



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0005842  
(43) 공개일자 2014년01월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 47/30 (2006.01) A61K 38/46 (2006.01)  
A61K 47/36 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2013-7001750  
(22) 출원일자(국제) 2011년06월25일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2013년01월23일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/041922  
(87) 국제공개번호 WO 2011/163647  
국제공개일자 2011년12월29일  
(30) 우선권주장  
61/358,857 2010년06월25일 미국(US)  
(뒷면에 계속)

(71) 출원인  
샤이어 휴먼 지네틱 테라피즈 인크.  
미국 매사추세츠 (우편번호 02421) 렉싱턴 샤이어  
웨이 300  
(72) 발명자  
나톨리, 파라  
미국, 매사추세츠 01833, 조지타운, 폰트 스트리트 106  
주, 가오종  
미국, 매사추세츠 02493, 웨스턴, 유닛 15, 사우스 예비뉴 680  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
강명구

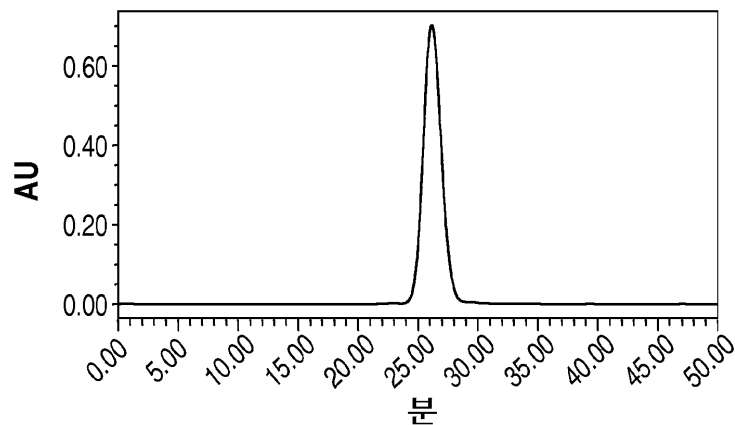
전체 청구항 수 : 총 72 항

(54) 발명의 명칭 **헤파란 N-설파타제의 CNS 전달을 위한 방법들 및 조성물들**

(57) 요약

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 산필리포 증후군 (Sanfilippo syndrome) A형의 치료를 위한 헤파란 N-설파타제 (HNS) 단백질, 염, 및 폴리솔베이트 표면활성제를 포함하는 직접 CNS 경막내 투여를 위한 안정한 제형물을 포함한다.

**대표도** - 도1a



(72) 발명자

**데류, 제니퍼**

미국, 매사추세츠 01742, 콩코드, 커먼웰스 에비뉴 225

**지앙, 유안**

미국, 뉴햄프셔 03053, 런던데리, 포레스트 스트리트 42

**정, 제이미**

미국, 매사추세츠 02482, 웰즐리, 칼튼 로드 7

**샤로크, 자흐라**

미국, 매사추세츠 02493, 웨스턴, 테라스 로드 5

**버나글리아, 브라이언**

미국, 매사추세츠 01890, 윈체스터, 사전트 로드 19

**판, 징**

미국, 매사추세츠 01719, 박스버러, 데포 로드 868

**파이퍼, 리차드**

미국, 코네티컷 06060, 노쓰 그랜비, 실버 스트리트 243

**칼리아스, 페리클레스**

미국, 매사추세츠 02176, 멜로즈, 스웨인즈 폰드 에비뉴 39

(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)

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

헤파란 N-설파타제 (HNS) 단백질, 완충제, 염, 완충제 및 폴리솔베이트 표면활성제를 포함하는 경막내 투여를 위한 안정한 제형물.

### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 HNS 단백질은 대략 100 mg/mL까지의 농도로 존재하는, 안정한 제형물.

### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 HNS 단백질은 대략 30 mg/mL까지의 농도로 존재하는, 안정한 제형물.

### 청구항 4

제 1항 내지 제 3항의 어느 한 항에 있어서, 상기 HNS 단백질은 대략 10 내지 20 mg/mL 범위의 농도로 존재하는, 안정한 제형물.

### 청구항 5

제 1항 내지 제 4항의 어느 한 항에 있어서, 상기 HNS 단백질은 대략 15 mg/mL 범위의 농도로 존재하는, 안정한 제형물.

### 청구항 6

제 1항 내지 제 5항의 어느 한 항에 있어서, 상기 HNS 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, 안정한 제형물.

### 청구항 7

제 1항 내지 제 6항의 어느 한 항에 있어서, 상기 염은 NaCl인, 안정한 제형물.

### 청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 NaCl은 대략 0 내지 300 mM 범위의 농도로 존재하는, 안정한 화합물.

### 청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 NaCl은 대략 100 내지 200 mM 범위의 농도로 존재하는, 안정한 화합물.

### 청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 NaCl은 대략 145 mM 의 농도로 존재하는, 안정한 화합물.

### 청구항 11

제 1항 내지 제 10항의 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리솔베이트 표면활성제는 폴리솔베이트 20, 폴리솔베이트 40, 폴리솔베이트 60, 폴리솔베이트 80 및 그들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 안정한 제형물.

### 청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 폴리솔베이트 표면활성제는 폴리솔베이트 20인, 안전한 제형물.

### 청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 폴리솔베이트 20은 대략 0 내지 0.05% 범위의 농도로 존재하는, 안정한 제형물.

### 청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 폴리솔베이트 20은 대략 0.02%의 농도로 존재하는, 안정한 제형물.

#### 청구항 15

제 13항에 있어서, 상기 폴리솔베이트 20은 대략 0.005%의 농도로 존재하는, 안정한 제형물.

#### 청구항 16

제 1항 내지 제 15항의 어느 한 항에 있어서, 상기 완충제는 포스페이트인, 안정한 제형물.

#### 청구항 17

제 16항에 있어서, 상기 포스페이트는 많아야 50 mM의 농도로 존재하는, 안정한 제형물.

#### 청구항 18

제 16항에 있어서, 상기 포스페이트는 많아야 20 mM의 농도로 존재하는, 안정한 제형물.

#### 청구항 19

제 16항에 있어서, 상기 포스페이트는 대략 5 mM의 농도 존재하는, 안정한 제형물.

#### 청구항 20

제 1항 내지 제 19항의 어느 한 항에 있어서, 상기 제형물은 대략 5.0 내지 8.0의 pH를 가지는, 안정한 제형물.

#### 청구항 21

제 18항에 있어서, 상기 제형물은 대략 6.5 내지 7.5의 pH를 가지는, 안정한 제형물.

#### 청구항 22

제 19항에 있어서, 상기 제형물은 대략 7.0의 pH를 가지는, 안정한 제형물.

#### 청구항 23

제 1항 내지 제 22항의 어느 한 항에 있어서, 상기 제형물은 상기에 더하여 안정화제를 포함하는, 안정한 제형물.

#### 청구항 24

제 23항에 있어서, 상기 안정화제는 슈크로스, 포도당, 만니톨, 소비톨, PEG 4000, 히스티딘, 아르기닌, 라이신, 인지질들 및 그들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 안정한 제형물.

#### 청구항 25

제 24항에 있어서, 상기 안정화제는 슈크로스인, 안정한 제형물.

#### 청구항 26

제 25항에 있어서, 상기 슈크로스는 대략 0 내지 10% 범위의 농도로 존재하는, 안정한 제형물.

#### 청구항 27

제 26항에 있어서, 상기 슈크로스는 대략 0.5 내지 2.0% 범위의 농도로 존재하는, 안정한 제형물.

#### 청구항 28

제 23항에 있어서, 상기 안정화제는 포도당인, 안정한 제형물.

#### 청구항 29

제 28항에 있어서, 상기 포도당은 대략 0.5 내지 1.0% 범위의 농도로 존재하는, 안정한 제형물.

### 청구항 30

제 1항 내지 제 29항의 어느 한 항에 있어서, 상기 제형물은 액상 제형물인, 안정한 제형물.

### 청구항 31

제 1항 내지 제 29항의 어느 한 항에 있어서, 상기 제형물은 동결건조된 건조 파우더로서 제형화되는, 안정한 제형물.

### 청구항 32

대략 30 mg/mL까지의 농도로 헤파란 N-설패타제 (HNS) 단백질, 대략 100 내지 200 mM의 농도로 NaCl, 대략 0.02%의 농도로 폴리솔베이트 20, 대략 5 mM의 농도로 포스페이트, 및 대략 7.0의 pH를 포함하는 경막내 투여를 위한 안정한 제형물.

### 청구항 33

제 32항에 있어서, 상기 HNS 단백질은 대략 15 mg/mL의 농도인, 안정한 제형물.

### 청구항 34

제 32항 또는 제 33항에 있어서, 상기 NaCl은 대략 145 mM의 농도인, 안정한 제형물.

### 청구항 35

제 32항 내지 제 34항의 어느 한 항에 있어서, 상기 제형물은 상기에 더하여 슈크로스를 대략 0 내지 10%의 농도로 포함하는, 안정한 제형물.

### 청구항 36

대략 30 mg/mL까지의 농도로 헤파란 N-설패타제 (HNS) 단백질, 대략 145 mM의 농도로 NaCl, 대략 0.02%의 농도로 폴리솔베이트 20, 대략 5 mM의 농도로 포스페이트, 대략 0.5 내지 2%의 농도로 슈크로스 및 대략 7.0의 pH를 포함하는 경막내 투여를 위한 안정한 제형물.

### 청구항 37

대략 30 mg/mL까지의 농도로 헤파란 N-설패타제 (HNS) 단백질, 대략 145 mM의 농도로 NaCl, 대략 0.02%의 농도로 폴리솔베이트 20, 대략 5 mM의 농도로 포스페이트, 대략 0.5 내지 1.0%의 농도로 포도당 및 대략 7.0의 pH를 포함하는 경막내 투여를 위한 안정한 제형물.

### 청구항 38

제 35항 또는 제 37항에 있어서, 상기 제형물은 동결건조된 건조 파우더로서 제형화된, 안정한 제형물.

### 청구항 39

제 1항 내지 제 38항의 어느 한 항에 따른 안정한 제형물의 단일 용량 형태를 포함하는 용기.

### 청구항 40

제 39항에 있어서, 상기 용기는 앰플, 미리-충전된 주사기, 바이알, 카트리지, 동결건조-용기, 저장조로부터 선택되는, 용기.

### 청구항 41

제 40항에 있어서, 상기 용기는 미리-충전된 바이알인, 용기.

### 청구항 42

제 39항 내지 제 40항의 어느 한 항에 있어서, 상기 안정한 제형물은 약 50 mL 이하의 부피로 존재하는, 용기.

#### 청구항 43

제 42항에 있어서, 상기 안정한 제형물은 약 5.0 mL 이하의 부피로 존재하는, 용기.

#### 청구항 44

제 1항 내지 제 38항의 어느 한 항에 따른 제형물을 치료의 필요가 있는 개체에게 경막내 투여하는 단계를 포함하는 산필리포 A형 증후군을 치료하는 방법.

#### 청구항 45

제 44항에 있어서, 상기 경막내 투여는 개체에게 실질적인 역효과들을 유발하지 않는, 방법.

#### 청구항 46

제 45항에 있어서, 상기 경막내 투여는 개체에게 실질적인 적응적 T 세포-매개성 면역 반응을 유발하지 않는, 방법.

#### 청구항 47

제 44항 내지 제 46항의 어느 한 항에 있어서, 상기 제형물의 경막내 투여는 하나 이상의 표적 뇌 조직들에게 HNS 단백질의 전달을 유도하는, 방법.

#### 청구항 48

제 47항에 있어서, 하나 이상의 표적 뇌 조직들은 회색질, 백색질, 뇌실주위 영역들, 연질-거미막, 뇌척수막, 신생피질, 소뇌, 대뇌 피질에서의 깊은 조직들, 분자층, 미상엽핵/조가비핵 부위, 중뇌, 교뇌 또는 연수의 깊은 부위들, 및 그들의 조합으로부터 나온 조직들로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 49

제 47항 또는 제 48항에 있어서, 상기 HNS 단백질은 뉴런들, 교아세포들, 혈관주위 세포들 및/또는 뇌척수막 세포들로 전달되는, 방법.

#### 청구항 50

제 44항 내지 제 49항의 어느 한 항에 있어서, 상기 HNS 단백질은 상기에 더하여 척수에 있는 뉴런들로 전달되는, 방법.

#### 청구항 51

제 44항 내지 제 50항의 어느 한 항에 있어서, 상기 제형물의 경막내 투여는 상기에 더하여 말초 표적 조직들로 HNS 단백질의 전신적 전달을 유도하는, 방법.

#### 청구항 52

제 51항에 있어서, 상기 말초 표적 조직들은 간, 신장, 및/또는 심장으로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 53

제 44항 내지 제 52항의 어느 한 항에 있어서, 상기 제형물의 경막내 투여는 뇌 표적 조직들, 척수 뉴런들 및/또는 말초 표적 조직들에서 리소좀 정착을 유도하는, 방법.

#### 청구항 54

제 44항 내지 제 53항의 어느 한 항에 있어서, 상기 제형물의 경막내 투여는 뇌 표적 조직들, 척수 뉴런들 및/또는 말초 표적 조직들에서 리소좀 축적의 감소를 유도하는, 방법.

#### 청구항 55

제 54항에 있어서, 상기 리소좀 축적은 대조군과 대비하여 적어도 20%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90%, 1배, 1.5배,

또는 2배 감소되는, 방법.

#### 청구항 56

제 44항 내지 제 55항의 어느 한 항에 있어서, 상기 제형물의 경막내 투여는 뉴런들에서 감소된 공포화를 유도하는, 방법.

#### 청구항 57

제 56항에 있어서, 상기 뉴런들은 퍼킨지 세포들을 포함하는, 방법.

#### 청구항 58

제 44항 내지 제 55항의 어느 한 항에 있어서, 상기 제형물의 경막내 투여는 뇌 표적 조직들, 척수 뉴런들 및/또는 말초 표적 조직들에서 증가된 HNS 효소적 활성을 유도하는, 방법

#### 청구항 59

제 58항에 있어서, 상기 HNS 효소적 활성은 대조군과 대비하여 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배로 증가되는, 방법.

#### 청구항 60

제 58항 또는 제 59항에 있어서, 상기 증가된 HNS 효소적 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/mg인, 방법.

#### 청구항 61

제 58항에 있어서, 상기 HNS 효소적 활성은 요추 부위에서 증가되는, 방법.

#### 청구항 62

제 61항에 있어서, 상기 요추 부위에서 증가된 HNS 효소적 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/mg인, 방법.

#### 청구항 63

제 44항 내지 제 62항의 어느 한 항에 있어서, 상기 제형물의 경막내 투여는 산필립포 A형 증후군의 적어도 하나의 증상 또는 특징의 감소된 강도, 중증도, 또는 빈도 또는 지연된 발병을 유도하는, 방법.

#### 청구항 64

제 63항에 있어서, 상기 산필립포 A형 질환의 적어도 하나의 증상 또는 특징은 난청, 지연된 언어 발달, 운동 능력들의 결여, 과다활동, 정신지체, 공격성 및/또는 수면 방해들인, 방법.

#### 청구항 65

제 44항 내지 제 62항의 어느 한 항에 있어서, 상기 경막내 투여는 2주마다 한 번 시행되는, 방법.

#### 청구항 66

제 44항 내지 제 62항의 어느 한 항에 있어서, 상기 경막내 투여는 매일 한 번 시행되는, 방법.

#### 청구항 67

제 44항 내지 제 62항의 어느 한 항에 있어서, 상기 경막내 투여는 2개월마다 한 번 시행되는, 방법.

#### 청구항 68

제 44항 내지 제 67항의 어느 한 항에 있어서, 상기 경막내 투여는 정맥내 투여와 결합하여 사용되는, 방법.

#### 청구항 69

제 68항에 있어서, 상기 정맥내 투여는 많아야 매월 한 번의 빈도인, 방법.

#### 청구항 70

제 68항에 있어서, 상기 정맥내 투여는 많아야 2개월마다 한 번의 빈도인, 방법.

#### 청구항 71

제 44항 내지 제 67항의 어느 한 항에 있어서, 상기 경막내 투여는 정맥내 투여의 부재 시 사용되는, 방법.

#### 청구항 72

제 44항 내지 제 71항의 어느 한 항에 있어서, 상기 경막내 투여는 동시적인 면역억제 요법의 부재 시 사용되는, 방법.

### 명세서

#### 기술 분야

[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 참조 문헌으로 통합되어 있다. 본 출원은 동일한 날짜에 제출된 "치료제들의 CNS 전달(CNS Delivery of Therapeutic Agents)"; 동일한 날짜에 제출된 "이두로네이트-2-설파타제의 CNS 전달을 위한 방법들 및 조성물들 (Methods and compositions for CNS Delivery of Iduronate-2-Sulfatase)"; 동일한 날짜에 제출된 " $\beta$ -갈락토세레브로시다제의 CNS 전달을 위한 방법들 및 조성물들 (Methods and compositions for CNS Delivery of  $\beta$ -Galactocerebrosidase)"; 동일한 날짜에 제출된 "아릴설파타제 A의 CNS 전달을 위한 방법들 및 조성물들 (Methods and compositions for CNS Delivery of Arylsulfatase A)"; 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.

#### 배경 기술

[0003] 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.

[0004] 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.

[0005] 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 발생하는 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 카테



터들에 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 설치하는 매우 침습적이고 임상적 대안으로서 별로 바람직하지 않다.

[0006] 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.

[0007] 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.

[0008] 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 입수가 가능한 수단이라면 모두에 의해서 성공적으로 치료되지 못하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 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

[0010] 본 발명은 중추신경계 (CNS)로 치료제들의 직접적인 전달을 위한 효과적이고 덜 침습적인 접근법을 제공한다. 본 발명은 부분적으로 리소좀 축적병 (lysosomal storage disease) (예로, 산필리포 A형 증후군)의 대체 효소 (예로, 헤파란-N-설파타제 (HNS))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 발견에 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.

[0011] 하기 자세하게 기술되는 바와 같이, 본 발명자들은 헤파란 N-설파타제 (HNS) 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 간접적 주사를 위한 기타 다른 기법들 및 경로들을 통한 CNS 전달에 사용될 수 있다.

[0012] 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.

[0013] 한 가지 관점에서, 본 발명은 헤파란 N-설파타제 (HNS) 단백질, 염 (salt), 완충제 (buffering agent) 및 폴리솔베이트 표면활성제 (polysorbate surfactant)를 포함하는 경막내 투여를 위한 안정한 제형물들을 제공한다. 일정 구현예들에서, HNS 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, HNS 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.

- [0014] 다양한 구현예들에서, 본 발명은 HNS 단백질이 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, 본 명세서에서 기술된 구현예들이라면 모두의 안정한 제형물을 포함한다. 일정 구현예들에서, HNS 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, NaCl은 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 135-155 mM 범위의 농도로 존재한다. 일정 구현예들에서, NaCl은 대략 145 mM의 농도로 존재한다.
- [0015] 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. 일정 구현예들에서, 폴리솔베이트 20은 대략 0.02%의 농도로 존재한다.
- [0016] 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. 소정의 구현예들에서, 포스페이트는 대략 5 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, 5-7.5, 5.5-8.0, 5.5-7.7, 5.5-6.5, 6-7.5, 6-7.0, 또는 6.5-7.5)를 가지는, 본 명세서에서 기술된 구현예들이라면 모두의 안정한 제형물을 포함한다. 일정 구현예들에서, 제형물은 대략 pH 6.5-7.5 (e.g., 6.5, 6.7, 6.9, 7.0, 7.2, 7.3, 또는 7.5)를 가진다. 일정 구현예들에서, 제형물은 대략 pH 7.0을 가진다.
- [0017] 일정 구현예들에서, 제형물들은 좀 더 나아가 안정화제를 포함한다. 소정의 구현예에서, 안정화제는 슈크로스 (sucrose), 포도당 (glucose), 만니톨 (mannitol), 소비톨 (sorbitol), PEG 4000, 히스티딘 (histidine), 아르기닌 (arginine), 라이신 (lysine), 인지질들 (phospholipids) 및 그들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일정 구현예들에서, 슈크로스는 대략 0-10%로부터 나온 범위의 농도로 존재한다. 일정 구현예들에서, 슈크로스는 대략 0.5-2.0%로부터 나온 범위의 농도로 존재한다. 소정의 구현예들에서, 안정화제는 포도당이다. 일정 구현예들에서 포도당은 대략 0.5-1.0%로부터 나온 범위의 농도로 존재한다.
- [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 30 mg/mL까지의 농도로 헤파란 N-설파타제 (HNS) 단백질, 대략 100 내지 200 mM의 농도로 NaCl, 대략 0.02%의 농도로 폴리솔베이트 20, 대략 5 mM의 농도로 포스페이트, 및 대략 7.0의 pH를 포함하는 경막내 투여를 위한 안정한 제형물을 포함한다. 일정 구현예들에서, HNS 단백질은 대략 15 mg/ml의 농도이다. 일정 구현예들에서, HNS 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. 일정 구현예들에서, NaCl은 대략 145 mM의 농도이다. 일정 구현예들에서, 제형물은 좀 더 나아가 슈크로스를 대략 0-10% (예로, 대략 0-5%, 1-7%, 1-2.5%, 1-1.5%, 또는 0.5-1.5%)의 농도로 포함한다.
- [0020] 일정 구현예들에서, 대략 30 mg/mL까지의 농도로 헤파란 N-설파타제 (HNS) 단백질, 대략 145 mM의 농도로 NaCl, 대략 0.02%의 농도로 폴리솔베이트 20, 대략 5 mM의 농도로 포스페이트, 대략 0.5-2%의 농도로 슈크로스 및 대략 7.0의 pH를 포함하는 경막내 투여를 위한 안정한 제형물을 포함한다.
- [0021] 일정 구현예들에서, 대략 30 mg/mL까지의 농도로 헤파란 N-설파타제 (HNS) 단백질, 대략 145 mM의 농도로 NaCl, 대략 0.02%의 농도로 폴리솔베이트 20, 대략 5 mM의 농도로 포스페이트, 대략 0.5-1%의 농도로 포도당 및 대략 7.0의 pH를 포함하는 경막내 투여를 위한 안정한 제형물을 포함한다.
- [0022] 다양한 관점에서, 본 발명은 본 명세서에서 기술된 다양한 구현예들에서의 안정한 제형물의 단일 용량 형태를 포함하는 용기 (container)를 포함한다. 일정 구현예들에서, 용기는 앰플 (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 약 3.0 mL 이하의 부피로 존재한다.

[0023] 다양한 관점들에서, 본 발명은 본 명세서에서 기술된 구현예들이라면 모두에 따른 제형물 치료의 필요가 있는 개체에게 경막내 투여하는 단계를 포함하는 산필리포 A형 증후군을 치료하는 방법을 포함한다.

[0024] 일정 구현예들에서, 본 발명은 대략 1-300 mg/mL까지의 농도로 헤파란 N-설패타제 (HNS) 단백질, 대략 145 mM의 농도로 NaCl, 대략 0.02%의 농도로 폴리솔베이트 20, 및 대략 7.0의 pH를 포함하는 제형물 치료의 필요가 있는 개체에게 경막내 투여하는 단계를 포함하는 산필리포 A형 증후군을 치료하는 방법을 포함한다.

[0025] 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.

[0026] 일정 구현예들에서, 제형물의 경막내 투여는 뇌, 척수, 및/또는 말초 기관들에서 다양한 표적 조직들에게서 HNS 단백질의 전달을 유도한다. 일정 구현예들에서, 제형물의 경막내 투여는 표적 뇌 조직들에게서 HNS 단백질의 전달을 유도한다. 소정의 구현예들에서, 하나 이상의 표적 뇌 조직들은 회색질 (gray matter), 백색질 (white matter), 뇌실주위 영역들 (periventricular areas), 연질-거미막 (pia-arachnoid), 뇌척수막 (meninges), 신생피질 (neocortex), 소뇌 (cerebellum), 대뇌 피질에서의 깊은 조직들 (deep tissues in cerebral cortex), 분자층 (molecular layer), 미상엽핵 (caudate)/조가비핵 (putamen) 부위들, 중뇌 (midbrain), 교뇌 (pons) 또는 연수 (medulla)의 깊은 부위들, 및 그들의 조합으로부터 나온 조직들로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 소정의 구현예들에서, HNS 단백질은 뉴런들 (neurons), 교아세포들 (glial cells), 혈관주위 세포들 (perivascular cells) 및/또는 뇌척수막 세포들로 전달된다. 일정 구현예들에서, HNS 단백질은 좀 더 나아가 척수에 있는 뉴런들로 전달된다.

[0027] 일정 구현예들에서, 제형물의 경막내 투여는 말초 표적 조직들에서 HNS 단백질의 전신적 전달을 유도한다. 일정 구현예들에서, 말초 표적 조직들은 간, 신장, 비장 및/또는 심장으로부터 선택된다.

[0028] 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 GAG 축적의 감소를 유도한다. 일정의 구현예들에서, GAG 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.

[0029] 일정 구현예들에서, 제형물의 경막내 투여는 뇌 표적 조직들, 척수 뉴런들 및/또는 말초 표적 조직들에서 증가된 HNS 효소 활성을 유도한다. 일정의 구현예들에서, HNS 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 HNS 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.

[0030] 일정 구현예들에서, HNS 효소 활성은 요추 부위 (lumbar region)에서 증가된다. 일정의 구현예들에서, 요추 부위에서 증가된 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/mg이다.

[0031] 일정 구현예들에서, 제형물의 경막내 투여는 산필리포 A형 증후군의 적어도 하나의 증상 또는 특징의 감소된 강도, 중증도, 또는 빈도 또는 지연된 발병을 유도한다. 일정 구현예들에서, 산필리포 A형 증후군의 적어도 하나의 증상 또는 특징은 난청, 지연된 언어 발달, 운동 능력들의 결여, 과다활동, 정신지체, 공격성 및/또는 수면

방해들이다.

[0032] 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.

[0033] 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 스케줄로 수행된다. 일정의 구현예들에서, 경막내 투여는 매주, 격주, 매월 두 번, 또는 매월, 정맥내 투여의 스케줄과 같은 투여 스케줄에서의 정맥내 투여를 대체하고, 본 스케줄에서 세 번째, 네 번째 또는 다섯 번째 투여는 정맥내 투여를 대신하여 경막내 투여로 대체될 수 있다.

[0034] 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).

[0035] 일정 구현예들에서, 경막내 투여는 정맥내 투여의 부재 시 사용된다.

[0036] 일정 구현예들에서, 경막내 투여는 동시적인 면역억제 요법의 부재 시 사용된다.

### 도면의 간단한 설명

[0037] 도면들은 제한하려는 것이 아니라, 단지 도시 (illustration)의 목적들을 위한 것이다.

도 1은 HNS를 위한 SEC-HPLC 용출 프로파일들의 대표적인 크로마토그램을 나타낸 것이다. (A) 2mg/ml rhHNS 20mM 시트레이트, pH 7.0의 프로파일; (B) 2mg/ml rhHNS 20mM 시트레이트, pH 7.0의 측정된 크로마토그램, 기저선 (ilc); (C) 50℃에서 7일 이후에 2mg/ml rhHNS 20mM 시트레이트, pH 7.0의 측정된 크로마토그램; (D) 50℃에서 7일 이후에 2mg/ml 시트레이트, pH 7.0의 16분 피크 및 26분 이중 피크의 확장 스캔 오버레이.

도 2는 다양한 완충액들 및 다양한 pH (A-C)에서 rhHNS에 대한 pH 연구들로부터 얻은 대표적인 환원된 SDS-PAGE 젤들을 나타낸 것이다.

도 3은 다양한 완충액들 및 다양한 pH (A-C)에서 rhHNS에 대한 pH 연구들로부터 얻은 대표적인 비-환원된 SDS-PAGE 젤들을 나타낸 것이다.

도 4는 DSC에 의해 결정된 바와 같이 시트레이트에서 대표적인 pH-의존성 열 안정도를 나타낸 것이다. 시트레이트에서 rhHNS의 최고 용융 온도는 pH 6.0에서 90℃이었다. 조사된 모든 pH에서 rhHNS의 용융 온도는 70℃를 초과한다.

도 5는 DSC에 의해 결정된 바와 같이 포스페이트에서 대표적인 pH-의존성 열 안정도를 나타낸 것이다. 포스페이트를 포함하는 rhHNS 제형물은 pH 6-7에서 최고의 열 안정도를 보여주었다. 조사된 모든 pH에서 rhHNS의 용융 온도는 70℃를 초과한다.

도 6은 50℃에서 5일 이후에 이온 효과들 연구로부터 얻은 rhHNS 제형물들의 대표적인 은 염색된 SDS-PAGE 젤들을 나타낸 것이다. 젤들은 10분 동안 끓인 시료들을 사용하여 전개되었다 (A-B).

도 7은 대표적인 rhHNS 용해도 연구를 나타낸 것이다. (A) rhHNS 용해도에 미치는 pH 효과; (B) rhHNS 용해도에 미치는 염 농도의 효과. 증가하는 pH 및 염화나트륨은 rhHNS 용해도를 증가시키는 것으로 보였다.

도 8은 AUC를 사용한 rhHNS의 자연적 상태에 미치는 염의 효과에 관한 대표적인 연구를 나타낸 것이다. (A) 145



mM 염의 효과; (B) 300 mM 염의 효과.

도 9는 동결건조된 rhHNS 제형물들의 케이크 모양에 미치는 슈크로스 수준 및 동결건조 유닛의 효과에 관한 대표적인 연구를 나타낸 것이다. (A) VirTis 라يو 유닛; 상부 패널, 1% 슈크로스; 하부 패널, 1.5% 슈크로스; (B) 1.5% 슈크로스; 상부 패널, VirTis 라يو 유닛; 하부 패널, LyoStar 라يو 유닛.

도 10은 동결건조된 rhHNS 시료들의 미세-유동 영상화 (Micro-Flow Imaging, MFI)에 의한 대표적인 미립자 영상들을 나타낸 것이다..

도 11은 0.22  $\mu\text{m}$  여과 이후 1.5% 슈크로스를 포함하는 동결건조된 rhHNS 시료들의 경우 MFI에 의해 검출되는 미립자들에 미치는 폴리솔베이트 효과의 대표적인 연구 영상들을 나타낸 것이다.

도 12A는 6개월의 투여에 이어서 1.5, 4.5 및 8.3 mg 용량들에서 rhHNS의 CSF 농도들을 시간의 함수로서 도시하는 대표적인 결과를 나타낸 것이다. 도 12B는 원숭이들에서 1.5, 4.5 및 8.3 mg 용량들의 IT 투여의 6개월 이후 CSF에서 항-HNS 항체 농도들을 도시하는 대표적인 결과를 상술하고 있다. 데이터는 수컷 및 암컷들이 조합된 것이다. 도 12C는 6개월의 투여에 이어서 원숭이들에서 1.5, 4.5 및 8.3 mg 용량들의 IT 투여의 6개월 이후 CSF에서 항-HNS 항체 농도들을 도시하는 대표적인 결과를 상술하고 있다. 데이터는 수컷 및 암컷들이 조합된 것이다. 8.3 mg의 HNS로 IT 투여 6번 이후 두 가지 최고 농도들 (32,205 ng/mL 및 15,467 ng/mL)은 CSF 시료들이 투여 전 6번이 채워지지 못하였기 때문에 좌표로부터 배제되었다.

도 13은 헤마톡실린 및 에오신으로 염색된 뇌의 뇌척수막 및 실질로부터 얻은 조직 절편들의 대표적인 영상들을 도시하는 대표적인 결과를 나타낸 것이다. 도 13A는 DC 원숭이에서 IT 카테터에 국소적인 호중성구 침윤물들의 저-해상도 단면을 도시하는 대표적인 결과를 나타낸다. 도 13B는 고용량 (8.3 mg/dose) 원숭이의 뇌척수막에서 호산구 침윤물들의 고-해상도 단면을 도시하는 대표적인 결과를 나타내고; 침윤물들의 전반적인 중증도는 중간 용량 (4.5 mg/dose) 그룹과 유사하였다 (미도시). 도 13C는 혈관주위 공간 (뇌 실질)에서 호산구들을 보여주는 저용량 (1.5 mg/dose) 원숭이의 고해상도면을 도시하는 대표적인 결과를 나타낸다. 도 13D는 혈관주위 공간 및 결합 실질에서 호산구들을 보여주는 저용량 (1.5 mg/dose) 원숭이의 도시하는 대표적인 결과를 나타낸다. 도 13E 저용량 그룹 동물의 척수 실질 (화살표로 표시됨)에서 호산구들을 도시하는 대표적인 결과를 나타내고; 영역에서 뉴런들은 정상이다. 도 13F는 저용량 (1.5 mg/용량) 원숭이에서 호산구들 및 미세신경아교종의 영역 (화살표는 호산구들을 가르키고; 박스는 미세아교종의 영역을 가르킨다)을 도시하는 대표적인 결과를 나타낸다. 모두 정상인 영역에서 여러 큰 뉴런들이 존재한다. 크기 막대: 200  $\mu\text{m}$ .

도 14는 원숭이 척수들 및 뇌들에서 rhHNS 효소 활성을 도시하는 대표적인 결과를 나타낸 것이다. 도 14A 및 B는 (A) 수컷 및 (B) 암컷 원숭이들의 척수들에서 활성을 도시하는 대표적인 결과를 나타낸다. 조각 -3 = 요추, 조각들 3, 6 = 흉추, 및 조각 9 = 경추; 0 = 카테터 팁. 도 14C 및 D는 (C) 수컷 및 (D) 암컷 원숭이들의 뇌들에서 rhHNS 활성을 도시하는 대표적인 결과를 나타낸다. 조각들은 입쪽부터 꼬리쪽으로 번호 매겨진다 (3 내지 15). 모든 조직 시료들은 회복 동물들의 경우 마지막 용량 이후 대략 24시간 또는 4주에 수집되었다. DC, 장치 대조군. 데이터는 치료 그룹 당  $n=4$ 원숭이들의 평균  $\pm$  SEM을 나타낸다.

도 15는 원숭이 척수들 및 뇌들에서 HNS 효소 활성을 도시하는 대표적인 결과를 나타낸 것이다. 도 15A는 (A) 수컷 및 (B) 암컷 원숭이들의 척수들에서 rhHNS 활성을 도시하는 대표적인 결과를 나타낸다. 조각 -3 = 요추, 조각들 3, 6 = 흉추, 및 조각 9 = 경추; 0 = 카테터 팁. 도 15B는 (C) 수컷 및 (D) 암컷 원숭이들의 뇌들에서 rhHNS 활성을 도시하는 대표적인 결과를 나타낸다. 조각들은 입쪽부터 꼬리쪽으로 번호 매겨진다 (3 내지 15). 모든 조직 시료들은 회복 동물들의 경우 마지막 용량 이후 대략 24시간 또는 4주에 수집되었다. DC, 장치 대조군. 데이터는 치료 그룹 당  $n=4$ 원숭이들의 평균  $\pm$  SEM을 나타낸다.

도 16은 어린 사이노물 원숭이 소뇌에서의 rhHNS 정착을 도시하는 대표적인 결과를 나타낸 것이다. 도 16A는 rhHNS 면역염색에 대해 음성인 운반체 대조군 동물 (0 mg/용량) 의 소뇌를 도시하는 대표적인 결과를 나타낸다; 20배 확대. 도 16B는 분자층에 제한되는 최소의 양성 염색을 보여주는 저용량 (1.5 mg/용량) 동물의 소뇌를 도시하는 대표적인 결과를 나타낸다; 20배 확대. 도 16C는 외부 과립층에서 최소의 염색을 보여주는 중간-용량 (4.5 mg/용량) 동물의 소뇌를 도시하는 대표적인 결과를 나타낸다; 20배 확대. 도 16D는 분자층, 외부 과립층 및 퍼킨지 세포들을 포함하는 고용량 (8.3 mg/용량) 동물의 소뇌에서 적당한 염색을 도시하는 대표적인 결과를 나타낸다; 20배 확대.

도 17은 1 및 10 mg/kg으로  $^{124}\text{I}$ -HNS의 IT 투여 이후 처음 20분에 시간으로 좌표 표시된 머리 부위에서의 대표적

인 rhHNS 농도의 연구를 나타낸 것이다.

도 18은 1 및 10 mg/kg으로  $^{124}\text{I}$ -HNS의 IT 투여 이후 시간으로 좌표 표시된 뇌에서의 대표적인 rhHNS 농도의 연구를 나타낸 것이다.

도 19는 1 및 10 mg/kg으로  $^{124}\text{I}$ -HNS의 IT 투여 이후 시간으로 좌표 표시된 뇌 부위에서의 대표적인 rhHNS 농도의 연구를 나타낸 것이다.

도 20은 1 및 10 mg/kg으로  $^{124}\text{I}$ -HNS의 IT 투여 이후 시간으로 좌표 표시된 머리 부위에서의 대표적인 rhHNS 농도의 연구를 나타낸 것이다.

도 21은 1 및 10 mg/kg으로  $^{124}\text{I}$ -HNS의 IT 투여 이후 시간으로 좌표 표시된 근육 척수에서의 대표적인 rhHNS 농도의 연구를 나타낸 것이다.

도 22는 1 및 10 mg/kg으로  $^{124}\text{I}$ -HNS의 IT 투여 이후 시간으로 좌표 표시된 중간-척수에서의 대표적인 rhHNS 농도의 연구를 나타낸 것이다.

도 23은 1 및 10 mg/kg으로  $^{124}\text{I}$ -HNS의 IT 투여 이후 시간으로 좌표 표시된 말단 척수에서의 대표적인 rhHNS 농도의 연구를 나타낸 것이다.

도 24는 1 및 10 mg/kg으로  $^{124}\text{I}$ -HNS의 IT 투여 이후 시간으로 좌표 표시된 간에서의 대표적인 rhHNS 농도의 연구를 나타낸 것이다.

도 25는 1 및 10 mg/kg으로  $^{124}\text{I}$ -HNS의 IT 투여 이후 시간으로 좌표 표시된 뇌에서의 대표적인 rhHNS 농도의 연구, 개별 (위) 및 평균  $\pm$ SD (아래)를 나타낸 것이다.

도 26은 1 및 10 mg/kg으로  $^{124}\text{I}$ -HNS의 IT 투여 이후 시간으로 좌표 표시된 대표적인 rhHNS 간 농도의 연구, 개별 (위) 및 평균  $\pm$ SD (아래)를 나타낸 것이다.

도 27은 1 및 10 mg/kg으로  $^{124}\text{I}$ -HNS의 IT 투여 이후 시간으로 좌표 표시된 대표적인 rhHNS 신장 농도의 연구, 개별 (위) 및 평균  $\pm$ SD (아래)를 나타낸 것이다.

도 28은 1 및 10 mg/kg으로  $^{124}\text{I}$ -HNS의 IT 투여 이후 시간으로 좌표 표시된 대표적인 rhHNS 심장 농도의 연구, 개별 (위) 및 평균  $\pm$ SD (아래)를 나타낸 것이다.

도 29는 1 및 10 mg/kg으로  $^{124}\text{I}$ -HNS의 IT 투여 이후 시간으로 좌표 표시된 대표적인 rhHNS 피부 농도의 연구, 개별 (위) 및 평균  $\pm$ SD (아래)를 나타낸 것이다.

도 30은 1 및 10 mg/kg으로  $^{124}\text{I}$ -HNS의 IT 투여 이후 시간으로 좌표 표시된 대표적인 rhHNS 뇌 농도의 연구 (위), 또한 뇌에서 비구획 PK 변수들의 비교 (아래)를 나타낸 것이다.

도 31은 1 및 10 mg/kg으로  $^{124}\text{I}$ -HNS의 IT 투여 이후 시간으로 좌표 표시된 대표적인 rhHNS 간 농도의 연구 (위), 또한 간에서 비구획 PK 변수들의 비교 (아래)를 나타낸 것이다.

도 32 는 대표적인 경막내 약물 전달 장치 (IDDD)를 나타낸 것이다.

도 33은 대표적인 Port-A-Cath 로우 프로파일 경막내 이식가능한 접근 시스템을 나타낸 것이다.

도 34 는 대표적인 경막내 약물 전달 장치 (IDDD)를 나타낸 것이다.

도 35 는 CNS 효소 대체 요법 (ERT)을 위한 가정용 투여를 허용하는 대표적인 경막내 약물 전달 장치 (IDDD)를 나타낸 것이다.

도 36은 안전 기작을 가진 대표적인 경막내 약물 전달 장치 (IDDD)의 대표적인 도면을 나타낸 것이다.

도 37A는 IDDD가 설치되는 환자의 신체 안에 대표적인 위치들을 나타내고; 도 37B는 경막내 약물 전달 장치 (IDDD)의 다양한 구성요소들을 나타내고; 또한 도 37C는 IT-요추 주사를 위한 환자의 신체 안에 대표적인 주사

위치를 나타낸 것이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038]

### 정의들

[0039]

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.

[0040]

**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.

[0041]

**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.

[0042]

**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.

[0043]

**충전제 (Bulking agent):** 본 명세서에서 사용되는 바, "충전제"는 냉동동결된 혼합물에 질량을 더하는 화합물을 말하고 냉동동결된 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.

[0044]

**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 리소솜에 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.

[0045]

**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.

[0046]

**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 텍스트로스 용액을 포함한다.

[0047]

**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.

- [0048] 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.
- [0049] 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.
- [0050] 개인 (Individual), 개체 (subject), 환자 (patient): 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.
- [0051] 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.
- [0052] 링커 (Linker): 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "링커"는 천연의 단백질에서, 특정한 위치에서 나타나는 것이 아닌 아미노산 서열을 말하고 일반적으로 단백질 분체들 사이에서 유연하고 알파-나선과 같은 구조를 부여하도록 설계된다.
- [0053] 냉동보호제 (Lyoprotectant): 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "냉동보호제"는 냉동동결 (동결건조ation) 및 연속적 보관 시 단백질 또는 기타 다른 물질의 화학적 및/또는 물리적 불안정성을 예방하거나 감소시키는 분자를 말한다. 대표적인 냉동보호제들로는 슈크로스 또는 트레할로스와 같은 당류들; 모노소듐 글루타메이트 (monosodium glutamate) 또는 히스티딘과 같은 아미노산; 베타인 (betaine)과 같은 메틸아민; 마그네슘 셀페이트와 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 (Pluronic); 및 그들의 조합들을 포함한다. 일정 구현예들에서, 냉동보호제는 트레할로스 또는 슈크로스와 같은 비-환원성 당이다.
- [0054] 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.
- [0055] 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.
- [0056] 리소좀 축적병 (lysosomal storage disease): 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "리소좀 축적병"은 천연의 거대



분자들을 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.

[0057] 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 그림에도 불구하고 임의적으로 폴리펩타이드 사슬 내에 통합될 수 있는 "비-천연의 (non-natural)" 아미노산들 또는 기타 다른 실체들을 때로 포함할 수 있는 점을 인정할 것이다.

[0058] 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.

[0059] 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. 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 (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 일정한 치료제들, 상세하게는 일정한 단백질을 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.

[0060] 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 프로파일들의 이동 (shift)에 의해 측정될 수 있다.

[0061] 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.

[0062] 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, 당업자라

면 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.

[0063] 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, 또는 500개 이상의 잔기들이다.

[0064] 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, 또는 500개 이상의 잔기들이다.

[0065] 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 (artificial CSF)라고도 역시 말한다. 일정 구현예들에서, 합성 CSF는 엘리엇 B 용액 (Elliott's B solution)이다.

[0066] CNS 전달에 적합한 (Suitable for CNS delivery): 본 명세서에서 사용되는 바, 용어구 본 발명의 약제학적 조성물들에 관한 "CNS 전달에 적합한" 또는 "경막내 전달에 적합한 (suitable 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.

[0067] 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.

다. 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.

[0068] **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.

[0069] **치료적 유효량 (therapeutically effective amount):** 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "치료적 유효량"은 의학 적 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 발병 또는 진행을 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 용합 단백질의 대사; 치료의 지속기간; 및 의학 적 기술분야에서 잘 알려져 있는 요인들 등을 포함하는 다양한 요인들에 의존할 수 있다.

[0070] **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.

[0071] **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 A형 증후군, 산필리포 B형 증후군)의 하나 이상의 증상들 또는 특징들을 완화시키고, 개선시키고, 안정시키고, 억제 하고, 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.

## [0072] 발명의 상세한 설명

[0073] 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, 산필리포 A형 증후군)의 대체 효소 (예로, HNS 단백질)가 치료의 필요가 있는 개체의 뇌척수액 (CSF) 내로 높은 농도로 개체에서 실질적인 역효과들을 유발하지 않고도 직접 도입될 수 있는 점의 예기치 않은 발견에 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 내성의 유발 없음) 사용될 수 있다.

[0074] 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 경막내 전달은 표면, 얇은 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 충분한량의 대체 효소들을 유도하였다. 그 결과, 일정 경우에는, 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.

