(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년10월04일
(11) 등록번호 10-1997935
(24) 등록일자 2019년07월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/08 (2006.01) *A61K 38/46* (2006.01)
A61K 38/54 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7001752
(22) 출원일자(국제) 2011년06월25일
심사청구일자 2016년06월24일
(85) 번역문제출일자 2013년01월23일
(65) 공개번호 10-2013-0135821
(43) 공개일자 2013년12월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/041926
(87) 국제공개번호 WO 2011/163650
국제공개일자 2011년12월29일
(30) 우선권주장
61/358,857 2010년06월25일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
US20090017005 A1*
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 25 항

(73) 특허권자
샤이어 휴먼 지네틱 테라피즈 인크.
미국 매사추세츠 (우편번호 02421) 렉싱턴 샤이어 웨이 300
(72) 발명자
살라맛-밀러, 나질라
미국, 매사추세츠 02474, 알링턴, 컬리지 에비뉴 80
타일러, 케써린
미국, 매사추세츠 02476, 알링턴, 애플톤 스트리트 472
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강명구, 이경민

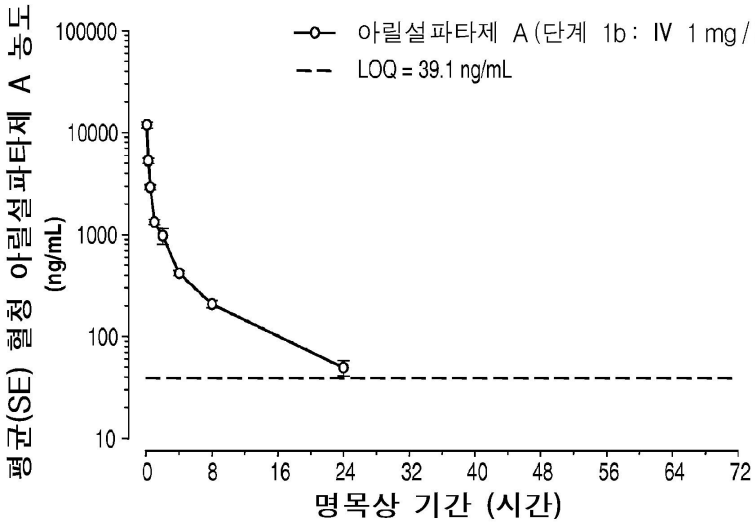
심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 **아릴설파타제 A의 CNS 전달을 위한 방법들 및 조성물들**

(57) 요 약

본 발명은 무엇보다도 리소좀 축적병들 (lysosomal storage diseases)의 효과적인 치료를 위한 리소좀 효소들의 CNS 전달을 위한 조성물들 및 방법들을 제공한다. 일정 구현예들에서, 본 발명은 이염색성 백색질장애 질환의 치료를 위한 아릴설파타제 A (ASA) 단백질, 염, 및 폴리솔베이트 표면활성제를 포함하는 직접 CNS 경막내 투여를 위한 안정한 제형물을 포함한다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

캄폴리에토, 폴

미국, 버지니아 22903, 샬롯츠빌, 레드 힐 로드 3595

샤로크, 자흐라

미국, 매사추세츠 02493, 웨스톤, 테라스 로드 5

판, 징

미국, 매사추세츠 01719, 박스버러, 데포 로드 868

찰나스, 로렌스

미국, 매사추세츠 01760, 나티크, 밀 스트리트 49

라이트, 테레사 레아

미국, 매사추세츠 02142, 렉싱턴, 얼 스트리트 39

칼리아스, 페리클레스

미국, 매사추세츠 02176, 멜로즈, 스웨인즈 폰드 로드 39

(56) 선행기술조사문헌

JP2007504166 A

US20090246187 A1

US20110105560 A1

US20090130079 A1

US20100260706 A1

US20080003211 A1

US20100068195 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(30) 우선권주장

61/360,786 2010년07월01일 미국(US)

61/387,862 2010년09월29일 미국(US)

61/435,710 2011년01월24일 미국(US)

61/442,115 2011년02월11일 미국(US)

61/476,210 2011년04월15일 미국(US)

61/495,268 2011년06월09일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

10-100mg/ml 농도 범위의 아릴설파타제 A (ASA) 단백질, 염, 폴리솔베이트 계면활성제, 및 0-5mM 농도의 포스페이트를 포함하고, pH 5.5-7.0인 경막내 투여를 위한 안정한 제형물(formulation).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 ASA 단백질은 30 mg/mL, 50 mg/mL, 또는 100 mg/mL로부터 선택되는 농도로 존재하는, 안정한 제형물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 ASA 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, 안정한 제형물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 ASA 단백질은 인간 세포주로부터 생산되는, 안정한 제형물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 ASA 단백질은 중국 햄스터 난소(CHO) 세포들로부터 생산되는, 안정한 제형물.

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 염은 NaCl인, 안정한 제형물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 NaCl은 300 mM 이하의 농도로 존재하는, 안정한 제형물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 NaCl은 137-154 mM의 농도로 존재하는, 안정한 제형물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 NaCl은 154 mM의 농도로 존재하는, 안정한 제형물.

청구항 11

삭제

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 폴리솔베이트 계면활성제는 폴리솔베이트 20인, 안전한 제형물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 폴리솔베이트 20은 0.2%(v/v) 이하의 농도로 존재하는, 안정한 제형물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 폴리솔베이트 20은 0.005%(v/v)의 농도로 존재하는, 안정한 제형물.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

제1항에 있어서, 상기 제형물의 pH는 6.0 내지 6.5인, 안정한 제형물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 제형물의 pH는 6.0인, 안정한 제형물.

청구항 23

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제형물은 액상 제형물인, 안정한 제형물.

청구항 24

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제형물은 동결건조된 건조 파우더로서 제형화되는, 안정한 제형물.

청구항 25

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제형물은 안정화제를 추가로 포함하는, 안정한 제형물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 안정화제는 슈크로스, 포도당, 만니톨, 소비톨, PEG 4000, 히스티딘, 아르기닌, 라이신, 인지질들 및 그들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 안정한 제형물.

청구항 27

10-100mg/ml 농도의 아릴설파타제 A (ASA) 단백질, 154mM의 NaCl, 및 0.005%(v/v)의 폴리솔베이트 20을 포함하고, pH는 6.0인, 경막내 투여를 위한 안정한 제형물.

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

제1항 또는 제27항에 따른 안정한 제형물의 단일 용량 형태를 포함하는 용기.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 용기는 앰풀, 바이알, 카트리지, 저장조, 동결건조-용기, 또는 미리-충전된 주사기로부터 선택되는, 용기.

청구항 39

제37항에 있어서, 상기 용기는 미리-충전된 주사기인, 용기.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 미리-충전된 주사기는 구운 실리콘 코팅을 가진 보로실리케이트 유리 주사기들, 분사된 실리콘을 가진 보로실리케이트 유리 주사기들, 또는 실리콘이 없는 플라스틱 레진 주사기들로부터 선택되는, 용기.

청구항 41

제37항에 있어서, 상기 안정한 제형물은 0.5-50.0 ㎖의 부피로 존재하는, 용기.

청구항 42

제37항에 있어서, 상기 안정한 제형물은 0.5-5.0 ㎖의 부피로 존재하는, 용기.

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원들에 관한 상호 참조

[0002] 본 출원은 미국 가특허출원들 2010년 6월 25일자로 제출된 일련번호 제 61/358,857호; 2010년 7월 1일자로 제출된 제61/360,786호; 2010년 9월 29일자로 제출된 제 61/387,862호; 2011년 1월 24일자로 제출된 제 61/435,710호; 2011년 2월 11일자로 제출된 제 61/442,115호; 2011년 4월 15일자로 제출된 제 61/476,210호; 및 2011년 6월 9일자로 제출된 제 61/495,268호에 대한 우선권을 주장하고 있고; 이들 각각은 전부 본 명세서에 의해 참조문헌으로 통합되어 있다.

[0003] 본 출원은 동일한 날짜에 제출된 "치료제들의 CNS 전달(CNS Delivery of Therapeutic Agents)"; 동일한 날짜에 제출된 "헤파란 N-설파타제의 CNS 전달을 위한 방법들 및 조성물들 (Methods and compositions for CNS Delivery of Heparan N- Sulfatase)"; 동일한 날짜에 제출된 "이듀로네이트-2-설파타제의 CNS 전달을 위한 방법들 및 조성물들 (Methods and compositions for CNS Delivery of Iduronate-2-Sulfatase)"; 동일한 날짜에 제출된 "β-갈락토세레브로시다제의 CNS 전달을 위한 방법들 및 조성물들 (Methods and compositions for CNS Delivery of β-Galactocerebrosidase)";; 동일한 날짜에 제출된 "산필리포 증후군 B형의 치료 (Treatment of Sanfilippo Syndrome Type B)"라는 명칭을 가지는 미국 출원들에 관한 것이고; 이들 각각은 전부 본 명세서에 의해 참고문헌으로 통합되어 있다.

배 경 기 술

[0004] 효소 대체 요법 (Enzyme replacement therapy, ERT)은 개체에게 천연 또는 재조합-유래 단백질들 및/또는 효소들의 전신적 투여가 관여한다. 승인된 요법들은 전형적으로 정맥내 투여되고 근간이 되는 효소 결핍의 신체적 증상들을 치료하는 데 일반적으로 효과적이다. 중추신경계 (CNS)의 세포들 및 조직들 내에 정맥내 투여된 단백질 및/또는 효소의 제한된 분배의 결과로서, CNS 병인학 (CNS etiology)을 가지는 질환들의 치료는 정맥내 투여된 단백질들 및/또는 효소들이 혈액-뇌 장벽 (blood-brain barrier, BBB)을 적당하게 통과하지 못하기 때문에

특히 문제가 되어왔다.

[0005] 혈액-뇌 장벽 (BBB)은 박테리아, 거대분자들 (예로, 단백질들) 및 기타 친수성 분자들과 같은 혈류에서 해로운 물질들로부터 중추신경계 (CNS)를 보호하도록 BBB를 거쳐서 근간이 되는 뇌척수액 (CSF) 및 CNS 내로 이러한 물질들의 확산을 제한하는 기능을 하는 내피세포들을 포함하는 구조적 체계이다.

[0006] 조직 분포를 변경하는 직접적인 두개내 (intra-cranial) 주사, BBB의 일시적 투과화 (transient permeabilization), 및 활성을 가진 제제의 변형을 포함하는, 치료제의 뇌 전달을 증진하도록 BBB를 기만하는 여러 가지의 방식들이 존재한다. 뇌 조직 내로 치료제의 직접 주사는 혈관 구조 (vasculature)를 완전하게 우회하지만, 두개내 주사들 및 투여 부위로부터 적게 확산되는 활성을 가진 제제로 인해 발생되는 합병증들 (감염, 조직 손상, 면역 반응)의 위험을 주로 겪는다. 지금까지, 뇌 물질 내로 단백질들의 직접 투여는 확산 장벽들 및 투여가능한 치료제의 제한된 부피로 인해 유의한 치료 효과를 달성하지 못하였다. 전도-조력 (convection-assisted) 확산은 저속의 장기간 주입 (long-term infusions)을 사용하는 뇌 실질 (parenchyma)에 설치된 카테터들에 의해 연구되어 왔지만 (Bobo, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 91, 2076-2080 (1994); Nguyen, et al. J. Neurosurg. 98, 584-590 (2003)), 현재 승인된 요법들은 본 장기 요법의 접근법을 전혀 사용하지 않고 있다. 또한, 뇌내 카테터들의 설치는 매우 침습적이고 임상적 대안으로서 별로 바람직하지 않다.

[0007] 경막내 (IT) 주사, 또는 뇌척수액 (CSF)으로 단백질들의 투여도 역시 시도되어 왔지만, 치료적 성공은 아직 달성하지 못하였다. 본 치료의 대부분의 도전은 연속적인 확산을 방해하는 뇌실의 뇌실막 내층 (ependymal lining)과 매우 강하게 결합하는 활성을 가진 제제의 경향이 되어왔다. 현재로는, CSF로의 직접 투여에 의해 뇌의 유전적 질환을 치료하는 승인된 제품들이 전혀 없다.

[0008] 사실상, 많은 사람들이 뇌의 표면에서는 확산에 대한 장벽, 뿐만 아니라 효과적이고 편리한 전달 방법들의 부족이 너무 큰 장애물이 되어 뇌 질환이라면 모두에서 적당한 치료적 효과를 달성할 수 없는 것으로 여겨왔다.

[0009] 많은 리소좀 축적 장애들이 신경계에 영향을 주고 따라서 전통적인 요법들로 이들 질환들을 치료하는 데 독특한 문제점을 보여준다. 침범된 환자들의 뉴런들 및 뇌척수막에서 글리코아미노글리칸들 (glycosaminoglycans, GAGs)의 많은 생성이 종종 존재하고 다양한 형태들의 CNS 증상들의 유발시킨다. 지금까지, 리소좀 장애로부터 초래되는 CNS 증상들은 입수가능한 수단이라면 모두에 의해서 성공적으로 치료되지 못하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 따라서, 뇌에 치료제들을 효과적으로 전달해야 하는 강한 필요성이 있다. 보다 상세하게는, 리소좀 축적 장애들을 치료하기 위해 중추신경계로 활성을 가진 제제들의 더욱 효과적인 전달의 강한 필요성이 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 중추신경계 (CNS)로 치료제들의 직접적인 전달을 위한 효과적이고 덜 침습적인 접근법을 제공한다. 본 발명은 부분적으로 리소좀 축적병 (lysosomal storage disease) (예로, MLD)의 대체 효소 (예로, 아릴설파타제 A (ASA))가 치료의 필요가 있는 개체의 뇌척수액 (cerebrospinal fluid, CSF) 내로 높은 농도 (예로, 약 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml 이상)로 직접 도입될 수 있어 효소가 다양한 표면들을 거쳐서 효과적으로 또한 광범위하게 확산되고 깊은 뇌의 부위들을 포함하는 뇌를 거쳐서 다양한 부위들을 침투하는 점의 예기치 않은 발견을 기초하고 있다. 보다 놀랍게도, 본 발명자들은 이러한 높은 단백질 농도 전달이 단순한 식염수 또는 완충용액-기초 제형물을 사용하고 개체에서 심각한 면역 반응과 같은 실질적인 역효과들을 유발하지 않고도 시행될 수 있는 점을 기술하였다. 따라서, 본 발명은 CNS 성분들을 가지는 다양한 질환들 및 장애들, 상세하게는 리소좀 축적병의 치료를 위한 직접적인 CNS 전달의 매우 효율적이고, 임상적으로 바람직하며 환자-친근한 접근법을 제공한다. 본 발명은 CNS 표적 (CNS targeting) 및 효소 대체 요법 (enzyme replacement therapy)의 분야에서 중대한 진보를 보여주고 있다.

[0012] 하기 자세하게 기술되는 바와 같이, 본 발명자들은 아릴설파타제 A (ASA) 단백질의 효과적인 경막내 (IT) 투여를 위한 안정한 제형물들을 성공적으로 개발하였다. 그러나, 본 명세서에서 기술된 다양한 안정한 제형물들은 일반적으로 다양한 다른 리소좀 효소들을 포함하는 치료제들의 CNS 전달에 적합한 점이 고려된다. 따라서, 본 발명에 따른 안정한 제형물들은, 이에 제한되는 것은 아니지만 실질내, 뇌내, 대뇌 측실내 (ICV), 경막내 (예로, IT-요추, IT-대수공) 투여들을 포함하는 다양한 기법들 및 경로들 또한 CNS 및/또는 CSF로 직접 또는 간

접적 주사를 위한 기타 다른 기법들 및 경로들을 통한 CNS 전달에 사용될 수 있다.

[0013] 또한 본 명세서에서 기술된 다양한 안정한 제형물들은 일반적으로 리소좀 축적병들에 대한 다양한 대체 효소들을 포함하는 치료적 단백질들과 같은 기타 치료제들의 CNS 전달에 적합한 점이 고려된다. 일정 구현예들에서, 대체 효소는 합성, 재조합, 유전자-활성화 또는 천연 효소일 수 있다.

[0014] 다양한 구현예들에서, 본 발명은 아릴설파타제 A (ASA) 단백질, 염 (salt), 및 폴리솔베이트 표면활성제 (polysorbate surfactant)를 포함하는 직접 CNS 경막내 투여를 위한 안정한 제형물을 제공한다. 일정 구현예들에서, ASA 단백질은 대략 1-300 mg/ml (예로, 1-250 mg/ml, 1-200 mg/ml, 1-150 mg/ml, 1-100 mg/ml, 1-50 mg/ml)로부터 나온 범위의 농도로 존재한다. 일정 구현예들에서, ASA 단백질은 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/ml, 45 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml, 또는 300 mg/ml으로부터 선택되는 농도까지 존재한다.

[0015] 다양한 구현예들에서, 본 발명은 ASA 단백질이 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, 본 명세서에서 기술된 구현예들이라면 모두의 안정한 제형물을 포함한다. 일정 구현예들에서, ASA 단백질은 서열번호 1과 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 98% 일치하는 아미노산 서열을 포함한다. 일정 구현예들에서, 본 명세서에서 기술된 구현예들이라면 모두의 안정한 제형물은 염을 포함한다. 일정 구현예들에서, 염은 NaCl이다. 일정 구현예들에서, NaCl는 대략 0-300 mM (예로, 0-250 mM, 0-200 mM, 0-150 mM, 0-100 mM, 0-75 mM, 0-50 mM, 또는 0-30 mM)로부터 나온 범위의 농도로 존재한다. 일정 구현예들에서, NaCl은 대략 137-154 mM 범위의 농도로 존재한다. 일정 구현예들에서, NaCl는 대략 154 mM의 농도로 존재한다.

[0016] 다양한 구현예들에서, 본 발명은 폴리솔베이트 표면활성제가 폴리솔베이트 20, 폴리솔베이트 40, 폴리솔베이트 60, 폴리솔베이트 80 및 그들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 본 명세서에서 기술된 구현예들이라면 모두의 안정한 제형물을 포함한다. 일정 구현예들에서, 폴리솔베이트 표면활성제는 폴리솔베이트 20이다. 일정 구현예들에서, 폴리솔베이트 20은 대략 0-0.02% 범위의 농도로 존재한다. 일정 구현예들에서, 폴리솔베이트 20은 대략 0.005%의 농도로 존재한다.

[0017] 다양한 구현예들에서, 본 발명은 상기에 더하여 제형물이 완충제를 포함하는, 본 명세서에서 기술된 구현예들이라면 모두의 안정한 제형물을 포함한다. 일정 구현예들에서, 완충제는 포스페이트 (phosphate), 아세테이트 (acetate), 히스티딘 (histidine), 숙시네이트 (succinate), 트리스 (Tris), 및 그들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일정 구현예들에서, 완충제는 포스페이트이다. 일정 구현예들에서, 포스페이트는 많아야 50 mM (예로, 많아야 45 mM, 40 mM, 35 mM, 30 mM, 25 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 또는 5 mM)의 농도로 존재한다. 일정 구현예들에서, 포스페이트는 많아야 20 mM의 농도로 존재한다. 다양한 관점에서, 본 발명은 제형물이 대략 pH 3-8 (예로, 대략 4-7.5, 5-8, 5-7.5, 5-6.5, 5-7.0, 5.5-8.0, 5.5-7.7, 5.5-6.5, 6-7.5, 또는 6-7.0)를 가지는, 본 명세서에서 기술된 구현예들이라면 모두의 안정한 제형물을 포함한다. 일정 구현예들에서, 제형물은 대략 pH 5.5-6.5 (e.g., 5.5, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 또는 6.5)를 가진다. 일정 구현예들에서, 제형물은 대략 pH 6.0을 가진다.

[0018] 다양한 구현예들에서, 본 발명은 제형물이 액상 제형물인, 본 명세서에서 기술된 구현예들이라면 모두의 안정한 제형물들을 포함한다. 다양한 구현예들에서, 본 발명은 제형물이 동결건조된 건조 파우더인, 본 명세서에서 기술된 구현예들이라면 모두의 안정한 제형물들을 포함한다.

[0019] 일정 구현예들에서, 본 발명은 대략 1-300 mg/mL로부터 나온 범위의 농도로 아릴설파타제 A (ASA) 단백질, 대략 154 mM의 농도로 NaCl, 대략 0.005%의 농도로 폴리솔베이트 20, 및 대략 6.0의 pH를 포함하는 경막내 투여를 위한 안정한 제형물을 포함한다. 일정 구현예들에서, ASA 단백질은 대략 10 mg/ml의 농도이다. 일정 구현예들에서, ASA 단백질은 대략 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml, 또는 300 mg/ml의 농도이다.

[0020] 다양한 관점들에서, 본 발명은 본 명세서에서 기술된 다양한 구현예들에서의 안정한 제형물의 단일 용량 형태를 포함하는 용기 (container)를 포함한다. 일정 구현예들에서, 용기는 앰풀 (ampule), 바이알 (vial), 병 (bottle), 카트리지 (cartridge), 저장조 (reservoir), 동결건조-용기 (lyo-ject), 또는 미리-충전된 주사기 (pre-filled syringe)로부터 선택된다. 일정 구현예들에서, 용기는 미리-충전된 주사기이다. 일정 구현예들에서, 미리-충전된 주사기는 구운 실리콘 코팅을 가진 보로실리케이트 유리 (borosilicate glass) 주사기들, 분사된 실리콘을 가진 보로실리케이트 유리 주사기들, 또는 실리콘이 없는 플라스틱 레진 주사기들로부터

선택된다. 일정 구현예들에서, 안정한 제형물은 약 50 mL (예로, 45 ml, 40 ml, 35 ml, 30 ml, 25 ml, 20 ml, 15 ml, 10 ml, 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2.5 ml, 2.0 ml, 1.5 ml, 1.0 ml, 또는 0.5 ml) 이하의 부피로 존재한다. 일정 구현예들에서, 안정한 제형물은 약3.0 mL 이하의 부피로 존재한다.

[0021] 다양한 관점들에서, 본 발명은 본 명세서에서 기술된 구현예들이라면 모두에 따른 제형물 치료의 필요가 있는 개체에게 경막내 투여하는 단계를 포함하는 이염색성 백색질장애 (Metachromatic Leukodystrophy) 질환을 치료하는 방법을 포함한다.

[0022] 일정 구현예들에서, 본 발명은 대략 1-300 mg/mL로부터 나온 범위의 농도로 아릴설파타제 A (ASA) 단백질, 대략 145 mM의 농도로 NaCl, 대략 0.005%의 농도로 폴리솔베이트 20, 및 대략 6.0의 pH를 포함하는 제형물 치료의 필요가 있는 개체에게 경막내 투여하는 단계를 포함하는 이염색성 백색질 장애를 치료하는 방법을 포함한다.

[0023] 일정 구현예들에서, 경막내 투여는 개체에게 실질적인 역효과들 (예로, 심각한 면역반응)을 전혀 유발하지 않는다. 일정 구현예들에서, 경막내 투여는 개체에게 실질적인 적응적 T-세포-매개성 면역반응을 전혀 유발하지 않는다.

[0024] 일정 구현예들에서, 제형물의 경막내 투여는 뇌, 척수, 및/또는 말초 기관들에서 다양한 표적 조직들에게로 아릴설파타제 A 단백질의 전달을 유도한다. 일정 구현예들에서, 제형물의 경막내 투여는 표적 뇌 조직들에게로 아릴설파타제 A 단백질의 전달을 유도한다. 일정 구현예들에서, 뇌 표적 조직들은 백색질 및/또는 회색질에서의 뉴런들을 포함한다. 일정 구현예들에서, 아릴설파타제 A 단백질은 뉴런들 (neurons), 교아세포들 (glial cells), 혈관주위 세포들 (perivascular cells) 및/또는 뇌척수막 세포들 (meningeal cells)로 전달된다. 일정 구현예들에서, 아랄설파타제 A 단백질은 좀 더 나아가 척수에 있는 뉴런들로 전달된다.

[0025] 일정 구현예들에서, 제형물의 경막내 투여는 말초 표적 조직들로 ASA 단백질의 전신적 전달을 유도한다. 일정 구현예들에서, 말초 표적 조직들은 간, 신장, 비장 및/또는 심장으로부터 선택된다.

[0026] 일정 구현예들에서, 제형물의 경막내 투여는 뇌 표적 조직들, 척수 뉴런들 및/또는 말초 표적 조직들에서 리소좀 정착 (lysosomal localization)을 유도한다. 일정 구현예들에서, 제형물의 경막내 투여는 뇌 표적 조직들, 척수 뉴런들 및/또는 말초 표적 조직들에서 설파타이드 축적의 감소를 유도한다. 일정의 구현예들에서, 설파타이드 축적은 대조군 (예로, 개체에서 치료전 GAG 축적)과 대비하여 적어도 10%, 20%, 30% 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1배, 1.5배, 또는 2배로 감소된다. 일정 구현예들에서, 제형물의 경막내 투여는 뉴런들에서 감소된 공포화 (vacuolization) 를 유도한다 (예로, 대조군과 대비하여 20%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90%, 1배, 1.5배, 또는 2배). 일정 구현예들에서, 뉴런들은 퍼킨지 세포들을 포함한다.

[0027] 일정 구현예들에서, 제형물의 경막내 투여는 뇌 표적 조직들, 척수 뉴런들 및/또는 말초 표적 조직들에서 증가된 ASA 효소 활성을 유도한다. 일정의 구현예들에서, ASA 효소 활성은 대조군 (예로, 개체에서 치료전 내재적 효소 활성)과 대비하여 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배로 증가된다. 일정의 구현예들에서, 증가된 ASA 효소 활성은 적어도 대략 10 nmol/hr/mg, 20 nmol/hr/mg, 40 nmol/hr/mg, 50 nmol/hr/mg, 60 nmol/hr/mg, 70 nmol/hr/mg, 80 nmol/hr/mg, 90 nmol/hr/mg, 100 nmol/hr/mg, 150 nmol/hr/mg, 200 nmol/hr/mg, 250 nmol/hr/mg, 300 nmol/hr/mg, 350 nmol/hr/mg, 400 nmol/hr/mg, 450 nmol/hr/mg, 500 nmol/hr/mg, 550 nmol/hr/mg 또는 600 nmol/hr/mg이다.

[0028] 일정 구현예들에서, ASA 효소 활성은 요추 부위 (lumbar region)에서 증가된다. 일정의 구현예들에서, 요추 부위에서 증가된 ASA 효소 활성은 적어도 대략 2000 nmol/hr/mg, 3000 nmol/hr/mg, 4000 nmol/hr/mg, 5000 nmol/hr/mg, 6000 nmol/hr/mg, 7000 nmol/hr/mg, 8000 nmol/hr/mg, 9000 nmol/hr/mg, 또는 10,000 nmol/hr/mg 이다.

[0029] 일정 구현예들에서, 제형물의 경막내 투여는 MLD의 적어도 하나의 증상 또는 특징의 감소된 강도, 중증도, 또는 빈도 또는 지연된 발병을 유도한다. 일정 구현예들에서, MLD의 적어도 하나의 증상 또는 특징은 인지 손상, 백색질 병변들, 뇌 실질, 신경절, 뇌들보 및/또는 뇌줄기에서의 확장된 혈관주위 공간들, 위축, 및/또는 뇌실비대증이다.

[0030] 일정 구현예들에서, 경막내 투여는 2주마다 한 번 시행된다. 일정 구현예들에서, 경막내 투여는 매월 한 번 시행된다. 일정 구현예들에서, 경막내 투여는 2개월마다 한 번 시행된다. 일정 구현예들에서, 경막내 투여는 정맥내 투여와 조합하여 시행된다. 일정 구현예들에서, 정맥내 투여는 많아야 매주 한 번인 빈도이다. 일정 구현예들에서, 정맥내 투여는 많아야 2주마다 한 번인 빈도이다. 일정 구현예들에서, 정맥내 투여는 많아야 매월 한 번인 빈도이다. 일정 구현예들에서, 정맥내 투여는 많아야 2개월마다 한 번인 빈도이다. 소정의 구현예들에서,

정맥내 투여는 주당 두 번, 매주, 격주, 또는 매월 두 번과 같은 많아야 월간 투여의 빈도이다.

[0031] 일정 구현예들에서, 정맥내 및 경막내 투여는 동일한 날짜에 수행된다. 일정 구현예들에서, 정맥내 및 경막내 투여들은 적어도 2일 이내, 적어도 3일 이내, 적어도 4일 이내, 적어도 5일 이내, 적어도 6일 이내, 적어도 7일 이내, 또는 적어도 한 주 이내와 같이 서로의 소정의 시간 간격 이내에서 수행되지 않는다. 일정 구현예들에서, 정맥내 및 경막내 투여들은 매주 교대하는 투여들, 2주마다 교대로, 매월 두 번, 또는 매월과 같이 교대하는 스케쥴로 수행된다. 일정의 구현예들에서, 경막내 투여는 매주, 격주, 매월 두 번, 또는 매월, 정맥내 투여의 스케쥴과 같은 투여 스케쥴에서의 정맥내 투여를 대체하고, 본 스케쥴에서 세 번째, 네 번째 또는 다섯 번째 투여는 정맥내 투여를 대신하여 경막내 투여로 대체될 수 있다.

[0032] 일정 구현예들에서, 정맥내 및 경막내 투여들은 먼저 정맥내 투여들을 수행하고 (예로, 2주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 또는 1년 이상 동안 매주, 격주, 매월 두 번, 또는 매월의 용량 투여) IT 투여들로 이어지는 (예로, 2주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 또는 1년 이상 동안 매주, 격주, 매월 두 번, 또는 매월의 용량 투여) 것과 같이 순서적으로 수행된다. 일정 구현예들에서, 먼저 경막내 투여들을 수행하고 (예로, 2주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 또는 1년 이상 동안 매주, 격주, 매월 두 번, 또는 매월의 용량 투여) 정맥내 투여들로 이어진다 (예로, 2주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 또는 1년 이상 동안 매주, 격주, 매월 두 번, 또는 매월의 용량 투여).

[0033] 일정 구현예들에서, 경막내 투여는 정맥내 투여의 부재 시 사용된다.

[0034] 일정 구현예들에서, 경막내 투여는 동시적인 면역억제 요법의 부재 시 사용된다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도면들은 제한하려는 것이 아니라, 단지 도시 (illustration)의 목적들을 위한 것이다.

도 2는 IT-요추 투여 이후 혈청에서 대표적인 rhASA 농도 데이터를 나타낸 것이다.

도 3은 IV 투여 이후 CSF에서 대표적인 rhASA 농도를 나타낸 것이다.

도 4는 IT-요추 투여 이후 CSF에서 대표적인 rhASA 농도를 나타낸 것이다.

도 5는 rhASA의 열적 안정도에 미치는 완충액 및 pH 효과의 대표적인 분석을 나타낸 것이다.

도 6은 40 ± 2℃로 두 주 이후에 rhASA의 대표적인 SDS-PAGE (쿠마시) 분석을 나타낸 것이다.

도 7은 5 및 25℃로 3개월 이후에 IT 제형물들에서 rhASA의 대표적인 SDS-PAGE (쿠마시) 분석을 나타낸 것이다.

도 8은 교반 (패널 A) 및 진탕 (패널 B) 48시간 이후에 대표적인 rhASA 약물 물질 및 약물 제품의 외양 관찰을 나타낸 것이다.

도 9는 48시간 동안 교반한 이후에 상부공간이 있거나 (n=2) 없는 (n=1) 대표적인 rhASA약물 제품의 외양 관찰 (w/o P20)을 나타낸 것이다.

도 10은 염산으로 적정될 때 완충액 대조군과 대비하여 rhASA 약물 물질의 완충 능력을 보여주는 대표적인 데이터를 나타낸 것이다.

도 11은 수산화나트륨으로 적정될 때 완충액 대조군과 대비하여 rhASA 약물 물질의 완충 능력을 보여주는 대표적인 데이터를 나타낸 것이다.

도 12는 식염수 pH 6.0에서 농도가 다양한 대표적인 rhASA 시료들을 나타낸 것이다.

도 13은 154 mM NaCl, pH 5.9에서 rhASA (pH 5.5 이동상)의 대표적인 SEC-HPLC 분석을 나타낸 것이다.

도 14는 154 mM NaCl, pH 5.9에서 rhASA (pH 7.0 이동상)의 대표적인 SEC-HPLC 분석을 나타낸 것이다.

도 15는 154 mM NaCl, pH 5에서 rhASA의 기저선 및 11개월 안정도 시료들의 대표적인 크기 배제 프로파일들을 나타낸 것이다.

도 16은 치료 이후에 뇌 조직, 뇌척수막, 침윤물 (중간 및 고용량 그룹들, 둘 다의 성별)의 대표적인 현미경 사진들을 나타낸 것이다.

도 17은 치료 이후에 뇌 조직, 뇌척수막, 침윤물 (중간 및 고용량 그룹들, 둘 다의 성별)의 대표적인 현미경 사

진들을 나타낸 것이다.

도 18은 치료 이후에 뇌 조직, 뇌척수막, 침윤물 (중간 용량 수컷들; 고용량 암컷들)의 대표적인 현미경 사진들을 나타낸 것이다.

도 19는 rhASA으로 치료된 면역내성 MLD 마우스 척수의 대표적인 알시안 블루 염색. 또한 1, 8, 15 및 22일에 520 mg/kg 뇌 무게 용량들로 재조합 rhASA의 경막내 주사들 또는 운반체 대조군을 수여받았던 동물들에서 경부 척수의 알시안 블루 염색에 의해 결정되는 설파타이드 감소를 도시하는 대표적인 결과들을 나타낸 것이다. 도시된 바와 같이, 경막내 주사된 재조합 rhASA로의 치료는 척수의 경부를 포함하는 척수에서 설파타이드 축적의 감소를 유도하였다.

도 20은 전체 척수 (T-Spinal Cord), 전체 회색질 (T-GM), 요추 회색질 (L-GM), 경추 회색질 (C-GM), 전체 백색질 (T-WM), 요추 백색질 (L-WM), 및 경추 백색질 (C-WM)에서 알시안 블루의 광학 밀도를 도시하는 대표적인 결과들을 포함하는, rhASA로 치료된 면역내성 MLD 마우스로부터 얻은 알시안 블루 염색된 척수 단면들의 대표적인 형태측정 분석을 나타낸 것이다. 도시된 바와 같이, rhASA 로 치료된 동물들에서는 운반체 대조군과 대비하여 알시안 블루 염색에서 통계적으로 유의한 감소가 관찰되었다.

도 21은 rhASA로 치료된 면역내성 MLD 마우스의 백색질 (해마술)에서 대표적인 LAMP 염색의 감소를 나타내고, 면연조직화학에 의해 결정되는 해마술에서의 LAMP-1 수준들을 도시하는 대표적인 결과들을 나타낸 것이다. 확대 = 20배. 도시된 바와 같이, 경막내 주사된 rhASA로의 치료는 대뇌 백색질에서 LAMP-1의 감소를 유도하였다.

도 22는 rhASA로 치료된 면역내성 MLD 마우스로부터 얻은 뇌의 LAMP 염색의 대표적인 형태측정 분석, 또한 20 mg/kg 정맥내 rhASA, 300 mg/kg 뇌 무게 경막내 rhASA, 520 mg/kg 뇌 무게 경막내 rhASA 또는 운반체 대조군으로 치료된 동물들의 뇌들보 (CC), 해마술 (F), 소뇌 백색질 (CB-WM) 및 뇌줄기 (BS)에서 LAMP-1 염색 강도를 도시하는 대표적인 결과들을 나타낸 것이다.

도 23은 6개월 동안 EOW IT 투여에 이어서 운반체-투여된 어린 사이노몰 원숭이들의 뇌 천자물들-주요 부검에서 대표적인 rhASA 농도를 나타낸 것이다.

도 24는 6개월 동안 1.8 mg/용량으로 rhASA의 EOW IT 투여에 이어서 어린 사이노몰 원숭이들의 뇌 천자물들-주요 부검에서 대표적인 rhASA 농도를 나타낸 것이다.

도 25는 6개월 동안 6.0 mg/용량으로 rhASA의 EOW IT 투여에 이어서 어린 사이노몰 원숭이들의 뇌 천자물들-주요 부검에서 대표적인 rhASA 농도를 나타낸 것이다.

도 26은 6개월 동안 18.6 mg/용량으로 rhASA의 EOW IT 투여에 이어서 어린 사이노몰 원숭이들의 뇌 천자물들-주요 부검에서 대표적인 rhASA 농도를 나타낸 것이다.

도 27은 6개월 동안 EOW IT 투여 (PBS-대조군)에 이어서 어린 사이노몰 원숭이들의 뇌 천자물들-회복 부검에서 대표적인 ASA 농도를 나타낸 것이다.

도 28은 6개월 동안 운반체의 EOW IT 투여에 이어서 어린 사이노몰 원숭이들의 뇌 천자물들-회복 부검에서 대표적인 rhASA 농도를 나타낸 것이다.

도 29는 6개월 동안 1.8 mg/용량으로 rhASA의 EOW IT 투여에 이어서 어린 사이노몰 원숭이들의 뇌 -회복 부검에서 대표적인 rhASA 농도를 나타낸 것이다.

도 30은 6개월 동안 6.0 mg/용량으로 rhASA의 EOW IT 투여에 이어서 어린 사이노몰 원숭이들의 뇌 천자물들에서 -회복 부검에서 대표적인 rhASA 농도를 나타낸 것이다.

도 31은 6개월 동안 18.6 mg/용량으로 rhASA의 EOW IT 투여에 이어서 어린 사이노몰 원숭이들의 뇌 천자물들-회복 부검에서 대표적인 rhASA 농도를 나타낸 것이다.

도 32는 장치 대조군, 운반체, 1.8 mg, 6.0 mg 및 18.6 mg 처리된 동물들의 경우 뇌의 표면으로부터 얻은 선택된 천자물들에서 대표적인 rhASA 농도를 나타낸 것이다. (수컷 및 암컷 분리, 장치 대조군 데이타는 회복 부검으로부터, 다른 모든 데이타는 주요 부검으로부터 나온다)

도 33은 장치 대조군, 운반체, 1.8 mg, 6.0 mg 및 18.6 mg 처리된 동물들의 경우 뇌의 깊은 백색 영역으로부터 얻은 선택된 천자물들에서 대표적인 rhASA 농도를 나타낸 것이다. (수컷 및 암컷 분리, 장치 대조군 데이타는 회복 부검으로부터, 다른 모든 데이타는 주요 부검으로부터 나온다)

도 34는 장치 대조군, 운반체, 1.8 mg, 6.0 mg 및 18.6 mg 처리된 동물들의 경우 뇌의 깊은 회색 영역으로부터 얻은 선택된 대표적인 rhASA 농도를 나타낸 것이다. (수컷 및 암컷 분리, 장치 대조군 데이타는 회복 부검으로부터, 다른 모든 데이타는 주요 부검으로부터 나온다)

도 35는 장치 대조군, 운반체, 1.8 mg, 6.0 mg 및 18.6 mg 처리된 동물들의 경우 다양한 부위들로부터 얻은 선택된 대표적인 rhASA 농도를 나타낸 것이다. (수컷 및 암컷 분리, 장치 대조군 데이타는 회복 부검으로부터, 다른 모든 데이타는 주요 부검으로부터 나온다)

도 36은 6개월 동안 EOW IT 투여에 이어서 어린 사이노몰 원숭이들의 척수 단면들-회복 부검에서 대표적인 rhASA 농도를 나타낸 것이다.

도 37은 6개월 동안 EOW IT 투여에 이어서 어린 사이노몰 원숭이들의 간-회복 부검에서 대표적인 rhASA 농도를 나타낸 것이다.

도 38은 소정의 뇌 천자물들의 대표적인 해부적 위치들을 나타낸 것이다.

도 39는 소정의 뇌 천자물들의 대표적인 해부적 위치들을 나타낸 것이다.

도 40은 소정의 뇌 천자물들의 대표적인 해부적 위치들을 나타낸 것이다.

도 41은 소정의 뇌 천자물들의 대표적인 해부적 위치들을 나타낸 것이다.

도 42는 소정의 뇌 천자물들의 대표적인 해부적 위치들을 나타낸 것이다.

도 43은 소정의 뇌 천자물들의 대표적인 해부적 위치들을 나타낸 것이다.

도 44A-G는 운반체, 1.8mg rhASA 또는18.6mg rhASA가 투여된 어른 및 어린 사이노몰 원숭이들의 뇌 조직들로부터 얻은 추출된 조직 천자물들에서 재조합 인간 아릴설파타제 A (rhASA)의 농도를 나타낸 것이다. 도 44A-G 각각은 도 39에서 도시된 뇌 조직의 부위에 해당한다.

도 45A 및 B는 rhASA가 경막내 (IT) 또는 뇌실내 (ICV) 투여된 어른 및 어린 사이노몰 원숭이들의 깊은 백색질 (도 45A) 또는 깊은 회색질 (도 45B) 뇌 조직들에서 검출되는 재조합 인간 아릴설파타제 A (rhASA)의 대표적인 농도 비교를 나타낸 것이다..

도 46A는 재조합 인간 아릴설파타제 A (rhASA)의 18.6 또는 1.8mg 용량이 IT 투여된 어린 사이노몰 원숭이들 (< 12개월령)로부터 얻은 여러 가지 조직 천자물들에서 검출되는 대표적인 rhASA 농도를 나타낸 것이다. 도 40A-B 둘 다에서 도시된 바와 같이, 조직들로 전달된 rhASA 농도는 2.5mg/mg 단백질의 목표 치료 농도 이내 또는 다른 경우라면 이를 초과하였다. 도46A 및 도 46B에 도시된 천자물 번호들 각각에 해당하는 뇌 조직의 해부적 부위들은 피질하 백색질 (1); 뇌실주위 백식질 및 깊은 백색질 (2); 피질하 백색질 (3); 피질하 백색질 (4); internal 속섬유막 (5); 속섬유막 미상엽핵 (6); 깊은 백색질 (7); 피질하 백색질 및 피질 (8); 조가비핵 (9); 일시적 피질하 백색질 및 피질 (10), 깊은 회색질 (11), 깊은 회색질 (12), 전방 뇌실주위 및 피질하 (13); 피질하 백색질, 피질 겸주위 표피 (superficial perifalxian) (14); 뇌들보 및 뇌들보주위 피질하 백색질 (15); 깊은 피질하 백색질 (16); 깊은 회색질 (17); 깊은 회색질 (18); 뇌실주위 백색질 (19); 깊은 피질하 백색질 (20); 해마 (21); 뇌들보 (22); 깊은 백색질 (23); 피질하 백색질, 후두엽(24); 및 소뇌 백색질 (25): 이었다.

도 47A는 1.8mg의 rhASA가 IT 투여된 사이노몰 원숭이로부터 추출된 깊은 백색질 조직의 영역을 나타낸 것이다. 도 47B는 깊은 백색질 조직의 면역염색 및 적절한 세포들에서 관찰된 rhASA의 분포를 도시한다. 도 47C는 IT-투여된 rhASA가 사이노몰 원숭이의 깊은 백색질 조직들, 상세하게는 리소좀들에서 소기관 공동-정착을 보여주었던 점을 도시한다. 도 47C에서, ASA 면역염색은 왼쪽 위 박스에 도시된다.

도 48은 표지된 rhASA의 IT- 또는 ICV-투여에 이어서 24시간에 PET 스캐닝을 사용하여 ^{124}I-표지된 아릴설파타제 A (rhASA)의 분포를 비교하여 나타낸 것이다.

도 49는 사이노몰 원숭이에게 ICV 투여에 이어서 즉시 ^{124}I-표지된 ASA 의 분포를 나타내고, 2-5시간 이내의IT-투여된 ^{124}I-표지된 ASA의 분포를 비교한 것이다. 도시된 바와 같이, IT 투여는 ICV 투여의 경우 나타난 바와 동일한 초기 구획들 (뇌실 및 근위 척수)로 ^{124}I-표지된 ASA를 전달하였다.

도 49는 마우스 모델에서 대표적인 ICV 및 IT 투여를 나타낸 것이다.

도 51은 대표적인 경막내 약물 전달 장치 (IDDD)를 나타낸 것이다.

도 52는 대표적인 PORT-A-CATH® 로우 프로파일 경막내 이식가능한 접근 시스템을 나타낸 것이다.

도 53은 대표적인 경막내 약물 전달 장치 (IDDD)를 나타낸 것이다.

도 54는 CNS 효소 대체 요법 (ERT)를 위한 가정용 투여를 허용하는 대표적인 경막내 약물 전달 장치 (IDDD)를 나타낸 것이다.

도 55는 안전 기작을 가지는 대표적인 경막내 약물 전달 장치 (IDDD)를 나타낸 것이다.

도 56은 IDDD가 장착될 수 있는 환자의 신체 안의 대표적인 위치들을 나타내고; 도 56B는 경막내 약물 전달 장치 (IDDD)의 다양한 구성요소들을 나타내고; 또한 도 56C는 IT-요추 주사를 위한 환자의 신체 안의 대표적인 삽입 위치를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] **정의들**

[0037] 본 발명을 더욱 잘 이해하기 위하여, 소정의 용어들이 먼저 하기에 정의된다. 다음의 용어들 및 기타 다른 용어들에 대한 추가적인 정의들이 본 명세서 전체를 통하여 설명된다.

[0038] *대략 (Approximately) 또는 약 (about):* 본 명세서에서 사용되는 바, "대략" 또는 "약"은 관심있는 하나 이상의 수치들에 적용되는 바와 같이 진술된 기준 수치와 유사한 수치를 말한다. 소정의 구현예들에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 달리 진술되지 않거나 달리 내용으로부터 분명하지 않는 둘 중 하나의 경우라면 (이러한 숫자가 가능한 수치의 100%를 초과하는 경우를 제외함) 진술된 기준 수치의 방향 (이상 또는 이하)으로 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 이하 이내에 속하는 수치들의 범위를 말한다.

[0039] *개선 (Amelioration):* 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "개선"은 개체의 상태의 예방 (prevention), 감소 (reduction) 또는 완화 (palliation), 또는 상태의 향상 (improvement)을 의미한다. 개선은 질환 병폐의 완벽한 회복 또는 완벽한 예방을 포함하지만 이들을 요구하지는 않는다. 일정 구현예들에서, 개선은 적절한 질환 조직들에서 결핍되는 적절한 단백질 또는 그의 활성의 증가된 수준들을 포함한다.

[0040] *생물학적으로 활성을 가진 (Biologically active):* 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 (phrase) "생물학적으로 활성을 가진"은 생물학적 체계 (biological system)에서, 상세하게는 생물에서 활성을 가지는 제제라면 모두의 특징을 말한다. 예를 들어, 생물에게 투여될 때 본 생물에 미치는 생물학적 효과를 가지는 제제는 생물학적으로 활성을 가지는 것으로 고려된다. 상세한 구현예들에서, 단백질 또는 폴리펩타이드가 생물학적으로 활성을 가지는 경우, 단백질 또는 폴리펩타이드의 생물학적 활성 적어도 하나를 공유하는 단백질 또는 폴리펩타이드의 부분은 "생물학적으로 활성을 가진" 부분으로서 언급된다.

[0041] *충전제 (Bulking agent):* 본 명세서에서 사용되는 바, "충전제"는 동결건조된 혼합물에 질량을 더하는 화합물을 말하고 동결건조된 케이크 (동결건조ed cake)의 물리적 구조에 기여한다 (예로, 개방 공극 구조를 유지하는 필수적으로 일정한 냉동동결된 케이크의 생산을 용이하게 함). 대표적인 충전제들로는 만니톨 (mannitol), 글리신 (glycine), 염화나트륨 (sodium chloride), 하이드록시에틸 전분 (hydroxyethyl starch), 락토스 (lactose), 슈크로스 (sucrose), 트레할로스 (trehalose), 폴리에틸렌 글리콜 (polyethylene glycol) 및 덱스트란 (dextran)을 포함한다.

[0042] *양이온-비의존성 만노스-6-포스페이트 수용체 (Cation-independent mannose-6-phosphate receptor, CI-MPR):* 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "양이온-비의존성 만노스-6-포스페이트 수용체 (CI-MPR)"는 리소좀에 운반될 골지체 (Golgi apparatus)에 있는 산 가수분해효소 전구체들 상에 만노스-6-포스페이트 (M6P) 태그들 (tags)을 결합시키는 세포성 수용체를 말한다. 만노스-6-포스페이트들에 추가하여, CI-MPR는 IGF-II를 포함하는 기타 다른 단백질도 역시 결합시킨다. CI-MPR는 "M6P/IGF-II 수용체," "CI-MPR/IGF-II 수용체," "IGF-II 수용체" 또는 "IGF2 수용체"라고도 역시 알려져 있다. 본 명세서에서 이들 용어들 및 그들의 약어들은 상호교환적으로 사용된다.

[0043] *동시적인 면역억제 요법 (Concurrent immunosuppressant therapy):* 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "동시적인 면역억제 요법"은 전-치료, 전조정 또는 치료 방법과 평등한 것으로서 사용되는 면역억제 요법이라면 모두를

포함한다.

[0044] *희석제 (Diluent)*: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "희석제"는 재구성된 제형물의 제조에 유용한 약제학적으로 허용가능한 (예로, 인간에게 투여 시 안전하고 비-독성) 희석 물질 (diluting substance)을 말한다. 대표적인 희석제들은 무균수 (sterile water), 주사용 정균수 (bacteriostatic water for injection, BWFI), pH 완충 용액 (예로, 인산염-완충 식염수), 무균 식염수 용액, 링거 용액 또는 덱스트로스 용액을 포함한다.

[0045] *용량 형태 (Dosage form)*: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "용량 형태" 및 "단위 용량 형태 (unit dosage form)"는 치료될 환자를 위한 치료적 단백질의 물리적으로 명확한 단위를 말한다. 각 단위는 원하는 치료적 효과를 생산하도록 계산된 활성 물질의 선결정된 정량 (predetermined quantity)을 포함한다. 그러나, 조성물의 전체 용량은 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 참석한 의사가 결정하는 것으로 이해될 것이다.

[0046] *효소 대체 요법 (효소 replacement therapy, ERT)*: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "효소 대체 요법 (ERT)"은 소실된 효소를 제공하여 효소 결핍을 교정하는 치료적 전략 (therapeutic strategy)이라면 모두를 말한다. 일정 구현예들에서, 소실된 효소는 경막내 투여에 의해 제공된다. 일정 구현예들에서, 소실된 효소는 혈류 내에 주입하여 제공된다. 일단 투여되면, 효소는 세포들에 의해 흡수되고 리소좀으로 운반되고, 여기에서 효소는 효소 결핍으로 인해 리소좀들에 축적되었던 물질을 제거하도록 작용한다. 전형적으로, 효과적인 리소좀 효소 대체 요법 (lysosomal 효소 replacement therapy)의 경우, 치료적 효소가 축적 결함이 나타나는 표적 조직들에서 적절한 세포들에 있는 리소좀들로 운반된다.

[0047] *개선하다 (Improve), 증가하다 (increase) 또는 감소하다 (reduce)*: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어들 "개선하다", "증가하다" 또는 "감소하다" 또는 문법적 동등물들은 본 명세서에서 기술된 치료의 개시 이전에 동일한 개인에서의 측정 또는 본 명세서에서 기술된 치료의 부재 시 대조군 개인 (또는 다수의 대조군 개인들)에서의 측정과 같은 기저선 측정 (baseline measurement)과는 대비되는 수치들을 가르킨다. "대조군 개인 (control individual)"은 치료될 개인과 리소좀 축적병의 동일한 형태로 고생하고, (치료된 개인 및 대조군 개인(들)에서 질환의 단계들이 비교가능한 점을 보장하는) 치료될 개인과 거의 동일한 연령인 개인이다.

[0048] *개인 (Individua), 개체 (subject), 환자 (patien)t*: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어들 "개체", "개인" 또는 "환자"는 인간 또는 비-인간 포유동물 개체를 말한다. 치료된 개인 ("환자" 또는 "개체"라도도 말함)은 질환을 앓는 개인 (태아, 유아, 아동, 청소년, 또는 성인 인간)이다.

[0049] *경막내 투여 (Intrathecal administration)*: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "경막내 투여" 또는 "경막내 주사 (intrathecal injection)"는 척수관 (spinal canal) (척수 주위의 경막내 공간) 내로의 주사를 말한다. 다양한 기법들 (techniques)이, 제한되지 않고 천두공 (burrhole) 또는 대수조 (cisternal) 또는 요추 (lumbar) 천자 (puncture) 등을 통한 측뇌실 주사 (lateral cerebroventricular injection)를 포함하여 사용될 수 있다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 "경막내 투여" 또는 "경막내 전달 (intrathecal delivery)"은 요추 IT 투여 또는 전달과 같은 요추 영역 또는 부위를 통한 IT 투여 또는 전달을 말한다. 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "요추 부위(lumbar region)" 또는 "요추 영역 (lumbar area)"은 세 번째 및 네 번째 요추 (등쪽 하부) 사이의 영역, 보다 더욱 자세하게는 척추 (spine)의 L2-S1 부위를 말한다.

[0050] *링커 (Linker)*: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "링커"는 천연의 단백질에 서, 특정한 위치에서 나타나는 것이 아닌 아미노산 서열을 말하고 일반적으로 단백질 분체들 사이에서 유연하고 알파-나선과 같은 구조를 부여하도록 설계된다.

[0051] *동결보호제 (Lyoprotectant)*: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "동결보호제"는 동결건조 (lyophilization) 및 연속적 보관 시 단백질 또는 기타 다른 물질의 화학적 및/또는 물리적 불안정성을 예방하거나 감소시키는 분자를 말한다. 대표적인 동결보호제들로는 슈크로스 또는 트레할로스와 같은 당류들; 모노소듐 글루타메이트 (monosodium glutamate) 또는 히스티딘과 같은 아미노산; 베타인 (betaine)과 같은 메틸아민; 마그네슘 설페이트와 같은 친액성 (lyotropic) 염; 삼수소 (trihydric) 또는 고차 당 알코올들, 예로 글리세린 (glycerin), 에리트리톨 (erythritol), 글리세롤 (glycerol), 아라비톨 (arabitol), 자일리톨 (xylitol), 소비톨 (sorbitol), 및 만니톨 (mannitol)과 같은 폴리올 (polyol); 프로필렌 글리콜 (propylene glycol); 폴리에틸렌 글리콜 (polyethylene glycol); 플루로닉스 (Pluronics); 및 그들의 조합들을 포함한다. 일정 구현예들에서, 동결보호제는 트레할로스 또는 슈크로스와 같은 비-환원성 당이다.

[0052] *리소좀 효소 (Lysosomal 효소)*: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "리소좀 효소"는 포유동물 리소좀들에서 축적된 물질들을 감소시킬 수 있고 하나 이상의 리소좀 축적병 증상들을 회복시키거나 개선시킬 수 있는 효소라면

모두를 말한다. 본 발명에 적합한 리소좀 효소들은 야생형 또는 변형된 리소좀 효소들을 둘 다 포함하고, 재조합 및 합성 방법들을 사용하여 생산되거나 천연의 출처들로부터 정제될 수 있다. 대표적인 리소좀 효소들은 표 1에 나열되어 있다.

[0053] *리소좀 효소 결핍 (Lysosomal enzyme deficiency)*: 본 명세서에서 사용되는 바, "리소좀 효소 결핍"은 리소좀들에서 거대분자들 (예로, 효소 기질들)을 펩타이드들, 아미노산들, 모노사카라이드들, 핵산들 및 지방산들로 분해하는 데 요구되는 효소들 적어도 하나의 결핍으로부터 유발되는 유전적 장애들의 그룹을 말한다. 그 결과, 리소좀 효소 결핍들을 앓고 있는 개인들은 다양한 조직들 (예로, CNS, 간, 비장, 장, 혈관 벽들 및 기타 다른 기관들)에서 축적된 물질들을 가지고 있다.

[0054] *리소좀 축적병 (lysosomal storage disease)*: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "리소좀 축적병"은 천연의 거대분자들을 대사하는 데 필요한 리소좀 효소들 적어도 하나의 결핍으로부터 유발되는 질환이라면 모두를 말한다. 전형적으로, 이들 질환들은 리소좀들에서 분해되지 않은 분자들의 축적을 유도하여, 축적 과립들 (storage granules) (축적 소포들이라고도 명명함)의 수적 증가를 유도한다. 이들 질환들 및 다양한 예들이 보다 자세하게 하기에 기술된다.

[0055] *폴리펩타이드 (Polypeptide)*: 본 명세서에서 사용되는 바, "폴리펩타이드"는 일반적으로 말하자면 펩타이드 결합에 의해 서로 부착된 적어도 두 개의 아미노산들의 연결 (string)을 말한다. 일정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 적어도 하나의 펩타이드 결합에 의해 다른 것들에 각각 부착된 적어도 3 내지 5개의 아미노산들을 포함할 수 있다. 당업자라면 폴리펩타이드들이 그럼에도 불구하고 임의적으로 폴리펩타이드 사슬 내에 통합될 수 있는 "비-천연의 (non-natural)" 아미노산들 또는 기타 다른 실체들을 때로 포함할 수 있는 점을 인정할 것이다.

[0056] *대체 효소 (Replacement 효소)*: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "대체 효소"는 치료될 질환에서 적어도 부분적으로 결핍되거나 소실된 효소를 대체하도록 작용할 수 있는 효소라면 모두를 말한다. 일정 구현예들에서, 용어 "대체 효소"는 치료될 리소좀 축적병에서 적어도 부분적으로 결핍되거나 소실된 효소를 대체하도록 작용할 수 있는 효소라면 모두를 말한다. 일정 구현예들에서, 대체 효소는 포유동물 리소좀들에서 축적된 물질들을 감소시킬 수 있거나, 하나 이상의 리소좀 축적병 증상들을 회복시키거나 개선시킬 수 있다. 본 발명에 적합한 리소좀 효소들은 야생형 또는 변형된 리소좀 효소들을 둘 다 포함하고, 재조합 및 합성 방법들을 사용하여 생산되거나 천연의 출처들로부터 정제될 수 있다. 대체 효소는 재조합, 합성, 유전자-활성화 또는 천연의 효소일 수 있다.

[0057] *용해성 (Soluble)*: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "용해성)"은 균질한 용액을 형성하는 치료제의 능력을 말한다. 일정 구현예들에서, 치료제가 투여되고 작용의 표적 부위 (예로, 뇌의 세포들 및 조직들) 내로 운반되는 용액에서 치료제의 용해도 (solubility)는 작용의 표적 부위로 치료적 유효량의 치료제의 전달을 허용하는데 충분하다. 여러 가지 요인들이 치료제들의 용해도에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어, 단백질 용해도에 영향을 줄 수 있는 적절한 요인들은 이온 강도, 아미노산 서열 및 기타 다른 공-용해화 (co-solubilizing) 제제들 또는 염들 (예로, 칼슘 염들)의 존재를 포함한다. 일정 구현예들에서, 약제학적 조성물들은 칼슘 염들이 이러한 조성물들로부터 배제되도록 제형화된다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 치료적 제제들은 해당하는 그의 약제학적 조성물에서 용해성이다. 일반적으로 등장액들이 비경구 투여 약물들을 위해 선호되는 한편, 등장액들 (isotonic solutions)의 사용은 일정의 치료제들, 상세하게는 일정의 단백질들 및/또는 효소들에 대한 적당한 용해도를 제한할 수 있는 점이 인정될 것이다. 약간 고장액들 (hypertonic solutions) (예로, 175mM까지의 염화나트륨) 및 당-포함 용액들 (예로, pH 7.0에서 5mM 소듐 포스페이트에 녹인 2%까지의 슈크로스)는 원숭이들에서 잘 내성화되는 (tolerated) 것으로 나타났다. 예를 들어, 가장 공통적인 CNS 볼루스 제형 조성물은 식염수 (물에 녹인 150mM NaCl)이다.

