



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105664142 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 15

(21) 申请号 201610086722. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 06. 25

A61K 38/46(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 9/19(2006. 01)

61/358, 857 2010. 06. 25 US

A61K 47/26(2006. 01)

61/360, 786 2010. 07. 01 US

A61K 47/02(2006. 01)

61/387, 862 2010. 09. 29 US

A61P 25/00(2006. 01)

61/435, 710 2011. 01. 24 US

A61P 25/14(2006. 01)

61/442, 115 2011. 02. 11 US

A61P 25/20(2006. 01)

61/476, 210 2011. 04. 15 US

A61P 25/28(2006. 01)

61/495, 268 2011. 06. 09 US

(62) 分案原申请数据

201180040902. 2 2011. 06. 25

(71) 申请人 夏尔人类遗传性治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 F·纳托里 G·朱 J·特略 Y·江

J·宗 Z·夏若克 B·维纳格利亚

J·潘 R·菲佛 P·加莱斯

(74) 专利代理机构 北京商专永信知识产权代理

事务所(普通合伙) 11400

代理人 邬玥 葛强

权利要求书4页 说明书71页

序列表6页 附图35页

(54) 发明名称

乙酰肝素N-硫酸酯酶CNS递送的方法和组合物

(57) 摘要

本发明提供了,除了其它的以外,CNS递送溶酶体酶的组合物和方法,以有效治疗溶酶体贮积症。在一些实施方案中,本发明包括直接CNS鞘内施用的稳定制剂,所述稳定制剂包括乙酰肝素N-硫酸酯酶(HNS)蛋白质、盐、和聚山梨醇酯表面活性剂,以治疗Sanfilippo综合症类型A。

1. 鞘内施用的稳定制剂, 包含乙酰肝素N-硫酸酯酶(HNS)蛋白质、盐、缓冲剂和聚山梨醇酯表面活性剂。

2. 如权利要求1所述的稳定制剂, 其中所述HNS蛋白质以多达大约100mg/ml的浓度存在。

3. 如权利要求1所述的稳定制剂, 其中所述HNS蛋白质以多达大约30mg/ml的浓度存在。

4. 前述权利要求中任意一项所述的稳定制剂, 其中所述HNS蛋白质存在的浓度范围从大约10-20mg/ml。

5. 前述权利要求中任意一项所述的稳定制剂, 其中所述HNS蛋白质存在的浓度范围为大约15mg/ml。

6. 前述权利要求中任意一项所述的稳定制剂, 其中所述HNS蛋白质包括氨基酸序列SEQ ID NO:1。

7. 前述权利要求中任意一项所述的稳定制剂, 其中所述盐是NaCl。

8. 权利要求7所述的稳定制剂, 其中所述NaCl存在的浓度范围从大约0-300mM。

9. 权利要求8所述的稳定剂, 其中所述NaCl以大约100-200mM的浓度存在。

10. 权利要求9所述的稳定制剂, 其中所述NaCl以大约145mM的浓度存在。

11. 前述权利要求中任意一项所述的稳定制剂, 其中所述聚山梨醇酯表面活性剂选自: 聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯80及其组合。

12. 如权利要求11所述的稳定制剂, 其中所述聚山梨醇酯表面活性剂选自为聚山梨醇酯20。

13. 如权利要求12所述的稳定制剂, 其中所述聚山梨醇酯20存在的浓度范围大约0-0.05%。

14. 如权利要求13所述的稳定制剂, 其中所述聚山梨醇酯20存在的浓度范围大约0.02%。

15. 如权利要求13所述的稳定制剂, 其中所述聚山梨醇酯20以大约0.005%的浓度存在。

16. 前述权利要求中任意一项所述的稳定制剂, 其中所述缓冲剂为磷酸盐。

17. 如权利要求16所述的稳定制剂, 其中所述磷酸盐存在的浓度不大于50mM。

18. 如权利要求16所述的稳定制剂, 其中所述磷酸盐存在的浓度不大于20mM。

19. 如权利要求17所述的稳定制剂, 其中所述磷酸盐存在的浓度范围大约5mM。

20. 前述权利要求中任意一项所述的稳定制剂, 其中所述制剂具有pH大约5.0-8.0。

21. 如权利要求18所述的稳定制剂, 其中所述制剂具有pH大约6.5-7.5。

22. 如权利要求19所述的稳定制剂, 其中所述制剂具有pH大约7.0。

23. 前述权利要求中任意一项所述的稳定制剂, 其中所述制剂进一步包括稳定剂。

24. 权利要求23所述的稳定制剂, 其中所述稳定剂选自: 蔗糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、PEG 4000、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、磷脂及其组合。

25. 权利要求24所述的稳定制剂, 其中所述稳定剂为蔗糖。

26. 权利要求25所述的稳定制剂, 其中所述蔗糖存在的浓度范围从大约0-10%。

27. 权利要求26所述的所述稳定制剂, 其中所述蔗糖存在的浓度范围从大约0.5-2.0%。

28. 权利要求23所述的所述稳定制剂,其中所述稳定剂是葡萄糖。
29. 权利要求28所述的所述稳定制剂,其中所述葡萄糖存在的浓度范围从大约0.5-1.0%。
30. 前述权利要求中任意一项所述的稳定制剂,其中所述制剂为液体制剂。
31. 权利要求1-29中任意一项所述的稳定制剂,其中所述制剂配制成冻干粉。
32. 鞘内施用的稳定制剂,包括至多大约30mg/ml浓度的乙酰肝素N-硫酸酯酶(HNS)蛋白质,浓度大约100-200mM的NaCl,浓度大约0.02%的聚山梨醇酯20,浓度大约5mM的磷酸盐,以及大约7.0的pH。
33. 权利要求32所述的稳定制剂,其中所述HNS蛋白质的浓度大约15mg/ml。
34. 权利要求32或者33所述的稳定制剂,其中所述NaCl的浓度大约145mM。
35. 权利要求32-34中任意一项所述稳定制剂,其中所述制剂进一步包括浓度大约0-10%的蔗糖。
36. 鞘内施用的稳定制剂,包括至多大约30mg/ml浓度的乙酰肝素N-硫酸酯酶(HNS)蛋白质,浓度大约145mM的NaCl,浓度大约0.02%的聚山梨醇酯20,浓度大约5mM的磷酸盐,浓度大约0.5-2%的蔗糖,以及大约7.0的pH。
37. 鞘内施用的稳定制剂,包括至多大约30mg/ml浓度的乙酰肝素N-硫酸酯酶(HNS)蛋白质,浓度大约145mM的NaCl,浓度大约0.02%的聚山梨醇酯20,浓度大约5mM的磷酸盐,浓度大约0.5-1.0%的葡萄糖,以及大约7.0的pH。
38. 权利要求36或者37所述稳定制剂,其中所述制剂配制成冻干粉。
39. 容器,包括单剂型稳定制剂,所述稳定制剂为根据权利要求1-38任意一项所述的稳定制剂。
40. 根据权利要求39所述的容器,其中所述容器选自:安瓿、预填充的注射器、小药瓶、药筒、二室注射器给药系统、贮液囊。
41. 权利要求40所述的容器,其中所述容器为预填充的小药瓶。
42. 权利要求39-41中任意一项所述的容器,其中所述稳定制剂存在的体积小于约50mL。
43. 权利要求42所述的容器,其中所述稳定制剂存在的体积小于约5.0mL。
44. 根据权利要求1-38任意一项所述的制剂在药物制备中的用途,所述药物用于治疗Sanfilippo A综合症,其中所述治疗包括向需要治疗的受试者鞘内施用所述药物。
45. 根据权利要求44所述的用途,其中所述鞘内施用在所述受试者中没有产生实质性副作用。
46. 权利要求45所述的用途,其中所述鞘内施用在所述受试者中没有产生实质性适应性T-细胞介导的免疫应答。
47. 权利要求44-46中任意一项所述的用途,其中所述制剂的所述鞘内施用导致递送所述HNS蛋白质至一种或多种靶脑组织。
48. 权利要求47所述的用途,其中所述一种或多种靶脑组织选自:灰质、白质、脑室周围区域、软膜蛛网膜、脑膜、新皮质、小脑、大脑皮层的深部组织、分子层、尾状核/豆状核区域、中脑、脑桥或者延髓的深部区域、及其组合。
49. 权利要求47或者48所述的用途,其中所述HNS蛋白质被递送至神经元、胶质细胞、血

管周细胞和/或脑膜细胞。

50. 权利要求44-49中任意一项所述的用途,其中所述HNS蛋白质被进一步递送至在所述脊髓中的神经元。

51. 权利要求44-50任意一项所述的用途,其中所述制剂的所述鞘内施用进一步导致所述HNS蛋白质在外周靶组织中的全身递送。

52. 权利要求51所述的用途,其中所述外周靶组织选自:肝脏、肾脏、和/或心脏。

53. 权利要求44-52中任意一项所述的用途,其中所述制剂的所述鞘内施用导致在脑靶组织、脊髓神经元和/或外周靶组织中的溶酶体定位。

54. 权利要求44-53中任意一项所述的用途,其中所述制剂的所述鞘内施用导致在脑靶组织、脊髓神经元和/或外周靶组织中溶酶体储存减少。

55. 权利要求54所述的用途,其中所述溶酶体储存与对照相比,以至少20%、40%、50%、60%、80%、90%、1-倍、1.5-倍,或者2-倍地减少。

56. 权利要求44-55中任意一项所述的用途,其中所述制剂的所述鞘内施用导致在神经元中液泡化减少。

57. 根据权利要求56所述的用途,其中所述神经元包括浦肯野细胞。

58. 权利要求44-53中任意一项所述的用途,其中所述制剂的所述鞘内施用导致所述HNS酶活性在所述脑靶组织、脊髓神经元和/或外周靶组织中增加。

59. 根据权利要求58所述的用途,其中所述HNS酶活性与对照相比,以至少1-倍、2-倍、3-倍、4-倍、5-倍、6-倍、7-倍、8-倍、9-倍或者10-倍地增加。

60. 根据权利要求58或者59所述的用途,其中所述增加的HNS酶活性为至少大约10nmol/hr/mg, 20nmol/hr/mg, 40nmol/hr/mg, 50nmol/hr/mg, 60nmol/hr/mg, 70nmol/hr/mg, 80nmol/hr/mg, 90nmol/hr/mg, 100nmol/hr/mg, 150nmol/hr/mg, 200nmol/hr/mg, 250nmol/hr/mg, 300nmol/hr/mg, 350nmol/hr/mg, 400nmol/hr/mg, 450nmol/hr/mg, 500nmol/hr/mg, 550nmol/hr/mg或者600nmol/hr/mg。

61. 根据权利要求58所述的用途,其中所述HNS酶活性在所述腰椎区域中增加。

62. 权利要求61所述的用途,其中所述增加的HNS酶活性在所述腰椎区域中为至少大约2000nmol/hr/mg, 3000nmol/hr/mg, 4000nmol/hr/mg, 5000nmol/hr/mg, 6000nmol/hr/mg, 7000nmol/hr/mg, 8000nmol/hr/mg, 9000nmol/hr/mg, 或者10,000nmol/hr/mg。

63. 权利要求44-62任意一项所述的用途,其中所述制剂的所述鞘内施用导致Sanfilippo A综合症的至少一种症状或者特征在强度、严重程度或者频率方面减少,或者延缓发生。

64. 权利要求63所述的用途,其中所述San A疾病的至少一种症状或者特征为听力损失、语言发展迟缓、运动技能缺陷、活动过度、智力迟钝、攻击性和/或睡眠障碍。

65. 权利要求44-62任意一项所述的用途,其中所述鞘内施用的发生每两个星期一次。

66. 权利要求44-62任意一项所述的用途,其中所述鞘内施用的发生每月一次。

67. 权利要求44-62任意一项所述的用途,其中所述鞘内施用的发生每两个月一次。

68. 权利要求44-67任意一项所述的用途,其中所述鞘内施用被用于连同静脉施用。

69. 权利要求68所述的用途,其中所述静脉施用没有比每月一次更频繁。

70. 权利要求68所述的用途,其中所述静脉施用没有比每两个月一次更频繁。

71. 权利要求44-67任意一项所述的用途,其中所述鞘内施用在缺乏静脉施用时使用。

72. 权利要求44-71任意一项所述的用途,其中所述鞘内施用在缺乏并发免疫抑制疗法时使用。

乙酰肝素N-硫酸酯酶CNS递送的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是申请号为201180040902.2、申请日为2011年6月25日、发明名称为“乙酰肝素N-硫酸酯酶CNS递送的方法和组合物”的中国发明专利申请的分案申请,原申请为国际申请号为PCT/US2011/041922的国家阶段申请。

[0003] 该国际申请要求美国临时申请序列号61/358,857(2010年06月25日提交);61/360,786(2010年7月1日提交);61/387,862(2010年9月29日提交);61/435,710(2011年1月24日提交);61/442,115(2011年2月11日提交);61/476,210(2011年4月15日提交);和61/495,268(2011年6月9日提交)的优先权;其中每个的整体通过参考的方式并入本文。与该申请相关的美国申请:名称为“治疗试剂的CNS递送;”于同日提交;“艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶的CNS递送的方法和组合物;”于同日提交;“ β -半乳糖脑苷脂酶CNS递送的方法和组合物;”于同日提交;“芳基硫酸酯酶A的CNS递送的方法和组合物;”于同日提交;“Sanfilippo综合症类型B的治疗;”于同日提交;其中每个的整体通过参考的方式并入本文。

背景技术

[0004] 酶替代治疗(ERT)涉及全身施用天然或者重组来源的蛋白质和/或酶至受试者。批准的疗法通常是通过静脉向受试者施用,并且对于治疗潜在的酶缺乏症的躯体症状有效。由于所述静脉施用的蛋白质和/或酶在进入所述中枢神经系统(CNS)的细胞和组织内的有限分布,具有CNS病因学的所述疾病的治疗尤其具有挑战性,因为所述静脉施用的蛋白质和/或酶没有充分穿过血-脑屏障(BBB)。

[0005] 所述血-脑屏障(BBB)是由内皮细胞构成的体系,其功能是保护所述中枢神经系统(CNS)使免于遭受在所述血流中的有害物质,例如细菌、大分子(例如蛋白质)和其它亲水性分子,通过限制这种物质穿过所述BBB的扩散并进入所述潜在的脑脊髓液(CSF)和CNS。

[0006] 有几种绕过所述BBB的方式,以增强治疗试剂的脑递送,包括直接的颅内注射、所述BBB的短暂通透性、以及修饰活性剂以改变组织分布。治疗试剂完全绕过所述血管直接注射进入脑组织,但是主要有患并发症(传染、组织损伤、免疫应答)的风险,所述并发症由颅内注射、以及所述活性剂从所述施用位点的轻度扩散所引起。到目前为止,蛋白质直接施用进所述脑物质中不能实现显著的治疗效果,因为扩散障碍和可以被施用的治疗体积有限。对流协助扩散已经通过放置在所述脑实质中的导管研究,使用缓慢的、长期的输液(Bobo,等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 91,2076-2080(1994);Nguyen,等J.Neurosurg.98,584-590(2003)),但是没有使用这种方法进行长期治疗的批准疗法。另外,大脑内导管的放置是非常侵入性的,并且作为临床替代不太理想。

[0007] 鞘内(IT)注射,或者施用蛋白质到所述脑脊髓液(CSF),也已经被尝试,但是没有产生成功的治疗。在这种治疗方法中的主要的挑战是所述活性剂倾向于非常紧密地绑定在脑室室管膜衬里,其阻止了随后的扩散。目前,通过直接施用到所述CSF以治疗脑遗传性疾病,还没有批准的产品。

[0008] 事实上,很多人都认为在大脑表面扩散的障碍、以及缺乏有效和便捷的递送方式,

极大地妨碍了在大脑中任何疾病达到足够的治疗效果。

[0009] 许多溶酶体贮积症影响神经系统,从而在用传统治疗方法治疗这些疾病中表现出独特的挑战。在受影响的个体的神经元和脑膜中往往在大量聚集糖胺聚糖(GAG),导致各种形式的CNS症状。迄今为止,还没有成功地以任何方式治疗由溶酶体疾病导致的CNS症状。

[0010] 因此,仍然非常需要有效地将治疗试剂递送到大脑。更具体地讲,非常需要更有效地递送活性剂到中枢神经系统,用于治疗溶酶体贮积症。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明提供了有效和较少侵入性的直接递送治疗试剂到中枢神经系统(CNS)的方法。部分上,本发明基于意外发现的基础上,即溶酶体贮积症(例如, Sanfilippo A综合症)的替代酶(例如,乙酰肝素N-硫酸酯酶(HNS))可以直接以高浓度(例如,大于约3mg/ml, 4mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml或更多)引入到有需要治疗的受试者的脑脊髓液(CSF)中,使得所述酶有效和广泛地在各表面之间扩散并在所述脑的各区域之间贯通,包括深部脑区域。更令人惊讶的是,本发明人已经证明可以使用简单的生理盐水或缓冲液为基础的制剂会达到如此高浓度蛋白的递送,而不诱发实质性的不利影响,如在所述受试者中严重的免疫反应。因此,本发明提供了高效、临床可取的和患者友好型的方法,用于直接CNS递送以治疗具有CNS组分,特别是溶酶体贮积症的各种疾病和紊乱。本发明在CNS靶向领域和酶替代疗法中代表了显著的进步。

[0013] 如下文详细描述,本发明人已经成功开发了稳定制剂,以有效鞘内(IT)施用乙酰肝素N-硫酸酯酶(HNS)蛋白质。可以设想,无论如何,下文描述的多种稳定制剂通常适合于治疗试剂的CNS递送,包括多种其它溶酶体酶。的确,根据本发明的稳定制剂可以通过多种技术和途径,用于CNS递送,包括但不限于,脑实质内的、大脑内的、脑室内的(ICV)、鞘内的(例如, IT-腰椎、IT-小脑延髓池)施用,以及其它直接或间接注射入所述CNS技术和/或CSF的技术和途径。

[0014] 还可以设想,下文描述的多种稳定制剂通常适合于其它治疗试剂的CNS递送,例如治疗性蛋白质,包括用于溶酶体贮积症的多种替代酶。在一些实施方案中,替代酶可以是合成的、重组的、基因活化的或者天然的酶。

[0015] 在一个方面中,本发明提供了鞘内施用的稳定制剂,所述稳定制剂包括乙酰肝素N-硫酸酯酶(HNS)蛋白质、盐、缓冲剂和聚山梨醇酯表面活性剂。在一些实施方案中,所述HNS蛋白质存在的浓度范围从大约1-300mg/ml(例如, 1-250mg/ml, 1-200mg/ml, 1-150mg/ml, 1-100mg/ml, 1-50mg/ml)。在一些实施方案中,所述HNS蛋白质存在的浓度为或者至多选自: 2mg/ml, 3mg/ml, 4mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml, 15mg/ml, 20mg/ml, 25mg/ml, 30mg/ml, 35mg/ml, 40mg/ml, 45mg/ml, 50mg/ml, 60mg/ml, 70mg/ml, 80mg/ml, 90mg/ml, 100mg/ml, 150mg/ml, 200mg/ml, 250mg/ml, 或者300mg/ml。

[0016] 在多种实施方案中,本发明包括下文描述的任意实施方案的稳定制剂,其中所述HNS蛋白质包括氨基酸序列SEQ ID NO:1。在一些实施方案中,所述HNS蛋白质包括的氨基酸序列与SEQ ID NO:1至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或者98%地一致。在一些实施方案中,所述下文描述的任意实施方案的稳定制剂包括盐。在一些实施方案中,所述盐是NaCl。在一些实施方案中,所述NaCl存在的浓度范围从大约0-300mM(例如, 0-250mM, 0-200mM, 0-150mM, 0-100mM, 0-75mM, 0-50mM, 或者0-30mM)。在一些实施方案中,所述

NaCl存在的浓度范围从大约135-155mM。在一些实施方案中,所述NaCl以大约145mM的浓度存在。

[0017] 在多种实施方案中,本发明包括下文描述的任意实施方案的稳定制剂,其中所述聚山梨醇酯表面活性剂选自:聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯80及其组合。在一些实施方案中,所述聚山梨醇酯表面活性剂为聚山梨醇酯20。在一些实施方案中,所述聚山梨醇酯20存在的浓度范围大约0-0.02%。在一些实施方案中,所述聚山梨醇酯20以大约0.005%的浓度存在。在一些实施方案中,所述聚山梨醇酯20存在的浓度范围大约0.02%。

[0018] 在多种实施方案中,本发明包括下文描述的任意实施方案的稳定制剂,其中所述制剂进一步包括缓冲剂。在一些实施方案中,所述缓冲剂选自:磷酸盐、醋酸盐、组氨酸、琥珀酸盐、Tris、及其组合。在一些实施方案中,所述缓冲剂为磷酸盐。在一些实施方案中,所述磷酸盐存在的浓度不大于50mM(例如,不大于45mM、40mM、35mM、30mM、25mM、20mM、15mM、10mM、或者5mM)。在一些实施方案中,所述磷酸盐存在的浓度不大于20mM。在某些实施方案中,所述磷酸盐存在的浓度范围大约5mM。在多个方面中,本发明包括下文描述的任意实施方案的稳定制剂,其中所述制剂具有pH大约3-8(例如,大约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,或者6.5-7.5)。在一些实施方案中,所述制剂具有pH大约6.5-7.5(例如,6.5,6.7,6.9,7.0,7.2,7.3,或者7.5)。在一些实施方案中,所述制剂具有pH大约7.0。

[0019] 在一些实施方案中,所述制剂进一步包括稳定剂。在某些实施方案中,所述稳定剂选自:蔗糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、PEG 4000、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、磷脂及其组合。在某些实施方案中,所述稳定剂为蔗糖。在一些实施方案中,所述蔗糖存在的浓度范围从大约0-10%。在一些实施方案中,所述蔗糖存在的浓度范围从大约0.5-2.0%。在某些实施方案中,所述稳定剂是葡萄糖。在一些实施方案中,所述葡萄糖存在的浓度范围从大约0.5-1.0%。

[0020] 在多种实施方案中,本发明包括本文描述的任意实施方案的稳定制剂,其中所述制剂为液体制剂。在多种实施方案中,本发明包括下文描述的任意实施方案的稳定制剂,其中所述制剂配制成冻干粉。

[0021] 在一些实施方案中,本发明包括鞘内施用的稳定制剂,所述稳定制剂包括至多大约30mg/ml浓度的乙酰肝素N-硫酸酯酶(HNS)蛋白质,浓度大约100-200mM的NaCl,浓度大约0.02%的聚山梨醇酯20,浓度大约5mM的磷酸盐,以及大约7.0的pH。在一些实施方案中,所述HNS蛋白质的浓度大约15mg/ml。在一些实施方案中,所述HNS蛋白质的浓度大约30mg/ml,40mg/ml,50mg/ml,100mg/ml,150mg/ml,200mg/ml,250mg/ml,或者300mg/ml。在一些实施方案中,所述NaCl的浓度大约145mM。在一些实施方案中,所述制剂进一步包括浓度大约0-10%的蔗糖(例如,大约0-5%,1-7%,1-2.5%,1-1.5%,或者0.5-1.5%)。

[0022] 在一些实施方案中,本发明包括鞘内施用的稳定制剂,所述稳定制剂包括至多大约30mg/ml浓度的乙酰肝素N-硫酸酯酶(HNS)蛋白质,浓度大约145mM的NaCl,浓度大约0.02%的聚山梨醇酯20,浓度大约5mM的磷酸盐,浓度大约0.5-2%的蔗糖,以及大约7.0的pH。

[0023] 在一些实施方案中,本发明包括鞘内施用的稳定制剂,所述稳定制剂包括至多大

约30mg/ml浓度的乙酰肝素N-硫酸酯酶(HNS)蛋白质,浓度大约145mM的NaCl,浓度大约0.02%的聚山梨醇酯20,浓度大约5mM的磷酸盐,浓度大约0.5-1.0%的葡萄糖,以及大约7.0的pH。

[0024] 在多个方面中,本发明包括容器,所述容器包含单剂型的稳定制剂(在本文描述的多个实施方案中)。在一些实施方案中,所述容器选自:安瓿、小药瓶、瓶子、药筒、贮液囊、(装有冻干粉和稀释剂的)二室注射器给药系统、或预填充的注射器。在一些实施方案中,所述容器为预填充的注射器。在一些实施方案中,所述预填充的注射器选自:具有烘干的硅树脂涂层的硼硅酸盐玻璃注射器,喷涂硅树脂的硼硅酸盐玻璃注射器,或者无硅树脂的塑料树脂注射器。在一些实施方案中,所述稳定制剂存在的体积小于约50mL(例如,小于约45ml、40ml、35ml、30ml、25ml、20ml、15ml、10ml、5ml、4ml、3ml、2.5ml、2.0ml、1.5ml、1.0ml或者0.5ml)。在一些实施方案中,所述稳定制剂存在的体积小于约3.0mL。

[0025] 在多个方面中,本发明包括治疗Sanfilippo A综合症的方法,所述方法包括根据本文描述的任意实施方案,向需要治疗的受试者鞘内施用制剂的步骤。

[0026] 在一些实施方案中,本发明包括治疗Sanfilippo A综合症的方法,所述方法包括步骤:向需要治疗的受试者鞘内施用制剂,所述制剂包括浓度范围从大约1-300mg/ml的HNS蛋白质,浓度大约145mM的NaCl,浓度大约0.02%的聚山梨醇酯20以及大约7的pH。

[0027] 在一些实施方案中,所述鞘内施用在所述受试者中没有导致实质性副作用(例如,严重的免疫应答)。在一些实施方案中,所述鞘内施用在所述受试者中没有导致实质性适应性T-细胞介导的免疫应答。

[0028] 在一些实施方案中,所述制剂的所述鞘内施用导致递送所述HNS蛋白质至在所述脑、所述脊髓和/或外周器官中的多个靶组织。在一些实施方案中,所述制剂的所述鞘内施用导致递送所述HNS蛋白质至靶脑组织。在某些实施方案中,所述一种或多种脑靶组织选自:灰质、白质、脑室周围区域、软膜蛛网膜、脑膜、新皮质、小脑、大脑皮层的深部组织、分子层、尾状核/豆状核区域、中脑、脑桥或者延髓的深部区域、及其组合。在某些实施方案中,所述HNS蛋白质被递送至神经元、胶质细胞、血管周细胞和/或脑膜细胞。在一些实施方案中,所述HNS蛋白质被进一步递送至在所述脊髓中的神经元。