[0075] 본 발명은 다양한 뇌 표적 조직들로 대체 효소들의 효율적이고 편리한 전달을 허용하여 CNS 표시들 (CNS indications)을 가지는 리소좀 축적병들의 효과적인 치료를 유도하는 다양한 예기치 못한 유익한 특징들을 제공한다.

[0076] 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.

[0077] **대체 효소들**

[0078] 헤파란-N-설패타제 (HNS) 단백질

[0079] 일정 구현예들에서, 본 발명에 의해 제공되는 발명적 방법들 및 조성물들은 헤파란-N-설패타제 (HNS) 단백질을 산필리포 A형의 치료를 위해 CNS에 전달하는 데 사용된다. 적합한 HNS 단백질은 자연적으로 발생하는 헤파란-N-설패타제 (HNS) 단백질 활성을 대체하거나 HNS-결핍과 관련된 표현형들 또는 증상을 하나 이상을 복구할 수 있는 분자 또는 분자의 일부분이라면 모두일 수 있다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 대체 효소는 성숙한 인간 HNS 단백질과 실질적으로 유사하거나 일치하는 N-말단 및 C-말단 또한 아미노산 서열을 가지는 폴리펩타이드이다.

[0080] 전형적으로, 인간 HNS는 성숙한 형태로 프로세싱되는 전구체 분자로서 생산된다. 본 프로세싱은 일반적으로 20개의 아미노산 신호 펩타이드를 제거하여 진행된다. 전형적으로, 전구체 형태는 502개 아미노산들을 포함하는 전장 (full-length) 전구체 또는 전장의 HNS 단백질이다. N-말단 20개 아미노산들이 절단되어 길이가 482개 아미노산들인 성숙한 형태가 된다. 따라서, N-말단 20개 아미노산들은 HNS 단백질 활성을 위해 일반적으로 필요하지 않는 것으로 고려된다. 전형적인 야생형 또는 자연적으로 발생하는 인간 HNS 단백질의 성숙한 형태 (서열번호 1) 및 전장 전구체 (서열번호 2)의 아미노산 서열들은 표 1에 나타나 있다. 하기 표 1은 인간 헤파란-N-설패타제를 나타낸다.

**표 1**

**성숙한 형태**

RPRNALLLLA	DDGGFESGAY	NNSAIATPHL	DALARRSLLF
RNAFTSVSSC	SPSRASLLTG	LPQHONGMYG	LHQDVHHFNS
FDKVRSLPLL	LSQAGVRTGI	IGKKHVGPE	VYPFDFAYTE
ENGSVLQVGR	NITRIKLLVR	KFLQTQDDRP	FFLYVAFHDP
HRCGHSQPQY	GTFCEKFGNG	ESGMGRIPDW	TPQAYDPLDV
LVPYFVPNTP	AARADLAAQY	TTVGRMDQGV	GLVLQELRDA
GVLNDTLVIF	TSDNGIPFPS	GRTNLYWPGT	AEPLLVSSE
HPKRWGQVSE	AYVSLDLTP	TILDWFSIPY	PSYAIFGSKT
IHLTGRSLLP	ALEAEPLWAT	VFGSQSHHEV	TMSYPMRSVQ
HRHFRLVHNL	NFKMPFPIDQ	DFYVSPTFQD	LLNRTTAGQP
TGWYKDLRHY	YYRARWELYD	RSRDPHETQN	LATDPRFAQL
LEMLRDQLAK	WQWETHDPWV	CAPDGVLEEK	LSPQCQPLHN

EL (서열번호 1)

**전장 전구체**

MSCPVPACCA	LLLVLGLCRA	RPRNALLLLA	DDGGFESGAY
NNSAIATPHL	DALARRSLLF	RNAFTSVSSC	SPSRASLLTG
LPQHONGMYG	LHQDVHHFNS	FDKVRSLPLL	LSQAGVRTGI
IGKKHVGPE	VYPFDFAYTE	ENGSVLQVGR	NITRIKLLVR
KFLQTQDDRP	FFLYVAFHDP	HRCGHSQPQY	GTFCEKFGNG
ESGMGRIPDW	TPQAYDPLDV	LVPYFVPNTP	AARADLAAQY
TTVGRMDQGV	GLVLQELRDA	GVLNDTLVIF	TSDNGIPFPS
GRTNLYWPGT	AEPLLVSSE	HPKRWGQVSE	AYVSLDLTP
TILDWFSIPY	PSYAIFGSKT	IHLTGRSLLP	ALEAEPLWAT
VFGSQSHHEV	TMSYPMRSVQ	HRHFRLVHNL	NFKMPFPIDQ
DFYVSPTFQD	LLNRTTAGQP	TGWYKDLRHY	YYRARWELYD
RSRDPHETQN	LATDPRFAQL	LEMLRDQLAK	WQWETHDPWV
CAPDGVLEEK	LSPQCQPLHN		

EL (서열번호 2)

[0081]

[0082] 따라서 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 치료적 분체 (therapeutic moiety)는 성숙한 인간 HNS 단백질 (서열번호 1)이다. 일정 구현예들에서, 적합한 치료적 분체는 성숙한 인간 HNS 단백질의 상동체 또는 유사체일 수



있다. 예를 들어, 인간 HNS 단백질의 상동체 또는 유사체는 야생형 또는 자연적으로-발생하는 HNS 단백질 (서열 번호 1)과 대비하여 하나 이상 아미노산 치환들, 결실들, 및/또는 삽입들을 포함하는 한편, 실질적인 HNS 단백질 활성을 보유하는 변형된 성숙한 인간 HNS 단백질일 수 있다. 따라서 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 치료적 분체는 성숙한 인간 HNS 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 치료적 분체는 성숙한 인간 HNS 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 HNS 단백질의 단편 또는 일부분을 포함한다.

[0083] 임의적으로, 본 발명에 적합한 치료적 분체는 전장의 HNS 단백질이다. 일정 구현예들에서, 적합한 치료적 분체는 전장의 인간 HNS 단백질의 상동체 또는 유사체일 수 있다. 예를 들어, 전장의 인간 HNS 단백질의 상동체 또는 유사체는 야생형 또는 자연적으로-발생하는 전장의 HNS 단백질 (서열번호 2)과 대비하여 하나 이상 아미노산 치환들, 결실들, 및/또는 삽입들을 포함하는 한편, 실질적인 HNS 단백질 활성을 보유하는 변형된 전장의 인간 HNS 단백질일 수 있다. 따라서 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 치료적 분체는 전장의 인간 HNS 단백질 (서열번호 2)과 실질적으로 상동적이다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 치료적 분체는 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 치료적 분체는 전장의 인간 HNS 단백질 (서열번호 2)과 실질적으로 일치한다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 적합한 치료적 분체는 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 치료적 분체는 전장의 인간 HNS 단백질의 단편 또는 일부분을 포함한다.

[0084] 다른 리소좀 축적병들 및 대체 효소들

[0085] 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 (mucopolysaccharidosis) 제 I형, 시알산증 제 I/II형, 점액지질증 제 II/III형, I-세포병 (I-cell disease), 점액지질증 제 IIIC형, 유사-허러 다중장애 (pseudo-Hurler polydystrophy), 점액다당류증 (mucopolysaccharidosis) 제 I형, 점액다당류증 제 II형, 점액다당류증 제 IIIA형, 산필리포 증후군 (Sanfilippo syndrome) (예로, A형, B형, C형 또는 D형), 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 설패타제 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 (pseudohypoparathyroidism), 원들러병 제 I/II형, 가우셔병 및 시알산 축적병 (sialic acid storage disease)을 포함하는, CNS 병리학 및/또는 증상들을 가지는 이들 리소좀 축적병들을 치료하는 데 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0086] 리소좀 축적병들의 유전적 병리학, 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 표에 예시되고 있다.

표 2

질병 명칭	효소결핍	축적 물질
폼브병	산-알, 4-글루코시다제	글리코겐 $\alpha$ 1-4 결합 올리고다당류
GM1 갱글리오사이드 축적증	$\beta$ -갈락토시다제	GM <sub>1</sub> 갱글리오사이드들
테이삭스병	$\beta$ -헥소아미다제 A	GM <sub>2</sub> 갱글리오사이드
GM2 갱글리오사이드 축적증: AB 변이체	GM <sub>2</sub> 활성인자 단백질	GM <sub>2</sub> 갱글리오사이드
샌드호프병	$\beta$ -헥소아미다제 A&B	GM <sub>2</sub> 갱글리오사이드
파브리병	$\alpha$ -갈락토시다제 A	글로보사이드 (Globosides)
가우셔병	글루코세레브로시다제	글루코실세라마이드
이염색성 백색질 장애	아릴설파타제 A	설파타이드들
크래브병	갈락토실세라미다제	갈락토세레브로사이드
니만피크병 A & B 형	산 �핑고미엘리나제	스핑고마이엘린
니만피크병 C 형	콜레스테롤 에스테르화 결함	스핑고마이엘린
니만피크병 D 형	미지	스핑고마이엘린
파버병	산 세라미다제	세라마이드
울만병	산 리파제	콜레스테릴 에스테르들
헐러 증후군 (MPS IH)	$\alpha$ -L-이듀로니다제	헤파란 & 더마탄 설페이드들
쉬에 증후군 (MPS IS)	$\alpha$ -L-이듀로니다제	헤파란 & 더마탄 설페이드들
헐러-쉬에병 (MPS IH/S)	$\alpha$ -L-이듀로니다제	헤파란 & 더마탄 설페이드들
헌터 증후군 (MPS II)	이듀로네이트 설파타제	헤파란 & 더마탄 설페이드들
신필리포 A 형 (MPS IIIA)	헤파란 N-설파타제	헤파란 설페이드들
산필리포 B 형 (MPS IIIB)	$\alpha$ -N-아세틸글루코사미다제	헤파란 설페이드들
산필리포 C 형	아세틸-CoA-	헤파란 설페이드들

[0087]

(MPS IIIC)	글루코사미나이드 아세틸전이효소	
산필리포 D 형 (MPS IIID)	N-아세틸글루코사민-6- 설파타제	헤파란 설페이드들
모르퀴오병 B 형 (Morquio B) (MPS IVB)	$\beta$ -갈락토시다제	케라탄 설페이드들
마로토-라미병 (Maroteaux-Lamy) (MPS VI)	아릴설파타제 B	더마탄 설페이트
슬라이 증후군 (MPS VII)	$\beta$ -글루쿠로니다제	
$\alpha$ -만노사이드증	$\alpha$ -만노시다제	만노스/올리고다당류
$\beta$ -만노사이드증	$\beta$ -만노시다제	만노스/올리고다당류
퓨코사이드증	$\alpha$ -L-퓨코시다제	퓨코실 다당류
아스파틸글루코사민 뇨증	N-아스파틸- $\beta$ - 글루코사미다제	아스파틸글루코사민, 아스파라진들
시알산증 (점액지질증 제 I 형)	$\alpha$ -뉴라미다제	시알산올리고다당류
갈락토시알산증 (골드버그 증후군)	리소좀 보호 단백질 결핍	시알산올리고다당류
헌들러병	$\alpha$ -N-아세틸-갈락토사미다제	
점액지질증 제 II 형 (제 I 형-세포 질환)	N-아세틸글루코사민-1- 포스포전이효소	헤파란 설페이트
점액지질들 제 III 형 (유사-혈러 다중장애)	ML II와 동일함	
시스틴증	시스틴 운반 단백질	자유 시스틴
살라병	시알산 운반 단백질	자유 시알산 및 글루쿠론산
소아 시알산 축적병	시알산 운반 단백질	자유 시알산 및 글루쿠론산
소아 신경 세로이드 지질갈색소증	팔미토일-단백질 티오에스터라제	지질퓨코신들
점액지질증 제 IV 형	미지	갱글리오사이드 및

[0088]

		하이알루론산
프로사포닌병	사포닌들 A, B, C or D	

[0089]

[0090]

본 발명에 따른 발명적 방법들은 다양한 다른 대체 효소들을 전달하는 데 사용될 수 있다. 본 명세서에서 사용 되는 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.

[0091]

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

- [0092] 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).
- [0093] 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.
- [0094] 효소들이 재조합적으로 생산되는 경우, 발현 시스템이라면 모두가 사용될 수 있다. 몇 가지의 예들을 제시하면, 기지의 발현 시스템들은 예를 들어 계란, 배콜로바이러스, 식물, 효모, 또는 포유동물 세포들을 포함한다.
- [0095] 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, 네덜란드); 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); 베타로 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.
- [0096] 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.
- [0097] 일정 구현예들에서, 본 발명의 방법을 사용하여 전달된 대체 효소들은 세포성 흡수 및/또는 리소솜 표적화를 용이하게 하도록 베타 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 리소솜 효소들 상에서 UDP-GlcNAc로부터  $\alpha$ -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.
- [0098] 일정 구현예들에서, 본 발명에서 사용되는 대체 효소들은 베타 세포들의 표면 상의 수용체에 결합할 수 있는 리소솜 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.
- [0099] 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 대체 효소들은 BBB를 거쳐서 또한 CNS 내로 이러한 제제들의 전달 또는 이동을 증진하도록 변형되지 않았다.
- [0100] 일정 구현예들에서, 치료적 단백질은 표적 분체 (예로, 리소솜 표적 서열) 및/또는 막-침투 펩타이드를 포함한다.



다. 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.

[0101] 제형물들

[0102] 일정 구현예들에서, 원하는 효소는 경막내 전달을 위해 안정 제형물들로 전달된다. 본 발명의 소정의 구현예들은 적어도 부분적으로는 본 명세서에서 기재된 다양한 제형물들이 CNS의 표적된 조직들, 세포들 및/또는 소기관들로 하나 이상의 치료제들 (예로, HNS 효소)의 효과적인 전달 및 분배를 용이하게 하는 점의 발견을 기초로 한다. 무엇보다도, 본 명세서에서 기술된 제형물들은 치료제들 (예로, HNS 효소)의 높은 농도들을 용해화할 수 있고 CNS 성분 및/또는 병인학 (예로, 산필리포 A형 증후군)을 가지는 질환들의 치료를 위해 개체들의 CNS로 이러한 치료제들의 전달에 적합하다. 본 명세서에서 기술된 조성물들은 좀 더 나아가 그의 필요가 있는 개체의 CNS로 (예로, 경막내) 투여될 때 향상된 안정도 및 향상된 내성도를 특징으로 한다.

[0103] 본 발명 이전에, 통상적인 비완충된 등장성 식염수 및 인공 CSF인 엘리엇 B 용액이 전형적으로 경막내 전달에 사용되었다. 엘리엇 B 용액에 대비하여 CSF의 조성들을 보여주는 비교가 하기 표 3에 포함되어 있다. 표 3에서 나타난 바와 같이, 엘리엇 B 용액의 농도는 CSF의 농도와 매우 유사하다. 그러나 엘리엇 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, 엘리엇 B 용액은 일정 치료제들, 상계하게는 단백질들 또는 효소들을 전달하도록 의도된 제형물들과 부적합할 수 있는 소정의 염들을 포함한다. 예를 들어, 엘리엇 B 용액에 존재하는 칼슘 염들은 단백질 침전을 매개할 수 있고 이에 의해 제형물의 안정도를 감소시킬 수 있다.

표 3

용액	Na <sup>+</sup> mEq/L	K <sup>+</sup> mEq/L	Ca <sup>++</sup> mEq/L	Mg <sup>++</sup> mEq/L	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mEq/L	Cl <sup>-</sup> mEq/L	pH	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
엘리엇 B 용액	149	2.6	2.7	2.4	22.6	132	6.0-7.5	2.3	80

[0104]

[0105] 따라서, 일정 구현예들에서, 본 발명에 따른 CNS 전달에 적합한 제형물들은 합성 또는 인공 CSF가 아니다.

[0106] 일정 구현예들에서, CNS 전달용 제형물들은 이로 제형화된 치료제 (예로, HNS 효소)을 안정화하거나, 임의적으로 그의 분해를 지연시키거나 방지할 수 있도록 제형화되어 왔다. 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, HNS 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.

[0107] 치료제의 안정도는 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).

[0108] 일정 구현예들에서, 치료제들 (예로, 원하는 효소들)은 본 발명의 제형물들에서 용해가능하다. 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.

[0109] 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 단백질을 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 단백질을 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.

[0110] 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.

[0111] 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 대표적인 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

[0112]

[0113] 완충액들

[0114] 제형물의 pH는 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 완충액을 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.

[0115] 긴장도

[0116] 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/kg 으로부터 약 350 mOsm/kg까지의 삼투도를 가질 것이다. 등장도는, 예를 들어 증기압 또는 동결점 유형의 삼투 측정기들 (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.

[0117] 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).

[0118] 안정화제들

[0119] 일정 구현예들에서, 제형물들은 단백질을 보호하도록 안정화제 또는 동결 보호제 (lyoprotectant)를 포함할 수 있다. 전형적으로, 적합한 안정화제는 당 또는 비-환원 당 및/또는 아미노산이다. 대표적인 당들로는, 이에 제한되는 것은 아니지만 텍스트란, 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.

[0120] 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.

[0121] 충전제들

- [0122] 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.
- [0123] 표면활성제들
- [0124] 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; 로틸-, 미리스틸-, 리노레일-, 또는 스테아릴-설포베타인 (sulfobetaine); 미리스틸-, 리노레일-, 또는 스테아릴-사르코신 (sarcosine); 리노레일-, 미리스틸-, 또는 세틸-베타인; 라우로아미도프로필 (lauroamidopropyl)-, 코코아미도프로필 (cocamidopropyl)-, 리노레아미도프로필 (linoleamidopropyl)-, 미리스타미도프로필 (myristamidopropyl)-, 팔미도프로필 (palmidopropyl)-, 또는 이소스테아르아미도프로필 (isostearamidopropyl)-베타인 (예로, 라우로아미도프로필); 미리스타미도프로필-, 팔미도프로필-, 또는 이소스테아르아미도프로필-디메틸아민; 소듐 메틸 코코일-, 또는 디소듐 메틸 오페일-타우레이트; 또한 MONAQUAT<sup>TM</sup> 시리즈 (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.), 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필 글리콜, 폴리에틸 글리콜, 폴리프로필 글리콜 및 에틸렌 및 프로필렌 글리콜의 공중합체들 (예로, 플루로닉스 (Pluronic), 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.
- [0125] 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.
- [0126] 본 발명에
- [0127] 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.
- [0128] 일반적으로, (동결건조된 또는 수성의) 제형물들은 상온에서 연장된 기간들 동안 보관될 수 있다. 보관 온도는 전형적으로 0 °C로부터 45 °C까지의 범위 (예로, 4°C, 20 °C, 25 °C, 45 °C 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.
- [0129] 제형물들은 운반 단계들을 없애려고 재구성 관 (reconstitution vessel)로서도 역시 기능할 수 있는 동결건조



용기에 직접 보관될 수 있다. 임의적으로, 동결건조된 제품 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.

[0130] 동결건조

[0131] 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.

[0132] 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 freeze-drying processes for pharmaceuticals: Practical advice," *Pharm. Res.*, 21:191-200; Nail S.L. et al. (2002) "Fundamentals of freeze-drying," in *Development and manufacture of protein pharmaceuticals*. Nail S.L. editor New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp 281-353; Wang et al. (2000) "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals," *Int. J. Pharm.*, 203:1-60; Williams N.A. et al. (1984) "The lyophilization of pharmaceuticals; A literature review." *J. Parenteral Sci. Technol.*, 38:48-59을 참고하라. 일반적으로, 동결건조 공정이라면 모두가 본 발명과 연결하여 사용될 수 있다.

[0133] 일정 구현예들에서, 아닐링 (annealing) 단계가 산물의 초기 냉동기간 동안 도입될 수 있다. 아닐링 단계는 전반적인 순환 시간을 감소시킬 수 있다. 이론이라면 모두에 집착하려고 앓더라도, 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 °C일 수 있고, 아닐링 단계는 온도를, 예를 들어 -10 °C로 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 °C사이의 범위일 수 있다.

[0134] 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.

[0135] 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 탈성된다. 초기 냉동은 제형물을 전형적으로 단지 약 4시간 (예로, 단지 약 3시간, 단지 약 2.5시간, 단지 약 2시간)에 약 -20 °C (예로, -50 °C, -45 °C, -40 °C, -35 °C, -30 °C, -25 °C 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 20부터 250 mTorr까지 범위의 적합한 압력에서 약 -30부터 25 °C까지 (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 치료제의 유형에 의존하여, 약 0-60°C에서 수행된다. 다시, 액체 부피는 주로 건조에 요구되는 시간을 진술할 것이고, 이는 수 시간부터 여러 날까지의 범위일 수 있다.

[0136] 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

[0137] 것이다.

[0138] 재구성

[0139] 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.

[0140] 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.

[0141] 추가적인 대표적 희석제들로는 pH 완충된 용액 (예로 포스페이트-완충 식염수), 무균 식염수 용액, 엘리어트 용액 (Elliot's solution), 링거액 (Ringer's solution) 또는 텍스트로스 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.

[0142] 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.

[0143] 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 제형물의 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.

[0144] 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.

[0145] 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 동결건조 물질과 접촉할 수 있고 재구성이 본 명세서에서 기술된 바와 같이 일어날 수 있다 (실시예 5 참조).

[0146] 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 리

소증 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.

#### [0147] CNS 전달

[0148] 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.

#### [0149] 경막내 전달

[0150] 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, HNS 단백질)을 CSF 내로 전달하는 데 사용된다. 본 명세서에서 사용되는 바, 경막내 투여 (경막내 주사라고도 함)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 Omay et al., Cancer Drug Delivery, 1: 169-179에 기술되어 있고, 그의 내용들은 본 명세서에서 참고문헌으로 통합되어 있다.

[0151] 본 발명에 따르면, 효소는 척수관을 감싸는 부위라면 모두에 주사될 수 있다. 일정 구현예들에서, 효소는 요추 영역 또는 대수공 내로 또는 대뇌 측실 공간 내에 뇌실내 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 척단 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.

[0152] 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.

#### [0153] 경막내 전달을 위한 장치

[0154] 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 36에 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.

[0155] 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 37A-C).

[0156] 전형적으로 경막내 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.

[0157] 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.

[0158] 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.

[0159] 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.

[0160] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명에 사용되는 약제학적 조성물은 개체의 대수조 또는 요추 영역 내로의 주사에 의해 투여된다.

[0161] 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.

[0162] 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 "지속적인 전달 (sustained delivery)"은 투여에 이어지는 초과기간, 바람직하게 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 추적 과립들의 계속적인 감소량에 의해 확인될 수 있다). 임의적으로, 효소의 지속적인 전달은 초과기간 동안 생체내 효소의 존재를 검출하여 확인될 수 있다.

#### [0163] 표적 조직들로의 전달

[0164] 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, HNS 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 충분한 치료제들 (예로, HNS 효소)을 전달시킨다.

[0165] 따라서, 일정 구현예들에서, 치료적 단백질 (예로, HNS 효소)은 개체의 중추신경계로 전달된다. 일정 구현예들에서, 치료적 단백질 (예로, HNS 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.

[0166] 뇌 표적 조직들

[0167] 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.

[0168] 뇌는 대뇌 (cerebrum), 소뇌 (cerebellum), 및 뇌줄기 (brain stem)를 포함하는 세 가지의 일차 소구분들을 가진다. 대뇌 반구들 (cerebral hemispheres)는 뇌 구조들의 가장 위에 위치하고 피질층 (cortical layer)으로 덮여있다. 뇌줄기는 대뇌가 부착되는 줄기와 유사하고 대뇌 아래에 놓여있다. 뇌의 후반구에는, 소뇌가 대뇌 아래 및 뇌줄기 뒤에 있다.

[0169] 뇌의 중간선 근처에 또한 중뇌 (mesencephalon) 위에 위치하는 간뇌 (diencephalon)는 시상 (thalamus), 시상 후부 (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 peduncles), 적색핵, 및 뇌신경 the red nucleus, III 핵을 포함한다. 중뇌는 시각, 청각, 운동 조절, 수면/기상, 각성 및 온도 조절과 연관되어 있다.

[0170] 뇌를 포함하는 중추신경계의 조직들의 부위들은 조직의 깊이를 기초로 하여 특징지어진다. 예를 들어, CNS (예로, 뇌) 조직들은 표면 또는 얇은 조직들, 중간-깊이 조직들, 및/또는 깊은 조직들로서 특징지어진다.

[0171] 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 얇은 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 얇은 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 mm, 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm, 또는 10 mm 이상의 깊은 뇌 표적 조직으로 전달된다.

[0172] 일정 구현예들에서, 치료제들 (예로, 효소들)은 대뇌의 표면 또는 얇은 조직들의 하나 이상으로 전달된다. 일정 구현예들에서, 대뇌의 표적된 표면 또는 얇은 조직들은 대뇌의 표면으로부터 4 mm 이내에 위치한다. 일정 구현예들에서, 대뇌의 표적된 표면 또는 얇은 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.

[0173] 일정 구현예들에서, 치료제들 (예로, 효소들)은 하나 이상의 대뇌의 깊은 조직들로 전달된다. 일정의 구현예들에서, 표적된 표면 또는 얇은 조직들은 대뇌의 표면 아래로 (또는 내부로) 4 mm (예로, 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm, 또는 10 mm)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.

[0174] 일정 구현예들에서, 치료제들 (예로, 효소들)은 소뇌의 하나 이상의 조직들로 전달된다. 소뇌의 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.

[0175] 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.

- [0176] 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.
- [0177] 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.
- [0178] 척수
- [0179] 일반적으로, 척수의 부위들 또는 조직들은 조직들의 깊이를 기초로 하여 특징지어질 수 있다. 예를 들어, 척수 조직들은 표면 또는 얇은 조직들, 중간-깊이 조직들, 및/또는 깊은 조직들로서 특징지어질 수 있다.
- [0180] 일정 구현예들에서, 치료제들 (예로, 효소들)은 척수의 하나 이상의 표면 또는 얇은 조직들로 전달된다. 일정 구현예들에서, 척수의 표적된 표면 또는 얇은 조직은 척수의 표면으로부터 4 mm 이내에 위치한다. 일정 구현예들에서, 척수의 표적된 표면 또는 얇은 조직은 연질막 및/또는 백색질의 관들을 포함한다.
- [0181] 일정 구현예들에서, 치료제들 (예로, 효소들)은 척수의 하나 이상의 깊은 조직들로 전달된다. 일정 구현예들에서, 척수의 표적된 깊은 조직은 척수의 표면으로부터 4 mm 내부에 위치한다. 일정 구현예들에서, 척수의 표적된 깊은 조직은 척수 회색질 및/또는 뇌실막 세포들을 포함한다.
- [0182] 일정 구현예들에서, 치료제들 (예로, 효소들)은 척수의 뉴런들로 전달된다.
- [0183] 말초 표적 조직들
- [0184] 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 구현예들에서, 본 발명에 따른 치료적 단백질 (예로, 대체 효소)는 하나 이상의 말초 표적 조직들로 전달된다.
- [0185] 생체분배 및 생물 유용성
- [0186] 다양한 구현예들에서, 일단 표적 조직으로 전달되면 치료제 (예로, HNS 효소)는 세포내에 정착된다. 예를 들어, 치료제 (예로, 효소)는 표적 세포 (예로, 퍼킨지 세포들과 같은 뉴런들)의 엑손들, 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 중추신경계의 심부 조직들 내로 경막내-투여된 단백질들 또는 효소들의 분배에 기여하거나 다른 경우라면 이를 용이하게 할 수 있다.
- [0187] 일정 구현예들에서, 본 발명에 따라 전달된 치료제 (예로, HNS 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.
- [0188] 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.

[0189] 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.

[0190] 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 이어서 12시간, 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 보유했을 수 있다. 검출가능한 수준 또는 활성은 당해 기술분야에 알려져 있는 다양한 방법들을 사용하여 결정될 수 있다.

[0191] 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 적어도 0.5ug/ml의 농도를 달성하고 있다.

#### [0192] 산필리포 A형 증후군 및 다른 리소좀 축적병들의 치료

[0193] 리소좀 축적병은 리소좀 기능에서의 결함들로부터 발생하는 비교적 희귀한 유전되는 대사 장애들의 그룹을 대표한다. 리소좀 질환들은 리소좀들 내에 이들 효소 기질들을 포함하는 미소화된 (undigested) 거대분자들의 축적을 특징으로 하고 (표 1 참조), 이는 이러한 리소좀들의 크기 및 숫자에서 증가를 또한 궁극적으로 세포성 기능 이상 및 임상적 이상들을 가져온다.

[0194] 유익하게, 본 명세서에서 기술된 발명적 방법들은 표적된 소기관들에게서 하나 이상의 치료제들 (예로, 하나 이상의 대체 효소들)의 전달을 용이하게 할 수 있다. 예를 들어, 산필리포 증후군 A형과 같은 리소좀 축적병은 침범된 세포들의 리소좀들에서 글리코사미노글리칸 (GAG)의 축적을 특징으로 하고, 리소좀들은 리소좀 축적병들의 치료를 위한 원하는 표적 소기관을 대표한다.

[0195] 상세하게, 본 발명의 발명적 방법들 및 조성물들은 CNS 병인학 또는 성분을 가지는 이들 질환들을 치료하는 데 유용하다. CNS 병인학 또는 성분을 가지는 리소좀 축적병들은 예를 들어 산필리포 증후군 A형, 산필리포 증후군 B형, 헌터 증후군, 이염색성 백색질 장애 및 구형세포 백색질 장애를 포함한다. 본 발명의 이전에, 통상적인 요법들은 개체들에게 정맥내로 투여하는 것에 제한되고, 일반적으로 내제된 효소 결함의 신체 증상들을 치료하는 데만 효과적이다. 유익하게, 본 발명의 조성물들 및 방법들은 이러한 CNS 병인학을 가지는 질환을 앓고 있는 개체의 CNS 내로 직접 투여되고 이에 의해 CNS (예로, 뇌)의 침범된 세포들 및 조직들 내에서 치료적 농도를 달성할 수 있고, 따라서 이러한 치료제들의 통상적인 전신적 투여와 연관된 문제점들을 극복할 수 있다.

[0196] 일정 구현예들에서, 본 발명의 발명적 조성물들은 리소좀 축적병들의 신경적 및 신체적 후유증 또는 증상들 둘 다를 치료하는데 유용하다. 예를 들어, 본 발명의 일정 구현예들은 리소좀 축적병의 CNS 또는 신경적 후유증 및 소견들의 치료를 위해 개체의 CNS에 하나 이상의 치료제들을 (예로, 경막내, 측실내 또는 대수공내로) 전달하는 한편 본 리소좀 축적병의 전신적 또는 신체적 소견들을 치료하는 조성물들 및 방법들에 관한 것이다. 예를 들어, 본 발명의 일정 조성물들은 개체에게 경막내로 투여되고, 이에 의해 개체의 CNS로 치료제들을 전달하고 신경학적 후유증을 치료할 수 있으며, 이러한 치료제들을 전신적 순환의 세포들 및 조직들 (예로, 심장, 폐들, 간, 신장 또는 림프절들의 세포들 및 조직들) 둘 다로 전달하여 신체적 후유증을 치료하도록 하나 이상의 치료제들의 정맥내 투여와 결합될 수 있다. 예를 들어, 리소좀 축적병 (예로, 산필리포 증후군 A형)을 가지거나 이

에 의해 침범된 개체에게 신경학적 후유증을 치료하도록 하나 이상의 치료제들 (예로, HNS)을 포함하는 약제학적 조성물이 적어도 매주, 격주, 매월, 2개월마다 또는 그 이상마다 한 번 투여될 수 있고, 한편 서로 다른 치료제가 개체에게 질환의 전신적 또는 신체적 소견들을 치료하도록 더 빈번하게 (예로, 매일, 격일, 매주 세 번 또는 매주) 정맥내 투여된다.

- [0197] 산필리포 증후군 또는 점액다당류증 제 III형 (MPS III)은 글리코사미노글리칸들 (GAG)의 분해에 관여하는 효소들의 결핍을 특징으로 한다. 효소의 부재 시, 부분적으로 분해된 GAG 분자들은 신체로부터 청소될 수 없고 다양한 조직들의 리소좀들 내에 축적되어, 광범위한 진행성 신체 기능이상을 유발한다 (Neufeld and Muenzer, 2001).
- [0198] MPS IIIA, B, C, 및 D이라고 명명되는 MPS III의 네 가지 구별되는 형태들이 확인되었다. 각각은 GAG 헤파란 설페이트의 분해에 관여하는 네 가지 효소들의 하나에 결핍을 나타낸다. 모든 형태들은 조잡한 얼굴 특징들, 간비장비대 (hepatosplenomegaly), 각막 혼탁 및 골격 변형들을 포함하는 동일한 임상적 증상들의 다양한 정도들을 포함한다. 그러나 더욱 명확하게는, 심각한 진행성 인지능력 상실이고, 이는 뉴런들에서 헤파란 설페이트의 축적뿐만 아니라 일차적인 GAG축적에 의해 초래된 갱글리오사이드들 GM2, GM3 및 GD2의 이어지는 상승과 연관된다 (Walkley 1998).
- [0199] 점액다당류증 제 IIIA형 (MPS IIIA; 산필리포 증후군 A형)은 가장 심한 형태의 산필리포 증후군이고 전세계적으로 인구 100,000명 당 대략 1명이 걸린다. 산필리포 증후군 A형 (SanA)은 글리코사미노글리칸 (GAG) 헤파란 설페이트의 리소좀 이화작용에 관여하는 효소 헤파란 N-설페이트 (HNS)의 결핍을 특징으로 한다 (Neufeld EF, et al. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (2001) pp. 3421-3452). 본 효소의 부재 시, GAG 헤파란 설페이트가 뇌의 외부에는 더 적게 축적되면서 뉴런들 및 아교세포들의 리소좀에 축적된다.
- [0200] 본 장애의 명확한 임상적 특징은 중추신경계 (CNS)의 퇴화이고, 이는 주요 발단 지표들의 소실, 또는 이를 획득하는 데 부전을 유발한다. 진행성 인지 감소는 치매 및 조기 사망으로 이어진다. 전형적으로 질환은 아동들에서 소견을 그대로 나타나고, 침범된 개인의 수명은 일반적으로 십대 후반 내지 이십대 초반을 넘지 못한다.
- [0201] 본 발명의 조성물들 및 방법들은 산필리포 증후군 A형을 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 발병 또는 진행의 예방 또는 지연, 및/또는 질환의 하나 이상 증상들의 중증도 또는 빈도의 감소를 말한다.
- [0202] 일정 구현예들에서, SanA환자에서 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. 예를 들어, 신경학적 손상의 증상들은 발달 지연, 진행성 정신지체, 청력 상실, 손상된 언어 발달, 운동 능력들의 결여, 과다활동, 공격성 및/또는 수면 방해들을 포함할 수 있다.
- [0203] 일정 구현예들에서, 치료는 다양한 조직들에서 감소된 리소좀 축적 (예로, GAG)을 말한다. 일정 구현예들에서, 치료는 뇌 표적 조직들, 척수 뉴런들, 및/또는 말단 표적 조직들에서 감소된 리소좀 축적을 말한다. 소정의 구현예들에서, 리소좀 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, 리소좀 축적은 대조군과 대비하여 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배로 감소된다. 일정 구현예들에서, 리소좀 축적은 리소좀 축적 과립들 (예로, 얼룩무늬 모양)의 존재에 의해 측정된다.
- [0204] 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%, 또는 100% 이상으로 감소된다. 일정 구현예들에서, 공포화는 대조군과 대비하여 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배로 감소된다.
- [0205] 일정 구현예들에서, 치료는 다양한 조직들에서 증가된 HNS 효소 활성을 말한다. 일정 구현예들에서, 치료는 뇌 표적 조직들, 척수 뉴런들 및/또는 말초 표적 조직들에서 증가된 HNS 활성을 말한다. 일정 구현예들에서, HNS 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 증가된다. 일정 구현예들에서, HNS 효소 활성은 대조군과 대비하여 약 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배,



9배 또는 10배 증가된다. 일정 구현예들에서, 증가된 HNS 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, HNS 효소 활성은 요추 부위에서 증가된다. 일정 구현예들에서, 요추 부위에서 증가된 HNS 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.

[0206] 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.

[0207] 일정 구현예들에서, 치료는 증가된 생존 (예로, 생존 시간)을 말한다. 예를 들어, 치료는 환자의 증가된 수명 기대치를 가져올 수 있다. 일정 구현예들에서, 본 발명에 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 발명에 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 발명에 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.

[0208] 본 명세서에서 사용되는 바, 용어들 "개선하다", "증가하다" 또는 "감소하다"는 대조군과 대비한 수치들을 가르킨다. 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 산필리포 증후군 A형을 앓고 있는 개인이다.

[0209] 치료된 개인 ("환자" 또는 "개체"라고도 함)은 산필리포 증후군 A형을 가지거나 산필리포 증후군 A형이 생길 잠재력을 가지는 개인 (태아, 유아, 아동, 청소년, 또는 어른 인간)이다. 개인은 남아있는 내인성 HNS 발현 및/또는 활성을 가지거나, 측정가능한 활성을 전혀 가지지 않을 수 있다. 예를 들어, 산필리포 증후군 A형을 가지는 개인은 정상적인 HNS 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 HNS 발현을 가질 수 있다.

[0210] 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.

#### [0211] 면역 내성

[0212] 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.

[0213] 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.

[0214] 일정 구현예들에서, 치료제들의 경막내 투여는 이들 제제들에 대한 면역 반응을 유발시킬 수 있다. 따라서, 일

정 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.

[0215] 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 et 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.

[0216] 투여

[0217] 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 조건 (예로, 리소좀 축적병)의 본성, 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)로 경막내 투여될 수 있다.

[0218] 일정 구현예들에서, 경막내 투여는 다른 경로들의 투여와 결합하여 사용될 수 있다 (예로, 정맥내, 피하, 근육내, 비경구, 경피적, 또는 경점막 (예로, 경구적 또는 비강내)). 일정 구현예들에서, 이들 다른 경로들의 투여 (예로, 정맥내 투여)는 격주, 매월, 2개월마다 한 번, 3개월마다 한 번, 4개월마다 한 번, 5개월마다 한 번, 6개월마다 한 번, 매년의 투여의 빈도로 수행될 수 있다.

[0219] 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 의미 있는 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.

[0220] 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 용합 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.

[0221] 일정 구현예들에서, 치료적 유효 용량은 약 0.005 mg/kg 너 무게로부터 500 mg/kg 너 무게까지의 범위, 예로, 약 0.005 mg/kg 너 무게로부터 400 mg/kg 너 무게까지, 약 0.005 mg/kg 너 무게로부터 300 mg/kg 너 무게까지, 약 0.005 mg/kg 너 무게로부터 200 mg/kg 너 무게까지, 약 0.005 mg/kg 너 무게로부터 100 mg/kg 너 무게까지, 약 0.005 mg/kg 너 무게로부터 90 mg/kg 너 무게까지, 약 0.005 mg/kg 너 무게로부터 80 mg/kg 너 무게까지, 약 0.005 mg/kg 너 무게로부터 70 mg/kg 너 무게까지, 약 0.005 mg/kg 너 무게로부터 60 mg/kg 너 무게까지, 약 0.005 mg/kg 너 무게로부터 50 mg/kg 너 무게까지, 약 0.005 mg/kg 너 무게로부터 40 mg/kg 너 무게까지, 약 0.005 mg/kg 너 무게로부터 30 mg/kg 너 무게까지, 약 0.005 mg/kg 너 무게로부터 25 mg/kg 너 무게까지, 약 0.005 mg/kg 너 무게로부터 20 mg/kg 너 무게까지, 약 0.005 mg/kg 너 무게로부터 15 mg/kg 너 무게까지, 약 0.005 mg/kg 너 무게로부터 10 mg/kg 너 무게까지의 범위이다.

[0222] 일정 구현예들에서, 치료적 유효 용량은 약 0.1 mg/kg 너 무게 이상, 약 0.5 mg/kg 너 무게 이상, 약 1.0 mg/kg 너 무게 이상, 약 3 mg/kg 너 무게 이상, 약 5 mg/kg 너 무게 이상, 약 10 mg/kg 너 무게 이상, 약 15 mg/kg 너 무게 이상, 약 20 mg/kg 너 무게 이상, 약 30 mg/kg 너 무게 이상, 약 40 mg/kg 너 무게 이상, 약 50 mg/kg 너 무게 이상, 약 60 mg/kg 너 무게 이상, 약 70 mg/kg 너 무게 이상, 약 80 mg/kg 너 무게 이상, 약 90 mg/kg 너 무게 이상, 약 100 mg/kg 너 무게 이상, 약 150 mg/kg 너 무게 이상, 약 200 mg/kg 너 무게 이상, 약 250 mg/kg 너 무게 이상, 약 300 mg/kg 너 무게 이상, 약 350 mg/kg 너 무게 이상, 약 400 mg/kg 너 무게 이상, 약 450 mg/kg 너 무게 이상, 약 500 mg/kg 너 무게 이상이다.

[0223] 일정 구현예들에서, 치료적 유효 용량도 역시 mg/kg 체중으로 정의될 수 있다. 당업자라면 인정할 바와 같이, 너 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, 투여량은 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

[0224]

[0225] 일정 구현예들에서, 치료적 유효 용량은 또한 mg/15 cc CSF로 정의될 수 있다. 당업자라면 인정할 바와 같이, 너 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.

[0226] 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.

#### [0227] 키트들

[0228] 본 발명은 좀 더 나아가 본 발명의 제형물을 포함하는 키트들 또는 기타 다른 제조 물품들을 제공하고 그의 제 구성 (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),

앰플들, 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.

[0229] 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, BWF1, 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.

[0230] 본 발명은 다음의 실시예들을 참조하여 보다 완벽하게 이해될 것이다. 그러나, 그들은 본 발명의 범위를 제한하는 것으로서 해석되지는 않는다. 모든 인용 문헌들은 참고문헌으로 통합되어 있다.

# [0231] 실시예들

## [0232] 실시예 1: HNS 제형물

[0233] 본 실시예에서의 실험들은 경막내 전달을 의도하는 pH, 이온 강도 및 완충액 유형을 포함하는 다양한 제형물 조건들에서 헤파란-N-설패타제 (HNS)의 안정도를 조사하도록 전-제형물 연구의 일부로서 설계되었다.

[0234] 일반적으로 HNS는 그의 천연 상태에서 이량체인 것으로 확인되었다 (Bielicki *et al.*, Journal of Biochemistry, 1998, 329, 145-150). HNS 이량체의 분자량은 115 kDa이다. 전형적으로 HNS는 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 동안 이량체로서 용출된다. SDS-PAGE 젤들 상에서 전개될 때, HNS는 젤 상에 로딩하기 이전에 이것이 단량체 (62 kDa)로서 관찰되는 100℃로 가열되지 않는 경우라면 이량체로서 관찰된다. HNS의 전장 및 성숙한 서열들은 아래 표 6 및 표 7에 각각 나타나 있다. 성숙한 HNS 서열은 5개의 시스테인 잔기들 (밑줄)을 포함하고, 이는 두 개의 내부 설패이드 결합들 및 한 개의 자유 시스테인을 허용할 수 있다. 하기 표 6은 전장의 HNS 서열을 나타낸다. 하기 표 7은 성숙한 HNS (rhHNS)의 서열을 나타낸다.

표 6

MSCPVPACCA	LLLVLGLCRA	RPRNALLLLA	DDGGFESGAY	NNSAIATPHL	DALARRSLLF
RNAFTSVSSC	SPSRASLLTG	LPQHQNMGY	LHQDVHHFNS	FDKVRSLPLL	LSQAGVRTGI
IGKKHVGPE	VYPFDFAYTE	ENGSVLQVGR	NITRIKLLVR	KFLQTQDDRP	FFLYVAFHDP
HRCGHSQPQY	GTFCEKFGNG	ESGMGRIPDW	TPQAYDPLDV	LVPYFVPNTP	AARADLAAQY
TTVGRMDQGV	GLVLQELRDA	GVLNDTLVIF	TSDNGIPFPS	GRTNLYWPGT	AEPLLVSPE
HPKRWGVSE	AYVSLDLTTP	TILDWFSIPY	PSYAFGSKT	IHLTGRSLLP	ALEAEPLWAT
VFGSQSHHEV	TMSYPMRSVQ	HRHFRLVHNL	NFKMPFPIDQ	DFYVSPTFQD	LLNRTTAGQP
TGWYKDLRHY	YYRARWELYD	RSRDPHETQN	LATDPRFAQL	LEMLRDQLAK	WQWETHDPWV
CAPDGVLEEK	LSPQCQPLHN				
EL (서열번호 2)					

[0235]



표 7

RPRNALLLLA	DDGGFESGAY	NNSAIATPHL	DALARRSLLF	RNAFTSVSSC	SPSRASLLTG
LPQHQNMGMYG	LHQDVHHFNS	FDKVRSLPLL	LSQAGVRTGI	IGKKHVGPEP	VYPFDFAYTE
ENGSVLQVGR	NITRIKLLVR	KFLQTQDDRP	FFLYVAFHDP	HRCGHSQPQY	GTFCEKFGNG
ESGMGRIPDW	TPQAYDPLDV	LVPYFVPNTP	AARADLAAQY	TTVGRMDQGV	GLVLQELRDA
GVLNDTLVIF	TSDNGIFPFS	GRTNLYWPGT	AEPLLVSSE	HPKRWGQVSE	AYVSLDLTP
TILDWFSIPY	PSYAIFGSKT	IHLTGRSLLP	ALEAEPLWAT	VFGSQSHHEV	TMSYPMRSVQ
HRHFRLVHNL	NFKMPFPIDQ	DFYVSPTEQD	LLNRRTAGQP	TGWYKDLRHY	YYRARWELYD
RSRDPHETQN	LATDPRFAQL	LEMLRDQLAK	WQWETHDPWV	CAPDGVLEEK	LSPQCQPLHN

EL (서열번호 1)

[0236]

[0237]

본 실시예에서, 다음의 제형물 변수들이 조사되었다: (1) pH, pH 3-8의 시트레이트 제형물들 및 pH 5-8의 포스페이트 제형물들; (2) 완충액, 모두 20 mM 농도로 소듐 시트레이트 완충액 (pH 3.0-8.0) 및 소듐 포스페이트 완충액 (pH 5.0-8.0); 또한 (3) 이온 강도, NaCl (0-300 mM).