[0058] *안정도 (Stability)*: 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "안정한 (stable)"은 연장된 기간 동안 그의 치료적 효능 (예로, 의도된 생물학적 활성 및/또는 물리화학적 본성의 모두 또는 대다수)을 유지하는 치료제 (예로, 재조합 효소)의 능력을 말한다. 치료제의 안정도, 및 이러한 치료제의 안정도를 유지하는 약제학적 조성물의 능력은 연장된 기간 동안 (예로, 적어도 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 또는 36개월 이상 동안) 평가될 수 있다. 일반적으로, 본 명세서에서 기술된 약제학적 조성물들은 이로 제형화된 하나 이상의 치료제들 (예로, 재조합 단백질들)을 안정화하거나, 임의적으로 그의 분해를 지연시키거나 방지할 수 있도록 제형화되어 왔다. 제형물의 문맥에서, 안정한 제형물은 안에 있는 치료제가 필수적으로 보관 시 및 공정들 (냉동/해동, 기계적인 혼합 및 동결건조와 같음) 동안 그의 물리적 및/또는 화학적 본성 및 생물학적 활성을 보유하는 것이다. 단백질 안정도의 경우, 고분자량 (HMW) 응집체들 (aggregates)의 형성, 효소 활성의 상실, 단백질 단편들의 생성 및 전하 프

로파일들의 이동 (shift)에 의해 측정될 수 있다.

[0059] *개체 (Subject):* 본 명세서에서 사용되는 바, "개체"는 인간을 포함하는 포유동물이라면 모두를 의미한다. 본 발명의 소정의 구현예들에서, 개체는 인간, 청소년 또는 유아이다. 또한 본 발명에 의해 약제학적 조성물들의 투여 및/또는 자궁내 (*in-utero*) 치료 방법의 성적이 참작된다.

[0060] *실질적인 상동성 (Substantial homology)*: 본 발명에서 용어구 "실질적인 상동성"은 아미노산 또는 핵산 서열들 간의 비교를 말하는 것으로 사용된다. 당업자라면 인정할 바와 같이, 일반적으로 두 개의 서열들은 그들의 해당하는 위치들에서 상동한 잔기들을 포함하는 경우 "실질적으로 상동한 (substantially homologous)"인 것으로 고려된다. 상동한 잔기들은 일치하는 잔기들 (identical residues)일 수 있다. 임의적으로, 상동한 잔기들은 대략적으로 유사한 구조적 및/또는 기능적 특징들을 가지는 비-일치하는 잔기일 수 있다. 예를 들어, 당업자라면 잘 숙지하고 있는 바와 같이, 전형적으로 소정의 아미노산들은 "소수성" 또는 "친수성" 아미노산들로서, 및/또는 "극성" 또는 "비극성" 측쇄들을 가지는 것으로서 분류된다. 하나의 아미노산이 동일한 유형의 또 다른 것으로의 치환은 종종 "상동한" 치환이라고 고려될 수 있다.

[0061] 당해 기술 분야에서 알려져 있는 바와 같이, 아미노산 또는 핵산 서열들은 뉴클레오타이드 서열들의 경우 BLASTN, 아미노산 서열들의 경우 BLASTP, 갭 (gapped) BLAST, 및 PSI-BLAST와 같은 시판되는 컴퓨터 프로그램들에서 입수가능한 것들을 포함하는 다양한 알고리즘들이라면 모두를 사용하여 비교될 수 있다. 이러한 대표적인 프로그램들은 Altschul, et al., Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., *Methods in Enzymology*; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., *Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998; and Misener, et al., (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999에 기술되어 있다. 상동한 서열들을 확인하는 것에 추가하여, 상기에 언급된 프로그램들은 전형적으로 상동성의 정도 표시를 제공한다. 일정 구현예들에서, 두 개의 서열들은 잔기들의 적절한 연장길이 (stretch)에 걸쳐서 해당하는 그들의 잔기들의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상이 상동한 경우라면 실질적으로 상동한 것으로 고려된다. 일정 구현예들에서, 적절한 연장길이는 완전한 서열이다. 일정 구현예들에서, 적절한 연장길이는 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 또는500개 이상의 잔기들이다.

[0062] *실질적인 일치도 (Substantial identity)*: 본 명세서에서 용어구 "실질적인 일치도"는 은 아미노산 또는 핵산 서열들 간의 비교를 말하는 것으로 사용된다. 당업자라면 인정할 바와 같이, 일반적으로 두 개의 서열들은 그들의 해당하는 위치들에서 일치하는 잔기들을 포함하는 경우 "실질적으로 일치하는 (substantially identical)" 것으로 고려된다. 당해 기술 분야에서 알려져 있는 바와 같이, 아미노산 또는 핵산 서열들은 뉴클레오타이드 서열들의 경우 BLASTN, 아미노산 서열들의 경우 BLASTP, 갭 (gapped) BLAST, 및 PSI-BLAST와 같은 시판되는 컴퓨터 프로그램들에서 입수가능한 것들을 포함하는 다양한 알고리즘들이라면 모두를 사용하여 비교될 수 있다. 이러한 대표적인 프로그램들은 Altschul, et al., Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., *Methods in Enzymology*; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., *Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998; and Misener, et al., (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999에 기술되어 있다. 일치하는 서열들을 확인하는 것에 추가하여, 상기에 언급된 프로그램들은 전형적으로 일치도의 정도 표시를 제공한다. 일정 구현예들에서, 두 개의 서열들은 잔기들의 적절한 연장길이 (stretch)에 걸쳐서 해당하는 그들의 잔기들의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상이 일치하는 경우라면 실질적으로 일치하는 것으로 고려된다. 일정 구현예들에서, 적절한 연장길이는 완전한 서열이다. 일정 구현예들에서, 적절한 연장길이는 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 또는500개 이상의 잔기들이다.

[0063] *합성 CSF (Synthetic CSF):* 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "합성CSF"는 척수액과 합치되는 pH, 전해질 조성, 포도당 함량 및 삼투도를 가지는 용액을 말한다. 합성 CSF는 인공 CSF (artifical CSF)라고도 역시 말한다. 일정 구현예들에서, 합성 CSF는 엘리어트 B 용액 (Elliott뭘 B solution)이다.

[0064] *CNS 전달에 적합한 (Suitable for CNS delivery):* 본 명세서에서 사용되는 바, 용어구 본 발명의 약제학적 조성물들에 관한 "CNS 전달에 적합한" 또는 "경막내 전달에 적합한 (sui표 for intrathecal delivery)"은 일반적으로 이러한 조성물들의 안정도, 내성 (tolerability), 및 용해도 성질들 뿐만 아니라 이에 포함되는 치료제의 유효량을 전달의 표적 부위 (예로, CSF 또는 뇌)로 전달하는 이러한 조성물들의 능력을 말한다.

[0065] *표적 조직들 (Target tissues):* 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "표적 조직들"은 치료될 리소좀 축적병에 의해 영향을 받는 조직이라면 모두 또는 결핍 리소좀 효소가 정상적으로 발현되는 조직이라면 모두를 말한다. 일정 구현예들에서, 표적 조직들은 리소좀 축적병을 앓거나 이에 취약한 환자들에서 예를 들어 조직의 세포성 리소좀들에 축적된 효소 기질의 검출가능하거나 비정상적으로 많은 양이 존재하는 이들 조직들을 포함한다. 일정 구현예들에서, 표적 조직들은 질환-연관된 병리학, 증상, 또는 특징을 나타내는 이들 조직들을 포함한다. 일정 구현예들에서, 표적 조직들은 결핍 리소좀 효소가 올라간 수준으로 정상적으로 발현되는 이들 조직들을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바, 표적 조직은 뇌 표적 조직, 척수 표적 조직 및/또는 말초 표적 조직일 수 있다. 대표적인 표적 조직들은 하기에 상술되고 있다.

[0066] *치료적 분체 (Therapeutic moiety):* 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "치료적 분체"는 분자의 치료적 효과를 가져오는 분자의 일부를 말한다. 일정 구현예들에서, 치료적 분체는 치료적 활성을 가지는 폴리펩타이드이다.

[0067] *치료적 유효량 (therapeutically effective amount):* 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "치료적 유효량"은 의학적 치료라면 모두에 적용가능한 합리적인 유익/위험 비율로 치료되는 개체에 미치는 치료적 효과를 부여하는 치료적 단백질 (예로, 대체 효소)의 양을 말한다. 치료적 효과는 주관적 (예로, 일정의 테스트 또는 마커에 의해 측정가능) 또는 객관적 (예로, 개체가 효과의 표시를 주거나 느낌)일 수 있다. 상세하게, "치료적 유효량"은 질환과 연관된 증상들을 개선하거나 질환의 발병을 예방하거나 지연시키는 것, 및/또는 질환의 증상들의 중증도 또는 빈도도 역시 감소시키는 것에 의해서와 같이 원하는 질환 또는 병폐를 치료하거나, 개선하거나, 예방하는 데, 또는 검출가능한 치료적 또는 예방적 효과를 나타내는 데 효과적인 치료적 단백질 또는 조성물의 양을 말한다. 치료적 유효량은 공통적으로 다수의 단위 용량들을 포함할 수 있는 용량 요법 (dosing regimen)으로 투여된다. 특정한 치료적 단백질이라면 모두의 경우, 치료적 유효량 (및/또는 효과적인 용량 요법 내의 적절한 단위 용량)은, 예를 들어 투여의 경로 또는 다른 치료제들과의 조합에 의존하여 변화될 수 있다. 또한, 특정한 환자를 위한 치료적 유효량 (및/또는 단위 용량)은 치료되는 장애 및 장애의 중증도; 적용되는 특이적 치료제의 활성; 적용되는 특이적 조성물; 환자의 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별 및 식이요법; 투여 시간, 투여 경로, 및/또는 배출율 또는 적용되는 특이적 융합 단백질의 대사; 치료의 지속기간; 및 의학적 기술분야에서 잘 알려져 있는 요인들 등을 포함하는 다양한 요인들에 의존할 수 있다.

[0068] *내성 (Tolerable):* 본 명세서에서 사용되는 바, 용어들 "내성" 및 "내성도 (tolerability)"는 본 발명의 약제학적 조성물들이 이러한 조성물이 투여된 개체에서 역효과를 발현하지 않도록, 임의적으로 이러한 조성물이 투여된 개체에서 심각한 역효과를 발현하지 않도록 하는 능력을 말한다. 일정 구현예들에서, 본 발명의 약제학적 조성물들은 이러한 조성물들이 투여된 개체에 의해 내성화된다.

[0069] *치료 (Treatment):* 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "치료" (또한 "치료하다 (treat)" 또는 "치료하는 (treating)")은 부분적으로 또는 완벽하게 특정한 질환, 장애, 및/또는 병폐 (예로, 헌터 증후군, 산필리포 B형 증후군)의 하나 이상의 증상들 또는 특징들을 완화시키고, 개선시키고, 안정시키고, 억제하고, 발병을 지연시키고, 중증도를 감소시키고 및/또는 이의 빈도를 감소시키는 치료적 단백질 (예로, 리소좀 효소)의 투여라면 모두를 말한다. 이러한 치료는 적절한 질환, 장애 및/또는 병폐의 징후들을 발현하지 않는 개체 및/또는 단지 질환, 장애 및/또는 병폐의 초기 징후들만을 나타내는 개체에게 할 수 있다. 임의적으로 또는 추가적으로, 이러한 치료는 적절한 질환, 장애 및/또는 병폐의 하나 이상의 확립된 징후들을 발현하는 개체에게 할 수 있다.

[0070] **발명의 상세한 설명**

[0071] 본 발명은 무엇보다도, 중추신경계 (CNS)로의 치료의 효과적인 직접 전달을 위한 개선된 방법들 및 조성물들을 제공한다. 상기에서 논의된 바와 같이, 본 발명은 부분적으로 리소좀 축적병 (lysosomal storage disease) (예로, 이염색 백색질장애 질환)을 위한 대체 효소 (예로, ASA 단백질)가 치료의 필요가 있는 개체의 뇌척수액 (CSF) 내로 높은 농도로 개체에서 실질적인 역효과들을 유발하지 않고도 직접 도입될 수 있는 점의 예기치 않은 발견을 기초하고 있다. 보다 놀랍게도, 본 발명자들은 합성 CSF를 사용하지 않고도 단순한 식염수 또는 완충용액-기초 제형물을 사용하여 전달될 수 있는 점을 발견하였다. 보다 더 예기치 않게도, 본 발명에 따른 경막내 전달은 개체에서 심각한 면역반응과 같은 실질적인 역효과들을 유발하지 않는다. 따라서, 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 경막내 전달은 동시적인 면역억제 요법의 부재 시 (예로, 전-치료 또는 전-조정에 의한 면역 내

성의 유발 없음) 사용될 수 있다.

[0072] 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 경막내 전달은 표면, 얕은 및/또는 깊은 뇌 부위들에 있는 다양한 표적 뇌 조직들에서 대체 효소의 효과적인 전달을 유도하여 다양한 뇌 조직들을 거친 효율적인 확산을 허용한다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 경막내 전달은 말초 순환에 들어가는 충분량의 대체 효소들을 유도하였다. 그 결과, 일정 경우에서는, 본 발명에 따른 경막내 전달이 간, 심장, 비장 및 신장과 같은 말초 조직들에서 대체 효소의 전달을 유도하였다. 본 발견은 예측되지 않고 특히 CNS 및 말초 성분들 둘 다를 가지는 리소좀 축적병의 치료에 유용할 수 있고, 이는 전형적으로 규칙적인 경막내 투여 및 정맥내 투여 둘 다를 요구할 것이다. 본 발명에 따른 경막내 전달은 말초 증상들을 치료하는 것에서 치료적 효과들과 타협하지 않고도 감소된 용량 투여 및/또는 정맥내 (*iv*) 주사의 빈도를 허용할 수 있는 점을 보여준다.

[0073] 본 발명은 다양한 뇌 표적 조직들로 대체 효소들의 효율적이고 편리한 전달을 허용하여CNS 표시들 (CNS indications)을 가지는 리소좀 축적병들의 효과적인 치료를 유도하는 다양한 예기치 못한 유익한 특징들을 제공한다.

[0074] 본 발명의 다양한 관점들은 다음의 섹션들에서 상술되고 있다. 섹션들의 사용은 본 발명을 제한하도록 의미하지는 않는다. 각 섹션은 본 발명의 각 관점에 적용될 수 있다. 본 명세서에서, 달리 진술되지 않는 경우라면 "또는 (or)"은 "및/또는 (and/or)" 을 의미한다.

[0075] ***치료적 단백질들***

[0076] 일정 구현예들에서, 본 발명에 의해 제공되는 발명적 방법들 및 조성물들은 이염색성 백색질장애 (Metachromatic Leukodystrophy) 질환의 치료를 위해 CNS로 아릴설파타제 A (ASA)를 전달하는 데 사용된다. 적합한 ASA 단백질은 자연적으로-발생하는 아릴설파타제 A (ASA) 단백질 활성을 대체하거나 ASA-결핍과 연관된 하나 이상의 표현형들 또는 증상들을 복구할 수 있는 분자 또는 분자의 일부분이라면 모두일 수 있다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 대체 효소는 성숙한 인간 ASA 단백질과 실질적으로 유사하거나 일치하는N-말단 및 C-말단 또한 아미노산 서열을 가지는 폴리펩타이드이다.

[0077] 전형적으로, 인간 ASA 단백질은 성숙한 형태로 프로세싱되는 전구체 형태로서 생산된다. 본 과정은 일반적으로 18개 아미노산들 신호 펩타이드를 제거하여 발생한다. 전형적으로, 전구체 형태는 507개 아미노산 잔기들을 포함하는 전장의 전구체 또는 전장의 ASA 단백질이라고도 역시 말한다. N-말단의 18개 아미노산들은 절단되어 489개 아미노산들 길이가 되는 성숙한 형태가 된다. 따라서, N-말단의 18개 아미노산들은 일반적으로 ASA 단백질 활성에 필요하지 않은 것으로 사료된다. 전형적인 야생형 또는 자연적으로-발생하는 인간 ASA 단백질의 성숙한 형태 (서열번호 1) 및 전장의 전구체 (서열번호 2)의 아미노산 서열들이 표 1에 나타나 있다. 하기 표 1은 인간 아릴설파타제 A를 나타낸 것이다.

표 1

[0078]

성숙한 형태	RPPNIVLIFADDLGYGDLGCYGHPSSTTPNLDQLAAGGLRFTDFYVPVSLCTPS RAALLTGRLPVRMGMYPGVLVPSSRGGLPLEEVTVAEVLAARGYLTGMAGKWHL GVGPEGAFLPPHQGFHRFLGIPYSHDQGPCQNLTCFPPATPCDGGCDQGLVPIP LLANLSVEAQPPWLPGLEARYMAFAHDLMADAQRQDRPFFLYYASHHTHYPQFS GQSFAERSGRGPFGDSLMELDAAVGTLMTAIGDLGLLEETLVIFTADNGPETMR MSRGGCSGLLRCGKGTTYEGGVREPALAFWPGHIAPGVTHELASSLDLLPTLAA LAGAPLPNVTLDGFDLSPLLLGTGKSPRQSLFFYPSYPDEVRGVFAVRTGKYKA HFFTQGSAHSDTTADPACHASSSLTAHEPPLLYDLSKDPGENYNLLGGVAGATP EVLQALKQLQLLKAQLDAAVTFGPSQVARGEDPALQICCHPGCTPRPACCHCPD PHA (SEQ ID NO:1)
전장의 전구체	MGAPRSLLLALAAGLAVARPPNIVLIFADDLGYGDLGCYGHPSSTTPNLDQLAA GGLRFTDFYVPVSLCTPSRAALLTGRLPVRMGMYPGVLVPSSRGGLPLEEVTVA EVLAARGYLTGMAGKWHLGVGPEGAFLPPHQGFHRFLGIPYSHDQGPCQNLTCF PPATPCDGGCDQGLVPIPLLANLSVEAQPPWLPGLEARYMAFAHDLMADAQRQD RPFFLYYASHHTHYPQFSGQSFAERSGRGPFGDSLMELDAAVGTLMTAIGDLGL LEETLVIFTADNGPETMRMSRGGCSGLLRCGKGTTYEGGVREPALAFWPGHIAP GVTHELASSLDLLPTLAALAGAPLPNVTLDGFDLSPLLLGTGKSPRQSLFFYPS YPDEVRGVFAVRTGKYKAHFFTQGSAHSDTTADPACHASSSLTAHEPPLLYDLS KDPGENYNLLGGVAGATPEVLQALKQLQLLKAQLDAAVTFGPSQVARGEDPALQ ICCHPGCTPRPACCHCPDPHA (SEQ ID NO:2)

[0079] 따라서 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 치료적 분체는 성숙한 인간 ASA단백질 (서열번호 1)이다. 일정 구현예들에서, 적합한 치료적 분체는 성숙한 인간 ASA 단백질의 상동체 또는 유사체일 수 있다. 예를 들어, 인간 ASA 단백질의 상동체 또는 유사체는 야생형 또는 자연적으로-발생하는ASA 단백질 (서열번호 1)과 대비하여 하나 이상 아미노산 치환들, 결실들, 및/또는 삽입들을 포함하는 한편, 실질적인 ASA 단백질 활성을 보유하는 변형된 성숙한 인간 ASA 단백질일 수 있다. 따라서 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 치료적 분체는 성숙한 인간 ASA 단백질 (서열번호 1)과 실질적으로 상동적이다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 치료적 분체는 서열번호 1과 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 상동한 아미노산 서열을 가진다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 대체 효소는 성숙한 인간 ASA 단백질 (서열번호 1)과 실질적으로 일치한다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 치료적 분체는 서열번호 1과 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 일치하는 아미노산 서열을 가진다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 치료적 분체는 성숙한 인간 ASA 단백질의 단편 또는 일부분을 포함한다.

[0080] 임의적으로, 본 발명에 적합한 대체 효소는 전장의ASA 단백질이다. 일정 구현예들에서, 적합한 대체 효소는 전장의 인간 ASA 단백질의 상동체 또는 유사체일 수 있다. 예를 들어, 전장의 인간 ASA 단백질의 상동체 또는 유사체는 야생형 또는 자연적으로-발생하는 전장의ASA 단백질 (서열번호 2)과 대비하여 하나 이상 아미노산 치환들, 결실들, 및/또는 삽입들을 포함하는 한편, 실질적인 ASA 단백질 활성을 보유하는 변형된 전장의 인간 ASA 단백질일 수 있다. 따라서 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 대체 효소는 전장의 인간 ASA 단백질 (서열번호 2)과 실질적으로 상동적이다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 대체 효소는 서열번호 2와 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 상동한 아미노산 서열을 가진다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 대체 효소는 전장의 인간 ASA 단백질 (서열번호 2)과 실질적으로 일치한다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 대체 효소는 서열번호 2와 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 일치하는 아미노산 서열을 가진다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 대체 효소는 전자의 인간 ASA 단백질의 단편 또는 일부분을 포함한다.

[0081] 일정 구현예들에서, 치료적 단백질은 표적 분체 (예로, 리소좀 표적 서열) 및/또는 막-침투 펩타이드를 포함한다. 일정 구현예들에서, 표적 서열 및/또는 막-침투 펩타이드는 치료적 분체의 내재적 부분 (예로, 화학적 결합에 의해, 융합 단백질에 의해)이다. 일정 구현예들에서, 표적 서열은 만노스-6-포스페이트 분체를 포함한다. 일정 구현예들에서, 표적 서열은 IGF-I 분체를 포함한다. 일정 구현예들에서, 표적 서열은 IGF-II 분체를 포함한다.

[0082] 다른 리소좀 축적병들 및 대체 효소들

[0083] 본 발명에 따른 방법들 및 조성물들은 다른 리소좀 축적병들, 상세하게는 이에 제한되는 것은 아니지만 아스파틸글루코사민 뇨증 (aspartylglucosaminuria), 콜레스테롤 에스테르 축적병 (cholesterol ester storage disease), 울만병 (Wolman disease), 시스틴증 (cystinosis), 다논병 (Danon disease), 파브리병 (Fabry disease), 파버 지질육아종증 (Farber lipogranulomatosis), 파버병 (Farber disease), 퓨코시드 축적증 (fucosidosis), 갈락토시알산증 (galactosialidosis) 제 I/II형, 가우셔병 (Gaucher disease) 제 I/II/III형, 구형세포 백색질장애 (globoid cell leukodystrophy), 크래브병 (Krabbe disease), 글리코겐 축적병 (glycogen storage disease) 제 II형, 폼프병 (Pompe disease), GM1-갱글리오사이드 축적증 (gangliosidosis) 제 I/II/III형, GM2- 갱글리오사이드 축적증 제 I형, 테이삭스병 (Tay Sachs disease), GM2- 갱글리오사이드 축적증 제 II형, 샌드호프병 (Sandhoff disease), GM2- 갱글리오사이드 축적증, α-만노사이드증 (mannosidosis) 제 I/II형, 베타-만노사이드증 (beta.-mannosidosis), 이염색성 백색질장애 (metachromatic leukodystrophy), 점액지질증 (mucolipidosis) 제 I형, 시알산증 제 I/II형, 점액지질증 제 II/III형, I-세포병 (I-cell disease), 점액지질증 제 IIIC형, 유사-헐러 다중장애 (pseudo-Hurler polydystrophy), 점액다당류증 (mucopolysaccharidosis) 제 I형, 점액다당류증 제 II형, 점액다당류증 제 IIIA형, 산필리포 증후군 (Sanfilippo syndrome), 점액다당류증 제 IIIB호, 점액다당류증 제 IIIC형, 점액다당류증 제 IIID형, 점액다당류증 제 IVA형, 모르퀴오 증후군 (Morquio syndrome), 점액다당류증 제 IVB형, 점액다당류증 제 VI형, 점액다당류증 제 VII형, 슬라이 증후군 (Sly syndrome), 점액다당류증 제 IX형, 다중 설파타제 결핍 (multiple

sulfatase deficiency), 신경 세로이드 지질갈색소증 (neuronal ceroid lipofuscinosis), CLN1 바튼병 (Batten disease), CLN2 바튼병, 니만-피크병 (Niemann-Pick disease) A/B형, 니만-피크병 C1형, 니만-피크병 C2형, 피크노다이소스토 왜소증 (pycnodysostosis), 쉰들러병 제 I/II형, 가우셔병 및 시알산 축적병 (sialic acid storage disease)을 포함하는, CNS 병인학 및/또는 증상들을 가지는 이들 리소좀 축적병들을 치료하는 데 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0084] 리소좀 축적병들의 유전적 병인학, 임상적 소견들, 및 분자생물학의 자세한 리뷰들은 Scriver et al., eds., The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 7.sup.th Ed., Vol. II, McGraw Hill, (1995)에 상술되고 있다. 따라서, 상기 질환들에서 결핍되는 효소는 당업자라면 숙지하고 있고, 이들의 일부는 하기 표 2에 예시되고 있다.

표 2

질환명	효소결핍	축적 물질
폼브병	산-알, 4-글루코시다제	글리코겐 α1-4 결합 올리고다당류
GM1 갱글리오사이드 축적증	β-갈락토시다제	GM_1 갱글리오사이드들
테이삭스병	β-헥소아미다제 A	GM_2 갱글리오사이드
GM2 갱글리오사이드 축적증: AB 변형체	GM_2 활성인자 단백질	GM_2 갱글리오사이드
샌드호프병	β-헥소아미다제 A&B	GM_2 갱글리오사이드
파브리병	α- 갈락토시다제 A	글로보사이드 (Globosides)
가우셔병	글루코세레브로시다제	글루코실세라마이드
이염색성 백색질 장애	아릴설파타제 A	설파타이드들
크래브병	갈락토실세라미다제	갈락토세레브로사이드
니만피크병 A & B 형	산 스핑고미엘리나제	스핑고마이엘린
니만피크병 C 형	콜레스테롤 에스터화 결함	스핑고마이엘린
니만피크병 D 형	미지	스핑고마이엘린
파버병	산 세라미다제	세라마이드
울만병	산 리파제	콜레스테릴 에스테르들
헐러 증후군 (MPS IH)	α-L-이듀로니다제	헤파란 & 더마탄 설페이드들
쉬에 증후군 (MPS IS)	α-L- 이듀로니다제	헤파란 & 더마탄 설페이드들
헐러-쉬에병 (MPS IH/S)	α-L- 이듀로니다제	헤파란 & 더마탄 설페이드들
헌터 증후군 (MPS II)	이듀로네이트 설파타제	헤파란 & 더마탄 설페이드들
신필립포 A 형 (MPS IIIA)	헤파란 N-설파타제	헤파란 설페이드들
산필리포 B 형 (MPS IIIB)	α-N-아세틸글루코사미다제	헤파란 설페이드들
산필리포 C 형	아세틸-CoA-	헤파란 설페이드들

[0085]

		하이알루론산
프로사포닌병	사포닌들 A, B, C or D	

[0086]

[0087] 본 발명에 따른 발명적 방법들은 다양한 다른 대체 효소들을 전달하는 데 사용될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바, 본 발명에 적합한 대체 효소들은 치료될 리소좀 축적병에서 결핍 또는 소실된 리소좀 효소의 적어도 부분적 활성을 대체하도록 작용할 수 있는 효소라면 모두를 포함할 수 있다. 일정 구현예들에서, 대체 효소는 리소좀들에서 축적된 물질을 감소시킬 수 있고 리소좀 축적병 증상들을 하나 이상 회복시키거나 개선시킬 수 있다.

[0088] 일정 구현예들에서, 적합한 대체 효소는 치료될 리소좀 축적병과 연관되는 것으로 알려진 리소좀 효소라면 모두일 수 있다. 일정 구현예들에서, 적합한 대체 효소는 상기 표 2에 나열된 효소로부터 선택된 효소이다.

[0089] 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 대체 효소는 야생형 또는 자연적으로 발생한 서열을 가질 수 있다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 대체 효소는 야생형 또는 자연적으로 발생한 서열과 실질적인 상동성 또는 일치도를 가지는 변형된 서열을 가질 수 있다 (예로, 야생형 또는 자연적으로 발생한 서열과 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 서열 일치도).

[0090] 본 발명에 적합한 대체 효소는 사용가능한 수단이라면 모두에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 대체 효소들은 대체 효소-인코딩 핵산을 발현하도록 조작된 숙주세포 시스템을 사용하여 재조합적으로 생산될 수 있다. 임의적으로 또는 추가적으로, 대체 효소들은 화학적 합성에 의해 부분적으로 또는 전적으로 제조될 수 있다. 임의적으로 또는 추가적으로, 대체 효소들은 또한 천연의 출처들로부터 정제될 수 있다.

[0091] 효소들이 재조합적으로 생산되는 경우, 발현 시스템이라면 모두가 사용될 수 있다. 몇 가지의 예들을 제시하면, 기지의 발현 시스템들은 예를 들어 계란, 배큘로바이러스, 식물, 효모, 또는 포유동물 세포들을 포함한다.

[0092] 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 효소들은 포유동물 세포들에서 생산된다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 포유동물 세포들의 비-제한적인 예들로는 BALB/c 마우스 마이엘로마 세포주 (NSO/1, ECACC No: 85110503); 인간 망막모세포들 (PER.C6, CruCell, Leiden, 네델란드); SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (현탁 배양에서의 성장을 위해 계대배양된 293 또는 293 세포들, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59,1977); 인간 섬유육종 세포주 (예로, HT1080); 새끼 햄스터 신장세포들 (BHK, ATCC CCL 10); 중국 햄스터 난소 세포들 +/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216, 1980); 마우스 세르톨리 세포들 (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251, 1980); 원숭이 신장 세포들 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장세포들 (VERO-76, ATCC CRL-1 587); 인간 자궁암종 세포들 (HeLa, ATCC CCL 2); 고양이 신장세포들 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간세포들 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐세포들 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간세포들 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방세포들 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포들 (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68, 1982); MRC 5 세포들; FS4 cells; 및 인간 간암세포들 (Hep G2)을 포함한다.

[0093] 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 방법들은 인간 세포들로부터 생산된 대체 효소들을 전달하는 데 사용된다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 방법들은 CHO 세포들로부터 생산된 대체 효소들을 전달하는 데 사용된다.

[0094] 일정 구현예들에서, 본 발명의 방법을 사용하여 전달된 대체 효소들은 세포성 흡수 및/또는 리소좀 표적화를 용이하게 하도록 뇌 세포들의 표면 상의 수용체에 결합하는 분체를 포함한다. 예를 들어, 이러한 수용체는 만노스-6-포스페이트 (M6P) 잔기들을 결합시키는 양이온-비의존성 만노스-6-포스페이트 수용체 (CI-MPR)일 수 있다. 추가적으로, CI-MPR도 역시 IGF-II를 포함하는 기타 다른 단백질들을 결합시킨다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 대체 효소는 단백질의 표면 상에 M6P 잔기들을 포함한다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 대체 효소는 CI-MPR에 더 높은 결합 친화도를 가지는 비스-인산화 올리고사카라이드들 (bis-phosphorylated oligosaccharides)를 포함할 수 있다. 일정 구현예들에서, 적합한 효소는 효소 당 약 적어도 20%까지의 비스-인산화 올리고사카라이드들 를 포함한다. 다른 구현예들에서, 적합한 효소는 효소 당 약 10%, 15%, 18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%의 비스-인산화 올리고사카라이드들을 포함할 수 있다. 이러한 비스-인산화 올리고사카라이드들은 효소 상에 자연적으로 존재할 수 있으면서도, 효소들은 이러한 올리고사카라이드들을 소유하도록 변형될 수 있는 점을 주목해야 한다. 예를 들어, 적합한 대체 효소들은 리소좀 효소들 상에서 UDP-GlcNAc 로부터 α-1,2-연결된 만노스들의 6' 위치로 N-아세틸글루코사민-L-포스페이트의 이동을 촉매할 수

있는 소정의 효소들에 의해 변형될 수 있다. 이러한 효소들을 생산하고 사용하는 방법들 및 조성물들은, 예를 들어 캔필드 등 (Canfield et al.)에 의해 미국 특허 제 6,537,785호 및 미국 특허 제 6,534,300호에서 기술되고 있고, 이들 각각은 본 명세서에서 참고문헌으로 통합되어 있다.

[0095] 일정 구현예들에서, 본 발명에서 사용되는 대체 효소들은 뇌 세포들의 표면 상의 수용체에 결합할 수 있는 리소좀 표적화 분체와 결합하거나 융합될 수 있다. 적합한 표적화 분체는 IGF-I, IGF-II, RAP, p97, 및 변이체들 (variants), 상동물들 (homologues) 또는 그들의 단편들 (예로, 야생형 성숙한 인간 IGF-I, IGF-II, RAP, p97 펩타이드 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%일치하는 서열을 가지는 이들 펩타이드를 포함함)일 수 있다.

[0096] 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 대체 효소들은 BBB를 거쳐서 또한 CNS 내로 이러한 제제들의 전달 또는 이동을 증진하도록 변형되지 않았다.

[0097] 일정 구현예들에서, 치료적 단백질은 표적 분체 (예로, 리소좀 표적 서열) 및/또는 막-침투 펩타이드를 포함한다. 일정 구현예들에서, 표적 서열 및/또는 막-침투 펩타이드는 치료적 분체의 내재 부분 (예로, 화학적 결합에 의해, 융합 단백질에 의해)이다. 일정 구현예들에서, 표적 서열은 만노스-6-포스페이트 분체를 포함한다. 일정 구현예들에서, 표적 서열은 IGF-I 분체를 포함한다. 일정 구현예들에서, 표적 서열은 IGF-II 분체를 포함한다.

[0098] 제형물들

[0099] 개체의 CNS 내로 치료제들을 전달하는데 통상적으로 사용되는 수성의 약제학적 용액들 및 조성물들 (예로, 제형물)은 비완충된 등장성 식염수 및 인공 CSF인 엘리어트 B 용액을 포함한다. 엘리어트 B 용액에 대비하여 CSF의 조성들을 보여주는 비교가 하기 표 3에 포함되어 있다. 표 3에서 나타난 바와 같이, 엘리어트 B 용액의 농도는 CSF의 농도와 매우 유사하다. 그러나 엘리어트 B 용액은 매우 낮은 완충액 농도를 포함하고 따라서 특히 연장된 기간 동안 (예로, 축적 조건들 동안) 치료제들 (예로, 단백질들)을 안정화하는 데 필요한 적당한 완충화 능력을 제공할 수 없다. 또한, 엘리어트 B 용액은 일정 치료제들, 상게하게는 단백질들 또는 효소들을 전달하도록 의도된 제형물들과 부적합할 수 있는 소정의 염들을 포함한다. 예를 들어, 엘리어트 B 용액에 존재하는 칼슘 염들은 단백질 침전을 매개할 수 있고 이에 의해 제형물의 안정도를 감소시킬 수 있다.

표 3

[0100]

용액	Na^{+} mEq/L	K^{+} mEq/L	Ca^{++} mEq/L	Mg^{++} mEq/L	$HCO3^{-}$ mEq/L	Cl^{-} mEq/L	pH	인 mg/L	포도당 mg/L
CSF	117-137	2.3	2.2	2.2	22.9	113-127	7.31	1.2-2.1	45-80
엘리어트 B 용액	149	2.6	2.7	2.4	22.6	132	6.0-7.5	2.3	80

[0101] 본 발명은 이로 (예로, 재조합 단백질) 제형화된 하나 이상의 치료제들을 안정화하거나, 임의적으로 그의 분해를 지연시키거나 방지할 수 있도록 제형화되었던 치료제들을 위한, 수성의, 전-동결건조된, 동결건조된 또는 재구성된 형태로의 제형물들을 제공한다. 일정 구현예들에서, 본 제형물들은 치료제들을 위한 동결건조 제형물을 제공한다. 일정 구현예에서, 본 제형물은 치료제들을 위한 수성의 제형물들을 제공한다. 일정 구현예에서, 본 제형물은 안정한 제형물들이다.

[0102] 안정한 제형물들

[0103] 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "안정한"은 연장된 기간 동안 그의 치료적 효능 (예로, 의도된 생물학적 활성 및/또는 물리화학적 본성의 모두 또는 대다수)을 유지하는 치료제 (예로, 재조합 효소)의 능력을 말한다. 치료제의 안정도, 및 이러한 치료제의 안정도를 유지하는 약제학적 조성물의 능력은 연장된 기간 동안 (예로, 적어도 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 또는 36개월 이상 동안) 평가될 수 있다. 제형물의 문맥에서, 안정한 제형물은 안에 있는 치료제가 필수적으로 보관 시 및 공정들 (냉동/해동, 기계적인 혼합 및 동결건조와 같음) 동안 그의

물리적 및/또는 화학적 본성 및 생물학적 활성을 보유하는 것이다. 단백질 안정도의 경우, 고분자량 (HMW) 응집체들의 형성, 효소 활성의 상실, 단백질 단편들의 생성 및 전하 프로파일들의 이동 (shift)에 의해 측정될 수 있다.

[0104] 치료제의 안정도는 제제가 그의 의도하는 치료적 기능을 하도록 요구되는 특정한 범위의 치료제 농도 유지의 측면에서 특히 중요하다. 치료제의 안정도는 좀 더 나아가 연장된 기간 동안 치료제의 생물학적 활성 또는 물리화학적 본성과 대비하여 평가될 수 있다. 예를 들어, 주어진 시점에서의 안정도는 이전 시점 (예로, 제형화0일)에서의 안정도와 대비하여 또는 비제형화된 치료제 및 백분율로서 표시되는 본 비교의 결과들과 대비하여 비교될 수 있다. 바람직하게, 본 발명의 약제학적 조성물들은 연장된 기간 동안 치료제의 생물학적 활성 또는 물리화학적 본성의 적어도 100%, 적어도 99%, 적어도 98%, 적어도 97%, 적어도 95%, 적어도 90%, 적어도 85%, 적어도 80%, 적어도 75%, 적어도 70%, 적어도 65%, 적어도 60%, 적어도 55% 또는 적어도 50%를 유지한다 (예로, 적어도 약 6 내지 12개월 동안 상온에서 또는 가속된 보관 조건들 하에서 측정된 바와 같음).

[0105] 바람직하게, 치료제들은 본 발명의 약제학적 제형물들에서 용해성이다. 용어 "용해성 (soluble)"은 이것이 본 발명의 치료제들에 관한 바 균질한 용액을 형성하는 이러한 치료제들의 능력을 말한다. 바람직하게, 치료제가 투여되고 작용의 표적 부위 (예로, 뇌의 세포들 및 조직들) 내로 운반되는 용액에서 치료제의 용해도는 작용의 표적 부위로 치료적 유효량의 치료제의 전달을 허용하는데 충분하다. 여러가지 요인들이 치료제들의 용해도에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어, 단백질 용해도에 영향을 줄 수 있는 적절한 요인들은 이온 강도, 아미노산 서열 및 기타 다른 공-용해화 제제들 또는 염들 (예로, 칼슘 염들)의 존재를 포함한다. 일정 구현예들에서, 약제학적 조성물들은 칼슘 염들이 이러한 조성물들로부터 배제되도록 제형화된다.

[0106] 수성, 전-동결건조, 동결건조 또는 재구성된 형태의 적합한 제형물들은 다양한 농도들로 관심있는 치료제 (예로, 효소)를 포함할 수 있다. 일정 구현예들에서, 제형물들은 약 0.1 mg/ml 내지 100 mg/ml (예로, 약 0.1 mg/ml 내지 80 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 60 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 50 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 40 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 30 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 25 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 20 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 60 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 50 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 40 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 30 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 25 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 20 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 15 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 10 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 5 mg/ml, 약 1 mg/ml 내지 10 mg/ml, 약 1 mg/ml 내지 20 mg/ml, 약 1 mg/ml 내지 40 mg/ml, 약 5 mg/ml 내지 100 mg/ml, 약 5 mg/ml 내지 50 mg/ml, 또는 약 5 mg/ml 내지 25 mg/ml) 범위의 농도로 관심있는 단백질 또는 치료제를 포함할 수 있다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 적합한 제형물들은 대략 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 또는 100 mg/ml, 의 농도로 관심있는 단백질 또는 효소를 포함할 수 있다. 일정 구현예들에서, 경막내 전달에 적합한 제형물들은 대략 1 mg/ml, 3 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml 또는 300 mg/ml의 농도로 치료제를 포함할 수 있다.

[0107] 본 발명의 제형물들은 수성 용액들 또는 재구성 동결건조 용액들로서 그들의 내성도를 특징으로 한다. 본 명세서에서 사용되는 바, 용어들 "내성 (tolerable)" 및 "내성도 (tolerability)"는 본 발명의 약제학적 조성물들이 이러한 조성물이 투여된 개체에서 역효과를 발현하지 않도록, 임의적으로 이러한 조성물이 투여된 개체에서 심각한 역효과를 발현하지 않도록 하는 능력을 말한다. 일정 구현예들에서, 본 발명의 약제학적 조성물들은 이러한 조성물들이 투여된 개체에 의해 잘 내성화된다.

[0108] 많은 치료제들, 상세하게 본 발명의 단백질들 및 효소들은 본 발명의 약제학적 조성물들에서 그들의 용해도 및 안정도를 유지하도록 조절된 pH 및 특이적 부형제들을 요구한다. 표 4는 본 발명의 단백질 치료제들의 용해도 및 안정도를 유지하는 데 고려되는 단백질 제형물들의 전형적인 관점들을 확인시켜주고 있다.

표 4

변수	전형적 범위/유형	원리
pH	5 내지 7.5	안정성 때로 용해도
완충액 유형	아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 히스티딘, 포스페이트 또는 트리스	최적 pH 유지 안정도에도 영향줄 수 있음
완충액 농도	5-50 mM	pH 유지 안정화 및 이온 강도 추가
긴장화제	NaCl, 당류, 만니톨	이소-삼투 또는 등장액화
표면활성제	폴리솔베이트 20, 폴리솔베이트 80	간격 및 막에 대한 안정화
기타	아미노산들 (예로, 아르기닌) 수십 내지 수백 mM	증진된 용해도 또는 안정성

[0109]

[0110] 완충액들

[0111] 제형물의pH는 수성의 제형물에서 또는 전-동결건조 제형물의 경우 치료제 (예로, 효소 또는 단백질)의 용해도를 변경시킬 수 있는 추가적인 요인이다. 따라서 본 발명의 제형물들은 바람직하게 하나 이상의 완충액들을 포함한다. 일정 구현예들에서, 수성의 제형물들은 상기 조성물의 최적의 pH를 약 4.0 내지 8.0 사이 (예로, 약 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.2, 6.4, 6.5, 6.6, 6.8, 7.0, 7.5, 또는 8.0)로 유지하도록 충분한 양의 완충액을 포함한다. 일정 구현예들에서 제형물의 pH는 약 5.0 내지 7.5 사이, 약 5.5 내지 7.0 사이, 약 6.0 내지 7.0 사이, 및 약 6.0 내지 7.5 사이이다. 예를 들어, 적합한 완충액들로는 아세테이트 (acetate), 숙시네이트 (succinate), 시트레이트 (citrate), 히스티딘 (histidine), 포스페이트 (phosphate), 숙시네이트 (succinate), 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 ("트리스 (Tris)") 및 기타 다른 유기산들을 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물들의 완충액 농도 및 pH 범위는 제형물의 내성도를 조절하거나 조정하는 요인들이다. 일정 구현예들에서, 완충제는 약 1 mM 내지 약 150 mM 사이, 약 10 mM 내지 약 50 mM 사이, 약 15 mM 내지 약 50 mM 사이, 약 20 mM 내지 약 50 mM 사이, 또는 약 25 mM 내지 약 50 mM 사이 범위의 농도로 존재한다. 일정 구현예들에서, 적합한 완충제는 대략 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM 50 mM, 75 mM, 100 mM, 125 mM 또는 150 mM의 농도로 존재한다.

[0112] 긴장도

[0113] 일정 구현예들에서, 수성, 전-동결건조, 동결건조 또는 재구성 형태로의 제형물들은 등장성으로 제형물들을 유지하도록 등장성 제제 (isotonicity agent)를 포함한다. 전형적으로, "등장성"에 의하여 관심있는 제형물이 필수적으로 인간 혈액과 동일한 삼투압을 가지는 것을 의미한다. 일반적으로, 등장성 제형물들은 약 240 mOsm/kg으로부터 약 350 mOsm/kg까지의 삼투도를 가질 것이다. 등장도는, 예를 들어 증기압 또는 동결점 유형의 삼투측정기들 (osmometers)을 사용하여 측정될 수 있다. 대표적인 등장성 제제들로는, 이에 제한되는 것은 아니지만 글리신, 소비톨, 만니톨, 염화나트륨 및 아르기닌을 포함한다. 일정 구현예들에서, 적합한 등장성 제제들은 무게로 약 0.01내지 5 % (예로, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 또는 5.0%)로부터 나온 농도로 수성 및/또는 전-동결건조 제형물들에 존재할 수 있다. 일정 구현예들에서, 동결건조를 위한 제형물들은 전-동결건조 제형물들 또는 재구성된 제형물들을 등장성으로 유지하도록 등장성 제제를 포함한다.

[0114] 일반적으로 등장성 용액들이 비경구적으로 투여되는 약물들의 경우에 선호되는 한편, 등장성 용액들의 사용은 일정 치료제들 및 상세하게는 일정 단백질 및/또는 효소들의 용해도를 변화시킬 수 있다. 약간 고장성 용액들 (예로, pH 7.0에서 5 mM 소듐 포스페이드에 녹은 175 mM까지의 염화나트륨) 및 당-포함 용액들 (예로, pH 7.0에서 5 mM 소듐 포스페이드에 녹은 2%까지의 슈크로스)가 잘 내성화되는 것으로 기술되어 왔다. 가장 보편적인 승인된 CNS 볼루스 제형 조성물은 식염수이다 (물에 녹은 약 150 mM NaCl).

[0115] 안정화제들

[0116] 일정 구현예들에서, 제형물들은 단백질을 보호하도록 안정화제 또는 동결보호제 (lyoprotectant)를 포함할 수 있다. 전형적으로, 적합한 안정화제는 당 또는 비-환원 당 및/또는 아미노산이다. 대표적인 당들로는, 이에 제한되는 것은 아니지만 덱스트란, 락토스, 만니톨, 만노스, 소비톨, 라피노스, 슈크로스, 및 트레할로스를 포함한다. 대표적인 아미노산들은, 이에 제한되는 것은 아니지만 아르기닌, 글리신 및 메티오닌을 포함한다. 추가적인 안정화제들은 염화나트륨, 하이드록시에틸 전분 및 폴리비닐피롤리돈을 포함할 수 있다. 일반적으로 동결건조 제형물에서 안정화제의 양은 제형물이 등장성이 될 양이다. 그러나, 고장성 재구성된 제형물들도 역시 적합할 수 있다. 또한, 안정화제의 양은 너무 낮아서 치료제의 분해/응집이 허용가능하지 않은 양으로 발생해서는 안된다. 제형물에서 대표적인 안정화제 농도들은 약 1 mM 로부터 약 400 mM까지 (예로, 약 30 mM 로부터 약 300 mM까지, 및 약 50 mM 로부터 약 100 mM까지)의 범위, 또는 임의적으로 무게로 0.1% 로부터 15%까지 (예로, 1% 로부터 10%까지, 5% 로부터 15%까지, 5% 로부터 10%까지)의 범위일 수 있다. 일정 구현예들에서, 안정화제 및 치료제의 질량의 비율은 약 1:1이다. 다른 구현예들에서, 안정화제 및 치료제의 질량의 비율은 약 0.1:1, 0.2:1, 0.25:1, 0.4:1, 0.5:1, 1:1, 2:1, 2.6:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1, 또는 20:1이다. 일정 구현예들에서, 동결건조에 적합한 안정화제는 역시 동결보호제들 (lyoprotectants)이다.

[0117] 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 액상 제형물들은 무정형 물질들이다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 액상 제형물들은 실질적인 양의 무정형 물질들을 포함한다 (예로, 슈크로스-기초 제형물들). 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 액상 제형물들은 부분적으로 결정/부분적으로 무정형 물질들을 포함한다.

[0118] 충전제들

[0119] 일정 구현예들에서, 동결건조에 적합한 제형물들은 좀 더 나아가 하나 이상의 충전제들을 포함할 수 있다. "충전제 (bulking agents)"는 동결건조된 혼합물에 질량을 첨가하고 동결건조된 케이크의 물리적 구조에 기여한다. 예를 들어, 충전제는 동결건조된 케이크 (예로, 필수적으로 일정한 동결건조된 케이크)의 모양을 개선시킬 수 있다. 적합한 충전제들로는, 이에 제한되는 것은 아니지만 염화나트륨, 락토스, 만니톨, 글리신, 슈크로스, 트레할로스, 하이드록시에틸 전분을 포함한다. 대표적인 충전제들의 농도들은 약 1% 로부터 약 10%까지 (예로, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0%, 3.5%, 4.0%, 4.5%, 5.0%, 5.5%, 6.0%, 6.5%, 7.0%, 7.5%, 8.0%, 8.5%, 9.0%, 9.5%, 및 10.0%)이다.

[0120] 표면활성제들

[0121] 일정 구현예들에서, 제형물들에 표면활성제를 첨가하는 것이 바람직하다. 대표적인 표면활성제들로는 폴리솔베이트들 (Polysorbates) (예로, 폴리솔베이트 20 또는 80); 폴록사머들 (poloxamers) (예로, 폴록사머 188); 트리톤 (Triton); 소듐 도데실 설페이트 (SDS); 소듐 라우렐 설페이트; 소듐 옥실 글리코사이드; 로릴-, 미리스틸-, 리노레일-, 또는 스테아릴-설포베타인 (sulfobetaine); 미리스틸-, 리노레일-, 또는 스테아릴-사르코신 (sarcosine); 리노레일-, 미리스틸-, 또는 세틸-베타인; 라우로아미도프로필 (lauroamidopropyl)-, 코크아미도프로필 (cocamidopropyl)-, 리노레아미도프로필 (linoleamidopropyl)-, 미리스트아미도프로필 (myristamidopropyl)-, 팔미도프로필 (palmidopropyl)-, 또는 이소스테아르아미도프로필 (isostearamidopropyl)-베타인 (예로, 라우로아미도프로필); 미리스트아미도프로필-, 팔미도프로필-, 또는 이소스테아르아미도프로필-디메틸아민; 소듐 메틸 코코일-, 또는 디소듐 메틸 오페일-타우레이트; 또한 MONAQUAT™ 시리즈 (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.), 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필 글리콜, 폴리에틸 글리콜, 폴리프로필 글리콜 및 에틸렌 및 프로필렌 글리콜의 공중합체들 (예로, 플루로닉스 (Pluronics), PF68 등)와 같은 비이온성 표면활성제들을 포함한다. 전형적으로, 첨가된 표면활성제의 양은 이것이 단백질의 응집을 감소시키고 미립자들 또는 포기들 (effervescences)의 형성을 최소화하는 양이다. 예를 들어, 표면활성제는 약 0.001 내지 0.5% (예로, 약 0.005 내지 0.05%, 또는 0.005 내지 0.01%)로부터 나온 농도로 제형물에 존재할 수 있다. 상세하게, 표면활성제는 대략 0.005%, 0.01%, 0.02%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 또는 0.5% 등의 농도로 제형물에 존재할 수 있다. 임의적으로, 또는 추가적으로, 표면활성제가 동결건조 제형물, 전-동결건조 제형물 및/또는 재구성된 제형물에 첨가될 수 있다.

[0122] 일정 구현예들에서, 레밍턴의 약제학적 과학들 제 16판, Osol, A. 출판사 (1980)에 기술된 것들과 같은 기타 다른 약제학적으로 허용가능한 담체들, 부형제들 또는 안정화제들을 그들이 제형물의 원하는 특성들에 역효과를 주지 않는 경우라면 제형물 (및/또는 동결건조 제형물 및/또는 재구성된 제형물)에 포함될 수 있다. 허용가능한 담체들, 부형제들 또는 안정화제들은 적용되는 해당 용량들 및 농도들에서 수여자들에게 비독성이고, 또한 이에 제한되는 것은 아니지만 추가적인 완충제들; 보존제들; 공-용매들; 아스코브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제들; EDTA와 같은 킬레이팅제들; 금속 복합체들 (예로, Zn-단백질 복합체들); 폴리에스테르들과 같은 생분해성

중합체들; 및/또는 소듐과 같은 염-형성 반대이온들을 포함한다.

[0123] 수성, 전-동결건조, 동결건조 또는 재구성된 형태로의 본 발명에 따른 제형물들은 제품 품질 분석, 재구성 시간 (동결건조된 경우), 재구성의 품질 (동결건조된 경우), 고분자량, 수분, 및 유리 전이 온도를 기초로 하여 평가될 수 있다. 전형적으로, 단백질 품질 및 제품 분석은, 이에 제한되는 것은 아니지만 크기 배제 HPLC (SE-HPLC), 양이온 교환-HPLC (CEX-HPLC), X-선 회절 (XRD), 조정된 차별 스캐닝 열량측정법 (modulated differential scanning calorimetry, mDSC), 역상 HPLC (RP-HPLC), 다각도 광 분산 (MALS), 형광, 자외선 흡수, 혼탁측정법 (nephelometry), 모세관 전기영동 (capillary electrophoresis, CE), SDS-PAGE, 및 그들의 조합을 포함하는 방법들을 사용하는 제품 분해율 분석을 포함한다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 제품의 평가는 모양 (액체 또는 케이크 모양)을 평가하는 단계를 포함할 수 있다.

[0124] 일반적으로, (동결건조된 또는 수성의) 제형물들은 상온에서 연장된 기간들 동안 보관될 수 있다. 보관 온도는 전형적으로 0 ℃로부터 45 ℃까지의 범위 (예로, 4℃, 20 ℃, 25 ℃, 45 ℃ 등)일 수 있다. 제형물들은 개월 단위 기간 내지 연 단위 기간 동안 보관될 수 있다. 일반적으로 보관 시간은 24개월, 12개월, 6개월, 4.5개월, 3개월, 2개월 또는 1개월일 것이다. 제형물들은 이동 단계들을 없애려고 투여에 사용되는 용기에 직접 보관될 수 있다.

[0125] 제형물들은 운반 단계들을 없애려고 재구성 관 (reconstitution vessel)로서도 역시 기능할 수 있는 동결건조 용기에 직접 보관될 수 있다. 임의적으로, 동결건조된 산물 제형물들은 보관을 위해 더 작은 증분들 (increments) 내로 측정될 수 있다. 일반적으로 보관은 단백질의 분해를 유발하는, 이에 제한되는 것은 아니지만 태양광 노출, UV 조사, 다른 형태들의 전자기 조사, 과도한 열 또는 추위, 급속한 열적 충격, 및 기계적인 충격을 포함하는 환경들을 피해야 한다.

[0126] 동결건조

[0127] 본 발명에 따른 발명적 방법들은 물질들이라면 모두, 상세하게는 치료제들을 동결건조하는 데 사용될 수 있다. 전형적으로, 전-동결건조 (pre-lyophilization) 제형물은 좀 더 나아가 관심있는 화합물을 냉동-건조 및 보관 기간 동안 분해되지 않도록 안정화제들 (stabilizers), 완충제들 (buffering agents), 충전제들 (bulking agents), 및 표면활성제들 (surfactants)과 같은 부형제들 또는 기타 다른 성분들의 적절한 선택을 포함한다. 동결건조를 위한 제형물은 동결보호제들 (lyoprotectants) 또는 안정화제들, 완충액들, 충전제들, 등장성 제제들 및 표면활성제들을 포함하는 하나 이상의 추가적인 성분들을 포함할 수 있다.

[0128] 관심있는 물질 및 추가적인 성분들이 다함께 혼합된 이후, 제형물은 동결건조된다. 일반적으로, 동결건조는 세 가지 단계: 냉동, 일차 건조 및 이차 건조를 포함한다. 냉동은 물을 얼음으로 또는 일정 무정형 제형물 성분들을 결정 형태로 전환하는 데 필요하다. 일차 건조는 얼음이 낮은 압력 및 온도에서 직접적인 승화에 의해 냉동된 산물로부터 제거되는 공정 단계이다. 이차 건조는 남아있는 물의 증발 표면으로의 확산을 이용하여 부착된 물을 산물 기질로부터 제거하는 공정 단계이다. 이차 건조 동안 산물 온도는 정상적으로 일차 건조 동안보다 더 높다. Tang X. et al. (2004) "Design of 냉동-drying processes for pharmaceuticals: Practical advice," *Pharm. Res.*, 21:191-200; Nail S.L. et al. (2002) "Fundamentals of 냉동-drying," in Development and manufacture of protein pharmaceuticals. Nail S.L. editor New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp 281-353; Wang et al. (2000) "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals," *Int. J. Pharm.*, 203:1-60; Williams N.A. et al. (1984) "The lyophilization of pharmaceuticals; A literature review." *J. Parenteral Sci. Technol.*, 38:48-59을 참고하라. 일반적으로, 동결건조 공정이라면 모두가 본 발명과 연결하여 사용될 수 있다.

[0129] 일정 구현예들에서, 아닐링 (annealing) 단계가 산물의 초기 냉동기간 동안 도입될 수 있다. 아닐링 단계는 전반적인 순환 시간을 감소시킬 수 있다. 이론이라면 모두에 집착하려고 않더라도, 아닐링 단계는 초저온화 (supercooling) 동안 형성되는 작은 결정들의 결정화로 인해 부형제 결정화 및 더 큰 얼음 결정들의 형성을 촉진시키도록 도울 수 있고, 이는 다음으로 재구성을 개선시킨다. 전형적으로, 아닐링 단계는 냉동기간 동안 온도에서 간격 또는 진동을 포함한다. 예를 들어, 냉동 온도는 -40 ℃일 수 있고, 아닐링 단계는 온도를, 예를 들어 -10 ℃로 증가시키고 본 온도를 설정 기간 동안 유지할 것이다. 아닐링 단계는 0.5시간부터 8시간 (예로, 0.5, 1.0 1.5, 2.0, 2.5, 3, 4, 6, 및 8시간)까지의 범위일 수 있다. 아닐링 온도는 냉동 온도 및 0 ℃사이의 범위일 수 있다.

[0130] 동결건조는 튜브, 백, 병, 선반, 바이알 (예로, 유리 바이알), 주사기, 또는 기타 적합한 용기들과 같은 용기

내에서 수행될 수 있다. 용기들은 일회용일 수 있다. 동결건조는 대규모 또는 소규모로도 역시 수행될 수 있다. 예를 들어, 운반 단계를 피하도록 단백질의 재구성이 수행될 용기에서 단백질 제형물을 동결건조하는 것이 바람직할 수 있다. 본 경우에, 용기는 예를 들어 3, 4, 5, 10, 20, 50 또는 100 cc 바이알일 수 있다.