[0029] 在一些实施方案中,所述制剂的所述鞘内施用进一步导致所述HNS蛋白质在外周靶组织中的全身递送。在一些实施方案中,所述外周靶组织选自:肝脏,肾脏,脾脏和/或心脏。

[0030] 在一些实施方案中,所述制剂的所述鞘内施用导致在脑靶组织、脊髓神经元和/或外周靶组织中的溶酶体定位。在一些实施方案中,所述制剂的所述鞘内施用导致GAG储存在所述脑靶组织、脊髓神经元和/或外周靶组织中减少。在一些实施方案中,所述GAG储存与对照相比,以至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1-倍、1.5-倍、或者2-倍地减少(例如,在所述受试者中的所述预处理GAG储存)。在一些实施方案中,所述制剂的所述鞘内施用导致在神经元中液泡化减少(例如,与对照相比,以至少20%、40%、50%、60%、80%、90%、1-倍、1.5-倍、或者2-倍)。在一些实施方案中,所述神经元包括浦肯野细胞。

[0031] 在一些实施方案中,所述制剂的所述鞘内施用导致所述HNS酶活性在所述脑靶组织、脊髓神经元和/或外周靶组织中增加。在一些实施方案中,所述HNS酶活性与对照相比,

以至少1-倍、2-倍、3-倍、4-倍、5-倍、6-倍、7-倍、8-倍、9-倍或者10-倍地增加(例如,在所述受试者中的所述预处理内源性酶活性)。在一些实施方案中,所述增加的酶活性为至少大约10nmol/hr/mg,20nmol/hr/mg,40nmol/hr/mg,50nmol/hr/mg,60nmol/hr/mg,70nmol/hr/mg,80nmol/hr/mg,90nmol/hr/mg,100nmol/hr/mg,150nmol/hr/mg,200nmol/hr/mg,250nmol/hr/mg,300nmol/hr/mg,350nmol/hr/mg,400nmol/hr/mg,450nmol/hr/mg,500nmol/hr/mg,550nmol/hr/mg或者600nmol/hr/mg。

[0032] 在一些实施方案中,所述HNS酶活性在所述腰椎区域中增加。在一些实施方案中,在所述腰椎区域中所述增加的HNS酶活性微至少大约2000nmol/hr/mg,3000nmol/hr/mg,4000nmol/hr/mg,5000nmol/hr/mg,6000nmol/hr/mg,7000nmol/hr/mg,8000nmol/hr/mg,9000nmol/hr/mg,或者10,000nmol/hr/mg。

[0033] 在一些实施方案中,所述制剂的所述鞘内施用导致Sanfilippo A综合症的至少一种症状或者特征在强度、严重程度或者频率方面减少,或者延缓发生。在一些实施方案中,所述Sanfilippo A综合症的所述至少一种症状或者特征为听力损失、语言发展迟缓、运动技能缺陷、活动过度、智力迟钝、攻击性和/或睡眠障碍。

[0034] 在一些实施方案中,所述鞘内施用的发生每两个星期一次。在一些实施方案中,所述鞘内施用的发生每月一次。在一些实施方案中,所述鞘内施用的发生每两个月一次。在一些实施方案中,所述鞘内施用被用于连同静脉施用。在一些实施方案中,所述静脉施用频率没有比每隔一周更频繁。在一些实施方案中,所述静脉施用没有比每两个星期一次更频繁。在一些实施方案中,所述静脉施用没有比每月一次更频繁。在一些实施方案中,所述静脉施用没有比每两个月一次更频繁。在某些实施方案中,所述静脉施用比每月一次施用更频繁,例如每周两次、每周一次、每隔一周一次或者每月两次。

[0035] 在一些实施方案中,静脉和鞘内施用在同一天进行。在一些实施方案中,所述静脉和鞘内施用不在彼此的一定时间内执行,例如不执行:在至少2天以内,在至少3天以内,在至少4天以内,在至少5天以内,在至少6天以内,在至少7天以内,或者在至少一周以内。在一些实施方案中,静脉和鞘内施用按照交替的时间表执行,例如每周一次、每隔一周、每月两次或者每月一次交替施用。在一些实施方案中,鞘内施用替代在施用时间表上的静脉施用,例如在每周一次、每隔一周、每月两次或者每月一次的静脉施用时间表上,在该时间表中的每第三次或第四次或第五次施用可以用鞘内施用代替静脉施用。

[0036] 在一些实施方案中,静脉和鞘内施用是连续地执行的,例如首先执行静脉施用(例如,每周一次、每隔一周、每月两次或者每月一次给药为期两周、一个月、二个月、三个月、四个月、五个月、六个月或者一年或者更久),然后鞘内施用(例如每周一次、每隔一周、每月两次或者每月一次给药为期多于两周、一个月、二个月、三个月、四个月、五个月、六个月或者一年或者更久)。在一些实施方案中,首先执行鞘内施用(例如,每周一次、每隔一周、每月两次、每月一次、每两个月一次、每隔三个月一次给药为期两周、一个月、二个月、三个月、四个月、五个月、六个月或者一年或者更久),然后静脉施用(例如每周一次、每隔一周、每月两次或者每月一次给药为期多于两周、一个月、二个月、三个月、四个月、五个月、六个月或者一年或者更久)。

[0037] 在一些实施方案中,所述鞘内施用在缺乏静脉施用时使用。

[0038] 在一些实施方案中,所述鞘内施用在缺乏并发免疫抑制疗法时使用。

[0039] 附图简述

[0040] 所述附图仅仅是解释的目的,而不是为了限制。

[0041] 图1描述了HNS的SEC-HPLC洗脱图的示例性色彩层析谱。(A)2mg/ml rhHNS的图谱,20mM柠檬酸盐,pH 7.0;(B)2mg/ml rhHNS的有刻度色彩层析谱,20mM柠檬酸盐,pH 7.0,基线(ilc);(C)2mg/ml rhHNS的有刻度色彩层析谱,20mM柠檬酸盐,pH 7.0在50℃,7天以后;(D)16min峰和26min峰二聚体峰波长扫描的重叠,2mg/ml柠檬酸盐,pH 7.0在50℃,7天以后。

[0042] 图2描述了在多种缓冲剂中和在多个pH值时,rhHNS pH研究的示例性SDS-PAGE凝胶(A-C)。

[0043] 图3描述了在多种缓冲剂中和在多个pH值时,rhHNS pH研究的示例性SDS-PAGE凝胶(A-C)。

[0044] 图4描述了如DSC所测定的,在柠檬酸盐中示例性的pH-依赖性热稳定性。在柠檬酸盐中rhHNS的最高熔点为90℃,pH6.0。在每个pH时rhHNS的所述熔点超过70℃。

[0045] 图5描述了如DSC所测定的,在磷酸盐中示例性的pH-依赖性热稳定性。含有磷酸盐的rhHNS制剂显示出最大的热稳定性,pH6-7。在每个pH时rhHNS的所述熔点超过70℃。

[0046] 图6描述了在50℃,7天以后,离子效应研究的rhHNS制剂示例性银染的SDS-PAGE凝胶。凝胶的运行,使用煮沸10分钟的样品(A-B)。

[0047] 图7描述了示例性的rhHNS可溶性研究。(A)pH对rhHNS可溶性的影响;(B)盐浓度对rhHNS可溶性的影响。增加pH和氯化钠似乎增加rhHNS可溶性。

[0048] 图8描述了使用AUC,盐对于rhHNS天然态影响的示例性研究。(A)145mM盐的影响;(B)300mM盐的影响。

[0049] 图9描述了蔗糖水平和冻干单元对于冻干rhHNS制剂块状物外观的影响的示例性研究。(A)VirTis冻干单元;较上的面板,1%蔗糖;较低的面板1.5%蔗糖;(B)1.5%蔗糖;较上的面板,VirTis冻干单元;较低的面板LyoStar冻干单元。

[0050] 图10描述了通过微血流显像(MFI),冻干的rhHNS样品示例性的颗粒图像。

[0051] 图11描述了通过MFI检测,对于含有1.5%蔗糖、在0.22μm过滤后的预冻干的rhHNS样品,聚山梨醇酯20对于微粒状物质的影响。

[0052] 图12A描述了示例性结果,其图解了rhHNS的CSF浓度(作为时间的函数),在1.5,4.5和8.3mg剂量,在给药6个月之后。图12B详述了示例性结果,其图解了在CSF中的抗-HNS抗体浓度,在6个月的IT施用1.5,4.5和8.3mg剂量后(在猴子中)。显示的数据是雄性和雌性联合的。图12C详述了示例性结果,其图解了在CSF中的抗-HNS抗体浓度,在6个月的IT施用1.5,4.5和8.3mg剂量后(在给药6个月的猴子中)。显示的数据是雄性和雌性联合的。在IT给药后的两个最高浓度(32,205ng/mL和15,467ng/mL)被从所述绘图中排除,因为预给药6没有采集到CSF样品。

[0053] 图13描述了用苏木精和伊红染色的,来自所述脑膜和脑软组织的组织切片的代表性图形。图13A描述了示例性结果,其图解了定位在DC猴子中导管的嗜中性浸润的低能量视图。图13B描述了示例性结果,其图解了在高剂量高剂量(8.3mg/剂)猴子的脑膜中,嗜酸性浸润的高能量视图;浸润的总体严重程度于中剂量(4.5mg/剂)组相似(未示出)。图13C描述了示例性结果,其图解了低剂量(1.5mg/剂)猴子的高能量视图,显示了在血管周围间隙(脑

实质)中的嗜酸性细胞。图13D描述了示例性结果,其图解了低剂量猴子(1.5mg/剂),显示了在血管周围间隙和软组织附近的嗜酸性细胞。图13E描述了示例性结果,其图解了在低剂量组动物脊髓软组织中的嗜酸性细胞(由箭头指示);在所述区域中的神经元是正常的。图13F描述了示例性结果,其图解了在剂量猴子(1.5mg/剂)中,嗜酸性细胞以及小胶质细胞积累的区域(箭头表示嗜酸性细胞;方框表示小胶质细胞积累的区域)。在所述区域中有几个大型的神经元,所有的都是正常的。比例尺:200 μ m。

[0054] 图14描述了示例性结果,其图解了在猴子脊髓和脑中的rhHNS酶活性。图14A和B描述了示例性结果,其图解了在所述(A)雄性和(B)雌性猴子脊髓中的活性。切片-3=腰椎,切片3,6=胸椎,以及切片9=颈部;0=导管尖端。图14C和D描述了示例性结果,其图解了(C)雄性和(D)雌性猴子脑中的rhHNS活性。切片切片从吻端至尾端进行编号(3至15)。对于恢复的动物、DC和设备对照,所有组织样品的收集,在所述末次给药后24小时,或者在所述末次给药后的4星期。所呈现的数据为平均值 $\pm$ SEM,n=4只猴子每个治疗组。

[0055] 图15描述了示例性结果,其说明了在猴子脑和肝脏中的酶活性。图15A描述了示例性结果,其说明了在所述高剂量(8.3mg/剂)组猴子脑中的rhHNS活性分布。显示了:所述脑的表面、深部、和非常深部(脑室周围)区域的活性倍数-变化,与内源性水平(DC组)的比较。所有的组织样品的收集,在末次给药后的约24小时,或者在末次给药的4周(对于恢复期动物)。所述数据呈现以平均值 $\pm$ SEM,n=6猴子(两个性别),脑切片6和9。两只猴子的数据没有包括在内;在尸检时所述导管被发现不通畅。图15B显示了在猴子肝脏中的rhHNS活性。所有组织样本的收集,在所述末次给药后的约24小时,或者在所述末次给药后的4周(对于恢复期动物)。DC,设备对照。Rec,恢复期。所述数据呈现形式为平均值 $\pm$ SEM,n=4猴子(每个治疗组);除了所述低剂量(4.5mg/剂)雌性组(n=3)。

[0056] 图16描述了示例性结果,其说明了在青少年食蟹猴小脑中的rhHNS定位:3-个月中间时期队列。图16A描述了示例性结果,其说明了媒介物对照动物(0mg/剂)的小脑对于rhHNS免疫染色为阴性;20x放大倍数。图16B描述了示例性结果,其说明了低剂量(1.5mg/剂)的小脑,其显示了:最小阳性染色限制于所述分子层;20x放大倍数。图16C描述了示例性结果,其说明了中剂量(4.5mg/剂)动物的小脑,其显示了在所述外部颗粒层中的最小染色;20x放大倍数。图16D描述了示例性结果,其说明了高剂量(8.3mg/剂)动物的小脑中的中度染色,包括分子层、外部颗粒层、以及浦肯野细胞;20x放大倍数。

[0057] 图17描述了示例性的研究,在IT给药 124 I-HNS(以1和10mg/kg的剂量)之后,将在所述头部区域中的rhHNS浓度随时间(在所述第一个20分钟中)进行标绘。

[0058] 图18描述了示例性的研究,在IT给药 124 I-HNS(以1和10mg/kg的剂量)之后,将在所述脑中的rhHNS浓度随时间进行标绘。

[0059] 图19描述了示例性的研究,在IT给药 124 I-HNS(以1和10mg/kg的剂量)之后,将在所述脑区域中的rhHNS浓度随时间进行标绘。

[0060] 图20描述了示例性的研究,在IT给药 124 I-HNS(以1和10mg/kg的剂量)之后,将在所述头部区域中的rhHNS浓度随时间进行标绘。

[0061] 图21描述了示例性的研究,在IT给药 124 I-HNS(以1和10mg/kg的剂量)之后,将在所述近端脊柱中的rhHNS浓度随时间进行标绘。

[0062] 图22描述了示例性的研究,在IT给药 124 I-HNS(以1和10mg/kg的剂量)之后,将在所

述中段脊柱中的rhHNS浓度随时间进行标绘。

[0063] 图23描述了示例性的研究,在IT给药 ^{124}I -HNS(以1和10mg/kg的剂量)之后,将在所述远端脊柱中的rhHNS浓度随时间进行标绘。

[0064] 图24描述了示例性的研究,在IT给药 ^{124}I -HNS(以1和10mg/kg的剂量)之后,将在所述肝脏中的rhHNS浓度随时间进行标绘。

[0065] 图25描述了示例性的研究,在IT给药 ^{124}I -HNS(以1和10mg/kg的剂量)之后,将在所述脑中的rhHNS浓度随时间进行标绘,单个(顶部)以及平均值 $\pm$ SD(底部)。

[0066] 图26描述了示例性的研究,在IT给药 ^{124}I -HNS(以1和10mg/kg的剂量)之后,将rhHNS的肝脏浓度随时间进行标绘,单个(顶部)以及平均值 $\pm$ SD(底部)。

[0067] 图27描述了示例性的研究,在IT给药 ^{124}I -HNS(以1和10mg/kg的剂量)之后,将rhHNS的肾脏浓度随时间进行标绘,单个(顶部)以及平均值 $\pm$ SD(底部)。

[0068] 图28描述了示例性的研究,在IT给药 ^{124}I -HNS(以1和10mg/kg的剂量)之后,将rhHNS的心脏浓度随时间进行标绘,单个(顶部)以及平均值 $\pm$ SD(底部)。

[0069] 图29描述了示例性的研究,在IT给药 ^{124}I -HNS(以1和10mg/kg的剂量)之后,将rhHNS的皮肤浓度随时间进行标绘,单个(顶部)以及平均值 $\pm$ SD(底部)。

[0070] 图30描述了示例性的研究,在IT给药 ^{124}I -HNS(以1和10mg/kg的剂量)之后,将rhHNS的脑浓度随时间进行标绘(顶部),并将在脑中(底部)非房室的PK参数进行比较。

[0071] 图31描述了示例性的研究,在IT给药 ^{124}I -HNS(以1和10mg/kg的剂量)之后,将rhHNS的肝脏浓度随时间进行标绘(顶部),并将在肝脏中(底部)非房室的PK参数进行比较。

[0072] 图32描述了示例性的鞘内药物递送设备(IDDD)。

[0073] 图33描述了示例性的PORT-A-CATH[®] 低调鞘内植入入口系统(low profile intrathecal implantable access system)。

[0074] 图34描述了示例性的鞘内药物递送设备(IDDD)。

[0075] 图35描述了示例性的鞘内药物递送设备(IDDD),其允许在家施用以进行CNS酶替代治疗(ERT)。

[0076] 图36图解了具有固定机构的鞘内药物递送设备(IDDD)示例性图表。

[0077] 图37A描述了在患者体内IDDD可能被放置的示例性定位;图37B描绘了鞘内药物递送设备(IDDD)的多种组件;并且图37C描述了在IT-腰椎注射的患者体内的示例性插入位置。

[0078] 术语解释

[0079] 为了使本发明更容易被理解,某些术语在下文首先被定义。下面的术语和其它术语的其它定义在整个说明书提出。

[0080] 约或者大约:如本文使用的,所述术语“约”或者“大约,”如应用于一个或多个感兴趣的值,其是指与规定的参考值相似的值。在某些实施方案中,所述术语“约”或者“大约”是指某范围的值,其落入所述规定的参考值在任意方向上(大于或小于)的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、或更小以内,除非另有说明或以其他方式明显从上下文得出(除非其中该数字将超过100%的可能值)。

[0081] 转佳:如本文使用的,所述术语“转佳”意思是状态的预防、减轻或者缓减,或者受

试者状态的改善。转佳包括,但是不要求病情的痊愈或彻底的预防。在一些实施方案中,转佳包括相关蛋白质的水平或其活性的增加,所述相关蛋白质在相关疾病组织中缺乏。

[0082] 生物活性::如本文使用的,所述短语“生物活性”是指在生物系统中具有活性的任何实际的特性,并且特别地在生物体中。例如,当将试剂施用到生物体中,所述试剂对生物体具有生物效应,这被认为是生物活性。在特别的实施方案中,当蛋白质或多肽是生物活性的,该部分的蛋白或多肽将享有至少所述蛋白或多肽的一种生物活性,这通常被称为“生物活性”部分。

[0083] 填充剂:如本文使用的,所述术语“填充剂”是指复合物,其为冻干混合物添加质量,并且有助于所述冻干块状物的物理结构(例如促进基本均匀的冻干块状物的生产,使其保持了开放的孔隙结构)。示例性的填充剂包括甘露醇、甘氨酸、氯化钠、羟乙基淀粉、乳糖、蔗糖、海藻糖、聚乙二醇和葡萄聚糖。

[0084] 阳离子依赖型甘露糖-6-磷酸受体(CI-MPR):如本文使用的,所述术语“阳离子依赖型甘露糖-6-磷酸受体(CI-MPR)”是指细胞受体,所述细胞受体在高尔基体中,在酸水解酶前体上结合甘露糖-6-磷酸(M6P)标签,并被注定运输到所述溶酶体。除了甘露糖-6-磷酸,所述CI-MPR也结合其他蛋白质,包括IGF-II。所述CI-MPR也被称为“M6P/IGF-II受体”、“CI-MPR/IGF-II受体”、“IGF-II受体”或者“IGF2受体”。这些术语和其省略语在本文中互换使用。

[0085] 并发免疫抑制疗法:如本文使用的,所述术语“并发免疫抑制疗法”包括作为预处理、预调节或者与治疗方法平行的任意免疫抑制疗法。

[0086] 稀释剂:如本文使用的,所述术语“稀释剂”是指药学上可接受的(例如对施用到人类是安全的和非毒性的)稀释物质,其对于重组制剂的制备是有效的。示例性的稀释剂包括无菌水、注射用制菌水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如磷酸盐-缓冲盐水)、无菌生理盐水、林格式溶液或者右旋糖溶液。

[0087] 剂型:如本文使用的,所述术语“剂型”和“单位剂型”是指待治疗患者的治疗蛋白质的物理上分离的单位。每个单位含有预定量的经计算产生预期治疗效果的活性材料。可以理解,尽管如此,所述组合物的总剂量可以被由主治医生根据合理的医学判断决定。

[0088] 酶替代治疗(ERT):如本文使用的,所述术语“酶替代治疗(ERT)”是指任意的治疗策略,其可以通过所述丢失的酶以纠正酶缺乏。在一些实施方案中,所述丢失的酶通过鞘内施用提供。在一些实施方案中,所述丢失的酶通过注入到血流中提供。一旦施用,酶被细胞吸收,并运输到所述溶酶体,在所述溶酶体中所述酶发挥清除由于酶缺乏而累积在所述溶酶体中的材料。通常,为了使溶酶体酶替代治疗有效,所述治疗酶被递送到在靶组织合适的细胞中的溶酶体(在所述组织中所述贮积缺陷是明显的)。

[0089] 改善、增加、或者减少:如本文使用的,所述术语“改善”、“增加”或者“减少”或语法等价表达,包括相对于基线测量的值,例如在开始本文所描述的处理之前在相同个体中的测量,或者在缺乏本文所描述的处理的对照个体(或者多个对照个体)中的测量。“对照个体”是这样的个体:其受到与所述正被治疗的个体相同形式的溶酶体贮积症的折磨,并且其与所述治疗个体年龄相同(以确保在所述正被治疗的个体和所述对照个体之间所述疾病所处的阶段是可比性的)。

[0090] 个体、受试者、患者:如本文使用的,所述术语“受试者”、“个体”或者“患者”是指人

类或者非人类的哺乳动物受试者。所述正被治疗的个体(也称为“患者”或者“受试者”)是患有疾病的个体(胎儿、婴儿、儿童、青少年、成人)。

[0091] 鞘内施用:如本文使用的,所述术语“鞘内施用”或者“鞘内注射”是指注射进入所述脊椎管(在所述脊髓周围的鞘内空间)。多种技术可以使用,包括但不限于,侧脑室注射(通过钻孔或小脑延髓池或腰椎穿刺或诸如此类)。在一些实施方案中,根据本发明的“鞘内施用”或“鞘内递送”是指IT施用或者递送(通过腰部或腰区),即腰椎IT施用或者递送。如本文使用的,所述术语“腰区”或“腰部”是指在所述第三和第四腰椎(下背部)骨之间的区域,更包含所述脊椎的L2-S1区域。

[0092] 连接体:如本文使用的,所述术语“连接体”是指,在融合蛋白中,不同于在天然蛋白质中在特定位点出现的氨基酸序列,并且通常设计成柔性的或插入到在两个蛋白质部分之间的结构中(例如 α -螺旋)。连接体也被称为间隔区。

[0093] 冻干保护剂:如本文使用的,所述术语“冻干保护剂”是指这样的分子:其防止或减少蛋白质或其它物质在经过冷冻干燥和后续储存中的化学和/或物理的不稳定性。示例性的冻干保护剂包括糖(例如蔗糖或海藻糖);氨基酸(例如氨基酸(例如谷氨酸一钠或组氨酸);甲胺(例如甜菜碱);感胶离子盐(硫酸镁);多元醇(例如三价或更高的糖醇,例如甘油、赤藻糖醇、甘油、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露醇);丙二醇;聚乙二醇;普流罗尼类;及其组合。在一些实施方案中,冻干保护剂是非还原糖,例如海藻糖或蔗糖。

[0094] 溶酶体酶:如本文使用的,所述术语“溶酶体酶”是指任意的酶,其能够在哺乳动物溶酶体中累积的材料,或者能使一种或多种溶酶体贮积症症状得到拯救或转佳。适合于本发明的溶酶体酶包括野生类型的或者修饰的溶酶体酶,并能使用重组和合成的方法制备,或者从天然来源中纯化。示例性的溶酶体在表1中列出。

[0095] 溶酶体酶缺乏:如本文使用的,“溶酶体酶缺乏”是指一组遗传性疾病,其由于至少一种酶的缺乏所导致,所述酶是在溶酶体中将大分子(例如酶底物)裂解成肽、氨基酸、单糖、核酸和脂肪酸所需要的。结果,患有溶酶体酶缺乏症的个体在多种组织(例如CNS、肝脏、脾脏、肠、血管壁和其它器官)中具有累积的材料。

[0096] 溶酶体贮积症:如本文使用的,所述术语“溶酶体贮积症”是指导致一种或多种溶酶体酶缺乏的任意疾病,所述溶酶体酶是代谢天然大分子所需要的。这些疾病通常导致在溶酶体中未降解分子的累积,导致贮藏粒(术语也称为储存囊泡)数量的增加。这些疾病和多种实施例在下文详细地被描述。

[0097] 多肽:如本文使用的,“多肽”,一般而言,是指由至少两个氨基酸彼此通过肽键连接成的一串。在一些实施方案中,多肽包括至少3-5个氨基酸,其中每个通过至少一个肽键的方式与其余的连接。那些在本领域的普通技术人员会意识到有时多肽包括“非天然”氨基酸或者任选的、其它仍然能合并到多肽链中的其它实体。

[0098] 替代酶:如本文使用的,所述术语“替代酶”是指任意的酶,其能发挥作用以替代至少部分的所述(在待治疗的疾病中)缺乏或丢失的酶。在一些实施方案中,所述术语“替代酶”是指任意的酶,其能发挥作用以替代至少部分的所述(在待治疗的溶酶体贮积症中)缺乏或丢失的溶酶体酶。在一些实施方案中,替代酶能减少在哺乳动物溶酶体中累积的材料,或者其能拯救或改善一种或多种溶酶体贮积症症状。适合于本发明的替代酶包括野生类型或者修饰的溶酶体酶,并且能使用重组和合成的方法制备或者从天然来源中纯化。替代酶

可以是重组的、合成的、基因活化的或者天然的酶。

[0099] 可溶性:如本文使用的,所述术语“可溶性”是指治疗试剂形成均匀的溶液的能力。在一些实施方案中,所述治疗试剂在所述溶液中的可溶性(其在所述溶液中被施用,并且通过它运输到作用的靶向位点(例如所述脑的所述细胞和组织))是足够的,以允许递送治疗有效量的治疗世界至作用的靶向位点。几种因素可以影响所述治疗试剂的可溶性。例如,可能影响蛋白质可溶性的相关因素包括离子强度、氨基酸序列和存在其它共溶剂或者盐(例如钙盐)。在一些实施方案中,所述药物组合物被配制,使得所述钙盐从这种组合物中排除。在一些实施方案中,依照本发明的所述试剂是在对应的组合物中可溶性的。可以理解,当等渗溶液通常对于肠胃外施用药物是优选的,使用等渗溶液可能限制一些治疗世界充分的溶解性,特别是某些蛋白质和/或酶。已经表明,轻微高渗溶液(例如高达175mM氯化钠,在5mM磷酸钠中,pH 7.0)和含糖溶液(例如高达2%蔗糖,在5mM磷酸钠中,pH 7.0)在猴中具有良好的耐受性。例如,最常见的批准的CNS推注制剂组合物是生理盐水(在水中150mM NaCl)。

