciones respaldan aún más la conclusión de los estudios de titulación de ácidos y bases que demostraron una 55 capacidad de amortiguación adecuada de la sustancia farmacológica rhASA formulada en solución salina.

TABLA 26: VALORES DE PH DE LA SUSTANCIA FÁRMACOLÓGICA RHASA DILUIDA

5	Concentración diana de sustancias farmacológicas (mg/ml)	Concentración medida de sustancias farmacológicas utilizando A280 (mg/ml)	Valor de pH de inicio	Valor de pH después de una semana de almacenamiento a 2-8°C
10	37,0	38,8	6,00	6,20
	30,0	33,4	6,07	6,10
	25,0	28,3	6,04	6,09
	20,0	20,1	6,02	6,12
	10,0	9,2	6,04	6,10
15	5,0	4,5	6,03	6,11
	1,0	1,0	6,00	6,07

[0198] Durante la investigación de la dilución de rhASA y el pH, se observó que la aparición de muestras diluidas demostró una disminución dependiente de la concentración en opalescencia, es decir, muestras de rhASA con mayores concentraciones fueron más opalescentes en comparación con las muestras a concentraciones más bajas que tenían una apariencia casi clara. La Figura 12 exhibe la apariencia observada de rhASA diluido. La solución de rhASA de 1 mg/ml demostró una apariencia similar al agua, mientras que la apariencia de 30 mg/ml se evaluó entre las suspensiones de referencia II y III o III y IV.

## 25 Estudios de estabilidad

[0199] Para estudios de estabilidad, la sustancia farmacológica se formuló a 38 $\pm$ 4 mg/ml en NaCl 154 mM, pH 6,0 y el medicamento se formuló a 30 $\pm$ 3 mg/ml en NaCl 154 mM, pH 6,0 en presencia y ausencia de 0,005% de polisorbato 20. Se dispensaron alícuotas de 1 ml de sustancia farmacológica en frascos de policarbonil de 5 ml con tapones de rosca de polipropileno y se almacenaron a  $\leq$ -65°C, -15°C a -25°C y 2-8°C. Se dispensaron alícuotas de 1,0 a 1,1 ml de medicamento en viales de vidrio de 3 ml con tapones Fluorotec de 13 mm y se almacenaron a 2-8°C, 25  $\pm$  2°C y 40  $\pm$  2°C. Los viales del producto farmacológico se almacenaron en la orientación vertical para los estudios iniciales de estabilidad y se cambiaron a la orientación invertida para los últimos estudios utilizando el medicamento sin P20. En cada punto de tiempo, las muestras de estabilidad se analizaron mediante SEC-HPLC, RP-HPLC, OD320, concentraciones de proteínas, pH, actividad específica, SDS-PAGE (Coomassie) y apariencia. El mapa de péptidos, el mapa de glucano y el porcentaje de formilglicina se realizaron anualmente. Además, los últimos ensayos también se realizaron para las condiciones estresadas y aceleradas.

[0200] En conjunto, los resultados de los estudios de preformulación, congelación-descongelación y agitación sugieren que solo tres formulaciones eran adecuadas para un mayor desarrollo. Se iniciaron estudios de estabilidad a largo plazo en estas tres formulaciones en presencia de P20 al 0,005%. La Tabla 27, la Tabla 28 y la Tabla 29 resumen los datos de estabilidad para tres formulaciones en puntos de tiempo seleccionados.

TABLA 27: ESTABILIDAD A LARGO PLAZO A 2-8°C PARA RHASA EN 154 MM NACL , PH 5,9

45	Prueba	Línea de base	3m	6m	11m
50	Apariencia	Claro a ligeramente opalescente			
	Proteína Conc. (mg/ml)	25,6	24,3	26,5	27,3
55	SEC-HPLC (% pico principal) a pH 5,5	>99,9	99,8	99,9	99,8
	SEC-HPLC (% pico principal) a pH 7,0	99,1	99,0	99,4	99,7
	RP-HPLC (% pico principal)	99,6	99,7	99,8	>99,9
60	pH	5,9	6,0	6,0	6,0
	Actividad específica (U/mg)	95	79	90	87

(Continuación)

Prueba	Base	3m	Los 6m	11m
Apariencia	Claro a ligeramente opalescente	Claro a ligeramente opalescente	Claro a ligeramente opalescente	Claro a ligeramente opalescente
SDS-Page (Coomassie)	Cumple con el estándar de referencia sin bandas nuevas con una intensidad mayor que el control de ensayo del 1%	Conforme	Conforme	Conforme

**TABLA 28: ESTABILIDAD A LARGO PLAZO A 2-8°C PARA rhASA EN 154 MM NACL , PH 7,0**

Prueba	Base	3m	6m	11m
Apariencia	Claro a ligeramente opalescente	Claro a ligeramente opalescente	Claro a ligeramente opalescente	Claro a ligeramente opalescente
Proteína Conc. (mg/ml)	27,3	26,9	28,1	29,2
SEC-HPLC (% pico principal) a pH 5,5	99,9	97,5	99,8	>99,9
SEC-HPLC (% pico principal) a 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
Actividad específica (U/mg)	112	88	98	86
Página SDS (Coomassie)	Cumple con el estándar de referencia sin bandas nuevas con una intensidad mayor que el control de ensayo del 1%	Conforme	Conforme	Conforme

**TABLA 29: ESTABILIDAD A LARGO PLAZO A 2-8°C PARA rhASA EN TAMPÓN DE FOSFATO DE 5 MM CON NACL DE 145 MM, PH 6,0**

Prueba	Base	3m	Los 6m	11m
Apariencia	Claro a ligeramente opalescente			
Proteína Conc. (mg/ml)	27,9	27,4	27,1	29,3
SEC-HPLC (% pico principal) a pH 5,5	99,9	97,8	99,8	99,9
SEC-HPLC (% pico principal) a 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
Actividad específica (U/mg)	87	88	95	90

(Continuación)

	<b>Prueba</b>	<b>Base</b>	<b>3m</b>	<b>6m</b>	<b>11m</b>
5	Apariencia	Claro a ligeramente opalescente	Claro a ligeramente opalescente	Claro a ligeramente opalescente	Claro a ligeramente opalescente
10	SDS-Page (Coomassie)	Cumple con el estándar de referencia sin bandas nuevas con una intensidad mayor que el control de ensayo del 1%	Conforme	Conforme	Conforme

15 [0201] Los estudios de estabilidad, realizados hasta 11 meses a 2-8°C, sugirieron que la calidad de rhASA se mantiene en las formulaciones prototipo. Los perfiles de HPLC de exclusión por tamaño representativos de rhASA en solución salina, pH 5,9 se muestran en las Figuras 13 y 14. La HPLC de exclusión por tamaño no detectó ningún cambio significativo en el estado de asociación de rhASA después de 11 meses de almacenamiento a 2-8°C.

20 [0202] En general, la calidad de producto de fármaco en las tres formulaciones candidatas se mantuvo después de un almacenamiento de 11 meses a 2-8°C.

#### **EJEMPLO 4 - TOXICOLOGÍA**

25 [0203] Este ejemplo ilustra la administración de dosis repetidas intratecal (IT) de rhASA de una toxicología y perspectiva farmacológica de seguridad durante un período de seis meses. El artículo de prueba de IT para este estudio fue rhASA. Treinta y seis monos cynomolgus machos y 36 hembras fueron asignados aleatoriamente a cinco grupos de tratamiento. Los animales en el Grupo 1 eran control de dispositivo de implante no tratado (puerto y catéter) y no se dosificaron con el vehículo o el artículo de prueba; sin embargo, estos animales fueron dosificados con 0,6 mL de PBS en un horario que coincide con el horario de dosificación del artículo de prueba. Los animales en los Grupos 30 2-5 recibieron 0,6 mL de infusión IT de 0, 3, 10 o 31 mg/ml de rhASA (dosis total de 0, 1,8, 6,0 o 18,6 mg) cada dos semanas (es decir, un total de 12 dosis). A los animales se les realizó una autopsia a los 6 meses (24 horas después de la última dosis de IT), y a los 4 animales/sexo/grupo restantes se les realizó una autopsia al final de un período de recuperación de 4 semanas. Los tejidos seleccionados fueron cosechados, guardados y examinados microscópicamente.

35 [0204] En general, los cambios relacionados con el artículo de prueba podrían clasificarse en dos tipos principales y estaban presentes en todos los niveles de dosis (1,8, 6,0 y 18,6 mg/dosis). Aumento de infiltrados (de glóbulos blancos, generalmente con un componente eosinófilo prominente) en las meninges, el parénquima cerebral, el parénquima de la médula espinal, el ganglio trigémino y, ocasionalmente, las raíces/ganglios del nervio espinal (o el epineuro que rodea esas estructuras). Sin desear estar ligado por ninguna teoría, este aumento se interpretó que es debido a la presencia del artículo de prueba (una proteína) en el espacio intratecal y en los tejidos del sistema nervioso. Ligero aumento focal de células microgliales en la médula espinal y el cerebro en animales ocasionales (no se observó microgliosis en ningún animal con dosis altas). Sin desear limitarse a ninguna teoría, ambas categorías de cambios morfológicos se interpretaron como una respuesta a la presencia del artículo de prueba. No hubo evidencia de necrosis neuronal en ningún animal. Ninguno de los cambios relacionados con el artículo de prueba se relacionó con reacciones biológicamente adversas en el cerebro, la médula espinal, las raíces nerviosas espinales o los ganglios. Específicamente, no hubo evidencia de necrosis neuronal o una respuesta glial biológicamente importante. No hubo lesiones relacionadas con el artículo de prueba en los tejidos del sistema nervioso.

50 [0205] Después de un período de recuperación de un mes (un período libre de dosificación), los cambios relacionados con el artículo de prueba se resolvieron por completo o se limitaron a los restos del aumento previo en la respuesta inflamatoria asociada con la presencia del artículo de prueba. No hubo efectos morfológicos adversos en los animales de recuperación. Según un examen microscópico cegado que asigna una puntuación de tinción semicuantitativa, la tinción inmunohistoquímica para la arilsulfatasa A (rhASA; el artículo de prueba) se incrementó en el cerebro y la médula espinal en varios tipos de células, excepto las neuronas, para todos grupos tratados con artículos de prueba en el sacrificio terminal. Este aumento también fue evidente en las células de Kupffer del hígado. Después del período de recuperación de 1 mes, la tinción de rhASA en los animales tratados con el artículo de prueba (todos grupos de dosis) había vuelto a los niveles de control (dispositivo y/o control del vehículo). En un hombre de baja dosis de recuperación, hubo múltiples focos de astrocitosis y pérdida neuronal, lo que indica múltiples áreas de isquemia previa, en la corteza cerebral. Aunque la patogénesis exacta de estas lesiones en este animal no era evidente, la ausencia de lesiones similares en cualquier otro animal tratado con artículo de prueba, incluyendo los animales de alta dosis que recibieron 10 veces la dosis, indica estas lesiones no se relacionaron con el artículo de prueba.

65 [0206] El artículo de prueba de IT para este estudio fue rhASA. Treinta y seis monos cynomolgus machos y 36 hembras fueron asignados aleatoriamente a cinco grupos de tratamiento. Los animales en el Grupo 1 eran control de dispositivo de implante no tratado (puerto y catéter) y no se dosificaron con el vehículo o el artículo de prueba; sin embargo, estos

animales fueron dosificados con 0,6 mL de PBS en un horario que coincide con el horario de dosificación del artículo de prueba. Los animales de los Grupos 2-5 recibieron 0,6 ml de infusión de IT de 0, 3, 10 o 31 mg/mL de rhASA (dosis total de 0, 1,8, 6,0, o 18,6 mg) cada dos semanas (es decir, un total de 12 dosis). A los animales se les realizó una autopsia a los 6 meses (24 horas después de la última dosis de IT), y a los 4 animales/sexo/grupo restantes se les

5 realizó una autopsia al final de un período de recuperación de 4 semanas. Los tejidos seleccionados fueron cosechados, guardados y examinados microscópicamente. La siguiente tabla refleja el diseño del estudio en lo que respecta al aspecto patológico de este estudio.

10 **[0207]** En el momento del sacrificio, el cerebro se cortó en una matriz cerebral con un grosor de corte coronal de aproximadamente 3 mm. La primera rebanada y cada segunda rebanada después se fijaron en formalina para evaluación histopatológica y análisis inmunohistoquímico. El cerebro se procesó como secciones coronales completas. Estas secciones incluyeron como mínimo las siguientes regiones del cerebro.

15

- Neocorteza (incluida la corteza frontal, parietal, temporal y occipital): secciones del cerebro 1 a 8 (y corte 9 cuando está presente)
- Paleocorteza (bulbos olfatorios y/o lóbulo piriforme): secciones del cerebro 1 a 3
- Ganglios basales (incluidos caudados y putamen): secciones de cerebro 3 y 4
- Sistema límbico (incluyendo el hipocampo y gyrus cingulado): las secciones del cerebro 4 y 5
- Tálamo/hipotálamo y regiones del cerebro medio, incluyendo la sustancia negra: secciones de cerebro 4 y 5
- 20 • Cerebelo, puente de varolio y la médula oblonga: secciones de cerebro 6 a 8 (y corte 9 cuando esté presente).

25 **[0208]** Las secciones de cerebro se enumeran en las tablas de datos como secciones 1 a 8/9 (una sección 9 fue provista por la instalación de pruebas para algunos animales). El seccionamiento varió ligeramente entre animales. Las secciones del cerebro (1 a 8/9) proporcionadas anteriormente eran la ubicación aproximada de las diversas áreas anatómicas. Las secciones del cerebro se enumeran en las tablas de datos como secciones individuales, con diagnósticos pertinentes a esa sección, para facilitar una posible revisión de diapositivas adicional en el futuro (si corresponde). Durante la interpretación de los datos, se compararon sitios anatómicos cerebrales individuales (como se enumeró anteriormente) para identificar cualquier efecto único del artículo de prueba (es decir, exclusivo de una región cerebral particular). En TPS, todas las secciones del cerebro de todos los animales se incluyeron en parafina, se seccionaron a 5 micras, se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se examinaron microscópicamente. Además, los cerebros de los animales de control y dosis altas se tiñeron con Fluoro-Jade B (una mancha que aumenta la sensibilidad de evaluar el cerebro para la degeneración neuronal) y una mancha de plata de Bielschowsky (un procedimiento que permite la visualización directa de axones, dendritas y filamentos neuronales) y examinados.

30 **[0209]** La médula espinal (cervical, torácica y lumbar) se cortó en secciones de centímetro. El primer corte y cada dos cortes posteriores se fijaron en formalina para evaluación histopatológica y análisis inmunohistoquímico. Las secciones de la médula espinal (cervical, torácica (incluida la punta del catéter) y lumbar) de todos los animales se seccionaron a aproximadamente 5 micras, se tiñeron con H&E y se examinaron con secciones transversales y oblicuas tomadas en cada nivel. Las secciones seriales de la médula espinal del control y los grupos de dosis altas se tiñeron adicionalmente con tinción de plata de Bielschowsky y anti-GFAP (una tinción inmunohistoquímica que permite la visualización directa de los astrocitos y sus procesos).

35 **[0210]** Las raíces del nervio espinal dorsal y el ganglio (tomados a medio cuello uterino, medio torácico y medio lumbar) se incrustaron en parafina, con secciones en serie teñidas con H&E. Además, las secciones en serie de los grupos de control y dosis altas se tiñeron con la tinción de plata de Bielschowsky.

40 **[0211]** Para las secciones de nervio ciático, tibial y sural de todos los animales: una sección longitudinal de cada nervio se incrustó en parafina, se seccionó a aproximadamente 5 micras y se tiñó con H&E. Una sección transversal de cada nervio se fijó en osmio, se embebió en resina de Spurr, se seccionó a aproximadamente 1 a 2 micras y se tiñó con azul de toluidina. La fijación posterior de osmio y la incrustación de resina proporcionan una conservación superior de la mielina en los nervios periféricos y, por lo tanto, un examen más detallado del nervio.

45 **[0212]** Todos los tejidos recogidos y las lesiones macroscópicas recogidas en la necropsia de todos los animales también se incluyeron en parafina, se tiñeron con H&E y se examinaron microscópicamente. El procesamiento histopatológico y las evaluaciones y los análisis inmunohistoquímicos fueron realizados por TPS.

#### Tinción de arilsulfatasa A (rhASA)

50 **[0213]** Los portaobjetos de control positivo fue suministrado por el patrocinador de estudio. Los portaobjetos eran secciones de hígado de ratones inyectados con rhASA. Los portaobjetos de control positivo mostraron una amplia evidencia de rhASA en las células de Kupffer (macrófagos sinusoidales) en el hígado. Los portaobjetos de control positivo se almacenan con los portaobjetos de este estudio. Todas las evaluaciones de las secciones teñidas con rhASA se realizaron inicialmente cegadas al grupo de tratamiento del animal. Esto se logró haciendo que el patólogo lea inicialmente los portaobjetos teñidos por rhASA con el número del animal en la etiqueta oscurecida (por un asistente con conocimiento del animal real que está siendo evaluado), dictando la puntuación (grado de gravedad) durante la evaluación, y haciendo que el mismo asistente registre inmediatamente el puntaje de tinción (grado de gravedad) en

las tablas de datos. La identificación del animal fue verificada tanto por el neuropatólogo del estudio como por el asistente para garantizar la entrada precisa de datos. Este procedimiento se realizó para no introducir ningún sesgo en el juicio de la intensidad general de la tinción con la tinción inmunohistoquímica para la detección de rhASA intracelular. El grado relativo de tinción de neuronas, macrófagos menígeos, macrófagos perivasculares y células gliales (astrocitos y células microgliales, pero probablemente células predominantemente microgliales) se calificó en todas las secciones del cerebro y la médula espinal. Los puntajes de gravedad promedio en cada nivel de cerebro y médula espinal para cada grupo se sumaron (por grupo) y se registraron como un total bajo el encabezado de tejido Cerebro, General, tinción de rhASA y Médula espinal, General, Tinción de rhASA.

5 [0214] En general, la tinción de rhASA en neuronas del cerebro era una medida de las neuronas en la corteza cerebral y otras áreas nucleares en el cerebro. La tinción de rhASA en macrófagos menígeos fue evidencia de la captación del artículo de prueba por los macrófagos menígeos y/o rhASA endógeno en macrófagos menígeos. La tinción de rhASA de macrófagos perivasculares fue una medida de la absorción de rhASA por los macrófagos en el cerebro/médula espinal (o rhASA endógeno), aunque debe tenerse en cuenta que el espacio perivascular en el cerebro y la médula espinal (el espacio de Virchow-Robins) es continuo con las meninges. En general, la clasificación de la tinción de rhASA en las células gliales fue predominantemente una medida de absorción del artículo de prueba/penetración del artículo de prueba en la materia gris y/o blanca, especialmente de la corteza cerebral (la corona radiata es la materia blanca debajo de la corteza cerebral). La tinción de rhASA en la sustancia blanca parecía estar en astrocitos y células microgliales.

10 [0215] El siguiente esquema de clasificación se usó para puntuar el grado de tinción de rhASA en los diversos tipos de células (neuronas, células gliales, macrófagos).

#### Explicación de grado (% de las posibles células teñidas)

25 [0216]

- 30 1 Menos del 10%
- 2 Mayor que 10 a 25%
- 3 Mayor que 25 a 50%
- 4 Mayor que 50 a 75%
- 5 Mayor que 75%

35 [0217] Tenga en cuenta que este esquema no es estrictamente cuantitativo. Se utilizó como un método eficiente y semicuantitativo para evaluar el cerebro y la médula espinal para determinar el grado de tinción con rhASA. El neuropatólogo del estudio observó que no todas las áreas neuronales tenían la misma tinción de rhASA. También se observó que había una tinción neuronal endógena en algunos animales de control y que las células del plexo coroideo y las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal tendían a teñirse fuertemente para rhASA incluso en animales de control. La tinción del plexo coroideo y los ganglios de la raíz dorsal no se calificó, pero el neuropatólogo del estudio observó que era prominente, incluso en animales de control.

40 [0218] Nota: Todos los grupos de dosis: Dosis baja = 1,8 mg/dosis; Dosis media = 6,0 mg/dosis; Dosis alta = 18,6 mg/dosis. No hubo lesiones relacionadas con el artículo de prueba en los tejidos del sistema nervioso, excepto por el aumento de la tinción de rhASA en el hígado de todos los grupos de dosis (masculino y femenino; ver más abajo).

#### 45 Animales de sacrificio terminal (dosificación EOW de 6 meses): Secciones teñidas con rhASA

50 [0219] Hubo un aumento de la tinción de rhASA en los siguientes tipos de tejidos/células. Al considerar un efecto del artículo de prueba sobre el grado de tinción de rhASA en un tipo de célula particular en un grupo de dosis particular, se consideraron los niveles de tinción en el control del vehículo concurrente y el control del dispositivo (sacrificado con los animales de sacrificio de recuperación) para la comparación.

#### 55 [0220] Cerebro, meninges, macrófagos (todos los grupos de dosis, hombres y mujeres)

- 60 • Cerebro, perivascular, macrófagos (todos los grupos de dosis, hombres y mujeres)
- Cerebro, células gliales (todos los grupos de dosis, hombres y mujeres)
- Médula espinal, Meninges, macrófagos (todos los grupos de dosis, hombres y mujeres)
- Médula espinal, perivascular, macrófagos (todos los grupos de dosis, hombres y mujeres)
- Médula espinal, células gliales (dosis media y alta en hombres y mujeres)
- Hígado, células de Kupffer (todos los grupos de dosis, hombres y mujeres)

65 [0221] Debido a la tinción endógena, los niveles de tinción de rhASA en las neuronas del cerebro y la médula espinal fueron los más difíciles de definir específicamente. La tinción de rhASA demostró niveles constantemente aumentados de rhASA en los macrófagos perivasculares menígeos y cerebro/médula espinal y también dentro de las células gliales. No hubo diferencias detectables de tinción de rhASA en las neuronas entre los animales tratados con el artículo de prueba y control.

Animales de sacrificio de recuperación (dosificación EOW de 6 meses seguida de 1 mes sin dosificación)

5 [0222] En general, los cambios relacionados con el artículo de prueba se resolvieron totalmente o disminuyeron notablemente en aquellos animales que permitieron un período de un mes sin dosificación antes de la necropsia. Los siguientes cambios microscópicos estuvieron presentes con una incidencia y/o gravedad que indicaron una posible relación con el artículo de prueba.

## 10 [0223] Cambios microscópicos relacionados con el artículo de prueba (animales de recuperación)

- 15 • Cerebro, meninges, infiltrados (grupos de dosis media y alta, ambos sexos) (Figuras 16 y 17)
- Cerebro, meninges, infiltrados, % de eosinófilos (hombres de dosis media; mujeres de dosis alta)
- Cerebro, perivasculares, infiltrados (hombres de dosis media; mujeres de dosis altas) (Figura 18)
- Cerebro, perivasculares, infiltrados, % de eosinófilos (dosis media hombres; mujeres con dosis altas)
- 20 • Cerebro, materia gris, infiltrados (todos grupos de dosis, ambos sexos)
- Cerebro, infiltrados con materia gris, % de eosinófilos (hombres con dosis bajas)
- Cerebro, materia gris, eosinófilos, necrosis (hombres con dosis bajas)
- Médula espinal, las meninges, infiltrados (medias y altas dosis de machos, las hembras de baja y alta dosis)
- 25 • Médula espinal, las meninges, infiltrados, % de eosinófilos (machos mediados de dosis, las hembras de dosis bajas)
- Médula espinal, la materia gris, infiltrados (hembras de dosis baja)
- Médula espinal, materia gris, infiltrados, % de eosinófilos (mujeres con dosis bajas)
- Ganglio y raíces de la raíz dorsal, epineuro, Infiltrados (mujeres de dosis media)
- 30 • Raíces y ganglios del nervio espinal, infiltrados, eosinófilos (hombres de dosis media y alta; todas las dosis, hembras)
- Ganglio trigémino, infiltrados, eosinófilos (dosis media machos y hembras)

35 [0224] Todos estos cambios fueron interpretados para representar restos del aumento de los cambios inflamatorios observados en los animales de sacrificio terminal. Al igual que en los animales de sacrificio terminal, no hubo evidencia de que el aumento de los infiltrados de células inflamatorias aún presentes en algunos animales de recuperación representara cambios morfológicos que estaban causando efectos adversos. No hubo lesiones relacionadas con el artículo de prueba en los tejidos del sistema no nervioso.

Animales de sacrificio de recuperación (dosificación EOW de 6 meses seguida de 1 mes sin dosificación): tinción de rhASA.

40 [0225] No hubo indicios de una mayor tinción de rhASA en los machos o hembras de recuperación en comparación con los controles del dispositivo y/o vehículo. En el cerebro de los varones con recuperación de dosis baja, media y alta, en realidad había una indicación de disminución de la tinción de rhASA en algunos tipos de células (esto variaba entre los grupos de tratamiento) en comparación con los controles del dispositivo y/o vehículo. La razón de esto, incluso si esto fue o no un efecto real, no era aparente. Una posible explicación sería que la administración de rhASA exógeno puede causar cierta disminución en la producción de rhASA endógeno. Un hallazgo similar no estaba presente en la médula espinal de los machos. En los hombres y mujeres en recuperación, la tinción en el hígado fue similar a la observada en los controles.

45 [0226] En general, los cambios relacionados con el artículo de prueba podrían clasificarse en dos tipos principales y estaban presentes en todos los niveles de dosis (1,8, 6,0 y 18,6 mg/dosis).

50 [0227] Aumento de infiltrados (de glóbulos blancos, generalmente con un componente eosinófilo prominente) en las meninges, el parénquima cerebral, el parénquima de la médula espinal, el ganglio trigémino y ocasionalmente las raíces/ganglios del nervio espinal (o el epineuro que rodea esas estructuras). Se interpretó que este aumento se debía a la presencia del artículo de prueba (una proteína) en el espacio intratecal y en los tejidos del sistema nervioso.

55 [0228] Aumento leve y focal de células microgliales en la médula espinal y el cerebro en animales ocasionales (no se observó microgliosis en ningún animal con dosis altas). Ambas categorías de cambios morfológicos se interpretaron como una respuesta a la presencia del artículo de prueba. No hubo evidencia de necrosis neuronal en ningún animal. Ninguno de los cambios relacionados con el artículo de prueba se relacionó con reacciones biológicamente adversas en el cerebro, la médula espinal, las raíces nerviosas espinales o los ganglios. Específicamente, no hubo evidencia de necrosis neuronal o una respuesta glial biológicamente importante. No hubo lesiones relacionadas con el artículo de prueba en los tejidos del sistema no nervioso. Después de un período de recuperación de un mes (un período libre de dosificación), los cambios relacionados con el artículo de prueba se resolvieron por completo o se limitaron a los restos del aumento previo en la respuesta inflamatoria asociada con la presencia del artículo de prueba. No hubo efectos morfológicos adversos en los animales de recuperación.

65 [0229] Como se basa en un examen microscópico cegado que asigna una puntuación de tinción semicuantitativa, la tinción inmunohistoquímica para la arilsulfatasa A (rhASA; el artículo de prueba) se incrementó en el cerebro y la

médula espinal en varios tipos de células, excepto las neuronas, para todos los grupos tratados con el artículo de prueba. Este aumento también fue evidente en las células de Kupffer del hígado. Después del período de recuperación de 1 mes, la tinción de rhASA en los animales tratados con el artículo de prueba (todos grupos de dosis) había vuelto a los niveles de control (dispositivo y/o control del vehículo). En un hombre de baja dosis de recuperación, hubo 5 múltiples focos de astrocitosis y pérdida neuronal, lo que indica múltiples áreas de isquemia previa, en la corteza cerebral. Aunque la patogénesis exacta de estas lesiones en este animal no era aparente, la falta de lesiones similares 10 en cualquier otro animal tratado con artículo de prueba, incluidos los animales de dosis alta que recibieron 10X la dosis, indicó que estas lesiones no estaban relacionadas con el artículo de prueba. Basado estrictamente en los hallazgos macroscópicos y microscópicos (en las secciones embebidas en parafina, teñidas con hematoxilina y eosina) en este estudio, el nivel de efectos adversos no observados (NOAEL) fue de 18,6 mg.

#### EJEMPLO 5 - DATOS FARMACINÉTICOS

Datos de animales de 6 meses

[0230] Este ejemplo proporciona un análisis interpretativo para las concentraciones séricas y de LCR de los anticuerpos séricos rhASA y anti-rhASA de Northern Biomedical Research, Inc.

[0231] El objetivo del ejemplo fue evaluar la administración intratecal (IT) de dosis repetidas de rhASA desde una perspectiva de toxicología y farmacología de seguridad en monos cynomolgus juveniles (<12 meses de edad). Se administraron un total de 12 dosis en un período de seis meses. Los animales fueron sometidos a necropsia 24 horas o un mes después de la última dosis. El diseño del estudio se muestra en la Tabla 30.

TABLA 30: Diseño del estudio

Grupo	Nº de animales	Concentración de dosis nominal (mg/ml)	Dosis administrada (mg)	Nº de animales, sacrificio de 6 meses	Nº de animales, 1 mes Sacrificio de recuperación
1	4M, 4F	DC	0	-	4M, 4F
2	8M, 4F	0	0	4 M, 3 F <sup>a</sup>	4M, 4F
3	8M, 4F	3	1,8	4 M, 4 F	4M, 4F
4	8M, 4F	10	6,0	4 M, 4 F	4M, 4F
5	8M, 4F	31	18,6	4 M, 4 F	4M, 4F

30 DC = Control del dispositivo; Animales en el Grupo 1 no recibieron dosis de vehículo o artículo de prueba. <sup>a</sup> Animal de control del vehículo N° 044 fue sacrificado temprano en el día 50 debido a una fuga de catéter

#### 40 Métodos de ensayo: Análisis de anticuerpos

[0232] La cuantificación de anticuerpos anti-rhASA en el suero y el LCR de monos cynomolgus se realizó usando un método validado. Brevemente, el ensayo comienza bloqueando una placa recubierta con estreptavidina MSD, seguido de incubación con rhASA marcado con biotina. Después de una etapa de lavado, las muestras diluidas, los calibradores y los QC se agregan a la placa y se incuban. Después de un paso de lavado adicional, se agrega e incuba el fármaco marcado con SULFO TAG. Se realiza un paso final de lavado y se agrega el tampón de lectura MSD. Las placas se leen de inmediato. Los datos de la señal en unidades de luminiscencia relativa (RLU) se analizan utilizando plantillas SOFTMax Pro.