[0131] 본 목적으로, 헐 파일럿 스케일 건조기 (Hull pilot scale dryer, SP Industries, USA), 제네시스 (Genesis, SP Industries) 연구실 동결건조기들 또는 주어진 동결건조공정 변수들을 조절할 수 있는 냉동-건조기들이라면 모두와 같은 많은 서로 다른 동결건조기들이 사용가능하다. 냉동-건조는 제형물을 냉동시키고 연속하여 일차 건조에 적합한 온도에서 냉동된 내용물로부터 얼음을 승화시켜서 달성된다. 초기 냉동은 제형물을 전형적으로 단지 약 4시간 (예로, 단지 약 3시간, 단지 약 2.5시간, 단지 약 2시간)에 약 -20 ℃ (예로, -50 ℃, -45 ℃, -40 ℃, -35 ℃, -30 ℃, -25 ℃ 등) 미만 온도로 도달시킨다. 본 조건 하에서, 산물 온도는 전형적으로 제형물의 공융점 (eutectic point) 또는 붕괴 온도 미만이다. 전형적으로, 일차 건조를 위한 보관 온도는 전형적으로 약 20부터250 mTorr까지 범위의 적합한 압력에서 약 -30부터 25 ℃까지 (일차 건조 동안 용융점 미만으로 남아있는 경우)의 범위일 것이다. 제형물, 시료를 담는 용기의 크기 및 유형 (예로, 유리 바이알) 또한 액체 부피는 주로 건조에 요구되는 시간을 진술할 것이고, 이는 수 시간부터 여러 날까지의 범위일 수 있다. 이차 건조 단계는 먼저 용기의 유형 및 크기 또한 적용되는 치료 단백질의 유형에 의존하여, 약 0-60℃에서 수행된다. 다시, 액체 부피는 주로 건조에 요구되는 시간을 진술할 것이고, 이는 수 시간부터 여러 날까지의 범위일 수 있다.

[0132] 일반적인 제안으로서, 동결건조는 그의 수분 함량이 약 5% 이하, 약 4% 이하, 약 3% 이하, 약 2% 이하, 약 1% 이하, 및 약 0.5% 이하인 동결건조된 제형물을 만들 것이다.

[0133] 재구성

[0134] 본 발명의 약제학적 조성물들이 개체에게 투여 시 일반적으로 수성의 형태인 한편, 일정 구현예들에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 동결건조된다. 이러한 조성물들은 개체에게 투여 이전에 이에 하나 이상의 희석제들을 첨가하여 재구성되어야 한다. 원하는 단계에서, 전형적으로 환자에게 투여 이전 적절한 시간에, 동결건조된 제형물은 재구성된 제형물에서 단백질 농도가 바람직할 수 있도록 희석제를 사용하여 재구성될 수 있다.

[0135] 다양한 희석제들이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 일정 구현예들에서, 재구성에 적합한 희석제는 물이다. 희석제로 사용되는 물은 역삼투 (reverse osmosis), 증류 (distillation), 탈이온화 (deionization), 여과들 (filtrations) (예로, 활성화 탄소, 미세여과, 나노여과) 및 이들 처리 방법들의 조합들을 포함하는 다양한 방식들로 처리될 수 있다. 일반적으로, 물은, 이에 제한되는 것은 아니지만 주사용 무균수 또는 정균수 (bacteriostatic water)를 포함하여 주사에 적합해야 한다.

[0136] 추가적인 대표적 희석제들로는 pH 완충된 용액 (예로 포스페이트-완충 식염수), 무균 식염수 용액, 엘리어트 용액 (Elliot뭡 solution), 링거액 (Ringer's solution) 또는 덱스트로스 용액을 포함한다. 적합한 희석제들은 임의적으로 보존제를 포함할 수 있다. 대표적인 보존제들은 벤질 또는 페닐 알코올과 같은 방향족 알코올들을 포함한다. 적용되는 보존제의 양은 단백질 및 보존제 효능 시험과 합치되는 서로 다른 보존제 농도들을 조사하여 결정된다. 예를 들어, 보존제가 방향족 알코올 (벤질 알코올과 같음)인 경우라면, 약 0.1-2.0%로부터, 약 0.5-1.5%로부터, 또는 약 1.0-1.2%로부터 나온 양으로 존재할 수 있다.

[0137] 본 발명에 적합한 희석제들은, 이에 제한되는 것은 아니지만 pH 완충제들 (예로, 트리스, 히스티딘), 염들 (예로, 염화나트륨), 및 상기에 기술된 것들 (예로, 안정화제들, 등장성 제제들)을 포함하는 기타 다른 첨가제들 (예로, 슈크로스)를 포함하는 다양한 첨가제들을 포함할 수 있다.

[0138] 본 발명에 따르면, 동결건조된 물질 (예로, 단백질)은 적어도 25 mg/ml (예로, 적어도 50 mg/ml, 적어도 75 mg/ml, 적어도 100 mg/ml)의 농도로 재구성될 수 있다. 일정 구현예들에서, 동결건조된 물질 (예로, 단백질)은 약 1 mg/ml부터 100 mg/ml까지 (예로, 약 1 mg/ml부터 50 mg/ml까지, 약 1 mg/ml부터 100 mg/ml까지, 약 1 mg/ml부터 5 mg/ml까지, 약 1 mg/ml부터 10 mg/ml까지, 약 1 mg/ml부터 25 mg/ml까지, 약 1 mg/ml부터 75 mg/ml까지, 약 10 mg/ml부터 30 mg/ml까지, 약 10 mg/ml부터 50 mg/ml까지, 약 10 mg/ml부터 75 mg/ml까지, 약 10 mg/ml부터 100 mg/ml까지, 약 25 mg/ml부터 50 mg/ml까지, 약 25 mg/ml부터 75 mg/ml까지, 약 25 mg/ml부터 100 mg/ml까지, 약 50 mg/ml부터 75 mg/ml까지, 약 50 mg/ml부터 100 mg/ml까지)의 농도로 재구성될 수 있다. 일정 구현예들에서, 재구성된 제형물에서 단백질의 농도는 전-동결건조 제형물에서의 농도보다 더 높을 수 있다. 재구성된 제형물에서의 높은 단백질 농도들은 특히 재구성된 제형물의 피하 또는 근육내 전달이 의도되는 곳에서 유용한 것으로 고려된다. 일정 구현예들에서, 재구성된 제형물에서 단백질의 농도는 전-동결건조 제형물

의 약 2-50배 (예로, 약 2-20배, 약 2-10배, 또는 약 2-5배)일 수 있다. 일정 구현예들에서, 재구성된 제형물에서 단백질의 농도는 전-동결건조 제형물의 적어도 약 2배 (예로, 적어도 약 3배, 4배, 5배, 10배, 20배, 40배)일 수 있다.

[0139] 본 발명에 따른 재구성은 용기라면 모두에서 수행될 수 있다. 본 발명에 적합한 대표적인 용기들로는, 이에 제한되는 것은 아니지만 튜브들, 바이알들, 주사기들 (예로, 단일-체임버 또는 이중-체임버), 백들, 병들, 및 선반들을 포함한다. 적합한 용기들은 유리, 플라스틱, 금속과 같은 물질들이라면 모두로 만들어질 수 있다. 용기들은 일회용이거나 재사용가능할 수 있다. 재구성은 대규모 또는 소규모로도 역시 수행될 수 있다.

[0140] 일정 경우들에서, 운반 단계를 피하도록 단백질의 재구성이 수행될 용기에서 단백질 제형물을 동결건조하는 것이 바람직할 수 있다. 본 경우에, 용기는 예를 들어 3, 4, 5, 10, 20, 50 또는 100 cc 바이알일 수 있다. 일정 구현예들에서, 동결건조 및 재구성에 적합한 용기는 이중 체임버 주사기 (예로, Lyo-Ject®(Vetter) 주사기들)이다. 예를 들어, 이중 체임버 주사기는 동결건조 물질 및 희석제 둘 다를 정지기 (stopper)로 분리된 각각 별도의 체임버에 포함할 수 있다 (실시예 5 참조). 재구성하기 위하여, 플런저 (plunger)가 희석제 측면에서 정지기에 부착될 수 있고 눌러서 희석제를 산물 체임버 내로 이동시키며, 결과적으로 희석제는 냉동건조 물질과 접촉할 수 있고 재구성이 본 명세성에서 기술된 바와 같이 일어날 수 있다 (실시예 5 참조).

[0141] 본 발명의 약제학적 조성물들, 제형물들 및 관련 방법들은 개체의 CNS로 (예로, 경막내, 뇌실내 또는 대수공내) 다양한 치료제들을 전달하는 데 또한 연관된 질환들의 치료에 유용하다. 본 발명의 약제학적 조성물은 특히 리소좀 축적병들을 앓고 있는 개체들에게 단백질들 및 효소들을 전달하는 데 (예로, 효소 대체 요법) 유용하다. 리소좀 축적병들은 리소좀 기능의 결함들로부터 유발되는 비교적 희귀한 유전되는 대사 장애들의 그룹을 말한다. 리소좀 질환들은 리소좀들 내에 미소화된 거대분자들의 축적을 특징으로 하고, 이러한 리소좀들의 크기 및 수의 증가 또한 궁극적으로는 세포성 기능장애 및 임상적 이상들을 유발한다.

[0142] **CNS 전달**

[0143] 본 명세서에서 기술된 다양한 안정한 제형물들은 일반적으로 치료제들의 CNS 전달에 적합한 것으로 참작된다. 본 발명에 따른 안정한 제형물들은, 이에 제한되는 것은 아니지만 실질내, 대뇌내, 대뇌 측실내 (ICV), 경막내 (예로, IT-요추, IT-대수공) 투여들을 포함하는 다양한 기법들 및 경로들 또한 CNS 및/또는 CSF로 직접 또는 간접 주사하는 기타 다른 기법들 및 경로들에 의한 CNS 전달에 사용될 수 있다.

[0144] ***경막내 전달***

[0145] 일정 구현예들에서, 대체 효소는 본 명세서에서 기술된 제형물에 넣어 CNS로 전달된다. 일정 구현예들에서, 대체 효소는 치료를 필요로 하는 개체의 뇌척수액 (CSF) 내로 투여되어 CNS로 전달된다. 일정 구현예들에서, 경막내 투여는 원하는 대체 효소 (예로, ASA 단백질)을 CSF 내로 전달하는 데 사용된다. 본 명세서에서 사용되는 바, 경막내 투여 (경막내 주사라고도 말함)은 척수관 (척수 주위의 경막내 공간) 내로의 주사를 말한다. 다양한 기법들이, 제한되지 않고 천두공 또는 대수조 또는 요추 천자 (puncture) 등을 통한 측뇌실 주사를 포함하여 사용될 수 있다. 대표적인 방법들은 Lazorthes et al. Advances in Drug Delivery Systems and Applications in Neurosurgery, 143-192 and Omaya et al., Cancer Drug Delivery, 1: 169-179에 기술되어 있고, 그의 내용들은 본 명세서에서 참고문헌으로 통합되어 있다.

[0146] 본 발명에 따르면, 효소는 척수관을 감싸는 부위라면 모두에 주사될 수 있다. 일정 구현예들에서, 효소는 요추 영역 또는 대수공 내로 또는 대뇌 측실 공간 내에 뇌측내 주사된다. 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "요추 부위" 또는 "요추 영역"은 세 번째 및 네 번째 요추 (등쪽 하부) 사이의 영역, 보다 자세하게는 척추 (spine)의 L2-S1 부위를 말한다. 전형적으로, 요추 부위 또는 요추 영역을 통한 경막내 주사는 "요추 IT 전달" 또는 "요추 IT 투여"라고도 말한다. 용어 "대수공"은 두개골 및 척수의 첨단 사이의 구멍을 통한 소뇌 주변 또는 아래의 공간을 말한다. 전형적으로, 대수공을 통한 경막내 주사는 "대수공 전달"이라고도 말한다. 용어 "대뇌 측실"은 척수의 중앙관과 연속되는 뇌에서의 공동들을 말한다. 전형적으로, 대뇌 측실 공동들을 통한 주사들은 대뇌 측실내 (ICV) 전달이라고 말한다.

[0147] 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 "경막내 투여" 또는 "경막내 전달"은 요추 IT 투여 또는 전달, 예를 들어 세 번째 및 네 번째 요추 (등쪽 하부) 사이, 보다 자세하게는 척추 (spine)의 L2-S1 부위로 전달되는 것을 말한다. 요추 IT 투여 또는 전달은 우리 발명에 따른 요추 IT 투여 또는 전달이 말단 척수관으로 더 나은 더욱 효과적인 전달을 제공하는 한편, 대수공 전달은 무엇보다도 전형적으로 말단 척수관으로 잘 전달되지 못하는 점에서

대수공 전달과는 차별되는 것으로 고려된다.

[0148] 경막내 전달을 위한 장치

[0149] 다양한 장치들이 본 발명에 따른 경막내 전달에 사용될 수 있다. 일정 구현예들에서, 경막내 투여장치는 체액 유입 포트; 체액 유입 포트와 액체 소통하는 첫 번째 유동 입구 및 척수 내로의 삽입을 위해 형성된 두 번째 유동 입구를 가지는 공동체; 또한 척수에서 공동체의 삽입을 보장하는 안전 기작:을 포함한다. 도 62에 나타난 비-제한적인 예로서, 적합한 안전 기작은 공동체가 척수로부터 벗어나는 것을 막도록 공동체의 표면 위에 올려진 하나 이상의 돌기들 및 하나 이상의 돌기들 위로 조절가능한 연결된 고리를 포함한다. 다양한 구현예들에서, 체액 유입 포트는 저장조를 포함한다. 일정의 구현예들에서, 체액 유입 포트는 기계적인 펌프 (예로, 주입 펌프)를 포함한다. 일정 구현예들에서, 이식된 카테터는 저장조 (예로, 일시 주사용), 또는 주입 펌프 둘 중 하나로 연결된다. 액체 유입 포트는 이식되어 있거나 외부에 있을 수 있다.

[0150] 일정 구현예들에서, 경막내 투여는 요추 천자 (예로, 저속 볼루스)에 의해 또는 포트-카테터 전달 시스템 (예로, 주입 또는 볼루스)를 통해 수행될 수 있다. 일정 구현예들에서, 카테터는 요추 판들 (laminae) 사이에 삽입되고 말단은 원하는 수준 (일반적으로 L3-L4)까지 경막 공간 위로 올려진다 (threaded up) (도 63).

[0151] 전형적으로 정맥내 투여와 대비하여, 경막내 투여에 적합한 단일 용량 부피는 적다. 전형적으로, 본 발명에 따른 경막내 전달은 CSF조성물의 균형뿐만 아니라 개체의 구개골내 압력을 유지시킨다. 일정 구현예들에서, 경막내 전달은 개체로부터 해당하는 CSF 제거 없이 수행된다. 일정 구현예들에서, 적합한 단일 용량은, 예로 약 10 ml, 8 ml, 6 ml, 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1.5 ml, 1 ml, 또는 0.5 ml일 수 있다. 일정 구현예들에서, 적합한 단일 용량 부피는 약 0.5-5 ml, 0.5-4 ml, 0.5-3 ml, 0.5-2 ml, 0.5-1 ml, 1-3 ml, 1-5 ml, 1.5-3 ml, 1-4 ml, 또는 0.5-1.5 ml일 수 있다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 경막내 투여는 먼저 원하는 양의 CSF를 제거하는 단계가 관여한다. 일정 구현예들에서, 약 10 ml 이하 (예로, 약 9 ml, 8 ml, 7 ml, 6 ml, 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml 이하)의 CSF가 IT 투여 이전에 먼저 제거된다. 이들 경우들에서, 적합한 단일 용량 부피는, 예로 약 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml, 또는 20 ml 이상이다.

[0152] 다양한 다른 장치들이 치료적 조성물의 경막내 투여에 효과를 주도록 사용될 수 있다. 예를 들어, 원하는 효소들을 포함하는 제형물들이 수막성 암종증 (meningeal carcinomatosis)을 위한 약물들을 경막내 투여하는 데 공통적으로 사용되는 오마야 저장조 (Ommaya reservoir)를 사용하여 주어질 수 있다 (Lancet 2: 983-84, 1963). 보다 상세하게, 본 방법에서는 뇌실 튜브가 전방각 (anterior horn)에 형성되는 구멍을 통해 삽입되고 두피 하에 설치된 오마야 저장조로 연결되며, 저장조는 들어있는 특정한 효소를 경막내 전달하도록 피하적으로 천자된다. 개인에게 치료적 조성물들 또는 제형물들의 경막내 투여를 위한 다른 장치들이 본 명세서에서 참고문헌으로 통합되어 있는 미국 특허 제 6,217,552호에 기술되어 있다. 임의적으로, 약물은 예를 들어 단일 주사 또는 연속식 주입에 의해 경막내로 주어질 수 있다. 투여량 치료 (dosage treatment)는 단일 용량 투여 또는 다중 용량들의 형태일 수 있다.

[0153] 주사의 경우, 본 발명의 제형물들은 액체 용액들로 제형화될 수 있다. 또한, 효소는 고형으로 제형화되어 사용 바로 직전에 재-용해되거나 현탁될 수 있다. 동결건조된 형태들도 역시 포함된다. 예를 들어, 주사는 효소의 일시 주사 또는 연속식 주입 (예로, 주입 펌프들을 사용함)의 형태일 수 있다.

[0154] 본 발명의 한 가지 구현예에서, 효소는 개체의 뇌 내로 측뇌실 주사 (lateral cerebro ventricular injection)에 의해 투여된다. 예를 들어, 주사는 개체의 두개골 내에 만들어진 천두공을 통하여 이루어진다. 또 다른 구현예들에서, 효소 및/또는 다른 약제학적 제형물은 개체의 뇌실 내로 외과적으로 삽입된 지름길 (shunt)을 통하여 투여된다. 예를 들어, 주사는 더 큰 뇌실들 내로 이루어진다. 일정 구현예들에서, 세 번째 및 네 번째로 작은 뇌실들 내로의 주사도 역시 이루어진다.

[0155] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명에 사용되는 약제학적 조성물은 개체의 대수조 또는 요추 영역 내로의 주사에 의해 투여된다.

[0156] 본 발명의 방법의 또 다른 구현예에서, 약제학적으로 허용가능한 제형물은 지속적인 전달, 예로 본 발명에 사용되는 효소 또는 다른 약제학적 조성물의 "저속 방출 (slow release)"을 개체에게 약제학적으로 허용가능한 제형물이 개체에게 투여된 이후 적어도 1, 2, 3, 4주 이상의 기간 동안 제공한다.

[0157] 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "지속적인 전달 (sustained delivery)"은 투여에 이어지는 초과기간, 바람직

하게 적어도 수 일, 한 주 또는 수 주 동안 생체내 (*in vivo*)에서 본 발명의 약제학적 제형물의 연속적인 전달을 말한다. 조성물의 지속적인 전달은 예를 들어 초과기간 동안 효소의 계속되는 치료적 효과에 의해 확인될 수 있다 (예로, 효소의 지속적인 전달은 개체에서 축적 과립들의 계속적인 감소량에 의해 확인될 수 있다). 임의적으로, 효소의 지속적인 전달은 초과기간 동안 *생체내* 효소의 존재를 검출하여 확인될 수 있다.

[0158] ***표적 조직들로의 전달***

[0159] 상기에서 논의된 바와 같이, 본 발명의 놀랍고도 중요한 특징들의 하나는 치료제들, 상세하게는 본 발명의 발명적 방법들 및 조성물을 사용하여 투여된 대체 효소들이 뇌 표면을 거쳐서 효과적으로 또는 광범위하게 확산되고 깊은 뇌의 부위들을 포함하는 뇌의 다양한 층들 또는 부위들을 침투하는 점이다. 또한, 본 발명의 발명적 방법들 및 조성물들은 치료제들 (예로, ASA 효소)을 ICV 주사와 같은 기존의 CNS 전달 방법들에 의해 표적하는 것이 어려운 다양한 조직들, 뉴런들 또는 요추 부위를 포함하는 뇌척수의 세포들로 효과적으로 전달시킨다. 또한, 본 발명의 발명적 방법들 및 조성물들은 혈류 및 다양한 말초 기관들 및 조직들로 충분량의 치료제들 (예로, ASA 효소)을 전달시킨다.

[0160] 따라서, 일정 구현예들에서, 치료적 단백질 (예로, ASA 효소)은 개체의 중추신경계로 전달된다. 일정 구현예들에서, 치료적 단백질 (예로, ASA 효소)은 뇌, 척수 및/또는 말초 기관들의 하나 이상의 표적 조직들로 전달된다. 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "표적 조직들 (target tissues)"은 치료될 리소좀 축적병에 의해 영향을 받는 조직이라면 모두 또는 결핍 리소좀 효소가 정상적으로 발현되는 조직이라면 모두를 말한다. 일정 구현예들에서, 표적 조직들은 리소좀 축적병을 앓거나 이에 취약한 환자들에서 효소 기질, 예를 들어 조직의 세포성 리소좀들에 축적된 것의 검출가능하거나 비정상적으로 많은 양이 존재하는 이들 조직들을 포함한다. 일정 구현예들에서, 표적 조직들은 질환-연관된 병리학, 증상 또는 특징을 나타내는 이들 조직들을 포함한다. 일정 구현예들에서, 표적 조직들은 결핍 리소좀 효소가 올라간 수준으로 정상적으로 발현되는 이들 조직들을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바, 표적 조직인 뇌 표적 조직, 척수 표적 조직 및/또는 말초 표적 조직일 수 있다. 대표적인 표적 조직들은 하기에 상술되고 있다.

[0161] 뇌 표적 조직들

[0162] 일반적으로, 뇌는 서로 다른 부위들, 층들 및 조직들로 구분될 수 있다. 예를 들어, 뇌척수막 조직은 뇌를 포함하는 중추신경계를 감싸는 막들의 시스템이다. 뇌척수막들은 경질막, 거미막 및 연질막을 포함하는 세 가지의 층들을 포함한다. 일반적으로, 뇌척수막 및 뇌척수액의 일차적인 기능은 중추신경계를 보호하는 것이다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 치료적 단백질은 뇌척수막들의 하나 이상의 층들로 전달된다.

[0163] 뇌는 대뇌 (cerebrum), 소뇌 (cerebellum), 및 뇌줄기 (brain stem)를 포함하는 세 가지의 일차 소구분들을 가진다. 대뇌 반구들 (cerebral hemispheres)는 대부분의 기타 뇌 구조들의 위에 위치하고 피질층 (cortical layer)으로 덮혀있다. 뇌줄기는 대뇌가 부착되는 줄기와 유사하고 대뇌 아래에 놓여있다. 뇌의 후반구에는, 소뇌가 대뇌 아래 및 뇌줄기 뒤에 있다.

[0164] 뇌의 중간선 근처에 또한 중뇌 (mesencephalon) 위에 위치하는 간뇌 (diencephalon)는 시상 (thalamus), 시상후부 (metathalamus), 시상 하부 (hypothalamus), 시상 상부 (epithalamus), 시상 전부 (prethalamus), 및 덮개 전부 (pretectum)를 포함한다. 중간뇌라고도 불리는 중뇌는 덮개 (tectum), 뒷판 (tegumentum), 뇌실 중배강 (ventricular mesocoelia), 및 대뇌다리 (cerebral peduncels), 적색핵, 및 뇌신경 the red nucleus, III 핵을 포함한다. 중뇌는 시각, 청각, 운동 조절, 수면/기상, 각성 및 온도 조절과 연관되어 있다.

[0165] 뇌를 포함하는 중추신경계의 조직들의 부위들은 조직의 깊이를 기초로 하여 특징지어진다. 예를 들어, CNS (예로, 뇌) 조직들은 표면 또는 얕은 조직들, 중간-깊이 조직들, 및/또는 깊은 조직들로서 특징지어진다.

[0166] 본 발명에 따르면, 치료제 (예로, 대체 효소)는 개체에서 치료될 특정한 질환과 연관된 적절한 뇌 표적 조직(들)이라면 모두로 전달될 수 있다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 치료제 (예로, 대체 효소)는 표면 또는 얕은 뇌 표적 조직으로 전달된다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 치료제는 중간-깊이 뇌 표적 조직으로 전달된다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 치료제는 깊은 뇌 표적 조직으로 전달된다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 치료제는 표면 또는 얕은 뇌 표적 조직, 중간-깊이 뇌 표적 조직, 및/또는 깊은 뇌 표적 조직의 조합으로 전달된다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 치료제는 뇌의 외부 표면 아래로 (또는 내부로)

적어도 4 ㎜, 5 ㎜, 6 ㎜, 7 ㎜, 8 ㎜, 9 ㎜, 또는 10 ㎜ 이상의 깊은 뇌 표적 조직으로 전달된다.

[0167] 일정 구현예들에서, 치료제들 (예로, 효소들)은 대뇌의 표면 또는 얕은 조직들의 하나 이상으로 전달된다. 일정 구현예들에서, 대뇌의 표적된 표면 또는 얕은 조직들은 대뇌의 표면으로부터 4 ㎜ 이내에 위치한다. 일정 구현예들에서, 대뇌의 표적된 표면 또는 얕은 조직들은 연질막 조직들, 대뇌 피질 리본 조직들, 해마, 버코우 로빈 공간 (Virchow Robin space), VR 공간 내의 혈관들, 해마, 뇌의 하부 표면 상의 시상하부의 일부들, 시신경들 및 관들, 후각 망울 및 돌출부들, 또한 그들의 조합으로부터 선택된다.

[0168] 일정 구현예들에서, 치료제들 (예로, 효소들)은 하나 이상의 대뇌의 깊은 조직들로 전달된다. 일정의 구현예들에서, 표적된 표면 또는 얕은 조직들은 대뇌의 표면 아래로 (또는 내부로) 4 ㎜ (예로, 5 ㎜, 6 ㎜, 7 ㎜, 8 ㎜, 9 ㎜, 또는 10 ㎜)에 위치한다. 일정 구현예들에서, 대뇌의 표적된 깊은 조직들은 대뇌 피질 리본을 포함한다. 일정 구현예들에서, 대뇌의 표적된 깊은 조직들은 하나 이상의 간뇌 (예로, 시상하부, 시상, 시상 전부, 시상 아래부 등), 후뇌, 렌즈핵 (lentiform nuclei), 기저 신경절 (basal ganglia), 미상엽 (caudate), 조가비핵 (putamen), 편도핵 (amygdale), 창백핵 (globus pallidus), 및 그들의 조합을 포함한다.

[0169] 일정 구현예들에서, 치료제들 (예로, 효소들)은 소뇌의 하나 이상의 조직들로 전달된다. 소정의 구현예들에서, 소뇌의 표적된 하나 이상의 조직들은 분자층 의 조직들, 퍼킨지 세포층 (Purkinje cell layer), 과립 세포층 (granular cell layer)의 조직들, 대뇌다리, 및 그들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일정 구현예들에서, 치료제들 (예로, 효소들)은, 이에 제한되는 것은 아니지만 퍼킨지 세포층의 조직들, 과립 세포층의 조직들, 깊은 소뇌 백색질 조직 (예로, 과립 세포층에 대비하여 깊음), 및 깊은 소뇌 핵 조직을 포함하는 소뇌의 하나 이상의 깊은 조직들로 전달된다.

[0170] 일정 구현예들에서, 치료제들 (예로, 효소들)은 뇌줄기의 하나 이상의 조직들로 전달된다. 일정의 구현예들에서, 뇌줄기의 표적된 하나 이상의 조직들은 뇌 줄기 백색질 조직 및/또는 뇌줄기 핵 조직을 포함한다.

[0171] 일정 구현예들에서, 치료제들 (예로, 효소들)은, 이에 제한되는 것은 아니지만 회색질, 백색질, 뇌실주위 영역들, 연질-거미막, 뇌척수막, 신생피질 (neocortex), 소뇌, 대뇌 피질에서의 깊은 조직들, 분자층, 미상엽/조가비핵 부위, 중간뇌, 교뇌 (pons) 또는 연수 (medulla)의 깊은 부위들, 및 그들의 조합을 포함하는 다양한 뇌 조직들로 전달된다.

[0172] 일정 구현예들에서, 치료제들 (예로, 효소들)은, 이에 제한되는 것은 아니지만 뉴런들. 아교세포들, 혈관주위 세포들 및/또는 뇌척수막 세포들을 포함하는 다양한 세포들로 전달된다. 일정 구현예들에서, 치료적 단백질은 깊은 백색질의 희소돌기아교세포들 (oligodendrocytes)로 전달된다.

[0173] 척수

[0174] 일반적으로, 척수의 부위들 또는 조직들은 조직들의 깊이를 기초로 하여 특징지어질 수 있다. 예를 들어, 척수 조직들은 표면 또는 얕은 조직들, 중간-깊이 조직들, 및/또는 깊은 조직들로서 특징지어질 수 있다.

[0175] 일정 구현예들에서, 치료제들 (예로, 효소들)은 척수의 하나 이상의 표면 또는 얕은 조직들로 전달된다. 일정 구현예들에서, 척수의 표적된 표면 또는 얕은 조직은 척수의 표면으로부터 4 ㎜ 이내에 위치한다. 일정 구현예들에서, 척수의 표적된 표면 또는 얕은 조직은 연질막 및/또는 백색질의 관들을 포함한다.

[0176] 일정 구현예들에서, 치료제들 (예로, 효소들)은 척수의 하나 이상의 깊은 조직들로 전달된다. 일정 구현예들에서, 척수의 표적된 깊은 조직은 척수의 표면으로부터 4 ㎜ 내부에 위치한다. 일정 구현예들에서, 척수의 표적된 깊은 조직은 척수 회색질 및/또는 뇌실막 세포들을 포함한다.

[0177] 일정 구현예들에서, 치료제들 (예로, 효소들)은 척수의 뉴런들로 전달된다.

[0178] 말초 표적 조직들

[0179] 본 명세서에서 사용되는 바, 말초 기관들 또는 조직들은 중추신경계 (CNS)의 일부가 아닌 기관들 또는 조직들이라면 모두를 말한다. 말초 표적 조직들은, 이에 제한되는 것은 아니지만 간, 신장, 및/또는 심장, 내피세포, 골수 및 세포들로부터 유래한 골수, 비장, 폐, 림프절, 뼈 및 연골, 난소 및 정소를 포함할 수 있다. 일정 구현예

들에서, 본 발명에 따른 치료적 단백질 (예로, 대체 효소)는 하나 이상의 말초 표적 조직들로 전달된다.

[0180] ***생물분배 및 생물 유용성***

[0181] 다양한 구현예들에서, 일단 표적 조직으로 전달되면 치료제 (예로, ASA 효소)는 세포내에 정착된다. 예를 들어, 치료제 (예로, 효소)는 표적 세포 (예로, 퍼킨지 세포들과 같은 뉴런들)의 액손들, 축삭들, 리소좀들, 미토콘드리아 또는 소포들에 정착될 수 있다. 예를 들어, 일정 구현예들에서 경막내-투여된 효소들은 전위 역학 (translocation dynamics)을 나타내어 효소는 혈관 주위 공간 내에서 움직인다 (예로, 박동성 전도 기작들 (pulsation-assisted convective mechanisms)에 의함). 또한, 투여된 단백질 또는 효소의 신경섬유 (neurofilaments)와 연결과 관련된 활동성 축삭 전달기작들도 역시 중축신경계의 심부 조직들 내로 경막내-투여된 단백질들 또는 효소들의 분배에 기여하거나 다른 경우라면 이를 용이하게 할 수 있다.

[0182] 일정 구현예들에서, 본 발명에 따라 전달된 치료제 (예로, ASA 효소)는 본 명세서에서 기술된 다양한 표적 조직들에서 치료적 또는 임상적 유효 수준들 또는 활성들을 달성할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바, 치료적 또는 임상적 유효 수준 또는 활성은 표적 조직에서 치료적 효과를 부여하는 데 충분한 수준 또는 활성이다. 치료적 효과는 객관적 (예로, 일정 테스트 또는 마커에 의해 측정가능함) 또는 주관적 (예로, 개체가 효과의 표시를 주거나 느낌)일 수 있다. 예를 들어, 치료적 또는 임상적 유효 수준 또는 활성은 표적 조직에서 질환과 연관된 증상들 (예로, GAG 축적)을 개선시키는 데 충분한 효소적 수준 또는 활성일 수 있다

[0183] 일정 구현예들에서, 본 발명에 따라 전달되는 치료제 (예로, 대체 효소)는 표적 조직에서 해당하는 리소좀 효소의 정상적인 수준 또는 활성의 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%가 되는 효소적 수준 또는 활성을 달성할 수 있다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 따라 전달되는 치료제 (예로, 대체 효소)는 대조군 (예로, 치료가 없는 내인성 수준들 또는 활성들)과 대비하여 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배로 증가되는 효소적 수준 또는 활성을 달성할 수 있다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 따라 전달되는 치료제 (예로, 대체 효소)는 표적 조직에서 적어도 대략 10 nmol/hr/mg, 20 nmol/hr/mg, 40 nmol/hr/mg, 50 nmol/hr/mg, 60 nmol/hr/mg, 70 nmol/hr/mg, 80 nmol/hr/mg, 90 nmol/hr/mg, 100 nmol/hr/mg, 150 nmol/hr/mg, 200 nmol/hr/mg, 250 nmol/hr/mg, 300 nmol/hr/mg, 350 nmol/hr/mg, 400 nmol/hr/mg, 450 nmol/hr/mg, 500 nmol/hr/mg, 550 nmol/hr/mg 또는 600 nmol/hr/mg로 증가된 효소적 수준 또는 활성을 달성할 수 있다.

[0184] 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 발명적 방법들은 상세하게 요추 부위를 표적하는 데 유용하다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 따라 전달되는 치료제 (예로, 대체 효소)는 요추 부위에서 적어도 대략 500 nmol/hr/mg, 600 nmol/hr/mg, 700 nmol/hr/mg, 800 nmol/hr/mg, 900 nmol/hr/mg, 1000 nmol/hr/mg, 1500 nmol/hr/mg, 2000 nmol/hr/mg, 3000 nmol/hr/mg, 4000 nmol/hr/mg, 5000 nmol/hr/mg, 6000 nmol/hr/mg, 7000 nmol/hr/mg, 8000 nmol/hr/mg, 9000 nmol/hr/mg, 또는 10,000 nmol/hr/mg로 증가된 효소적 수준 또는 활성을 달성할 수 있다.

[0185] 일반적으로, 본 발명에 따라 전달되는 치료제 (예로, 대체 효소)는 CSF 또한 뇌, 척수, 및 말초 기관들의 표적 조직들에서 충분하게 긴 반감기를 가진다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 따라 전달되는 치료제 (예로, 대체 효소)는 적어도 대략 30분, 45분, 60분, 90분, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 12시간, 16시간, 18시간, 20시간, 25시간, 30시간, 35시간, 40시간, 3일까지, 7일까지, 14일까지, 21일까지 또는 한 달까지의 반감기를 가질 수 있다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 따라 전달되는 치료제 (예로, 대체 효소)는 투여에 이어서12시간, 24시간, 30시간, 36시간, 42시간, 48시간, 54시간, 60시간, 66시간, 72시간, 78시간, 84시간, 90시간, 96시간, 102시간 또는 한 주 이후에 CSF 또는 혈류에서 검출가능한 수준 또는 활성을 보유할 수 있다. 검출가능한 수준 또는 활성은 당해 기술분야에 알려져 있는 다양한 방법들을 사용하여 결정될 수 있다.

[0186] 소정의 구현예들에서, 본 발명에 따라 전달되는 치료제 (예로, 대체 효소)는 투여에 이어서 (예로, 개체에게 약제학적 조성물의 경막내 투여에 이어서 한 주, 3일, 48시간, 36시간, 24시간, 18시간, 12시간, 8시간, 6시간, 4시간, 3시간, 2시간, 1시간, 30분 이하) 개체의 CNS 조직들 및 세포들에서 적어도 30ug/ml의 농도를 달성하고 있다. 소정의 구현예들에서, 본 발명에 따라 전달되는 치료제 (예로, 대체 효소)는 이러한 개체로의 투여에 이어서 (예로, 개체에게 약제학적 조성물의 경막내 투여에 이어서 한 주, 3일, 48시간, 36시간, 24시간, 18시간, 12시간, 8시간, 6시간, 4시간, 3시간, 2시간, 1시간, 30분 이하) 개체의 표적된 조직들 또는 세포들 (예로, 뇌 조직들 또는 뉴런들)에서 적어도 20ug/ml, 적어도 15ug/ml, 적어도 10ug/ml, 적어도 7.5ug/ml, 적어도

5ug/ml, 적어도 2.5ug/ml, 적어도 1.0ug/ml, 또는 적어도0.5ug/ml의 농도를 달성하고 있다.

[0187] ***이염색성 백색질장애 질환 (MLD)의 치료***

[0188] 이염색성 백색질장애 질환 (MLD)은 효소 아릴설파타제 A (ASA)의 결핍으로부터 유발되는 상염색체 열성 장애이다. 인간에서 ARSA에 의해 인코드되는 ASA는 세레브로사이드3-설페이트 또는 스핑고지질 3-O-설포갈락토실세라마이드 (설파타이드)를 세레브로사이드 및 설페이트로 분해하는 효소이다. 효소의 부재 시, 설파타이드들이 신경계 (예로, 미엘린초들, 뉴런들 및 교아세포들)에 또한 더 적은 정도로 내장 기관들에 축적된다. 이들 분자 및 세포 과정들의 결론은 임상적으로 심각한 운동 및 인지 기능이상을 동반하는 CNS 및 PNS 내의 진행성 탈미엘린화 및 축삭 소실이다.

[0189] 본 장애의 명확한 임상적 특징은 인지 손상 (예로, 무엇보다도 정신지체, 신경장애들 및 실명)을 유발하는 중추신경계 (CNS) 퇴화이다.

[0190] MLD는 침범된 아동은 전형적으로 생애 첫 해 (예로, 약 15내지 24개월)에 바로 증상들을 나타내고이 일반적으로 5세 연령을 넘어 생존하지 못하는, 어린 아동에서 그 소견을 나타낼 수 있다 (만기-소아 형태). MLD는 침범된 아동이 전형적으로 약 3 내지 1 내지 10세의 연령까지 인지 손상을 나타내고 수명은 다양할 수 있는 (예로, 증상들의 발생 이후 10 내지 15년의 범위에서), 아동에서 그 소견을 나타낼 수 있다 (청소년 형태). MLD는 어른들에서 그 소견을 나타낼 수 있고 (어른-발병 형태) 모든 연령대의 개인들에서 출현할 수 있으며 질환의 진행은 매우 다양해질 수 있다.

[0191] 본 발명의 조성물들 및 방법들은 MLD를 앓고 있거나 이에 취약한 개인들을 효과적으로 치료하는 데 사용될 수 있다. 용어들 "치료하다" 또는 "치료"는 질환과 연관된 하나 이상의 증상들의 개선, 질환의 하나 이상 증상들의 발병의 예방 또는 지연, 및/또는 질환의 하나 이상 증상들의 중증도 또는 빈도의 감소를 말한다. 대표적인 증상들은, 이에 제한되는 것은 아니지만 두개내압, 외수두증, 중앙 및 말초 신경계에 및 내장 기관들에 있는 미엘린초들에서 축적된 황화된 당지질들, CNS 및 PNS 내의 진행성 탈메엘린화 및 축삭 소실, 및/또는 운동 및 인지 기능이상을 포함한다.

[0192] 일정 구현예들에서, MLD 환자에서 신경학적 손상의 부분적 또는 완벽한 완화, 개선, 안정, 억제, 발병의 지연, 중증도 및/또는 발생의 감소를 말한다. 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "신경학적 손상 (neurological impairment)"은 중추신경계 (예로, 뇌 및 척수)의 손상과 연관된 다양한 증상들을 포함한다. 일정 구현예들에서, MLD의 다양한 증상들이 말초신경계 (PNS)의 손상과 연관되어 있다. 일정 구현예들에서, MLD 환자에서의 신경학적 손상은 총 운동 기능의 강하를 특징으로 한다. 총 운동 기능은 적절한 방법이라면 모두에 의해 평가될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 예를 들어, 일정 구현예들에서, 총 운동 기능은 총 운동 기능 척도-88 (GMFM-88) 전체 점수 그대로를 사용한 운동 기능의 기저선으로부터 나온 변화로서 측정된다.

[0193] 일정 구현예들에서, 치료는 다양한 조직들에서 감소된 설파타이드를 말한다. 일정 구현예들에서, 치료는 뇌 표적 조직들, 척수 뉴런들, 및/또는 말단 표적 조직들에서 감소된 설파타이드 축적을 말한다. 소정의 구현예들에서, 설파타이드 축적은 대조군과 대비하여 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 이상으로 감소된다. 일정 구현예들에서, 설파타이드 축적은 대조군과 대비하여 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배로 감소된다. 설파타이드 축적은 적절한 방법이라면 모두에 의해 측정될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 예를 들어, 일정 구현예들에서, 설파타이드 축적은 알시안 블루 염색에 의해 측정된다. 일정 구현예들에서, 설파타이드 축적은 LAMP-1 염색에 의해 측정된다.

[0194] 일정 구현예들에서, 치료는 뉴런들 (예로, 퍼킨지 세포들을 포함하는 뉴런들)에서 감소된 공포화 (vacuolization)를 말한다. 소정의 구현예들에서, 공포화는 대조군과 대비하여 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는100% 이상으로 감소된다. 일정 구현예들에서, 공포화는 대조군과 대비하여 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배로 감소된다.

[0195] 일정 구현예들에서, 치료는 다양한 조직들에서 증가된 ASA 효소 활성을 말한다. 일정 구현예들에서, 치료는 뇌 표적 조직들, 척수 뉴런들 및/또는 말초 표적 조직들에서 증가된 ASA 활성을 말한다. 일정 구현예들에서, ASA 효소 활성은 대조군과 대비하여 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 또는 1000% 이상으로 증

가된다. 일정 구현예들에서, ASA 효소 활성은 대조군과 대비하여 약 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배 증가된다. 일정 구현예들에서, 증가된 ASA 효소 활성은 적어도 대략 10 nmol/hr/mg, 20 nmol/hr/mg, 40 nmol/hr/mg, 50 nmol/hr/mg, 60 nmol/hr/mg, 70 nmol/hr/mg, 80 nmol/hr/mg, 90 nmol/hr/mg, 100 nmol/hr/mg, 150 nmol/hr/mg, 200 nmol/hr/mg, 250 nmol/hr/mg, 300 nmol/hr/mg, 350 nmol/hr/mg, 400 nmol/hr/mg, 450 nmol/hr/mg, 500 nmol/hr/mg, 550 nmol/hr/mg 또는 600 nmol/hr/mg 이상이다. 일정 구현예들에서, ASA 효소 활성은 요추 부위에서 또는 요추 부위에 있는 세포들에서 증가된다. 일정 구현예들에서, 요추 부위에서 증가된 ASA 효소 활성은 적어도 대략 2000 nmol/hr/mg, 3000 nmol/hr/mg, 4000 nmol/hr/mg, 5000 nmol/hr/mg, 6000 nmol/hr/mg, 7000 nmol/hr/mg, 8000 nmol/hr/mg, 9000 nmol/hr/mg 또는 10,000 nmol/hr/mg 이상이다.

[0196] 일정 구현예들에서, 치료는 인지 능력 상실의 진행 감소를 말한다. 소정의 구현예들에서, 인지 능력 상실의 진행은 대조군과 대비하여 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 이상으로 감소된다. 일정 구현예들에서, 치료는 감소된 발달 지연을 말한다. 소정의 구현예들에서, 발달 지연은 대조군과 대비하여 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 이상으로 감소된다.

[0197] 일정 구현예들에서, 치료는 증가된 생존 (예로, 생존 시간)을 말한다. 예를 들어, 치료는 환자의 증가된 수명 기대치를 가져올 수 있다. 일정 구현예들에서, 본 발명 에 따른 치료는 한 명 이상의 유사한 질환을 가진 대조군 개인들의 치료가 없는 평균 수명 기대치와 대비하여 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 100%, 약 105%, 약 110%, 약 115%, 약 120%, 약 125%, 약 130%, 약 135%, 약 140%, 약 145%, 약 150%, 약 155%, 약 160%, 약 165%, 약 170%, 약 175%, 약 180%, 약 185%, 약 190%, 약 195%, 또는 약 200% 이상으로 증가된 수명 기대치를 가져온다. 일정 구현예들에서, 본 발명 에 따른 치료는 한 명 이상의 유사한 질환을 가진 대조군 개인들의 치료가 없는 평균 수명 기대치와 대비하여 약 6개월, 약 7개월, 약 8개월, 약 9개월, 약 10개월, 약 11개월, 약 12개월, 약 2년, 약 3년, 약 4년, 약 5년, 약 6년, 약 7년, 약 8년, 약 9년, 또는 약 10년 이상으로 증가된 수명 기대치를 가져온다. 일정 구현예들에서, 본 발명 에 따른 치료는 환자의 강기 생존을 가져온다. 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "장기 생존 (long term survival)"은 40년, 45년, 50년, 55년, 또는 60년 이상보다 긴 수명 기대치의 생존 시간을 말한다.

[0198] 본 명세서에서 사용되는 바, 용어들 "개선하다", "증가하다" 또는 "감소하다"는 대조군과 대비한 수치들을 가리킨다. 일정 구현예들에서, 적합한 대조군은 본 명세서에서 기술된 치료의 개시 이전에 동일한 개인에서의 측정 또는 본 명세서에서 기술된 치료의 부재 시 대조군 개인에서의 측정과 같은 기저선 측정이다. "대조군 개인 (control individual)"은 (치료된 개인 및 대조군 개인(들)에서 질환의 단계들이 비교가능한 점을 입증하도록) 치료될 개인과 거의 동일한 연령 및/또는 성별인 동일한 형태의 MLD (예로, 만기-소아, 청소년, 또는 어른-발병 형태)를 앓고 있는 개인이다.

[0199] 치료된 개인 ("환자" 또는 "개체"라고도 말함)은 MLD를 가지거나 MLD가 생길 잠재력을 가지는 개인 (태아, 유아, 아동, 청소년, 또는 어른 인간)이다. 개인은 남아있는 내인성 ASA 발현 및/또는 활성을 가지거나, 측정가능한 활성을 전혀 가지지 않을 수 있다. 예를 들어, MLD를 가지는 개인은 정상적인 ASA 발현 수준들의 약 30 내지 50% 이하, 약 25 내지 50% 이하, 약 20 내지 25% 이하, 약 15 내지 20% 이하, 약 10 내지 15% 이하, 약 5 내지 10% 이하, 약 0.1 내지 5% 이하인 ASA 발현을 가질 수 있다.

[0200] 일정 구현예들에서, 개인은 최근에 질환으로 진단되었던 개인이다. 전형적으로, 조기 치료 (진단 이후 가능한 신속하게 시작한 치료)가 질환의 효과들을 최소화하고 치료의 유익들을 극대화하는 데 중요하다.

[0201] 면역 내성

[0202] 일반적으로, 본 발명에 따른 치료제 (예로, 대체 효소)의 경막내 투여는 개체에서 심각한 역효과들을 유발하지 않는다. 본 명세서에서 사용되는 바, 심각한 역효과들은, 이에 제한되는 것은 아니지만 실질적인 면역 반응, 독성, 또는 사망을 유도한다. 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "실질적인 면역 반응 (substantial immune response)"은 적응성 T-세포 면역 반응과 같은 중증 또는 심각한 면역 반응들을 말한다.

[0203] 따라서, 많은 구현예들에서 본 발명에 따른 발명적 방법들은 동시적인 면역억제 요법 (예로, 전-치료/전-조정 또는 본 방법과 평등한 것으로서 사용되는 면역억제 요법이라면 모두)이 관여하지 않는다. 일정 구현예들에서,

본 발명에 따른 발명적 방법들은 치료될 개인에서 면역 내성 유도가 관여하지 않는다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 발명적 방법들은 T-세포 면역억제제를 사용하는 개체의 전-치료 또는 전조정이 관여하지 않는다.

[0204] 일정 구현예들에서, 치료제들의 경막내 투여는 이들 제제들에 대한 면역 반응을 유발시킬 수 있다. 따라서, 일정 구현예들에서, 개체가 효소 대체 요법에 내성을 가지는 대체 효소를 수여하도록 하는 것이 유용할 수 있다. 면역 내성은 당해 기술분야에서 알려져 있는 다양한 방법들을 사용하여 유도될 수 있다. 예를 들어, 사이클로스포린 A (CsA)와 같은 T-세포 면역억제제 또한 아자티오프린 (azathioprine, Aza)와 같은 항증식제의 초기 30 내지 60일 섭생이 원하는 대체 효소의 저용량들의 매주 경막내 주입들과 조합하여 사용될 수 있다.

[0205] 당업자라면 숙지하고 있는 면역억제제라면 모두가 본 발명의 조합 요법과 함께 적용될 수 있다. 이러한 면역억제제들로는, 이에 제한되는 것은 아니지만 사이클로스포린 (cyclosporine), FK506, 라파마이신 (rapamycin), CTLA4-Ig, 및 에타너셉트 (etanercept)와 같은 항-TNF 제제들 (예로, Moder, 2000, Ann. Allergy Asthma Immunol. 84, 280-284; Nevins, 2000, Curr. Opin. Pediatr. 12, 146-150; Kurlberg et al., 2000, Scand. J. Immunol. 51, 224-230; Ideguchi et al., 2000, Neuroscience 95, 217-226; Potteret al., 1999, Ann. N.Y. Acad. Sci. 875, 159-174; Slavik et al., 1999, Immunol. Res. 19, 1-24; Gaziev et al., 1999, Bone Marrow Transplant. 25, 689-696; Henry, 1999, Clin. Transplant. 13, 209-220; Gummert et al., 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10, 1366-1380; Qi et al., 2000, Transplantation 69, 1275-1283 참조)를 포함한다. 이식 환자들에서 효과적인 것으로 확인되었던 항-IL2 수용체 (알파-단위체) 항체 다크리주마브 (daclizumab) (예로, 제나팍스 TM (Zenapax.TM.))도 역시 면역억제제로서 사용될 수 있다 (예로, Wiseman et al., 1999, Drugs 58, 1029-1042; Beniaminovitz et al., 2000, N. Engl J. Med. 342, 613-619; Ponticelli et al., 1999, Drugs R. D. 1, 55-60; Berard et al., 1999, Pharmacotherapy 19, 1127-1137; Eckhoff et al., 2000, Transplantation 69, 1867-1872; Ekberg et al., 2000, Transpl. Int. 13, 151-159 참조). 추가적인 면역억제제들로는, 이에 제한되는 것은 아니지만 항-CD2 (Branco et al., 1999, Transplantation 68, 1588-1596; Przepiorka et al., 1998, Blood 92, 4066-4071), anti-CD4 (Marinova-Mutafchieva et al., 2000, Arthritis Rheum. 43, 638-644; Fishwild et al., 1999, Clin. Immunol. 92, 138-152), 및 항-CD40 리간드 (Hong et al., 2000, Semin. Nephrol. 20, 108-125; Chirmule et al., 2000, J. Virol. 74, 3345-3352; Ito et al., 2000, J. Immunol. 164, 1230-1235)를 포함한다.

[0206] 투여

[0207] 본 발명의 발명적 방법들은 본 명세서에서 기술된 치료제들 (예로, 대체 효소)의 치료적 유효량의 단일 뿐만 아니라 다중 투여들을 고려하고 있다. 치료제들 (예로, 대체 효소들)은 개체의 병폐 (예로, 리소좀 축적병)의 성질, 중증도 및 정도에 의존하여 규칙적인 간격들로 투여될 수 있다. 일정 구현예들에서, 본 발명의 치료제들 (예로, 대체 효소들)의 치료적 유효량은 규칙적인 간격들 (예로, 매년 한 번, 6개월마다 한 번, 5개월마다 한 번, 3개월마다 한 번, 격월 (2개월마다 한 번), 매월 (매월 한 번), 격주 (2주마다 한 번), 매주 경막내 투여될 수 있다.

[0208] 일정 구현예들에서, 경막내 투여는 다른 투여 경로들과 결합하여 사용될 수 있다 (예로, 정맥내, 피하, 근육내, 비경구, 경피적, 또는 경점막 (예로, 경구적 또는 비강내)). 일정 구현예들에서, 이들 다른 투여 경로들 (예로, 정맥내 투여)는 많아야 격주, 매월, 2개월마다 한 번, 3개월마다 한 번, 4개월마다 한 번, 5개월마다 한 번, 6개월마다 한 번, 매년의 투여의 빈도로 수행될 수 있다.

[0209] 본 명세서에서 사용되는 바, "치료적 유효량 (therapeutically effective amount)"은 주로 본 발명의 약제학적 조성물들에 포함되는 치료제의 전체량을 기초로 하여 결정된다. 일반적으로, 치료적 유효량은 개체에게 의미있는 유익을 주는 데 (예로, 내재된 질환 또는 병폐를 치료하고, 조정하고, 치유하고, 예방하고 및/또는 개선하는 데) 충분하다. 예를 들어, 치료적 유효량은 리소좀 효소 수용체들 또는 그들의 활성을 조정하여 이러한 리소좀 축적병 또는 그의 증상들을 치료 (예로, 개체에게 본 발명의 조성물들의 투여에 이어지는 "얼룩무늬체들 (zebra bodies)"의 존재 또는 출현 또는 세포성 공포화에서의 감소 또는 이의 제거)하는 데 충분량과 같은 원하는 치료적 및/또는 예방적 효과를 달성하는 데 충분량일 수 있다. 일반적으로, 필요로 하는 개체에게 투여되는 치료제 (예로, 재조합 리소좀 효소)의 양은 개체의 특징들에 의존할 것이다. 이러한 특징들은 개체의 병폐, 질환의 중증도, 일반적인 건강, 연령, 성별 및 체중을 포함한다. 당업자라면 이들 및 기타 다른 관련 요인들에 의존하여 적절한 용량들을 바로 결정할 것이다. 또한, 임의적으로 객관적 및 주관적인 검정법들 둘 다가 최적의 용량 범위들을 확인하도록 적용될 수 있다.

[0210] 공통적으로 치료적 유효량은 다수의 단위 용량들을 포함할 수 있는 투여량 요법으로 투여된다. 특정한 치료적 단백질이라면 모두의 경우, 치료적 유효량 (및/또는 효과적인 투여량 요법 내의 적절한 단위 용량)은, 예를 들어 투여의 경로, 다른 약제학적 제제들과의 조합에 의존하여 다양해질 수 있다. 또한, 특정한 환자라면 모두를 위한 특이적 치료적 유효량 (및/또는 단위 용량)은 치료되는 장애 및 장애의 중증도; 적용되는 특이적 약제학적 제제의 활성; 적용되는 특이적 조성물; 환자의 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별 및 식이요법; 적용되는 특이적 융합 단백질의 투여 시간, 투여 경로, 및/또는 배출율 또는 대사율; 치료의 지속기간; 등의 의학적 기술분야들에 잘 알려져 있는 바와 같은 요인들을 포함하는 다양한 요인들에 의존할 수 있다.

[0211] 일정 구현예들에서, 치료적 유효 용량은 약 0.005 mg/kg 뇌 무게로부터 500 mg/kg 뇌 무게까지의 범위, 예로, 약 0.005 mg/kg 뇌 무게로부터 400 mg/kg 뇌 무게까지, 약 0.005 mg/kg 뇌 무게로부터 300 mg/kg 뇌 무게까지, 약 0.005 mg/kg 뇌 무게로부터 200 mg/kg 뇌 무게까지, 약 0.005 mg/kg 뇌 무게로부터 100 mg/kg 뇌 무게까지, 약 0.005 mg/kg 뇌 무게로부터 90 mg/kg 뇌 무게까지, 약 0.005 mg/kg 뇌 무게로부터 80 mg/kg 뇌 무게까지, 약 0.005 mg/kg 뇌 무게로부터 70 mg/kg 뇌 무게까지, 약 0.005 mg/kg 뇌 무게로부터 60 mg/kg 뇌 무게까지, 약 0.005 mg/kg 뇌 무게로부터 50 mg/kg 뇌 무게까지, 약 0.005 mg/kg 뇌 무게로부터 40 mg/kg 뇌 무게까지, 약 0.005 mg/kg 뇌 무게로부터 30 mg/kg 뇌 무게까지, 약 0.005 mg/kg 뇌 무게로부터 25 mg/kg 뇌 무게까지, 약 0.005 mg/kg 뇌 무게로부터 20 mg/kg 뇌 무게까지, 약 0.005 mg/kg 뇌 무게로부터 15 mg/kg 뇌 무게까지, 약 0.005 mg/kg 뇌 무게로부터 10 mg/kg 뇌 무게까지의 범위이다.

[0212] 일정 구현예들에서, 치료적 유효 용량은 약 0.1 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 0.5 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 1.0 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 3 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 5 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 10 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 15 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 20 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 30 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 40 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 50 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 50 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 60 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 70 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 80 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 90 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 100 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 150 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 200 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 250 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 300 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 350 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 400 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 450 mg/kg 뇌 무게 이상, 약 500 mg/kg 뇌 무게 이상이다.

[0213] 일정 구현예들에서, 치료적 유효 용량도 역시 mg/kg 체중으로 정의될 수 있다. 당업자라면 인정할 바와 같이, 뇌 무게들 및 체중들은 교정될 수 있다. Dekaban AS. "Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights," Ann Neurol 1978; 4:345-56. 따라서, 일정 구현예들에서, 투여량들은 표 5에 나타난 바와 같이 전환될 수 있다.

표 5

수컷의 뇌 무게, 체중 및 연령 간 상호관련성		
연령(년)	뇌 무게 (kg)	체중(kg)
3 (31-43 개월)	1.27	15.55
4-5	1.30	19.46

[0214]

[0215] 일정 구현예들에서, 치료적 유효 용량은 또한 mg/15 cc CSF로 정의될 수 있다. 당업자라면 인정할 바와 같이, 뇌 무게들 및 체중들을 기초로 하는 치료적 유효 용량은 mg/15 cc CSF로 전환될 수 있다. 예를 들어, 어른 인간들에서 CSF의 부피는 대략 150 mL이다 (Johanson CE, et al. "Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease," Cerebrospinal Fluid Res. 2008 May 14;5:10). 따라서, 어른들에게 0.1 mg 내지 50 mg 단백질의 단일 용량 주사들은 어른들에서 대략 0.01 mg/15 cc CSF (0.1 mg) 내지 5.0 mg/15 cc CSF (50 mg) 용량들일 것이다.