[0100] 稳定性:如本文使用的,所述术语“稳定的”是指所述治疗试剂在较长期间保持其治疗效果(例如所有的或者大部分的其预期生物活性和/或理化完整性)的能力。所述治疗试剂的稳定性,以及所述药物组合物保持这种治疗试剂的稳定性的能力,可以在延长的时间周期内进行评估(例如至少1、3、6、12、18、24、30、36月或更久)。通常,本文描述的药物组合物已经被配制,可以使得其能稳定、或者作为选择减慢或阻止与之相配制的一种或多种治疗试剂(例如重组蛋白质)的所述降解。在配制的情况下,稳定的制剂是一种,在这种制剂中所述治疗试剂在储存和在加工过程中(例如冷冻/融化,机械混合和冻干),基本保持其物理的和/或化学完整性和生物活性。对于蛋白质稳定性,其可以通过形成高分子量(HMW)聚集物酶活性损失、肽片段形成和电荷转移性能进行测量。

[0101] 受试者:如本文使用的,所述术语“受试者”意思是任意的哺乳动物,包括人类。在本发明的某些实施方案中,所述受试者是成年人、青少年或者婴儿。本发明也考虑了所述药物组合物的施用、和/或子宫内治疗方法的性能。

[0102] 基本的同源性:本文使用的所述短语“基本的同源性”是指,在氨基酸或核酸序列之间的比较。如本领域的普通技术人员的理解,两条序列通常会被认为“基本同源”,如果它们在对应的位点含有同源的残基。同源的残基可以是相同的残基。可选择的,同源的残基也可以是不相同的残基,其具有合适的相似结构和/或功能特性。例如,如本领域的普通技术人员所已知的,某些氨基酸通常被分类为“疏水的”或者“亲水的”氨基酸,和/或具有“极性”或“非极性”侧链。一个氨基酸取代另一个相同类型的氨基酸,通常被认为是“同源”取代。

[0103] 众所周知在本领域技术中,氨基酸或者核酸序列可以使用多种算法比较,包括商业计算机程序,例如核酸序列的BLASTN,氨基酸序列的BLASTP、间隙BLAST(gapped BLAST)和PSI-BLAST。示例性的这种程序在这些文献中进行了描述:Altschul,等,Basic local alignment search tool,J.Mol.Biol.,215(3):403-410,1990;Altschul,等,Methods in Enzymology;Altschul,等,“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,等,(eds.),Bioinformatics Methods and

Protocols(Methods in Molecular Biology,Vol.132),Humana Press,1999.除了识别同源序列,上述提及的所述程序通常提供同源性程度的指示。在一些实施方案中,两个序列被认为基本同源,如果他们相应残基的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多在相关延伸的残基之间是同源的。在一些实施方案中,所述相关延伸是完全的序列。在一些实施方案中,所述相关延伸是至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500或更多残基。

[0104] 基本一致性:本文使用的所述短语“基本一致性”是指在氨基酸或者核酸序列之间的比较。如本领域的普通技术人员所理解的,两条序列通常会被认为是“基本一致的”,如果它们在相应的位点含有一致的残基。众所周知在本领域技术中,氨基酸或者核酸序列可以使用多种算法中的任意一个进行比较,包括在商业计算机中的程序,例如核酸序列的BLASTN,以及氨基酸序列的BLASTP、间隙BLAST(gapped BLAST)和PSI-BLAST。示例性的这种程序在下述的文献中进行了描述:Altschul,等,Basic local alignment search tool, J.Mol.Biol.,215(3):403-410,1990;Altschul,等,Methods in Enzymology;Altschul等,Nucleic Acids Res.25:3389-3402,1997;Baxeavanis et al.,Bioinformatics:A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins,Wiley,1998;and Misener,等,(eds.),Bioinformatics Methods and Protocols(Methods in Molecular Biology, Vol.132),Humana Press,1999.除了识别这些一致的序列,上文所提及的所述程序通常提供了一致性程度的指示。在一些实施方案中,所述序列被认为是基本一致的,如果他们相应残基的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多在相关延伸的残基之间是一致的。在一些实施方案中,所述相关延伸是完全的序列。在一些实施方案中,所述相关延伸是至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500或更多残基。

[0105] 合成的CSF:如本文使用的,所述术语“合成的CSF”是指具有与脑脊髓液一致的pH、电解质组成、葡萄糖含量和渗透压的溶液。合成的CSF也被称为人工CSF。在一些实施方案中,合成的CSF是Elliott's B溶液。

[0106] 适合于CNS递送:如本文使用的,所述短语“适合于CNS递送”或者“适合于鞘内递送”是指本发明的所述药物组合物,通常是指这些组合物的稳定性、耐受性和可溶性性能,以及这些组合物递送有效量的含于其中的治疗试剂至递送靶向位点(例如所述CSF或者所述脑)的能力。

[0107] 靶组织:如本文使用的,所述术语“靶组织”是指受到待治疗的所述溶酶体贮积症影响的任意组织,或者在其中所述缺乏的溶酶体酶正常表达。在一些实施方案中,靶组织包括这些组织,在其中具有可检测的或者异常高量的酶底物(例如储存在所述组织的所述细胞溶酶体中),在患有或者易患有溶酶体贮积症的患者中。在一些实施方案中,靶组织包括这些组织:其表现疾病相关病理、症状或特征。在一些实施方案中,靶组织包括这些组织:在其中所述缺乏的溶酶体酶以升高的水平正常表达。如本文使用的,靶组织可以是脑部靶组织、脊髓靶组织和/或周边靶组织。示例性的靶组织在下文详细描述。

[0108] 治疗部分:如本文使用的,所述术语“治疗部分”是指部分的分子,其为所述分子提

供治疗效果。在一些实施方案中,治疗部分是具有治疗活性的多肽。

[0109] 治疗有效量:如本文使用的,所述术语“治疗有效量”是指治疗性蛋白质(例如替代酶)的量,其给予所述治疗的受试者治疗效果,以合理的效益/风险比率(适合于任意的医疗)。所述治疗效果可以是客观的(例如通过某种测试或者标记物测量)或主观的(例如受试者给出的效果的指示或感觉)。特别地,所述“治疗有效量”是指某种量的治疗蛋白质或者组合物有效治疗、改善或者阻止预期的病或者病情,或者表现可检测的治疗或者预防效果(例如通过改善疾病相关症状、阻止或者延缓所述疾病的发生、和/或减少所述疾病的严重程度或频率)。在给药方案上的治疗有效量通常施用,可以包括多种单位剂量。对任何特定治疗蛋白质,治疗有效量(和/或在有效给药方案内的合适的单位剂量)会有所不同,例如,根据施用途、以及其它药物试剂。而且,任何特定患者的所述特定的治疗有效量(和/或单位剂量)可以根据多种因素改变,包括被治疗的疾病和所述疾病的严重程度;所采用的特定药物试剂的活性;所采用的特定组合物;所述患者的年龄、体重、一般健康、性别和饮食;施用时间;施用途;和/或所采用的特定融合蛋白的排泄和代谢;所述治疗持续的时间;以及在医药领域已知的类似因素。

[0110] 可容忍的:如本文使用的,所述术语“可容忍的”和“耐受性”是指本发明的药物组合物在所述受试者(所述的这些受试者是指被施用组合物的受试者)中不引发有害反应的能力,或者可选择地在所述受试者(所述的这些受试者是指被施用组合物的受试者)中不引发严重的有害反应的能力。在一些实施方案中,本发明所述药物组合物可以被所述受试者(所述受试者是指被施用组合物的受试者)良好地容忍。

[0111] 治疗:如本文使用的,所述术语“治疗”(也称为“处理”或“治疗”)是指任意施用的治疗性蛋白质(例如溶酶体酶),其部分地或者完全地缓解、改善、减轻、已知或者延缓发生,减少严重程度和/或减少(特定疾病、紊乱和/或病情(例如Hunters综合症、Sanfilippo综合症类型B的)一种或多种症状或特征的发生率。这种治疗可以是这样的受试者(其不表现相关的疾病、紊乱和/或病情的体征),和/或这样的受试者(其仅仅表现相关的疾病、紊乱和/或病情的早期体征)。可选择地或者额外地这种治疗可以是这样的受试者,其表现所述相关的疾病、紊乱和/或病情的一种或多种已建立的体征。

[0112] 发明详述

[0113] 本发明提供了,此外,改善的方法和组合物用于有效直接递送治疗试剂至所述中枢神经系统(CNS)。如上文所讨论的,本发明基于意外的发现:溶酶体贮积症(例如Sanfilippo A综合症)的替代酶(例如,HNS蛋白质)可以以高浓度直接引入到有需要治疗的受试者的所述脑脊髓液(CSF)中,而在受试者中不诱发实质性副作用。更加出乎意料的是,本发明人发现:所述替代酶可以在简单的生理盐水或者缓冲液基础制剂中递送,而不使用合成的CSF。甚至更出乎意料的是,根据本发明的鞘内递送在所述受试者中不导致实质性副作用,例如严重的免疫应答。因此,在一些实施方案中,根据本发明的鞘内递送可以在缺乏并发免疫抑制疗法时使用(例如通过预处理或者预调节不诱发免疫耐受性)。

[0114] 在一些实施方案中,根据本发明的鞘内递送允许在多种脑组织间的有效扩散,导致所述替代酶在在表面、浅部和/或深部的脑区域中多种靶脑组织中的有效递送。在一些实施方案中,根据本发明的鞘内递送产生充分量的替代酶进入所述外周循环。结果,在某些情况下,根据本发明的鞘内递送导致所述替代酶在外周组织中的递送,例如肝脏、心脏、脾脏

和肾脏。该发现是预料之外的,并且可以是对具有CNS和外周组件的所述溶酶体贮积症的治疗特别有用,其通常需要常规鞘内施用和静脉施用。这也是想到的:根据本发明的鞘内递送可以允许减少给药和/或iv注射的频率,而不损害周边症状治疗的治疗效果。

[0115] 本发明提供了多种意外的和有益的特征,其允许替代酶有效和便捷地递送至多种脑靶组织,导致具有CNS指示的溶酶体贮积症的有效治疗。

[0116] 本发明的多个方面在下面章节进行详细描述。所述章节的使用不是打算限制本发明。每章节可以应用于本发明的任意方面。在这份申请中,使用“或者”意思是“和/或”,除非另有声明。

[0117] 替代酶

[0118] 乙酰肝素-N-硫酸酯酶(HNS)蛋白质

[0119] 在一些实施方案中,本发明提供的发明方法和组合物,用于递送乙酰肝素-N-硫酸酯酶(HNS)蛋白质至所述CNS,以治疗Sanfilippo A。合适的HNS蛋白质可以是任意的分子或者分子的部分,其适合于天然发生的乙酰肝素-N-硫酸酯酶(HNS)蛋白质活性或者拯救一种或多种与HNS-缺乏症并发的表现型或者症状。在一些实施方案中,适合于本发明的替代酶是这样的多肽:其具有的N-末端和C-末端以及氨基酸序列与成熟人类HNS蛋白质基本相似或者一致。

[0120] 通常地,人类HNS作为前体分子制备并加工成成熟形式。该加工通常通过删除20个氨基酸信号肽而发生。通常地,所述前体形式也称为全长前体或者全长HNS蛋白质,其含有502个氨基酸。所述N-末端的20氨基酸被断裂,导致产生长度为482个氨基酸的成熟形式。因此,这也是考虑到的,所述N-末端的20氨基酸通常对于所述HNS蛋白质活性不是必需的。典型野生型或天然发生的成熟形式(SEQ ID NO:1)和全长前体(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列见表1所示。

[0121] 表1. 人类乙酰肝素-N-硫酸酯酶

成熟形式

[0122]

RPRNALLLLA	DDGGFESGAY	NNSAIATPHL	DALARRSLIF
RNAFTSVSSC	SPSRASLLTG	LPQHONGMYG	LHQDVHHFNS
FDKVRSLPLL	LSQAGVRTGI	IGKKHVGPEP	VYPDFAYTE
ENGSVLQVGR	NITRIKLLVR	KFLQTQDDRP	FFLYVAFHDP
HRCGHSQPQY	GTFCEKFGNG	ESGMGRIPDW	TPQAYDPLDV
LVPYFVPNTF	AARADLAAQY	TTVGRMDQGV	GLVLQELRDA
GVLNDTLVIF	TSDNGIPFPS	GRTNLYWPGT	AEPLLVSSE
HPKRWGQVSE	AYVSLLDLTP	TILDWFSIPY	PSYAIFGSKT
IHLTGRSLLP	ALEAEPLWAT	VFGSQSHHEV	TMSYPMRSVQ
HRHFRLVHNL	NFKMPFPIDQ	DFYVSPTFQD	LLNRTTAGQP

	TGWYKDLRHY	YYRARWELYD	RSRDPHETQN	LATDPRFAQL
	LEMLRDQLAK	WQWETHDPWV	CAPDGVLEEK	LSPQCQPLHN
	EL (SEQ ID NO:1)			
[0123]	MSCPVPACCA	LLLVLGLCRA	RPRNALLLLA	DDGGFESGAY
	NNSAIATPHL	DALARSSLLE	RNAFTSVSSC	SFSRASLLTG
	LPQHQNMGY	LHQDVHHEFS	FDKVRSLPLL	LSQAGVRTGI
	IGKKHVGPE	VYPDFEAYTE	ENGSVLQVGR	NITRIKLLVR
	KFLQTQDDRP	FFLYVAFHDP	HRCGHSQPOY	GTFCEKFGNG
	ESGMGRIPDW	TPQAYDPLDV	LVPYFVPNTF	AARADLAAQY
	TTVGRMDQGV	GLVLQELRDA	GVLNDTLVIF	TSDNIGIFPS
	GRTNLYWPGT	AEPLLVSSPE	HPKRWGQVSE	AYVSLDLTP
	TILDWFSIPY	PSYAIFGSKT	IHLTGRSLLP	ALEAEPLWAT
	VFGSQSHHEV	TMSYPMRVQ	HRHFRVLVHNL	NFKMPFPIDQ
	DFYVSPTEQD	LLNRTTAGQP	TGWYKDLRHY	YYRARWELYD
	RSRDPHETQN	LATDPRFAQL	LEMLRDQLAK	WQWETHDPWV
	CAPDGVLEEK	LSPQCQPLHN		
	EL (SEQ ID NO:2)			

[0124] 因此,在一些实施方案中,适合于本发明的治疗部分是成熟人类HNS蛋白质(SEQ ID NO:1)。在一些实施方案中,合适的治疗部分可以是成熟人类HNS蛋白质的同源物或者类似物。例如,成熟人类HNS蛋白质的同源物或者类似物可以是修饰的成熟人类HNS蛋白质,其含有一个或者多个氨基酸替换、删除、和/或插入(与野生型或天然发生的HNS蛋白质(例如,SEQ ID NO:1)相比),同时保留基本的HNS蛋白质活性。因此,在一些实施方案中,适合于本发明的治疗部分与成熟人类HNS蛋白质(SEQ ID NO:1)基本同源。在一些实施方案中,适合于本发明的治疗部分具有氨基酸序列至少50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或者更多与SEQ ID NO:1同源。在一些实施方案中,适合于本发明的治疗部分与成熟人类HNS蛋白质(SEQ ID NO:1)基本一致。在一些实施方案中,适合于本发明的治疗部分具有的氨基酸序列至少50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或者更多地与SEQ ID NO:1一致。在一些实施方案中,适合于本发明的治疗部分含有成熟人类HNS蛋白质的片段或者部分。

[0125] 可选择地,适合于本发明的治疗部分为全长HNS蛋白质。在一些实施方案中,合适的治疗部分可以是全长人类HNS蛋白质的同源物或者类似物。例如,全长人类HNS蛋白质的同源物或者类似物可以是修饰的全长人类HNS蛋白质,其含有一个或者多个氨基酸替换、删除、和/或插入(与野生型或天然发生的全长HNS蛋白质(例如,SEQ ID NO:2)相比),同时保留基本的HNS蛋白质活性。因此,在一些实施方案中,适合于本发明的治疗部分与全长人类HNS蛋白质(SEQ ID NO:2)基本同源。在一些实施方案中,适合于本发明的治疗部分具有的氨基酸序列与SEQ ID NO:2,至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或者更多地同源。在一些实施方案中,适合于本发明的治疗部分与SEQ ID NO:2基本一致。在一些实施方案中,适合于本发明的治疗部分具有的氨基酸序列与SEQ ID NO:2,至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或者更多地一致。在一些实施方案中,适合于本发明的治疗部分含有全长人类HNS蛋白质的片段或者部分。如本文所使用的,全长HNS蛋白质通常地含有信号肽序列。

[0126] 其它溶酶体贮积症和替代酶

[0127] 可以设想,根据本发明发明的方法和组合物可以用于治疗其它溶酶体贮积症,特别是具有CNS病因和/或症状的溶酶体贮积症,包括但不限于:天冬氨酰葡萄糖胺尿症,胆固醇脂沉积病,沃尔曼病,胱氨酸病,Danon病,法布里病,Farber脂肪肉芽肿病,Farber病,墨角藻糖苷酶缺乏病,半乳糖唾液酸沉积症I/II型,戈谢病类型I/II/III,球细胞脑白质营养不良,克拉伯病,糖原贮积症II,庞贝氏症,GM1-神经节苷脂沉积症类型I/II/III,GM2-神经节苷脂沉积症类型I,泰-萨克斯病,GM2-神经节苷脂沉积症类型II,桑德霍夫病,GM2-神经节苷脂沉积症, α -甘露糖苷过多症类型I/II, β -甘露糖苷过多症,异染性脑白质营养不良,粘脂糖症类型I,唾液酸沉积症类型I/II,唾液酸沉积症类型II/III,I-细胞病,粘脂糖症类型IIIC假胡尔勒氏多种营养不良,黏多糖贮积症类型I,黏多糖贮积症类型II,黏多糖贮积症类型IIIA,Sanfilippo综合症(例如,类型A,B,C,D),黏多糖贮积症类型IIIB,黏多糖贮积症类型IIIC,黏多糖贮积症类型IIID,黏多糖贮积症类型IVA,莫基奥综合症,黏多糖贮积症类型IVB,黏多糖贮积症类型VI,黏多糖贮积症类型VII,Sly综合症,黏多糖贮积症类型IX,多种硫酸酯酶缺乏症,神经元蜡样脂褐质沉积症,CLN1Batten病,CLN2Batten病,尼曼匹克病类型A/B,尼曼匹克病类型C1,尼曼匹克病类型C2,致密性成骨不全症,Schindler病类型I/II,戈谢病和唾液酸贮积病。

[0128] 所述溶酶体贮积症的遗传病因、临床表现和分子生物学的详细评论可以详参于 Scriver et al.,eds.,The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 7.sup.th Ed.,Vol.II,McGraw Hill,(1995).因此,在上文的疾病中的酶缺陷对本领域的普通技术人员是已知的,其中一些在下表中示出。

[0129] 表2.

[0130]

疾病名称	酶缺乏	贮积的物质
庞贝氏症	酸性 α -1,4 葡萄糖苷酶	糖原 α 1-4 连接的寡糖
GM1 Gangliosidosis	β -半乳糖苷酶	GM ₁ 神经节苷脂
泰 - 萨 二 氏 病 (Tay-Sachs Disease)	β -氨基己糖苷酶 A	GM ₂ 神经节苷脂
GM2 神经节苷脂沉积症: AB 变异型	GM ₂ 激活蛋白	GM ₂ 神经节苷脂
桑德霍夫病	β -氨基己糖苷酶 A&B	GM ₂ 神经节苷脂
法布里病	α -半乳糖苷酶 A	红细胞糖苷酯
戈谢病	葡糖脑苷脂酶	葡糖苷(脂)酰鞘氨醇
异染性脑白质营养不良	芳基硫酸酯酶 A	硫脑苷酯[类]
克拉伯病	半乳糖(基)神经酰胺酶	半乳糖脑苷脂
尼曼匹克病, 类型 A & B	酸性鞘磷脂酶	(神经)鞘磷脂
尼曼匹克病, 类型 C	胆固醇酯化缺陷	(神经)鞘磷脂
尼曼匹克病, 类型 D	未知的	(神经)鞘磷脂
Farber 病	酸性神经酰胺酶	神经酰胺
沃尔曼病	酸性脂酶	胆固醇酯
赫尔利综合症(MPS IH)	α -L-艾杜糖苷酸酶	乙酰肝素&硫酸皮肤素
沙伊综合症(MPS IS)	α -L-艾杜糖苷酸酶	乙酰肝素&皮肤素、硫酸盐
Hurler-Scheie(MPS IH/S)	α -L-艾杜糖苷酸酶	乙酰肝素& 硫酸皮肤素
亨特综合症 (MPS II)	艾杜糖醛酸硫酸酯酶	乙酰肝素&硫酸皮肤素
Sanfilippo 综合症 A (MPS IIIA)	乙酰肝素 N-硫酸酯酶	硫酸乙酰肝素
Sanfilippo 综合症 B (MPS IIIB)	α -N-乙酰葡糖胺糖苷酶	硫酸乙酰肝素
Sanfilippo 综合症 C (MPS IIIC)	乙酰-CoA-氨基葡糖苷 乙酰转移酶	硫酸乙酰肝素
Sanfilippo 综合症类型 D (MPS IIID)	N-乙酰氨基葡萄糖-6-硫酸酯酶	硫酸乙酰肝素
Morquio B (MPS IVB)	β -半乳糖苷酶	硫酸角质素
Maroteaux-Lamy (MPS VI)	芳香基硫酸酯酶 B	硫酸皮肤素

[0131]

Sly 综合症 (MPS VII)	β -葡萄糖醛酸酶	
α -甘露糖苷过多症	α -甘露糖苷酶	甘露糖/寡糖
β -甘露糖苷过多症	β -甘露糖苷酶	甘露糖/寡糖
墨角藻糖苷酶缺乏病	α -L-岩藻糖苷酶	岩藻糖基化寡糖
天冬氨酰葡萄糖胺尿症	N-天冬氨酰基- β -氨基葡萄糖苷酶	天冬氨酰基氨基葡萄糖天门冬氨酸
唾液酸沉积症(粘脂糖症 I)	α -唾液酸苷酶	唾液酸寡糖
半乳糖唾液酸沉积症(Goldberg 综合症)	溶酶体保护蛋白缺乏症	唾液酸寡糖
Schindler 病	α -N-乙酰-半乳糖苷酶	
粘脂糖症 II (I-细胞病)	N-乙酰氨基葡萄糖-1-磷酸转移酶	硫酸乙酰肝素
粘脂糖症 III (假胡尔勒氏多种营养不良)	同 MLII	
胱氨酸病	胱氨酸转运蛋白	游离胱氨酸
Salla 病	唾液酸转运蛋白	游离唾液酸和葡萄糖醛酸
小儿唾液酸贮积病 (infantile sialic acid storage disease)	唾液酸转运蛋白	游离唾液酸和葡萄糖醛酸
小儿神经元蜡样脂褐质沉积症	棕榈酰-蛋白硫酯酶	脂褐质
粘脂糖症 IV	未知的	神经节苷脂& 透明质酸
鞘脂激活蛋白原	皂化蛋白 (saposin) A、B、C 或者 D	

[0132] 根据本发明发明的方法可以用于递送多种其它替代酶。如本文使用的, 适合于本发明的替代酶可以包括任何替代酶, 其能发挥作用替代在待治疗的溶酶体贮积症中缺乏或者丢失的溶酶体酶的至少部分活性。在一些实施方案中, 替代酶能够减少在溶酶体中累积的物质, 或者能拯救或改善一种或多种溶酶体贮积症症状。

[0133] 在一些实施方案中, 合适的替代酶可以是已知的与待治疗的所述溶酶体贮积症相关的任何替代酶。在一些实施方案中, 合适的替代酶是选自在表2中列出的所述酶中的酶。

[0134] 在一些实施方案中, 适合于本发明的替代酶可以具有野生-类型或者天然发生的序列。在一些实施方案中, 适合于本发明的替代酶可以具有修饰的序列, 所述修饰的序列与所述野生-类型或者天然发生的序列具有基本的同源性或者一致性(例如与所述野生-类型或者天然发生的序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%序列一致性)。

[0135] 适合于本发明的替代酶可以通过任何可用的方法制备。例如, 替代酶可以利用设计表达替代酶编码核酸的宿主细胞系统重组制备。可选择地或者附加地, 替代酶可以通过激活内源基因制备。可选择地或者附加地, 替代酶可以通过化学合成部分地或者完全地制备。可选择地或者附加地, 替代酶可以从天然来源纯化得到。

[0136] 可以使用任意的表达系统, 来重组制备酶。为了给出一些例子, 已知的表达系统包括, 例如卵、杆状病毒、植物、酵母、或者哺乳动物细胞。

[0137] 在一些实施方案中, 适合于本发明的酶在哺乳动物细胞中制备。可以根据本发明使用的哺乳动物细胞的非限定实施例包括: BALB/c 小鼠骨髓瘤系(NS0/1, ECACC No:

85110503)、人类成视网膜细胞(PER.C6,CruCell,Leiden,荷兰)、SV40转化的猴肾脏CV1系(COS-7,ATCC CRL 1651)、人类胚胎肾脏系(在悬浮培养生长的293或293细胞亚克隆,Graham等,J.Gen Virol.,36:59,1977)、人类纤维肉瘤细胞系(例如HT1080)、幼地鼠肾脏细胞(BHK,ATCC CCL 10)、中国仓鼠卵巢细胞+/-DHFR(CHO,Urlaub and Chasin,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4216,1980)、小鼠睾丸支持细胞(TM4,Mather,Biol.Reprod.,23:243-251,1980)、猴肾脏细胞(CV1ATCC CCL 70)、非洲绿猴肾脏细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587)、人类宫颈癌细胞(HeLa,ATCC CCL 2)、犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34)、布法罗大鼠肝细胞(BRL3A,ATCC CRL 1442)、人类肺细胞(W138,ATCC CCL 75)、人类肝细胞(Hep G2,HB 8065)、小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562,ATCC CCL51)、TRI细胞(Mather et al.,Annals N.Y.Acad.Sci.,383:44-68,1982)、MRC 5细胞、FS4细胞、和人类肝癌细胞系(Hep G2)。

