



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-092089- -00000-0000

Fecha: 2013-04-09 16:21:31
Tra. 11 PATENTEIYI
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 150

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____

USO DE ACIDO LIPASA LISOSOMAL PARA TRATAR

LA DEFICIENCIA DE ACIDO LIPASA LISOSOMAL EN

PACIENTES

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____

SYNAGEVA BIOPHARMA CORP.

DOMICILIO _____

LEXINGTON, MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO _____

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C., _____



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-092089- -00000-0000

Fecha: 2013-04-09 16:21:31
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 150

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención	☐ Patente de Modelo de Utilidad
		☒ Capítulo I	☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
	Solicitud Internacional No.	PCT/US2011/051096	Fecha 2011/09/09
	Publicación Internacional No.	WO 2012/050695 A1	Fecha 2012/04/19
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN		
	USO DE ÁCIDO LIPASA LISOSOMAL PARA TRATAR LA DEFICIENCIA DE ÁCIDO LIPASA LISOSOMAL EN PACIENTES		
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
	A61K 031/135, A61K 031/366, A61K 031/397, A61K 038/046, A61P 003/006		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
	SYNAGEVA BIOPHARMA CORP.		
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
	DIRECCIÓN	128 Spring Street, Suite 520, Lexington, Massachusetts 02421	No. TELÉFONO 3 47 36 11
	CIUDAD	Lexington	CORREO ELECTRÓNICO clientes@cavelier.com
	DEPARTAMENTO/ESTADO	Massachusetts	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
	PAÍS DE RESIDENCIA	Estados Unidos de América	
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
	1. QUINN	Anthony	Británico
	DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:		
8	DATOS INVENTOR (ES)		
	PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD
	1. Estados Unidos de América	Massachusetts	Chestnut Hill
			107 Manet Road, Chestnut Hill, Massachusetts 02467,
	OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)		
	☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.		
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
	APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
	De Páez	Luz Clemencia	C.C . 35.456.344 T.P . 23.555
	DIRECCIÓN	Carrera 4ª No. 72-35	No. TELÉFONO 3 47 36 11
	CIUDAD	BOGOTA	CORREO ELECTRÓNICO cavelier@cavelier.com
	PAÍS	COLOMBIA	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
	(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
	1. U.S.A.	US	61/403,011
	2. U.S.A.	US	61/456,014
	3. U.S.A.	US	61/432,372
			(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
			2010/09/09
			2010/10/29
			2011/01/13

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No. 13-0030605	Fecha: 2013/04/03
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL		
<i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>			
Nombre del Firmante LUZ CLEMENCIA DE PAEZ		Firma 	
C.C. 35.456.344 de Usaquen		Tarjeta Profesional 23.555	

JGG\SDC\ID-AF239339\WPC20095

17	ANEXOS
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: 101 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 65 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 19 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.	Documentación Jurídica 9. ☒ Poder de SYNAGEVA BIOPHARMA CORP. 10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☒ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$500.000. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.



HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD		NUMERO DE RADICACIÓN	
☒ Patente de invención			FECHA DE PRESENTACIÓN	
☐ Patente de Modelo de Utilidad				
4	(71) SOLICITANTE (S)			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
5	DATOS DEL SOLICITANTE			
PAÍS DE RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
TELÉFONO		FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD
6	(72) INVENTOR (ES)			
APELLIDOS		NOMBRE	NACIONALIDAD	
7	DATOS INVENTOR (ES)			
DIRECCIÓN		CIUDAD	DEPARTAMENTO/ESTADO	PAÍS RESIDENCIA
9	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA (AAAA/MM/DD)
4.	U.S.A.	US	PCT/US2011/033699	2011/04/23

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
19 April 2012 (19.04.2012)

(10) International Publication Number
WO 2012/050695 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 38/46 (2006.01) *A61K 31/135* (2006.01)
A61K 31/366 (2006.01) *A61P 3/06* (2006.01)
A61K 31/397 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2011/051096

(22) International Filing Date:

9 September 2011 (09.09.2011)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/403,011 9 September 2010 (09.09.2010) US
61/456,014 29 October 2010 (29.10.2010) US
61/432,372 13 January 2011 (13.01.2011) US
PCT/US2011/033699 23 April 2011 (23.04.2011) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
SYNAGEVA BIOPHARMA CORP. [US/US]; 128
Spring Street, Suite 520, Lexington, Massachusetts 02421
(US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): **QUINN, Anthony**
[GB/US]; 107 Manet Road, Chestnut Hill, Massachusetts
02467 (US).

(74) Agents: **HAANES, Elizabeth et al.**; Sterne Kessler Gold-
stein & Fox P.L.L.C., 1100 New York Avenue, NW,
Washington, DC 20005 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,

GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: USE OF LYSOSOMAL ACID LIPASE FOR TREATING LYSOSOMAL ACID LIPASE DEFICIENCY IN PA-
TIENTS

(57) Abstract: The present invention provides treating LAL deficiency (e.g. Wolman's disease, CESD) comprising administering
to a mammal a therapeutically effective amount o lysosomal acid lipase with an effective dosage frequency. Methods of improving
growth and liver function, increasing LAL tissue concentration, and increasing LAL activity in a human patient suffering from
LAL deficiency are also provided

WO 2012/050695 A1

USO DE ÁCIDO LIPASA LISOSOMAL PARA TRATAR LA DEFICIENCIA DE ÁCIDO LIPASA LISOSOMAL EN PACIENTES

FUNDAMENTO DE LA INVENCION

5

La Deficiencia de Ácido Lipasa Lisosomal (LAL) es una rara enfermedad de almacenamiento lisosomal (LSD) caracterizada por la insuficiencia en la descomposición de ésteres de colesterilo (CE) y triglicéridos (TAG) en lisosomas debido a una

10 deficiencia de la enzima. La deficiencia de LAL se asemeja a otros trastornos de almacenamiento lisosomal con la acumulación de sustrato en un número de tejidos y tipos de células. En la deficiencia de LAL la acumulación está más marcada en células del sistema reticuloendotelial incluyendo las células de

15 Kupffer en el hígado, histiocitos en el bazo y en la lámina propia del intestino delgado. Las células retículo-endoteliales expresan el macrófago manosa/ receptor de N-acetil glucosamina (conocido también como receptor de macrófago manosa, MMR, o CD206), que media la unión, captación celular e

20 internalización de proteínas con GlcNAc o N-glicanos terminados en manosa, y proporciona una vía para la corrección potencial de la deficiencia enzimática en estos tipos de células clave.

La Deficiencia de LAL es una enfermedad de múltiples sistemas que se manifiesta más comúnmente en complicaciones

25 gastrointestinales, hepáticas y cardiovasculares y está asociada con morbilidad y mortalidad significativas. Los efectos clínicos de la Deficiencia de LAL se deben a la acumulación masiva de material lípido en los lisosomas en un número de tejidos y una profunda perturbación del colesterol y

30 los mecanismos homeostáticos de los lípidos, incluyendo aumentos sustanciales en la síntesis de colesterol hepático. La Deficiencia de LAL se presenta como por lo menos dos fenotipos: Enfermedad de Wolman (WD) y Enfermedad de Almacenamiento de Colesteril Éster (CESD).

La Enfermedad de Wolman, nombrada en homenaje al médico que la describió por primera vez, es la presentación más agresiva de la Deficiencia de LAL. Este fenotipo se caracteriza por gastrointestinal y manifestaciones hepáticas incluyendo insuficiencias de crecimiento, mala absorción, esteatorrea, pérdida profunda de peso, linfadenopatía, esplenomegalia y hepatomegalia. La Enfermedad de Wolman es rápidamente progresiva e invariablemente fatal, usualmente dentro del primer año de vida. La revisión del informe de caso indica que la sobrevida más allá de los 12 meses de edad es extremadamente rara para pacientes que se presentan con insuficiencia de crecimiento debido a la Deficiencia de LAL severa en el primer año de vida. En esta forma más agresiva, la insuficiencia de crecimiento es la característica clínica predominante y es un contribuyente clave para la mortalidad precoz. El compromiso hepático según se evidencia en el agrandamiento hepático y elevación de las transaminasas es también común en los bebés.

El diagnóstico de la Enfermedad de Wolman se establece tanto a través de hallazgos físicos como análisis de laboratorio. Normalmente se hospitaliza a los bebés dentro de los dos primeros meses de vida a causa de diarrea, vómitos persistentes, dificultad para alimentarse, crecimiento interrumpido e insuficiencia para desarrollarse. Los hallazgos físicos incluyen distensión abdominal con hepatomegalia y esplenomegalia, y el examen radiológico con frecuencia revela calcificación de las glándulas adrenales. Las evaluaciones de laboratorio normalmente revelan niveles elevados de transaminasas séricas y actividad ausente o marcadamente reducida de enzima LAL endógena. Los niveles elevados en sangre de colesterol y triglicéridos se observan en algunos pacientes.

Los pacientes con Deficiencia de LAL también pueden estar presentes en una etapa posterior de la vida con compromiso cardiovascular y hepático predominante, y esto con frecuencia

se denomina Enfermedad de Almacenamiento de Colesterol Éster (CESD). En CESD, el hígado se ve afectado severamente con hepatomegalia marcada, necrosis de hepatocitos, elevación de las transaminasas, cirrosis, y fibrosis hepática. Debido a los niveles aumentados de CE y TAG, el compromiso cardiovascular puede caracterizarse por hiperlipidemia. Una acumulación de los depósitos grasos en las paredes arteriales (ateroesclerosis) se ha informado en algunos sujetos que sufren de CESD. Los depósitos estrechan el lumen arterial y pueden conducir a la oclusión de los vasos aumentando el riesgo de eventos cardiovasculares significativos incluyendo infarto de miocardio e infartos. Sin embargo, no todos los sujetos que sufren de Deficiencia de LAL desarrollan aterosclerosis. Por ejemplo, los pacientes con Enfermedad de Wolman se ven agobiados con otros síntomas asociados con la enfermedad, incluyendo agrandamiento del hígado y el bazo, linfadenopatía, y la mala absorción del intestino delgado, pero WD no se caracteriza generalmente por la aterosclerosis. (*The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. and Valle D., eds.) 7th ed., Volume 2 p.2570 McGraw Hill, 1995). Del mismo modo, no todos los pacientes con CESD exhiben aterosclerosis. Ver, Di Bisceglie et al., *Hepatology* 11: 764-772 (1990), Ameis et al., *J. Lipid Res.* 36: 241-250 (1995). La presentación de CESD es altamente variable con algunos pacientes que no reciben diagnóstico hasta que las complicaciones se manifiestan en la adultez, mientras que otros pueden tener disfunción hepática que se presenta en la niñez. La CESD está asociada con una reducción de la expectativa de vida y enfermedad significativa. La expectativa de vida de aquellos que sufren de CESD depende de la severidad de las complicaciones asociadas.

Las opciones de tratamiento actuales para la Enfermedad de Wolman son muy limitadas. Los antibióticos se administran a los bebés con pirexia y/o evidencia de infección. Puede

prescribirse terapia de reemplazo de esteroides para la insuficiencia adrenal y soporte nutricional especializado, y a la vez que no hay evidencia de que estas intervenciones previenen la muerte, también resulta poco claro si tienen un

5 impacto sobre la sobrevida a corto plazo. En una serie de cuatro pacientes con Deficiencia de LAL tratados con trasplante de médula ósea, la totalidad de los cuatro pacientes murieron debido a complicaciones del procedimiento luego de algunos meses del trasplante. Aunque se ha descrito cierto éxito en

10 informes de caso posteriores, el índice de mortalidad permanece alto y muchos pacientes no se trasplantan ya que están demasiado enfermos para sobrevivir al régimen de acondicionamiento previo al trasplante. El número muy pequeño de sobrevivientes informados a largo plazo indica realmente que

15 la corrección de la deficiencia enzimática en células hemopoyéticas es suficiente para mejorar sustancialmente el estado clínico de esta enfermedad. Normalmente se proporciona soporte clínico a través de restricciones dietarias en un intento por restringir la construcción de lípidos no

20 susceptibles de transportarse o catabolizarse asociados con las manifestaciones agudas de enfermedad que conduce a la muerte.

Las opciones actuales de tratamiento para el fenotipo de CESD se centran en el tratamiento sintomático a través del control de la acumulación de lípidos a través de la dieta que

25 excluye alimentos ricos en colesterol y triglicéridos y la supresión de la síntesis de colesterol y la producción de apolipoproteína B a través de la administración de medicamentos que reducen el colesterol (por ej., estatinas y colestiramina). Aunque puede observarse cierta mejora clínica, las

30 manifestaciones subyacentes de la enfermedad persisten y ocurre incluso progresión de la enfermedad.

Se ha sugerido que la terapia de reemplazo enzimático con LAL recombinante puede ser una opción de tratamiento viable para la deficiencia de ácido lipasa lisosomal y afecciones

relacionadas (ver, Meyers et al. (1985) *Nutrition Res.* 5(4):423-442; WO9811206; y Besley (1984) *Clinical Genetics* 26:195-203). Algunos estudios que utilizan un modelo de ratón de Deficiencia de LAL han demostrado corrección de algunas anormalidades de ratones con deficiencia de LAL (LAL^{-/-}) a través de la infusión de dosis altas (más de 1 miligramo por kilogramo de peso corporal) de LAL humano recombinante una vez cada 3 días (ver, por ejemplo, Grabowski US 2007/0264249). Estos estudios anteriores para corregir los defectos dentro de ratones con deficiencia de LAL sugirieron que se requerían cantidades relativamente altas y dosificaciones frecuentes de proteína LAL recombinante para corregir los fenotipos subyacentes. También es importante observar que, a diferencia del modelo de rata LAL^{-/-} descrito inicialmente por Yoshida y Kuriyama (1990) *Laboratory Animal Science*, vol 40, p 486-489, el modelo de ratón LAL^{-/-} usado en el estudio anterior no se asemeja demasiado a la WD humana en el sentido que los ratones con deficiencia de LAL no exhiben defectos de crecimiento como se observa en pacientes humanos.

Hasta la actualidad, no se ha administrado LAL exógeno a humanos y no hay un tratamiento efectivo disponible para tratar deficiencias de LAL incluyendo WD, CESD, y otras. Por lo tanto, hay una fuerte necesidad de lograr tratamientos con una minimizada frecuencia de administración con el fin de mejorar la calidad de vida para los pacientes. Además, se desean las dosis terapéuticamente efectivas que recuperan el crecimiento, normalizan la función hepática, aumentan las concentraciones de LAL en tejidos, y aumentan la actividad de LAL en pacientes humanos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se basa en los primeros casos clínicos humanos en los cuales los pacientes recibieron exitosamente una dosis de LAL exógeno. Un bebé que sufría de Deficiencia de LAL de otro modo fatal (Enfermedad de Wolman, o

inicio temprano de Deficiencia de LAL) recibió tratamiento en forma efectiva por medio de la administración de LAL exógeno, y la evaluación de seguridad de terapia de reemplazo de la enzima de LAL se evaluó en un grupo de pacientes humanos que sufrían inicio tardío de la deficiencia de LAL. El bebé con inicio temprano de Deficiencia de LAL recibió la administración semanal de dosis sin generar ningún evento adverso o reacción. Se observaron mejoras drásticas en los signos vitales y mediciones de laboratorio / clínicas para determinar la eficacia, tan pronto como una o dos semanas después de la administración inicial. Luego de más de 4 meses de administración semanal, el bebé tratado había recuperado su crecimiento normal y exhibía mejoras significativas en todos los síntomas relacionados con deficiencia de LAL incluyendo mala absorción, hepatomegalia, y función hepática. Los pacientes adultos con comienzo tardío también han recibido dosis semanales de bajas cantidades de LAL exógeno, sin signos de eventos adversos. Por lo tanto, los datos clínicos recolectados hasta la fecha muestran que la terapia de reemplazo de enzimas que utiliza el LAL exógeno de la presente invención provee tratamiento seguro y efectivo para la deficiencia de LAL.

Como consecuencia, la presente invención provee métodos de tratamiento de enfermedades o afecciones asociadas con deficiencia de LAL en pacientes humanos por medio de la administración de una cantidad efectiva de ácido lipasa lisosomal exógeno (LAL). El LAL exógeno puede ser un LAL humano recombinante que tiene una estructura de glicano N-ligado que comprende por lo menos una manosa y/o manosa-6-fosfato. El LAL exógeno se internaliza en forma efectiva en el lisosoma de, por ej., linfocitos, macrófagos y/o fibroblastos.

En algunas realizaciones, el paciente humano que sufre de deficiencia de LAL recibe el diagnóstico de Enfermedad de

Wolman (WD). En una realización, la es suficiente para aumentar el crecimiento de un paciente con WD. En una realización, la administración es suficiente para recuperar el crecimiento normal del paciente con WD. En otras

5 realizaciones, el paciente humano que sufre de deficiencia de LAL recibe el diagnóstico de enfermedad de almacenamiento de colesteril éster (CESD). Los métodos de tratamiento de acuerdo con la presente invención pueden aplicarse a pacientes humanos de cualquier edad.

10 También se proveen aquí métodos para el tratamiento de un paciente humano que sufre de deficiencia de LAL por medio de la administración de LAL humano recombinante al paciente en una cantidad efectiva para mejorar la función hepática. En algunas realizaciones, la administración es suficiente para normalizar

15 los análisis hepáticos. En una realización, la administración es suficiente para reducir los niveles séricos de las transaminasas hepáticas. Por ejemplo, las transaminasas hepáticas pueden incluir transaminasa aspartato sérico (AST) y/o alanina transaminasa (ALT). En una realización, la

20 administración es suficiente para minimizar la hepatomegalia. En una realización, la administración es suficiente para reducir el tamaño del hígado del paciente. En una realización, la administración es suficiente para reducir los niveles de ferritina sérica.

25 En una realización, la administración es suficiente para reducir los niveles de lípidos, incluyendo, por ejemplo, los niveles de colesteril éster (CE) y/o triglicéridos (TG).

Se provee además un método de aumento de la actividad de LAL en un paciente humano con una deficiencia de LAL. Dicho

30 método comprende administrar un LAL humano recombinante al paciente de modo que la administración genere un aumento de la actividad de LAL, como puede medirse, por ejemplo, en linfocitos y/o fibroblastos.

En una realización, se describe un método de tratamiento de una afección asociada con deficiencia de LAL en un paciente humano por medio de la administración de una cantidad efectiva de proteína de LAL exógeno al paciente una vez cada 5 días hasta una vez cada 30 días.

En algunas realizaciones, el paciente humano que sufre de deficiencia de LAL recibe una dosis de alrededor de 0,1 mg hasta alrededor de 50 mg de LAL exógeno por kilogramo de peso corporal. En una realización, el paciente humano recibe una dosis de alrededor de 0,1 mg hasta alrededor de 10 mg de LAL exógeno por kilogramo de peso corporal. En una realización, el paciente humano recibe una dosis de alrededor de 0,1 mg hasta alrededor de 5 mg de LAL exógeno por kilogramo de peso corporal.

En una realización, una velocidad de infusión es de entre alrededor de 0,1 mg/kg/hr y alrededor de 4 mg/kg/hr.

En algunas realizaciones, el paciente humano se trata con un segundo agente terapéutico. El segundo agente terapéutico puede incluir, por ejemplo, un fármaco reductor del colesterol (por ej., estatina o ezetimibe), una anti histamina (por ej., difenhidramina), o un inmunosupresor.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1A muestra los niveles de aspartato transaminasa sérica (AST) de un paciente infantil masculino con Enfermedad de Wolman (es decir, inicio temprano de la Deficiencia de LAL) quien recibió administración semanal de LAL exógeno (SBC-102) (dosis: 0,2 mg/kg (infusión inicial; semana 0); 0,3 mg/kg (semana 1); 0,5 mg/kg (semana 2); y 1,0 mg/kg (semanas 3-8)). La Figura 1B muestra niveles de alanina transaminasa sérica (ALT) del mismo paciente. El paciente tenía 4 meses y 1 semana de vida en el momento de la infusión inicial.

La Figura 2 muestra los niveles séricos de ferritina del paciente con Enfermedad de Wolman quien recibió administración semanal de LAL exógeno (SBC-102) (dosis: 0,2 mg/kg (infusión inicial; semana 0); 0,3 mg/kg (semana 1); 0,5 mg/kg (semana 2); y 1,0 mg/kg (semanas 3-8)). El paciente tenía 4 meses y 1 semana de vida en el momento de la infusión inicial. Los niveles de ferritina sérica se muestran desde la semana 1 después de la dosificación inicial a la semana 0.

La Figura 3 muestra la velocidad de crecimiento del paciente con Enfermedad de Wolman quien recibió administración semanal de LAL exógeno (SBC-102) (dosis: 0,2 mg/kg (infusión inicial; semana 0); 0,3 mg/kg (semana 1); 0,5 mg/kg (semana 2); y 1,0 mg/kg (semanas 3-8)).

La Figura 4 muestra una curva de crecimiento del paciente con Enfermedad de Wolman (kg, percentiles de peso para la edad para niños).

La Figura 5 muestra los niveles séricos de AST de un paciente con CESD de sexo masculino de 41 años de edad quien recibió dosis semanales de 0,35 mg/kg de LAL exógeno.

La Figura 6 muestra niveles séricos de ALT de un paciente con CESD de sexo masculino de 41 años de edad quien recibió dosis semanales de 0,35 mg/kg de LAL exógeno.

La Figura 7 muestra niveles séricos de albúmina de un paciente con CESD de sexo masculino de 41 años de edad quien recibió dosis semanales de 0,35 mg/kg de LAL exógeno.

La Figura 8 muestra los niveles séricos de ferritina de un paciente con CESD de sexo masculino de 41 años de edad quien recibió dosis semanales de 0,35 mg/kg de LAL exógeno.

La Figura 9 ilustra el índice de aumento de peso en cuatro ratas macho, agrupadas por edad cada una asignada a los siguientes cuatro regímenes de dosificación de LAL exógeno: 1 mg por kilogramo una vez por semana, 5 mg por kilogramo una vez por semana, 5 mg por kilogramo una vez cada 2 semanas, o

placebo. Los números dentro de las columnas representan días después del nacimiento.

La Figura 10 muestra los resultados del examen patológico e histo-patológico de una rata con deficiencia de LAL, de control tipo salvaje tratada con LAL exógeno, y una rata con deficiencia de LAL tratada con placebo. La patología en general demuestra una normalización de color y tamaño del hígado en ratas tratadas con LAL exógeno. Histopatología de tejido hepático de ratas tratadas con LAL exógeno muestra histología hepática esencialmente normal en marcado contraste con la acumulación sustancial de macrófagos espumosos en los animales tratados con placebo.

La Figura 11 muestra la co-localización de LAL humano recombinante (SBC-102) y marcador lisosomal en los lisosomas de células examinadas por microscopio con fluorescencia confocal usando un modo de barrido secuencial.

La Figura 12 muestra la especificidad de unión de LAL humano recombinante (SBC-102) al receptor de manosa/ GlcNAc evaluados por ensayos de unión competitiva usando la línea celular de macrófago, NR8383.

La Figura 13 muestra la actividad de LAL humano recombinante en células, en células normales y con deficiencia de LAL *in vitro*.

La Figura 14 ilustra el efecto del tratamiento con LAL humano recombinante (SBC-102) en la masa de órganos internos de ratas con deficiencia de LAL. El tamaño del órgano está representado por porcentaje de peso corporal determinado a las 8 semanas de vida, en ratas LAL-/- y ratas LAL+/+ luego de la administración semanal de vehículo o SBC-102 at 5 mg/kg durante 4 semanas.

La Figura 15 ilustra el peso corporal en ratas tipo salvaje y con deficiencia de LAL luego de la administración semanal de vehículo o SBC-102 a 5 mg·kg⁻¹ durante 4 semanas.

La administración de la dosis se resalta en el eje X por diamantes que comienzan en la 4ta semana.

La Figura 16 muestra niveles de colesterol hepático, colesteril éster y triglicérido determinado a las 8 semanas de vida en WT y ratas con deficiencia de LAL luego de la administración semanal de vehículo o SBC-102 a $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ durante 4 semanas.

La Figura 17 muestra el porcentaje de aumento del peso corporal en ratas con deficiencia de LAL.

La Figura 18 muestra el peso del hígado, como porcentaje del peso corporal, en ratas con deficiencia de LAL después de la administración de SBC-102 durante 4 semanas.

La Figura 19 ilustra los niveles de colesteril éster en los tejidos en ratas con deficiencia de LAL después de la administración de SBC-102 durante 4 semanas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos de tratamiento de un humano que sufre una enfermedad o afección que es sensible a la administración de ácido lipasa lisosomal exógeno.

Definiciones

Como conveniencia, ciertos términos empleados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones anexas, se establecen aquí para ilustrar y definir el significado y el alcance de los varios términos usados para describir la presente invención.

"LAL" como se usa aquí se refiere a "ácido lipasa lisosomal," y los dos términos se usan en forma indistinta en toda la memoria descriptiva. El LAL puede ser una proteína humana, es decir, ácido lipasa lisosomal humano. El término "SBC-102," como se usa aquí, se refiere a un ácido lipasa lisosomal humano recombinante. LAL se refiere, además, en la literatura a ácido colesteril éster hidrolasa, colesteril esterasa, Lipasa A, LIPA, y esteroil esterasa.

El LAL cataliza la hidrólisis de ésteres de colesterol y triglicéridos en colesterol libre, glicerol, y ácidos grasos libres. De este modo, la "Actividad de LAL" puede medirse, por ejemplo, por la descomposición del sustrato fluorogénico, 4-
5 metilumbelilferil oleato (4MUO). La descomposición de 4MUO puede detectarse, por ejemplo, por excitación a alrededor de 360 nm y emisión a 460 nm del fluoróforos liberado, 4-metilumbeliferona (4MU). Los resultados pueden informarse en unidades de fluorescencia relativa (RFU). Por ejemplo, la
10 cantidad de sustrato descompuesto en un ensayo de parámetros de 30 minutos puede cuantificarse con relación a una curva estándar de 4MU, y una unidad (U) de actividad puede definirse como la cantidad de enzima requerida para descomponer 1 micromol de 4MUO por minuto a 37 °C. Como consecuencia, los
15 fragmentos o variantes funcionales de LAL incluyen fragmentos o variantes que tienen Actividad de LAL, por ej., la capacidad de hidrolizar ésteres de colesterol y/o triglicéridos.

Como se usa aquí "LAL exógeno" se refiere a LAL que no es producido en forma natural por un paciente. Por ejemplo, LAL
20 exógeno incluye proteína LAL recombinante que se administra a un paciente, la proteína LAL que se aísla de una persona o animal y se administra a un paciente, y la proteína LAL que se produce (es decir, se expresa) en un paciente como resultado de la administración de ARN y/o ADN que codifica LAL u otro
25 tratamiento que aumenta la expresión de proteína LAL endógena.

"Inyección intravenosa," con frecuencia denominada desde el punto de vista médico inyección en bolo o por impulso IV, se refiere a una vía de administración en la cual una jeringa se conecta al dispositivo de acceso IV y la medicación se inyecta
30 directamente, normalmente en forma rápida y ocasionalmente hasta un período de 15 minutos si pudiera causar irritación de la vena o un efecto demasiado rápido. Una vez que el medicamento se ha inyectado en el chorro de fluidos de la sonda IV, debe haber algunos medios de asegurar que pase de la sonda

al paciente. Usualmente esto se logra permitiendo que el caudal de fluido fluya normalmente y de este modo transporte el medicamento al torrente sanguíneo. Sin embargo, en algunos casos una segunda inyección de fluido, en ocasiones denominado "enjuague," se usa después de la primera inyección para facilitar el ingreso del medicamento en el torrente sanguíneo.

"Infusión intravenosa" se refiere a una vía de administración en la cual la medicación se administra durante un período extendido de tiempo. Por ejemplo, la medicación puede administrarse a un paciente durante un período de tiempo entre 1 y 8 horas. La medicación también puede administrarse a un paciente durante un período de alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, o alrededor de 8 horas. Para lograr una infusión intravenosa, puede usarse un gotero por gravedad IV o un bombeador IV. Normalmente se usa infusión IV cuando un paciente requiere medicaciones sólo en determinados momentos y no requiere fluidos intravenosos adicionales (por ej., soluciones acuosas que pueden contener sodio, cloruro, glucosa o cualquier combinación de los anteriores) tales como aquellas que recuperan los electrolitos, el azúcar en sangre y la pérdida de agua.

El término "ave" como se usa aquí se refiere a cualquier especie, sub-especie o raza de organismo de las aves de clase taxonómica, tales como, sin carácter limitativo pollos, pavo, pato, ganso, codorniz, faisanes, loros, pinzones, águilas, cuervos, y rátidas incluyendo avestruz, emú y casuario. El término incluye las varias cepas conocidas de *Gallus*, o pollos (por ejemplo, White Leghorn, Brown Leghorn, Barred-Rock, Sussex, New Hampshire, Rhode Island, Australorp, Minorca, Amrox, California Gray), así como también cepas de pavos, faisanes, codornices, pato, avestruces, y otras aves de corral normalmente criadas en cantidades comerciales. Esto también

incluye un organismo de ave individual en todas las etapas de desarrollo, incluyendo etapas fetales y embrionarias.

El término " derivado de las aves de corral " o "derivado de las aves" se refiere a una composición o sustancia producida por u obtenida de aves de corral. "Aves de corral" se refiere a aves que pueden mantenerse como animales de granja, incluyendo sin carácter limitativo, pollos, pato, pavo, codorniz y rátidas. Por ejemplo, "derivado de las aves de corral" puede referirse a derivados de pollos, derivados de pavo y/o derivados de codorniz.

El término "paciente" como se usa aquí se refiere a cualquier persona que recibe o que ha recibido o debe recibir cuidado o tratamiento médico, por ej., como el proporcionado por el profesional de la salud.

"Dosis terapéuticamente efectiva" como se usa aquí se refiere a la dosis (por ej., cantidad y/o intervalo) de fármaco requerido para producir una respuesta terapéutica pretendida. A dosis terapéuticamente efectiva se refiere a una dosis que, cuando se compara con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha dosis, produce una mejora en el tratamiento, curación, prevención, o alivio de una enfermedad, trastorno, o efecto colateral, o una reducción en el índice de ocurrencia o avance de una enfermedad o trastorno. El término incluye, además, dentro de su alcance, dosis efectivas para potenciar las funciones fisiológica.

Los términos "tratar," "tratar," y "tratamiento" se refieren a métodos de aliviar, abatir, o atenuar una enfermedad o síntoma, prevenir un síntoma adicional, atenuar o prevenir una causa subyacente de un síntoma, inhibir una enfermedad o afección, detener el desarrollo de una enfermedad o afección, aliviar una enfermedad o afección, producir regresión de una enfermedad o afección, aliviar una afección causada por la enfermedad o afección, o detener un síntoma de la enfermedad o

afección ya sea en forma profiláctica y/o después de que ha ocurrido el síntoma.

Como se usa aquí con referencia a una dosis particular, "kg⁻¹", "por kg", "/kg," y "por kilogramo" representan "por
5 kilogramo del peso corporal" del mamífero, y de este modo los términos pueden usarse en forma indistinta.

Como se usa aquí, el término "polipéptido" pretende abarcar un "polipéptido" singular así como también "polipéptidos," en plural y se refiere a una molécula compuesta
10 por monómeros (aminoácidos) ligados en forma lineal por enlaces de amida (conocidos también como enlaces de péptidos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, y no se refieren a una longitud específica del producto. De este modo, péptidos, dipéptidos,
15 tripéptidos, oligopéptidos, "proteínas," "cadenas de aminoácidos," o cualquier otro término usado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, se incluyen dentro de la definición de "polipéptido," y el término "polipéptido" puede usarse en su lugar, o en forma indistinta
20 con cualquiera de estos términos. El término "polipéptido" también pretende referirse a los productos de modificaciones post-expresión del polipéptido, incluyendo sin limitación glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por medio de cualquier grupo protector/ de
25 bloqueo conocido, disociación proteolítica o modificación por aminoácidos no naturales. Un polipéptido puede derivar de una fuente biológica natural o producirse por tecnología recombinante, pero no se traduce esencialmente de una secuencia designada de ácido nucleico. Puede generarse de cualquier modo,
30 incluyendo síntesis química.