#### 50 Concentración de suero y LCR

[0233] La cuantificación de rhASA en el suero y LCR de monos cynomolgus se realizó utilizando un método validado. El método se basa en la tecnología de Ensayo de Inmunosorbentes Enzimados (ELISA). Brevemente, una placa de microtitulación está recubierta con un anticuerpo políclonal de conejo (SH040) producido contra la Arilsulfatasa A humana recombinante (ASA). Después de la incubación con los estándares de referencia ASA y las muestras de prueba, la proteína ASA unida se detecta mediante el anticuerpo monoclonal anti-ASA conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (clon 19-16-3). La placa se incuba con un sustrato para HRP, peroxidasa TMB. Esta reacción enzima-sustrato se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico 2N ( $H_2SO_4$ ) y la absorbancia de cada pocillo se mide a la absorbancia de longitud de onda 450 nm con una longitud de onda de referencia 655 nm. Las concentraciones de ASA en las muestras se calculan utilizando la curva de calibración de rhASA en la misma placa.

[0234] Resúmenes de las concentraciones séricas de rhASA, concentraciones de CSF de rhASA, **¡Error! Fuente de referencia no encontrada.** Las concentraciones séricas de anticuerpos anti-rhASA, las concentraciones de anticuerpos CSF anti-rhASA y la incidencia de anticuerpos por grupo y sexo se presentan en la Tabla 33-39 a continuación.

TABLA 33: Resumen de la concentración de suero de rhASA en monos Cynomolgus

<b>Grupo 1: control del vehículo</b>	Masculino			Femenino		
	Media	DE	n	Media	DE	n
<b>Punto de tiempo</b>	ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Antes de la dosis 2	0	0	4	0	0	4
Post Dosis 2	0	0	4	0	0	4
Antes de la dosis 4	0	0	4	0	0	4
Post Dosis 4	0	0	4	0	0	4
Antes de la dosis 6	0	0	4	0	0	4
Post Dosis 6	0	0	4	0	0	4
Antes de la dosis 8	0	0	4	0	0	4
Post dosis 8	0	0	4	0	0	4
Antes de la dosis 10	0	0	4	0	0	4
Post Dosis 10	0	0	4	0	0	4
Antes de la dosis 12	0	0	4	0	0	4
Post Dosis 12	0	0	4	0	0	4
Recuperación media	0	0	4	0	0	4
Necropsia de recuperación	0	0	4	0	0	4
<b>Grupo 2: 0 mg</b>	Masculino			Femenino		
	Media	DE	n	Media	DE	n
<b>Punto de tiempo</b>	ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Antes de la dosis 2	0	0	8	0	0	7
Post Dosis 2	0	0	8	0	0	7
Antes de la dosis 4	0	0	8	0	0	7
Post Dosis 4	0	0	8	0	0	7
Antes de la dosis 6	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 6	0	0	8	0	0	8
Antes de la dosis 8	0	0	8	0	0	8
Post dosis 8	0	0	8	0	0	8
Antes de la dosis 10	0	0	8	0	0	7
Post Dosis 10	0	0	8	0	0	7
Antes de la dosis 12	0	0	8	0	0	7
Post dosis 12 (antes de la necropsia de 6 meses)	0	0	8	0	0	8
Recuperación media	0	0	4	0	0	4
Necropsia de recuperación	0	0	4	0	0	4
<b>Grupo 3:1,8 mg</b>	Masculino			Femenino		
	Media	DE	n	Media	DE	n
<b>Punto de tiempo</b>	ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Antes de la dosis 2	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 2	49,2	46,8	8	40,3	27,3	8
Antes de la dosis 4	0	0	8	0	0	8

(Continuación)

<b>Grupo 3:1,8 mg</b>		Masculino			Femenino		
		Media	DE	n	Media	DE	n
<b>Punto de tiempo</b>		ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Post Dosis 4		0	0	8	0	0	8
Antes de la dosis 6		0	0	8	0	0	8
Post Dosis 6		0	0	8	0	0	8
Antes de la dosis 8		0	0	8	0	0	8
Post dosis 8		0	0	8	0	0	8
Antes de la dosis 10		0	0	8	0	0	8
Post Dosis 10		0	0	8	0	0	8
Antes de la dosis 12		0	0	8	0	0	8
Post dosis 12 (antes de la necropsia de 6 meses)		0	0	8	0	0	8
Recuperación media		0	0	4	0	0	4
Necropsia de recuperación		0	0	4	0	0	4
<b>Grupo 4: 6,0 mg</b>		Masculino			Femenino		
		Media	DE	N	Media	DE	N
<b>Punto de tiempo</b>		ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	
Antes de la dosis 2		0	0	8	0	0	8
Post Dosis 2		173,6	69,5	8	143,2	89,0	8
Antes de la dosis 4		0	0	8	0	0	8
Post Dosis 4		17	49	8	63,8	119,9	8
Antes de la dosis 6		0	0	8	0	0	8
Post Dosis 6		0	0	8	0	0	8
Antes de la dosis 8		0	0	8	0	0	8
Post dosis 8		0	0	8	0	0	8
Antes de la dosis 10		0	0	8	0	0	8
Post Dosis 10		0	0	8	0	0	8
Antes de la dosis 12		0	0	8	0	0	8
Post dosis 12 (antes de la necropsia de 6 meses)		0	0	8	0	0	8
Recuperación media		0	0	4	0	0	4
Necropsia de recuperación		0	0	4	0	0	4
<b>Grupo 5:18,6 mg</b>		Masculino			Femenino		
<b>Punto de tiempo</b>		ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	
Antes de la dosis 2		0	0	8	0	0	8
Post Dosis 2		348,0	272,9	8	562,3	204,3	8
Antes de la dosis 4		0	0	8	0	0	8
Post Dosis 4		105,7	274,6	8	172,0	141,3	8

(Continuación)

<b>Grupo 5:18,6 mg</b>	Masculino			Femenino		
	Media	DE	n	Media	DE	n
<b>Punto de tiempo</b>	ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Antes de la dosis 6	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 6	20,4	38,4	8	88,6	121,4	8
Antes de la dosis 8	0	0	8	0	0	8
Post dosis 8	0	0	8	54,0	89,4	8
Antes de la dosis 10	0	0	8	0	0	8
Post Dosis 10	0	0	8	6	18	8
Antes de la dosis 12	0	0	8	0	0	8
Post dosis 12 (antes de la necropsia de 6 meses)	0	0	8	0	0	8
Recuperación media	0	0	4	0	0	4
Necropsia de recuperación	0	0	4	0	0	4

TABLA 34: Resumen de las concentraciones de LCR en monos Cynomolgus

<b>Grupo 1: control del vehículo</b>	Masculino			Femenino		
	Media	DE	n	Media	DE	n
<b>Punto de tiempo</b>	ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Antes de la dosis 2	0	0	4	0	0	4
Post Dosis 2	0	0	4	0	0	4
Antes de la dosis 4	0	0	4	0	0	4
Post Dosis 4	0	0	4	0	0	4
Antes de la dosis 6	0	0	4	0	0	4
Post Dosis 6	0	0	4	0	0	4
Antes de la dosis 8	0	0	4	0	0	4
Post dosis 8	0	0	4	0	0	4
Antes de la dosis 10	0	0	4	0	0	4
Post Dosis 10	0	0	3	0	0	4
Antes de la dosis 12	0	0	3	0	0	4
Post Dosis 12	0	0	3	0	0	4
Recuperación media	0	0	3	0	0	4
Necropsia de recuperación	0	0	4	0	0	4
<b>Grupo 2: 0 mg</b>	Masculino			Femenino		
	Media	DE	n	Media	DE	n
<b>Punto de tiempo</b>	ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Antes de la dosis 2	0	0	6	0	0	7
Post Dosis 2	0	0	5	0	0	7

(Continuación)

<b>Grupo 2: 0 mg</b>	<b>Masculino</b>			<b>Femenino</b>		
	Media	DE	n	Media	DE	n
<b>Punto de tiempo</b>	ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Antes de la dosis 4	0	0	5	0	0	6
Post Dosis 4	0	0	5	0	0	5
Antes de la dosis 6	0	0	5	0	0	5
Post Dosis 6	0	0	5	0	0	5
Antes de la dosis 8	0	0	5	0	0	5
Post dosis 8	0	0	5	0	0	5
Antes de la dosis 10	0	0	4	0	0	5
Post Dosis 10	0	0	4	0	0	5
Antes de la dosis 12	0	0	4	0	0	5
Post dosis 12 (antes de la necropsia de 6 meses)	0	0	5	0	0	5
Recuperación media	0	0	2	0	0	3
Necropsia de recuperación	0	0	4	0	0	4
<b>Grupo 3: 1,8 mg</b>	<b>Masculino</b>			<b>Femenino</b>		
	Media	DE	n	Media	DE	n
<b>Punto de tiempo</b>	ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Antes de la dosis 2	42491	59255	7	42217	47300	6
Post Dosis 2	95886	22626	7	125717	61723	6
Antes de la dosis 4	17664	24372	6	50829	41891	6
Post Dosis 4	106783	42823	6	138400	49908	6
Antes de la dosis 6	39400	50105	4	45817	38404	6
Post Dosis 6	95275	12836	4	104080	37423	5
Antes de la dosis 8	25799	31589	4	58086	43821	5
Post dosis 8	148750	34664	4	119200	66556	5
Antes de la dosis 10	25927	31380	4	30380	30328	5
Post Dosis 10	89975	29494	4	105200	44603	5
Antes de la dosis 12	29746	34267	4	82780	65906	5
Post dosis 12 (antes de la necropsia de 6 meses)	32030	39155	7	47331	49015	6
Recuperación media	0	0	3	0	0	2
Necropsia de recuperación	0	0	4	0	0	4
<b>Grupo 4: 6,0 mg</b>	<b>Masculino</b>			<b>Femenino</b>		
	Media	DE	n	Media	DE	n
<b>Punto de tiempo</b>	ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Antes de la dosis 2	75203	67002	8	146979	233673	6
Post Dosis 2	360000	179276	8	267667	103369	6
Antes de la dosis 4	58064	77210	8	53285	73340	5

(Continuación)

<b>Grupo 4: 6,0 mg</b>		<b>Masculino</b>			<b>Femenino</b>		
		Media	DE	n	Media	DE	n
<b>Punto de tiempo</b>		ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Post Dosis 4		369250	241251	8	305517	152232	6
Antes de la dosis 6		77253	91407	8	97987	146762	6
Post Dosis 6		418600	200098	5	369000	232238	5
Antes de la dosis 8		66342	80374	5	11592	23072	4
Post dosis 8		329400	209841	5	340500	135128	4
Antes de la dosis 10		119420	148408	5	74031	104609	2
Post Dosis 10		412000	149278	5	245500	161927	2
Antes de la dosis 12		68651	92902	5	74577	105251	2
Post dosis 12 (antes de la necropsia de 6 meses)		141833	173933	7	58986	99016	4
Recuperación media		0	0	3	0	N/A	1
Necropsia de recuperación		0	0	4	0	0	4
<b>Grupo 5:18,6 mg</b>		<b>Masculino</b>			<b>Femenino</b>		
		Media	DE	n	Media	DE	n
<b>Punto de tiempo</b>		ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Antes de la dosis 2		289917	291188	7	201339	250774	8
Post Dosis 2		734429	298352	7	920143	448409	7
Antes de la dosis 4		150238	210302	7	169895	185675	6
Post Dosis 4		984857	570039	7	965167	425924	6
Antes de la dosis 6		265479	252067	7	288879	226889	6
Post Dosis 6		758143	102009	7	1270000	558533	6
Antes de la dosis 8		190529	240081	7	196021	199396	6
Post dosis 8		1003429	538271	7	989800	585072	5
Antes de la dosis 10		176297	272500	7	168864	191087	6
Post Dosis 10		1013000	390673	7	773400	103717	5
Antes de la dosis 12		142334	196793	5	430542	436534	6
Post dosis 12 (antes de la necropsia de 6 meses)		291525	350251	7	252142	381200	6
Recuperación media		0	0	3	0	0	2
Necropsia de recuperación		0	0	4	0	0	4

TABLA 35: Resumen de la concentración de anticuerpos anti-rhASA en suero

<b>Grupo 1: control del vehículo</b>		<b>Masculino</b>			<b>Femenino</b>		
		Media	DE	n	Media	DE	n
<b>Punto de tiempo</b>		ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Predosis 2		0	0	4	0	0	4
Predosis 4		0	0	4	0	0	4

(Continuación)

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

(Continuación)

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

TABLA 36: Resumen de la concentración de anticuerpos anti-rhASA en LCR

Grupo 1: control del vehículo		Masculino			Femenino		
Punto de tiempo	Media ng/ml	DE ng/ml	n	Media ng/ml	DE ng/ml	n	
Cirugía	0	0	4	0	0	4	
Predosis 2	0	0	4	0	0	4	
Predosis 4	0	0	4	0	0	4	
Predosis 6	0	0	4	0	0	4	
Predosis 8	0	0	4	0	0	4	
Predosis 10	0	0	4	0	0	4	
Predosis 12	0	0	3	0	0	4	
Recuperación media	0	0	3	0	0	4	
Necropsia de recuperación	0	0	4	0	0	4	

(Continuación)

Grupo 1: control del vehículo		Masculino			Femenino		
		Media	DE	n	Media	DE	n
Punto de tiempo		ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Grupo 2: 0 mg							
		Media	DE	n	Media	DE	n
Punto de tiempo		ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Cirugía		0	0	7	0	0	6
Predosis 2		0	0	6	0	0	7
Predosis 4		0	0	5	0	0	6
Predosis 6		0	0	5	0	0	5
Predosis 8		0	0	5	0	0	5
Predosis 10		0	0	4	0	0	5
Predosis 12		0	0	4	0	0	5
Necropsia (24 horas después de la última dosis)		0	0	3	0	0	2
Recuperación media		0	N/A	1	0	0	3
Necropsia de recuperación		0	0	4	0	0	4
Grupo 3: 1,8 mg							
		Media	DE	n	Media	DE	n
Punto de tiempo		ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Cirugía		0	0	7	0	0	8
Predosis 2		0	0	7	0	0	6
Predosis 4		0	0	6	41	101	6
Predosis 6		685	1317	4	632	1413	5
Predosis 8		2238	2596	4	2180	4875	5
Predosis 10		3393	5038	4	5560	12433	5
Predosis 12		6436	8266	4	12700	28398	5
Necropsia (24 horas después de la última dosis)		14848	12401	4	21442	32382	4
Recuperación media		29307	40617	3	18700	283	2
Necropsia de recuperación		21060	30010	3	13078	7181	4
Grupo 4: 6,0 mg							
		Media	DE	n	Media	DE	n
Punto de tiempo		ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Cirugía		0	0	7	0	0	8
Predosis 2		0	0	7	0	0	6
Predosis 4		99	172	7	84	187	5
Predosis 6		1117	1862	8	1473	2775	6
Predosis 8		3987	5580	5	20824	27320	4

(Continuación)

Grupo 4: 6,0 mg		Masculino			Femenino		
		Media	DE	n	Media	DE	n
Punto de tiempo		ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Predosis 10		6600	9679	5	2715	1237	2
Predosis 12		5285	7279	5	955	1237	2
Necropsia (24 horas después de la última dosis)		16870	16350	4	63000	63000	3
Recuperación media		66233	42238	3	16800	N/A	1
Necropsia de recuperación		53600	14388	3	28880	29890	4

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

TABLA 37: Concentraciones de suero y LCR de rhASA, masculino y femenino combinado (ng/mL)

Grupo 1: control del vehículo		Suero rhASA (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
		Grupo en total			Grupo en total		
Punto de tiempo		Media	DE	n	Media	DE	n
		ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Antes de la dosis 2		0	0	8	0	0	8
Post Dosis 2		0	0	8	0	0	8
Antes de la dosis 4		0	0	8	0	0	8
Post Dosis 4		0	0	8	0	0	8
Antes de la dosis 6		0	0	8	0	0	8
Post Dosis 6		0	0	8	0	0	8
Antes de la dosis 8		0	0	8	0	0	8
Post dosis 8		0	0	8	0	0	8
Antes de la dosis 10		0	0	8	0	0	8
Post Dosis 10		0	0	8	0	0	7

(Continuación)

Grupo 1: control del vehículo		Suero rhASA (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
		Grupo en total			Grupo en total		
Punto de tiempo	Media	DE	n	Media	DE	n	
	ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml		
Antes de la dosis 12	0	0	8	0	0	7	
Post Dosis 12	0	0	8	0	0	7	
Recuperación media	0	0	8	0	0	7	
Necropsia de recuperación	0	0	8	0	0	8	
Grupo 2: 0 mg		Suero rhASA (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
		Grupo en total			Grupo en total		
Punto de tiempo	Media	DE	n	Media	DE	n	
	ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml		
Antes de la dosis 2	0	0	16	0	0	13	
Post Dosis 2	0	0	16	0	0	12	
Antes de la dosis 4	0	0	16	0	0	11	
Post Dosis 4	0	0	16	0	0	10	
Antes de la dosis 6	0	0	15	0	0	10	
Post Dosis 6	0	0	15	0	0	10	
Antes de la dosis 8	0	0	15	0	0	10	
Post dosis 8	0	0	15	0	0	10	
Antes de la dosis 10	0	0	15	0	0	9	
Post Dosis 10	0	0	15	0	0	9	
Antes de la dosis 12	0	0	15	0	0	9	
Post dosis 12 (antes de la necropsia de 6 meses)	0	0	15	0	0	10	
Recuperación media	0	0	8	0	0	5	
Necropsia de recuperación	0	0	8	0	0	8	
Grupo 3:1,8 mg		Suero rhASA (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
		Grupo en total			Grupo en total		
Punto de tiempo	Media	DE	n	Media	DE	n	
	ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml		
Antes de la dosis 2	0	0	16	42365	51844	13	
Post Dosis 2	44,7	37,3	16	109654	45639	13	
Antes de la dosis 4	0	0	16	34247	36982	12	
Post Dosis 4	0	0	16	122592	47311	12	
Antes de la dosis 6	0	0	16	43250	40831	10	

(Continuación)

<b>Grupo 3:1,8 mg</b>	Suero rhASA (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
	Grupo en total			Grupo en total		
	Media	DE	n	Media	DE	n
	ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Post Dosis 6	0	0	16	100167	27992	9
Antes de la dosis 8	0	0	16	43736	40298	9
Post dosis 8	0	0	16	132333	53926	9
Antes de la dosis 10	0	0	16	28401	28890	9
Post Dosis 10	0	0	16	98433	37220	9
Antes de la dosis 12	0	0	16	59209	58253	9
Post dosis 12 (antes de la necropsia de 6 meses)	0	0	16	39092	42786	13
Recuperación media	0	0	8	0	0	5
Necropsia de recuperación	0	0	8	0	0	8
<b>Grupo 4: 6,0 mg</b>						
<b>Grupo 4: 6,0 mg</b>	Suero rhASA (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
	Grupo en total			Grupo en total		
	Media	DE	n	Media	DE	n
	ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Antes de la dosis 2	0	0	16	105964	157408	14
Post Dosis 2	158,4	78,7	16	320429	153832	14
Antes de la dosis 4	0	0	16	56226	72638	13
Post Dosis 4	40,6	91,7	16	341936	203284	14
Antes de la dosis 6	0	0	16	86139	113563	14
Post Dosis 6	0	0	16	393800	206033	10
Antes de la dosis 8	0	0	16	42009	65286	9
Post dosis 8	0	0	16	334333	169995	9
Antes de la dosis 10	0	0	16	106452	130375	7
Post Dosis 10	0	0	16	364429	160707	7
Antes de la dosis 12	0	0	16	70344	87227	7
Post dosis 12 (antes de la necropsia de 6 meses)	0	0	16	111707	151129	11
Recuperación media	0	0	8	0	0	4
Necropsia de recuperación	0	0	8	0	0	8

(Continuación)

<b>Grupo 5:18,6 mg</b>	Suero rhASA (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
	Grupo en total			Grupo en total		
	Media	DE	n	Media	DE	n
	ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Antes de la dosis 2	0	0	16	242676	264338	15
Post Dosis 2	455,1	257,8	16	827286	378379	14
Antes de la dosis 4	0	0	16	159311	191264	13
Post Dosis 4	138,8	213,7	16	975769	488021	13
Antes de la dosis 6	0	0	16	276279	231010	13
Post Dosis 6	54,5	93,8	16	994385	453568	13
Antes de la dosis 8	0	0	16	193064	213058	13
Post dosis 8	27,0	67,1	16	997750	531567	12
Antes de la dosis 10	0	0	16	172866	228817	13
Post Dosis 10	3,2	13	16	913167	319975	12
Antes de la dosis 12	0	0	16	299538	365275	11
Post dosis 12 (antes de la necropsia de 6 meses)	0	0	16	273348	349718	13
Recuperación media	0	0	8	0	0	5
Necropsia de recuperación	0	0	8	0	0	8

**TABLA 38: Suero y Anticuerpo anti-rhASA CSF, masculino y femenino combinados (ng/mL)**

<b>Grupo 1: control del vehículo</b>	Anticuerpo sérico anti-rhASA (ng/mL)			CSF Anti-rhASA Anticuerpo (ng/mL)		
	Grupo en total			Grupo en total		
	Media	DE	n	Media	DE	n
	ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Cirugía				0	0	8
Predosis 2	0	0	8	0	0	8
Predosis 4	0	0	8	0	0	8
Predosis 6	0	0	8	0	0	8
Predosis 8	0	0	8	0	0	8
Predosis 10	0	0	8	0	0	8
Predosis 12	0	0	8	0	0	7
Recuperación media	0	0	8	0	0	7
Necropsia de recuperación	0	0	8	0	0	8

(Continuación)

<b>Grupo 2: 0 mg</b>		Anticuerpo sérico anti-rhASA (ng/mL)			CSF Anti-rhASA Anticuerpo (ng/mL)		
		Grupo en total			Grupo en total		
		Media	DE	n	Media	DE	n
<b>Punto de tiempo</b>		ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Cirugía					0	0	13
Predosis 2	0	0	16	0	0	0	13
Predosis 4	0	0	16	0	0	0	11
Predosis 6	0	0	15	0	0	0	10
Predosis 8	0	0	15	0	0	0	10
Predosis 10	0	0	15	0	0	0	9
Predosis 12	0	0	15	0	0	0	9
Necropsia (24 horas después de la última dosis)	0	0	8	0	0	0	5
Recuperación media	0	0	8	0	0	0	4
Necropsia de recuperación	0	0	8	0	0	0	8
<b>Grupo 3: 1,8 mg</b>		Anticuerpo sérico anti-rhASA (ng/mL)			CSF Anti-rhASA Anticuerpo (ng/mL)		
		Grupo en total			Grupo en total		
		Media	DE	n	Media	DE	n
<b>Punto de tiempo</b>		ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Predosis 2	0	0	16	0	0	0	13
Predosis 4	23028	29871	16	21	72	12	
Predosis 6	80769	70467	16	656	1284	9	
Predosis 8	142031	93979	16	2206	3796	9	
Predosis 10	341506	436656	16	4597	9386	9	
Predosis 12	511938	635340	16	9916	20970	9	
Necropsia (24 horas después de la última dosis)	497588	666122	8	18145	22972	8	
Recuperación media	358213	226397	8	25064	29302	5	
Necropsia de recuperación	504013	766860	8	16499	18552	7	
<b>Grupo 4: 6,0 mg</b>		Anticuerpo sérico anti-rhASA (ng/mL)			CSF Anti-rhASA Anticuerpo (ng/mL)		
		Grupo en total			Grupo en total		
		Media	DE	n	Media	DE	n
<b>Punto de tiempo</b>		ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Cirugía	0	0	15				
Predosis 2	0	16	0	0	13		
Predosis 4	47209	66899	16	93	170	12	
Predosis 6	167721	137276	16	1269	2205	14	
Predosis 8	315800	201572	16	11470	19344	9	
Predosis 10	750656	682110	16	5490	8143	7	

(Continuación)

<b>Grupo 4: 6,0 mg</b>		Anticuerpo sérico anti-rhASA (ng/mL)			CSF Anti-rhASA Anticuerpo (ng/mL)		
		Grupo en total			Grupo en total		
		Media	DE	n	Media	DE	n
<b>Punto de tiempo</b>		ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Predosis 12		1003450	868860	16	4048	6328	7
Necropsia (24 horas después de la última dosis)		880534	857199	8	36640	45439	7
Recuperación media		1270750	938646	8	53875	42430	4
Necropsia de recuperación		953125	763122	8	39474	26274	7
<b>Grupo 5:18,6 mg</b>		Anticuerpo sérico anti-rhASA (ng/mL)			CSF Anti-rhASA Anticuerpo (ng/mL)		
		Grupo en total			Grupo en total		
		Media	DE	n	Media	DE	n
<b>Punto de tiempo</b>		ng/ml	ng/ml		ng/ml	ng/ml	
Cirugía		0	0	13			
Predosis 2		0	0	16	0	0	15
Predosis 4		48433	46054	16	55	146	13
Predosis 6		252450	224723	16	821	2204	13
Predosis 8		441119	310702	16	4757	7781	13
Predosis 10		936813	849893	16	17822	24652	13
Predosis 12		1380250	1331905	16	13531	20189	11
Necropsia (24 horas después de la última dosis)		286150	238760	8	8652	9129	8
Recuperación media		2492875	1686472	8	51346	36819	5
Necropsia de recuperación		2005125	1347857	8	44258	31114	8

TABLA 39: INCIDENCIA DE ANTICUERPOS ANTIRASA EN LA NECROPSIA

Grupo	Animales de anticuerpos positivos de suero (positivo/total probado)		Animales de anticuerpos positivos de CSF (positivo/total probado)	
	M	F	M	F
1 (DC)	N/A	0/4	Necropsia de recuperación 6 meses	Necropsia de recuperación 6 meses
2 (vehículo)	0/4	0/4	0/4	0/4
3 (1,8 mg de IT)	4/4	4/4	4/4	4/4
4 (6,0 mg IT)	4/4	4/4	4/4	4/4
5 (18,6 mg de IT)	4/4	4/4	4/4	4/4

5 [0235] El límite de cuantificación para rhASA en suero de mono cynomolgus es 39,1 ng/ml, y todas las muestras de suero de los Grupos 1 y 2 estaban por debajo del límite de cuantificación (BQL), consulte la Tabla 33. Los niveles séricos de rhASA se analizaron antes y a las 24 horas después de las dosis 2, 4, 6, 8, 10 y 12 (necropsia de 6 meses), a mitad del período de recuperación y antes de la recuperación necropsia. Los niveles de rhASA fueron indetectables en el Grupo 3 (1,8 mg/dosis), el Grupo 4 (6,0 mg/dosis) y el Grupo 5 (18,6 mg/dosis) antes de las dosis 2, 4, 6, 8, 10 y 12, después de la dosis 12, a mitad del período de recuperación, y antes de la necropsia de recuperación. Después de la dosis 2, los niveles de rhASA en suero estaban relacionados con la dosis. Después de la dosis 4 (grupo 3), la dosis 6(grupos 3 y 4) y las dosis 8 y 10 (grupos 3 y 4 y hombres del grupo 5), los niveles de rhASA fueron indetectables. Los niveles séricos de rhASA disminuyeron en el grupo 4 (6,0 mg/dosis) después de la dosis 4 y en el grupo 5 (18,6 mg/dosis) después de las dosis 4 y 6 para los hombres y las dosis 4, 6, 8 y 10 para las mujeres. Esta aparente disminución en los niveles séricos de rhASA puede estar relacionada con la creciente concentración de anticuerpos anti-rhASA. No hubo diferencias sexuales aparentes en los niveles séricos de rhASA, dada la variabilidad de la muestra y los números de grupos pequeños en este estudio.

10 15 [0236] El límite de cuantificación para rhASA en cynomolgus monkey CSF es 19,5 ng/mL, y todas las muestras de CSF de los Grupos 1 y 2 eran BQL, ver Tabla 34. rhASA era detectable en CSF antes y después de las dosis 2, 4, 6, 8, 10 y 12 (necropsia de 6 meses) en todos grupos dosificados. Los niveles fueron mayores después de la dosis (aproximadamente 24 horas después de la dosis) y estuvieron relacionados con la dosis. Los niveles en el LCR fueron mucho mayores que los del suero. No hubo diferencias sexuales aparentes en los niveles de CSF de rhASA, dada la variabilidad de la muestra y los números de grupos pequeños en este estudio. rhASA no fue detectable a mitad del período de recuperación y antes de la necropsia de recuperación en todos grupos dosificados. Los niveles de LCR en las colecciones de Dosis 12 (necropsia) para los grupos tratados con rhASA fueron más bajos que los niveles posteriores a la dosis 8 y 11. Las razones potenciales para niveles más bajos de rhASA en la necropsia incluyen el mayor volumen tomado (< 2,25 ml en total para recuentos celulares, química, rhASA y anti -rhASAanticuerpo) en la necropsia versus los que se toman en el intervalo de dosificación en vida (hasta 0,5 ml antes o después de la dosis para la concentración de rhASA). Además, algunos animales no tenían catéteres de patente en la necropsia, y las muestras se tomaron a través de un grifo CM en lugar de a través del catéter. Esta ruta arrojó consistentemente concentraciones más bajas de rhASA en comparación con el muestreo a través del catéter. Esto probablemente se deba a la limitada dirección rostrocaudal del flujo masivo de LCR que se reconoce que ocurre en animales orientados verticalmente como los monos y el hombre (por ejemplo, es bien sabido que los componentes del LCR exhiben marcados gradientes rostrocaudales a lo largo de la vida de un individuo).

20 25 30 [0237] Se detectaron anticuerpos anti-rhASA en suero en cada animal tratado con rhASA en algún momento, véase la Tabla 35. Los animales se definen como positivos para anticuerpos anti-rhASA si el nivel de anticuerpo anti-rhASA estaba por encima del límite de cuantificación (78,1 ng/ml). Los animales permanecieron positivos para anticuerpos anti-rhASA una vez que seroconvirtieron. Ningún animal fue positivo para anticuerpos anti-rhASA en el punto de tiempo de predosis 2. Todos los animales rhASA excepto el macho No. 026 (Grupo 4; 6,0 mg/dosis) fueron positivos para anticuerpos anti-rhASA en suero en el punto de tiempo de predosis 4. El hombre No. 026 fue positivo para el suero de antiboday en el punto de tiempo de predosis 6. En el Grupo 5 (18,6 mg/kg), las muestras de anticuerpos contra la necropsia tenían niveles de anticuerpos más bajos. Esta aparente disminución puede deberse a la presencia de rhASA que interfiere con el ensayo. El título fue generalmente mayor en los grupos de dosis media y alta (6,0 y 18,6 mg/dosis) que en los animales de dosis baja (1,8 mg/dosis). La presencia de anticuerpos anti-rhASA es un resultado esperado del tratamiento de monos cynomolgus con una proteína humana recombinante i. Dada la variabilidad en los resultados, no hubo diferencias aparentes de sexo.

40 45 50 [0238] Todos los animales con anticuerpos anti-rhASA detectables en LCR también tenían anticuerpos de rhASA detectables en suero, con la excepción de las Femininos N°s 049 (Grupo 3; 1,8 mg/dosis) y 057 (Grupo 4; 6,0 mg/dosis). La variabilidad en la concentración e incidencia de anticuerpos impide la determinación de una respuesta a la dosis. Los animales se definen como positivos para anticuerpos anti-rhASA si el nivel de anticuerpo anti-rhASA estaba por encima del límite de cuantificación (78,1 ng/ml).