[0216] 좀 더 나아가, 특정한 개체라면 모두를 위해 특이적 투여량 요법들이 필요한 개인 및 투여하고 효소 대체 요법의 투여를 감독하는 사람의 전문적인 판단에 따라 조절되어야 하고 또한 본 명세서에서 설명된 투여량 범위들이 대표적인 것일 뿐이고 청구된 발명의 범위 또는 관행을 제한하도록 의도하지는 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0217] ***키트들***

[0218] 본 발명은 좀 더 나아가 본 발명의 제형물을 포함하는 키트들 또는 기타 다른 제조 물품들을 제공하고 그의 재구성 (동결건조된 경우) 및/또는 사용을 위한 지침들을 제공한다. 키트들 또는 기타 다른 제조 물품들은 용기, IDDD, 카테터 및 기타 다른 물품들, 경막간 (interthecal) 투여 및 연관된 수술에 유용한 장치들 또는 장비를 포함할 수 있다. 예를 들어, 적합한 용기들은 병들, 바이알들, 주사기들 (예로, 미리-충전된 주사기들), 앰풀들, 카트리지들, 저장조들, 또는 동결건조-용기 (lyo-jects)를 포함한다. 일정 구현예들에서, 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질들로 만들어질 수 있다. 적합한 미리-충전된 주사기들은, 이에 제한되는 것은 아니지만 구운 실리콘 코팅을 가진 보로실리케이트 유리 주사기들, 분사된 실리콘을 가진 보로실리케이트 유리 주사기들, 또는 실리콘이 없는 플라스틱 레진 주사기들을 포함한다.

[0219] 전형적으로, 용기들은 제형물을 보유할 수 있고, 재구성 및/또는 사용을 위한 안내들을 표시할 수 있는 라벨이 용기 위에 연결되어 있다. 예를 들어, 라벨은 제형물이 상기에 기술된 바와 같이 단백질 농도들로 재구성되는 것을 표시할 수 있다. 좀 더 나아가 라벨은 제형물이 예를 들어 IT 투여에 유용하거나 이를 의도하는 점을 표시할 수 있다. 일정 구현예들에서, 용기는 치료제 (예로, 대체 효소)를 포함하는 안정한 제형물의 단일 용량을 포함할 수 있다. 다양한 구현예들에서, 안정한 제형물의 단일 용량은 약 15 ml, 10 ml, 5.0 ml, 4.0 ml, 3.5 ml, 3.0 ml, 2.5 ml, 2.0 ml, 1.5 ml, 1.0 ml, 또는 0.5 ml 이하의 부피로 존재한다. 임의적으로, 제형물을 보유하는 용기는 제형물의 반복적 투여들 (예로, 2 내지 6회 투여들로부터)을 허용하는 다용도 바이알일 수 있다. 키트들 및 기타 다른 제조 물품들은 좀 더 나아가 적합한 희석제 (예로, BWFI, 식염수, 완충된 식염수)를 포함하는 두 번째 용기를 포함할 수 있다. 희석제 및 제형물의 혼합 시, 일반적으로 재구성된 제형물에서 최종 단백질 농도는 적어도 1 mg/ml (예로, 적어도 5 mg/ml, 적어도 10 mg/ml, 적어도 25 mg/ml, 적어도 50 mg/ml, 적어도 75 mg/ml, 적어도 100 mg/ml)일 것이다. 키트들 및 기타 다른 제조 물품들은 좀 더 나아가 시판 및 사용자의 관점으로부터 바람직한, 다른 완충액들, 희석제들, 필터들, 바늘들, IDDD들, 카테터들, 주사기들 및 사용 시 지침들을 가진 포장 삽입물들을 포함하는 기타 다른 물질들을 포함할 수 있다.

[0220] 본 발명은 다음의 실시예들을 참조하여 보다 완벽하게 이해될 것이다. 그러나, 그들은 본 발명의 범위를 제한하는 것으로서 해석되지는 않는다. 모든 인용 문헌들은 참고문헌으로 통합되어 있다.

[0221] **실시예들**

[0222] **실시예 1. IT 투여된 아릴설파타제 a의 독성학**

[0223] CNS 의 세포들 및 조직들 내로 배분되는 다른 경막-투여된 재조합 효소들의 능력을 평가하기 위하여, GLP 연구가 어린 사이노몰 원숭이들 (12개월 이하)에서 한 달 기간 동안 독성학 및 안전성 약물학 관점으로부터 재조합적으로-제조된 인간 아릴설파타제 (rhASA)의 반복 용량 경막내 (IT) 투여를 평가하도록 시행되었다. rhASA 의 제형물이 154 mM NaCl, 0.005% 폴리솔베이트 20의 운반체로 pH 6.0에서 제조되어 제형화되었다.

[0224] 이것을 성취하기 위하여, 9마리 수컷 및 9마리 암컷 어린 사이노몰 원숭이들이 체중에 의해 다음의 표 6에 나타난 바와 같이 세 가지 치료 그룹들의 하나로 무작위 배정되었다. 동물들 (용량 1의 경우 1마리 수컷 동물을 제외함)은 0, 3 또는 31 mg/mL rhASA (전체 용량 0, 1.8 또는 18.6 mg)의 0.6 mL 단기 IT 주입을 격주로 동물마다 전부 세 번 용량들을 받았다. 체중들, 임상적 관찰들, 신경학적 및 신체 검사들, 임상적 병리학, 안과 검사들, 및 독성역학적 시료 채취가 감시되었다. 모든 동물들은 29, 30 또는 31일 (마지막 IT 용량 이후 ~24시간)에 부검되었다. 선택된 조직들은 수확되어 수집되었고 현미경적으로 조사되었다.

표 6

[0225]

그룹	동물수	용량 농도 (mg/mL)	용량 부피 (mL)	투여량 (mg)
1	3M, 3F	0	0.6	0
2	3M, 3F	3	0.6	1.8
3	3M, 3F	31	0.6	18.6

[0226] 사이노몰 원숭이들의 CNS 조직들에서 검출되는 rhASA 농도들은 ELISA에 의해 분석되었고 대략 2.5ng/mg 조직에 해당하는 정상적인 인간 rhASA 농도들의 10%의 치료적 표적과 비교되었다. 조직 시료들 또는 천자물들(punches)은 사이노몰 원숭이들의 뇌들의 서로 다른 영역들로부터 추출되었고 좀 더 나아가 rhASA 존재에 대하여 분석되었다. 도 24는 천자물들이 추출된 조직들을 도시하고 있다. 천자된 조직 시료들은 대뇌 피질로부터 깊은 백색질 및 깊은 회색질까지의 침전 구배를 가지면서 도 25A 내지 G에 반영된 바와 같이 rhASA의 농도들에서 증가를 반영하였다.

[0227] 18.6mg 용량의rhASA를 투여받은 6마리 원숭이들의 경우 IT 및 ICV 투여 경로들 둘 다로부터 동일한 천자를 사용하여 검출된 rhASA의 농도들이 도 26A 내지 B에 도시되어 있다. rhASA가 경막내-(IT) 또는 뇌실내 (ICV) 투여된 어른 및 어린 사이노몰 원숭이들의 깊은 백색질 (도 25A) 및 깊은 회색질 (도 26B) 뇌 조직들에서 검출되는 rhASA의 농도들이 비교가능하였다.

[0228] 다음으로 어른 및 어린 사이노몰 원숭이들의 뇌들로부터 추출된 천자된 조직 시료들은 추출된 조직 시료에 축적된 rhASA 의 농도들을 결정하도록, 또한 이러한 농도들을 mg 단백질 당 2.5ng rhASA(건강한 개체에서 rhASA 의 정상적인 농도 10%에 해당함)의 치료적 표적 농도들과 비교하도록 분석되었다. 도 27A에 도시된 바와 같이, 분석된 각 조직 시료 천자물에서18.6mg 용량의 IT-투여된rhASA는 표적 치료적 농도2.5ng/mg 단백질을 초과하는 rhASA 농도를 가져왔다. 유사하게, 1.8 mg 용량의 rhASA 가 어린 사이노몰 원숭이들에게 IT-투여되었을 때, 분석된 각 조직 시료 천자물은 2.5ng/mg 단백질의 치료적 농도 이내 또는 이를 초과하는 rhASA 농도 둘 중 하나를 보여주었고, 중앙값 rhASA 농도들은 테스트된 모든 조직 천자물들의 경우 치료적 표적을 초과하였다 (도 27B).

[0229] IT-투여된 rhASA가 적절한 세포들로 배분되는지 여부를 결정하도록 조직들이 도 28A 에 도시된 영역으로부터 1.8mg의 ASA이 IT-투여된 사이노몰 원숭이의 깊은 백색질로부터 분석되었다. 도 28B 에 의해 도시된 바와 같이, 깊은 백색질의 면역염색은 사이노몰 원숭이에 있는 희소돌기교아세포들에서 rhASA의 분포를 드러냈다. 유사하게, 도 28C는 IT-투여된 rhASA가 사이노몰 원숭이의 깊은 백색질 조직들에서 공동-정착을 보여주었던 것을 도시하고 있다. 상세하게, 염색 하에 리소좀과 같은 표적 소기관들에서 공동-정착은 분명하고 (도 28C), IT-투여된 rhASA가 희소돌기교아세포들의 리소좀들을 포함하여, CNS의 적절한 세포들, 조직들 및 소기관들로 배분될 수 있다는 결론을 지지한다. 상기 기술은 ICV 및 IT 전달 간 차이도 역시 rhASA 전달의 경우 최소가 되는 것으로 확인된 결론을 지지한다.

[0230] **실시예 2. 방사선-표지된 단백질로의 생체분배**

[0231] 양전자 방출자 ^{124}I로 표지된 rhASA가 준비되었고 pH 6.0에서 154 mM NaCl, 0.005% 폴리솔베이트 20의 운반체로 제형화되었다. 3mg rhASA (38mg/kg 의 뇌에 해당함)와 동등한 제형물의 부피가 뇌실내 (ICV) 및 경막내 (IT) 투여 경로들을 통해 어른 사이노몰 원숭이들에게 투여되었다. 사이노몰 원숭이들은 투여된 ^{124}I-표지된 rhASA 의 분포를 결정하도록 고-해상도 PET 스캔 영상화 연구들 (마이크로 PET P4)이 시행되었다.

[0232] PET 영상화 데이타 (도 29)는 ICV- 및 IT-투여된 ^{124}I-표지된 rhASA 가 CNS의 조직들로 효과적으로 배분되었고 상세하게는 ^{124}I-표지된 rhASA가 IT-요추 카테터를 통해 바로 투여되고 척수의 길이를 따라 뇌척수액 (CSF)에서 일정하게 분산되는 것을 도시하고 있다. 상세하게는 도 29에 도시된 바와 같이, ICV- 및 IT-투여에 이어서, ^{124}I-표지된 rhASA 의 치료적 농도들이 뇌, 척수 및 CNS를 포함하는 사이노몰 개체의 CNS 조직들에서 검출되었다. 이러한 CNS 조직, 상세하게는 뇌의 조직들에서 검출되는 rhASA 농도들은 2.5ng/mg 단백질의 치료적 표적 농도를 초과하였다.

[0233] rhASA 단백질의 분포는 IT 및 ICV 투여 경로들 둘 다의 경우 비교가능한 한편, 도 29에 의해 입증된 바와 같이 ICV는 척수 기둥 내에 명백하게 더 적은 축적을 가져왔다.

[0234] 제형물의 투여에 이어서 24시간째, ICV- 및 IT-투여된 ^{124}I-표지된 ASA 둘 다는 CNS 조직들로 효과적으로 배분되었다. 상세하게는, 투여에 이어 24시간째, ICV-투여된 용량의 16.7%와 대비하여 투여된 용량의 12.4%는 두개골 부위에 있었다. 따라서, rhASA가 투여될 때 이러한 CNS 조직들, 상세하게 뇌의 조직들에서 검출되는 rhASA농도들은 동일한 용량의 ICV 투여에 이어서 검출되는 이들 농도들에 근접하였다.

[0235] ^{124}I-표지된 rhASA의 ICV 주사는 도 30에서 도시된 바와 같이 주사된 부피의 대수조, 교뇌수조 (cistern

pontis), 각간 수조 (cistern interpeduncularis) 및 근위 척수 (proximal spine)로 즉각적인 전달을 유도하고 있다. 또한 도 30에 도시된 바와 같이, ^{124}I-표지된 rhASA은 ICV 투여의 경우에 나타난 바와 같이 동일한 초기 구획들 (수조들 및 근위 척수)로 IT 투여 2-5시간 이내에 전달되었다. ICV- 및 IT-투여 둘 다를 이어서 24시간 째, ^{124}I-표지된 rhASA 의 분포는 도 31에 도시된 바와 같이 비교가능하였다. 따라서, 소분자들 약물과는 달리, 상기 기술된 결과들은 ICV 투여가 rhASA의 IT 투여를 능가하는 최소의 장점들을 제공하는 점을 제시하고 있다.

[0236] 이들 결과들은 rhASA가 덜 침습적인 IT 투여 경로를 사용하여 개체로 전달될 수 있고, 이에 의해 표적 세포들 및 조직들에서 치료적 농도들을 달성할 수 있는 점을 입증하고 있다.

[0237] 리소좀 축적병들은 비정상적인 기질 축적을 유도하는 효소의 상실 또는 결핍에 의해 초래되는 유전병들의 패밀리를 말한다. 여러 가지의 이들 질환들과 연관된 말초 증후군들은 재조합 효소들의 정맥내 투여에 의해 효과적으로 경감될 수 있는 한편, 이러한 재조합 효소들의 정맥내 투여는 대다수의 리소좀 축적병들과 연관된 CNS 소견들을 유의하게 영향을 주도록 기대되지 않는다. 예를 들어, 재조합 인간 이듀로네이트-2-설파타제 (이듀설파제, Elaprase®; Shire Human Genetic Therapies, Inc. Lexington, MA)는 헌터 증후군의 신체적 증상들의 치료를 위해 승인되었지만, 지연된 발달 및 진행성 정신이상을 포함할 수 있는 신경학적 소견들의 치료를 위한 약물학적 요법은 전혀 없다. 이것은 부분적으로 대략 76kD의 분자량을 가지는 크고 매우-당화된 효소이고 정맥내 투여를 이어서 혈액 뇌 장벽을 통과하지 못하는 I2S의 본성으로 인한다.

[0238] 따라서 본 발명자들은, 예를 들어 이듀로네이트-2-설파타제 (I2S), 아릴설파타제 A (rhASA) 및 알파-N-아세틸글루코사미다제 (Naglu)와 같은 재조합 인간 효소들의 경막내 제형물들의 경막내 (IT) 전달을 연구하는 프로그램에 착수하였다. 본 명세서에서 설명된 이들 결과들은 재조합 리소좀 단백질들의 IT-요추 투여가 투여된 단백질의 유의한 부분의 전달을 유도하고, 상세하게는 사이노몰 원숭이들 및 개들 둘 다에 있는 뇌 및 척수의 뉴런들에서 이러한 단백질의 광범위한 축적을 유도하는 점을 처음으로 보여주도록 기술하고 있다. CNS 조직들의 면역조직화학적 분석들은 단백질이 리소좀 축적 장애들에서 병리적 글리코사미노글리칸 축적의 부위인 리소좀으로 표적되는 점을 보여주었다. 또한, 헌터 증후군의 IKO 마우스 모델, 산필리포 증후군 B형의 Naglu-결핍 마우스 모델, 이염색성 백색질 장애 (MLD)의 ASA 녹아웃 마우스 모델에서 나타난 형태적 향상들은 IT-투여된 효소가 적절한 조직들로 배분되고 적절한 세포 구획들 및 소기관들로 운반되는 점의 관찰을 강조하고 있다.

[0239] I2S의 IT-요추 및 ICV 투여 이후 검출되는 뇌 분포 양상에서 관찰되는 유사성들은 CSF의 대량 (bulk) 유동 및 능동적 재혼합을 제시하고 있다. 따라서 임상적 설정에서, IT 및 ICV 투여 경로들 둘 다는 잠재적으로 실행가능하지만, IT 투여에 이어서 척수에서 I2S의 관찰된 축적은 척추 휴유증들 및 헌터 증후군과 같은 리소좀 축적병들의 성분들을 설명하는데 분명한 유익을 제공한다. 더구나, 척수 주사 포트들은 덜 침습적이고 특히 소아과 환자들에서 만성적 사용에 더 적합할 것으로 기대된다.

[0240] 상기 PET 영상화 연구들에 의해 관찰되는 혈관주위 세포 염색 및 단백질 전위 역학으로부터 나온 증거는 효소가 혈관주위 공간 내에서, 아마도 박동성 전도 기작들 에 의해 이동하는 것을 가리킨다. 전달의 추가적인 기작은 관찰된 I2S의 능동적 축삭 전달을 표시하는 신경 필라멘트들과 연관성에 의해 제시된다. 후자는 아마도 척수 및 뇌의 세포들 위에 널리 발현되고 뇌 실질로의 직접 투여 시 I2S 효소가 표적 세포들에 의해 바로 흡수되도록 유도할 수 있는 신경성 만노스-6-포스페이트 (M6P) 수용체들과의 단백질 상호작용으로 시작한다 (Begley, et al., Curr Pharm Des (2008) 14: 1566-1580).

[0241] 리소좀 효소들의 축삭 전달은 이전에 *시험관내* 간접 방법들에 의해 또한 *시험관내* 영상화에 의해 설명되었던 한편, 최신의 연구들은 CSF를 통해 전달된 비-바이러스성 또는 발현된 효소들의 축산 전달의 직접적인 증거를 처음 제공하고 있다. 따라서, CSF로부터 뇌 표면 및 뇌 조직들 내로 더 깊이까지 단백질의 전달은, 이전에 뇌의 세포들, 조직들 및 소기관들로 단백질 또는 효소 전달에 대해 기술되거나 밝혀진 적이 아무 것도 없었던 능동적 운반 공정들에 의존하는 것 같다.

[0242] 기질 (parenchyma), 간질 (interstitium) 및 CSF의 유동 역학이 뇌의 백색질로 IT-요추 투여된 단백질들의 배분을 막을 수 있다는 널리 퍼진 관점과는 대조적으로, 일시적 연구들은 리소좀 효소의 IT 전달이 모든 뇌 조직들에서 단백질 배분 및 축적 또한 병리적 글리코사미노글리칸의 축적 부위인 표적 세포들의 리소좀 구획에서 침전을 가져오는 점을 분명하게 보여준다 (예로, Fenstermacher et al., Ann N Y Acad Sci (1988) 531:29-39 및 DiChiro et al., Neurology (1976) 26:1-8 참조). IT-요추 전달의 덜 침습적인 본성과 함께, 본 경로는 특히 어린이들에서 뇌로 생물적 치료제들을 전달하는 임상적으로 적절한 수단을 제공한다.

[0243] **실시예 3. IT 투여를 위한 아릴설파타제 A의 제형물**

[0244] 본 실시예는 경막내 (IT) 경로의 투여를 통한 이염색성 백색질장애 (MLD)의 치료를 위한 rhASA (아릴설파타제 A)이 고농도 액상 용량 형태 또한 약물 물질 및 약물 산물의 제형화를 확립하는 작업을 요약하고 있다.

[0245] 안정도 데이터는 액물 물질 및 약물 산물의 식염수 제형물 (PBS 20 없음)이 < -65℃ 에서 18개월 및 2-8℃에서 18개월 이후에 안정한 것으로 기술하고 있다. 본 단백질의 약제학적 개발 동안, rhASA의 용해도 및 안정도는 CNS로의 그의 의도된 전달로 인해 제한된 완충액 및 부형제 조건들 하에서 조사되었다. 이전에, 제형물 개발 연구들은 정맥내 (IV) 제형물을 개발하도록 시행되어 왔다. 이들 시험들의 결과를 기초로 하여, 137 mM NaCl 및 0.15% 폴록사머 188을 가진 10mM 시트레이트-포스페이트 완충액, pH 5.5에 녹은 30 mg/ml의rhASA를 포함하는 제형물이 선도적 IV 제형물로서 선택되었다. rhASA는 IT 전달을 위해 세 가지 제형물들로도 역시 제형화되었고 본 단백질에 대한 안정도 데이터가 이들 조건들 하에서 조사되었다. 한 장소의 상부 (upstream) 물질 산물로부터 유래한 rhASA 로트들이 사용되었다. 결과들은 rhASA가 적어도 2 내지 8℃로 적어도 18개월 동안 0.005% 폴리솔베이트 20 (P20), pH 6.0를 가진 154 mM 염화나트륨 용액에서 안정한 것을 보여주었다. 또한, 연구들은 냉동-해동 및 교란-유도성 분해에 대한 안정도를 보여주도록 시행되었다.

[0246] 개발 로트들이 정제되었고, 초여과되었으며 10mM 시트레이트/포스페이트, 137mM NaCl, pH 5.5내로 투석되었고 (UF/DF) 대략 40 mg/mL 농도로 최종 식염수 용액 내에 UF/DF가 이어졌다. UF/DF 작동들은 표 7에 정리되어 있다. 하기 표 7은 엑설레스 (Xcellerex) 유래한 것으로부터 UF/DF 작동들을 위한 선택된 제형물들을 나타낸다.

표 7

[0247]

제형물	초기 완충액 및 식염수 내로 UF/DF	첨가물
A	10mM 시트레이트/포스페이트, 137mM NaCl, pH 5.5. 154 mM NaCl 내로 연속 UF/DF. 최종 pH 5.9	0.005% 폴리솔베이트 20*
B	10mM 시트레이트/포스페이트, 137mM NaCl, pH 5.5. 5mM 소듐 포스페이트, 145mM NaCl, pH 6.0 내로 연속 UF/DF. 최종 pH 6.0	0.005% 폴리솔베이트 20*
C	10mM 시트레이트/포스페이트, 137mM NaCl, pH 5.5. 10mM 시트레이트/포스페이트, 137mM NaCl, pH 7.0 내로 연속 UF/DF. 154 mM NaCl 내로 이차 UF/DF. 최종 pH 6.5	0.005% 폴리솔베이트 20*

[0248] **rhASA**

[0249] 137mM NaCl, pH 5.6을 가진 10mM 시트레이트 소듐 포스페이트에서 40 mg/mL로 제형화된 rhASA은 IT 전제형물 연구들을 위해 사용되었던 다섯 가지의 제형물들 내로 투석되었다 (표 8). 하기 표 8은 IT 적합한 제형물 검색을 위한 선택된 완충액들을 나타낸다.

표 8

[0250]

제형물 번호	완충액 종류	pH
1	154 mM NaCl *	5.9
2	154 mM NaCl **	7.0
3	145 mM NaCl 를 가진 5 mM 포스페이트 완충액	6.0
4	145 mM NaCl 를 가진 5 mM 포스페이트 완충액	7.0
5	2 mM $CaCl_2$ 및 137 mM NaCl 을 가진 1 mM 포스페이트 완충액	7.0

[0251] **방법들**

[0252] 차별 스캐닝 열량측정법 (DSC)에 의한 용융 온도 (Tm) 결정을 위해, 모세관 DSC 미세열량측정기 (MicroCal)가

60℃/hr의 스캔 속도로 10-110℃의 온도 범위에서 사용되었다. 완충액 기저선들이 단백질 스캔들로부터 차감되었다. 스캔 결과들은 각 시료의 단백질 농도 (280 nm에서의 자외선 흡광도에 의해 0.69 (mg/mL)-1.cm-1의 흡광계수를 사용하여 측정됨)에 대해 정상화되었다. 초기 단기간 안정도 실험들의 경우, rhASA 약물 물질은 40℃에서 두 주 또는 40℃에서 2개월이 주어졌다. 추가적인 시료들을 단기간 안정도를 위해 2 내지 8℃에서 3개월 동안 놓아두었다. 시료들은 여과되었고 (Millipore, P/N SLGV033RS) 0.5 mL의 분량들이 13 mm Flurotec 정지기들을 사용하여 2 mL씩 분산되었다.

[0253] Tm (열 유도된 변성의 온도 중간점)에 미치는 제형 조성물의 효과가 DSC를 사용하여 조사되었다. 서로 다른 제형 조성물들의 Tm 수치들은 도 5에 나타나 있다. Tm 수치들은 154mM NaCl를 가진 5mM 소듐 포스페이트, pH 7.0 또한 2mM $CaCl_2$ 및 137mM NaCl를 가진 1mM 소듐 포스페이트, pH 7.0으로 제형화된 rhASA의 경우 낮은 Tm 수치들이 관찰된 것을 제외하고는, 대부분의 제형물들의 경우 유사한 용융 (unfolding) 온도들을 보여주었다.

[0254] 다섯 가지의 선택된 제형물들에서 rhASA의 열 유도된 분해의 효과도 역시 조사되었다 (표 8). 시료들은 40℃에서 2주 또는 1개월 동안 또는 2 내지 8℃에서 3개월 동안 보관되었다. 보관된 시료들의 SDS-PAGE (쿠마시) 분석법이 154mM NaCl를 가진 5mM 소듐 포스페이트, pH 7.0뿐만 아니라 2mM $CaCl_2$ 및 137mM NaCl를 가진 1mM 소듐 포스페이트, pH 7.0으로 제형화된 rhASA 의 단편화 (fragmentation)를 검출하였다 (도 6). 이러한 분해는 다른 제형물들의 경우 전혀 관찰되지 않았다.

[0255] 절단 (breakdown) 산물들의 존재는 동일한 시간대의 경우 RP-HPLC에 의해 관찰된 더 낮은 백분율의 주요 피크와 부합된다 (도 10). 2mM $CaCl_2$ 를 가진 1mM PBS, pH 7.0에서 제형화된 rhASA가 시작점 및 이어진 열적 스트레스 조건들에 단기간 노출 시 그의 pH를 유지하지 못하는 점도 역시 관찰되었다.

[0256] 물 HPLC 시스템들이 크기 배제 및 역상 HPLC 분석법들을 위해 사용되었다. 초기 SEC-HPLC 분석의 경우, 50 ug의 rhASA이 애질런트 조백스 (Agilent Zorbax) GF-250 컬럼 (4.6mm x 250mm) 상에 주입되었고 280 nm의 검출 파장 및 100 mM 소듐 시트레이트 pH 5.5의 이동상 사용하여 0.24 mL/분에서 동일 용매로 전개되었다 (팔량체 검출). 분석들은 100 mM 소듐 시트레이트, pH 7.0의 이동상 조건들을 사용하여 반복되었다 (이량체 검출).

[0257] 모든 완충액 교환 및 농도 연구들은 센트리콘 플러스-20 (Centricon-Plus 20) (Millipore, 10 kDa MWCO)을 사용하여 수행되었다.

[0258] **전제형물 검색 연구들 - 완충액 종류 및 pH의 효과**

[0259] CNS 투여에 사용되는 인증된 용액 조성물들의 제한된 수로 인해, 표 8에 나열된 바와 같이 다섯 가지의 등장성 용액 조성물들만이 검색을 위해 선택되었다.

[0260] **pH 암기**

[0261] 장기간 안정도를 위한 완충액들의 선택 이전에, 두 가지의 "pH 암기 (pH memory)" 실험들이 식염수 용액 내로 완충액 교환된 단백질이 원래 완충액의 pH를 유지할 수 있는지 여부를 조사하도록 수행되었다. 초기 실험에서, 대략 8 mg/mL에서 rhASA가 먼저 137 mM NaCl 를 가진 10 mM 시트레이트-포스페이트, pH 수치들 5.5 또는 7.0 둘 중 하나 내로 투석되었고 이어서 식염수 용액 내로 두 번째 투석되었다. 두 번째 실험에서, rhASA는 137 mM NaCl 를 가진 10 mM 시트레이트-포스페이트, pH 수치들 5.5 또는 7.0 둘 중 하나 내로 투석되었고 연속하여 완충액 교환되었으며 식염수 용액들 내에 대략 35 mg/mL로 농축되었다.

[0262] 137 mM NaCl 를 가진 10 mM 시트레이트-포스페이트, pH 수치들 5.5 또는 7.0 둘 중 하나로 제형화된 rhASA가 식염수 용액 내에 투석되었을 때, 증가된 혼탁도는 전혀 관찰되지 않았다. 최종 식염수 용액의 pH는 노출되었던 이전의 시트레이트-포스페이트 완충액의 pH와 유사하였다. pH 수치들 5.5 또는 7.0에서 시트레이트-포스페이트 기초한 완충액들로 제형화된 rhASA가 식염수 내에 투석되고 다음으로 센트리콘을 사용하여 대략 35 mg/mL으로 농축되었을 때, 단백질 식염수 용액들의 pH는 pH 5.5 내지 5.8로부터 또는 pH 7.0 내지 6.8로부터 각각 이동하였다. 식염수에서 농축된 rhASA 용액들 둘 다는 약간 유백색이었고 0.064 (pH 6.8) 내지 0.080 (pH 5.5) 범위의 OD320 수치들을 가졌다.

[0263] **부형제 선택**

[0264] 폴리솔베이트 20 (P20)이 0.005%의 최종 농도로 모두 다섯 가지의 선택된 용액 조성물들에 포함되었다. 표면활성제 선택은 다른 쉬어 (Shire) 단백질들의 CNS 전달의 경우에 0.005%에서 P20의 *생체내* 내성도의 이전 경험을 기초로 하여 이루어졌다. 5% P20 (v/v)의 용액이 준비되었고 0.005%의 최종 농도를 획득하도록 적절한 부피가 각 단백질 제형물에 첨가되었다.

[0265] **제형물 강건도 연구들-안정도 연구**

[0266] 서로 다른 완충액들 및 pH 수치들의 검색으로부터 얻은 초기 결과들을 기초로 하여, 세 가지의 용액 조성물들이 장기간 안정도 연구들을 위해 선택되었다 (표 8과 같이 시료 준비). 1년 연구는 제안된 제형물들에서 개시되었다 (표 9). 각 시간대에서 안정도 시료들은 SEC-HPLC, RP-HPLC, OD320, 단백질 농도, pH, 특이 활성, SDS-PAGE (쿠마시), 및 외양 관찰에 의해 분석되었다. 하기 표 9는 장기간 안정도 연구들을 위한 제형물들을 나타낸다. 하기 표 10은 40±2℃에서 2주 이후에 선택된 제형물들의 안정도를 나타낸다.

표 9

[0267]

제형물	0.005% 폴리솔베이트 20 을 가진 제형물 조성물들	연구 조건들
A	154 mM NaCl, pH 5.9	5°C, 25°C, 40°C , 및 ≤-65°C 의 냉동 기저선
B	5mM 소듐 포스페이트, 145mM NaCl, pH 6.0	
C	154 mM NaCl, pH 6.5	

표 10

[0268]

제형물	외양 관찰	단백질 농도 (mg/mL)	OD320	SEC-HPLC (% 주요 피크) pH 5.5	SEC-HPLC (% 주요 피크) pH 7.0	RP-HPLC (% 주요 피크)	pH	특이 활성 (U/mg)
식염수, pH 5.9								
기저선	투명 또는 약간유백색	29.9	0.044	>99.9	99.7	99.8	5.6	74
스트레스	투명 또는 약간유백색	31.1	0.062	99.8	99.6	99.9	5.7	88
식염수, pH 7.0								
기저선	투명 또는 약간유백색	29.0	0.038	>99.9	99.6	>99.9	6.7	83
스트레스	투명 또는 약간유백색	32.1	0.041	99.1	99.7	97.0	6.5	66
5 mM PBS, pH 6.0								
기저선	투명 또는 약간유백색	29.8	0.058	>99.9	99.7	99.9	5.9	102
스트레스	투명 또는 약간유백색	30.5	0.076	98.8	99.7	99.7	5.9	95
5 mM PBS, pH 7.0								
기저선	투명 또는 약간 유백색	29.7	0.035	>99.9	99.7	>99.7	6.9	86
스트레스	약간 유백색 또는 유백색	30.5	0.041	95.4	99.4	98.0	6.8	94
2 mM $CaCl_2$, pH 7.0 를 가진 1 mM PBS, pH 7.0								
기저선	투명 또는 약간 유백색	27.5	0.040	>99.9	99.7	>99.9	5.6	90
스트레스	약간 유백색 또는 유백색	27.7	0.042	94.8	99.8	99.0	6.6	93

[0269] 스트레스 시료들의 경우 특이 활성에서 유의한 변화가 전혀 관찰되지 않았다 (표 10). 크기 배제 HPLC에 의한 분석은 154mM NaCl을 가진 5mM 소듐 포스페이트, pH 7.0로 제형화된 2주 열 압박된 시료의 경우에 일정 분해를

검출하였다. 분해는 팔량체로의 rhASA 결합을 유도하는 pH 5.5 이동상 조건을 사용하는 SEC-HPLC 에 의해 더욱 명백하였다. 이들 이동상 조건들 하에서, 2mM $CaCl_2$ 를 가진 1mM PBS, pH 7.0으로 제형화된 rhASA도 역시 유의한 분해를 보여주었다.

[0270] 40℃에서 1개월 노출에 이어서, 2 mM $CaCl_2$ 를 가진 5mM PBS, pH 7.0및 1mM PBS, pH 7.0으로 제형화된 시료들은 SDS-PAGE에 의해 단편화를 보여주었다 (결과 미도시). 본 관찰과 부합하여, 주요 피크 백분율에서 감소도 역시 이들 두 가지의 pH 제형물들에서 보관된 시료들의 경우 RP-HPLC 및 SEC-HPLC에 의해 관찰되었다 (표 11). 그러나, 특이 활성에서의 감소는 5 mM PBS, pH 7.0으로 제형화된 rhASA의 경우에만 관찰되었다. 하기 표 11은 40±2℃에서 1개월 이후 선택된 IT 제형물들의 안정도를 나타낸다.

표 11

[0271]

제형물	외양 관찰	단백질 농도 (mg/mL)	OD320	SEC-HPLC (% 주요 피크) pH 5.5	SEC-HPLC (% 주요 피크) pH 7.0	RP-HPLC (% 주요 피크)	pH	특이 활성 (U/mg)
식염수, pH 5.9								
기저선	투명 또는 약간 유백색	29.9	0.044	>99.9	99.7	99.8	5.6	74
스트레스	투명 또는 약간 유백색	28.3	0.061	>99.9	99.5	99.9	5.7	107
식염수, pH 7.0								
기저선	투명 또는 약간 유백색	29.0	0.038	>99.9	99.6	>99.9	6.7	83
스트레스	투명 또는 약간 유백색	25.7	0.189	95.7	99.8	99.5	6.6	100
5 mM PBS, pH 6.0								
기저선	투명 또는 약간 유백색	29.8	0.058	>99.9	99.7	99.9	5.9	102
스트레스	투명 또는 약간 유백색	28.0	0.059	>99.9	99.6	99.9	6.0	94
5 mM PBS, pH 7.0								
기저선	투명 또는 약간 유백색	29.7	0.035	>99.9	99.7	>99.9	6.9	86
스트레스	약간 유백색 또는 유백색	27.3	0.142	91.8	89.6	97.1	6.9	48
2 mM CaCl2 를 가진 1 mM PBS, pH 7.0								
기저선	투명 또는 약간 유백색	27.5	0.040	>99.9	99.7	>99.9	5.6	90
스트레스	약간 유백색 또는 유백색	28.3	0.053	90.6	88.7	97.9	6.7	133

[0272] 2 내지 8℃에서 3개월 보관 이후에, rhASA는 모든 제형물들에서 그의 활성을 보유하였다 (표 12). 추가적으로, rhASA는 SEC-HPLC에 의해 평가된 바와 같이 그의 주요 피크의 >99.8%를 둘 다의 이동상 조건들 하에서 유지하였다. 2 내지 8℃에서 3개월 동안의 안정도 데이터는 표 12에 정리되어 있다. 하기 표 12는 2 내지 8℃에서 3개월 이후 선택된 IT 완충액들의 안정도를 나타낸다.

표 12

[0273]

제형물	외양 관찰	단백질 농도 (mg/mL)	OD320	SEC-HPLC (% 주요 피크) pH 5.5	SEC-HPLC (% 주요 피크) pH 7.0	RP-HPLC (% 주요 피크)	pH	특이 활성 (U/mg)
식염수, pH 5.9								
기저선	투명 또는 약간 유백색	29.9	0.044	>99.9	99.7	99.8	5.6	74
스트레스	투명 또는 약간 유백색	29.4	0.056	99.8	>99.9	99.9	5.6	97
식염수, pH 7.0								
기저선	투명 또는 약간 유백색	29.0	0.038	>99.9	99.6	>99.9	6.7	83
스트레스	투명 또는 약간 유백색	25.5	0.040	99.8	>99.9	>99.9	6.6	127
5 mM PBS, pH 6.0								
기저선	투명 또는 약간 유백색	29.8	0.058	>99.9	99.7	99.9	5.9	102
스트레스	투명 또는 약간 유백색	29.9	0.045	99.8	>99.9	>99.9	5.9	109
5 mM PBS, pH 7.0								
기저선	투명 또는 약간 유백색	29.7	0.035	>99.9	99.7	>99.9	6.9	86
스트레스	투명 또는 약간 유백색	29.0	0.038	99.8	>99.9	>99.9	6.9	110
2 mM $CaCl_2$를 가진 1 mM PBS, pH 7.0								
기저선	투명 또는 약간 유백색	27.5	0.040	>99.9	99.7	>99.9	5.6	90
스트레스	투명 또는 약간 유백색	28.0	0.042	99.8	99.9	>99.9	6.6	105

[0274] 식염수, pH 7.0 및 2 mM $CaCl_2$를 가진 1 mM PBS, pH 7.0으로 제형화된 RhASA도 역시 25℃의 가속된 조건에서 3개월 보관 이후에 평가되었다. 도 7에서 나타난 바와 같이, rhASA는 이들 제형물들에서 약간의 단편화를 겪는다 (대략 0.5% BSA 불순도 곡선의 강도).

[0275] 종합하면, 전제형물 연구들은 rhASA의 안정도가 pH 5.5 내지 6.0의 범위에 유지되는 것을 보여주었다. pH 7.0에서 제형물 용액들을 사용하는 연구들 모두에서, rhASA는 그의 분해 경로들의 하나로서 단편화를 보여주었다. pH 7.0에서 IT 제형물 후보들의 경우에 획득된 열적 스트레스 결과들은 단편화가 역시 관찰되었던 IV 제형물들의 경우 (137 mM NaCl 를 가진 10 mM 소듐 시트레이트-포스페이트) pH 7.0에서 획득된 열적 스트레스 결과들과 유사하였다. 이들 연구들을 기초하여, 다음의 세 가지 제형물들이 표 9에서와 같이 장기간 안정도 연구들을 위해 선택되었다.

[0276] **냉동-해동 연구들**

[0277] 냉동-해동 실험들이 버티스 제네시스 35EL (Vertis Genesis 35EL) 동결건조기의 선반 위에서 0.1℃/분씩 상온부터 -50℃까지 조절된 냉동-해동의 세 번의 순환들을 수행하여 시행되었다. 다섯 가지의 조성물들 각각에서 (표 8) 30 mg/mL로 제형화된 약물 물질의 1 mL 분량들을 본 연구를 위한 3 mL 유리 바이알들 내에 분배하였다.

[0278] 약물 물질 (38±4 mg/mL)은 모든 냉동-해동 연구들에 사용되었다. 소규모 조절된 속도 냉동-해동 실험들을 위해, 2 mL 분량들의 약물 물질이 20 mm 플루오텍 (Flurotec) 정지기들을 가진 5 mL 유리 바이알들 내에 분배되었다. 냉동-해동 스트레스 실험들은 버티스 제네시스 35EL 동결건조기의 선반들 위 또는 조절된 속도 냉동기 (Tenney Jr Upright Test Chamber, Model: TUJR-A-VERV)의 선반들 위 둘 중 하나에서 시행되었다. -50℃로 냉동 및 25℃로 해동의 세 번의 순환들이 0.1℃ /분의 냉동 및 해동 속도로 (조절된 속도 냉동기를 사용함) 또는

0.1℃/분의 냉동 속도 및 0.03℃/분의 해동 속도로 (동결건조기를 사용함) 수행되었다. 대규모 냉동-해동 연구들을 위해, 90 mL의 약물 물질이 250 mL 폴리카보네이트 병들 내에 배분되었다. 드라이아이스 상에서의 냉동-해동 연구들을 위해, 3 mL의 약물 물질이 폴리프로필렌 회전마개가 있거나 없는 5 mL 폴리카보네이트 (Biotainer P/N 3500-05) 바이알들 내에 분배되었다. 시료들은 ≤ -65℃에서 밤샘 냉동되었고 다음으로 밀폐된 용기에 들어있는 드라이아이스 상에 놓아두었다. 이들 실험들을 위해, 동일한 시료 부피를 포함하는 정지기로 닫힌 유리 바이알들이 연구 대조군으로서 사용되었다. 희석된 약물 물질의 냉동-해동 연구들을 위해, 1 및 5 mg/mL의 1 mL 분량들이 2 mL 폴리프로필렌 튜브들 내에 분배되었고 ≤ -65℃에서 냉동되었다. 냉동된 시료들은 벤치 탑에서 연속하여 해동되었다. 순환은 참조 표준 분량들의 조작으로 발생할 수 있는 잠재적인 스트레스를 모방하도록 10회까지 반복되었다.

[0279] 0.005% P20 를 가지는 제형물들에서 rhASA 품질에 미치는 냉동-해동의 효과가 조절된 속도 냉동 및 해동 (0.1℃/분)의 3번 순환들 이후에 결정되었다. rhASA의 외양에서 변화는 전혀 관찰되지 않았고 용해성 응집물들 또는 분해물들이 SEC 또는 RP-HPLC 방법들을 사용하여 전혀 확인되지 않았다. 추가적으로, 단편화 또는 응집 밴드들도 환원 SDS-PAGE 분석에서 전혀 관찰되지 않았다 (결과 미도시). 표 13은 이들 연구들의 결과들을 정리하고 있다. 하기 표 13은 rhASA 약물 물질의 품질에 미치는 소규모 냉동-해동의 효과를 나타낸다.

표 13

제형물	외양 관찰	단백질 농도 (mg/mL)	OD320	SEC-HPLC (% 주요 피크) pH 5.5	SEC-HPLC (% 주요 피크) pH 7.0	RP-HPLC (% 주요 피크)	pH
식염수, pH 5.9							
기저선	투명 또는 약간 유백색	29.9	NT*	NT	NT	5.6	102
스트레스	투명 또는 약간 유백색	29.4	>99.9	99.6	99.4	5.5	86
식염수, pH 7.0							
기저선	투명 또는 약간 유백색	29.0	NT	NT	NT	6.7	94
스트레스	투명 또는 약간 유백색	25.0	>99.9	99.6	99.2	6.6	96
5 mM PBS, pH 6.0							
기저선	투명 또는 약간 유백색	29.8	NT	NT	NT	5.9	92
스트레스	투명 또는 약간 유백색	31.1	>99.9	99.7	99.5	5.9	95
5 mM PBS, pH 7.0							
기저선	투명 또는 약간 유백색	29.7	NT	NT	NT	6.9	99
스트레스	투명 또는 약간 유백색	29.9	>99.9	99.6	99.0	6.9	112
2 mM CaCl2 를 가진 1 mM PBS, pH 7.0							
기저선	투명 또는 약간 유백색	27.5	NT	NT	NT	5.6	90
스트레스	투명 또는 약간 유백색	27.3	>99.9	99.6	99.3	6.7	103

[0280] *미테스트

[0281] 약물 물질의 2mL 분량들 상에서 세 벌로 수행된 소규모 조절된 속도 냉동-해동 연구들의 결과들은 표 14에 정리되어 있다. 약물 물의 품질에서의 변화는 전혀 관찰되지 않았다. 냉동 및 해동된 약물 물질의 외양은 기저선 시료의 외양과 비교가능하였다. 단백질 농도 또는 물질의 순도에서 감소는 전혀 관찰되지 않았다. 하기 표 14는 rhASA 약물 물질의 품질에 미치는 소규모 냉동-해동의 효과를 나타낸다.

표 14

냉동/해동 속도	기저선	0.1 ℃/분 냉동- 0.1 ℃/분 해동 조절된 속도 냉동기 사용함	0.1 ℃/분 냉동- 0.03 ℃/분 해동 동결건조기 사용함
외양 관찰	약간 유백색 또는 유백색	약간 유백색 또는 유백색	약간 유백색 또는 유백색
단백질 농도 (mg/mL)	42	37	36
320 nm 에서 광학 밀도	0.044	0.045	0.043
SEC-HPLC (% 주요 피크)	99.6%	99.7%	99.7%
RP-HPLC (% 주요 피크)	>99.9%	>99.9%	>99.9%
pH	5.9	5.9	5.9
특이 활성 (U/mg)	65	69	71

[0282]

[0283] 모든 실험들은 rhASA가 냉동-해동 이후에도 그의 품질성들을 유지하는 것을 보여주었다. 작은 감소 경향이 표 15에서 나타난 바와 같이 냉동-해동의 10번 순환들 이후에 1 mg/mL rhASA 시료들의 경우 활성 및 역상 백분율 주요 피크에서 관찰되었던 점을 주목해야 한다. 하기 표 15는 1 mg/mL로 희석된 rhASA 약물 물질에 미치는 소규모 냉동-해동의 효과를 나타낸다.

표 15

시료	기저선	1 F/T 순환	3 F/T 순환	5 F/T 순환	10 F/T 순환
단백질 농도 (mg/mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
320 nm 에서 광학 밀도	0.013	0.005	0.010	0.006	0.017
SEC-HPLC (% 주요 피크)	99.5%	99.5%	99.5%	99.5%	99.6%
RP-HPLC (% 주요 피크)	99.2%	99.2%	99.1%	99.0%	98.9%
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
특이 활성 (U/mg)	78	76	75	69	65

[0284]

[0285] **교란 연구들**

[0286] P20을 가진 다섯 가지의 선택된 용액 조성물들 (표 8) 각각에서 30 mg/mL로 제형화된 무균의 여과된 단백질의 1.0 mL 분량들이 13 mm 플루오텍 정지기들을 가진 3 mL 유리 바이알들 내에 분배되었다. 바이알들은 랩라인 (Labline) 궤도 진탕기 상에 옆으로 놓아두었고 100 rpm으로 24시간 동안 진탕되었다. 다음으로 설정은 진탕 기간의 이후 24시간 동안 200 rpm으로 증가시켰다.

[0287] 교란, 진탕 및 교반에 대한 rhASA의 민감도를 평가하기 위하여, 연구들이 약물 물질 및 약물 산물 둘 다의 경우 35.4 및 30 mg/mL의 농도에서 각각 수행되었다. 이들 연구들을 위해, 1.0 mL 분량들의 약물 물질이 13 mm 플루오텍 정지기들을 가진 3 mL 유리 바이알들 내에 배분되었다. 교란된 바이알들은 처음 8시간 동안은 2시간마다 이후는 24 및 48시간에 조사되었다. 시료들의 외양 관찰은 기록되었고 시료들은 pH, SEC-HPLC, 특이 활성 및 OD320을 사용하여 검정되었다. 약물 산물 교란 연구들은 세 벌의 약물 물질로 (0.005% P20을 가진 154 mM NaCl 에서) 수행되었고 한 벌의 약물 물질 과 (154 mM NaCl, pH 6.0에서) 비교되었다. 진탕 연구들도 역시 식염수 제형물에서 P20의 포함 없이 반복되었다. 이들 연구들 위해, 1 mL 또는 3 mL 분량들의 약물 산물이 30 mg/mL로 3 mL 바이알들 내에 분배되었고 rhASA의 품질에 미치는 진탕뿐만 아니라 상부공간 부피의 효과가 조사되었다. 이들 진탕 연구들을 위해, 220 rpm의 속도가 사용되었다.

[0288] 수행된 IV 제형물 개발 연구들의 경우 rhASA의 초기 진탕 연구들은 표면활성제의 존재의 잠재적인 장점을 보여

주었다. IV 제형물 개발 연구들의 경우, 0.005% P20가 선택되었고 진탕 연구들을 위한 제형물들에 포함되었다. 100 rpm으로 15 내지 24시간의 진탕 이후에, 가시적인 변화들이 모든 제형물들의 경우에 전혀 관찰되지 않았고 진탕 속도는 200 rpm으로 증가되었다. 제안된 후보 제형물들에 있는 진탕된 시료들의 외양에서는 100 및 200 rpm으로 전체 48시간의 진탕 이후에 변화가 전혀 관찰되지 않았다. 본 기간 이후에 시료들은 분석되었고 결과들은 표 16에 정리되어 있다. 검정법들이라면 모두에 의해 변화들이 전혀 관찰되지 않았다. SDS-PAGE 쿠마시도 진탕된 시료들의 경우 역시 고분자량 또는 저분자량의 추가적인 밴드들을 보여주지 않았다 (결과 미도시). 하기 표 16은 선택된 IT 제형물들의 진탕 연구들의 결과들을 나타낸다.

표 16

제형물	외양 관찰	단백질 농도 (mg/mL)	OD320	SEC-HPLC (% 주요 피크) pH 5.5	SEC-HPLC (% 주요 피크) pH 7.0	RP-HPLC (% 주요 피크)
식염수, pH 5.9						
기저선	투명 또는 약간 유백색	29.9	0.044	NT**	NT	111
스트레스	투명 또는 약간 유백색	28.5	0.041	>99.9	99.9	111
식염수, pH 7.0						
기저선	투명 또는 약간 유백색	29.0	0.038	NT	NT	115
스트레스	투명 또는 약간 유백색	24.7	0.032	>99.9	>99.9	110
5 mM PBS, pH 6.0						
기저선	투명 또는 약간 유백색	29.8	0.058	NT	NT	103
스트레스	투명 또는 약간 유백색	30.4	0.047	>99.9	99.9	116
5 mM PBS, pH 7.0						
스트레스	투명 또는 약간 유백색	29.7	0.035	NT	NT	92
기저선	투명 또는 약간 유백색	26.5	0.029	>99.9	99.9	110
2 mM $CaCl_2$를 가진 1 mM PBS, pH 7.0						
기저선	투명 또는 약간 유백색	27.5	0.040	NT	NT	147
스트레스	투명 또는 약간 유백색	27.0	0.038	>99.9	99.9	107

*컬럼 문제들로 인해, 이량체 형태의 SEC 프로파일이 pH 7.0 의 이동상에서 획득되지 않았다.
**미테스트됨

[0289]

[0290] 약물 물질 (154 mM NaCl, pH 6.0에서) 또는 약물 산물 (0.005% P20을 가진 154 mM NaCl, pH 6.0에서)의 외양 변화는 교반 처음 4시간 동안 전혀 관찰되지 않았다. 교반 6시간 이후에, 약물 물질 및 약물 산물 둘 다는 약간 혼탁해졌다 (결과 미도시). 혼탁은 P20이 제형물에 존재할 때 교반 48시간 이후에 더욱 현저하였다. 추가적으로, 진탕에 노출된 약물 물질 및 약물 산물은 24시간 이후에 혼탁해졌다. 도8은 48시간 이후에 교란 관찰 결과들을 보여주었다.

[0291] 표 17 및 표 18은 교란 연구 관찰들을 정리하고 있다. 하기 표 17은 교반 이후 rhASA 약물 물질 및 약물 산물 (P20 있음)의 외양 관찰을 나타낸다. 하기 표 18은 진탕 이후 rhASA 약물 물질 및 약물 산물 (P20 있음)의 외양 관찰을 나타낸다.

표 17

시간	교반된 약물 물질	교반된 약물 산물
기저선	무색, 유백색, 무입자	무색, 유백색, 무입자
2	무변화	무변화
4	무변화	무변화
6	1-2 개 작은 조각들, 약간 혼탁	섬유성 물질, 약간 혼탁
8	1-2 개 작은 조각들, 약간 혼탁	섬유성 물질, 약간 혼탁
24	1-2 개 작은 조각들, 매우 혼탁	섬유성 물질, 혼탁
48	1-2 개 작은 조각들, 매우 혼탁	섬유성 물질, 매우 혼탁

[0292]

표 18

시간	진탕된 약물 물질	진탕된 약물 산물
기저선	무색, 유백색, 무입자	무색, 유백색, 무입자
2	무변화	무변화
4	무변화	무변화
6	무변화	무변화
8	무변화	무변화
24	1-2 개 작은 조각들	1-2 개 섬유들
48	섬유성 물질	1-2 개 섬유들

[0293]

[0294] 또한 교란된 시료들은 OD320, pH, 특이 활성, RP-HPLC, 및 SEC-HPLC에 의해 분석되었다. 결과들은 표 19 및 표 20에 표현되어 있다. 전반적으로 교반 및 진탕한 이후에 외양을 제외하고는 rhASA의 품질에서 유의한 변화가 전혀 관찰되지 않았다. 하기 표 18은 약물 물질 및 약물 산물에 미치는 48시간의 진탕의 효과를 나타낸다.

표 19

냉동/해동 속도	기저선	48 시간 동안 진탕된 약물 물질 (n=1)	48 시간 동안 진탕된 약물 산물 (n=3)
320 nm 에서 광학 밀도	0.080	0.053	0.048
SEC-HPLC (% 주요 피크)	99.7%	99.7%	99.7%
RP-HPLC (% 주요 피크)	>99.9%	>99.9%	>99.9%
pH	6.0	6.0	5.9
특이 활성 (U/mg)	96	71	72

[0295]

[0296] 0.005% P20를 가진 약물 산물을 6시간 동안 교반 시, 세 벌의 하나는 혼탁해졌다. 본 시료는 제거되었고 나머지 두 시료들은 40시간까지 교반되었다. 표 20은 두 벌의 시료들의 경우 평균 데이터를 보여주고 있다. 하기 표 20은 약물 물질 및 약물 산물에 미치는 48시간 교반의 효과를 나타낸다.

표 20

[0297]

냉동/해동 속도	기저선	6 시간 동안 교반된 약물 물질 (n=1)	48 시간 동안 교반된 약물 산물 (n=2)
320 nm 에서 광학 밀도	0.080	0.244	0.103
SEC-HPLC (% 주요 피크)	99.7%	99.7%	99.7%
RP-HPLC (% 주요 피크)	>99.9%	>99.9%	>99.9%
pH	6.0	6.0	6.0
특이 활성 (U/mg)	69	73	73

[0298] 결과들 및 가시적 관찰들을 기초로 하여, 약물 물질 및 약물 산물은 외양에서 변화가 일어나는 데 계속적인 교반 (설정 번호 5에서) ~4시간 및 계속적인 격렬한 진탕 (220 rpm으로) 8시간이 걸리기 때문에 교란-유도성 분해에 민감한 것은 아니다.

[0299] 진탕 연구들은 P20이 없는 약물 산물을 사용하여 반복되었다. 이들 연구들의 경우, 각 바이알은 rhASA의 품질에 미치는 진탕뿐만 아니라 상부공간 부피의 효과를 조사하도록1 mL 또는 3 mL 의 약물 산물로 충전되었다. 3 mL 바이알들에 1 mL 충전의 경우, 220 rpm에서의 8시간 진탕을 통하여 약물 산물의 외양에서 변화가 전혀 관찰되지 않았다 (결과 미도시). 상부 공간이 없는 바이알들 (n=1)은 더 큰 상부 공간을 가진 바이알들과 대비할 때 더 높은 속도에서 작은 조각들, 소수의 섬유들 및 솜털 물질의 형성을 보여주었다. 48시간 관찰들은 도 9에 표현되었다.

[0300] 가시적 결과들은 또한 표 21 및 표 22에 정리되어 있다. 하기 표 21은 3 mL 바이알에 1 mL 충전으로 48시간의 진탕 이후에 폴리솔베이트20이 없는 약물 산물의 외양 관찰을 나타낸다. 하기 표 22는 3 mL 바이알에 3 mL 충전으로 48시간의 진탕 이후에 폴리솔베이트 20이 없는 약물 산물의 외양 관찰을 나타낸다.

표 21

[0301]

시간	P20 없는 진탕된 약물 산물 MLD-200L-001	P20 없는 진탕된 약물 산물 MLD-200L-003	대조군_P20 있는 진탕된 약물 산물 MLD-200L-001
기저선	무색, 약간 유백색, 필수적으로 무입자		
2	무변화	무변화	무변화
4	무변화	무변화	무변화
6	무변화	무변화	무변화
8	무변화	무변화	무변화
24	솜털	유의한 솜털	무변화
48	솜털	유의한 솜털	무변화

표 22

시간	P20 없는 진탕된 약물 산물 MLD-200L-003	대조군_P20 있는 진탕된 약물 산물 MLD-200L-001
기저선	무색, 약간 유백색, 필수적으로 무입자	
2	무변화	무변화
4	작은 조각들, 소수의 섬유들 및 솜털들	무변화
6	작은 조각들, 소수의 섬유들 및 솜털들	무변화
8	작은 조각들, 소수의 섬유들 및 솜털들	무변화
24	작은 조각들, 소수의 섬유들 및 솜털들	무변화
48	작은 조각들, 소수의 섬유들 및 솜털들	무변화

[0302]

[0303] 단백질 농도에서 변화는 전혀 관찰되지 않았다. 추가적으로, 용해성 응집물들은 1 mL 및 3 mL 충전 부피들 둘 다의 경우 SEC-HPLC를 사용하여 전혀 검출되지 않았다 (표 23 및 표 24). 환원된 SDS-PAGE (쿠마시) 검정법은 고분자량 또는 저분자량 밴드들을 검출하지 못하였다 (결과 미도시). 하기 표 23은 3 mL 바이알에 1 mL 충전으로 폴리솔베이트 20의 부재 시 약물 산물 상의 48시간 진탕의 결과들을 나타낸다. 하기 표 24는 3 mL 바이알에 3 mL 충전으로 폴리솔베이트 20의 부재 시 약물 산물 상의 48시간 진탕의 결과들을 나타낸다.

표 23

검정법	기저선	P20 없는 24 시간후 진탕된 약물 산물 (n=2)	P20 없는 48 시간후 진탕된 약물 산물 (n=2)	P20 있는 대조군 (n=1)
농도 (mg/mL)	32.3	32.9	33.8	31.8
320 nm 에서 광학 밀도	0.164	0.160	0.163	0.169
SEC-HPLC (% 주요 피크)	99.5	99.5	99.5	99.6
pH	6.1	6.1	6.0	6.0
특이 활성 (U/mg)	64	63	62	72

[0304]

표 24

검정법	기저선	P20 없는 4 시간후 진탕된 약물 산물 (n=2)	P20 없는 48 시간후 진탕된 약물 산물 (n=2)	P20 있는 대조군 (n=1)
농도 (mg/mL)	31.02	34.4	32.1	32.6
320 nm 에서 광학 밀도	0.152	0.163	0.166	0.151
SEC-HPLC (% 주요 피크)	99.6	99.6	99.6	99.6
pH	6.0	6.0	5.9	6.0
특이 활성 (U/mg)	70	64	65	71

[0305]

[0306] **완충 능력 연구들**

[0307] rhASA의 완충 능력의 결정을 위해, 산물은 희석 산 또는 희석 염기 둘 중 하나로 세 번 적정되었다. 10 mL 분량들의 38 또는 30 mg/mL둘 중 하나의 약물 물질은 (약물 산물을 모방하는 후자) 미세교반 막대가 첨가된 20 mL 유리 바이알에 넣었다. 1 uL 분량들의 1N 염산 (HCl)이 단백질 용액에 첨가되었고, 내용물들이 혼합되었으며 pH가 기록되었다. 실험은 희석을 피하도록 측정들 간에 pH 탐침을 헹구지 않고 대략 pH 5.5에 도달할 때까지 1 uL HCl 점적 (spikes)의 첨가와 함께 계속되었다. 실험들은 세 벌로 수행되었고 150 mM 염화나트륨, pH 6.0을 포함하는 5 mM 포스페이트 완충액이 비교를 위해 차례로 적정되었다. 유사하게, 둘 다의 농도들에서 약물 물질이 최

종 대략 pH 6.5 에 도달할 때까지 1M 수산화나트륨 (NaOH)으로 적정되었다. rhASA 에서 잔여 포스페이트라면 모두의 존재를 조사하기 위하여, 약물 물질은 유도성 결합 플라즈마 (inductively coupling plasma) 질량 분광분석법 (ICP-MS)에 의해 분석되었다. 희석된 rhASA 약물 물질의 완충 능력도 역시 용액의 pH 수치가 단백질 용액의 희석 시 변화하지 않는 점을 입증하도록 조사되었다. 30 mg/mL부터 1 mg/mL까지 범위의 희석된 시료들이 1.5 mL 에펜도르프 튜브들에 준비되었고 pH 수치들이 희석 시작 시 또한 2 내지 8℃에서 1주의 보관 이후에 측정되었다.