[0238]

본 실시예에서 기술된 모든 전-제형물 연구들은 1-2 mg/mL의 낮은 단백질 농도들에서 시행되었다.

[0239]

다양한 압박들 하에서 생성된 제형물 산물들 및 분해 산물들을 분석하기 위하여, SEC-HPLC, SDS-PAGE, 차별 스캐닝 열량측정법 (DSC), 혼탁도 (OD 320) 및 효소 활성 측정법들이 사용되었다.

[0240]

일반적으로, SDS-PAGE 결과들은 낮은 pH (pH 3)에서 제형물의 분절화 (fragmentation)를 보여준 한편 더 높은 pH 제형물들은 거의 분절화를 보여주지 않았다. DSC에 의한 용융 온도의 평가는 시트레이트 및 포스페이트를 포함하는 rhHNS 제형물들이 pH 6-7의 범위에서 가장 큰 열적 안정도를 가지는 점을 보여주었다. 효소적 활성 결과들은 평가된 모든 pH에서 시트레이트를 포함하는 rhHNS 제형물들이 50°C에서 7일 동안 보관 이후에 불활성으로 되는 점을 보여주었다. pH 6-7에서 포스페이트를 포함하는 rhHNS 제형물들은 50°C에서 7일 동안 보관 이후에도 유의한 활성을 유지하였다. 그러나, 고분자량 피크 (SECdp 의해 관찰된 바, "16분 피크")는 본 피크가 동일한 제형물의 별도의 제조물들에서 일관성있게 관찰되지 않았더라도, pH 7-8에서 최대이다.

[0241]

또한 rhHNS 제형물 안정도에 미치는 이온 강도인 0-300 mM NaCl도 평가되었다. 50°C에서 7일 동안의 가속된 안정도 조건들에서 보관된 시료들의 SDS-PAGE는 내부의 로트 대조군 만큼의 분절화를 보여주었다. 시트레이트를 포함하는 rhHNS 제형물들은 이온 강도와는 상관없이 50°C에서 7일 이후에 완전한 활성 소실을 보여주었다. 포스페이트를 포함하는 rhHNS 제형물들은 50-300 mM NaCl에서 유의한 활성을 유지하였다. 그러나 16분 피크는 (SEC에 의해) 50-150 mM NaCl 범위에서 최대이다.

[0242]

방법들

[0243]

rhHNS 안정도에 미치는 pH의 효과

[0244]

rhHNS (10 mM 소듐 포스페이트, 138 mM 염화나트륨, pH 7.0에 녹인 9.2 mg/ml)는 pH 3.0 내지 8.0 범위를 가진 20 mM 소듐 시트레이트 및 pH 6.0 내지 8.0 범위를 가진 20 mM 소듐 포스페이트 내로 투석 (Piece Slide-A-Lyzer, PN# 66383, lot # HK107537)을 사용하여 완충액-교환되었다. 각 교환된 완충액에서 최종 단백질 농도는 2.0 mg/mL을 목표로 하였다. 이들 용액들은 2.0ml 유리 바이알들 (West Pharmaceuticals, Cat#: 6800-0314, lot#: 30809A2001) 내로 0.5 mL씩 각각 분량되었고, 다음으로 50°C, 25°C 및 2-8°C 체임버들에서 배양되었다. 7, 14 및 28일 이후에, 시료들은 응집 (SEC-HPLC), 분절화 (SDS-PAGE), 혼탁도 (OD320) 및 효소적 활성의 분석을 위해 가져왔다.

[0245]

포스페이트 완충액으로 연속적인 pH 연구가 상기와 동일한 절차들에 이어서 반복되었지만, rhHNS 로트번호 SS10이 사용되었다. 처음 포스페이트 연구의 경우 pH 범위가 협소하여, 본 연구는 더 넓은 pH 범위를 도입하도록 반복되었다.

[0246]

OD320

[0247]

rhHNS 시료들의 혼탁도는 OD320 측정들을 수행하여 결정되었다. 시료들은 0.2 cm 길이 (pathlength) 큐벳에 넣은 2 mg/ml로 Molecular Devices SpectraMax Plus 384를 사용하여 측정되었다. 사용된 전체 부피는 각 테스트의 경우 30 ul 이었다.

- [0248] SEC-HPLC
- [0249] rhHNS 의 SEC-HPLC 분석의 경우, 슈퍼텍스 컬럼 200 (10/300 GL, PN: 17-5175-01, GE Healthcare)이 사용되었다. 유동상은 0.5 ml/분의 유동 속도로 전개되는 포스페이트 완충 식염수 (25 mM 소듐 포스페이트, 150 mM 염화나트륨, pH 6)이었다. 주입 부피는 30  $\mu$ l의 1 mg/ml (각 완충용액으로 2 mg/ml으로부터 희석됨)이었다. 각 주입의 전개 시간은 50분, 검출 파장은 214 nm이었다.
- [0250] SDS-PAGE
- [0251] 본 방법은 환원되고 변성시키는 조건들 하에서 rhHNS의 분절화 및 응집을 평가한다. rhHNS 시료들은 SDS 완충액 (최종 농도 = 0.5 mg/ml)과 혼합되었고, DTT가 첨가되었다 (환원된 시료만). 시료들은 100℃로 5분 동안 가열되었다. 5분 이상 동안 끓인 시료들은 rhHNS의 분절화를 가져왔다. 각 레인은 8-16% 구배 아크릴아미드 젤들 (Cat#: EC6045BOX) 상에 10  $\mu$ g의 rhHNS 시료들을 로딩하였다. 젤은 150V로 전개된 다음 젤 코드 블루 (Gel Code Blue) 쿠마시 염색으로 밤샘 (진탕하면서) 배양되었다. 젤들은 스캐닝 이전 1시간 동안 물로 탈염색되었다.
- [0252] 활성 검정
- [0253] rhHNS에 대한 활성 검정법은 두 가지 단계 반응이다. 첫 번째 반응에서, 헤파란-N-설퍼타제는 기질을 탈황시킨다. 좀 더 나아가 가수분해가 두 번째 반응에서 4-MU를 방출하는 알파-글루코시다제 효소의 첨가로 일어나고, 다음으로 이는 측정될 수 있다. rhHNS는 10  $\mu$ g/ml의 최종 검정 농도를 위해 1:210으로 희석되었다. 포스페이트 완충액 pH 연구를 위해, 검정법은 변형되었고 rhHNS ~100  $\mu$ g/mL의 최종 검정 농도를 위해 1:24로 희석되었다.
- [0254] DSC
- [0255] 차별 스캐닝 열량측정법 (Differential scanning calorimetry, DSC) 측정들이 미세열량측정기 (Microcalorimeter) 장치 (MicroCal VP-DSC) 상에서 시행되었다. 테스트된 rhHNS 시료들은 0.5 mg/ml이었다. 온도는 10℃로 평형화된 다음 분당 1℃로 100℃까지 상승시켰다.
- [0256] HNS 안정도에 미치는 이온 강도 효과
- [0257] rhHNS는 0-300 mM 범위의 염화나트륨을 가진 pH 6.0의 20 mM 소듐 시트레이트 또한 0-300 mM 범위의 염화나트륨을 가진 pH 7.0의 20 mM 소듐 포스페이트 내로 투석 (Piece Slide-A-Lyzer, PN# 66383, lot # HK107537)을 사용하여 완충액-교환되었다. 각 교환된 완충액에서 최종 단백질 농도는 2.0 mg/mL을 목표로 하였다. 이들 용액들은 2.0ml 유리 바이알들 (West Pharmaceuticals, Cat#: 6800-0314, lot#: 30809A2001) 내로 0.5 mL씩 각각 분량되었고, 다음으로 50℃, 25℃ 및 2-8℃ 체임버들에서 배양되었다. 7, 14 및 28일 이후에, 시료들은 응집 (SEC-HPLC), 분절화 (SDS-PAGE), 혼탁도 (OD320) 및 효소적 활성의 분석을 위해 가져왔다.
- [0258] 결과들
- [0259] *HNS 안정도에 미치는 pH 효과*
- [0260] OD320 및 외양 관찰
- [0261] 혼탁도를 측정하는 OD 320 수치들의 결과들은 하기 표 8에 나타나 있다. pH 7로 포스페이트 또는 pH 3-6로 시트레이트를 포함하는 rhHNS 제형물들의 가속된 안정도 조건들 하에서 유의한 혼탁도의 변화는 전혀 없었다. 그러나, 포스페이트 및 시트레이트 제형물들 둘 다에서 pH 8.0로 시료들 또한 pH 7.0로 시트레이트는 50℃ 에서 7일 이후에 증가된 혼탁도를 보여주었다. 형태 검토했는 광상자 (light box) 하에서 (M.W. Technologies, INC, Model #: MIH-DX) 수행되었고, 모든 제형물은 분명하고 무색이며 가시적 미립자가 없는 것으로 관찰되었다. 하기 표 8은 pH 연구의 OD320 요약을 나타낸다.

표 8

보관 조건	제형물	OD 320
ILC	2mg/ml HNS 20mM Citrate, pH 3.0	0.005
50°C 7 일	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 3.0	0.006
25°C 14 일	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 3.0	0.007
5°C 28 일	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 3.0	0.003
ILC	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 4.0	0.002
50°C 7 일	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 4.0	0.006
25°C 14 일	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 4.0	0.009
5°C 28 일	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 4.0	0.000
ILC	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 5.0	0.002
50°C 7 일	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 5.0	0.004
25°C 14 일	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 5.0	0.004
5°C 28 일	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 5.0	0.004
ILC	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 6.0	0.000
50°C 7 일	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 6.0	0.002
25°C 14 일	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 6.0	0.001
5°C 28 일	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 6.0	0.000
ILC	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 7.0	0.001
50°C 7 일	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 7.0	0.017
25°C 14 일	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 7.0	0.002
5°C 28 일	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 7.0	-0.001
ILC	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 8.0	0.000
50°C 7 일	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 8.0	0.018
25°C 14 일	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 8.0	0.002
5°C 28 일	2mg/ml HNS 20mM 시트레이트, pH 8.0	-0.001
ILC	2mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 7.0	0.000
50°C 7 일	2mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 7.0	0.005
25°C 14 일	2mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 7.0	0.000
5°C 28 일	2mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 7.0	0.001
ILC	2mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 8.0	0.002
50°C 7 일	2mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 8.0	0.023
25°C 14 일	2mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 8.0	0.002
5°C 28 일	2mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 8.0	0.001

[0262]

[0263]

SEC-HPLC

[0264]

rhHNS의 SEC 용출 프로파일들의 대표적인 크로마토그램들이 도 1A-1C에 나타나 있다. 기저선 시료는 주로 보유 시간 ~22 분, ~26 분, 및 ~32 분을 각각 포함한다. 때로는, 이것이 ~34 분에서도 역시 피크를 가진다. ~26 분에 서의 주요한 피크는 SEC-LS에 의해 이량체로서 검증되었다. 다른 피크들의 성질들은 미지이다.

[0265]

첫 번째 pH 연구로부터 얻은 SEC 데이터는 하기 표 9에 요약되어 있다. 전반적으로, 모든 제형물들은 필수적으로 압박 조건들 (50°C) 뿐만 아니라 가속 (25°C) 및 실시간 보관 조건 (2-8°C) 하에서 거의 변화가 없었다. 그러나, 50°C에서 7일 이후에 pH 6-8으로 시트레이트 또는 포스페이트를 포함하는 rhHNS 제형물들은 보유시간 16 분을 가지는 고분자량 피크를 생성하였다. pH 7.0 포스페이트를 포함하는 rhHNS 제형물에서, 16분 피크는 전체 영역의 ~2%를 차지한다. 그러나, 이온 강도에서 제조된 동일한 제형물은 약 0.1%만을 포함하였다. 하기 표 9는

pH 연구로부터 얻은 SEC-HPLC 데이터 요약을 나타낸다.

표 9

보관 조건	제형물 기재	% 16 분 피크	% 이량체
ILC	20 mM 시트레이트 pH 3.0	0	99.8
7 일 50°C	20 mM 시트레이트 pH 3.0	0	99.9
14 일 25°C	20 mM 시트레이트 pH 3.0	0	99.7
1 개월 5°C	20 mM 시트레이트 pH 3.0	0	99.7
ILC	20 mM 시트레이트 pH 4.0	0	99.8
7 일 50°C	20 mM 시트레이트 pH 4.0	0	99.8
14 일 25°C	20 mM 시트레이트 pH 4.0	0	99.6
1 개월 5°C	20 mM 시트레이트 pH 4.0	0	99.5
ILC	20 mM 시트레이트 pH 5.0	0	99.8
7 일 50°C	20 mM 시트레이트 pH 5.0	0	99.8
14 일 25°C	20 mM 시트레이트 pH 5.0	0	99.6
1 개월 5°C	20 mM 시트레이트 pH 5.0	0	99.5
ILC	20 mM 시트레이트 pH 6.0	0	99.8
7 일 50°C	20 mM 시트레이트 pH 6.0	0.3	99.0
14 일 25°C	20 mM 시트레이트 pH 6.0	0	99.6
1 개월 5°C	20 mM 시트레이트 pH 6.0	0	99.3
ILC	20 mM 시트레이트 pH 7.0	0	99.8
7 일 50°C	20 mM 시트레이트 pH 7.0	0.9	98.6
14 일 25°C	20 mM 시트레이트 pH 7.0	0	99.6
1 개월 5°C	20 mM 시트레이트 pH 7.0	0	99.2
ILC	20 mM 시트레이트 pH 8.0	0	99.8
7 일 50°C	20 mM 시트레이트 pH 8.0	0.5	98.7
14 일 25°C	20 mM 시트레이트 pH 8.0	0	99.6
1 개월 5°C	20 mM 시트레이트 pH 8.0	0	99.4
ILC	20 mM 포스페이트 pH 7.0	0	99.8
7 일 50°C	20 mM 포스페이트 pH 7.0	2.0	97.2
14 일 25°C	20 mM 포스페이트 pH 7.0	0	99.6
1 개월 5°C	20 mM 포스페이트 pH 7.0	0	99.5

[0266]

ILC	20 mM 포스페이트 pH 8.0	0	99.8
7 일 50°C	20 mM 포스페이트 pH 8.0	1.0	98.8
14 일 25°C	20 mM 포스페이트 pH 8.0	0	99.7
1 개월 5°C	20 mM 포스페이트 pH 8.0	0	99.4

[0267]

[0268]

본 현상을 확인하기 위하여, 포스페이트 완충액에서 pH 연구가 더 넓은 pHs 범위에서 반복되었고 SEC 데이터는 하기 표 10에 정리되어 있다. 본 연구에서, 16분 피크는 50°C에서 7일 이후에 pH 5에서는 존재하지 않았지만, pH 6-8의 제형물들에서는 존재하였으며, 이는 pH가 증가하면서 증가하였다. 폴리솔베이트 20 (0.05%)의 첨가는 16분 피크의 크기에 유의하게 영향을 주지 않았다. 흥미롭게도, pH 5 제형물은 안정도 시료들에서 본 피크를 포함하지 않았더라도, 식염수 용액으로부터 pH 5 내로 투석을 준비하는 동안에 유의한 양의 rhHNS가 침전되었다. 하기 표 10은 반복 포스페이트 완충액 pH 연구로부터 SEC-HPLC 데이터 요약을 나타낸 것이다.

표 10

보관 조건	제형물 기재	% 16 분 피크	% 이량체
5°C 7 일	2 mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 5.0	0.0	98.4
50°C 7 일	2 mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 5.0	0.0	99.3
5°C 7 일	2 mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 6.0	0.0	99.0
50°C 7 일	2 mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 6.0	0.2	99.1
5°C 7 일	2 mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 7.0	0.0	98.8
50°C 7 일	2 mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 7.0	0.6	98.8
5°C 7 일	2 mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 7.0, 0.05% 폴리솔베이트 20	0.0	98.9
50°C 7 일	2 mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 7.0, 0.05% 폴리솔베이트 20	0.8	98.0
5°C 7 일	2 mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 8.0	0.0	99.1
50°C 7 일	2 mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 8.0	1.6	97.6

[0269]

[0270]

예비적인 특성분석 결과들은 16분 피크가, 측정되었을 때 rhHNS 이량체 피크의 스펙트럼과 잘 겹치는 단백질의 스펙트럼 표시자를 가지는 점을 입증하였다 (도 1D). SEC-LS에 의해 조사되었을 때, 16분 피크는 외관상 분자량 > 1 MDa를 나타낸다. 좀 더 나아간 특성분석이 본 피크의 성질을 이해하는 데 필요할 수 있다.

[0271]

#### 효소 활성

[0272]

첫 번째 pH 연구로부터 얻은 활성 데이터 요약은 하기 표 5에 나타나 있다. 50°C, 7일 동안의 가속된 안정도 조건들 하에서, rhHNS는 모든 pH 3-8 시트레이트 포함 제형물들에서 효소적 활성을 상실한 한편, pH 7-8 포스페이트를 포함하는 rhHNS 제형물들은 활성을 보유한다. 25°C 및 5°C에서, 시트레이트 및 포스페이트 완충액들 둘다에 있는 모든 rhHNS 제형물들은 대부분의 활성을 보유한다. pH 3.0의 시트레이트를 포함하는 rhHNS 제형물들은 전반적으로 더 낮은 활성 수치들을 가지는 것으로 보인다. 포스페이트에서의 반복 pH 연구로부터 얻은 활성 데이터는 표 11 및 12에 정리되어 있다. pH 5-7의 모든 rhHNS 제형물들은, pH 8.0의 rhHNS 제형물들이 65% 활성을 상실하였던 예외에도 50°C, 에서 7일 이후에도 84-100%의 효소 활성을 보유한다. 하기 표 11은 첫 번째 pH 연구로부터 얻은 활성 요약이다. 하기 표 12는 반복 pH 연구로부터 얻은 활성 요약을 나타낸다.



표 11

보관 조건	제형물 기재	활성 nmol/mg/hr
ILC	20 mM 시트레이트 pH 3.0	639
7 일 50°C	20 mM 시트레이트 pH 3.0	29
14 일 25°C	20 mM 시트레이트 pH 3.0	920
1 개월 5°C	20 mM 시트레이트 pH 3.0	794
ILC	20 mM 시트레이트 pH 4.0	2178
7 일 50°C	20 mM 시트레이트 pH 4.0	43
14 일 25°C	20 mM 시트레이트 pH 4.0	1998
1 개월 5°C	20 mM 시트레이트 pH 4.0	2123
ILC	20 mM 시트레이트 pH 5.0	1901
7 일 50°C	20 mM 시트레이트 pH 5.0	72
14 일 25°C	20 mM 시트레이트 pH 5.0	1779
1 개월 5°C	20 mM 시트레이트 pH 5.0	2194
ILC	20 mM 시트레이트 pH 6.0	2316
7 일 50°C	20 mM 시트레이트 pH 6.0	80
14 일 25°C	20 mM 시트레이트 pH 6.0	2026
1 개월 5°C	20 mM 시트레이트 pH 6.0	2122
ILC	20 mM 시트레이트 pH 7.0	2312
7 일 50°C	20 mM 시트레이트 pH 7.0	115
14 일 25°C	20 mM 시트레이트 pH 7.0	2009
1 개월 5°C	20 mM 시트레이트 pH 7.0	2205
ILC	20 mM 시트레이트 pH 8.0	2221
7 일 50°C	20 mM 시트레이트 pH 8.0	44
14 일 25°C	20 mM 시트레이트 pH 8.0	2071
1 개월 5°C	20 mM 시트레이트 pH 8.0	2505
ILC	20 mM 포스페이트 pH 7.0	640
7 일 50°C	20 mM 포스페이트 pH 7.0	1200
14 일 25°C	20 mM 포스페이트 pH 7.0	1749
1 개월 5°C	20 mM 포스페이트 pH 7.0	1391
ILC	20 mM 포스페이트 pH 8.0	1451
7 일 50°C	20 mM 포스페이트 pH 8.0	1125
14 일 25°C	20 mM 포스페이트 pH 8.0	1620
1 개월 5°C	20 mM 포스페이트 pH 8.0	1492

[0273]

표 12

pH 연구로부터 얻은 HNS 제형물들의 SDS-PAGE 젤들

보관 조건	제형물 기재	활성 nmol/mg/hr
°C 7 일	2 mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 5.0	4201
50°C 7 일	2 mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 5.0	3952
5°C 7 일	2 mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 6.0	3923
50°C 7 일	2 mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 6.0	4131
5°C 7 일	2 mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 7.0	4107
50°C 7 일	2 mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 7.0	3841
5°C 7 일	2 mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 7.0, 0.05% 폴리솔베이트 20	4952
50°C 7 일	2 mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 7.0, 0.05% 폴리솔베이트 20	4173
5°C 7 일	2 mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 8.0	4729
50°C 7 일	2 mg/ml HNS 20mM 포스페이트, pH 8.0	1590

[0274]

[0275]

대표적인 SDS-PAGE 젤들은 도 2 및 도 3에 나타나 있다. pH 연구로부터 나온 환원된 젤들은 도2에 나타내고 pH 3에서 시트레이트를 포함하는 제형물에서 분절화 밴드들을 보여준다. pH 4-8의 기타 모든 제형물들은 유사하였고, 40°C에서 7일 이후에 pH 8.0에서 관찰되는 일정 고분자량 응집체들을 제외하고는 ~60 kDa에서 유일한 주요 (단량체) 밴드를 보여준다. 도 3은 pH 연구로부터 얻은 비-환원 젤들을 보여준다. 다시 분절화는 pH 3 시트레이트를 포함하는 rhHNS 제형물로는 관찰될 수 없었다.

[0276]

이들 결과들을 기초로 하여, 자연 그대로의 rhHNS 이량체는 환원제의 분재 또는 부재가 주요한 밴드의 위치에 영향을 주지 않기 때문에 주로 비-공유적으로 결합된다. 그러나, 희미한 125 kDa 이량체 밴드가 주로 비-환원된 시료들에서 존재하였고, 이는 본 밴드가 공유적으로 결합된 비-자연적인 이량체라는 점을 제시하고 있다. 비-자연적인 이량체 밴드는 ILC 및 25 °C 시료들에서 40 °C 시료들보다 더 현저하였다.

[0277]

pH 연구로부터 얻은 DSC 데이터

[0278]

도 4는 DSC에 의해 결정된 바와 같이 시트레이트의 pH 의존성 열적 안정도를 나타낸다. 시트레이트에서 rhHNS의 최고 용융 온도는 pH 6.0에서 90 °C이었다. 포스페이트를 포함하는 rhHNS 제형물들은 pH 6-7에서 최대의 열적 안정도를 보여주었다. rhHNS의 용융 온도는 조사된 모든 pH에서 70 °C를 초과하였다.

[0279]

rhHNS 안정도에 미치는 이온 강도 효과

[0280]

혼탁도 및 외양 관찰

[0281]

OD 320 수치들의 결과들은 하기 표 13에 나타나 있다. 시간에 따른 시료들의 혼탁도에서 변화 및 수치들에서 온도 의존성 변화는 전혀 관찰되지 않았다. 시료들의 외양은 각 시간대에 변화 없이 그대로 남아있었다. 모든 시료들은 분명하고 무색이며 가시적 미립자가 없는 것으로 관찰되었다. 하기 표 13은 이온 효과의 OD320를 나타낸다.

표 13

시료	제형물	OD 320
ILC	10 mM 시트레이트 pH 6.0	0.001
50°C 7 일	10 mM 시트레이트 pH 6.0	0.006
25°C 14 일	10 mM 시트레이트 pH 6.0	0.005
5°C 28 일	10 mM 시트레이트 pH 6.0	0.003
ILC	10 mM 시트레이트 pH 6.0 100 mM NaCl	0.002
50°C 7 일	10 mM 시트레이트 pH 6.0 100 mM NaCl	0.009
25°C 14 일	10 mM 시트레이트 pH 6.0 100 mM NaCl	0.004
5°C 28 일	10 mM 시트레이트 pH 6.0 100 mM NaCl	0.001
ILC	10 mM 시트레이트 pH 6.0 150mM NaCl	0.001
50°C 7 일	10 mM 시트레이트 pH 6.0 150mM NaCl	0.007
25°C 14 일	10 mM 시트레이트 pH 6.0 150mM NaCl	0.003
5°C 28 일	10 mM 시트레이트 pH 6.0 150mM NaCl	0.001
ILC	10 mM 시트레이트 pH 6.0 300mM NaCl	0.001
50°C 7 일	10 mM 시트레이트 pH 6.0 300mM NaCl	0.006
25°C 14 일	10 mM 시트레이트 pH 6.0 300mM NaCl	0.006
5°C 28 일	10 mM 시트레이트 pH 6.0 300mM NaCl	0.003
ILC	10 mM 포스페이트 pH 7.0	0.002
50°C 7 일	10 mM 포스페이트 pH 7.0	0.009
25°C 14 일	10 mM 포스페이트 pH 7.0	0.005
5°C 28 일	10 mM 포스페이트 pH 7.0	0.002
ILC	10 mM 포스페이트 pH 7.0 50mM NaCl	0.001
50°C 7 일	10 mM 포스페이트 pH 7.0 50mM NaCl	0.009
25°C 14 일	10 mM 포스페이트 pH 7.0 50mM NaCl	0.003
5°C 28 일	10 mM 포스페이트 pH 7.0 50mM NaCl	0.002
ILC	10 mM 포스페이트 pH 7.0 100mM NaCl	0.002
50°C 7 일	10 mM 포스페이트 pH 7.0 100mM NaCl	0.009
25°C 14 일	10 mM 포스페이트 pH 7.0 100mM NaCl	0.004
5°C 28 일	10 mM 포스페이트 pH 7.0 100mM NaCl	0.002
ILC	10 mM 포스페이트 pH 7.0 150mM NaCl	0.002
50°C 7 일	10 mM 포스페이트 pH 7.0 150mM NaCl	0.004

[0282]

25°C 14 일	10 mM 포스페이트 pH 7.0 150mM NaCl	0.002
5°C 28 일	10 mM 포스페이트 pH 7.0 150mM NaCl	0.001
ILC	10 mM 포스페이트 pH 7.0 300mM NaCl	0.002
50°C 7 일	10 mM 포스페이트 pH 7.0 300mM NaCl	0.010
25°C 14 일	10 mM 포스페이트 pH 7.0 300mM NaCl	0.005
5°C 28 일	10 mM 포스페이트 pH 7.0 300mM NaCl	0.003

[0283]

[0284]

# SEC-HPLC

[0285]

표 14는 이온 효과 연구로부터 얻은 SEC-HPLC 데이터 요약을 나타낸다. 50°C에서 7일 이후에, 모든 제형물들은 16분 피크를 제외하고 거의 변화가 없었다. 시트레이트 완충액에서, 16분 피크 영역의 백분율은 NaCl 수준으로 특정한 증가 또는 감소하는 경향이 전혀 없이 0.1 및 0.3 % 사이의 범위이었다. 그러나, 포스페이트 완충액에서는 50부터 150 mM까지의 이온 강도들의 경우 16분 피크 백분율에서 ~ 0.5 % 로의 증가가 있었다. 더 낮고 더 높은 이온 강도들에서는, 16분 피크가 ~ 0.1%로 감소되었다. 하기 표 14는 이온 강도 효과의 SEC-HPLC 데이터 요약을 나타낸다.

표 14

보관 조건	제형물 기재	%16 분 피크	% 이량체
ILC	시트레이트 pH 6.0	0	99.3
7 일 50°C	시트레이트 pH 6.0	0.24	99.2
14 일 25°C	시트레이트 pH 6.0	0	99.4
1 개월 5°C	시트레이트 pH 6.0	0	99.5
ILC	시트레이트 pH 6.0 100mM NaCl	0	99.3
7 일 50°C	시트레이트 pH 6.0 100mM NaCl	0.10	99.3
14 일 25°C	시트레이트 pH 6.0 100mM NaCl	0	99.1
1 개월 5°C	시트레이트 pH 6.0 100mM NaCl	0	99.4
ILC	시트레이트 pH 6.0 150mM NaCl	0	99.8
7 일 50°C	시트레이트 pH 6.0 150mM NaCl	0.22	99.5
14 일 25°C	시트레이트 pH 6.0 150mM NaCl	0	99.2
1 개월 5°C	시트레이트 pH 6.0 150mM NaCl	0	99.5
ILC	시트레이트 pH 6.0 300 mM NaCl	0	99.5
7 일 50°C	시트레이트 pH 6.0 300 mM NaCl	0.04	99.6
14 일 25°C	시트레이트 pH 6.0 300 mM NaCl	0	99.4
1 개월 5°C	시트레이트 pH 6.0 300 mM NaCl	0	99.3
ILC	포스페이트 pH 7.0	0	99.3
7 일 50°C	포스페이트 pH 7.0	0.11	99.1
14 일 25°C	포스페이트 pH 7.0	0	99.2
1 개월 5°C	포스페이트 pH 7.0	0	99.4
ILC	포스페이트 pH 7.0 50mM NaCl	0	99.4
7 일 50°C	포스페이트 pH 7.0 50mM NaCl	0.57	98.9
14 일 25°C	포스페이트 pH 7.0 50mM NaCl	0	99.3
1 개월 5°C	포스페이트 pH 7.0 50mM NaCl	0	99.5

[0286]

ILC	포스페이트 pH 7.0 100mM NaCl	0	99.3
7 일 50°C	포스페이트 pH 7.0 100mM NaCl	0.53	98.9
14 일 25°C	포스페이트 pH 7.0 100mM NaCl	0	99.2
1 개월 5°C	포스페이트 pH 7.0 100mM NaCl	0	99.3
ILC	포스페이트 pH 7.0 150mM NaCl	0	99.4
7 일 50°C	포스페이트 pH 7.0 150mM NaCl	0.52	98.9
14 일 25°C	포스페이트 pH 7.0 150mM NaCl	0	99.2
1 개월 5°C	포스페이트 pH 7.0 150mM NaCl	0	99.4
ILC	포스페이트 pH 7.0 300mM NaCl	0	99.4
7 일 50°C	포스페이트 pH 7.0 300mM NaCl	0.06	99.3
14 일 25°C	포스페이트 pH 7.0 300mM NaCl	0	99.3
1 개월 5°C	포스페이트 pH 7.0 300mM NaCl	0	99.1

[0287]

[0288]

#### 효소 활성

[0289]

표 15는 50°C, 7일 동안의 가속된 조건들 하에서, rhHNS 안정도에 미치는 이온 효과의 활성 데이터 요약을 나타낸다. 시트레이트를 포함하는 rhHNS 제형물들은 가속된 조건들 하에서 이온 강도와는 상관없이 단지 8-30% 활성만을 보유하였다. 0-300 mM NaCl 를 가지는 포스페이트를 포함하는 rhHNS 제형물들은 모든 가속된 조건들 하에서 45-70%로 보유된 전반적인 더 높은 활성을 보여주었다. 하기 표 15는 이온 강도 효과 연구의 활성 요약을 나타낸다.

표 15

보관 온도	제형물 기재	활성 nmol/mg/hr
ILC	시트레이트 pH 6.0	1725
7 일 50°C	시트레이트 pH 6.0	144
ILC	시트레이트 pH 6.0 100mM NaCl	1715
7 일 50°C	시트레이트 pH 6.0 100mM NaCl	303
ILC	시트레이트 pH 6.0 150mM NaCl	1475
7 일 50°C	시트레이트 pH 6.0 150mM NaCl	250
ILC	시트레이트 pH 6.0 300 mM NaCl	2059
7 일 50°C	시트레이트 pH 6.0 300 mM NaCl	619
ILC	포스페이트 pH 7.0	1661
7 일 50°C	포스페이트 pH 7.0	766
ILC	포스페이트 pH 7.0 50mM NaCl	1441
7 일 50°C	포스페이트 pH 7.0 50mM NaCl	784
ILC	포스페이트 pH 7.0 100mM NaCl	1290
7 일 50°C	포스페이트 pH 7.0 100mM NaCl	875
ILC	포스페이트 pH 7.0 150mM NaCl	1297
7 일 50°C	포스페이트 pH 7.0 150mM NaCl	839
ILC	포스페이트 pH 7.0 300mM NaCl	1338
7 일 50°C	포스페이트 pH 7.0 300mM NaCl	693

[0290]

[0291]

SDS-PAGE

[0292]

도 6은 50°C에서 7일 이후에 이온 효과 연구로부터 나온 rhHNS 제형물들의 은 염색된 SDS-PAGE 젤들을 나타낸다. 이들 젤들은 10분 동안 끌려진 시료들을 사용하여 전개되었고, 따라서 젤들 상에서 관찰되는 분절화는 연속적인 연구들에서 rhHNS를 5분 동안 끓였을 때 관찰되지 않았기 때문에 10분 가열으로 인할 수 있다.

[0293]

0-300 mM NaCl 를 가진 시트레이트 제형물들 및 0-300 mM NaCl 를 가진 포스페이트 제형물들은 모두 60 kDa에서 주요 단량체 밴드를 보여주었다. rhHNS 제형물의 내부적 로트 대조군들 (-80°C에서 보관됨)은 50°C에서 7일 동안 보유된 시료들보다 더욱 현저한 단편 밴드를 보여주는 것으로 관찰되었다. 전반적으로, 이온 강도는 SDS 젤들 상에서 밴드 양상에 영향을 주지 않았다.

[0294]

결론들

[0295]

본 연구들로부터 나온 결과들은 제형물 검색을 위한 일차적 안정도를 표시하는 검정법들은 효소적 활성 및 HPLC-SEC인 점을 보여준다. DSC 데이터는 rhHNS가 pH 6-7에서 ~90°C의 T<sub>m</sub>값으로 최대의 열적 안정도를 가지는 점을 보여주었다. 시트레이트 완충액들에서 rhHNS는 모든 pH 및 이온 강도로 가속된 조건들 하에서 유의한 활성의 상실을 보여주었고, 이는 시트레이트가 허용가능하지 않는 제형물 완충액인 점을 제시하고 있다. 포스페이트의 경우 결과들은 상당히 더 좋았고 pH 6-7의 가속된 조건들 하에서 최대의 활성을 보유하였다. 또한, 100-150 mM NaCl을 포함하는 포스페이트 제형물들은 가속된 조건들 하에서 최대의 활성 보유를 보여주었다. 그러나, SEC-HPLC에서 고분자량 (16분) 피크는 가속된 조건들 하 pH 6-8에서 또한 50-150 mM의 이온 강도에서 최대이다.

[0296]

추가적인 제형물 실험들이 16분 피크의 원인들을 더 잘 이해하도록 진행되고 있다. 또한, 포스페이트 제형물들의 안정도를 미-완충 식염수 제형물들과 비교, 또한 단백질의 저농도 대비 고농도의 안정도와 비교하도록 연구들이 진행되고 있다.

[0297]

실시예 2. RHNS을 위한 액상 제형물

[0298]

본 실시예에서 실험들은 경막내 전달을 의도하는 rhHNS 제형물들의 용해도를 최적화하도록 설계되었다. 본 명세



서에서 기술된 바와 같이, 경막내 약물 전달은 적은 양의 주사될 액체 부피를 요구하고, 결과적으로 매우 농축된 단백질 용액이 필요하다. 그러나, rhHNS는 전형적으로 5.1부터 6.5까지의 등전점 범위를 가지는 비균질한 전하 프로파일을 가지고, 이는 그의 용해도에 영향을 준다. 본 실시예에서의 연구들은 rhHNS 산물의 용해도에 미치는 pH 및 염화나트륨 농도의 효과에 관한 정보를 제공한다.

[0299] 도 7에서 관찰될 수 있는 바와 같이, 증가하는 pH 및 염 농도 (예로, 염화나트륨)은 증가된 rhHNS 용해도를 유도하였다. rhHNS의 자연 그대로의 상태가 다양한 염 농도 (145 mM 또는 300 mM)로 제형화된 rhHNS의 분석적 초원심분리법 (AUC)에 의해 분석되었다. 도 8에서 관찰될 수 있는 바와 같이, rhHNS은 균질한 분자들을 포함하고 pH 7에서 145 mM 부터 300 mM까지의 염 농도에서 동일한 구조를 유지하고 있다. 종합하면, 이들 결과들은 증가하는 NaCl 농도가 rhHNS의 증가된 용해도를 유도하는 점을 가르쳤다.

[0300] 높은 염의 액상 제형물 (15 mg/mL rhHNS, 175 mM NaCl, 5 mM 포스페이트, 0.005% 폴리솔베이트 20, pH 7.0); 및 슈크로스-포함하는 제형물 (15 mg/mL rhHNS, 2% 슈크로스, 145 mM NaCl, 5 mM 포스페이트, 0.005% 폴리솔베이트 20, pH 7.0)을 포함하는, 두 가지의 액상 제형물들이 심화 연구를 위해 확인되었다.

### [0301] 실시예 3. RHHNS를 위한 동결건조 제형물

[0302] 본 실시예에서 실험들은 rhHNS의 동결건조 제형물들 및 이를 위한 조건들을 최적화하도록 설계되었다. 상세하게, 이들 연구들은 동결건조된 케이크의 모양, rhHNS 효소 활성, 및 동결건조된 산물의 화학적 성질을 포함하는, 산물의 안정도에 미치는 제형물의 효과에 관한 정보를 제공한다.

[0303] rhHNS는 다양한 포스페이트 기초한 동결건조 제형물들로 제형화되었다. 다음의 제형물 변수들이 조사되었다: (1) 안정화제, 포도당 (0.5-1%) 또는 슈크로스 (1-1.5%); 및 (2) 표면활성제, 폴리솔베이트 20 (0.02-0.005%). 다음의 변수들은 테스트된 모든 제형물들에서 사용되었다: (3) 15 mg/mL rhHNS; (4) 145 mM NaCl; (5) 5 mM 포스페이트; (6) pH 7.0.

[0304] 대표적인 제형물들은 표 16에서의 조건들에 따라 동결건조되었다. 하기 표 6은 대표적인 동결건조 순환을 나타낸다.

표 16

Lyo 전기간 - 4 일	
냉동/아닐링	
냉동	0.25°C /분으로 -20°C
유지	-20°C 에서 5 시간
냉동 계속	0.25°C /분으로 -50°C at
유지	-50 °C 에서 3 시간
일차 건조	
상승	0.5°C /분으로 -25°C 및 진공으로 60 mT
유지	-25°C 및 60°C mT 에서 50 시간
이차 건조	
상승	0.3°C /분으로 20°C 및 150 mT 으로 N2 압력
유지	20°C 및 150 mT 에서 5 시간.

[0305]

[0306] 포도당을 포함하는 제형물들은 화학적 안정도가 유지되었더라도 (데이터 미도시), 긴 재구성 시간들 (>30 분)을 가지는 것으로 관찰되었다.

[0307] 1% 슈크로스를 포함하는 rhHNS lyo-제형물들은 SEC, RP, 및 SDS-PAGE에서 ≤ 1% 의 변화를 보여주면서, 2-8°C 에서 15개월 데이터를 또한 25°C/40°C에서 3개월 데이터를 가졌다 (하기 표 17에서 나타난 바와 같음). 하기 표 17은 1% 슈크로스 Lyo-제형물 안정도를 나타낸다.

표 17

테스트	Pre-Lyo	Post-Lyo	5 ± 3°C		25 ± 2°C	40 ± 2°C
			3 M	15 M	3 M	0.5 M
케이크 모양	NA	백색 고체 케이크	백색 고체 케이크	백색 고체 케이크	백색 고체 케이크	백색 고체 케이크
수분 함량	NA	0.5%	NA	NA	NA	NA
재구성 시간	NA	<60 sec	<60 sec	<60 sec	<60 sec	<60 sec
재구성 용액 모양	무입자, 유백광, 무색	무입자, 유백광, 무색	무입자, 유백광, 무색	무입자, 유백광, 무색	무입자, 유백광, 무색	무입자, 유백광, 무색
pH	7.2	7.2	7.3	NA	7.2	7.2
단백질 농도 (mg/mL)	14.8	14.8	NA	15.3	14.6	14.0
특이 활성 (U/mg)	71	62	NA	78	85	78
SEC 주요 피크%	99.9%	99.8%	99.6%	99.5%	99.6%	99.5%
RP-HPLC 주요 피크%	99.0%	98.9%	98.4%	98.5%	98.7%	98.5%
SDS-PAGE	동일	동일	동일	더 낮은 밴드의 약간 증가 (<1%)	동일	동일

[0308]

[0309]

1.5% 슈크로스를 포함하는 rhHNS lyo-제형물들은 SEC, RP, 및 SDS-PAGE에서 ≤ 0.2% 의 변화를 보여주면서, 2-8°C에서 14개월 데이터를 또한 25°C에서 3개월 데이터를 가졌다 (하기 표 18에서 나타난 바와 같음). 하기 표 18은 1.5% 슈크로스 Lyo-제형물 안정도를 나타낸다.

표 18

테스트	Pre-Lyo	Post-Lyo	5 ± 3°C	25 ± 2°C	40 ± 2°C	
			3M	3M	1M	3M
케이크 모양	NA	백색 고체 케이크	백색 고체 케이크	백색 고체 케이크	백색 고체 케이크	백색 고체 케이크
수분 함량	NA	0.5%	NA	NA	NA	NA
재구성 시간	NA	<60 sec	<60 sec	<60 sec	<60 sec	<60 sec
재구성 용액 모양		무입자, 유백광, 무색	무입자, 유백광, 무색	무입자, 유백광, 무색	무입자, 유백광, 무색	무입자, 유백광, 무색
pH	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9
단백질 농도 (mg/mL)	16.1	14.2	15.7	15.4	16.6	15.4
특이 활성 (U/mg)	176	210	149	122	169	139
SEC 주요 피크%	99.9%	99.8%	99.8%	99.6%	99.6%	99.0%
RP-HPLC 주요 피크%	99.2%	99.0%	98.8%	98.5%	98.0%	97.7%
SDS-PAGE	동일	동일	동일	더 낮은 밴드의 약간 증가(<1%)	동일	더 낮은 밴드의 약간 증가(~1%)

[0310]

[0311]

동결건조 케이크는 케이크의 모양 및 성질 (예로, 재용융)에 대해 관찰되었다. 도 9A에 관찰될 수 있는 바와 같이, 1.5% 슈크로스로 제형화된 동결건조 케이크들은 1.0% 슈크로스로 제형화된 것들보다 더 큰 케이크 수축을

가졌다. 1.5% 슈크로스로 제형화된 동결건조 케이크들은 VirTis 유닛 대비 LyoStar 유닛과 같은 서로 다른 동결건조 유닛에도 역시 더 민감하였다 (도 9B).

[0312] 별도의 실험 설정들은 하기 표 19에서 표시하는 바와 같이, 증가하는 슈크로스가 증가된 케이크 수축을 초래하는 점을 입증하고 있다. 하기 표 19는 다양한 슈크로스에서 rhHNS 안정도 및 케이크 모양의 비교를 나타낸다.

표 19

테스트	기저선으로부터의 변화					
	1% 슈크로스			1.25% 슈크로스	1.5% 슈크로스	
장기간 (5C) SEC RP SDS-PAGE	22M	12M		6M	21M	5 M
	0.4%	0.2%		0.1%	0.1%	0%
	0.5%	0.5%		0.5%	0.3%	0.5%
	<1%	<1%		<1%	0%	0%
가속 (25C) SEC RP SDS-PAGE	20M	12M		6M	21M	12M
	0.5%	0.2%		0.1%	0.1%	0%
	1.5%	0.5%		0.5%	0.5%	0%
	<1%	1%		1%	0%	0%
압박 데이터 (40C) SEC RP SDS-PAGE	0.5M	1M	3M	1M	0.5M	1 M
	0.5%	0.4%	1%	0.1%	0.1%	0.2%
	0.5%	0.5%	1.5%	0.1%	0.5%	0.2%
	<1%	<1%	>1%	1%	0%	0%
케이크 모양	약간 수축			일정 수축	더 많은 수축	

[0313]

[0314] 종합하면, 이들 데이터는 rhHNS lyo-제형물들에서 슈크로스 농도의 증가가 안정도의 증가 뿐만 아니라 동결건조 케이크 수축의 증가와도 상호관련된 점을 보여주고 있다.