55 [0239] Valores combinados para machos y Femininos para niveles de suero y CSF rhASA y para anticuerpos anti-rhASA se muestran en la Tabla 36 y en la Tabla 37. Los resultados combinados de hombres y mujeres son similares a los sexos individuales, discutidos anteriormente.

## EJEMPLO 6 – EFICACIA

60 65 [0240] En este ejemplo, 11 ratones de control de tipo salvaje (mASA +/- hASA -/-) fueron asignados al Grupo A y no recibieron tratamiento. se asignaron treinta y cuatro (34) ratones hASAC69S/ASA -/- a cada uno de los 5 grupos de dosis y recibieron vehículo (Grupo B) o rhASA (rhASA) a dosis de 20 mg/kg (intravenosa [IV]; Grupo C) o 0,04, 0,12 y 0,21 mg (Grupos D, E y F, respectivamente) en los días 1, 9, 15/16 y 22. Todas las dosis IV se administraron a través de una vena de la cola. Todas las dosis intratecales (IT) se administraron como una infusión en un volumen de 12  $\mu$ L en un rango aproximado de 2  $\mu$ L/20 segundos (Tabla 40).

TABLA 40: DISEÑO DEL ESTUDIO

	Grupo	Nº de animales	Tipo de animal	Tratamiento	Dosis	Ruta	Nº total de inyecciones	Sacrificio	Dosis en mg/kg de peso cerebral <sup>a</sup>		
5	A	11	Control de tipo salvaje (MASA ++ hASA -/-)	Ninguna	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		
10	B	9	hASAC69S /ASA -/-	Control de vehículos	Vehículo	IT lumbar	4 (Días 1, 9, 15/16 <sup>b</sup> , y 22)	24 horas después de la cuarta dosis	0		
15	C	5		rhASA	20 mg/kg	IV (vena de la cola)			N/A		
20	D	5		rhASA	0,04 mg	IT lumbar			100		
25	E	5		rhASA	0,12 mg	IT lumbar			300		
30	F	10		rhASA	0,21 mg	IT lumbar			520		
			NA = no aplicable; IT = intratecal; IV = intravenoso.								
			<sup>a</sup> Peso de cerebro para los ratones es de aproximadamente 0,0004 kg.								
			<sup>b</sup> Grupos C, D y E se dosificaron el día 15; Grupos B y E se dosificaron el día 16.								

**[0241]** El ratón knockout ASA hASAC69S/ASA (-/-) es un modelo aceptado de MLD, y se ha utilizado para probar tratamientos potenciales para esta enfermedad. La ruta intratecal es la ruta de administración prevista en humanos. La ruta de administración intravenosa se ha probado para este compuesto y un compuesto similar en ratones MLD. Se agregó un grupo de control intravenoso como control positivo para los cambios histológicos esperados en los órganos periféricos. Los animales recibieron 100, 300 o 520 mg/kg de peso cerebral (0,04, 0,12, 0,21 mg, respectivamente) de rhASA. Los niveles de dosis normalizados al peso cerebral seleccionados para este estudio corresponden a dosis que están planificadas para su uso en humanos o que se han utilizado en estudios de toxicología o en modelos de eficacia previos de enfermedades de almacenamiento lisosómico. No se esperaba que estas dosis tuvieran ninguna toxicidad.

#### Recepción

#### 45 [0242]

	50	Especies	Ratones ( <i>Mus musculus</i> )
		Presión	Ratones hASAC69S/ASA (-/-) y controles de tipo salvaje
		Edad	Aproximadamente 14-17 meses a la llegada
		Nº de grupos	6
		Nº de animales	34 ratones knockout ASA + 11 controles de tipo salvaje

55 **[0243]** Despues de la llegada, se examinó cada animal para evaluar el estado de salud.

#### Carcasa

60 **[0244]** Los animales se alojaron en grupos en jaulas con filtro de policarbonil de alta temperatura, con lecho de papel CareFresh y botellas de agua. Cada jaula estaba claramente etiquetada con una tarjeta de jaula que indicaba los números de proyecto, grupo y animal, y sexo. Cada animal se identificó de manera única utilizando un sistema de perforación de orejas. Los animales fueron tratados de conformidad con las pautas federales.

65 **[0245]** Las condiciones específicas para la temperatura ambiente de los animales y el fotoperíodo fueron las siguientes:

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

10 [0246] Durante y después de la administración de la dosis, el fotoperíodo puede haberse interrumpido temporalmente para actividades programadas. No se considera que tales interrupciones afecten el resultado o la calidad de esta investigación.

15 [0247] Todos los animales de tipo salvaje disponibles (11) se asignaron al Grupo A y se numeraron del 35 al 45. A los animales ASA (-/-) hASA (+/-) se les asignaron números consecutivos (1 al 34) a medida que se retiraban de sus jaulas, pesadas, y orejas perforadas durante la aclimatación. Los animales fueron asignados a los grupos de tratamiento utilizando Research Randomizer ([www.randomizer.org](http://www.randomizer.org)) el 3 de enero de 2011. Los primeros 9 números fueron asignados al Grupo B, los siguientes 5 al Grupo C, los siguientes 5 al Grupo D, los siguientes 5 al Grupo E, y los 10 finales al Grupo F. Los animales se asignaron de la siguiente manera en la Tabla 41:

20 **TABLA 41: ASIGNACIÓN DE ANIMALES**

Grupo	N	Números de animales
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 <sup>a</sup> , 21, 32
D	5	5, 9, 14, 18, 27
E	5	1, 2, 4, 8, 11
F	10	3 <sup>b</sup> , 10, 12, 15, 20, 25, 26, 31, 33, 34

25 <sup>a</sup> Animal Nº 19 no pudo ser localizado al momento de la dosificación.  
<sup>b</sup> Animal Nº 3 murió antes de comenzar la dosificación.

30 *Artículo de prueba y vehículo*

35 **Artículo de prueba**

40 [0248]

Identidad rhASA  
 45 Descripción arilsulfatasa A recombinante humana (rhASA)  
 Condiciones de Aproximadamente 4°C  
 almacenaje

50 **Vehículo**

55 [0249]

Identidad Vehículo rhASA (NaCl 154 mM, 0,005% de polisorbato 20, pH < 6,0)  
 Condición de Aproximadamente 4°C  
 almacenamiento

55 *Preparación del vehículo*

55 [0250] El vehículo se usó como se proporciona. El vehículo se calentó en el banco (ambiente). Una vez que el vehículo se calentó, el material se mezcló girando e invirtiendo suavemente. Las botellas no fueron agitadas. La botella se secó antes de acceder al material. Cualquier vehículo restante fue devuelto al refrigerador (1°C-8°C).

60 *Preparación de formulación de dosis*

60 [0251] Se diluyó rhASA con vehículo para alcanzar las concentraciones necesarias. El artículo de prueba se calentó en el banco (ambiente). Una vez que se calentó el artículo de prueba, el material se mezcló girando e invirtiendo suavemente. Las botellas no fueron agitadas.

65 *Colorantes para seguir las inyecciones:*

65 [0252] Se utilizó un colorante infrarrojo (tal como IRDye®, LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) para seguir las

5 inyecciones. Se han usado colorantes en inyecciones intratecales como un procedimiento de supervivencia después de la administración intratecal. El colorante se mezcló con el artículo de prueba antes de la administración; Se añadió 1 nmol de colorante en 1  $\mu$ l al artículo de prueba. Además del tinte infrarrojo, se usó 1  $\mu$ l de azul FD&C nº 1 (0,25%) para el seguimiento de las inyecciones. Este tinte azul es un aditivo alimentario común y generalmente se considera seguro y no tóxico.

#### **Inyección IT lumbosacral de rhASA o vehículo**

10 [0253] Los animales de los grupos B, D, E y F recibieron inyecciones intratecales los días 1, 9, 15 o 16 y 22.

15 [0254] Los ratones adultos se anestesiaron con 1,25% 2,2,2 tribromoetanol (Avertin) a 200-300  $\mu$ L/10 gramos de peso corporal (250-350 mg/kg) por inyección intraperitoneal. Se eliminó el vello dorsal entre la base de la cola y los omóplatos con un cortaúñas. El área afeitada se limpió con un exfoliante de povidina/betadina seguido de alcohol isopropílico. Se realizó una pequeña incisión en la línea media de la piel (1-2 cm) sobre la columna lumbosacra, y se identificó la intersección de la línea media dorsal y la cara craneal de las alas de la íleal (íleon singular). El músculo en la fosa ilíaca (glúteo medio) es un músculo en forma de corazón. Los dos lados de la parte superior del "corazón" se aproximan a la ubicación de las alas de la íleal. Se insertó una aguja de calibre 32 unida a una jeringa Hamilton de vidrio de 10-20  $\mu$ L hermética al gas hasta que se sintió resistencia del hueso subyacente. La inyección de 10  $\mu$ L de artículo de prueba, 1  $\mu$ L de tinte infrarrojo y 1  $\mu$ L de FD&C azul nº 1 (volumen total de inyección de 12  $\mu$ L) se realizó a una velocidad aproximada de 2  $\mu$ L/20 segundos (12  $\mu$ L/2 minutos). La incisión en la piel se cerró con clips para heridas. El éxito de la inyección se juzgó mediante imágenes para determinar si el tinte infrarrojo se había distribuido por todo el SNC, así como el tinte azul visible. Después de la obtención de imágenes, se permitió que el animal se recuperara en una cámara de recuperación.

#### **Inyección intravenosa de rhASA**

25 [0255] Los animales en el Grupo C recibieron inyecciones intravenosas los días 1, 9, 15 y 22.

30 [0256] Para las inyecciones IV, los animales fueron anestesiados con isoflurano, si fuera necesario, y se colocaron en un dispositivo de retención. La vena de la cola se dilató al calentarse golpeando suavemente la cola con el dedo. Luego se limpió el sitio de inyección con etanol al 70%. Alternativamente, el animal se colocó en una cámara caliente (40°C) durante 1-1,5 minutos. Se usó una aguja de calibre 28 a 30 para inyectar material de prueba. El volumen de inyección fue de 5-10 ml/kg.

35 [0257] Aproximadamente 24 horas después de la cuarta dosis, los animales en los grupos BF fueron sacrificados. Los animales fueron sometidos a diferentes procedimientos de recolección de tejidos, como se detalla a continuación. Los animales del grupo A no fueron tratados; sin embargo, fueron sacrificados el 27 o 28 de enero de 2011 y sometidos a procedimientos de recolección de tejidos, como se detalla a continuación.

#### **Suero (todos los animales)**

40 [0258] Se recogió una muestra de sangre terminal (aproximadamente 0,5 ml) de todos los animales (Grupos A-F) mediante punción retroorbital bajo anestesia con isoflurano. Se colocó un tubo de vidrio en la órbita, penetrando suavemente el área detrás del ojo e interrumpiendo así el drenaje venoso ubicado detrás del ojo. La sangre se recogió por acción capilar y/o flujo por gravedad. Después de la extracción de sangre, se aplicó presión a la órbita para detener el sangrado.

45 [0259] Las muestras de sangre completa se procesaron en suero y se congelaron a <-80°C. El suero se almacenó a -80°C y se analizó en busca de anticuerpos.

#### **Tejidos para investigaciones de microscopía de luz (Grupos A-F; 5 ratones por grupo)**

50 [0260] Después de la recogida de sangre, los animales se sometieron a eutanasia mediante CO<sub>2</sub> asfixia. Se recogió un corte de cola antes de la perfusión y se congeló para un posible genotipo. La cavidad pericárdica fue expuesta. Se perfundieron transcardialmente tres (3) ratones por grupo con solución salina heparinizada (1 U/ml de heparina sódica en NaCl al 0,9%, filtrado estéril) enfriado con hielo y luego con paraformaldehído al 4% a aproximadamente 4°C. Se extrajo el cerebro y se cortó el abdomen para exponer aún más los órganos internos. El cerebro y la carcasa se colocaron en paraformaldehído, a excepción del corte de la cola que estaba congelado.

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

55 [0261] Después de la recogida de sangre, los animales se sometieron a eutanasia mediante CO<sub>2</sub> asfixia. Se recogió un corte de cola antes de la perfusión y se congeló para un posible genotipo. La cavidad pericárdica fue expuesta. Para los análisis de lípidos, se perfundieron transcardialmente 4-6 ratones por grupo con solución salina heparinizada (1 U/ml de heparina de sodio en NaCl al 0,9%, filtrado estéril) enfriado con hielo. Ejemplos de tejidos recogidos para análisis de lípidos se presentan en la Tabla 42.

TABLA 42: TEJIDOS RECOGIDOS PARA EL ANÁLISIS DE LÍPIDOS

<b>Tejidos recogidos para el análisis de lípidos</b>	
Cerebro (separado en hemisferios izquierdo y derecho y pesado)	Riñón (2)
Médula espinal (eliminada de la columna vertebral)	
Nervio ciático (2) (disecado libre de músculo)	Recorte de la cola (antes de la perfusión)

[0262] Tras la recogida, los tejidos se pesaron y luego se congelaron, en hielo seco o colocándolos en un congelador a -80°C. El cerebro se separó en hemisferios izquierdo y derecho. El derecho se utiliza para el análisis de lípidos por MS. La izquierda se analizará para un posible análisis de N-acetil-1-aspartato (NAA). Los tejidos se almacenaron a -80°C hasta el análisis (ver Tabla 43).

TABLA 43: CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA

<b>Tipo de muestra</b>	<b>Temperatura de almacenamiento</b>
Suero	congelado a <i>alrededor de</i> -80°C
tejidos para análisis de lípidos	congelado a <i>alrededor de</i> -80°C
Recortes de cola	congelado a <i>alrededor de</i> -80°C
Tejidos para microscopía óptica.	Aproximadamente 4°C

[0263] rhASA reduce almacenamiento sulfatida en la médula espinal de ratones MLD, particularmente en la sustancia blanca, Figura 19. Análisis de morfometría de la médula espinal demostró que la densidad óptica de la tinción con azul alcíán fue estadísticamente redujo significativamente después de rhASA dosificación, **Figura 20**. Los ratones MLD tratados con rhASA también mostraron una actividad lisosómica reducida en el cerebro, **Figura 21**. Esta reducción fue estadísticamente significativa en el grupo de dosis alta (0,21 mg-520 mg/kg de peso cerebral) en comparación con los animales tratados con vehículo, Figura 22.

[0264] Los ratones MLD inmunotolerantes (hASAC69S/ASA(-/-)) mayores de 1 año de edad recibieron la administración intratecal-lumbar de rhASA una vez por semana durante 4 semanas (un total de 4 dosis). Las dosis fueron vehículo (NaCl 154 mM, polisorbato 20 al 0,005%, pH < 6,0), 0,04, 0,12, 0,21 mg/dosis (las dosis normalizadas fueron 100, 300 y 520 mg/kg de peso cerebral, respectivamente). En los puntos de tiempo terminales, la eficacia se evaluó mediante la evaluación inmunohistoquímica del aclaramiento de sulfatida y la actividad de los lisosomas en el cerebro y la médula espinal. Las secciones de la médula espinal y el cerebro se tiñeron usando tinción con azul alciano dirigido a sulfatidos en tejidos. Las secciones del cerebro también se tiñeron por la presencia de proteína de membrana asociada a lisosomas (LAMP), un indicador de procesos lisosómicos. Además, se realizó un análisis de morfometría en secciones teñidas con azul alciano y LAMP de la médula espinal (cervical, torácica y lumbar) y cerebro.

[0265] Estos resultados preliminares demuestran la eficacia de la administración intratecal lumbar de rhASA. En comparación con los ratones de control de vehículos, los ratones MLD tratados con rhASA muestran evidencia de mejoría dentro de los marcadores histológicos de la enfermedad, como el almacenamiento reducido de sulfatida (notado por la tinción de azul alciano) y la actividad lisosómica en el cerebro. Estos cambios histopatológicos se observaron cerca del sitio de administración (médula espinal), así como en las porciones distales del cerebro.

## EJEMPLO 7 – BIODISTRIBUCIÓN 2

### *Descripción general*

[0266] En este estudio, se asignaron 36 monos cynomolgus juveniles machos y 36 Fémininas (<12 meses al inicio) a cada uno de los 5 grupos de dosis y recibieron rhASA (rhASA) a dosis de 0 (control del dispositivo; los animales recibieron dosis de 0,6 ml de PBS), 0 (control del vehículo), 1,8, 6,0 o 18,6 mg (Grupos 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente) cada dos semanas durante 6 meses para un total de 12 dosis. Todas las dosis se administraron como una infusión en un volumen de 0,6 ml, seguido de un lavado de 0,5 ml de PBS administrado durante aproximadamente 10 minutos (Tabla 44).

TABLA 44: DISEÑO DEL ESTUDIO

5	Diseño del estudio					
	Grupo	Nº de animales	Concentración de dosis nominal (mg/mL)	Dosis administrada (mg)	Nº de animales, sacrificio de 6 meses	Nº de animales, 1 Mes Sacrificio de recuperación
10	1	4M, 4F	DC	0	-	4M, 4F
	2	8M, 8F	0	0	4 M, 3 F <sup>a</sup>	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

15 DC = Control del dispositivo; animales en el Grupo 1 no recibieron dosis de vehículo o artículo de prueba.  
<sup>a</sup> Animal de control del vehículo n° 044 se sacrificó temprano el día 50 debido a una fuga del catéter

20 **Materiales y métodos***Recogida de tejidos*

25 [0267] Los cerebros se cortaron en una matriz cerebral con un grosor de corte coronal de 3 mm de espesor. Cada cerebro se seccionó en cortes coronales completos que incluyen: neocorteza (incluida la corteza frontal, parietal, temporal y occipital), paleocorteza (bulbos olfatorios y/o lóbulo piriforme), ganglios basales (que incluyen caudado y putamen), sistema límbico (que incluye hipocampo y circunvolución cingulada), tálamo/hipotálamo, regiones del mesencéfalo (incluida la sustancia negra), cerebelo, protuberancia y bulbo raquídeo. Las ubicaciones de las que se obtuvieron muestras de tejido individuales (a través de un punzón de biopsia de 4 mm) se muestran en las Figuras 32 a 37. Las imágenes en las Figuras 32 a 37 son de las Colecciones de Cerebro de Mamíferos Comparativos de la Universidad de Wisconsin y Michigan, (también el Museo de Salud y Medicina). El punzón número 22 no se recolectó, ya que esta estructura no estaba presente durante la necropsia. Todas las muestras de cerebro se congelaron y se almacenaron a -60°C o menos antes del análisis de rhASA usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

30 [0268] El primer corte de cerebro y cada segundo corte después se fijaron en formalina para evaluación histopatológica e inmunohistoquímica. La segunda porción del cerebro y cada segunda porción después se congelaron para el análisis de concentración del artículo de prueba. Antes de la congelación, se tomaron muestras de cerebro de la porción derecha de las rebanadas cerebrales de análisis de artículos de prueba de número par para el análisis de biodistribución. La ubicación de las muestras de cerebro se fotografió en la necropsia y se registró el número de corte de cerebro. Las muestras se obtuvieron usando un punzón circular de 4 mm o cortado con un bisturí para optimizar la cantidad de materia blanca recolectada. Todos los punzones fueron congelados y almacenados a -60°C o menos para el análisis del artículo de prueba. El resto del corte cerebral se congeló y se almacenó a -60°C o menos para un posible análisis del artículo de prueba. Las ubicaciones de los golpes se muestran en el Apéndice B.

35 [0269] La médula espinal (cervical, torácica y lumbar) se cortó en secciones de un centímetro. La primera rebanada y cada segunda rebanada después se fijaron en formalina para análisis histopatológico e inmunohistoquímico. La segunda rebanada de médula espinal y cada segunda rebanada se congelaron y almacenaron a -60°C o menos para el análisis del artículo de prueba. La distribución de los cortes se ajustó para que el corte con la punta del catéter intratecal (Slice 0) se fijara en formalina y se analizara por histopatología.

50 *Preparación de extractos de cerebro, hígado y columna vertebral y determinación de la concentración de rhASA*

55 [0270] Las punciones de cerebro, la médula espinal y las muestras de hígado se analizaron utilizando un método validado de conformidad con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) regulaciones 21 CFR, Parte 58 y con los procedimientos operativos estándar aplicables de Midwest Bioresearch. Las muestras de tejido se homogeneizaron en tampón de lisis, se centrifugaron para eliminar cualquier residuo de tejido y se almacenaron a -80°C hasta su análisis. La concentración de rhASA en las fracciones solubles de los homogenados se determinó mediante un ELISA utilizando el anticuerpo polyclonal de conejo SH040 como anticuerpo de captura y el anticuerpo monoclonal anti-ASA conjugado con HRP (peroxidasa de rábano picante) 19-16-3 como anticuerpo de detección. Después de un paso de lavado para eliminar los materiales no unidos, la solución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB) reaccionó con el peróxido en presencia de anticuerpo conjugado con HRP para producir una señal colorimétrica que era proporcional a la cantidad de ASA unida por el anticuerpo anti ASA en el paso inicial. La cantidad resultante de rhASA en cada homogeneizado de tejido se interpoló a partir de una curva estándar.

60 [0271] Las muestras también se analizaron mediante un ensayo de determinación de proteína de ácido bicinconínico

(BCA) para obtener la concentración de proteína en una muestra desconocida. La concentración de proteína para cada muestra se determinó mediante la interpolación de la curva estándar de albúmina. Los resultados de la concentración de rhASA se normalizaron a la proteína total en extractos de tejido, según lo determinado por el ensayo de ácido bicinchoníco.

5 [0272] Los niveles de ASA de todos los punzones para el vehículo, 1,8 mg/dosis, 6,0 mg/dosis y 18,6 mg/dosis se muestran en la Figura 23, Figura 24, Figura 25 y Figura 26, respectivamente. Los niveles de ASA de todos los punzones para los animales de recuperación para el control del dispositivo, el vehículo, 1,8 mg/dosis, 6,0 mg/dosis y 18,6 mg/dosis se muestran en la Figura 27, Figura 28, Figura 29, Figura 30 y Figura 31, respectivamente.

10 [0273] Los niveles de ASA para punzones seleccionados que se tomaron cerca de la superficie (meninges) del cerebro se muestran en la Figura 32. Los niveles de ASA para punzones seleccionados que se consideran que contienen principalmente materia cerebral blanca profunda se muestran en la Figura 33. La materia blanca está compuesta de haces de procesos de células nerviosas mielinizadas (o axones). Los punzones seleccionados que contienen principalmente material de la materia cerebral gris profunda se muestran en la Figura 34. La materia gris contiene cuerpos de células neurales, en contraste con la materia blanca. Los valores de ASA en punzones seleccionados de la superficie, blanco profundo y gris profundo se muestran para cada grupo de dosis en la Figura 35.

15 [0274] Los datos de concentración de la médula espinal se muestran en la Figura 36.

20 [0275] Los datos de concentración hepática se muestran en la Figura 37.

25 [0276] Niveles de concentración ASA en el hígado, la médula espinal, y el cerebro del dispositivo y los grupos de control con vehículo dosificado fueron en algunos casos medibles. Los niveles en el hígado y la médula espinal fueron más bajos que cualquiera de los grupos tratados con rhASA (Figura 23, Figura 32 y Figura 33). El nivel de rhASA medido en el control del dispositivo y los animales dosificados con vehículo representa una reactividad cruzada entre el anticuerpo anti-rhASA utilizado en el ELISA con la proteína de mono cynomolgus nativa. Los valores reportados en los tejidos de control de dispositivos y vehículos no representan valores cuantitativos para cynomolgus monkey rhASA en los tejidos, debido a que el grado de reactividad cruzada entre el anticuerpo y ASA cynomolgus no se conoce, y el hecho de que los patrones de ensayo utilizan ASA humana. Sin embargo, sin querer limitarse a ninguna teoría, la variación en los niveles de ASA detectados entre el control del dispositivo y los tejidos dosificados con vehículo puede interpretarse como una variabilidad demostrada en las cantidades relativas de ASA de cinomolgo en diferentes tejidos y regiones anatómicas.

30 [0277] Los niveles de ASA en láminas de médula espinal variaron de 160-2352, 1081-6607, y 1893-9252 ng/mg de proteína en los hombres y 0-3151, 669-6637, y 1404-16424 ng/mg de proteína en las mujeres para los grupos de 1,8, 6,0 y 18,6 mg/dosis, respectivamente (Figura 32). Los niveles de AAS fueron más altos en la región lumbar de la columna vertebral que en la región cervical. Los niveles de proteína ASA detectados en el hígado respondieron a la dosis en los grupos tratados con rhASA y fueron muy bajos en el grupo de vehículos. Los niveles medios de ASA fueron 88, 674 y 2424 en hombres y 140, 462 y 1996 ng/mg de proteína en mujeres para los grupos de 1,8, 6,0 y 18,6 mg/dosis, respectivamente (Figura 33).

35 [0278] En general, el nivel de ASA parecía estar en muestras preparadas a partir de las rodajas de la médula espinal y el hígado relacionada con la dosis de los grupos dosificados-Rhasa. Muchas de las regiones cerebrales evaluadas demostraron una clara relación de dosis entre los niveles de ASA y la administración de rhASA, mientras que otras fueron más equívocas. En general, los niveles de ASA en el cerebro aumentaron con la dosis de rhASA.

#### Ejemplo 8: ESTUDIO FARMACOCINÉTICO Y DE BIODISTRIBUCIÓN

40 [0279] El objetivo de este estudio es evaluar la farmacocinética (PK) y la biodistribución de varias enzimas terapéuticas de reemplazo después de la administración intratecal (IT) e intravenosa (IV) a monos cynomolgus.

45 [0280] En este estudio, un total de doce monos cynomolgus masculinos y doce femeninos con patente intratecal-lumbar (IT-L) y los catéteres intratecal-cisterna magna (IT-M) se asignaron aleatoriamente por peso corporal en cuatro grupos de tratamiento para la Fase 1a (administración de IS2) y la Fase 1b (administración de ASA).

50 [0281] Se recogieron sangre y CSF (del catéter IT-M) a intervalos específicos después de la dosificación para ambas fases. Después, las últimas muestras fueron recolectadas de la Fase 1a, a los animales se les permitió un período de lavado de 7 días antes del inicio de la Fase 1b.

55 [0282] Despues de que se recogieron las últimas muestras de la Fase 1b, se permitirá a los animales un período de lavado de 7 días entre el inicio de la Fase 2. Un total de 12 monos cynomolgus machos y femeninos de la Fase 1b se asignaron aleatoriamente por peso corporal a 12 grupos de tratamiento de IS2 (Grupos 1a-6a) y ASA (Grupos 1b-6b).

60 [0283] La biodisponibilidad absoluta de ASA en suero después de la administración de IT-L es de < 30 a 40%. En contraste, solo el 0,5% de la dosis IV está biodisponible en LCR.

[0284] La exposición a ASA en suero aumenta de manera más que proporcional después de la administración de IT-L.

5 [0285] Despues de la administración de IT-L, la exposición a ASA en LCR aumenta de una manera menos que proporcional a medida que aumenta la dosis. Los resúmenes de los parámetros PK de rhASA en suero, los parámetros PK de rhASA en suero en LCR y la biodisponibilidad se muestran en las Tablas 45-47.

TABLA 45 - RESUMEN PK parámetros DE ASA EN EL SUERO DE MONOS CYNOMOLGUS

MEDIA (CV%)		SUERO ARILSULFATASA A			
		ARILSULFATASA A (FASE 1B: IV 1 MG/KG)	ARILSULFATASA A (FASE 1B: IT-L1,8 MG)	ARILSULFATASA A (FASE 1B: IT-L6 MG)	ARILSULFATASA A (FASE 1B: IT-L18,6 MG)
N	8	6	8	8	8
AUC <sub>0-T</sub> (NG H/ML)	10505 (16,9)	2219 (41,9)	10352 (31,9)	17583 (28,2)	
AUC <sub>0-∞</sub> (NG H/ML)	11069 (17,2)	NC (NC) B	9634 (28,9) C	20789 (27,8) D	
C <sub>MAX</sub> (NG/ML)	11911 (20,0)	363 (40,4)	1160 (29,9)	1621 (25,1)	
T <sub>MAXA</sub> (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 <sub>1/2</sub> (H)	6,55 (31,8)	NC (NC) B	6,77 (21,4) C	7,40 (32,8) D	
CL o CL/F (ML/H)	261 (17,0)	NC (NC) B	654 (25,0) C	944 (25,4) D	
V <sub>Z</sub> o V <sub>Z/F</sub> (ML)	2418 (32,4)	NC (NC) B	6523 (41,3) C	9686 (25,8) D	

TABLA 46 - RESUMEN PARÁMETROS DE PK DE ASA EN LCR DE MONOS DE CINÓMOLO

Media (CV%)		CSF Arilsulfatasa A			
		Arilsulfatasa A (Fase 1b: IV 1 mg/kg)	Arilsulfatasa A (Fase 1b: IT-L1,8 mg)	Arilsulfatasa A (Fase 1b: IT-L6 mg)	Arilsulfatasa A (Fase 1b: IT-L18,6 mg)
N	4	6	8	8	8
AUC <sub>0-t</sub> (ng h/ml)	1629 (179,8)	1267266 (86,6)	5334329 (68,8)	8028775 (71,2)	
AUC <sub>0-∞</sub> (ng h/mL)	8221 (NC) b	1595942 (79,1)c	4291829 (84,2) d	9406664 (64,5) e	
C <sub>MAX</sub> (ng/mL)	69,3 (94,2)	345167 (48,7)	1039079 (73,6)	1841125 (62,8)	
T <sub>MAXA</sub> (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 <sub>1/2</sub> (h)	37,6 (NC) b	23,6 (68,3)c	17,1 (31,3) d	13,4 (29,3) e	
CL o CL/F (ml/h)	392 (NC) b	1,95 (74,1)c	38,1 (214,8) d *	3,04 (66,1) e	
V <sub>Z</sub> o V <sub>Z/F</sub> (ml)	21237 (NC) b	80,6 (110,4)c	1090 (215,1) d	67,6 (81,2) e	

TABLA 47 - BIODISPONIBILIDAD DE ASA EN SUERO Y CSF

Comparación de biodisponibilidad absoluta			
	Arilsulfatasa A (Fase 1b: IT-L1,8 mg)	Arilsulfatasa A (Fase 1b: IT-L6 mg)	Arilsulfatasa A (Fase 1b: IT-L18,6 mg)
Fabs (%)	NC	39,9	27,3

60 [0286] La biodisponibilidad de ASA en suero después de la administración de IT-L es < 30-40%. En contraste, solo el 0,5% de la dosis administrada por vía IV está biodisponible en LCR. La partición sérica del LCR se muestra en la Tabla 48.