Como se usa aquí, el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos o dos secuencias de nucleótidos es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre las dos

secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología= # de posiciones idénticas/total # de posiciones X 100), teniendo en cuenta el número de separaciones, y la longitud de cada separación, que necesita introducirse para una óptima alineación de las dos secuencias. La comparación de secuencias y determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede lograrse usando un algoritmo matemático, como se describe a continuación en los ejemplos no limitativos.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)), que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2,0), usando una tabla de residuo de peso PAM120, una penalidad de longitud de separación de 12 y una penalidad de separación de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete informático GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando tanto una matriz Blossom 62 como una matriz PAM250, y un peso de separación de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

Por un polipéptido "aislado" o un fragmento, variante, o derivado de los anteriores se entiende un polipéptido que no está en su medio natural. No se requiere ningún nivel particular de purificación. Por ejemplo, un polipéptido aislado puede eliminarse de su entorno natural o de origen. Los polipéptidos y proteínas producidos en forma recombinante expresados en las células huésped se consideran aislados como se divulga aquí, ya que son polipéptidos recombinantes o nativos que se han separado, fraccionado, o purificado parcial o sustancialmente por cualquier técnica apropiada.

Otros polipéptidos divulgados aquí son fragmentos, derivados, análogos, o variantes de los polipéptidos que

antecedentes, y cualquier combinación de los anteriores. Los términos "fragmento," "variante," "derivado" y "análogo" cuando se refiere a cualquiera de los polipéptidos divulgados aquí incluyen cualquier polipéptido que mantenga por lo menos parte de la actividad del polipéptido nativo correspondiente (por ej., fragmentos, variantes, derivados, y análogos de polipéptido LAL que mantienen la capacidad de hidrolizar ésteres de colesterol y/o triglicéridos). Los fragmentos de polipéptidos incluyen, por ejemplo, fragmentos proteolíticos, así como también fragmentos de eliminación. Las variantes de un polipéptido incluyen fragmentos como se describió con anterioridad, y también polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas debido a sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos. Las variantes pueden ocurrir naturalmente o no ocurrir en forma natural. Las variantes no naturales pueden producirse usando técnicas de mutagénesis conocidas en el arte. Los polipéptidos variantes pueden comprender sustituciones, eliminaciones o incorporaciones de aminoácidos conservadores o no conservadores. Los derivados son polipéptidos que se han alterado para exhibir características adicionales que no se encuentran en el polipéptido nativo. Ejemplos incluyen proteínas de fusión. Los polipéptidos variantes también pueden denominarse aquí "análogos de polipéptido." Como se usa aquí, un "derivado" de un polipéptido sujeto puede contener uno o más residuos derivados en forma química por reacción de un grupo lateral funcional. También se incluyen como "derivados" son aquellos péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos naturales de los veinte aminoácidos estándar. Por ejemplo, 4-hidroxiprolina puede sustituirse en lugar de prolina; 5-hidroxilisina puede sustituirse en lugar de lisina; 3-metilhistidina puede sustituirse en lugar de histidina; homoserina puede sustituirse en lugar de serina; y/o ornitina puede sustituirse en lugar de lisina.

El término "polinucleótido" pretende abarcar un ácido nucleico en singular así como también ácidos nucleicos en plural, y se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislado, por ej., ARN mensajero (ARNm) o ADN plásmido (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ej., un enlace amida, tales como se encuentra en los ácidos nucleicos polipeptídicos (PNA)). El término "ácido nucleico" se refiere a cualquiera de uno o más segmentos de ácido nucleico, por ej., fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido. Por ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha eliminado de su entorno de origen. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica el LAL contenido en un vector se considera aislado para los fines de la presente invención. Ejemplos adicionales de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterólogas o polinucleótidos modificados (en forma parcial o sustancial) en solución. Las moléculas de ARN aislado incluyen transcripciones de ARN *in vivo* o *in vitro* de polinucleótidos de la presente invención. Los polinucleótidos o aislados ácido nucleicos de acuerdo con la presente invención además incluyen dichas moléculas producidas sistemáticamente. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulatorio tal como un promotor, sitio de unión a ribosomas, o un terminador de transcripción.

Como se usa aquí, una "región de codificación" es una porción de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de detención" (TAG, TGA, o TAA) no se traduce en un aminoácido, puede considerarse que es parte de una región de codificación, pero cualquier secuencia que lo rodea, por ejemplo promotores, sitios de unión a los ribosomas, terminadores de transcripción, intrones, y similares, no son parte de una región de codificación. Dos o más regiones de

codificación de la presente invención pueden estar presentes en una única construcción de polinucleótidos, por ej., en un vector simple, o en construcciones separadas de polinucleótidos, por ej., en vectores separados (diferentes).

5 En forma adicional, cualquier vector puede contener una región de codificación simple, o puede comprender dos o más regiones de codificación. Además, un vector, polinucleótido, o ácido nucleico de la invención pueden codificar regiones de codificación heterólogas, ya sea fusionadas o no fusionadas a
10 un ácido nucleico que codifica a polipéptido LAL o fragmento, variante, o derivado de los anteriores. Las regiones de codificación heterólogas incluyen sin limitación elementos o motivos especializados, tales como un péptido de señal secretorio o un dominio funcional heterólogo.

15 Una variedad de regiones de control de transcripción resulta conocida para aquellas personas con experiencia en el arte. Estas incluyen, sin limitación, regiones de control de transcripción que funcionan en las células de los vertebrados, tales como, sin carácter limitativo, segmentos promotor y
20 potenciador de citomegalovirus (el promotor de inicio inmediato, en conjunción con intrón A), virus de simio 40 (el promotor de inicio), y retrovirus (tales como virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de transcripción incluyen aquellas derivadas de genes de vertebrados tales como actina,
25 proteína de shock térmico, hormona de crecimiento de bovino y β -globina de ratón, así como también otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucarióticas. Las regiones apropiadas de control de transcripción adicionales incluyen promotores específicos de tejidos y potenciadores así
30 como también promotores inductores de linfoquina (por ej., promotores inducibles por interferones o interleucinas).

De manera similar, una variedad de elementos de control de traducción resultan conocidos para aquellas personas con experiencia usual en el arte. Estos incluyen, sin carácter

limitativo sitios de unión a los ribosomas, codones de inicio y terminación de la traducción, y elementos derivados de picornaviruses (en particular un sitio de entrada al ribosoma interno, o IRES, también denominado secuencia CITE).

5 En otras realizaciones, un polinucleótido de la presente invención es ARN, por ejemplo, en la forma de ARN mensajero (ARNm).

Las regiones de codificación de polinucleótido y ácido nucleico de la presente invención pueden estar asociadas con
10 regiones de codificación adicionales que codifican los péptidos de señal o secretorios, que dirigen la secreción codificada por un polinucleótido de la presente invención. De acuerdo con la hipótesis de señal, las proteínas secretadas por células de mamíferos tienen una secuencia de líder secretor o péptido de
15 señal que se disocia de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena de proteína creciente a través del retículo endoplasmático. Aquellas personas con experiencia en el arte tienen conocimiento de que los polipéptidos secretados por las células de los vertebrados
20 generalmente tienen un péptido de señal fusionado al N-término del polipéptido, que se disocia del polipéptido completo o "de longitud completa" para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En determinadas realizaciones, el péptido de señal nativo, por ej., se usa el péptido de señal
25 MKMRFLGLVCLVLTWLHSEG (SEC ID NO: 2) de LAL humano, o un derivado funcional de esa que mantiene la capacidad de orientar la secreción del polipéptido que está asociado en forma funcional con éste. En forma alternativa, un péptido de señal heterólogo (por ej., un péptido de señal heterólogo de ave o de
30 mamífero), o un derivado funcional de los anteriores, puede utilizarse. Por ejemplo, la secuencia líder del tipo salvaje puede sustituirse con la secuencia líder de activador de plasminógeno humano (TPA) o β -glucuronidasa de ratón.

"Vector" significa un polinucleótido formado por un ARN o ADN de hebra simple, hebra doble, circular o superbobinado. Un vector típico puede estar formado por los siguientes elementos ligados en forma operativa a las distancias apropiadas para permitir la expresión del gen funcional: origen de replicación, promotor, potenciador, secuencia líder 5' ARNm, sitio de unión al ribosoma, casete de ácido nucleico, sitios de terminación y poliadenilación y secuencias marcadoras seleccionables. Uno o más de estos elementos pueden omitirse en aplicaciones específicas. El casete de ácido nucleico puede incluir un sitio de restricción para inserción de la secuencia de ácido nucleico que se expresará. En un vector funcional el casete de ácido nucleico contiene la secuencia de ácido nucleico que se expresará incluyendo sitios de inicio y terminación de la traducción. Un intrón puede incluirse en forma opcional en la construcción, por ejemplo, 5'' a la secuencia de codificación. Un vector se construye de manera tal que la secuencia de codificación particular esté ubicada en el vector con las secuencias regulatorias apropiadas, el posicionamiento y orientación de la secuencia de codificación con respecto a las secuencias de control de modo tal que la secuencia de codificación se transcribe bajo el "control" de las secuencias de control o regulatorias. La modificación de las secuencias que codifican la proteína particular de interés puede ser deseable para lograr este extremo. Por ejemplo, en algunos casos puede ser necesario modificar la secuencia de manera que pueda unirse a las secuencias de control con la orientación apropiada, o para mantener el marco de lectura. Las secuencias de control y otras secuencias regulatorias pueden ligarse a la secuencia de codificación antes de la inserción en un vector. En forma alternativa, la secuencia de codificación puede clonarse directamente en un vector de expresión que ya contiene las secuencias de control y un sitio de restricción apropiado

que está en el marco de lectura con y bajo control regulatorio de las secuencias de control.

El término "expresión" como se usa aquí se refiere a un proceso por el cual un gen produce un bioquímico, por ejemplo, un polipéptido. El proceso incluye cualquier manifestación de la presencia funcional del gen dentro de la célula incluyendo, sin limitación, knockdown génico así como también tanto expresión transitoria como expresión estable. Incluye sin limitación transcripción del gen en ARN mensajero (ARNm), y la traducción de dicho ARNm en polipéptido(s). La expresión de un gen produce un "producto génico." Como se usa aquí, un producto génico puede ser o bien un ácido nucleico, por ej., un ARN mensajero producido por transcripción de un gen, o un polipéptido que se traduce de una transcripción. Los productos génicos que se describen en esta invención además incluyen ácido nucleicos con modificaciones post-transcripcionales, por ej., poliadenilación, o polipéptidos con modificaciones post traslacionales, por ej., metilación, glicosilación, la incorporación de lípidos, asociación con otras sub-unidades de proteína, separación proteolítica, y similares.

Como se usa aquí, "células huésped" se refiere a células que albergan vectores contruidos usando técnicas de ADN recombinante y que codifican por lo menos un gen heterólogo.

Como se usa aquí los términos "N-glicano," "oligosacárido," "estructura de oligosacárido," "patrón de glicosilación," "perfil de glicosilación," y "estructura de glicosilación" tienen esencialmente el mismo significado y cada uno se refiere a una o más estructuras que se forman a partir de residuos de azúcar y están unidas a las proteínas glicosiladas.

Como se usa aquí, el término "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de un compuesto descrito aquí con otros componentes químicos, tales como vehículos, estabilizadores,

diluyentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes aglutinantes, y/o excipientes.

Pacientes con Insuficiencia de la Actividad de LAL

5 Sin la intención de limitar la invención al tratamiento de cualquier afección particular o grupo de afecciones, la invención incluye el tratamiento de deficiencias ácido lipasa lisosomal (LAL) en pacientes. Como se usa aquí, un paciente con una Deficiencia de LAL es cualquier paciente que tiene
10 insuficiencia de la actividad de LAL. La insuficiencia de la actividad de LAL en el paciente puede, por ejemplo, ser el resultado de bajos niveles de ARN, bajos niveles de proteínas, o baja actividad de proteínas. La insuficiencia de la actividad de LAL puede ser el resultado de una mutación en la
15 secuencia de codificación de LAL, una secuencia regulatoria de LAL, o en otro gen (por ej., un gen que regula LAL). La insuficiencia de la actividad de LAL también puede ser el resultado de factores ambientales.

La presente invención puede usarse para tratar un amplio
20 espectro de afecciones en un sujeto o paciente. Por lo tanto, cualquier afección que pueda tratarse en forma beneficiosa por LAL exógeno de acuerdo con la invención se incluye dentro del alcance de la invención.

Una realización de la invención se centra en el
25 tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosomal (LSDs) que resultan de una deficiencia en el ácido lipasa lisosomal, específicamente Enfermedad de Wolman (WD) y Enfermedad de Almacenamiento de Colesterol Éster (CESD). Sin la intención de limitar la invención a ninguna teoría particular o mecanismo de
30 operación, ambas WD y CESD pueden deberse a mutaciones en el espacio del LAL y producir la acumulación masiva de material lípido en los lisosomas en una cantidad de tejidos y una profunda molestia en el en una cantidad de tejidos y una profunda molestia en los mecanismos homeostáticos de lípidos y

colesterol que pueden tratarse por la administración de LAL exógeno de acuerdo con los métodos de la invención. De este modo, en una realización, la Deficiencia de LAL tratada de acuerdo con la invención es WD. En otra realización, la Deficiencia de LAL tratada de acuerdo con la invención es CESD. En algunas realizaciones, un diagnóstico de WD o CESD se basa en análisis genético (por ej., identificación de una mutación funcional en una secuencia de codificación de LAL). En otras realizaciones, un diagnóstico de WD o CESD se basa en hallazgos clínicos (por ej., análisis físico y/o análisis de laboratorio).

En algunas realizaciones, el LAL exógeno puede usarse para tratar complicaciones en una variedad de afecciones tales como Enfermedad de Hígado Graso No Alcohólico (NAFLD) y Esteatohepatitis No Alcohólica (NASH). NAFLD se refiere a una enfermedad del hígado que tiene histopatología similar a la enfermedad hepática que se debe a la excesiva ingesta de alcohol. Se caracteriza por macrovesicular esteatosis que produce agrandamiento del hígado. La NAFLD puede progresar en NASH que se refiere a una enfermedad del hígado que es similar a NAFLD con el agregado de inflamación y daño al hígado que puede conducir a fibrosis y cirrosis.

En algunas realizaciones, el LAL exógeno puede usarse para tratar afecciones incluyendo pancreatitis, por ejemplo, pancreatitis crónica y/o pancreatitis aguda así como también lesión al páncreas inducida por alcohol tal como pancreatitis inducida por alcohol.

El LAL exógeno producido por cualquier método útil puede usarse para tratar enfermedades producidas por lesión celular inducida por alcohol incluyendo, sin carácter limitativo, aquellas lesiones celulares inducidas por alcohol que producen la acumulación de ésteres de lípidos en tejidos corporales tales como, sin carácter limitativo, tejido hepático, bazo, gota, cardiovascular. De acuerdo con la invención, la mala

absorción también puede tratarse por administración de LAL exógeno. El LAL exógeno también es útil para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Tangier e hipoalfalipoproteinemia familiar. La hipoalfalipoproteinemia familiar/ enfermedad de Tangier está asociada con la acumulación de ésteres de colesterol en macrófagos acompañado por hepatoesplenomegalia y/o linfadenopatía junto con bajos niveles de HDL que pueden tratarse por la administración de LAL exógeno. Por ejemplo, sin la intención de limitar la invención a ninguna teoría particular o mecanismo de operación, la insuficiencia en la Actividad de LAL puede reducir la expresión de ABCA1 y por el contrario un aumento en Actividad de LAL obtenida por la administración de LAL exógeno a un paciente con hipoalfalipoproteinemia familiar/ enfermedad de Tangier aumentará la expresión de ABCA1 para superar los efectos de un gen de ABCA1 con una reducida actividad funcional como resultado de polimorfismo.

En algunas realizaciones, el nivel de Actividad de LAL en un paciente antes del tratamiento es de alrededor de 1%, alrededor de 2%, alrededor de 3%, alrededor de 5%, alrededor de 10%, alrededor de 15%, alrededor de 20%, alrededor de 30%, alrededor de 40%, alrededor de 50%, alrededor de 60%, alrededor de 70%, o alrededor de 80% de los niveles normales de Actividad de LAL. En una realización, el nivel de Actividad de LAL en un paciente antes del tratamiento es de alrededor de 50% o menos de los niveles normales de Actividad de LAL. En una realización, el nivel de Actividad de LAL en un paciente antes del tratamiento es de alrededor de 40 % o menos de los niveles normales de Actividad de LAL. En algunas realizaciones, el nivel de Actividad de LAL en un paciente antes del tratamiento es de alrededor de 30% o menos de los niveles normales de Actividad de LAL. En algunas realizaciones, el nivel de Actividad de LAL en un paciente antes del tratamiento es de alrededor de 30% o menos de los niveles normales de Actividad

de LAL. En algunas realizaciones, el nivel de Actividad de LAL en un paciente antes del tratamiento es de alrededor de 20% o menos de los niveles normales de Actividad de LAL. En algunas realizaciones, el nivel de Actividad de LAL en un paciente
5 antes del tratamiento es de alrededor de 10% o menos de los niveles normales de Actividad de LAL. En algunas realizaciones, el nivel de Actividad de LAL en un paciente antes del tratamiento es de alrededor de 5% o menos de los niveles normales de Actividad de LAL. En algunas
10 realizaciones, un paciente muestra Actividad de LAL no mensurable antes del tratamiento.

En algunas realizaciones, el nivel de Actividad de LAL se mide en fibroblasto cultivado obtenido de un paciente humano que sufre Deficiencia de LAL. En algunas realizaciones, el
15 nivel de Actividad de LAL se mide en linfocitos (por ej., leucocitos) de un paciente humano que sufre Deficiencia de LAL. Los linfocitos incluyen, sin carácter limitativo, células mononucleares de sangre periférica (PMBC). Métodos para la medición se describen, por ejemplo, en Burton et al., (1980)
20 *Clinica Chimica Acta* 101: 25-32, y en Anderson et al., (1999) *Mol. Genet. & Metab.*, **66**: 333-345, ambas se incorporan a esta invención en totalidad. Los pacientes con deficiencia de LAL que deben recibir tratamiento con LAL exógeno pueden exhibir actividad enzimática de LAL en fibroblasto que es menor que
25 alrededor de 30, alrededor de 20, alrededor de 10, alrededor de 5, alrededor de 4, alrededor de 3, alrededor de 2 o alrededor de 1 pmol/mg/min según se mide usando trioleína como sustrato. Los pacientes con deficiencia de LAL que deben recibir tratamiento con LAL exógeno pueden exhibir actividad enzimática
30 de LAL con leucocitos que es menor que alrededor de 30, alrededor de 20, alrededor de 10, alrededor de 5, alrededor de 4, alrededor de 3, alrededor de 2 o alrededor de 1 pmol/mg/min según se mide por trioleína como sustrato. Los pacientes con deficiencia de LAL que deben recibir tratamiento con LAL

exógeno exhiben actividad enzimática de LAL en fibroblasto que es menor que alrededor de 30, alrededor de 20, alrededor de 10, alrededor de 5, alrededor de 4, alrededor de 3, alrededor de 2 o alrededor de 1 pmol/mg/min según se mide usando oleato de colesterilo como sustrato. Los pacientes con deficiencia de LAL que deben recibir tratamiento con LAL exógeno pueden exhibir actividad enzimática de LAL con leucocitos que es menor que alrededor de 30, alrededor de 20, alrededor de 10, alrededor de 5, alrededor de 4, alrededor de 3, alrededor de 2 o alrededor de 1 pmol/mg/min según se mide usando oleato de colesterilo como sustrato.

Administración de LAL exógeno

La invención provee métodos de tratamiento de pacientes humanos con LAL exógeno que comprenden administrar LAL exógeno al paciente, en donde la administración es suficiente para recuperar el crecimiento, para mejorar la función hepática, para reducir el daño al hígado, para aumentar los niveles de LAL en tejidos, y/o aumentar la Actividad de LAL en el paciente. La invención provee frecuencias útiles y no caracterizadas anteriormente de administración (es decir, cronogramas de dosificación) de LAL exógeno para tratar afecciones que derivan de la Deficiencia de LAL, incluyendo WD y CESD, así como también cantidades de dosificación no caracterizadas anteriormente para el tratamiento de estas afecciones.

La invención provee una dosis terapéuticamente efectiva de LAL exógeno que se administrará a un paciente entre una vez cada 5 días y una vez cada 30 días durante un período de tiempo determinado por el profesional con experiencia en el arte de las ciencias médicas. En una realización, el período de tiempo será el resto del ciclo de vida del paciente. En una realización, la frecuencia de dosificación es entre una vez cada 5 días y una vez cada 25 días. En una realización, la

frecuencia de dosificación es entre una vez cada 5 días y una vez cada 21 días. En otra realización, la frecuencia de dosificación es entre una vez cada 7 días y una vez cada 14 días. El LAL exógeno puede administrarse una vez cada 5 días, una vez cada 6 días, una vez cada 7 días, una vez cada 8 días, una vez cada 9 días, una vez cada 10 días, una vez cada 11 días, una vez cada 12 días, una vez cada 13 días, o una vez cada 14 días. En algunas realizaciones, el LAL exógeno se administra alrededor de semanalmente. En otras realizaciones, el LAL exógeno se administra alrededor de bi-semanalmente. En una realización, la frecuencia de dosificación es de alrededor de una vez cada 30 días.

Para el tratamiento de una afección, generalmente, la cantidad de LAL exógeno administrado puede variar dependiendo de factores conocidos tales como edad, salud, y peso del receptor, tipo de tratamiento concurrente, frecuencia de tratamiento, y similares. Usualmente una dosificación de principio activo puede ser de 0,01 a alrededor de 50 mg por kilogramo del peso corporal. En una realización, la dosificación de LAL exógeno de acuerdo con la invención es alrededor de 0,1 a 0,5 mg por kilogramo del peso corporal. En una realización, la dosis es alrededor de 0,1 mg a alrededor de 5,0 mg por kilogramo. En una realización, la dosis es de alrededor de 0,1 mg hasta alrededor de 5,0 mg por kilogramo. En una realización la dosis es de alrededor de 0,1, alrededor de 0,2, alrededor de 0,25, alrededor de 0,30, alrededor de 0,35, alrededor de 0,40, alrededor de 0,45, alrededor de 0,50 mg por kilogramo. En una realización, la dosis es alrededor de 1 mg a alrededor de 5 mg por kilogramo. En una realización, la dosis es de alrededor de 1 mg por kilogramo. En una realización, la dosis es de alrededor de 3 mg por kilogramo. Por ejemplo, 0,1 mg por kilogramo del peso corporal, 0,2 mg por kilogramo del peso corporal, 0,3 mg por kilogramo del peso corporal, 0,4 mg por kilogramo del peso corporal, 0,5 mg por

kilogramo del peso corporal, 1 mg por kilogramo del peso corporal, 2 mg por kilogramo del peso corporal, 3 mg por kilogramo del peso corporal, 4 mg por kilogramo del peso corporal, o 5 mg por kilogramo del peso corporal puede administrarse. En una realización, la dosis es alrededor de 1 mg a alrededor de 20 mg por kilogramo del peso corporal.

La invención incluye, además, otras dosificaciones cuando se emplea un cronograma de dosificación de la invención. Por ejemplo de acuerdo con un cronograma de dosificación de la invención, entre alrededor de 0,1 mg y alrededor de 50 mg por kilogramo del peso corporal se administra a un paciente.

En algunas realizaciones, se administran alrededor de 0,5 hasta alrededor de 50 mg de LAL exógeno, por ej., a un paciente con enfermedad de Wolman a la edad de entre 1 mes y 24 meses.

En una realización los pacientes tienen menos de 1 año de edad. En otra realización, el paciente tiene menos de 2 años de edad. En algunas realizaciones, se administran alrededor de 0,1 mg, alrededor de 0,2 mg, alrededor de 0,3 mg, alrededor de 0,4 mg, alrededor de 0,5 mg, alrededor de 1 mg, alrededor de 2 mg, alrededor de 3 mg, alrededor de 5 mg, alrededor de 10 mg, alrededor de 15 mg, alrededor de 20 mg, alrededor de 25 mg, alrededor de 30 mg, alrededor de 35 mg, alrededor de 40 mg, o alrededor de 45 mg de LAL exógeno al paciente con Enfermedad de Wolman. En algunas realizaciones, se administran alrededor de 0,5 hasta alrededor de 30 mg, alrededor de 0,5 hasta alrededor de 20 mg, alrededor de 0,5 hasta alrededor de 10 mg, o alrededor de 0,5 hasta alrededor de 5 mg al paciente con Enfermedad de Wolman. En algunas realizaciones, se administran alrededor de 1 hasta alrededor de 30 mg, alrededor de 1 hasta alrededor de 20, alrededor de 1 hasta alrededor de 10, o alrededor de 1 hasta alrededor de 5 mg.

En algunas realizaciones, se administran alrededor de 1 mg hasta alrededor de 350 mg de LAL exógeno, por ej., a un paciente diagnosticado con CESD. De este modo, en algunas

realizaciones, se administran alrededor de 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, o 350 mg de LAL exógeno al paciente con CESD. En algunas realizaciones, se administran alrededor de 5 hasta alrededor de 350 mg, alrededor de 5 hasta alrededor de 300 mg, alrededor de 5 hasta alrededor de 250, o alrededor de 5 hasta alrededor de 200 mg al paciente con CESD. En algunas realizaciones, se administran alrededor de 10 hasta alrededor de 350 mg, alrededor de 10 hasta alrededor de 300 mg, alrededor de 10 hasta alrededor de 250 mg, o alrededor de 10 hasta alrededor de 200 mg al paciente con CESD.

Tratamientos Combinados

Las proteínas terapéuticas que se describen aquí pueden usarse en combinación con otros agentes terapéuticos. La invención provee un procedimiento de tratamiento previo para minimizar o prevenir cualquier reacción anafiláctica potencial en la que puede incurrirse por administración de LAL exógeno de acuerdo con la invención. En una realización, para pre-tratar una potencial reacción anafiláctica, un antagonista del receptor H-1, conocido también como un antihistamínico (por ej., difenhidramina) se administra al paciente. En una realización, el antagonista del receptor H-1 se administra en una dosis de alrededor de 1 mg hasta alrededor de 10 mg por kilogramo del peso corporal. Por ejemplo, un antihistamínico puede administrarse en una dosis de alrededor de 5 mg por kilogramo. La administración del antihistamínico puede ser antes de la administración de LAL exógeno de acuerdo con la invención. En una realización, el antagonista del receptor H-1 se administra alrededor de 10 hasta alrededor de 90 minutos, por ejemplo, alrededor de 30 hasta alrededor de 60 minutos antes de la administración de LAL exógeno. El antagonista del receptor H-1 puede administrarse usando un sistema ambulatorio conectado a un puerto de acceso vascular. En una realización,

el antihistamínico se administra alrededor de 90 minutos antes de la administración de LAL exógeno. En una realización, el antihistamínico se administra entre alrededor de 10 y alrededor de 60 minutos antes de la administración de LAL exógeno. En otra realización, el antihistamínico se administra entre alrededor de 20 y alrededor de 40 minutos antes de administrar LAL exógeno. Por ejemplo, el antihistamínico puede administrarse 20, 25, 30, 35, o 40 minutos antes de la administración de LAL exógeno. En una realización, el antihistamínico administrado es difenhidramina. Puede usarse cualquier antihistamínico útil. Dichas anti histaminas incluyen, sin limitación, clemastina, doxilamina, loratidina, desloratidina, fexofenadina, feniramina, cetirizina, ebastina, prometazina, clorfeniramina, levocetirizina, olopatadina, quetiapina, meclizina, dimenhidrinato, embramina, dimetideno, y dexclorofeniramina.

En una realización, el antihistamínico se administra en una dosis de entre alrededor de 0,1 mg y alrededor de 10 mg por kilogramo del peso corporal. En una realización, el antihistamínico se administra en una dosis entre alrededor de 1 mg y alrededor de 5 mg por kilogramo del peso corporal. Por ejemplo la dosis puede ser 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, o 5 mg por kilogramo del peso corporal. El antihistamínico puede administrarse por cualquier método útil. En una realización, el antihistamínico se administra por vía intravenosa. En otra realización, el antihistamínico se administra en cápsulas aceptables desde el punto de vista farmacéutico.

En otra realización, con referencia una infusión intravenosa, el potencial de reacciones anafilácticas puede reducirse administrando las infusiones usando un protocolo de aumento de la dosis. En este contexto, un protocolo de aumento escalonado se refiere a aumentar lentamente la velocidad de infusión durante el transcurso de la infusión para desensibilizar al paciente a la infusión de la medicación.

Los inmunosupresores tales como, sin carácter limitativo, anti histaminas, corticosteroides, sirolimo, voclosporina, ciclosporina, metotrexato, anticuerpos orientados al receptor de IL-2, anticuerpos orientados al receptor de células T, anticuerpos orientados a TNF-alfa o proteínas de fusión (por ej., infliximab, etanercept, o adalimumab), CTLA-4-Ig (por ej., abatacept), anticuerpos anti-OX-40 también pueden administrarse antes, durante, o después de la administración de LAL exógeno, por ejemplo, si se espera una reacción anafiláctica o respuesta inmunológica adversa en un paciente.

La invención también abarca el tratamiento que incluye administración de composiciones que contienen LAL exógeno en combinación con uno o más agentes reductores del colesterol (por ej., inhibidores de HMG-CoA reductasa). Ejemplos no limitativos de dichos agentes incluyen: atorvastatina (Lipitor® y Torvast®), fluvastatina (Lescol®), lovastatina (Mevacor®, Altocor®, Altoprev®), pitavastatina (Livalo®, Pitava®), pravastatina (Pravachol®, Selektine®, Lipostat®), rosuvastatina (Crestor®), y simvastatina (Zocor®, Lipex®).

Efectos de LAL exógeno

La presente invención provee una reacción o normalización de síntomas relacionados con la enfermedad luego del tratamiento con LAL exógeno. La progresión clínica (es decir, mejora de la afección) como respuesta a LAL exógeno puede monitorearse por cualquier o procedimiento útil.

En algunas realizaciones, la administración de LAL exógeno es suficiente para lograr una Cmáx de alrededor de 200 ng/ml a alrededor de 1,500 ng/mL. En algunas realizaciones, la administración de LAL exógeno es suficiente para lograr una Cmáx de alrededor de 200 ng/mL a alrededor de 1,000 ng/ml. En algunas realizaciones, la administración de LAL exógeno es suficiente para lograr una Cmáx de alrededor de 200 ng/ml a alrededor de 800 ng/ml. En algunas realizaciones, la

administración de LAL exógeno es suficiente para lograr una $C_{\text{máx}}$ alrededor de 200 ng/ml, alrededor de 300 ng/ml, alrededor de 400 ng/ml, alrededor de 500 ng/ml, alrededor de 600 ng/ml, alrededor de 700 ng/ml, alrededor de 800 ng/ml, alrededor de 900 ng/ml, alrededor de 1,000 ng/ml, alrededor de 1,250 ng/mL. 5 0 alrededor de 1,500 ng/mL. En algunas realizaciones, la $C_{\text{máx}}$ se alcanza durante la infusión.

En algunas realizaciones, la administración de LAL exógeno es suficiente para lograr una vida media de LAL ($t_{1/2}$) que es de menos de 40 minutos. En algunas realizaciones, la administración de LAL exógeno es suficiente para lograr una vida media de LAL ($t_{1/2}$) que es de menos de 30 minutos. En algunas realizaciones, la administración de LAL exógeno es suficiente para lograr una vida media de LAL ($t_{1/2}$) que es de menos de 20 minutos. En algunas realizaciones, la administración de LAL exógeno es suficiente para lograr una vida media de LAL ($t_{1/2}$) que es de menos de 15 minutos. En algunas realizaciones, la administración de LAL exógeno es suficiente para lograr una vida media de LAL ($t_{1/2}$) que es de menos de 10 minutos. En algunas realizaciones, la administración de LAL exógeno es suficiente para lograr una vida media de LAL ($t_{1/2}$) de alrededor de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 o 40 minutos.

En algunas realizaciones, el LAL exógeno aumenta la Actividad de LAL en un paciente. La Actividad de LAL puede aumentarse, por ejemplo, en el hígado, bazo, nodos linfáticos, aorta, leucocitos de sangre periférica, y/o fibroblastos cutáneos. En algunas realizaciones, la Actividad de LAL se mide en extractos de linfocitos aislados de muestras de sangre.