[0315] 재구성된 lyo-제형물들이 미세-유동 영상화 (MFI)에 의해 미립자들의 존재에 대하여 관찰되었다. 대표적인 미립자 영상들은 도 10에 도시되어 있다. 도 10에서 관찰될 수 있는 바와 같이, 큰 미립자들이 보관 이후 1% 및 1.5% 슈크로스를 포함하는 lyo-제형물들의 재구성 이후에 관찰되었다.

[0316] 진동결건조 제형물들은 0.22 um 여과 이후에 미립자들의 존재에 대하여 관찰되었다. 도 11에서 관찰될 수 있는 바와 같이, 폴리솔베이트 20 (P20)의 존재는 0.22 um 여과 시 P20 없이 생성되었던 단백질-유사 현탁입자 (flocclulants)를 방지한다. 따라서, P20은 여과 시 미립자 형성을 방지하고 및/또는 rhHNS 단백질을 보호하는데 효과적이다. 심화 연구들은 P20의 존재가 rhHNS 제형물들에서 냉동-해동 유도된 미립자들 뿐만 아니라 동결건조-유도된 미립자들의 존재를 감소시키는 데 효과적이었던 점을 보여주었다 (결과 미도시).

[0317] 동결건조 조건들

[0318] 동결건조 순환 조건들이 rhHNS 동결건조 제형물들에 미치는 효과를 결정하도록 연구되었다. 예를 들어, 일차 건조 온도들은 -38℃로부터 -20℃까지 변화되었고, rhHNS lyo-제형물들의 안정도는 효소 활성, SEC, RP, 및 케이크 모양에 의해 결정되었다. 이들 분석들의 대표적인결과들은 하기 표 20에 나타나있다. 하기 표 20은 1.5% 슈크로스 lyo-제형물들에 미치는 일차 건조의 효과를 나타낸다.

표 20

Test	(-38°C)			(-30°C)		(-25°C)		(-23°C)		(-20°C)	
	Pre-Lyo	Post-Lyo	40°C	Post-Lyo	40°C	Post-Lyo	40°C	Post-Lyo	40°C	Post-Lyo	40°C
			0.5M		1M		0.5M		0.5M		0.5M
Activity	246	285	236	227	125	141	124	160	128	249	157
SEC	99.8	99.8	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.6	99.8
RP	98.8	98.8	98.5	98.8	NT	99.2	NT	99.1	98.8	98.9	99.0
2-10 µm	NT	2958	1395	7593	4013	1550	3188	869	942	1235	4650
Cake Shrinkage	NA	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

[0319]

[0320]

관찰될 수 있는 바와 같이, 안정도 프로파일에서는 유의한 차이가 -38°C로부터 -20°C까지의 일차 건조 온도의 범위 내에서 관찰되지 않았다. 동결건조 케이크의 모양은 -20°C의 일차 건조 온도에서 증가된 케이크 수축을 보여주었다. 유사한 결과들이 1.25% 및 1.0% 슈크로스를 포함하는 lyo-제형물들에서도 역시 관찰되었다 (결과 미도시).

[0321]

#### 실시예 4. 헤파란 N-설파타제의 만성 경막내 투여

[0322]

본 실시예는 경막내 투여가 점액다당류증 IIIA (MPS IIIA; 산필리포 증후군)의 신경적 증상들, 본 장애의 명확한 임상적 특징의 치료를 위해 재조합 인간 헤파란 N-설파타제 (rhHNS)와 같은 리소좀 효소를 뇌 조직들 내로 효과적으로 전달하는 데 사용될 수 있는 점을 보여준다. 본 실시예에서 기술된 실험들은 rhHNS의 만성적 IT 투여는 뇌, 척수 및 간에서 검출되는 용량-관련 효소 활성화와 잘 내성화되었던 점을 보여주고 있다.

[0323]

요약하면, 재조합 인간 헤파란 N-설파타제 (rhHNS)의 경막내 제형물이 점액다당류증 IIIA (MPS IIIA; 산필리포 증후군)의 신경적 증상들, 본 장애의 명확한 임상적 특징의 치료를 위해 개발되었다. MPS IIIA 환자들의 평균 연령은 4.5세이기 때문에, rhHNS의 중추적인 독성학 연구들은 발달하는 뇌에 미치는 효과를 평가하도록 어린 사이노물 원숭이들에서 시행되었다. 원숭이들은 경막내 (IT)-요추 약물 전달 장치로 이식 수술되었고 또한 장치 및 포스페이스트-완충 식염수 또는 부형제를 수여받는 부형제 대조군들과 함께 격주로 단기간 (short-term) 주입 (6개월 동안 1.5, 4.5, 또는 8.3 mg/용량 rhHNS; 12번 용량들)에 의해 투여되었다. 그룹 당 8마리의 동물들 (4 마리/성별)이 3 및 6개월 시 부검되었고 (장치-대조군 그룹은 3개월에 부검됨), 부형제 그룹 및 3가지 rhHNS 투여 그룹들로부터 나온 8마리 동물들이 최종 IT 투여 이후 1개월에 부검되었다. rhHNS-관련 임상적 징후들 또는 총 중추신경계 병변들은 전혀 관찰되지 않았다. 대조군들과 대비하여, 뇌/척수를 감싸는 뇌척수막/신경외막에서는 약간 내지 최소의 평균 중증도의 세포성 침윤물들이 있었고, 뇌척수액 (CSF) 백혈구들, 우세하게는 호산구들의 일시적 증가들과 상호관련되며, 이는 최종-투여 이후 1개월에 많이 해결되었다. 이들 변화들은 뇌 또는 척수에서 해로운 형태적 변화들과 연관이 없었다. 뇌, 척수 및 간에 있는 조직 rhHNS 활성화 수준들에서는 더 높은 평균 CSF rhHNS 수준들로 향하는 용량 관련 경향이 있는 것으로 보인다. 역효과 무관찰 수준은 격주로 주어진 최고의 투여량인 8.3 mg/용량이었고, rhHNS가 8.3 mg/용량 이상의 농도들을 포함하여 다양한 농도에서 안전하게 경막내 투여될 수 있는 점을 가르킨다.

[0324]

#### 산필리포 질환

[0325]

점액다당류증 제 IIIA형 (MPS IIIA; 산필리포 질환)은 전세계적으로 대략 10만명 당 1명이 걸린 희귀한 리소좀 축적병이고, 글리코사미노글리칸 (GAG)의 리소좀 이화작용에 관여하는 엑소설파타제인 헤파란 N-설파타제 (HNS)의 부재 또는 결함성 기능으로부터 유발된다 (Neufeld EF, et al. The Metabolic 및 Molecular Bases of Inherited Disease (2001) pp. 3421-3452). 본 효소의 부재 시, GAG 헤파란 설파이트가 뇌의 오부에는 더 적게 축적되면서 뉴런들 및 교아세포들의 리소좀들에 축적된다. 본 장애의 정의되는 임상적 특징은 중추신경계 (CNS) 퇴화이고, 이는 주요한 발달 지표들의 소실, 또는 이를 획득 부전이 유발된다. 진행성 인지 감소는 치매 및 조기 사망을 유발한다.

[0326]

#### rhHNS의 IT 전달

[0327]

MPS IIIA 환자들의 평균 연령은 4.5세이기 때문에, rhHNS의 중추적인 독성학 연구들은 발달하는 뇌에 미치는 효

과를 평가하도록 어린 사이노물 원숭이들 (인간들과 유전적 및 해부적 유사성을 기초로 한 종 선택)에서 시행되었다. 문헌에서 인용된 바와 같이 인간들과 원숭이들의 연령 동등성은 30 내지 40개월 된 어린이의 경우 7.6개월로부터 12.1개월의 (Hood RD, Developmental 및 Reproductive Toxicology: A practical approach (2006) p. 276). 본 노력의 일환으로서, 6개월 독성학 연구가 rhHNS의 IT 요추 투여를 평가하도록 어린 사이노물 원숭이들에서 시행되었다. 1개월 이전의 어린 사이노물 원숭이 독성학 연구로부터 획득된 데이터는 용량 수준 선택 및 6개월 반복-용량 어린 원숭이 연구의 설계를 안내하였다. 지금까지 알려진 결과를 기초로 하여, 이것은 어린 비인간 영장류들에서 ERT의 만성적 IT 투여를 다루는 첫 번째 연구이다.

[0328] 대략 6 내지 9개월령이고 무게가 0.82 내지 1.81 kg 이 되는 56마리의 수컷 및 56마리 암컷의 어린 사이노물 원숭이들이 본 연구에 사용되었다. 원숭이들은 PMI-인증된 영장류식 5048 (Richmond, IN)의 15개 비스킷을 매일 먹었다. 물은 여과된 자동 물 시스템을 통해 자유롭게 제공되었고 노 채취 기간들 동안은 유보되었다. 원숭이들은 도착 시 2 내지 4주 동안 스테인레스강 상자들에서 3개월 원숭이들을 제외하고는 집단으로 사육되었다 (상자 당 두 마리). 연구 기간 동안, 모든 원숭이들은 조절된 온도 및 습도를 가진 방들에 있는 개별적 스테인레스강 상자들 안에 12시간씩 명암 주기로 사육되었다.

[0329] 연구 개시 이전에, 모든 원숭이들은 SC 포트들 및 IT 카테터들이 외과적으로 이식되었다. 수술 전에 프레드니솔론 소듐 숙시네이트 (IV, 30 mg/kg) 및 플루니진 메글루민 (flunixin meglumine) (근육내 [IM], 2 mg/kg)이 투여되었다. 원숭이들은 C 아트로핀 설페이트 (0.04 mg/kg)로 전처리되어 IM 케타민 HCl (8 mg/kg)으로 진정되었고, 후두에 관을 넣어 대략 1 L/분의 산소 및 2.0% 이소플루란 상에서 유지되었다. 요추의 등 공정 위로 절개가 만들어졌고 (L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub>, 또는 L<sub>6</sub>), 또한 L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>, 또는 L<sub>5</sub>에 가는 폴리우레탄 카테터 (0.33 mm 직경의 6개 측공들을 가진 길이 25 cm, 0.9 mm 외부 직경 x 0.5 mm 내부 직경)의 삽입을 위해, 반층상해부법 (hemilaminectomy)이 시행되었다. 카테터는 작은 경뇌막 절개를 통해 삽입되었고 대략 10 cm 앞의 흉요추 연결 영역으로 진행되었다. 티타늄 SC 포트는 IT 카테터에 부착되었고 SC 조직에 이식되었다. 적절한 카테터 설치는 Isovue-300 (0.8 ml; Bracco Diagnostics, Inc., Princeton, NJ)를 사용하는 미엘로그래프에 의해 검증되었다. 수술로부터 회복한 이후에, 원숭이들은 부토포놀 타르테이트 (butorphanol tartrate, IM, 0.05 mg/kg) 및 세프티오퍼 소듐 (ceftiofur sodium, IM, 5.0 mg/kg 2일 동안 매일 두 번)를 수여받았다.

[0330] 본 실시예에서, rhHNS는 5 mM 소듐 포스페이트, 145 mM 염화나트륨, 및 0.005% 폴리솔베이트 20 (pH 7.0)을 포함하는 IT 제형물 운반체로 제공되었다. rhHNS의 EOW 용량들이 대략 11분 동안 단기 주입으로서 투여되었고: 0.6 mL (4 분) 0.5 mL 포스페이트-완충 식염수 (PBS) (7분)이 이어졌다. 운반체-대조군 그룹의 원숭이들은 IT 제형물만 단독으로 수여받았고; DC 원숭이들은 PBS (pH 7.2) IT를 수여받았다.

[0331] 유병율 및 치사율

[0332] rhHNS-관련 사망들 및 조기 희생은 전혀 없었다. 투여 시 또는 매일 관찰들 동안 주목되는 rhHNS-관련 임상적 징후들은 전혀 없었다. 투여 기간 동안 및 이후에 관찰되는 잘못된 두기 (misplacement), 가려움 (pruritis), 흔들기 (tremors), 및 실조 (ataxia)는 투여의 수 분 내지 대략 4시간 이내에 해결되었고, rhHNS 또는 운반체라기 보다는 부피-관련 반응인 것으로 고려되었다. 투여 동안 및 직후에 관찰되는 임상적 징후들은 대조군에서 비교 가능한 빈도로 관찰되었고 (DC 및/또는 운반체-투여 그룹); 용량 반응의 증거는 전혀 없었다. 일반적으로, 투여 시 임상적 징후들의 빈도는 각 연속 용량과 함께 감소되었다. 체중, 음식 소비, 또한 신체적 및 신경적 발견들, 또는 ECG에서의 변경들 또는 안과적 검사들에서 rhHNS-관련 변화들은 전혀 없었다.

[0333] 임상적 병리학

[0334] 혈액, 혈청 화학, 응고, 또는 뇨분석 변수들에서 간격이라면 모두에 rhHNS와 관련되는 것으로 고려되는 변화들은 전혀 없었다.

[0335] CSF 세포 계수 및 화학

[0336] DC 및 0 mg/용량 그룹들, 투여 이후 24시간을 포함한 모든 그룹들에서 평균 CSF 백혈구 계수들에서 용량-관련 증가들이 있었다. 투여된 각 용량으로 백혈구 계수에서 일반적인 증가가 있었다. 투여 이전에 원숭이들의 대략 절반으로부터 CSF 채취는 이들 효과들이 이전의 용량 이래 2주에 감소된 것을 보여주었다. 5번 용량 이후, 백혈구들에서 증가에 추가하여, 더 높은 그룹 평균 CSF 전체 단백질 및 알부민이 투여 이전 평균과 비교하여 rhHNS-투여된 수컷들의 경우에 4.5 및 8.3 mg/용량 그룹들 (4- 내지 5배까지)로 관찰되었고 ( $P \leq 0.05$  대비 DC 및 0 mg/용량 그룹); 암컷 rhHNS-투여 그룹들에서는 덜한 경향성이 분명하였다,



[0337] rhHNS 농도들 및 항체 분석

[0338] 전형적으로, 혈청에서 평균 rhHNS 수준들은 모든 테스트 그룹들의 경우 모든 시간대에 < 검출 한계 (LOD)이었다. DC- 및 운반체-투여 대조군 그룹에 있는 원숭이들로부터 나온 CSF의 rhHNS 농도는 일반적으로 정량 한계 (LOQ) 미만이었다. 통계적인 분석들이 수행되지는 않았더라도, 1.5, 4.5, 및 8.3 mg/용량 그룹에서 CSF의 더 높은 rhHNS 수준들을 향한 용량-관련 경향이 있는 것으로 보였다. 투여이전 CSF 평균 rhHNS 수준들은 투여이전 CSF 수준들보다 유의하게 더 낮았다. 연구 종결 시 (주요 및 회복 부검) 6개월 집단 (둘 다의 성별)의 평균 rhHNS 농도들은 표 42에 정리되어 있다. 주어진 용량 수준에서, CSF에서 rhHNS의 평균 농도들은 연구를 통하여 계속 올라갔던 혈청 및 CSF에서의 항-HNS 항체 수준들에도 불구하고 동일한 범위로 유지되는 것으로 보였다 (도 12A). 하기 표 21은 연구 종결시CSF rhHNS 농도들 (주요 부검 및 회복 부검)을 나타낸다. 여기에서CSF, 뇌척수액; HNS, 인간 헤파란 N-설파타제; n = LOQ 초과 시료수; IT, 경막내; SD, 표준 편차. <sup>a</sup> = 투여후 24시간에 채취된 시료들. NA = 분석에 사용가능하지 않은 시료 또는 LOQ 미만의 시료들.

표 21

그룹	주요 부검		회복 부검	
	n	평균 ± SD <sup>a</sup> (ng/mL)	N	평균 ± SD (ng/mL)
운반체	8	-	8	NA
1.5 mg IT	8	516,366 ± 1,024,084	8	NA
4.5 mg IT	7	377,460 ± 304,996	7	NA
8.3 mg IT	8	419,492 ± 345,975	8	NA

[0339]

[0340] 6-개월/회복 집단에서, 장치 대조군 그룹 (PBS만)의 원숭이들 또는 운반체 투여된 것들은 테스트된 시간대라면 모두에서 항-HNS 항체들을 혈청 또는 CSF에서 발생시켰다. 1.5, 4.5, 및 8.3 mg/용량 그룹들에서 모든 원숭이들은 연구전 (CSF의 경우) 및 투여 이전 2번에서 채취된 혈청 및 CSF 시료들에서 항-HNS 항체들에 대해 음성으로 테스트되었다 (<LOD). 본 연구의 말에, 모든 원숭이들은 혈청에서 항-HNS 항체들에 대해 양성으로 테스트되었다.

[0341] 1.5 mg/용량 및 8.3 mg/용량 그룹들에서 모든 원숭이들 또한 4.5 mg/용량 그룹에서 8마리 원숭이들 중 6마리가 하나 이상의 시간대에서 항-HNS 항체들에 대해 CSF에서 양성으로 테스트되었다. 4.5 mg 그룹에서 두 마리 원숭이들은 부검을 포함하는 시간대라면 모두에서 채취된 시료를 가지지 않기 때문에, 이들 결과들은 rhHNS로 투여된 모든 원숭이들은 항체 반응을 생성하는 점을 가르키도록 보일 것이다.

[0342] 모두 세가지의 용량 수준들에서, 혈청에서 항-HNS 항체 농도들은 용량 2번 이후에 검출되었고 수준들은 용량 4번 이후에 형저하게 증가되었다. 통계적인 분석들이 수행되지 않았더라도, 더 높은 혈청 항체 농도로 향한 용량-관련 경향이 있는 것으로 보였고; 연구의 말에, 수준들은 3가지 rhHNS 용량 그룹들을 거쳐서 비교가능하였다 (도 12B). 혈청에서 항-HNS 항체 수준들은 본 연구의 과정 동안 CSF에서보다 항상 더 높았고 (9로부터 236배까지 혈청/CSF 항체 농도들); 혈청/CSF 농도들의 최고 비율들 (98 및 236배)는 8.3 mg 용량 수준에서 투여 초기 과정 (6 및 10주)에서 관찰되었다.

[0343] 혈청에서 항-HNS 항체 농도들은 초기 투여 시간에서 (6주부터 14주까지) 1.5 mg, 4.5 mg, 및 8.3 mg/용량 수준들에서 각각 9-, 16-, 및 16배로 증가되었다. 동일한 기간 동안, CSF 항체 농도들은 1.5 mg, 4.5 mg, 및 8.3 mg/용량 수준들에서 30-, 41-, 및 52-배로 각각 증가되었고 (도 12B); 실질적인 수준들은 1개월 무투여 회복 단계 이후에 그대로 남아있었다. 하기 표 47은 연구 종결 시 CSF 항-HNS 항체 농도들을 나타낸다 (주요 및 회복 부검). 여기에서CSF, 뇌척수액; HNS, 인간 헤파란 N-설파타제; IT, 경막내; n, 정량 한계 초과 시료수; SD, 표준 편차. <sup>a</sup>투여전 대략 1주에 채취된 조직들.

표 22

그룹	주요 부검 <sup>a</sup>		회복 부검	
	n	평균±SD (ng/mL)	N	평균±SD (ng/mL)
운반체	8	-	8	-
1.5 mg IT	8	351,456 ± 244,171	8	299,512 ± 226,654
4.5 mg IT	7	147,187 ± 213,095	7	193,045 ± 157,896
8.3 mg IT	8	185,227 ± 315,858	8	238,727 ± 185,785

[0344]

[0345]

항-HNS 항체들은 이후에 혈청보다는 CSF에서 출현하였다 (도 146C). 혈청 또는 CSF에서 항체 농도들의 분명한 용량-관련 차이들은 관찰되지 않았고 (통계적 분석은 작은 시료 크기들로 인해 시행되지 않음); 항체 반응들에서 수컷들 및 암컷들 간 관찰가능한 차이는 없었다.

[0346]

CSF에서 항-HNS 항체의 존재 시, CSF에서 HNS의 평균 농도는 유지되는 것으로 보였고, 혈청 및 CSF에서 항-HNS 항체들의 존재는 IT-투여된 HNS의 농도 수준을 변경시키지 않는 점을 제시하였다. rhHNS의 6개월 반복-용량 투여의 6개월/회복 집단 분석들은 3개월 중간 및 6개월 계획집단 희생 원숭이들의 경우 항-HNS 항체 농도들이 비교가능한 점을 가르켰다 (도 12C).

[0347]

전체 및 조직병리학적 발견들

[0348]

모든 용량 수준들에서 (희생 간격들, 성별-특이적 또는 용량-관련 방식으로서는 아니더라도), 호산구성 침윤물들 (도 13)이 뇌 (우세하게는 회색질), 척수 (회색 및 백색질), 등 척수 신경근들/신경절 및 삼차 신경절 (중간-용량 수컷들만)의 실질에 존재하였다 (도 13A-E). 침윤물들은 조직의 실질 내에서 뇌척수막/신경외막 침윤물들 및/또는 rhHNS의 존재 (이에 의한 침투)에 대해 이차적인 것으로 관찰되었다. 수많은 염증 유형의 변화들이 존재 하더라도, 원숭이들은 rhHNS의 투여를 내성화하는 것으로 보였고 침윤물들은 신경계 실질과 관련되거나 해로운 형태적 변화들을 초래하지 않는 것으로 고려되었다. 상세하게는, 신경 괴사/퇴화 및 rhHNS 투여와 관련된 교아 반응의 증거는 전혀 없었다.

[0349]

뇌 및 척수의 회색질에서, 우세하게는 호산구성 세포성 침윤물들과 연관되는 미세신경교아증 (microgliosis)은 이전에 수행된 1개월 어린 원숭이 독성 연구에서 비교적 공통적이었고; 이들 변화들은 6개월 연구에서 3개월 중간 희생에 의해서는 비교적 공통적이지 않지만, 이러한 반응의 남아있는 증거는 여전히 6개월 집단에서 관찰될 수 있었다 (도 13F). 미세교아 반응들은 일정 (전형적으로 단백질-기초) 중추 투여된 (또는 중추-반응성) 테스트 항목에 대한 반응에서 비교적 초기 사건인 경향이 있다. 호산구 침윤물들은 세포들이 역반응을 나타내도록 충분한 수로 존재하지는 않더라도, rhHNS-투여된 원숭이들의 CSF에서 호산구들의 증가된 수와는 상호관련이 없었다.

[0350]

모든 용량 수준들에서, 호산구성 침윤물들이 대부분 rhHNS-투여 그룹들의 경우 성별에 상관없이 등 척수 신경근들/신경절에서 관찰되었다. 다양한 신경계 조직들에서 침윤물들은 조직의 실질 내에서 뇌척수막/신경외막 침윤물들 및/또는 rhHNS의 존재 (이에 의한 침투)에 대해 이차적인 것으로 관찰되었다. 회복 희생 원숭이들에서, rhHNS-관련 효과들은 일반적으로 없거나 대조군 수준들로 감소되었다. 척수에서 미세교아신경증과 같은 일정 변화들은 회복 기간 이후에 완벽하게 해결되었다. rhHNS-관련 변화들은 뇌 또는 척수에서 해로운 구조적 현미경적 변화들이라면 모두와 연관이 없는 것으로 보였다. 뇌, 척수 또는 신경절에서 주목되는 신경 괴사는 전혀 없었다.

[0351]

척수에서 신경섬유 퇴화 및 신경아교증은 IT 카테타의 설치 및/또는 존재에 대해 이차적으로 나타났다. 이들 변화들은 대조군 및 rhHNS-투여 그룹들 간에 비교적 유사하였다. 척수 신경근들에서, 쉬만 세포 (말초 신경계의 미엘린화 세포) 증식 및 신경섬유 퇴화가 대조군 및 rhHNS-투여 원숭이들 둘 다에서 존재하였다. 이들 변화는 카테타 설치 시점에서 하나 이상의 척수 신경근들에 대한 손상으로 인하였다.

[0352]

HNS 효소 활성

- [0353] 6개월/회복 집단들에서, 운반체-투여된 그룹 (0.0-0.154 nmol/hr/mg단백질)의 척수 및 뇌에서 rhHNS 효소 활성은 3개월 중간 집단으로부터 나온 조직들에서 나타나는 수준들과 유사하였다 (0.0-0.0.154 nmol/hr/mg 단백질). 척수에서 효소 활성 수준들은 뇌 또는 간에서 측정된 수준들, 4.5 mg 및 8.3 mg/유사한 수준들을 가지는 용량 그룹들보다 더 높았다 (대략 요추에서 더 높은 순위의 규모). 척수 조각들에서 rhHNS 효소 활성은 1.5, 4.5, 및 8.3 mg/용량 그룹들의 경우 각각 수컷들에서 3.9-18.6, 13.1-67.1, 및 3.6-69.2 nmol/hr/mg 단백질 (도 14A) 또한 암컷들에서 1.8-16.2, 4.5-61.2, 및 21.1-66.0 nmol/hr/mg 단백질 (도 14B)의 범위였다. 1개월 회복 기간 이후 척수 조직에서, 효소 활성 수준들은 운반체 대조군 수치들과 일치하는 수준들로 돌아왔다.
- [0354] 뇌 조각들에서 rhHNS 효소 활성은 1.5, 4.5, 및 8.3 mg/용량 그룹들의 경우 각각 수컷들에서 0.03-16.0, 0.30-55.7, 및 0.15-21.2 nmol/hr/mg 단백질 (도 14C), 또한 암컷들에서 0.04-5.1, 0.0-14.4 및 0.9-33.2 nmol/hr/mg 단백질 (도 14D)의 범위이었다. 회복 이후 뇌 조직에서, 효소 활성 수준들은 대조군 수치들과 일치하는 수준들로 돌아왔다.
- [0355] 뇌의 서로 다른 영역들의 경우 내인성 수준들 (DC 그룹)과 비교하여 활성에서의 배수 변화는 도 15A에 나타나 있다. 증가된 배분으로의 경향이 표면 시료들에서 주목되더라도, 요추-IT투여된rhHNS는 뇌의 측실주위 영역들로 침투하는 것으로 관찰될 수 있다.
- [0356] 6개월 집단/회복 집단들에서, 간에서의 평균 활성은 1.5, 4.5, 및 8.3 mg/용량 그룹들의 경우 각각 수컷들에서 0.50, 2.41, 및 6.65 nmol/hr/mg 단백질 또한 암컷들에서 1.04, 4.15, 및 7.62 nmol/hr/mg 단백질이었다 (도 15B). 운반체 대조군 원숭이들에서 수준들은 수컷들의 경우 0.089 nmol/hr/mg 단백질 또한 암컷들의 경우 0.083 nmol/hr/mg 단백질이었다. 회복 기간을 이어서, 간에서의 rhHNS 활성 수준들은 모든 용량 그룹들의 경우 기저 대조군 수준들과 비교가능하다.
- [0357] 면역조직화학
- [0358] 3개월 중간 및 6개월/회복 집단들에서 IT 일시 주사에 의한 CNS로의 HNS 전달은 척수 및 뇌의 연결-거미막 조직들로 면역반응성 테스트 항목의 전달을 유도하였다. IT rhHNS를 수여받은 원숭이들에서, 면역반응성 물질이 뇌 척수막 및 혈관주위 대식세포들 (뇌/척수)에 일정하게 존재하였고, 인접한 교아세포들 및 신경세포 집단들에 다양하게 존재하였다. 운반체-투여 대조군 원숭이들에서 염색의 결여는 (도 16A) 인간 rhHNS로의 항체 특이성을 보여주었다. 일반적으로, 면역반응성은 용량 관련되었다 (예로, 반-정량적인 등급화 척도를 사용하여, 증가된 면역조직화학 염색은 일반적인 용량-의존적 방식으로 언급되었다). IT 일시 주사에 의한 CNS로의 HNS 전달은 대 뇌 피질 및 소뇌에서 양성 면역염색을 유도하였다 (도 16B-D); 그러나 면역반응성은 미상엽/조가비핵 부위, 중간뇌, 또는 교뇌 또는 연수의 더 깊은 부위들에서 지속적으로 명백하지는 않았다. 면역반응성은 rhHNS 투여된 모든 원숭이들의 간들에서 (간세포들이 아닌 컵 세포들을 포함하는 시누소이드 내층 세포들) 명백하였다. 면역반응성은 조기에 희생된 한 마이 암컷에서는 복구될 수 없는 카테터의 누출 때문에 명백하지 않았다.
- [0359] 1.5 mg/용량 그룹에서, 필수적으로 완전 회복은 간 및 일정 잔여 면역반응성이 명백한 뇌 및 척수의 뇌척수막을 제외하고 명백하였다. 더 높은 용량들에서 (4.5 및 8.3 mg/용량), 면역반응성의 강도 및 빈도들은 투여의 말에서보다 더 낮았다. 모든 용량 수준들에서, 척수, 뇌 및 간의 rhHNS 수준들은 1개월 회복 기간 이후에 운반체-투여 대조군들에서 관찰된 수준들과 대략 같았다.
- [0360] 논의
- [0361] 본 연구에서, IT 투여된 rhHNS의 EOW 전달은 일반적으로 잘 내성화되었다. 체중, 임상적 상태, 안과/신경적/신체 검사들, ECGs, 기관 무게들, 또는 총 기관 외양에서 두드러진 변화들은 전혀 관찰되지 않았다. 발견들은 회복 기간에 이어서 최고 용량 그룹에서만 거의 완벽한 역전을 가지면서 약간 내지 적당한 뇌척수막 침윤물들 및 경막외 염증을 동반하는 CSF 임상 병리학에서 일시적인 변화들에 제한되었다. 뇌 및 척수 전체를 통하여 HNS의 광범위한 분포가 관찰되었다.
- [0362] rhHNS EOW의 IT 투여는 잔여 백혈구 침윤 및 투여 이후 24시간제 및 부검 시 주목되는 알부민의 삼출을 특징으로 하는 염증성 반응을 나타내었다. 특정한 이론이라면 모두에 침착하려고 았더라도, 이것은 아마도 카테터 팀 근처 밀착 연결부 (tight junctions)에서의 변화들과 관련된 BBB의 일시적, 국소적 및 불완전 개방을 반영하고 있고, 백혈구들 및 혈장 단백질들의 CSF 내로의 도입을 유도한다 (Simard JM, et al. Lancet Neurol. (2007) 6, 258-268; Stamatovic SM, et al. Curr. Neuropharmacol. (2008) 6, 179-192). 이것은 이것은 두 가지 성분들의 결과일 수 있다: 용량 투여 절차들 또는 부피와 관련된 성분 및 단백질의 IT 투여와 관련된 다른 성분.

- [0363] BBB 투과성에서 일시적 변화들은 (주요 부검시 투여 이후 24시간째 용량 그룹들 및 대조군들 사이에 유의한 차이들이 없음) 임상적 징후들이라면 모두가 동반되지 않았다.
- [0364] 더 높은 평균 CSF rhHNS 수준들의 경우 용량-관련된 경향이 존재하는 것으로 보였고; 주어진 용량 수준에서 CSF에서 rhHNS의 평균 농도들은 혈청 및 CSF에서 항-HNS 항체 수준들이 증가함에도 불구하고 동일한 범위로 유지되는 것으로 보였다.
- [0365] 약간 내지 최소의 평균 중증도의 뇌척수막 세포성침윤이 rhHNS-투여 어린 원숭이들의 뇌 및 척수들에서 관찰되었다. 본 현미경적 변화는 운반체-투여된 대조군들에서도 역시 주목되었고 일정 반응이 IT 카테터 장착, 뿐만 아니라 외래 단백질에 비특이적 염증 반응과 관련되는 점을 가르켰다. IT 공간 내로 생물학적 단백질, 특히 CNS를 침투하는 것의 도입은 거의 항상 일정 정도의 염증성 반응을 나타내고 (Hovland DN, et al. Toxicol. Pathol. (2007) 35, 1013-1029; Butt MT, Toxicol. Pathol. (2011) 39, 213-219), 인접 조직을 손상시키도록 많이 존재하는 경우 역효과를 나타낼 것이다. 그러나, 최신 연구에서 이들 세포들 (우세하게는 호산구들)은 조직 반응/침투의 마커를 나타내는 것으로 보였고 역효과로서 분석될 충분한 양으로 발견되지는 않았다. rhHNS-관련 변화들은 뇌 또는 척수에서 해로운 구조적 현미경적 변화들이라면 모두와 연관이 없는 것으로 보였다. 뇌, 척수 또는 신경절에서 주목되는 신경 괴사는 전혀 없었다.
- [0366] 일정 원숭이들에서 약물 전달 장치와 연관된 척수의 등쪽 관들에서 신경섬유 퇴화, 카테타관 섬유증, 및 척수의 압박을 포함하는 변화들이 있었고; 이들 변화들은 그들이 IT 카테타와 인접하여 발생하는 점에서 rh-HNS-관련된 것으로 고려되었다. IT 요추 약물 전달 장치는 인간보다 더 작은 IT 공간을 가지는 어린 원숭이들에서 IT 이식을 위해 특이적으로 설계되지 않았다. IT 연구들에서 대조군 (장치 및/또는 식염수-투여) 동물들로부터 나온 현미경적 평가 결과의 후향 분석은 뇌척수 침윤 및 카테타 관-연관성 염증, 신경섬유증 및 신경교아증 또한 척수 신경 섬유 퇴화가 일정 최소의 정도로 관찰되는 것으로 결론지었다 (Butt MT, Toxicol. Pathol. (2011) 39, 213-219).
- [0367] 항-테스트 항목 항체들은 테스트 항목의 청소 또는 생체분배에 미치는 중화 또는 결합 항체들의 잠재적인 영향 때문에 독성 연구들의 중요한 관점이다 (Ponce RP, et al. Regul. Toxicol. Pharmacol. (2009) 54, 164-182). 본 연구에서, rhHNS 효소 활성의 용량-관련 및 정량적으로 유사한 수준들이 3개월 중간 및 6개월 집단들의 뇌 및 척수에서 발견되기 때문에, CSF에서의 rhHNS의 평균 농도들은 혈청 및 CSF에서 항-HNS 항체 수준을 증가시키는데도 불구하고 동일한 범위로 유지되는 것으로 보였고, 우리는 중화 활성이 전혀 관찰되지 않는 것으로 결론지었다.
- [0368] 척수, 뇌 및 간에서의 rhHNS 효소 활성의 더 높은 수준들로 향한 용량-관련 경향, 척수의 요추 영역에 있는 주사 부위 근처에서 가장 높고 뇌에서 일정하며 입과 꼬리 및 좌우 반구들 간 유의한 차이가 없는 것이 존재하는 것으로 보였다. rhHNS 축적에 대한 증거는 3개월 중간 집단과 비교된 바와 같이 6개월 집단의 뇌 및 척수 조직에서 전혀 주목되지 않았다. 증가된 배분으로 향한 경향이 표면 시료들에서 주목되었더라도, 요추-IT 투여된 rhHNS는 뇌의 깊은 측실주위 영역들로 침투하였다. 간에서 rhHNS 효소 활성은 IT 전달 이후에 체계적으로 재분배되는 rhHNS를 제시하였고; rhHNS-관련 역효과들은 중추적 독성 연구들에서 임상적 및 해부적 병리학 변수들의 평가 이후에 간에서 전혀 관찰되지 않았다.
- [0369] 일반적으로, 면역조직화학 결과들은 조직 효소 활성과 협력하였고 용량-관련 면역반응성이 척수 및 뇌 연결-거미막 뇌척수막에서 또한 뇌척수막과 바로 인접한 신경 조직들 (뉴런들, 교아세포들)에서 관찰되었다. IT 일시 주사 또는 단기 IT 주입 이후에 대뇌 및 소뇌의 회색질 침투가 좋았다. 면역반응성이 기저 신경절 또는 시상/해마, 중뇌 또는 교뇌/연수와 같은 더 깊은 구조들에서 분명하지 않더라도, 효소 활성 결과들은 요추-IT 투여된 rhHNS가 뇌의 깊은 측실주위 영역들로 침투하는 것을 가르켰다. 따라서, 면역조직화학이 테스트 항목의 생체분배를 검출하는 덜 민감한 기법일 수 있다. 면역반응성은 간의 컵 세포들 및 내피세포들 (대식작용 가능한 세포들)에서는 분명하지만, 실질세포들 (간세포들)에서는 그렇지 않다.
- [0370] 어린 원숭이들에서 6개월 반복된-용량 IT 독성 연구의 6개월/회복 집단 분석들은 3개월 중간 및 6개월 희생 원숭이들에서 rhHNS-관련 변화들이 생명 변수들, 임상적 및 해부적 병리학, CSF 및 혈청에서 rhHNS 및 항-HNS 항체들의 농도들 또한 척수, 뇌 및 간에서 rhHNS의 분포/세포화 위치를 포함하여 비교가능한 점을 가르켰다. 회복 희생 원숭이들에서, rhHNS 효과들은 부재하거나 유의하게 감소되었다. 따라서, 6개월 어린 원숭이 연구의 역효과 무관찰 수준은 최고의 투여량인 8.3 mg/용량이었다.
- [0371] CSF 세포충실성 및 단백질 농도들에서 변화들을 감시하는 것이 조직병리적 평가 상에 주목되는 형태적 변화들의



밀을만한 상관 (correlate)인 것으로 보이고 rhHNS로 IT 치료된 환자들에서 유용할 수 있다; 이들 변화들은 IT-투여된 단백질에 대한 기대된 반응으로 고려되었고 회복 기간 이후 많이 해소되었다. 동물 모델들로부터 얻은 이들 데이터는 리소좀 축적병들의 신경학적 소견들을 위한 치료 전략으로서 IT 요법을 추구하는 데 확인을 준다. 본 어린 비인간 영장류 독성 연구는 소아 환자들에서 IT 요주 약물 전달 장치를 통한 rhHNS의 투여의 실용성 및 내성도를 보여주고 있다. 무해한 CNS 병리학 및 해로운 임상적 징후들의 결여는 최근 연구적 의학제품 서류 승인을 지지하였고 IT-투여된 rhHNS가 산필리포 증후군 A형의 CNS 증상들을 안전하고 효과적으로 치료할 수 있는 점을 가르켰다.

[0372] 본 실시예에서 기술된 다양한 실험들에 사용되는 대표적인 재료들 및 방법들은 하기에 제공된다.

# [0373] 연구 설계 및 rhHNS 투여

[0374] 원숭이들은 5가지 치료 그룹들로 무작위화 되었다; 그룹 1은 미치료되고 (이식 장치 대조군 [DC], 포트 및 카테터) 운반체 또는 테스트 항목이 투여되지 않았다. 그룹 2 내지 5는 0.6 mL의 0, 2.5, 7.5 또는 13.8 mg/mL rhHNS IT, (예로, 전체 용량 0, 1.5, 4.5, 또는 8.3 mg) EOW를 수여받았다. 네 마리의 원숭이들/성별/그룹이 3개월에 부검되었고 (중간 부검; 6번 용량 이후 24시간째), 네 마리의 원숭이들/성별/그룹 (3개월에 부검된 DC 그룹 제외)은 투여 6개월에 부검되었고 (주요 부검; 12번 용량 이후 24시간), 남아있는 네 마리의 원숭이들/성별/그룹이 1개월 회복 기간말에 부검되었다. 검시, 선택된 조직들이 수확되어 가공되었고 현미경적으로 조사되었다.

[0375] rhHNS는 5 mM 소듐 스페이트, 145 mM 염화나트륨, 0.005% 폴리솔베이트 20 (pH 7.0)으로 구성되는 IT 제형물 운반체에 넣어 제공되었다. rhHNS의 격주 용량들이 대략 11분 동안 단기 주입으로서 투여되었다: 0.6 mL (4분), 0.5 mL 포스페이트-완충 식염수 (PBS) (7분)의 세척이 이어졌다. 운반체-대조군 그룹의 원숭이들은 IT 제형물만 단독으로 수여받았고; DC 원숭이들은 PBS (pH 7.2) IT를 수여받았다.

# [0376] 임상적 평가

[0377] 임상적 징후들, 유병율 및 치사율이 첫 번째 용량에서 시작하여 적어도 매일 두 번 기록되었다. 체중들은 수술 전, 수술일, 연구 동안 매주, 및 부검시에 측정되었다. 식품 소비가 수술 전에 시작하여 매일 감시되었다. 신체적 (심장 속도, 호흡, 체온, 청진, 보행, 소질, 복부 촉진, 림프절, 및 일반적인 외양) 및 신경적 (의식 수준, 추적) 검사들이 연구가 개시되기 이전, 연구 동안 매일, 및 부검 전에 수행되었다. 운동 기능, 뇌 반사들 (동공, 누감박임 및 각막 반사), 및 척수 반사들 (발 감각, 무릎 반사, 피하, 고유 감각 (proprioceptive), 및 꼬리 반사)도 역시 평가되었다. 심전도 (ECG; leads I, II, 및 III) 및 안과적 검사들이 rhHNS의 첫 번 용량 이전, 중간부검 (3개월) 또는 최종 부검 (6개월) 전 주에 완료되었다. 안과적 검사들은 도상검안경에 의해 수행되었다. 원숭이들은 케타민 HCl (IM, 8 mg/kg)로 진정되었고 눈들은 및 1% 트로피카마이드 (tropicamide)로 확장되었다..

# [0378] 임상적 병리학

[0379] 혈액 시료들은 혈액학 및 혈청 화학을 위해 연구 시작 이전, IT 투여 1, 3, 5, 7, 9 및 11이후, 중간-회복 및 부검시 절식 원숭이들로부터 채취되었다. 소변 시료들은 팬 케치에 의해, 투여전, 투여 동안 매일, 회복 기간 및 부검 이전 채취되었다. CSF 시료들은 전체 세포 계수 및 화학 분석을 위해 수술시, IT 투여 1, 3, 5, 7, 9 및 11에 이어서 24시간, 중간-회복 및 부검시 요주 카테터에 의해 채취되었다; 때로 시료들은 부분적 카테터 방해로 인해 채취되지 못하였다. 기대한 CSF 백혈구 계수 이상이 주목되었기 때문에, 3개월 용량 5 CSF 시료들이 투여 이전 각 그룹의 원숭이들 절반으로부터 또한 투여 이후 24시간째 남아있는 원숭이들로부터 채취되었다. 투여전 시료 채취는 투여 직전 CSF 부피를 유의하게 변경하지 않도록 투여 이전 적어도 1일에 이루어졌다. 6개월 및 회복 원숭이들의 경우 전체 세포 계수 및 화학을 위해 CSF가 투여 이전 각 그룹의 원숭이들 절반으로부터 또한 투여 이후 24시간째 남아있는 원숭이들로부터 채취되었다. 원숭이가 방해로 인해 무시료 카테터를 가지는 경우라면, 척수 탭 (대수공)이 부검시 수행되었다.

# [0380] rhHNS 분석

[0381] rhHNS 분석을 위한 혈액 시료들은 IT 용량들 2, 4, 6, 8, 10, 12 이전 및 이후 24시간; 중간-회복, 및 부검시 말초 정맥으로부터 채취되었다. CSF 시료들은 IT 용량들 2, 4, 6, 8, 10, 12 이전 및 이후 24시간; 중간-회복, 및 부검시 요주 카테터에 의해 채취되었다. rhHNS 농도들은 효소-결합 면역흡착 검정법에 의해 결정되었다. 포획 항체는 폴리클론 토끼 항-HNS IgG이었고 검출 항체는 동일한 항-HNS IgG의 호스래디쉬 퍼옥시다제-결합체이었다. LOD 는 0.22 ng/mL이었고, 따라서 LOQ는0.66 ng/mL로 계산되었다. 혈청 및 CSF 시료들은 1:100 및 1:5



희석들로 두 벌씩 검색되었다; 산정 곡선의 고점을 초과하는 시료들은 좀 더 희석되어 재시험되었다.

[0382] **항-HNS 항체 분석**

[0383] 항체 분석을 위한 혈액은 IT 용량들 2, 4, 6, 8, 10, 12 이전 대략 1주; 중간-회복, 및 부검시 말초 정맥으로부터 채취되었다. 항체 분석을 위한 CSF 시료들은 수술시, IT 용량들 2, 4, 6, 8, 10, 12 이전 대략 1주, 중간-회복, 및 부검시 요추 카테터에 의해 채취되었다. 메조 스케일 디스커버리 (Meso Scale Discovery (MSD®)) 기법 전기화학발광 브리지 테스트가 항-HNS 항체들의 검출을 위해 사용되었다. 본 검정법은 일반적이지만 민감한, 종이라면 모두 및 면역글로불린 이소형들 모두로부터 얻은 항-HNS 항체들을 검색하는 방법이다. LOD 는 5 ng/mL 이었고, 시료들은 1:20 희석으로 두 벌씩 검색되었고, 100 ng/mL의 효과적인 검정 민감도를 가져왔다; 산정 곡선의 고점을 초과하는 시료들은 좀 더 희석되어 재시험되었다.