TABLA 48 - CSF: PARTICIÓN DE SUERO

CSF: PARTICIÓN DE PLASMA			
5	ARILSULFATASA A (FASE 1B: IV 1 MG/KG)	ARILSULFATASA A (FASE 1B: IT-L1,8 MG)	ARILSULFATASA A (FASE 1B: IT-L6 MG)
	0,74	NC	445
			452

10

**EJEMPLO 9 - TRATAMIENTO DE PACIENTES MLD**

15

**[0287]** La administración directa del SNC a través de, por ejemplo, la administración de IT puede usarse para tratar eficazmente a pacientes MLD. Este ejemplo ilustra un estudio de aumento de dosis multicéntrico diseñado para evaluar la seguridad de hasta 3 niveles de dosis cada dos semanas (EOW) durante un total de 40 semanas de rhASA administrado a través de un dispositivo de administración de fármacos intratecal (IDDD) a pacientes con MLD infantil tardía. En las Figuras 45-48 se representan varios dispositivos ejemplares de administración de fármacos intratecal adecuados para el tratamiento humano.

20

**[0288]** Serán inscritos hasta 20 pacientes:

- Cohorte 1: 5 pacientes (dosis más baja)
- Cohorte 2: 5 pacientes (Intermedio dosis)
- Cohorte 3: 5 pacientes (dosis más alta)
- 25 5 pacientes serán aleatorizados con ningún tratamiento.

30

**[0289]** Los pacientes se seleccionan para el estudio basándose en la inclusión de los siguientes criterios: (1) aparición de los primeros síntomas antes de los 30 meses de edad; (2) ambulatorio en el momento del examen (definido como la capacidad de pararse solo y caminar 10 pasos hacia adelante con una mano); (3) presencia de signos neurológicos al momento del examen. Por lo general, se excluyen los antecedentes de pacientes con trasplante de células madre hematopoyéticas.

35

**[0290]** Se determina la seguridad de las dosis ascendentes de rhASA administradas por inyección IT durante 40 semanas en niños con MLD infantil tardía. Además, se evalúa la actividad clínica de rhASA sobre la función motora macroscópica y la farmacocinética de dosis únicas y repetidas en suero y las concentraciones en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

40

**[0291]** Si bien ciertos compuestos, composiciones y métodos descritos en este documento se han descrito con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los ejemplos sirven solo para ilustrar los compuestos de la invención y no pretenden limitarlos.

45

**[0292]** Los artículos "un" y "una" tal como se usan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, deben entenderse que incluyen los referentes plurales. Cuando los elementos se presentan en esta descripción como listas (por ejemplo, en el grupo Markush o en un formato similar), debe entenderse que cada subgrupo de los elementos también se divulga, y cualquier elemento(s) puede eliminarse del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando la invención, o los aspectos de la invención, se denominan/comprenden elementos, características, etc. particulares, ciertas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente en, tales elementos, características, etc. Por razones de simplicidad, esas realizaciones no se han establecido en todos los casos específicamente en tantas palabras en este documento.

55

60

65

## REIVINDICACIONES

5        1. Una formulación acuosa estable para administración intratecal que comprende una proteína arilsulfatasa A (ASA) a una concentración de más de 10 mg/ml, sal, un tensioactivo polisorbato y un agente tamponador, en donde la sal es NaCl.

10      2. La formulación acuosa estable de la reivindicación 1, en donde la proteína ASA está presente en una concentración que varía de 15-100 mg/ml, opcionalmente en donde la proteína ASA está presente en una concentración seleccionada de 30 mg/ml, 50 mg/ml, o 100 mg/ml.

15      3. La formulación acuosa estable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína ASA comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

15      4. La formulación acuosa estable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:

15        (i) la proteína ASA se produce a partir de una línea celular humana, o

15        (ii) la proteína ASA se produce a partir de células CHO.

20      5. La formulación acuosa estable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el NaCl está presente en una concentración que varía de 30-300 mM, opcionalmente en una concentración que varía de 137-154 mM, opcionalmente en una concentración de aproximadamente 154 mM.

25      6. La formulación acuosa estable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tensioactivo polisorbato se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80 y combinación de los mismos, opcionalmente en donde el tensioactivo polisorbato es polisorbato 20, opcionalmente en donde el tensioactivo de polisorbato está presente en una concentración que varía de 0,001 a 0,5%, y opcionalmente en donde el polisorbato 20 está presente en una concentración de aproximadamente 0,005%.

30      7. La formulación acuosa estable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el agente tamponador se selecciona del grupo que consiste en fosfato, acetato, histidina, succinato, citrato, Tris y combinaciones de los mismos, y opcionalmente en donde el agente tamponador es fosfato y está presente a una concentración no mayor de 50 mM, y opcionalmente a una concentración no mayor de 20 mM.

35      8. La formulación acuosa estable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 3-8,0, aproximadamente 6,0-6,5, o aproximadamente 6,0.

35      9. La formulación acuosa estable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la formulación se reconstituye a partir de una formulación liofilizada con un diluyente.

40      10. La formulación acuosa estable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la formulación comprende además un agente estabilizante.

45      11. La formulación acuosa estable de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el agente estabilizante se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, glucosa, manitol, sorbitol, PEG4000, histidina, arginina, lisina, fosfolípidos y combinación de los mismos.

50      12. Un recipiente que comprende una única forma de dosificación de una formulación acuosa estable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

50      13. El recipiente de la reivindicación 12, en donde el recipiente se selecciona de una ampolla, un vial, un cartucho, un depósito, un objeto o una jeringa precargada, opcionalmente en donde el recipiente es una jeringa precargada y se selecciona opcionalmente de jeringas de vidrio de borosilicato con revestimiento de silicona al horno, jeringas de vidrio de borosilicato con silicona pulverizada o jeringas de resina plástica sin silicona.

55      14. El recipiente de la reivindicación 12, en donde la formulación acuosa estable está presente en un volumen de menos de aproximadamente 50,0 ml, opcionalmente en donde la formulación acuosa estable está presente en un volumen de menos de aproximadamente 5,0 ml.

60      15. La formulación acuosa estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para usar en un método de tratamiento de la enfermedad de leucodistrofia metacromática (MLD) que comprende una etapa de administrar la formulación por vía intratecal a un sujeto.

65      16. La formulación acuosa estable para uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde:

65        (i) la administración intratecal se usa junto con la administración intravenosa, opcionalmente en donde la administración intravenosa no es más frecuente que una vez al mes, o no es más frecuente que una vez cada dos

meses, o

- (ii) la administración intratecal se usa en ausencia de administración intravenosa, y/o
- (iii) la administración intratecal se realiza una vez cada dos semanas, una vez al mes, o una vez cada dos meses, y/o
- (iv) la administración intratecal se usa en ausencia de terapia inmunosupresora concurrente directamente al SNC y/o CSF.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

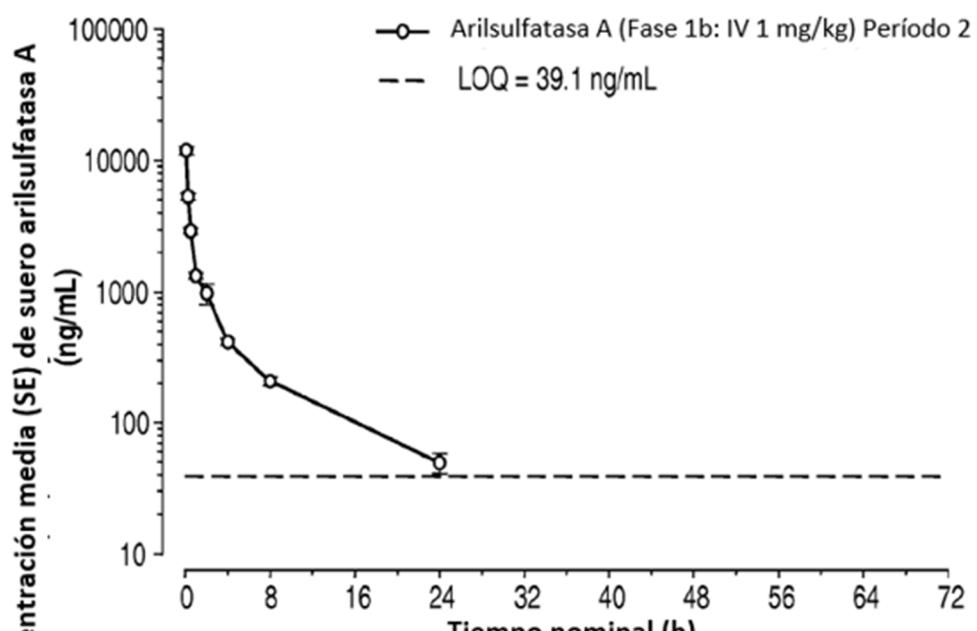


Fig. 1

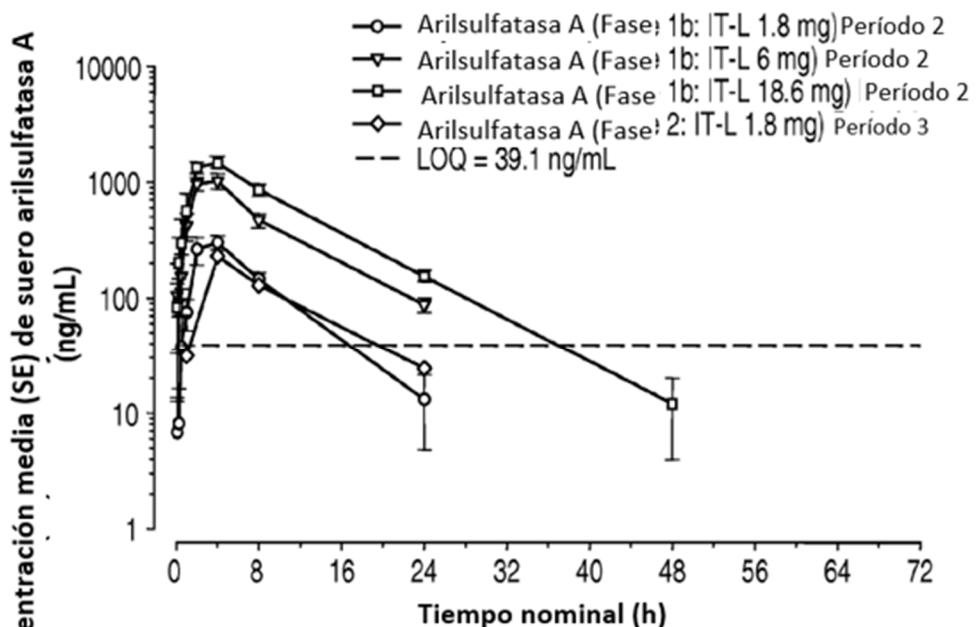
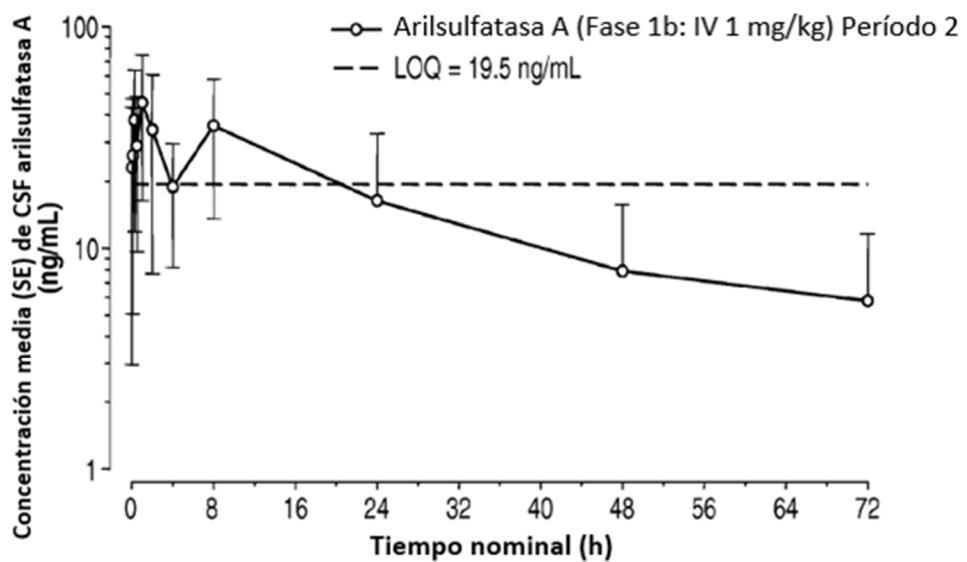
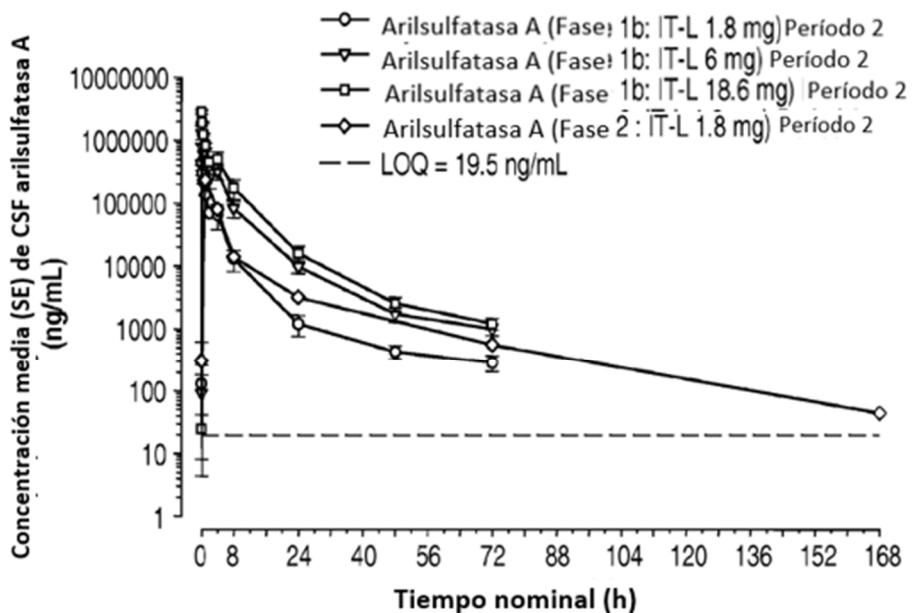
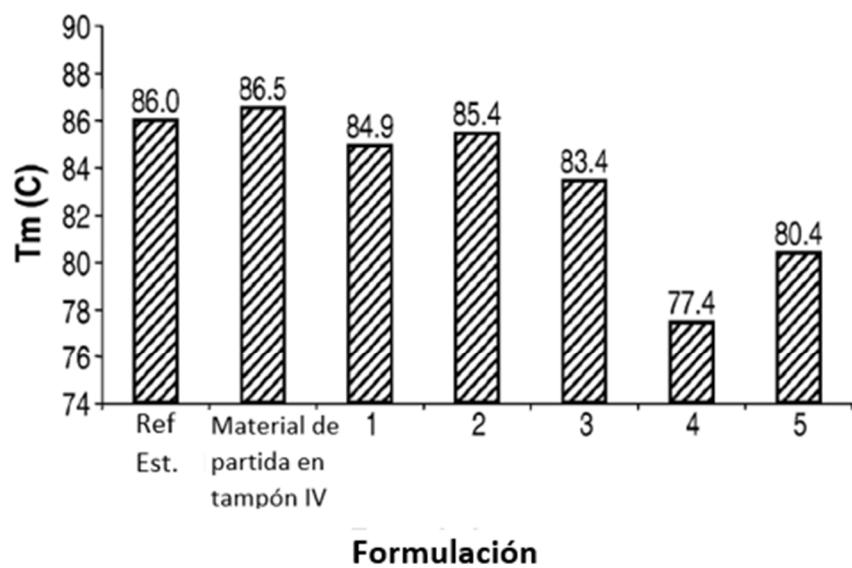
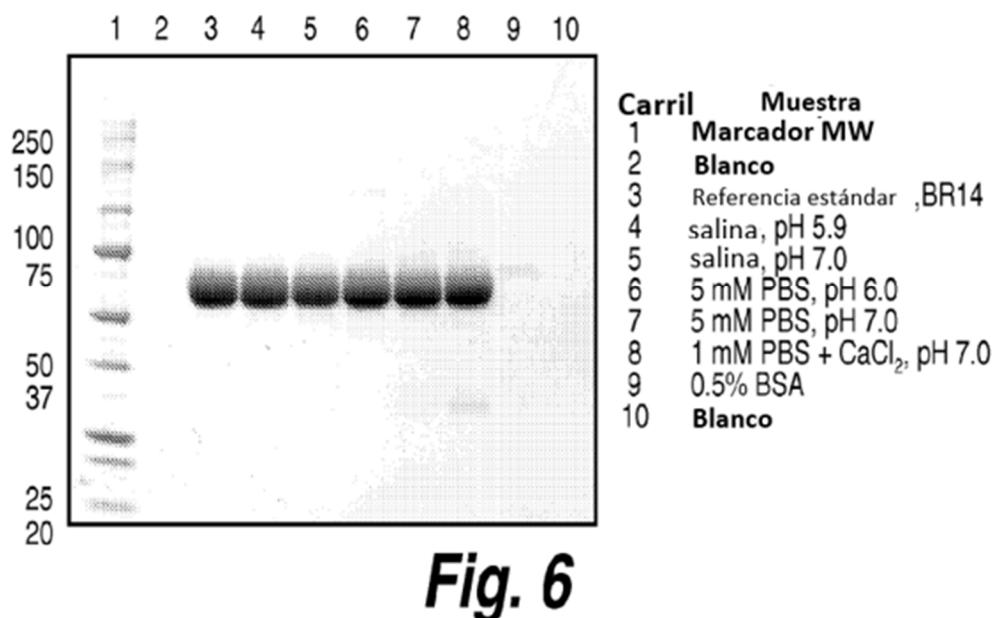


Fig. 2

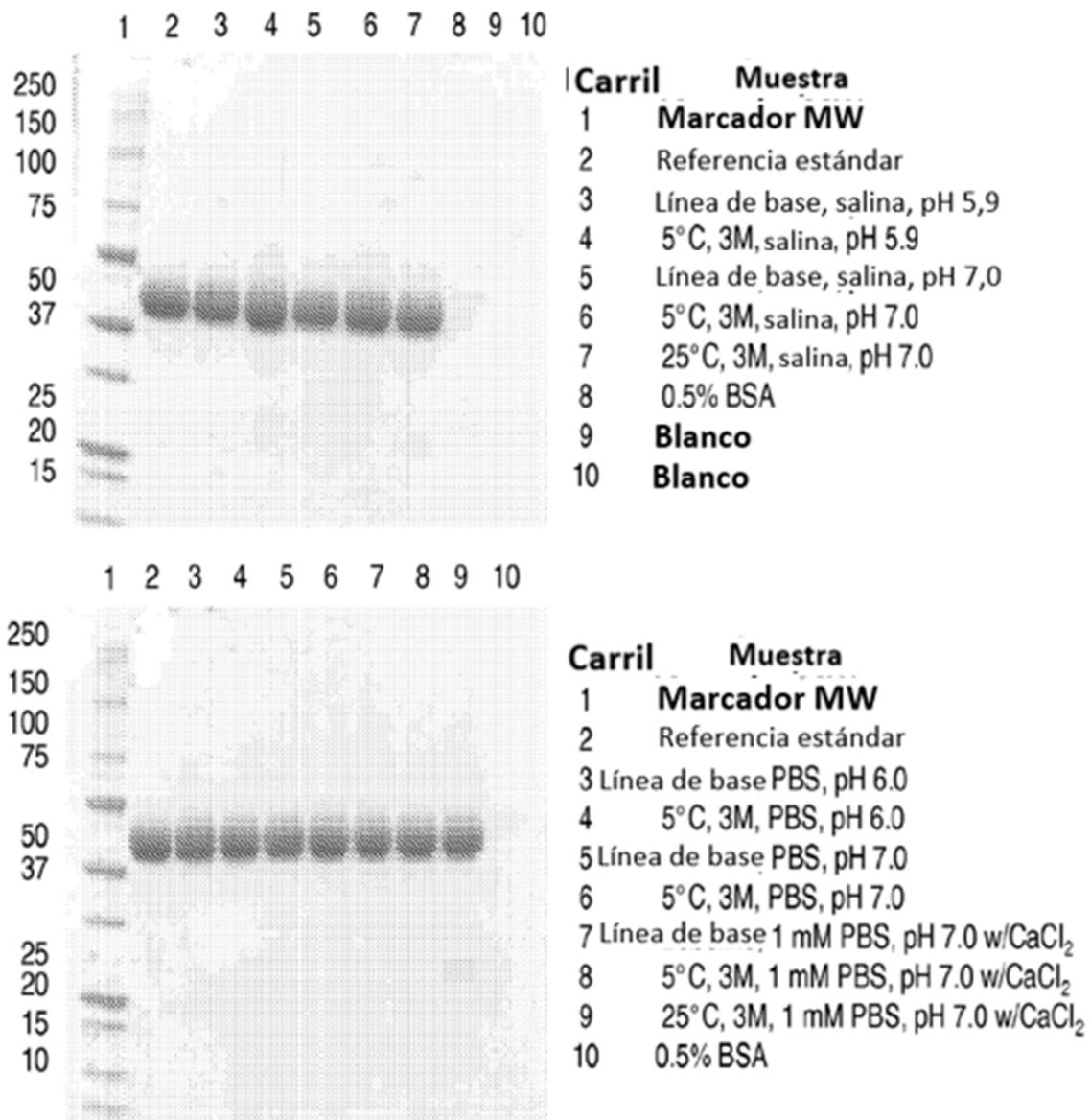
**Fig. 3****Fig. 4**



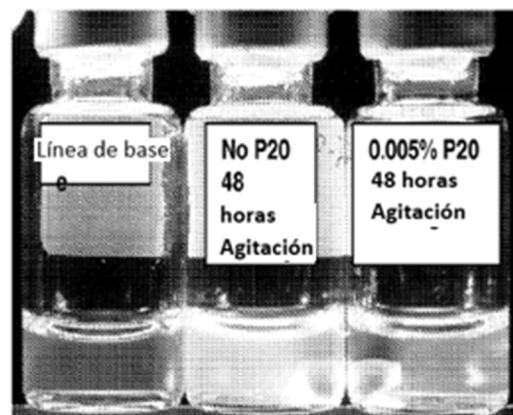
**Fig. 5**



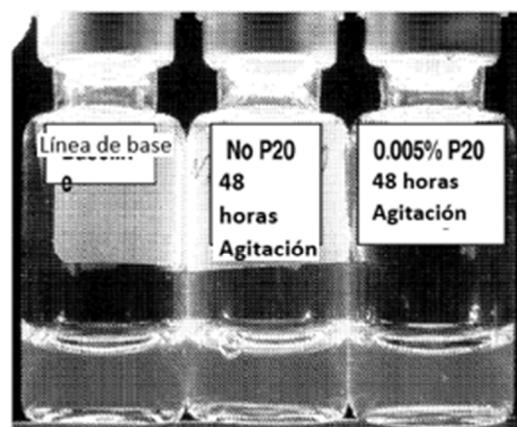
**Fig. 6**



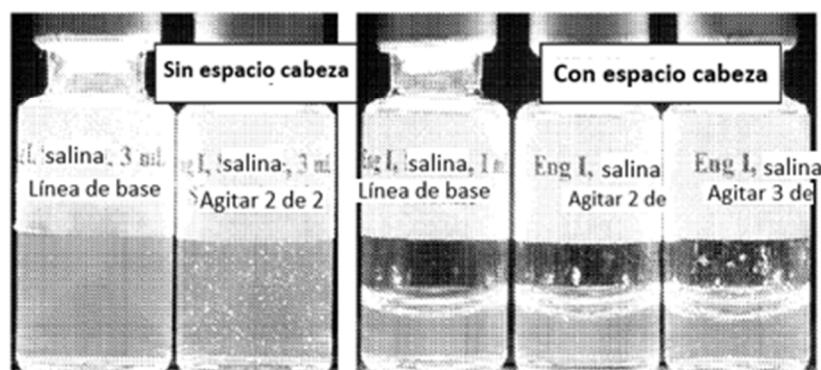
**Fig. 7**



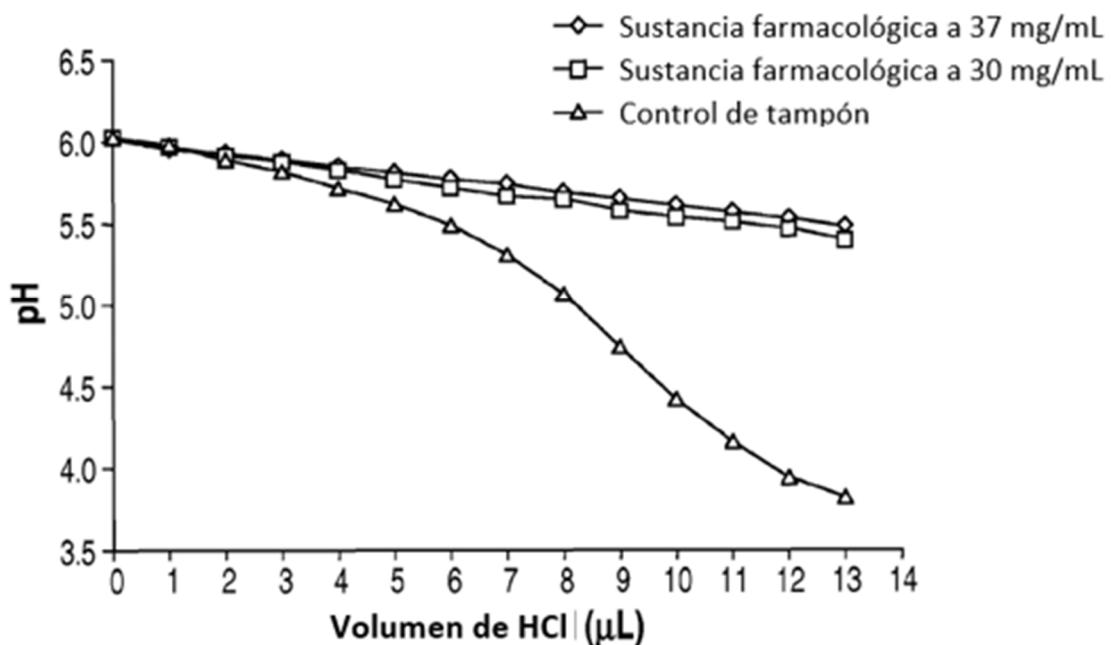
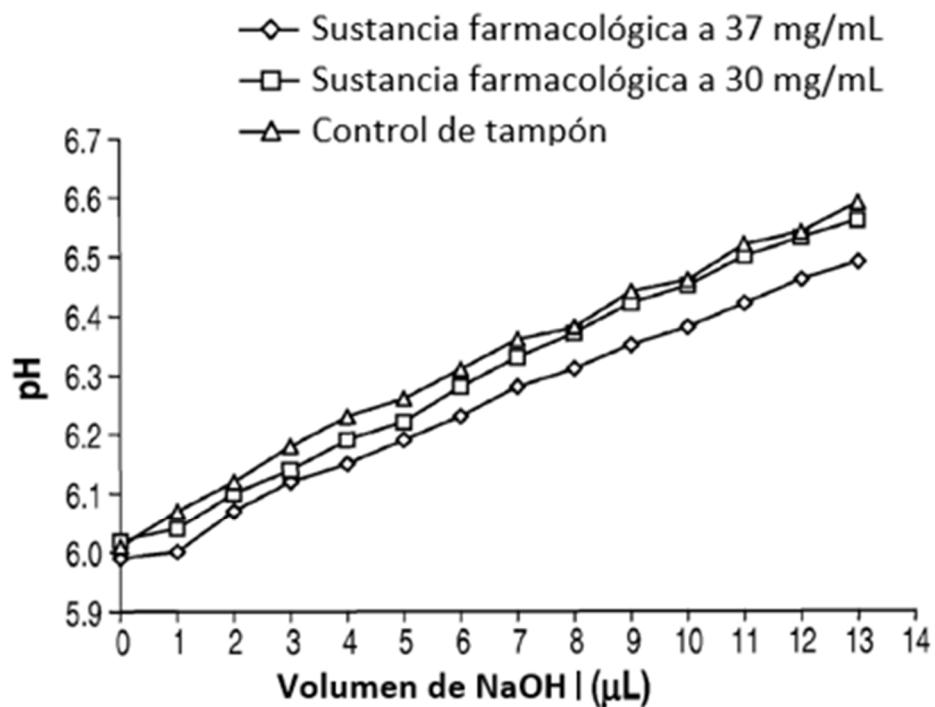
*Fig. 8A*