El LAL exógeno puede aumentar la Actividad de LAL hasta por lo menos alrededor de 1,5, alrededor de 2, alrededor de 2,5, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 15, o alrededor de 20 veces la actividad

antes de la administración de LAL. El LAL exógeno puede aumentar la Actividad de LAL hasta por lo menos alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14, alrededor de 15, alrededor de 16, alrededor de 17, alrededor de 18, alrededor de 19, alrededor de 20 veces la actividad antes de la administración de LAL. La Actividad de LAL puede evaluarse usando métodos conocidos en el arte incluyendo, por ejemplo, ensayos usando colesteril [1-¹⁴C]oleato, trioleína (glicerol tri [1-¹⁴C]oleato), *p*-nitrofenil miristato o 4-MUO (4-metilumbelilferil oleato) como sustratos.

En una realización, el volumen y caracterización del órgano y tejido se emplea para determinar la mejora de la afección después de la administración de LAL exógeno de acuerdo con la invención.

En una realización, la progresión clínica en la función hepática/lesión después de la administración de LAL exógeno se monitorea por la cuantificación de transaminasas sanguíneas tales como aminotransferasa de ácido aspártico (AST) y/o alanina transaminasa (ALT), y/u otros biomarcadores, tales como albúmina, fosfatasa alcalina, y bilirrubina (directa y total), con el tiempo.

En una realización, la progresión clínica se monitorea usando tecnología por imágenes. Por ejemplo, y sin limitación, la tecnología por imágenes usada puede ser ultrasonido, barrido por TC, imágenes por resonancia magnética, y espectroscopía por resonancia magnética nuclear.

En algunas realizaciones, la administración de LAL exógeno con las dosis que se describen en esta invención es suficiente para recuperar el crecimiento y/o aumentar el peso corporal en pacientes humanos. La administración de LAL exógeno también puede aumentar el índice de crecimiento (es decir, aumento del peso corporal) en un paciente bebé o niño que sufre de inicio temprano de la Deficiencia de LAL. Por ejemplo, la administración de LAL exógeno puede aumentar el índice de

aumento del peso corporal en por lo menos alrededor de 10%, alrededor de 20%, alrededor de 30%, alrededor de 40%, alrededor de 50%, alrededor de 60%, alrededor de 70%, alrededor de 80%, alrededor de 90%, alrededor de 100%, alrededor de 200%,
5 alrededor de 300%, alrededor de 400%, o alrededor de 500% de la velocidad/índice de crecimiento observado antes de la administración. En algunas realizaciones, la administración de LAL exógeno recupera el índice de crecimiento normal en un paciente pediátrico que sufre de inicio temprano de la
10 Deficiencia de LAL (por ej. Enfermedad de Wolman) cuya edad es entre alrededor de 1 mes y alrededor de 24 meses. "Normal" en este contexto se refiere a índice de crecimiento normal para el paciente tratado como lo determina el profesional de experiencia usual en el arte de las ciencias médicas.

15 En una realización, por ejemplo con referencia a WD y CESD o otras deficiencias de LAL, la hepatomegalia se revierte significativamente con el tamaño del hígado que vuelve a un tamaño que se encuentra dentro de alrededor de 1% hasta alrededor de 60% más que el del normal. "Normal" en este
20 contexto se refiere a un hígado de tamaño normal para el paciente tratado como lo determina el profesional de experiencia usual en el arte de las ciencias médicas. En una realización, el tamaño del hígado se reduce hasta entre alrededor de 1% y alrededor de 50% más que lo normal. En otra
25 realización, el tamaño del hígado se reduce hasta entre alrededor de 1% y alrededor de 40% más que lo normal. En una realización, el tamaño del hígado se reduce hasta entre alrededor de 1% y alrededor de 30% más que lo normal. En otra
30 realización, el tamaño del hígado se reduce hasta entre alrededor de 1% y alrededor de 20% más que lo normal. En otra realización, el tamaño del hígado se reduce hasta entre alrededor de 10% y alrededor de 20% más que lo normal. Por ejemplo, el hígado puede ser 10%, 11%, 12% 13% 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, o 20% más grande que el tamaño normal. Incluso

en otra realización, el tamaño del hígado se reduce hasta entre alrededor de 0% y alrededor de 10% más que lo normal. Por ejemplo, el hígado puede ser 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, o 10% más grande que el tamaño normal del hígado.

- 5 El tratamiento con LAL exógeno también puede mejorar la función hepática. De este modo, en algunas realizaciones, el tratamiento con LAL exógeno es suficiente para recuperar la función hepática normal y/o normalizar los análisis del hígado. En algunas realizaciones, el tratamiento con LAL exógeno es
- 10 suficiente para disminuir los niveles séricos de transaminasas hepáticas, por ej., en por lo menos alrededor de 20%, alrededor de 30%, alrededor de 40%, alrededor de 50%, alrededor de 60%, alrededor de 70%, alrededor de 80%, y/o hasta por lo menos alrededor de 90%. En una realización, el tratamiento con LAL
- 15 exógeno es suficiente para disminuir los niveles séricos de transaminasas hepáticas en por lo menos alrededor de 40%. En una realización, el tratamiento con LAL exógeno es suficiente para disminuir los niveles séricos de transaminasas hepáticas en por lo menos alrededor de 50%. En una realización, el
- 20 tratamiento con LAL exógeno es suficiente para disminuir los niveles séricos de transaminasas hepáticas en por lo menos alrededor de 60%. En una realización, el tratamiento con LAL exógeno es suficiente para disminuir los niveles séricos de transaminasas hepáticas en por lo menos alrededor de 70%. En
- 25 una realización, el tratamiento con LAL exógeno es suficiente para disminuir los niveles séricos de transaminasas hepáticas en por lo menos alrededor de 80%. En una realización, el tratamiento con LAL exógeno es suficiente para disminuir los niveles séricos de transaminasas hepáticas en por lo menos
- 30 alrededor de 90%.

En algunas realizaciones, la transaminasa hepática es alanina aminotransferasa (ALT). En una realización, la administración de LAL exógeno es suficiente para reducir la ALT sérica. Por ejemplo, la administración de LAL exógeno puede

reducir la ALT sérica, por ej., por lo menos en alrededor de 50%, 60%, 70%, 80% o 90%. El nivel de ALT sérica puede servir como indicación de la lesión hepática. De este modo, la presente invención también contempla métodos de reducción de la lesión hepática en un paciente humano que sufre de deficiencia de LAL administrando una cantidad efectiva LAL exógeno para reducir la ALT sérica.

En algunas realizaciones, la transaminasa hepática es aspartato transaminasa sérica (AST). En una realización, la administración de LAL exógeno es suficiente para reducir el AST sérico. Por ejemplo, la administración de LAL exógeno puede reducir el AST sérico, por ej., por lo menos en alrededor de 50%, 60%, 70%, 80% or 90%. El nivel de AST sérico puede servir como indicación de la lesión hepática. Como consecuencia, la presente invención también contempla un método para reducir la lesión hepática en un paciente que sufre de deficiencia de LAL al administrar una cantidad efectiva de LAL exógeno para reducir la AST sérica.

En algunas realizaciones, el tratamiento con LAL exógeno puede reducir los niveles séricos de ferritina. De este modo, en algunas realizaciones, el tratamiento con LAL exógeno es suficiente para reducir la ferritina sérica, por ej., en por lo menos alrededor de 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 95% comparado con los niveles pretratamiento. En una realización, el tratamiento con LAL exógeno es suficiente para disminuir los niveles séricos de ferritina en por lo menos 50%. En una realización, el tratamiento con LAL exógeno es suficiente para disminuir los niveles séricos de ferritina en por lo menos 60%. Incluso en otra realización, el tratamiento con LAL exógeno es suficiente para disminuir los niveles séricos de ferritina en por lo menos alrededor de 70%. En una realización, el tratamiento con LAL exógeno es suficiente para disminuir los niveles séricos de ferritina en por lo menos alrededor de 80%. En una realización, el tratamiento con LAL

exógeno es suficiente para reducir los niveles séricos de ferritina en por lo menos alrededor del 90%. En una realización, el tratamiento con LAL exógeno es suficiente para reducir los niveles séricos en por lo menos alrededor del 95%.

5 En una realización, por ejemplo, con referencia a Enfermedad de Wolman y CESD o otras deficiencias de LAL, esplenomegalia se revierte significativamente con bazo tamaño volviendo a un tamaño que se encuentra dentro de alrededor de 1% hasta alrededor de 60% más que el del normal. "Normal" en
10 este contexto se refiere a un bazo de tamaño normal para el paciente sometido a estudio como lo determina el profesional de experiencia usual en el arte de las ciencias médicas. En una realización, bazo tamaño se reduce hasta entre alrededor de 1% y alrededor de 50% más que lo normal. En otra realización,
15 bazo tamaño se reduce hasta entre alrededor de 1% y alrededor de 40% más que lo normal. En una realización, bazo tamaño se reduce hasta entre alrededor de 1% y alrededor de 30% más que lo normal. En otra realización, bazo tamaño se reduce hasta entre alrededor de 1% y alrededor de 20% más que lo normal. En
20 otra realización, bazo tamaño se reduce hasta entre alrededor de 10% y alrededor de 20% más que lo normal. Por ejemplo, el bazo puede ser 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, o 20% más grande que el tamaño normal. Incluso en otra realización, bazo tamaño se reduce hasta entre alrededor de 0%
25 y alrededor de 10% más que lo normal. Por ejemplo, el bazo puede ser 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, o 10% más grande que el tamaño normal del bazo.

En una realización, administración de LAL exógeno es suficiente para reducir la linfadenopatía (es decir
30 agrandamiento de los nodos linfáticos). De este modo, en algunas realizaciones, los nodos linfáticos se reducen hasta alrededor de un tamaño que se encuentra dentro de alrededor de 1% hasta alrededor de 60% más que el del normal. "Normal" en este contexto se refiere a nodos linfáticos de tamaño normal

para el paciente sometido a estudio como lo determina el profesional de experiencia usual en el arte de las ciencias médicas. En una realización, el tamaño del nodo linfático se reduce hasta alrededor de 1% hasta alrededor de 50% más que lo normal. En otra realización, el tamaño del nodo linfático se reduce hasta alrededor de 1% hasta alrededor de 40% más que lo normal. En una realización, el tamaño del nodo linfático se reduce hasta alrededor de 1% hasta alrededor de 30% más que lo normal. En otra realización, el tamaño del nodo linfático se reduce hasta alrededor de 1% hasta alrededor de 20% más que lo normal. En otra realización, el tamaño del nodo linfático se reduce hasta alrededor de 10% hasta alrededor de 20% más que lo normal. Por ejemplo, los nodos linfáticos pueden ser 10%, 11%, 12% 13% 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, o 20% más grande que el tamaño normal. Incluso en otra realización, el tamaño del nodo linfático se reduce hasta alrededor de 0% hasta alrededor de 10% más que lo normal. Por ejemplo, el nodo linfático puede ser 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, o 10% más grande que el tamaño normal de los nodos linfáticos.

En otra realización, el análisis de lípidos se realiza para monitorear la mejora de la afección. Por ejemplo, el análisis de lípidos puede realizarse para evaluar el efecto terapéutico del LAL exógeno. El análisis de lípidos puede conducirse en una muestra de tejido de un paciente (por ej., una muestra de sangre, muestra de biopsia de hígado) por cualquier método útil tales como, sin carácter limitativo cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía gaseosa, espectroscopía de masa, o cromatografía de fase delgada, o cualquier combinación de los anteriores según lo considere apropiado una persona con experiencia en el arte. En una realización, el análisis de lípidos realizado de acuerdo con la invención, demuestra los niveles de colesterol total, triglicéridos, lipoproteínas de baja densidad, lipoproteínas de alta densidad y/o colesteril éster.

En una realización, por ejemplo, con referencia a Enfermedad de Wolman y CESD o otras deficiencias de LAL, el análisis de lípidos de un paciente tratado de acuerdo con la invención muestra una normalización de concentraciones de lípidos en el hígado, bazo, intestino, los nodos linfáticos, y/o aorta como lo puede determinar el profesional de experiencia usual en el campo de las ciencias médicas.

Los niveles de lípidos pueden evaluarse usando análisis de lípidos en plasma o el análisis de lípidos en tejido. En el análisis de lípidos en plasma, el plasma sanguíneo puede recolectarse, y los niveles de colesterol libre en plasma total pueden medirse usando, por ejemplo ensayos colorimétricos con un kit COD-PAP (Wako Chemicals), triglicéridos totales en plasma pueden medirse usando, por ejemplo, un kit Triglicéridos/GB (Boehringer Mannheim), y/o colesterol total en plasma puede determinarse usando un kit Cholesterol/HP (Boehringer Mannheim). En el análisis de lípidos en tejidos, los lípidos pueden extraerse, por ejemplo, de muestras de hígado, bazo, y/o intestino delgado (por ej., usando el método de Folch provisto en Folch et al. *J. Biol. Chem* 226: 497-505 (1957)). Las concentraciones de totales de colesterol en tejidos pueden medirse, por ejemplo, usando O-ftalaldehído.

En algunas realizaciones, administración de LAL exógeno es suficiente para aumentar la absorción de nutrientes. En una realización, la administración de LAL exógeno aumenta la absorción de nutrientes según se mide por niveles de tocoferol alfa en suero, 25OH vitamina D, retinol sérico, didehidroretinol o transtiretina.

En algunas realizaciones, por ejemplo con referencia a WD y CESD u otras deficiencias de LAL, la administración de LAL exógeno es suficiente para aumentar los niveles de hemoglobina sérica (Hb). En una realización, el nivel de hemoglobina aumenta en por lo menos alrededor de 10% o alrededor de 20%

cuando se compara con el observado antes de la administración con LAL exógeno.

En algunas realizaciones, el LAL exógeno puede administrarse usando métodos para minimizar efectos colaterales. Por ejemplo, la administración de LAL exógeno puede minimizar las respuestas inmunológicas al LAL exógeno.

LAL y Composiciones Farmacéuticas que comprenden LAL exógeno

La presente invención abarca el tratamiento de cualquiera de las afecciones relacionadas con la Deficiencia de LAL que se describen en esta invención y otras afecciones no mencionadas anteriormente, pero que podrían beneficiarse a partir del tratamiento. El LAL exógeno empleado de acuerdo con la invención incluye LAL recombinante que puede producirse en cualquier sistema de expresión de proteínas útil incluyendo, sin limitación, cultivo celular (por ej., células CHO, células COS), bacterias tales como *E. coli*, animales transgénicos tales como mamíferos y aves (por ej., pollos, pato, y pavo) y en sistemas vegetales (por ej., malezas y plantas de tabaco). Un aspecto de la invención se relaciona con LAL recombinante producido de acuerdo a la patente US nro. 7.524.626, concedida el 3 de octubre de 2006; las solicitudes de patente US nros. 11/973.853 presentada el 10 de octubre de 2007; 11/978.360 presentada el 29 de octubre de 2007 y 12/319.396 presentada el 7 de enero de 2009, las divulgaciones de las cuales se incorporan por referencia a la presente en su totalidad. Un aspecto de la invención se relaciona con LAL recombinante producido como se describe en Du et al., (2005) *Am. J. Hum. Genet.* **77**: 1061-1074, y Du et al., (2008) *J. Lipid Res.*, **49**: 1646-1657, cuyas divulgaciones se incorporan en su totalidad aquí a modo de referencia. En una realización útil, el LAL exógeno se produce en el oviducto de un ave transgénica (por ej., un pollo transgénico), por ejemplo, de acuerdo con un método descrito en PCT/US2011/033699, presentada el 23 de abril

de 2011, que se incorpora como referencia en esta invención en su totalidad. En algunas realizaciones, el LAL recombinante se produce en una línea celular de aves. En algunas realizaciones, el LAL recombinante se produce en una línea celular de mamífero (por ej., un humano).

En una realización, el ácido lipasa lisosomal exógeno usado de acuerdo con la invención contiene glicanos que tienen N-acetilglucosamina sustancial (GlcNAc) y estructuras N-ligadas con terminación de manosa. EL GlcNAc y glicanos terminados en manosa sobre LAL exógeno pueden reconocerse específicamente e internalizarse por macrófagos y fibroblasto. El Manosa-6-fosfoato (M6P), que puede dirigir las proteínas al receptor de manosa/ GlcNAcs que se expresan en células implicadas en las afecciones que pueden tratarse por administración de LAL exógeno, también está normalmente presente en el LAL exógeno usado de acuerdo con la invención.

Normalmente, el LAL exógeno de la invención discutido y descrito aquí es LAL humano. En una realización, el LAL exógeno tiene la secuencia de aminoácidos provista en Genbank RefSeq NM_000235,2). En una realización, el LAL exógeno maduro tiene la secuencia de aminoácidos:

SGGKLTAVDPETNMNVSEIISYWGFPSSEYLVETEDGYILCLNRIPHGRKNH
SDKGPKPVVFLQHGLLADSSNWVTNLANSSLGFIADAGFDVWMGNSRGNTW
SRKHKTLSVSQDEFWAFSYDEMAKYDLPASINFILNKTGQEQVYYVGHSQGT
TIGFIAFSQIPELAKRIKMFFALGPVASVAFCTSPMAKLGRLPDHLIKDLFG
DKEFLPQSAFLKWLGTHVCTHVILKELCGNLCFLLCGFNERNLNMSRVDVYT
THSPAGTSVQNMLHWSQAVKFQKFQAFDWGSSAKNYFHYNQSYPTYNVKDM
LVPTAVWSSGGHDWLADVVDVNILLTQITNLVVFHESIPEWEHLDFIWGLDAPW
RLYNKIINLMRKYQ (SEC ID NO: 1)

En algunas realizaciones, el LAL exógeno comprende aminoácidos 1-378 de SEC ID NO: 1, aminoácidos 3-378 de SEC ID NO: 1, aminoácidos 6-378 de SEC ID NO: 1, o aminoácidos 7-378

de SEC ID NO: 1. En algunas realizaciones, el LAL exógeno comprende una mezcla de por lo menos dos polipéptidos seleccionados del grupo formado por los aminoácidos 1-378 de SEC ID NO: 1, aminoácidos 3-378 de SEC ID NO: 1, aminoácidos 6-378 de SEC ID NO: 1, y aminoácidos 7-378 de SEC ID NO: 1. En algunas realizaciones, el LAL exógeno comprende una mezcla de un polipéptido que comprende los aminoácidos 1-378 de SEC ID NO: 1, un polipéptido que comprende los aminoácidos 3-378 de SEC ID NO: 1, y un polipéptido que comprende los aminoácidos 6-378 de SEC ID NO: 1.

En algunas realizaciones, el LAL exógeno comprende un polipéptido que es idéntico a los aminoácidos 1-378 de SEC ID NO: 1, aminoácidos 3-378 de SEC ID NO: 1, aminoácidos 6-378 de SEC ID NO: 1, o aminoácidos 7-378 de SEC ID NO: 1. En otras realizaciones, el LAL exógeno comprende un polipéptido que es por lo menos alrededor de 70%, alrededor de 75%, alrededor de 80%, alrededor de 85%, alrededor de 90%, alrededor de 95%, alrededor de 96%, alrededor de 97%, alrededor de 98%, o alrededor de 99% idéntico a los aminoácidos 1-378 de SEC ID NO: 1, aminoácidos 3-378 de SEC ID NO: 1, aminoácidos 6-378 de SEC ID NO: 1, o aminoácidos 7-378 de SEC ID NO: 1. En algunas realizaciones, el LAL exógeno comprende un polipéptido que es un fragmento funcional de SEC ID NO: 1 o es por lo menos alrededor de 70%, alrededor de 75%, alrededor de 80%, alrededor de 85%, alrededor de 90%, alrededor de 95%, alrededor de 96%, alrededor de 97%, alrededor de 98%, o alrededor de 99% idéntico a un fragmento funcional de SEC ID NO: 1.

En algunas realizaciones el LAL exógeno es una proteína LAL recombinante descrita en PCT/US2011/033699, presentada el 23 de abril de 2011, que se incorpora como referencia en esta invención en su totalidad.

Se reconoce que las posiciones de aminoácidos que no son idénticas con frecuencia difieren por sustituciones de aminoácidos conservadores, donde los residuos de aminoácidos

están sustituidos en lugar de otros residuos de aminoácidos con similares propiedades químicas (por ej., carga o hidrofobicidad) y por lo tanto no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Donde las secuencias difieren en

5 sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para realizar este ajuste se conocen muy bien para aquellas personas con experiencia en el arte. La puntuación de las sustituciones

10 conservadoras pueden calcularse de acuerdo con, por ejemplo, el algoritmo de Meyers & Millers, *Computer Applic. Biol. Sci.* 4:11-17 (1988).

Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento de posiciones contiguas, tales como entre alrededor de 25 y

15 alrededor de 400 posiciones, o entre alrededor de 50 a 200 posiciones, o entre alrededor de 100 y 150 posiciones, sobre el cual una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias están alineadas en forma óptima. Los

20 métodos de alineación de las secuencias para comparación se conocen muy bien en el arte. La alineación óptima de secuencias para comparación puede conducirse, por ejemplo, por un algoritmo de homología local (Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), por un algoritmo de alineación global

25 (Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), por búsqueda de métodos de similitud (Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444 (1988); Altschul et al., *Nucl. Acids Res.* 25:3389-402 (1997), por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (por ej., GAP, BESTFIT, FASTA, y BLAST en el

30 Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), normalmente usando las configuraciones por defecto, o por alineación manual e inspección visual (ver, por ej., *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al. (eds.), 1994). Por ejemplo, las

búsquedas de proteínas en BLAST pueden realizarse usando el programa XBLAST, puntaje = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos que son más de 80% idénticas a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 1 o un fragmento de los anteriores.

Un ejemplo de implementación de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de secuencia múltiple a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineaciones en pares progresivos. También puede graficar un dendrograma que muestra las relaciones de familias génicas usadas para crear la alineación. PILEUP usa una simplificación del método de alineación progresiva de Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360 (1987). El método usado es similar al método descrito por Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-3 (1989). El procedimiento de alineación múltiple comienza con la alineación en pares de las dos secuencias más similares, produciendo una familia génica de dos secuencias alineadas. Esta familia génica puede alinearse entonces con la secuencia más relacionada o la familia génica de dos secuencias alineadas. Dos familias génicas de secuencias pueden alinearse por una simple extensión de la alineación en pares de dos secuencias individuales. Una serie de dichas alineaciones en pares que incluyen secuencias crecientemente no similares y las familias génicas de secuencias en cada iteración producen la alineación final.

En algunas realizaciones, LAL exógeno polipéptidos de la invención incluyen variantes de secuencias del tipo salvaje. Estas variantes caen dentro de una o más de tres clases: variante sustitucional, de inserción, de eliminación. Estas variantes pueden ser variantes inter-especies o alélicas naturales o pueden prepararse por mutagénesis específica del sitio de nucleótidos en el ADN que codifica la proteína. La mutagénesis específica del sitio puede realizarse usando mutagénesis en cassette o PCR u otras técnicas conocidas en el arte para producir ADN que codifica la variante y, a partir de

entonces, expresar el ADN en el cultivo celular recombinante. Los fragmentos de proteína blanco variantes que tienen hasta alrededor de 100-150 residuos de aminoácidos pueden prepararse por síntesis *in vitro* usando técnicas de sustitución establecidas. Las tablas de sustitución conservadora que proveen aminoácidos de funcionalidad similar se conocen en el arte (Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919 (1992)).

Las sustituciones de aminoácidos son normalmente de residuos simples. Las inserciones usualmente serán del orden de desde alrededor de 1 hasta alrededor de 20 aminoácidos, aunque pueden tolerarse inserciones considerablemente más extensas. Las eliminaciones oscilan desde alrededor de 1 hasta alrededor de 20 residuos, aunque en algunos casos, las eliminaciones pueden ser mucho más extensas. Las sustituciones, eliminaciones e inserciones o cualquier combinación de los anteriores pueden usarse para arribar a un derivado final.

En algunas realizaciones, el LAL exógeno tiene una actividad específica de por lo menos alrededor de 100 U/mg. En algunas realizaciones, el LAL exógeno tiene una actividad específica de por lo menos alrededor de 200 U/mg. En algunas realizaciones, el LAL exógeno tiene una actividad específica de por lo menos alrededor de 250 U/mg. En algunas realizaciones, el LAL exógeno tiene una actividad específica de alrededor de 100 hasta alrededor de 1000 U/mg. En algunas realizaciones, el LAL exógeno tiene una actividad específica de alrededor de 100 hasta alrededor de 500 U/mg. En algunas realizaciones, el LAL exógeno tiene una actividad específica de alrededor de 100 hasta alrededor de 350 U/mg. En algunas realizaciones, el LAL exógeno tiene una actividad específica de alrededor de 200 hasta alrededor de 350 U/mg. En algunas realizaciones, el LAL exógeno tiene una actividad específica de alrededor de 250 hasta alrededor de 350 U/mg. En algunas realizaciones, el LAL exógeno tiene una actividad específica de alrededor de 250

U/mg. En algunas realizaciones, el LAL exógeno tiene una actividad específica de alrededor de 275 U/mg. En algunas realizaciones, el LAL exógeno tiene una actividad específica de alrededor de 300 U/mg.

- 5 El LAL humano tiene 6 sitios potenciales en su secuencia de aminoácidos para glicosilación N-ligada: Asn36, Asn72, Asn101, Asn161, Asn273, y Asn321, como se indica en la SEC ID NO: 1. En algunas realizaciones, por lo menos 1, 2, 3, 4, o 5 de los sitios de la glicosilación N-ligada están glicosilados.
- 10 En algunas realizaciones la totalidad de los seis sitios de glicosilación están glicosilados. En algunas realizaciones, Asn36, Asn101, Asn161, Asn273, y Asn321 están glicosilados. En algunas realizaciones, Asn36, Asn101, Asn161, Asn273, y Asn321 están glicosilados, y Asn72 no está glicosilado. En algunas
- 15 realizaciones, las estructuras de N-glicano comprenden estructuras bi-, tri-, y tetraantenarias con N-acetilglucosamina (GlcNAc), manosa, y/o manosa-6-fosfato (M6P). En algunas realizaciones, el LAL exógeno comprende N-glicanos M6P-modificados en Asn101, Asn161, y Asn273. En algunas
- 20 realizaciones, el LAL exógeno no comprende glicanos O-ligados. En algunas realizaciones, el LAL exógeno no comprende ácido siálico. En algunas realizaciones, el LAL exógeno tiene un patrón de glicosilación como se describe en PCT/US2011/033699, presentada el 23 de abril de 2011, que se incorpora como
- 25 referencia en esta invención en su totalidad.

En algunas realizaciones, el peso molecular del LAL exógeno es de alrededor de 55 kD.

- En determinadas realizaciones, un sujeto puede tratarse con una molécula de ácido nucleico que codifica el LAL exógeno,
- 30 por ej., en un vector. Las dosis para ácidos nucleicos que codifican polipéptidos oscilan desde alrededor de 10 ng hasta 1 g, 100 ng hasta 100 mg, 1 µg hasta 10 mg, o 30-300 µg de ADN por paciente. Las dosis para vectores virales infecciosos varían desde 10-100, o más, viriones por dosis.

En algunas realizaciones de la presente invención LAL exógeno se administra en un método de tratamiento que incluye: (1) transferir o transfectar una célula huésped susceptible de implantarse con un ácido nucleico, por ej., un vector, que expresa LAL o un fragmento activo, variante, o derivado de los anteriores; y (2) implantar la célula huésped transformada en un mamífero. En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped susceptible de implantarse se extrae de un mamífero, se cultiva en forma temporaria, se transforma o se transfecta con un ácido nucleico aislado que codifica LAL exógeno, y se implanta nuevamente en el mismo mamífero del cual se extrajo. La célula puede ser, aunque no se requiere que sea, retirada del mismo sitio en el cual se implantó. Dichas realizaciones, en ocasiones conocidas como terapia génica ex vivo, pueden proveer un suministro continuo de LAL exógeno polipéptido, durante un período limitado de tiempo.

Mientras que es posible para la proteína terapéutica proporcionada en esta invención, el LAL recombinante, que se administrará en forma en bruto, se prefiere administrar la proteína terapéutica como parte de una formulación farmacéutica.

La invención de este modo además provee formulaciones farmacéuticas que comprenden proteínas terapéuticas glicosiladas derivadas de las aves o un derivado aceptable desde el punto de vista farmacéutico de los anteriores junto con uno o más vehículos aceptables desde el punto de vista farmacéutico de los anteriores y, en forma opcional, otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos y métodos de administración de dichas formulaciones farmacéuticas. La invención provee, además, formulaciones farmacéuticas que comprenden proteínas terapéuticas glicosiladas derivadas de mamíferos o un derivado aceptable desde el punto de vista farmacéutico de los anteriores junto con uno o más vehículos aceptables desde el punto de vista farmacéutico de los

anteriores y, en forma opcional, otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos y métodos de administración de dichas formulaciones farmacéuticas.

5 El(los) vehículo(s) deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con otros principios de la formulación, y no perjudiciales para el receptor de los anteriores. Los métodos de tratamiento de un paciente (por ej., cantidad de proteína farmacéutica administrada, frecuencia de administración y duración del período de tratamiento) usando composiciones
10 farmacéuticas de la invención puede determinarse usando metodologías estándar conocidas por los médicos con experiencia en el arte.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen aquellas apropiadas para administración oral, rectal, nasal, tópica
15 (incluyendo bucal y sub-lingual), vaginal o parenteral. Las formulaciones farmacéuticas incluyen aquellas apropiadas para administración por inyección incluyendo administración intramuscular, sub-cutánea e intravenosa. Las formulaciones farmacéuticas también incluyen aquellas para administración por
20 inhalación o insuflación. Las formulaciones pueden, donde corresponda, presentarse en forma conveniente en unidades de dosificación individuales y pueden prepararse por cualquiera de los métodos conocidos en el arte de la farmacia. Los métodos de producción de las formulaciones farmacéuticas normalmente
25 incluyen el paso de hacer un puente de las proteínas terapéuticas en asociación con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y entonces, si es necesario, dar forma al producto para obtener la formulación deseada.

30 Las formulaciones farmacéuticas apropiadas para administración oral pueden presentarse en forma conveniente como unidades individuales tales como cápsulas, cachés o comprimidos cada uno con una cantidad predeterminada del principio activo; como un polvo o gránulos; como una solución;

como una suspensión; o como una emulsión. El principio activo también puede presentarse como bolo, electuario o pasta. Los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, rellenos, lubricantes, desintegrantes o agentes humectantes. Los comprimidos pueden estar recubiertos de acuerdo con métodos conocidos en el arte. Las preparaciones orales líquidas pueden ser en forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden presentarse como producto seco para constitución con agua u otro vehículo apropiado antes de usar. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles) o conservantes.

Las proteínas terapéuticas de la invención también pueden formularse para administración parenteral (por ej., por inyección, por ejemplo inyección en bolo o infusión continua) y pueden presentarse en forma de dosificación unitaria en ampollas, jeringas pre-llenadas, infusión de pequeño volumen o en envases de múltiples dosis con un conservante agregado. Las proteínas terapéuticas pueden inyectarse por, por ejemplo, inyecciones subcutáneas, inyecciones intramusculares e infusiones o inyecciones intravenosas (IV).

En una realización, el LAL exógeno se administra por vía intravenosa por infusión IV por cualquier método útil. En un ejemplo, el LAL exógeno puede administrarse por infusión intravenosa a través de una línea periférica. En otro ejemplo, el LAL exógeno puede administrarse por infusión intravenosa a través de un catéter central insertado en forma periférica. En otro ejemplo, el LAL exógeno puede administrarse por infusión intravenosa facilitada por una máquina para infusión ambulatoria unida a un puerto de acceso vascular. En una realización, la infusión intravenosa, la medicación se

administra durante un período de 1 a 8 horas dependiendo de la cantidad de medicación que se infundirá y la historia de reacción anterior del paciente relacionada con las infusiones, según lo determine el médico experto en el arte. En otra
5 realización, el LAL exógeno se administra por vía intravenosa por inyección IV. En otra realización, el LAL exógeno puede administrarse por inyección intraperitoneana. Incluso en otra realización, el LAL exógeno se administra a través de una cápsula aceptable desde el punto de vista farmacéutico de la
10 proteína terapéutica. Por ejemplo, la cápsula puede ser una cápsula de gelatina con recubrimiento entérico.