[0308] 희석 산 및 희석 염 적정 연구들의 결과들은 rhASA 용액들의 적당한 완충 능력을 보여주었다. HCl을 사용한 적정 연구들의 경우, 처음에는 대략 2 uL의 1 M 산의 첨가가 약물 또는 완충액 대조군 둘 중 하나의 pH를 변경시키지 않았다. 그러나, 산의 증가하는 부피들은 rhASA 약물 물질과 대비하여 완충액의 pH 상에 극적인 강하를 보여주었다. 13 uL의 19 M HCl 첨가 이후에, 완충액 대조군의 pH는 약물 물질의 pH보다 2 pH 단위 이상 낮았다. 약물 산물 농도를 모방하도록 본 실험에 30 mg/mL의 약물 물질 농도도 역시 포함되었다. 도 10은 산으로 적정될 때 150 mM 염화나트륨을 가진 5 mM 소듐 포스페이트 완충액, pH 6.3과 대비하여 rhASA 약물 물질의 완충 능력을 도시하고 있다.

[0309] 수산화나트륨으로 rhASA 약물 물질의 적정은 pH를 유지하는 측면에서 비교적 서로 다른 결과들을 보여주었다 (도 11). pH 변화의 속도는 약물 물질 및 완충액 대조군 간에 실질적으로 다르지 않았다.

[0310] 관찰된 결과들을 기초로 하고 또한 이론이라면 모두에 집착하려고 않는 경우라면, 아스파트산, 글루탐산, 및 히스티딘 측쇄들이 용액 pH를 유지하도록 양성자 수여자들 및/또는 공여자들로서 작용하는 능력을 가지기 때문에 용액의 완충 능력에 기여하는 것 같다. 본 단백질의 완충 능력도 이전에 "pH 암기" 효과가 발견되었을 때 전제형화 연구들 과정 동안 역시 관찰되었다. pH의 유지는 연구실 규모 및 대규모 작동들 둘 다에서 여러 번 기술되어 왔다. 종합하면, 이들 두 가지 실험들의 결과는 식염수에서의 rhASA의 완충 능력이 산성 방향으로 더욱 우세한 점을 제시한다. 문헌에 따르면, 더 낮은 pH 수치들에 대한 완충 능력은 주어진 단백질 내의 히스티딘 잔기들과 대비한 더 많은 아스파트산 및 글루탐산 잔기들을 직접 가리킨다. 이론에 집착하려고 않는 경우라도, 이것은 18개 히스티딘 잔기들과 대비하여 전부 45개의 글루탐산 뿐만 아니라 아스파트산 잔기들이 있는 아릴설파타제 A의 사례가 될 수 있다.

[0311] 약물 물질의 완충 능력은 또한 ICP-MS를 사용하는 약물 물질에 존재하는 것으로 확인된 잔여 결합 포스페이트에 기인할 수도 있다. 표 25는 세 가지 서로 다른 LSDL 약물 물질 로트들에 존재하는 포스페이트의 잔여량을 보여준다. 본 데이터도 역시 파일럿 규모 공정의 경우 초여과 및 투석 단계들의 일관성을 입증하고 있다. 하기 표 25는 LSDL로 생산된 약물 물질에서 포스페이트의 잔여량을 나타낸다.

표 25

[0312]

rhASA 로트 번호	포스페이트 농도 (ppm)
001	27
002	31
003	31

[0313] 본 단백질의 완충 능력을 좀 더 이해하기 위하여, pH 에 미치는 희석의 효고도 역시 조사되었다. 식염수로 더 낮은 단백질 농도들로 rhASA 약물 물질의 희석 시, 약물 물질의 pH 수치들에서 변화가 전혀 관찰되지 않았다. 연속하여, 희석된 약물 물질은 2-8℃에 보관되었고 이후 pH 측정들이 기록되었다. 표 26은 데이터를 정리하고 있다. 결과들은 2-8℃에서 희석 및 보관이 희석된 약물 물질의 pH 수치들에 미치는 효과를 전혀 가지지 않는 점을 보여준다. 이들 관찰들은 좀 더 나아가 식염수로 제형화된 rhASA 약물 물질의 적당한 완충 능력을 기술하는 산 및 염기 적정 연구들의 결론을 지지한다. 하기 표 26은 희석된 rhASA 약물 물질의 pH 수치들을 나타낸다.

표 26

[0314]

약물 물질표적 농도 (mg/mL)	A280 (mg/mL)를 사용한 약물 물질측정 농도	pH 수치 시작점	2-8°C 에서 1 주일 보관후 pH 수치
37.0	38.8	6.00	6.20
30.0	33.4	6.07	6.10
25.0	28.3	6.04	6.09
20.0	20.1	6.02	6.12
10.0	9.2	6.04	6.10
5.0	4.5	6.03	6.11
1.0	1.0	6.00	6.07

[0315] rhASA 희석 및 pH의 조사 과정 동안, 희석된 시료들의 외양 관찰은 유백색에서 농도 의존성 감소를 보여주었고, 예로 더 높은 농도를 가진 rhASA 시료들이 거의 투명한 외양을 가지는 더 낮은 농도의 시료들과 대비하여 더욱 유백색인 점을 보여주는 것으로 관찰되었다. 도 12는 희석된 rhASA의 외양 관찰을 나타낸다. 1 mg/mL rhASA 용액은 물과 유사한 외양을 보여주었던 한편, 30 mg/mL 외양은 기준 현탁액들 II 및 III 또는 III 및 IV 사이인 것으로 평가되었다.

[0316] **안정도 연구들**

[0317] 안정도 연구들을 위해, 약물 물질이 154 mM NaCl, pH 6.0에서 38±4 mg/mL로 제형화되었고 약물 산물은 0.005% 폴리솔베이트 20가 있거나 없이 154 mM NaCl, pH 6.0 에서 30±3 mg/mL로 제형화되었다. 1 mL분량의 약물 물질이 폴리프로필렌 회전마개를 가진 5 mL 폴리프로필렌 병들 내에 배분되었고 ≤ -65℃, -15℃ 내지 -25℃, 및 2-8℃에서 보관되었다. 1.0 내지 1.1 mL 분량의 약물 산물이 13 mm 플루오텍 정지기들을 가지는 3 mL 유리 바이알들 내에 분배되었고 2-8℃, 25±2℃, 및 40±2℃에서 보관되었다. 약물 산물 바이알들은 초기 안정도 연구들을 위해 위쪽 방향으로 보관되었고 P20이 없는 약물 산물을 사용하는 다음 연구들을 위해 역전된 방향으로 바꾸었다. 각 시간대에, 안정도 시료들은 SEC-HPLC, RP-HPLC, OD320, 단백질 농도들, pH, 특이 활성, SDS-PAGE (쿠마시), 및 외양 관찰에 의해 테스트되었다. 펩타이드 맵, 글리칸 맵, 및 포르밀 글리신 백분율이 매년 수행되었다. 추가적으로, 후자의 검정법들도 역시 압박 및 가속된 조건들에 대해 수행되었다.

[0318] 종합하면, 전제형화, 냉동-해동, 및 교란 연구들의 결과들은 세 가지의 제형물들만이 좀 더 나아간 개발에 적합하였던 점을 제시하고 있다. 장기간 안정도 연구들이 0.005% P20 존재 시 이들 세 가지 제형물들에서 개시되었다. 표 27, 표 28, 및 표 29는 선택된 시간대들에서 세 가지 제형물들의 안정도 데이터를 정리하고 있다. 하기 표 27은 154 mM NaCl, pH 5.9에 넣은 rhASA 의 경우 2-8℃에서 장기간 안정도를 나타낸다. 하기 표 28은 154 mM NaCl, pH 7.0에 넣은 rhASA 의 경우 2-8℃에서 장기간 안정도를 나타낸다. 하기 표 29는 145 mM NaCl, pH 6.0를 가진 5 mM 포스페이트 완충액에 넣은 rhASA 의 경우 2-8℃에서 장기간 안정도를 나타낸다.

표 27

[0319]

테스트	기저선	3m	6m	11m
외양 관찰	투명 또는 약간 유백색	투명 또는 약간 유백색	투명 또는 약간 유백색	투명 또는 약간 유백색
단백질 농도 (mg/mL)	25.6	24.3	26.5	27.3
SEC-HPLC (% 주요 피크), pH 5.5	>99.9	99.8	99.9	99.8
SEC-HPLC (% 주요 피크), pH 7.0	99.1	99.0	99.4	99.7
RP-HPLC (% 주요 피크)	99.6	99.7	99.8	>99.9
pH	5.9	6.0	6.0	6.0
특이 활성 (U/mg)	95	79	90	87
SDS-PAGE (쿠마시)	1% 검정 대조군보다 큰 강도로 새로운 밴드없이 참고 표준과 일치	일치	일치	일치

표 28

[0320]

테스트	기저선	3m	6m	11m
외양 관찰	투명 또는 약간 유백색	투명 또는 약간 유백색	투명 또는 약간 유백색	투명 또는 약간 유백색
단백질 농도 (mg/mL)	27.3	26.9	28.1	29.2
SEC-HPLC (% 주요 피크), pH 5.5	99.9	97.5	99.8	>99.9
SEC-HPLC (% 주요 피크), pH 7.0	99.4	99.0	99.2	99.8
RP-HPLC (% 주요 피크)	99.6	99.7	99.9	>99.9
pH	6.5	6.6	6.7	6.5
특이 활성 (U/mg)	112	88	98	86
SDS-PAGE (쿠마시)	1% 검정 대조군보다 큰 강도로 새로운 밴드없이 참고 표준과 일치	일치	일치	일치

표 29

[0321]

테스트	기저선	3m	6m	11m
외양 관찰	투명 또는 약간 유백색	투명 또는 약간 유백색	투명 또는 약간 유백색	투명 또는 약간 유백색
단백질 농도 (mg/mL)	27.9	27.4	27.1	29.3
SEC-HPLC (% 주요 피크), pH 5.5	99.9	97.8	99.8	99.9
SEC-HPLC (% 주요 피크), pH 7.0	98.9	98.9	99.2	99.9
RP-HPLC (% 주요 피크)	99.7	99.6	99.8	>99.9
pH	5.9	6.0	6.0	5.9
특이 활성 (U/mg)	87	88	95	90
SDS-PAGE (쿠마시)	1% 검정 대조군보다 큰 강도로 새로운 밴드없이 참고 표준과 일치	일치	일치	일치

[0322] 2-8℃에서 11개월까지 동안 수행된 안정도 연구들은 rhASA 의 품질이 프로토타입 제형물들에서 유지되는 점을 제시하고 있다. 식염수, pH 5.9에서 rhASA의 대표적인 크기 배제 HPLC 프로파일들이 도 14 및 14에 나타나있다. 크기 배제 HPLC는 2-8℃에서 11개월 보관 이후에 rhASA의 결합 상태에서 유의한 변화를 검출하지 못하였다.

[0323] 전반적으로, 세 가지 후보 제형물들 모두에서 약물 산물의 품질은 2-8℃에서 11개월 보관 이후에 유지되었다.

[0324] **실시예 4. 독성학**

[0325] 본 실시예는 6개월 동안 독성학 및 안정성 약물학 관점으로부터 rhASA 의 반복 용량 경막내 (IT) 투여를 기술하고 있다. 본 연구를 위한 IT 테스트 항목은 rhASA 이었다. 36마리 수컷 및 36마리 암컷 사이노몰 원숭이들이 5개의 치료 그룹들로 무작위 배정되었다. 그룹 1에서 동물들은 미치료된 이식 장치 대조군 (포트 및 카테터)이었고 운반체 또는 테스트 항목으로 투여되지 않았지만; 이들 동물들은 테스트 항목 투여 스케쥴과 맞춘 스케쥴로 0.6 mL의 PBS가 투여되었다. 그룹들 2-5에서 동물은 0, 3, 10 또는31 mg/mL의 rhASA의 0.6 mL IT 주입 (전체 용량 0, 1.8, 6.0, 또는18.6 mg)을 격주로 (예로, 전부 12 번 용량)을 받았다. 동물들은 6개월 (마지막 IT 투여 이후 24시간)에 부검되었고, 남아있는 4마리 동물들/성별/그룹이 4주의 회복 기간의 말에 부검되었다. 선택된 조직들은 수확되어 수집되었고 현미경적으로 조사되었다.

[0326] 일반적으로, 테스트 항목 관련 변화들은 두 가지 주요한 유형들로 분류될 수 있었고 모든 용량 수준들에서 존재하였다 (1.8, 6.0 및 18.6 mg/용량). 뇌척수막, 뇌 실질, 척수 실질, 삼차 신경절, 및 때로는 척수 신경근들/신경절 (또는 이들 구조들을 감싸는 신경외막)에서 (일반적으로 두드러진 호산구 성분을 가진 백혈구 세포들의) 침윤물들의 증가가 있었다. 이론이라면 모두에 집착하려고 않는 경우라도, 본 증가는 경막내 공간에서 또한 신경계 조직들에서 테스트 항목 (단백질) 존재로 인한 것으로 해석되었다. 우연한 동물들 (신경아교증(microgliosis))에 있는 척수 및 뇌에서 미세교아 세포들의 약간의 국소적 증가는 고용량 동물들이라면 모두에서 관찰되지 않았다. 형태적 변화들의 분류들 둘 다는 테스트 항목의 존재에 대한 반응인 것으로 해석되었다. 어느 동물에서도 신경적 괴사의 증거는 없었다. 테스트 항목 관련 변화들은 뇌, 척수, 척수 신경근들 또는 신경절에서 생물학적 역반응들과는 전혀 관련이 없었다. 상세하게는, 신경적 괴사 또는 생물학적으로 중요한 신경교반응의 증거는 전혀 없었다. 비-신경계 조직들에서 테스트 항목 관련 병변들은 전혀 없었다.

[0327] 1개월 회복 기간에 이어서 (무투여 기간), 테스트 항목 관련된 변화들은 전부 해결되었거나, 이전의 테스트 항목의 존재와 연관된 염증 반응에서 예전 증가의 잔재에 제한되었다. 회복 동물들에서 형태적 역효과들은 전혀 없었다. 반-정량적인 염색 점수들을 배정하는 가려진 (blinded) 현미경적 조사를 기초로 한 바와 같이, 아릴설파타제 A (rhASA; 테스트 항목)에 대한 면역조직화학적 염색은 테스트 항목 처리된 그룹들 모두의 경우 최종 희생시 뉴런들을 제외하고 다양한 세포 유형들로 뇌 및 척수에서 증가되었다. 본 증가는 간의 컵퍼 세포들(Kupffer cells)에서도 역시 명백하였다. 1개월 회복 기간에 이어서, 테스트 항목 처리된 동물들 (모든 용량 동물들)에서 rhASA 염색은 대조군 (장치 및/또는 운반체 대조군) 수준들로 돌아왔다. 1마리의 저용량 회복 수컷에서, 별아교세포증의 다중 국소들 및 신경 소실이 있었고, 대뇌 피질에서 과거 허혈의 다중 영역들을 가르켰다. 본 동물에서 이들 병변들의 정확한 발병기전 (pathogenesis)은 명확하지 않았더라도, 10배의 용량을 받은 고용량 동물들을 포함하여 다른 테스트 항목 치료된 동물들에서 유사한 병변들의 결여는 테스트 항목과 관련이 없는 것을 가르켰다.

[0328] 본 연구를 위한 테스트 항목은 rhASA이었다. 36마리 수컷 및 36마리 암컷 사이노몰 원숭이들이 5가지의 치료 그룹들로 무작위 배정되었다. 그룹 1의 동물들은 미치료된 이식 장치 대조군 (포트 및 카테터)이었고 운반체 또는 테스트 항목이 투여되지 않았지만; 이들 동물들은 테스트 항목 투여 스케쥴과 맞춘 스케쥴로 0.6 mL의 PBS가 투여되었다. 그룹들 2-5에서 동물은 0, 3, 10 또는31 mg/mL의 rhASA의 0.6 mL IT 주입 (전체 용량 0, 1.8, 6.0, 또는18.6 mg)을 격주로 (예로, 전부 12 번 용량)을 받았다. 동물들은 6개월 (마지막 IT 투여 이후 24시간)에 부검되었고, 남아있는 4마리 동물들/성별/그룹이 4주의 회복 기간의 말에 부검되었다. 선택된 조직들은 수확되어 수집되었고 현미경적으로 조사되었다. 하기 표는 본 연구의 병리학 관점에 속하는 연구 설계를 반영하고 있다.

[0329] 희생 시, 뇌는 대략 3㎜의 관상 슬라이스 두께로 뇌 매트릭스에서 절단되었다. 첫 번째 조각 및 이후 조각은 조직병리학적 평가 및 면역조직화학 분석을 위해 포르말린에 고정되었다. 뇌는 관상 절편들로서 전체가 처리되었다. 이들 절편들은 다음의 뇌 부위들을 최소로 포함하였다.

[0330] -신생피질 (neocortex) (전두, 몸통, 일시적 및 후두 피질을 포함): 뇌 절편들 1 내지 8 (또한 존재할 때 조각 9)

[0331] -고피질 (paleocortex) (후각 망울들 및/또는 이상엽 (piriform lobe)): 뇌 절편들 1 내지 3

[0332] -기저 신경절 (미상엽 및 조가비핵 포함): 뇌 절편들 3 및 4

[0333] -번연계 (limbic system) (해마 및 대상회 (cingulate gyri)를 포함): 뇌 절편들 4 및 5

[0334] -시상/해마 및 흑색질 (substantia nigra)을 포함하는 중간뇌: 뇌 절편들 4 및 5

[0335] -소뇌, 교뇌 (pons) 및 연수 (medulla oblongata): 뇌 절편들 6 내지 8 (또한 존재할 때 조각 9).

[0336] 뇌 절편들은 절편 1 내지 8/9 (절편 9는 일정 동물들의 경우 테스트 기기에 의해 제공됨)로서 데이타 표들에 나열되고 있다. 절편화는 동물들 사이에 약간 다양하였다. 상기에 제공된 뇌 절편들 (1부터 8/9까지)은 다양한 해부적 영역들의 예상된 위치이었다. 뇌 절편들은 (있을 수 있는) 잠재적인 미래의 추가적인 조각 검토를 용이하게 하도록 본 절편에 적절한 진단들을 가지고 개별적 절편들로서 데이타 표들에 나열되어 있다. 데이타 해석 동안, 개별적 뇌 해부 부위들 (상기에 나열된 바와 같음)은 독특한 (예로, 특정한 뇌 부위에 독특한) 테스트 항목 효과들 확인하기 위하여 비교되었다. TPS에서, 모든 동물들로부터 나온 모든 뇌 절편들은 파라핀에 포매되었고, 5마이크론으로 절단되어 헤마톡실린 및 에오신 (H&E)으로 염색되었으며 현미경적으로 조사되었다. 또한, 대조군 및 고용량 동물들로부터 나온 뇌들도 형광-제이드 B (Fluoro-Jade B) (뇌를 신경적 퇴화에 대해 평가하는 민감도를 증가시키는 염색) 및 비엘스코우스키 은 염색 (Bielschowsky뭘 silver stain) (축삭들, 가지세포들 및 신경 필라멘트들의 직접 영상화를 허용하는 절차)으로 염색되었고 조사되었다.

[0337] 척수 (경추, 흉추 및 요추)는 1센티미터 절편들로 절단되었다. 첫 번째 조각 및 이후 두 번째 조각은 조직병리학적 평가 및 면역조직화학 분석을 위해 포르말린에 고정되었다. 모든 동물들로부터 나온 척수 단편들 (경추, 흉추 (카테터 팁 포함) 및 요추)는 대략 5 마이크론으로 절편화되고 H&E로 염색되었으며 각 수준에서 얻은 대각선 및 사선 단편들을 사용하여 조사되었다. 대조군 및 고용량 그룹들로부터 나온 일련의 척수 절편들은 추가적으로 비엘코우스키 은 염색 및 항-GFAP (별아교세포들의 직접 영상화 및 그들의 공정들을 허용하는 면역조직화학적 염색)로 염색되었다.

[0338] 등 척수 신경근들 및 신경절 (중-경부, 중-흉부, 및 중-요추에서 얻음)은 파라핀에 포매되었고 일련의 절편들은 H&E로 염색되었다. 또한, 대조군 및 고용량 그룹들로부터 나온 일련의 단편들은 비엘코우스키 은 염색으로 염색되었다.

[0339] 모든 동물들로부터 나온 좌골, 전경골 및 비복 신경 절편들의 경우: 각 신경의 가로 절편은 파라핀에 포매되었고 대략 5마이크론으로 절편화되어 H&E로 염색되었다. 각 신경의 세로 절편은 오스뮴으로 후-고정되었고 스푸르 레진 (Spurr뭘 resin)에 포매되었으며 대략 1 내지 2 마이크론으로 절편화되어 톨루이딘 블루로 염색되었다. 오스뮴 후-고정 및 레진 포매는 말초 신경들에서 미엘린의 월등한 보존 또한 신경의 더 자세한 조사를 제공한다.

[0340] 모든 동물들로부터 수집된 모든 조직들 및 부검시 수확된 총 병변들도 역시 파라핀에 포매되어 H&E로 염색되었으며 현미경적으로 조사되었다. 조직병리학적 처리 및 평가들 또한 면역조직화학적 분석들은 TPS에 의해 수행되었다.

[0341] **아릴설파타제 A (rhASA) 염색**

[0342] 양성 대조군 슬라이드들은 연구 후원자에 의해 공급되었다. 슬라이드들은 rhASA로 주사된 마우스로부터 나온 간 절편들이었다. 양성 대조군 슬라이드들 모두는 간에 있는 컵퍼 세포들 (시누소이드 대식세포들)에서 rhASA의 충분한 증거를 보여주었다. 양성 대조군 슬라이드들은 본 연구로부터 나온 다른 슬라이드들과 함께 보관되었다. rhASA 염색된 절편들의 평가들 모두는 처음에 동물의 치료 그룹을 가리고 시행되었다. 이것은 병리학자가 (평가되는 실제 동물의 지식을 가진 조력자에 의해) 가려진 라벨 위의 동물 번호로 rhASA 염색된 슬라이드들을 읽도록 하고, 평가하는 동안 점수 (중증도 등급)를 구술하고, 동일한 조력자가 바로 염색 점수 (중증도 등급)를 데이타 표들 내에 기록하도록 하여 수행되었다. 다음으로, 동물 ID는 정확한 데이타 입력을 보장하도록 연구 신경병리학자 및 조력자 둘 다에 의해 확인되었다. 본 절차는 세포내 rhASA의 검출을 위한 면역조직화학적 염색으로 전반적인 염색 강도의 판단에 편견이 도입되지 않도록 시행되었다. 뉴런들, 뇌척수막 대식세포들, 혈관주위 대식세포들 및 교아세포들 (별아교세포들 및 미세교아세포들이지만 우세하게는 미세교아세포들)의 염색의 상대적 정도가 뇌 및 척수 절편들 모두에서 등급이 매겨졌다. 각 그룹의 경우 각 뇌 및 척수 수준에서 평균 중증도 점수들은 그룹으로 합산되었고 뇌, 일반, rhASA 염색 또한 척수, 일반, rhASA 염색으로 조직 하의 전체값으로서

기록되었다.

[0343] 일반적으로, 뇌의 뉴런들에서 rhASA 염색은 대뇌 피질 및 뇌에 있는 다른 핵 영역들에서 뉴런들의 척도가 되었다. 뇌척수막 대식세포들에서 rhASA 염색은 뇌척수막 대식세포들 및/또는 뇌척수막 대식세포들에 있는 내인성 rhASA에 의한 테스트 항목의 흡수의 증거가 되었다. 혈관주위 대식세포들의 rhASA 염색은 뇌 및 척수에서 혈관주위 공간 (버코우-로빈스 공간)이 뇌척수막과 연속적이라는 점이 강조되어야 하더라도, 뇌/척수에서 대식세포들에 의한 rhASA (또는 내인성rhASA)의 흡수의 척도가 되었다. 일반적으로, 교아세포들에서 rhASA의 등급 매기기는 우세하게는 테스트 항목의 흡수/ 특히 대뇌 피질 (대뇌 부채살 (corona radiata)은 대뇌 피질 아래의 백색질임)의 회색 및/또는 백색질 내로 테스트 항목의 침투의 척도가 되었다. 백색질에서 rhASA 염색은 별아교세포들 및 미세교아세포들에 존재하는 것으로 보였다.

[0344] 다음의 등급 매기기 계획은 다양한 세포 유형들에서rhASA 염색의 정도를 점수 매기는 데 사용되었다 (뉴런들, 교아세포들, 대식세포들).

[0345] **등급 설명 (가능한 염색된 세포들의 %)**

[0346] 1 10% 이하

[0347] 2 10 내지 25% 이상

[0348] 3 25 내지 50% 이상

[0349] 4 50 내지 75% 이상

[0350] 5 75% 이상

[0351] 본 계획이 엄격하게 정량적이지 않은 점을 명심하라. 이것은 뇌 및 척수를 rhASA를 사용한 염색 정도로 접근하는 효과적인 반-정량적인 방법으로서 사용되었다. 연구 신경병리학자에 의해 모든 신경적 영역들이 동등한 rhASA 염색을 가지지는 않는 점을 언급되었다. 일정 대조군 동물들에서 내인성 신경 염색이 존재하고 맥락막총 (choroid plexus)의 세포들 및 배근 신경절의 뉴런들이 대조군 동물에서도 rhASA에 대해 강하게 염색시키는 경향이 있는 점도 역시 언급되었다. 맥락막총 및 배근 신경절의 염색은 등급이 매겨지지 않았지만 연구 신경병리학자에 의해 대조군 동물들에서도 두드러진 것이 언급되었다.

[0352] 주석: 모든 용량 그룹들: 저용량 = 1.8 mg/dose; 중간 용량 = 6.0 mg/dose; 고용량 = 18.6 mg/dose. 모든 용량 그룹들 (수컷 및 암컷: 하기 참조)의 간에서 증가된 rhASA 염색을 제외하고 비-신경계 조직들에서 테스트 항목 관련 병변들이 없었다.

[0353] *최종 희생 동물들 (6개월 투여): rhASA 염색된 절편들*

[0354] 다음의 조직들/세포 유형들에는 rhASA 염색의 증가가 있었다. 특정한 용량 그룹에 있는 특정한 세포 유형에서 rhASA 염색의 정도에 미치는 테스트 항목 효과를 고려할 때, 동시적인 운반체 대조군 및 장치 대조군 (회복 희생 동물들과 함께 희생됨)이 비교를 위해 고려되었다.

[0355] 뇌, 뇌척수막들, 대식세포들 (모든 용량 그룹들, 수컷들 및 암컷들)

[0356] -뇌, 혈관주위, 대식세포들 (모든 용량 그룹들, 수컷들 및 암컷들)

[0357] -뇌, 교아세포들 (모든 용량 그룹들, 수컷들 및 암컷들)

[0358] -척수, 뇌척수막들, 대식세포들 (모든 용량 그룹들, 수컷들 및 암컷들)

[0359] -척수, 혈관주위, 대식세포들 (모든 용량 그룹들, 수컷들 및 암컷들)

[0360] -척수, 교아세포들 (중간 및 고용량 수컷들 및 암컷들)

[0361] -간, 컵퍼 세포들 (모든 용량 그룹들, 수컷들 및 암컷들)

[0362] 내인성 염색 때문에, 뇌 및 척수의 뉴런들에서 rhASA 염색 수준들은 특이적으로 정의하는 것이 가장 어려웠다. rhASA 염색은 뇌척수막 및/또는 뇌/척수 혈관주위 대식세포들에서 또한 교아세포들 내에서도 지속적으로 증가된 수준들의 rhASA를 보여주었다. 뉴런들에서 rhASA 염색은 대조군 및 테스트 항목 치료된 동물들 간에 검출가능한 차이들이 없었다.

[0363] *회복 희생 동물들 (6개월 EOW 투여에 이어서 1개월 무투여기간)*

[0364] 일반적으로, 테스트 항목 관련 변화들은 전적으로 해결되거나 부검 이전에 무투여 1개월 기간이 허용된 이들 동물들에서 명백하게 감소되었다. 다음의 현미경적 변화들이 테스트 항목과의 가능한 관련성을 가르키는 발병 및/또는 중증도에서 존재한다. 테스트 항목 관련 현미경적 변화들 (회복 동물들)

[0365] -뇌, 뇌척수막들, 침윤물들 (중간 및 고용량 그룹들, 양쪽 성별) (도 16 및 도 17)

[0366] -뇌, 뇌척수막들, 침윤물들, % 호산구들 (중간 용량 수컷들; 고용량 암컷들)

[0367] -뇌, 혈관주위, 침윤물들 (중간 용량 수컷들; 고용량 암컷들) (도 18)

[0368] -뇌, 혈관주위, 침윤물들, % 호산구들 (중간 용량 수컷들; 고용량 암컷들)

[0369] -뇌, 회색질, 침윤물들 (모든 용량 그룹들, 양쪽 성별)

[0370] -뇌, 회색질, 침윤물들, % 호산구들 (저용량 수컷들)

[0371] -뇌, 회색질, 호산구들, 괴사 (저용량 수컷들)

[0372] -척수, 뇌척수막들, 침윤물들 (중간 및 고용량 수컷들 또한 고용량 암컷들)

[0373] -척수, 뇌척수막들, 침윤물들, % 호산구들 (중간 용량 수컷들; 저용량 암컷들)

[0374] -척수, 회색질, 침윤물들 (저용량 암컷들)

[0375] -척수, 회색질, 침윤물들, % 호산구들 (저용량 암컷들)

[0376] -배근 신경절 및 신경근들, 신경외막, 침윤물들 (중간 용량 암컷들)

[0377] -척수 신경근들 및 신경절, 침윤물들, 호산구들 (중간 및 고용량 수컷들; 모든 용량들, 암컷들)

[0378] -삼차 신경절, 침윤물들, 호산구들 (중간 용량 수컷들 및 암컷들)

[0379] 이들 모든 변화들은 최종 희생 동물들에서 관찰되는 증가된 염증 변화들의 잔재를 나타내는 것으로 해석되었다. 최종 희생 동물들에서와 같이, 일정 회복 동물들에서 여전히 존재하는 염증 세포 침윤물의 증가가 역효과들을 초래하는 형태적 변화들을 나타내는 증거는 전혀 없었다. 비-신경계 조직들에서는 테스트 항목 관련 병변들이 전혀 없었다.

[0380] *회복 희생 동물들 (6개월 EOW 투여에 이어서 1개월 무투여기간): rhARA 염색*

[0381] 장치 및/또는 운반체 대조군들과 대비하여, 회복 수컷들 또는 암컷들에서 증가된 rhASA 염색의 표시는 전혀 없었다. 저, 중간 및 고용량 회복 수컷들의 뇌에서, 장치 및/또는 운반체 대조군들과 대비하여, 일정 세포 유형들 (이것은 치료 그룹들 중에 다양함)에서 감소된 rhASA 염색의 표시가 실제로 있었다. 이것이 실제적인 효과인지 여부를 포함하여 이것의 이유는 명확하지 않았다. 한 가지 가능한 설명은 rhASA의 투여가 내인성 rhASA 생산에서 일정 감소를 초래할 수 있다는 것이다. 유사한 발견이 수컷들의 척수에서는 존재하지 않았다. 회복 수컷들 및 암컷들에서, 간에서의 염색은 대조군들에서 언급된 것과 유사하였다.

[0382] 일반적으로, 테스트 항목 관련 변화들은 두 가지 주요한 유형들로 분류될 수 있었고 모든 용량 수준들에서 존재하였다 (1.8, 6.0 및 18.6 mg/용량).

[0383] 뇌척수막, 뇌 실질, 척수 실질, 삼차 신경절, 및 때로는 척수 신경근들/신경절 (또는 이들 구조들을 감싸는 신경외막)에서 (일반적으로 두드러진 호산구 성분을 가진 백혈구 세포들의) 침윤물들의 증가가 있었다. 본 증가는 경막내 공간에서 또한 신경계 조직들에서 테스트 항목 (단백질) 존재로 인한 것으로 해석되었다.

[0384] 우연한 동물들 (신경아교증 (microgliosis))에 있는 척수 및 뇌에서 미세교아 세포들의 약간의 국소적 증가는 고용량 동물들이라면 모두에서 관찰되지 않았다. 형태적 변화들의 분류들 둘 다는 테스트 항목의 존재에 대한 반응인 것으로 해석되었다. 어느 동물에서도 신경적 괴사의 증거는 없었다. 테스트 항목 관련 변화들은 뇌, 척수, 척수 신경근들 또는 신경절에서 생물학적 역반응들과는 전혀 관련이 없었다. 상세하게는, 신경적 괴사 또는 생물학적으로 중요한 신경교 반응의 증거는 전혀 없었다. 비-신경계 조직들에서 테스트 항목 관련 병변들은 전혀 없었다. 1개월 회복 기간에 이어서 (무투여 기간), 테스트 항목 관련된 변화들은 전부 해결되었거나, 이전의

테스트 항목의 존재와 연관된 염증 반응에서 예전 증가의 잔재에 제한되었다. 회복 동물들에서 형태적 역효과들은 전혀 없었다.

[0385] 반-정량적인 염색 점수들을 배정하는 가려진 현미경적 조사를 기초로 한 바와 같이, 아릴설파타제 A (rhASA; 테스트 항목)에 대한 면역조직화학적 염색은 테스트 항목 처리된 그룹들 모두의 경우 뉴런들을 제외하고 다양한 세포 유형들로 뇌 및 척수에서 증가되었다. 본 증가는 간의 컵퍼 세포들에서도 역시 명백하였다. 1개월 회복 기간에 이어서, 테스트 항목 처리된 동물들 (모든 용량 동물들)에서 rhASA 염색은 대조군 (장치 및/또는 운반체 대조군) 수준들로 돌아왔다. 1마리의 저용량 회복 수컷에서, 별아교세포증의 다중 국소들 및 신경 소실이 있었고, 대뇌 피질에서 이전 허혈의 다중 영역들을 가르켰다. 본 동물에서 이들 병변들의 정확한 발병기전은 명확하지 않았더라도, 10배의 용량을 받은 고용량 동물들을 포함하여 다른 테스트 항목 치료된 동물들에서 유사한 병변들의 결여는 테스트 항목과 관련이 없는 것을 가르켰다. 엄격하게 본 연구에서 전체 및 현미경적 발견들을 기초로 하여 (포매된 파라핀 위에 에마톡실린 및 에오신 염색된 절편들), 관찰된 역효과 수준 (NOAEL)은 18.6 mg이 아니었다.

[0386] **실시예 5. 약물역학적 데이타**

[0387] 6개월 동물 데이타

[0388] 본 실시예는 rhASA 의 혈청 및 CSF 농도들 또한 노던 바이오메디칼 리서치사 (Northern Biomedical Research, Inc.)로부터 얻은 항-rhASA 혈청 항체들에 관한 해석적 분석을 제공하고 있다.

[0389] 본 실시예의 목적은 어린 사이노몰 원숭이들 (< 12개월)에서 독성학 및 안전성 약물학 관점으로부터 rhASA의 반복 용량 경막내 (IT) 투여를 평가하는 것이었다. 전체 12번 용량들이 6개월 기간에 주어졌다. 동물들은 마지막 용량 이후에 24시간 또는 1개월째 부검되었다. 연구 설계는 표 30에 나타나 있다. 하기 표 30은 연구 설계를 나타낸다. 이 때 DC = 장치 대조군; 그룹 1 동물은 운반체 또는 테스트 항목이 투여되지 않았다. 운반체 대조군 동물 번호 044는 누출 카테터로 인해 50일에 일찍 희생되었다.

표 30

[0390]

연구 설계					
그룹	동물수	용량 농도 (mg/mL)	투여량 (mg)	6 개월 희생 동물수	1 개월 회복 희생 동물수
1	4M, 4F	DC	0	-	4M, 4F
2	8M, 8F	0	0	4 M, 3 F[a]	4M, 4F
3	8M, 8F	3	1.8	4 M, 4 F	4M, 4F
4	8M, 8F	10	6.0	4 M, 4 F	4M, 4F
5	8M, 8F	31	18.6	4 M, 4 F	4M, 4F

[0391] **검정 방법들- *항체 분석***

[0392] 사이노몰 원숭이들로부터 얻은 혈청 및 CSF에서 항-rhASA 항체들의 정량이 유효한 방법을 사용하여 시행되었다. 간략하게, 검정은 MSD 스트렙트아비딘 코팅된 플레이트를 차단하여 시작하고, 바이오틴-표지된 rhASA과의 배양이 이어진다. 세척 단계 이후에, 희석된 시료들, 측정기들, 및 QC들이 플레이트에 첨가되고 배양된다. 추가적인 세척 단계 이후에, SULFO TAG-표지된 약물이 첨가되고 배양된다. 최종 세척 단계가 수행되고 MSD 리딩 완충액이 첨가된다. 플레이트들은 즉시 해독된다. 상대적인 발광 단위들 (RLU)로의 신호 데이타가 SOFTMax 프로 주형들을 사용하여 분석된다.

[0393] 혈청 및 CSF 농도

[0394] 사이노몰 원숭이들로부터 얻은 혈청 및 CSF에서 rhASA 의 정량이 유효한 방법을 사용하여 시행되었다. 본 방법은 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA) 기법을 기초로 한다. 간략하게, 마이크로플레이트는 재조합 인간 아릴설파타제 A (ASA)에 대해 올라간 토끼 폴리클론 항체 (SH040)로 코팅된다. ASA 참조 표준들 및 테스트 시료들과 배양 이후에, 결합된 ASA 단백질은 호스래디쉬 퍼옥시다제 (HRP)-결합된 항-ASA 모노클론 항체 (클론 19-16-3)에 의해 검출된다. 다음으로, 플레이트는 HRP, TMB 퍼옥시다제에 대한 기질과 배양된다. 본 효소-기질 반응은 2N 황산 (H_2SO4)의 첨가에 의해 정지되고 각 웰의 흡광도가 기준 파장 655 nm를 사용하여 흡광도 파장 450 nm에서

측정된다. 시료들에서 ASA의 농도들이 동일한 플레이트에서의 ASA 산정 곡선을 사용하여 계산된다.

[0395] rhASA 의 혈청 농도들, rhASA 의 CSF 농도들, 항-rhASA 혈청 항체 농도들,

[0396] 항-rhASA CSF 항체 농도들, 또한 그룹 및 성별에 의한 항체들의 발생 빈도의 요약들이 표 33 내지 39에 표현되어 있다. 하기 표 33은 사이노몰 원숭이들에서 rhASA 의 혈청 농도의 요약을 나타낸다.

표 31

[0397]

표 32

[0398]

표 33

그룹 1: 운반체 대조군	수컷			암컷		
	평균	SD	n	평균	SD	N
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
용량 2 이전	0	0	4	0	0	4
용량 2 이후	0	0	4	0	0	4
용량 4 이전	0	0	4	0	0	4
용량 4 이후	0	0	4	0	0	4
용량 6 이전	0	0	4	0	0	4
용량 6 이후	0	0	4	0	0	4
용량 8 이전	0	0	4	0	0	4
용량 8 이후	0	0	4	0	0	4
용량 10 이전	0	0	4	0	0	4
용량 10 이후	0	0	4	0	0	4
용량 12 이전	0	0	4	0	0	4
용량 12 이후	0	0	4	0	0	4
중간 부검	0	0	4	0	0	4
회복 부검	0	0	4	0	0	4

그룹 2: 0 mg	수컷			암컷		
	평균	SD	n	평균	SD	N
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
용량 2 이전	0	0	8	0	0	7
용량 2 이후	0	0	8	0	0	7
용량 4 이전	0	0	8	0	0	7
용량 4 이후	0	0	8	0	0	7
용량 6 이전	0	0	8	0	0	8
용량 6 이후	0	0	8	0	0	8
용량 8 이전	0	0	8	0	0	8
용량 8 이후	0	0	8	0	0	8
용량 10 이전	0	0	8	0	0	7
용량 10 이후	0	0	8	0	0	7
용량 12 이전	0	0	8	0	0	7
용량 12 이후 (6 개월 부검 이전)	0	0	8	0	0	8

[0399]

중간 부검	0	0	4	0	0	4
회복 부검	0	0	4	0	0	4

그룹 3: 1.8 mg	수컷			암컷		
	평균	SD	n	평균	SD	N
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
용량 2 이전	0	0	8	0	0	8
용량 2 이후	49.2	46.8	8	40.3	27.3	8
용량 4 이전	0	0	8	0	0	8
용량 4 이후	0	0	8	0	0	8
용량 6 이전	0	0	8	0	0	8
용량 6 이후	0	0	8	0	0	8
용량 8 이전	0	0	8	0	0	8
용량 8 이후	0	0	8	0	0	8
용량 10 이전	0	0	8	0	0	8
용량 10 이후	0	0	8	0	0	8
용량 12 이전	0	0	8	0	0	8
용량 12 이후 (6 개월 부검 이전)	0	0	8	0	0	8
중간 부검	0	0	4	0	0	4
회복 부검	0	0	4	0	0	4

그룹 4: 6.0 mg	수컷			암컷		
	평균	SD	n	평균	SD	N
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
용량 2 이전	0	0	8	0	0	8
용량 2 이후	173.6	69.5	8	143.2	89.0	8
용량 4 이전	0	0	8	0	0	8
용량 4 이후	17	49	8	63.8	119.9	8
용량 6 이전	0	0	8	0	0	8
용량 6 이후	0	0	8	0	0	8
용량 8 이전	0	0	8	0	0	8
용량 8 이후	0	0	8	0	0	8
용량 10 이전	0	0	8	0	0	8
용량 10 이후	0	0	8	0	0	8
용량 12 이전	0	0	8	0	0	8

[0400]

용량 12 이후(6 개월 부검 이전)	0	0	8	0	0	8
중간 부검	0	0	4	0	0	4
회복 부검	0	0	4	0	0	4

그룹 5: 18.6 mg	수컷			암컷		
	평균	SD	n	평균	SD	N
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
용량 2 이전	0	0	8	0	0	8
용량 2 이후	348.0	272.9	8	562.3	204.3	8
용량 4 이전	0	0	8	0	0	8
용량 4 이후	105.7	274.6	8	172.0	141.3	8
용량 6 이전	0	0	8	0	0	8
용량 6 이후	20.4	38.4	8	88.6	121.4	8
용량 8 이전	0	0	8	0	0	8
용량 8 이후	0	0	8	54.0	89.4	8
용량 10 이전	0	0	8	0	0	8
용량 10 이후	0	0	8	6	18	8
용량 12 이전	0	0	8	0	0	8
용량 12 이후 (6 개월 부검 이전)	0	0	8	0	0	8
중간 부검	0	0	4	0	0	4
회복 부검	0	0	4	0	0	4

[0401]

[0402] 표 34는 사이노몰 원숭이들에서 CSF 농도의 요약을 나타낸다.

표 34

그룹 1: 운반체 대조군	수컷			암컷		
	평균	SD	n	평균	SD	N
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
용량 2 이전	0	0	4	0	0	4
용량 2 이후	0	0	4	0	0	4
용량 4 이전	0	0	4	0	0	4
용량 4 이후	0	0	4	0	0	4
용량 6 이전	0	0	4	0	0	4
용량 6 이후	0	0	4	0	0	4
용량 8 이전	0	0	4	0	0	4
용량 8 이후	0	0	4	0	0	4
용량 10 이전	0	0	4	0	0	4
용량 10 이후	0	0	3	0	0	4
용량 12 이전	0	0	3	0	0	4
용량 12 이후	0	0	3	0	0	4
중간 회복	0	0	3	0	0	4
회복 부검	0	0	4	0	0	4

그룹 2: 0 mg	수컷			암컷		
	평균	SD	n	평균	SD	n
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
용량 2 이전	0	0	6	0	0	7
용량 2 이후	0	0	5	0	0	7
용량 4 이전	0	0	5	0	0	6
용량 4 이후	0	0	5	0	0	5
용량 6 이전	0	0	5	0	0	5
용량 6 이후	0	0	5	0	0	5
용량 8 이전	0	0	5	0	0	5
용량 8 이후	0	0	5	0	0	5
용량 10 이전	0	0	4	0	0	5
용량 10 이후	0	0	4	0	0	5
용량 12 이전	0	0	4	0	0	5
용량 12 이후(6 개월 부검 이전)	0	0	5	0	0	5

[0403]

중간 회복	0	0	2	0	0	3
회복 부검	0	0	4	0	0	4

그룹 3: 1.8 mg	**수컷**			**암컷**		
	평균	SD	n	평균	SD	n
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
용량 2 이전	42491	59255	7	42217	47300	6
용량 2 이후	95886	22626	7	125717	61723	6
용량 4 이전	17664	24372	6	50829	41891	6
용량 4 이후	106783	42823	6	138400	49908	6
용량 6 이전	39400	50105	4	45817	38404	6
용량 6 이후	95275	12836	4	104080	37423	5
용량 8 이전	25799	31589	4	58086	43821	5
용량 8 이후	148750	34664	4	119200	66556	5
용량 10 이전	25927	31380	4	30380	30328	5
용량 10 이후	89975	29494	4	105200	44603	5
용량 12 이전	29746	34267	4	82780	65906	5
용량 12 이후 (6 개월 부검 이전)	32030	39155	7	47331	49015	6
중간 회복	0	0	3	0	0	2
회복 부검	0	0	4	0	0	4
그룹 4: 6.0 mg	**수컷**			**암컷**		
	평균	SD	n	평균	SD	n
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
용량 2 이전	75203	67002	8	146979	233673	6
용량 2 이후	360000	179276	8	267667	103369	6
용량 4 이전	58064	77210	8	53285	73340	5
용량 4 이후	369250	241251	8	305517	152232	6
용량 6 이전	77253	91407	8	97987	146762	6
용량 6 이후	418600	200098	5	369000	232238	5
용량 8 이전	66342	80374	5	11592	23072	4
용량 8 이후	329400	209841	5	340500	135128	4
용량 10 이전	119420	148408	5	74031	104609	2
용량 10 이후	412000	149278	5	245500	161927	2
용량 12 이전	68651	92902	5	74577	105251	2

[0404]

용량 12 이후 (6 개월 부검 이전)	141833	173933	7	58986	99016	4
중간 회복	0	0	3	0	NA	1
회복 부검	0	0	4	0	0	4

그룹 5: 18.6 mg	**수컷**			**암컷**		
	평균	SD	n	평균	SD	n
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
용량 2 이전	289917	291188	7	201339	250774	8
용량 2 이후	734429	298352	7	920143	448409	7
용량 4 이전	150238	210302	7	169895	185675	6
용량 4 이후	984857	570039	7	965167	425924	6
용량 6 이전	265479	252067	7	288879	226889	6
용량 6 이후	758143	102009	7	1270000	558533	6
용량 8 이전	190529	240081	7	196021	199396	6
용량 8 이후	1003429	538271	7	989800	585072	5
용량 10 이전	176297	272500	7	168864	191087	6
용량 10 이후	1013000	390673	7	773400	103717	5
용량 12 이전	142334	196793	5	430542	436534	6
용량 12 이후 (6 개월 부검 이전)	291525	350251	7	252142	381200	6
중간 회복	0	0	3	0	0	2
회복 부검	0	0	4	0	0	4

[0405]

[0406] 표 35는 혈청에서 항- rhASA 항체 농도의 요약을 나타낸다.

표 35

그룹 1: 운반체 대조군	수컷			암컷		
	평균	SD	n	평균	SD	n
시간대	ng/mL	ng/Ml		ng/mL	ng/mL	
투여전 2	0	0	4	0	0	4
투여전 4	0	0	4	0	0	4
투여전 6	0	0	4	0	0	4
투여전 8	0	0	4	0	0	4
투여전 10	0	0	4	0	0	4
투여전 12	0	0	4	0	0	4
중간 회복	0	0	4	0	0	4
회복 부검	0	0	4	0	0	4

그룹 2: 0 mg	수컷			암컷		
	평균	SD	n	평균	SD	n
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
투여전 2	0	0	8	0	0	8
투여전 4	0	0	8	0	0	8
투여전 6	0	0	8	0	0	7
투여전 8	0	0	8	0	0	7
투여전 10	0	0	8	0	0	7
투여전 12	0	0	8	0	0	7
부검 (최종 용량 24 시간 후)	0	0	4	0	0	4
중간 회복	0	0	4	0	0	4
회복 부검	0	0	4	0	0	4

그룹 3: 1.8 mg	수컷			암컷		
	평균	SD	n	평균	SD	N
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
투여전 2	0	0	8	0	0	8
투여전 4	18409	21371	8	27648	37504	8
투여전 6	75913	64863	8	85625	79871	8
투여전 8	132163	95576	8	151900	97818	8
투여전 10	392338	606626	8	290675	186213	8
투여전 12	499438	735028	8	524438	569523	8

[0407]

부검 (최종 용량 24 시간 후)	261625	157865	4	733550	928411	4
중간 회복	339250	265888	4	377175	218955	4
회복 부검	712500	1107129	4	295525	174718	4

그룹 4: 6.0 mg	**수컷**			**암컷**		
	평균	SD	n	평균	SD	N
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
투여전 2	0	0	8	0	0	8
투여전 4	30419	30561	8	64000	89510	8
투여전 6	143693	128094	8	191750	150511	8
투여전 8	325750	190651	8	305850	224707	8
투여전 10	669125	515458	8	832188	846241	8
투여전 12	946125	651530	8	1060775	1088889	8
부검 (최종 용량 24 시간 후)	713500	598812	4	1047568	1132048	4
중간 회복	1566000	708132	4	975500	1149734	4
회복 부검	1113250	554510	4	793000	991450	4

그룹 5: 18.6 mg	**수컷**			**암컷**		
	평균	SD	n	평균	SD	N
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
투여전 2	0	0	8	0	0	8
투여전 4	56873	39107	8	39994	53411	8
투여전 6	311638	237796	8	193263	208952	8
투여전 8	482875	270130	8	399363	360425	8
투여전 10	1006750	857916	8	866875	894776	8
투여전 12	1419000	1382276	8	1341500	1373771	8
부검 (최종 용량 24 시간 후)	165000	147463	4	407300	268570	4
중간 회복	2884250	1363128	4	2101500	2090420	4
회복 부검	2504250	1118042	4	1506000	1524682	4

[0408]

[0409] 표 36은 CSF에서 항-rhASA 항체 농도의 요약을 나타낸다

표 36

그룹 1: 운반체 대조군	수컷			암컷		
	평균	SD	n	평균	SD	n
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
수술	0	0	4	0	0	4
투여전 2	0	0	4	0	0	4
투여전 4	0	0	4	0	0	4
투여전 6	0	0	4	0	0	4
투여전 8	0	0	4	0	0	4
투여전 10	0	0	4	0	0	4
투여전 12	0	0	3	0	0	4
중간 회복	0	0	3	0	0	4
회복 부검	0	0	4	0	0	4

그룹 2: 0 mg	수컷			암컷		
	평균	SD	n	평균	SD	n
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
수술	0	0	7	0	0	6
투여전 2	0	0	6	0	0	7
투여전 4	0	0	5	0	0	6
투여전 6	0	0	5	0	0	5
투여전 8	0	0	5	0	0	5
투여전 10	0	0	4	0	0	5
투여전 12	0	0	4	0	0	5
부검 (최종 용량 24 시간 이후)	0	0	3	0	0	2
중간 회복	0	NA	1	0	0	3
회복 부검	0	0	4	0	0	4

그룹 3: 1.8 mg	수컷			암컷		
	평균	SD	n	평균	SD	n
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
수술	0	0	7	0	0	8
투여전 2	0	0	7	0	0	6
투여전 4	0	0	6	41	101	6
투여전 6	685	1317	4	632	1413	5

[0410]

투여전 8	2238	2596	4	2180	4875	5
투여전 10	3393	5038	4	5560	12433	5
투여전 12	6436	8266	4	12700	28398	5
부검 (최종 용량 24 시간 이후)	14848	12401	4	21442	32382	4
중간 회복	29307	40617	3	18700	283	2
회복 부검	21060	30010	3	13078	7181	4

그룹 4: 6.0 mg	**수컷**			**암컷**		
	평균	SD	n	평균	SD	n
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
수술	0	0	7	0	0	8
투여전 2	0	0	7	0	0	6
투여전 4	99	172	7	84	187	5
투여전 6	1117	1862	8	1473	2775	6
투여전 8	3987	5580	5	20824	27320	4
투여전 10	6600	9679	5	2715	1237	2
투여전 12	5285	7279	5	955	1237	2
부검 (최종 용량 24 시간 이후)	16870	16350	4	63000	63000	3
중간 회복	66233	42238	3	16800	NA	1
회복 부검	53600	14388	3	28880	29890	4

그룹 5: 18.6 mg	**수컷**			**암컷**		
	평균	SD	n	평균	SD	n
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
수술	0	0	7	0	0	6
투여전 2	0	0	7	0	0	8
투여전 4	102	192	7	0	0	6
투여전 6	233	351	7	1506	3234	6
투여전 8	3378	5931	7	6367	9865	6
투여전 10	16327	24035	7	19567	27542	6
투여전 12	11596	16406	5	15143	24351	6
부검 (최종 용량 24 시간 이후)	5168	7427	4	12135	10341	4
중간 회복	54700	26439	3	46315	62770	2
회복 부검	50725	29217	4	37790	35967	4

[0411]

[0412] 표 37은 수컷 및 암컷을 조합한 rhASA의 혈청 및 CSF 농도 (ng/mL)를 나타낸다.

표 37

그룹 1: 운반체 대조군	혈청 rhASA (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
	그룹 전체			그룹 전체		
시간대	평균	SD	n	평균	SD	N
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
용량 2 이전	0	0	8	0	0	8
용량 2 이후	0	0	8	0	0	8
용량 4 이전	0	0	8	0	0	8
용량 4 이후	0	0	8	0	0	8
용량 6 이전	0	0	8	0	0	8
용량 6 이후	0	0	8	0	0	8
용량 8 이전	0	0	8	0	0	8
용량 8 이후	0	0	8	0	0	8
용량 10 이전	0	0	8	0	0	8
용량 10 이후	0	0	8	0	0	7
용량 12 이전	0	0	8	0	0	7
용량 12 이후	0	0	8	0	0	7
중간 회복	0	0	8	0	0	7
회복 부검	0	0	8	0	0	8

그룹 2: 0 mg	혈청 rhASA (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
	그룹 전체			그룹 전체		
시간대	평균	SD	n	평균	SD	N
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
용량 2 이전	0	0	16	0	0	13
용량 2 이후	0	0	16	0	0	12
용량 4 이전	0	0	16	0	0	11
용량 4 이후	0	0	16	0	0	10
용량 6 이전	0	0	15	0	0	10
용량 6 이후	0	0	15	0	0	10
용량 8 이전	0	0	15	0	0	10
용량 8 이후	0	0	15	0	0	10

[0413]

용량 10 이전	0	0	15	0	0	9
용량 10 이후	0	0	15	0	0	9
용량 12 이전	0	0	15	0	0	9
용량 12 이후 (6 개월 부검 이전)	0	0	15	0	0	10
중간 회복	0	0	8	0	0	5
회복 부검	0	0	8	0	0	8

그룹 3: 1.8 mg	혈청 rhASA (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
	그룹 전체			그룹 전체		
시간대	평균	SD	n	평균	SD	N
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
용량 2 이전	0	0	16	42365	51844	13
용량 2 이후	44.7	37.3	16	109654	45639	13
용량 4 이전	0	0	16	34247	36982	12
용량 4 이후	0	0	16	122592	47311	12
용량 6 이전	0	0	16	43250	40831	10
용량 6 이후	0	0	16	100167	27992	9
용량 8 이전	0	0	16	43736	40298	9
용량 8 이후	0	0	16	132333	53926	9
용량 10 이전	0	0	16	28401	28890	9
용량 10 이후	0	0	16	98433	37220	9
용량 12 이전	0	0	16	59209	58253	9
용량 12 이후 (6 개월 부검 이전)	0	0	16	39092	42786	13
중간 회복	0	0	8	0	0	5
회복 부검	0	0	8	0	0	8

그룹 4: 6.0 mg	혈청 rhASA (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
	그룹 전체			그룹 전체		
시간대	평균	SD	n	평균	SD	N
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
용량 2 이전	0	0	16	105964	157408	14
용량 2 이후	158.4	78.7	16	320429	153832	14
용량 4 이전	0	0	16	56226	72638	13
용량 4 이후	40.6	91.7	16	341936	203284	14
용량 6 이전	0	0	16	86139	113563	14

[0414]

용량 6 이후	0	0	16	393800	206033	10
용량 8 이전	0	0	16	42009	65286	9
용량 8 이후	0	0	16	334333	169995	9
용량 10 이전	0	0	16	106452	130375	7
용량 10 이후	0	0	16	364429	160707	7
용량 12 이전	0	0	16	70344	87227	7
용량 12 이후 (6 개월 부검 이전)	0	0	16	111707	151129	11
중간 회복	0	0	8	0	0	4
회복 부검	0	0	8	0	0	8

그룹 5: 18.6 mg	혈청 rhASA (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
	그룹 전체			그룹 전체		
시간대	평균	SD	n	평균	SD	N
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
용량 2 이전	0	0	16	242676	264338	15
용량 2 이후	455.1	257.8	16	827286	378379	14
용량 4 이전	0	0	16	159311	191264	13
용량 4 이후	138.8	213.7	16	975769	488021	13
용량 6 이전	0	0	16	276279	231010	13
용량 6 이후	54.5	93.8	16	994385	453568	13
용량 8 이전	0	0	16	193064	213058	13
용량 8 이후	27.0	67.1	16	997750	531567	12
용량 10 이전	0	0	16	172866	228817	13
용량 10 이후	3.2	13	16	913167	319975	12
용량 12 이전	0	0	16	299538	365275	11
용량 12 이후 (6 개월 부검 이전)	0	0	16	273348	349718	13
중간 회복	0	0	8	0	0	5
회복 부검	0	0	8	0	0	8

[0415]

[0416] 표 38는 수컷 및 암컷을 조합한 혈청 및 CSF 항- rhASA 항체 (ng/mL)를 나타낸다.