[0384] **부검 및 조직들의 준비**

[0385] 원숭이들은 최종 IT 용량들 이후 24시간 (최종 부검) 또는 1개월 회복 기간의 말 (회복 부검)에 전적으로 부검되었다. 모든 원숭이들은 케타민 HCl (IM, 8 mg/kg)으로 진정되었고 이소플루란/산소 혼합물 상에 유지되었으며, 헤파린 소듐 (200 IU/kg)의 IV 주사를 맞았다. 원숭이들은 좌심실을 통해 식염수에 넣은 상온 0.001% 소듐 나이트라이트를 200 ml/분의 속도로 12분 동안 (~2400 ml) 관류시켰다. 다음으로 채취 이후에, 조직 시료들은 조직병리학적 검사/면역조직화학적 분석을 위해 10% 중성 완충 포르말린에서 고정되었고, 드라이아이스 상에 냉동되어 -60°C 이하에서 rhHNS 활성의 분석을 위해 보관되었다.

[0386] 뇌는 3mm 관상 슬라이스 두께로 뇌 매트릭스에서 절단되었다 (MBM-2000C, ASI Instruments, Inc., Warren, MI). 조각들에는 가장 입쪽 조각이 조각 1로 지정되어 번호가 매겨졌다. 조각들 1, 4, 7, 10, 13, 및 16은 조직병리학을 위해 가공되었고 조각들 2, 5, 8, 11, 14, 및 17 은 (사용가능한 경우) 면역조직화학을 위해 가공되었다. 조각들 3, 6, 9, 12, 및 15은 rhHNS 활성의 분석을 위해 냉동되었다. 척수 (경추, 흉추 및 요추 부분들)은 1-cm 절편들로 절단되었다. 첫 번째 조각 및 이후 세 번째 조각은 조직병리학적 평가를 위해 가공되었고, 두 번째 조각 및 이후 세 번째 조각은 면역조직화학적 분석을 위해 가공되었다. 세 번째 조각 및 이후 세 번째 조각은 rhHNS 분석을 위해 냉동되었다. 조각들의 배분은 경막내 카테터의 팁을 포함하는 조각 (조각 0)이 포르말린에 고정되고 조직병리학으로 분석되도록 조절되었다. 간의 ~5 g의 두 벌 시료들을 두 개의 분리된 염들로부터 취하였고 rhHNS 분석을 위해 냉동되었으며, ~5 g의 추가적인 시료가 면역조직화학적 분석을 위해 고정되었다.

[0387] **조직병리학**

[0388] 모든 원숭이들로부터 뇌들, 척수들, 등 척수 신경근들, 신경절, 좌골, 전경골 및 비복 신경들, 완전한 조직 리스트 (본 종에서 본 지속기간의 전임상 약물 안전성 연구들에 전형적임), 및 총 병변들이라면 모두가 부검시 수확되었다. 조직 절편들은 파라핀에 포매되었고 해석적 현미경적 평가를 위해 (하기에 기술된 특별한 염색/포매 절차들에 추가하여) 헤마톡실린 및 에오신으로 염색되었다.

[0389] 장치 및 운반체-대조군 그룹들, 및 고용량 원숭이들로부터 준비된 파라핀 블록들로부터 얻은 뇌 절편들은 형광-제이드 B (뇌를 신경적 퇴화에 대해 평가하는 민감도를 증가시키는 염색) 및 비엘스코우스키 은 염색 (축삭들, 가지세포들 및 신경 필라멘트들의 직접 영상화를 허용하는 절차)으로 염색되었다. 형광-제이드 B 염색된 슬라이드들은 프루오레신 이소티오시아네이트 필터 큐브를 사용하여 형광 빛 하에서 조사되었다.

[0390] 척수들은 카테터 팁에서 취한 절편들을 포함하여 경추, 흉추 및 요추 부위들에서 취한 (각 수준에서 조사되는 하나의 조각) 대각성 및 사선 절편들을 가지며 일련으로 절편화되었다; 추가적인 대각성 절편은 말총 (cauda equine) 부위로부터 가져왔다. 등 척수 신경근들 및 신경절 (중간경추, 중간흉추 및 중간요추)가 가공되어 조사되었다. 말초 신경들 (좌골, 전경골, 비복)은 가로로 절편화되었고 파라핀에 포매되어 헤마톡실린 및 에오신 (H&E)으로 염색되었다. 교차 절편들은 오스뮴으로 후-고정되었고 스푸르 레진 (Spurr's resin)에 포매되었으며 (2 um) 절편화되어 톨루이딘 블루로 염색되었다. 장치 및 운반체 대조군 그룹들 및 고용량 그룹으로부터 일련의 척수 절편들 뿐만 아니라 등 척수신경근들 및 신경절은 비엘스코우스키 은으로 염색되었다. 이들 그룹들로부터 얻은 척수 절편들도 별아교세포들 및 그들의 공정들의 직접 영상화를 허용하는 면역조직화학적 염색인 항-신경교 원섬유 산성 단백질로 역시 염색되었다.

[0391] **정량적 분석을 위한 조직 추출물들의 제조**

[0392] 냉동 뇌 조각들 3, 6, 9, 12, 및 15은 좌우 반구들을 분리하여 절개되었다. 표면 조직은 표면으로부터 4 mm를 측정하여 취하였고, 각 반구에서 남아있는 조직은 깊은 조직으로 고려하였다. 존재하는 경우라면 (예로, 조각들

6 및 9), 추가적인 측실주위 시료가 관상 조각들로부터 절단되었다. 뇌의 절반만 (우측)이 가공되었기 때문에 (좌측은 냉동된채로 남았음), 절편화는 조각 당 둘 내지 셋 시료들을 가져왔다: 우 표면, 우 심부 및 존재하는 경우 우 측실주위 (예로, 깊은 측실; Vdeep). 대뇌 및 뇌줄기 조직들은, 존재할 때 반구들을 분리하기 이전에 분리되었고 독립적으로 가공되었다. 척수 절편들은 유사하게 준비되었고 무게를 달아 균질화되었다.

[0393] 조직 시료들은 TeenA 용해 매트릭스A 튜브들 또는 원추형 폴리프로필렌 튜브들을 사용하여 알파 완전 단백분해 효소 저해제 미니정제 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)가 보충된 10 mM 트리스, 5 mM 에틸렌디아민테트라아세트산, 0.1% Igepal로 제형화된 용해 완충액 (1 ml/0.25 g 조직)에서 균질화되었다. 시료들은 Fastprep-24 자동화 균질화기기 (MP Biomedicals, Solon, OH) 또는 PowerGen 모델 125 강력 균질화기기 (Omni International, Kennesaw, GA)로 40초 동안 가공되었다. 일단 균질화되면, 시료들은 에탄올/드라이아이스 수조 및 37°C 물 수조를 사용하여 5회 냉동-해동 순환 과정을 시행하였고 다음으로 4°C에서 조직 펠렛 잔여물로 원심 분리하였다; 상청액들은 검정될 때까지 -80°C에서 보관되었다. rhHNS 활성은 특이적 기질 (4-메틸엠펠리페릴- $\alpha$ -D-N-설포글루코사미나이드 (4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-N-sulphoglucosaminide)를 사용하여 2-단계 형광측정 검정법으로 결정되었다.

#### [0394] 면역조직화학을 위한 조직 가공 및 염색

[0395] 각 원숭이로부터 나온 3-mm 두께의 6개의 포르말린 고정된 관상 뇌 조각들 (조각 번호들 2, 5, 8, 11, 14, 및 17)은 입부터 꼬리까지 1 내지 6으로 번호매겨졌다. 일반적으로, 조각 1 내지 4는 기저 핵/시상/중뇌 및 대뇌를 포함하였고, 꼬리쪽 2개 조각들은 소뇌 및 뇌줄기 (연수) 조직을 포함하였다. 뇌, 척수 및 간 절편들 (H&E 및 다양한 특별한 염색들에 사용되는 것과 동일한 파라핀 블록들로부터 나옴)은 면역조직화학적으로 rhHNS에 대해 염색되었다. 특이적 마우스 모노클론 항체 (클론 2C7; Maine Biotech, Portland, ME)이 IT-투여된 rhHNS의 세포내 흡수를 검출하는 데 사용되었다; 본 반응액은 내인성 사이노물 원숭이 rhHNS와 교차-반응성을 전혀 보이지 않았다. 음성 대조군들이 부적절한 마우스 IgG를 사용하여 수행되었다. 탈파라핀화된 슬라이드들이 일차 마우스 항-HNS항체와 2-8°C에서 밤샘 배양되었다. 이차 염소 항-마우스 바이오틴화된 면역글로불린 G가 첨가되었고 37°C에서 30분 동안 배양되었다. 아비딘-바이오틴 호스래디쉬 퍼옥시다제 복합체가 첨가되어 30분 동안 배양되었다. 슬라이드들은 퍼옥시다제 기질 디아미노벤지딘 용액에서 원하는 염색 강도가 형성될 때까지 배양되었다. 핵은 헤마톡실린으로 반대염색 되었다.

#### [0396] 통계적 분석들

[0397] 원-웨이 분산 분석 (one-way analysis of variance) 또한 듀넛 테스트 (Dunnett's test)에 의한 장치 및 운반체 대조군 그룹들 및 각 rhHNS-투여 그룹의 비교에 의해, 체중들, 체중 변화들, 음식 소비, 호흡율, 체온, 심장 속도, CSF 세포 계수, CSF 화학, 임상적 병리학 데이터, 소변 데이터, 또한 절대적 및 상대적 기관 무게들이 분석되었다. 또한, 통계적 분석은 두 가지 대조군 그룹들을 서로 비교하였다. 분석은 5% 및 1%의 유의성 수준들로 시행되었다. 모든 데이터는 평균  $\pm$  표준 편차로서 표현된다.

#### [0398] 실시예 5. 헤파란 N-설파타제 생체분배 및 약물역학적 연구들

[0399] 본 실시예에서 실험들은 rhHNS의 단일 정맥내 또는 경막내 (1 또는 10 mg/kg) 이후에 래트들에서 rhHNS의 조직 분포를 결정하도록 설계되었다. 예를 들어, 무엇보다도 이들 실험들의 목적은 양전자 방출 단층촬영법 (PET)을 사용하여 래트들에서 rhHNS의 생체분배 (BD) 특성을 분석하고; 서로 다른 경로들 (IV 또는 IT) 및 서로 다른 용량들 (1 또는 10 mg/kg)로 주어질 때 rhHNS의 배분 양상들을 비교하고; 또한 이들 투여 요법들에서 관심있는 기관들 각각의 rhHNS의 약물역학적 특성들을 결정하는 것이었다.

[0400]  $^{124}$ I-설파미다제 (rhHNS)의 약물역학 (PK) 및 생체분배 (BD) 프로파일들이 1 또는 10 mg/kg의  $^{124}$ I-HNS의 단일 정맥내 (IV) 또는 경막내 (IT) 투여 이후에 래트들에서 조직 PET 영상화에 의해 연구되었다. 관심있는 부위에서 방사능-시간 데이터가 처음 20분 내에 동적 영상들로부터 또한 IV 또는 IT 투여 이후 0.05 (IT 투여만), 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 및 192 시간에 정적 영상들로부터 획득되었다.

[0401] 네 가지 그룹 각각에서 4마리 래트들이 (1 mg/kg IV, 1 mg/kg IT, 10 mg/kg IV 및 10 mg/kg IT)이 본 연구에 사용되었다. 방사능-시간 데이터가 머리, 뇌 (뇌척수액, CSF 포함), 척수 및 간 부위들에서 IT 투여 이후; 또한 혈액, 뇌 (CSF 포함), 간, 신장, 심장 (폐들을 포함) 및 피부에서 IV 투여 이후에 측정되었다. 데이터는 124-요오드의 붕괴 반감기 (100.2시간)에 의해 교정되었고, 관심있는 부위의 주사량의 백분율 (%ID) 또는 영상화된 조

직들 그래프 당 %ID (%ID/g)로서 표현되었으며, 다음으로 200 그래프의 체중으로 정상화되었다. 관심있는 부위에 투여된 단백질의 전체량 (ug) 또는 농도들 (ug/g)은 해당하는 %ID 또는 %ID/g 결과로부터 계산되었다.

[0402] IT 투여 이후 처음 20분에, 머리 부위에서 rhHNS의 전체량은 0.002/분 - 0.011/분 ( $\lambda z$ )의 일정한 속도로 1 및 10 mg/kg로 감소되었다. 청소율들 및 배분 부피들은 본 보고서에서 두 가지 용량들 및 두 가지 투여 경로들 간 약물역학적 비교들에 사용되지 않았다 (추가 정보를 위해 결과 섹션을 참조하라). 뇌로부터 제거의 일정한 속도는 필수적으로 두 가지 테스트 용량들 (1 및 10 mg/kg 각각의 경우  $\lambda z$ : 0.016/시간 대비 0.014/시간)에서 IT 투여 이후 192시간까지의 정적 영상에 의해 결정된 바와 같은 약 2일의 유사한 반감기와 동일하였다.  $C_{max}$  및 AUC (0-최종 또는 0-무한대)는 투여된 용량들과 비례적이었다. 전형 PK 행동은 이들 IT 단일 투여 요법들에서 주어진 1내지 10 mg/kg의 용량 범위로 표시되었다. 농도 구배들은 용량 수준들 둘 다에서 척수의 전방으로부터 말단 절편들까지 관찰되었다.

[0403] IT 투여 이후, rhHNS 단백질은 간에서 rhHNS의 1 mg/kg에서 96시간까지 또한 10 mg/kg에서 192시간까지 측정 가능하였다. 간에서 농도들은 1 mg/kg에서 2시간 및 10 mg/kg에서 7시간에 피크에 도달하였다. 제거는 1 mg/kg에서  $0.030 \pm 0.011/\text{hr}$  (평균  $\lambda z$ ) 이었고, 해당하는  $t_{1/2}$  (1 및 10 mg/kg의 용량들 각각에서 28시간 대비 48시간)를 가지면서 10 mg/kg ( $\lambda z$  0.017  $\pm$  0/hr)에서와 유의하게 서로 다르지 않았다 ( $p=0.10$ ).

[0404] IV투여 이후, 간, 신장, 심장 및 피부에서 제거 반감기들은 1 및 10 mg/kg 에서 각각 간의 경우  $47 \pm 10$  및  $38 \pm 13$  시간, 신장의 경우  $54 \pm 25$  및  $29 \pm 16$  시간, 심장의 경우  $36 \pm 15$  및  $42 \pm 19$  시간 또한 피부의 경우  $40 \pm 21$  및  $31 \pm 13$  시간이었고; 한편 뇌에서의 반감기는  $71 \pm 23$  및  $60 \pm 53$  시간이었다. 간, 피부, 신장, 심장 및 뇌의 경우 평균  $C_{max}$  수치들은 1 mg/kg에서 9.6, 0.30, 0.25, 0.22, 및 0.08 ug/g 또한 10 mg/kg에서 132, 7.9, 3.9, 3.7 및 1.8 ug/g이었다. 개별 동물로부터 얻은  $C_{max}$  수치들을 용량으로 정상화한 이후에, 10 mg/kg에서  $C_{max}$  /용량 수치들은 이들 모든 기관들에서 1 mg/kg에서보다 유의하게 더 높았다 (간의 경우 대부분  $p$ 수치들  $<0.05$ ,  $p=0.06$ ). 간, 피부, 신장, 심장 및 뇌의 경우 AUClast 수치들은 1 mg/kg에서 525, 16, 14, 9 및 7 hr.ug/g 또한 10 mg/kg에서 6747, 276, 183, 201 및 86 hr.ug/g이었다. 정상화 이후, 10 mg/kg에서 AUClast /용량 수치들은 피부에서 1 mg/kg에서보다 유의하게 더 높았고 ( $p<0.01$ ), 심장에서 최저한 서로 달랐고 ( $p=0.06$ ), 간, 뇌 및 신장에서는 유의하게 서로 다르지 않았다 (모두  $p>0.34$ ).

[0405] 동일량의rhHNS가 주사될 때, 경막내 투여는 정맥내 투여보다 로그3 이상 뇌 노출을 가져왔다. 뇌에서 제거 반감기는 IT에 의해 2일 또한 IV 투여에 의해 3일이었다. 그러나, IT 투여 이후 간 노출들은 rhHNS의 동일량에서 IV 투여 이후에서와 유사하였다. 간의 경우 노출 ( $C_{max}$  및 AUClast)은 IT/IV에 의해 1 mg/kg 및 10 mg/kg에서 0.4 - 1.2의 범위이었다.

[0406] 실험적 설계

[0407] 중추신경계 (CNS)는 대부분의 리소좀 축적병들에 취약하고, 산필리포 (점액다당류증 제 III형), 이염색성 백색질 장애 (MLD) 및 헌터 증후군과 같은 이들 질환들의 일정 유형들에서 심각하게 손상된다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 말초적으로 투여될 때 혈액-뇌 장벽을 통한 약한 침투로 인해, CNS 내로 효소적 단백질의 직접 투여는 중추 신경 조직들에서 그들의 농도들을 증가시키고 좀 더 나아가 그들의 치료적 효과들을 증진시킬 수 있다. 본 연구에서는 서로 다른 용량 수준들에서 경막내 (IT 또는 대수조) 투여가 조사되었고 IV 투여와 비교되었다.

[0408] PET는 관심있는 기관에서 시간에 따른 약물 농도의 동적 변화를 제공하도록 비-침습적이고 반복가능하고 정량적인 기술이다. 표적 기관 (혈액 순환에서라기 보다는 활성 부위들)로부터 얻은 동적 농도-시간 데이터가 소중하고, 투여된 약물의 생물학적 활성과 직접 관련된다. 또한, 동물들에서 PET 연구로부터 나온 조직 노출들에 관한 정보가 인간에서 최초 용량의 선택을 안내하는 데 사용될 수 있다.

[0409] 재료들 및 방법들

[0410] 테스트 항목들

[0411] 헤파란 N-설페타제 (rhHNS)는 145 mM 염화나트륨을 가지는 5 mM 소듐 포스페이트 완충액으로 pH 7.0에서 20 mg/mL의 rhHNS 농도로 제형화되었다. 재료는 RP-HPLC에 의해 정제되었고 98.7%의 헤파란 N-설페타제를 99.9%의 이량체로 포함하였다. rhHNS는 <sup>124</sup>요오드로 표지되었다.

[0412] 시료 출처

- [0413] 방사능 영상들이 1 및 10 mg/kg으로 <sup>124</sup>I-H-N-설파타제 IV 및 IT 투여 이후에 래트들로부터 나왔다.
- [0414] **동물들**
- [0415] 16마리 수컷 스프라그-달리 래트들은 찰스 리버 연구실사 (Charles River Laboratories)로부터 구입하였고 (190 ± 60 g, n = 16), 네 가지 그룹들로 분리되었다 (n = 4). 서로 다른 두 가지 용량들로 (1 mg/kg 및 10 mg/kg) 단일 IV 또는 IT 주사가 이들 래트들의 각 그룹에 주어졌다 (전부 4 그룹들). 용량 및 주사 부위는 각 동물의 체중을 기초로 하여 개별화되었다. 두 가지 IV-처리 그룹들에서, 35 mg/kg으로 소듐 펜토바비탈 (sodium pentobarbital)의 IV 주사에 의해 진정되었다. 정맥내 용량들은 꼬리 정맥을 통해 볼루스로 주사되었다. 두 가지 IT-처리된 그룹들에서는, 동물들이 50 mg/kg 용량으로 소듐 펜토바비탈의 복강내 투여에 의해 마취되었다. 경막내 용량들은 1분 동안 대수조 수준으로 환추-후두막 (atlanto-occipital membrane)을 통해 투여되었다. 실제 투여된 방사능은 PET에 의해 측정되었고 주사된 용량으로서 제공된다.
- [0416] **실험적 및/또는 검정 방법(들)**
- [0417] 동적 영상들 (매 2분)이 용량들 둘 다의 IV 투여 이후 처음 20분에 심장 (폐들 포함), 간 및 신장들의 부위들에서; 또한 IT 투여 이후에 머리 부위에서 획득되었다. 정적 영상화는 IV-처리된 그룹에서 뇌 (뇌척수액, CSF 포함), 간, 신장, 심장 (폐들 포함), 근육, 피부 및 뼈를 포함하는 부위들에서; 또한 투여 이후 0.05 (IT 그룹들에만 사용가능함), 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 및 192 시간에 IT-처리된 동물들의 머리, 뇌 (CSF 포함) 및 간의 부위에서 획득되었다. 영상들은 재구성되었고 세 가지의 신체 절편들이 하나의 영상으로 융합되었다.
- [0418] **데이터 분석들**
- [0419] PET 결과는 mL 당 (체액의 경우) 또는 그램 당 (조직의 경우) 나노큐리 (nCi)로 표현되었다. 상대적 활성이 뇌, 간, 신장들, 골격근, 위, 심장 (폐들 포함) 및 피부 부위들의 경우 정적 영상들로 획득되었다. 전체 머리 또는 뇌 부위들에서 절대적 활성은 IT 주사들을 맞은 동물들의 경우에 획득되었다. 척수 컬럼의 밀리미터 당 방사능이 IT 주사된 동물들에서 세 가지 선택된 절편들로 결정되었다: 전방 (목), 중간 (간의 상부 모서리 기준), 및 말단 (구획을 포함하는 단백질의 말단으로부터 1cm) 척수.
- [0420] 모든 데이터는 <sup>124</sup>I 붕괴 반감기 (100.2시간)에 의해 교정되었고, 외부적으로 측정된 활성을 가진 <sup>124</sup>I 출처의 산정을 기초로 하여 등록된 효능을 위해 정상화되었다. 데이터는 전체 부위 (머리 및 뇌)의 주사량의 백분율 (%ID) 또는 조직 그램 당 %ID (%ID/g)로서 표현되었으며, 다음으로 200 그램의 체중으로 정상화되었다 [데이터 정상화: (%ID or %ID/g) / 동물의 체중 x 200]. 정상화는 단지 네 마리 동물들이 각 그룹에 사용되었기 때문에 데이터의 다양성을 줄이도록 채택되었다.
- [0421] 본 실시예에서, rhHNS 단백질 농도들 또는 양은 각 동물에 주사된 단백질 용량을 사용하여 계산되었다: 단백질 농도 (ug/g) = (%ID/g) x (mg/kg 주사된 용량 x 1000 x 0.2); 관심있는 부위에서 투여된 단백질의 전체량 (ug) = %ID x (mg/kg 주사된 용량 x 1000 x 0.2), 여기에서 주사된 용량은 1 mg/kg 또는 10 mg/kg이었고, 0.2는 체중의 경우 정상화 팩터이다. 각 PK 변수의 그룹 평균 및 표준 편차는 네 그룹들의 각각에서 개별적 비구획 데이터를 기초로 하여 계산되었다. 스튜던트 *t*-테스트가 두 가지 테스트 용량들 및 두 가지 투여 경로들 간에  $\lambda_z$ ,  $t_{1/2}$ ,  $C_{max}$  및 AUC 수치들을 비교하도록 수행되었다. 통계적 유의성은 0.05 ( $p < 0.05$ ) 이하의 *p*-값으로서 정의되었다.
- [0422] **결과들**
- [0423] 다음의 표들, 도면들, 및 PK 분석들에서 rhHNS의 양들 (ug) 또는 농도들 (ug/g) 이 주사된 단백질 용량을 (1 mg/kg 또는 10 mg/kg) 해당하는 of %ID 또는 %ID/g 수치들로 배가하여 계산되었다.
- [0424] 1 및 10 mg/kg 용량의 <sup>124</sup>I-HNS로 경막내 치료
- [0425] 동적 영상들로부터 머리 부위에 투여된 단백질 (ug)의 양이 시간의 함수로서 도 17에 좌표 표시되었다. 정적 영상들로부터 뇌 부위들에서의 농도 (ug/g)가 시간의 함수로서 도 18에 좌표 표시되었다. 정적 영상들로부터 뇌 및 머리 부위들에서 주사된 단백질의 전체량 (ug)은 시간으로 각각 도 19 및 도 20에 좌표 표시되었다. 전방, 중간 및 말단 척수에서 농도-시간 곡선 (ug/mm)은 도 21 내지 도 22에 나타나 있다. 도 24는 간에서 1 및 10 mg/kg으로 <sup>124</sup>I-HNS의 IT 투여 이후 시간으로 rhHNS 농도 (ug/g)의 변화들을 나타낸다.
- [0426] 전체량-시간 (ug) 또는 농도-시간 (ug/g) 결과는 비구획 모델들에 의해 (WinNonlin 5.2, Pharsight, Mountain



View, CA) 분석되었다. 제거의 일정한 속도 ( $\lambda_z$ ), 피크 농도 ( $C_{max}$ ), 최종 반감기 ( $t_{1/2}$ ), 곡선 아래 영역 ( $AUC_{last}$  및  $AUC_{0-inf}$ ) 등과 같은 PK 변수들이 각 개별 동물의 결과들로부터 추정되었다.

[0427] 청소율들 및 배분 부피들이 추정되지만, 그들은 본 보고서에서 두 가지 이유 (1) 본 연구가 혈액 PK보다는 고형 조직들에서 rhHNS의 생체분배에 초점을 맞추었고; (2) 뇌 부위에서 방사능은 본 연구에서 분리될 수 없는 뇌 조직 (고체) 및 CSF (액체)로부터 얻은 것들의 합계이기 때문에, 두 가지 용량들 및 두 가지 투여 경로들 간 PK 비교들에 사용되지 않았다.  $\lambda_z$ 가 단위 시간 당 제거되는 주사된 용량의 백분율을 표시하기 때문에 평가되었고 비교에 사용되었다.

[0428] 그룹 평균들 및 표준 편차들 (SD)이 계산되었고 두 가지 테스트 용량들 간에 비교되었다. 이들 PK 변수들은 하기 표 23에 도표화된다. 하기 표 23은 1 및 10 mg/kg의  $^{124}$ I-HNS IT 및 IV 투여 이후에 다양한 기관들에서 비-구획 PK 변수들 (그룹 평균  $\pm$  SD)의 요약을 나타낸다.

표 23

1 mg/kg IT		뇌 (ug/g)*		간		뇌 (ug)*		머리 (ug)*		근위		중간		원위	
변수		평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
$\lambda_z$		0.016	0.003	0.030	0.011	0.017	0.002	0.016	0.002	0.025	0.012	0.020	0.008	0.028	0.016
$t_{1/2}$		45	7	28	16	42	5	45	7	32	13	39	16	30	12
$T_{max}$		0.1	0.0	2.3	1.3	2.0	4.0	0.1	0.0	0.3	0.5	1.8	1.5	1.0	0.0
$C_{max}$		257.0	89.9	4.9	1.3	68.6	8.0	200.1	0.0	0.5	0.1	0.2	0.0	0.1	0.0
$AUC_{last}$		8393	2457	204	50	3809	622	8216	782	9	3	7	3	2	1
$AUC_{inf}$		8942	2416	216	57	4030	643	8904	1069	11	3	8	3	3	2
$MRT_{last}$		46	6	32	13	44	5	46	5	31	17	34	20	16	5

10 mg/kg IT		$\lambda_z$		$t_{1/2}$		$T_{max}$		$C_{max}$		$AUC_{last}$		$AUC_{inf}$		$MRT_{last}$	
변수		평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
$\lambda_z$		0.014	0.001	0.017	0.000	0.014	0.001	0.010	0.001	0.018	0.008	0.014	-	0.006	-
$t_{1/2}$		49	4	42	1	51	5	70	9	45	18	50	-	123	-
$T_{max}$		0.1	0.0	7.0	2.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.3	0.5	8.7	13.3	8.0	-
$C_{max}$		2628	265	105	41	836	117	1844	314	6	4	1	0	1	-
$AUC_{last}$		83962	10083	7987	3276	59115	8624	128751	15723	83	67	35	20	38	-
$AUC_{inf}$		89460	12098	8345	3424	63836	9466	151405	15123	98	66	60	-	73	-
$MRT_{last}$		56	1	51	1	58	2	65	3	31	2	32	7	61	-

1 mg/kg IV		뇌 (ug/g)*		간		신장		심장		피부	
변수		평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
$\lambda_z$		0.011	0.005	0.015	0.003	0.016	0.009	0.021	0.006	0.021	0.010
$t_{1/2}$		71	23	47	10	54	25	36	15	40	21
$T_{max}$		7	12	5	4	10	12	2	1	5	4
$C_{max}$		0.1	0.0	9.6	1.5	0.2	0.1	0.2	0.0	0.3	0.1
$AUC_{last}$		7	2	525	104	14	5	9	3	16	4
$AUC_{inf}$		9	3	576	138	16	6	10	3	18	5
$MRT_{last}$		61	16	47	5	47	18	36	13	41	16

10 mg/kg IV		$\lambda_z$		$t_{1/2}$		$T_{max}$		$C_{max}$		$AUC_{last}$		$AUC_{inf}$		$MRT_{last}$	
변수		평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
$\lambda_z$		0.102	0.180	0.021	0.012	0.035	0.024	0.020	0.010	0.026	0.012				
$t_{1/2}$		60.5	53.1	37.8	13.4	28.4	16.4	41.6	18.6	31.0	12.7				
$T_{max}$		13	12	2	1	12	11	16	9	3	1				
$C_{max}$		1.8	0.2	131.6	26.8	3.9	0.7	3.7	0.7	7.9	2.3				
$AUC_{last}$		86	66	6747	2837	183	123	201	89	276	40				
$AUC_{inf}$		118	98	7171	3029	198	131	230	110	292	43				
$MRT_{last}$		43	32	40	14	33	21	41	18	33	13				

[0429]

[0430] 투여 이후 처음 20분에, 머리 부위에서 rhHNS의 전체량 (ug)은 1 mg/kg에서 분당 0.002 - 0.011 ( $\lambda_z$ ,  $0.005 \pm 0.004$ /분) 또한 1 mg/kg에서 분당 0.003 - 0.010 ( $0.007 \pm 0.003$ /분)의 일정한 속도로 감소되었다. 이들 제거의 일정한 속도는 이들 두 가지 용량 수준들에서 유의하게 서로 다르지 않았다 ( $p=0.57$ , 도 17).

[0431] 뇌의 경우 농도-시간 곡선 (0.05로부터 192까지의 시간 ug/g)은 이단계 (bi-phasic) 프로파일을 가르켰다 (도 18). 초기 단계는 약 두 시간 지속된다. 말기 단계는 일차 역학을 따른다. 뇌로부터 제거의 일정한 속도들은 두 가지의 테스트된 용량들에서 약 2일의 유사한 반감기와 함께 (1 및 10 mg/kg에서 각각  $45 \pm 7$  및  $49 \pm 4$  시간) 매우 유사하였다 (시간 당  $0.0016 \pm 0.003$  및  $0.014 \pm 0.001$ ). 피크 농도들 ( $257 \pm 90$  및  $2628 \pm 265$  ug/g) 및  $AUC_{last}$  (1 및 10 mg/kg에서 각각  $8393 \pm 2457$  및  $83962 \pm 10083$  hr.ug/g)의 수치들은 용량이 1로부터 10 mg/kg까지 증가될 때 대략 10배 증가한다. 이들 관찰은 이들 IT 단일 투여 요법들에서 주어진 1 내지 10 mg/kg의 용량 범위에서 선행의 PK 행동을 가르켰다. IT 투여 이후에 뇌에서 피크 농도는 3분 ( $T_{max}$ )으로 나타났다.

[0432] 뇌 및 머리 부위들에서 전체량-시간 곡선 (0.05로부터 192시간까지 ug)은 뇌에서의 농도-시간 곡선들 (ug/g)에



서 보여지는 바와 동일한 이단계 양식을 따랐다 (도 19 및 도 20). 뇌 부위에서 Cmax 수치들은 머리 부위에서보다 유의하게 더 낮았다 (각각 1 mg/kg에서  $69 \pm 8$  대비  $200 \pm 0$  at,  $p < 0.01$ ; 10 mg/kg에서  $836 \pm 117$  대비  $1844 \pm 314$  ug,  $p < 0.01$ ). 제거의 일정한 속도들은 1 및 10 mg/kg에서 각각 뇌의 경우  $0.017 \pm 0.002/\text{hr}$  및  $0.014 \pm 0.001/\text{hr}$ , 또한 머리 부위의 경우  $0.016 \pm 0.002$  및  $0.010 \pm 0.001/\text{hr}$ 이었다. 평균 잔류 시간의 수치들은 1 및 10 mg/kg에서 각각 뇌의 경우  $42 \pm 5$  대비  $51 \pm 5$  시간 ( $p = 0.048$ ), 또한 머리 부위의 경우  $45 \pm 7$  versus  $70 \pm 9$  시간 ( $p < 0.01$ )이었다. 이들 관찰들은 투여된 단백질이 고용량들보다 저용량에서 더욱 신속하게 제거된 점을 제시하였다. 평균 반감기들은 1 및 10 mg/kg의 rhHNS를 IT 투여한 이후 이들 부위들에서 42 내지 70 시간의 범위이었다.

[0433] 농도 구배가 용량 수준들 둘 다에서 척수의 전방으로부터 중간 및 말단 절편들까지 관찰되었다 (결과 미도시). IT 투여 이후, 피크 농도 (ug/mm 척수 컬럼)는 전방에서 30분 주변 (0 내지 1시간), 중간에서 1 내지 4시간 (한 마리 래트만 24시간), 또한 말단 절편들에서 1 내지 8시간이었다. 이들 절편들에서 반감기들은 다양하였다 (평균  $t_{1/2}$ : 1 mg/kg 및 10 mg/kg 각각에서 척수의 전방의 경우  $32 \pm 13$  및  $45 \pm 18$ 시간, 중간의 경우  $39 \pm 16$  및 약 50시간 또한 말단의 경우  $30 \pm 12$  및 약 123시간). 피크 농도들의 평균 수치들은  $^{124}\text{I}$ -HNS의 1 mg/kg 및 10 mg/kg에서 이들 세 가지 절편들에서 용량들에 거의 비례적이었다 (척수의 전방, 중간 및 말단 절편들에서 각각 0.5 대비 6.0, 0.2 대비 0.9 및 0.1 대비 0.5 ug/mm). AUClast의 평균 수치들은 피크 농도에서 관찰되는 바와 동일한 비례적 양상을 따랐다 (전방, 중간 및 말단 절편들에서 각각 9.5 대비 83, 6.8 대비 35, 및 2 대비 38 hr.ug/mm).

[0434] rhHNS가 대부분의 말초 기관들에서 검출가능하지 않더라도, IT 투여 이후 간에서는 1 mg/kg에서 1시간 정도 (투여 이후 첫 영상 시간대)로부터 96시간 (네 마리 동물의 세 마리)까지 또한 10 mg/kg에서 192시간까지로 측정가능하였다 (도 24). 간에서 농도들은 1 mg/kg의 IT투여 이후 2시간 또한 10 mg/kg의 IT투여 이후 7시간의 피크에 도달하였고, 이는 일차 역학을 가진 제거 단계로 이어졌다. 제거의 일정한 속도는 해당하는 더 짧은  $t_{1/2}$ 를 가지고 (1 및 10 mg/kg의 용량들 각각에서  $28 \pm 16$  대비  $42 \pm 1$ ,  $p = 0.76$ ), 1 mg/kg에서는 ( $\lambda_z$   $0.030 \pm 0.011/\text{hr}$ ) 10 mg/kg보다 ( $\lambda_z$   $0.017 \pm 0/\text{hr}$ ) 더 빨랐다 ( $p = 0.10$ ). AUClast 수치는 10 mg/kg에서와 비교하여 약 40배 감소하였다 (각각  $204 \pm 50$  대비  $7987 \pm 3276$  ug/g).

[0435] 1 및 10 mg/kg의 용량들의  $^{124}\text{I}$ -HNS로 정맥내 치료

[0436] 도 25 내지 도 29에 각각 나타난 바와 같이, 1 및 10 mg/kg의 rhHNS를 IV 투여한 이후, 뇌, 간, 신장, 심장 (폐 조직 포함) 및 피부에서 농도가 시간의 함수로서 좌표 표시되었다. 이들 기관들의 경우 첫 정적 영상 시간대가 투여 이후 1시간이기 때문에, 이들 농도-시간 곡선들의 초기 단계는 본 연구에서 관찰될 수 없었다. 간, 신장, 심장 및 피부의 경우 농도-시간 곡선들이 IV 투여 이후 1으로부터 8시간까지 편평한 단계를 보여주었다. 본 편평한 단계는 투여 이후 뇌에서 24시간 동안 지속되었고, 뇌가 IV 투여된 단백질을 말초 기관들에 의한 것보다 느리게 흡수하는 점을 제시하였다. 나머지 결과는 대략 일차 역학으로 최종 제거 단계를 표시하였다.

[0437] 간, 신장, 심장 및 피부에서 제거 반감기들은 1 및 10 mg/kg에서 각각 간의 경우  $47 \pm 10$  및  $38 \pm 13$  시간, 신장의 경우  $54 \pm 25$  및  $29 \pm 16$  시간, 심장의 경우  $36 \pm 15$  및  $42 \pm 19$  시간, 피부의 경우  $40 \pm 21$  및  $31 \pm 13$  시간인 한편; 뇌에서의 반감기는 1 및 10 mg/kg에서 각각  $71 \pm 23$  및  $60 \pm 53$  시간 (10 mg/kg 그룹에서 래트 3은  $t_{1/2}$ 을 결정하는 데 불충분한 데이터로 배제됨)이었다. 통계적 차이들은 이들 기관들에서 신장의 경우  $p$  수치  $< 0.03$ 를 제외하고 1 및 10 mg/kg에서의 반감기들 간에 관찰되지 않았다.

[0438] 간, 피부, 심장, 신장 및 뇌의 경우 Cmax의 평균 수치들은 1 mg/kg에서 9.6, 0.3, 0.25, 0.22, 및 0.08 ug/g 또한 10 mg/kg에서 132, 7.9, 3.9, 3.7 및 1.8 ug/g이었다. 10 mg/kg에서 Cmax 와 1 mg/kg에서 해당하는 수치들의 비율들은 이들 기관들의 경우 14, 26, 16, 17 및 23이었다. 개별 동물로부터 얻은 Cmax 수치들은 용량으로 정상화된 이후, Cmax/용량 수치들은 모든 이들 기관들에서 10 mg/kg에서는 1 mg/kg 에서보다 유의하게 더 높았다 (간의 경우 대부분의  $p$  수치들  $< 0.05$ ,  $p = 0.06$ ). 간, 피부, 신장, 심장 및 뇌의 경우 AUClast의 수치들은 1 mg/kg에서 525, 16, 14, 9.3 및 7 hr.ug/g; 또한 10 mg/kg에서 6747, 276, 183, 201 및 86 hr.ug/g이었다. 10 mg/kg에서 AUClast 와 1 mg/kg에서 해당하는 수치들의 비율들은 이들 기관들의 경우 각각 13, 17, 13, 22 및 12 이었다. 정상화 이후, AUClast/용량 수치들은 10 mg/kg에서는 피부에서 1 mg/kg에서보다 유의하게 더 높았고 ( $p < 0.01$ ), 심장에서 최저한 서로 달랐고 ( $p = 0.06$ ), 간, 뇌 및 신장에서는 유의하게 서로 다르지 않았다 (모두  $p$  값  $> 0.34$ ).

[0439] 이들 관찰들은 (1) 대부분 기관들에서 반감기들이 뇌를 제외하고 (3일) 약 2일이었고; (2) 간에서 그램 당 노출

이 뇌의 노출보다 더 큰 피부, 심장 및 신장보다 더 컸고; (3) 용량에서 10배 증가로 (10 / 1 mg/kg), 10 mg/kg에서 모든 테스트된 기관들로부터 얻은 Cmax가 1 mg/kg에서의 것보다 10배 이상 증가된 점을 제시하였다.

[0440] IV 투여 이후에, 뇌에서 피크 농도는 1- 24 시간 (Tmax)에 달하였다.

#### [0441] IV 대비 IT 치료들

[0442] 1 및 10 mg/kg으로 IV 및 IT 투여 이후, 뇌 및 간에서 농도-시간 곡선들은 각각 도 30 및 도 31에서 비교되었다. 1 및 10 mg/kg으로 IV 및 IT 투여에 의해 뇌에서 Cmax의 비율들은 각각 3212 및 150이었다. AUC0-192시간의 이들 비율들은 1136 및 978이었다. 이들 관찰들은 rhHNS의 동일한 용량이 투여될 때, 경막내 투여가 정맥내 투여의 결과보다 대략 3-로그 이상 뇌의 노출을 가져오는 점을 가르켰다. 뇌에서 제거 반감기는 둘 다의 용량 수준들에서 IT에 의해 2일 (1 및 10 mg/kg에서 45 및 49시간) 또한 IV 투여에 의해 3일 (1 및 10 mg/kg에서 71 및 60시간)이었다.

[0443] 그러나, IT 투여 이후 간 노출들은 rhHNS의 동일한 용량에서 IV 투여 이후의 노출과 유사하였다. 간에서 1 mg/kg 및 10 mg/kg에서 IT/IV에 의한 Cmax의 비율들은 각각 0.5 및 0.8이었고 AUClast의 비율들은 0.4 및 1.2이었다.

#### [0444] 결론들

[0445] 124I-설퍼미다제 (rhHNS)의 약물역학 및 생체분배 프로파일들은 단일 1 또는 10 mg/kg의 <sup>124</sup>I-설퍼미다제의 정맥내 또는 경막내 투여 이후에 래트들에서의 조직 PET 영상들에 의해 연구되었다. 농도-시간 데이터는 투여 이후 0.05, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 및 192시간에 관심있는 부위들에서 동적 (처음 20분) 및 정적 둘 다로 획득되었다. IT x여 이후 동적인 영상화에 의해, 머리 부위에서 rhHNS의 전체량은 처음 20분에 0.005/분 - 0.007/분 (평균 λz)의 유사한 일정한 속도로 감소되었다. 정적인 영상화에 의해 뇌로부터 제거율들은 필수적으로 두 테스트된 용량들에서 약 2일의 유사한 반감기를 가지면서 동일하였다 (λz: 1 및 10 mg/kg 각각의 경우 0.016/시간 대비 0.014/시간).

[0446] Cmax 및 AUClast의 수치들은 투여된 용량들과 비례적이었다. 선형 PK 행동은 이들 IT 단일 투여 요법들에서 주어진 1 내지 10 mg/kg의 용량 범위로 표시되었다.

[0447] 농도 구배들은 용량 수준들 둘 다에서 척수의 전방으로부터 말단까지 관찰되었다.

[0448] IT 투여 이후, 피크 농도는 전방에서 20분 주변, 중간에서 1 내지 4시간, 또한 말단 절편들에서 1 내지 8시간이었다. 선형의 PK 행동은 척수의 서로 다른 절편들에서도 역시 표시되었다.

[0449] IT 투여 이후에, rhHNS 단백질은 1 mg/kg에서 매우 초기 시간대로부터 96시간 또한 10 mg/kg에서는 192시간까지 측정가능하였다. 제거의 속도는 더 낮은 용량에서 해당하는 더 짧은 t1/2를 가지고 (1 및 10 mg/kg의 용량들 각각에서 28 ± 16 대비 42 ± 1, p=0.76), 1 mg/kg에서는 (λz 0.030 ± 0.011/hr) 10 mg/kg보다 (λz 0.017 ± 0/hr) 더 빨랐다.

[0450] IV 투여 이후에, 간, 신장, 심장 및 피부에서 제거 반감기들은 1 및 10 mg/kg에서 각각 간의 경우 47 ± 10 및 38 ± 13 시간, 신장의 경우 54 ± 25 및 29 ± 16 시간, 심장의 경우 36 ± 15 및 42 ± 19 시간, 피부의 경우 40 ± 21 및 31 ± 13 시간인 한편; 뇌에서의 반감기는 71 ± 23 및 60 ± 53 시간이었다. 간, 피부, 심장, 신장 및 뇌의 경우 Cmax의 평균 수치들은 1 mg/kg에서 9.6, 0.3, 0.25, 0.22, 및 0.08 ug/g 또한 10 mg/kg에서 132, 7.9, 3.9, 3.7 및 1.8 ug/g이었다. 개별 동물로부터 얻은 Cmax 수치들은 용량으로 정상화된 이후, Cmax/용량 수치들은 모든 이들 기관들에서 10 mg/kg에서는 1 mg/kg 에서보다 유의하게 더 높았다 (간의 경우 대부분의 p 수치들 <0.05, p=0.06). 간, 피부, 신장, 심장 및 뇌의 경우 AUClast의 수치들은 1 mg/kg에서 525, 16, 14, 9.3 및 7 hr.ug/g; 또한 10 mg/kg에서 6747, 276, 183, 201 및 86 hr.ug/g이었다. 정상화 이후, AUClast/용량 수치들은 10 mg/kg에서는 피부에서 1 mg/kg에서보다 유의하게 더 높았고 (p<0.01), 심장에서 최저한 서로 달랐고 (p=0.06), 간, 뇌 및 신장에서는 유의하게 서로 다르지 않았다 (모두 p값>0.34).