En algunas realizaciones, las proteínas terapéuticas se administran por infusión, y la infusión puede ocurrir durante un período de tiempo prolongado, por ejemplo, 30 minutos hasta
15 10 horas. De este modo, la infusión puede ocurrir, por ejemplo, durante un período de alrededor de 1 hora, alrededor de 2 horas, alrededor de 3 horas, alrededor de 4 horas, o alrededor de 5 horas. La infusión también puede ocurrir a varias velocidades. De este modo, por ejemplo, la velocidad de
20 la infusión puede ser de alrededor de 1 ml por hora a alrededor de 20 ml por hora. En algunas realizaciones, la velocidad de la infusión es 5 ml a 10 ml por hora. En una realización, la velocidad de la infusión es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 ml por hora. En una
25 realización, la velocidad de la infusión es 0,1 a 5 mg/kg/hr. En una realización, la velocidad de la infusión es de alrededor 0,1, alrededor de 0,2, alrededor de 0,3, alrededor de 0,5, alrededor de 1,0, alrededor de 1,5, alrededor de 2,0, o alrededor de 3 mg/kg/hr,

30 Las proteínas terapéuticas pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizadores y/o agentes dispersantes. Las proteínas terapéuticas pueden ser en forma

de polvo, obtenido por aislamiento específico de sólido estéril o liofilización de la solución o por liofilización a partir de la, para constitución con un vehículo apropiado, por ej., agua estéril libre de pirógenos, antes de usar.

5 Para administración tópica a la epidermis, las proteínas terapéuticas pueden formularse como ungüentos, cremas o lociones, o como parche transdérmico. Los ungüentos y cremas pueden, por ejemplo, formularse con una base acuosa u oleosa con el agregado de agentes de gelificación y/o aglutinantes
10 apropiados. Las lociones pueden formularse con una base acuosa u oleosa y en general contendrán uno o más agentes emulsionantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes aglutinantes o agentes colorantes.

 Las formulaciones apropiadas para administración tópica en
15 la boca incluyen pastillas que comprenden el principio activo en una base saborizada, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tales como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo
20 en un vehículo líquido apropiado.

 Las formulaciones farmacéuticas apropiadas para administración rectal en donde el vehículo es un sólido se representan con la mayor preferencia como supositorios de dosificación unitaria. Los vehículos apropiados incluyen
25 manteca de cacao y otros materiales utilizados comúnmente en el arte, y los supositorios pueden formarse de manera conveniente por una mezcla del principio activo con el(los) vehículo(s) suavizados o fundidos seguido de congelación o formación en moldes.

30 Las formulaciones apropiadas para administración vaginal pueden presentarse como supositorios vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o aerosoles que contienen además del principio activo, vehículos tales como los que son conocidos como apropiados en el arte.

Para administración intra-nasal las proteínas terapéuticas de la invención pueden usarse como aerosol líquido o polvo dispersable o en la forma de gotas.

5 Las gotas pueden formularse con una base acuosa que también uno o más agentes dispersantes, agentes solubilizantes o agentes de suspensión. Los aerosoles líquidos se administran en forma conveniente a partir de envases presurizados.

10 Para administración por inhalación, las proteínas terapéuticas de acuerdo con la invención pueden administrarse en forma conveniente a partir de un insuflador, nebulizador o envase presurizado u otro medio conveniente para administrar un aerosol. Los envases presurizados pueden comprender un propelente apropiado tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de 15 carbono u otro gas apropiado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse suministrando una válvula para administrar una cantidad medida.

20 Para administración por inhalación o insuflación, las proteínas terapéuticas de acuerdo con la invención pueden tomar la forma de composición de polvo anhidro, por ejemplo una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo apropiada tal como lactosa o almidón. La composición en polvo puede presentarse en forma de dosificación unitaria en, por ejemplo, cápsulas o cartuchos o, por ej., envases de gelatina o blíster 25 desde el cual el polvo puede administrarse con ayuda de un inhalador o insuflador.

Cuando se desee, pueden emplearse las formulaciones mencionadas con anterioridad adaptadas para dar liberación prolongada del principio activo.

30 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención también pueden contener otros principios activos tales como agentes antimicrobianos o conservantes.

En algunas realizaciones, la concentración de LAL exógeno en la composición farmacéutica es de alrededor de 0,5 hasta

alrededor de 10 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de LAL es de alrededor de 1 hasta alrededor de 5 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de LAL es de alrededor de 1, alrededor de 1,5, alrededor de 2, alrededor de 2,5, alrededor de 3, alrededor de 3,5, alrededor de 4, alrededor de 4,5, alrededor de 5, alrededor de 5,5, alrededor de 6, alrededor de 6,5, o alrededor de 7,5 mg/ml.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende LAL exógeno además comprende un buffer. Algunos buffers ejemplificativos incluyen buffers de acetato, fosfonato, citrato y glutamato. Algunos buffers ejemplificativos también incluyen citrato de litio, citrato de sodio, citrato de potasio, citrato de calcio, lactato de litio, lactato de sodio, lactato de potasio, lactato de calcio, fosfato de litio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, fosfato de calcio, maleato de litio, maleato de sodio, maleato de potasio, maleato de calcio, tartrato de litio, tartrato de sodio, tartrato de potasio, tartrato de calcio, succinato de litio, succinato de sodio, succinato de potasio, succinato de calcio, acetato de litio, acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de calcio, y mezclas de los anteriores. En algunas realizaciones, el buffer es citrato de trisodio dihidrato. En algunas realizaciones, el buffer es ácido cítrico monohidrato. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica comprende citrato de trisodio dihidrato y ácido cítrico monohidrato.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprenden LAL exógeno además comprende un estabilizador. Estabilizadores ejemplificativos incluyen albúmina, trehalosa, azúcares, aminoácidos, polioles, ciclodextrinas, sales tales como cloruro de sodio, cloruro de magnesio, y cloruro de calcio, lipoprotectores, y mezclas de los anteriores. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica comprende albúmina de suero humano.

En un ejemplo específico, el LAL humano recombinante producido como se describen aquí, se emplea en una formulación farmacéutica en donde cada 1 mililitro contiene LAL exógeno (por ej., 2 mg de LAL), citrato de trisodio dihidrato (por ej., 13,7 mg), ácido cítrico monohidrato (por ej., 1,57 mg), y albúmina de suero humano (por ej., 10 mg), y está formulado con un pH ácido tal como $5,9 \pm 0,1$.

La presente invención abarca cualquier vía de administración que facilite la captación del LAL exógeno en los lisosomas de los órganos y tejidos pertinentes.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos tienen como finalidad ilustrar la invención y no deben construirse como límite del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1

Tratamiento de comienzo temprano de deficiencia de LAL (Enfermedad de Wolman) por la administración de LAL recombinante

A las 15 semanas de vida, un bebé varón fue internado en el hospital debido a un escaso aumento de peso desde el nacimiento (peso al nacimiento 3,88 kg). El bebé se presentó con vómitos, problemas de alimentación, status nutricional bajo, diarrea, y aumento de distensión abdominal y anemia. El paciente fue diagnosticado con Enfermedad de Wolman.

En el análisis físico inicial, el paciente pesaba 5,62 kg colocándolo por debajo del 5to. percentil de peso para la edad. Durante las siguientes cuatro semanas desde el examen inicial a las 15 semanas de vida y antes de iniciar la infusión a las 19 semanas de vida, el paciente no aumentó de peso. La velocidad de crecimiento fue calculada en menos de 1 percentil de peso para la edad. El abdomen estaba marcadamente distendido, con significativa hepatomegalia y esplenomegalia. El ultrasonido abdominal y TC confirmaron hepatoesplenomegalia y glándulas adrenales agrandadas simétricamente en forma bilateral con

calcificación. El nivel de alanina transaminasa sérica (ALT) se elevó a 119 U/L (normal 10-50 U/L, al igual que la aspartato transaminasa (AST), a 216 U/L (normal 10-45 U/L). Antes del inicio del tratamiento, la ferritina sérica, un marcador de inflamación, se elevó aproximadamente 1.500 µg/l (normal 7-144 µg/L). El paciente resultó anémico en forma persistente antes del tratamiento con valores de hemoglobina en el rango de entre 7,2 y 8,3 g/dL.

A las 19 semanas de vida se iniciaron infusiones IV semanales de rhLAL (SBC-102) a una dosis inicial de 0,2 mg/kg. El paciente recibió pretratamiento previo con 1 mg/kg de difenhidramina aproximadamente 90 minutos antes de la infusión de SBC-102 con el fin de contrarrestar las potenciales reacciones anafilácticas a la infusión. La duración de la infusión fue de aproximadamente 4 horas. Las infusiones fueron bien toleradas, y el paciente no experimentó ningún evento adverso de la infusión.

7 días después de la infusión inicial, la segunda infusión se administró al paciente. El paciente recibió una dosis de 0,3 mg/kg de SBC-102 aproximadamente durante 4 horas y toleró la infusión sin exhibir ningún signo de eventos adversos.

Dentro de las dos semanas de tratamiento, el paciente exhibió una significativa mejora en el bienestar general, incluyendo el estado de alerta y capacidad de respuesta aumentados. La diarrea y los vómitos se estabilizaron. El paciente comenzó a aumentar de peso y exhibió marcada reducción en las transaminases séricas (por ej., AST y ALT), esencialmente hasta alcanzar los niveles normales (Figuras 1A y 1B). La velocidad de crecimiento del paciente se normalizó rápidamente (Figuras 3 y 4). La distensión abdominal se redujo, en correspondencia con una reducción en la hinchazón abdominal. Los análisis de la función hepática continuaron mostrando mejoras (Figuras 1A y 1B).

En la tercera visita, el paciente recibió SBC-102 a 0,5 mg/kg. Las infusiones continuaron tolerándose bien. El estado clínico mostró una mejora continua, con un aumento de peso de 150 g en 7 días, y un aumento de 1,5 cm en la circunferencia del brazo desde el inicio del tratamiento (Figuras 3 y 4). Los análisis de hígado fueron estables, los niveles de hemoglobina aumentaron (10-11 g/dL) y los niveles de ferritina continuaron reduciéndose (Figura 2). La fosfatasa alcalina estuvo en el rango bajo de lo normal antes del tratamiento de 137 U/L (normal 110- 300 U/L) y aumentó con el tratamiento (204 U/L). Este efecto con la administración de SBC-102 fue consistente con las observaciones realizadas en el modelo preclínico de la enfermedad.

Comenzando con la cuarta infusión, el paciente comenzó a recibir una dosis semanal de 1,0 mg/kg. Dos meses después del inicio del tratamiento, el crecimiento del paciente se mejoró sustancialmente con una velocidad de crecimiento estimada cercana al percentil 95. Este aumento en el crecimiento generó un aumento de 1,25 kg, o 2,79 libras en 63 días con un peso de 7,21 kg, colocándolo en el percentil 30 de peso para la edad (Figuras 3 y 4). Ambos niveles de AST y ALT disminuyeron rápidamente después de la primera infusión.

Con tres meses en tratamiento, AST y ALT fueron normales. Además de las mejoras en la función hepática, también se observe una marcada reducción en la ferritina (Figura 2).

Durante el transcurso de 4 meses de tratamiento, los síntomas GI del paciente se resolvieron y el estado nutricional del paciente fue excelente. El paciente continuó aumentando de peso (Figuras 3 y 4) y demostró los signos físicos de un bebé sano, normal. El paciente continuó tolerando las infusiones sin presentar ninguna reacción a la infusión u otros efectos colaterales. El paciente recibió la 21ra dosis a 1,0 mg/kg como paciente ambulatorio.

Ejemplo 2

Diseño de estudio para deficiencia de LAL de inicio temprano

SBC-102, un rhLAL producido en *Gallus* transgénico, se administra por infusión IV semanal. El estudio se diseña para evaluar la seguridad, la tolerabilidad y la eficacia de dos regímenes posológicos de SBC-102 administrado por infusiones IV semanales. Como tal, las variables de producción principal en este estudio determinan la seguridad y la tolerabilidad de SBC-102 en niños con retraso en el crecimiento debida a una deficiencia de LAL, e incluyen: signos vitales y hallazgos de exámenes físicos; pruebas clínicas de laboratorio; pruebas antifarmacológicas de anticuerpos; y uso de medicaciones concomitantes. Considerando que un retraso en el crecimiento es una característica clínica universal de la deficiencia de LAL/fenotipo de Wolman, una terapia exitosa para este trastorno debería ser capaz de dirigirse al retraso en el crecimiento visto en niños afectados por deficiencia de LAL. Los parámetros directamente relacionados con el crecimiento de los niños y el status nutricional se evalúan como objetivos secundarios o de exploración: por ejemplo, velocidad de crecimiento incremental para el peso; aumento de peso; y tasa de crecimiento lineal. Este estudio también investiga los efectos de SBC-102 sobre los biomarcadores farmacodinámicos; tamaño de hígado y bazo; linfadenopatía; hemoglobina y plaquetas; evaluaciones de laboratorio de la función hepática y nutrición; circunferencia abdominal, circunferencia del brazo medio superior y circunferencia de la cabeza. Este estudio también describe la farmacocinética preliminar de SBC-102 en niños con retraso en el crecimiento debido a deficiencia de LAL, incluyendo C_{máx} en plasma y clearance estimada.

Tabla 1: programa de evaluaciones: control hasta la semana 24

Evaluaciones	Diag no-														
		Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se
		ma	ma	ma	ma	ma	ma	ma	ma	ma	ma	ma	ma	ma	ma
		na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

Medica-mentos / terapias concomitantes	Continuos
--	-----------

^P Preinfusión

¹ HRQOL apropiado para la edad.

² El examen físico incluirá la medición del peso (peso sólo en el control), evaluación del tamaño de hígado y bazo, linfadenopatía y enfermedad arterial.

Los sujetos se enrolan en dos cohortes secuenciales de igual tamaño (4 sujetos cada una). La dosificación se escalona dentro de cada cohorte y entre cohortes, comenzando con la dosis con el primer sujeto en la cohorte de dosis baja (Cohorte 1; dosis inicial de 0,35 mg·kg⁻¹). La dosificación de sujetos adicionales en la Cohorte 1 y el inicio de la dosificación en la cohorte de dosis más alta (Cohorte 2; dosis inicial de 1 mg·kg⁻¹) se basa en la seguridad aceptable y la tolerabilidad en los sujetos precedentes.

Cohorte 1

Los primeros cuatro sujetos enrolados en el estudio constituyen la Cohorte 1. El primer sujeto en esta cohorte recibe una dosis simple de SBC-102 de 0,35 mg·kg⁻¹ y, si se aprueba para una dosis continua en base a una revisión de seguridad al menos 24 horas después de la dosis, el sujeto recibe luego una segunda dosis de SBC-102 de 0,35 mg· kg⁻¹ una semana después. Después de que el sujeto reciba la segunda dosis de SBC-102, se revisan todos los datos de seguridad disponibles, en cuyo momento se decide la aceptabilidad respecto a la escalada de la dosis para el primer sujeto a 1 mg·kg⁻¹ y el inicio de la dosificación de los otros sujetos en la Cohorte 1. La dosificación de los otros 3 sujetos de la Cohorte 1 procede de una manera similar. Si la revisión de la seguridad no garantiza la escalada de la dosis de un sujeto de

0,35 mg·kg⁻¹ a 1 mg·kg⁻¹, pero la considera segura para el sujeto para continuar el tratamiento en la dosis inicial, el sujeto puede continuar recibiendo una dosis de 0,35 mg·kg⁻¹. Si cualquier sujeto en la Cohorte 1 exhibe una respuesta subóptima al tratamiento después de recibir al menos 4 dosis de SBC-102 de 1 mg·kg⁻¹, se considera otra escalada de la dosis a 3 mg·kg⁻¹.

Cohorte 2

El comienzo de la dosificación en la Cohorte 2 se produce después de que la Cohorte 1 se haya enrolado por completo y la seguridad se haya revisado para al menos 2 sujetos que recibieron 2 o más dosis de 1 mg·kg⁻¹ de SBC-102 en la Cohorte 1. Los últimos 4 sujetos que ingresan en el estudio se enrolan y se dosifican en la Cohorte 2. El primer sujeto en esta cohorte recibe una dosis simple de SBC-102 de 1 mg·kg⁻¹ y, si se aprueba para una dosificación continua en base a la revisión de la seguridad al menos 24 horas después de la dosis, el sujeto recibe luego una segunda dosis de SBC-102 de 1 mg·kg⁻¹ una semana después. Después de que el sujeto reciba la segunda dosis de SBC-102, todos los datos de seguridad disponibles se han de revisar respecto de la aceptabilidad de lo siguiente: escalada de la dosis para el primer sujeto a 3 mg·kg⁻¹ e inicio de la dosificación de los otros sujetos en la Cohorte 2. La dosificación de los otros 3 sujetos de la Cohorte 2 se lleva a cabo de una manera similar, con una revisión de la seguridad. Si el revisor de la seguridad no aprueba una escalada de la dosis del sujeto de 1 mg·kg⁻¹ a 3 mg·kg⁻¹, pero se considera segura para que el sujeto continúe el tratamiento con la dosis inicial, el sujeto puede continuar recibiendo una dosis de 1 mg·kg⁻¹. Si la dosis inicial de 1 mg·kg⁻¹ no es bien tolerada por un sujeto, se puede considerar una dosis reducida de 0,35 mg·kg⁻¹.

El estudio consiste en aproximadamente 22 visitas programadas: Visita 1 (control), Visita 2 (evaluación de la línea de base, inicio del fármaco de estudio) a la Visita 21 (administración semanal del fármaco de estudio), Visita 22 (final del seguimiento del estudio). Dada la gravedad y la naturaleza de la amenaza de vida del retraso en el crecimiento de inicio temprano debido a la deficiencia de LAL, es probable que estos sujetos deban ser hospitalizados.

La población blanco para el estudio son niños y niñas con retraso del crecimiento debido a la deficiencia de LAL. Un sujeto se puede elegir para participar en este estudio si se cumplen los siguientes criterios: (1) el padre del sujeto o su tutor legal comprende la naturaleza completa y la finalidad del estudio, incluyendo los posibles riesgos y efectos colaterales, y proporciona un consentimiento informado por escrito / permiso antes de cualquier procedimiento de estudio que se realice; (2) niños y niñas con una actividad de LAL reducida documentada respecto del rango normal del laboratorio que realiza el ensayo o resultado documentado de ensayo genético molecular que confirma una diagnosis de la deficiencia de LAL; y (3) retraso en el crecimiento con inicio antes de los 6 meses de edad.

Seguridad

Las variables de seguridad primarias incluyen la incidencia de eventos adversos (AEs) y reacciones relacionados con la infusión (IRRs); cambios de la línea de base en los signos vitales (presión sanguínea, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y temperatura), hallazgos de exámenes físicos y ensayos clínicos de laboratorio (CBC/hematología, química sérica y urinálisis); uso de medicaciones concomitantes / terapias; y caracterización de anticuerpos anti-SBC-102 (ADAs) que incluyen la tasa de seroconversión, tiempo para la

seroconversión, título de ADA medio y pico de inmunoglobulina G (IgG) y tiempo para el título de ADA pico de IgG.

Eficacia

5 Las variables de eficacia incluyen: (1) cambio y/o porcentaje de cambio desde la línea de base en el tamaño de hígado y de bazo (por ultrasonido) y volumen de hígado y bazo y contenido de grasas (por resonancia magnética por imágenes [MRI]); y (2) cambio de la línea de base en transaminasas
10 séricas, lípidos séricos (colesterol total, triglicéridos, lipoproteína de alta densidad [HDL], y lipoproteína de baja densidad [LDL]), recuento de hemoglobina y plaquetas. Los parámetros de crecimiento, incluidos el cambio de la línea de base en percentilos y puntajes z, también se evalúan para
15 sujetos ≤ 18 años de edad. Estos parámetros de crecimiento se basan en diagramas de crecimiento de los centros de control patológico (CDC) e incluyen peso por edad (WFA), peso por longitud (WFL), longitud por edad (LFA) y circunferencia de la cabeza por edad (HCFA) en sujetos < 30 meses de edad y WFA,
20 estatura por edad (SFA; nota: la estatura se refiere a la altura de un sujeto), y peso por estatura (WFS) en sujetos ≥ 36 meses a 18 años de edad, así como los correspondientes indicadores del estado de crecimiento de bajo peso, emaciación y retraso en el crecimiento en todos los sujetos.

25

Ejemplo 3

Análisis Físicos de Pacientes con Aparición Temprana de Deficiencia de LAL

Los pacientes que son lo suficientemente estables desde el
30 punto de vista clínico para tolerar anestesia general deben considerarse para colocación de línea central para acceso vascular a largo plazo. En sujetos que reciben anestesia general y/o sedación para otros procedimientos, se considera un análisis basal por imágenes abdominales por resonancia

magnética (MRI). En el caso de nuevos procedimientos que requieren anestesia general y/o sedación, se considera un MRI de seguimiento si no es antes de los 3 meses después de la primera infusión. Se miden antropométrica (peso, altura, 5 circunferencia abdominal, circunferencia de la parte superior del brazo y circunferencia de la cabeza). Se realiza un análisis físico general. Se conduce un análisis físico completo. El examen incluye una evaluación del aspecto general del sujeto, piel, cabeza, ojos, oídos, nariz y garganta, 10 corazón, pulmones, abdomen, extremidades/ articulaciones, y estado neurológico. Cada análisis físico incluye, además, lo siguiente:

Tamaño del hígado: Se realiza una evaluación clínica del tamaño del hígado (palpable/no palpable y centímetros por 15 debajo del margen costal), regularidad (suave/ nodular) y sensibilidad (sensible/ no sensible).

Tamaño del Bazo: Se realiza una evaluación clínica de tamaño del bazo (palpable/no palpable y centímetros por debajo del 20 margen costal), regularidad (suave/ nodular) y sensibilidad (sensible/ no sensible).

Linfadenopatía: Se realiza una evaluación del tamaño, locación, y carácter de cualquier nodo linfático palpable. Las áreas a examinar incluyen: cefálica (occipital, preauricular, 25 postauricular, submental, submandibular), cervical, clavicular, axilar, e inguinal. Cualquier nodo agrandado se caracteriza como sensible o no sensible.

Fotografía: Se sacó una imagen digital del sujeto en posición supina (de longitud completa y acercamiento abdominal)

30 *Ecografía hepática/ bazo y MRI*

Puede realizarse una ultrasonografía para medir el tamaño del hígado y el bazo. La MRI abdominal puede brindar una mejor cuantificación del volumen del hígado y el bazo y considerarse

en el momento basal y en una visita por lo menos 3 meses después de la primera infusión.

Signos Vitales

5 Los signos vitales incluyen velocidad del pulso, índice respiratorio, presión arterial sistólica y diastólica y temperatura corporal (rectal u oral). Se realizó una evaluación de la velocidad del pulso y presión arterial después de que el sujeto se encontraba en posición supina. Los
10 signos vitales se miden en todas las visitas del estudio. Los días en que se realiza la administración, los signos vitales se registran antes de la infusión, cada 15 minutos (± 10) durante la infusión y durante 2 horas después de la infusión y luego cada 30 minutos (± 15) entre 2 y 4 horas después de
15 completar la infusión.

Ejemplo 4

Análisis de Laboratorio

Se realizaron los siguientes análisis de laboratorio como
20 análisis de diagnóstico y eficiencia:

1) **CBC/Hematología:** Recuento de glóbulos blancos, recuento de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio MCV, hemoglobina corpuscular media (MCH), concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), recuento de
25 plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, frotis periférico para análisis de la morfología celular

2) **Panel químico:** Glucosa, nitrógeno de urea, creatinina, sodio, potasio, cloruro, calcio (total y ionizado), magnesio,
30 fósforo inorgánico, proteínas totales, lactato deshidrogenasa

3) **Análisis de la función hepática:** AST/transaminasa glutámico oxalacética sérica (SGOT), ALT/transaminasa glutámico pirúvica sérica (SGPT), fosfatasa alcalina,

gammaglutamil transpeptidasa (GGTP), albúmina, bilirrubina (directa, total)

4) Anticuerpos anti-medicamento: Anticuerpo Anti-SBC-102

5 **5) Análisis de Orina:** pH, glucosa, cetonas, sangre, proteína, nitrito

6) Estudios de coagulación: leucocitos (el análisis microscópico se pueden realizar si la sangre, nitritos y/o leucocitos son anormales)

10 **7) Análisis de Laboratorio sobre Nutrición:** alfa tocoferol sérico: relación de colesterol, vitamina D 25OH, retinol sérico, dideshidroretinol, transtiretina, ferritina sérica.

8) Panel de Lípidos: Colesterol total, triglicérido, HDL, LDL

9) Perfil genético

15 Las secuencias de DNA, incluyendo la secuencia de codificación de las proteínas y secuencias que regulan la transcripción génica, estabilidad del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y la eficiencia de la traducción de proteínas que pueden identificarse incluyen:

1. Ácido lipasa lisosomal (gen LIPA)

20 2. Genes que codifican proteínas involucradas en la biología de los lípidos que pueden contribuir a y/o modificar el fenotipo de la enfermedad de Deficiencia de LAL, por ej., ABCA1

25 3. Genes que pueden modificar la susceptibilidad a cualquier SBC-102

10) Evaluaciones de Farmacocinética

30 Para reducir el riesgo de anemia iatrogénica, la recolección de muestras de FC puede limitarse. En el orden de importancia, se recolectan muestras para derivar los siguientes parámetros: 1) C_{máx} y 2) estimación de CL. La recolección de muestras para medición de los niveles de SBC-102 sérico el Día 0 (Dosis 1) y Día 105 (Dosis 16) se recolectan. En todos los sujetos, se recolectan muestras antes de la dosis (dentro de 30 minutos de dosificación); a los 90(±5) minutos después del

comienzo de la infusión; y a los 110(±5) minutos después del
comienzo de la infusión. Todas las muestras de FC, en los
momentos que coinciden con una evaluación de signos vitales,
deben tomarse antes de la inflación del mango para evaluación
5 de la presión arterial en el brazo donde no se realiza la
infusión. Las muestras de FC en otros momentos se toman por lo
menos 5 minutos después de la deflación del mango.

Ejemplo 5

10 *Preparación e infusión de la dosis*

SBC-102 se presenta en viales de vidrio de una sola dosis
de 10 ml en un líquido transparente. La solución (total 10,5 ml
incluyendo 5% de reserva) tiene una concentración de 2 mg·ml⁻¹.
Todos los viales de SBC-102 se almacenan en una temperatura
15 controlada de 2-8°C. Los viales se congelan y se protegieron
de la luz durante el almacenamiento. La jeringa que contiene
SBC-102 diluido en 0,9% de solución salina se preparó
inmediatamente antes de la infusión. Cuando la jeringa de SBC-
102 se había preparado con anticipación, la solución diluida se
20 rotuló y se usó dentro de las 4 horas de preparación.

Se usó el peso del paciente, según se registró antes de la
dosificación a la mañana de la infusión y se redondeó hasta 0,1
kg más cercano, para calcular el volumen de SBC-102 para cada
infusión. Los volúmenes totales de infusión usados en el
25 estudio se basan en el régimen de dosificación que se muestra
en la Tabla 2.

Tabla 2

Dosis	Volumen de Infusión
0,35 mg/kg	10 ml
1 mg/kg	10 ml
3 mg/kg	20 ml

La preparación de la dosis y administración deben
30 realizarse usando materiales descartables estériles, no

pirogénicos, incluyendo, aunque sin restringirse a, agujas, sondas de transferencia y tapones.

La velocidad de la infusión en el dispositivo que regula el flujo debiera ser configurada para administrar el volumen total durante aproximadamente 120 minutos, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Dosis	Velocidad de infusión por hora	Velocidad de infusión por minuto	Velocidad de infusión por kilogramo por hora
0,35 mg/kg	5 ml	0,083 ml	0,175 mg/kg/hr
1 mg/kg	5 ml	0,083 ml	0,5 mg/kg/hr
3 mg/kg	10 ml	0,167 ml	1,5 mg/kg/hr

10 **Ejemplo 6**

Eventos adversos (EAs)

En sujetos que experimentaron EAs o reacciones relacionadas con la infusión (IRR) con efectos clínicamente significativos a nivel cardiovascular, respiratorio, o otros efectos, la infusión debe discontinuarse y el sujeto debe recibir tratamiento para una reacción anafiláctica de acuerdo con los lineamientos institucionales para manejo de reacciones severas a la infusión en niños menores de 2 años de edad. Estos pueden incluir anti histaminas intravenosas, corticosteroides, y epinefrina, si es necesario. Para productos biológicos relacionados, la mayoría de los IRRs demorados ocurre más de 24 horas después de la infusión. Los síntomas incluyen artralgia, mialgia, síntomas similares a los de la gripe, cefalea, cansancio y erupción o urticaria. Las reacciones tardías pueden tratarse con analgésicos o anti

histaminas según se indique desde el punto de vista clínico. Los IRRs se clasifican como agudo (que ocurre dentro de las 24 horas del comienzo de la infusión) o tardíos (que ocurren entre 1 y 6 días después de la infusión). Los medicamentos y equipos para el tratamiento de reacciones de hipersensibilidad deben estar disponibles para uso inmediato en el caso de reacciones severas e inesperadas de hipersensibilidad. Estos suministros incluyen, aunque no se restringen a, oxígeno, paracetamol, anti histaminas (por ej., difenhidramina, parenteral y PO), corticosteroides, epinefrina y dispositivos de resucitación cardiopulmonar. En productos biológicos similares, los IRRs más agudos ocurren dentro de 24 horas después de la infusión (información para prescripción de Cerezyme®, VPRIV®, Fabrazyme®). Los signos de un posible IRR agudo pueden categorizarse como: IRRs leves a moderados: hiperemia, rubor, fiebre y/o escalofríos, náuseas, purito, urticaria, síntomas gastrointestinales (vómitos, diarrea, calambres abdominales). Las reacciones leves se definen como reacciones auto-limitativas, de resolución espontánea después de la interrupción temporaria o una reducción en la velocidad de la infusión. Las reacciones moderadas se definen como reacciones que no se resuelven con medidas simples, requieren observación prolongada y discontinuación del tratamiento. Los IRR severos indican dolor en el pecho, disnea, estornudos, estridor, hipotensión o hipertensión, paro respiratorio, apnea, bradicardia o taquicardia. Si cualquiera de los signos y síntomas anteriores se observan durante la infusión y el sujeto permanece hemodinámicamente estable, puede reducirse la velocidad de la infusión (reducirse hasta la mitad del índice dado al comienzo del evento, por ej., desde 10 ml·hr⁻¹ hasta 5 ml·hr⁻¹) y extenderse el tiempo de infusión. Una vez que el evento se ha resuelto, la infusión debe continuar durante un mínimo de 30 minutos a la velocidad reducida antes de aumentar el índice hasta 75% de la velocidad original en el cronograma

de infusión. Si el sujeto continúa mostrando signos de hipersensibilidad, puede administrarse una dosis IM o IV lenta de un antihistamínico de acuerdo con los lineamientos institucionales para el manejo de reacciones por infusión en niños menores de 2 años de edad.

Ejemplo 7

Administración de rhLAL a un paciente humano con deficiencia de LAL de inicio tardío

El objetivo primario del estudio consiste en evaluar la seguridad y la tolerabilidad de SBC-102 en pacientes con disfunción hepática debido a una deficiencia de LAL de inicio tardío (signos vitales, exámenes físicos, pruebas clínicas de laboratorio, pruebas de inmunogenicidad, evaluación de eventos adversos, terapias concomitantes). El objeto secundario consiste en caracterizar la farmacocinética de SBC-102 provista por infusión IV después de dosis únicas y múltiples (pre- y posinfusión día 0 y 21). Los criterios de inclusión para sujetos con deficiencia de LAL de inicio tardío son los siguientes:

1. El paciente comprende la naturaleza completa y la finalidad del estudio, incluyendo los posibles riesgos y efectos colaterales, y está dispuesto y es capaz de cumplir todos los procedimientos de estudio y proporcionar un consentimiento informado;
2. Pacientes hombres o mujeres ≥ 18 y ≤ 65 años de edad;
3. Actividad de LAL reducida documentada respecto del rango normal del laboratorio realizando el ensayo o resultado documentado de ensayo genético molecular que confirma la diagnosis de deficiencia de LAL;
4. Evidencia de implicación del hígado en base a la presentación clínica (hepatomegalia) y/o resultados de ensayos de laboratorio (ALT o $AST \geq 1,5 \times ULN$);

5. Si en una estatina o ezetimibe, el paciente debe estar en una dosis estable durante al menos 4 semanas antes del control;
6. Todas las mujeres deben tener una prueba de embarazo seronegativa en el control y no pueden estar amamantando; y
7. Los pacientes mujeres de potencial edad fértil deben coincidir en el uso de un método anticonceptivo muy efectivo y aprobado por toda la duración del estudio y continuar con el uso durante 30 días después de la última dosis.