표 38

그룹 1: 운반체 대조군	혈청 항- rhASA 항체 (ng/mL)			CSF 항- rhASA 항체 (ng/mL)		
	그룹 전체			그룹 전체		
	평균	SD	n	평균	SD	N
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
수술				0	0	8
투여전 2	0	0	8	0	0	8
투여전 4	0	0	8	0	0	8
투여전 6	0	0	8	0	0	8
투여전 8	0	0	8	0	0	8
투여전 10	0	0	8	0	0	8
투여전 12	0	0	8	0	0	7
중간 회복	0	0	8	0	0	7
회복 부검	0	0	8	0	0	8

Group 2: 0 mg	혈청 항- rhASA 항체 (ng/mL)			CSF 항-rhASA 항체 (ng/mL)		
	그룹 전체			그룹 전체		
	평균	SD	n	평균	SD	n
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
수술				0	0	13
투여전 2	0	0	16	0	0	13
투여전 4	0	0	16	0	0	11
투여전 6	0	0	15	0	0	10
투여전 8	0	0	15	0	0	10
투여전 10	0	0	15	0	0	9
투여전 12	0	0	15	0	0	9
부검 (최종 용량 24 시간 이후)	0	0	8	0	0	5
중간 회복	0	0	8	0	0	4
회복 부검	0	0	8	0	0	8

그룹 3: 1.8 mg	혈청 항- rhASA 항체 (ng/mL)			CSF 항- rhASA 항체 (ng/mL)		
	그룹 전체			그룹 전체		
	평균	SD	n	평균	SD	n

[0417]

시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
수술				0	0	15
투여전 2	0	0	16	0	0	13
투여전 4	23028	29871	16	21	72	12
투여전 6	80769	70467	16	656	1284	9
투여전 8	142031	93979	16	2206	3796	9
투여전 10	341506	436656	16	4597	9386	9
투여전 12	511938	635340	16	9916	20970	9
부검 (최종 용량 24 시간 이후)	497588	666122	8	18145	22972	8
중간 회복	358213	226397	8	25064	29302	5
회복 부검	504013	766860	8	16499	18552	7

그룹 4: 6.0 mg	혈청 항- rhASA 항체 (ng/mL)			CSF 항- rhASA 항체 (ng/mL)		
	그룹 전체			그룹 전체		
	평균	SD	n	평균	SD	n
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
수술				0	0	15
투여전 2	0	0	16	0	0	13
투여전 4	47209	66899	16	93	170	12
투여전 6	167721	137276	16	1269	2205	14
투여전 8	315800	201572	16	11470	19344	9
투여전 10	750656	682110	16	5490	8143	7
투여전 12	1003450	868860	16	4048	6328	7
부검 (최종 용량 24 시간 이후)	880534	857199	8	36640	45439	7
중간 회복	1270750	938646	8	53875	42430	4
회복 부검	953125	763122	8	39474	26274	7

그룹 5: 18.6 mg	혈청 항-rhASA 항체 (ng/mL)			CSF 항-rhASA 항체 (ng/mL)		
	그룹 전체			그룹 전체		
	평균	SD	n	평균	SD	n
시간대	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
수술				0	0	13
투여전 2	0	0	16	0	0	15
투여전 4	48433	46054	16	55	146	13
투여전 6	252450	224723	16	821	2204	13

[0418]

투여전 8	441119	310702	16	4757	7781	13
투여전 10	936813	849893	16	17822	24652	13
투여전 12	1380250	1331905	16	13531	20189	11
부검 (최종 용량 24 시간 이후)	286150	238760	8	8652	9129	8
중간 회복	2492875	1686472	8	51346	36819	5
회복 부검	2005125	1347857	8	44258	31114	8

[0419]

[0420] 표 39는 부검 시 항- rhASA 항체의 발생 빈도를 나타낸다.

표 39

그룹	**혈청 항체-양성 동물 (양성/전체)**				**CSF 항체 양성 동물 (양성/전체)**			
	M		**F**		**M**		**F**	
	6 개월 부검	회복 부검	6 개월 부검	회복 부검	6 개월 부검	회복 부검	6 개월 부검	회복 부검
1 (DC)	NA	0/4	NA	0/4	NA	0/4	NA	0/4
2 (운반체)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/3	0/4	0/2	0/4
3 (1.8 mg IT)	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/3	3/4	4/4
4 (6.0 mg IT)	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/3	2/3	4/4
5 (18.6 mg IT)	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4	4/4	4/4

[0421]

[0422] 사이노몰 원숭이 혈청에서 rhASA 에 대한 정량 한계는 39.1 ng/mL이고, 그룹 1 및 2로부터 나온 모든 혈청 시료들은 정량 한계 (BQL) 미만이고, 표 33을 참조하라. rhASA의 혈청 수준들이 미리 또한 용량들 2, 4, 6, 8, 10, 및 12 (6-개월 부검) 이후 24시간째 month necropsy), 회복 기간 동안의 중간, 또한 회복 부검 이전에 테스트되

었다. RhASA 수준들은 그룹 3 (1.8 mg/용량), 그룹 4 (6.0 mg/용량), 및 그룹 5 (18.6 mg/용량)에서 미리 또한 용량들 2, 4, 6, 8, 10, 및 12 (6-개월 부검) 이후 24시간째, 회복 기간 동안의 중간, 또한 회복 부검 이전에 검출가능하지 않았다. 용량 2 이후에, rhASA의 혈청 수준들은 용량-관련되어 있었다. 용량4 (그룹 3), 용량 6 (그룹들 3 및 4), 및 용량8 및 10 (그룹들 3 및 4 또한 그룹 5 수컷들) 이후에, rhASA 수준들은 검출가능하지 않았다. RhASA의 혈청 수준들은 용량 4 이후 그룹 4 (6.0 mg/용량)에서, 또한 수컷들의 경우 용량 4 및 6 또한 암컷들의 경우 용량들 4, 6, 8 및 10에서 강하되었다. 혈청 rhASA 수준들에서 본 분명한 강하는 항- rhASA 항체들의 증가하는 농도와 관련될 수 있다. RhASA의 혈청 수준에서 본 연구에서 주어진 시료 다양성 및 작은 그룹 수들로는 분명한 성별 차이들은 없었다.

[0423] 사이노몰 원숭이CSF에서 rhASA의 정량 한계는 19.5 ng/mL이고 그룹 1 및 2로부터 나온 모든 CSF 시료들은 BQL이었으며, 표 34을 참조하라. RhASA는 CSF에서 모든 투여된 그룹들에서 미리 또한 용량들 2, 4, 6, 8, 10, 및 12 (6개월 부검) 이후에 검출가능하였다. CSF에서 수준들은 혈청에서 수준들보다 더 컸다. RhASA의 CSF 수준들에서 본 연구에서 주어진 시료 다양성 및 작은 그룹 수들로는 분명한 성별 차이들이 없었다. rhASA는 모든 용량 그룹들에서 회복 기간 동안의 중간 및 회복 부검 이전에 검출가능하지 않았다. rhASA 치료된 그룹들의 경우 용량 12 (부검) 수집물들에서 CSF 수준들은 투여 이후 8 및 11 수준들보다 더 낮았다. 부검시 더 낮은 rhASA 수준들에 대한 가능성 있는 이유들은 살아있을 때 투여 간격에서 취한 부피 (rhASA 의 농도를 위해 투여 이전 또는 이후 0.5 mL까지) 대비 부검시 취한 더 큰 부피 (세포수, 화학, rhASA 및 항 RHASA 항체를 위해 전체 ~2.25 mL)를 포함한다. 추가적으로, 일정 동물들은 부검시 특허 카테터들을 가지지 않았고, 시료들은 카테터를 통하기 보다는CM 탭을 사용하여 취하였다. 본 경로는 지속적으로 카테터를 통한 시료 채취와 대비하여 더 낮은 rhASA 농도들을 수득하였다. 이것은 원숭이들 및 사람과 같은 수직적-방향 동물들에서 일어나는 것으로 알려진 CSF 대량 유동 (bulk flow)의 입-꼬리 방향 (rostrocaudal direction)으로 인한 것 같다 (예로, CSF의 성분들은 개체들의 전수명을 통하여 현저한 입-꼬리 방향 구배들을 나타내는 것으로 잘 알려져 있음).

[0424] 혈청에서 항- rhASA 항체들은 일정 시간대에 RHASA로 처리된 동물 모두에서 검출되었고, 표 35를 참조하라. 동물들은 항- rhASA 항체의 수준이 정량 한계 (78.1 ng/mL) 초과라면 항- rhASA에 양성으로 정의된다. 일단 혈청이 전환되면 동물들은 항- rhASA 항체에 양성으로 남아있었다. 동물들은 투여 이전 2 시간대에 항- rhASA 항체들에 양성이 전혀 아니었다. 수컷 번호 026(그룹 4; 6.0 mg/용량)를 제외한 모든 rhASA 동물들은 투여 이전 4 시간대에 혈청 항- rhASA 항체들에 양성이었다. 수컷 번호 026은 투여 이전 6시간대에 혈청 항체에 양성이었다. 그룹 5(18.6 mg/kg)에서, 부검 항체 시료들은 더 낮은 항체 수준들을 가졌다. 본 명백한 감소는 본 검정과 간섭하는 rhASA의 존재로 인할 수 있다. 일반적으로 역가는 저용량 동물들 (1.8 mg/용량)보다 중간- 및 고용량 그룹들 (6.0 및 18.6 mg/용량)에서 더 높았다. 항- rhASA 항체들의 존재는 재조합 인간 단백질로 사이노몰 원숭이들을 치료하는 것으로부터 기대되는 결과이다. 결과들에서 다양성이 주어지지만, 명백한 성별 차이들은 없었다.

[0425] CSF에서 검출가능한 항- rhASA 를 가지는 동물들 모두는 암컷 번호 049 (그룹 3; 1.8 mg/용량) 및 057 (그룹p 4; 6.0 mg/용량)를 제외하고는, 혈청에서도 검출가능한 rhASA 항체들을 가졌다. 항체 농도에서 다양성 및 빈도는 용량 반응의 결정을 가로막는다. 동물들은 항- rhASA 항체의 수준이 정량 한계 (78.1 ng/mL) 초과라면 항-rhASA에 양성으로 정의된다.

[0426] 혈청 및 CSF RHASA 수준들 및 항-RHASA 항체들의 경우 수컷들 및 암컷들의 조합 수치들이 표 36 및 표 37에 나타나 있다. 조합된 수컷 및 암컷 결과들은 상기에 논의된 개별적 성별들과 유사하다.

[0427] **실시예 6. 효능**

[0428] 본 실시예에서, 11마리의 야생형 대조군 (mASA +/+ hASA -/-) 마우스가 그룹 A로 배정되었고 전혀 치료를 받지 않았다. 34마리의 hASAC69S/ASA -/- 마우스가 5가지 용량 그룹들 각각에 배정되었고 운반체 (그룹 B) 또는 용량들 20 mg/kg (정맥내 [IV]; 그룹 C) 또는 0.04, 0.12, 및 0.21 mg (그룹들 D, E, 및 F, respectively)에서의 rhASA (rhASA)를 1, 9, 15/16, 및 22일에 수여받았다. 모든 IV 용량들이 꼬리 정맥을 통해 투여되었다. 모든 경막내 (IT) 용량들이 12 uL 부피로의 주입으로서 대략 2 uL/20초의 범위로 투여되었다 (표40). 하기 표 40은 연구 설계를 나타낸다.

표 40

그룹	동물수	동물형	치료	용량	경로	전체 주사수	희생	용량 mg/kg 뇌무게 [a]
A	11	야생형 대조군 (mASA +/+ hASA -/-)	None	NA	NA	NA	NA	NA
B	9	hASAC69S/ ASA -/-	운반체 대조군	운반체	IT 요추	4 (1, 9, 15/16[b], 22 일)	네 번째 용량 이후 24 시간	0
C	5		rhASA	20 mg/kg	IV (꼬리정맥)			NA
D	5		rhASA	0.04 mg	IT 요추			100
E	5		rhASA	0.12 mg	IT 요추			300
F	10		rhASA	0.21 mg	IT 요추			520

NA = 미적용; IT = 경막내; IV = 정맥내.

[a] 마우스의 뇌 무게는 대략 0.0004 kg.

[b] 그룹들 C, D, 및 E 는 15 일에 투여; 그룹 B 및 E 는 16 일에 투여함.

[0429]

[0430] ASA 녹아웃 마우스 hASAC69S/ASA(-/-)가 MLD의 허용된 모델이고, 본 질환의 가능성 있는 치료들을 테스트하는 데 사용되었다. 본 경막내 경로는 인간들에서 의도된 투여 경로이다. 정맥내 투여 경로는 MLD 마우스에서 본 화합물 및 유사한 화합물에 대해 테스트되어 왔다. 정맥내 대조군 그룹이 말초 기관들에서 기대되는 조직학적 변화들에 양성 대조군으로서 첨가되었다. 동물들은 rhASA 의 100, 300, 또는 520 mg/kg 뇌 무게 (각각 0.04, 0.12, 0.21 mg)을 수여받았다. 본 연구를 위해 선택된 뇌 무게로 정상화된 용량 수준들은 인간들에서 사용을 위해 계획되거나 독성학 연구들 및 이전의 리소좀 축적병들의 효능 모델들에서 사용되어 왔던 용량들에 해당한다. 이들은 독성을 가질 것으로 기대되지 않았다.

[0431] *처방*

[0432] 동물종마우스 (Mus musculus)

[0433] 품종hASAC69S/ASA (-/-) 마우스 및 야생형 대조군들

[0434] 연령도착 시 대략 14 내지 17개월

[0435] 그룹 수들6

[0436] 동물 수들34마리 ASA 녹아웃 마우스 + 11마리 야생형 대조군들

[0437] 각 동물은 도착에 이어서 건강 상태를 평가하도록 조사되었다.

[0438] *사육*

[0439] 동물들은 고온 폴리카보네이트 필터-천장 (polycarbonate filter-top) 사육상자들에서 케어프레쉬 종이 베딩 (CareFresh paper bedding) 및 물병들을 가지고 집단으로 사육되었다. 각 상자는 프로젝트, 그룹 및 동물 번호들, 및 성별을 표시하는 상자 카드로 명확하게 라벨되었다. 각 동물은 귀 천자 시스템을 사용하여 독특하게 확인되었다. 동물들은 정부 지침에 따라 처리되었다.

[0440] 동물실 환경 및 광주기를 위한 목표 조건들은 다음과 같았다:

[0441] 온도 22℃±3℃

[0442] 습도 50%±20%

[0443] 광주기 12시간씩 명암

[0444] 용량 투여 동안 또한 이를 이어서, 광주기가 스케쥴 활동들을 위해 일시적으로 방해되었다. 이러한 방해들은 본 연구의 성과 또는 품질에 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

[0445] 모든 사용가능한 야생형 동물들 (11마리)는 그룹 A로 배정되었고 35 내지 45번으로 번호가 매겨졌다. ASA (-/-) hASA (+/-) 동물들은 순응 기간 동안 그들의 상자들부터 분리되었고 무게를 달고, 귀 천자되면서 연속적 번호들 (1 내지 34번)을 배정받았다. 다음으로 동물들은 리서치 랜더마이저 (Research Randomizer, www.randomizer.org)를 사용하여 2011년 1월 3일에 치료 그룹들로 배정되었다. 첫 번째 9마리의 번호들이 그룹 B에, 다음 5마리의 번호들이 그룹 C에, 다음 5마리의 번호들이 그룹 D에, 다음 5마리의 번호들이 그룹 E에, 최종 10마리의 번호들이 그룹 F에 배정되었다.

[0446] 동물들은 다음과 같이 배정되었다. 하기 표 41은 동물 배정을 나타낸다.

표 41

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

[a] 동물 번호 19는 투여시 제 위치에 없었다.

[b] 동물 번호 3은 투여 시작 전에 죽었다.

[0447]

[0448] *테스트 항목및 운반체*

[0449] **테스트 항목**

[0450] **특성** rhASA

[0451] **명세**인간 재조합 아릴설파타제 A (rhASA)

[0452] **보관 조건** 대략 4℃

[0453] **운반체**

[0454] **특 성**rhASA 운반체 (154 mM NaCl, 0.005% 폴리솔베이트 20, pH ~6.0)

[0455] **보관 조건** 대략 4℃

[0456] *운반체의 제조*

[0457] 운반체는 제공된 바와 같이 사용되었다. 운반체는 (상온) 벤치 탑에서 데워졌다. 일단 운반체가 데워지면, 재료가 가만히 회전 및 역전시키면서 혼합되었다. 병들은 볼텍스 또는 진탕되지 않았다. 병들은 재료를 첨가하기 이전에 건조되었다. 남아있는 운반체는 냉장고로 돌려보냈다 (1℃-8℃).

[0458] *용량 제형물 제조*

[0459] rhASA는 필요한 농도들을 달성하도록 운반체로 희석되었다. 테스트 항목은 (상온) 벤치 탑에서 데워졌다. 일단 테스트 항목이 데워지면, 재료가 가만히 회전 및 역전시키면서 혼합되었다. 병들은 볼텍스 또는 진탕되지 않았다.

[0460] *주사들을 추적하는 염색약들:*

[0461] 적외선 염색약 (IRDye® LI-COR Biosciences, Lincoln, NE와 같음)이 주사들을 추적하는 데 사용되었다. 이것과 같은 염색약들이 경막내 투여 이후 생존 절차로서 경막내 주사들에 사용되었다. 염색약은 투여 이전 테스트 항목과 혼합되었고; 1 uL로 1 nmole의 염색약이 테스트 항목에 첨가되었다. 적외선 염색약에 추가하여, In 1 uL의 FD&C blue #1 (0.25%)가 주사들을 추적하는 데 사용되었다. 본 청색 염색약은 공통적인 식품 첨가물이고 일반적으로 안전하고 비독성으로 고려된다.

[0462] **rhASA 또는 운반체의 요천골 IT 주사**

[0463] 그룹들 B, D, E, 및 F의 동물들은1, 9, 15 또는 16, 및 22일에 경막내 주사들을 맞았다.

[0464] 어른 마우스는 200-300 uL/ 10 그램 체중 (250-350 mg/kg)으로 1.25% 2,2,2 트리브로모에탄올 (Avertin)을 사용한 복강내 주사에 의해 마취되었다. 등의 털은 꼬리 기저부 및 어깨 사이가 제거되었고 면도된 영역은 포비딘/베타딘 스크럽으로 소독되었고 이소프로필 알코올이 이어졌다. 작은 중앙선 피부 절개 (1-2 cm)가 허리엉치 척수 위로 만들어졌고 등 중앙선 및 회장 (단일 회장) 날개들의 머리 면의 교차가 확인되었다. 장골와 (gluteus medius)에서의 근육은 심장 모양의 근육이고 "심장"의 첨단의 두 면들은 대략 회장의 날개들의 위치에 온다. 기체가 채워진 10-20 uL 유리 해밀턴 주사기에 부착된 32게이지 바늘은 내재하는 뼈로부터 저항이 느껴질 때까지 삽입되었다. 테스트 항목의 10 uL 주사가 2 uL/20초 (10 uL/2분)의 대략적인 속도로 수행되었다. 피부 절개는 적절한 상처 클립을 사용하여 닫혔다. 주상의 성공은 가시적인 청색 염색약뿐만 아니라 적외선 염색약이 CNS 전체를 통하여 분포하는지 여부를 결정하는 영상화에 의해 판단되었다. 영상화 이후에, 동물들은 회복실에서 회복하도록 허용되었다.

[0465] **rhASA의 정맥내 주사**

[0466] 그룹 C의 동물들은 1, 9, 15, 및 22일에 정맥내 주사를 맞았다.

[0467] IV 주사를 위해, 동물들은 필요한 경우 이소플루란 (isoflurane)을 사용하여 마취되었고, 현상억제제 (restrainer)에 나두었다. 꼬리 정맥은 손가락으로 꼬리를 가만히 때려서 보온하는 것에 의해 확장되었다. 다음으로 주사 부위는 70% 에탄올로 소독하였다. 임의적으로, 동물은 항온실 (40℃)에 1-1.5분 동안 두었다. 28- 내지 30-게이지 바늘이 테스트 물질을 주사하는 데 사용되었다. 주사의 부피는 5-10 mL/kg이었다.

[0468] 4번째 용량 이후 대략 24시간째, 그룹들 B-F의 동물들은 안락사되었다. 동물들은 하기에 상술된 바와 같이, 서로 다른 조직 수집 절차들로 처리되도록 하였다. 그룹 A의 동물들은 처리되지 않았지만; 2001년 1월 28일 또는 28일에 안락사되었고 조직 수집 절차들로 처리되었다.

[0469] **혈청 (모든 동물들)**

[0470] 최종 혈액 시료 (대략0.5 mL)가 후방안와 천자를 통해 이소플루란 마취 하에서 모든 동물들 (그룹들 A-F)로부터 수집되었다. 유리 튜브는 안와에 두었고, 눈 뒤의 영역을 가만히 침투하여 눈 뒤에 위치한 정맥 유출을 파괴하였다. 혈액은 모세관 작용 및/또는 중력 유동에 의해 채취되었다. 혈액 채취에 이어서, 출혈을 정지하도록 안와에 압력이 적용되었다.

[0471] 전혈 시료들은 혈청으로 분리되었고 < -80℃로 냉동되었다. 혈청은 -80℃에 보관되었고 항체들을 위해 분석되었다.

[0472] **광학현미경 조사들을 위한 조직들 (그룹들 A-F; 그룹당 5마리의 마우스)**

[0473] 혈액 채취 이후에, 동물들은 CO_2 질식에 의해 안락사되었다. 자른 꼬리가 관류 이전에 수집되었고 가능한 유전형 분석을 위해 냉동되었다. 심장주변 공동이 노출되었다. 그룹 당 세 마리 (3) 마우스가 얼음으로 식힌 헤파린화 식염수액 (무균-여과된0.9% NaCl에 넣은 1 U/mL 소듐 헤파린)로 다음으로 대략 4℃에서 4% 파라포름알데하이드로 경심장 관류되었다. 뇌가 제거되었고, 복부는 내장 기관들이 좀 더 노출되도록 절개되었다. 뇌 및 시체는 얼려진 자른 꼬리를 제외하고는 파라포름알데하이드에 두었다.

[0474] **지질 분석을 위한 조직들 (그룹들 A, B, 및 F; 각각 6, 4, 및 5 마리의 동물들)**

[0475] 혈액 채취 이후에, 동물들은 CO_2 질식에 의해 안락사되었다. 자른 꼬리가 관류 이전에 수집되었고 가능한 유전형 분석을 위해 냉동되었다. 심장주변 공동이 노출되었다. 지질 분석들을 위해, 4-6마리의 마우스가 얼음으로 식힌 헤파린화 식염수액 (무균-여과된0.9% NaCl에 넣은 1 U/mL 소듐 헤파린)로 경심장 관류되었다. 지질 분석들을 위해 수집된 대표적인 조직들은 표 42에 표현되어 있다. 하기 표 42는 지질 분석을 위해 수집된 조직들을 나타낸다.

표 42

조직 분석을 위해 수집된 조직들	
뇌 (좌우 반구들로 분리되어 무게를 측정함)	신장 (2)
척수 (척수 기둥으로부터 제거됨)	
좌골신경(2) (근육 없이 해부됨)	꼬리 절개 (관류 이전)

[0476]

[0477] 채취 시, 조직들은 무게를 달았고 다음으로 드라이아이스 상에 또는 -80℃ 냉동고에 두어서 냉동되었다. 뇌는 좌우 반구들로 분리되었다. 우반구는 Ms에 의한 지질 분석에 사용될 것이다. 좌반구는 가능한 N-아세틸-L-아스파테이트 (NAA) 분석으로 분석될 것이다. 조직들은 분석 시까지 -80℃에서 보관되었다 (표 43 참조). 하기 표 43은 시료 보관 조건들을 나타낸다.

표 43

시료형	보관 온도
혈청	*circa* –80ºC 로 냉동
지질 분석을 위한 조직들	*circa* –80ºC 로 냉동
꼬리 절개	*circa* –80ºC 로 냉동
광학현미경법을 위한 조직들	대략 4°C

[0478]

[0479] rhASA는 MLD 마우스의 척수에서, 상세하게는 백색질에서 설파타이드 축적을 감소시켰다, 도 19. 척수의 형태측정 분석 (morphometry)는 알시안 블루 염색의 광학 밀도가 rhASA 투여 이후 통계적으로 유의하게 감소되는 것을 보여주었다, 도 20. rhASA 처리된 MLD 마우스도 역시 뇌에서 감소된 리소좀 활성을 나타냈다, 도 21. 본 감소는 운반체 처리된 동물들과 비교하여 고용량 그룹 (0.21 mg- 520 mg/kg 뇌 무게)에서 통계적으로 유의하였다, 도 22.

[0480] 1년령의 면역내성 (Immunotolerant) MLD 마우스 (hASAC69S/ASA(-/-)) 가 매주 한 번 4주 동안 (전부 4번 용량들) rhASA 의 경막-요추 투여를 받았다. 용량은 운반체 (154 mM NaCl, 0.005% 폴리솔베이트 20, pH ~6.0)이었다. 최종 시간대, 효능은 뇌 및 척수 내에서 설파타이드 청소 (clearance) 및 리소좀 활성의 면역조직화학 접근에 의해 평가되었다. 척수 및 뇌 절편들은 조직들에서 설파타이드들을 표적하는 알시안 블루 염색을 사용하여 염색되었다. 뇌 절편들은 리소좀 프로세싱의 표시인자인 리소좀-연관 막 단백질 (LAMP)의 존재를 위해서도 역시 염색되었다. 추가적으로, 형태측정 분석이 알시안 블루 및 LAMP 염색된 척수 (경부, 흉부 및 요부) 및 뇌의 절편들 상에서 수행되었다.

[0481] 이들 예비적 결과들은 rhASA 의 경막내 요추 투여의 효능을 보여주고 있다. 운반체 대조군 마우스와 대비하여, rhASA 처리된 MLD 마우스는 뇌에서 감소된 설파타이드 축적 (알시안 블루 염색에 의해 주목됨) 및 리소좀 활성과 같은 질환의 조직학적 마커들 내에서 향상의 증거를 나타내고 있다. 이들 조직병리적 변화들은 투여 부위 (척수) 근처, 말단 척수, 뿐만 아니라 뇌의 원위 부분들에서 관찰되었다.

[0482] **실시예 7. 생체배분 2**

[0483] *개관*

[0484] 본 연구에서, 36마리 수컷 및 36마리 암컷 청년 사이노몰 원숭이들 (개시 시 < 12개월)이 각 5가지 용량 그룹들에 배정되었고 rhASA를 용량들 0 (장치 대조군; 동물들은 0.6 mL의 PBS가 투여됨), 0 (운반체 대조군), 1.8, 6.0, 또는 18.6 mg (각각 그룹들 1, 2, 3, 4, 및 5)으로 격주로 6개월 동안 전부 12번 수여받았다. 모든 용량은 0.6 mL 부피의 주입으로서 투여되었고, 대략 10분 동안 주어진0.5 mL의 PBS로 세척이 이어졌다 (표 44). 하기 표 44은 연구 설계를 나타낸다. 이 때 DC = 장치 대조군; 그룹 1 동물은 운반체 또는 테스트 항목이 투여되

지 않았다. [a]운반체 대조군 동물 번호 044는 누출 카테터로 인해 50일에 일찍 희생되었다.

표 44

[0485]

연구 설계					
그룹	동물수	용량 농도 (mg/mL)	투여량 (mg)	6 개월 희생 동물수	1 개월 회복 희생 동물수
1	4M, 4F	DC	0	-	4M, 4F
2	8M, 8F	0	0	4 M, 3 F[a]	4M, 4F
3	8M, 8F	3	1.8	4 M, 4 F	4M, 4F
4	8M, 8F	10	6.0	4 M, 4 F	4M, 4F
5	8M, 8F	31	18.6	4 M, 4 F	4M, 4F

[0486] **재료 및 방법들**

[0487] *조직 채취*

[0488] 뇌들은 대략 3㎜ 관상 슬라이스 두께로 뇌 매트릭스에서 절단되었다. 각 뇌는 신생피질 (neocortex) (전두, 몸통, 일시적 및 후두 피질을 포함), 고피질 (paleocortex) (후각 망울들 및/또는 이상엽 (piriform lobe)), 기저 신경절 (미상엽 및 조가비핵 포함), 변연계 (limbic system) (해마 및 대상회 (cingulate gyri)를 포함), 시상/해마 및 중간회 (흑색질 (substantia nigra)을 포함), 소뇌, 교뇌 (pons) 및 연수 (medulla oblongata): 를 포함하는 관상 조각들로 절편화되었다. 개별적 조직 시료들이 획득되는 (4-㎜ 생검 천자에 의함) 위치들은 도 133-138에 나타난 바와 같다. 도 133-138의 그림들은 위스콘신 대학 및 미시건주 비교 포유동물 뇌 수집기관 (또한 국립 보건원 박물관)으로부터 나온다. 천자 번호 22는 본 구조가 부검 동안 존재하지 않아서 채취되지 못하였다. 모든 뇌 시료들은 냉동되었고 효소-결합 면역흡착 검정법을 사용하는 rhASA 분석 이전에 -60℃미만에서 보관되었다.

[0489] 첫 번째 조각 및 이후 두 번째 조각은 조직병리학적 평가 및 면역조직화학 분석을 위해 포르말린에 고정되었다. 두 번째 뇌 조각 및 이후 두 번째 조각은 테스트 항목 농도 분석을 위해 냉동되었다. 냉동 이전에, 뇌 시료들은 생체배분 분석을 위해 짝수의 테스트 항목 분석 뇌 조각들의 오른쪽 부분으로부터 가져왔다. 뇌 시료들의 위치는 부검시 사진을 찍었고 뇌 조각 번호는 기록되었다. 시료들은 수집된 백색질의 양을 최적화하도록 4㎜ 원형 천자 또는 스카펠을 사용한 절단 둘 중 하나로 획득되었다. 모든 천자물들은 냉동되었고 -60℃ 미만에서 테스트 항목 분석을 위해 보관되었다. 뇌 조각들의 나머지는 냉동되었고 -60℃ 미만에서 가능한 테스트 항목 분석을 위해 보관되었다. 천자물들의 위치들은 첨부 B에 나타나 있다.

[0490] 척수 (경부, 흉부 및 요부)는 1센티미터 단편들로 절단되었다. 첫 번째 조각 및 이후 두 번째 조각은 조직병리학적 평가 및 면역조직화학 분석을 위해 포르말린에 고정되었다. 두 번째 척수 조각 및 이후 두 번째 조각은 테스트 항목 농도 분석을 위해 냉동되었고, -60℃ 이하에서 테스트 항목 분석을 위해 보관된다. 조각들의 분포는 경막내 카테터의 팁으로 얻은 조각 (조각 0)이 포르말린에 고정되고 조직병리학으로 분석되도록 조정되었다.

[0491] *뇌, 간, 및 척수 추출물들의 준비 또한 rhASA 농도의 결정*

[0492] 뇌 천자물들, 척수, 및 간 시료들은 미국 식품 및 의약품 관리부 (FDA) 바람직한 연구실 시행 (GLP) 규칙들 21 CFR, 파트 58에 따르는 인증된 방법을 사용하고 또한 적용가능한 중서부 생물연구 표준 작동 절차들로 분석되었다. 조직 시료들은 용해 완충액에서 균질화 되었고, 조직 잔여물라면 모두를 제거하도록 원심분리되었으며 검정될 때까지 -80℃에 보관되었다. 균질물들의 용해성 분획들에서 rhASA 농도는 포획 항체로서 폴리클론 토끼 항체 SH040 및 검출 항체로서 HRP (호스래디쉬 퍼옥시다제)-결합된 항-ASA 모노클론 항체19-16-3 를 사용하는 ELISA에 의해 결정되었다. 미결합된 물질을 제거하는 세척 단계 이후에, 테트라메틸벤지딘 (TMB) 기질 용액은 초기 단계에서 항ASA 항체에 결합된 ASA 양에 비례적인 비색 신호를 생산하도록 HRP-결합 항체의 존재 하에 퍼옥시다제와 반응시켰다. 각 조직 균질물에서 그 결과 얻은 rhASA양은 표준 곡선으로부터 외삽되었다.

[0493] 또한 시료들은 비신코닌산 (BCA) 단백질 결정 검정법에 의해 미지 시료에서의 단백질 농도를 획득하도록 분석되었다. 각 시료의 단백질 농도는 알부민 표준 곡선의 간입에 의해 결정되었다. 다음으로 rhASA 농도 결과들은 비신코닌산 검정법 (bicinchoninic acid assay)에 의해 결정된 바와 같이 조직 추출물에서 전체 단백질로 정상화

되었다.

[0494] 운반체, 1.8 mg/용량, 6.0 mg/용량, 및 18.6 mg/용량 그룹들에 대한 모든 천자물들의 ASA 수준들은 도 23, 도 24, 도 25, 및 도 26에 각각 나타나있다. 장치 대조군, 운반체, 1.8 mg/용량, 6.0 mg/용량, 및 18.6 mg/용량 그룹들에 대한 회복 동물들의 모든 천자물들의 ASA 수준들은 도 27, 도 28, 도 29, 도 30, 및 도 31에 각각 나타나 있다.

[0495] 뇌의 표면 (뇌척수막) 근처에서 가져온 선택된 천자물의 ASA 수준들은 도 32에 나타나 있다. 깊은 뇌 백색질을 대부분 포함하는 것으로 고려되는 선택된 천자물의 rhASA 수준들은 도 33에 나타나있다. 백색질은 미엘린화된 신경세포 공정들 (또는 축삭들)의 묶음으로 구성된다. 깊은 뇌 회색질로부터 나온 물질을 대부분 포함하는 선택된 천자물들은 도 34에 나타나있다. 회색질은 백색질과는 대조적으로 신경세포체들을 포함한다. 표면, 깊은 백색 및 깊은 회색질로부터 나온 선택된 천자물에서 ASA 수치들은 각 용량 그룹의 경우 도 35에 나타나 있다.

[0496] 척수 농도 데이타는 도 36에 나타나 있다.

[0497] 간 농도 데이타는 도 37에 나타나 있다.

[0498] 장치 및 운반체-투여된 대조군 그룹들의 간, 척수, 및 뇌에서의 ASA 농도 수준들은 일정 경우들에서 측정가능하였다. 간 및 척수에서 수준들은 rhASA-처리된 그룹들보다 더 낮았다 (도 23, 도 32, 및 도 33). 장치 대조군 및 운반체-투여된 동물들에서 측정되는 rhASA 수준은 자연 그대로의 사이노몰 원숭이 단백질과 ELISA에 사용되는 항-rhASA 항체 간 교차-반응성을 보여준다. 장치 대조군 및 운반체 조직들에서의 보고된 수치들은 항체 및 사이노몰구스 ASA간 교차 반응성의 정도가 미지이고 검정 표준들은 인간 ASA를 사용하는 사실 때문에, 조직들에서 사이노몰 원숭이rhASA에 대한 정량적 수치들을 보여주지 않고 있다. 그러나 이론이라면 모두에 집착하려고 않더라도, 장치 대조군 및 운반체-투여된 조직들 사이에 검출되는 ASA 수준들에서 다양성은 서로 다른 조직들 및 해부적 부위들에서 사이노몰구스 ASA의 상대량들에서 나타나는 다양성으로서 해석될 수 있다.

[0499] 척수 조각들에서의 ASA 수준들은 1.8, 6.0, 및 18.6 mg/용량 그룹들의 경우 각각 수컷들에서 160-2352, 1081-6607, 및 1893-9252 ng/mg단백질 또한 암컷들에서 0-3151, 669-6637, 및 1404-16424 ng/mg 단백질의 범위이었다 (도 32). rhASA 수준들은 척수의 경추 부위보다는 요추 부위에서 더 높았다. 간에서 검출되는 ASA 단백질의 수준들은 ASA 처리된 그룹들에서 용량 반응성이었고 운반체 그룹에서는 매우 낮았다. 평균 ASA 수준들은 1.8, 6.0, 및 18.6 mg/용량 그룹들의 경우 각각 수컷들에서 88, 674, 및 2424 또한 암컷에서 140, 462, 및 1996 ng/mg 단백질이었다 (도33).

[0500] 전반적으로, ASA 수준은 척수 조각들로부터 제조된 시료들 및 ASA-투여된 그룹들의 간에서 용량-관련되는 것으로 보였다. 많은 테스트된 뇌 부위들은 ASA 수준들 및 rhASA 투여 간에 분명한 용량 관련성을 보여주었던 한편 다른 것들은 더 애매하였다.

[0501] **실시예 8. 약물역학 및 생체배분 연구**

[0502] 본 연구의 목적은 사이노몰 원숭이들에게 경막내 (IT) 및 정맥내 (IV) 투여 이후에 다양한 치료적 대체 효소들의 약물역학 (PK) 및 생체배분을 평가하는 것이다. 본 연구에서, 특허 경막내-요추 (IT-L) 및 경막내-대수공 (IT-CM) 카테터들을 가지는 12마리의 수컷 및 12마리의 암컷 사이노몰 원숭이들이 체중에 의해 제 1a상 (I2S 투여) 및 제 1b상 (ASA 투여)를 위해 네 가지의 치료 그룹들로 무작위 배정되었다.

[0503] 혈액 및 CSF (IT-CM 카테터로부터 나옴)는 둘 다의 단계들 위한 투여 이후 특정된 간격들에서 채취되었다. 마지막 시료들이 제 1a상로부터 채취된 이후, 동물들은 제 1b상의 개시 이전 7일의 세척 기간이 허용되었다.

[0504] 마지막 시료들이 제 1b상로부터 채취된 이후, 동물들은 제 2상의 개시 이전 7일의 세척 기간이 허용될 것이다. 제 1b상으로부터 나온 전부 12마리 수컷 및 암컷 사이노몰 원숭이들은 I2S (그룹들1a-6a) 및 ASA (그룹들 1b-6b)의 12마리 치료 그룹들로 체중에 의해 무작위 배정되었다.

[0505] IT-L 투여에 이어서, 혈청에서 ASA의 절대 생물유용성은 ~30 내지 40%이다. 대조적으로, CSF에서는 IV 투여의 0.5%만이 생물유용하다.

[0506] IT-L 투여에 이어서, 혈청에서 ASA에 대한 노출은 비례적 방식 이상으로 증가한다.

[0507] IT-L 투여에 이어서, CSF에서 ASA에 대한 노출은 투여가 증가하면서 비례적 방식 이하로 증가한다. 혈청에서 PK 변수들, 혈청 및 CSF에서 rhASA의 PK 변수들 또한 생체배분의 요약들은 표 45 내지 47에 나타나 있다. 하기 표 45는 사이노몰 원숭이들의 혈청에서 ASA의 PK 변수들 요약을 나타낸다.

표 45

평균 (CV%)	혈청 아릴설파타제 A			
	아릴설파타제 A (Phase 1b: IV 1 mg/kg)	아릴설파타제 A (Phase 1b: IT-L 1.8 mg)	아릴설파타제 A (Phase 1b: IT-L 6 mg)	아릴설파타제 A (Phase 1b: IT-L 18.6 mg)
N	8	6	8	8
AUC0-t (ng•h/mL)	10505 (16.9)	2219 (41.9)	10352 (31.9)	17583 (28.2)
AUC0-∞ (ng•h/mL)	11069 (17.2)	NC (NC)b	9634 (28.9)c	20789 (27.8)d
Cmax (ng/mL)	11911 (20.0)	363 (40.4)	1160 (29.9)	1621 (25.1)
Tmaxa (h)	0.08 (0.08, 0.08)	4.00 (2.00, 4.00)	4.00 (1.00, 4.00)	3.00 (1.00, 4.00)
t1/2 (h)	6.55 (31.8)	NC (NC)b	6.77 (21.4)c	7.40 (32.8)d
CL or CL/F (mL/h)	261 (17.0)	NC (NC)b	654 (25.0)c	944 (25.4)d
Vz or Vz/F (mL)	2418 (32.4)	NC (NC)b	6523 (41.3)c	9686 (25.8)d

[0508]

[0509] 하기 표 46은 사이노몰 원숭이들의 CSF에서 ASA의 PK 변수들 요약을 나타낸다.

표 46

평균 (CV%)	CSF 아릴설파타제 A			
	아릴설파타제 A (Phase 1b: IV 1 mg/kg)	아릴설파타제 A (Phase 1b: IT-L 1.8 mg)	아릴설파타제 A (Phase 1b: IT-L 6 mg)	아릴설파타제 A (Phase 1b: IT-L 18.6 mg)
N	4	6	8	8
AUC0-t (ng•h/mL)	1629 (179.8)	1267266 (86.6)	5334329 (68.8)	8028775 (71.2)
AUC0-∞ (ng•h/mL)	8221 (NC)b	1595942 (79.1)c	4291829 (84.2)d	9406664 (64.5)e
Cmax (ng/mL)	69.3 (94.2)	345167 (48.7)	1039079 (73.6)	1841125 (62.8)
Tmaxa (h)	6.00 (1.00, 8.00)	0.08 (0.08, 4.00)	0.29 (0.08, 4.00)	2.04 (0.08, 4.00)
t1/2 (h)	37.6 (NC)b	23.6 (68.3)c	17.1 (31.3)d	13.4 (29.3)e
CL or CL/F (mL/h)	392 (NC)b	1.95 (74.1)c	38.1 (214.8)d *	3.04 (66.1)e
Vz or Vz/F (mL)	21237 (NC)b	80.6 (110.4)c	1090 (215.1)d	67.6 (81.2)e

[0510]

[0511] 하기 표 47는 혈청 및 CSF에서 ASA의 생물유용성을 나타낸다.

표 47

	절대 생물유용성 비교		
	아릴설파타제 A (Phase 1b: IT-L 1.8 mg)	아릴설파타제 A (Phase 1b: IT-L 6 mg)	아릴설파타제 A (Phase 1b: IT-L 18.6 mg)
Fabs (%)	NC	39.9	27.3

[0512]

[0513] IT-L 투여에 이어서, 혈청에서 rhASA의 절대 생물유용성은 ~30 내지 40%이다. 대조적으로, CSF에서는 IV경로에 의해 투여된 용량의 0.5%만이 생물유용하다. 하기 표 48은 CSF:혈청 구분을 나타낸다.

표 48

CSF:혈장 구분			
아릴설파타제 A (Phase 1b: IV 1 mg/kg)	아릴설파타제 A (Phase 1b:IT-L 1.8 mg)	아릴설파타제 A (Phase 1b: IT-L 6 mg)	아릴설파타제 A (Phase 1b:IT-L 18.6 mg)
0.74	NC	445	452

[0514]

[0515] **실시예 9. MLD 환자들의 치료**

[0516] 예로, IT 전달을 통한 직접 CNS 투여는 MLD 환자들을 효과적으로 치료하는 데 사용될 수 있다. 본 실시예는 만기 소아 MLD를 가진 환자들에게 경막내 약물 전달 장치 (IDDD)를 통해 투여된 rhASA의 전부 40주 동안 격주로 (EOW) 3번 용량 수준들까지의 안전성을 평가하도록 설계된 다중심 용량 점증 연구를 설명하고 있다. 인간 치료에 적합한 다양한 대표적인 경막내 약물 전달 장치들이 도 45 내지 48에 나타나있다.

[0517] 20명까지의 환자들이 참가할 것이다:

[0518] 집단1: 5명 환자들 (최저 용량)

[0519] 집단 2: 5 명 환자들 (중간 용량)

[0520] 집단3: 5 명 환자들 (최고 용량)

[0521] 5명 환자들이 무작위로 미치료될 것이다.

[0522] 환자들은 다음의 판단기준의 포함을 기초로 하여 연구를 위해 선택된다: (1) 연령 30개월 이전에 첫 번째 증상들의 출현; (2) 검색 시 보행가능 (혼자 서고 한 손을 잡고 10걸음 앞으로 걷는 능력으로서 정의됨); (3) 검색 시 신경학적 징후들의 존재. 전형적으로, 조혈줄기세포 이식의 환자 이력은 배제된다.

[0523] 만기 소아 MLD를 가진 어린이에서 40주 동안 IT 주사에 의해 투여된 rhASA의 상승 용량들의 안전성이 결정된다. 추가적으로, 총 운동 기능 및 혈청에서 단일, 반복-용량 약물역학에 미치는 rhASA의 임상적 활성 또한 뇌척수액 (CSF)에서 농도들이 평가된다.

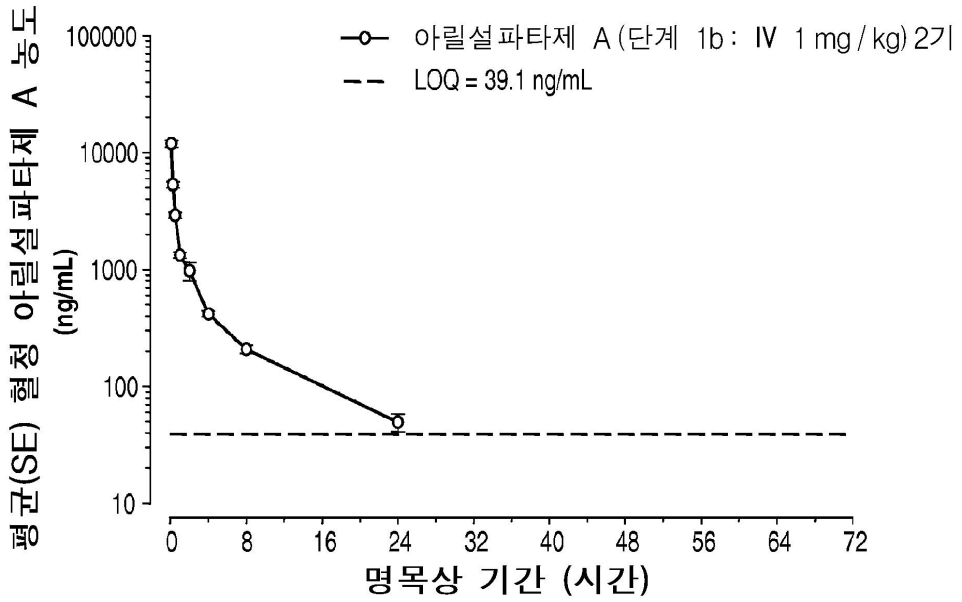
[0524] 본 명세서에서 기술된 소정의 화합물들, 조성물들 및 방법들이 소정의 구현예들에 따른 특이성을 가지고 기술되어 왔으며, 다음의 실시예들은 본 발명의 화합물을 단지 기술하기 위해서만 제공되고 이들을 제한하려고 의도하지 않는다.

[0525] 여기에서 사용되는 바, 용어 표현들 "하나 (a)" 및 "하나 (an)"는 본 명세서에서, 및 청구항들에서 복수의 형태들을 포함하도록 분명하게 반대로 가리키지 않는 경우라면 이해되어야 한다. 그룹의 하나 이상의 구성원들 간 "또는"을 포함하는 청구항들 또는 기술내용들은, 하나, 하나 이상, 또는 모두가 존재하거나 적용되는 경우, 또는 달리 정반대로 표시되지 않는다면 주어진 산물 또는 방법에 적절한 경우, 또는 달리 문맥으로부터 명백한 경우라면 만족되는 것으로 고려된다. 본 발명은 정확히 그룹의 한 구성원이 존재하거나 적용되거나, 달리 주어진 산물 또는 방법에 적절한 구현예들을 포함한다. 또한 본 발명은 그룹의 하나 이상 또는 구성원 전부가 존재하거나 적용되거나, 달리 주어진 산물 또는 방법에 적절한 구현예들도 포함한다. 또한, 본 발명은 달리 표시되지 않는 경우 또는 반박이나 불일치가 나올 수 있는 기술분야의 당업자에게 자명한 경우라면 나열된 청구항들로부터 나온 하나 이상의 제한들, 요소들, 조항들, 기술적 용어들 등이 동일한 기초 청구항 (또는 적절한 다른 청구항)에 의존하는 또 다른 청구항 내로 도입되는 모든 변형들, 조합들, 및 순열들을 포괄하는 것으로 이해된다. 요소들이 리스트로서 표현되는 곳에서는 (예로, 마쿠쉬 (Markush) 그룹 또는 유사한 형식), 요소들의 각 소그룹도 역시 기재되고 또한 요소(들)이라면 모두가 그룹으로부터 삭제될 수 있는 것으로 이해된다. 일반적으로, 본

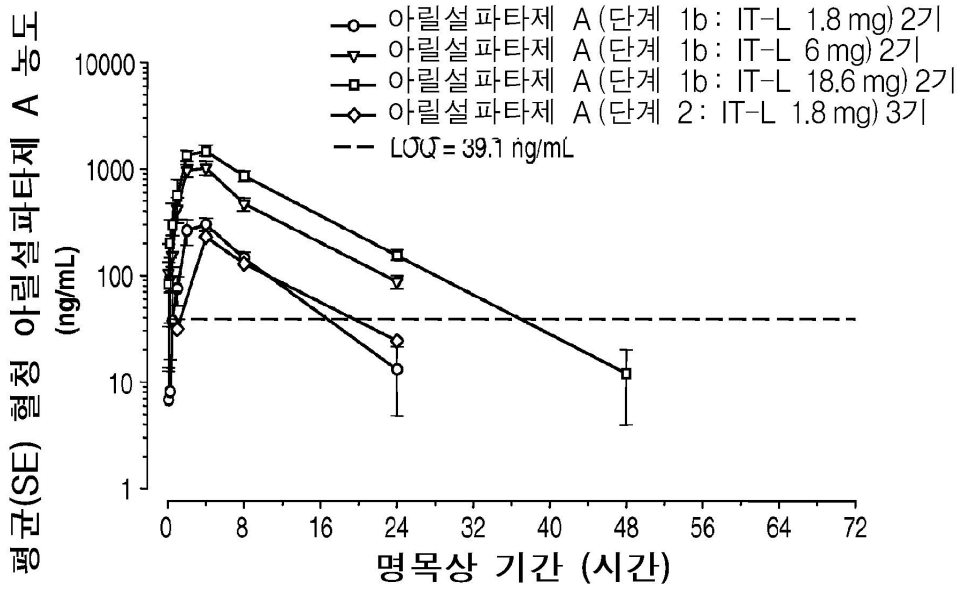
발명, 또는 본 발명의 관점은 특정한 요소들, 특징들 등을 포함하는 것으로서 언급되는 곳에서는, 본 발명의 소정의 구현예들 또는 본 발명의 관점들은 이러한 요소들, 특징들 등으로 구성되거나 이들로 필수적으로 구성되는 것으로 이해되어야 한다. 간략하게 기술하기 위해, 이들 구현예들은 모든 경우에 본 명세서에서 매우 많은 단어들로 상세하게 설명되지 않았다. 또한 본 발명의 구현예 또는 관점이라면 모두는 상세한 배제가 본 명세서에 재인용되는지 여부와는 상관없이, 청구항들로부터 명확하게 배제될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명의 배경기술을 기술하고 그의 실행에 관한 추가적인 자세한 사항을 제공하도록 본 명세서에서 참조된 출판물들, 웹사이트들, 및 기타 다른 참고물들은 참고문헌으로 본 명세서에 통합된다.