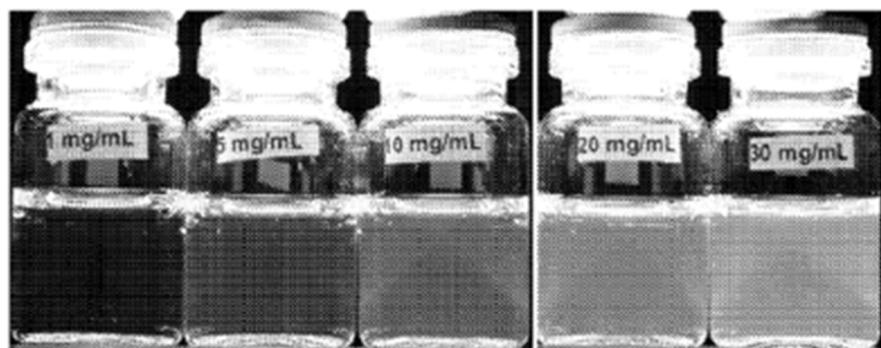


*Fig. 8B*

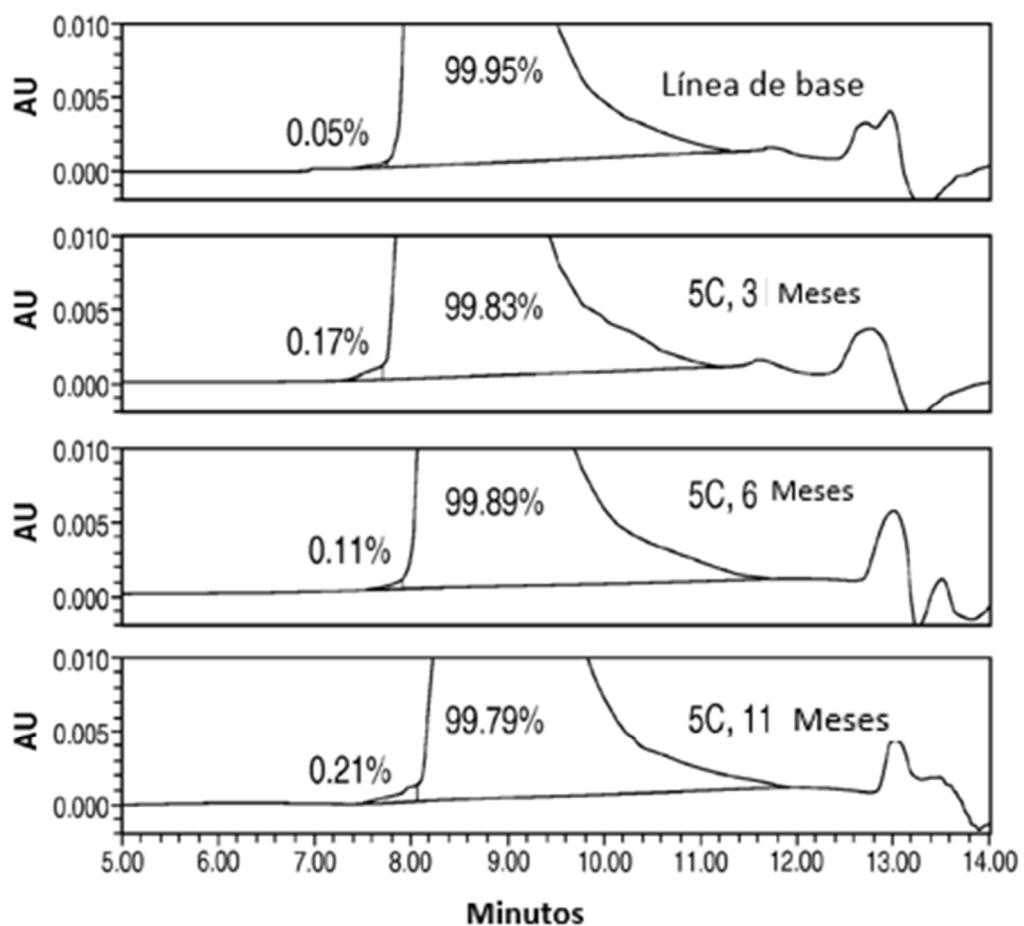


*Fig. 9*

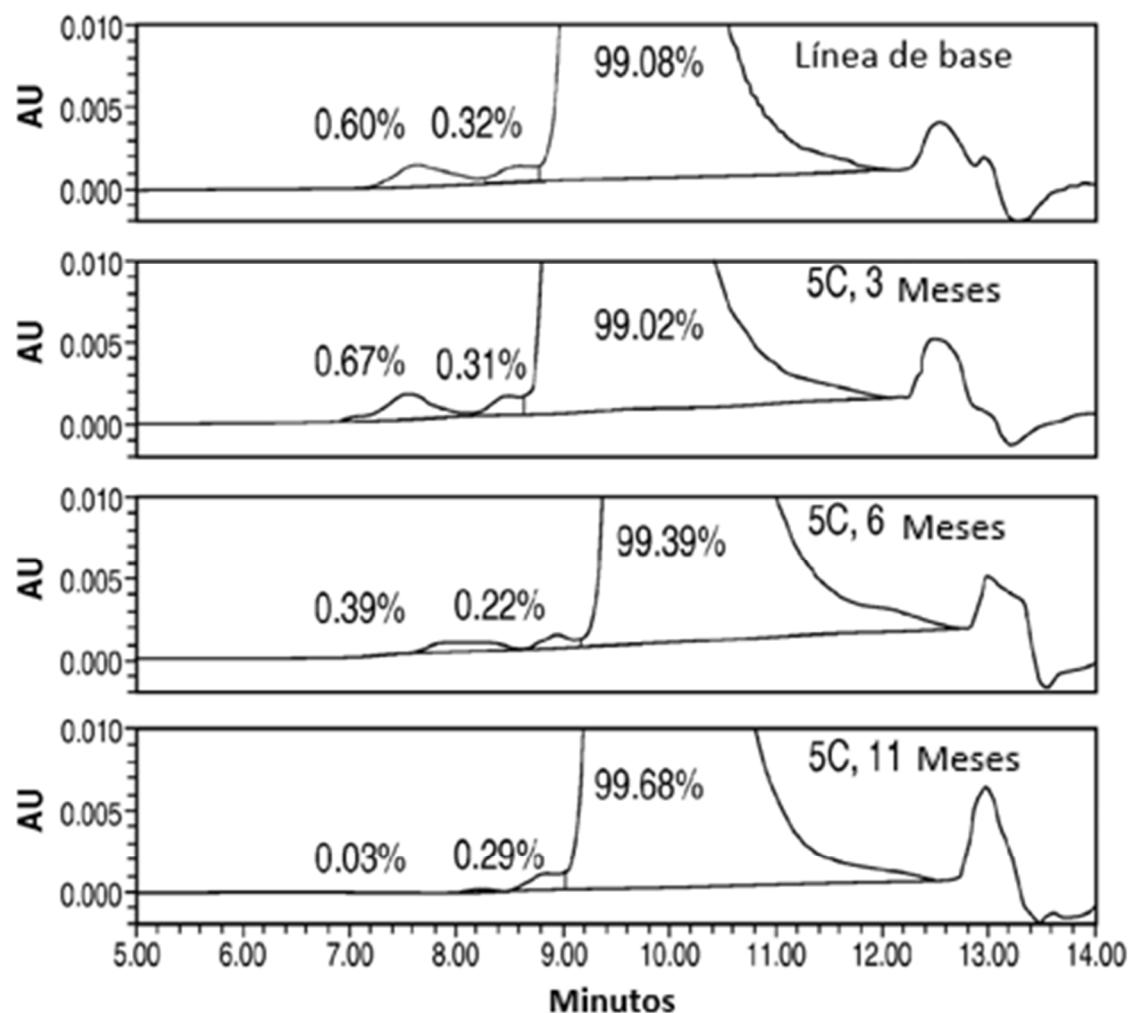
**Fig. 10****Fig. 11**



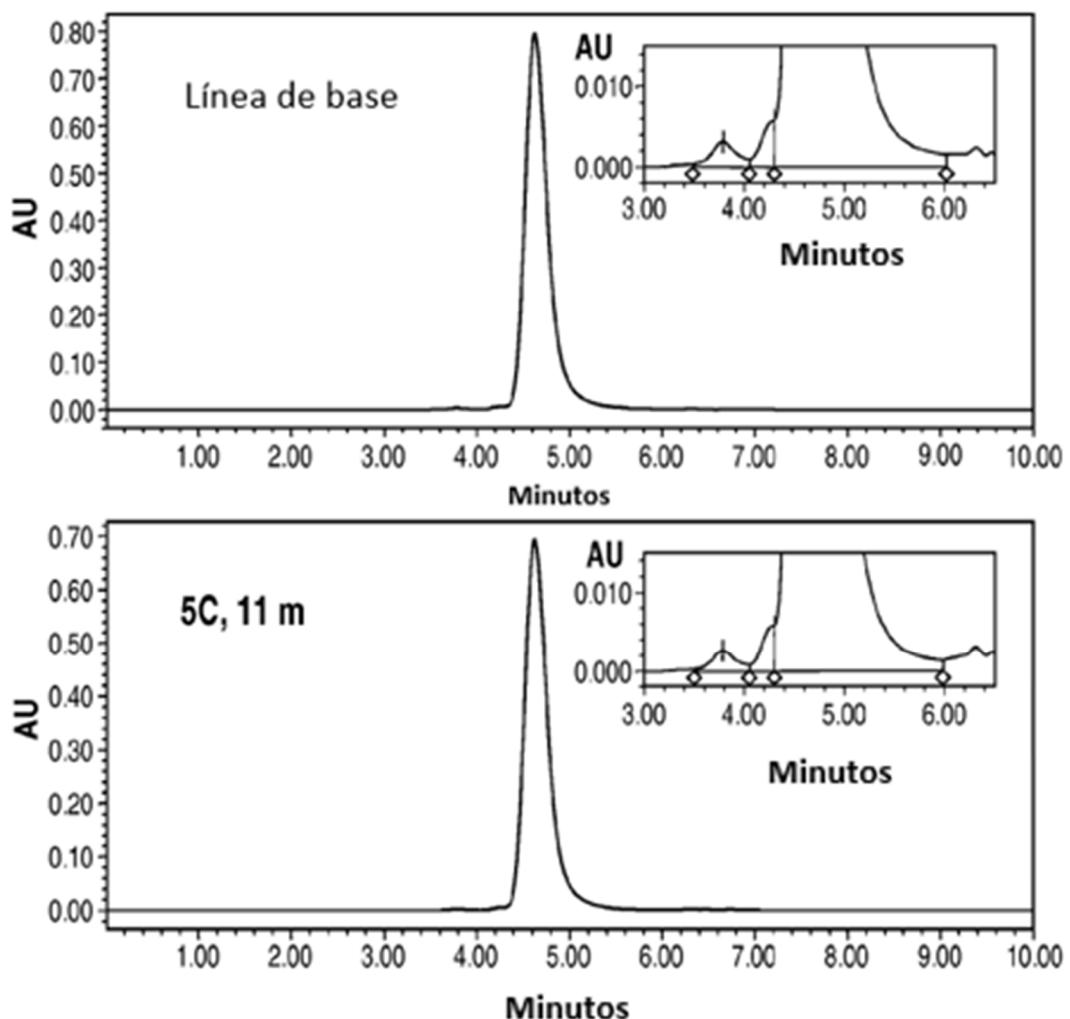
**Fig. 12**



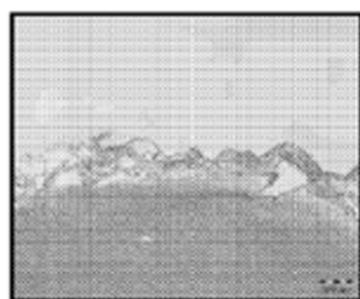
**Fig. 13**



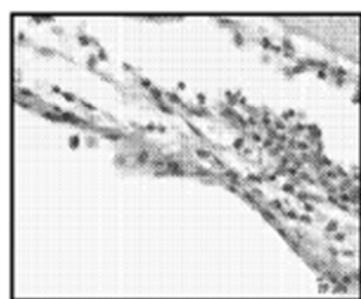
**Fig. 14**



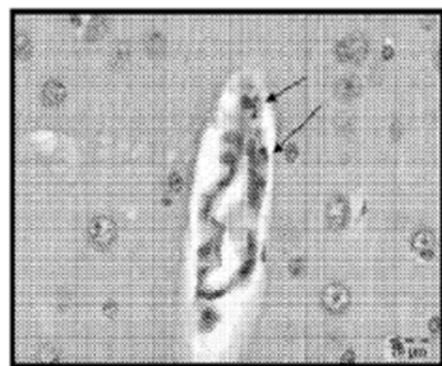
**Fig. 15**



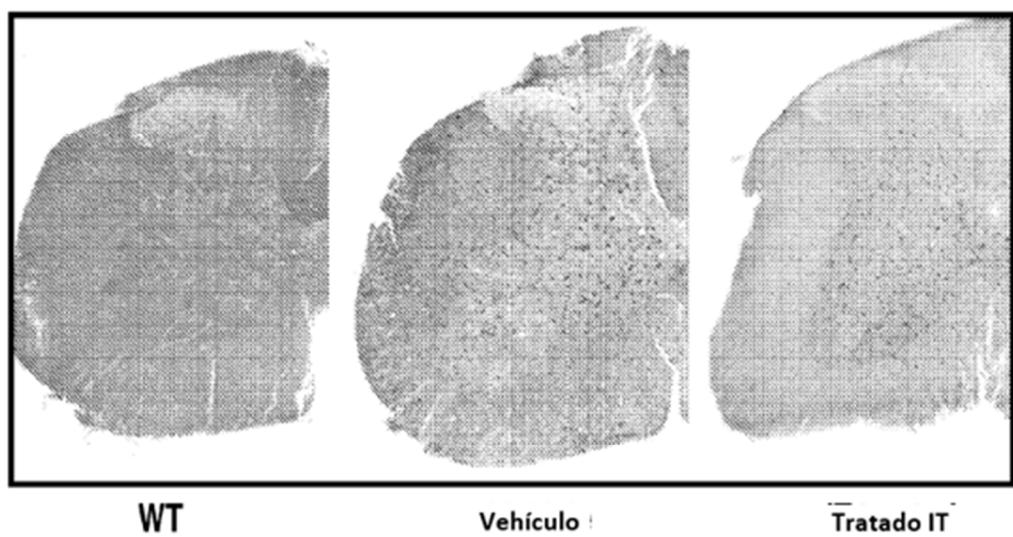
**Fig. 16**



**Fig. 17**

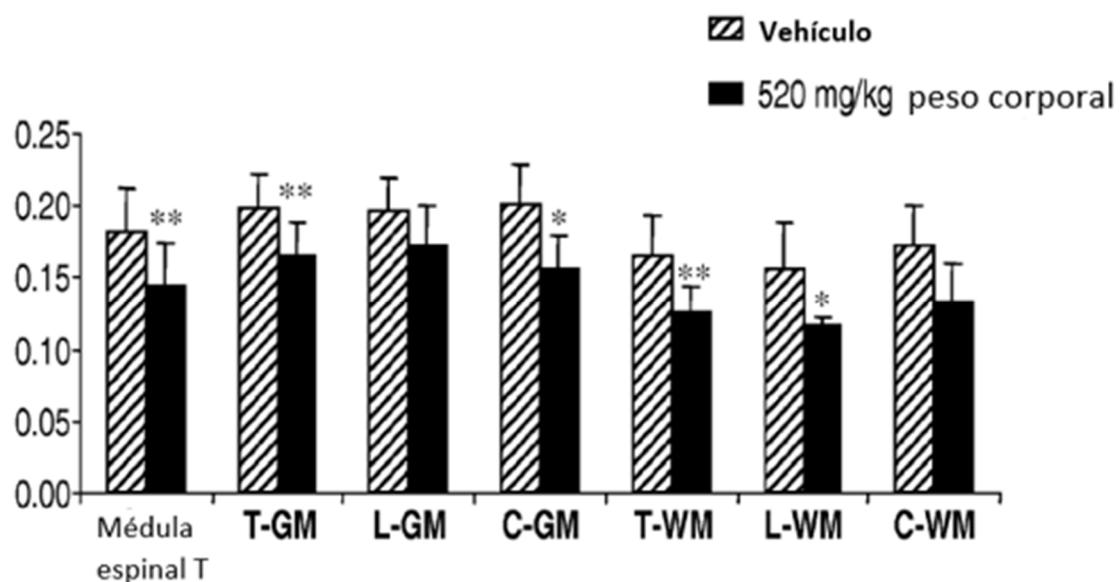


**Fig. 18**



WT= Tipo silvestre; ratones tratados IT recibieron dosis 4 veces semanalmente de 520 mg/kg peso cerebral de rhASA1 (0,21 mg), 4X magnificación.

**Fig. 19**



\*\* P<0.001; \* P<0.05

Médula espinal T = tédula total

T-GM = materia gris total

L-GM = materia gris lumbar

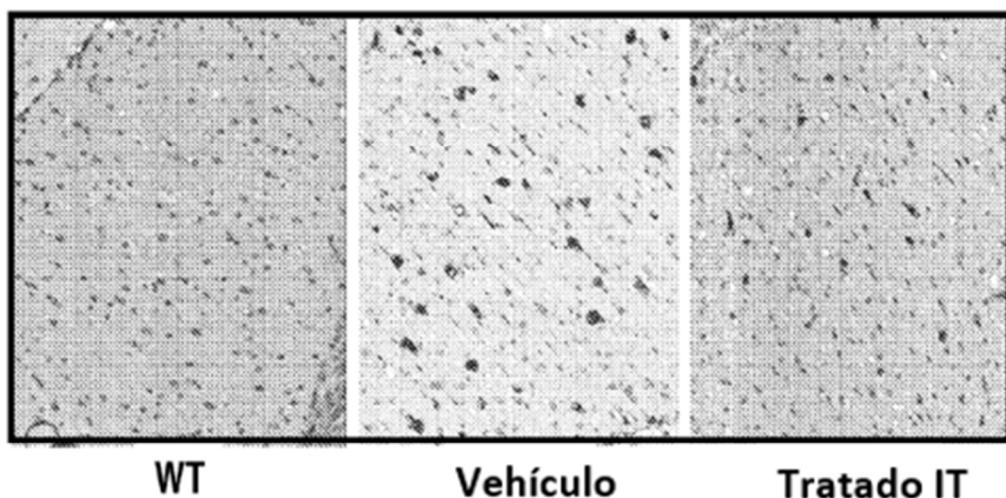
C-GM = materia gris cervical

T-WM = materia blanca total

L-WM = materia blanca lumbar

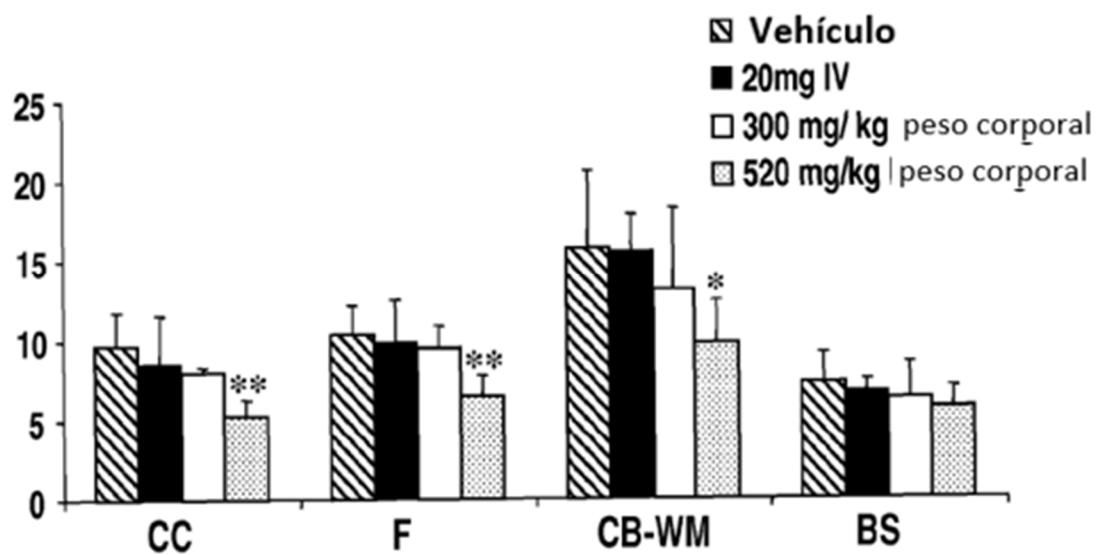
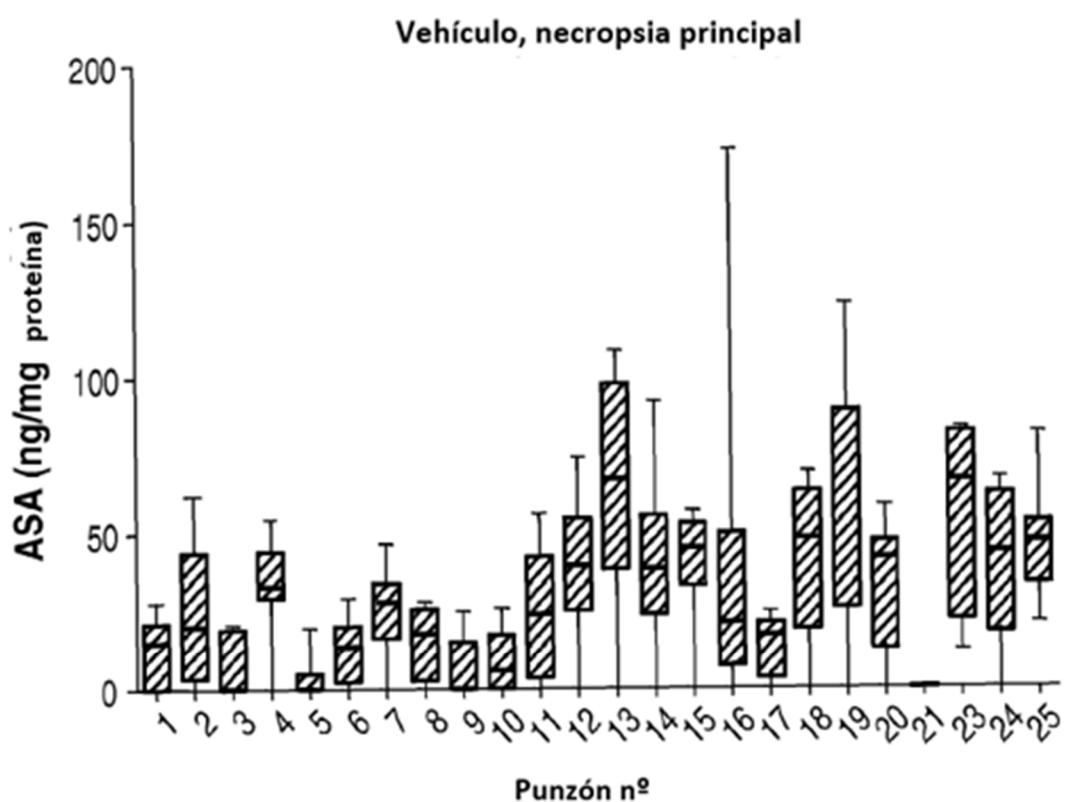
C-WM = materia blanca cervical

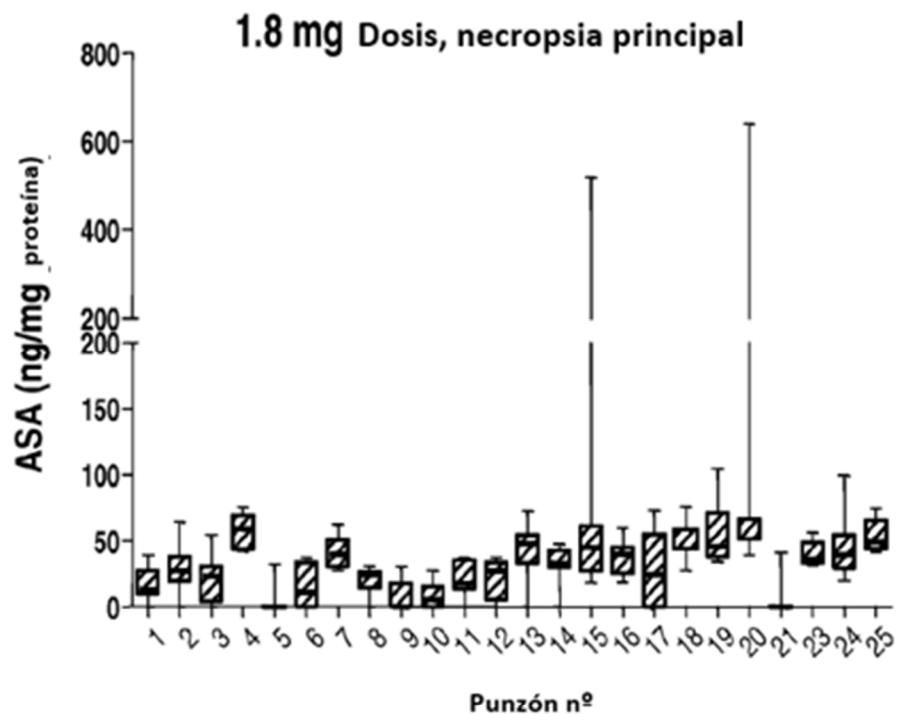
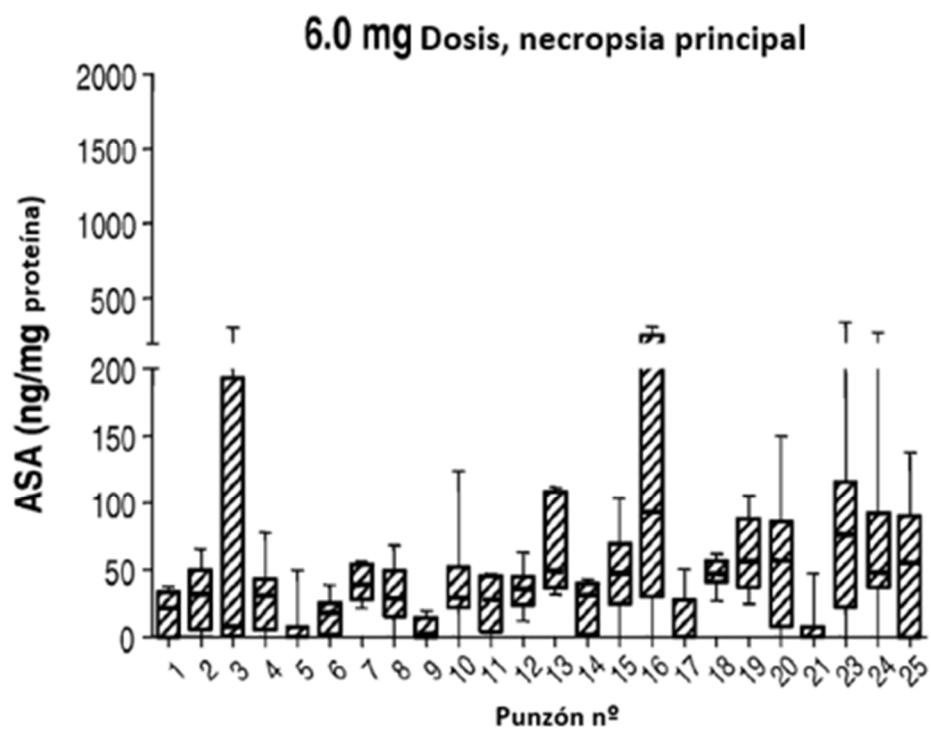
**Fig. 20**

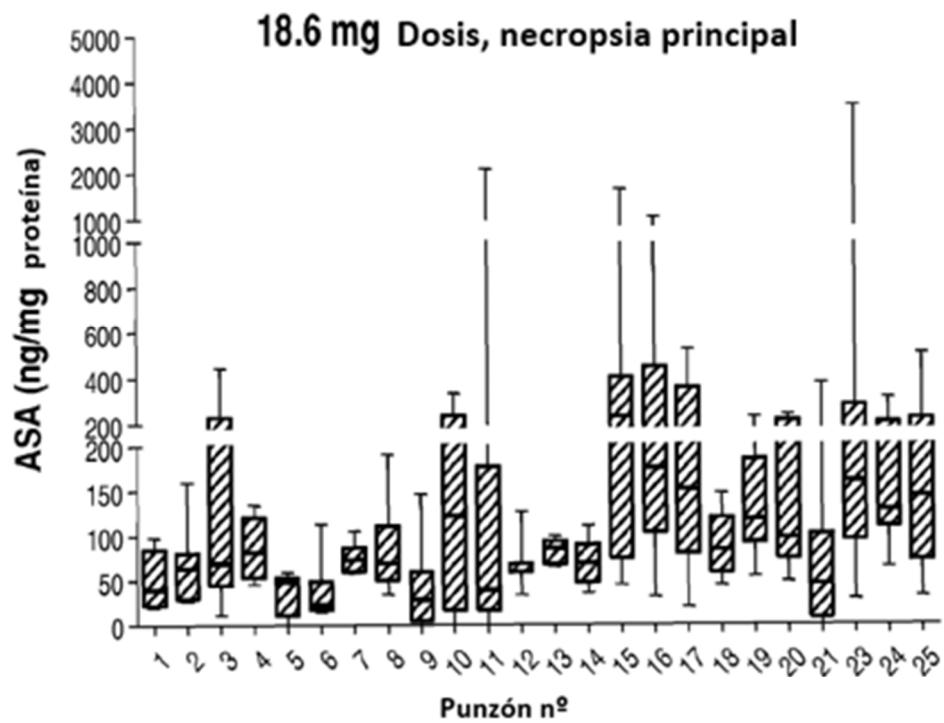
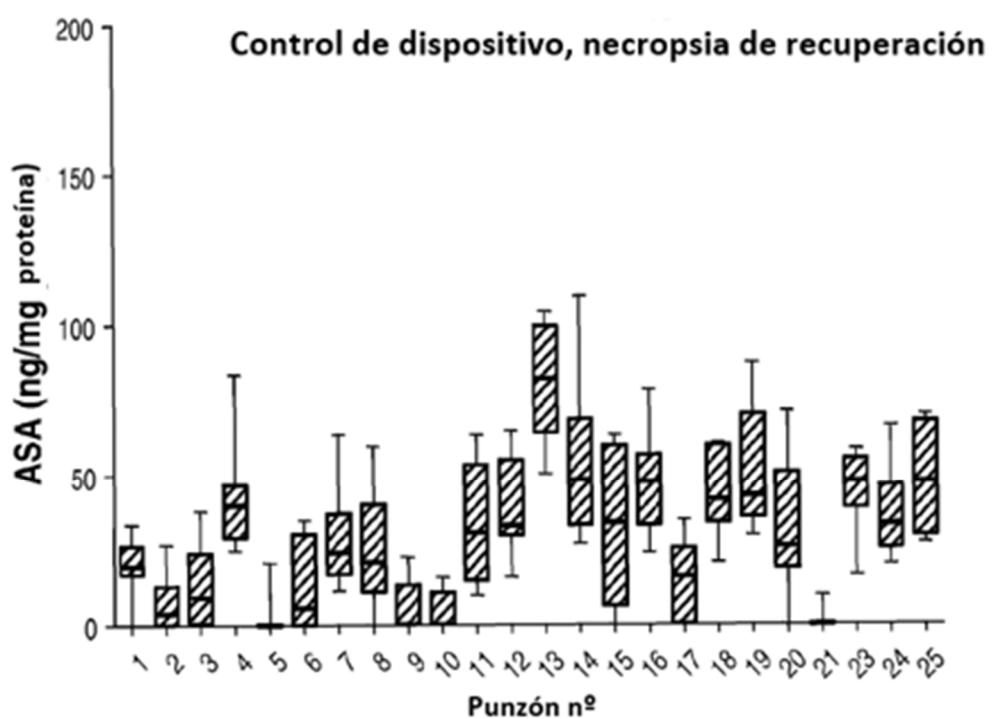


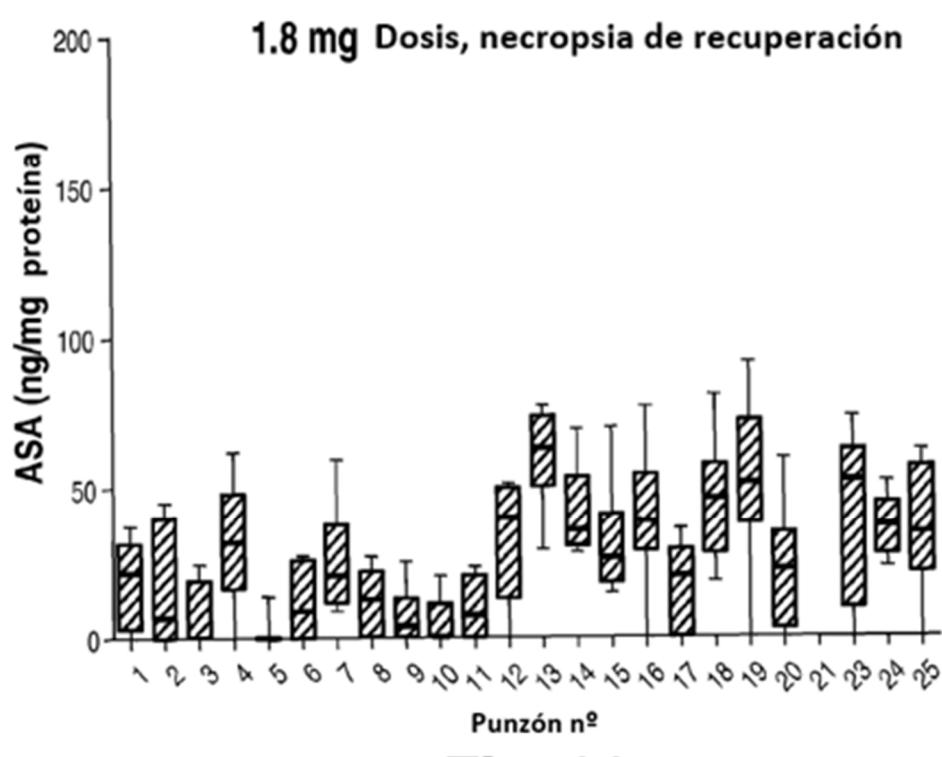
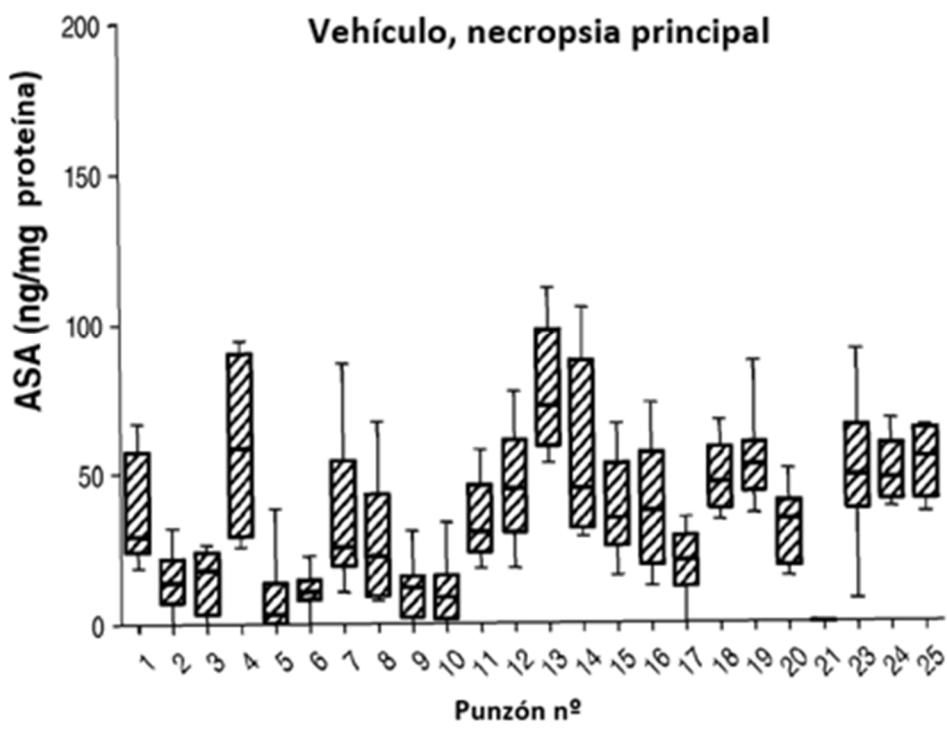
Tipo silvestre; ratones tratados IT recibieron dosis 4 veces semanalmente de 520 mg/kg peso cerebral de rhASA1 (0,21 mg), 20X magnificación.