[0138] 在一些实施方案中,根据本发明发明的方法被用来递送从人类细胞制备的替代酶。在一些实施方案中,使用根据本发明发明的方法递送从CHO细胞制备的替代酶。

[0139] 在一些实施方案中,使用本发明的方法递送的替代酶含有与在脑细胞表面上的受体结合的部分,以促进细胞吸收和/或靶向溶酶体。例如,这种受体可以是阳离子依赖型甘露糖-6-磷酸受体(CI-MPR),其与所述甘露糖-6-磷酸(M6P)残基结合。另外,所述CI-MPR也结合其它蛋白,包括IGF-II。在一些实施方案中,适合于本发明的替代酶在所述蛋白的表面含有M6P残基。在一些实施方案中,适合于本发明的替代酶可以含有双磷酸化的寡糖,其与所述CI-MPR具有更高的结合亲和力。在一些实施方案中,合适的酶含有至多大约平均每酶大约至少20%双磷酸化的寡糖。在其它实施方案中,合适的酶可以含有每酶大约10%、15%、18%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%双磷酸化的寡糖。而这种双磷酸化的寡糖可以是天然存在在所述酶上的,应该注意,所述酶可以通过某些酶修饰而拥有这种寡糖。例如,合适的替代酶可以被某些酶(其能够催化溶酶体酶上的N-乙酰氨基葡萄糖-L-磷酸盐从UDP-GlcNAc至 α -1,2-连接的甘露糖的6'位点)修饰。制备和使用这种酶的方法和组合物被详细描述,例如参见Canfield等(在美国专利号6,537,785中)和美国专利号6,534,300,每个都通过参考的方式并入本文。

[0140] 在一些实施方案中,在本发明中使用的替代酶可以缀合或融合至能够结合到脑细胞表面上受体的溶酶体靶向部分。合适的溶酶体靶向部分可以是:IGF-I、IGF-II、RAP、p97、和变异型、及其同源物或者片段(例如包括与野生类型成熟人类IGF-I、IGF-II、RAP、p97肽序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或者95%一致性的序列的肽)。

[0141] 在一些实施方案中,适合于本发明的替代酶未曾被修饰,以增强递送或者转运这种试剂穿过BBB而进入所述CNS。

[0142] 在一些实施方案中,治疗性蛋白质包括靶向部分(例如,溶酶体靶序列)和/或穿膜肽。在一些实施方案中,定向序列和/或穿膜肽为治疗部分的内在部分(例如,通过化学键,通过融合蛋白质)。在一些实施方案中,定向序列含有甘露糖-6-磷酸盐部分。在一些实施方案中,定向序列含有IGF-I部分。在一些实施方案中,定向序列含有IGF-II部分。

[0143] 制剂

[0144] 在一些实施方案中,预期的酶在鞘内递送的稳定制剂中进行递送。本发明的某些实施方案是基于,至少部分地,是基于该发现:本文公开的多种制剂一种或多种治疗试剂

(例如HNS酶)有效递送或分布至所述CNS的靶组织、细胞和/或细胞器官。此外,本文公开的制剂能增溶高浓度的治疗试剂(例如HNS酶),并适合于这种治疗试剂递送至受试者的所述CNS(为了治疗具有CNS组件和/或病因的疾病(例如, Sanfilippo A综合症))。本文描述的所述组合物进一步的特征是:当施用到有需要其的受试者的所述CNS(鞘内施用)时,改善其稳定性和改善其耐受性。

[0145] 在本发明之前,传统的无缓冲等渗盐水和Elliott's B溶液(其是人工CSF)通常地用于鞘内递送。所述CSF组合物相对于Elliott's B溶液的比较描述包含在下面的表3中。如表3所示,Elliott's B溶液的所述浓度密切地与所述CSF相似。Elliott's B溶液,尽管如此,含有非常低的缓冲液浓度,并且因此可能不能为稳定治疗试剂(例如蛋白质)的需要提供充分的缓冲能力,特别是在一段较长的时间(例如在储存条件下)。而且,Elliott's B溶液含有某些盐,这些盐可能与所述制剂(所述制剂打算用于递送某些治疗试剂,特别是蛋白质或者酶)不相容。例如,存在于Elliott's B溶液中的钙盐能够调节蛋白沉淀,并且因此减少了所述制剂的稳定性。

[0146] 表3

[0147]

溶液	Na ⁺ mEq/L	K ⁺ mEq/L	Ca ⁺⁺ mEq/L	Mg ⁺⁺ mEq/L	HCO ₃ ⁻ mEq/L	Cl ⁻ mEq/L	pH	含磷 mg/L	葡萄糖 mg/L
CSF	117-137	2.3	2.2	2.2	22.9	113-127	7.31	1.2-2.1	45-80
Elliott's B 溶液	149	2.6	2.7	2.4	22.6	132	6.0-7.5	2.3	80

[0148] 因此,在一些实施方案中,适合于根据本发明的CNS递送的制剂不是合成的或者人工的CSF。

[0149] 在一些实施方案中,CNS递送的制剂已经配制,使得它们能够稳定化,或者可选择地减缓或者阻止配制在其中的治疗试剂(例如HNS酶)的降解。如本文使用的,所述术语“稳定的”是指所述治疗试剂(例如HNS酶)在一段较长的时间内维持其治疗效果(例如它的预期的生物活性和/或理化完整性的全部或者大部分)的能力。治疗试剂的所述稳定性,和所述药物组合物维持这种治疗世界稳定性的能力,可以在一段较长的时间内(例如优选至少1、3、6、12、18、24、30、36月或者更多)进行评估。就制剂而言,稳定的制剂是这样的:其中的所述治疗试剂在储存和加工(例如冷冻/解冻、机械混合和冷冻干燥)过程中基本上保持其物理和/或化学完整性和生物活性。对于蛋白质稳定性,它可以通过形成高分子重量(HMW)聚集,酶活性损失、肽片段的形成和电荷性能的变化进行量度。

[0150] 治疗试剂的稳定性是特别重要的。所述治疗试剂的稳定性可以进一步评估,相对于所述治疗试剂在较长一段时间内的生物活性或理化完整性。例如,在给定时间点的稳定性可以与较早时间点(例如在配制的第0天)进行比较,或者与未配制的治疗试剂进行比较,并且这种比较结果以百分数表示。优选的,本发明的药物组合物使所述治疗试剂的生物活性或者理化完整性在一端较长的时间(例如在至少大约6-12个月、在室温或者加速储存条件下)内维持至少100%、至少99%、至少98%、至少97%至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少65%、至少60%、至少55%或至少50%。

[0151] 在一些实施方案中,治疗试剂(例如预期的酶)在本发明的制剂中是可溶的。所述

术语“可溶性”(如其所提及的本发明的治疗试剂)是指这种治疗试剂形成均匀的溶液的能力。优选地,所述治疗试剂在所述溶液(在其中所述治疗试剂被施用,并且通过所述溶液所述治疗试剂被运送到作用的靶位点)中的可溶性是足够地以允许递送治疗有效量的所述治疗试剂至作用的靶位点。几种因素可以影响所述治疗试剂的可溶性。例如,可能影响蛋白质可溶性的相关因素,包括离子强度、氨基酸序列和存在其它共溶剂或离子(例如钙盐)。在一些实施方案中,所述药物组合物被配制使得所述钙盐从所述组合物排除。

[0152] 合适的制剂,无论是水性的、预冻干的、冻干的或者再生的形式可以含有多种浓度的感兴趣治疗试剂。在一些实施方案中,制剂可以含有感兴趣蛋白质或者治疗试剂的浓度范围约0.1mg/ml至100mg/ml(例如,约0.1mg/ml至80mg/ml,约0.1mg/ml至60mg/ml,约0.1mg/ml至50mg/ml,约0.1mg/ml至40mg/ml,约0.1mg/ml至30mg/ml,约0.1mg/ml至25mg/ml,约0.1mg/ml至20mg/ml,约0.1mg/ml至10mg/ml,约0.1mg/ml至5mg/ml,约1mg/ml至10mg/ml,约1mg/ml至20mg/ml,约1mg/ml至40mg/ml,约5mg/ml至100mg/ml,约5mg/ml至50mg/ml,或者约5mg/ml至25mg/ml)。在一些实施方案中,根据本发明的制剂可以含有的治疗试剂浓度大约1mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml, 15mg/ml, 20mg/ml, 25mg/ml, 30mg/ml, 40mg/ml, 50mg/ml, 60mg/ml, 70mg/ml, 80mg/ml, 90mg/ml, 或者100mg/ml。

[0153] 本发明的所述制剂特征在于它们的耐受性,作为水性的溶液或者再生的冻干的溶液。如本文所使用的,所述术语“可容忍的”和“耐受性”是指本发明的所述药物组合物在被施用这种组合物的所述受试者中不引发不良反应的能力,或者可选择地在被施用这种组合物的所述受试者中不引发严重不良反应的能力。在一些实施方案中,本发明的所述药物组合物被施用这种组合物的受试者良好地容忍。

[0154] 许多治疗试剂,特别是本发明的蛋白质和酶,要求可控制的pH值和特定的赋形剂,以维持其在本发明所述药物组合物中的可溶性和稳定性。下面的表4认同的蛋白质制剂示例性方面,被认为维持本发明蛋白质治疗试剂的可溶性和稳定性。

[0155] 表4

参数	通常的范围/类型	基本的原理
pH	5 至 7.5	对于稳定性 有事也对于可溶性
缓冲剂类型	醋酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、组氨酸、磷酸盐或者 Tris	以维持最适 pH 也可能影响稳定性
[0156] 缓冲剂浓度	5-50 mM	以维持 pH 也可能使稳定或增加离子强度
Tonicifier	NaCl、糖、甘露醇	以提供等渗或等渗溶液
表面活性剂	聚山梨醇酯 20, 聚山梨醇酯 80	使界面和切面稳定
其它	氨基酸 (例如精氨酸), 在几十到几百的 mM	以增强可溶性或稳定性

[0157] 缓冲剂

[0158] 所述制剂的所述pH是能够改变治疗时机(例如酶或者蛋白质)在水性制剂或者预冻干制剂中的可溶性的额外因素。因此,本发明的所述制剂优选地包括一种或多种缓冲剂。

在一些实施方案中,所述水性的制剂包括大量的缓冲剂,以充分维持所述组合物最适pH值在约4.0-8.0之间(例如,约4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.2、6.4、6.5、6.6、6.8、7.0、7.5、或者8.0)。在一些实施方案中,所述制剂的所述pH在约5.0-7.5之间,在约5.5-7.0之间,在约6.0-7.0之间,在约5.5-6.0之间,在约5.5-6.5之间,在约5.0-6.0之间,在约5.0-6.5之间以及在约6.0-7.5之间。合适的缓冲剂包括:例如醋酸盐、柠檬酸盐、组氨酸、磷酸盐、琥珀酸盐、三羟甲基甲胺(“Tris”)以及其它有机酸。本发明的所述药物组合物的所述缓冲剂浓度和pH范围是控制或者调解所述制剂的耐受性的因素。在一些实施方案中,缓冲剂存在的浓度范围在约1mM至约150mM之间,或者在约10mM至约50mM之间,或者在约15mM至约50mM之间,或者在约20mM至约50mM之间,或者在约25mM至约50mM。在一些实施方案中,合适的缓冲剂存在的浓度范围大约1mM、5mM、10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、75mM、100mM、125mM或者150mM。

[0159] 渗透度

[0160] 在一些实施方案中,制剂(无论是水性的、预冻干的、冻干的或者再生的形式)含有等渗剂以维持所述制剂等渗,通常地,“等渗的”意思是所述感兴趣制剂与人类血液具有基本相同的渗透压。等渗的制剂通常具有渗透压从约240mOsm/kg至约350mOsm/kg。等渗性可以使用(例如)蒸汽压力或者凝固点类型渗透计进行测量。示例性的等渗剂包括但不限于:甘氨酸、山梨糖、甘露糖、氯化钠和精氨酸。在一些实施方案中,合适的等渗剂可以存在于水性的和/或预冻干的制剂中,以浓度从约0.01-5%(例如,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或者5.0%),以重量计。在一些实施方案中,冻干的制剂含有等渗剂,以维持所述预-冻干制剂或者所述再生制剂等渗。

[0161] 而且,通常地对于非肠胃施用的药物需要制备等渗的溶液,使用等渗的溶液可以改变一些治疗试剂的可溶性,特别地是一些蛋白质和/或酶。已经表明,可以良好地容忍稍微高渗的溶液(例如,在5mM磷酸钠中,至多175mM氯化钠,pH7.0)以及含糖溶液(例如,至多2%蔗糖,在5mM磷酸钠中,pH7.0)。所述最常见批准的CNS推注制剂组合物是生理盐水(在水中,约150mM NaCl)。

[0162] 稳定剂

[0163] 在一些实施方案中,制剂可以含有稳定剂或冻干保护剂,以保护所述蛋白质。通常地,合适的稳定剂为糖、非还原性糖和/或氨基酸。示例性的糖包括但不限于:葡萄聚糖、乳糖、甘露糖、甘露糖、山梨糖、棉子糖、蔗糖和海藻糖。示例性的氨基酸包括但不限于:精氨酸、甘氨酸和蛋氨酸。附加的稳定剂可以包括氯化钠、羟乙基淀粉和聚乙烯吡咯烷酮。在所述冻干的制剂中的稳定剂的量通常使得所述制剂等渗。无论如何,高渗的再生的制剂也可以是合适的。另外,所述稳定剂的量不能太低,而使所述治疗试剂发生降解/聚集的量不可接受。在所述制剂中的示例性稳定剂浓度范围从约1mM至约400mM(例如,从约30mM至约300mM,以及从约50mM至约100mM),或者可选择地,从0.1%至15%(例如,从1%至10%,从5%至15%,从5%至10%),以重量计。在一些实施方案中,所述稳定剂和所述治疗试剂的质量比例为约1:1。在一些实施方案中,所述稳定剂和所述治疗试剂的质量比例可以是约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,或者20:1。在一些实施方案中,适合于冷冻干燥,所述稳定剂也是冻干保护剂。

[0164] 在一些实施方案中,适合于本发明的液体制剂含有无定形材料。在一些实施方案

中,适合于本发明的液体制剂含有基本量的无定形材料(例如,基于蔗糖的制剂)。在一些实施方案中,适合于本发明的液体制剂含有部分的晶体/部分的无定形材料。

[0165] 填充剂

[0166] 在一些实施方案中,适合于冷冻干燥的制剂可以进一步包括一种或多种填充剂。“填充剂”是指复合物,其为冻干混合物添加质量,并且有助于所述冻干块状物的物理结构。例如,填充剂可以改善冻干块状物的所述外观(例如,基本均一的冻干的块状物)。合适的填充剂包括但不限于:氯化钠、乳糖、甘露糖、甘氨酸、蔗糖、海藻糖、羟乙基淀粉。示例性的填充剂浓度从约1%至约10%(例如,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%,以及10.0%)。

[0167] 表面活性剂

[0168] 在一些实施方案中,理想的是,添加表面活性剂至制剂。示例性的表面活性剂包括非离子表面活性剂,例如聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯20或者80);泊洛沙姆(例如洛沙姆188);Triton;十二烷基硫酸钠(SDS);月桂基硫酸钠;sodium octyl glycoside;十二烷基-,十四烷基-,linoleyl-,或者硬脂基-磺基甜菜碱;十二烷基-,十四烷基-,linoleyl-或者硬脂基-肌氨酸;linoleyl-,十四烷基-,或者鲸蜡基-甜菜碱;lauroamidopropyl-,cocamidopropyl-,linoleamidopropyl-,myristamidopropyl-,palmidopropyl-,或者异硬脂酰丙基-甜菜碱(例如lauroamidopropyl);myristamidopropyl-,palmidopropyl-,或者异硬脂酰丙基-二甲胺;甲基椰油酰基钠-,或者disodium methyl ofeyle-aurate;以及MONAQUAT™系列(Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.),聚乙二醇,聚丙二醇,以及乙烯和丙二醇的共聚物(例如Pluronic, PF68等)。通常地,所述添加的表面活性剂的量是使得所述蛋白质聚集减少,并且使颗粒或冒泡最小化。例如,存在于制剂中的表面活性剂可以是大约0.001-0.5%(例如大约0.005-0.05%,或者0.005-0.01%)。特别的,存在于制剂中的表面活性剂浓度可以是约0.005%、0.01%、0.02%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、或者0.5%等。可选择地,或者另外,所述表面活性剂可以添加至冻干制剂、预冻干制剂和/或再生制剂。

[0169] 其它药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂,例如这些在Remington's Pharmaceuticals Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)中描述的,可以被包括在所述制剂(和/或所述冻干的制剂和/或所述再生的制剂)中,以他们对所述制剂的预期特性没有不良影响为条件。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对于接受者是无毒的,并且包括但不限于:附加的缓冲剂;防腐剂;共溶剂;抗氧化剂(包括抗坏血酸和蛋氨酸);螯合剂(例如EDTA);金属复合物(例如,Zn-蛋白质复合物);生物可降解的多聚体(例如多元酯);和/或盐-形成平衡离子(例如钠)。

[0170] 根据本发明的制剂(无论是水性的、预冻干的、冻干的或者再生的形式)可以基于这些进行评估:产品质量分析、再生时间(如果冻干)、再生质量(如果冻干)、高分子量、湿度、和玻璃转化温度。通常地,蛋白质质量和产品分析包括产品降解率分析,使用的方法包括但不限于,体积排阻HPLC(SE-HPLC)、阳离子交换-HPLC(CEX-HPLC)、X-射线衍射(XRD)、调制式差示扫描量热法(mDSC)、反相HPLC(RP-HPLC)、多角度激光光散射(MALS)、荧光、紫外吸收、浊度测定法、毛细管电泳(CE)、SDS-PAGE、以及其组合。在一些实施方案中,根据本发明的产品的评估可以包括评估外貌的步骤(无论液体或者块状物的外貌)。

[0171] 通常,制剂(冻干的或者水性的)可以用于在室温下在长时间的储存。储存温度通常的范围可以从0℃至45℃(例如4℃、20℃、25℃、45℃等)。制剂可以在数月至数年的时间段储存。储存时间通常是24月、12月、6月、4.5月、3月、2月或者1月。制剂可以直接在用于施用、消除转移步骤的所述容器中储存。

[0172] 制剂可以直接在冻干容器中储存(如果冻干),所述冻干容器可以起重组器皿、消除转移步骤的作用。可选择的,冻干产品制剂可以估量成更小的储存增量。储存应该通常避免导致所述蛋白质降解的事件,包括但不限于暴露在阳光、紫外辐射、其它电磁辐射形式、过热或过冷、快速热冲击和机械冲击。

[0173] 冻干

[0174] 根据本发明发明的方法可以被用来冻干任何材料,特别是治疗试剂。通常地,预-冻干制剂进一步含有合适选择的赋形剂或者其它成分(例如稳定剂、缓冲剂、填充剂和表面活性剂)以阻止感兴趣的复合物在冷冻干燥和储存期间降解(例如,蛋白质聚集、脱酰胺基、和/或氧化)。对于冷冻干燥的制剂可以包括一种或多种附加的成分,包括冻干保护剂或者稳定剂、缓冲剂、填充剂、等渗剂和表面活性剂。

[0175] 在将所述感兴趣的物质和其它附加的成分混合一起后,将所述制剂冻干。冻干通常包括三个主要的阶段:冷冻、初级干燥和次级干燥。冷冻对于将水转变成冰或者将一些无定形制剂组分转变为晶体形式是必要的。初级干燥是在低压和低温下,通过直接升华使冰从所述冷冻产品中除去的加工步骤。次级干燥是利用残余水至所述蒸发面的扩散作用,从所述产品基质除去结合水的加工步骤。在次级干燥期间的产品温度通常高于初级干燥。参见,Tang X.et al.(2004)“Design of freeze-dry processes for pharmaceuticals: Practical advice,”Pharm.Res.,21:191-200;Nail S.L.et al.(2002)“Fundamentals of freeze-drying,”in Development and manufacture of protein pharmaceuticals.Nail S.L.editor New York:Kluwer Academic/Plenum Publishers,pp 281-353;Wang et al.(2000)“Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals,”Int.J.Pharm.,203:1-60;Williams N.A.et al.(1984)“The Lyophilization of pharmaceuticals;A literature review.”J.Parenteral Sci.Technol.,38:48-59.通常,任意的冻干过程可以与本发明结合使用。

[0176] 在一些实施方案中,可以在所述产品初始冷冻期间引入退火步骤。所述退火步骤可以减少所述总循环时间。不期望受任何理论的约束,可以设想,所述退火步骤有助于促进赋形剂结晶化、以及大冰晶的形成(由于在过冷期间形成的小晶体的再-结晶化),这反过来,改善了再生。通常地,退火步骤包括间隔或者冷冻期间的温度振荡。例如,所述冷冻温度可以是-40℃,所述退火步骤的所述温度将增加至,例如,-10℃并维持该温度一段设定的时间。所述退火步骤时间范围可以从0.5小时至8小时(例如,0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3、4、6、和8小时)。所述退火温度可以在所述冷冻温度和0℃之间。

[0177] 冻干可以在容器中进行,例如管子、袋子、瓶子、盘子、小药瓶(例如,玻璃小药瓶)、注射器或者任意其它合适的容器。所述容器可以是一次性的。冻干也可以是大规模或者小规模进行。在一些情况下,在冻干所述蛋白质制剂的容器中,进行所述蛋白质的再生,以避免转移步骤,是可取的。在这种情况下的所述容器可以例如是:3、4、5、10、20、50或者100cc小药瓶。

[0178] 为了该目的可以获得许多不同的冷冻干燥器,例如Hull中试规模干燥器(SP Industries,USA),Genesis(SP Industries)实验室冷冻干燥器,或者其它任意能够控制所述给定的冻干加工参数的冷冻干燥器。冷冻-干燥通过所述制剂的冷冻、以及随后在适合初级干燥的温度下将冰从所述冷冻内容物升华来实现。初始冷冻使所述制剂温度低于约-20℃(例如,-50℃,-45℃,-40℃,-35℃,-30℃,-25℃,等),在通常不超过4小时内(例如,不超过约3小时,不超过约2.5小时,不超过约2小时)。在这个条件下,所述产品温度通常地低于所述制剂的共晶点或者崩塌温度。通常地,所述初级干燥的所述搁板温度范围从约-30至25℃(以所述产品在初级干燥期间保持在所述熔点以下为条件),在合适的压力下,范围通常从约20至250mTorr。所述制剂、容纳所述样品的容器(例如玻璃小药瓶)的大小和类型、以及液体体积,将主要决定干燥所需要的时间(其范围可以从几小时至几天)。次级干燥阶段在约0-60℃,主要根据所述容器的类型和大小,以及采用的治疗试剂的类型。再者,液体的体积将主要决定干燥所需要的时间,其范围可以从几小时到几天。

[0179] 作为一个一般性的命题,冻干将导致冻干制剂其中的所述湿度小于约5%,小于约4%,小于约3%,小于约2%,小于约1%,以及小于约0.5%。

[0180] 再生

[0181] 当本发明的所述药物组合物通常以水性的形式施用至受试者,在一些实施方案中本发明的所述药物组合物是冻干的。这种组合物在施用至受试者前,必须通过添加一种或多种稀释剂至其中使其再生。在所述预期的阶段,通常在施用至所述患者之前的合适时间点,所述冻干制剂可以用稀释剂再生,使得在所述再生的制剂中的所述蛋白质浓度为理想的。

[0182] 多种稀释剂可以根据本发明使用。在一些实施方案中,对于再生合适的稀释剂是水。作为稀释剂使用的水可以以多种方式处理,包括:反渗透析、蒸馏、消电离作用、过滤(例如,活性炭、微量过滤、纳米过滤)以及这些治疗方法的组合。一般而言,所述水应该是适合于注射的,包括但不限于,无菌水或注射用抑菌水。

[0183] 附加的示例性稀释剂包括pH缓冲的溶液(例如,磷酸盐-缓冲的生理盐水),无菌生理盐水溶液,Elliott's溶液,Ringer's溶液或者右旋糖溶液。合适的稀释剂可以优选含有防腐剂。示例性的防腐剂包括芳香醇,例如苯甲基或者苯酚醇。采用的防腐剂的量通过评估不同防腐剂浓度来测定,使其与所述蛋白质和防腐剂功效测试相容。例如,如果所述防腐剂是芳香醇(例如苯甲醇),它能以从约0.1-2.0%,从约0.5-1.5%或者约1.0-1.2%的量存在。

[0184] 适合本发明的稀释剂包括多种添加剂,包括但不限于:pH缓冲剂,(例如Tris,组氨酸,)盐(例如,氯化钠)以及其它添加剂(例如,蔗糖)(包括上文描述的这些(例如稳定剂、等渗剂))。

[0185] 根据本发明,冻干的物质(例如蛋白质)可以被再生至至少25mg/ml的浓度(例如,至少50mg/ml,至少75mg/ml,至少100mg/ml)以及任何在其间的范围。在一些实施方案中,冻干的物质(例如,蛋白质)可以再生至浓度范围从约1mg/ml至100mg/ml(例如,从约1mg/ml至50mg/ml,从1mg/ml至100mg/ml,从约1mg/ml至约5mg/ml,从约1mg/ml至约10mg/ml,从约1mg/ml至约25mg/ml,从约1mg/ml至约75mg/ml,从约10mg/ml至约30mg/ml,从约10mg/ml至约50mg/ml,从约10mg/ml至约75mg/ml,从约10mg/ml至约100mg/ml,从约25mg/ml至约50mg/ml,从约25mg/ml至约75mg/ml,从约25mg/ml至约100mg/ml,从约50mg/ml至约75mg/ml,从约

50mg/ml至约100mg/ml)。在一些实施方案中,在所述再生的制剂中的蛋白质浓度可以高于在所述预-冻干制剂中的浓度。在所述再生制剂中的蛋白质浓度对于打算皮下或者肌肉间递送的再生制剂特别有用。在一些实施方案中,在所述再生制剂中的蛋白质浓度可以是所述预冻干制剂的约2-50倍(例如约2-20,约2-10倍,约2-5倍)。在一些实施方案中,在所述再生制剂中的蛋白质浓度可以是所述预冻干制剂的至少约2倍(例如,至少约3、4、5、10、20、40倍)。