도면

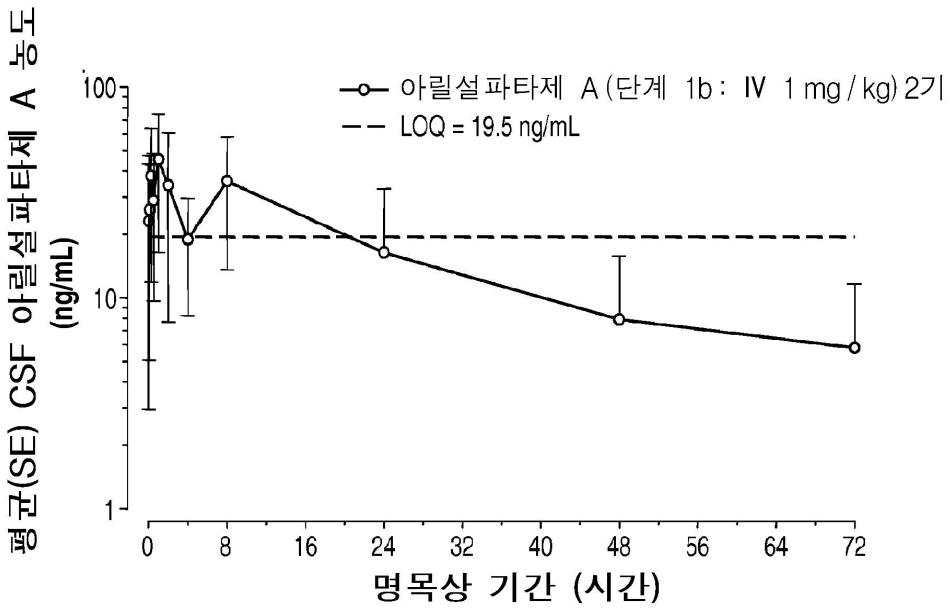
도면1



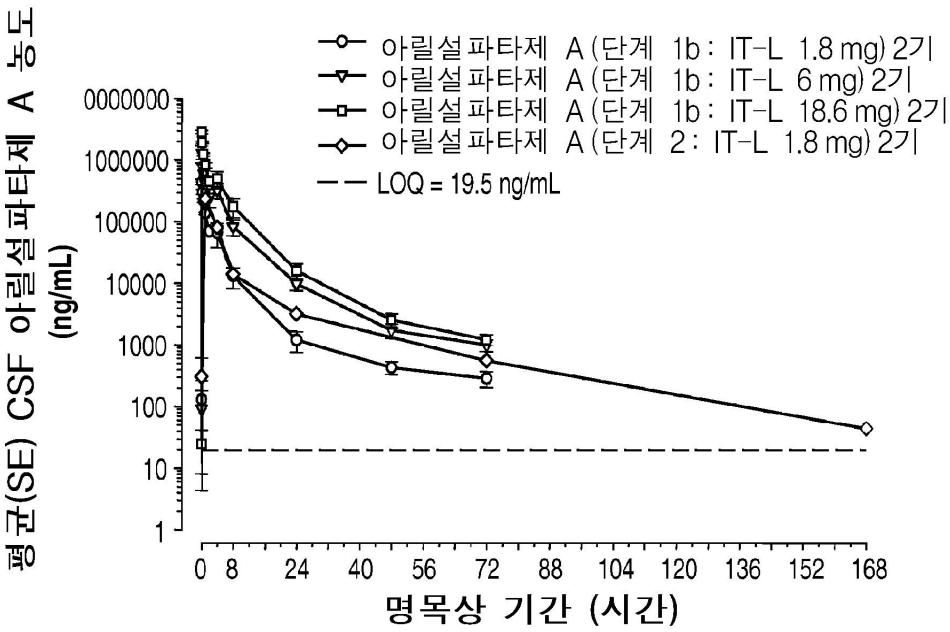
도면2



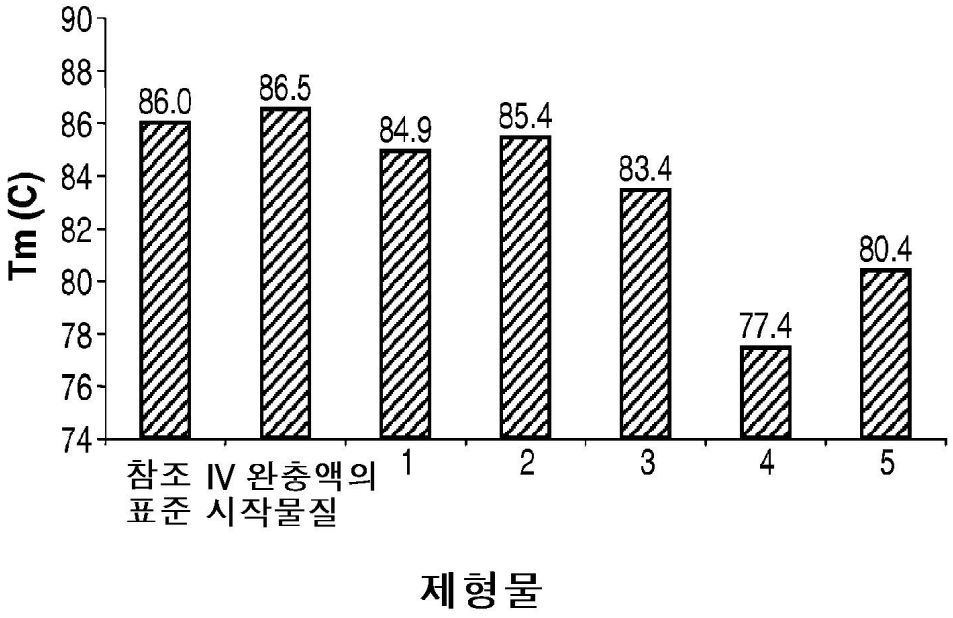
도면3


평균(SE) CSF 아릴설파타제 A 농도 (ng/mL)
100
10
1
0
8
16
24
32
40
48
56
64
72
명목상 기간 (시간)
아릴설파타제 A (단계 1b : IV 1 mg / kg) 2기
LOQ = 19.5 ng/mL

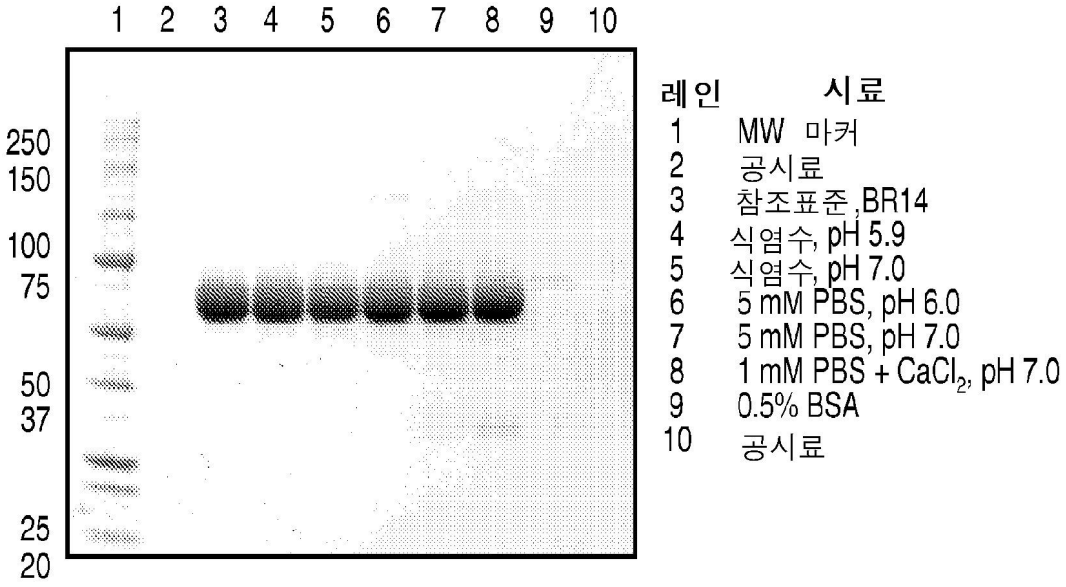
도면4


평균(SE) CSF 아릴설파타제 A 농도 (ng/mL)
0000000
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0
8
24
40
56
72
88
104
120
136
152
168
명목상 기간 (시간)
아릴설파타제 A (단계 1b : IT-L 1.8 mg) 2기
아릴설파타제 A (단계 1b : IT-L 6 mg) 2기
아릴설파타제 A (단계 1b : IT-L 18.6 mg) 2기
아릴설파타제 A (단계 2 : IT-L 1.8 mg) 2기
LOQ = 19.5 ng/mL

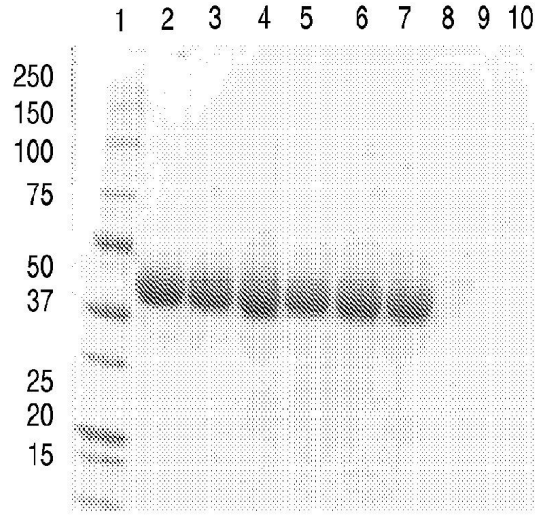
도면5


Tm (C)
90
88
86
84
82
80
78
76
74
86.0
86.5
84.9
85.4
83.4
77.4
80.4
참조 IV 완충액의 표준 시작물질
1
2
3
4
5
제형물

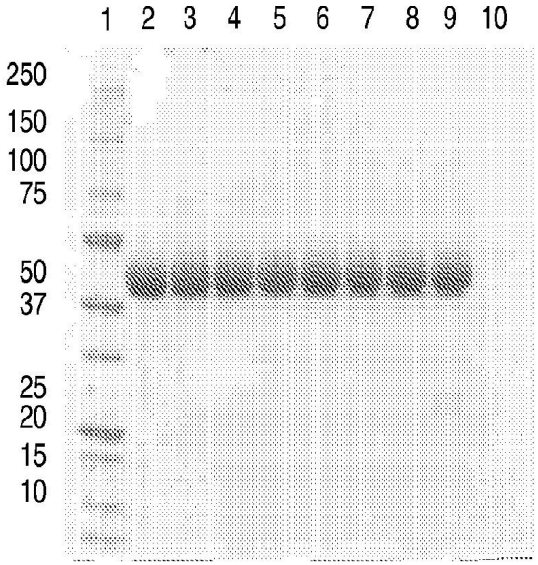
도면6


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
250
150
100
75
50
37
25
20
레인 시료
1 MW 마커
2 공시료
3 참조표준, BR14
4 식염수, pH 5.9
5 식염수, pH 7.0
6 5 mM PBS, pH 6.0
7 5 mM PBS, pH 7.0
8 1 mM PBS + CaCl2, pH 7.0
9 0.5% BSA
10 공시료

도면7

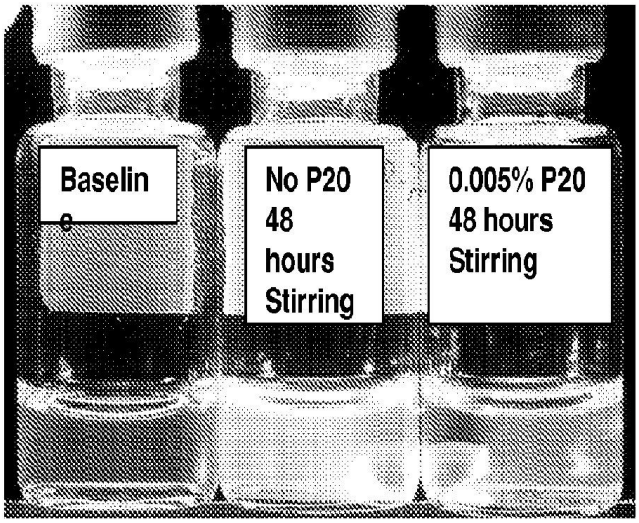


레인	시료
1	MW 마커
2	참조표준
3	기저선,식염수,pH 5.9
4	5°C, 3M,식염수,pH 5.9
5	기저선,식염수,pH 7.0
6	5°C, 3M,식염수,pH 7.0
7	25°C, 3M,식염수,pH 7.0
8	0.5% BSA
9	공시료
10	공시료

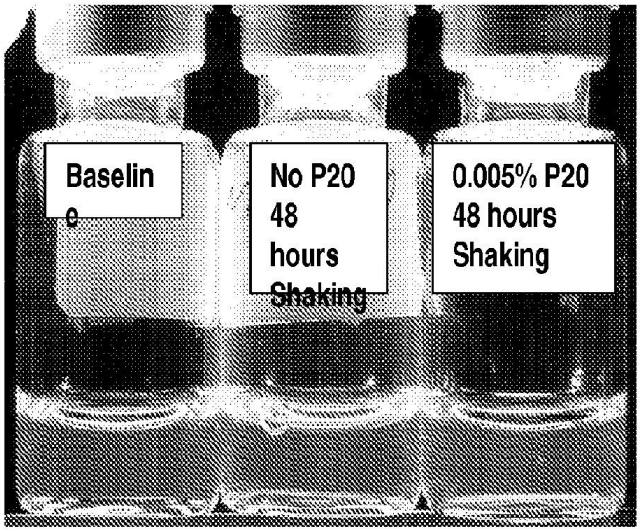


레인	시료
1	MW 마커
2	참조표준
3	기저선, PBS, pH 6.0
4	5°C, 3M, PBS, pH 6.0
5	기저선, PBS, pH 7.0
6	5°C, 3M, PBS, pH 7.0
7	기저선, 1 mM PBS, pH 7.0 w/$CaCl_2$
8	5°C, 3M, 1 mM PBS, pH 7.0 w/$CaCl_2$
9	25°C, 3M, 1 mM PBS, pH 7.0 w/$CaCl_2$
10	0.5% BSA

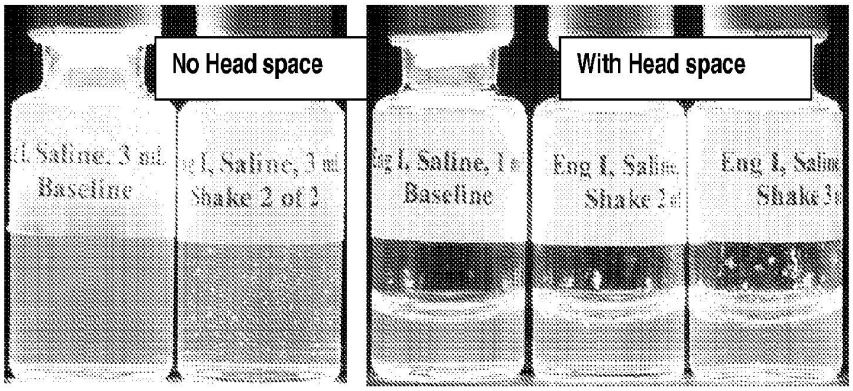
도면8a



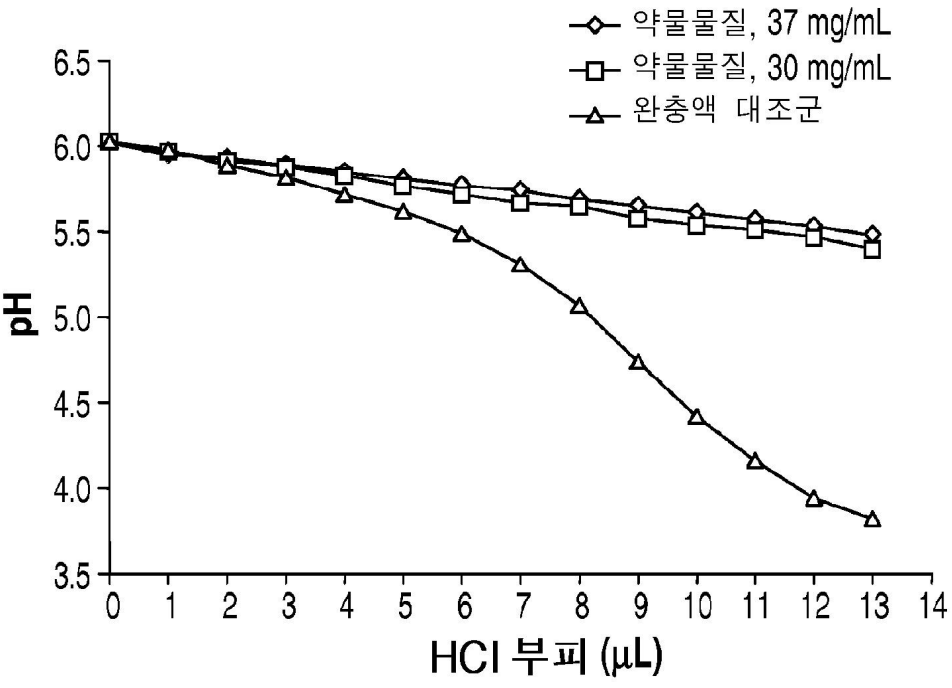
도면8b



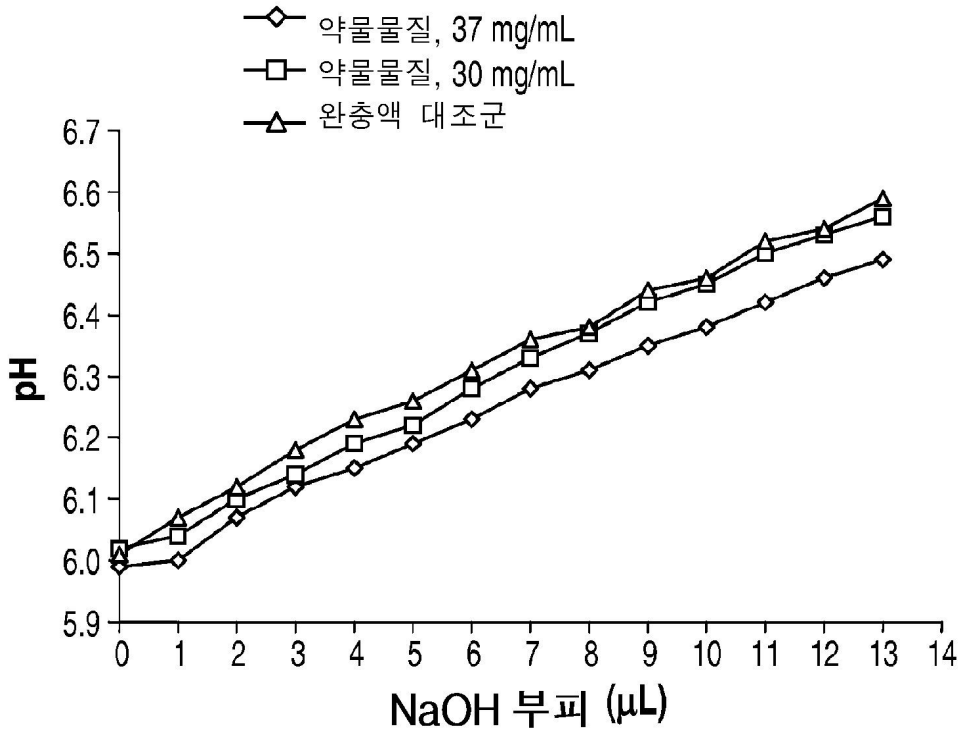
도면9



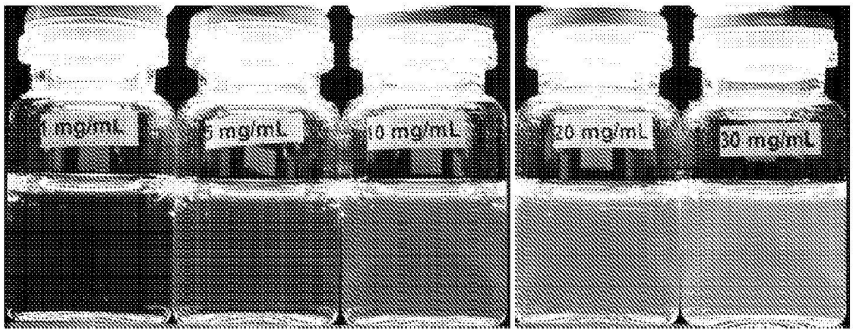
도면10



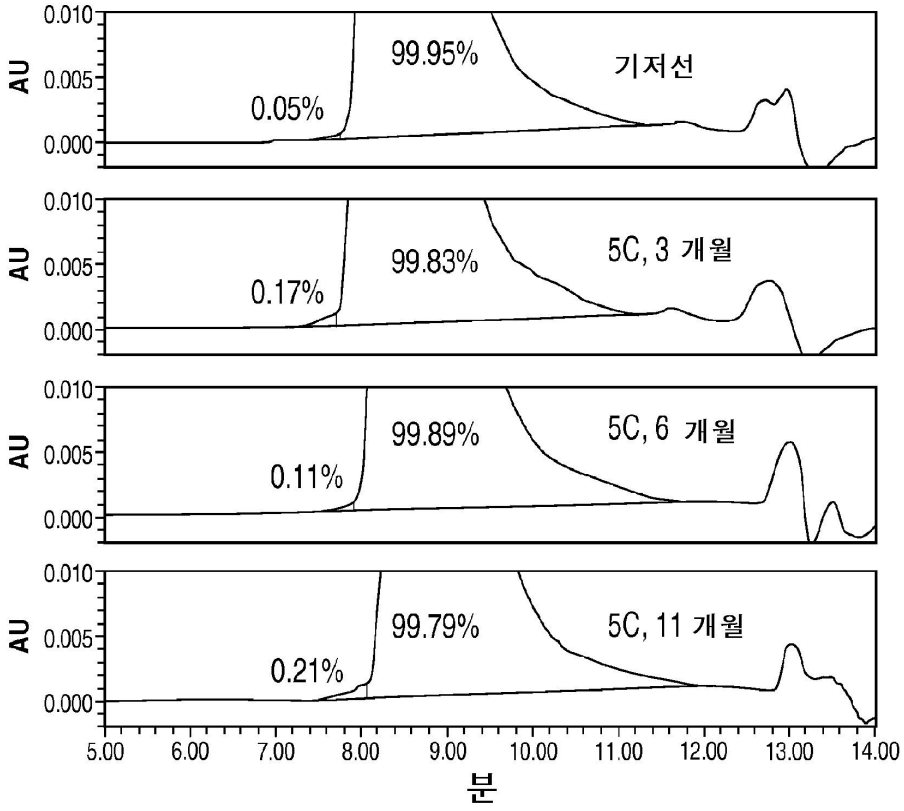
도면11


약물물질, 37 mg/mL
약물물질, 30 mg/mL
완충액 대조군
pH
6.7
6.6
6.5
6.4
6.3
6.2
6.1
6.0
5.9
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
NaOH 부피 (μL)

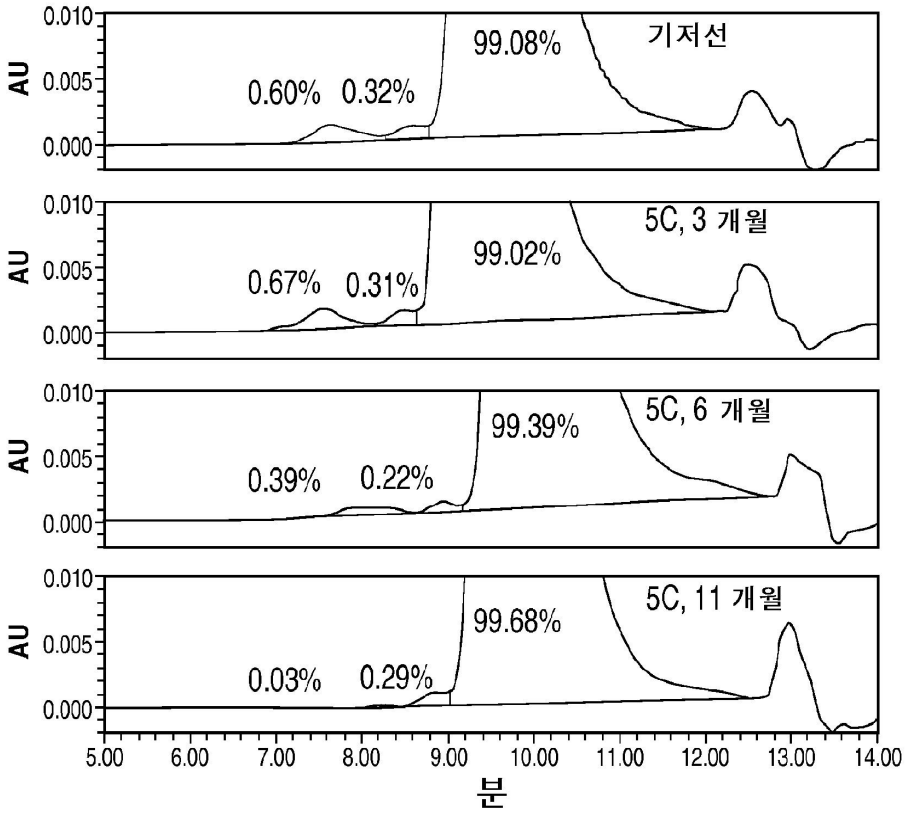
도면12


1 mg/mL
5 mg/mL
10 mg/mL
20 mg/mL
30 mg/mL

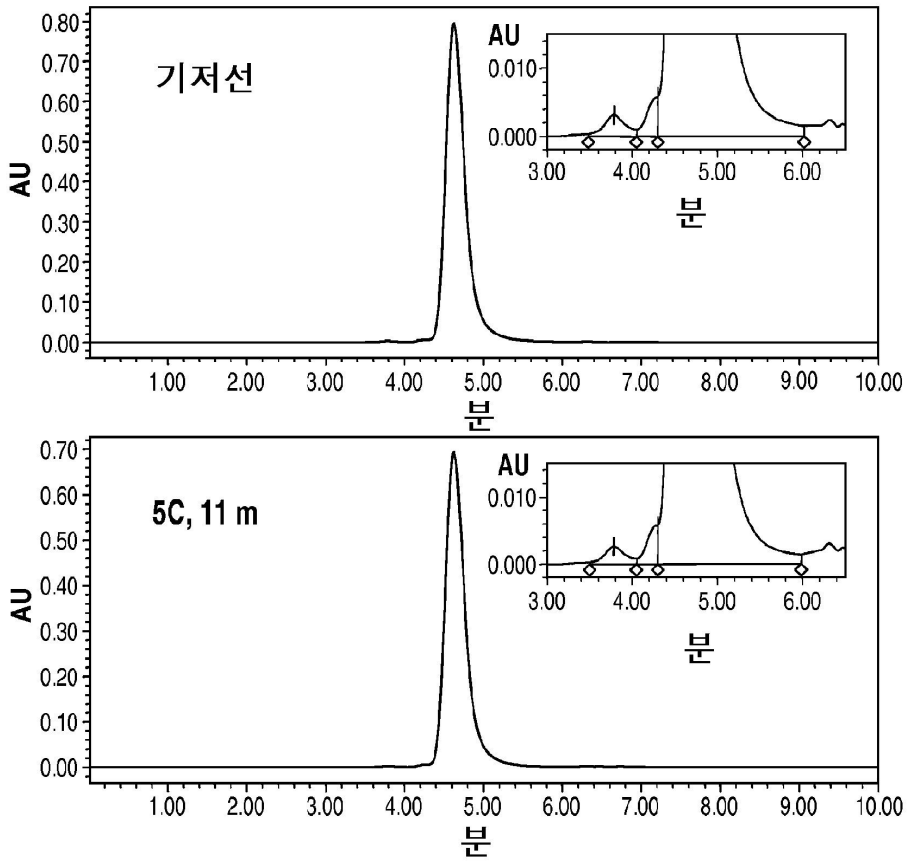
도면13


0.010
0.005
0.000
AU
0.05%
99.95%
기저선
0.17%
99.83%
5C, 3 개월
0.11%
99.89%
5C, 6 개월
0.21%
99.79%
5C, 11 개월
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
13.00
14.00
분

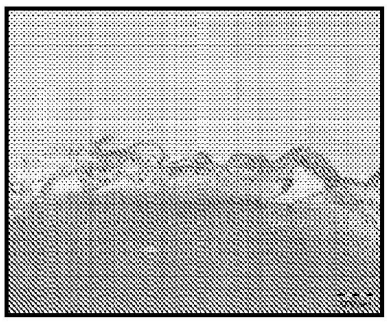
도면14


0.010
0.005
0.000
AU
0.60%
0.32%
99.08%
기저선
0.67%
0.31%
99.02%
5C, 3 개월
0.39%
0.22%
99.39%
5C, 6 개월
0.03%
0.29%
99.68%
5C, 11 개월
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
13.00
14.00
분

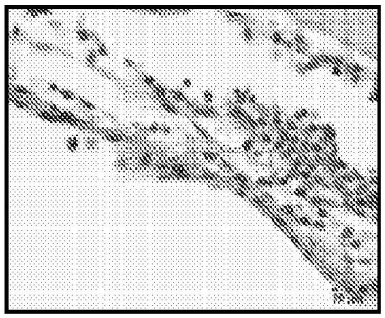
도면15



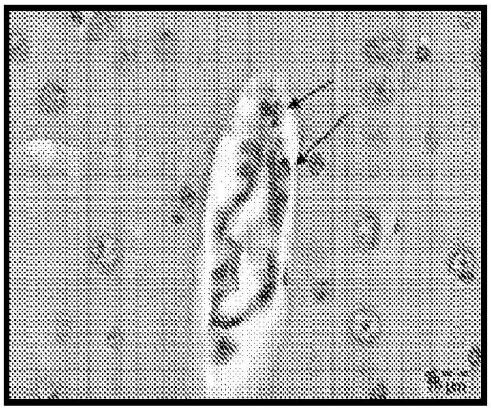
도면16



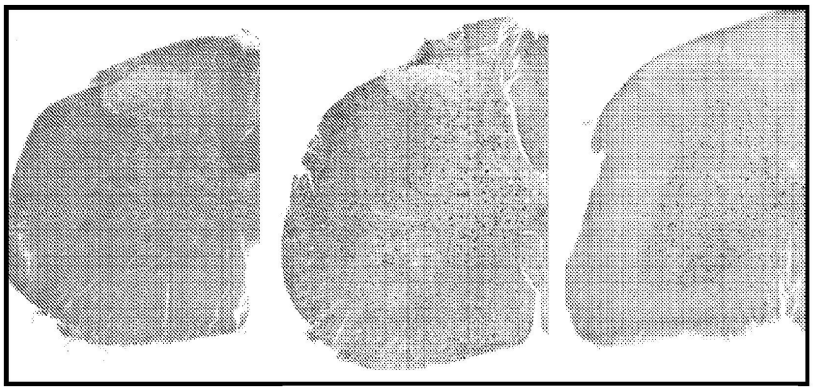
도면17



도면18



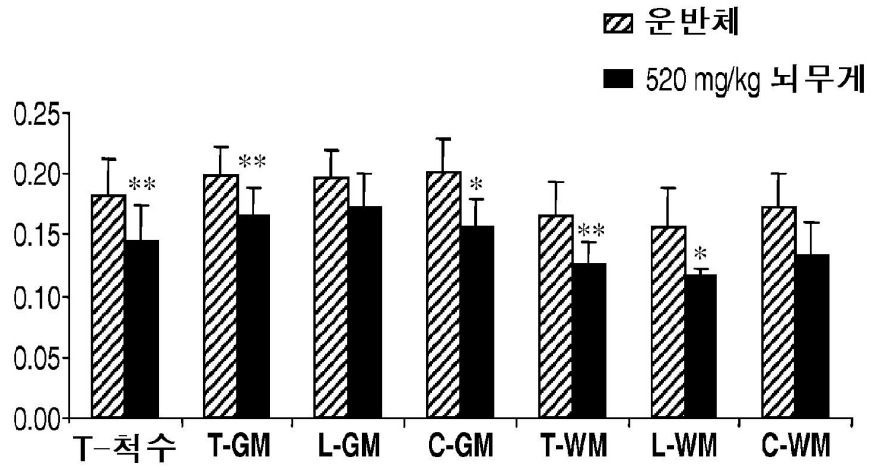
도면19



WT 운반체 IT 치료

WT = 야생형 ; IT 치료된 마우스는 rhASA의 520 mg/kg 뇌무게의 4주간 용량을 수여받았다(0.21 mg).
4배 확대

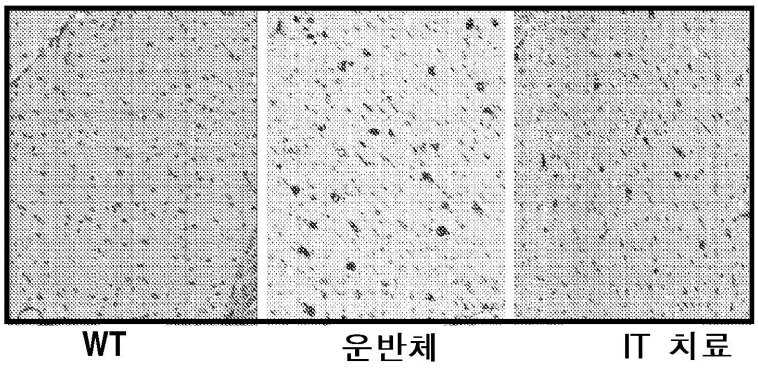
도면20



** P<0.001; * P<0.05

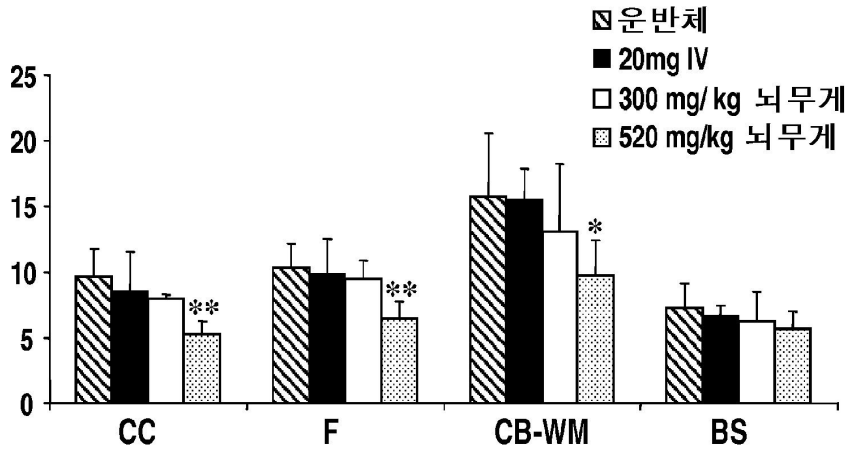
T-척수 = 전체 척수
T-GM = 전체 회색질
L-GM = 요추 회색질
C-GM = 경추 회색질
T-WM = 전체 백색질
L-WM = 요추 백색질
C-WM = 경추 백색질

도면21

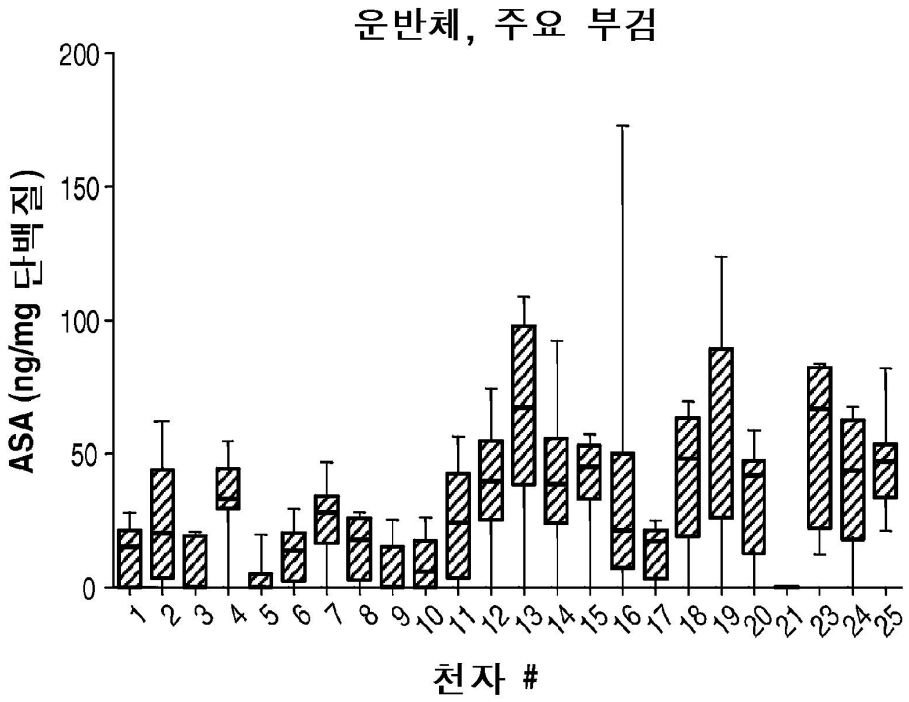


WT = 야생형 ; IT 치료된 마우스는 HGT-1110의 520 mg/kg 뇌무게의 4주간 용량을 수여받았다(0.21 mg). 20배 확대

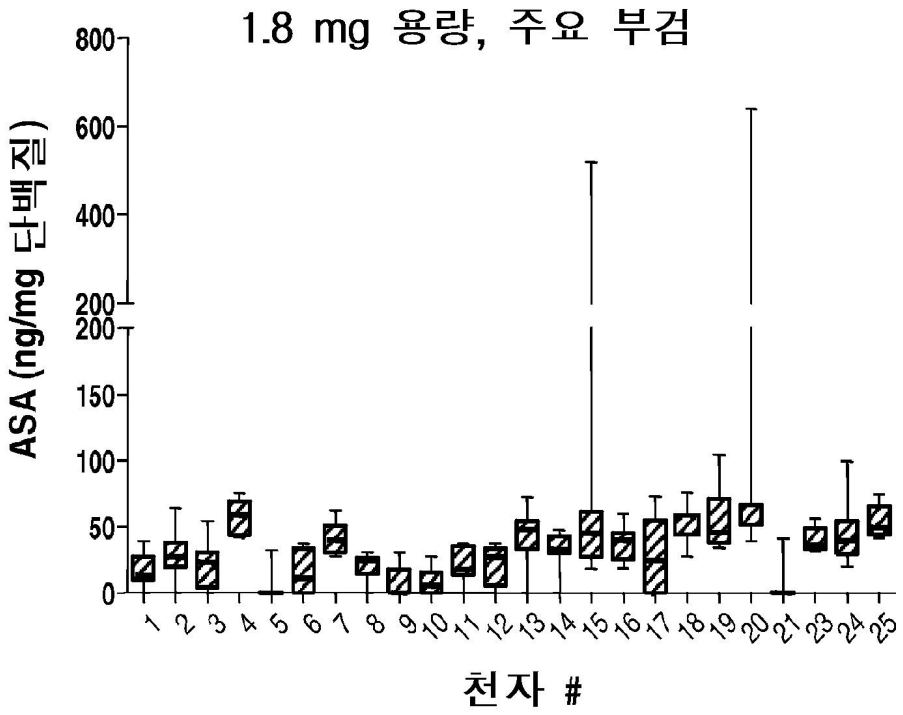
도면22


운반체
20mg IV
300 mg/ kg 뇌무게
520 mg/kg 뇌무게
25
20
15
10
5
0
**
**
*
CC
F
CB-WM
BS

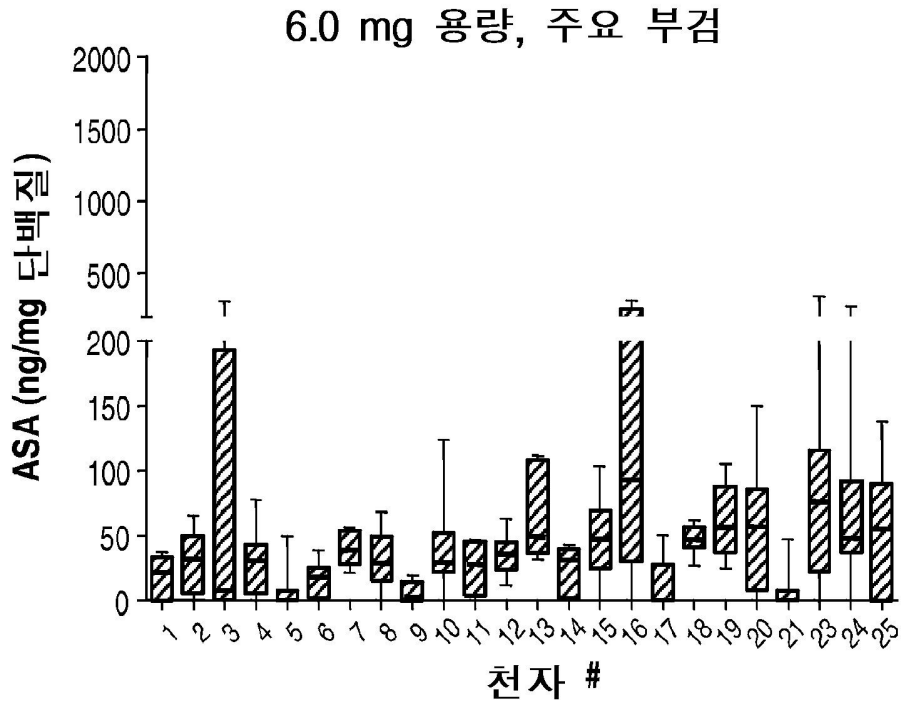
도면23


운반체, 주요 부검
ASA (ng/mg 단백질)
200
150
100
50
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 23 24 25
천자 #

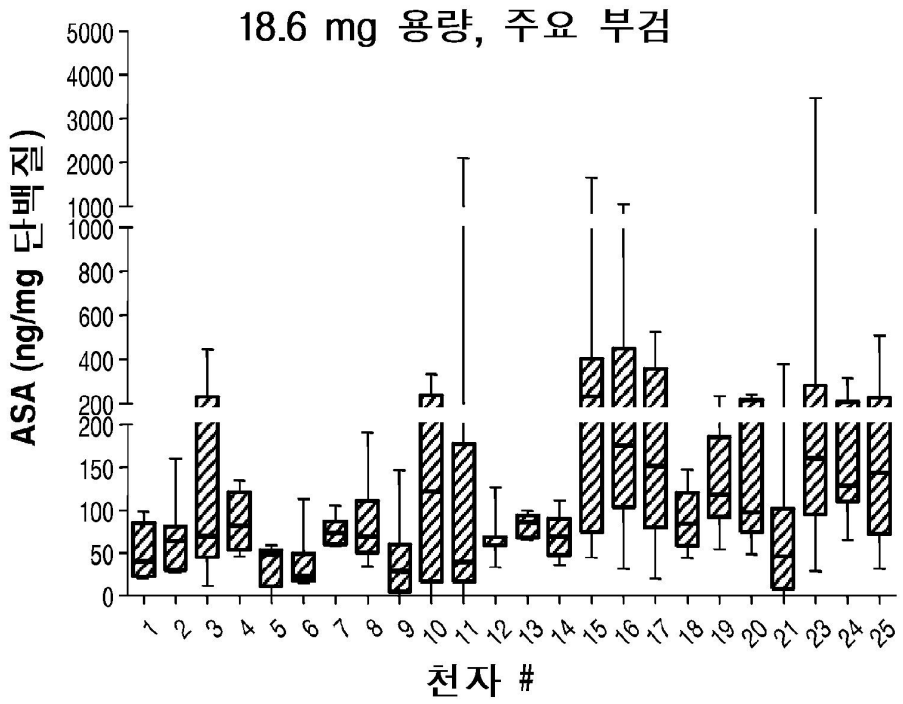
도면24


1.8 mg 용량, 주요 부검
ASA (ng/mg 단백질)
800
600
400
200
200
150
100
50
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 23 24 25
천자 #

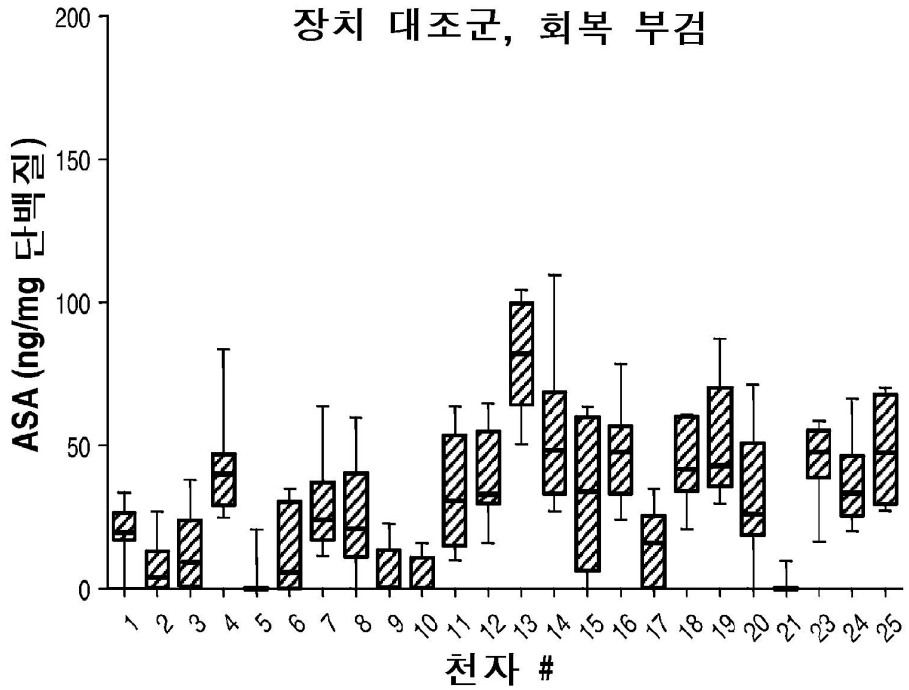
도면25


6.0 mg 용량, 주요 부검
ASA (ng/mg 단백질)
2000
1500
1000
500
200
150
100
50
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 23 24 25
천자 #

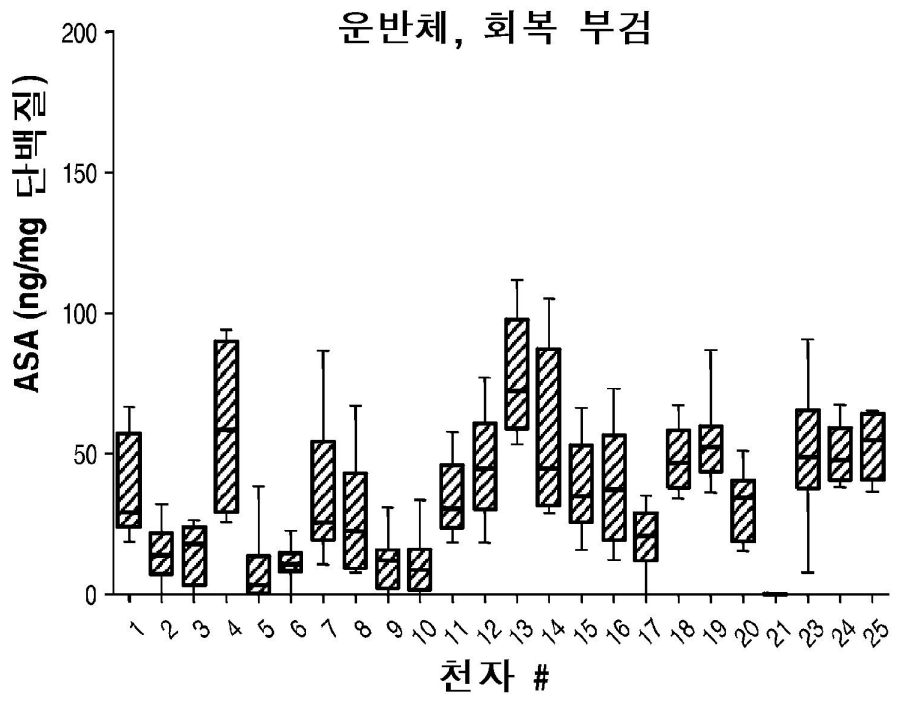
도면26


18.6 mg 용량, 주요 부검
ASA (ng/mg 단백질)
5000
4000
3000
2000
1000
1000
800
600
400
200
200
150
100
50
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 23 24 25
천자 #

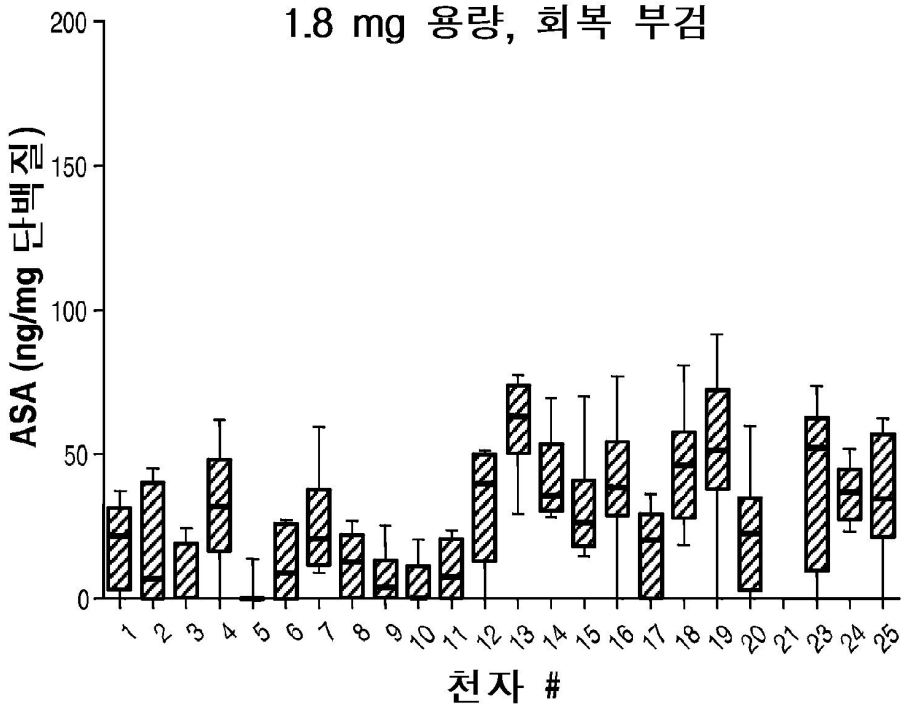
도면27


장치 대조군, 회복 부검
ASA (ng/mg 단백질)
200
150
100
50
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 23 24 25
천자 #

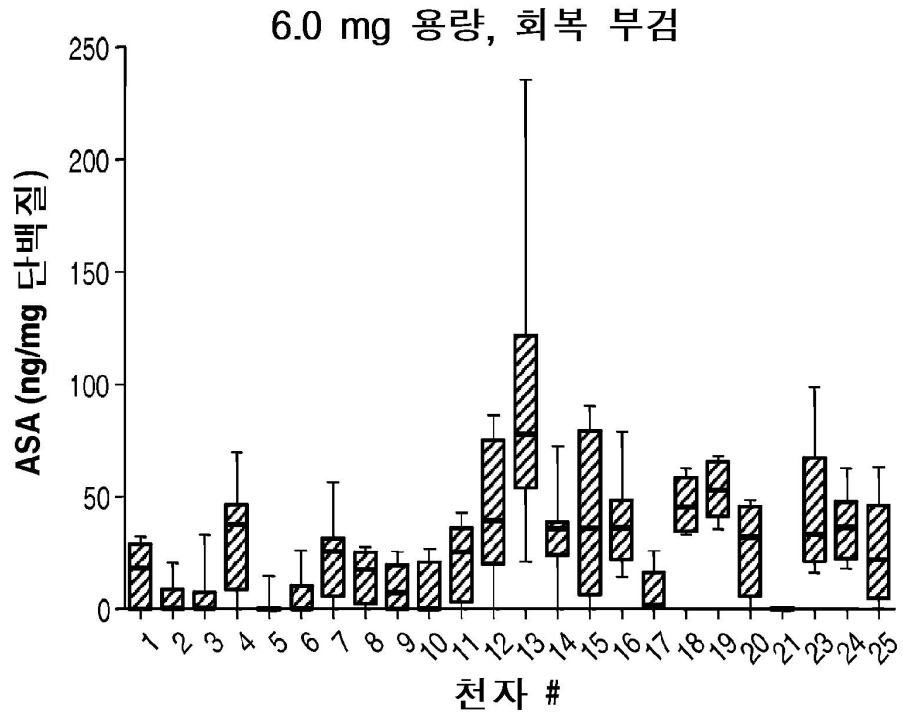
도면28


운반체, 회복 부검
ASA (ng/mg 단백질)
200
150
100
50
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 23 24 25
천자 #

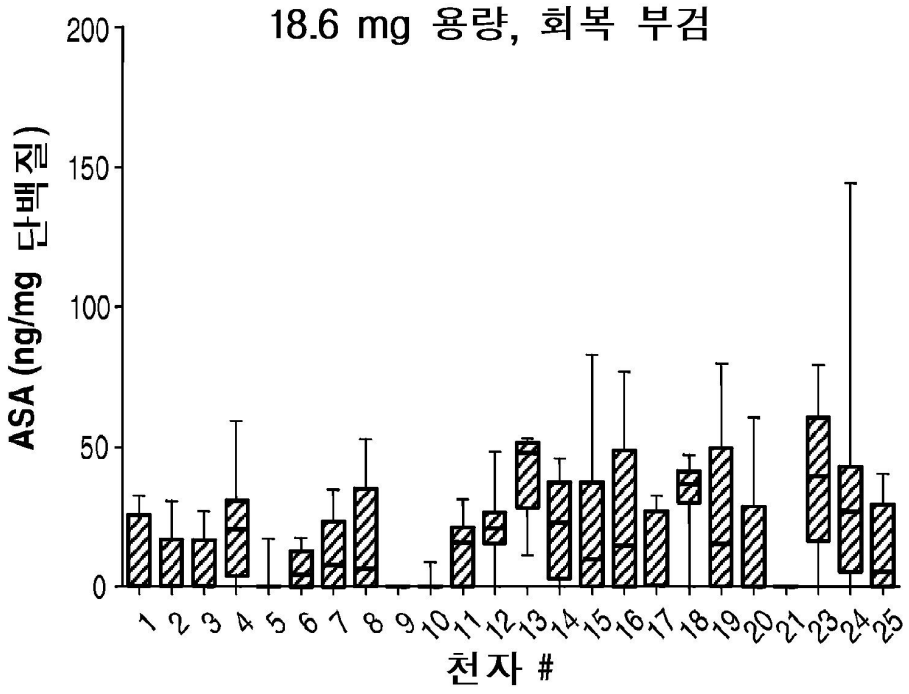
도면29


1.8 mg 용량, 회복 부검
ASA (ng/mg 단백질)
200
150
100
50
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 23 24 25
천자 #

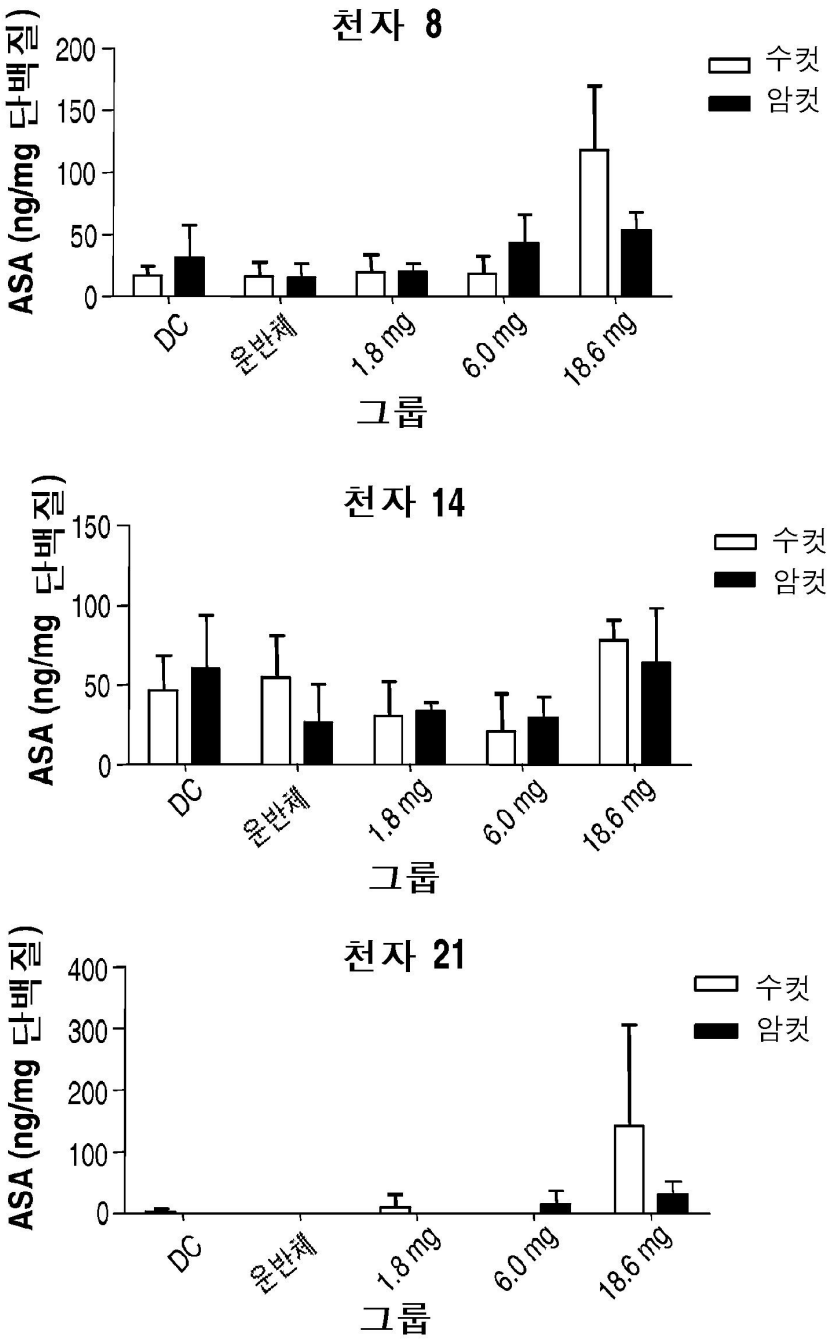
도면30


6.0 mg 용량, 회복 부검
ASA (ng/mg 단백질)
250
200
150
100
50
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 23 24 25
천자 #

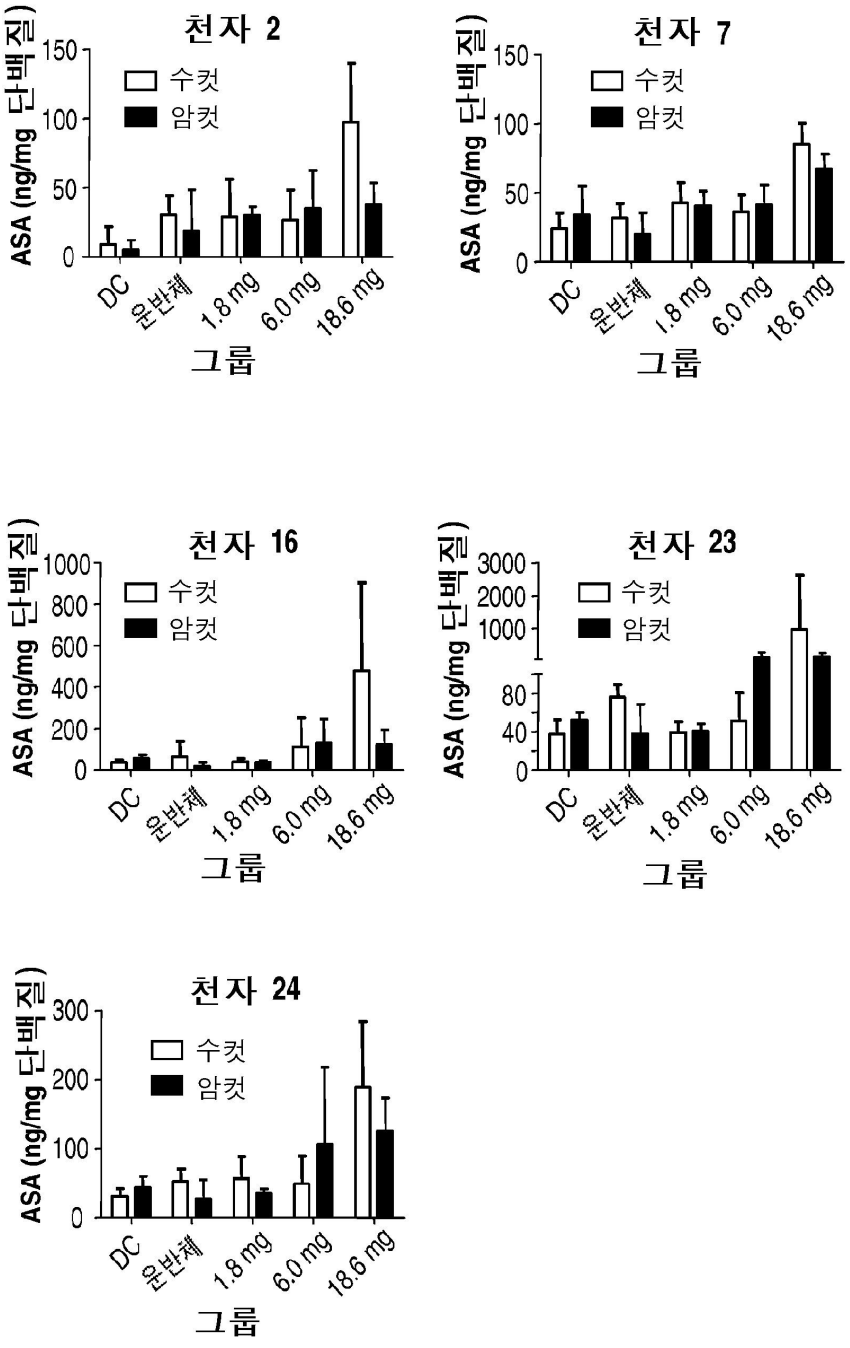
도면31


18.6 mg 용량, 회복 부검
ASA (ng/mg 단백질)
200
150
100
50
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 23 24 25
천자 #

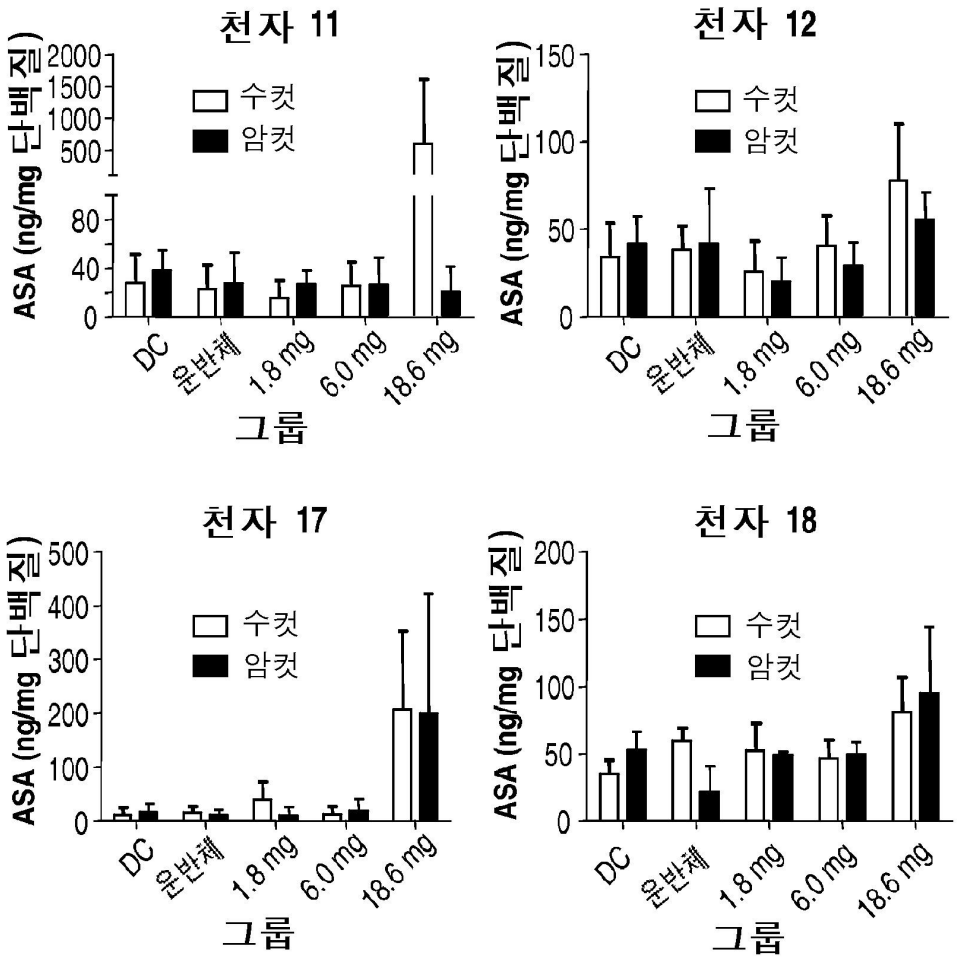
도면32


천자 8
ASA (ng/mg 단백질)
200
150
100
50
0
DC
운반체
1.8 mg
6.0 mg
18.6 mg
그룹
수컷
암컷
천자 14
ASA (ng/mg 단백질)
150
100
50
0
DC
운반체
1.8 mg
6.0 mg
18.6 mg
그룹
수컷
암컷
천자 21
ASA (ng/mg 단백질)
400
300
200
100
0
DC
운반체
1.8 mg
6.0 mg
18.6 mg
그룹
수컷
암컷