Las evaluaciones clínicas incluyen exámenes físicos, urinálisis, análisis químicos clínicos, CBC/hematología, reactivos de fase aguda, estudios de coagulación, 12-ECG, anticuerpos anti-SBC-102, y PK para derivar $C_{\max}$, AUC_{inf} , $T_{1/2}$, Cl y V_{ss} .

A los pacientes se dan $0,35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ o $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de LAL una vez por semana por infusión intravenosa (IV) durante 2 horas. El primer sujeto se dosifica y se controla respecto de la tolerabilidad durante al menos 24 horas antes de proceder con la dosificación de los otros sujetos en la cohorte. Cada sujeto queda en el paciente durante 24 horas después de su primera infusión de SBC-102. Los sujetos continúan con 3 dosis adicionales de infusiones IV una vez por semana de la dosis de SBC-102 siempre que la tolerabilidad y la seguridad sigan siendo aceptables.

Farmacocinética

Los datos de PK se analizan usando todos los sujetos que ingresan en el estudio que recibe al menos una dosis de medicación de estudio, excluyendo cualquier punto de dato que fue influido por una mayor desviación del protocolo. Los análisis de PK se llevan a cabo usando un modelo de infusión en

compartimiento. Los parámetros de PK siguiente se derivan y presentan por la cohorte ($C_{\text{máx}}$, AUC_{inf} , $T_{1/2}$, Cl y V_{ss}). Los parámetros de PK únicos y múltiples se comparan usando los datos de Visita 2 y Visita 6.

5 El incremento propuesto entre las dosis en este estudio puede ser de 3, 4, 5 ó 6 veces que puede permitir la evaluación de la seguridad inicial, tolerabilidad y farmacocinética en humanos a través de un rango de 6 veces de dosis sobre una base de $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. En un modelo de rata preclínico relevante, los
10 efectos farmacodinámicos de $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ una vez por semana, $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ una vez cada dos semanas y $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ una vez por semana son comparables. Así, a pesar de que no se anticipa que se requieren dosis mayores a $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ una vez por semana, se
15 pueden considerar dosis de más de $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, tales como 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ según la gravedad de la enfermedad.

Diseño del estudio

Dada la rareza de pacientes con esta condición patológica, el número objeto para este estudio es de 9 sujetos evaluables.
20 Los sujetos se enrolan en tres cohortes secuenciales de 3 sujetos por cohorte. Los sujetos asignados a la cohorte 1 comienzan la dosificación primero, seguido por aquellos asignados a la cohorte 2, luego aquellos de la cohorte 3.

25 **Tabla 4: programa de estudio de deficiencia de LAL de inicio tardío: Visitas, evaluaciones e intervalos**

TC = llamada telefónica

^P Predosis

¹ Incluyendo historia de alcohol (cuestionario AUDIT)

5 ² Incluyendo altura y peso

³ Predosis, cada 15 minutos durante la infusión, cada 15 minutos durante 2 horas después de la infusión y cada 30 minutos durante las horas 2-4 después de la infusión

10 ⁴ Suero en la Visita 1 y la Visita 8; orina en la Visita 2 y la Visita 6

⁵ Predosis, 10, 15, 20, 40, 60, 90 minutos durante la infusión, al final de la infusión (aproximadamente 120 minutos) y 5, 10, 20, 30, 40, 60 y 120 minutos después de la infusión

15 *Cohorte 1*

Tres sujetos reciben infusiones IV de 0,35 mg·kg⁻¹ de SBC-102. El primer sujeto se dosifica y controla respecto de la tolerabilidad durante al menos 24 horas antes de proceder con la dosificación a los otros 2 sujetos en la cohorte. Cada
20 sujeto queda en el paciente durante 24 horas después de su primera infusión de SBC-102. Los sujetos continúan con 3 infusiones IV adicionales de 0,35 mg·kg⁻¹ siempre que la tolerabilidad y la seguridad sean aceptables.

25 *Cohorte 2*

Tres sujetos reciben infusiones IV de 0,35 mg·kg⁻¹ de SBC-102. El primer sujeto en la Cohorte 2 se dosifica y controla respecto de la tolerabilidad durante al menos 24 horas antes de proceder con la dosificación a los otros 2 sujetos en la
30 cohorte. Cada sujeto queda en el paciente durante 24 horas después de su primera infusión de SBC-102. Los sujetos continúan con 3 infusiones IV adicionales de 1 mg·kg⁻¹ siempre que la tolerabilidad y la seguridad sean aceptables.

Cohorte 3

Tres sujetos reciben infusiones IV de $0,35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de SBC-102. El primer sujeto en la Cohorte 3 se dosifica y controla respecto de la tolerabilidad durante al menos 24 horas antes de proceder con la dosificación a los otros sujetos en la cohorte. Cada sujeto queda en el paciente durante 24 horas después de su primera infusión de SBC-102. Los sujetos continúan con 3 dosis adicionales de infusiones IV una vez por semana de $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, siempre que la tolerabilidad y la seguridad sean aceptables.

El Comité de Seguridad (SC) puede suspender la dosificación para una cohorte entera o para un sujeto individual en cualquier punto debido a una pobre tolerabilidad o riesgos potenciales de seguridad.

Si el sujeto se discontinúa del tratamiento de estudio en una visita programada distinta de la Visita 8 (fin del estudio) o en una visita no programada, el sujeto debería retornar no antes de 7 días después de la última dosis de SBC-102 para las evaluaciones de fin de estudio realizadas en la Visita 8.

Se administra SBC-102 por infusión IV en las Visitas 2, 4, 5 y 6. Las terapias concomitantes se registran en todo el estudio. Los eventos adversos se registran desde el momento de la firma del consentimiento informado.

Cada sujeto recibe un total de cuatro dosis semanales de SBC-102 siempre que la tolerabilidad y la seguridad sigan siendo aceptables.

Duración del estudio

El estudio implica 4 semanas de dosificación con SBC-102 y un período de lavado para sustentar la evaluación de seguridad y programa de dosificación para las posteriores pruebas clínicas. Tras completar este estudio, los sujetos se pueden elegir para resumir SBC-102 después de un protocolo separado para evaluar la seguridad y eficacia a largo plazo de SBC-102 en pacientes con deficiencia de LAL/fenotipo de CESD.

Examen físico

Un examen físico general se lleva a cabo por medio de una persona médicamente calificada. Los sistemas (que incluyen, pero sin limitación, los sistemas cardiovascular, respiratorio, gastrointestinal y neurológico) se deben especificar y registrar. Cualquier anormalidad debe ser establecida cada vez que se realice un examen. La diagnosis de nuevas anormalidades se deberá registrar como eventos adversos, de ser aplicable.

Evaluaciones de exámenes físicos adicionales para realizar en la visita de control:

a) Tamaño del hígado: Se hace una evaluación clínica del tamaño del hígado (palpable/no palpable y centímetros por debajo del margen costal), regularidad (lisa/nodular) y sensibilidad (suave/no suave).

b) Linfadenopatía: Se realiza una evaluación del tamaño, ubicación y carácter de cualquier nodo linfático palpable. Las áreas para examinar incluyen: cefálica (occipital, preauricular, posauricular, submental, submandibular), cervical, clavicular, axilar e inguinal. Cualquier nodo agrandado se caracteriza como blando o no blando.

c) Enfermedad arterial: Los pulsos de Posterior Tibialis y Dorsalis Pedis derechos e izquierdos se evalúan clínicamente y se registran los índices del tobillo braquial izquierdo y derecho (ABI). ABI se define como la relación de la presión sistólica en la arteria dorsalis pedis o posterior tibial dividido por la presión sistólica braquial del brazo izquierdo o derecho (lo que sea mayor).

Signos vitales

Se miden los signos vitales, incluyendo velocidad del pulso, frecuencia respiratoria, presión sanguínea sistólica y diastólica y temperatura. La evaluación de la frecuencia del pulso y a presión sanguínea se realiza después de que el sujeto

haya estado en una posición semisupina durante al menos 5 minutos. En los días de la dosificación, los signos vitales se registran preinfusión, cada 15 minutos (± 5) durante la infusión y durante 2 horas después de la infusión y luego cada 30 minutos (± 10) entre 2 y 4 horas después de completar la infusión. Las lecturas adicionales se pueden realizar a discreción del investigador en el evento de una reacción relacionada con una infusión (IRR). Se realiza 12- electrocardiograma (ECG) con registros formales después de que el sujeto haya estado en posición supina durante al menos 5 minutos.

Evaluaciones de laboratorio

Se toman muestras de laboratorio en los momentos temporales indicados en el programa de evaluaciones. Se realizan los siguientes análisis (a excepción de ESR, estudios de coagulación y anticuerpos anti-SBC-102).

CBC/Hematología: recuento de glóbulos blancos, recuento de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCH), concentración media corpuscular de hemoglobina (MCHC), recuento de plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos

Panel químico: Glucosa, urea nitrogenada, creatinina, sodio, potasio, cloruro, calcio, magnesio, fósforo inorgánico, proteína total, lactato deshidrogenasa, ácido úrico

Ensayo de la función hepática: AST/SGOT, ALT/SGPT, fosfatasa alcalina, GGTP, albúmina, bilirrubina (directa, total)

Panel lipídico: colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL

Estudios de coagulación: relación estandarizada internacional de tiempo de protrombina (PT) (INR), tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT)

Urinálisis: Glucosa, cetonas, sangre, pH, proteína, nitrito u leucocitos (el examen microscópico se realizará sólo si la sangre, proteína, nitrito y/o leucocitos son anormales)

Control de hepatitis viral: serología de HBsAg y HCV (en el control o si se indica clínicamente durante el ensayo)

Control de hepatitis autoinmune: anticuerpo del músculo anti-suave (ASMA), anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpo anti-LKM1, anticuerpo anti-SLA

Anticuerpo antifármaco: Anticuerpo anti-SBC-102

Reactivos en fase aguda: proteína reactiva con C de alta sensibilidad (CRP), tasa de sedimentación de eritrocitos (ESR) y ferritina sérica

Prueba de embarazo: Todas las mujeres tienen, como mínimo, pruebas de embarazo mensuales. Se realizan usando suero en la Visita 1 y Visita 8 y orina en la Visita 2 y Visita 6.

Evaluaciones farmacocinéticas (PK): se toman muestras de PK del brazo opuesto a la cánula de infusión. El muestreo intensivo para la medición de niveles séricos de SBC-102 el día 0 (dosis 1, Visita 2) y Día 21 (dosis 4, Visita 6) se colecta: inmediatamente predosis (en el lapso de 30 minutos de dosificación); a 10($\pm$ 1), 15($\pm$ 1), 20($\pm$ 1), 40($\pm$ 2), 60($\pm$ 2) 90($\pm$ 2) minutos durante la infusión y al final de la infusión (aproximadamente 120 minutos); y 5($\pm$ 1), 10($\pm$ 1), 20($\pm$ 1), 30($\pm$ 1), 40($\pm$ 2), 60($\pm$ 2) y 120($\pm$ 2) minutos después de terminar la infusión.

Preparación de SBC-102

El peso del sujeto registrado en la Visita 1 se usa para calcular el volumen de SBC-102 para cada infusión. El producto farmacológico SBC-102 para la infusión IV se prepara por dilución usando las siguientes etapas:

- 5
1. Los viales se retiran del refrigerador.
2. Se confirma que la fecha de vencimiento en el vial no pasó.
3. Se determina el volumen total calculado de SBC-102 requerido para la dosificación.

10

Ejemplo:
Wt del sujeto (en kg): 70 kg
Nivel de dosis del sujeto: 3 mg·kg⁻¹
Concentración de la droga: 2,0 mg·mL⁻¹

15

1. Cálculo de la dosis del sujeto:

Peso (en kg)	x	Nivel de dosis	=	Dosis total
70 kg	x	$\frac{3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}}{1}$	=	210 mg

2. Cálculo del volumen de inyección:

Dosis diaria total	÷	Concentración de la dosis en el vial	=	Volumen de inyección total
210 mg	÷	2,0 mgmL ⁻¹	=	105 mL

- 20
4. Se usan las siguientes bolsas de infusión salina al 0,9% en base a la asignación del grupo de dosificación:

Cohorte	Dosis (mg·kg ⁻¹) ¹⁾	Volumen de la bolsa de infusión (mL)
---------	--	--------------------------------------

1	0,35	100
2	1	
3	3	250

- 5
- 10
- 15
5. Se retira un volumen equivalente al volumen de SBC-102 requerido para la dosificación (tal como se calculó en la etapa 3 anterior) de una bolsa de infusión de 100 mL o de 250 mL de solución salina al 0,9% (es decir, usando el ejemplo anterior, 105 mL de solución salina se retiran de una bolsa de infusión de 250 mL).
6. El volumen total calculado de SBC-102 en la bolsa de infusión de solución salina al 0,9% se retira y se transfiere (es decir, usando el ejemplo anterior, se retiran 105 mL de solución de SBC-102 y se transfieren a la bolsa de infusión).
7. Se usa moderada inversión para mezclar la bolsa.

Administración de rhLAL

- 20
1. La tubería de infusión IV se adjunta a la bolsa diluida de SBC-102.
2. El tubo se ceba y todo el aire se expelle.
3. Se fija la tasa de infusión en el dispositivo regulador de flujo para administrar el volumen total en las siguientes tasas durante aproximadamente 100 minutos:

Cohorte	Dosis (mg·kg ⁻¹)	Tasa de infusión (por hora)	Tasa de infusión (por minuto)
1	0,35	60 mL	1 mL
2	1		
3	3	150 mL	2,5 mL

4. Se selecciona el sitio de infusión IV, que varía de sujeto en sujeto puede incluir venas antecubitales o de la muñeca (o un catéter venoso central).
5. El tubo IV se fija en el angiocatéter. La solución salina se inyecta en el tubo IV para evaluar la permeabilidad y para verificar que la solución salina se vuelca con facilidad.
6. El tubo IV se asegura con cinta.
7. La infusión de SBC-102 comienza usando un dispositivo de regulación de flujo.
8. La infusión se controla de modo regular.
9. Cuando la bolsa está vacía, se inyectan inmediatamente 25 mL de solución salina al 0,9% en la bolsa de infusión usando el puerto de inyección.
10. El tubo se vacía a la misma tasa de infusión (60 mL por hora [1 mL por minuto] para la dosis de $0,35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ y $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ y 150 mL por hora [2,5 mL por minuto] para la dosis de $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) hasta completar la infusión. El fin de la infusión se define cuando la infusión y el vaciado se hayan completado y documentado.

Reacciones de infusión

Una reacción relacionada con la infusión (IRR) se define como cualquier evento adverso mediado inmunológicamente que está relacionado al menos posiblemente con la infusión. Las IRR se clasifican como agudas (que ocurren dentro de las 24 horas del inicio de la infusión) o retardadas (que ocurren entre 1 y 14 días después de la infusión).

Las medicaciones y el equipo para el tratamiento de reacciones de hipersensibilidad deben estar disponibles para un uso inmediato en el caso de reacciones inesperadas de hipersensibilidad severa. Incluyen, pero sin limitación, oxígeno, acetaminofeno, antihistaminas (por ejemplo,

difenhidramina, parenteral y PO), corticosteroides, epinefrina (adrenalina) y dispositivos de resucitación cardiopulmonar.

Los signos de una posible IRR aguda pueden ser hiperemia, enrojecimiento, fiebre y/o escalofríos, náuseas, prurito, urticaria, síntomas gastrointestinales (vómitos, diarrea, calambres abdominales), reacciones cardiopulmonares, incluyendo dolor de pecho, disnea, sibilancias, estridor, hipotensión o hipertensión. Si se observa cualquiera de los signos y síntomas anteriores durante la infusión y el sujeto queda hemodinámicamente estable: la tasa de infusión se debe lentificar o detener. Si el sujeto continúa mostrando signos de hipersensibilidad, se deberá administrar una dosis IM o IV lenta de una antihistamina. En sujetos que experimenten reacciones severas por infusión con efectos cardiovasculares o respiratorios clínicamente significativos, la infusión se discontinúa. En una reacción anafiláctica de este tipo, el sujeto se puede tratar con antihistaminas intravenosas, corticosteroides y epinefrina.

20 **Ejemplo 8**

Administración de LAL recombinante en un Modelo de Rata

El efectos de la dosificación reiterada con LAL humano recombinante sobre el peso, triglicéridos y colesterol en tejidos, la hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía, peso intestinal, y otros parámetros se evalúan en ratas de Donryu con Deficiencia de LAL como se describe en Yoshida y Kuriyama (1990) Laboratory Animal Science, vol 40, p 486-489 (ver también Kuriyama et al (1990) Journal de Lipid Research, vol 31, p 1605-1611; Nakagawa et al, (1995) Journal de Lipid Research, vol 36, p 2212-2218), cuya divulgación se incorpora en su totalidad en esta invención como referencia.

A las 4 semanas de vida, las ratas Donryu que son homócigas para la elección de LAL (LAL -/-), se separaron en grupos que recibirían una dosis de LAL humano recombinante

producido en el sistema oviducto de un pollo transgénico o un placebo de solución salina. Se usaron ratas cría, agrupadas por edad, tipo salvaje, como controles. Las ratas LAL -/- recibieron una dosis una vez por semana durante cuatro semanas

5 (cuatro dosis en total) o una vez cada dos semanas durante cuatro semanas (dos dosis en total) por inyección en la vena de la cola como una sola dosis o en dos dosis iguales aplicadas con 30 minutos de separación. Las dosis de LAL recombinante fueron 1 mg/kg o 5 mg/kg. El cronograma de dosificación se

10 muestra en la Tabla 5.. Las ratas recibieron un pre-tratamiento con difenhidramina (5 mg/kg) para contrarrestar las potenciales reacciones anafilácticas, un procedimiento que se basa en experiencias anteriores en modelos animales de terapia de reemplazo de enzimas de la enfermedad de almacenamiento

15 lisosomal (Shull et al. (1994) Proceedings of the National Academy of Science, vol 91, p. 12937; Bielicki et al. (1999) The Journal de Biological Chemistry, 274, p. 36335; Vogler et al. (1999) Pediatric Research, 45, p. 838.), cuya divulgación se incorpora en su totalidad aquí a modo de referencia.

20 La Figura 9 muestra el progreso diario en el aumento de peso de ratas que reciben indistintamente 1 mg/kg de LAL recombinante por semana o 5 mg/kg de LAL recombinante por semana o 5 mg/kg de LAL recombinante por dos semanas. Puede observarse en la Figura que hay poca o ninguna diferencia en el

25 efecto terapéutico entre los dos tamaños y frecuencias de las dosis.

Tabla 5: Peso y Cronograma de Dosificación de ratas Donryu con deficiencia de LAL

Día desde el nacimiento	Evaluaciones/ inyecciones realizadas	
Día 13	P	
Día 14	E	

Día 20	S	
Día 21	A	Las crías se destetaron
Día 24	J	
Día 25	E	
Día 27		
Día 28		Primera Inyección para administración una vez cada semana y una vez cada dos semanas
Día 31		
Día 32		
Día 34		
Día 35		Segunda Inyección para administración una vez cada semana
Día 38		
Día 39		
Día 41		
Día 42		Tercera Inyección para administración una vez cada semana; Segunda administración para una vez cada dos semanas
Día 45		
Día 48		
Día 49		Cuarta inyección para administración una vez cada semana
Día 55		
Día 56		Necropsia

Ejemplo 9

Análisis patológico de Ratas LAL -/- tratadas con LAL recombinante

5 Al finalizar el estudio descrito en el Ejemplo 8, los animales del estudio se sacrificaron humanamente y se sometieron a necropsia para examinar la patología general, histopatología, y química clínica. La necropsia general incluyó la superficie externa del cuerpo, todos los orificios, y la cavidad torácica, craneana y abdominal y sus contenidos. La masa de los órganos y tejidos internos se determinó para las ratas y se cosecharon los órganos y tejidos y se fijaron en

10

formalina con buffer neutro al 10%. Luego de la fijación, los tejidos se procesaron y se prepararon y evaluaron cortes histológicos de secciones manchadas con hematoxilina y eosina.

El examen patológico general de los animales tratados
5 mostró una normalización sustancial en el tamaño y el color del hígado y color como puede observarse en la disección que se muestra en la Figura 10. Las proporciones de órgano a peso corporal se determinaron y se demostró una reducción en el tamaño relativo para hígado, bazo, tejido mesentérico, duodeno,
10 jejunio, íleo en animales tratados exitosamente que se diseccionaron, cuando se compara con las ratas tratadas con placebo. La histopatología de tejido hepático de ratas tratadas con LAL recombinante analizadas muestra histología hepática esencialmente normal en marcado contraste con la
15 acumulación sustancial de macrófagos espumosos en los animales tratados con placebo (Figura 10).

Ejemplo 10

Internalización de LAL humano recombinante en Lisosomas de
20 *Macrófago y Fibroblasto*

La capacidad del derivado transgénico del LAL humano recombinante de las aves ("SBC-102") para unirse a las células e internalizarse al compartimiento lisosomal, se examinó *in vitro* usando células de macrófago y fibroblastos. Cuando se
25 incubó con células de macrófago, se encontró que SBC-102 marcado en forma fluorescente se localiza en los lisosomas. Este efecto podría atenuarse usando un competidor de polisacárido, lo que implica que el receptor de N-acetilglucosamina/manosa (GlcNAc/manosa) es un mecanismo de
30 reconocimiento y captación de parte de estas células. El SBC-102 aumentó la actividad de LAL asociada con las células en fibroblastos humanos con deficiencia de LAL y fibroblastos de murino normales después de la incubación *in vitro*, lo que

indica que la exposición a SBC-102 puede producir reemplazo sustancial de actividad enzimática deficiente.

La manosa-6-fosfoato (M6P) está presente en la estructura de oligosacáridos de SBC-102 que ha demostrado estar involucrada en la administración de enzimas lisosomales a una amplia variedad de tipos de células a través del receptor M6P ubiquito.

El LAL recombinante se purificó de clara de huevo de gallinas transgénicas. Se obtuvo NHS Verde de Oregón de Invitrogen™ (#0-10241). La línea de macrófago alveolar de la rata, NR8383, y la línea de fibroblastos de ratón, NIH-3T3, se obtuvieron de ATCC. Los fibroblastos de Wolman con deficiencia de LAL se obtuvieron del Coriell Institute for Medical Research y LysoTracker® Red se obtuvo de Invitrogen™.

Marcado de las enzimas: 4 mg de LAL derivado de las aves transgénicas LAL en PBS se marcaron con Oregon Green, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y la reacción se dializó posteriormente contra PBS y a continuación se concentró.

Captación de Macrófagos: El LAL transgénico marcado en forma fluorescente derivado de las aves (5 µg/ml) y LysoTracker® Red se incubaron con células NR8383 durante 2 horas. Las células se examinaron con microscopio de fluorescencia co-focal usando un modo de barrido secuencial a 488 nm y a continuación 514 nm.

Inhibición competitiva con manan: SBC-102 marcado en forma fluorescente (5 ug/ml) y manan se incubaron con células NR8383 durante 2 horas. Las células se tripsinizaron, y la captación de LAL recombinante se midió por intensidad de mediana de fluorescencia de clasificación celular activada por fluorescencia como parámetro.

La capacidad de LAL derivado de aves transgénicas que se absorberá y posteriormente incorporará en los lisosomas de células blanco se examinó usando la línea celular de macrófago,

NR8383. El LAL marcado en forma fluorescente derivado de aves transgénicas y el marcador lisosomal, "LysoTracker® Red" (Invitrogen™), se incubaron con células durante 2 horas. La co-localización de LAL derivado de aves transgénicas y marcador lisosomal en los lisosomas de estas células se examinó con posterioridad por microscopio con fluorescencia confocal usando un modo de barrido secuencial (Fig. 11). El LAL recombinante demostró localización a lisosomas, lo que es consistente con estudios similares *in vitro* usando LAL humano recombinante (rhLAL) de una variedad de fuentes.

La especificidad de unión de LAL derivado de aves transgénicas al receptor de manosa/ GlcNAc se ha evaluado por ensayos de unión competitiva usando la línea celular de macrófago, NR8383 (Fig. 12). El LAL marcado en forma fluorescente (Oregon Green) derivado de aves transgénicas a 5 µg/ml y varias concentraciones de oligosacárido que contiene manosa, manan, se co-incubaron con células durante 2 horas. La inhibición relativa de la captación de LAL derivado de aves transgénicas realizada por manan, cuando se compara con ningún control con manan, se cuantificó por análisis de clasificación celular activado por fluorescencia usando intensidad mediana de fluorescencia como parámetro. Se observó una inhibición dependiente de la dosis de manosa en la unión/ captación de LAL derivado de aves transgénicas, lo cual es consistente con el LAL derivado de aves transgénicas: interacción de GlcNAcR.

Además, la captación mediada por manosa-6-fosfoato en células de fibroblastos se demostró por medio de experimentos de competición con manosa-6-fosfoato.

30 **Ejemplo 11**

Aumento de la Actividad de LAL en Células Tratadas

El LAL cataliza la hidrólisis de ésteres de colesterol y triglicéridos en colesterol libre, glicerol, y ácidos grasos libres. De este modo, la actividad de LAL puede medirse, por

ejemplo, por la descomposición del sustrato fluorogénico, 4-metilumbelilferil oleato (4MUO).

Fibroblastos

5 La capacidad de la exposición de LAL derivado de aves transgénicas para aumentar Actividad de LAL en células se ha examinado usando tanto células normales y con deficiencia de LAL *in vitro*. Los fibroblastos se aislaron a partir de un paciente con Wolman y fibroblastos de murino normal (NIH-3T3)
10 incubados en presencia de LAL derivado de aves transgénicas a concentraciones de 0, 0,16, o 0,5 microgramos/ml durante 5 horas. Las células se lavaron luego para eliminar la señal no específica, los lisatos celulares se analizaron para determinar la Actividad de LAL usando 4-metilumbelilferil oleato (4-MUO)
15 como sustrato. La Figura 13 demuestra que la Actividad de LAL asociada con células endógenas fue menor en fibroblastos de Wolman cuando se compara con NIH-3T3, y el aumento dependiente de la dosis en la Actividad de LAL se observó en ambos tipos de células después de la incubación con LAL derivado de aves
20 transgénicas (Fig. 13).

Leucocitos

 Los leucocitos séricos mononucleares se obtuvieron pacientes con deficiencia de LAL antes y después de la
25 administración. Las muestras de sangre se almacenaron sin pérdida de actividad enzimática. Los leucocitos mononucleares (linfocitos) se almacenaron a partir de sangre usando una preparación de Ficoll y ditrizoato de sodio. 4-8 ml de sangre, diluida previamente con 1:1 con solución salina balanceada de
30 Hanks, se estratificaron sobre 3 ml de Ficoll-Paque y se centrifugaron. El anillo de células mononucleares se aspiró y se lavó una vez con solución de Hanks, a continuación por lo menos dos veces re-suspendiendo el pellet en 1-2 ml de agua. Los pellets se congelaron a -20°C antes de usar. Antes de

analizar, los pellets se descongelaron, se suspendieron nuevamente en agua destilada se sonicaron sobre hielo. La preparación a continuación se centrifugó 20.000 x g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante (que contiene 0,5-1,5 mg de proteína/ml) se mantuvo sobre hielo, antes del análisis.

El sustrato para el análisis de Lipasa ácida se preparó agregando 1 ml de 4MUO (4-metilumbelilferil oleato) 10 mM en hexano a 1 ml de L- α -fosfoatidilcolina 16 mM en CHCl₃. Los solventes se evaporaron bajo N₂ y se agregaron 25 ml de ácido taurodesoxicólico (sal de sodio) 2,4 mM en agua. La mezcla se sonicó sobre hielo durante 1-2 min a 30-40 W. Antes del ensayo, se diluyó 1 vol de stock de sustrato con 7 vol de buffer de acetato de sodio/ ácido acético 200 mM (pH 4,0). Cada cubeta de reacción de 2 ml contenía 100 nmol de 4-metilumbelilferil oleato, 160 nmol de L- α -fosfoatidilcolina y 600 nmol de taurodesoxicolato de sodio.

La reacción se inició agregando 5-100 μ L de enzima y se monitoreó a 37°C usando un espectrofotofluorímetro. La descomposición de 4MUO se detectó, por ejemplo, por excitación a alrededor de 360 nm y emisión a alrededor de 460 nm del fluoróforo liberado, 4-metilumbeliferona (4MU). El cambio en la fluorescencia con tiempo se registró.

Ejemplo 12

25 Análisis *In Vivo* de LAL humano recombinante (SBC-102)

Se trataron Ratas de Yoshida con deficiencia de LAL (es decir, Homozygous) (ver Kuriyama et al. (1990), Journal de Lipid Research, vol. 31, p 1605-1611; Nakagawa et al., (1995) Journal de Lipid Research, vol. 36, p 2212-2218; y Yoshida y Kuriyama (1990) Laboratory Animal Science, vol. 40, p 486-489) con SBC-102 (5 mg/kg, IV) o placebo, una vez por semana durante cuatro semanas comenzando a las cuatro semanas de vida. Para cada administración el SBC-102 se inyectó en la vena de la cola de las ratas en dos dosis iguales (2,5 mg/kg) con 30 minutos de

separación. Las ratas y controles tipo salvaje agrupados por edad se examinaron una vez por semana después de la dosis final. Los análisis se realizaron por triplicado.

El examen patológico general de los animales tratados con SBC-102 demostró normalización en el color del hígado además de reducción en el tamaño del órgano. Las ratas tratadas con SBC-102 mostraron histología hepática esencialmente normal en marcado contraste con la acumulación sustancial de macrófagos espumosos animales tratados con vehículo. Los niveles de alanina sérica y aspartato transferasa, que son elevados en ratas LAL-/-, también se redujeron en ratas tratadas con SBC-102.

La masa de los órganos y tejidos internos se determinó para cada rata y los datos se muestran en la Fig. 14. El tamaño del órgano está representado por porcentaje de peso corporal determinado a las 8 semanas de vida, en ratas LAL-/- y ratas LAL+/+ luego de la administración semanal de vehículo o SBC-102 a 5 mg/kg durante 4 semanas.

El peso corporal de ratas de Yoshida tratadas con SBC-102 o vehículo se compararon con ratas tipo salvaje, como se muestra en la FIG. 15. El SBC-102 (5 mg/kg) o vehículo se administró por inyección IV ya sea como dosis única o en dosis separadas (dadas dentro de un período de 4 horas) a ratas LAL^{-/-}. Las ratas LAL+/+ se agruparon por como controles.

Ejemplo 13

Análisis de Triglicéridos

El análisis de triglicéridos se realizó en el tejido de hígado y tipo de animales tipo salvaje, tratados con placebo homócigo y SBC-102 homócigo. Los análisis de triglicéridos se realizaron usando metodologías estándar (es decir, MBL International's Triglicérido Quantification Kit Catalog # JM-K622-100) y se realizaron por triplicado.

Tabla 6: Niveles de Triglicéridos en el Hígado y Bazo en ratas tipo salvaje y con deficiencia de LAL

Triglicérido (ug/mg de tejido húmedo)			
	Tipo salvaje (n=3)	Placebo (n=3)	SBC-102 (n=3)
Hígado	48	84	57
Bazo	3	22	4

5 Niveles de Sustrato Hepático

La Fig. 16 muestra los niveles de colesterol hepático, colesteril éster y triglicéridos determinados a las 8 semanas de vida, en ratas con deficiencia de LAL y WT luego de la administración semanal de vehículo o SBC-102 a 5 mg·kg⁻¹ durante 4 semanas.

Ejemplo 14

Estudio de Respuesta a la Dosis en Ratas

Basados en los estudios realizados anteriormente, los efectos farmacodinámicos (FD) de un rango de dosis y cronogramas de dosificación (qw y qow) de LAL ("SBC-102") se examinaron en ratas LAL ^{-/-}. En estos estudios, el SBC-102 se administró por inyecciones IV a dosificaciones de 0,2, 1, 3 y 5 mg/kg, qow, o 0,35, 1,0 y 5,0 mg/kg, qw, durante 1 mes, comenzando a las 4 semanas de vida. Los resultados demuestran mejoras en el aumento de peso corporal (BW) (Fig. 17), organomegalia (Fig. 18), y niveles de sustrato de tejidos (Fig. 19). Los niveles de transaminasa sérica también se redujeron a medida que la dosis de SBC-102 aumentó, alcanzando los niveles esencialmente de tipo salvaje con dosis más altas.