[0186] 根据本发明的再生可以在任意的容器中进行。适合于本发明的示例性容器,包括但不限于:例如管子、小药瓶、注射器(例如,单室的或者二室的)、袋子、瓶子和盘子。合适的容器可以用任意材料制备,例如玻璃、塑料、金属。所述容器可以是一次使用的或者可多次使用的。再生也可以大规模或者小规模进行。

[0187] 在一些情况下,在冻干所述蛋白质制剂的容器中,进行所述蛋白质的再生,以避免转移步骤,是可取的。在这种情况下下的所述容器可以例如是:3、4、5、10、20、50或者100cc小药瓶。在一些实施方案中,用于冻干和再生的合适的容器是二室的注射器(例如,(装有冻干粉和稀释剂的)二室注射器给药系统,®(Vetter)注射器)。例如,二室的注射器可以含有冻干的物质和所述稀释剂两者,每个在单独的室中,通过阻塞物分开(参见实施例5)。为了再生,可以在所述稀释剂侧将活塞与所述阻塞物连接并且按压让稀释剂移动进入所述产品室,使得所述稀释剂能接触所述冻干的物质,然后再生可以如本文所描述地发生(参见实施例5)。

[0188] 本发明所述的药物组合物、制剂和相关方法对于递送多种治疗试剂至受试者的所述CNS(例如,鞘内地、脑室内地或者脑池内地)以及治疗所述相关的疾病是有用的。本发明的所述药物组合物对于递送蛋白质和酶(例如酶替代治疗)至患有溶酶体贮积症的受试者特别有用。所述溶酶体贮积症代表了导致溶酶体功能缺陷的一组相对罕见的遗传性代谢疾病。所述溶酶体疾病的特征在于未消化大分子在所述溶酶体内的累积,其导致这种溶酶体大小和数量的增加,并最终导致细胞功能障碍和临床异常。

[0189] CNS递送

[0190] 可以设想,下文描述的多种稳定制剂通常对于治疗试剂的CNS递送是合适的。根据本发明的稳定制剂可以通过多种技术和途径,用于CNS递送,包括但不限于:脑实质内的、大脑内的、脑室内的(ICV)、鞘内的(例如,IT-腰椎、IT-小脑延髓池)施用,以及其它直接或间接注入所述CNS技术和/或CSF的技术和途径。

[0191] 鞘内递送

[0192] 在一些实施方案中,替代酶在本文所描述的制剂中被递送至所述CNS。在一些实施方案中,通过施用进入有需要治疗的受试者的所述脑脊髓液(CSF),递送替代酶至所述CNS。在一些实施方案中,鞘内施用被用于递送期望的替代酶(例如,HNS蛋白质)进入所述CSF。如本文所使用的,鞘内施用(也称为鞘内注射)是指注射进入所述脊髓管(在所述脊髓周围的鞘内空间)。可以使用多种技术,包括但不限于,侧脑室注射(通过钻孔或小脑延髓池或腰椎穿刺或诸如此类)。示例性方法的描述见于Lazorthes et al. *Advances in Drug Delivery Systems and Applications in Neurosurgery*, 143-192 and Omayya et al., *Cancer Drug Delivery*, 1:169-179,其内容通过参考的方式并入本文。

[0193] 根据本发明,可以在所述脊髓管周围的任意区域注射酶。在一些实施方案中,将酶

注射进入所述腰椎区域或者所述小脑延髓池,或者脑室内地注射进入脑室空间。如本文所使用的,所述术语“腰椎部位”或者“腰椎区域”是指在所述第三和第四腰椎(下背部)骨之间的区域,更包含所述脊椎的L2-S1区域。通常地,通过腰椎部位或腰椎区域的鞘内注射也称为“腰椎IT递送”或者“腰椎IT施用”。所述术语“小脑延髓池”是指在所述小脑周围和下方的空间(经由在所述头骨和所述脊椎顶部之间的开口)。通常地,通过小脑延髓池的鞘内注射也称为“小脑延髓池递送”。所述术语“脑室”是指在所述脑中的空腔,其与所述脊髓的中央管是连续的。通常地,经由所述脑室空腔的注射是指脑室内的(intraventricular Cerebral, ICV)递送。

[0194] 在一些实施方案中,根据本发明的“鞘内施用”或者“鞘内递送”是指腰椎IT施用或者递送,例如,在所述第三和第四腰椎骨(下背部)之间递送,更包含所述脊椎的L2-S1区域。这也是考虑到的,腰部IT施用或者递送区别于在所述小脑延髓池递送,因为根据本发明的腰部IT施用或者递送提供了更好和更有效地递送至远端脊髓管,而小脑延髓池递送(除了其它的以外)通常地不能良好地递送至远端脊髓管。

[0195] 鞘内递送的设备

[0196] 根据本发明鞘内递送可以使用多种设备。在一些实施方案中,鞘内施用的设备含有:流体进入端口(例如可注射的端口);空心体(例如导管),所述空心体具有与所述流体进入端口液体连通的第一流体孔口以及配置插入到脊髓中的第二流体孔口;和固定机构,所述固定机构用于固定在所述脊髓中的空心体的插入。如在图36中示出的非限定性实施例,合适的固定机构含有固定在所述空心体表面的一个或多个球形门柄、以及可调节覆盖所述一个或多个球形门柄的缝合环,所述缝合环用于阻止所述空心体(例如导管)从所述脊髓滑出。在多种实施方案中,所述流体进入端口包括贮液囊。在一些实施方案中,所述流体进入端口包括机械泵(例如灌注泵)。在一些实施方案中,植入的导管连接到贮液囊(例如用于推注递送),或者灌注泵。所述流体进入端口可以是植入的或者外置的。

[0197] 在一些实施方案中,鞘内施用可以通过腰椎穿刺(缓慢推注)或通过端口-导管递送系统(例如注射或者推注)进行。在一些实施方案中,所述导管插入到所述腰椎之间的薄层,所述前端被拧到预期水平的鞘空间(通常L3-L4)(图37A-C)。

[0198] 相对于静脉施用,适合鞘内施用的单剂量体积通常地小的。通常地,根据本发明的鞘内递送维持了所述CSF的组合物与所述受试者颅内压力之间的平衡。在一些实施方案中,对于相应的去除了CSF的受试者,鞘内递送没有进行。在一些实施方案中,合适的单剂量体积可以例如小于大约10ml、8ml、6ml、5ml、4ml、3ml、2ml、1.5ml、1ml、或者0.5ml。在一些实施方案中,合适的单剂量体积可以是大约0.5-5ml、0.5-4ml、0.5-3ml、0.5-2ml、0.5-1ml、1-3ml、1-5ml、1.5-3ml、1-4ml、或者0.5-1.5ml。在一些实施方案中,根据本发明的鞘内递送涉及首先去除预期量的CSF的步骤。在一些实施方案中,小于大约10ml(例如小于大约9ml、8ml、7ml、6ml、5ml、4ml、3ml、2ml、1ml)的CSF首先被去除。在这些情况下,合适的单剂量体积可以是例如多于大约3ml、4ml、5ml、6ml、7ml、8ml、9ml、10ml、15ml、或者20ml。

[0199] 可以使用多种其它设备影响治疗组合物的鞘内施用。例如,含有预期酶的制剂的给予可以使用Ommaya贮液囊,所述Ommaya贮液囊通常用于脑膜癌扩散药物的鞘内施用(Lancet2:983-84,1963)。更具体地说,在这种方法中,脑室管通过在所述前角形成的孔中插入,并且连接到安装在所述头皮下的Ommaya贮液囊;并且所述Ommaya贮液囊是皮下穿刺,

使其鞘内递送所述特定被替代的酶(所述酶被注射到所述贮液囊中)。治疗组合物或者制剂鞘内施用到个体的其它设备的描述可以参见:美国专利号6,217,552,其通过参考的方式并入本文。可选择地,所述药物可以鞘内施用,例如,可以单一注射,或者持续注射。应该理解,所述剂量治疗可以以单一剂量施用或者多种剂量的形式。

[0200] 对于注射,本发明的制剂可以以液体溶液配制。另外,所述酶可以以固体形式配制,并且在使用之前重溶或者立即悬浮。冻干形式也包括在内。所述注射,例如以所述酶的推注射或者持续注射(例如使用灌流泵)的形式。

[0201] 在本发明的一个实施方案中,所述酶通过侧脑室注射至所述受试者的脑中。所述注射,可以例如通过在所述受试者的头骨中钻孔。在另一实施方案中,所述酶和/或其它药物制剂通过外科插入分流至所述受试者的脑室中。例如,所述注射可以在侧脑室(其更大)进行。在一些实施方案中,也可以注射进入所述第三和第四较小脑室。

[0202] 在又一个实施方案中,在本发明中使用的所述药物组合物通过注射施用至受试者所述小脑延髓池、或腰部。

[0203] 在本发明的又一实施方案中,所述药学可接受的制剂提供了持久的递送至受试者(例如:在本发明中使用的所述酶或者其它药物组合物的“缓慢释放”),在所述药学可接受的制剂被施用到所述受试者后,维持至少一周、两周、三周、四周或更长时间段。

[0204] 如本文使用的,所述术语“持久的递送”是指本发明的药物制剂在施用以后,在体内,在一段时间内持续递送,优选至少几天、一周或数周。所述组合物的持久递送可以被证明,例如所述酶在一段时间内的持久治疗效果(例如所述酶的持久递送可以通过在所述受试者中贮藏粒量的持续减少所证明)。可选择地,所述酶的持久递送可以被证明:通过检测在一定时间内,在体内存在的所述酶。

[0205] 递送至靶组织

[0206] 如上文所讨论的,本发明的一种令人惊讶的和重要的特征是:所述治疗试剂,特别的,使用本发明施用的替代酶能有效地、广泛地分散在所述脑表面,并渗透多层脑区域(包括深部脑区域)。另外,本发明的方法和组合有效地递送治疗试剂(例如,HNS酶)至脊髓的多种组织、神经元或细胞,包括腰区,所述腰区难以通过存在的CNS递送方法(例如ICV注射)靶向定位。而且,本发明的发明方法和组合物递送充分的量的治疗试剂(例如,HNS酶)至血流、多种外周器官和组织中。

[0207] 因此,在一些实施方案中,治疗性蛋白质(例如,HNS酶)被递送至受试者的中枢神经系统。在一些实施方案中,治疗性蛋白质(例如,HNS酶)被递送至脑、脊髓、和/或外周器官的靶组织。如本文使用的,所述术语“靶组织”是指受到待治疗的溶酶体贮积症的影响的任意组织,或者所述缺乏的溶酶体酶正常表达的任意组织。在一些实施方案中,靶组织包括这些组织:在所述组织中具有可检测的或者异常高的量的酶底物,例如储存在所述组织的细胞溶酶体中(在患有或已患有溶酶体贮积症的患者中)。在一些实施方案中,靶组织包括表现具有疾病相关病理、症状或特征的这些组织。在一些实施方案中,靶组织包括这些组织:在所述组织中所述缺乏的溶酶体酶以升高的水平正常表达。如本文使用的,靶组织可以是脑靶组织、脊髓靶组织和/或外周靶组织。示例性的靶组织在下文详细描述。

[0208] 脑靶组织

[0209] 一般而言,所述脑可以被分成不同的区域、层和组织。例如,脑膜组织是覆盖所述

中枢神经系统(包括所述脑)的膜系统。所述脑膜含有三层,包括硬脑膜、蛛网膜和软脑膜。一般而言,所述脑膜和脑脊髓液的主要功能是保护所述中枢神经系统。在一些实施方案中,根据本发明的治疗性蛋白质被递送至一层或多层所述脑膜。

[0210] 所述脑具有三个主要的细分区,包括大脑、小脑和脑干。所述大脑半球位于大部分其它脑结构上方,并且被皮层覆盖。在所述大脑下面是脑干,所述脑干看起来像连接在所述大脑上的柄。在所述脑的后部,所述大脑以下和所述脑干后面,是小脑。

[0211] 间脑(其位于所述脑中线附近,并且在所述中脑上方)含有丘脑、后丘脑、下丘脑、上丘脑、腹侧丘脑和前顶盖。中脑(也称为中脑)含有顶盖、大脑脚盖、脑中水管、大脑脚、红核、和颅神经III核。中脑与视觉、听觉、运动控制、睡眠/唤醒、警觉和温度调节相关。

[0212] 中枢神经系统组织的区域(包括脑)的特征,可以基于所述组织的深度划分。例如,CNS(例如脑)组织的特征可以描述成表面或者浅部组织、中层深度组织和/或深部组织。

[0213] 根据本发明,治疗性蛋白质(例如替代酶)可以递送到与在受试者中待治疗的特定疾病相关的任意合适的脑靶组织。在一些实施方案中,根据本发明的治疗性蛋白质(例如替代酶)被递送至表面或浅部的脑靶组织。在一些实施方案中,根据本发明的治疗性蛋白质被递送至中层深度脑靶组织。在一些实施方案中,根据本发明的治疗性蛋白质被递送至深部脑靶组织。在一些实施方案中,根据本发明的治疗性蛋白质被递送至表面或浅部脑靶组织、中层深度脑靶组织、和/或深部脑靶组织的组合。在一些实施方案中,根据本发明的治疗性蛋白质被递送至深部脑组织,其在脑的外部表面以下(或内部)至少4mm、5mm、6mm、7mm、8mm、9mm、10mm或更多。

[0214] 在一些实施方案中,治疗试剂(例如酶)被递送至大脑的一个或多个表面或者浅部组织。在一些实施方案中,所述靶向的大脑表面或者浅部组织位于距所述大脑表面4mm以内。在一些实施方案中,所述靶向的大脑表面或浅部组织选自:软脑膜组织、大脑皮质带状组织、海马、Virchow Robin空间、VR空间内的血管、海马、在脑下表面上的部分下丘脑、视神经和神经束、嗅球和突起物、以及其组合。

[0215] 在一些实施方案中,治疗试剂(例如酶)被递送至大脑的一个或多个深部组织。在一些实施方案中,所述靶向的大脑表面或浅部组织位于在所述脑表面以下(或内部)4mm(例如5mm、6mm、7mm、8mm、9mm、或者10mm)。在一些实施方案中,大脑的靶向深部组织包括大脑皮质丝带。在一些实施方案中,大脑的靶向深部组织包括间脑(例如下丘脑、丘脑、腹侧丘脑、底丘脑等)、后脑、豆状核、基底神经节、尾状核、豆状核、杏仁核、苍白球及其组合的一种或多种组织。

[0216] 在一些实施方案中,治疗试剂(例如酶)被递送至一种或多种的小脑组织。在某些实施方案中,所述靶向的一种多种小脑组织选自:分子层组织、浦肯野(氏)细胞层组织、颗粒细胞层组织、小脑脚、及其组合。在一些实施方案中,治疗试剂(例如酶)被递送至一种或多种小脑组织,包括但不限于浦肯野(氏)细胞层组织、颗粒细胞层组织、小脑深部白质组织(例如相对于颗粒细胞层的深部)、和小脑深部核组织。

[0217] 在一些实施方案中,治疗试剂(例如酶)被递送至一种或多种脑干组织。在一些实施方案中,所述靶向的一种或多种脑干组织包括脑干白质组织和/或脑干核组织。

[0218] 在一些实施方案中,治疗试剂(例如酶)被递送至多种脑组织,包括但不限于灰质、白质、脑室周围区域、软膜蛛网膜、脑膜、新皮质、小脑、大脑皮层中的深部组织、分子层、尾

状核/豆状核区域、中脑、脑桥或者延髓的深部区域及其组合。

[0219] 在一些实施方案中,治疗试剂(例如酶)被递送至在脑中的多种细胞,包括但不限于神经元、胶质细胞、血管周细胞和/或脑膜细胞。在一些实施方案中,治疗性蛋白质被递送至深部白质的少突胶质细胞。

[0220] 脊髓

[0221] 一般而言,脊髓的区域或者组织可以根据组织深度的特点区分。例如,脊髓组织可以区分为表面或者浅部组织、中层深度组织、和/或深部组织。

[0222] 在一些实施方案中,治疗试剂(例如酶)被递送至脊髓的一种多种表面或者浅部组织。在一些实施方案中,靶向的脊髓的表面或浅部组织位于距离所述脊髓表面4mm以内。在一些实施方案中,靶向的脊髓的表面或浅部组织含有软脑膜和/或束状的白质。

[0223] 在一些实施方案中,治疗试剂(例如酶)被递送至所述脊髓的一种或多种组织。在一些实施方案中,脊髓的靶向深部组织位于距所述脊髓表面内部4mm。在一些实施方案中,脊髓的靶向深部组织含有脊髓灰质和/或室管膜细胞。

[0224] 在一些实施方案中,治疗试剂(例如酶)被递送至脊髓的神经元。

[0225] 外周靶组织

[0226] 如本文使用的,外周器官或组织是指那些不是所述中枢神经系统(CNS)组成部分的任意器官或组织。外周靶组织可以包括,但不限于血液系统、肝脏、肾脏、心脏、内皮、骨髓和骨髓来源的细胞、脾脏、肺脏、淋巴结、骨、软骨、卵巢和睾丸。在一些实施方案中,根据本发明的治疗性蛋白质(例如替代酶)被递送至一种或多种外周靶组织。

[0227] 生物分布和生物药效率

[0228] 在多种实施方案中,一旦递送至所述靶组织,治疗试剂(例如HNS酶)被定位到细胞内。例如,治疗试剂(例如酶)可以定位至靶细胞(例如神经元,例如浦肯野细胞)的外显子、轴突、溶酶体、线粒体或者液泡。例如,在一些实施方案中,鞘内施用的酶展示易位动态,使得所述酶在所述血管周空间以内移动(例如通过脉动辅助对流机制)。此外,与将所述施用蛋白质或者酶与神经丝结合有关的活性轴突运输机制可能有助于或者促进鞘内施用蛋白质或者酶分布进入所述中枢神经系统的深部组织。

[0229] 在一些实施方案中,根据本发明递送的治疗试剂(例如HNS酶)可在多种本文描述的靶组织中,实现治疗(或临床)的效果水平(或活性)。如本文使用的,治疗(或临床)的效果水平(或活性)是这样的水平,其能在靶组织中提供足够的治疗效果。所述治疗效果可以是客观的(即通过某种测试或标记物进行可以测量的)或者主观的(即受试者给出的指示或者感觉的效果)。例如,治疗(或临床)的效果水平(或活性)可以是这样的酶水平或者活性:其可以足够地减缓与在所述靶组织中的疾病相关的症状(例如GAG储存)。

[0230] 在一些实施方案中,根据本发明递送的治疗试剂(例如替代酶)可以实现的酶水平或者活性是:相对于在靶组织中的溶酶体酶的正常水平或者活性的至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%。在一些实施方案中,根据本发明递送的治疗试剂(例如替代酶)可以实现的酶水平或者活性是:相对于对照(例如没有进行所述治疗时的内源水平或者活性),以至少1-倍、2-倍、3-倍、4-倍、5-倍、6-倍、7-倍、8-倍、9-倍或者10-倍地增加。在一些实施方案中,根据本发明递送的治疗试剂(例如替代酶)可以达到增加的酶水平或者活性是:在靶组织中,至少约10nmol/hr/mg、20nmol/hr/mg、40nmol/hr/mg、

50nmol/hr/mg、60nmol/hr/mg、70nmol/hr/mg、80nmol/hr/mg、90nmol/hr/mg、100nmol/hr/mg、150nmol/hr/mg、200nmol/hr/mg、250nmol/hr/mg、300nmol/hr/mg、350nmol/hr/mg、400nmol/hr/mg、450nmol/hr/mg、500nmol/hr/mg、550nmol/hr/mg或者600nmol/hr/mg。

[0231] 在一些实施方案中,根据本发明发明的方法对于靶向腰区特别有用。在一些实施方案中,根据本发明递送的治疗试剂(例如替代酶)可以达到的增加的酶水平或者活性是:在所述腰区中,至少约500nmol/hr/mg、600nmol/hr/mg、700nmol/hr/mg、800nmol/hr/mg、900nmol/hr/mg、1000nmol/hr/mg、1500nmol/hr/mg、2000nmol/hr/mg、3000nmol/hr/mg、4000nmol/hr/mg、5000nmol/hr/mg、6000nmol/hr/mg、7000nmol/hr/mg、8000nmol/hr/mg、9000nmol/hr/mg、或者10,000nmol/hr/mg。

[0232] 一般而言,根据本发明递送的治疗试剂(例如替代酶)在CSF以及脑、脊髓和外周器官的靶组织中具有充分长的半衰期。在一些实施方案中,根据本发明递送的治疗试剂(例如替代酶)可以具有的半衰期:至少约30分钟、45分钟、60分钟、90分钟、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、16小时、18小时、20小时、25小时、30小时、35小时、40小时、多达3天、多达7天、多达14天、多达21天或者多达一月。在一些实施方案中,在一些实施方案中,根据本发明递送的治疗试剂(例如替代酶)可以在CSF或者血流中持有可检测的水平或者活性,在施用的12小时、24小时、30小时、36小时、42小时、48小时、54小时、60小时、66小时、72小时、78小时、84小时、90小时、96小时、102小时、或一周后。可检测的水平或者活性可以使用本领域已知的方法测定。

[0233] 在某些实施方案中,根据本发明递送的治疗试剂(例如替代酶)达到的浓度是:在施用后(在鞘内施用所述药物组合物至所述受试者后的例如1周、3天、48小时、36小时、24小时、18小时、12小时、8小时、6小时、4小时、3小时、2小时、1小时、30分钟或更少)的所述受试者的所述CNS组织和细胞中,至少30 μ g/ml。在某些实施方案中,根据本发明递送的治疗试剂(例如替代酶)在施用至受试者(例如在鞘内施用这种组合物至所述受试者1周、3天、48小时、36小时、24小时、18小时、12小时、8小时、6小时、4小时、3小时、2小时、1小时、30分钟或更少时间之后)后,在所述受试者的靶组织或细胞中(例如脑组织或神经元),达到的浓度为:至少20 μ g/ml、至少15 μ g/ml、至少10 μ g/ml、至少7.5 μ g/ml、至少5 μ g/ml、至少2.5 μ g/ml、至少1.0 μ g/ml或者至少0.5 μ g/ml。

[0234] Sanfilippo A综合症和其它溶酶体贮积症的治疗

[0235] 所述溶酶体贮积症表示导致溶酶体功能缺陷的一组相对稀少的遗传代谢疾病。所述溶酶体疾病的特征在于在溶酶体内部(参见表1)未消化大分子的累积,包括这些酶底物,这导致这种溶酶体体积和数量的增加,并最终导致细胞机能障碍和临床异常。

[0236] 本文描述的发明方法能有利地促进一种或多种治疗试剂(一种或多种替代酶)递送至靶细胞器。例如,因为溶酶体贮积症(例如Sanfilippo综合症类型A)的特征在于粘多糖(GAG)在受影响细胞的溶酶体中的累积,所述溶酶体表示所述治疗的溶酶体贮积症的预期靶细胞。

[0237] 本发明的发明方法和组合物对于具有CNS病因或组件的这些疾病的治疗特别有用。具有CNS病因或组件的溶酶体贮积症,包括例如不限于:Sanfilippo综合症类型A、Sanfilippo综合症类型B、亨特综合症、异染性脑白质营养不良和球细胞脑白质营养不良。在本发明之前,传统治疗限于:将其静脉施用至受试者,并且通常仅对治疗潜在的酶缺乏的

躯体症状有效。本发明的这些组合物和方法可以有利地直接施用至患有具有CNS病因的疾病的受试者的CNS,从而在所述CNS的受影响细胞和组织(例如脑)中达到治疗浓度,从而克服与传统全身施用这种治疗试剂相关的限制。

[0238] 在一些实施方案中,本发明的发明方法和组合物对于治疗溶酶体贮积症的(神经病学的和身体的)后遗症或症状有用。例如,本发明的一些实施方案,关于递送(例如鞘内地、脑室内地或者脑池内地)一种或多种治疗试剂至受试者的CNS的组合物和方法,为了治疗所述CNS或者溶酶体贮积症的或者神经病学后遗症和表现,同时也治疗所述溶酶体贮积症的系统的或身体的表现。例如,本发明的一些组合物可以鞘内施用至受试者,从而递送一种或多种治疗试剂至所述受试者的所述CNS,并且治疗所述神经病学后遗症;联合静脉施用一种或多种治疗试剂以递送这种治疗试剂至体循环(例如心脏、肺脏、肝脏、肾脏或者淋巴结的细胞和组织)的细胞和组织(两者都包括),从而治疗所述身体的后遗症。例如,具有或者其它受到溶酶体贮积症(例如,Sanfilippo综合症类型A)影响的受试者,可以被鞘内施用药物组合物,所述药物组合物包括一种或多种治疗试剂(例如HNS),至少每周、两周,每月、两月或更多时间一次,以治疗所述神经病学的后遗症;同时不同的治疗试剂被静脉施用至所述受试者,更频繁地(例如,每天一次,隔日一次,一周或每周三次),以治疗所述疾病系统的或者身体的表现。

[0239] Sanfilippo综合症、或者黏多糖贮积症III(MPS III)是一种罕见的遗传性疾病,其特征涉及粘多糖(GAG)降解的酶的缺乏。在缺乏所述酶的情况下,部分降解的GAG分子不能从身体清除,并且在多种组织的溶酶体中累积,导致进行性广泛的身体功能障碍(Neufeld and Muenzer,2001)。

[0240] 已经识别MPSIII的四种不同形式,称为MPS IIIA、B、C、和D。每种代表了参与硫酸乙酰肝素降解的四种酶之一的缺乏。所有形式包括不同程度的所述相同相同临床症状,包括粗面部特征、肝脾大、角膜混浊和骨骼畸形。更加显著地,然而,是认知能力的严重和进行性丧失,其不仅与硫酸乙酰肝素在神经元中的积累相关,而且随后由初级GAG积累导致的神经节糖苷脂GM2、GM3和GD2升高(Walkley 1998)。