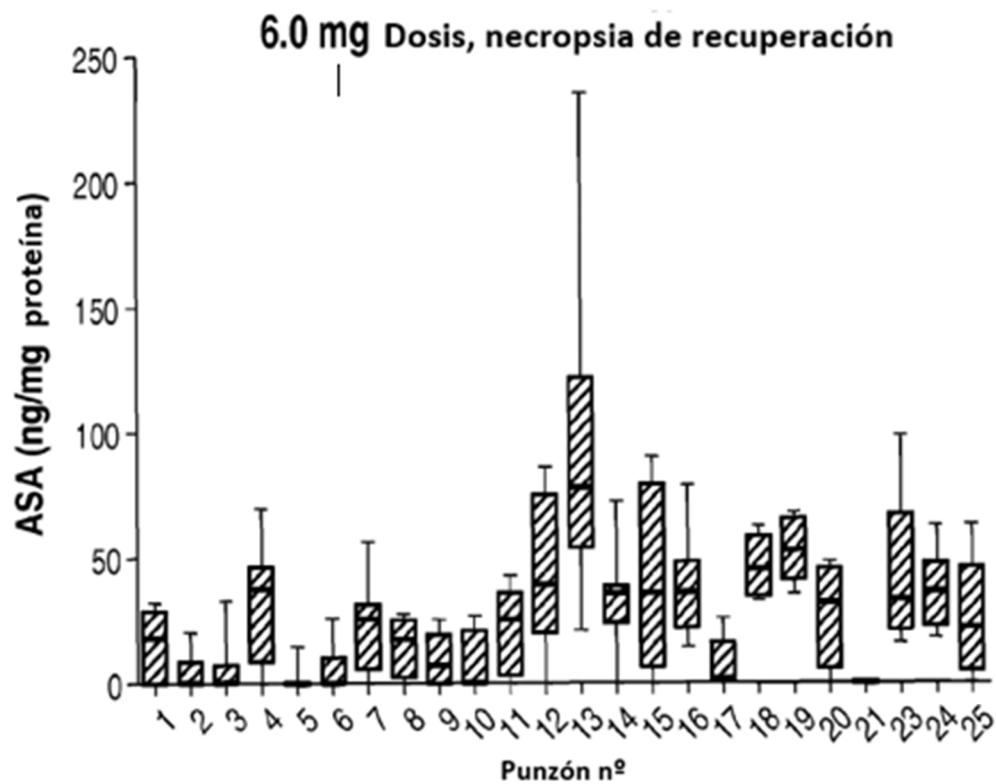
**Fig. 21**

*Fig. 22**Fig. 23*

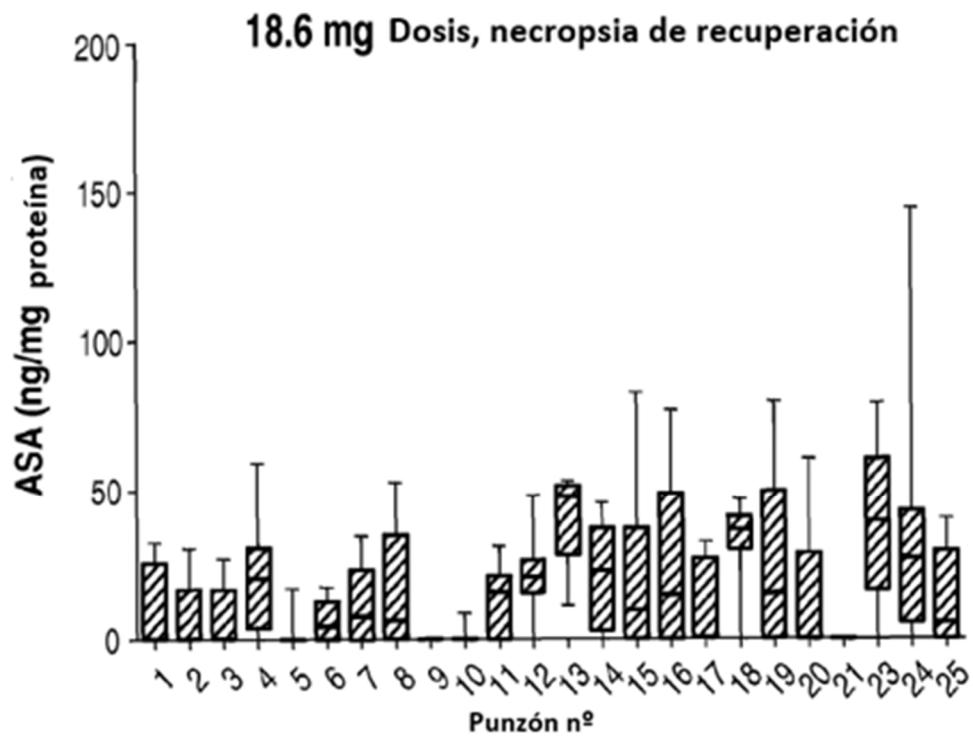
**Fig. 24****Fig. 25**

**Fig. 26****Fig. 27**

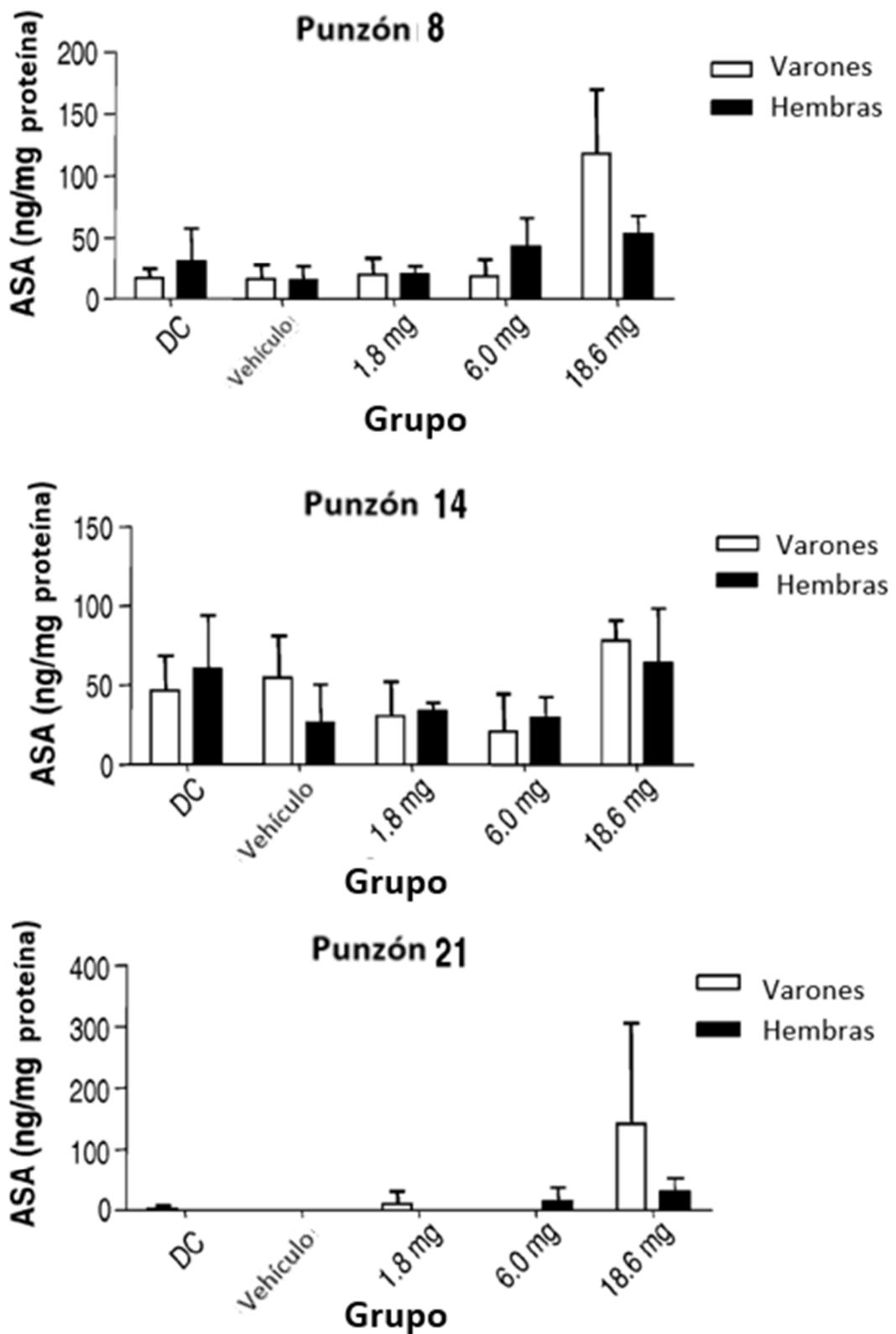




**Fig. 30**



**Fig. 31**

**Fig. 32**

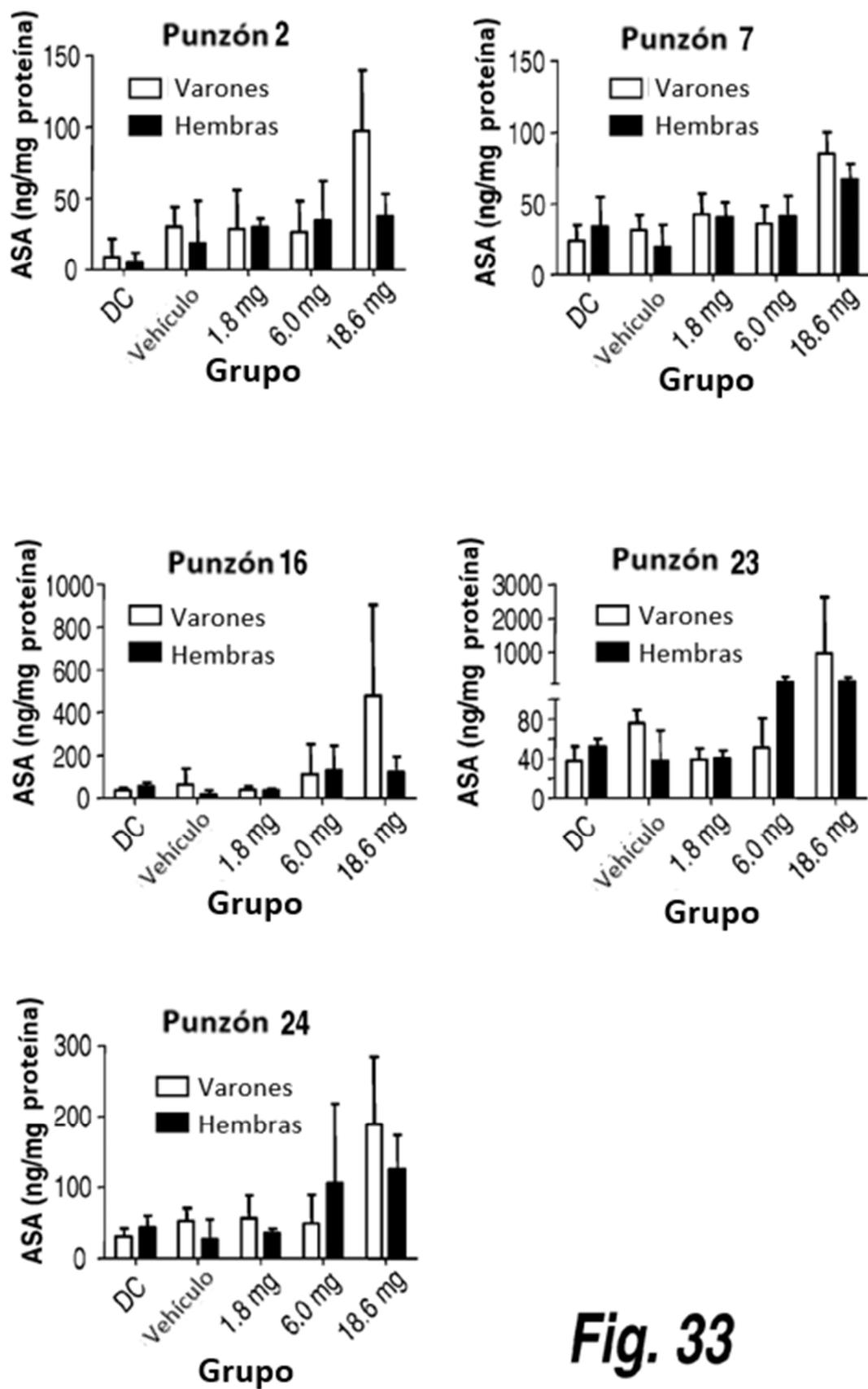


Fig. 33

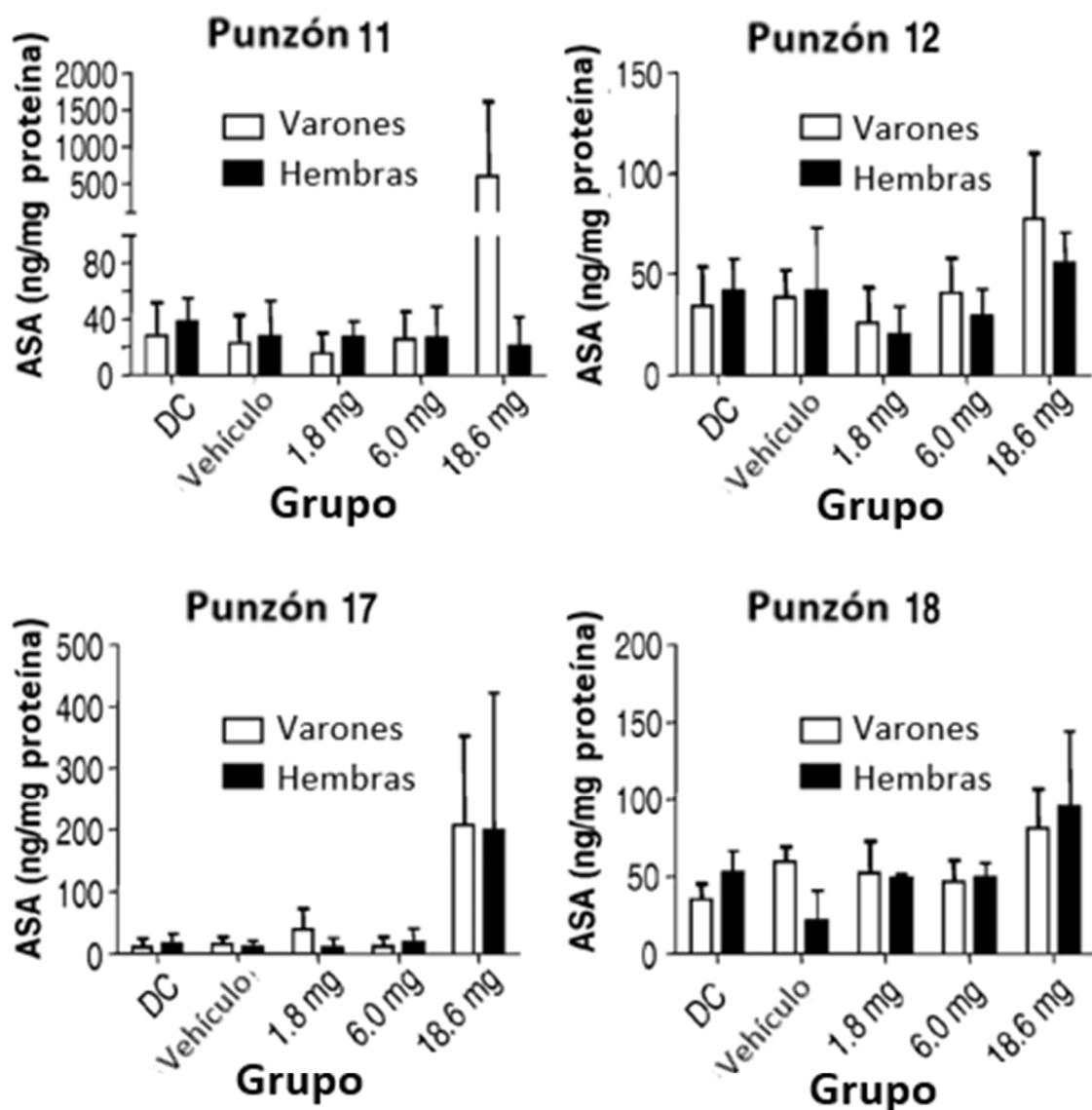
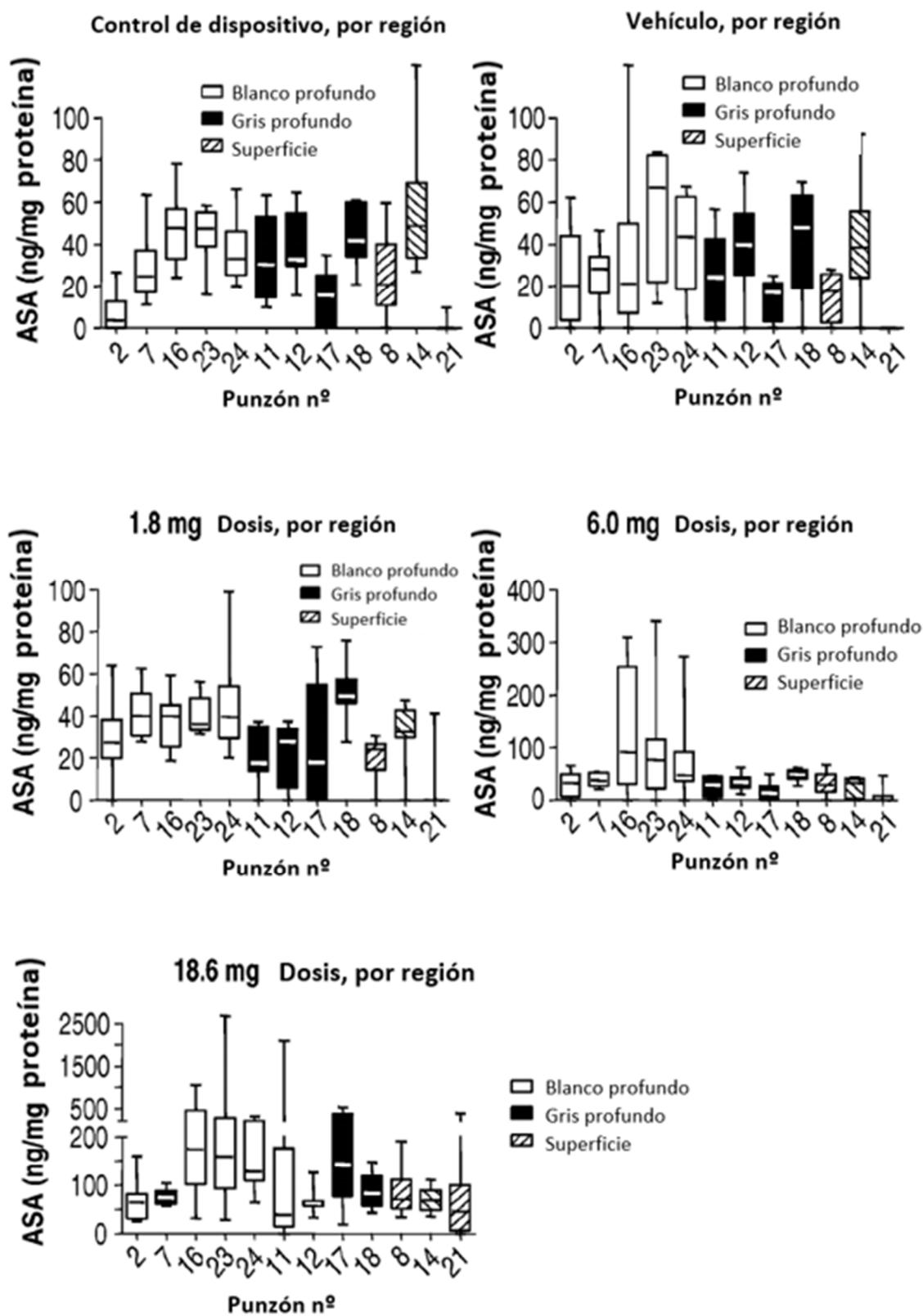


Fig. 34

**Fig. 35**

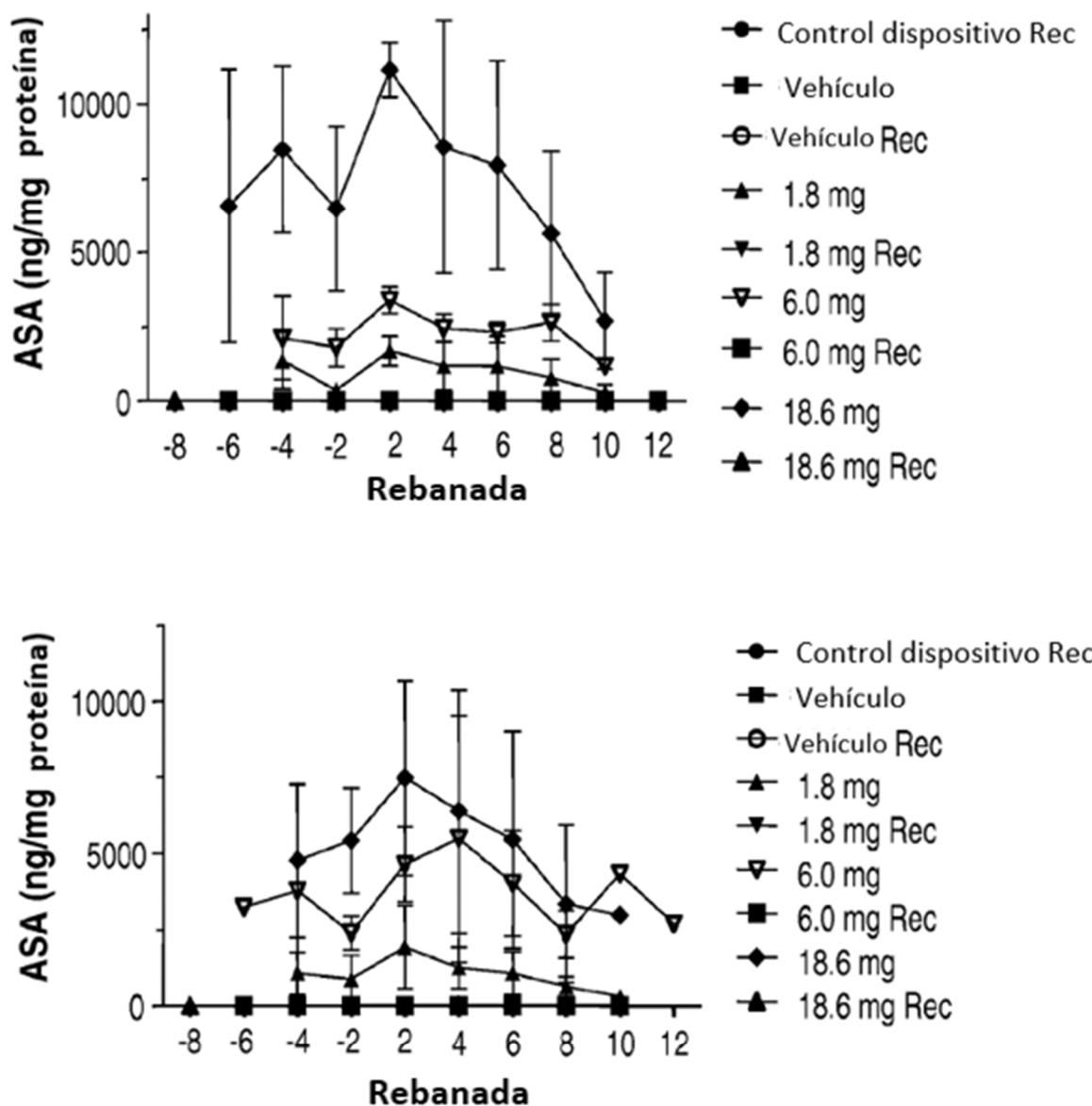
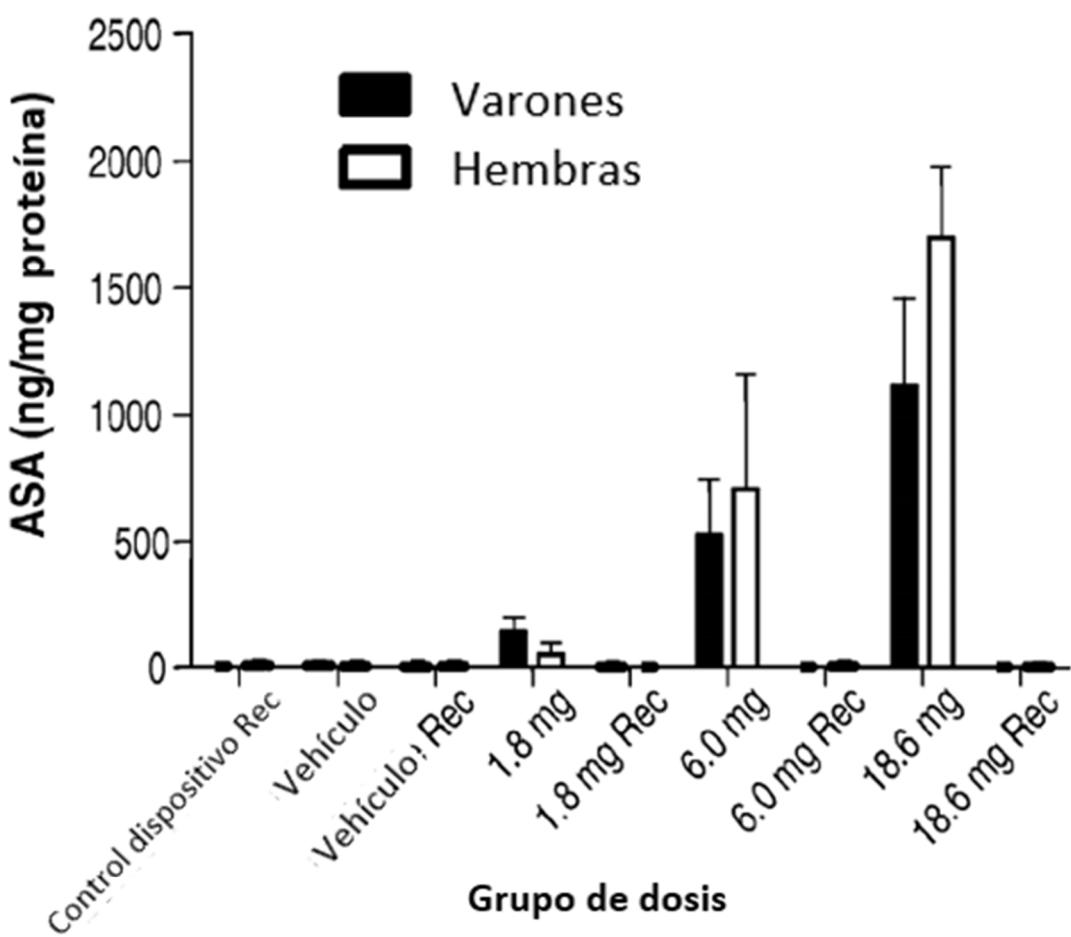