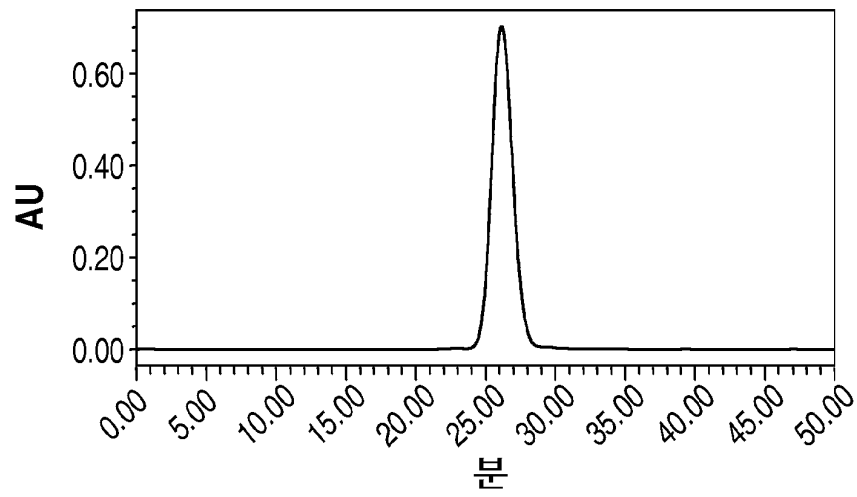
#### [0451] 실시예 6. RHNS로 산필리포 A형 (SanA) 환자들의 치료

[0452] 예로, IT 전달을 통한 직접 CNS 투여는 SanA 환자들을 효과적으로 치료하는 데 사용될 수 있다. 본 실시예는 SanA를 가진 환자들에게 경막내 약물 전달 장치 (IDDD)를 통해 투여된 rhHNS의 전부 40주 동안 격주로 (EOW) 3 번 용량 수준들까지의 안전성을 평가하도록 설계된 다중심 용량 점증 연구를 설명하고 있다. 인간 치료에 적합한 다양한 대표적인 경막내 약물 전달 장치들이 도 32-35에 나타나있다.

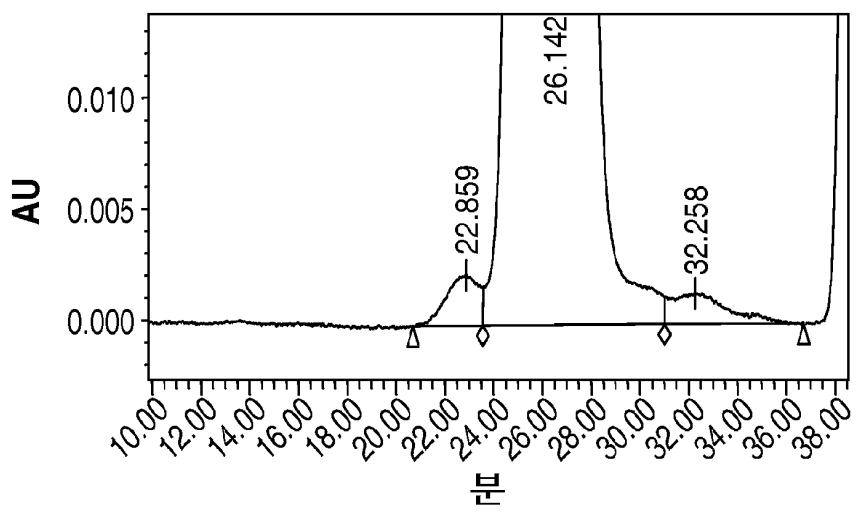
- [0453] 한 가지 상세한 실시예에서, 16명까지의 환자들이 참가할 것이다:
- [0454] 집단1: 4명 환자들 (최저 용량 -10 mg)
- [0455] 집단 2: 4 명 환자들 (중간 용량 - 30 mg)
- [0456] 집단3: 4 명 환자들 (최고 용량 - 100 mg)
- [0457] 4명 환자들이 무작위로 미치료 또는 장치 사용이 될 것이다.
- [0458] 일반적으로 산필리포 증후군 A형 환자들은 무엇보다도 초기 발달 지표들 (예로, 걷기, 말하기, 배변 훈련)의 지연, 지능적 결함, 과다 활동성, 난청, 손상된 언어 발달, 운동 능력들의 결여, 공격성 및/또는 수면 방해들을 포함하는 인지 및 신경발달 손상을 보여준다. 모든 지표들은 임상시험들을 위한 판단기준의 일부가 될 수 있다. 환자들은 다음의 판단기준의 포함을 기초로 하여 연구를 위해 선택된다: (1) 3 - 18세의 연령; (2) 77이하의 지능 지수 또는 과거 3년 동안 15 내지 30의 IQ 강하; (3) CSF 무차단 또는 거의 조절되지 않는 발작 장애; 또한 (4) 무감각 및/또는 수술적 위험들을 나타내는 동반이환 없음.
- [0459] 만기 소아 산필리포 증후군 A형을 가진 아동들에서 6개월 동안 IT 주사에 의해 투여된 rhHNS의 상승 용량들의 안전성이 결정된다. 참가 및 상승은 환자의 안전성의 완벽한 평가를 제공하도록 매우 천천히 진행될 수 있다. 추가적으로, 총 운동 기능 및 혈청에서 단일 및 반복-용량 약물역학에 미치는 rhHNS의 임상적 활성 또한 뇌척수액 (CSF)에서 농도들이 평가된다.
- [0460] 본 연구의 목적은 rhHNS의 상승하는 용량들의 안정성 및 내성도뿐만 아니라 IDDD의 안전성, 내성도 및 장기간 개방성을 평가하는 것이 될 것이다. 추가적으로, CSF 및 혈액 둘 다에서 단일 및 반복 IT 용량들 이후에 rhHNS의 농도 뿐만 아니라 CF 바이오마커들 및 노 GAG에 미치는 rhHNS의 효과들, 심화 평가는 생리학 및 신경인지 평가들, 신경 기능 및 뇌 구조 부피들과 같은 임상적 변수들에 미치는 rhHNS의 효과들을 포함할 것이다. 추가적으로, 매일의 생활에 미치는 치료의 효과들 및 바이오마커들 및 증상들 간의 관련성들이 평가될 수 있다.
- [0461] 전형적으로, rhHNS의 IT 전달에 의한 산필리포 증후군 A형의 치료는 다양한 조직들 (예로, 신경계, 신장들, 방광, 및 기타 다른 기관들)에서 GAG 축적의 감소를 가져온다.
- [0462] 본 명세서에서 기술된 소정의 화합물들, 조성물들 및 방법들이 소정의 구현예들에 따른 특이성을 가지고 기술되어 왔으며, 다음의 실시예들은 본 발명의 화합물들 단지 기술하기 위해서만 제공되고 이들을 제한하려고 의도하지 않는다.
- [0463] 여기에서 사용되는 바, 용어 표현들 "하나 (a)" 및 "하나 (an)"는 본 명세서에서, 및 청구항들에서 복수의 형태들을 포함하도록 분명하게 반대로 가르키지 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 채용되는지 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