[0241] 黏多糖贮积症类型IIIA(MPS IIIA;Sanfilippo综合症类型A)是Sanfilippo综合症的最严重形式,并且影响世界范围内大约100,000个人中的一个。Sanfilippo综合症类型A(SanA)的特征在于乙酰肝素N-硫酸酯酶(HNS)的缺陷,一种参与粘多糖(GAG)硫酸乙酰肝素溶酶体代谢的exosulfatase(Neufeld EF,et al.The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease(2001)pp.3421-3452)。在缺乏所述酶的情况下,GAG硫酸乙酰肝素神经元和胶质细胞中累计,而在所述脑外累积减少。

[0242] 所述疾病定义的临床特征是中枢神经系统(CNS)衰退,其导致主要发育标志事件的损失或者未能实现。所述进行性的认知能力下降在痴呆和过早死亡中到达高潮。所述疾病通常地表现在幼童中,并且受影响的个体的寿命通常不超过十几岁晚期或二十岁初期。

[0243] 本发明的组合物和方法可以用于有效治疗患有或易患有Sanfilippo综合症类型A的个体。所述术语,“处理”或者“治疗,”如本文所使用的,是指所述疾病并发的一种或多种症状的转佳,预防或者延缓所述疾病一种或多种症状的发病或发展,和/或减轻所述疾病一种或多种症状的严重程度或者频率。

[0244] 在一些实施方案中,治疗是指:在SanA患者中,使神经学损伤的严重程度和/或者

发病率部分或者完全地缓解、转佳、减轻、抑制、延缓发生、降低。如本文所使用的,所述术语“神经学损伤”包括:与中枢神经系统(例如脑和脊髓)损伤并发的多种症状。神经学损伤的症状包括,例如,发育迟滞、进行性认知障碍、听力损失、言语发展障碍、运动技能缺陷、活动过度、攻击性和/或睡眠障碍等等。

[0245] 在一些实施方案中,治疗是指溶酶体储存(例如GAG)在多种组织中的降低。在一些实施方案中,治疗是指在脑靶组织、脊髓神经元、和/或外周靶组织中,溶酶体贮积的减少。在某些实施方案中,溶酶体贮积相对于对照,以大约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更多地减少。在一些实施方案中,溶酶体贮积相对于对照,以至少1-倍、2-倍、3-倍、4-倍、5-倍、6-倍、7-倍、8-倍、9-倍或10-倍地减少。在一些实施方案中,溶酶体贮积以溶酶体贮藏粒(例如斑马-条纹形态)的存在进行量度。

[0246] 在一些实施方案中,治疗是在神经元(例如含有浦肯野细胞的神经元)中液泡化的减少。在某些实施方案中,在神经元中的液泡化相对于对照,以大约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更多地减少。在一些实施方案中,液泡化相对于对照,以至少1-倍、2-倍、3-倍、4-倍、5-倍、6-倍、7-倍、8-倍、9-倍或者10-倍地减少。

[0247] 在一些实施方案中,治疗是指HNS酶活性在多种组织中增加。在一些实施方案中,治疗是指HNS酶活性在脑靶组织、脊髓神经元和/或外周靶组织中增加。在一些实施方案中,HNS酶活性与对照相比,以约5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,100%,200%,300%,400%,500%,600%,700%,800%,900%1000%或者更多地增加。在一些实施方案中,HNS酶活性与对照相比,以至少1-倍,2-倍,3-倍,4-倍,5-倍,6-倍,7-倍,8-倍,9-倍或者10-倍地增加。在一些实施方案中,增加的HNS酶活性为至少大约10nmol/hr/mg,20nmol/hr/mg,40nmol/hr/mg,50nmol/hr/mg,60nmol/hr/mg,70nmol/hr/mg,80nmol/hr/mg,90nmol/hr/mg,100nmol/hr/mg,150nmol/hr/mg,200nmol/hr/mg,250nmol/hr/mg,300nmol/hr/mg,350nmol/hr/mg,400nmol/hr/mg,450nmol/hr/mg,500nmol/hr/mg,550nmol/hr/mg,600nmol/hr/mg或者更多。在一些实施方案中,HNS酶活性在所述腰椎区域中增加。在一些实施方案中,增加的HNS酶活性在所述腰椎区域中,以至少大约2000nmol/hr/mg,3000nmol/hr/mg,4000nmol/hr/mg,5000nmol/hr/mg,6000nmol/hr/mg,7000nmol/hr/mg,8000nmol/hr/mg,9000nmol/hr/mg,10,000nmol/hr/mg或者更多地增加。

[0248] 在一些实施方案中,治疗是指认知能力丧失的进展减少。在某些实施方案中,认知能力丧失的进展相对于对照,以大约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或者更多地减少。在一些实施方案中,治疗是指发展迟缓的减少。在某些实施方案中,发育迟缓相对于对照,以大约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或者更多地减少。

[0249] 在一些实施方案中,治疗涉及增加的存活率(例如存活时间)。例如,治疗能导致患者预期寿命的增加。在一些实施方案中,根据本发明的治疗导致患者预期寿命增加,相对于患有类似疾病而没有治疗的一个或多个个体对照的平均预期寿命,以多于大约5%、大约

10%、大约15%、大约20%、大约25%、大约30%、大约35%、大约40%、大约45%、大约50%、大约55%、大约60%、大约65%、大约70%、大约75%、大约80%、大约85%、大约90%、大约95%、大约100%、大约105%、大约110%、大约115%、大约120%、大约125%、大约130%、大约135%、大约140%、大约145%、大约150%、大约155%、大约160%、大约165%、大约170%、大约175%、大约180%、大约185%、大约190%、大约195%、大约200%或更多地增加。在一些实施方案中,根据本发明的治疗导致患者预期寿命增加,相对于患有类似疾病而没有治疗的一个或多个个体对照的平均预期寿命,以多于大约6月、大约7月、大约8月、大约9月、大约10月、大约11月、大约12月、大约2月、大约3月、大约4月、大约5月、大约6月、大约7月、大约8月、大约9月、大约10年或者更多地增加。在一些实施方案中,根据本发明的治疗导致患者的长期存活。如本文使用的,所述术语“长期存活”是指存活时间或者预期寿命长于大约40年、45年、50年、55年、60年、或更长时间。

[0250] 所述术语“改善”、“增加”或“减少”如本文使用的,表示指示相对于对照的值。在一些实施方案中,合适的对照是基线测量,例如在启动本文描述的治疗之前的相同个体内的测量,或者在缺乏本文描述的治疗的对照个体(或多个对照个体)内的测量。“对照个体”是受Sanfilippo综合症类型A折磨的个体,并且其处于与正被治疗的个体相同的年龄和/或者性别(以确保被治疗的所述疾病的阶段和所述对照个体具有可比性)。

[0251] 正被治疗的所述个体(也称为“患者”或“受试者”)是这样的个体(胎儿、婴儿、儿童、青少年或成年人类):其患有Sanfilippo综合症类型A或者具有发展为Sanfilippo综合症类型A的潜力。所述个体具有残留的内源性HNS表达和/或活性、或者不可测量的活性。例如,患有Sanfilippo综合症类型A的所述个体可以具有的HNS表达水平,比正常HNS表达水平,低大约30-50%、低大约25-30%、低大约20-25%、低大约15-20%、低大约10-15%、低大约5-10%、低大约0.1-5%。

[0252] 在一些实施方案中,所述个体是最近被诊断患有所述疾病的个体。通常地,早期治疗(在诊断后尽可能早地开始治疗)对于使疾病的影响最小化以及使治疗的益处最大化是重要的。

[0253] 免疫耐受性

[0254] 通常,鞘内施用根据本发明的治疗试剂(例如替代酶)在所述受试者中不导致严重的不良反应。如本文使用的,严重的不良反应包括但不限于,基本免疫应答、毒性或者死亡。如本文使用的,所述术语“基本免疫应答”是指严重的免疫应答,例如适应性T-细胞免疫应答。

[0255] 因此,在许多实施方案中,根据本发明发明的方法不涉及并发免疫抑制疗法(例如在与所述方法平行进行的作为预处理/预调节使用的许多免疫抑制剂治疗)。在一些实施方案中,根据本发明发明的方法不包括在所述被治疗的受试者中的免疫耐受诱导。在一些实施方案中,根据本发明发明的方法不涉及使用T-细胞免疫抑制剂进行的预处理或预调节。

[0256] 在一些实施方案中,治疗试剂的鞘内施用可以发动针对这些试剂的免疫应答。因此,在一些实施方案中,它对于使得接受所述替代酶的所述受试者容忍所述酶替代疗法有用。免疫耐受性可以使用多种现有技术的方法诱导。例如,可以使用的方法:最初30-60天方案的T-细胞免疫抑制剂,例如环孢霉素A(CsA)和抗增殖剂(例如硫唑嘌呤(Aza)),并结合每周鞘内注射低剂量的预期替代酶。

[0257] 对本领域技术人员已知的任何免疫抑制剂疗法,可以与本发明的组合疗法一起采用。这种免疫抑制剂包括但不限于:环孢霉素、FK506、纳巴霉素、CTLA4-Ig、和抗TNF试剂(例如依那西普)(参见例如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;Potter 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)。所述抗IL2受体(.α.-亚单位)抗体赛尼哌(例如Zenapax.TM.),其被表明在移植患者中有效,也能作为免疫抑制剂使用(参见例如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)。其它免疫抑制剂包括但不限于:抗-CD2(Branco et al.,1999,Transplantation68,1588-1596;Przepiorka et al.,1998,Blood 92,4066-4071),抗-CD4(Marinova-Mutafchieva et al.,2000,Arthritis Rheum.43,638-644;Fishwild et al.,1999,Clin.Immunol.92,138-152),和抗-CD40配体(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)。

[0258] 施用

[0259] 本发明的方法考虑到:单一以及多个治疗有效量的本文所描述的所述治疗试剂(例如替代酶)的施用。治疗试剂(例如替代酶)可以根据所述受试者的病情(例如溶酶体贮积症)的特性、严重程度和范围,以有规律的间隔施用。在一些实施方案中,治疗有效量的本发明治疗试剂(例如替代酶)可以周期性地鞘内施用,以有规律的间隔(例如一年一次、6个月一次、每五个月一次、每三个月一次、两月一次(每两个月一次)、每月一次(每月一次)、两周一次(每两周一次)、每周一次)。

[0260] 在一些实施方案中,鞘内施用可以连同其它施用途径使用(例如静脉内的、皮下地、肌肉内的、肠胃外地、经皮肤地、或者经黏膜地(或者口服地或经鼻地))。在一些实施方案中,这些施用途径(例如静脉施用)执行的频率不多于两周一次、每月一次、每两个月一次、每三个月一次、每四个月一次、每五个月一次、每六个月一次、每年一次施用。

[0261] 如本文使用的,所述术语“治疗有效量”很大程度上,是基于在所述本发明药物组合物中的治疗试剂的总量决定的。通常的,治疗有效量对于所述受试者足够能实现有意义的好处(例如治疗、调整、治愈、阻止和/或改善所述潜在的疾病或病情)。例如,治疗有效量可以是足够实现预期治疗和/或预防性效果的量,并且这种量足够调节溶酶体受体或者他们的活性,从而治疗这种溶酶体贮积症或者其症状(例如在施用本发明组合物至受试者后,使“斑马小体”或者细胞液泡化的存在或者发生率减少或者消除。通常,治疗试剂(例如溶酶体酶)的量(施用至需要其的受试者)将根据所述受试者的特性变化。这种特性包括:所述受试者的病情、疾病严重程度、健康状况、年龄、性别和体重。一个本领域技术人员将根据这些和其它相关因素,容易地决定合适的剂量。另外,客观的和主观的分析都可以任选地采用,

以识别最优剂量范围。

[0262] 治疗有效量通常施用的剂量方案,包括多个单位剂量。对特定的治疗性蛋白质,治疗有效量(和/或在有效给药方案内的合适的单位剂量)可能会变化,例如根据结合其它药物试剂的施用途径。而且,对于特定患者的特定治疗有效量(和/或单位剂量)可以根据多种因素改变,包括正被治疗的疾病和所述疾病的严重程度、所采用的特定药物试剂的活性;所采用的特定组合物;所述受试者的年龄、体重、健康状况、性别和饮食;所采用的特定融合蛋白的施用时间、施用途径和/或排泄率或代谢率;所述治疗的持续时间;以及在医药领域已知的类似因素。

[0263] 在一些实施方案中,所述治疗有效剂量的范围:从大约0.005mg/kg脑重量至500mg/kg脑重量,例如,从大约0.005mg/kg脑重量至400mg/kg脑重量,从大约0.005mg/kg脑重量至300mg/kg脑重量,从大约0.005mg/kg脑重量至200mg/kg脑重量,从大约0.005mg/kg脑重量至100mg/kg脑重量,从大约0.005mg/kg脑重量至90mg/kg脑重量,从大约0.005mg/kg脑重量至80mg/kg脑重量,从大约0.005mg/kg脑重量至70mg/kg脑重量,从大约0.005mg/kg脑重量至60mg/kg脑重量,从大约0.005mg/kg脑重量至50mg/kg脑重量,从大约0.005mg/kg脑重量至40mg/kg脑重量,从大约0.005mg/kg脑重量至30mg/kg脑重量,从大约0.005mg/kg脑重量至25mg/kg脑重量,从大约0.005mg/kg脑重量至20mg/kg脑重量,从大约0.005mg/kg脑重量至15mg/kg脑重量,从大约0.005mg/kg脑重量至10mg/kg脑重量。

[0264] 在一些实施方案中,所述治疗有效剂量是:大于约0.1mg/kg脑重量,大于约0.5mg/kg脑重量,大于约1.0mg/kg脑重量,大于约3mg/kg脑重量,大于约5mg/kg脑重量,大于约10mg/kg脑重量,大于约15mg/kg脑重量,大于约20mg/kg脑重量,大于约30mg/kg脑重量,大于约40mg/kg脑重量,大于约50mg/kg脑重量,大于约60mg/kg脑重量,大于约70mg/kg脑重量,大于约80mg/kg脑重量,大于约90mg/kg脑重量,大于约100mg/kg脑重量,大于约150mg/kg脑重量,大于约200mg/kg脑重量,大于约250mg/kg脑重量,大于约300mg/kg脑重量,大于约350mg/kg脑重量,大于约400mg/kg脑重量,大于约450mg/kg脑重量,大于约500mg/kg脑重量。

[0265] 在一些实施方案中,所述治疗有效剂量也可以通过mg/kg体重定义。作为本领域技术人员,将理解:所述脑重量和体重是相关的。Dekaban AS. “Changes in brain weights during the span of human life:relation of brain weights to body heights and bodyweights,” Ann Neurol 1978;4:345-56。因此,在一些实施方案中,所述剂量可以根据在表5中所示的进行转化。

[0266] 表5

[0267] 在雄性的脑重量、体重和年龄之间的相关性

年龄 (年)	脑重量 (kg)	体重 (kg)
[0268] 3 (31-43个月)	1.27	15.55
[0269] 4-5	1.30	19.46

[0270] 在一些实施方案中,所述治疗有效剂量可以通过mg/15cc的CSF定义。作为本领域技术人员,将理解:根据脑重量和体重,将治疗有效量转化成mg/15cc的CSF。例如,在成年人人类中的CSF的体积为约150mL(Johanson CE,et al. “Multiplicity of cerebrospinal

fluid functions:New challenges in health and disease,”cerebrospinal fluid Res.2008May 14;5:10)。因此,单剂量注射0.1mg至50mg蛋白质至成年人,在成年人中将会是约0.01mg/15cc的CSF(0.1mg)至5.0mg/15cc的CSF(50mg)剂量。

[0271] 进一步可以理解,对于任意特定的受试者,随着时间的过去,根据所述个体需要和施用并监督(所述酶替代治疗的施用)的人员的专业判断,应该调整特定剂量方案,并且本文提出的给药范围仅仅是示例性的,并不打算限制本发明要求的范围或实践。

[0272] 试剂盒

[0273] 本发明进一步提供了试剂盒或者含有本发明所述制剂的其它制品,并提供了其再生(如果冻干)和/或使用的指导。试剂盒或其它制造业制品可以包括容器、IDDD、导管和其它对于鞘内施用和相关手术有用的制品、设备或装置。合适的容器包括,例如瓶子、小药瓶、注射器(例如预填充的注射器)、安瓿、药筒、贮液囊、或(装有冻干粉和稀释剂的)二室注射器给药系统(lyo-ject)。所述容器可以用多种材料(例如玻璃或者塑料)形成。在一些实施方案中,容器是预填充的注射器。合适的预填充的注射器包括,但不限于,具有烘干的硅树脂涂层的硼硅酸盐玻璃注射器、喷涂硅树脂的硼硅酸盐、或者无硅树脂的塑料树脂注射器。

[0274] 通常地,所述容器可以容纳制剂,并在其上具有标签,或者与之相关地,所述容器可以指示再生和/或施用的指导。例如,所述标签可以指示:再生所述制剂至上文所描述的蛋白质浓度。所述标签可以进一步指示:所述制剂是有用的,或者打算用于(例如)IT施用。在一些实施方案中,容器可以含有单剂量的稳定制剂,所述制剂含有治疗试剂(例如替代酶)。在多种实施方案中,单剂量的所述稳定的制剂以小于大约15ml、10ml、5.0ml、4.0ml、3.5ml、3.0ml、2.5ml、2.0ml、1.5ml、1.0ml、或者0.5ml的体积存在。可选择地,持有所述制剂的容器可以是多用途的小药瓶,其允许重复施用(例如2-6次施用)所述制剂。试剂盒或者制品可以进一步包括第二容器,所述第二容器包括合适的稀释剂(例如BWF1、生理盐水、缓冲的生理盐水)。在将所述稀释剂和所述制剂混合后,在所述再生的制剂中的所述最终蛋白质浓度通常可以是:至少1mg/ml(例如至少5mg/ml、至少10mg/ml、至少25mg/ml、至少50mg/ml、至少75mg/ml、至少100mg/ml)。试剂盒或者制品可以进一步包括其它(从商业和用户的角度看)理想的材料,其包括其它缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头、IDDD、导管、注射器和具有使用指南的包装说明书。

[0275] 通过参考以下的实施例,本发明将更充分地被理解。但是这些用于解释的实施例不限制本发明的范围。所有文献引用通过参考的方式并入本文。

实施例

[0276] 实施例1:HNS制剂

[0277] 设计本实施例中的所述实验,作为所述预制剂研究的部分,以检测乙酰肝素-N-硫酸酯酶(HNS)在多种制剂条件中的稳定性,包括用来鞘内递送的pH、离子强度和缓冲剂类型。

[0278] 通常HNS以其天然态的二聚体被发现(Bielicki et al.,Journal of Biochemistry,1998,329,145-150)。所述HNS二聚体的分子重量为115kDa。HNS通常地作为二聚体,在体积排阻色谱分析(SEC)期间洗提。当在SDS-PAGE凝胶上运行时,HNS以二聚体出现,除非在加载到所述凝胶上之前将所述样品加热到100℃(在这种情况下,它以单体(62kDa)

存在)。HNS的全长和成熟序列在表6和表7中分别示出。所述成熟的HNS序列含有5个半胱氨酸残基(下划线的),其考虑了两个内部的二硫键和一个自由的半胱氨酸。

[0279] 表6:HNS全长序列

[0280]

```
MSCPVPACCA  LLLVLGLCRA  RPRNALLLLA  DDGGFESGAY  NNSAIATPHL  DALARRSLLF
RNAFTSVSSC  SPSRASLLTG  LPQHONGMYG  LHQDVHHFNS  FDKVRSPLLL  LSQAGVRTGI
IGKKHVGPEP  VYPFDFAYTE  ENGSVLQVGR  NITRIKLLVR  KFLQTQDDRP  FFLYVAFHDP
HRCGHSGQPQY  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 (SEQ ID NO:2)
```

[0281] 表7:成熟HNS序列(rhHNS)

[0282]

```
RPRNALLLLA  DDGGFESGAY  NNSAIATPHL  DALARRSLLF  RNAFTSVSSC  SPSRASLLTG
LPQHONGMYG  LHQDVHHFNS  FDKVRSPLLL  LSQAGVRTGI  IGKKHVGPEP  VYPFDFAYTE
ENGSVLQVGR  NITRIKLLVR  KFLQTQDDRP  FFLYVAFHDP  HRCGHSGQPQY  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 (SEQ ID NO:1)
```

[0283] 在这个实施例中,检测了下述的制剂参数:(1)柠檬酸盐制剂(pH 3-8)和磷酸盐制剂(pH 5-8)中的pH;(2)缓冲剂:柠檬酸钠缓冲剂(pH 3.0-8.0)和磷酸钠缓冲剂(pH 5.0-8.0),所有为20mM浓度;以及(3)离子强度:NaCl(0-300mM)。

[0284] 在这个实施例描述的所有预制剂研究,以1-2mg/mL低蛋白质浓度进行。

[0285] 为了分析制剂产品在多种胁迫条件下形成的降解产品,使用了SEC-HPLC、SDS-PAGE、差异扫描热量法(DSC)、浊度(OD 320)和酶活性分析。

[0286] 通常,SDS-PAGE结果显示了所述制剂在低pH(pH 3)下的破碎,而较高pH制剂显示了极少的破碎。通过DSC的评估,像是含有柠檬酸盐和磷酸盐的rhHNS制剂在6-7的pH范围具有最高的热稳定性。酶活性结果显示了:被评估的含有柠檬酸盐rhHNS制剂(在所有pH值下),在50℃储存7天之后,变得无活性。含有磷酸盐的rhHNS制剂(pH6-7),在50℃储存7天之仍保留活性。尽管如此,高分子质量峰(由SEC可见的16分钟峰)是最高程度的,pH7-8,但是这个峰没有在该所述相同制剂的单独制备中观察到的。

[0287] 评估了离子强度(0-300mM NaCl)对rhHNS制剂稳定性的影响。储存在加速稳定性条件下(50℃,7天)的样品没有显示比所述内部对照批件更大的破碎。无论如何,含有柠檬酸盐的rhHNS制剂在50℃,7天后,显示活性完全丧失。含有磷酸盐的rhHNS制剂在50-300mM NaCl中,仍保留显著的活性。尽管如此,在所述50-150mM NaCl范围中,所述16分钟峰(通过SEC)是最大程度的。

[0288] 方法

[0289] pH对于rhHNS稳定性的影响

[0290] 使用透析法(Piece Slide-A-Lyzer, PN#66383, lot#HK107537),将rhHNS(9.2mg/ml,在10mM磷酸钠中,138mM氯化钠,pH 7.0)缓冲液-替换成20mM柠檬酸钠(pH值范围3.0至8.0),以及20mM磷酸钠(pH值范围6.0至8.0)。在每种替换的缓冲剂中的最终蛋白质浓度目标至2.0mg/mL。这些溶液被等分为0.5mL,每份进入2.0ml玻璃小药瓶(West Pharmaceuticals, Cat#:6800-0314, lot#:30809A2001),并且然后在50℃、25℃和2-8℃室内孵育。在7、14和28天,拉出样品进行聚集(SEC-HPLC)、破碎(SDS-PAGE)、浊度(OD320)和酶活性分析。

[0291] 在上文相同的程序后,后续的pH研究在磷酸盐缓冲剂中重复,但是使用rhHNS lot#SS10。初始磷酸盐研究的pH范围是狭窄的,因此重复所述研究以合并较宽的pH范围。

[0292] OD320

[0293] 通过执行OD320测量,测定rhHNS样品的浊度。在所述Molecular Devices SpectraMax Plus 384酶标仪中,在0.2cm光程长比色皿中,测量所述样品。对每个测试使用的总体积为30μl。

[0294] SEC-HPLC

[0295] 对于rhHNS的SEC-HPLC分析,使用Superdex柱200(10/300GL, PN:17-5175-01, GE Healthcare)。所述流动相为磷酸盐缓冲剂的生理盐水(25mM磷酸钠,150mM氯化钠,pH 6),其运行的流速为0.5ml/min。所述注射体积为30μl的1mg/ml(diluted from 2mg/ml in respective缓冲剂)。每次注射的运行时间为50分钟,并且检测波长为214nm。

[0296] SDS-PAGE

[0297] 这种方法评估了rhHNS在还原和变性条件下的破碎和聚集。将rhHNS样品与SDS缓冲剂混合(终浓度=0.5mg/ml),并且添加DTT(仅对还原的样品)。样品加热至100℃,5分钟。煮沸样品,为期大于5分钟,导致rhHNS破碎。每个泳道加载10μg的rhHNS样品,在8-16%梯度丙烯酰胺凝胶(Cat#:EC6045BOX)上。所述凝胶在150V运行,并且然后过夜孵育(伴随震动),Gel Code Blue Coomassie染色。在扫描之前,用水使所述凝胶褪色1小时。

[0298] 活性分析

[0299] 所述rhHNS的活性分析是两步骤反应。在所述第一反应中,乙酰肝素-N-硫酸酯酶脱硫。进一步的水解发生在第二反应中,并添加α-葡萄糖苷酶,其释放4-MU,然后可以被测量。rhHNS以1:210稀释,以得10μg/ml的最终分析浓度。对于所述磷酸盐缓冲剂pH研究,修改所述分析,并且将rhHNS以1:24稀释,得~100μg/mL的最终分析浓度。

[0300] DSC

[0301] 在微热量计仪器(MicroCal VP-DSC)上,进行差异扫描热量法(DSC)测量。测试的rhHNS样品为0.5mg/ml。将所述温度平衡到10℃,然后以1°每分钟升温至100℃。

[0302] 离子强度对于HNS稳定性的影响

[0303] 使用透析法(Piece Slide-A-Lyzer, lot#HK107537),将rhHNS缓冲液-替换成20mM柠檬酸盐缓冲剂(pH 6.0,氯化钠范围0-300mM),以及20mM磷酸盐缓冲剂(pH 7.0,氯化钠范围0-300mM)。在每种替换的缓冲剂中的最终蛋白质浓度目标至2.0mg/mL。这些溶液被等分为0.5mL,每份进入2.0ml玻璃小药瓶(West Pharmaceuticals, Cat#:6800-0314, lot#:

30809A2001),并且然后在50℃、25℃和2-8℃室内孵育。在7、14和28天,拉出样品进行聚集(SEC-HPLC)、破碎(SDS-PAGE)、浊度(OD320)和酶活性分析。