Ejemplo 15

Farmacocinética de SBC-102

a. Recolección de muestras

Las muestras de FC se obtuvieron de pacientes adultos que sufren de inicio tardío de deficiencia de LAL. Los pacientes recibieron dosis de 0,35 mg/kg durante dos horas. Se recolectaron muestras de suero el Día 0 (Dosis 1, Visita 2) y
5 Día 21 (Dosis 4, Visita 6) inmediatamente antes de la dosis (dentro de 30 minutos de dosificación); a 10(±1), 15(±1), 20(±1), 40(±2), 60(±2) y 90(±2) minutos durante la infusión (DI) y al final de la infusión (EOI) (aproximadamente 120
10 minutos desde el comienzo de la infusión); y a los 5(±1), 10(±1), 20(±1), 30(±1), 40(±2), 60(±2) y 120(±2) minutos después de completar la infusión (AI).

b. Análisis enzimático en suero

15 Se descongeló 4- MUO(4mM) mantenido en freezer a -20°C en una heladera a 4°C en la oscuridad y se colocó en un incubador a 25°C durante 1,5 horas en la oscuridad antes de usar. El estándar se prepare diluyendo SBC-102 como product farmacológico hasta 1,56 ng/ml. Se incluyó un buffer para
20 valoración del blanco. Todas las muestras se diluyeron hasta 50 ng/ml para la primera dilución. Los estándares y las muestras se colocaron inmediatamente en placas después de hacer las diluciones. Después de preparar los estándares y las muestras, se agregó 62,5 uL de Buffer de Ensayo (0,2 mol/L de acetato de
25 sodio trihidrato, pH 5,5) a cada pocillo. Se agregaron a cada pocillo 12,5 uL de estándares y muestra, por duplicado, 4- MUO (4 mM) se diluyó hasta 1,6x con 4% Triton X-100 y se agregaron 25 uL por pocillo. La placa de múltiples pocillos se golpeó suavemente algunas veces para mezclar, se selló herméticamente
30 y se colocó en un incubador a 37°C durante 30 minutos. Después de la incubación, 50 uL de la solución de detención (0,77M Tris pH 8,0) se agregó a cada pocillo para llevar a un volumen final de 150 uL/pocillo. La placa se colocó en un lector de micro placas y se midieron los niveles de fluorescencia desde la

parte inferior de la placa a la excitación de 360nm y emisión 460 nm.

Como se muestra en las Tablas 7-11, la C_{máx} sérica del LAL recombinante administrado a pacientes adultos que sufren de inicio tardío de deficiencia de LAL osciló desde aproximadamente 270 ng/ml hasta 720 ng/ml. La vida media t_{1/2} osciló desde 7,6 minutos hasta 16,7 minutos y el t_{1/2} promedio fue de aproximadamente 13 minutos (desviación estándar, 3,812).

Tabla 7

ID del Paciente (Dosis: 0,35 mg/kg)	Visita #	Concentración (ng/ml)	Tiempo nominal
02-001	2	5,63	Pre-infusion
02-001	2	241,88	10 min DI
02-001	2	369,44	15 min DI
02-001	2	369,93	20 min DI
02-001	2	359,64	40 min DI
02-001	2	294,64	60 min DI
02-001	2	71,85	90 min DI
02-001	2	71,20	EOI
02-001	2	37,95	5 min AI
02-001	2	24,91	10 min AI
02-001	2	14,16	20 min AI
02-001	2	9,76	30 min AI
02-001	2	9,02	40 min AI
02-001	2	7,20	60 min AI
02-001	2	7,51	120 min AI

10 C_{máx} = 369,93 ng/ml; t_{1/2}= 16,8 min; LLOQ= 4,68 ng/ml

Tabla 8

ID del Paciente (Dosis: 0,35 mg/kg)	Visita #	Concentración (ng/ml)	Tiempo nominal
03-001	2	8,23	Pre
03-001	2	199,80	10 min DI
03-001	2	215,10	15 min DI

99

03-001	2	228,12	20 min DI
03-001	2	237,25	40 min DI
03-001	2	210,73	60 min DI
03-001	2	262,41	90 min DI
03-001	2	102,39	EOI
03-001	2	52,20	5 min AI
03-001	2	33,75	10 min AI
03-001	2	17,60	20 min AI
03-001	2	12,17	30 min AI
03-001	2	10,82	40 min AI
03-001	2	9,39	60 min AI
03-001	2	8,72	120 min AI

C_{máx} = 262 ng/ml; t_{1/2}= 15,3 min; LLOQ= 4,68 ng/ml

Tabla 9

ID del Paciente (Dosis: 0,35 mg/kg)	Visita #	Concentración (ng/ml)	Tiempo nominal
03-002	2	< 4,68	Pre-infusion
03-002	2	480,55	10 min DI
03-002	2	531,16	15 min DI
03-002	2	613,85	20 min DI
03-002	2	717,75	40 min DI
03-002	2	84,46	60 min DI
03-002	2	54,34	90 min DI
03-002	2	171,41	EOI
03-002	2	87,95	5 min AI
03-002	2	49,70	10 min AI
03-002	2	16,47	20 min AI
03-002	2	11,01	30 min AI
03-002	2	9,76	40 min AI
03-002	2	6,28	60 min AI
03-002	2	5,19	120 min AI

C_{máx} = 718 ng/ml; t_{1/2}= 10,8 min; LLOQ= 4,68 ng/ml

Tabla 10

ID del Paciente (Dosis:	Visita #	Concentración (ng/ml)	Tiempo nominal

0,35 mg/kg)			
02-001	6	5,12	Pre-infusion
02-001	6	249,91	10 min DI
02-001	6	294,37	15 min DI
02-001	6	313,75	20 min DI
02-001	6	330,04	40 min DI
02-001	6	245,48	60 min DI
02-001	6	262,78	90 min DI
02-001	6	81,09	EOI
02-001	6	32,10	5 min AI
02-001	6	20,39	10 min AI
02-001	6	10,74	20 min AI
02-001	6	8,08	30 min AI
02-001	6	6,38	40 min AI
02-001	6	5,82	60 min AI
02-001	6	< 4,68	120 min AI

C_{máx} = 330 ng/ml; t_{1/2}= 15,3 min; LLOQ= 4,68 ng/ml

Tabla 11

ID del Paciente (Dosis: 0,35 mg/kg)	Visita #	Concentración (ng/ml)	Tiempo nominal
03-001	6	6,63	Pre-infusion
03-001	6	317,45	10 min DI
03-001	6	333,46	15 min DI
03-001	6	310,83	20 min DI
03-001	6	378,68	40 min DI
03-001	6	234,49	60 min DI
03-001	6	246,07	90 min DI
03-001	6	206,06	EOI
03-001	6	253,80	5 min AI
03-001	6	70,81	10 min AI
03-001	6	24,61	20 min AI
03-001	6	12,32	30 min AI
03-001	6	9,03	40 min AI
03-001	6	7,18	60 min AI

03-001	6	5,56	120 min AI
--------	---	------	------------

$C_{\text{máx}} = 379 \text{ ng/ml}$; $t_{1/2} = 7,7 \text{ min}$; LLOQ= 4,68 ng/ml

Ejemplo 16

Análisis de Inmunogenicidad: medición de anti-SBC-102

Cada muestra positiva, negativa y desconocida se diluyó a 1:20 en 5% de leche en polvo en 1x PBS y se incubó a 4°C durante 12-18 horas en un rotador (500 rpm). Antes del ensayo, las muestras se centrifugaron a 2000 x g durante 20 minutos y el sobrenadante se retiró a un nuevo tubo de 1,5 ml.

Se diluyó SBC-102 en buffer 1X PBS hasta una concentración de 0,5 ug/ml, y 100 uL se colocó a cada pocillo de una placa de ELISA de 96 pocillos. La placa se cubrió con cubierta adhesiva y se incubó a temperatura ambiente durante 8 horas o hasta la mañana siguiente a 4°C. Después de la incubación, los pocillos se lavaron tres veces con buffer de lavado 1x. Se agregó 200 uL de 5% BSA libre de IgG a cada pocillo y la placa se selló y se incubó a 4 °C durante 12-18 horas o temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la incubación, los pocillos se lavaron tres veces con 1x buffer de lavado, 100 uL de cada muestra de control, muestra desconocida y muestra negativa se agregaron a los pocillos por triplicado. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1,5 horas en agitador de microplacas (500rpm). Después de la incubación, los pocillos se lavaron tres veces con 1x buffer de lavado. 100 uL de SBC-102 biotinilado diluido en buffer de dilución hasta una concentración de 100 ng/ml se agregó a cada pocillo y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1,5 horas en un agitador de microplacas (500 rpm). Después de la incubación, los pocillos se lavaron con buffer de lavado 1x. 100 uL del conjugado de estreptavidina-HRP se diluyó hasta 1:4000 en buffer de dilución se agregó a cada pocillo. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1,5 hora en un agitador de microplacas (500 rpm). Después de la incubación, los pocillos se lavaron cuatro veces con buffer de lavado 1x, 100 uL de TMB

como sustrato se agregó a cada pocillo y la placa se incubó durante 15 minutos en la oscuridad. Se agregaron 50 uL de solución de detención (0,5N H₂SO₄) a cada pocillo para interrumpir la reacción. Se midió la OD a 450 nm.

5 Como se indica en la Tabla 12, los pacientes que recibieron dosis semanales de 0,35 mg/kg de SBC-102 durante 4 semanas no mostraron niveles elevados de anticuerpo anti-SBC-102, lo que sugiere que la terapia de reemplazo de enzimas con SBC-102 no genera una inmunogenicidad significativa en
10 pacientes humanos. Estos pacientes no exhibieron ningún evento adverso o reacción relacionada con la infusión (IRR).

Tabla 12

Muestra	OD promedio	Desv. Est.	Concentración de SBC-102 (ng/ml)
Contr. Neg.	0,056	N/A	0
Contr. Pos. 1	0,076	0,005	15,6
Contr. Pos. 2	0,090	0,003	31,2
Contr. Pos. 3	0,132	0,008	62,5
Contr. Pos. 4	0,201	0,009	125
Contr. Pos. 5	0,349	0,019	250
Contr. Pos. 6	0,635	0,012	500
Contr. Pos. 7	0,958	0,101	1000
ID del Paciente	OD promedio	Desv. Est.	
01-001 Visita 1	0,053	0,000	
02-001 Visita 1	0,051	0,000	
02-001 Visita 7	0,053	0,002	
02-001 Visita 8	0,050	0,001	
03-001 Visita 1	0,051	0,001	
03-001 Visita 2	0,051	0,001	
03-001 Visita 7	0,050	0,000	
03-002 Visita 1	0,052	0,004	
03-002 Visita 2	0,056	0,006	

Ejemplo 17

Tratamiento de enfermedad de Wolman (WD) por administración de LAL recombinante

A las 7 semanas de edad, se admite un paciente mujer en el hospital debido a su dificultad por aumento de peso y poco progreso desde el nacimiento. En el examen físico inicial, la paciente pesa 3,6 kg (peso de nacimiento 3,7 kg) y es delgada, con pliegues flojos de piel. El abdomen está distendido, con hepatomegalia firme de 6 cm y esplenomegalia firme de aproximadamente 4 cm. Los nodos linfáticos agrandados se observan en la ingle y la actividad muscular es débil.

El nivel de hemoglobina inicial es de 9,2 gm, plaquetas 506.000, y glóbulos blancos 11.550. La urinalisis es normal, y la frotis de médula ósea revela linfocitos vacuolados y numerosas células espumosas. Mediciones químicas séricas: lípidos totales 834 mg/100 ml, fosfolípidos 176 mg/100 ml, triglicéridos 141 mg/100 ml, colesterol 129 mg/100 ml, bilirrubina 0,3 mg/100 ml, fosfatasa alcalina 9,0 BU %, SGOT 90 unidades, SGPT 50 unidades, colinesterasa 20 unidades, urea nitrogenada 8,3 mg, azúcar en ayunas 45 mg/100 ml. El barrido de CT del abdomen muestra hepatoesplenomegalia y glándulas adrenales bilaterales simétricamente agrandadas con calcificación.

El paciente es implantado quirúrgicamente con un puerto de acceso vascular venoso para la dosificación. Después de conectar el puerto con una máquina de infusión ambulatoria, se pretrata el paciente con 1 mg/kg de difenhidramina 20 minutos antes de la infusión de LAL recombinante a fin de contrarrestar las potenciales reacciones anafilácticas por infusión. Al paciente se administra luego LAL recombinante a 1 mg/kg en el curso de 5 horas por infusión intravenosa. Esta terapia se repite una vez cada 7 días de modo indefinido.

Dentro de las dos semanas de administración, la primera dosis de LAL recombinante, el paciente se evalúa respecto del

aumento de peso y tamaño de los órganos abdominales clave tal como se determina por ultrasonido. También se llevan a cabo resultados de laboratorio del ensayo de actividad de lipasa ácida lisosomal en el paciente.

5 **Ejemplo 18**

Tratamiento de enfermedad de almacenamiento de éster de colesterilo (CESD) por administración de LAL recombinante

Un niño de 3 años con una erupción abdominal prurítica es examinado por su pediatra. Después del examen abdominal, el
10 método observa hepatomegalia y lo confirma por ultrasonio. En este momento, no se hace diagnóstico y el paciente se controla periódicamente.

A la edad de 8, se admite en el hospital con gastroenteritis. La microscopia óptica de una biopsia de hígado
15 muestra un mayor glucógeno intracitoplasmático y pequeñas gotas de lípidos en los hepatocitos. La microscopia electrónica muestra gotas de lípidos ligadas a membrana con pequeños gránulos densos electrónicos. Se realiza una diagnosis de trabajo de la enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo
20 III (enfermedad de DeBrancher), pero la actividad de Debrancher de fibroblastos de piel es normal.

A la edad de 10, la hepatomegalia persiste y se toma una segunda biopsia de hígado. La microscopia óptica muestra una arquitectura lobular alterada del parénquima hepático con
25 hepatocitos distendidos que contienen gránulos citoplasmáticos y vacuolas con fibrosis periportal moderada. Se halló que la actividad de lipasa ácida de fibroblastos era del 7% de lo normal, que confirma la diagnosis de CESD. Las concentraciones en plasma de colesterol total (TC), triglicéridos (TG),
30 colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) están cada uno por encima del percentilo 95 para cada edad y sexo a 7,51, 3,24 y 5,58 mmol/L, respectivamente, mientras que el colesterol de lipoproteína de alta densidad en plasma (HDL-C) está por debajo del percentilo 5 a 0,47 mmol/L; tiene una hiperlipidemia

combinada (hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hipoalfalipoproteinemia e hiperbetalipoproteinemia).

El paciente se implanta quirúrgicamente con un puerto de acceso vascular venoso para dosificación. Después de conectar el puerto con una máquina de infusión ambulatoria, el paciente se pretrata con 5 mg/kg de difenhidramina 20 minutos antes de la infusión de LAL recombinante a fin de contrarrestar las potenciales reacciones de infusión anafiláctica. Al paciente se administra luego LAL recombinante a 5 mg/kg en el curso de 5 horas por infusión intravenosa. Esta terapia se repitió una vez cada 14 días de forma indefinida.

Dentro de las dos semanas de administración, la primera dosis de LAL recombinante, el paciente se evalúa respecto del aumento de peso y el tamaño de órganos abdominales clave tal como se determinó por medio de ultrasonido. También se realizaron resultados de laboratorio que ensayan la actividad de lipasa ácida lisosomal en el paciente.

* * *

Cada ejemplo en la memoria descriptiva que antecede se provee a modo de explicación de la invención, no como limitación de la invención. De hecho, resultará obvio para aquellas personas con experiencia en el arte que varias modificaciones, combinaciones, agregados, eliminaciones y variaciones pueden realizarse en la presente invención sin alejarse del alcance y espíritu de la invención. Por ejemplo, las características ilustradas o descritas como parte de una realización pueden usarse en otra realización para producir una realización, incluso, adicional. Se pretende que la presente invención cubra dichas modificaciones, combinaciones, agregados, eliminaciones y variaciones.

Todas las publicaciones, patentes, solicitudes de patentes, sitios en internet, y números de acceso/ secuencias de la base de datos (incluyendo tanto secuencias de polinucleótidos como polipéptidos) citadas aquí se incorporen

aquí a modo de referencia en su totalidad para todo fin hasta el mismo punto que si cada publicación, patente, solicitud de patente, sitio en internet, o números de acceso/ secuencias de la base de datos individuales se indicaran específica e
5 individualmente incorporados a modo de referencia.

REIVINDICACIONES

1. Un método para tratar un paciente humano que sufre de una deficiencia de lipasa ácida lisosomal (LAL), que comprende la administración de LAL humana recombinante a dicho paciente, donde la administración es suficiente para mejorar la función hepática.

2. El método de la reivindicación 1, donde la administración es suficiente para normalizar las pruebas hepáticas.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, donde dicha administración minimiza hepatomegalía.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la administración es suficiente para disminuir el tamaño del hígado.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la administración es suficiente para reducir los niveles séricos de las transaminasas hepáticas.

6. El método de cualquier de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la administración es suficiente para reducir los niveles de lípidos.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la administración es suficiente para reducir los niveles de triglicéridos.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la administración es suficiente para reducir los ésteres de colesterilo.

9. Un método para aumentar la actividad de LAL en un paciente humano con deficiencia de LAL que comprende

administrar LAL humana recombinante al paciente, en donde la administración resulta en un incremento de la actividad de LAL en el paciente.

5 10. El método de la reivindicación 9, en donde la administración es suficiente para incrementar la actividad de LAL en el paciente en al menos aproximadamente 35 pmol/mg/min.

10 11. Un método para tratar una condición asociada a la deficiencia de LAL en un paciente que lo necesita que comprende administrar una cantidad efectiva de proteína exógena de LAL al paciente una vez cada 5 días a una vez cada 30 días.

15 12. Un método para tratar una condición asociada a la deficiencia de LAL en un paciente que lo necesita que comprende administrar al paciente una dosis de 0,1 mg a 50 mg por kilogramo de LAL exógena, administrada una vez cada 7 días a una vez cada 14 días.

 13. Un método para tratar una condición asociada a la deficiencia de LAL en un paciente que lo necesita que comprende administrar al paciente una dosis de aproximadamente 0,1 mg a 5,0 mg por kilogramo de LAL exógena.

20 14. Un método para tratar la enfermedad de Wolman o CESD en un paciente humano que lo necesita que comprende administrar al paciente una dosis de aproximadamente 0,1 mg a 50 mg por kilogramo de LAL exógena, administrada una vez cada 5 días a una vez cada 30 días.

25 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde la LAL exógena es LAL humana recombinante.

 16. El método de cualquier de las reivindicaciones 11 a 15, en donde la LAL exógena comprende al menos una manosa o manosa-6-fosfato.

17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o 14 a 16, en donde la LAL es administrada en una cantidad de aproximadamente 0,10 a aproximadamente 5,0 mg/kg.

5 18. El método de la reivindicación 17, en donde la cantidad es de aproximadamente 0,30 mg/kg.

19. El método de la reivindicación 17, en donde la cantidad es de aproximadamente 0,35 mg/kg.

20. El método de la reivindicación 17, en donde la cantidad es de aproximadamente 1,0 mg/kg.

10 21. El método de la reivindicación 17, en donde la cantidad es de aproximadamente 3,0 mg/kg.

22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde la administración es aproximadamente semanal.

15 23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde la administración es aproximadamente bisemanal.

24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 en donde la administración es suficiente para reducir los niveles de aspartato transaminasa en suero (AST) en al menos 50% desde los niveles pre tratamiento.

20 25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 en donde la administración es suficiente para reducir los niveles de alanina transaminasa en suero (ALT) en al menos 50% desde los niveles pre tratamiento.

25 26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en donde la administración es suficiente para alcanzar una vida media ($t_{1/2}$) de LAL menor a aproximadamente 17 minutos.

27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en donde la administración es suficiente para alcanzar una

vida media ($t_{1/2}$) de LAL menor a aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 minutos.

28. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, en donde la administración es suficiente para alcanzar una $C_{máx}$ de al menos 200 ng por mL de suero.

29. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, en donde la administración es suficiente para alcanzar una $C_{máx}$ de entre aproximadamente 200 ng por mL de suero a 800 ng por mL de suero.

30. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, en donde la LAL es internalizada por fibroblastos.

31. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en donde la LAL es internalizada por macrófagos.

32. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, en donde la LAL es producida por un ave transgénica.

33. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, en donde la LAL es producida por una línea celular mamífera.

34. El método de la reivindicación 33, en donde la línea celular mamífera es una línea celular humana.

35. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34, en donde la administración es intravenosa.

36. El método de la reivindicación 35, en donde la administración es por infusión.

37. El método de la reivindicación 36, en donde la infusión es de aproximadamente dos a aproximadamente cuatro horas.

38. El método de la reivindicación 36 o 37, en donde la

infusión es a una velocidad de aproximadamente 0,1 mg/kg/hr a aproximadamente 4 mg/kg/hr.

39. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 38, en donde la administración minimiza las respuestas inmunes a la LAL humana recombinante.

40. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39, en donde la administración reduce la linfadenopatía.

41. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, en donde la administración es suficiente para reducir los niveles de ferritina en suero.

42. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, en donde la administración es suficiente para incrementar los niveles de hemoglobina en suero.

43. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 42, en donde la administración es suficiente para aumentar el crecimiento en un paciente niño.

44. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, en donde la administración es suficiente para incrementar la velocidad de incremento del peso corporal.

45. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 44, en donde la velocidad de crecimiento del paciente luego de la administración es al menos aproximadamente dos veces la velocidad de crecimiento del paciente previo a la administración.

46. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 45, en donde la administración es suficiente para aumentar el tejido adiposo.

47. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 46, en donde el paciente tiene menos de un año de edad.

112
48. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 46, en donde el paciente tiene al menos un año de edad.

49. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 48, en donde el paciente ha sido diagnosticado con la enfermedad de Wolman.
5

50. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 49, en donde el paciente ha sido diagnosticado con la Enfermedad de Almacenamiento de Colesteril Éster (CESD).

51. El método de la reivindicación 50, en donde la Enfermedad de Almacenamiento de Colesteril Éster (CESD) fue diagnosticada antes de los 10 años de edad.
10

52. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 51, que además comprende administrar un segundo terapéutico.

53. El método de la reivindicación 52, en donde el segundo terapéutico es una droga reductora del colesterol.
15

54. El método de la reivindicación 53, en donde el segundo terapéutico es una estatina.

55. El método de la reivindicación 53, en donde el segundo terapéutico es ezetimibe.

56. El método de la reivindicación 52, en donde el segundo terapéutico disminuye la inmunogenicidad de la LAL.
20

57. El método de la reivindicación 52, en donde el segundo terapéutico es una antihistamina.

58. El método de la reivindicación 52, en donde el segundo terapéutico es un inmunosupresor.
25

59. El método de la reivindicación 57, en donde la antihistamina es una dosis farmacéuticamente efectiva de difenhidramina que es administrada antes de que se administre

RESUMEN

La presente invención provee métodos de tratamiento de la Deficiencia de LAL que comprenden administrar a un mamífero una
5 cantidad terapéuticamente efectiva de ácido lipasa lisosomal con una frecuencia de dosificación efectiva. También se proporcionan métodos para mejorar el crecimiento y la función hepática, aumentar la concentración de LAL en tejidos y aumentar la Actividad de LAL en un paciente humano que sufre
10 Deficiencia de LAL.