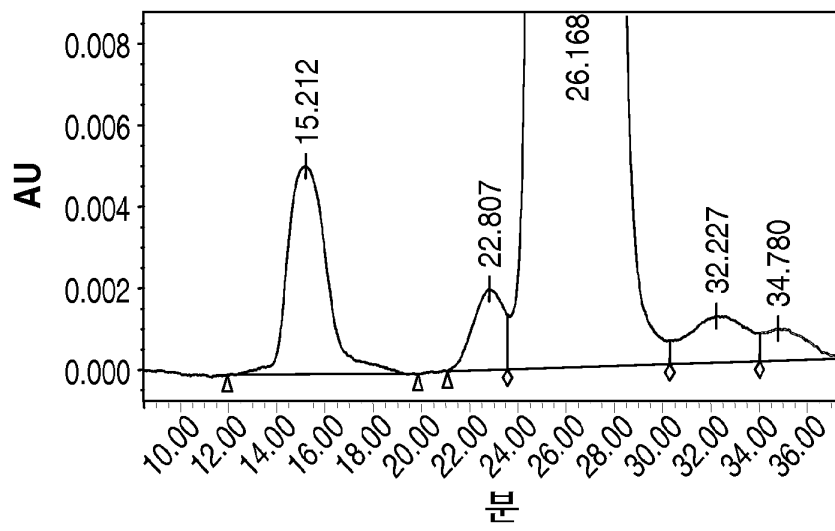
도면1a



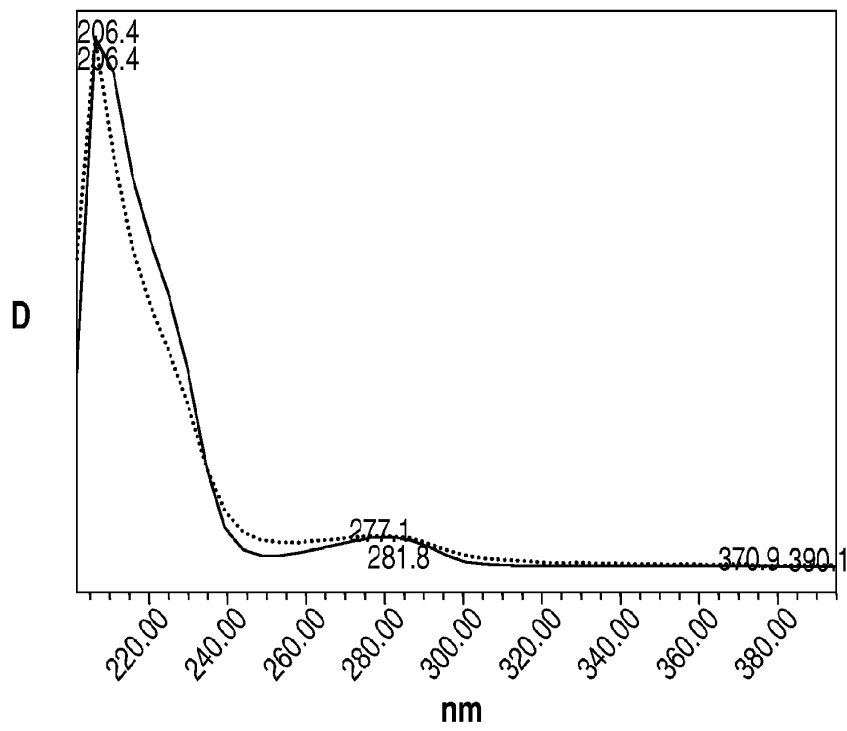
도면1b



도면1c

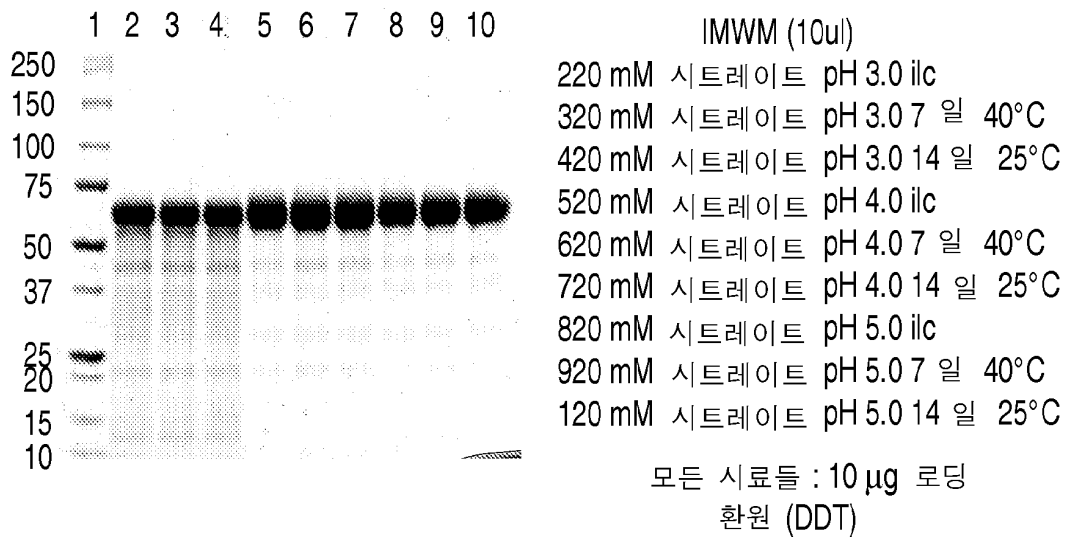


도면1d

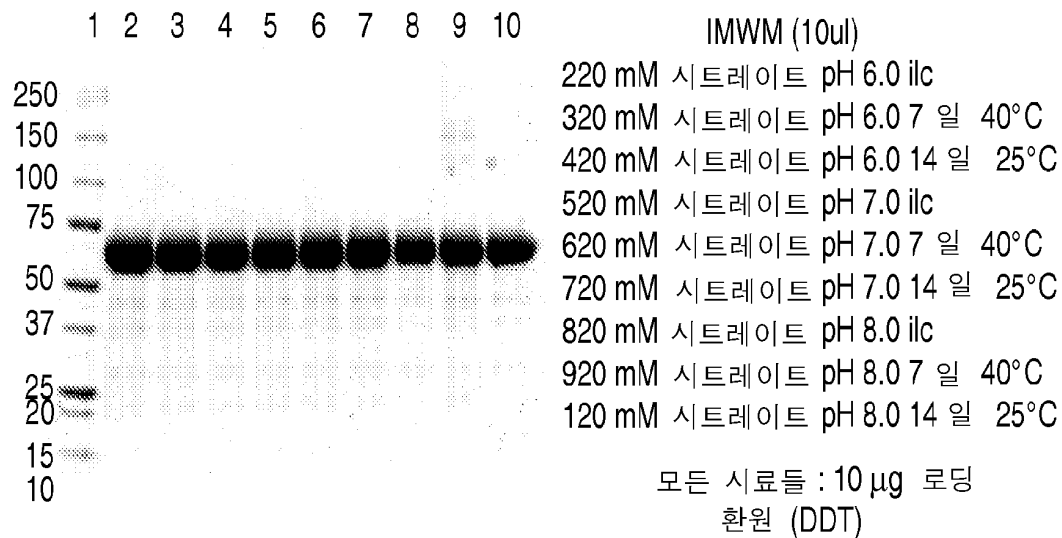




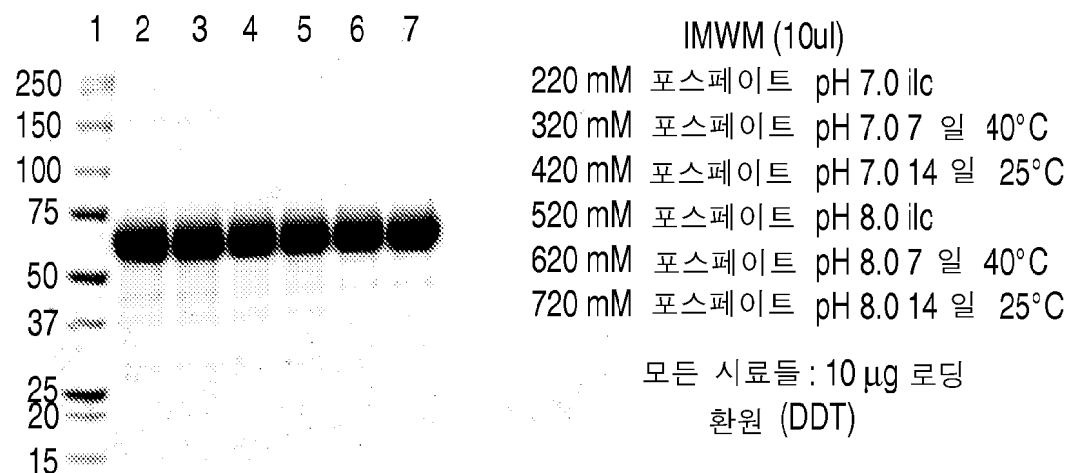
도면2a



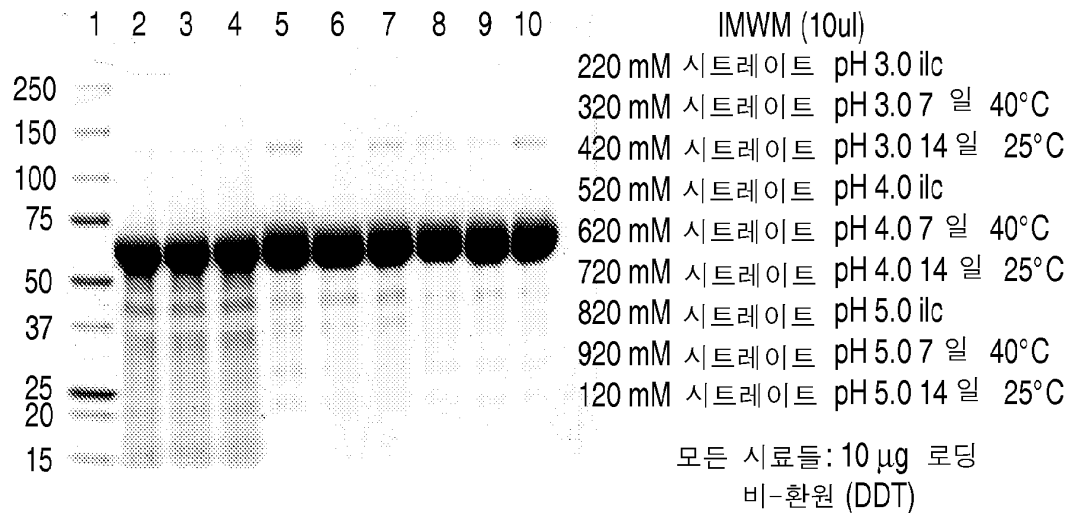
도면2b



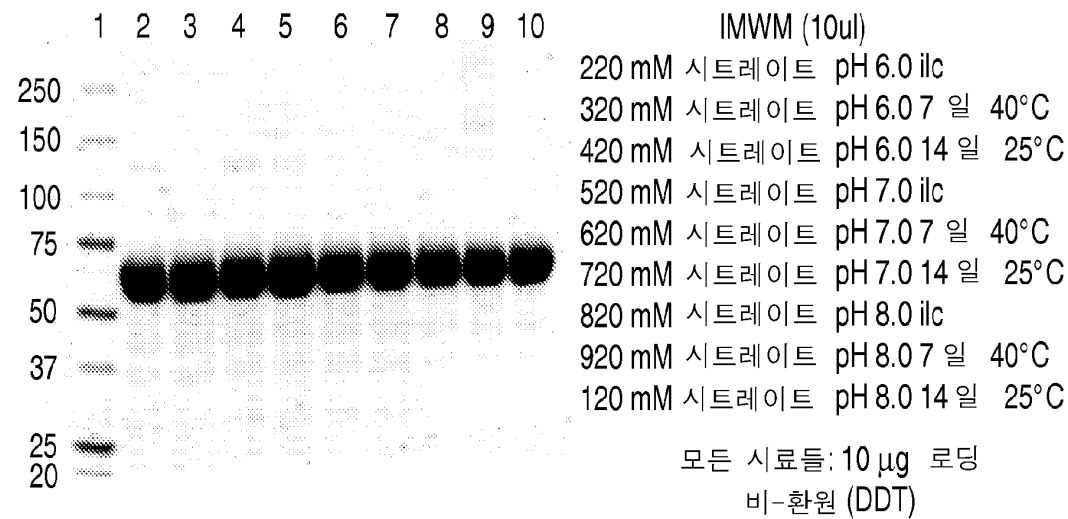
도면2c



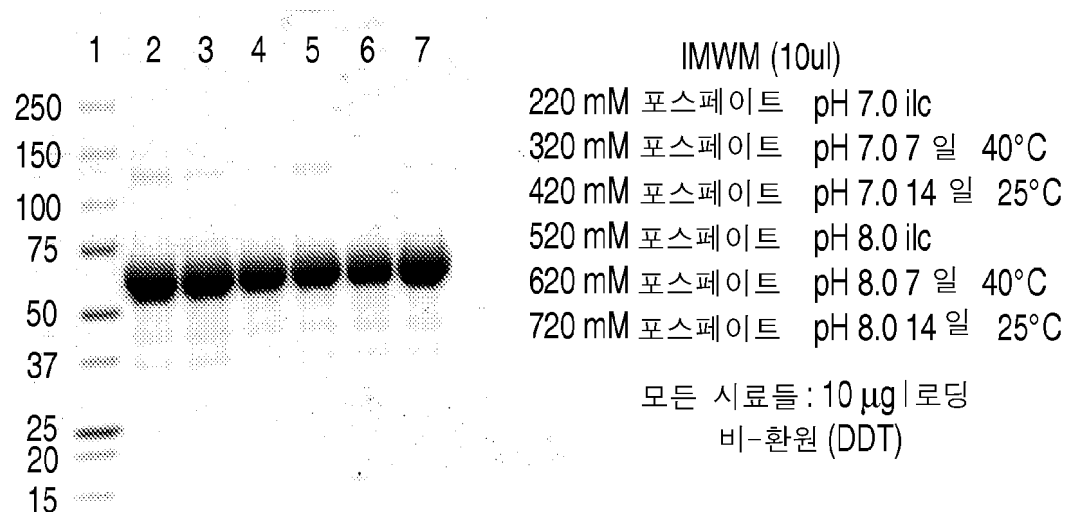
도면3a



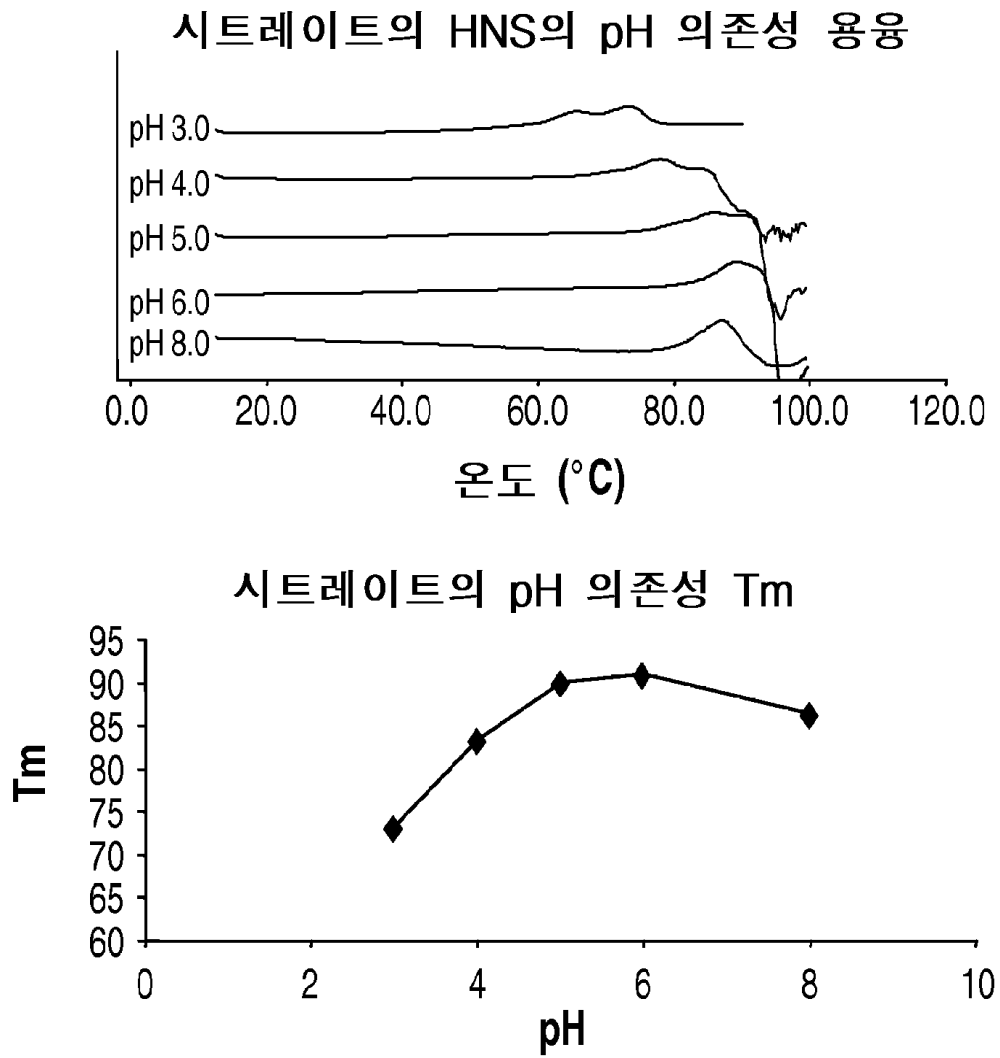
도면3b



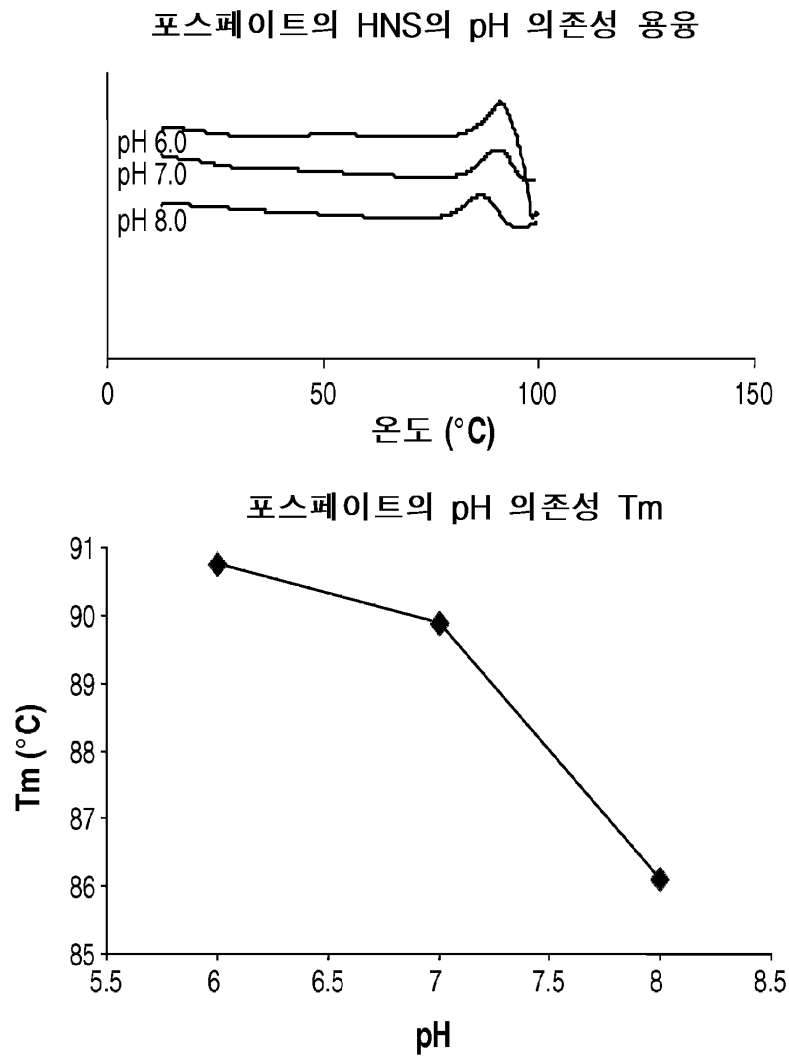
도면3c



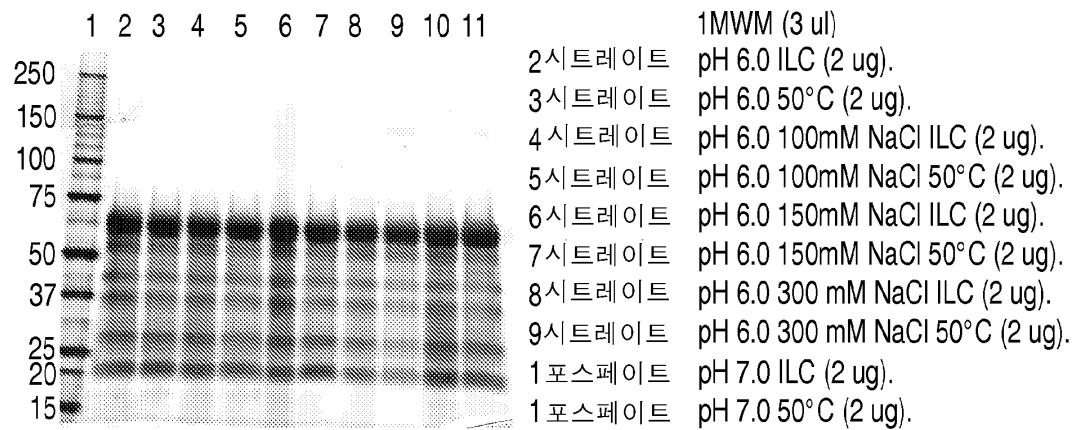
도면4



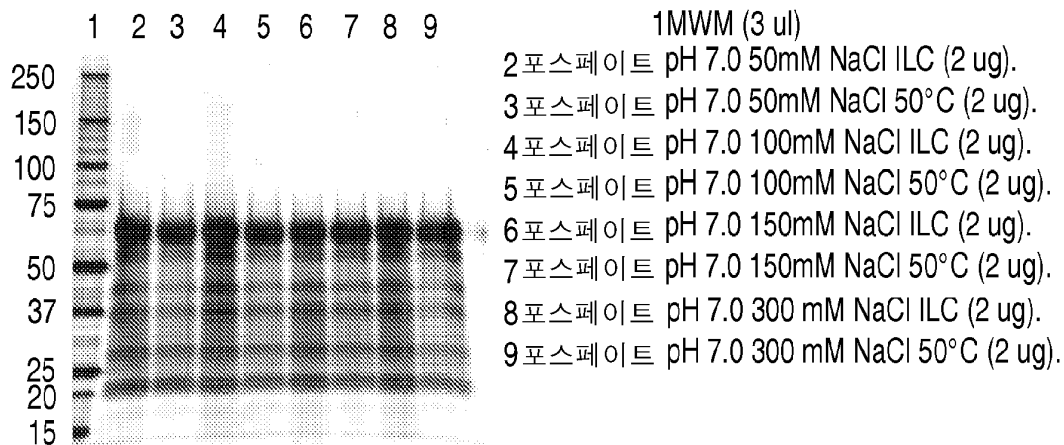
도면5



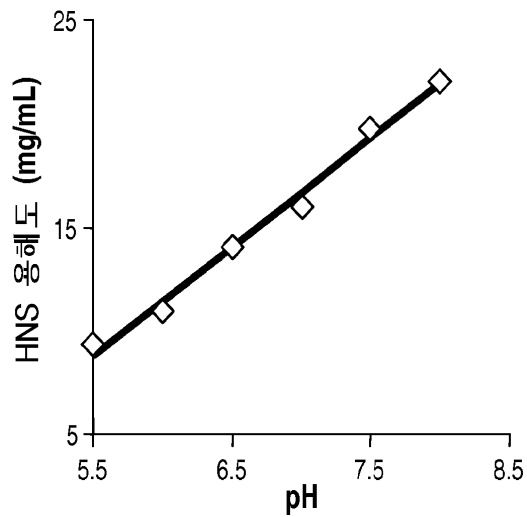
도면6a



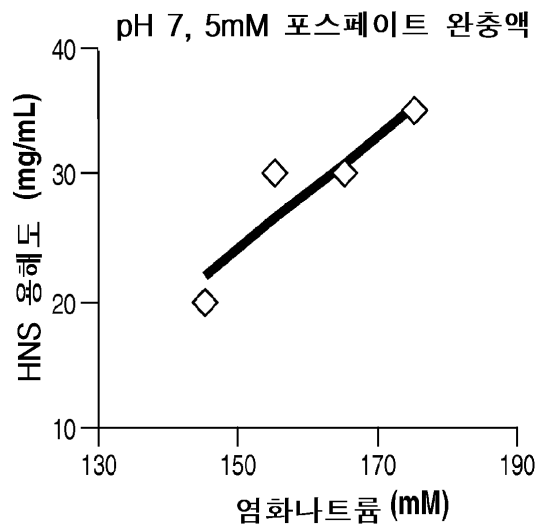
도면6b



도면7a

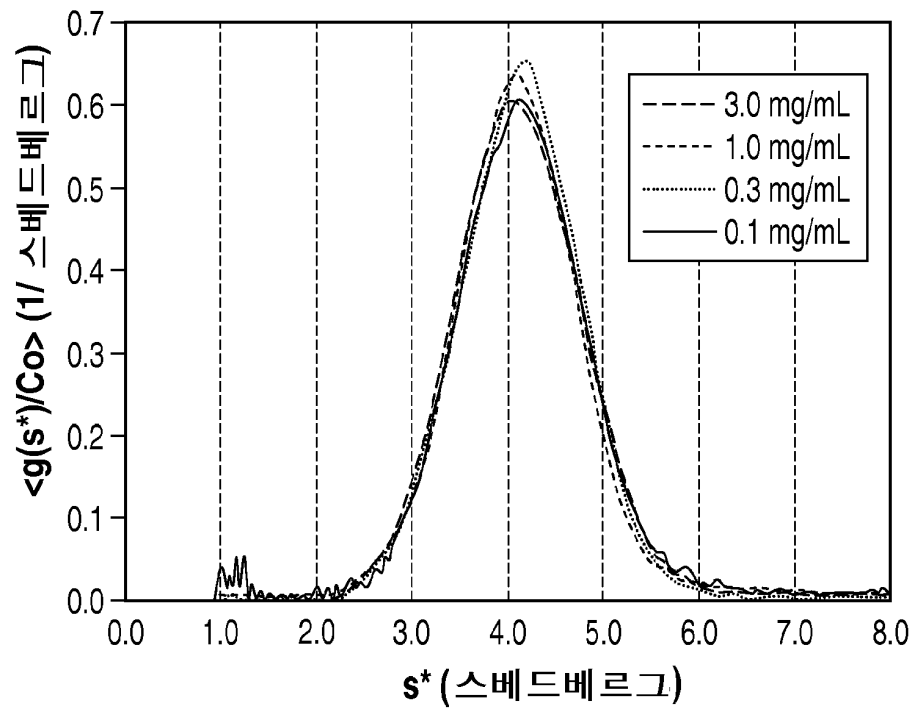


도면7b

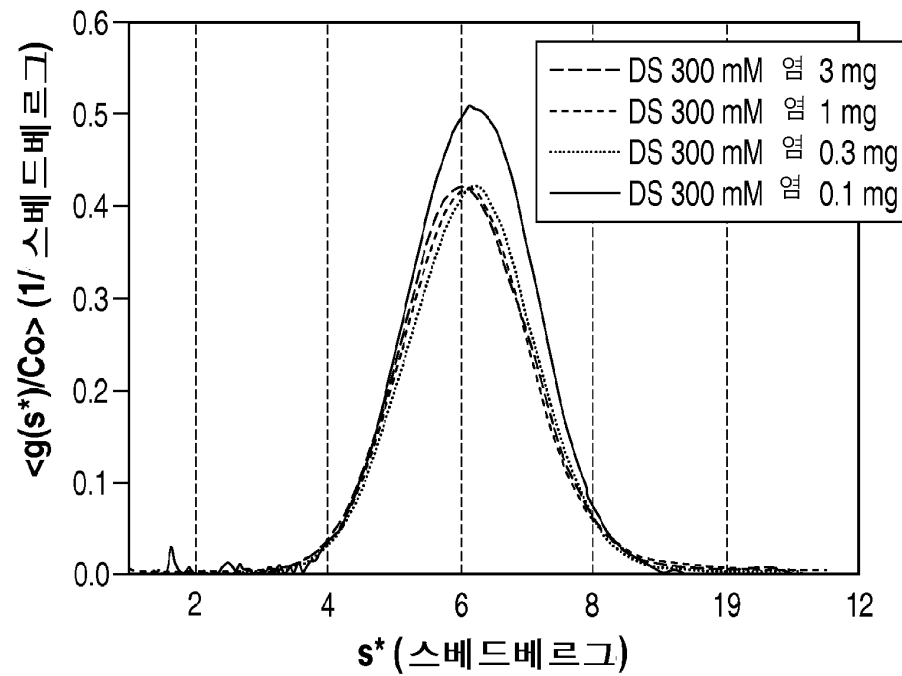




도면8a

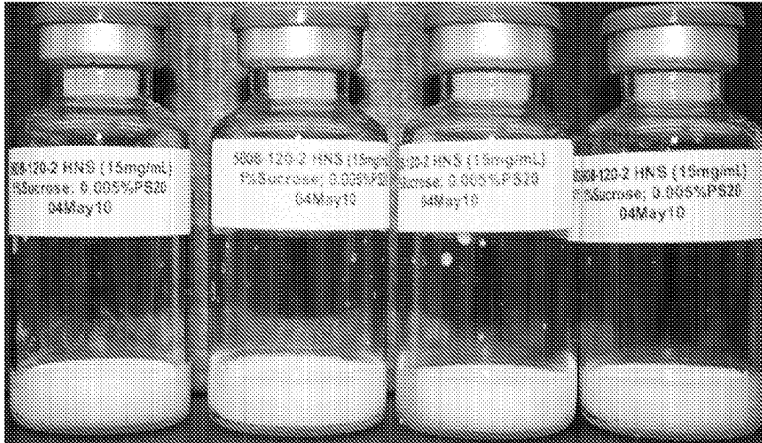


도면8b

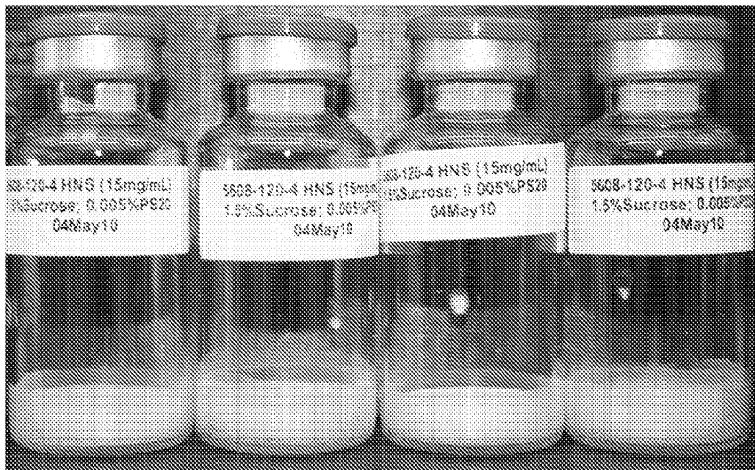


도면9a

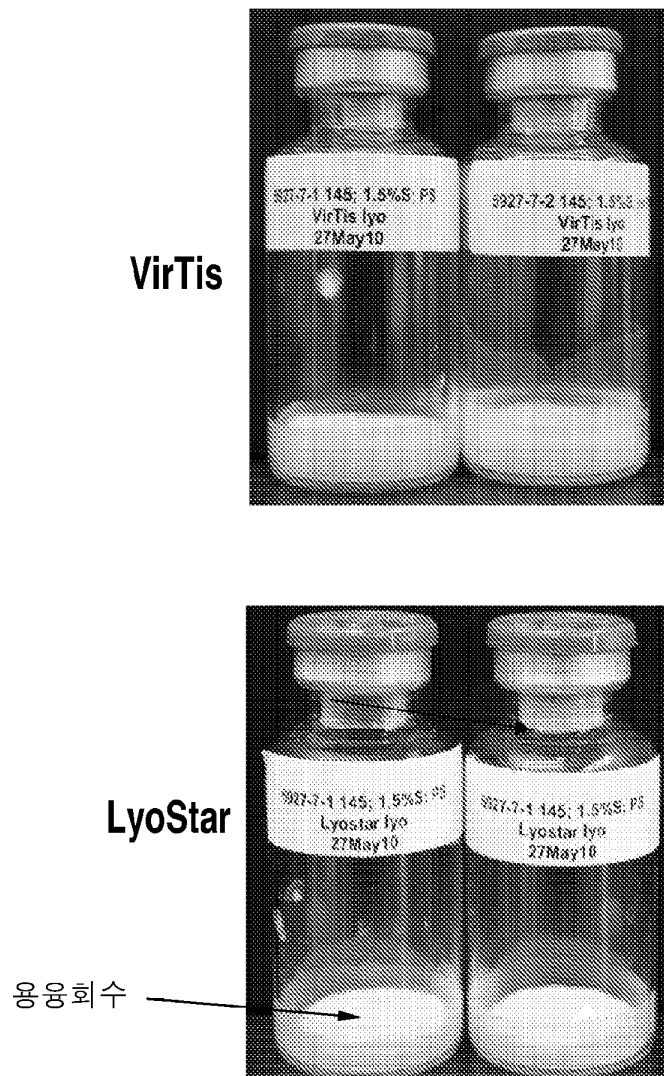
1%



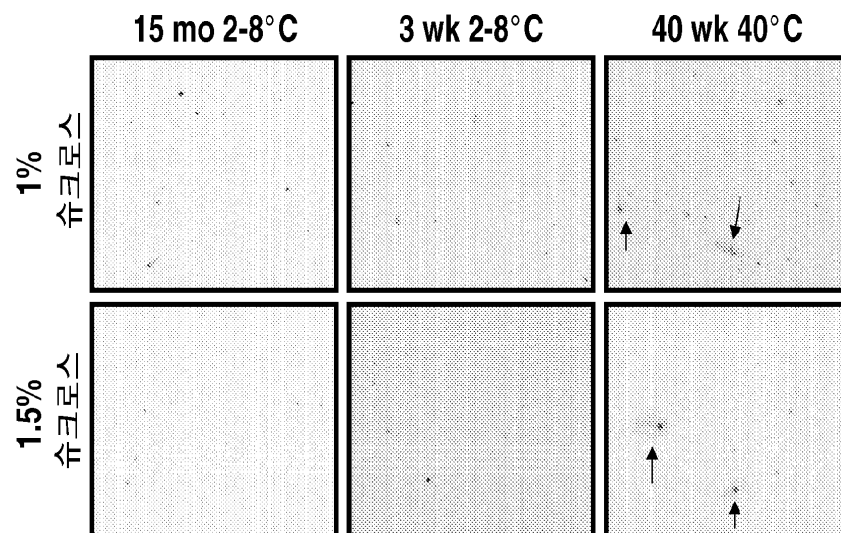
1.5%



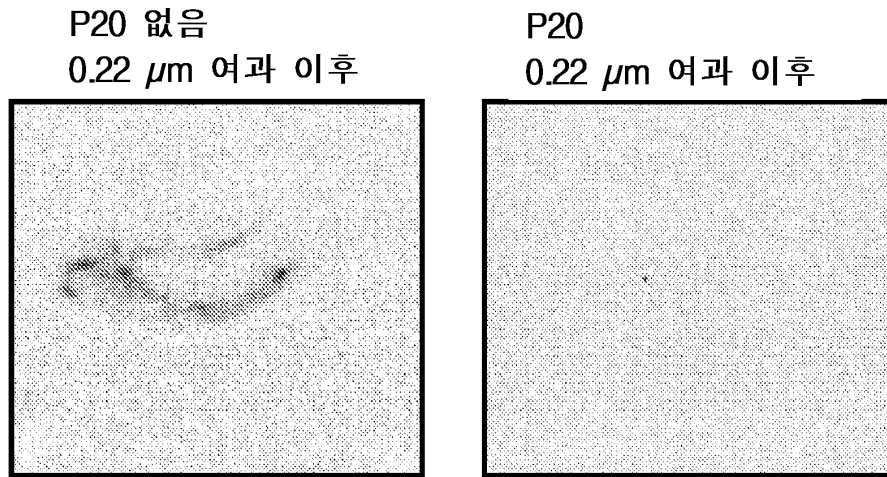
도면9b



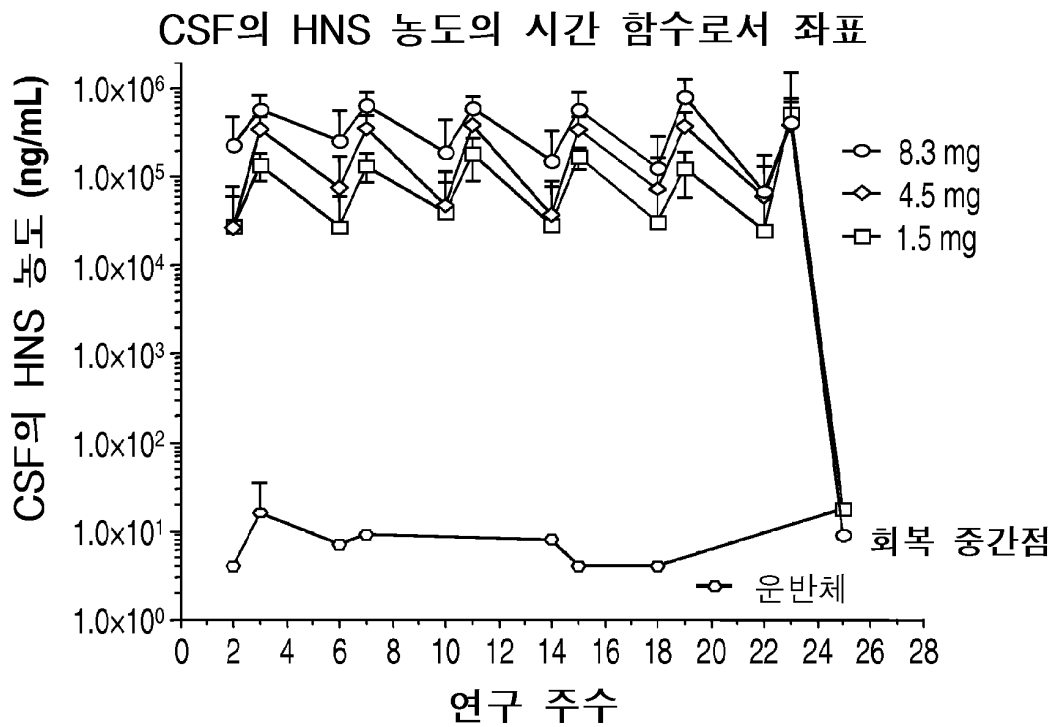
도면10



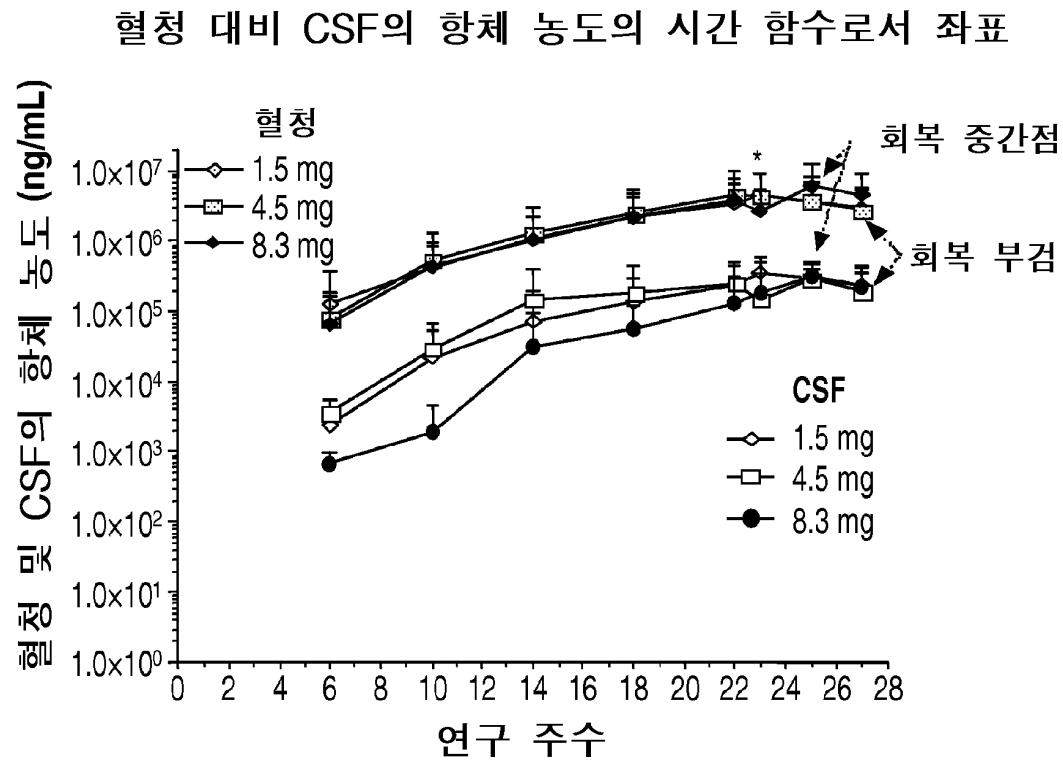
도면11



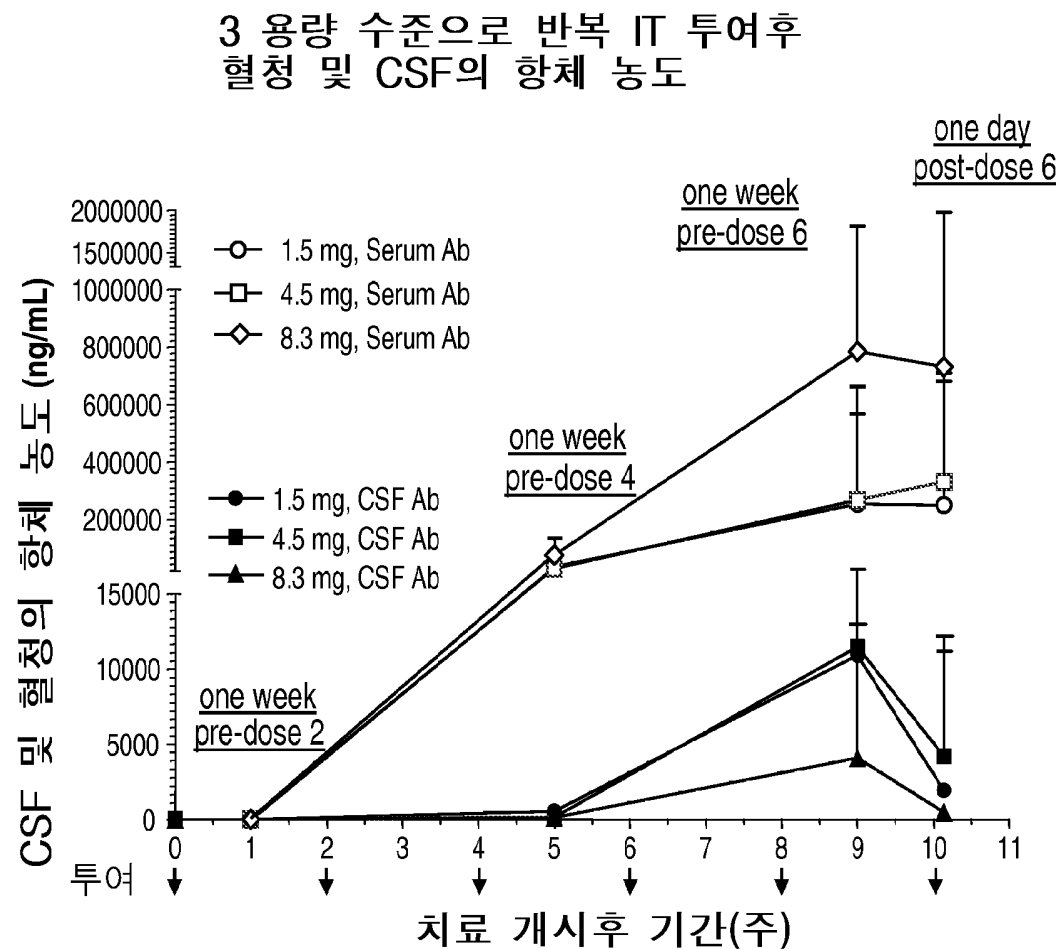
도면12a



도면12b

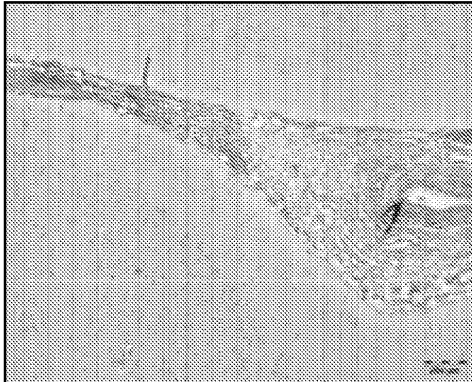


도면12c

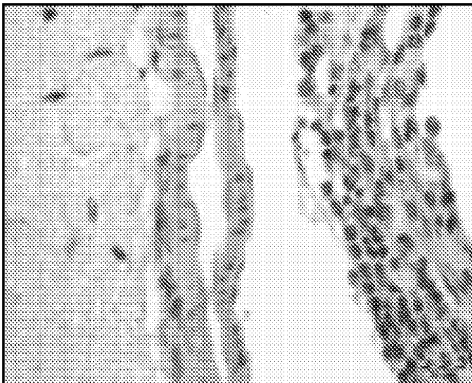




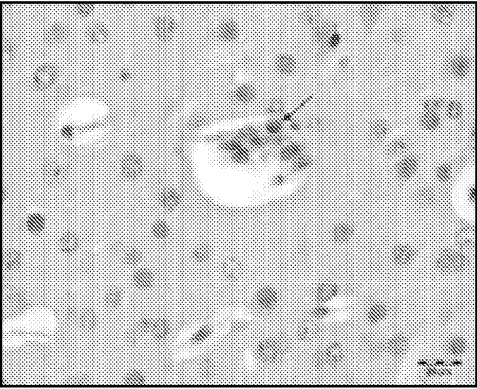
도면13a

그림	1A			
동물	058			
그룹	1F			
슬라이드	2			
배율	4X	염색	HE	
조직	뇌막			
노트	대조군 동물의 뇌척수막에서 중성구 침윤물 침윤물이 경막내 카테타를 가진 동물에서 다양하게 발생한다.			

도면13b

그림	1C		
동물	045		
그룹	5M		
슬라이드	2		
배율	40X	염색 HE	
조직	뇌막		
노트	고용량 수컷의 뇌척수막 침윤물 많은 세포들은 호산구이다.		

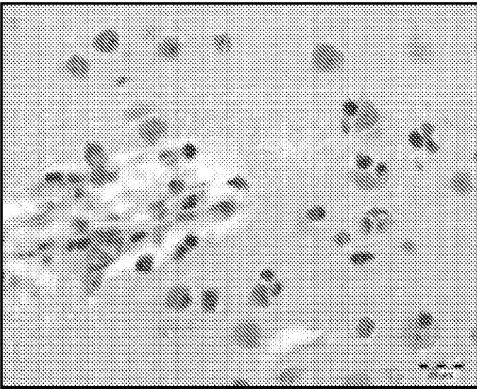
도면13c

그림	2A	
동물	080	
그룹	3F	
슬라이드	6	
배율	40X 염색 HE	
조직	뇌	

노트

화살표는 저용량 암컷의 혈관주위 공간에 있는 호산구를 가르킨다.

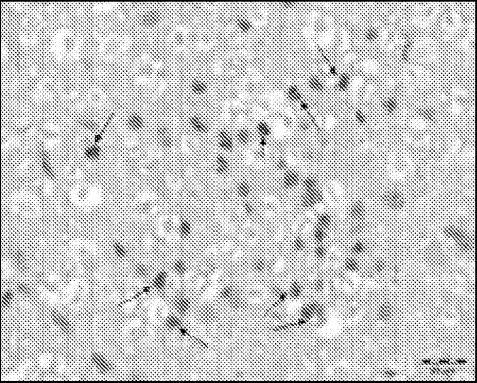
도면13d

그림	2C	
동물	023	
그룹	3M	
슬라이드	2	
배율	40X 염색 HE	
조직	뇌	

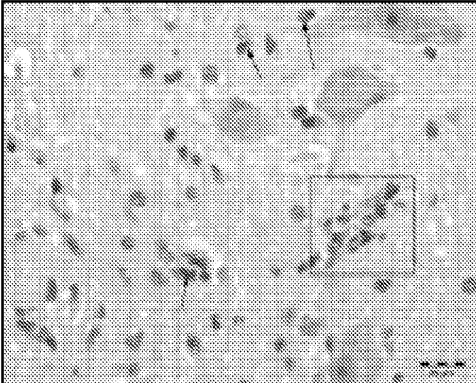
노트

저용량 수컷에서 혈관주위 공간 및 뇌의 인접 실질의 호산구

도면13e

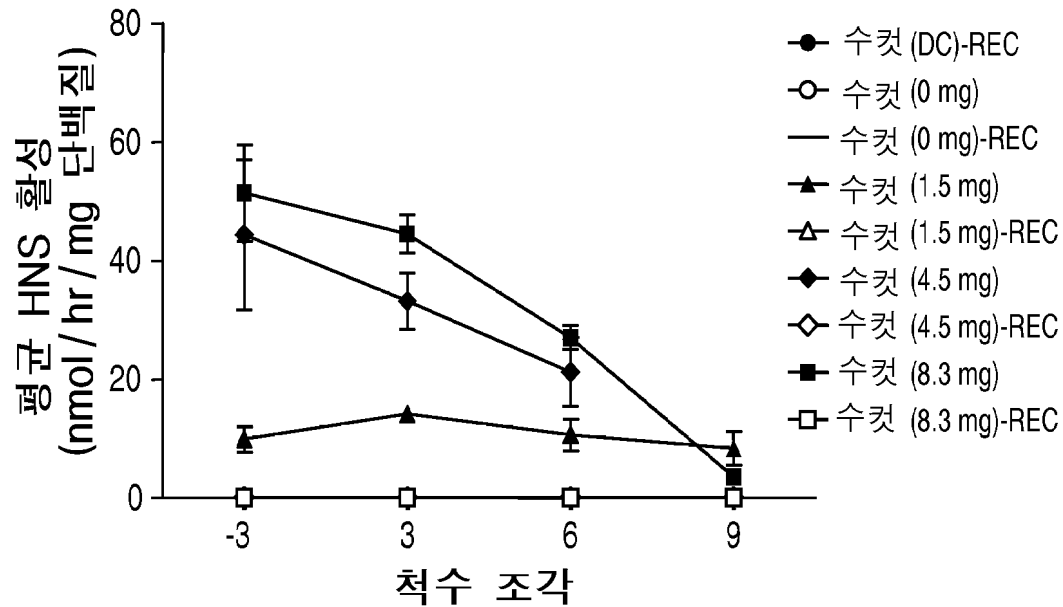
그림	3A	
동물	023	
그룹	3M	
슬라이드	7	
배율	40X 염색 HE	
조직	척수 경추	
노트	<p>화살표는 척수 실질의 호산구를 가르킨다. 주변 뉴런들은 정상이다.</p>	

도면13f

그림	3C	
동물	034	
그룹	3M	
슬라이드	8	
배율	40X 염색 HE	
조직	척수 경추	
노트	<p>화살표는 호산구를 가르킨다. 박스는 잠재적 미세교아증 영역을 가르킨다. 여러 큰 뉴런들이 있고, 모두 정상.</p>	

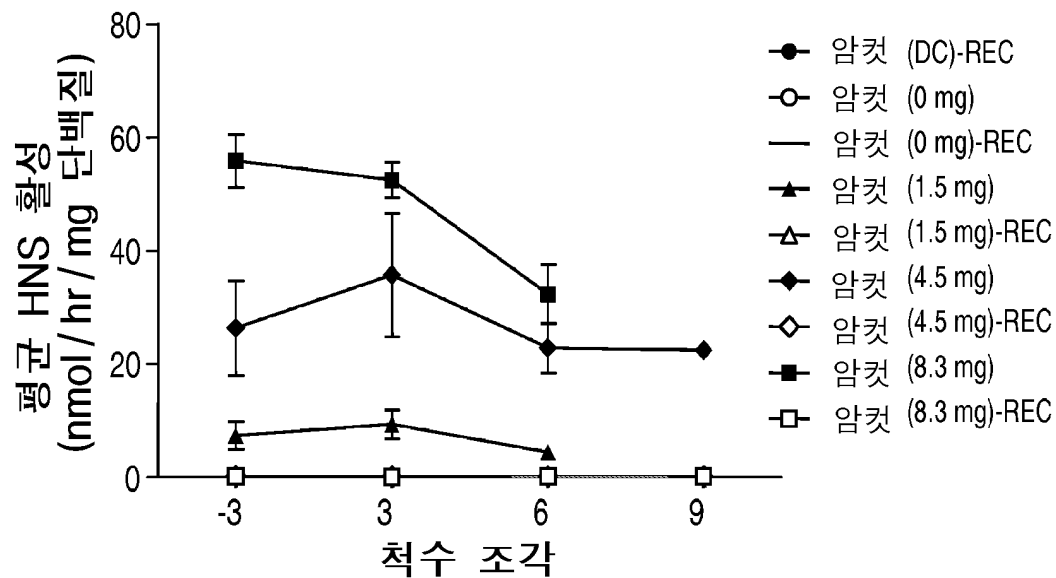
도면14a

6개월 투여후 수컷 사이노물 원숭이에서  
척수의 HNS 효소 활성 (nmol/hr/mg 단백질)



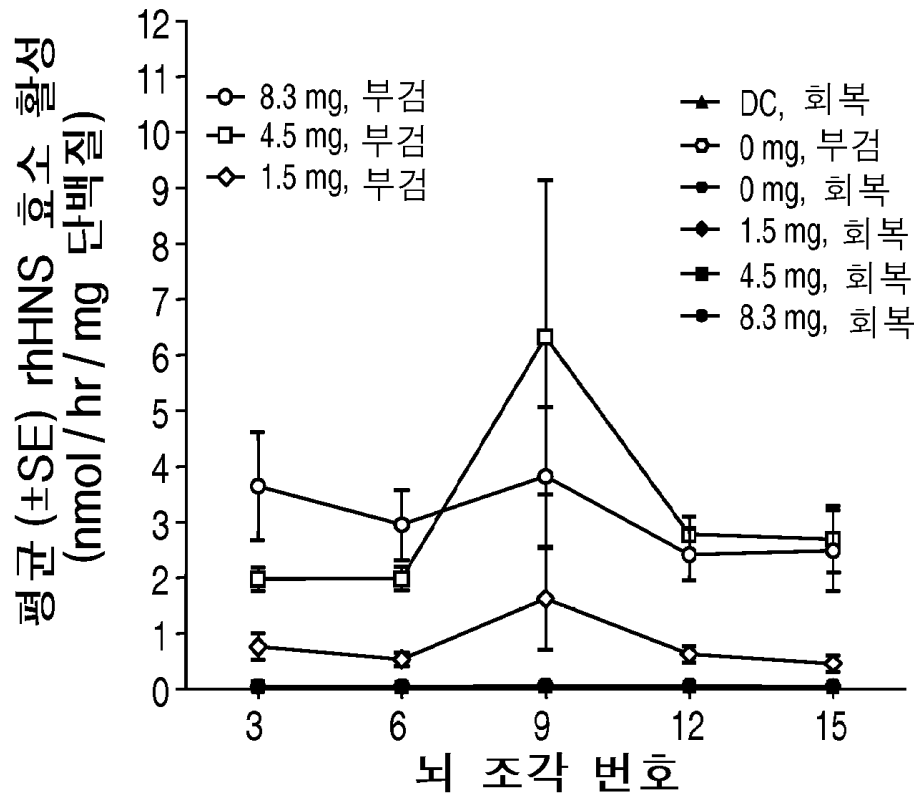
도면14b

6개월 투여후 암컷 사이노물 원숭이에서  
척수의 HNS 효소 활성 (nmol/hr/mg 단백질)



도면14c

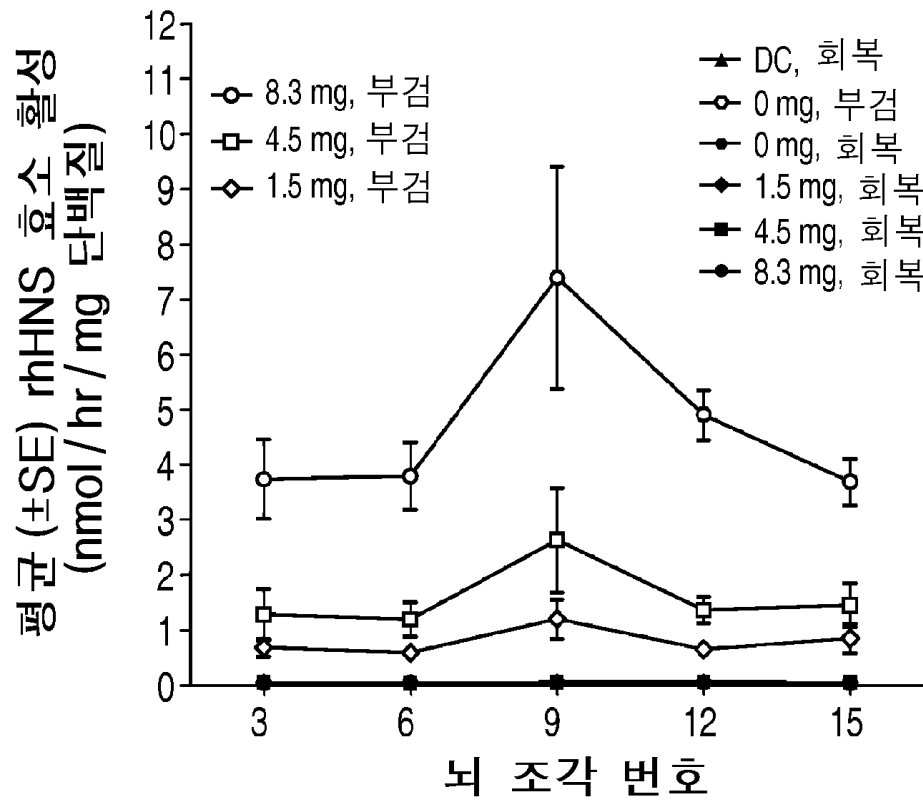
# 6개월 투여후 수컷 사이노몰 원숭이에서 효소 활성으로 표현된 뇌 rhHNS 농도



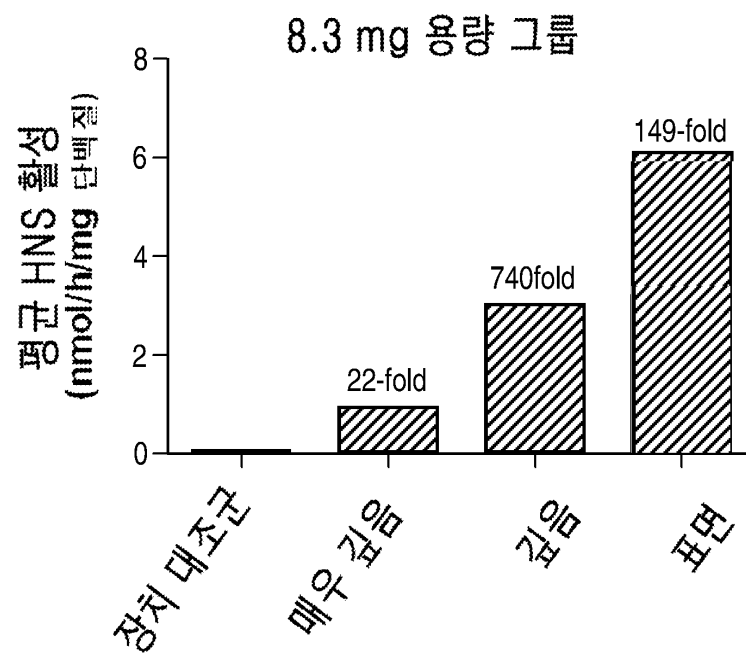
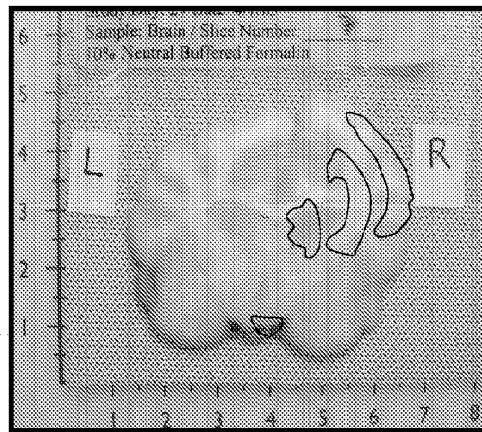


도면14d

# 6개월 투여후 암컷 사이노몰 원숭이에서 호소 활성으로 표현된 뇌 rhHNS 농도

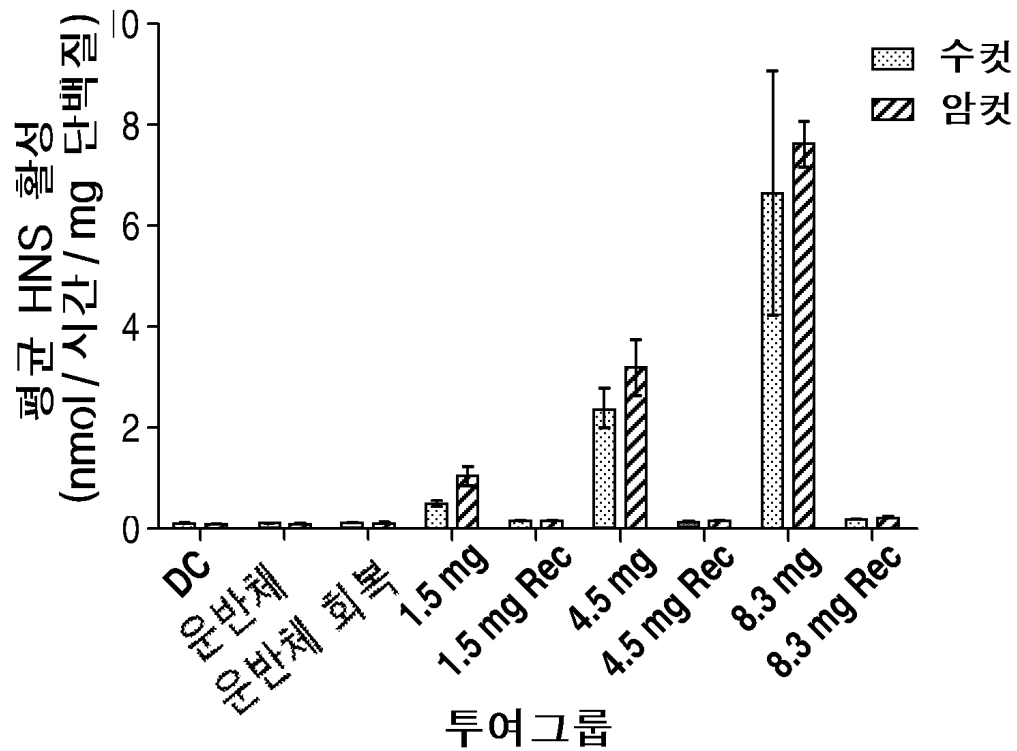


도면15a

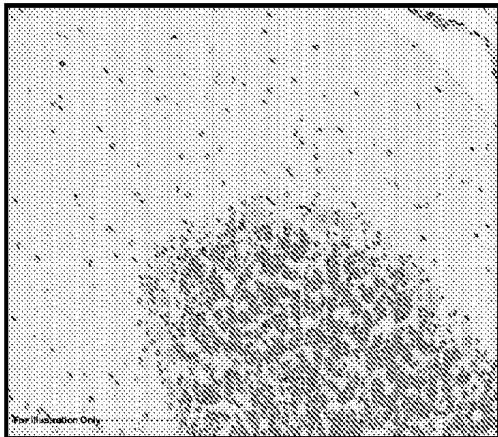


도면15b

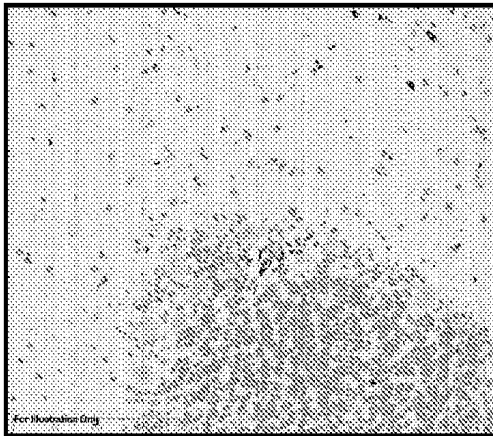
6개월 및 1개월 회복기간 이후 사이노몰 원숭이에서  
평균 HNS 효소 활성 (nmol / 시간 / mg 단백질)



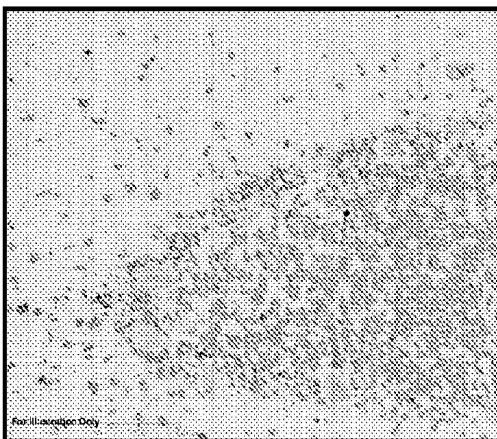
도면16a



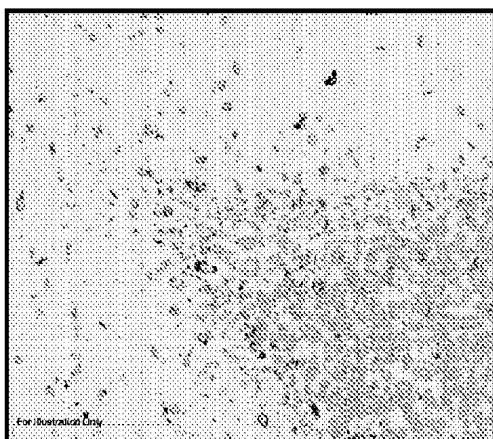
도면16b



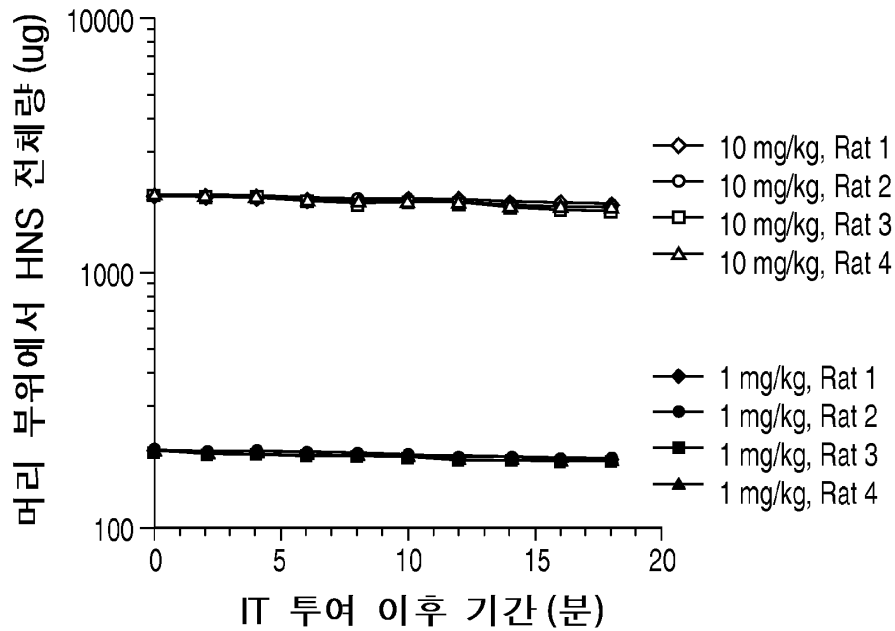
도면16c



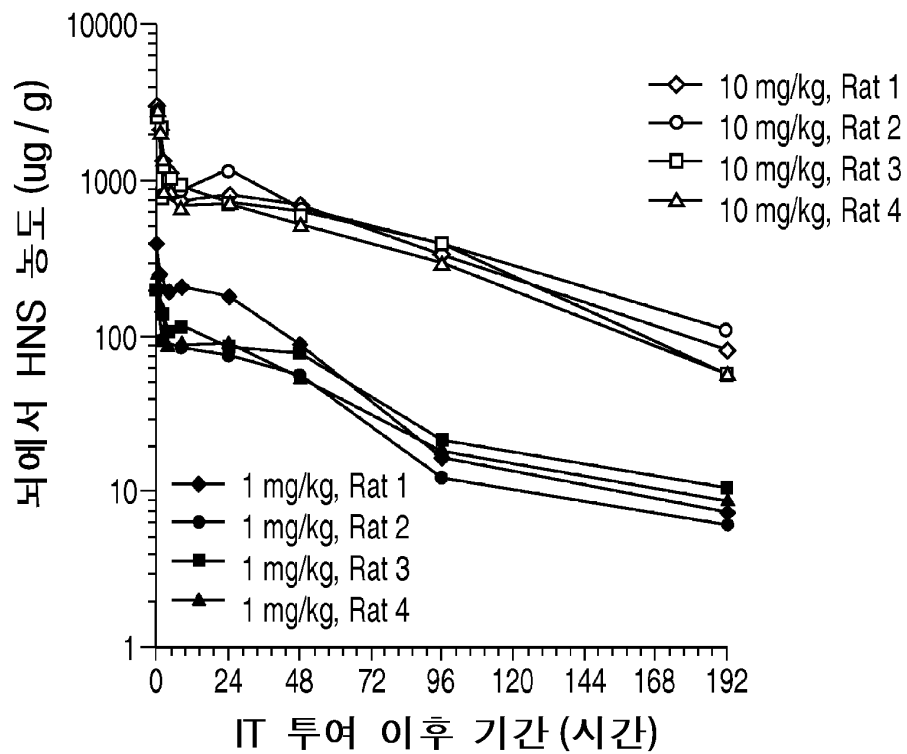
도면16d



도면17

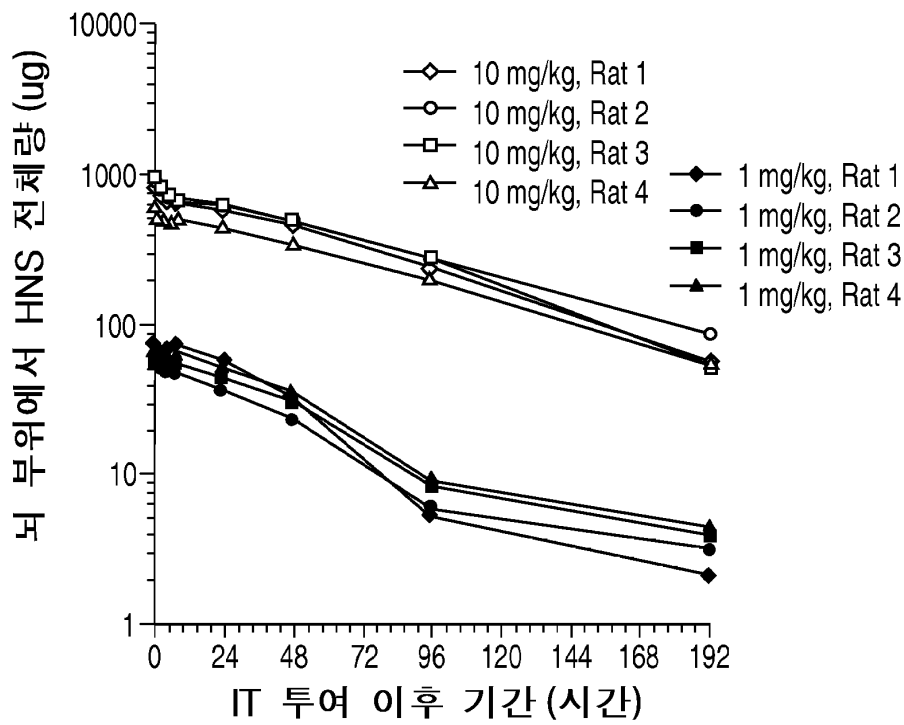


도면18

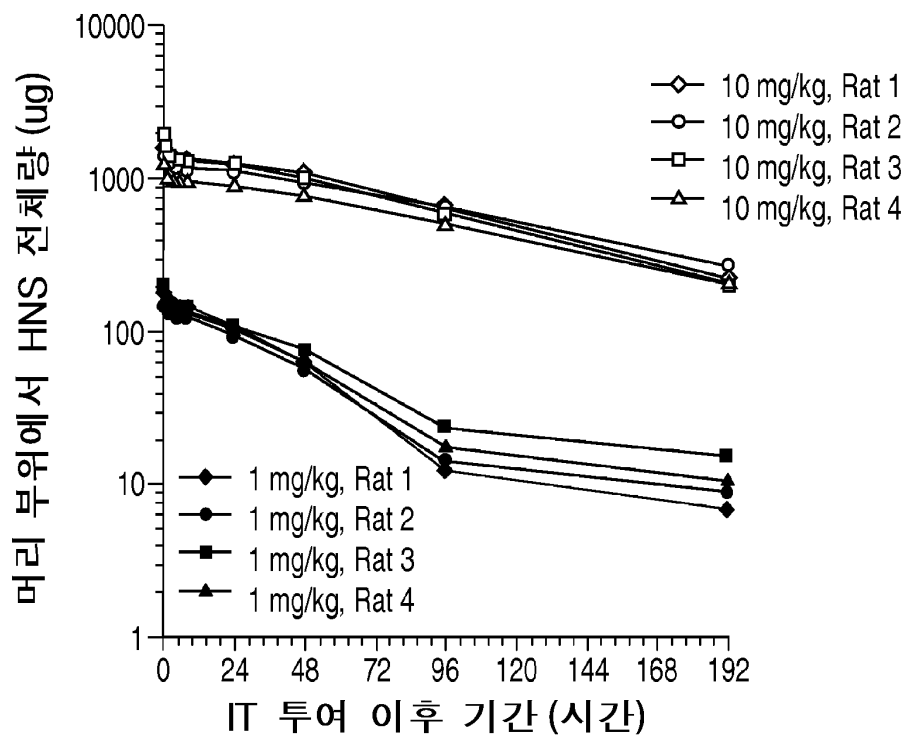




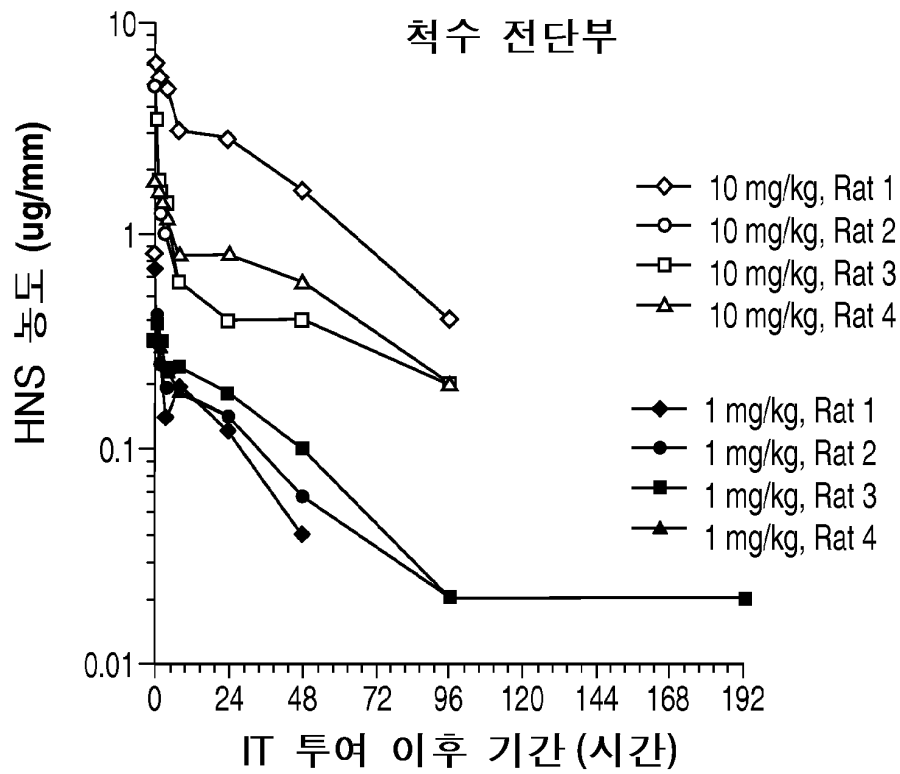
도면19



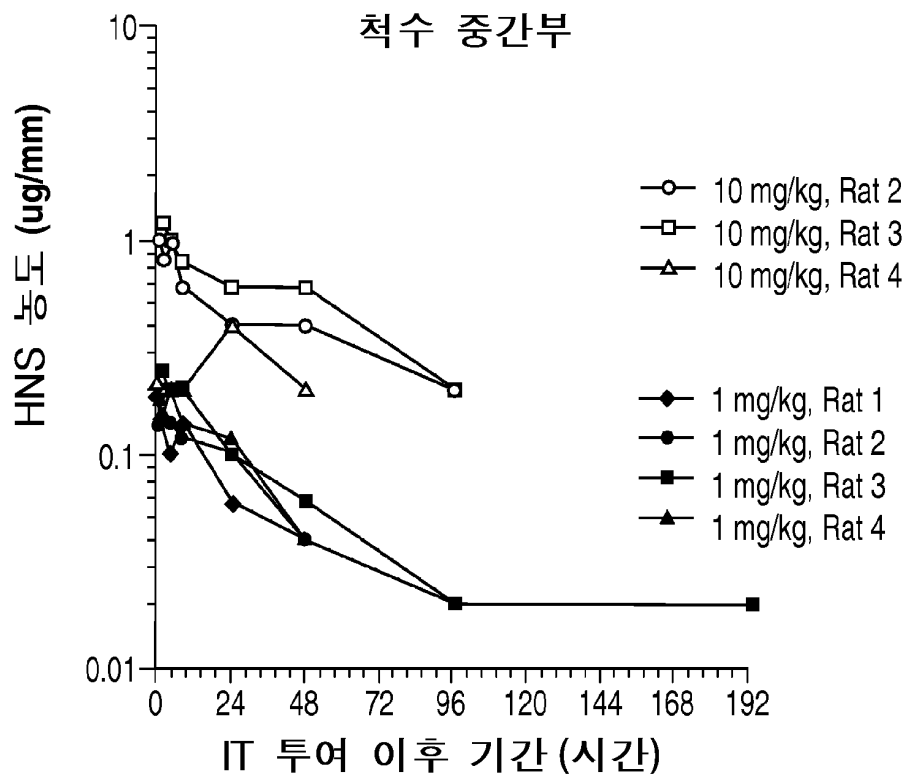
도면20



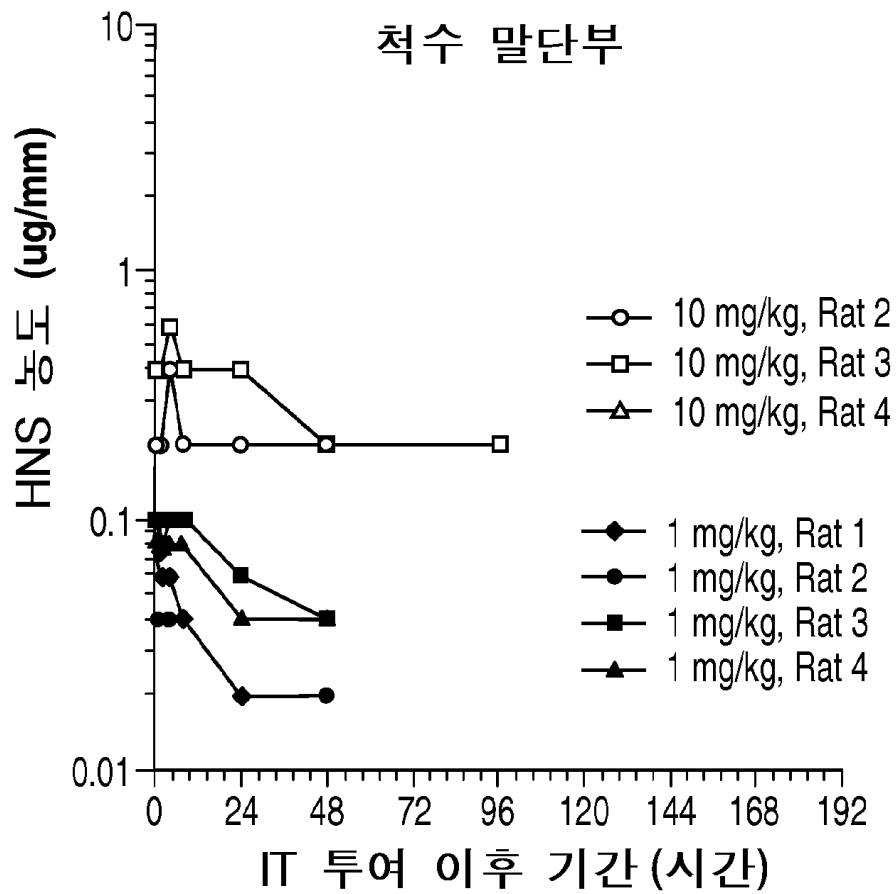
도면21



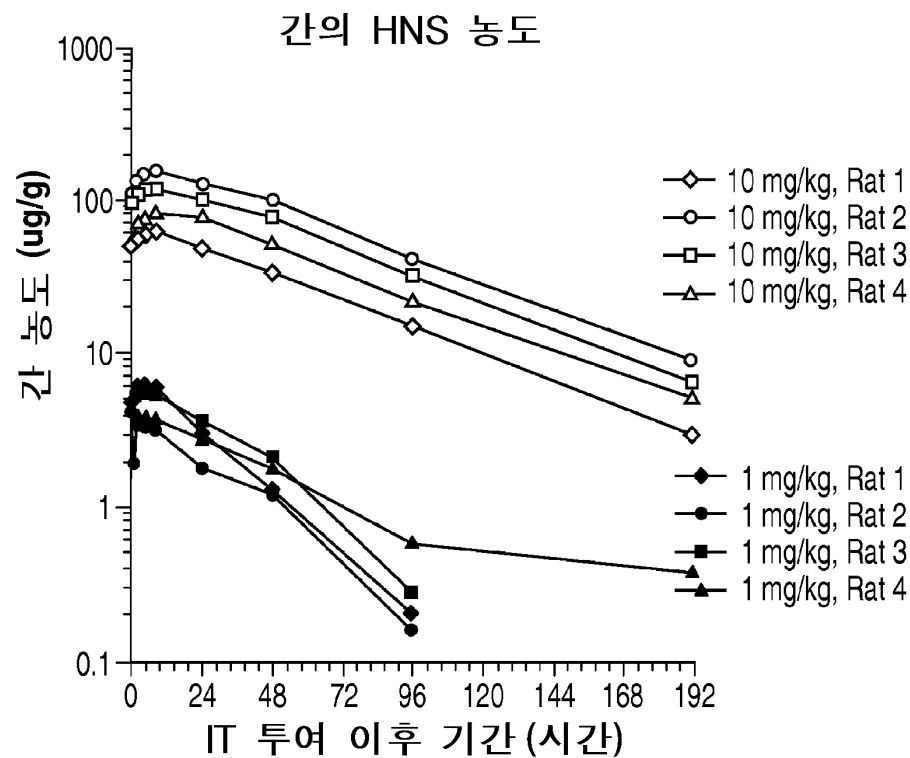
도면22



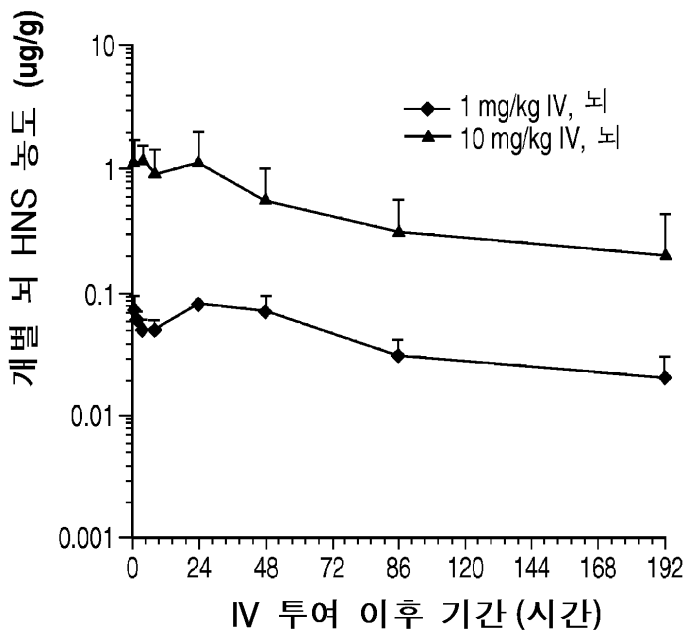
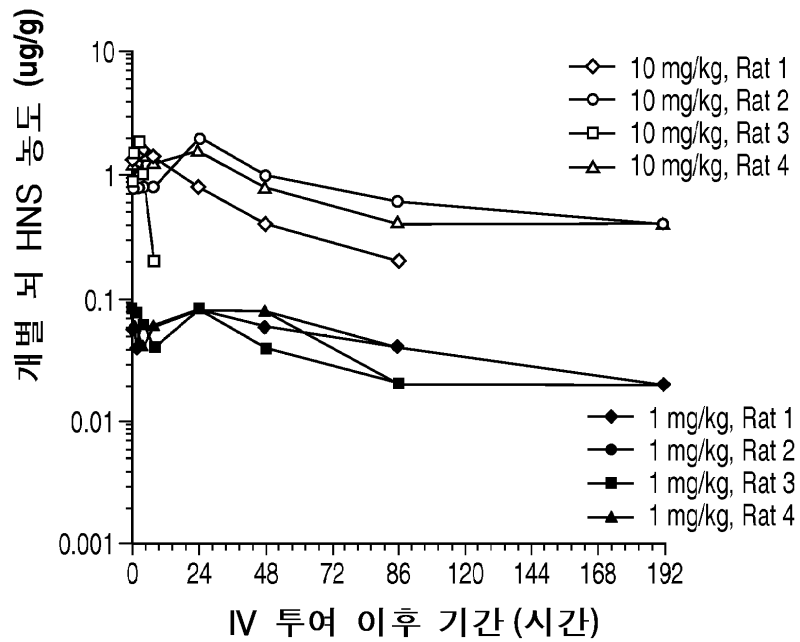
도면23