[0304] 结果

[0305] pH对HNS稳定性的影响

[0306] OD320和外观

[0307] 测量浊度的OD 320值结果在表8中示出。在rhHNS制剂的加速稳定性条件下的浊度没有显著的变化,所述rhHNS制剂含有磷酸盐(pH7)或者柠檬酸盐(pH3-6)。但是,所述样品,pH8.0(磷酸盐和柠檬酸盐制剂)、以及柠檬酸盐(pH7.0),在50℃ 7天后,显示浊度增加。在灯箱(M.W.Technologies,INC,Model#:MIH-DX)下进行外观检查,并且所有的制剂看起来为清晰的、无色的、并且不含可见微粒状物质。

[0308] 表8.pH研究的OD320概述

[0309]

储藏条件	制剂	OD 320
ILC	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 3.0	0.005
50°C 7 天	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 3.0	0.006
25°C 14 天	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 3.0	0.007
5°C 28 天	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 3.0	0.003
ILC	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 4.0	0.002
50°C 7 天	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 4.0	0.006
25°C 14 天	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 4.0	0.009
5°C 28 天	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 4.0	0.000
ILC	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 5.0	0.002
50°C 7 天	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 5.0	0.004
25°C 14 天	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 5.0	0.004
5°C 28 天	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 5.0	0.004
ILC	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 6.0	0.000
50°C 7 天	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 6.0	0.002
25°C 14 天	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 6.0	0.001
5°C 28 天	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 6.0	0.000
ILC	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 7.0	0.001
50°C 7 天	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 7.0	0.017
25°C 14 天	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 7.0	0.002

[0310]

5°C 28 天	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 7.0	-0.001
ILC	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 8.0	0.000
50°C 7 天	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 8.0	0.018
25°C 14 天	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 8.0	0.002
5°C 28 天	2mg/ml HNS 20mM 柠檬酸盐, pH 8.0	-0.001
ILC	2mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 7.0	0.000
50°C 7 天	2mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 7.0	0.005
25°C 14 天	2mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 7.0	0.000
5°C 28 天	2mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 7.0	0.001
ILC	2mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 8.0	0.002
50°C 7 天	2mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 8.0	0.023
25°C 14 天	2mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 8.0	0.002
5°C 28 天	2mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 8.0	0.001

[0311] SEC-HPLC

[0312] 在图1A-1C中,显示了rhHNS的SEC洗脱图的代表性色彩层析谱。所述基线样品主要含有三个峰,其分别具有保留时间~22min、~26min和~32min。偶然地,其也具有~34min的峰。所述峰在~26min,通过SEC-LS被证实为二聚体。其他峰的性质是未知的。

[0313] 所述第一pH研究的SEC数据在下面表9中总结。总之,所有的所述制剂在所述胁迫条件(50°C)下、以及加速(25°C)和实时(2-8°C)条件下,基本地具有极小的变化。但是,在50°C、7天之后,rhHNS制剂含有柠檬酸盐或者磷酸盐(pH6-8)形成具有16min峰保留时间的高分子质量。在所述含有磷酸盐(pH 7.0)的rhHNS制剂中,所述16min峰占据总区域的2%。但是,在所述离子强度研究中制备的所述相同制剂只含有约0.1%。

[0314] 表9. 来自pH研究的SEC-HPLC数据总结

[0315]

储藏条件	制剂说明	% 16 Min 峰	% 二聚体
ILC	20 mM 柠檬酸盐 pH 3.0	0	99.8
7 天 50°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 3.0	0	99.9
14 天 25°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 3.0	0	99.7
1mo 5°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 3.0	0	99.7
ILC	20 mM 柠檬酸盐 pII 4.0	0	99.8
7 天 50°C	20 mM 柠檬酸盐 pII 4.0	0	99.8
14 天 25°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 4.0	0	99.6

[0316]

1mo 5°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 4.0	0	99.5
ILC	20 mM 柠檬酸盐 pH 5.0	0	99.8
7 天 50°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 5.0	0	99.8
14 天 25°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 5.0	0	99.6
1mo 5°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 5.0	0	99.5
ILC	20 mM 柠檬酸盐 pH 6.0	0	99.8
7 天 50°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 6.0	0.3	99.0
14 天 25°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 6.0	0	99.6
1mo 5°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 6.0	0	99.3
ILC	20 mM 柠檬酸盐 pH 7.0	0	99.8
7 天 50°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 7.0	0.9	98.6
14 天 25°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 7.0	0	99.6
1mo 5°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 7.0	0	99.2
ILC	20 mM 柠檬酸盐 pH 8.0	0	99.8
7 天 50°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 8.0	0.5	98.7
14 天 25°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 8.0	0	99.6
1mo 5°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 8.0	0	99.4
ILC	20 mM 磷酸盐 pH 7.0	0	99.8
7 天 50°C	20 mM 磷酸盐 pH 7.0	2.0	97.2
14 天 25°C	20 mM 磷酸盐 pH 7.0	0	99.6
1mo 5°C	20 mM 磷酸盐 pH 7.0	0	99.5
ILC	20 mM 磷酸盐 pH 8.0	0	99.8
7 天 50°C	20 mM 磷酸盐 pH 8.0	1.0	98.8
14 天 25°C	20 mM 磷酸盐 pH 8.0	0	99.7
1mo 5°C	20 mM 磷酸盐 pH 8.0	0	99.4

[0317] 为了验证这个现象,在较宽的pH范围内,重复在磷酸盐缓冲剂中的所述pH研究,并且在表10中总结所述SEC数据。在这个研究中,在所述pH 5缓冲剂中,所述16分钟峰在50°C, 7天以后不存在;但是的确存在于pH 6-8的制剂中,并且随着pH增加而增加。添加聚山梨醇酯20(0.05%),没有显著影响所述16分钟峰的大小。有趣的是,尽管所述pH 5制剂在所述稳定性样品中不含有这个峰,在从生理盐水溶液透析制备pH 5的过程中,显著量的rhHNS沉淀。

[0318] 表10. 来自重复磷酸盐缓冲剂pH研究的SEC-HPLC数据总结

[0319]

储藏条件	制剂说明	% 16 min 峰	% 二聚体
------	------	------------	-------

[0320]

5°C 7 天	2 mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 5.0	0.0	98.4
50°C 7 天	2 mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 5.0	0.0	99.3
5°C 7 天	2 mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 6.0	0.0	99.0
50°C 7 天	2 mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 6.0	0.2	99.1
5°C 7 天	2 mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 7.0	0.0	98.8
50°C 7 天	2 mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 7.0	0.6	98.8
5°C 7 天	2 mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 7.0, 0.05% 聚山梨醇酯 20	0.0	98.9
50°C 7 天	2 mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 7.0, 0.05% 聚山梨醇酯 20	0.8	98.0
5°C 7 天	2 mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 8.0	0.0	99.1
50°C 7 天	2 mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 8.0	1.6	97.6

[0321] 初步鉴定结果证实:16分钟峰对蛋白质具有光谱指示,当成比例时,随着rhHNS二聚体峰,光谱良好地叠加(图1D).当通过SEC-LS检查时,所述16分钟峰表现明显的分子重叠>1Mda。需要进一步的特征鉴定,以理解这种峰的性质。

[0322] 酶活性

[0323] 来自所述第一pH研究的活性数据总结在下面表5中示出。在50°C,7天的加速稳定性条件下,在所有含有制剂的柠檬酸盐中(pH 3-8)的rhHNS丧失了大部分的酶活性,而所述含有磷酸盐的rhHNS制剂(pH 7-8)仍保留活性。在25°C和5°C,所有的rhHNS制剂(包括柠檬酸盐和磷酸盐缓冲剂)保留大部分的活性。含有柠檬酸盐的rhHNS制剂(pH 3.0)似乎有较低的总活性值。来自重复的所述活性数据,在磷酸盐中的pH研究,在表11和12中总结。所有的rhHNS制剂(在pH 5-7中)在50°C,7天后保留84-100%的酶活性;除了所述rhHNS制剂(pH8.0)丧失了65%的活性。

[0324] 表11.来自所述第一pH研究的活性总结

[0325]

储藏条件	制剂说明	活性 nmol/mg/hr
ILC	20 mM 柠檬酸盐 pH 3.0	639
7 天 50°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 3.0	29
14 天 25°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 3.0	920
1mo. 5°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 3.0	794
ILC	20 mM 柠檬酸盐 pH 4.0	2178
7 天 50°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 4.0	43
14 天 25°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 4.0	1998
1mo. 5°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 4.0	2123
ILC	20 mM 柠檬酸盐 pH 5.0	1901
7 天 50°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 5.0	72
14 天 25°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 5.0	1779
1mo. 5°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 5.0	2194
ILC	20 mM 柠檬酸盐 pH 6.0	2316
7 天 50°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 6.0	80
14 天 25°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 6.0	2026
1mo. 5°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 6.0	2122
ILC	20 mM 柠檬酸盐 pH 7.0	2312
7 天 50°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 7.0	115
14 天 25°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 7.0	2009
1mo. 5°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 7.0	2205
ILC	20 mM 柠檬酸盐 pH 8.0	2221
7 天 50°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 8.0	44
14 天 25°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 8.0	2071
1mo. 5°C	20 mM 柠檬酸盐 pH 8.0	2505
ILC	20 mM 磷酸盐 pH 7.0	640
7 天 50°C	20 mM 磷酸盐 pH 7.0	1200
14 天 25°C	20 mM 磷酸盐 pH 7.0	1749
1mo. 5°C	20 mM 磷酸盐 pH 7.0	1391
ILC	20 mM 磷酸盐 pH 8.0	1451
7 天 50°C	20 mM 磷酸盐 pH 8.0	1125
14 天 25°C	20 mM 磷酸盐 pH 8.0	1620
1mo. 5°C	20 mM 磷酸盐 pH 8.0	1492

[0326] 表12. 来自所述重复的pH研究的活性总结

[0327] 来自pH研究的HNS制剂的SDS-PAGE凝胶

[0328] 示例性的SDS-PAGE凝胶在图2和图3中示出。来自所述pH研究的还原凝胶在图2中示出,并且在含有柠檬酸盐的所述制剂(pH3)中显示有破碎的带。pH 4-8的所有其它制剂是相似的,并且只显示~60kDa的主要(单体)带,除了pH 8.0柠檬酸盐缓冲剂中在40°C 7天后显示一些高

[0329]

储藏条件	制剂说明	活性 nmol/mg/hr
°C 7 天	2 mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 5.0	4201
50°C 7 天	2 mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 5.0	3952
5°C 7 天	2 mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 6.0	3923
50°C 7 天	2 mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 6.0	4131
5°C 7 天	2 mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 7.0	4107
50°C 7 天	2 mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 7.0	3841
5°C 7 天	2 mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 7.0, 0.05% 聚山梨醇酯 20	4952
50°C 7 天	2 mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 7.0, 0.05% 聚山梨醇酯 20	4173
5°C 7 天	2 mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 8.0	4729
50°C 7 天	2 mg/ml HNS 20mM 磷酸盐, pH 8.0	1590

[0330] MW聚集体。图3显示了来自所述pH研究的非还原凝胶。所述破碎可以在含有柠檬酸(pH 3)的rhHNS制剂见到。

[0331] 基于这些结果,这是明显的:所述rhHNS天然二聚体主要是非共价键,因为还原剂的存在或缺乏不影响所述主要键的位置。但是,微弱的125kDa二聚体带主要存在于非还原样品中,这暗示:这个带是与非天然二聚体共价结合的。所述非天然二聚体带在所述ILC和25°C样品中比在所述40°C样品中更加显著。

[0332] 来自pH研究DSC数据

[0333] 图4显示,由DSC所测定,柠檬酸盐的pH依赖热稳定性。在柠檬酸盐中rhHNS的最高熔点为90°C, pH6.0。含有磷酸盐的rhHNS制剂显示最高的热稳定性, pH6-7。在每个被检测pH, rhHNS的熔点超过70°C。离子强度对于rhHNS稳定性的影响

[0334] 浊度和外观

[0335] OD320值的总结在下面表13中示出。所述样品随时间过去没有观察到显著的浊度变化,并且所述数值没有温度依赖性的变化。所述样品的外观在每个时间点保持不变。所有的样品看起来清洗、无色并且没有可见的微粒状物质。

[0336] 表13. 离子影响的OD320

[0337]

样品	制剂	OD 320
ILC	10 mM 柠檬酸盐 pH 6.0	0.001
50°C 7 天	10 mM 柠檬酸盐 pH 6.0	0.006
25°C 14 天	10 mM 柠檬酸盐 pH 6.0	0.005
5°C 28 天	10 mM 柠檬酸盐 pH 6.0	0.003
ILC	10 mM 柠檬酸盐 pH 6.0 100 mM NaCl	0.002
50°C 7 天	10 mM 柠檬酸盐 pH 6.0 100 mM NaCl	0.009
25°C 14 天	10 mM 柠檬酸盐 pH 6.0 100 mM NaCl	0.004
5°C 28 天	10 mM 柠檬酸盐 pH 6.0 100 mM NaCl	0.001
ILC	10 mM 柠檬酸盐 pH 6.0 150mM NaCl	0.001
50°C 7 天	10 mM 柠檬酸盐 pH 6.0 150mM NaCl	0.007
25°C 14 天	10 mM 柠檬酸盐 pH 6.0 150mM NaCl	0.003
5°C 28 天	10 mM 柠檬酸盐 pH 6.0 150mM NaCl	0.001
ILC	10 mM 柠檬酸盐 pH 6.0 300mM NaCl	0.001
50°C 7 天	10 mM 柠檬酸盐 pH 6.0 300mM NaCl	0.006
25°C 14 天	10 mM 柠檬酸盐 pH 6.0 300mM NaCl	0.006
5°C 28 天	10 mM 柠檬酸盐 pH 6.0 300mM NaCl	0.003
ILC	10 mM 磷酸盐 pH 7.0	0.002
50°C 7 天	10 mM 磷酸盐 pH 7.0	0.009
25°C 14 天	10 mM 磷酸盐 pH 7.0	0.005
5°C 28 天	10 mM 磷酸盐 pH 7.0	0.002
ILC	10 mM 磷酸盐 pH 7.0 50mM NaCl	0.001
50°C 7 天	10 mM 磷酸盐 pH 7.0 50mM NaCl	0.009
25°C 14 天	10 mM 磷酸盐 pH 7.0 50mM NaCl	0.003
5°C 28 天	10 mM 磷酸盐 pH 7.0 50mM NaCl	0.002
ILC	10 mM 磷酸盐 pH 7.0 100mM NaCl	0.002
50°C 7 天	10 mM 磷酸盐 pH 7.0 100mM NaCl	0.009
25°C 14 天	10 mM 磷酸盐 pH 7.0 100mM NaCl	0.004
5°C 28 天	10 mM 磷酸盐 pH 7.0 100mM NaCl	0.002
ILC	10 mM 磷酸盐 pH 7.0 150mM NaCl	0.002

[0338]

50°C 7 天	10 mM 磷酸盐 pH 7.0 150mM NaCl	0.004
25°C 14 天	10 mM 磷酸盐 pH 7.0 150mM NaCl	0.002
5°C 28 天	10 mM 磷酸盐 pH 7.0 150mM NaCl	0.001
ILC	10 mM 磷酸盐 pH 7.0 300mM NaCl	0.002
50°C 7 天	10 mM 磷酸盐 pH 7.0 300mM NaCl	0.010
25°C 14 天	10 mM 磷酸盐 pH 7.0 300mM NaCl	0.005
5°C 28 天	10 mM 磷酸盐 pH 7.0 300mM NaCl	0.003

[0339] SEC-HPLC

[0340] 表14显示了来自所述离子效应研究的SEC-HPLC数据总结。在50℃7天后,所有所述制剂具有极少的变化,除了所述16分钟峰。在所述柠檬酸盐缓冲剂中,所述16min峰区域百分比在0.1和0.3%之间,伴随NaCl水平(变化)没有特别的增加或减少趋势。但是在磷酸盐缓冲剂中,16min峰百分比增加至~0.5%,对应于离子强度范围从50至150mM。在较低和较高的离子强度,所述16分钟峰下降至~0.1%。

[0341] 表14. 离子强度效应的SEC-HPLC数据总结

[0342]

储藏条件	制剂说明	%16 Min 峰	% 二聚体
ILC	柠檬酸盐 pH 6.0	0	99.3
7 天 50°C	柠檬酸盐 pH 6.0	0.24	99.2
14 天 25°C	柠檬酸盐 pH 6.0	0	99.4
1mo. 5°C	柠檬酸盐 pH 6.0	0	99.5
ILC	柠檬酸盐 pH 6.0 100mM NaCl	0	99.3
7 天 50°C	柠檬酸盐 pH 6.0 100mM NaCl	0.10	99.3
14 天 25°C	柠檬酸盐 pH 6.0 100mM NaCl	0	99.1
1mo. 5°C	柠檬酸盐 pH 6.0 100mM NaCl	0	99.4
ILC	柠檬酸盐 pH 6.0 150mM NaCl	0	99.8
7 天 50°C	柠檬酸盐 pH 6.0 150mM NaCl	0.22	99.5
14 天 25°C	柠檬酸盐 pH 6.0 150mM NaCl	0	99.2
1mo. 5°C	柠檬酸盐 pH 6.0 150mM NaCl	0	99.5
ILC	柠檬酸盐 pH 6.0 300 mM NaCl	0	99.5
7 天 50°C	柠檬酸盐 pH 6.0 300 mM NaCl	0.04	99.6
14 天 25°C	柠檬酸盐 pH 6.0 300 mM NaCl	0	99.4
1mo. 5°C	柠檬酸盐 pH 6.0 300 mM NaCl	0	99.3
ILC	磷酸盐 pH 7.0	0	99.3
7 天 50°C	磷酸盐 pH 7.0	0.11	99.1
14 天 25°C	磷酸盐 pH 7.0	0	99.2
1mo. 5°C	磷酸盐 pH 7.0	0	99.4

[0343]

ILC	磷酸盐 pH 7.0 50mM NaCl	0	99.4
7 天 50°C	磷酸盐 pH 7.0 50mM NaCl	0.57	98.9
14 天 25°C	磷酸盐 pH 7.0 50mM NaCl	0	99.3
1mo. 5°C	磷酸盐 pH 7.0 50mM NaCl	0	99.5
ILC	磷酸盐 pH 7.0 100mM NaCl	0	99.3
7 天 50°C	磷酸盐 pH 7.0 100mM NaCl	0.53	98.9
14 天 25°C	磷酸盐 pH 7.0 100mM NaCl	0	99.2
1mo. 5°C	磷酸盐 pH 7.0 100mM NaCl	0	99.3
ILC	磷酸盐 pH 7.0 150mM NaCl	0	99.4
7 天 50°C	磷酸盐 pH 7.0 150mM NaCl	0.52	98.9
14 天 25°C	磷酸盐 pH 7.0 150mM NaCl	0	99.2
1mo. 5°C	磷酸盐 pH 7.0 150mM NaCl	0	99.4
ILC	磷酸盐 pH 7.0 300mM NaCl	0	99.4
7 天 50°C	磷酸盐 pH 7.0 300mM NaCl	0.06	99.3
14 天 25°C	磷酸盐 pH 7.0 300mM NaCl	0	99.3
1mo. 5°C	磷酸盐 pH 7.0 300mM NaCl	0	99.1

[0344] 酶活性

[0345] 表15示出了离子对于rhHNS稳定性影响的活性数据总结(在50°C,7天加速条件下的活性数据总结)。无论在加速条件下的离子强度如何,含有柠檬酸盐的rhHNS制剂仅保留8-30%的活性。在加速条件下,含有磷酸盐(并具有0-300mM NaCl)的rhHNS制剂都显示较高的总活性,保留45-70%。

[0346] 表15. 离子强度效应研究的活性总结

[0347]

储藏条件	制剂说明	活性 nmol/mg/hr
ILC	柠檬酸盐 pH 6.0	1725
7 天 50°C	柠檬酸盐 pH 6.0	144
ILC	柠檬酸盐 pH 6.0 100mM NaCl	1715
7 天 50°C	柠檬酸盐 pH 6.0 100mM NaCl	303
ILC	柠檬酸盐 pH 6.0 150mM NaCl	1475
7 天 50°C	柠檬酸盐 pH 6.0 150mM NaCl	250
ILC	柠檬酸盐 pH 6.0 300 mM NaCl	2059
7 天 50°C	柠檬酸盐 pH 6.0 300 mM NaCl	619
ILC	磷酸盐 pH 7.0	1661
7 天 50°C	磷酸盐 pH 7.0	766

[0348]

ILC	磷酸盐 pH 7.0 50mM NaCl	1441
7 天 50°C	磷酸盐 pH 7.0 50mM NaCl	784
ILC	磷酸盐 pH 7.0 100mM NaCl	1290
7 天 50°C	磷酸盐 pH 7.0 100mM NaCl	875
ILC	磷酸盐 pH 7.0 150mM NaCl	1297
7 天 50°C	磷酸盐 pH 7.0 150mM NaCl	839
ILC	磷酸盐 pH 7.0 300mM NaCl	1338
7 天 50°C	磷酸盐 pH 7.0 300mM NaCl	693

[0349] SDS-PAGE

[0350] 图6显示来自离子效应研究,在50°C、7天后rhHNS制剂的银染SDS-PAGE凝胶。这些凝胶使用煮沸10分钟的样品运行,因此在所述凝胶上可见到的破碎可能归因于10分钟煮沸,因为在后续的研究中,当rhHNS煮沸5分钟时没有观察到破碎。

[0351] 柠檬酸盐制剂(具有0-300mM NaCl)和磷酸盐制剂(具有0-300mM NaCl)都显示主要的单体带,在60kDa。所述内部批件对照(储藏在-80°C)的rhHNS制剂看起来显示更加显著的碎片带(与在50°C、7天后存放的样品比较)。总之,所述离子强度不影响在SDS凝胶上的带模式。

[0352] 结论

[0353] 来自所述研究的结果表明了,所述制剂筛选的主要稳定性指示分析是酶活性和HPLC-SEC。DSC数据显示, rhHNS具有最高的热稳定性, T_m值大约~90°C, pH6-7。在加速条件下,所有pH值和离子强度中,在柠檬酸盐缓冲剂中的rhHNS显示了显著的活性丧失,这表明了柠檬酸盐是不合适的制剂缓冲剂。磷酸盐的结果相当好,在加速条件、pH6-7时保留最大的活性。在加速条件下,含有100-150mM NaCl的磷酸盐制剂显示最大的活性保留。但是, pH6-8、50-150mM的离子强度,在加速条件下,在SEC-HPLC中的高分子质量(16分钟)峰最大。

[0354] 进行附加的制剂实验,以更好地理解导致所述16分钟峰的原因。进一步的,进行研究以比较磷酸盐制剂与非缓冲生理盐水制剂的稳定性,以及低、高蛋白质浓度的稳定性。

[0355] 实施例2:rhHNS的液体制剂

[0356] 设计在这个实施例中的实验,以优化打算鞘内递送的rhHNS制剂的可溶性。如本文所描述的,鞘内药物递送需要小量的注射液体体积,并且,因此需要高浓缩的蛋白质溶液。但是, rhHNS通常地具有异种电荷分布(从5.1至6.5的等电点),其影响它的可溶性。在本实施例中的所述研究提供了pH和氯化钠浓度对rhHNS产品可溶性影响的信息。

[0357] 如在图7中所见的, pH或者盐浓度(例如氯化钠)增加导致rhHNS可溶性增加。通过与不同盐浓度(145mM或者300mM)配制的rhHNS超高速离心法分析(AUC)分析rhHNS天然态。如图8所见, rhHNS含有均匀分子,并且维持相同的结构,从145mM至300mM盐浓度, pH7。总之,这些结果表明NaCl浓度增加导致rhHNS可溶性增加。

[0358] 鉴定两种液体制剂以进行进一步研究,包括:高盐液体制剂(15mg/mL rhHNS, 175mM NaCl, 5mM磷酸盐, 0.005%聚山梨醇酯20, pH 7.0);以及含蔗糖制剂(15mg/mL rhHNS, 2%蔗糖, 145mM NaCl, 5mM磷酸盐, 0.005%聚山梨醇酯20, pH 7.0)。

[0359] 实施例3:rhHNS的冻干制剂

[0360] 在这个实施例中的实验被设计,为了优化rhHNS的冻干制剂和条件。特别地,这些研究提供了所述产品稳定性的制剂影响信息,包括:冻干的块状物的外观、rhHNS酶活性、以及所述冻干产品的化学完整性。

[0361] 将rhHNS配制在多种磷酸盐基础的冻干制剂中。检查下述的制剂参数:(1)稳定剂:葡萄糖(0.5-1%)或者蔗糖(1-1.5%);以及(2)表面活性剂:聚山梨醇酯20(0.02-0.005%)。在所有被测试的制剂中使用下述的参数:(3)15mg/mL rhHNS;(4)145mM NaCl;(5)5mM磷酸盐;(6)pH 7.0。

[0362] 根据在表16中的条件,示例性制剂是冻干的:

[0363] 表16:示例性的冻干循环

[0364]

总冻干时间 -4 天

[0365]

冷冻/退火	
冷冻	0.25C/min 至 -20C
维持	-20C, 为期 5 小时。
继续冷冻	-50C, 以 0.25C/min
维持	-50, 为期 3 小时。
一次干燥	
升温	0.5C/min 至 -25C, 并且真空至 60 mT
维持	-25C, 以及 60 mT 为期 50 小时。
二次干燥	
升温	0.3C/min 至 20C, 以及 N2 压力 至 150 mT
维持	20C 以及 150 mT, 为期 6 小时。

[0366] 观察到:含有葡萄糖制剂具有长的再生时间(>30分钟),但是能维持化学稳定性(数据未示出)。

[0367] 含有1%蔗糖的rhHNS的lyo-制剂具有(在2-8℃)15个月的数据,以及(在25℃/40℃)3个月的数据(如下表17中示出的),显示SEC、RP和SDS-PAGE ≤ 1%变化。

[0368] 表17. 1%蔗糖Lyo-制剂的稳定性

[0369]