15

20

25

30

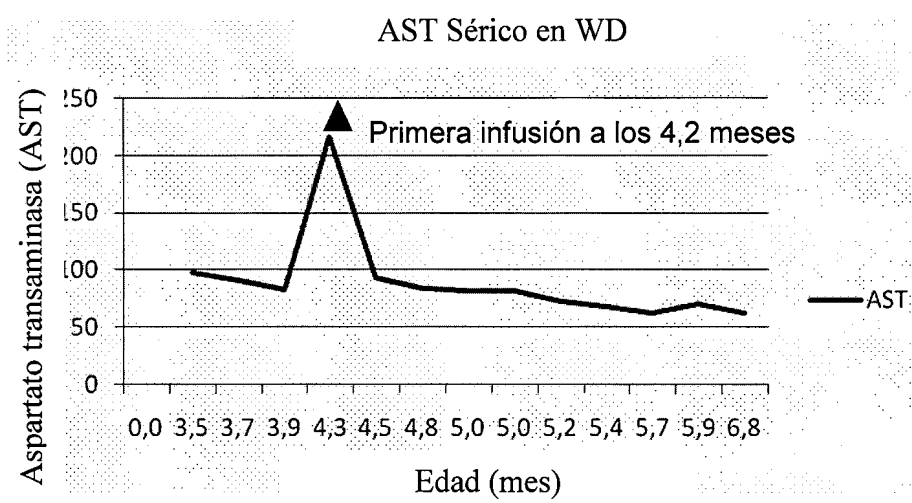


Fig. 1A

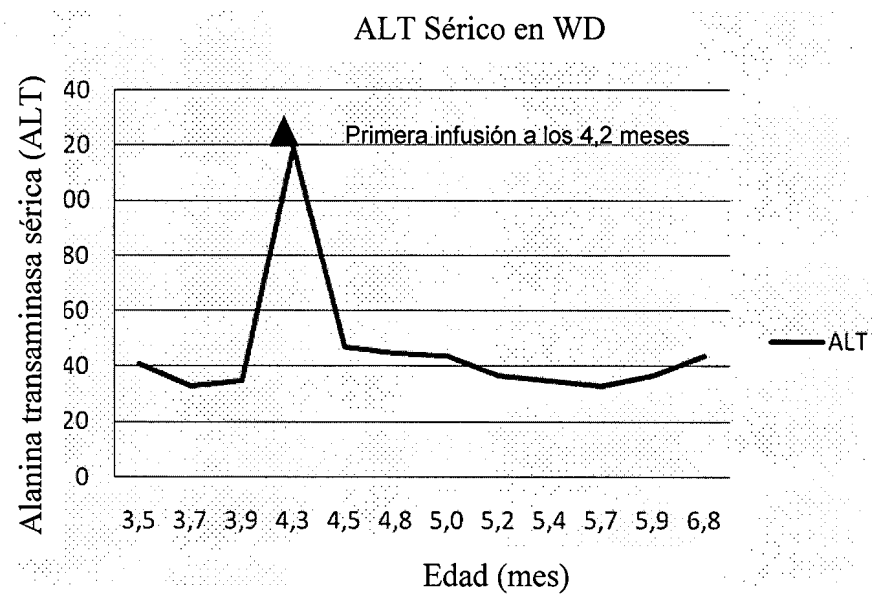


Fig. 1B

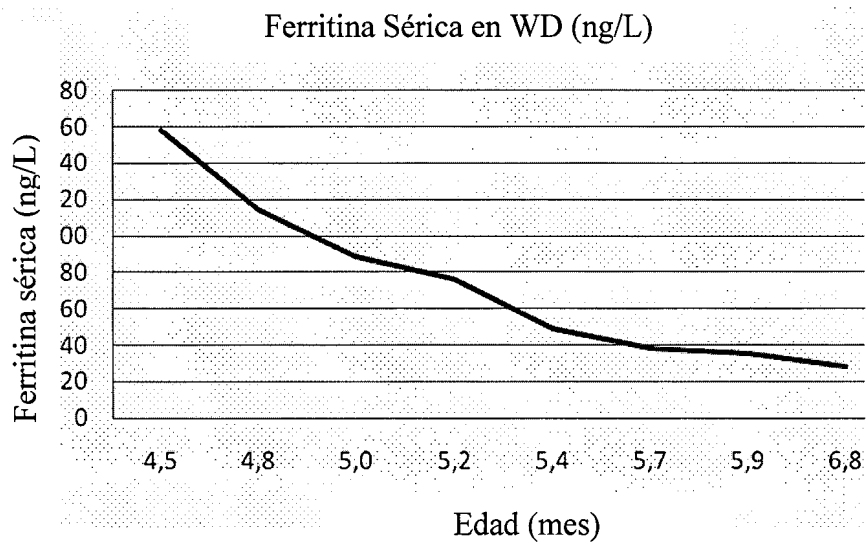


Fig. 2

Velocidad de Crecimiento en WD

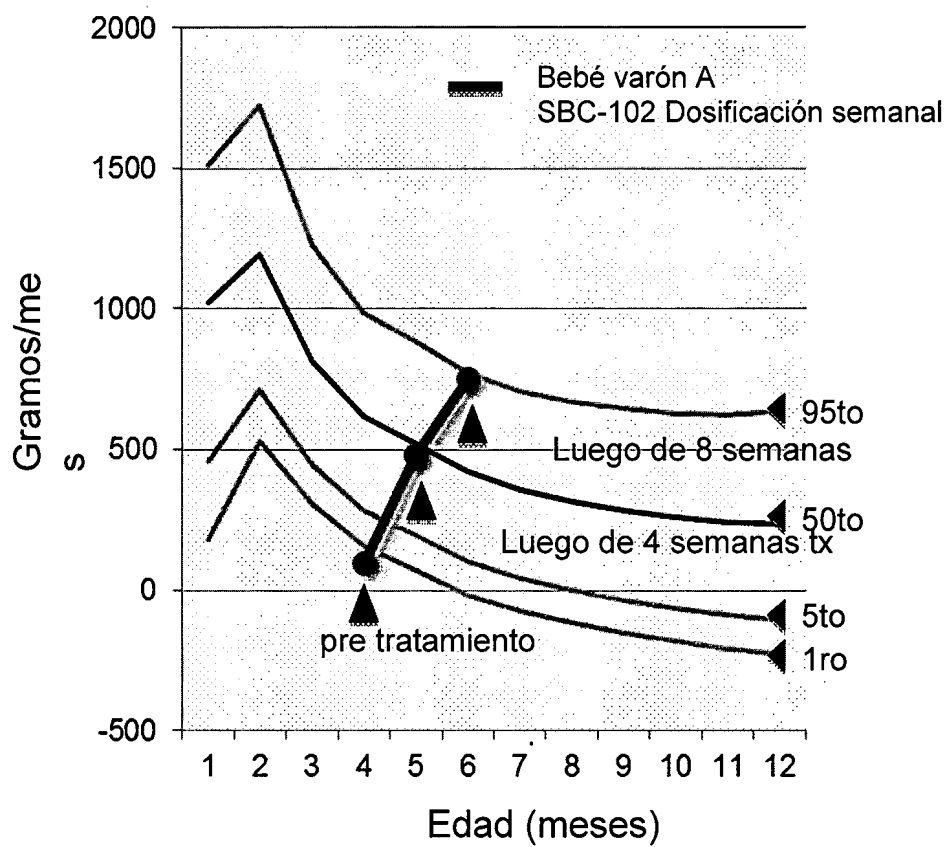


Fig. 3

Datos de Crecimiento en WD

Percentilos de peso por edad: niños

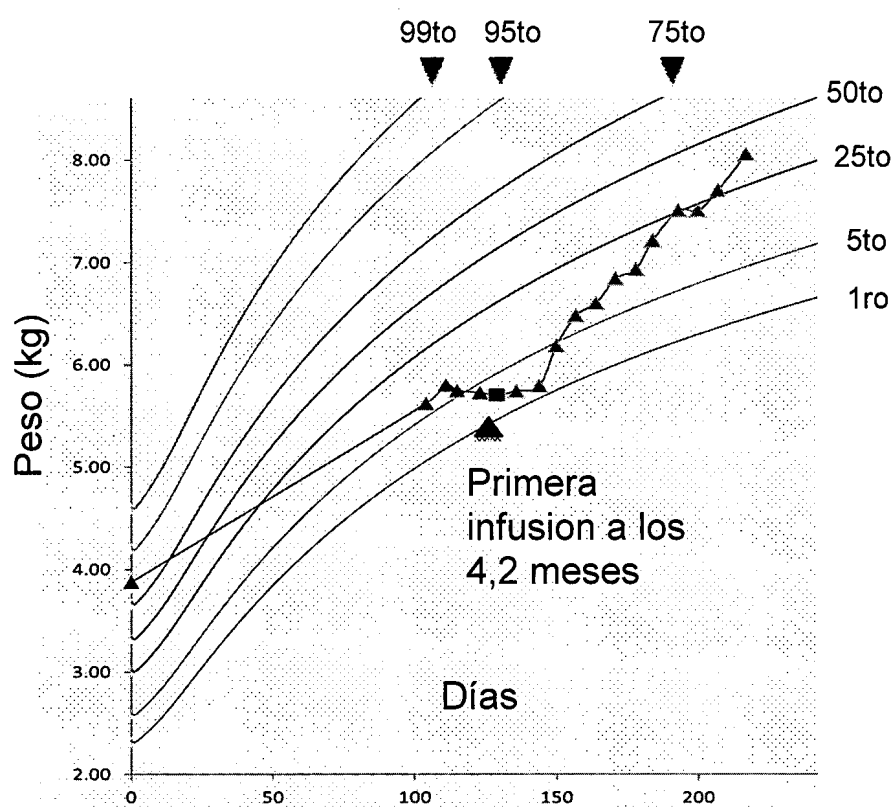


Fig. 4

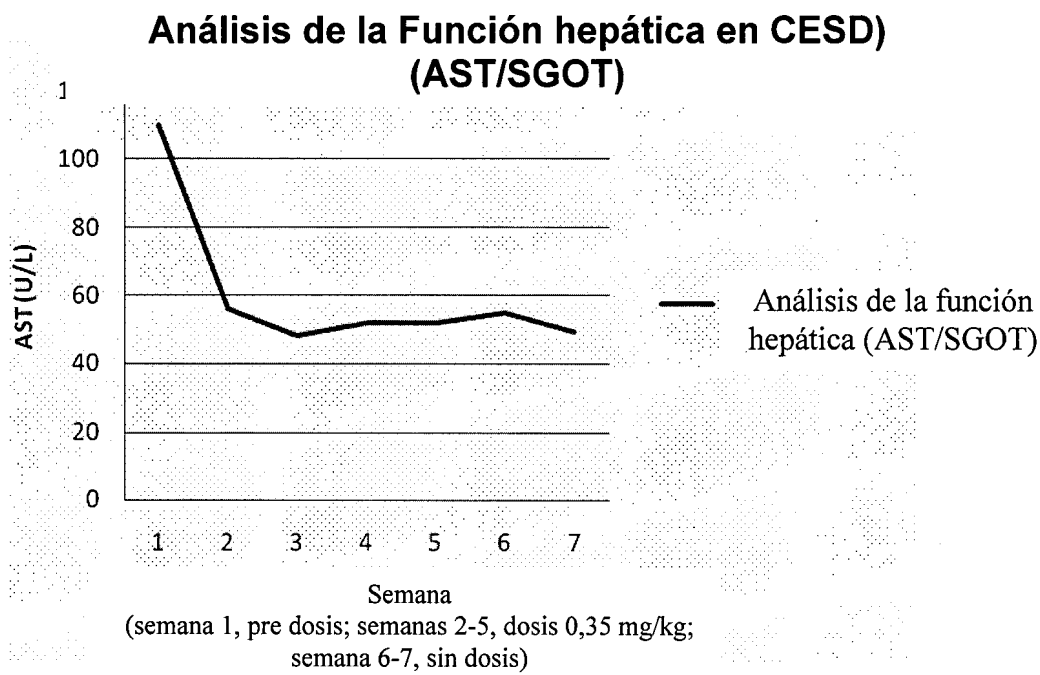


Fig. 5

**Análisis de la Función hepática en CESD
(ALT/SGPT)**

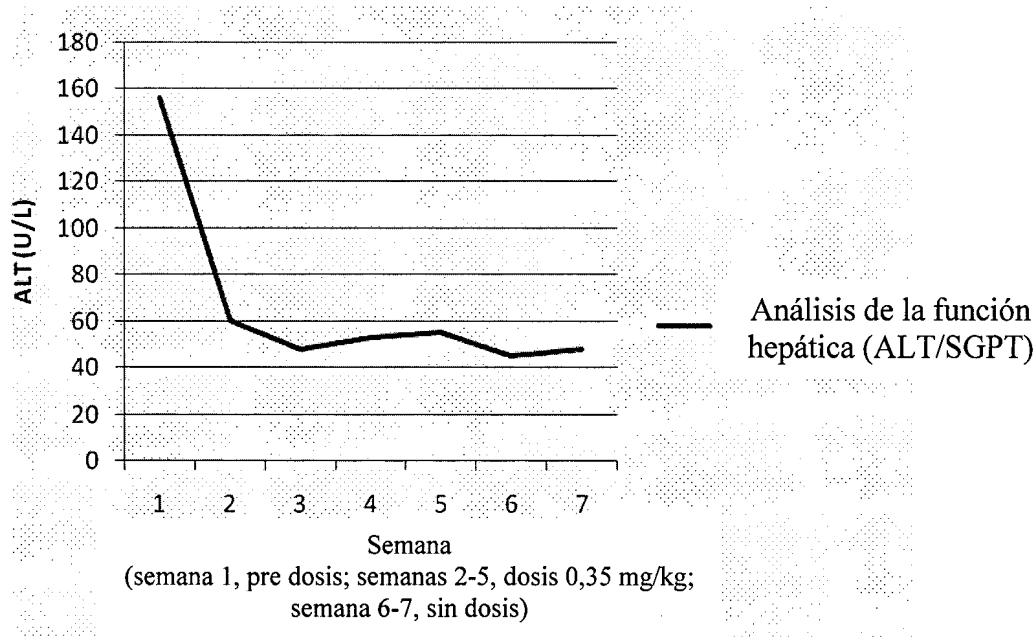


Fig. 6

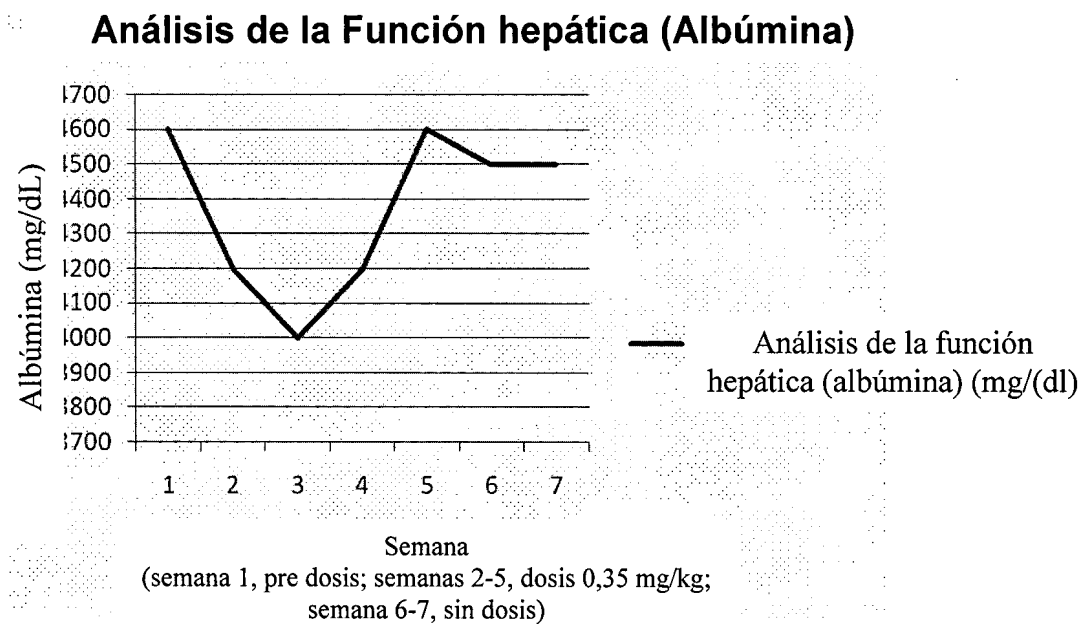


Fig. 7

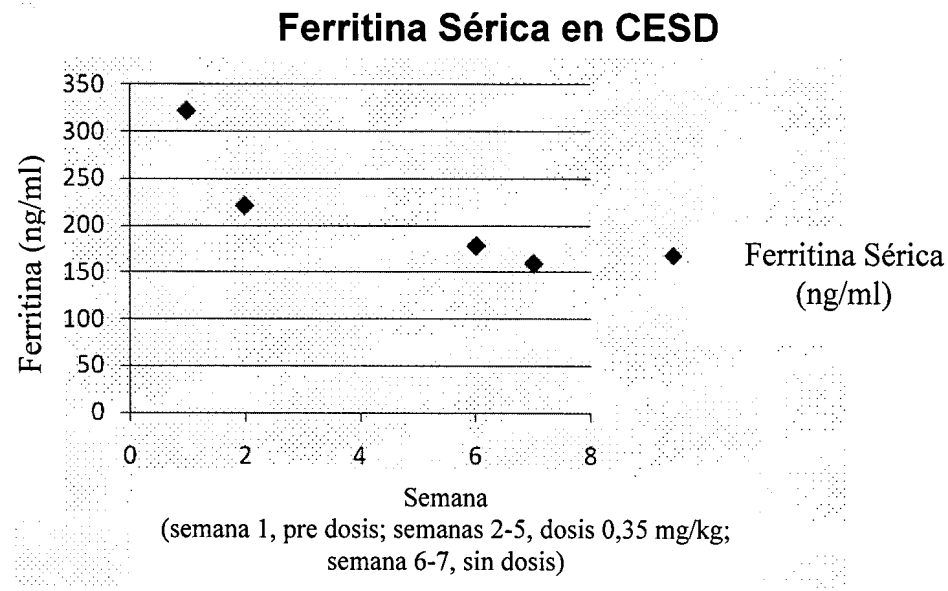


Fig. 8

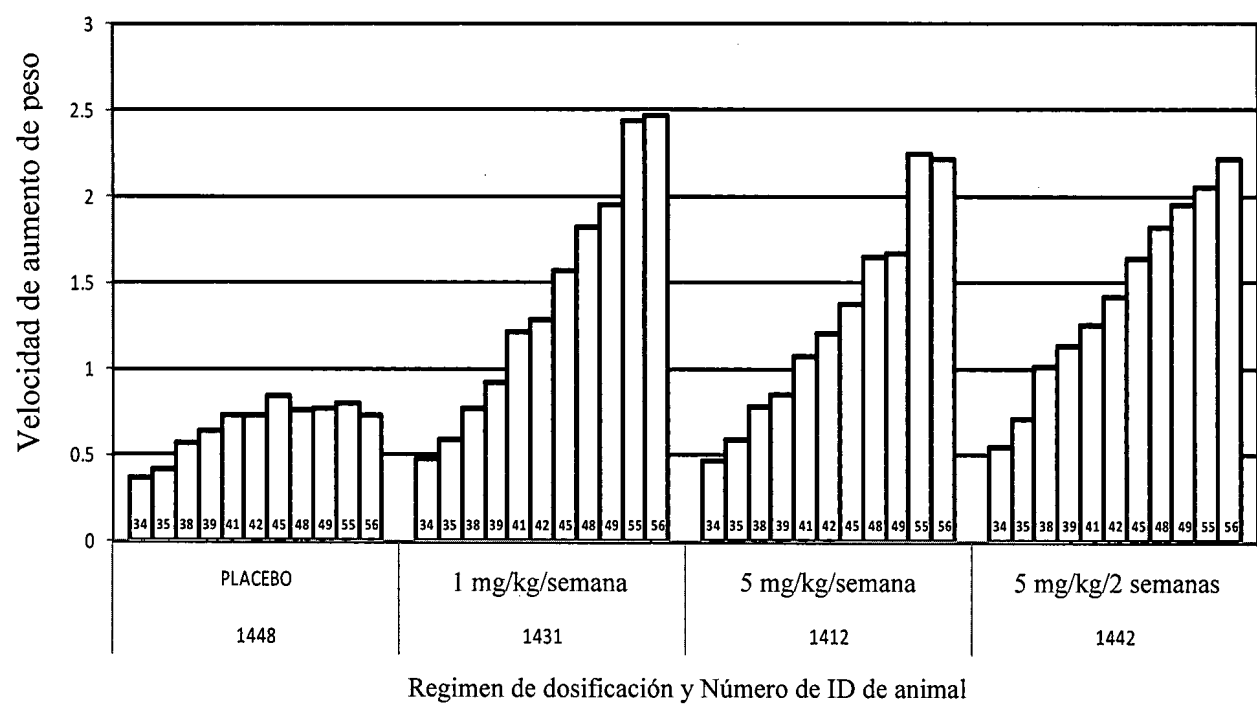


Fig. 9

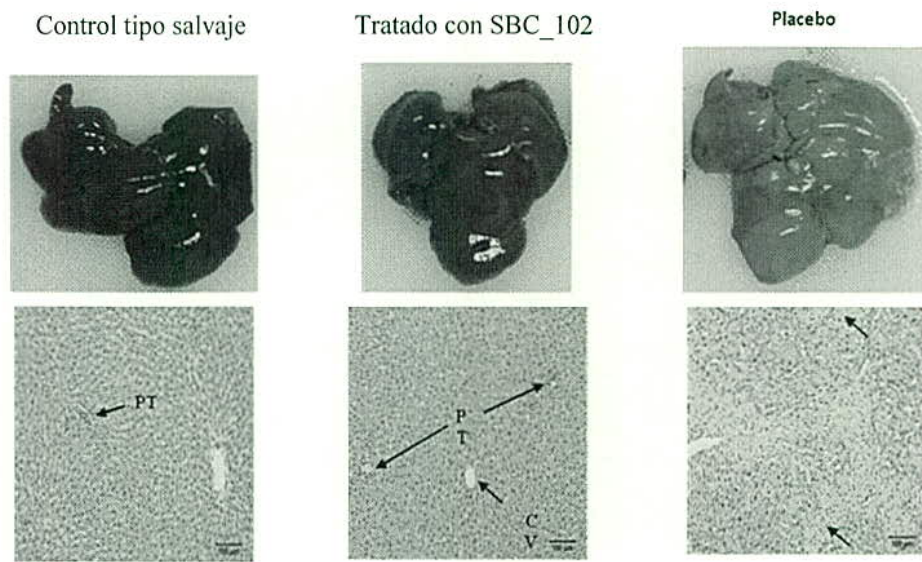


Fig. 10

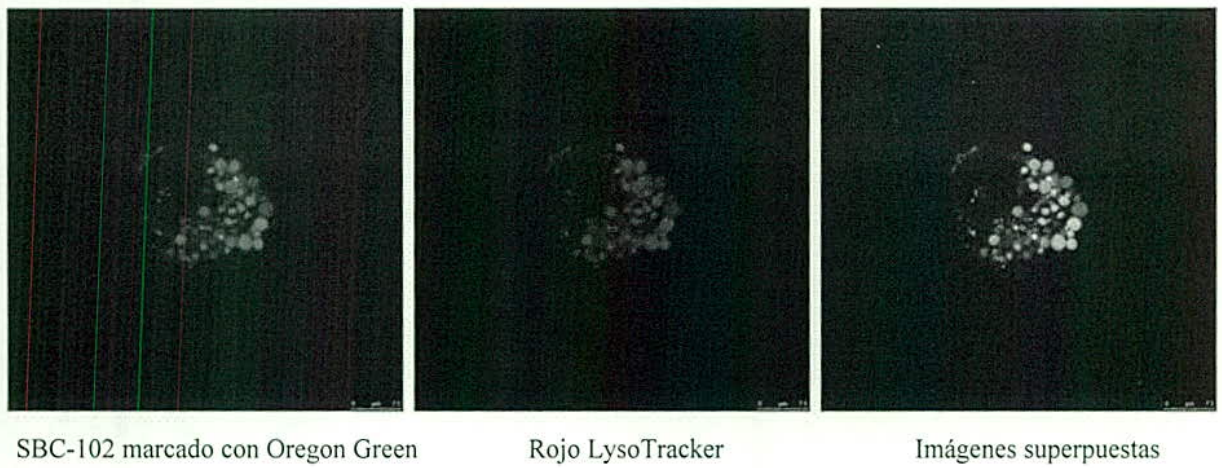


Fig. 11

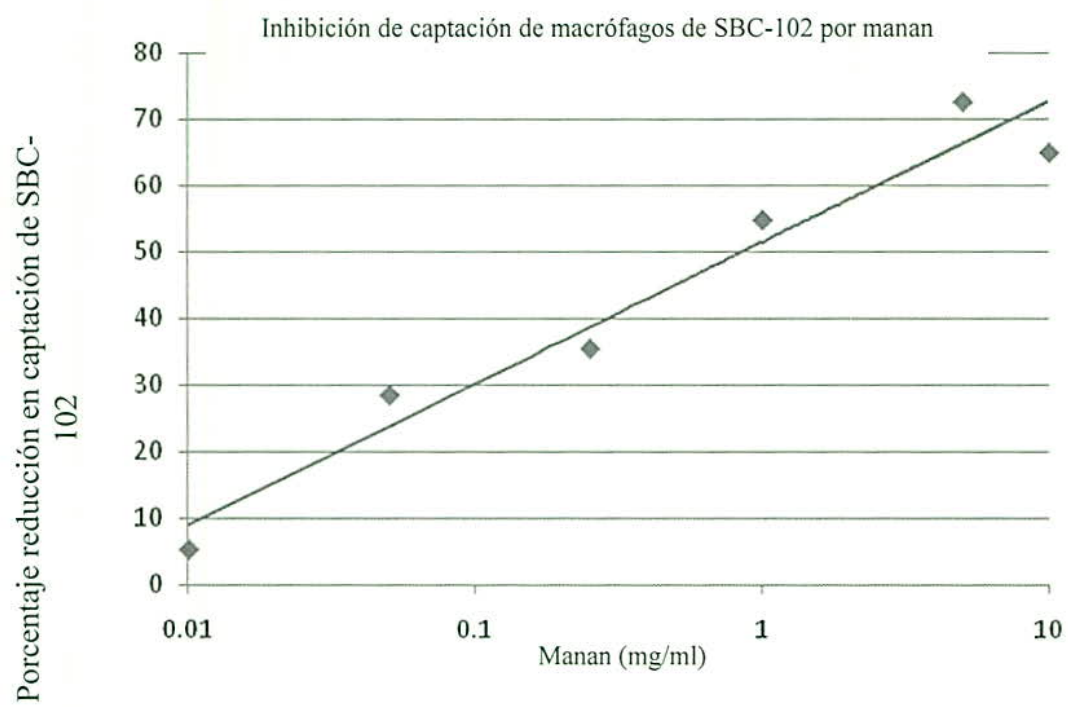


Fig. 12

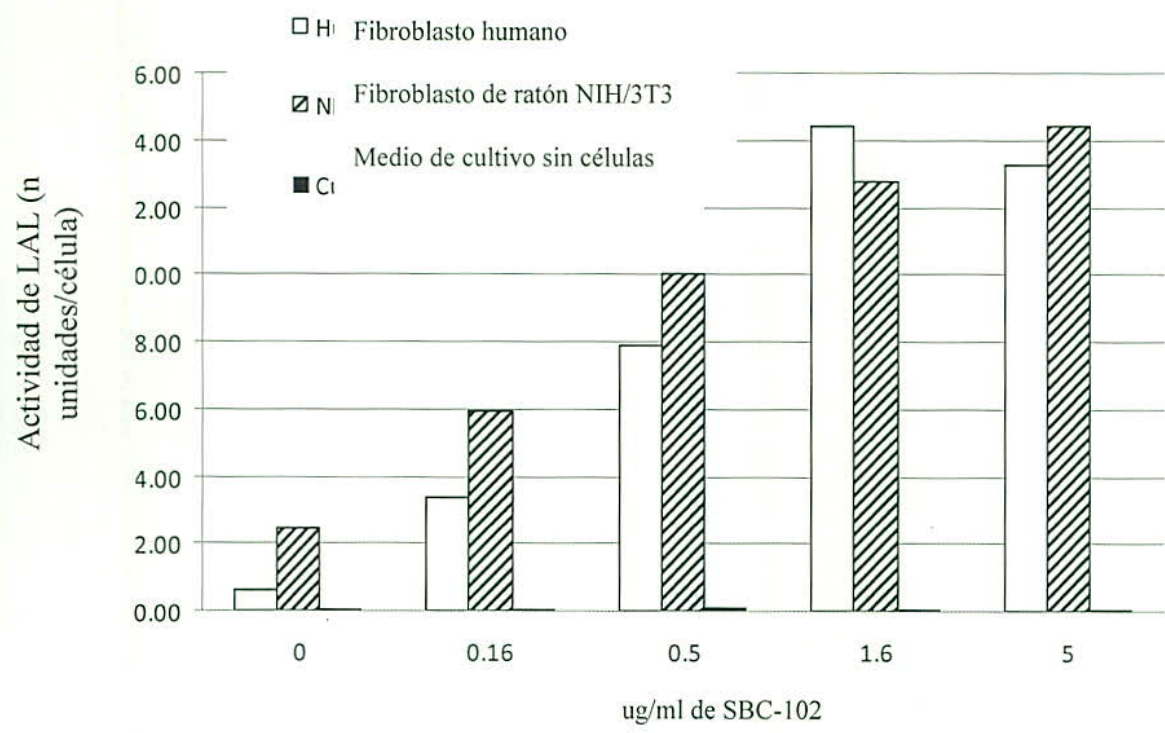


Fig. 13

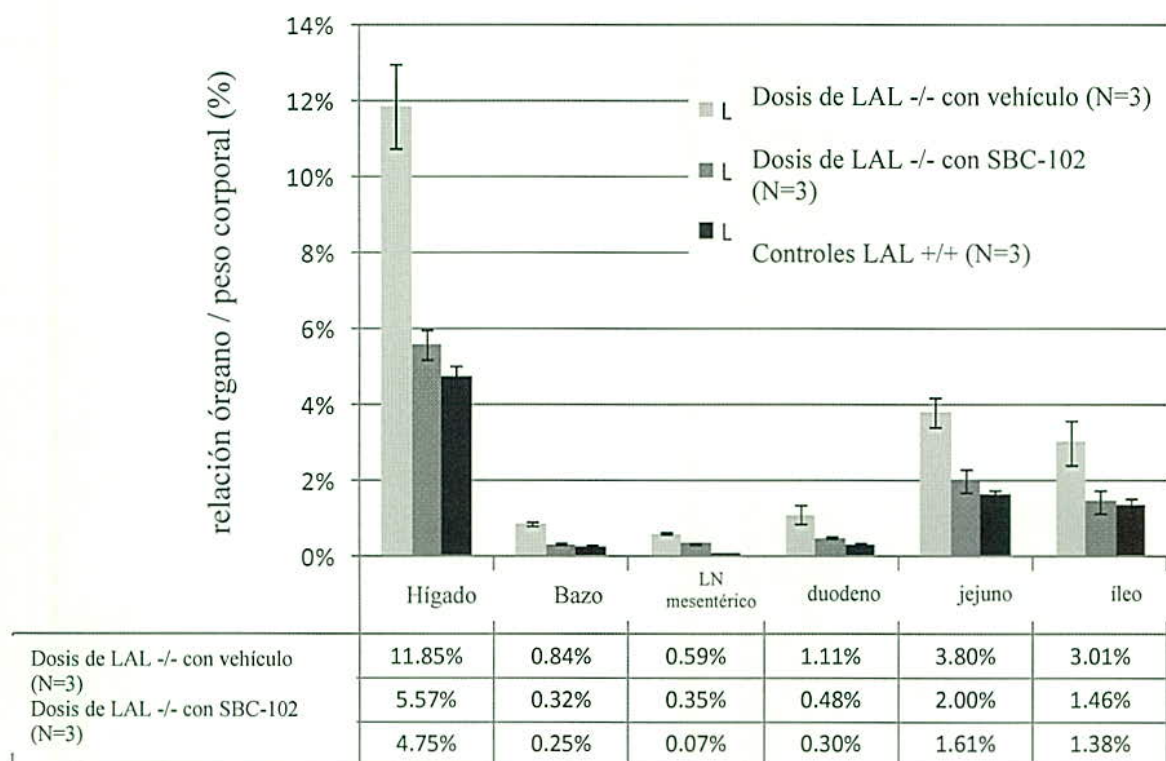


Fig. 14

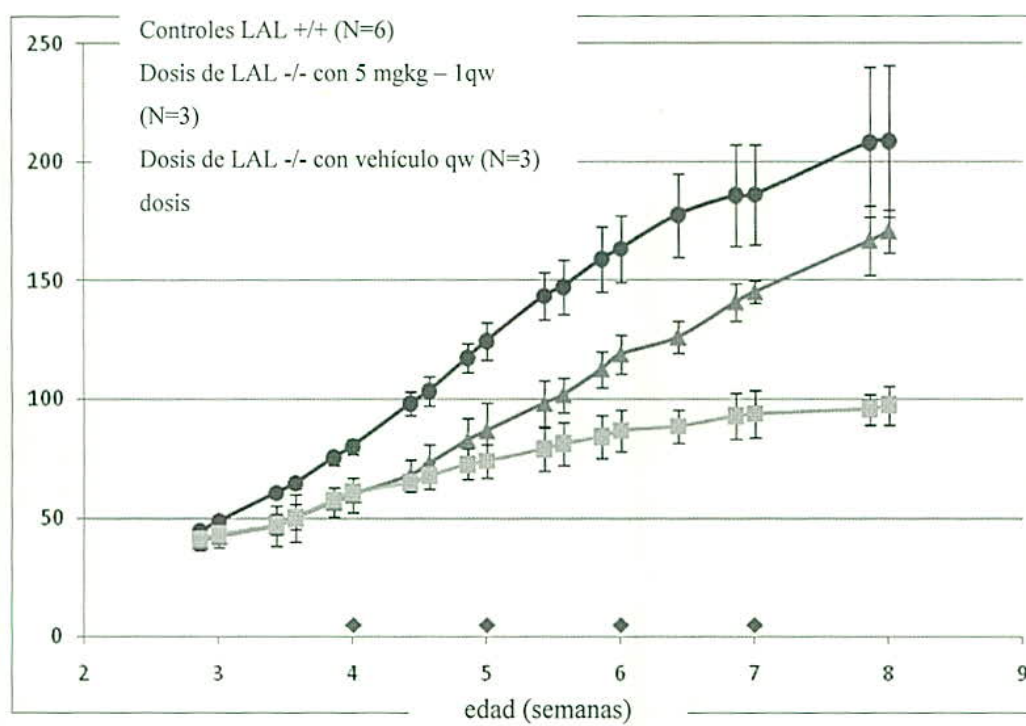


Fig. 15

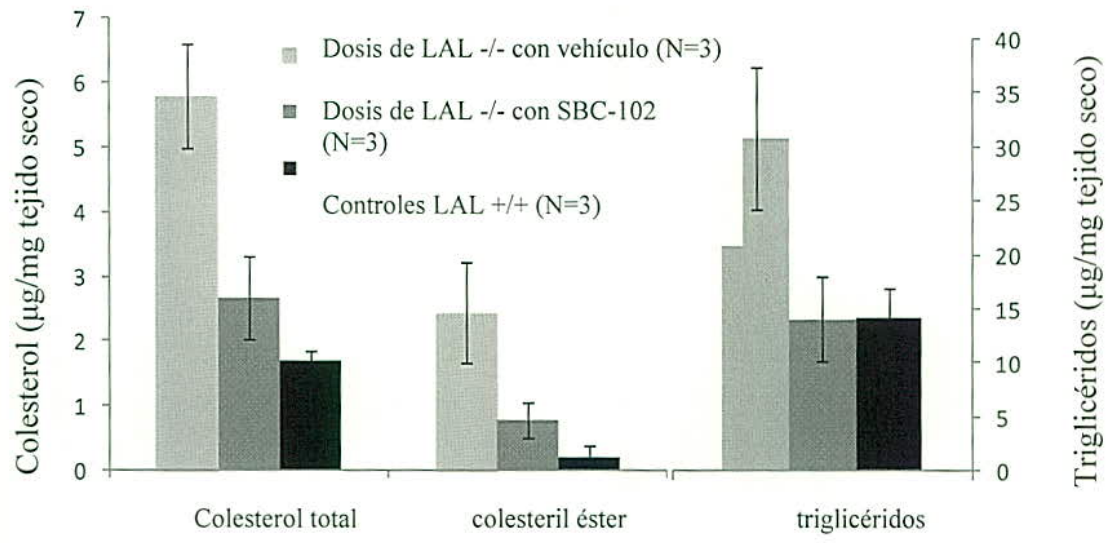


Fig. 16

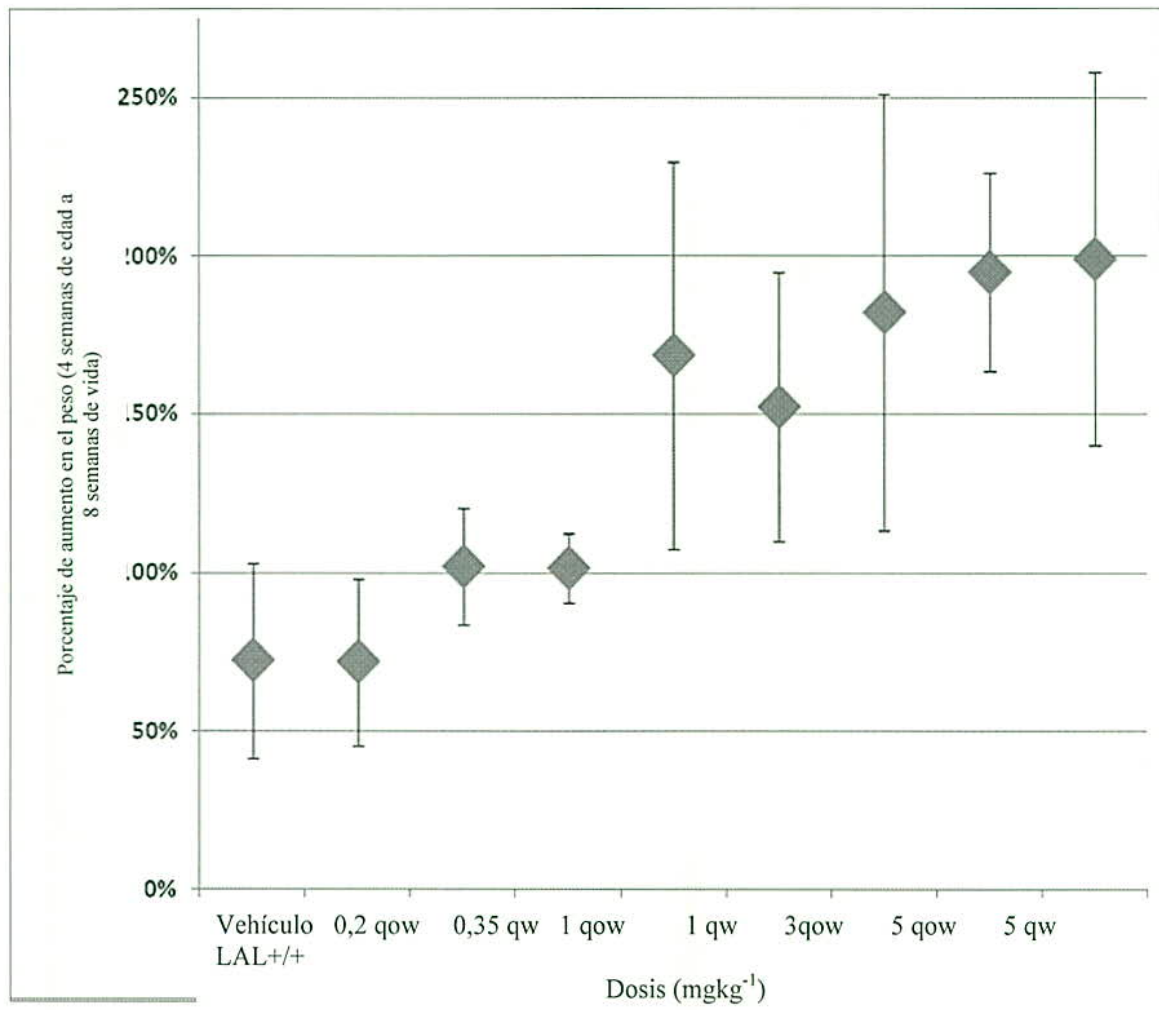


Fig. 17

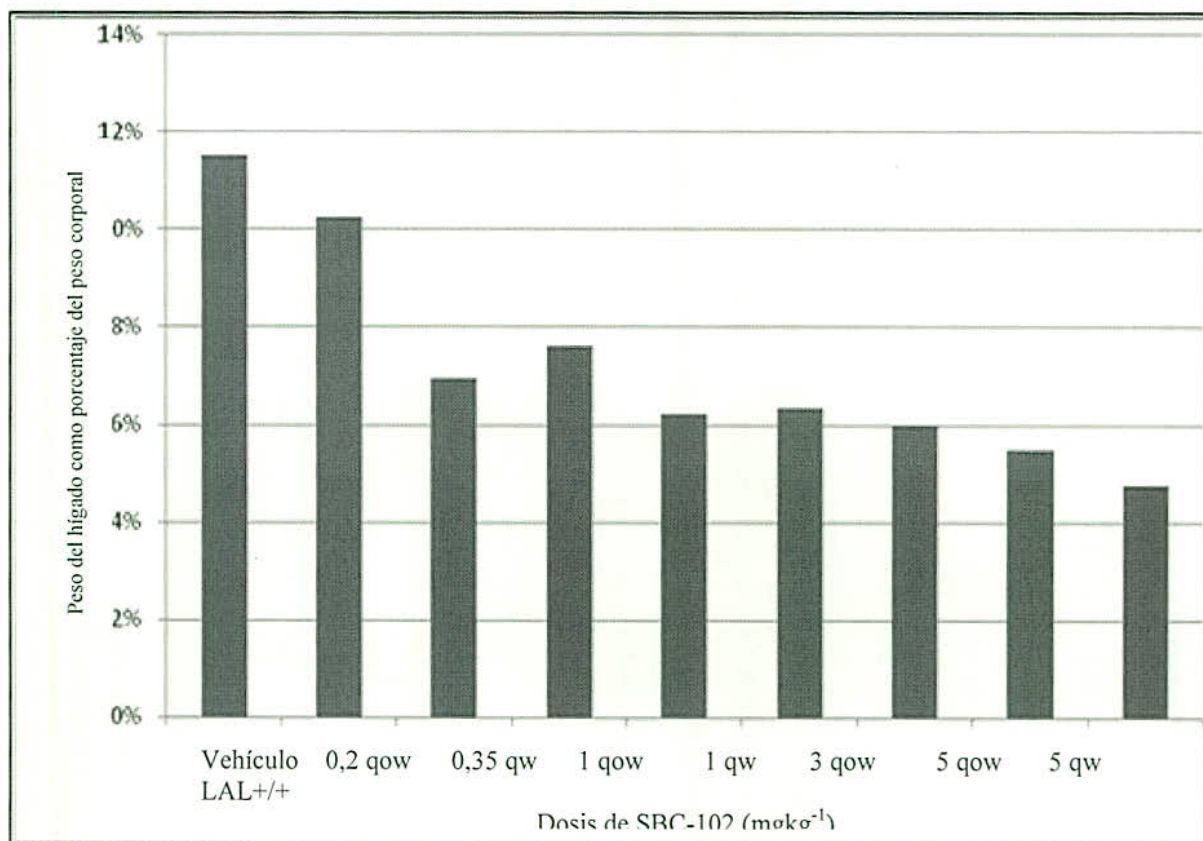


Fig. 18

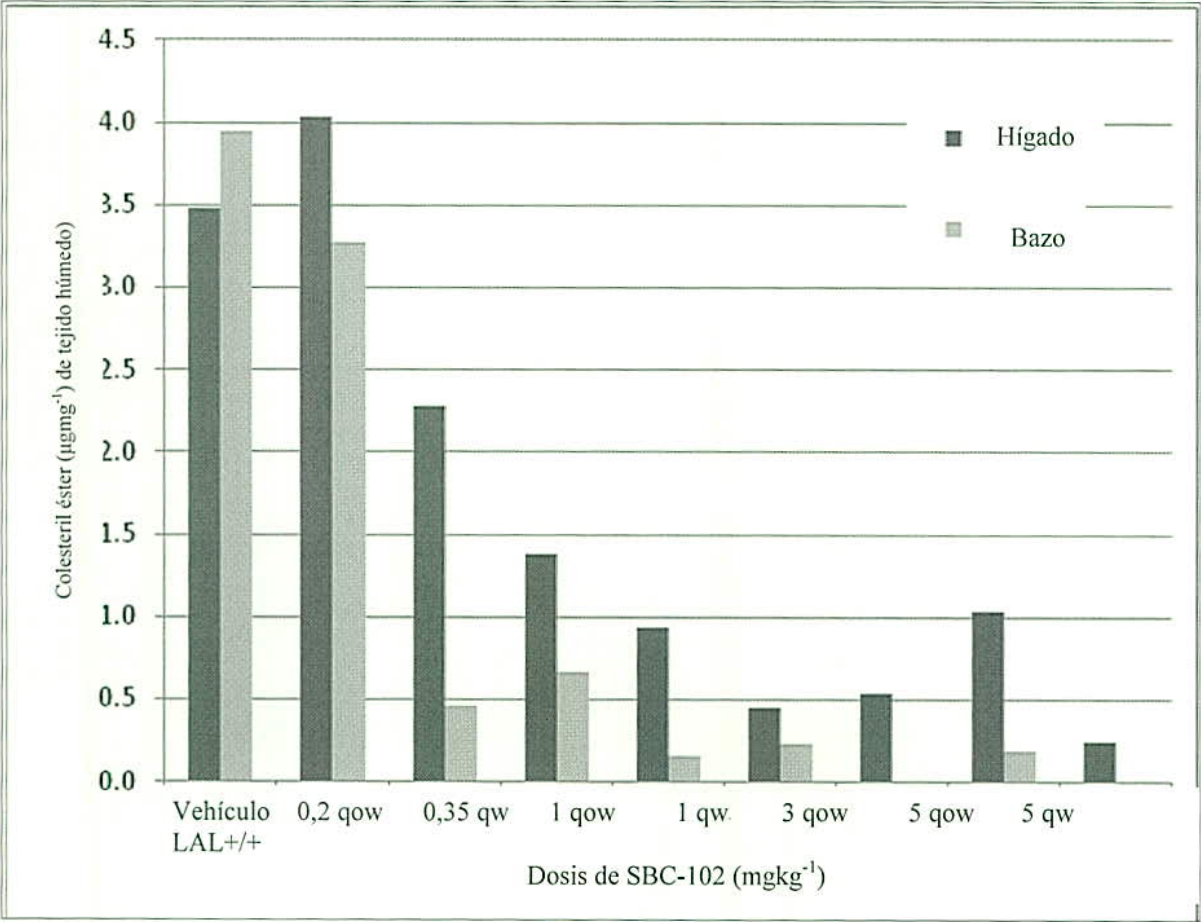


Fig. 19

Sequence Listing COLO 841 001 7
SEQUENCE LISTING

<110> SYNAGEVA BIOPHARMA CORP.

<120> USE OF LYSOSOMAL ACID LIPASE FOR TREATING LYSOSOMAL ACID LIPASE DEFICIENCY
IN PATIENTS

<130> 121424-00420

<140> PCT/US2011/051096

<141> 2011-09-09

<150> 61/403,011

<151> 2010-09-09

<150> 61/456,014

<151> 2010-10-29

<150> 61/432,372

<151> 2011-01-13

<150> PCT/US2011/033699

<151> 2011-04-23

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 378

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> LAL

<400> 1

Ser Gly Gly Lys Leu Thr Ala Val Asp Pro Glu Thr Asn Met Asn Val
1 5 10 15

Ser Glu Ile Ile Ser Tyr Trp Gly Phe Pro Ser Glu Glu Tyr Leu Val
20 25 30

Glu Thr Glu Asp Gly Tyr Ile Leu Cys Leu Asn Arg Ile Pro His Gly
35 40 45

Arg Lys Asn His Ser Asp Lys Gly Pro Lys Pro Val Val Phe Leu Gln
50 55 60

His Gly Leu Leu Ala Asp Ser Ser Asn Trp Val Thr Asn Leu Ala Asn
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gly Phe Ile Leu Ala Asp Ala Gly Phe Asp Val Trp Met
85 90 95

Gly Asn Ser Arg Gly Asn Thr Trp Ser Arg Lys His Lys Thr Leu Ser
100 105 110

Val Ser Gln Asp Glu Phe Trp Ala Phe Ser Tyr Asp Glu Met Ala Lys
115 120 125

Tyr Asp Leu Pro Ala Ser Ile Asn Phe Ile Leu Asn Lys Thr Gly Gln
130 135 140

Sequence Listing COLO 841 001 7

Glu Gln Val Tyr Tyr Val Gly His Ser Gln Gly Thr Thr Ile Gly Phe
 145 150 155 160

Ile Ala Phe Ser Gln Ile Pro Glu Leu Ala Lys Arg Ile Lys Met Phe
 165 170 175

Phe Ala Leu Gly Pro Val Ala Ser Val Ala Phe Cys Thr Ser Pro Met
 180 185 190

Ala Lys Leu Gly Arg Leu Pro Asp His Leu Ile Lys Asp Leu Phe Gly
 195 200 205

Asp Lys Glu Phe Leu Pro Gln Ser Ala Phe Leu Lys Trp Leu Gly Thr
 210 215 220

His Val Cys Thr His Val Ile Leu Lys Glu Leu Cys Gly Asn Leu Cys
 225 230 235 240

Phe Leu Leu Cys Gly Phe Asn Glu Arg Asn Leu Asn Met Ser Arg Val
 245 250 255

Asp Val Tyr Thr Thr His Ser Pro Ala Gly Thr Ser Val Gln Asn Met
 260 265 270

Leu His Trp Ser Gln Ala Val Lys Phe Gln Lys Phe Gln Ala Phe Asp
 275 280 285

Trp Gly Ser Ser Ala Lys Asn Tyr Phe His Tyr Asn Gln Ser Tyr Pro
 290 295 300

Pro Thr Tyr Asn Val Lys Asp Met Leu Val Pro Thr Ala Val Trp Ser
 305 310 315 320

Gly Gly His Asp Trp Leu Ala Asp Val Tyr Asp Val Asn Ile Leu Leu
 325 330 335

Thr Gln Ile Thr Asn Leu Val Phe His Glu Ser Ile Pro Glu Trp Glu
 340 345 350

His Leu Asp Phe Ile Trp Gly Leu Asp Ala Pro Trp Arg Leu Tyr Asn
 355 360 365

Lys Ile Ile Asn Leu Met Arg Lys Tyr Gln
 370 375

<210> 2
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Native signal peptide

<400> 2

Met Lys Met Arg Phe Leu Gly Leu Val Val Cys Leu Val Leu Trp Thr
 1 5 10 15

Leu His Ser Glu Gly

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS		
	Dependencia:	Fecha: ____/____/____/ AAAA MM DD	Recorrido:
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			Planilla:
Radicador:			

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1			
2	13-92099-	0	
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:

Folio 137 Sobre de Manila con C.D

Ce.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	Espacio reservado para el adhesivo de radicación
---	--

DELEGATURA PARA LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
FORMULARIO PARA OTORGAR PODER A ABOGADO
EN LOS TRÁMITES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

1. Datos del otorgante

☐ Persona Natural ☒ Persona Jurídica

SYNAGEVA BIOPHARMA CORP.

Nombre o denominación/Razón Social completa(En caso de que haya más de un solicitante, relaciónese en hoja adjunta

Nombre del Representante

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del otorgante	
Estado de Delaware, Estados Unidos de América	128 Spring Street, Suite 520, Lexington, Massachusetts 02421, Estados Unidos de América	
Dirección Electrónica	No. Fax	Número Telefónico
clientes@cavelier.com	2118650	3473611

2. Datos del Apoderado

Principal Luz Clemencia Suárez de Páez	35.456.344	23.555
Primer Suplente Jorge Chavarro Aristizabal	16.209.330	40.119
Segundo Suplente Oscar Correa Barbosa	79.524.634	71.027
Tercer Suplente Edna Darmely Sarmiento Charry	52.006.265	65.794

Apellidos y Nombre Documento de Identificación T.P.(sólo abogados Profesionales)

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del Apoderado	
Colombiana	Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia	
Dirección Electrónica	No. Fax	Número Telefónico
cavelier@cavelier.com	2118650	3473611

☐Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean

enviadas a través de la dirección de correo electrónico.

Mediante el presente documento, la persona indicada en el punto 1 de este documento nombra a las personas que se identifican en el punto 2 como sus apoderados en los términos del artículo 66 del Código de Procedimiento Civil, para las actuaciones que se relacionan a continuación.

3. Actuaciones en cuestión:

- Este poder concierne:
- ☒ Todas las solicitudes y/o registros actuales y futuros del otorgante.
 - ☐ La(s) siguiente(s) solicitud(es) y/o registro(s):

NOMBRE	NÚMERO DE SOLICITUD O REGISTRO

Nota: Si el espacio anterior no es suficiente, por favor relacione las actuaciones en hoja anexa.

4. Alcance del poder:

- ☒ Confiero expresamente al (los) apoderado(s) todas las facultades legales para que represente mi(s) interés(es) en la(s) actuación(es) señalada(s) en el punto 3 de este documento, incluyendo:
 - ☒ Desistir de la(s) solicitud(es) y de la demás actuaciones
 - ☒ Renunciar a los derechos del registro de signos distintivos o de nuevas creaciones
 - ☒ Transigir
 - ☒ Recibir
 - ☒ Conciliar
 - ☒ Ratificar los actos de agentes oficiosos

5. Firma <u>Sany Patel</u> Nombre del Firmante (Signer's name) <u>[Signature]</u> Firma (signature) <u>March 29</u>, 2013 Fecha (Date)	<u>LUZ CLEMENCIA DE PAEZ</u> Firma del Apoderado TP No. 23.555 <u>TP#23555255</u> Tarjeta Profesional
--	---

The Commonwealth of Massachusetts

William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by: Jessica Dale Bell

3. acting in the capacity of: Notary Public

4. bears the seal/stamp of: Jessica Dale Bell
whose commission expires on: March 16, 2018

Certified

5. at: Boston, Massachusetts 6. the: 2 April, 2013

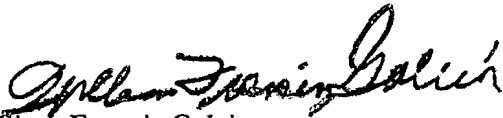
7. by: the Secretary of the Commonwealth

8. No.: 1660907

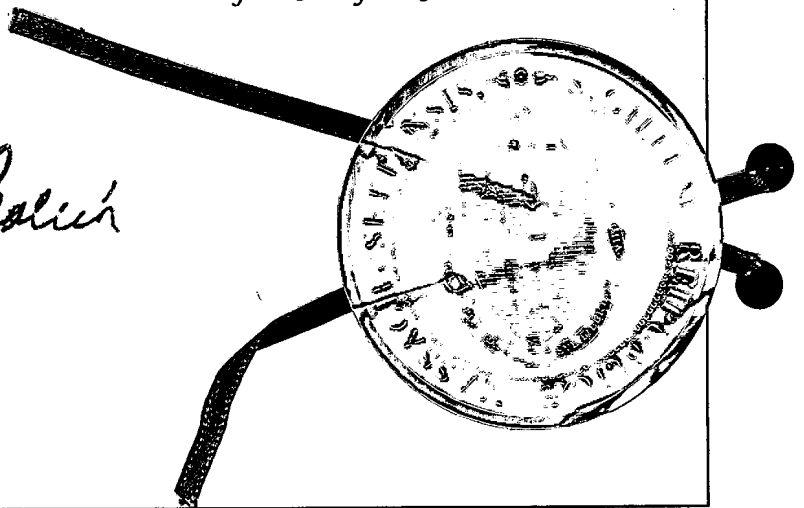
9. Seal/stamp:

Great Seal of the Commonwealth

10. Signature:



William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth

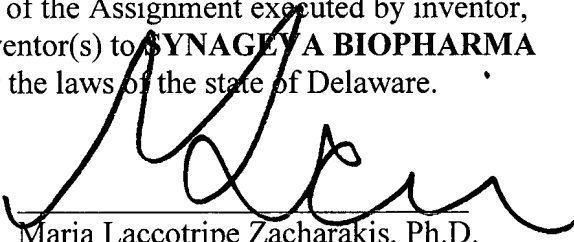


(121424-00429)

IN THE PATENT OFFICE OF COLOMBIA

Assignee(s): **SYNAGEVA BIOPHARMA CORP.**
Inventor(s): **Anthony Quinn**
Serial No.: **13/229558**
Filed: **09 September 2011**
Title: **METHODS FOR TREATING LYSOSOMAL ACID LIPASE DEFICIENCY IN PATIENTS**

I, Maria Laccotripe Zacharakis, Ph.D., attorney for the applicant, hereby attest that the attached document is a true and exact copy of the Assignment executed by inventor, **Anthony Quinn**. The Assignment is from said inventor(s) to **SYNAGEVA BIOPHARMA CORP**, a corporation organized and existing under the laws of the state of Delaware.



Maria Laccotripe Zacharakis, Ph.D.
Registration No. 56,266
Attorney for Applicant

United States of America)
Commonwealth of Massachusetts) ss.:
County of Suffolk)

On the 2nd day of April 2013 before me, the undersigned notary public, personally appeared Maria Laccotripe Zacharakis (name of document signer), proved to me through satisfactory evidence of identification, which was that she is known to me personally, to be the person whose name is signed on the preceding or attached document in my presence.

 _____ (official signature and seal of notary)
Jessica Dale Bell
My commission expires March 16, 2018





UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

NOVEMBER 23, 2011

PTAS

STERNE, KESSLER, GOLDSTEIN & FOX PLLC
1100 NEW YORK AVENUE, N.W.
SUITE 900
WASHINGTON, DC 20005

501732559

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 11/22/2011

REEL/FRAME: 027271/0080
NUMBER OF PAGES: 3

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: 3063.0020004/EJH/CLD

ASSIGNOR:
QUINN, ANTHONY

DOC DATE: 10/21/2011

ASSIGNEE:
SYNAGEVA BIOPHARMA CORP.
128 SPRING STREET
SUITE 520
LEXINGTON, MASSACHUSETTS 02421

APPLICATION NUMBER: 13229558

FILING DATE: 09/09/2011

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: METHODS FOR TREATING LYSOSOMAL ACID LIPASE DEFICIENCY IN PATIENTS

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

ASSIGNMENT

In consideration of the sum of One Dollar (\$1.00) or equivalent and other good and valuable consideration paid to the undersigned inventor: **Anthony QUINN**, hereby sells and assigns to **Synageva BioPharma Corp.**, a corporation formed under the laws of Delaware, whose mailing address is 128 Spring Street, Suite 520, Lexington, MA 02421 (hereafter referred to as the Assignee), his/her entire right, title and interest, including the right to sue for past infringement and to collect for all past, present and future damages, for the United States of America (as defined in 35 U.S.C. § 100) and throughout the world,

(a) in the invention(s) known as **Methods for Treating Lysosomal Acid Lipase Deficiency in Patients** for which application(s) for patent in the United States of America has a filing date or a 371(c) date of September 9, 2011 (also known as United States Application No. 13/229,558), in any and all applications thereon, in any and all Letters Patent(s) therefor, and

(b) in any and all applications that claim the benefit of the patent application listed above in part (a), including non-provisional applications, continuing (continuation, divisional, or continuation-in-part) applications, reissues, extensions, renewals and reexaminations of the patent application or Letters Patent therefor listed above in part (a), to the full extent of the term or terms for which Letters Patents issue, and

(c) in any and all inventions described in the patent application listed above in part (a), and in any and all forms of intellectual and industrial property protection derivable from such patent application, and that are derivable from any and all continuing applications, reissues, extensions, renewals and reexaminations of such patent application, including, without limitation, patents, applications, utility models, inventor's certificates, and designs together with the right to file applications therefor; and including the right to claim the same priority rights from any previously filed applications under the International Agreement for the Protection of Industrial Property, or any other international agreement, or the domestic laws of the country in which any such application is filed, as may be applicable;

all such rights, title and interest to be held and enjoyed by the above-named Assignee, its successors, legal representatives and assigns to the same extent as all such rights, title and interest would have been held and enjoyed by the Assignor had this assignment and sale not been made.

The undersigned inventor agrees to execute all papers necessary in connection with the application(s) and any non-provisional, continuing (continuation, divisional, or continuation-in-part), reissue, reexamination or corresponding application(s) thereof and also to execute separate assignments in connection with such application(s) as the Assignee may deem necessary or expedient.