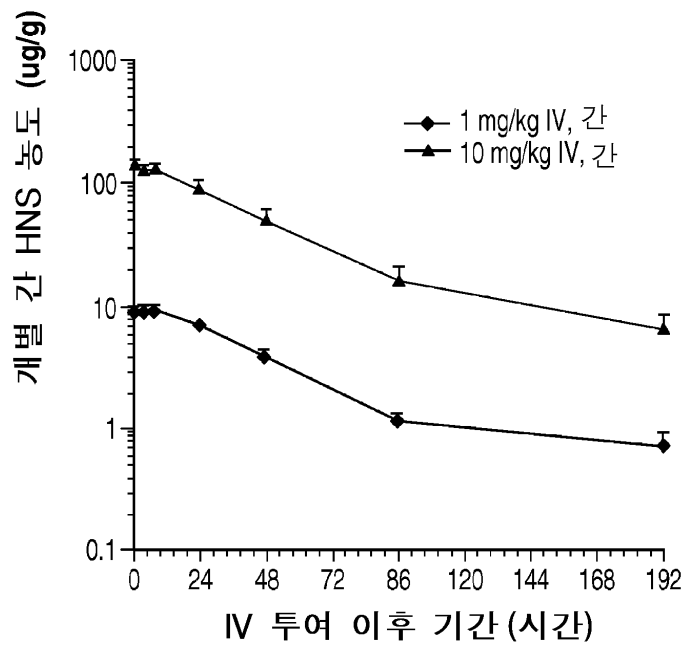
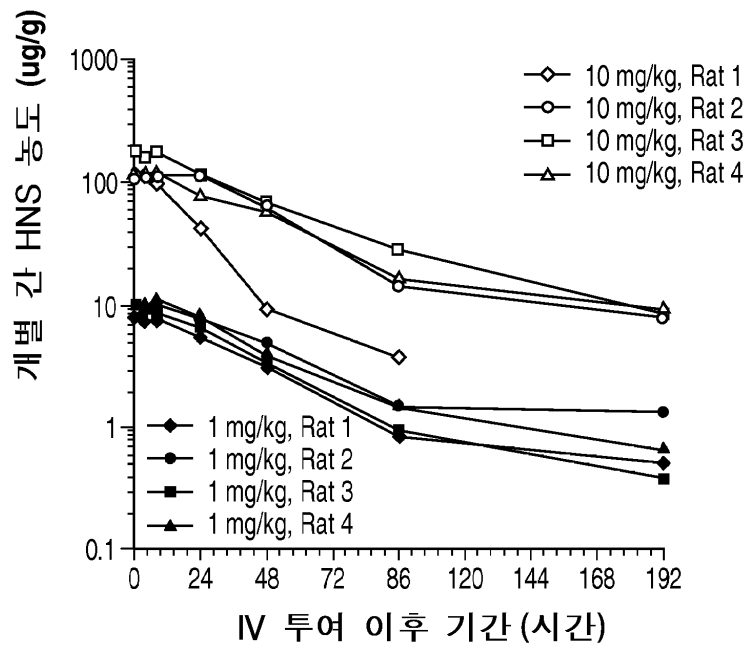
도면24



도면25

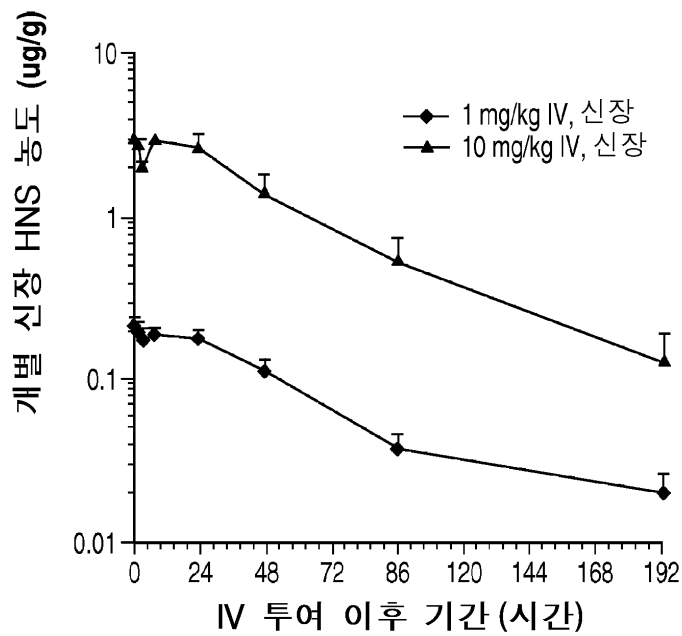
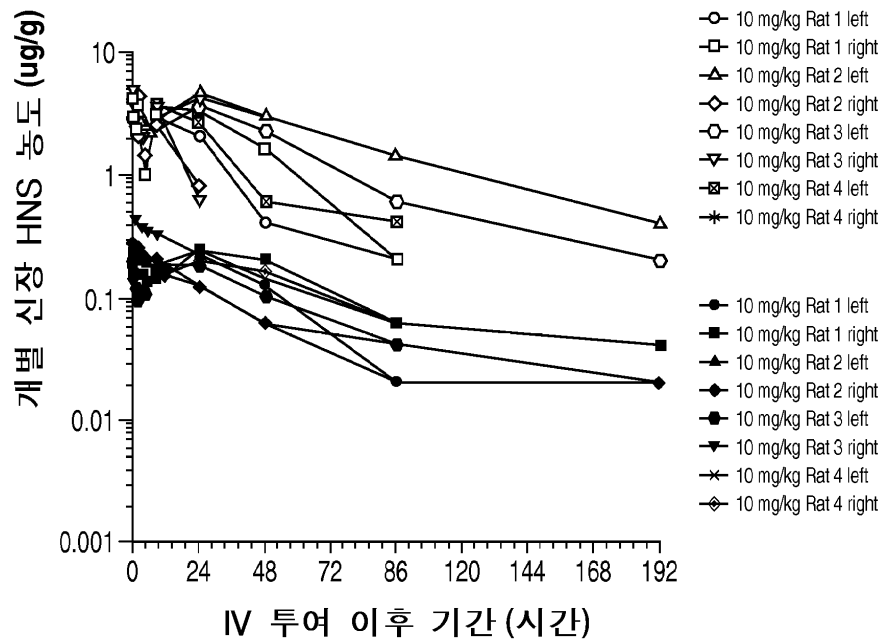


도면26

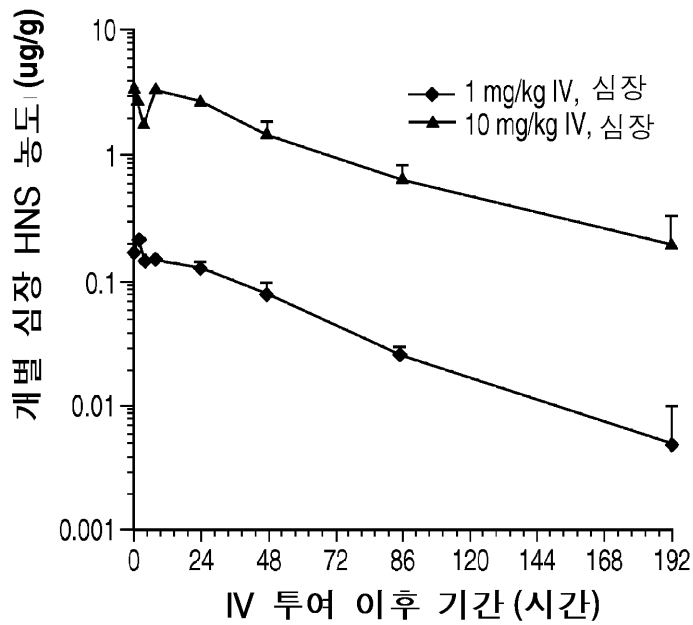
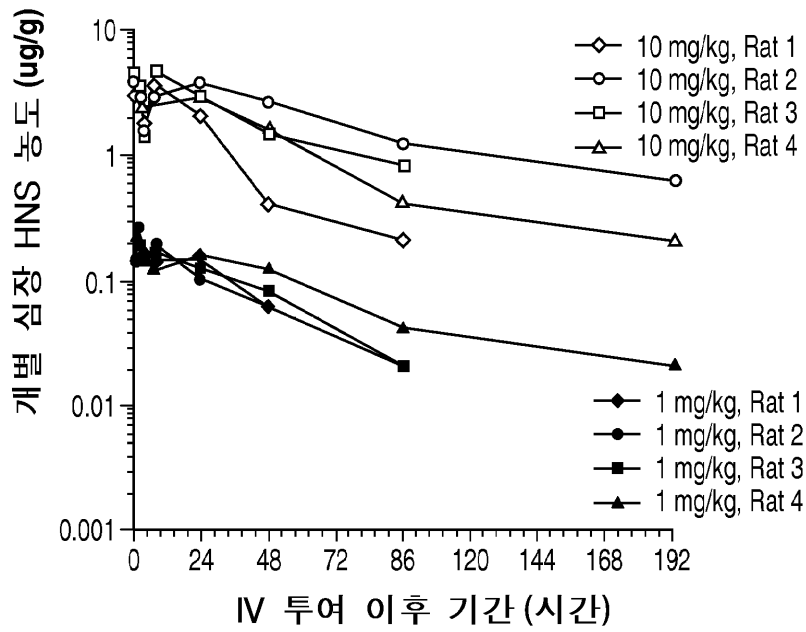




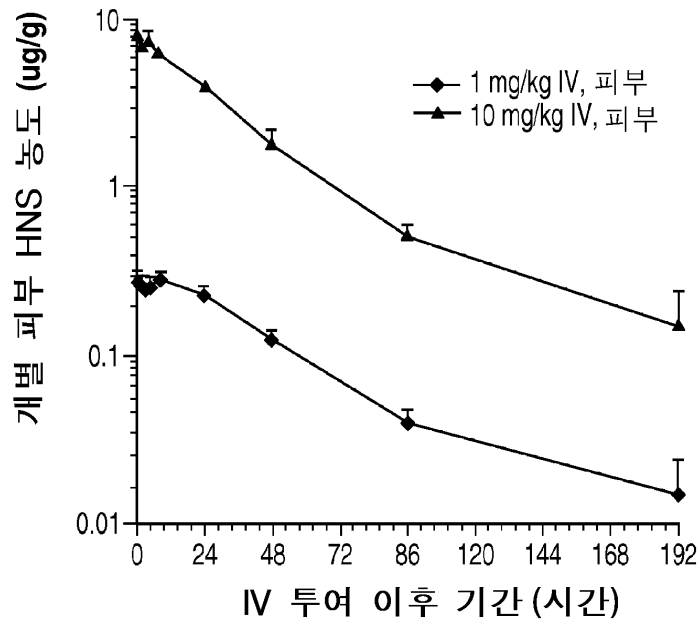
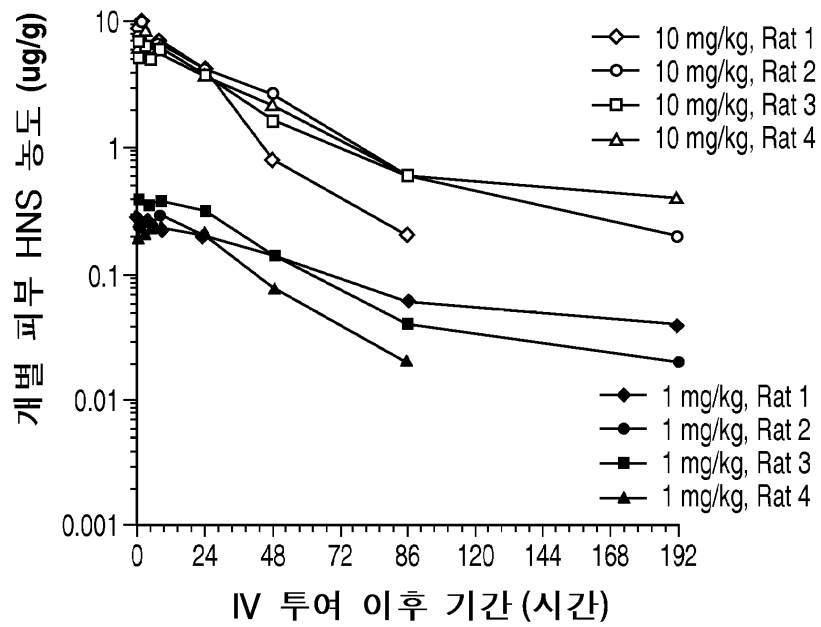
도면27



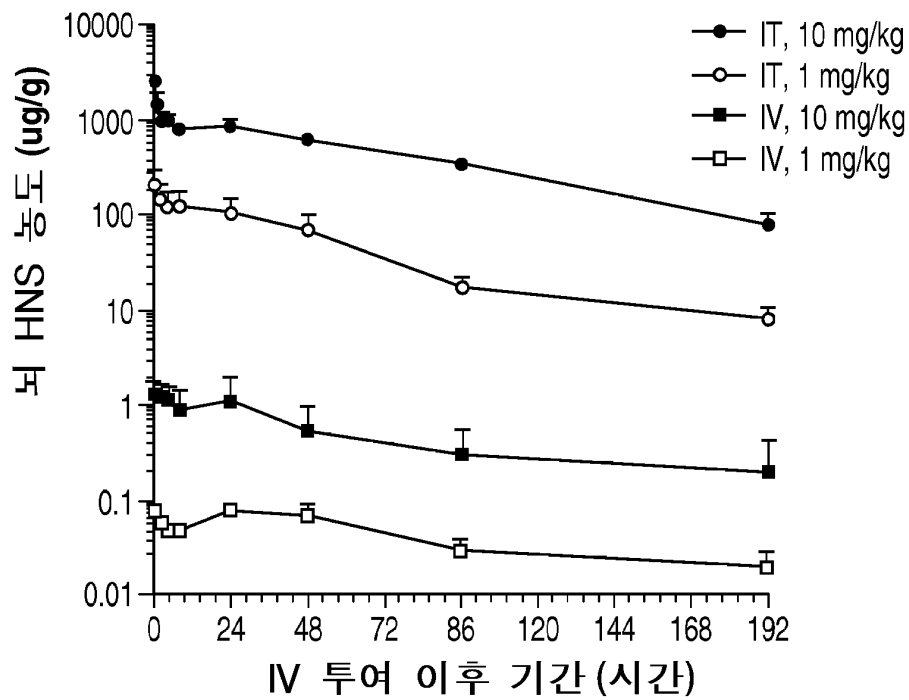
도면28



도면29



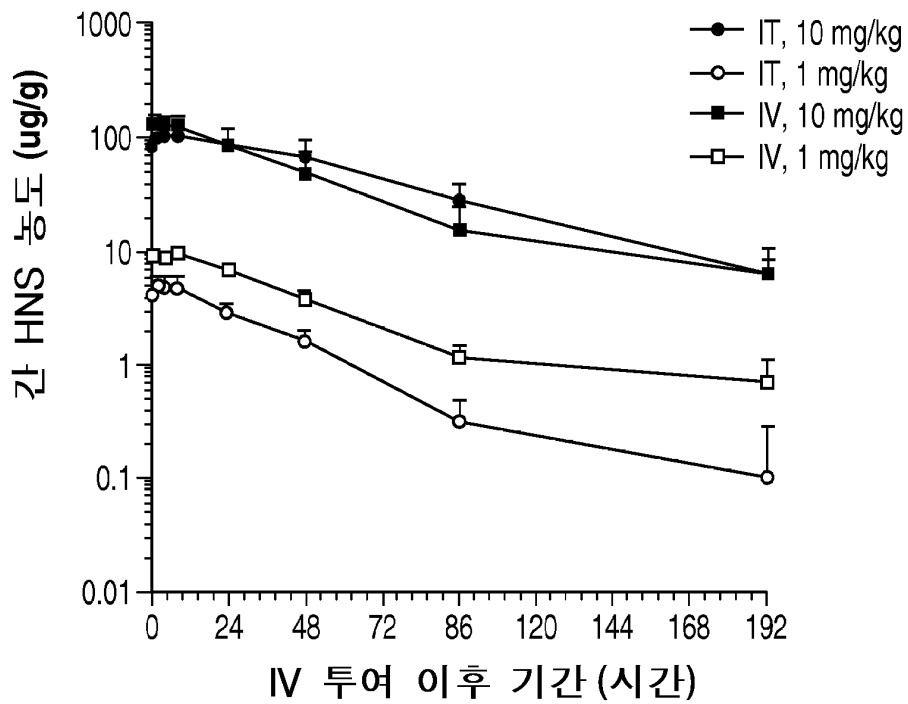
도면30



뇌에서 비구획 PK 변수의 비교

	변수	단위	IT		IV		비율 IT/IV
			평균	SD	평균	SD	
1 mg/kg	$\lambda_z$	1/hr	0.016	0.003	0.011	0.005	
	$t_{1/2}$	hr	45	7	71	23	
	$C_{max}$	ug/g	257	90	0.1	0.0	3212
	$AUC_{0-192hr}$	hr*ug/g	8393	2457	7	2	1136
10 mg/kg	$\lambda_z$	1/hr	0.014	0.001	0.102	0.180	
	$t_{1/2}$	hr	49	4	60	53	
	$C_{max}$	ug/g	2628	265	1.8	0.2	1501
	$AUC_{0-192hr}$	hr*ug/g	83962	10083	86	66	978

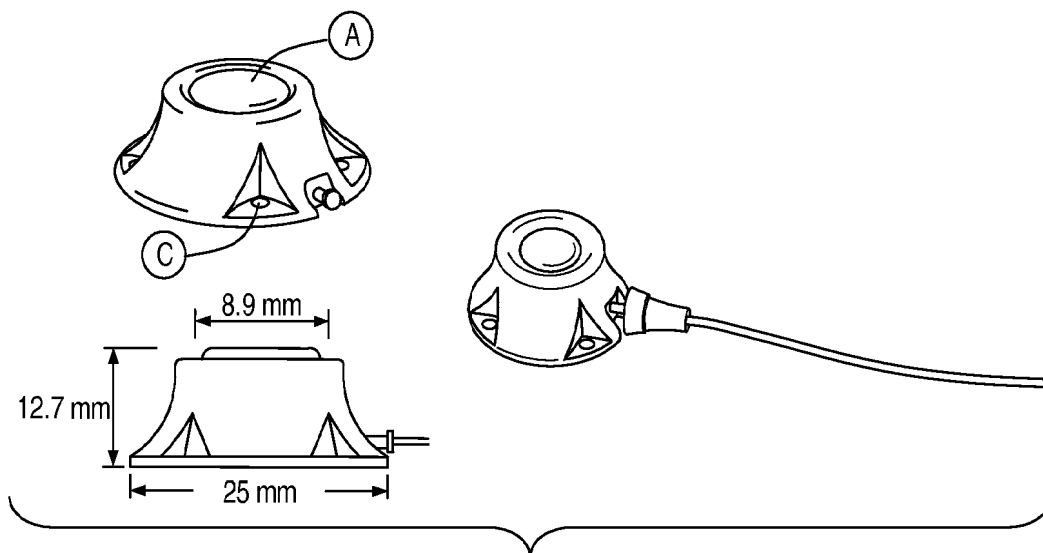
도면31



간에서 비구획 PK 변수의 비교

	변수	단위	IT		IV		비율 IT/IV
			평균	SD	평균	SD	
1 mg/kg	$\lambda_z$	1/hr	0.030	0.011	0.015	0.003	
	$t_{1/2}$	hr	28	16	47	10	
	$C_{max}$	ug/g	4.9	1.3	9.6	0.5	0.5
	$AUC_{0-192hr}$	hr*ug/g	204	50	525	104	0.4
10 mg/kg	$\lambda_z$	1/hr	0.017	0.000	0.021	0.012	
	$t_{1/2}$	hr	42	1	38	13	
	$C_{max}$	ug/g	105	41	131.6	27	0.8
	$AUC_{0-192hr}$	hr*ug/g	7987	3276	6747	2837	1.2

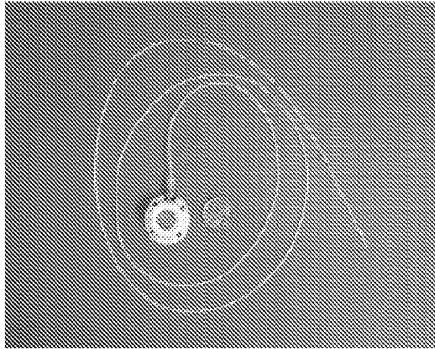
도면32



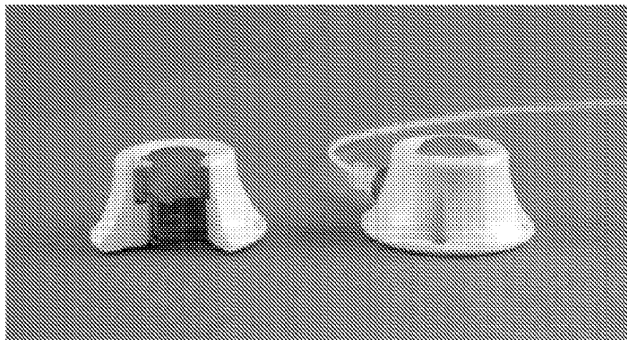


도면33

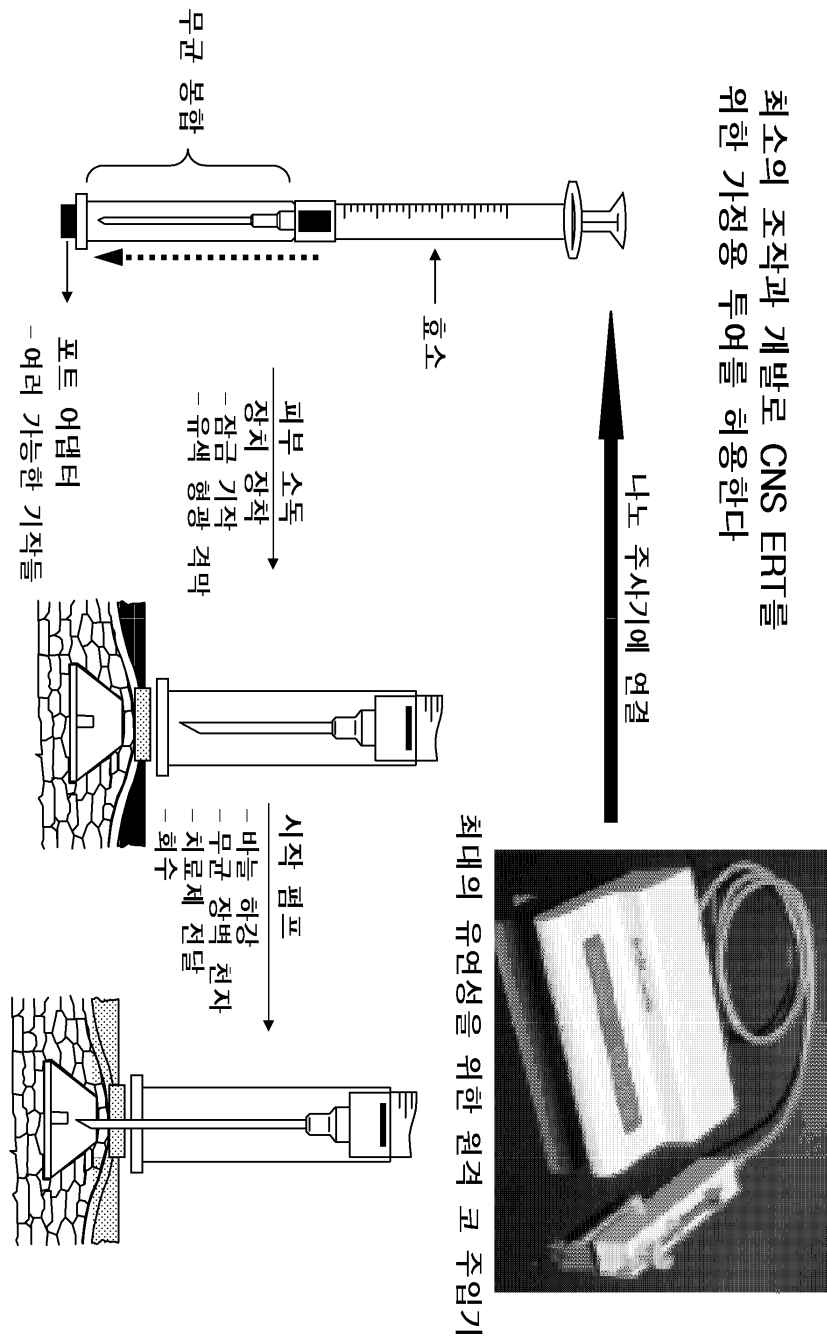
Part-A-Cath 로우 프로파일 경막내  
이식가능 접근 시스템



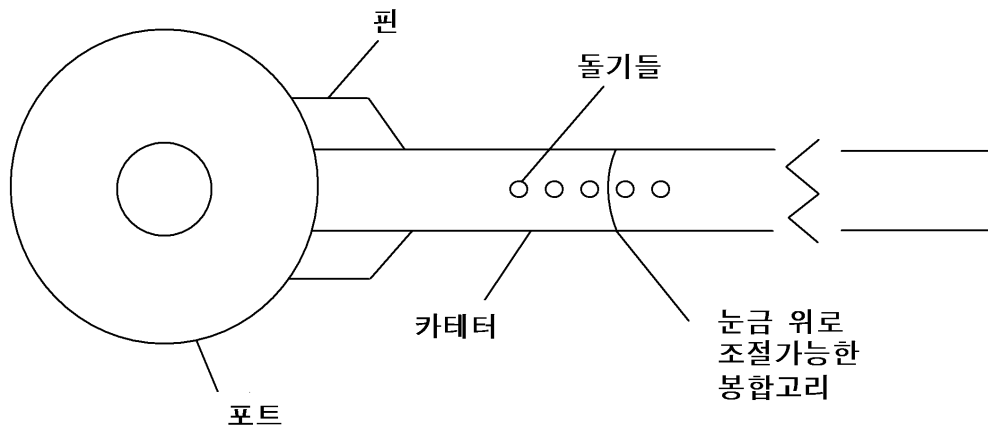
도면34



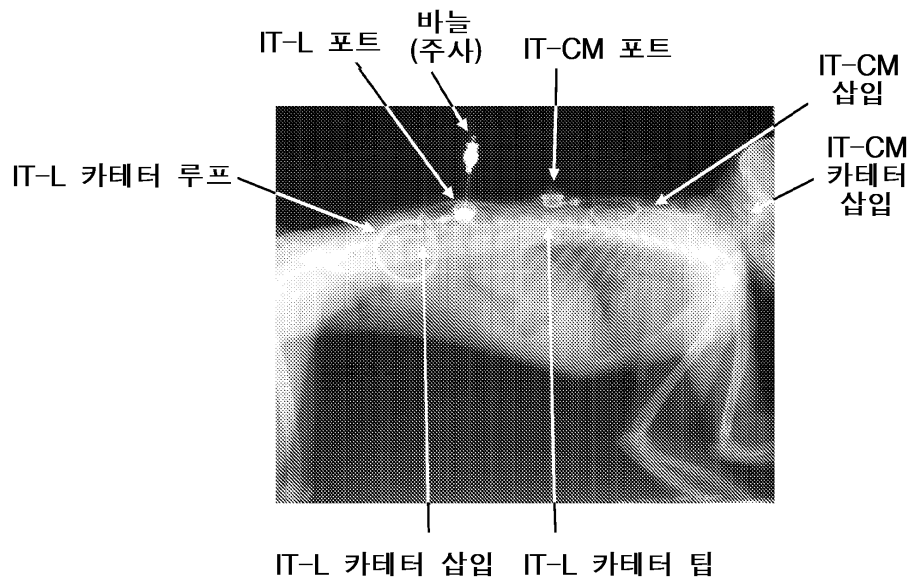
도면35



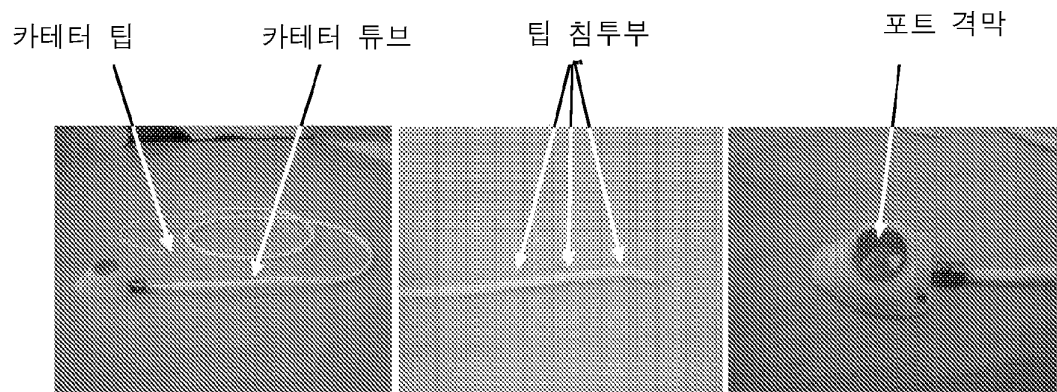
도면36



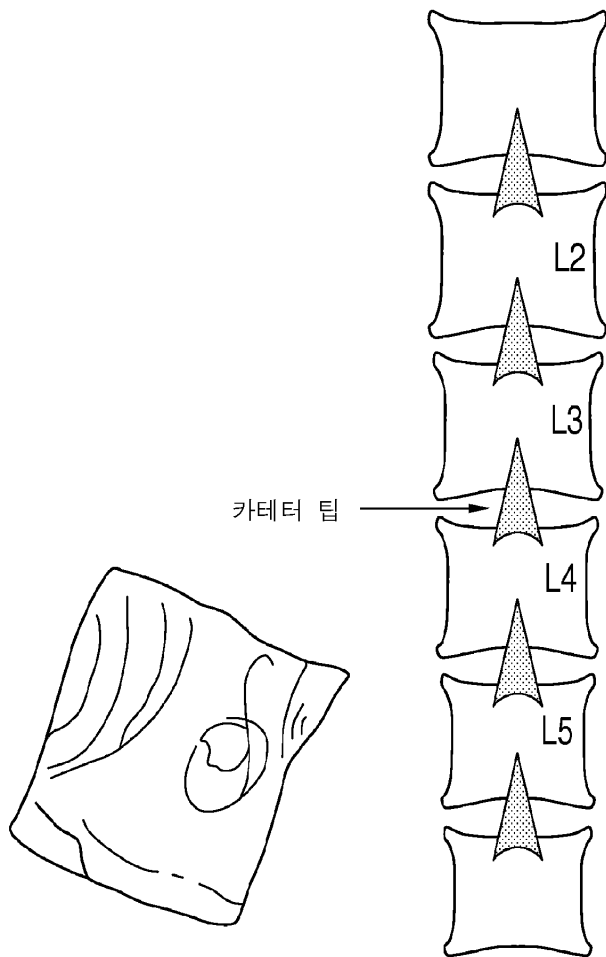
도면37a



도면37b



도면37c



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Shire Human Genetic Therapies, Inc.
- <120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR CNS DELIVERY OF HEPARAN N-SULFATASE
- <130> 2006685-0028
- <140> PCT/US2011/041922
- <141> 2011-06-25
- <150> 61/358,857
- <151> 2010-06-25
- <150> 61/360,786
- <151> 2010-07-01
- <150> 61/387,862
- <151> 2010-09-29
- <150> 61/435,710
- <151> 2011-01-24

<150> 61/442,115

<151> 2011-02-11

<150> 61/476,210

<151> 2011-04-15

<150> 61/495,268

<151> 2011-06-09

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 482

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Arg Pro Arg Asn Ala Leu Leu Leu Leu Ala Asp Asp Gly Gly Phe Glu

1 5 10 15

Ser Gly Ala Tyr Asn Asn Ser Ala Ile Ala Thr Pro His Leu Asp Ala

20 25 30

Leu Ala Arg Arg Ser Leu Leu Phe Arg Asn Ala Phe Thr Ser Val Ser

35 40 45

Ser Cys Ser Pro Ser Arg Ala Ser Leu Leu Thr Gly Leu Pro Gln His

50 55 60

Gln Asn Gly Met Tyr Gly Leu His Gln Asp Val His His Phe Asn Ser

65 70 75 80

Phe Asp Lys Val Arg Ser Leu Pro Leu Leu Leu Ser Gln Ala Gly Val

85 90 95

Arg Thr Gly Ile Ile Gly Lys Lys His Val Gly Pro Glu Thr Val Tyr

100 105 110

Pro Phe Asp Phe Ala Tyr Thr Glu Glu Asn Gly Ser Val Leu Gln Val

115 120 125

Gly Arg Asn Ile Thr Arg Ile Lys Leu Leu Val Arg Lys Phe Leu Gln

130 135 140

Thr Gln Asp Asp Arg Pro Phe Phe Leu Tyr Val Ala Phe His Asp Pro

145                      150                      155                      160  
 His Arg Cys Gly His Ser Gln Pro Gln Tyr Gly Thr Phe Cys Glu Lys  
                                  165                      170                      175  
  
 Phe Gly Asn Gly Glu Ser Gly Met Gly Arg Ile Pro Asp Trp Thr Pro  
                                  180                      185                      190  
 Gln Ala Tyr Asp Pro Leu Asp Val Leu Val Pro Tyr Phe Val Pro Asn  
                                  195                      200                      205  
 Thr Pro Ala Ala Arg Ala Asp Leu Ala Ala Gln Tyr Thr Thr Val Gly  
                                  210                      215                      220  
 Arg Met Asp Gln Gly Val Gly Leu Val Leu Gln Glu Leu Arg Asp Ala  
 225                      230                      235                      240  
  
 Gly Val Leu Asn Asp Thr Leu Val Ile Phe Thr Ser Asp Asn Gly Ile  
                                  245                      250                      255  
 Pro Phe Pro Ser Gly Arg Thr Asn Leu Tyr Trp Pro Gly Thr Ala Glu  
                                  260                      265                      270  
 Pro Leu Leu Val Ser Ser Pro Glu His Pro Lys Arg Trp Gly Gln Val  
                                  275                      280                      285  
 Ser Glu Ala Tyr Val Ser Leu Leu Asp Leu Thr Pro Thr Ile Leu Asp  
                                  290                      295                      300  
  
 Trp Phe Ser Ile Pro Tyr Pro Ser Tyr Ala Ile Phe Gly Ser Lys Thr  
 305                      310                      315                      320  
 Ile His Leu Thr Gly Arg Ser Leu Leu Pro Ala Leu Glu Ala Glu Pro  
                                  325                      330                      335  
 Leu Trp Ala Thr Val Phe Gly Ser Gln Ser His His Glu Val Thr Met  
                                  340                      345                      350  
 Ser Tyr Pro Met Arg Ser Val Gln His Arg His Phe Arg Leu Val His  
                                  355                      360                      365  
  
 Asn Leu Asn Phe Lys Met Pro Phe Pro Ile Asp Gln Asp Phe Tyr Val  
                                  370                      375                      380  
 Ser Pro Thr Phe Gln Asp Leu Leu Asn Arg Thr Thr Ala Gly Gln Pro  
 385                      390                      395                      400



Thr Gly Trp Tyr Lys Asp Leu Arg His Tyr Tyr Tyr Arg Ala Arg Trp  
 405 410 415  
 Glu Leu Tyr Asp Arg Ser Arg Asp Pro His Glu Thr Gln Asn Leu Ala  
 420 425 430

Thr Asp Pro Arg Phe Ala Gln Leu Leu Glu Met Leu Arg Asp Gln Leu  
 435 440 445  
 Ala Lys Trp Gln Trp Glu Thr His Asp Pro Trp Val Cys Ala Pro Asp  
 450 455 460  
 Gly Val Leu Glu Glu Lys Leu Ser Pro Gln Cys Gln Pro Leu His Asn  
 465 470 475 480  
 Glu Leu

<210> 2

<211> 502

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Cys Pro Val Pro Ala Cys Cys Ala Leu Leu Leu Val Leu Gly

1 5 10 15  
 Leu Cys Arg Ala Arg Pro Arg Asn Ala Leu Leu Leu Leu Ala Asp Asp  
 20 25 30  
 Gly Gly Phe Glu Ser Gly Ala Tyr Asn Asn Ser Ala Ile Ala Thr Pro  
 35 40 45  
 His Leu Asp Ala Leu Ala Arg Arg Ser Leu Leu Phe Arg Asn Ala Phe  
 50 55 60  
 Thr Ser Val Ser Ser Cys Ser Pro Ser Arg Ala Ser Leu Leu Thr Gly

65 70 75 80  
 Leu Pro Gln His Gln Asn Gly Met Tyr Gly Leu His Gln Asp Val His  
 85 90 95  
 His Phe Asn Ser Phe Asp Lys Val Arg Ser Leu Pro Leu Leu Leu Ser  
 100 105 110  
 Gln Ala Gly Val Arg Thr Gly Ile Ile Gly Lys Lys His Val Gly Pro

115                                      120                                      125  
 Glu Thr Val Tyr Pro Phe Asp Phe Ala Tyr Thr Glu Glu Asn Gly Ser  
  
 130                                      135                                      140  
 Val Leu Gln Val Gly Arg Asn Ile Thr Arg Ile Lys Leu Leu Val Arg  
 145                                      150                                      155                                      160  
 Lys Phe Leu Gln Thr Gln Asp Asp Arg Pro Phe Phe Leu Tyr Val Ala  
 165                                      170                                      175  
 Phe His Asp Pro His Arg Cys Gly His Ser Gln Pro Gln Tyr Gly Thr  
 180                                      185                                      190  
 Phe Cys Glu Lys Phe Gly Asn Gly Glu Ser Gly Met Gly Arg Ile Pro  
  
 195                                      200                                      205  
 Asp Trp Thr Pro Gln Ala Tyr Asp Pro Leu Asp Val Leu Val Pro Tyr  
 210                                      215                                      220  
 Phe Val Pro Asn Thr Pro Ala Ala Arg Ala Asp Leu Ala Ala Gln Tyr  
 225                                      230                                      235                                      240  
 Thr Thr Val Gly Arg Met Asp Gln Gly Val Gly Leu Val Leu Gln Glu  
 245                                      250                                      255  
 Leu Arg Asp Ala Gly Val Leu Asn Asp Thr Leu Val Ile Phe Thr Ser  
  
 260                                      265                                      270  
 Asp Asn Gly Ile Pro Phe Pro Ser Gly Arg Thr Asn Leu Tyr Trp Pro  
 275                                      280                                      285  
 Gly Thr Ala Glu Pro Leu Leu Val Ser Ser Pro Glu His Pro Lys Arg  
 290                                      295                                      300  
 Trp Gly Gln Val Ser Glu Ala Tyr Val Ser Leu Leu Asp Leu Thr Pro  
 305                                      310                                      315                                      320  
 Thr Ile Leu Asp Trp Phe Ser Ile Pro Tyr Pro Ser Tyr Ala Ile Phe  
  
 325                                      330                                      335  
 Gly Ser Lys Thr Ile His Leu Thr Gly Arg Ser Leu Leu Pro Ala Leu  
 340                                      345                                      350  
 Glu Ala Glu Pro Leu Trp Ala Thr Val Phe Gly Ser Gln Ser His His  
 355                                      360                                      365

Glu Val Thr Met Ser Tyr Pro Met Arg Ser Val Gln His Arg His Phe  
 370 375 380  
 Arg Leu Val His Asn Leu Asn Phe Lys Met Pro Phe Pro Ile Asp Gln  
  
 385 390 395 400  
 Asp Phe Tyr Val Ser Pro Thr Phe Gln Asp Leu Leu Asn Arg Thr Thr  
 405 410 415  
 Ala Gly Gln Pro Thr Gly Trp Tyr Lys Asp Leu Arg His Tyr Tyr Tyr  
 420 425 430  
 Arg Ala Arg Trp Glu Leu Tyr Asp Arg Ser Arg Asp Pro His Glu Thr  
 435 440 445  
 Gln Asn Leu Ala Thr Asp Pro Arg Phe Ala Gln Leu Leu Glu Met Leu  
  
 450 455 460  
 Arg Asp Gln Leu Ala Lys Trp Gln Trp Glu Thr His Asp Pro Trp Val  
 465 470 475 480  
 Cys Ala Pro Asp Gly Val Leu Glu Glu Lys Leu Ser Pro Gln Cys Gln  
 485 490 495  
 Pro Leu His Asn Glu Leu  
 500