Fig. 36

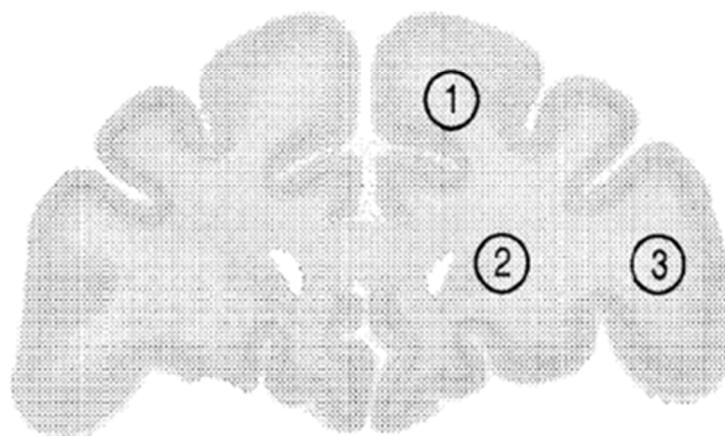


*Fig. 37*

62-133

#458

**Rebanada 4**



**Etiqueta anatómica**

1. WM subcortical
2. WM periventricular y materia blanca profunda
3. 3WM subcortical

---

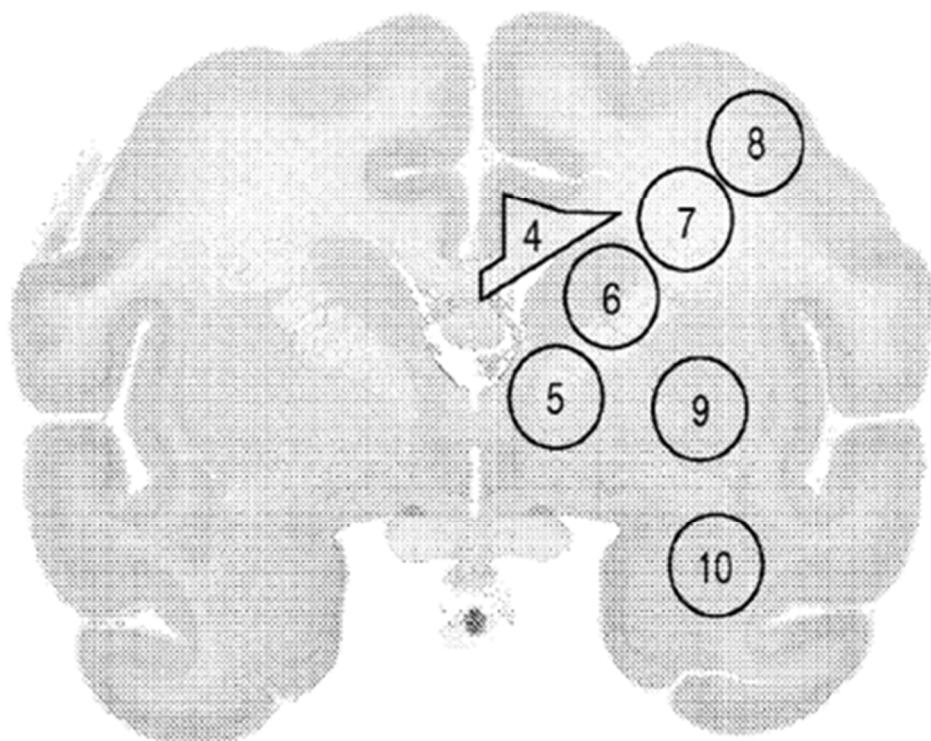
1 cm

***Fig. 38***

62-133

Rebanada 6

#780



---

1 cm

## Etiqueta anatómica

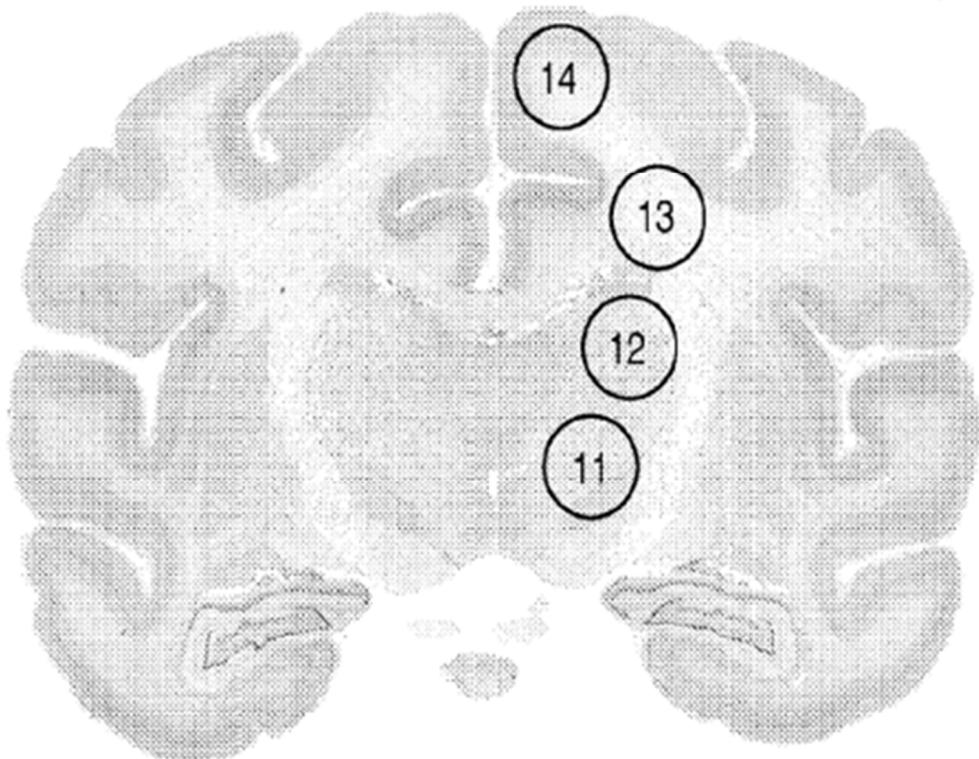
4. Cuerpo calloso y WM subcortical pericalloso
5. Cápsula interna, GPi
6. Cápsula interna, núcleo caudado
7. Materia blanca profunda
8. WM subcortical y corteza
9. putamen
10. WM subcortical temporal y corteza

*Fig. 39*

62-133

Rebanada 8

#962



---

1 cm

Etiqueta anatómica

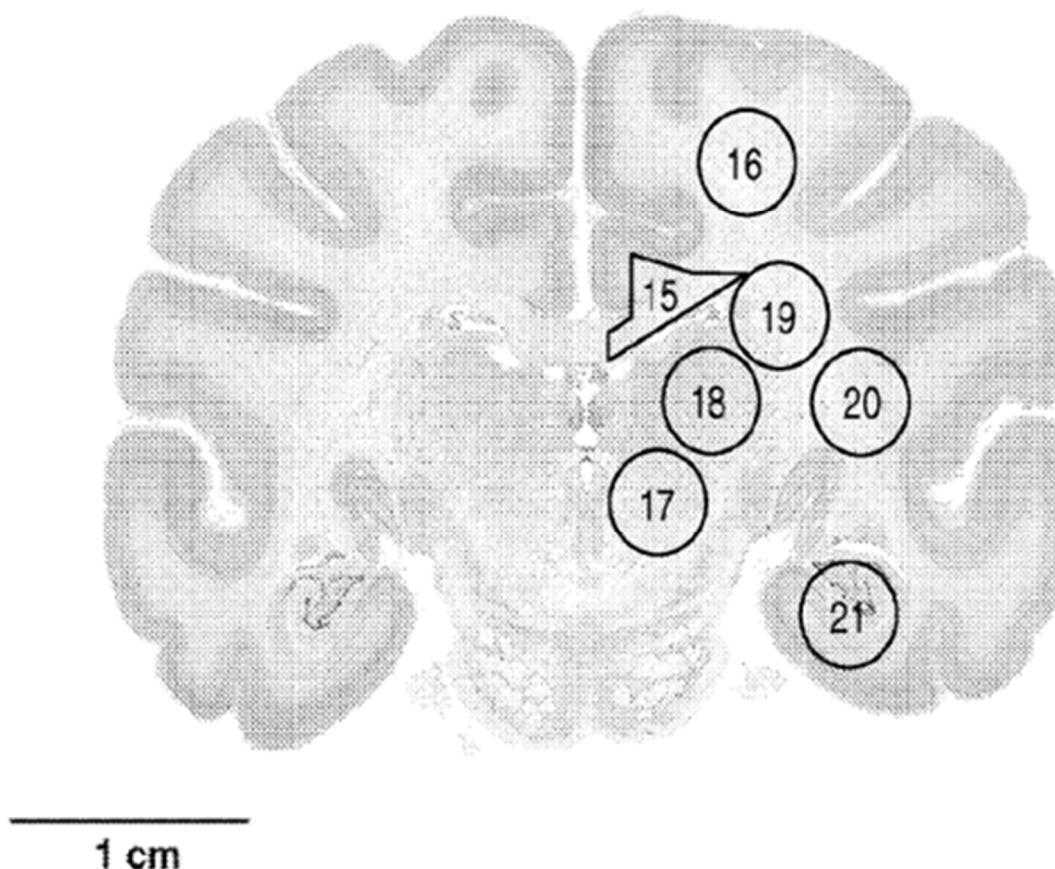
11. Materia Gris profunda
12. Materia gris profunda
13. WM profundo, frontal periventricular y subcortical
14. Blanco subcortical y corteza, superficial sagital

**Fig. 40**

62-133

Rebanada 10

#1102



1 cm

## Etiqueta anatómica

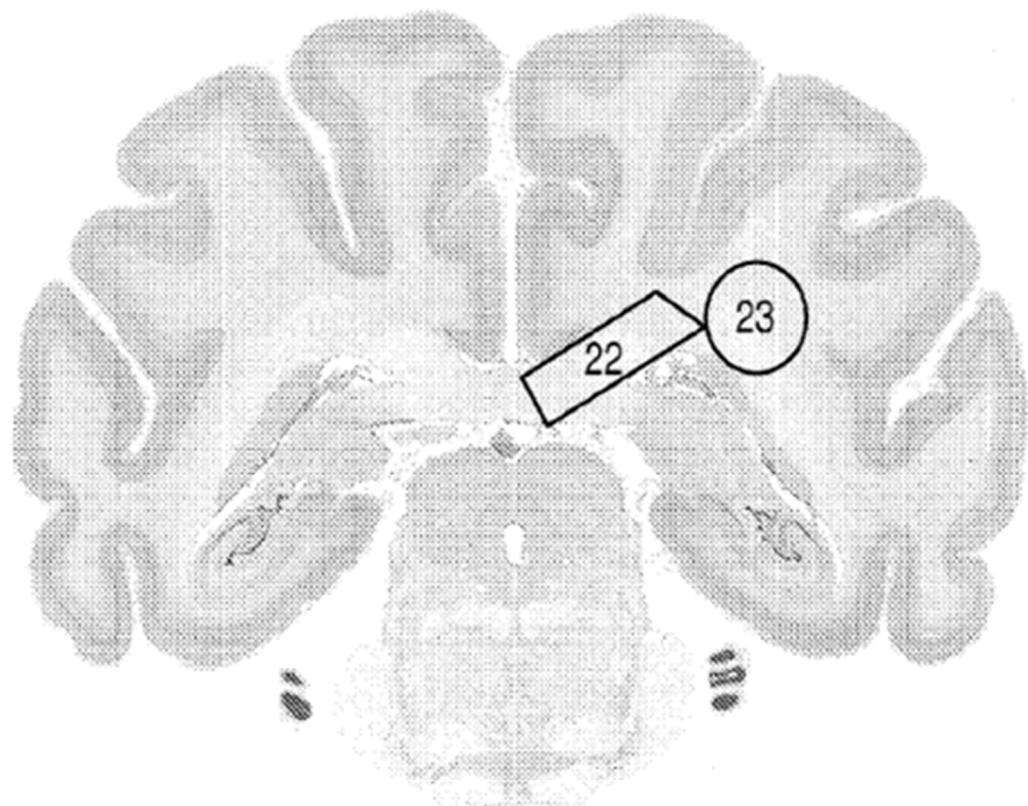
- 15. Cuerpo calloso y WM subcortical pericalloso
- 16. WM subcortical profundo
- 17. Gris profunda
- 18. Gris profunda
- 19. WM periventricular
- 20. WM subcortical
- 21. Hipocampo

***Fig. 41***

62-133

Rebanada 12

#1240



1 cm

Etiqueta anatómica

22. Cuerpo calloso

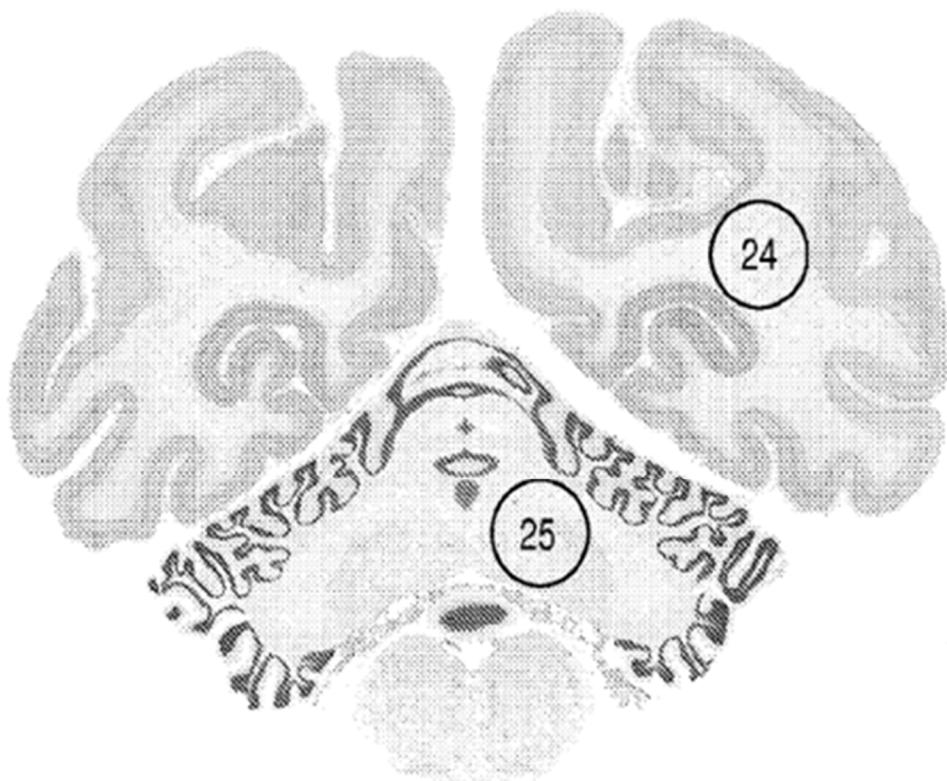
23. WM profunda

*Fig. 42*

62-133

Rebanada 14

#1486



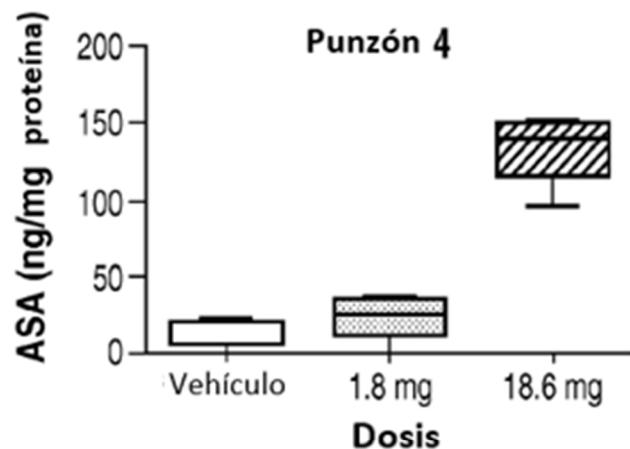
---

1 cm

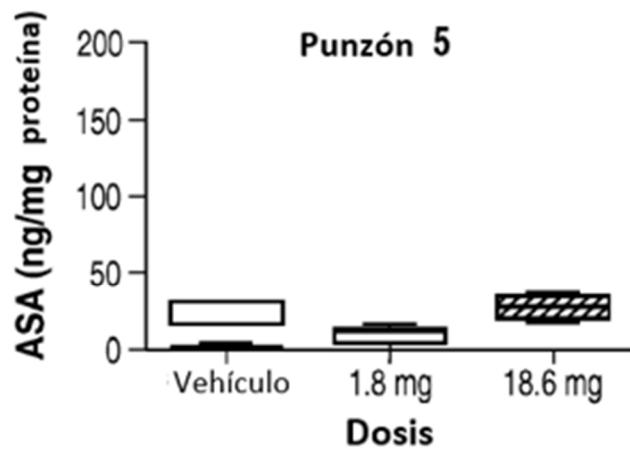
Etiqueta anatómica

24. WM subcortical, tubo occipital
25. Materia blanca cerebelar, incluyendo núcleo dentado (WM)

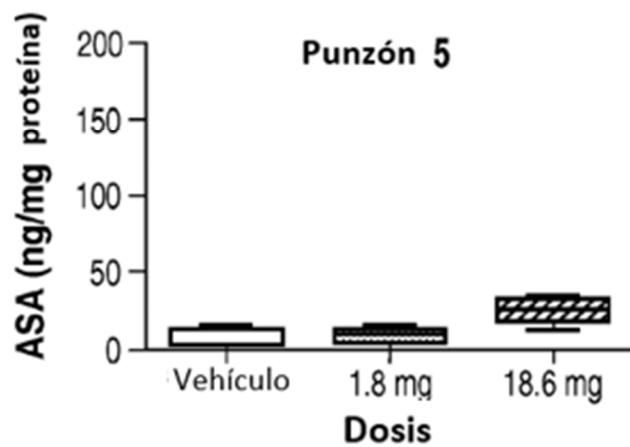
*Fig. 43*



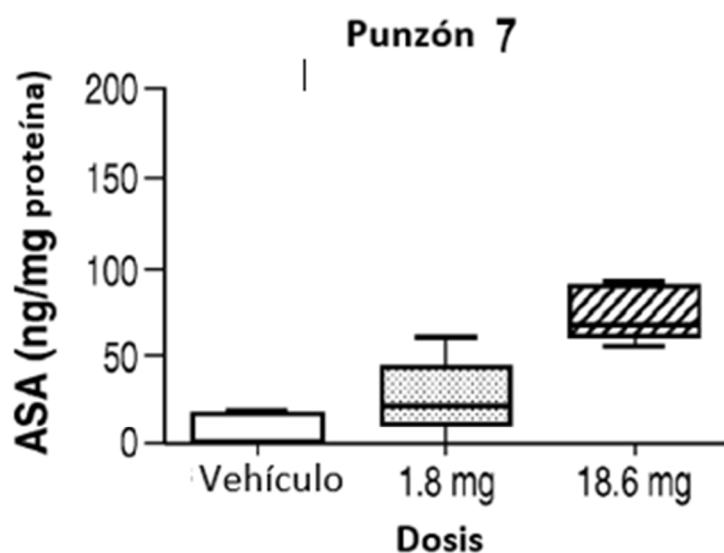
**Fig. 44A**



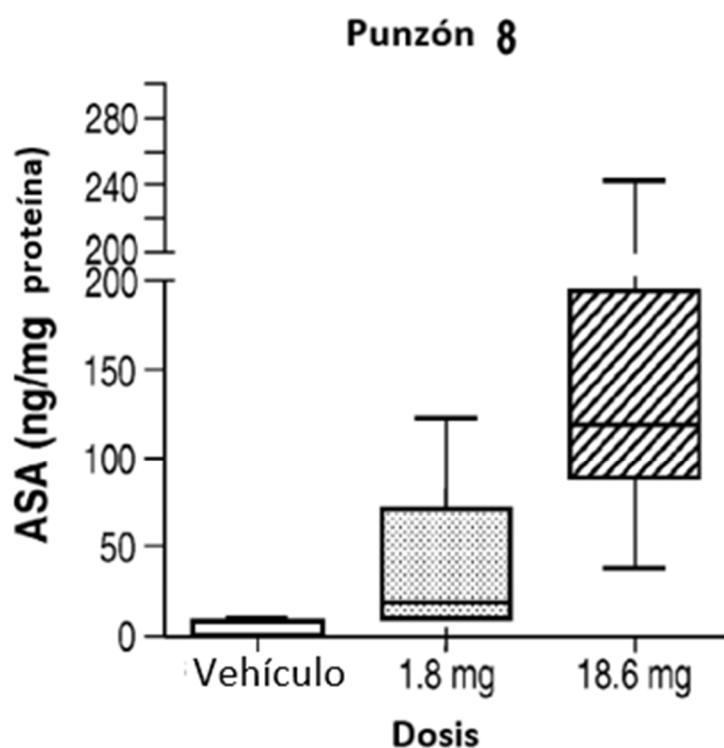
**Fig. 44B**



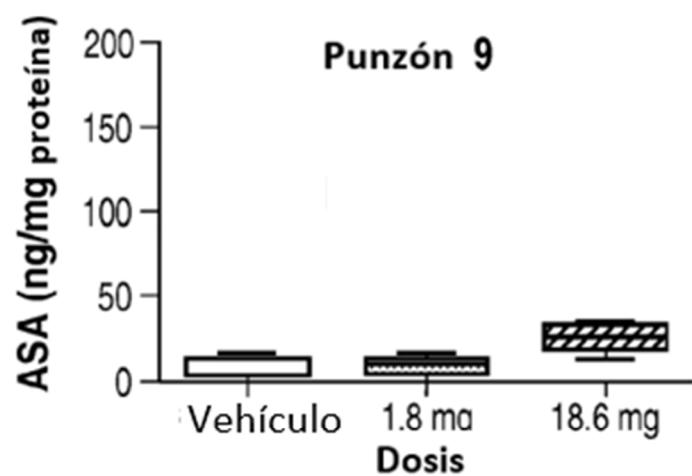
**Fig. 44C**



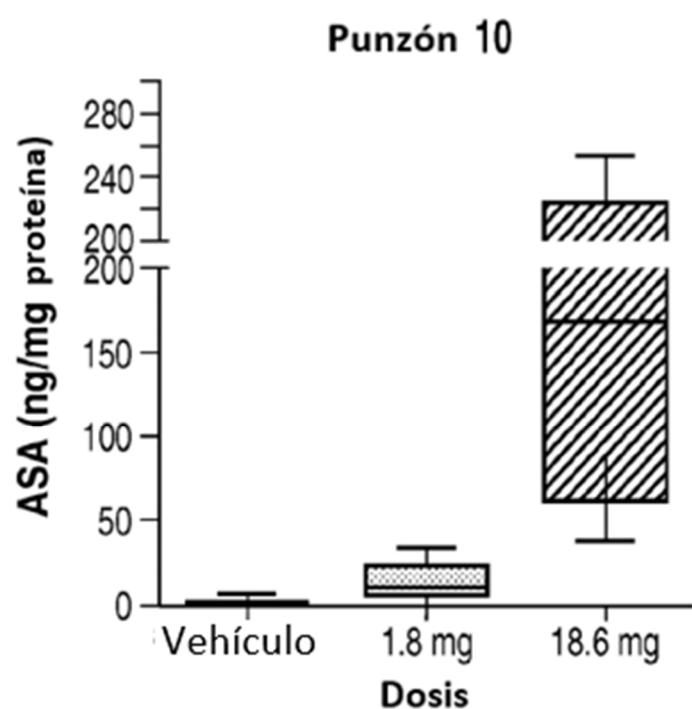
**Fig. 44D**



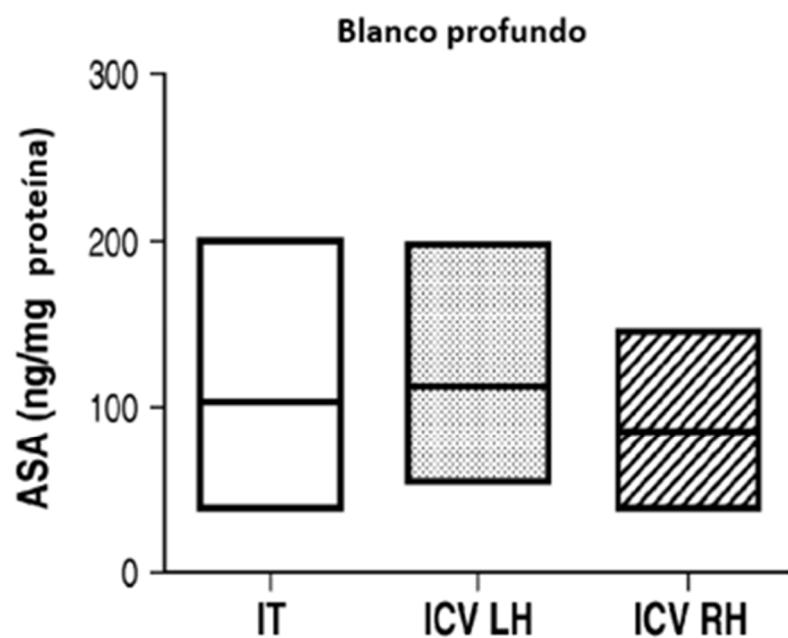
**Fig. 44E**



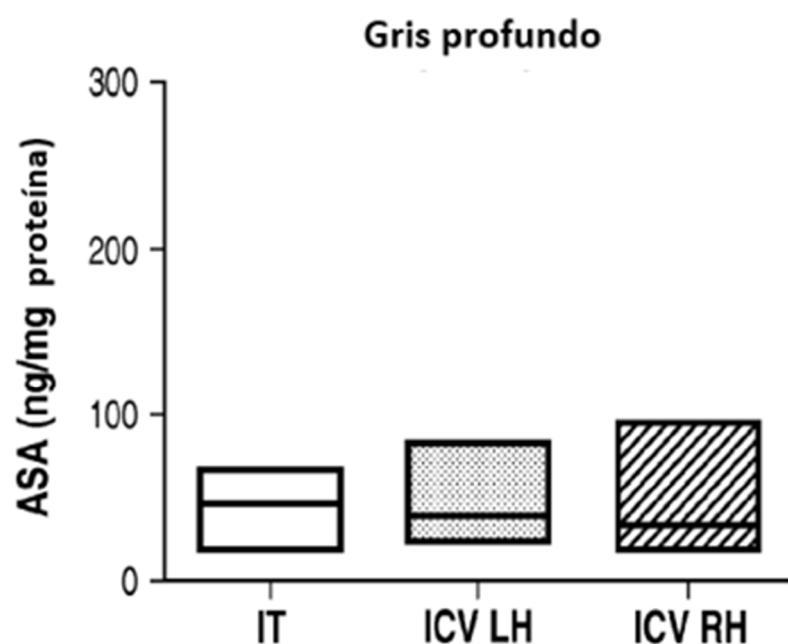
**Fig. 44F**



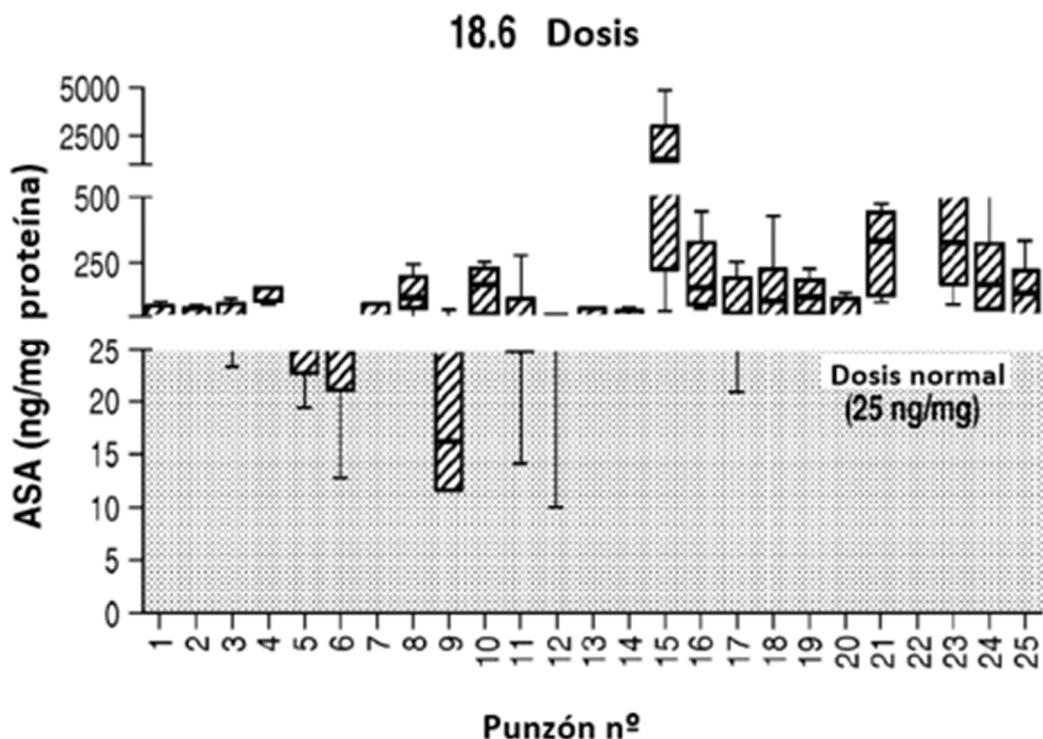
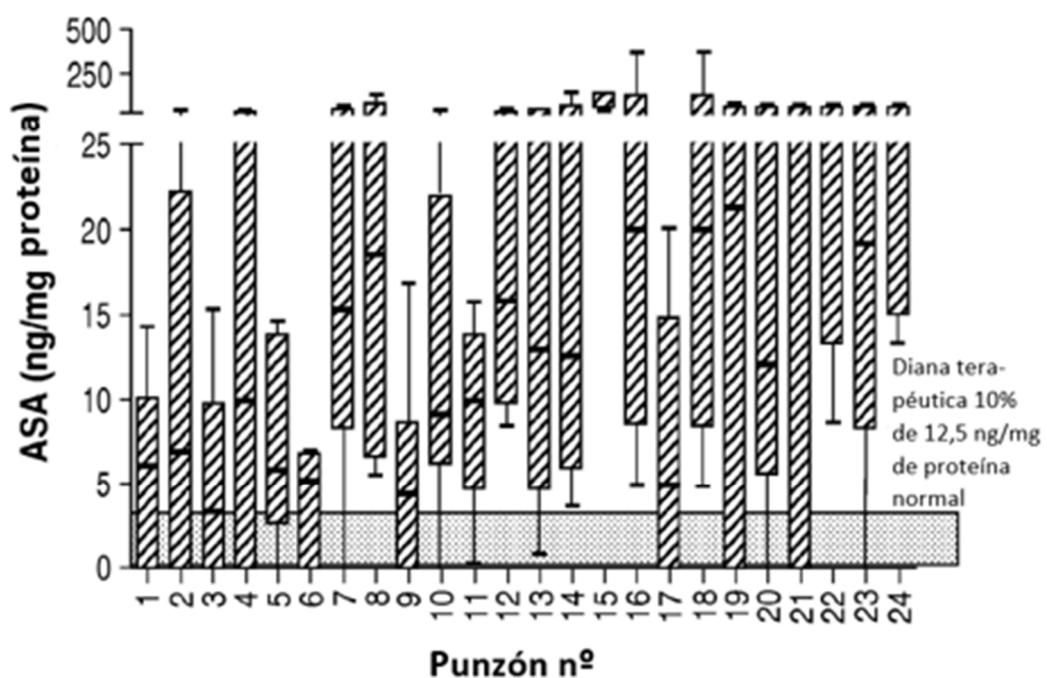
**Fig. 44G**