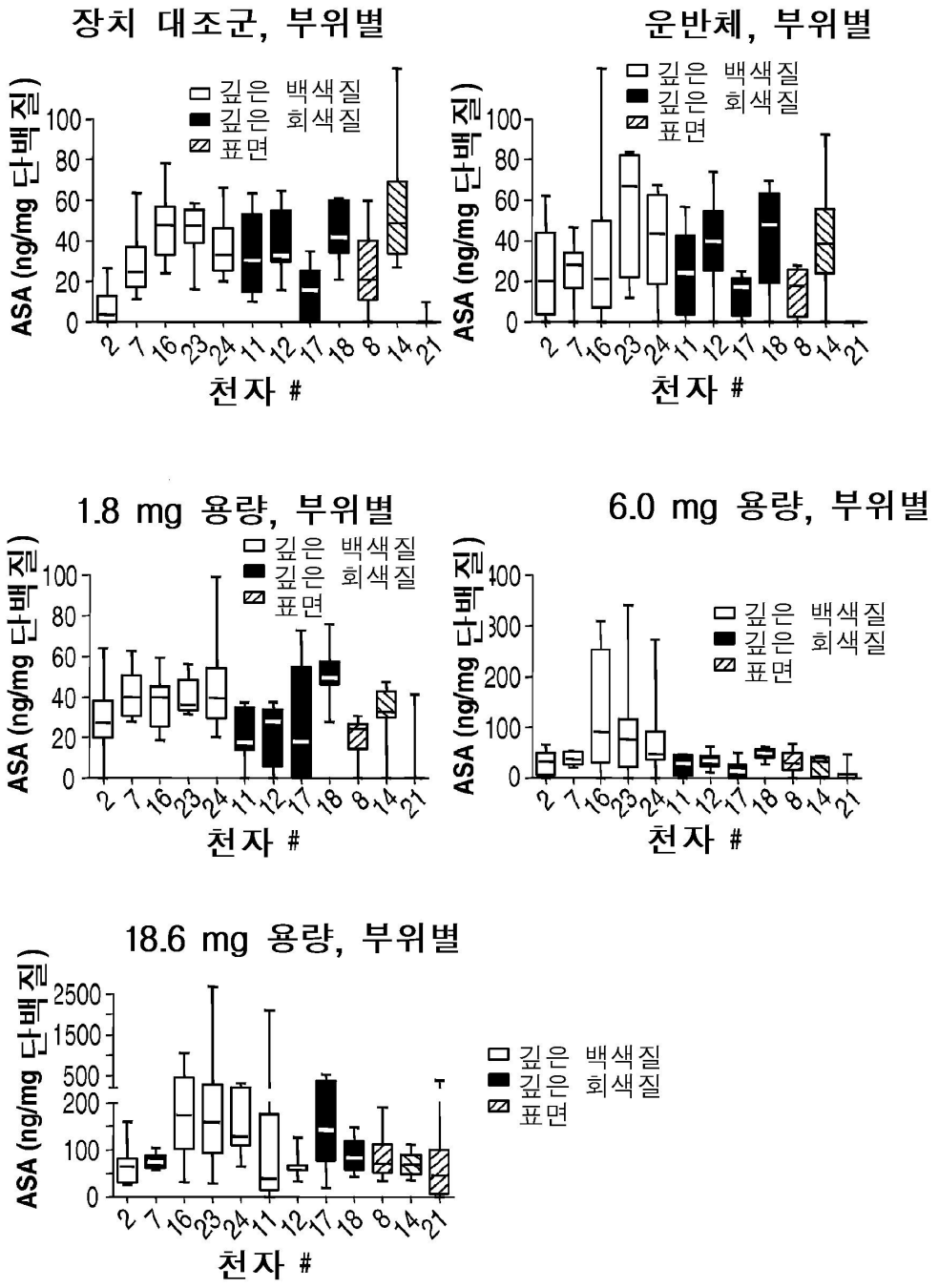
도면33


천자 2
ASA (ng/mg 단백질)
150
100
50
0
수컷
암컷
DC
운반체
1.8 mg
6.0 mg
18.6 mg
그룹
천자 7
ASA (ng/mg 단백질)
150
100
50
0
수컷
암컷
DC
운반체
1.8 mg
6.0 mg
18.6 mg
그룹
천자 16
ASA (ng/mg 단백질)
1000
800
600
400
200
0
수컷
암컷
DC
운반체
1.8 mg
6.0 mg
18.6 mg
그룹
천자 23
ASA (ng/mg 단백질)
3000
2000
1000
80
40
0
수컷
암컷
DC
운반체
1.8 mg
6.0 mg
18.6 mg
그룹
천자 24
ASA (ng/mg 단백질)
300
200
100
0
수컷
암컷
DC
운반체
1.8 mg
6.0 mg
18.6 mg
그룹

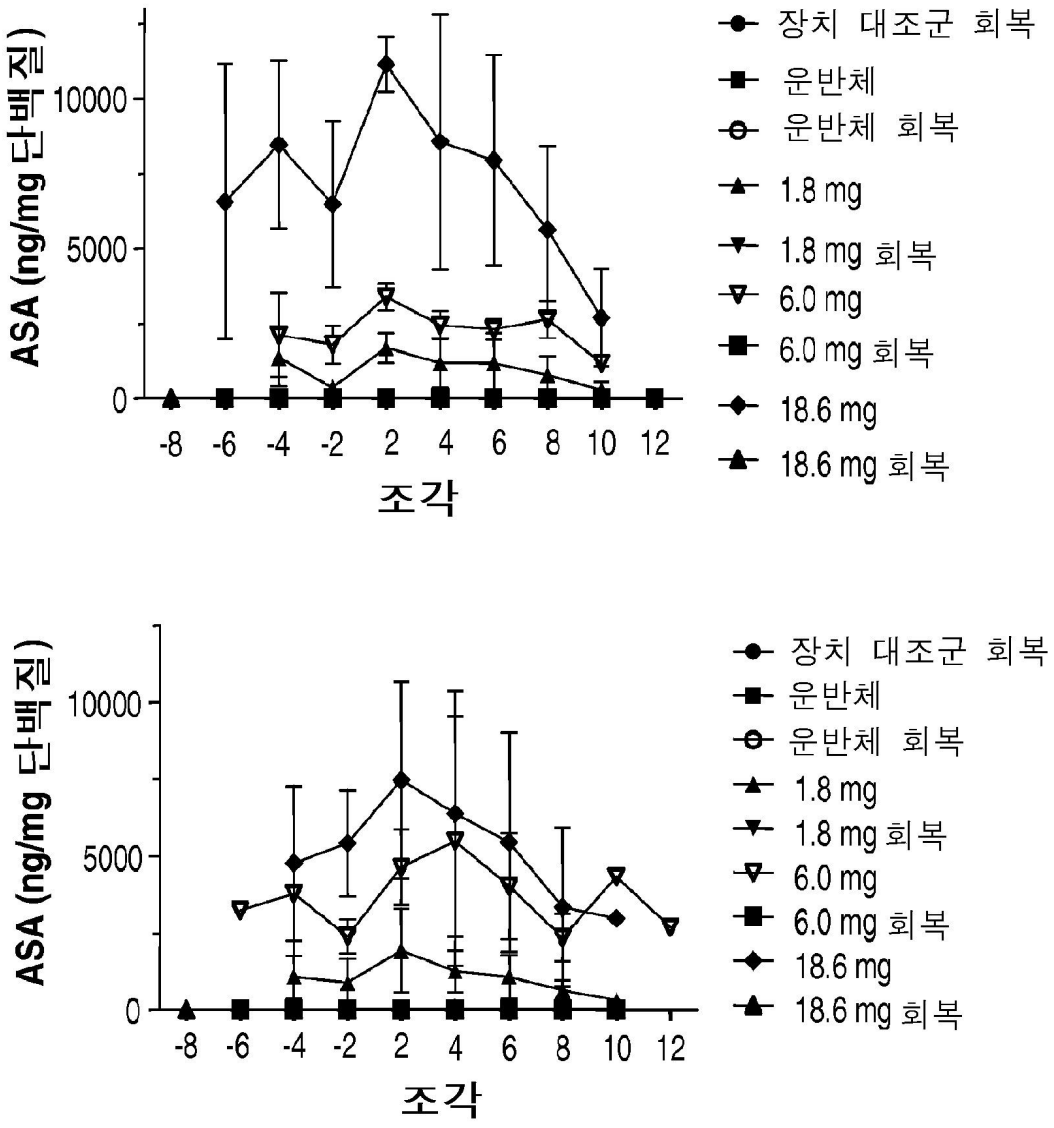
도면34


천자 11
ASA (ng/mg 단백질)
2000
1500
1000
500
80
40
0
수컷
암컷
DC
운반체
1.8 mg
6.0 mg
18.6 mg
그룹
천자 12
ASA (ng/mg 단백질)
150
100
50
0
수컷
암컷
DC
운반체
1.8 mg
6.0 mg
18.6 mg
그룹
천자 17
ASA (ng/mg 단백질)
500
400
300
200
100
0
수컷
암컷
DC
운반체
1.8 mg
6.0 mg
18.6 mg
그룹
천자 18
ASA (ng/mg 단백질)
200
150
100
50
0
수컷
암컷
DC
운반체
1.8 mg
6.0 mg
18.6 mg
그룹

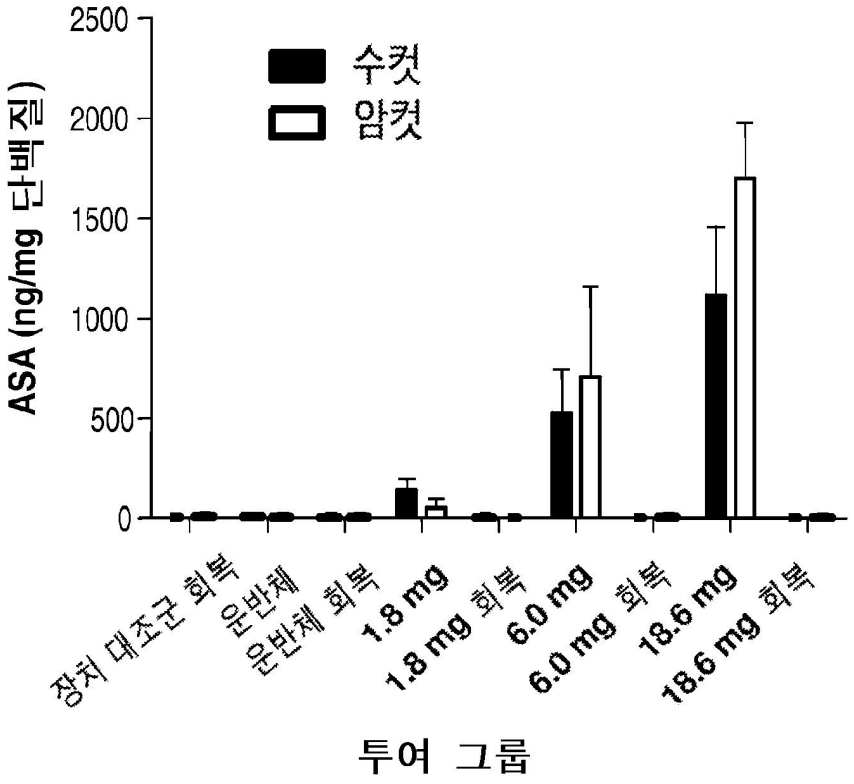
도면35


장치 대조군, 부위별
운반체, 부위별
1.8 mg 용량, 부위별
6.0 mg 용량, 부위별
18.6 mg 용량, 부위별
ASA (ng/mg 단백질)
천자 #
깊은 백색질
깊은 회색질
표면
2 7 16 23 24 11 12 17 18 8 14 21

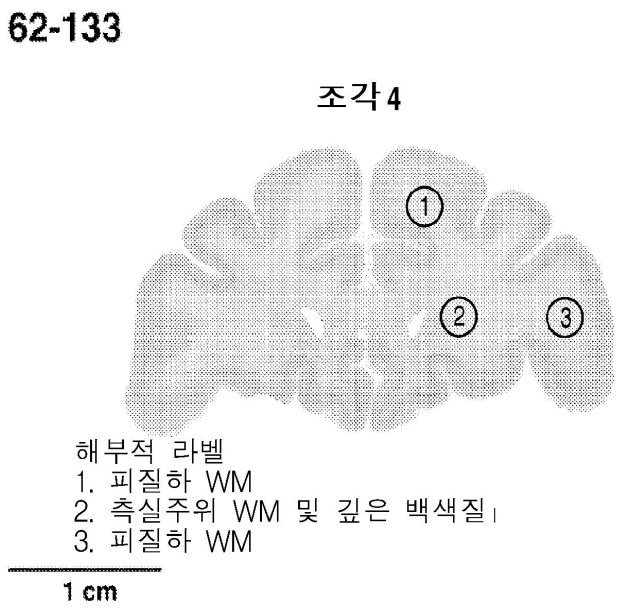
도면36


ASA (ng/mg 단백질)
10000
5000
0
-8 -6 -4 -2 2 4 6 8 10 12
조각
장치 대조군 회복
운반체
운반체 회복
1.8 mg
1.8 mg 회복
6.0 mg
6.0 mg 회복
18.6 mg
18.6 mg 회복
ASA (ng/mg 단백질)
10000
5000
0
-8 -6 -4 -2 2 4 6 8 10 12
조각
장치 대조군 회복
운반체
운반체 회복
1.8 mg
1.8 mg 회복
6.0 mg
6.0 mg 회복
18.6 mg
18.6 mg 회복

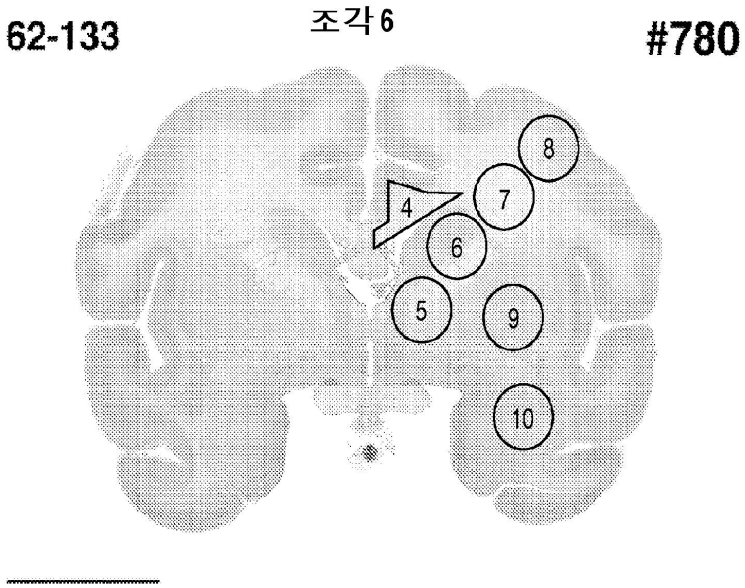
도면37


2500
2000
1500
1000
500
0
ASA (ng/mg 단백질)
수컷
암컷
장치 대조군 회복
운반체
운반체 회복
1.8 mg
1.8 mg 회복
6.0 mg
6.0 mg 회복
18.6 mg
18.6 mg 회복
투여 그룹

도면38

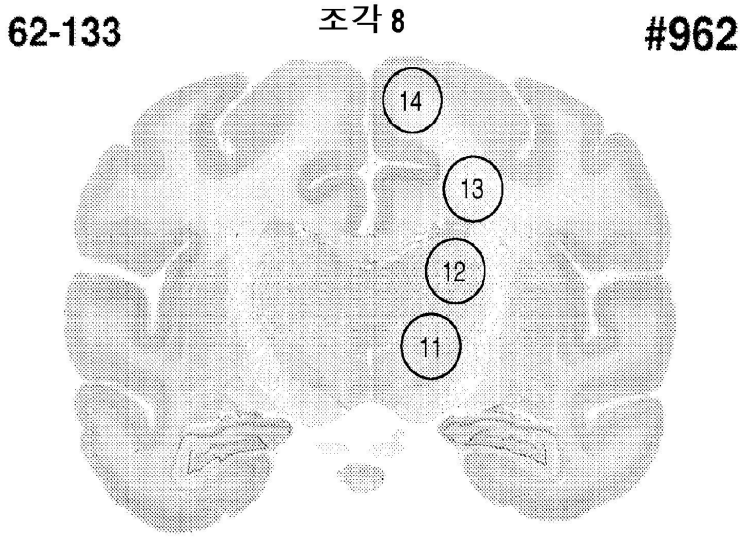

62-133
#458
조각 4
①
②
③
해부적 라벨
1. 피질하 WM
2. 측실주위 WM 및 깊은 백색질
3. 피질하 WM
1 cm

도면39



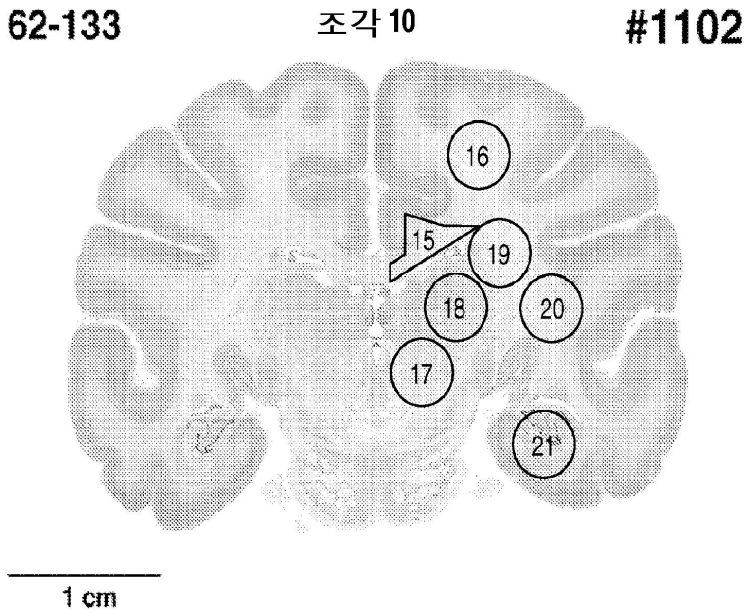
해부적 라벨
4. 뇌들보 및 뇌들보주위 피질하 WM
5. 속섬유막 GPi
6. 속섬유막, 미상엽핵
7. 깊은 백색질
8. 피질하 WM 및 피질
9. 조가비핵
10. 일시적 피질하 WM 및 피질

도면40



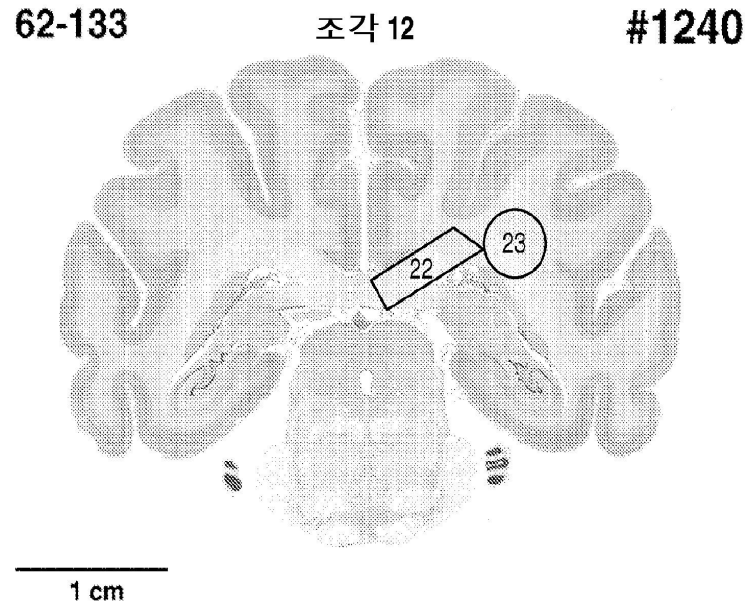
해부적 라벨
11. 깊은 회색질
12. 깊은 회색질
13. 깊은 WM, 전방 측실주위 & 피질하
14. 피질하 백색질 및 피질, 시상위

도면41



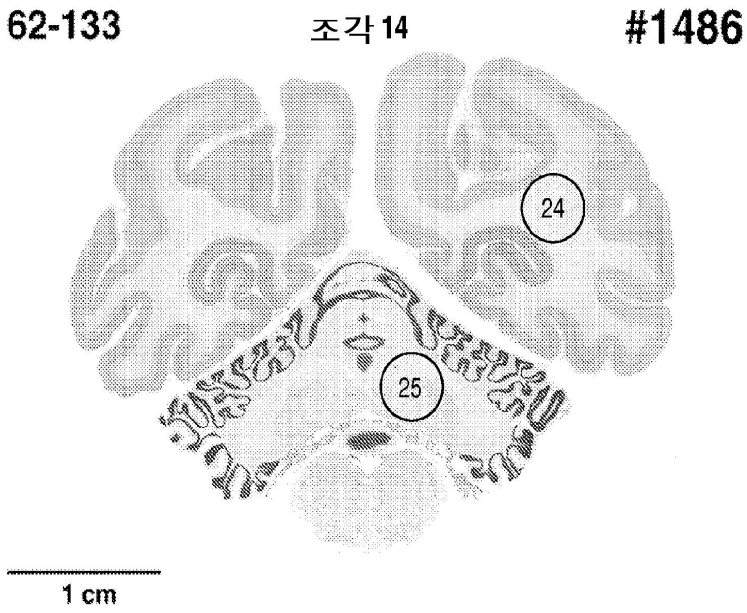
해부적 라벨
15. 속섬유막 및 속섬유막주위 피질하 WM
16. 깊은 피질하 WM
17. 깊은 회색질
18. 깊은 회색질
19. 측실주위 WM
20. 피질하 WM
21. 해마

도면42



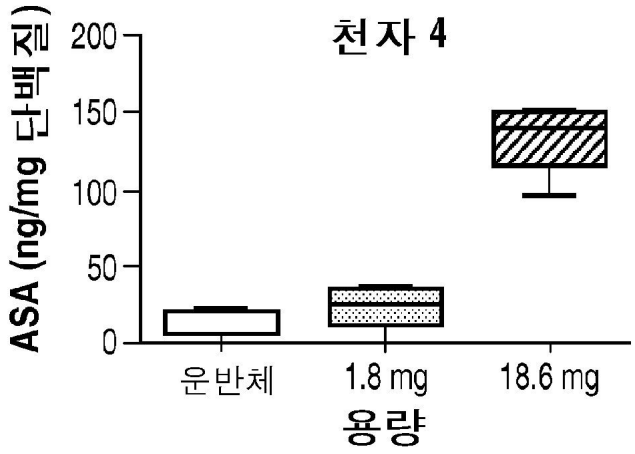
해부적 라벨
22. 속섬유막
23. 깊은 WM

도면43

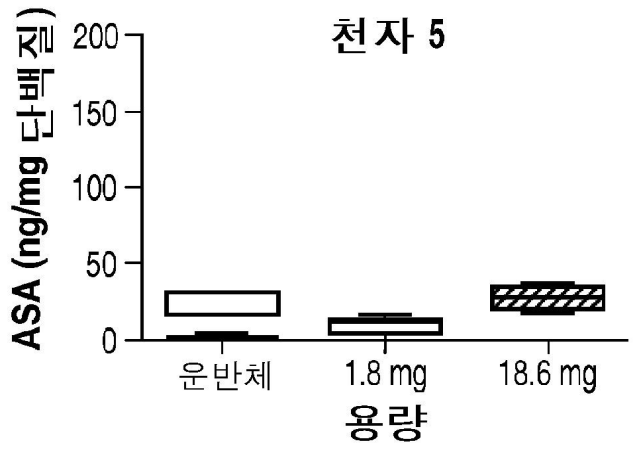


해부적 라벨
24. 피질하 WM, 후두엽
25. 소뇌 백색질, 치아핵 포함 (WM)

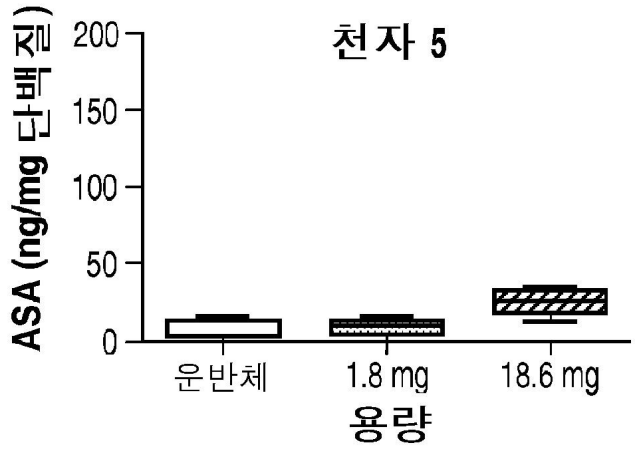
도면44a



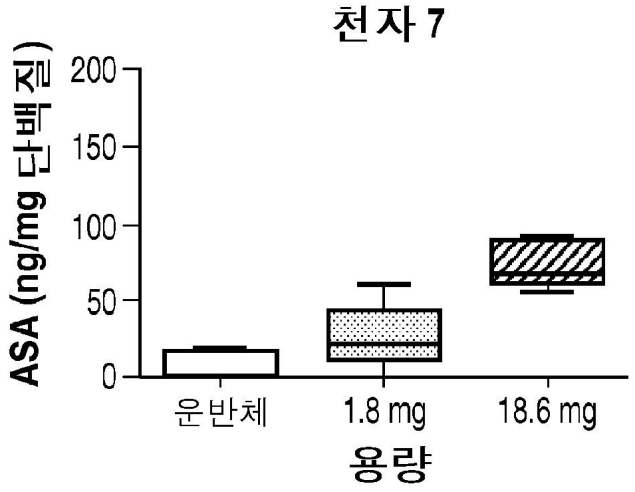
도면44b



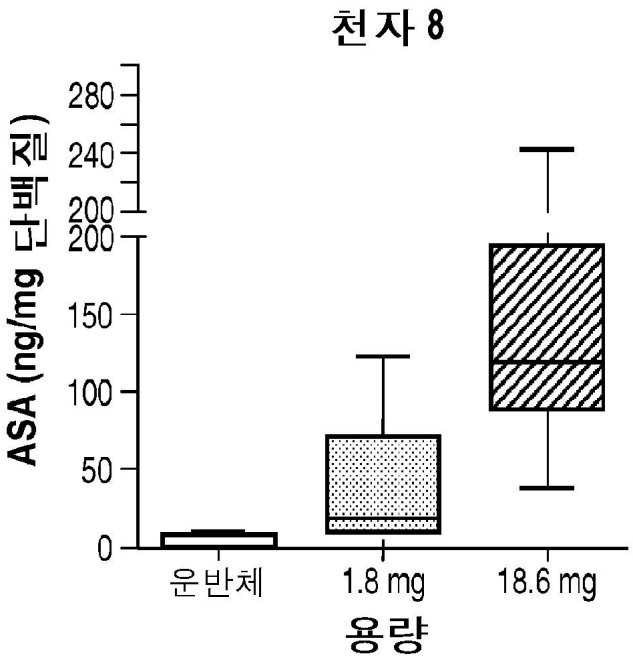
도면44c



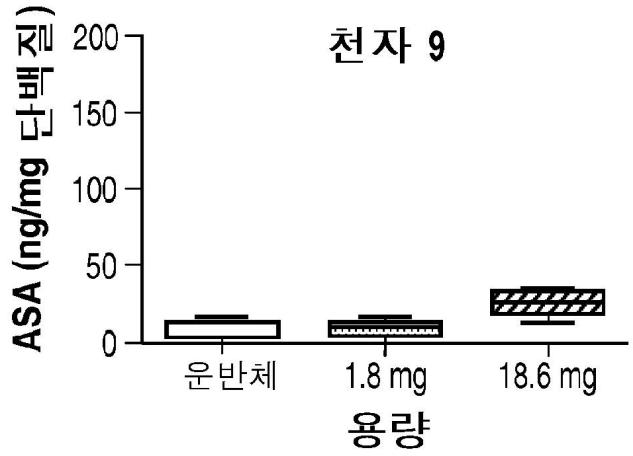
도면44d



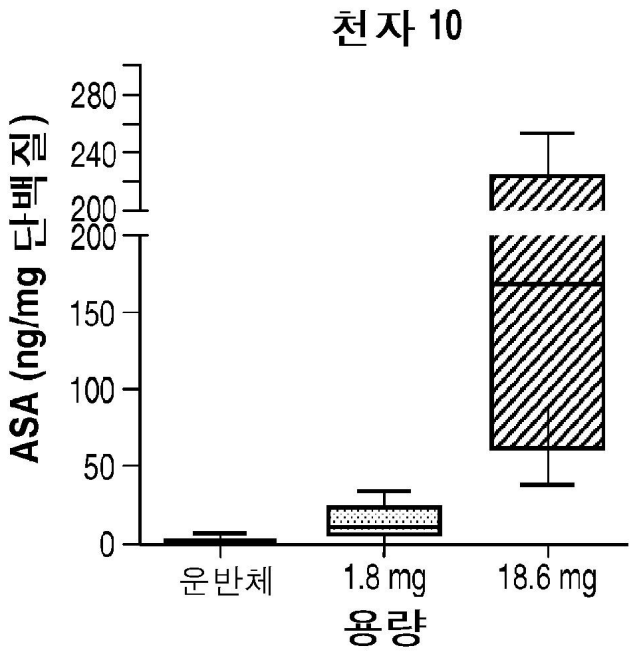
도면44e


천자 8
ASA (ng/mg 단백질)
280
240
200
200
150
100
50
0
운반체
1.8 mg
18.6 mg
용량

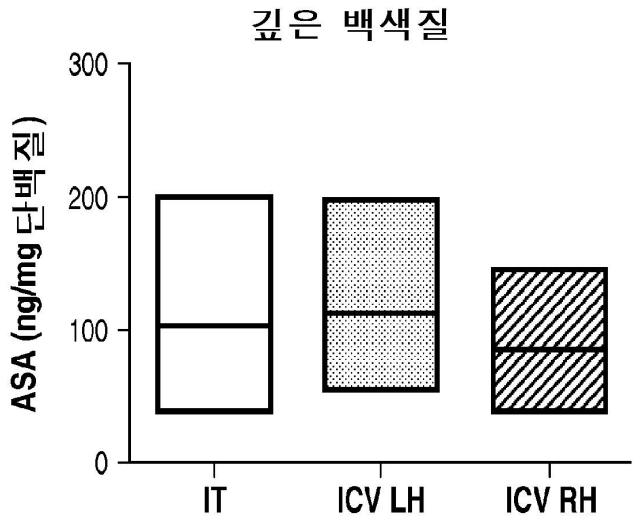
도면44f


천자 9
ASA (ng/mg 단백질)
200
150
100
50
0
운반체
1.8 mg
18.6 mg
용량

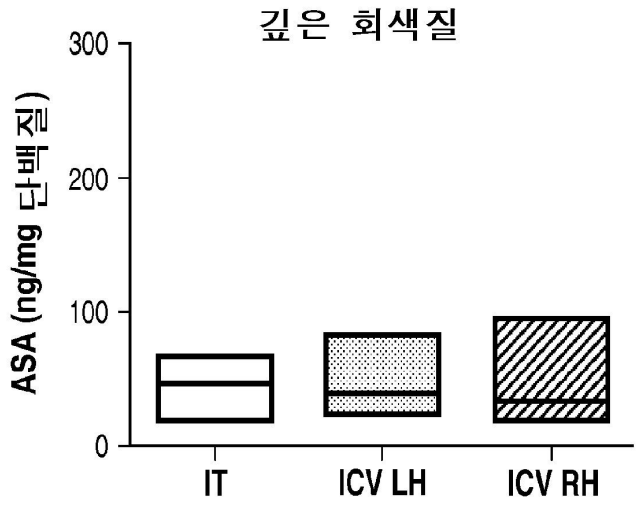
도면44g


천자 10
ASA (ng/mg 단백질)
280
240
200
200
150
100
50
0
운반체
1.8 mg
18.6 mg
용량

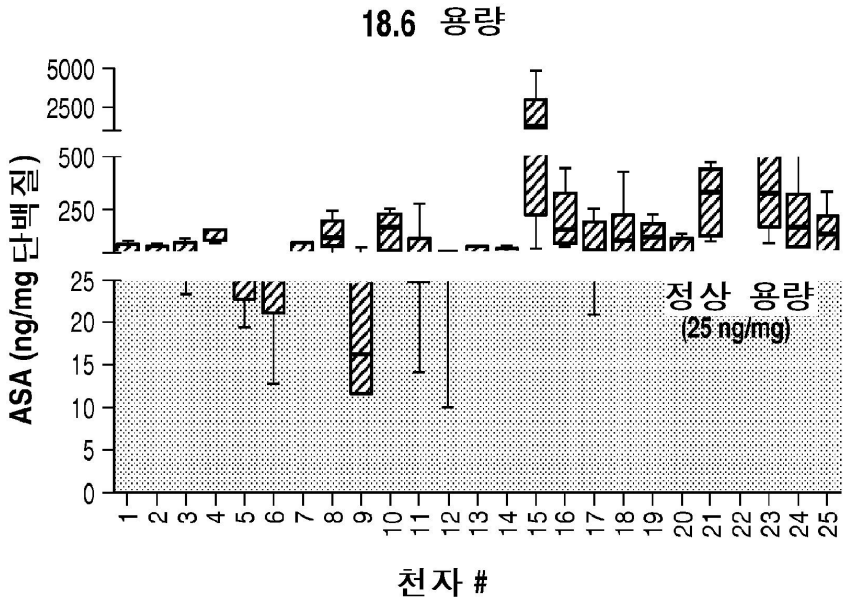
도면45a


깊은 백색질
ASA (ng/mg 단백질)
300
200
100
0
IT
ICV LH
ICV RH

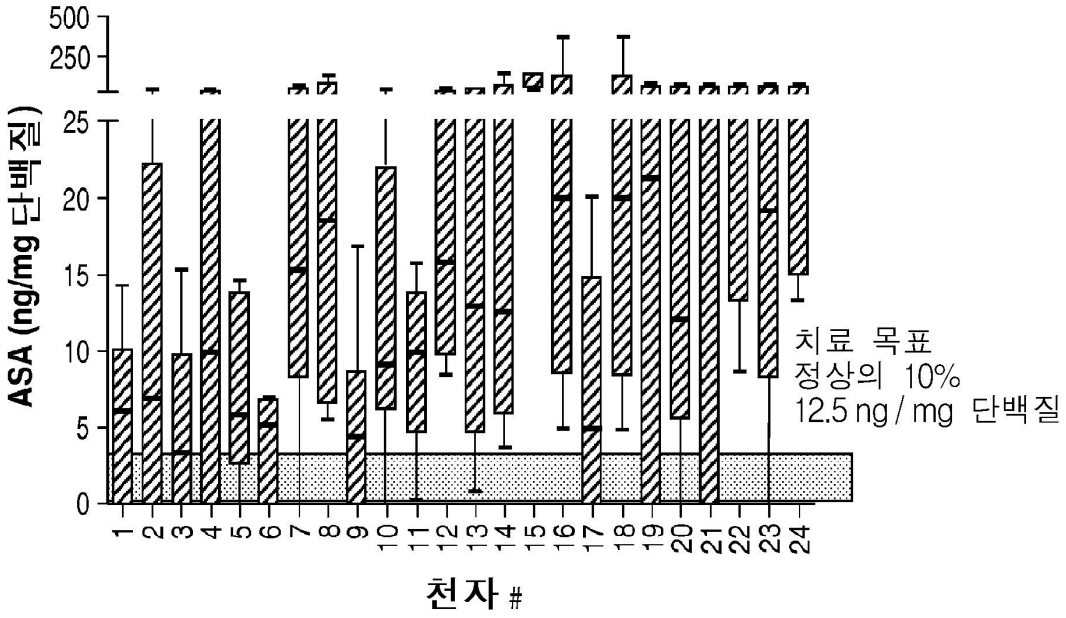
도면45b


깊은 회색질
ASA (ng/mg 단백질)
300
200
100
0
IT
ICV LH
ICV RH

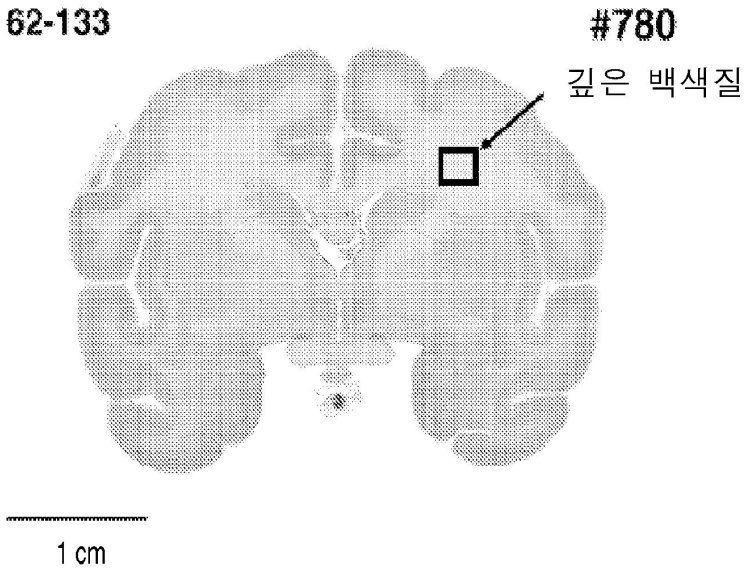
도면46a


18.6 용량
ASA (ng/mg 단백질)
5000
2500
500
250
25
20
15
10
5
0
정상 용량
(25 ng/mg)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
천자 #

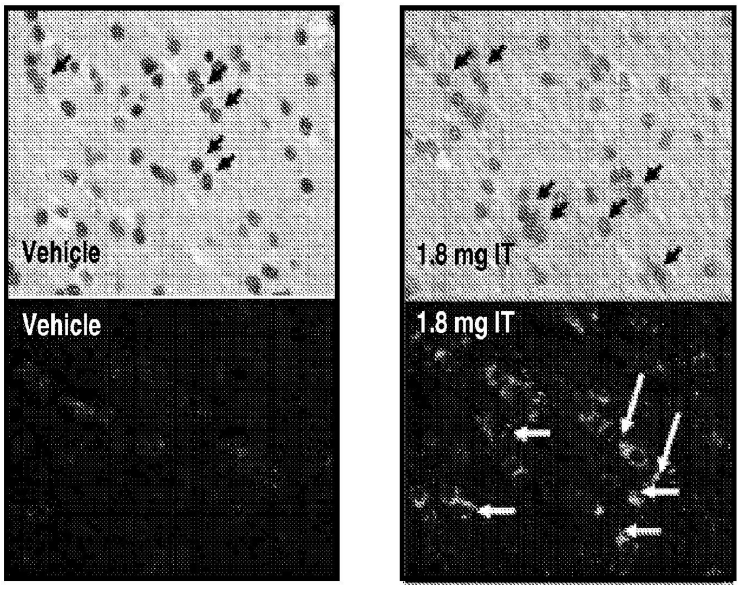
도면46b


500
250
25
20
15
10
5
0
ASA (ng/mg 단백질)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
천자 #
치료 목표
정상의 10%
12.5 ng / mg 단백질

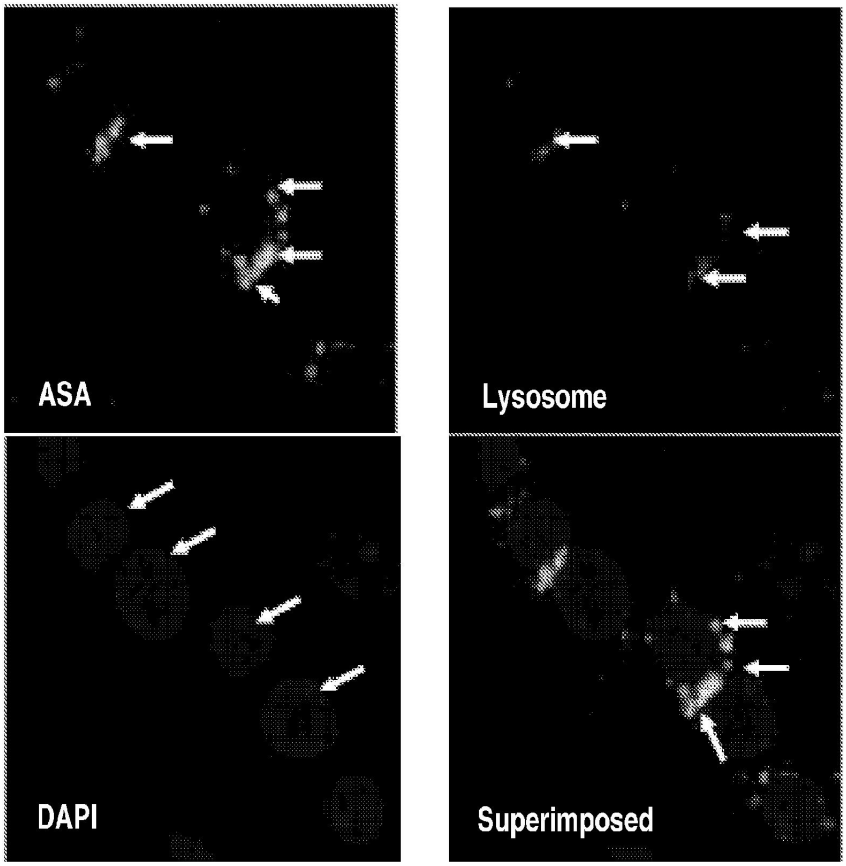
도면47a


62-133
#780
깊은 백색질
1 cm

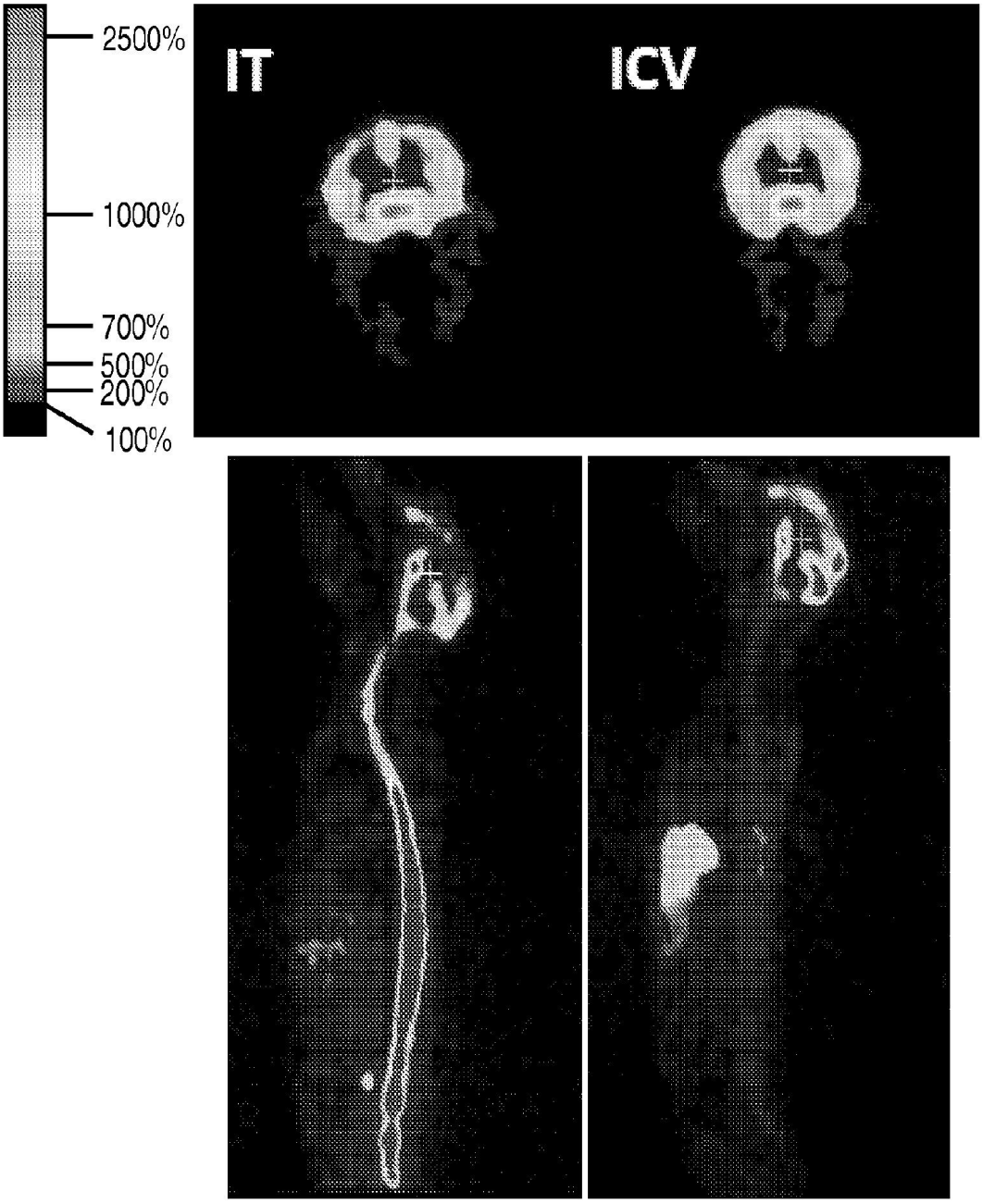
도면47b


Vehicle
Vehicle
1.8 mg IT
1.8 mg IT

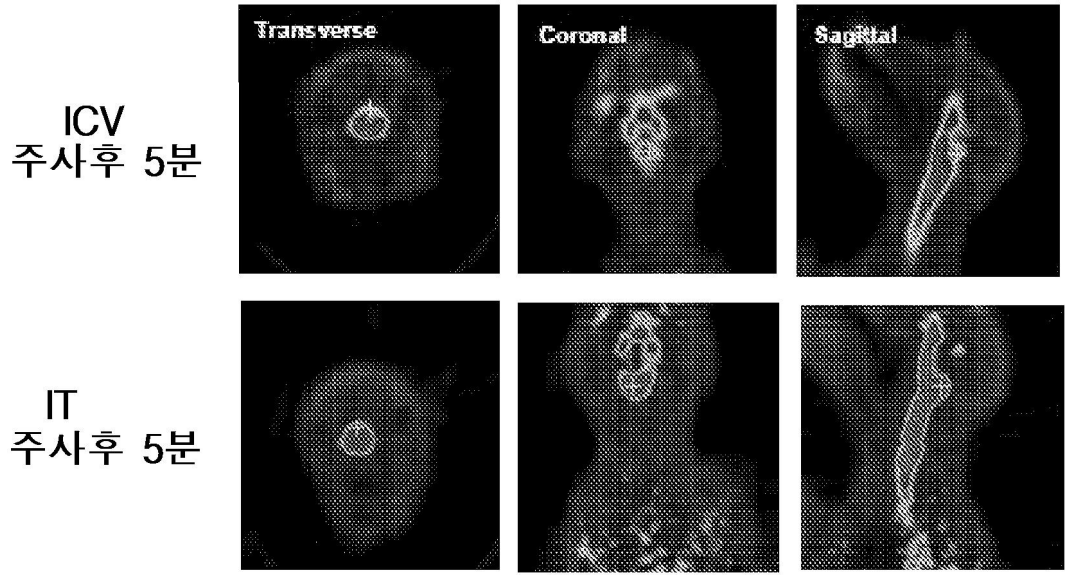
도면47c


ASA
Lysosome
DAPI
Superimposed

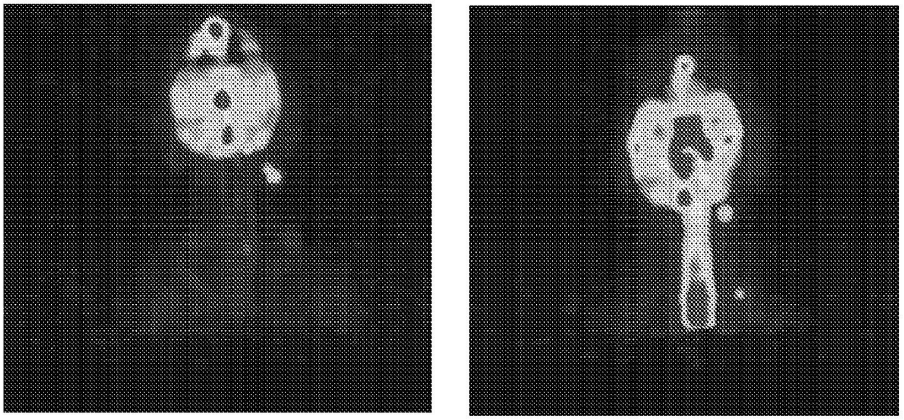
도면48



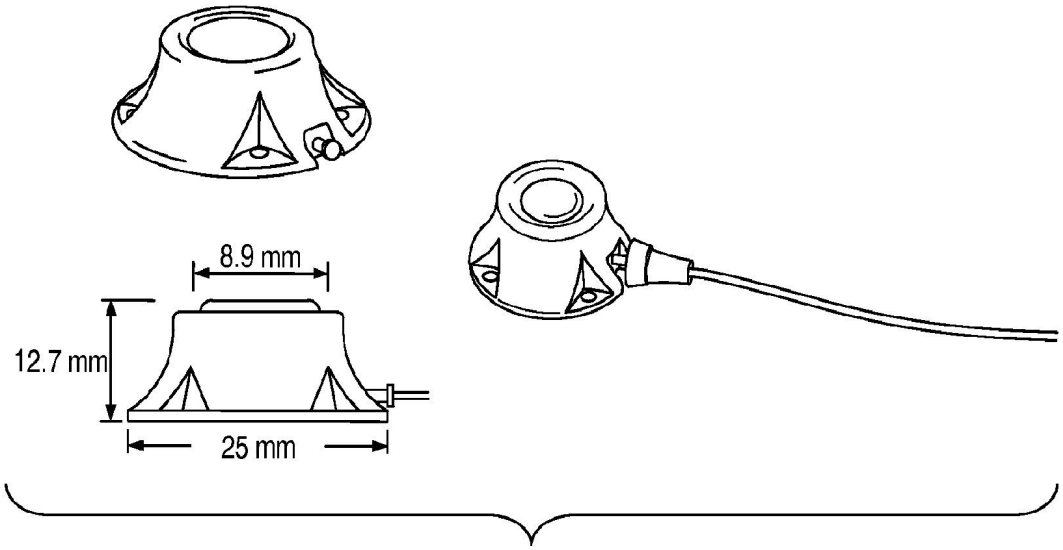
도면49



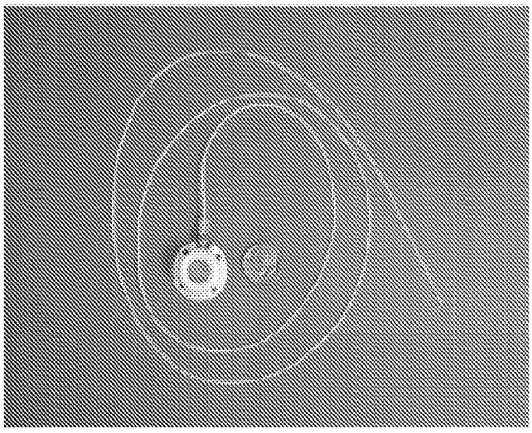
도면50



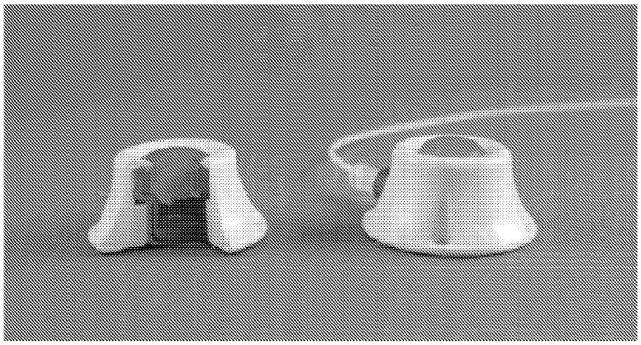
도면51



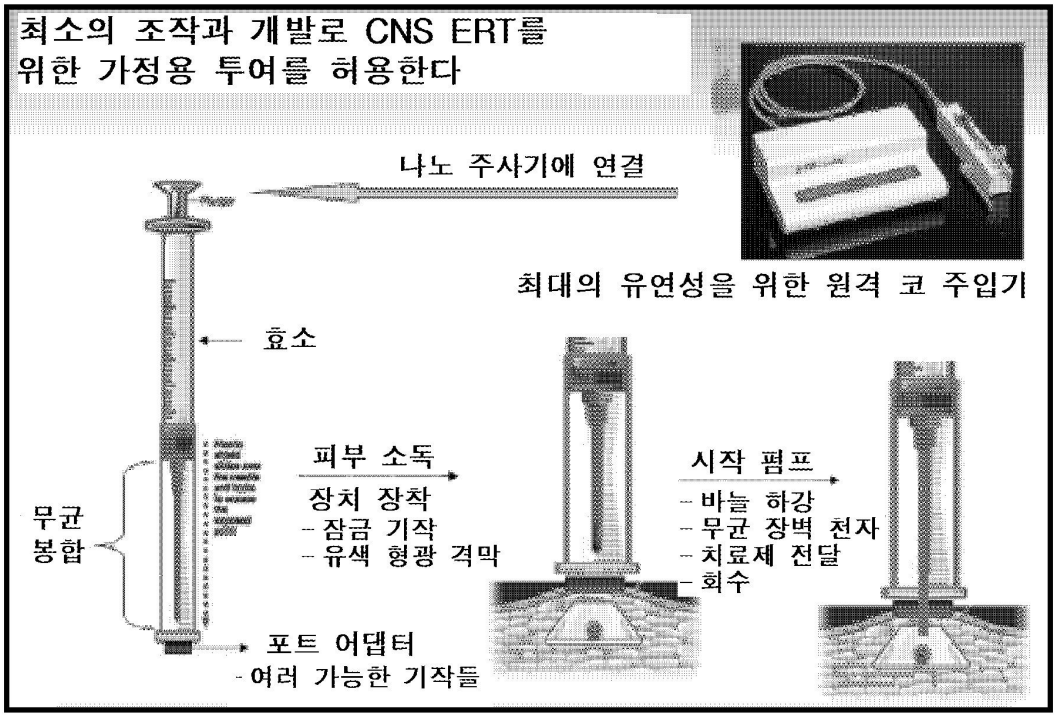
도면52



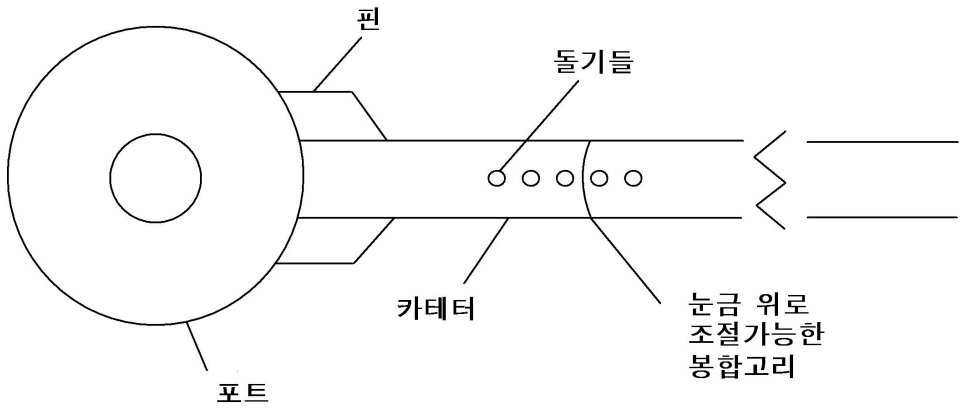
도면53



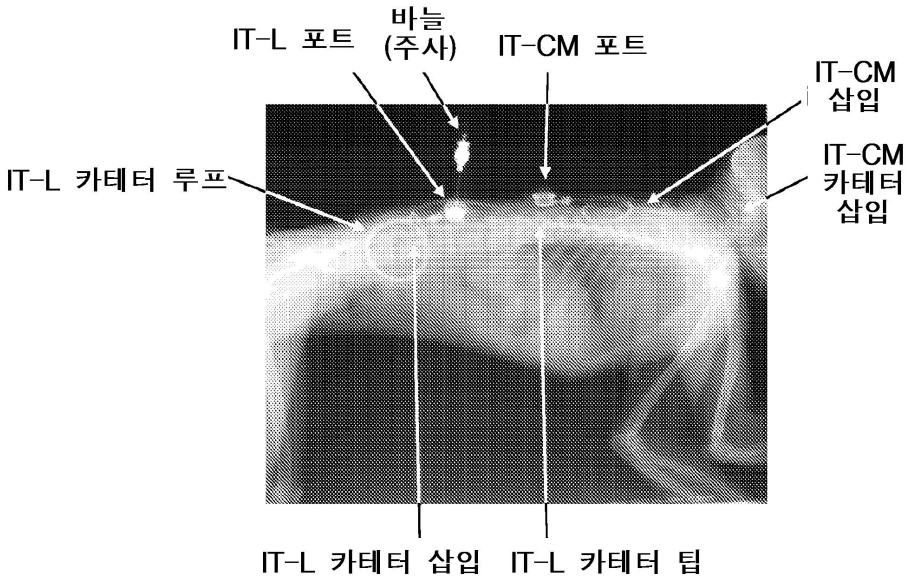
도면54



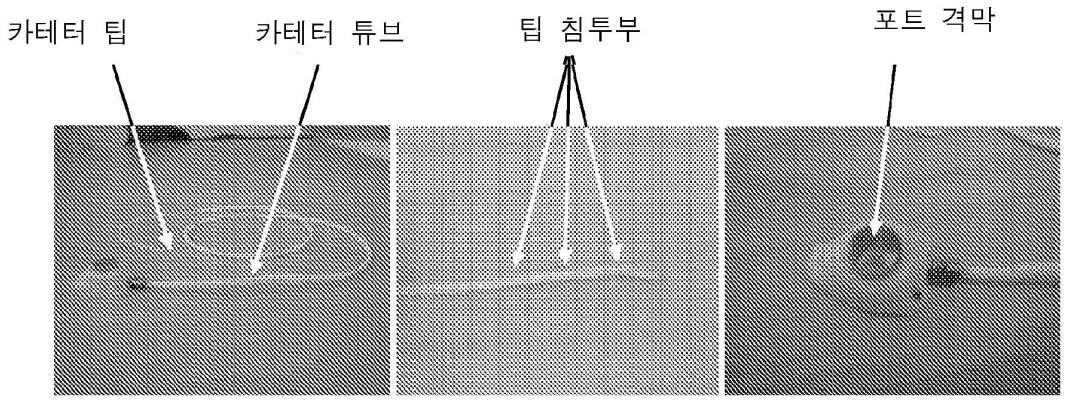
도면55



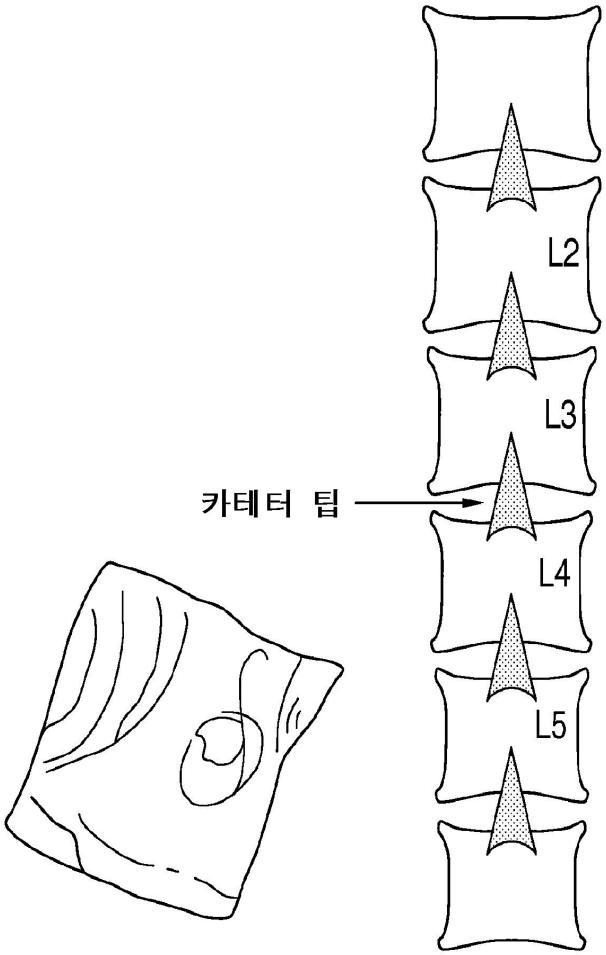
도면56a



도면56b



도면56c



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 8

【변경전】

상기 NaCl은 0-300 mM 범위의 농도로 존재하는,

【변경후】

상기 NaCl은 300 mM 이하의 농도로 존재하는,

【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 13

【변경전】

상기 폴리솔베이트 20은 0 내지 0.2%(v/v) 범위의 농도로 존재하는,

【변경후】

상기 폴리솔베이트 20은 0.2%(v/v) 이하의 농도로 존재하는,

【직권보정 3】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 12

【변경전】

상기 폴리솔베이트 표면활성제는

【변경후】

상기 폴리솔베이트 계면활성제는