The undersigned inventor agrees to execute all papers necessary in connection with any interference or patent enforcement action (judicial or otherwise) related to the application(s) or any non-provisional, continuing (continuation, divisional, or continuation-in-part), reissue or reexamination application(s) thereof and to cooperate with the Assignee in every way possible in obtaining evidence and going forward with such interference or patent enforcement action.

The undersigned inventor hereby represents that he/she has full right to convey the entire interest herein assigned, and that he/she has not executed, and will not execute, any agreement in conflict therewith.

The undersigned inventor hereby grants the patent practitioners associated with **CUSTOMER NUMBER 26111** the power to insert in this assignment any further identification that may be necessary or desirable in order to comply with the rules of the United States Patent and Trademark Office for recordation of this document.

The undersigned inventor hereby represents that he/she understands that the patent practitioners associated with **CUSTOMER NUMBER 26111** are the legal representatives of, and attorneys for, the assignee, and are NOT the legal representatives of, and attorneys for, the inventor.

IN WITNESS WHEREOF, executed by the undersigned inventor on the date opposite his/her name.

Date: 10/21/2011

Signature of Inventor: _____

Anthony QUINN

La siguiente es una traducción simple de documento originalmente escrito en Inglés

La Comunidad de Massachussets
William Francis Galvin
Secretario de la Comunidad

APOSTILLA
(Convención de La Haya de octubre 5, 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por: Jessica Dale Bell

3. Que actúa en calidad de: Notario Público

4. Lleva el sello/timbre de: Jessica Dale Bell

cuya comisión expira el: 16 de marzo, 2018

Certifica

5. En Boston, Massachussets

6. El 2 de abril, 2013

7. Por. el Secretario de la Comunidad

8. No. 1660907

9. Sello/timbre

Gran Sello de la Comunidad

10. Firma

(Aparece sello adhesivo)

(aparece firma)

William Francis Galvin

Secretario de la Comunidad

(121424-00429)

EN LA OFICINA DE PATENTES DE COLOMBIA

Cesionario: SYNAGEVA BIOPHARMA CORP.
Inventores: Anthony Quinn
No. de Serie: 13/229558
Fecha presentación: 09 septiembre 2011
Título: MÉTODOS PARA TRATAR DEFICIENCIA DE LIPASA
ÁCIDA LISOSOMAL EN PACIENTES

Yo, María Laccotripe Zacharakis, Ph, D., abogada del solicitante, por la presente doy fe de que el documento adjunto es una copia fiel y verdadera de la Cesión legalizada por el inventor **Anthony Quinn**. La Cesión es del inventor a SYNAGEVA BIOPHARMA CORP., una sociedad constituida y vigente de conformidad con las leyes del estado de Delaware.

(Aparece firma ilegible)
Maria Laccotripe Zacharakis, Ph, D.,
Registro No. 56,266
Abogado del Solicitante

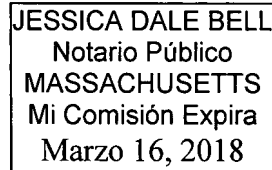
Estados Unidos de América)
Comunidad de Massachussets) ss.:
Condado de Suffolk)

El día 2 de abril de 2013 ante mí, el notario público abajo firmante, compareció María Laccotripe Zacharakis (nombre del firmante del documento), quien me comprobó mediante evidencia de identificación satisfactoria, a quien conozco personalmente, ser la persona con cuyo nombre firma el documento precedente o adjunto en mi presencia.

(aparece firma ilegible) firma oficial y sello del notario)

Jessica Dale Bell

Mi comisión expira Marzo 16, 2018



(Aparece Sello)

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS

BAJO LA SECRETARÍA DE COMERCIO PARA PROPIEDAD INTELECTUAL Y
DIRECTOR DE LA OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS

NOVIEMBRE 23, 2011 PTAS
DSTERNE, KESSLER, GOLDSTEIN & FOX PLLC
1100 MEW YORK AVENUE, N.W.
SUITE 900
WASHINGTON, DC 20005

501732559

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS
AVISO DE REGISTRO DE DOCUMENTO DE CESIÓN

EL DOCUMENTO ADJUNTO HA SIDO INSCRITO ANTE EL DEPARTAMENTO DE REGISTRO DE CESIONES DE LA OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS. SE ENCUENTRA DISPONIBLE UNA COPIA EN MICROFILM COMPLETA EN LA SALA DE BÚSQUEDA DE CESIONES EN EL NÚMERO DE CUADRO Y CARRETE REFERENCIADO ADELANTE.

POR FAVOR REVISE TODA LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE AVISO. LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE AVISO DE INSCRIPCIÓN REFLEJA LOS DATOS PRESENTADOS EN EL SISTEMA DE CESIÓN DE MARCAS Y PATENTES. SI USTED ENCUENTRA ERRORES O TIENE PREGUNTAS QUE SE RELACIONAN CON ESTE AVISO, PUEDE CONTACTAR A LA DEPARTAMENTO DE REGISTRO DE CESIONES AL 571-272-3350. POR FAVOR ENVÍE SOLICITUD

DE CORRECCIÓN A: OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS, PARADA DE CORREO: DEPARTAMENTO DE REGISTRO DE CESIONES, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

FECHA DE INSCRIPCIÓN: 11/22/2011

CARRETE/CUADRO: 027271/0080

NÚMERO DE PAGINAS: 3

RESUMEN: CESIÓN DE INTERÉS DEL CEDENTE (VER DOCUMENTOS PARA DETALLES).

NÚMERO DE EXPEDIENTE: 3063.0020004/EJH/CLD

CEDENTE

QUINN, ANTHONY.

FECHA DOC: 10/21/2011

CESIONARIO:

SYNAGEVA BIOPHARMA CORP.

128 SPRING STREET

SUITE 520

LEXINGTON, MASSACHUSSETS 02421

NÚMERO DE SOLICITUD: 13229558

FECHA DE PRESENTACIÓN: 09/09/2011

NÚMERO DE PATENTE: FECHA DE PUBLICACIÓN:

TÍTULO: MÉTODOS PARA TRATAR DEFICIENCIA DE LIPASA ÁCIDA LISOSOMAL EN PACIENTES

DEPARTAMENTO DE REGISTRO DE CESIONES

DIVISIÓN DE REGISTROS PÚBLICOS

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 - www.USPTO.GOV

CESIÓN

En contraprestación de la suma de Un Dólar (USD\$1.00) o equivalente y a título oneroso pagado al inventor abajo firmante: Anthony QUINN, por la presente vende y cede a **Synageva BioPharma Corp.**, una sociedad constituida en virtud de las leyes de Delaware, cuya dirección de correspondencia es 128 Spring Street, Suite 520, Lexington, MA 02421 (denominada en lo sucesivo como el Cesionario), su derecho completo título y participación, que incluye el derecho a demandar por infracciones pasadas y a recaudar todas las indemnizaciones por daños pasados presentes y futuros, en los Estados Unidos de América (en virtud de lo definido en el 35 U.S.C. §100) y en todo el mundo,

- (a) En la invención conocida como MÉTODOS PARA TRATAR DEFICIENCIA DE LIPASA ÁCIDA LISOSOMAL EN PACIENTES para la que la solicitud de patente tiene una fecha de presentación o una fecha 371(c) de septiembre 9, 2011 (también conocida como solicitud estadounidense No. 13/229,558), en todas y cualesquiera de las solicitudes de esta, en todas y cualesquiera de las patentes de la misma, y
- (b) En todas y cualesquiera de las solicitudes que reivindican el beneficio de la solicitud enumerada en la parte (a), que incluyen solicitudes no provisionales, Solicitudes de continuación (continuación, divisional, o continuación en parte), extensiones, renovaciones, y reemisiones de la solicitud de patente o Título de Patente de la misma enumerada anteriormente en el literal (a), al máximo grado del término o términos para los que se emite los Títulos de Patente, y
- (c) En todas y cualesquiera de las invenciones descritas anteriormente en la parte (a), y en todas y cualesquiera de las formas de protección de propiedad industrial e intelectual que se puedan derivar de dicha solicitud de patente, y que se puedan derivar de todas y cualesquiera de las solicitudes de continuación, remisiones, extensiones renovaciones y reexaminaciones de dicha solicitud de patente, que incluyen, sin limitación, patente, solicitudes, modelos de utilidad, certificados de inventor, y diseños junto con el derecho a presentar solicitudes de las mismas; y que incluyen el derecho a reivindicar los mismos derechos de prioridad de cualesquier solicitudes presentadas anteriormente en virtud del Acuerdo Internacional para la Protección de Propiedad Industrial, o cualesquier otro acuerdo internacional, o leyes nacionales del país en el que se presente cualquiera de dichas solicitudes, según se pueda aplicar;

todos dichos derechos, título y participación que van a ser poseídos y disfrutados por el Cesionario mencionado anteriormente, sus sucesores, representantes legales y sucesores al máximo grado en que todos dichos derechos, título e interés hubieran sido poseídos y disfrutados por el Cedente si no se hubiera hecho esta cesión y venta.

El inventor abajo firmante acepta legalizar todos los documentos necesarios en relación con las solicitudes y cualesquiera solicitudes no provisionales, de continuación (continuación, divisional o continuación en parte), reemisión, reexaminación o solicitudes correspondientes de la misma y también acepta legalizar cesiones separadas en relación con dichas solicitudes según pueda considerar necesario o conveniente el Cesionario.

El inventor abajo firmante acepta legalizar todos los documento necesarios en relación con cualesquiera acción de cumplimiento de patente o interferencia (judicial o de otra forma) relacionada con las solicitudes y cualesquiera solicitudes no provisionales, de continuación (continuación, divisional o continuación en parte), reemisión, reexaminación o solicitudes correspondientes de la misma y también acepta cooperar con el Cesionario en toda forma posible para obtener pruebas y seguir adelante con dicha interferencia o acción de cumplimiento de patente.

El inventor abajo firmante por el presente documento declara que tiene pleno derecho a ceder la participación aquí cedida, y que no ha legalizado, y no legalizará, ningún acuerdo que entre en conflicto con este.

El inventor abajo firmante por el presente otorga a los abogados de patentes asociados con el **Número de cliente 26111** la facultad de insertar en este acuerdo cualquier identificación que pueda ser necesaria o deseable con el fin de cumplir con las normas de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos para el registro de este documento.

El inventor abajo firmante por el presente documento declara que comprende que los abogados de patentes asociados con el **Número de cliente 26111** son representantes legales de, y abogados de, el cesionario, y **NO** son representantes legales de, ni abogados de, el inventor.

EN FE DE LO CUAL, legalizado por el inventor quien firma frente a la fecha.

Fecha: 10/21/2011 Firma del Inventor: (aparece firma ilegible)
Anthony Quinn

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0030605

Bogotá D.C., Abril 03 de 2013 - 08:50:23

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	189813971	03/04/2013	30.980.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. CONTABILISTICO	CONCEPTO	VR. UNDITARIO	VR. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
			\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al E

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-092089- -00000-0000

Fecha: 2013-04-09 16:21:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 150

020: 20095-841-001-7.

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Computador: (571) 5870000 Fax: (571) 5370284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 3 de 2013 - 08:50:39

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD FASE NACIONAL PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País 61/403,011 2010/09/09 US 61/456,014 2010/10/29 US 61/432,372 2011/01/13 US PCTUS2011033699 2011/04/23 US		(51) Int Cl: A61K 038/046 (71) Solicitante(s) SYNAGEVA BIOPHARMA CORP. (72) Inventor(es) ANTHONY QUINN (74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 2013/04/09 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 2011/09/09 No. de solicitud PCT/US2011/051096		(87) Publicación internacional Fecha: 2012/04/19 N° publicación: WO 2012/050695 A1	
(54) Titulo: USO DE ÁCIDO LIPASA LISOSOMAL PARA TRATAR LA DEFICIENCIA DE ÁCIDO LIPASA LISOSOMAL EN PACIENTES			

Resumen:

La presente invención provee métodos de tratamiento de la Deficiencia de LAL que comprenden administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de ácido lipasa lisosomal con una frecuencia de dosificación efectiva. También se proporcionan métodos para mejorar el crecimiento y la función hepática, aumentar la concentración de LAL en tejidos y aumentar la Actividad de LAL en un paciente humano que sufre Deficiencia de LAL.



No. 13-092089- -00000-0000

ES

Fecha: 2013-04-09 16:21:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 150

00

PATENTE DE INVENCION ☐

MODE

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia:		Fecha: ____/____/____ AAAA MM DD	Recorrido:
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador			Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	13 - 92089 - 10		
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:

NO SE PUEDE SUBIR INFORMACION ELECTRONICA DEL CD ANEXO A ESTA PATENTE, YA QUE CONTIENE ARCHIVOS EN FORMATO TEXTO POR LO QUE EL SISTEMA SOLO PERMITE INDEXAR ARCHIVO EN FORMATO PDF

Yenny ARJUNOJAGA
12-04-13