***Fig. 45A***

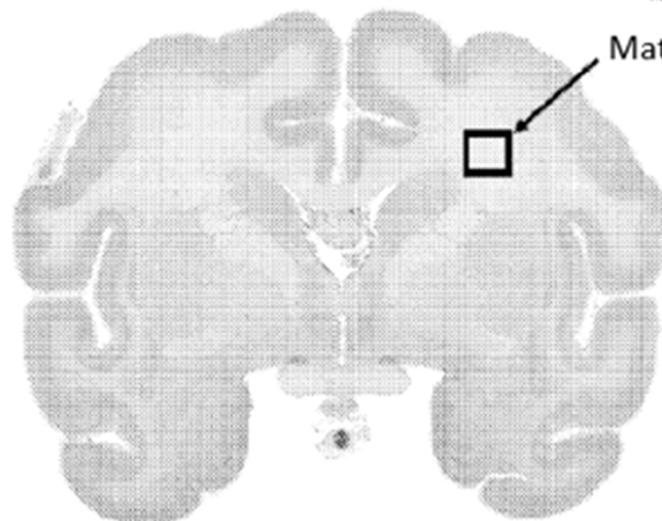


***Fig. 45B***

**Fig. 46A****Fig. 46B**

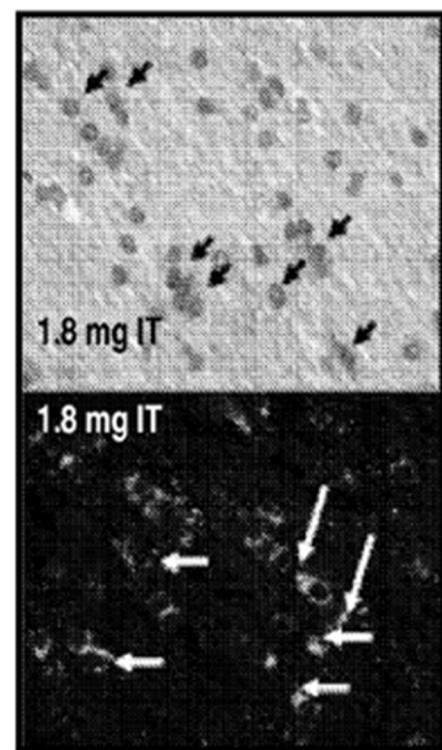
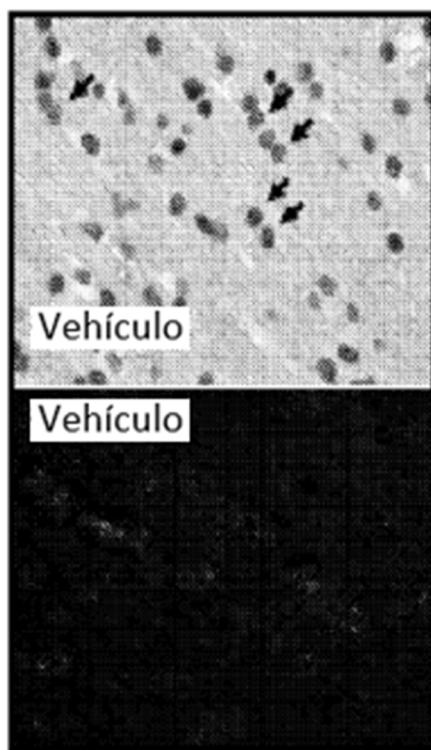
62-133

#780

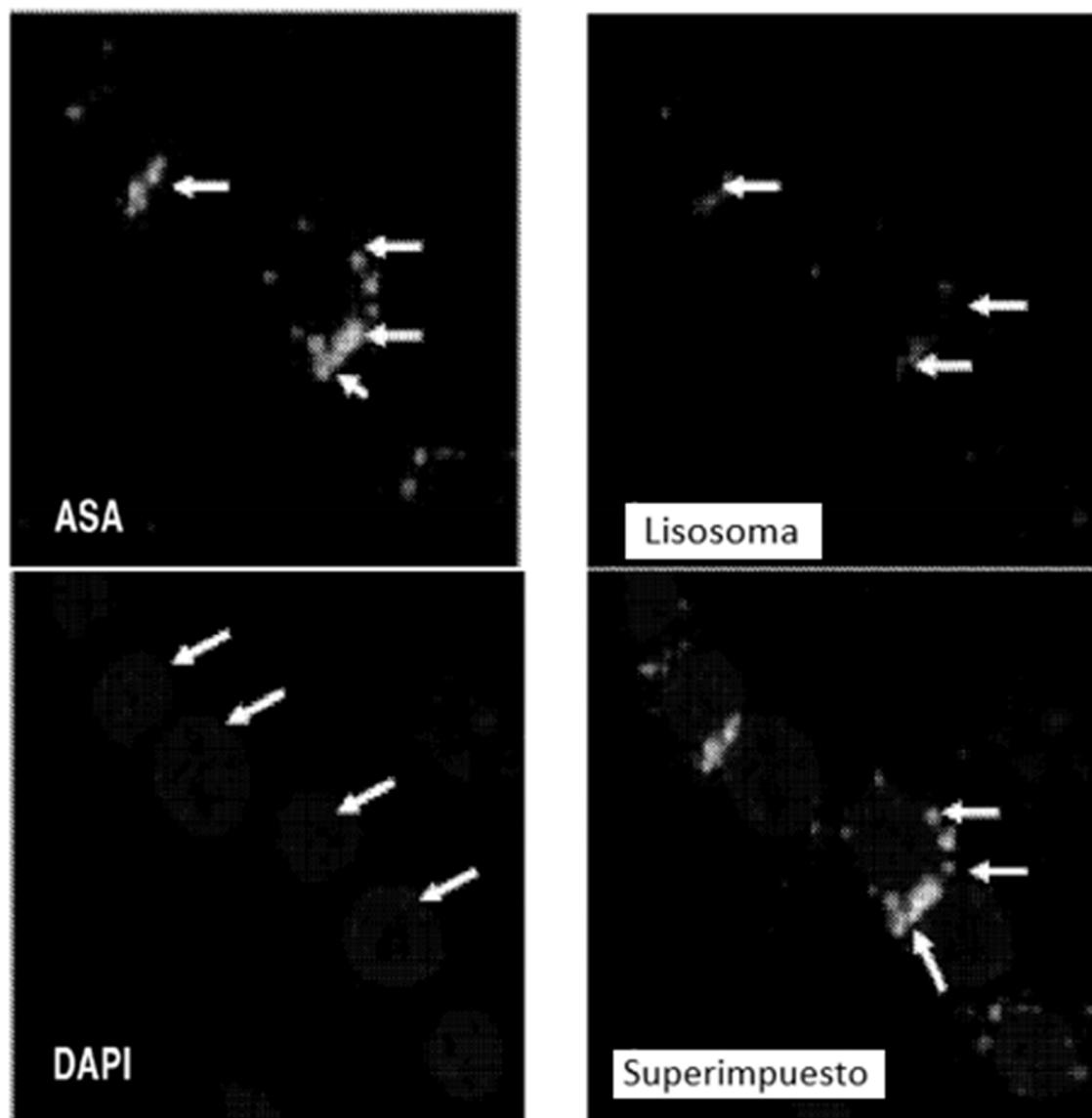


1 cm

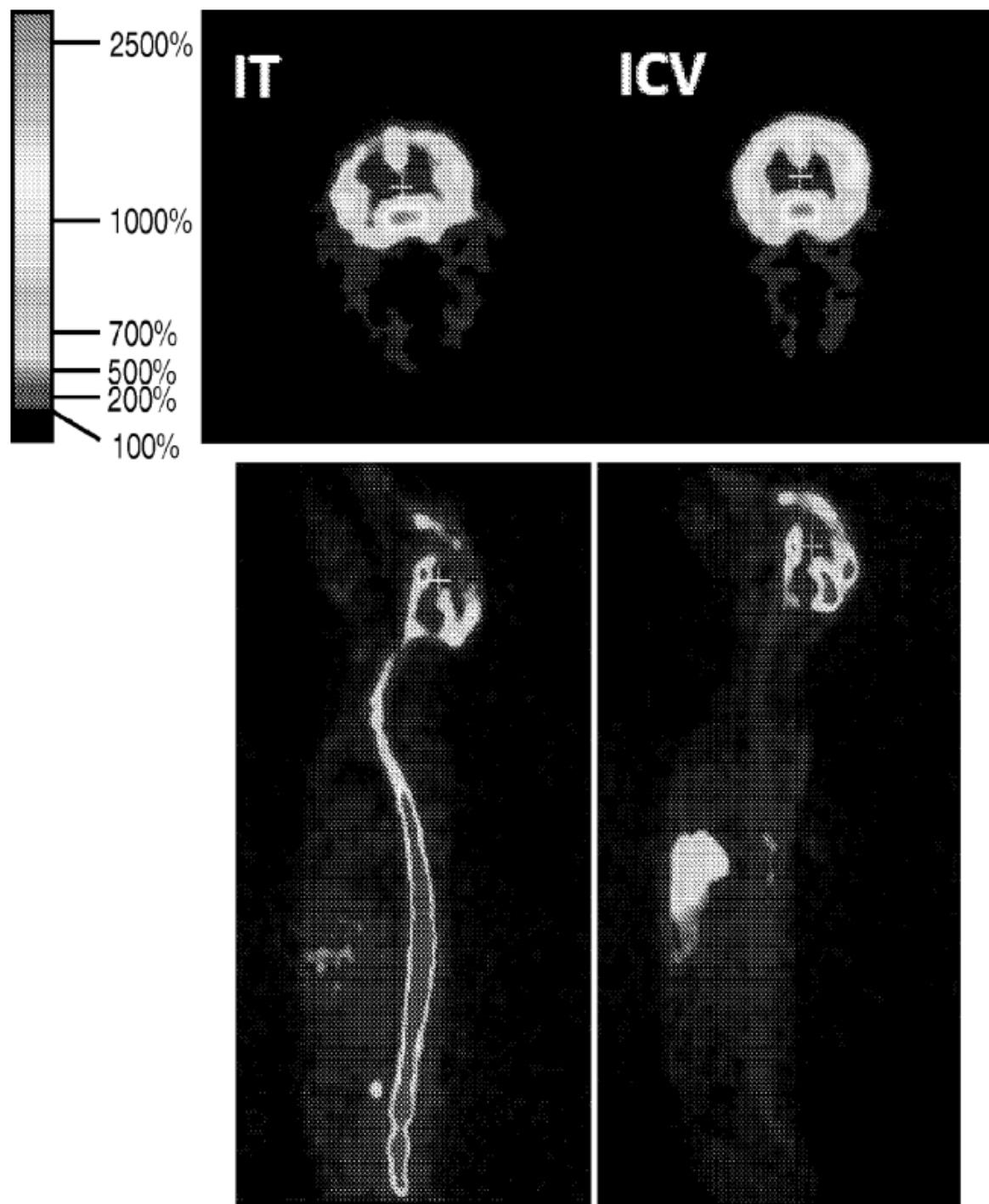
*Fig. 47A*



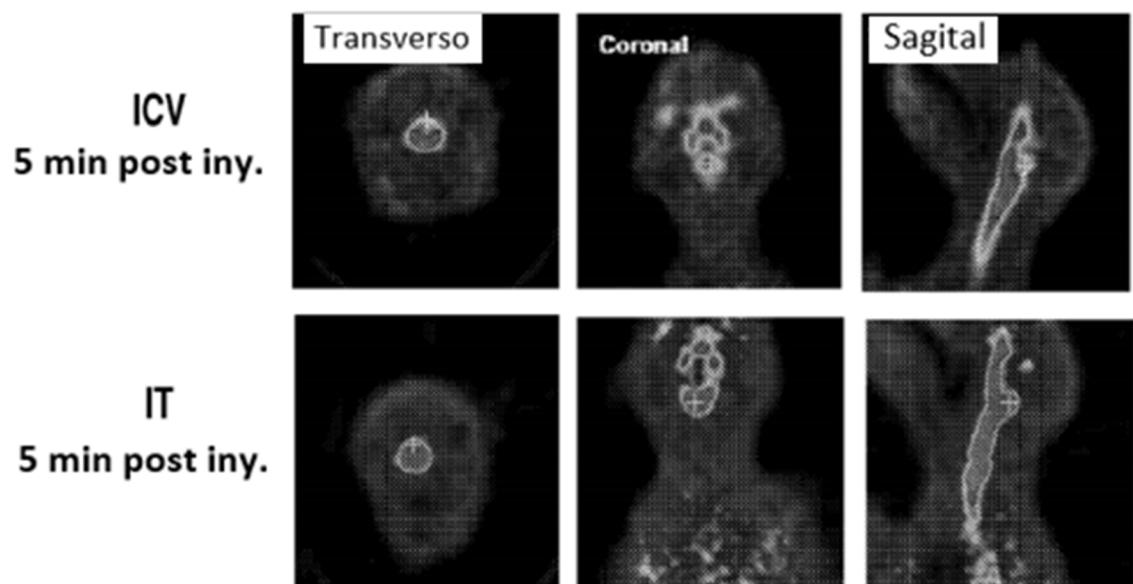
*Fig. 47B*



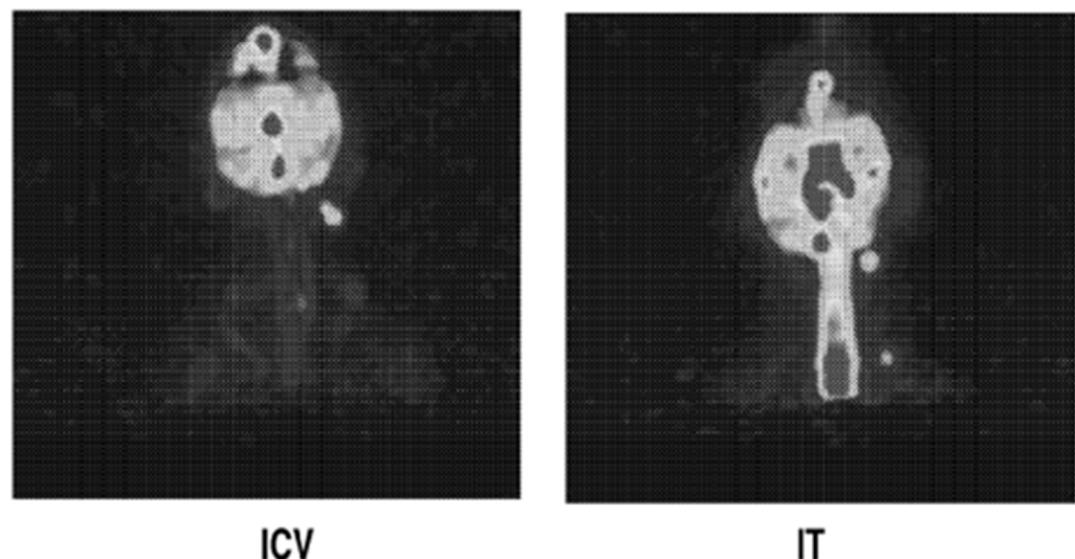
*Fig. 47C*



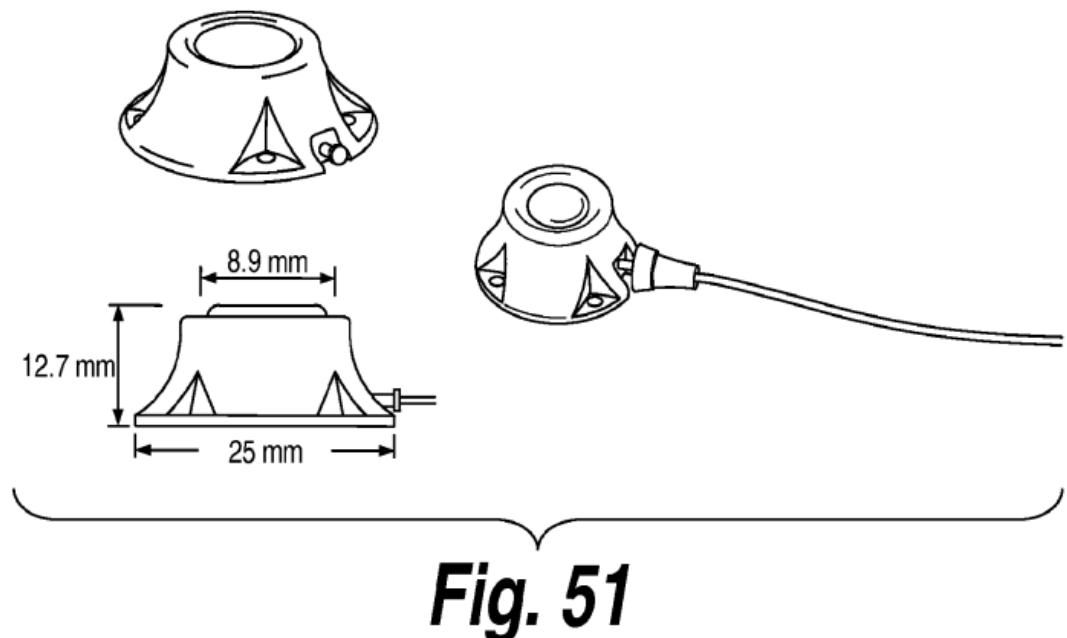
*Fig. 48*



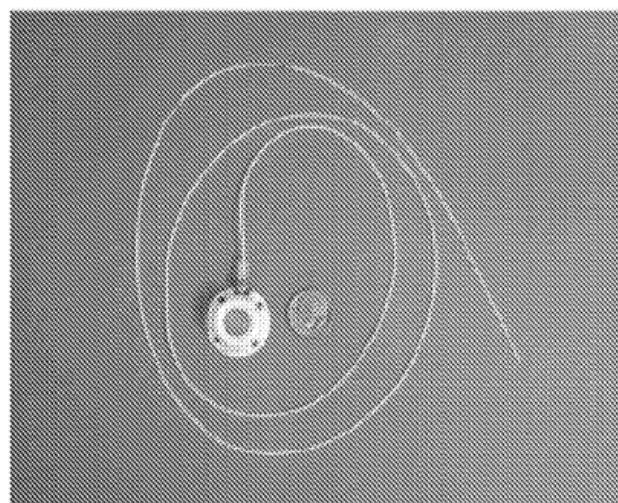
*Fig. 49*



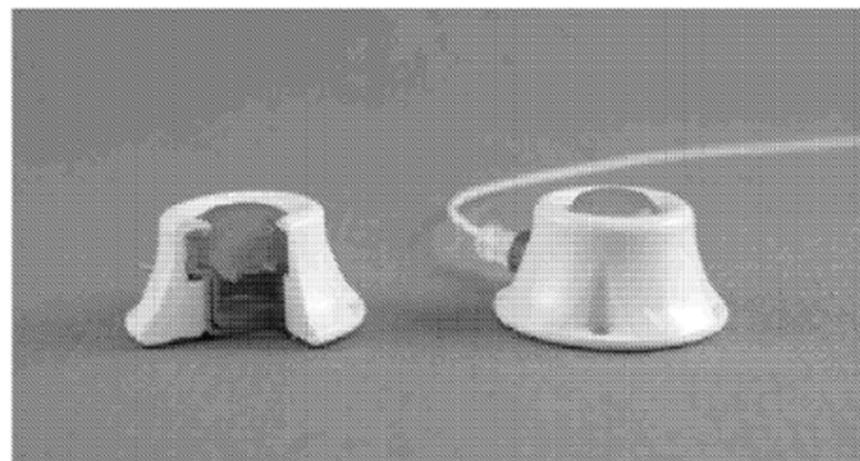
*Fig. 50*



*Fig. 51*



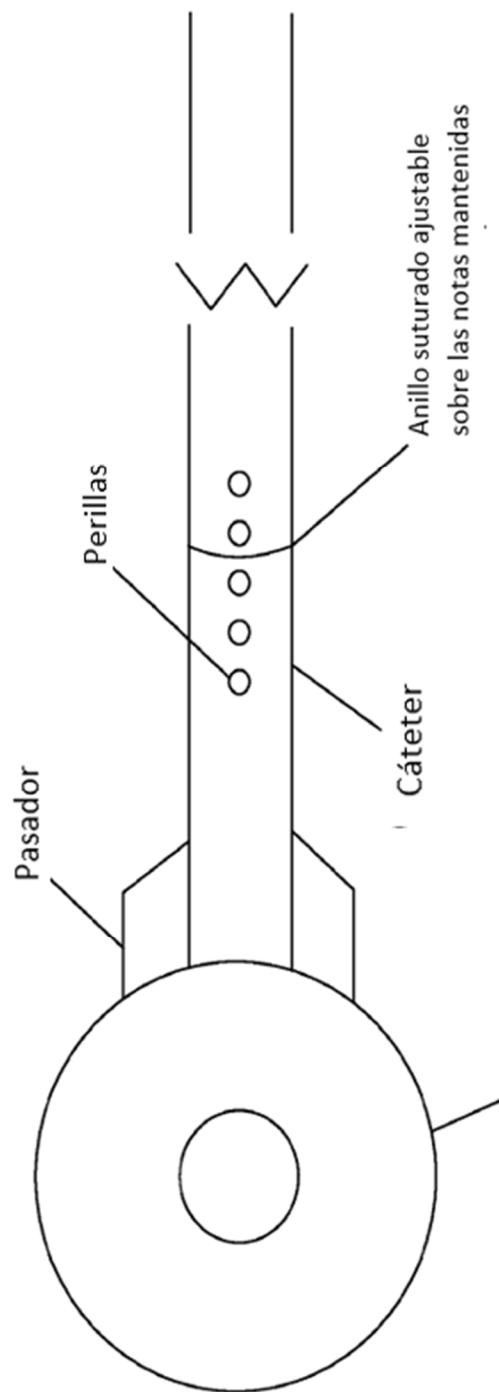
*Fig. 52*



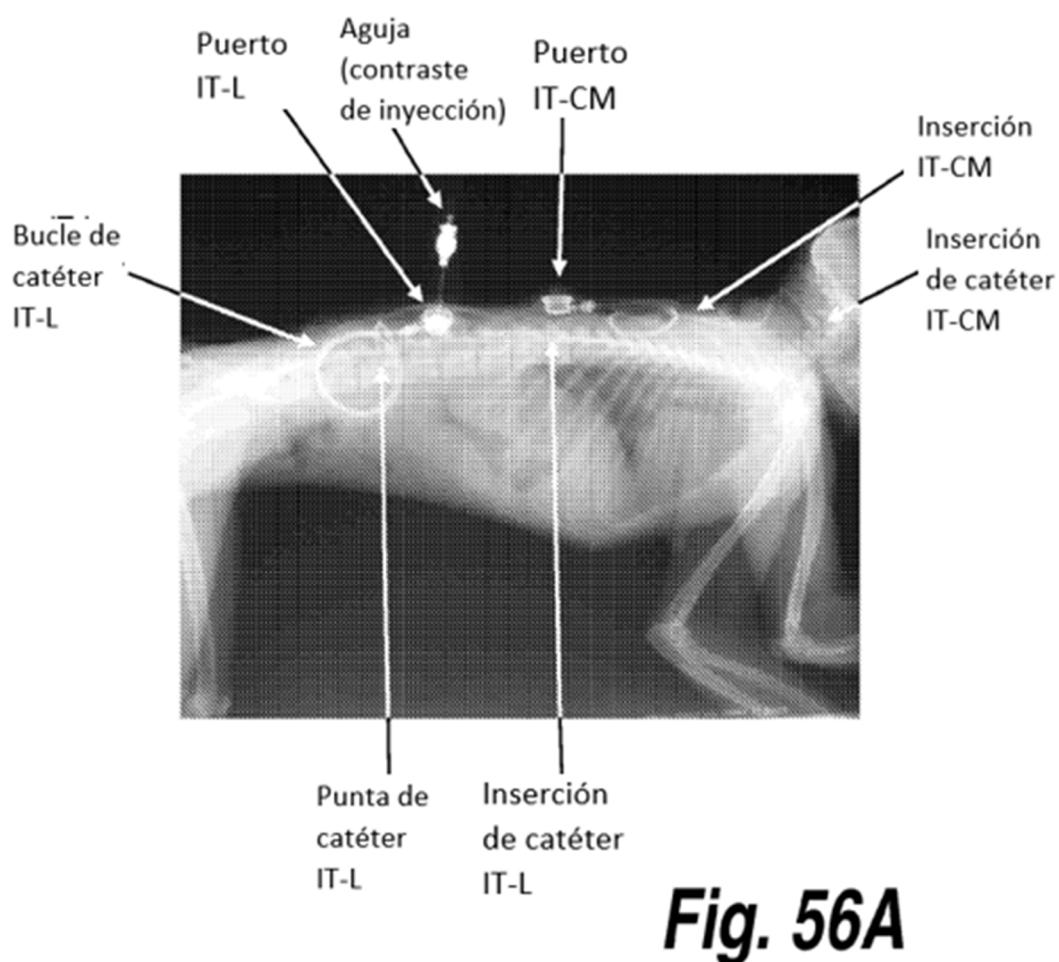
**Fig. 53**



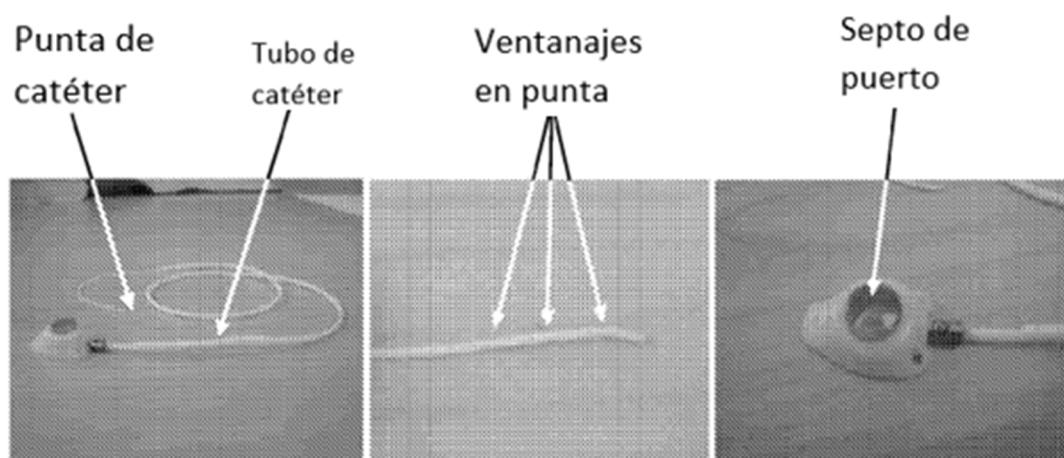
**Fig. 54**



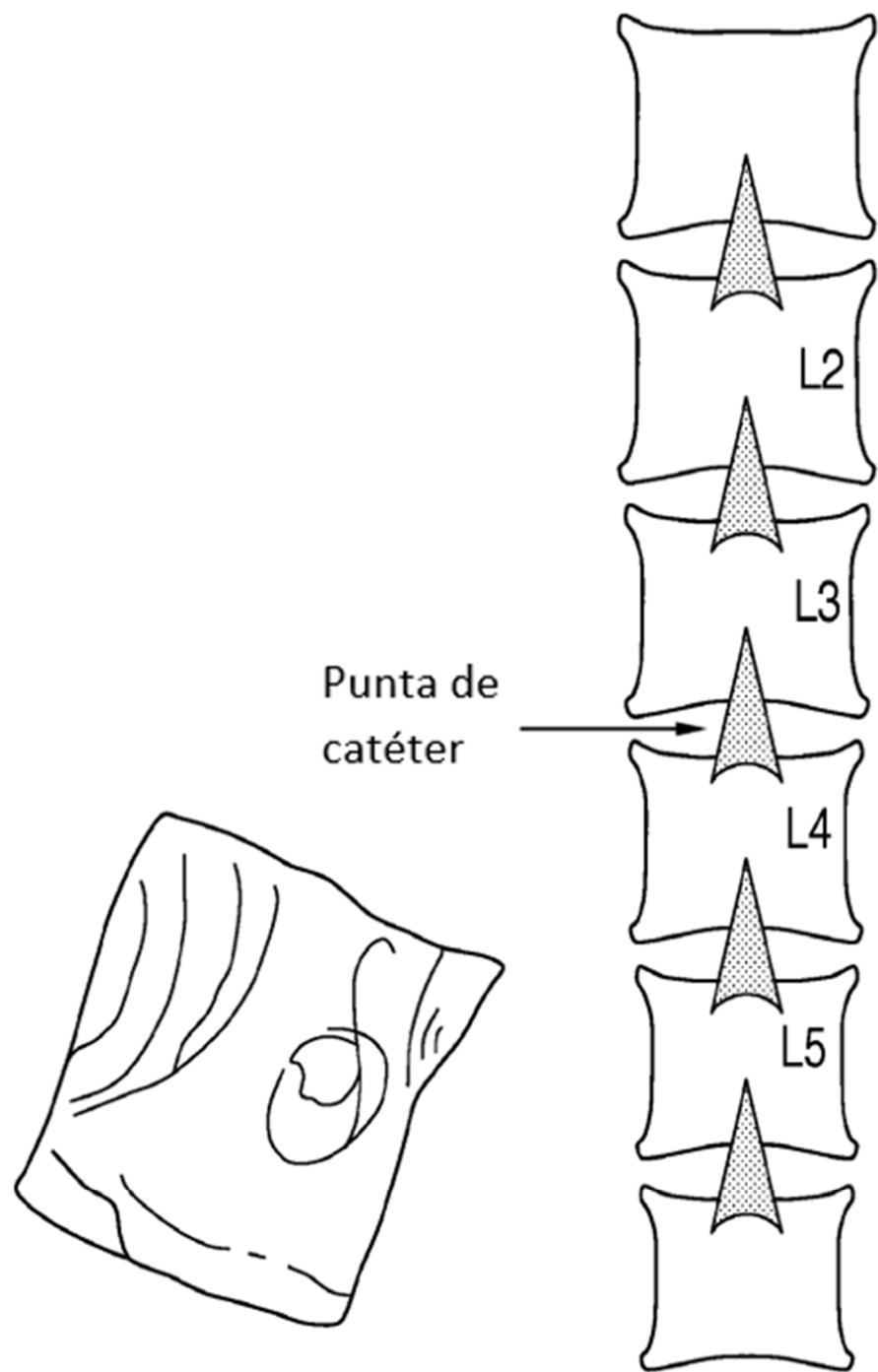
**Fig. 55**



**Fig. 56A**



**Fig. 56B**



**Fig. 56C**