测试	预-Lyo	后-Lyo	5 ± 3°C		25 ± 2°C	40 ± 2°C
			3 M	15 M	3 M	0.5 M
块状物外观	NA	白色, 固体块状物	白色, 固体块状物	白色, 固体块状物	白色, 固体块状物	白色, 固体块状物
湿度含量	NA	0.5%	NA	NA	NA	NA
再生时间	NA	<60 秒	<60 秒	<60 秒	<60 秒	<60 秒
再生溶液的外观	乳色的, 无色的 w/o 粒子	乳色的, 无色的 w/o 粒子	乳色的, 无色的 w/o 粒子	乳色的, 无色的 w/o 粒子	乳色的, 无色的 w/o 粒子	乳色的, 无色的 w/o 粒子
pH	7.2	7.2	7.3	NA	7.2	7.2
蛋白质浓度 (mg/mL)	14.8	14.8	NA	15.3	14.6	14.0
特异性活性 (U/mg)	71	62	NA	78	85	78
SEC 主峰%	99.9%	99.8%	99.6%	99.5%	99.6%	99.5%
RP-HPLC 主峰%	99.0%	98.9%	98.4%	98.5%	98.7%	98.5%

[0370]

SDS-PAGE	符合	符合	符合	较低得到带(<1%), 稍微的增加	符合	符合
----------	----	----	----	-------------------	----	----

[0371] 含有1.5%蔗糖的rhHNS的lyo-制剂具有(在2-8°C)14个月的数据,以及(在25°C)3个月的数据(如下表18中示出的),显示SEC、RP和SDS-PAGE ≤ 0.2%变化。

[0372] 表18. 1.5%蔗糖Lyo-制剂的稳定性

[0373]

测试	预-Lyo	后-Lyo	5 ± 3°C	25 ± 2°C	40 ± 2°C	
			3M	3M	1M	3M
块状物外观	NA	白色, 固体块状物	白色, 固体块状物	白色, 固体块状物	白色, 固体块状物	白色, 固体块状物
湿度含量	NA	0.5%	NA	NA	NA	NA
再生时间 e	NA	<60 秒	<60 秒	<60 秒	<60 秒	<60 秒
再生溶液的外观	乳色的, 无色的 w/o 粒子	乳色的, 无色的 w/o 粒子	乳色的, 无色的 w/o 粒子	乳色的, 无色的 w/o 粒子	乳色的, 无色的 w/o 粒子	乳色的, 无色的 w/o 粒子
pH	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9
蛋白质浓度 (mg/mL)	16.1	14.2	15.7	15.4	16.6	15.4
特异性活性 (U/mg)	176	210	149	122	169	139
SEC 主峰%	99.9%	99.8%	99.8%	99.6%	99.6%	99.0%
RP-HPLC 主峰%	99.2%	99.0%	98.8%	98.5%	98.0%	97.7%
SDS-PAGE	符合	符合	符合	较小带 (<1%), 稍微的增加	符合	较小带 (~1%), 稍微的增加

[0374] 冻干的块状物, 观察其块状物外观和完整性(例如反复熔炼的)。如在图9A中所示的, 配制1.5%蔗糖的冻干块状物(比配制1.0%蔗糖)具有更多的块状物收缩。配制1.5%蔗糖的冻干块状物对不同的冻干单元也更加敏感, 例如VirTis单元vs LyoStar单元(图9B)。

[0375] 单独设置的实验证实了, 蔗糖增加导致块状物收缩, 如下表19中指出的。

[0376] 表19.rhHNS稳定性和块状物外观在不同蔗糖中的比较

[0377]

测试	从基线的变化					
	1% 蔗糖		1.25% 蔗糖		1.5% 蔗糖	
长期 (5C)	22M	12M	6M	21M	5 M	
SEC	0.4%	0.2%	0.1%	0.1%	0%	
RP	0.5%	0.5%	0.5%	0.3%	0.5%	
SDS-PAGE	<1%	<1%	<1%	0%	0%	
加速 (25C)	20M	12M	6M	21M	12M	
SEC	0.5%	0.2%	0.1%	0.1%	0%	
RP	1.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0%	
SDS-PAGE	<1%	1%	1%	0%	0%	
胁迫数据 (40C)	0.5M	1M	3M	1M	0.5M	1 M
SEC	0.5%	0.4%	1%	0.1%	0.1%	0.2%
RP	0.5%	0.5%	1.5%	0.1%	0.5%	0.2%
SDS-PAGE	<1%	<1%	>1%	1%	0%	0%
块状物外观	稍微的收缩		一些收缩		更多的收缩	

[0378] 总之,所述数据表明,在rhHNS lyo-制剂中蔗糖浓度增加于稳定性增加相关,以及冻干块状物收缩相关。

[0379] 对于再生的lyo-制剂,通过微血流显像(MFI)以观察微粒状物质的存在。示例性的颗粒图像在图10中描述。如在图10中所见的,在储藏后的含有1%或者1.5%蔗糖的lyo-制剂在再生后观察到大型的颗粒。

[0380] 对于预冻干制剂,观察0.22um过滤后微粒状物质的存在。如在图11中所见的,聚山梨醇酯20(P20)的存在防止了在0.22um过滤后蛋白质样絮凝剂(其在没有P20时形成)的形成。因此,P20对于阻止微粒状物质形成和/或保护过滤期间的rhHNS蛋白质是有效的。进一步的研究表明,P20的存在对于减少在rhHNS制剂中由于冻融引起的微粒状物质、以及冻干引起的微粒状物质是有效的(数据未示出)。

[0381] 冻干条件

[0382] 研究冻干循环条件,以测定其对rhHNS冻干制剂的印象。例如初级干燥温度变化范围从-38C至-20C,通过酶活性、SEC、RP以及块状物外观测定rhHNS lyo-制剂的稳定性。这些分析的示例性结果在下表20中示出。

[0383] 表20. 初级干燥对于1.5%蔗糖Lyo-制剂的影响

[0384]

测试	(-38°C)			(-30°C)		(-25°C)		(-23°C)		(-20°C)	
	预-Lyo	后-Lyo	40°C	后-Lyo	40°C	后-Lyo	40°C	后-Lyo	40°C	后-Lyo	40°C
			0.5M		1M		0.5M		0.5M		0.5M
活性	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
块状物收缩	NA	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

[0385] 如已经观察到的,在初级干燥温度从-38C变化至-20C以内,对于稳定性属性没有观察到显著的差异。冻干的块状物外观显示,在-20C的初级干燥温度时块状物收缩增加。相似的结果也在含有1.25%以及含1.0%蔗糖的lyo-制剂中观察到(数据未示出)。

[0386] 实施例4.乙酰肝素N-硫酸酯酶的慢性鞘内施用

[0387] 这个实施例表明:可以使用鞘内施用以有效地递送溶酶体酶,例如重组人类乙酰肝素N-硫酸酯酶(rhHNS),至脑组织中,以治疗黏多糖贮积症IIIA(MPS IIIA;Sanfilippo综合症类型A)的神经病学症状(这种疾病定义的临床特征)。在这个实施例描述的实验表明:慢性IT施用rhHNS与在所述脑、脊髓和肝脏中检测的剂量相关酶活性耐受性良好。

[0388] 总之,已经开发了重组人类乙酰肝素N-硫酸酯酶(rhHNS)的鞘内制剂,用于治疗黏多糖贮积症IIIA(MPS IIIA;Sanfilippo综合症)的神经病学症状(这种疾病定义的临床特征)。由于MPS IIIA患者的平均年龄是4.5年,rhHNS的关键毒理学研究在青少年食蟹猴中进行,以评估对发育中的大脑的影响进行评估。猴子被植入鞘内(IT)-腰椎药物递送设备,并每隔一周给药,通过短期注射(1.5、4.5、或者8.3mg/剂rhHNS,持续6个月;12剂),以及分别接受磷酸盐-缓冲生理盐水或者媒介物的设备和媒介物对照。每组8只动物(4/性别)在3个月和6个月尸检(设备对照组在3个月尸检),并且来自媒介物组的8只动物和rhHNS给药组的3只动物在所述最终IT给药后的1个月尸检。没有观察到rhHNS相关的临床体征或者严重的中枢神经系统损害。与对照相比,在所述脑/脊髓周围的脑膜/神经束膜中具有轻微至最小平均严重程度的细胞浸润,其与在脑脊髓液(CSF)白血球的增加相关,主要是嗜酸性细胞(其大程度地消退,在最终给药1个月后)。这些变化不与在脑或者脊髓中的任何不良形态学变化相关。似乎有剂量相关的趋势,所述趋势倾向于更高的平均CSF中rhHNS水平和组织rhHNS活性水平(在脑、脊髓、以及肝脏中)。未观察到不良效应水平是每隔一周给予8.3mg/剂(所述最高施用剂量),表明:rhHNS可以以不同的浓度(包括高于8.3mg/剂的浓度),被安全地鞘内施用。

[0389] Sanfilippo A疾病

[0390] 黏多糖贮积症类型IIIA(MPS IIIA;Sanfilippo A疾病),一种罕见的溶酶体贮积症(其影响世界范围内约每100,000个人中的一个),其是由于乙酰肝素N-硫酸酯酶(HNS)的缺乏或者缺陷所导致(Neufeld EF,et al.The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease(2001)pp.3421-3452),乙酰肝素N-硫酸酯酶(HNS)是一种exosulfatase,其参与粘多糖(GAG)硫酸乙酰肝素的溶酶体分解代谢。在缺乏这种酶时,GAG硫酸乙酰肝素在神经元和胶质细胞的溶酶体中累积,伴随在脑外累积的减少。这种疾病定义的临床特征是中枢神经系统(CNS)退化,其导致丧失,或者不能实现主要发育标志事件。所述进行性的认知衰退在痴呆和过早死亡中达到顶点。

[0391] rhHNS的IT递送

[0392] 由于MPS IIIA患者的平均年龄是4.5年,所述rhHNS的关键毒理学研究在青少年食蟹猴中(所述物种的选择是根据其与人类的遗传学和解剖学相似性)进行,以评估对脑发育的影响。在文献中引用的猴子与人类的等价年龄范围从7.6个月至12.1个月,而对应于30-40个月年龄的儿童。(Hood RD,Developmental and Reproductive Toxicology:A practical approach(2006)p.276)。作为这种努力的一部分,6个月的毒理学研究在青少年食蟹猴中进行,以评估rhHNS的IT腰椎施用。从1个月前的青少年食蟹猴毒性研究中获得的

数据,指导了所述剂量水平的选择、以及所述6个月重复给药的青少年猴研究的设计。据最新的数据,这是在青少年非人类灵长类中涉及慢性IT施用ERT的第一次研究。

[0393] 在本研究中,使用56个雄性和56个雌性青少年食蟹猴(约6至9个月的年龄),并且称重0.82至1.81kg。猴子被每天饲喂15个饼干的PMI-Certified灵长类饲料5048(Richmond, IN)。水通过过滤的自动水系统随意提供,并且在尿液收集期间保留。猴子在达到后被分组容纳(每笼2只)(对于2至4周)在不锈钢笼子中,除了所述3个月龄的猴子,这些被单个地容纳在不锈钢笼子中。在所述研究期间,所有的猴子被容纳在单个不锈钢笼子中,其空间中控制温度和湿度,并具有12小时光照和12小时黑暗的循环。

[0394] 在研究启动之前,所有的猴子被手术植入SC端口和IT导管。在手术前施用氢化波尼松琥珀酸钠(IV, 30mg/kg)和氟胺烟酸葡胺(肌肉内[IM], 2mg/kg)。所述猴子用SC硫酸阿托品(0.04mg/kg)预处理,用IM氯胺酮盐酸使其镇静;8mg/kg),插管的,并维持约1L/min的氧气和2.0%异氟醚。在所述腰椎(L₄、L₅、或者L₆)的背侧上制作一切口,并且进行偏侧椎板切除术,以在L₃、L₄、或者L₅处插入锥形聚氨酯导管(长度25cm, 0.9mm外直径x 0.5mm内直径,并具有6个0.33mm直径的测孔)。所述导管通过小的硬脑膜切口插入,并且顺行所述胸腰部连接区域推进约10cm。将钛SC端口与所述IT导管连接,并且在所述SC组织中植入。合适的导管放置通过脊髓造影确认,使用Isovue-300(0.8ml; Bracco Diagnostics, 有限公司, 普林斯顿, NJ)。在从手术恢复后,使猴子接受酒石酸布托啡诺(IM, 0.05mg/kg)和头孢噻夫钠(IM, 5.0mg/kg, 每天两次,持续两天)。

[0395] 在这个实施例中, rhHNS在IT制剂媒介物中提供, 包括5mM磷酸钠、145mM氯化钠和0.005%聚山梨醇酯20(pH 7.0)。EOW给药的rhHNS按照短期注射施用的(超过约11分钟): 0.6mL(4分钟), 然后用一阵0.5mL磷酸盐-缓冲的生理盐水(PBS)(7分钟)。在所述媒介物对照组中的猴子仅接受IT制剂; DC猴子接收PBS(pH 7.2)IT。

[0396] 发病率和死亡

[0397] 没有rhHNS相关的死亡或者更早的牺牲。在给药或者在日常观察期间没有rhHNS相关的临床体征指示。在给药期间或之后观察到的错放、瘙痒、震颤和运动失调, 在施用的数分钟至约4小时以内消退, 并且这些被认为是体积相关应答, 而不是对rhHNS或者媒介物的反应。在给药期间或者刚给药之后观察到的临床体征, 可看到其在对照组中以可比的发生率(DC和/或媒介物-给药组); 没有剂量应答的证据。一般而言, 在给药时临床体征的发生率随着后续的给药而减少。没有与rhHNS-相关: 在体重、采食量、物理身体和神经病学研究结果方面的变化, 或者在ECG或者眼科学检查中的变化。

[0398] 临床病理

[0399] 在血液学、血清、化学、凝结或者尿分析参数中, 以任意的时间间隔, 没有变化被认为是rhHNS相关。

[0400] CSF细胞计数和化学

[0401] 对所有组的平均CSF白血球计数具有剂量相关的增加, 包括DC和0mg/剂组, 在给药后24小时。随着每个剂量的施用, 在白血球计数方面通常增加。在给药之前, 从约一半的猴子中收集CSF, 表明: 因为先前的剂量导致的这些效应在两周内减弱。在给药5次后, 除了白血球增加之外, 相对于先前给药平均值($P \leq 0.05$ 相对于, 所述DC和所述0mg/剂组)观察到更高组的平均CSF总蛋白和白蛋白(对于所述rhHNS给药的雄性), 在所述4.5和8.3mg/剂组(多

达4-至5-倍)中;显著的是:在雌性rhHNS-给药组中的较少的趋势。

[0402] rhHNS浓度和抗体分析

[0403] 通常地,在血清中的所述平均rhHNS水平<对于所述时间点的所有测试组的检测极限(LOD)。在来自猴子的CSF中的所述rhHNS浓度(在所述DC-和媒介物-给药对照组中)通常在定量极限以下(LOQ)。尽管没有进行统计分析,但是似乎具有倾向于更高的平均rhHNS水平(在所述1.5、4.5和8.3mg/剂组的CSF中)的趋势。所述给药前CSF平均rhHNS水平显著低于所述给药后CSF水平。对于6个月队列(所有性别)的所述平均rhHNS浓度,在研究结束时(主要的和恢复的尸检),在表21中总结。在给定的剂量水平,在CSF中的平均rhHNS浓度似乎维持在相同的范围(图12A),尽管所述抗HNS抗体水平(在所述血清和CSF中)在整个研究中继续升高。

[0404] 表21:在研究结束时(主要的和恢复的尸检)的CSF rhHNS浓度

[0405]

组	主要的尸检 (Main Necropsy)		恢复的尸检 (Recovery Necropsy)	
	n	平均值 ± SD ^a (ng/mL)	n	平均值 ± SD (ng/mL)
媒介物	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

[0406] CSF,脑脊髓液;HNS,人类乙酰肝素N-硫酸酯酶;n=在LOQ以上的样本数目;IT,鞘内;SD,标准差。

[0407] ^a=在给药后约24小时收集的样本。

[0408] NA=不能获得样本进行分析,或者在所述LOQ以下的样本。

[0409] 在所述6-月/恢复队列,在设备对照组(仅PBS)中或者那些给药媒介物的组中,没有猴子在任意测试时间点的血清或者CSF中产生抗HNS抗体。在所述1.5、4.5、和8.3mg/剂组中的所有猴子被测试为对抗HNS抗体阴性(<LOD),在血清和CSF样本中,从研究前(对于CSF)以及在给药2之前收集。在所述研究结束前,所有猴子被测试对抗HNS抗体阳性(在血清中)。

[0410] 在所述1.5mg/剂和8.3mg/剂组中的所有猴子,以及在所述4.5mg/剂组中的8只猴子中的6只,测试为对抗HNS抗体阳性(在一个或多个时间点的CSF中)。由于在所述4.5mg组中的两只猴子没有从任意时间点收集的样本(包括尸检),这些结果似乎表明所有给药rhHNS的猴子产生抗体应答。

[0411] 在所有三个剂量水平,在给药2之后检测在血清中的抗HNS抗体浓度,并且在给药4之后水平显著增加。尽管没有进行统计分析,似乎有倾向于更高更高血清抗体浓度的剂量相关趋势;在所述研究结束前,其水平可以与所述3个rhHNS剂量组相比(图12B)。在所述血清中的抗HNS抗体总是高于在所述CSF中的,在所述研究过程的整个时间中(从9至236-倍血清/CSF抗体浓度);血清与CSF浓度的最高比率(98和236倍),在更早的给药过程中(6和10

周)中,在8.3mg剂量水平观察到。

[0412] 在所述血清中的抗HNS抗体浓度在1.5mg、4.5mg、和8.3mg/剂水平,分别增加9-、16-、和16-倍,在给药的早期时间(从第6周至第14周)。在所述相同的时间段,CSF抗体浓度在1.5mg、4.5mg、和8.3mg/剂水平,分别增加30-、41-、和52-倍,(图12B);在所述给药1月后自由恢复阶段,保持基本水平(表22)。

[0413] 表22:在研究结束时,CSF抗HNS抗体浓度(主要的和恢复的尸检)。

[0414]

组	主要的尸检 ^a		恢复的尸检	
	n	平均值± SD (ng/mL)	n	平均值± SD (ng/mL)
媒介物	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

[0415] CSF,脑脊髓液;HNS,人类乙酰肝素N-硫酸酯酶;IT,鞘内;n=在所述定量极限以上的样本数目;SD,标准差。

[0416] ^a在给药后约1周后收集的样本。

[0417] 在所述CSF中抗HNS抗体出现的比在所述血清中较迟(图12C)。在所述血清或者CSF中的抗体浓度,没有观察到明显的剂量相关性的差异(由于样本容量小,没有进行统计分析);在雄性和雌性之间,抗体应答没有观察到可观察的差异。

[0418] 在所述CSF中,存在抗HNS抗体时,在所述CSF中的rhHNS平均浓度似乎被保持,这意味着:在所述血清和CSF中,抗HNS抗体的存在不改变所述IT给药的rhHNS的浓度水平。所述6-月重复剂量施用rhHNS的所述6-月重复/恢复队列分析表明:所述3-月中间时期和6-月队列处死猴子的抗HNS抗体浓度是可比的(图12C)。

[0419] 总体和组织病理学发现

[0420] 在所有剂量水平(尽管不是在所有的处死间隔、性别-特异的,也不是剂量相关的方式),嗜酸性细胞的浸润(图13)存在于脑(主要是灰质)、脊髓(灰质和白质)、背部脊髓神经根/神经节和三叉神经神经节(仅仅中剂量雄性)的软组织(图13A-E)。所述浸润被解释为次级的所述脑膜/神经束膜浸润和/或在存在rhHNS在所述组织以内的(浸润)。尽管有大量的炎症类型变化,所述猴子似乎容忍rhHNS施用,并且所述浸润没有被认为与不良形态变化相关或者导致其产生(在所述神经系统软组织中)。特别地,没有神经元坏死/退化的证据,并且没有与rhHNS施用相关的胶质细胞应答。

[0421] 在所述脑和脊髓的灰质中的小胶质细胞积累,与细胞浸润相关,主要是嗜酸性细胞,在先前进行的1-个月青少年猴子毒性研究中相对地常见;这些变化在所述6-个月研究(在所述3-个月中间时期牺牲之前)相对地不常见,但是这种应答的残留证据仍然能在所

述6个月队列中看到(图13F)。小胶质细胞反应倾向于相对早的时间,在与一些(通常基于蛋白质)集中施用(或者集中反应)测试制品相同的反应中。所述嗜酸性细胞的浸润没有与嗜酸性细胞(在rhHNS给药的猴子的CSF中)的增加相关,但是所述细胞不存在充分的数量以引起不良反应。

[0422] 在所有剂量水平,对多数rhHNS-给药组,观察到在所述背部脊髓神经根/神经节中观察到嗜酸性细胞的浸润,而不管性别如何。在多种神经系统组织中的浸润被解释为次级的所述脑膜/神经束膜浸润和/或在存在rhHNS在所述组织以内的(浸润)。在所述恢复的牺牲猴子中,与对照水平相比,rhHNS相关影响通常缺乏或者减少。一些变化,例如在所述脊髓中的小胶质细胞积累,在所述恢复期后完全消退。所述rhHNS相关变化似乎没有与在脑或脊髓中任何的不良结构形态变化相关。在所述脑、脊髓或者神经节中没有神经元坏死。

[0423] 在脊髓中的神经纤维退化和神经胶质过多症似乎是继发于所述IT导管的放置和/或存在。这些变化在所述对照和rhHNS-给药组之间比较地相似。在所述脊神经根中,Schwann细胞(外周神经系统的髓鞘形成)增生和神经纤维退化存在于对照和rhHNS-给药的猴子中。由于对一只或更多的脊神经根的损坏而产生的变化,在导管放置时存在。

[0424] HNS酶活性

[0425] 在所述6个月/恢复队列中,在媒介物-给药组(0.0-0.154nmol/hr/mg蛋白质)的所述脊髓和脑中的rhHNS酶活性,与在来自所述3个月中间时期队列(0.0-0.154nmol/hr/mg蛋白质)组织显示的水平相似。在脊椎中的酶活性水平比在脑或肝脏中测量的水平更高(在所述腰椎中约更高一个数量级),所述4.5mg和8.3mg/剂组具有相似的水平。在所述脊髓切片中的rhHNS酶活性范围:在雄性中从3.9-18.6、13.1-67.1、和3.6-69.2nmol/hr/mg蛋白质(图14A);在雌性中1.8-16.2、4.5-61.2、以及21.1-66.0nmol/hr/mg蛋白质(图14B);分别对应于所述1.5、4.5、和8.3mg/剂组。在脊髓组织中,在1个月恢复期,酶活性水平回到与媒介物对照值一致的水平。

[0426] 在所述脑切片中的所述rhHNS活性范围:在雄性中从0.03-16.0、0.30-55.7、和0.15-21.2nmol/hr/mg蛋白质(图14C),在雌性中0.04-5.1、0.0-14.4和0.9-33.2nmol/hr/mg蛋白质(图14D);分别对应于所述1.5、4.5、和8.3mg/剂组。在恢复后的脑组织中,酶活性水平回到与对照值一致的水平。

[0427] 不同年龄脑的活性倍数-变化与内源性水平(DC组)的比较在图15A中示出。尽管倾向于增加分布的趋势在表面样本中没有指出,可以表明腰椎-IT施用rhHNS渗透入所述脑的脑室周围区域。

[0428] 在所述6个月队列/恢复队列中,在肝脏中的平均活性水平是:在雄性中0.50、2.41和6.65nmol/hr/mg蛋白质;在雌性中1.04、4.15和7.62nmol/hr/mg蛋白质,分别对应于1.5、4.5和8.3mg/剂组(图15B)。在媒介物对照猴子中的水平是:雄性0.089nmol/hr/mg蛋白质,雌性0.083nmol/hr/mg蛋白质。在所述恢复期后,在肝脏中rhHNS活性水平与基线对照水平(对于所有剂量组)是可比的。

[0429] 免疫组织化学

[0430] 通过推注IT注射将rhHNS递送至所述CNS,在所述3个月中间时期和6个月/恢复队列中,导致递送免疫反应性测试制品至所述脊髓和脑的软膜蛛网膜组织。在接受IT rhHNS的所述猴子中,所述免疫反应性材料是始终存在于脑膜和血管周巨噬细胞中(脑/脊

髓),并且可变地存在于邻近的神经胶质和神经元细胞群体中。在媒介物-给药对照猴子中缺乏染色(图16A),表明了:针对人类HNS抗体的特异性。通常的,所述免疫反应性是剂量相关的(即,使用半定量分级标准,增加的免疫组织化学染色以通常的剂量依赖性方式指出)。通过IT推注递送rhHNS至所述CNS,导致在大脑皮层和小脑中的阳性免疫染色(图16B-D);尽管如此,在所述尾状核/豆状核区域、中脑、或者脑桥(或延髓)深部区域的免疫反应性是始终明显的。施用rhHNS的所有猴子,在所述肝脏中(在窦状腺系细胞中,包括Kupffer细胞,但在肝细胞中)的免疫反应性是明显的。在一只牺牲初期的雌性(4.5mg/剂组)中,免疫反应性不明显,因为导管泄露而不能修补。

[0431] 在所述1.5mg/剂组,基本恢复是明显的,例外的是:肝脏、所述脑的脑膜、以及一些残留的免疫反应性明显的脊髓。在更高剂量(4.5和8.3mg/剂),免疫反应性的强度和发生率低于给药结束时。在所有剂量组,在脊髓、脑和肝脏中的rhHNS水平接近于在媒介物给药对照中的水平(在所述1个月恢复期之后)。

[0432] 讨论

[0433] 在这个研究中,EOW递送rhHNS,IT施用持续6个月,通常耐受性良好。在体重、临床状态、眼科学的/神经病学的/身体检查、ECG、脏器重量、或者总体器官外貌方面没有观察到显著的变化。研究结果限于在CSF中临床病理中的瞬时变化,伴随着轻微至中度的脑膜浸润和硬脑膜外炎症、以及接近于完全的逆转(在所有但是所述最高的剂量组,在所述恢复期之后)。观察到:rhHNS在整个所述脑和脊髓中的广泛分布。

[0434] IT施用rhHNS EOW,引起炎症反应,其特征为残余白血球浸润和白细胞的溢出,在给药24小时后以及在尸检时被指出。不希望被任何特定的理论所约束,这可能反映了:与所述(在导管尖端附近的)紧密连接中的变化相关,所述BBB瞬时的、局部的和不完全的开口,这导致白血球和血浆蛋白质进入所述CSF(Simard JM,et al.Lancet Neurol.(2007)6,258-268;Stamatovic SM,et al.Curr.Neuropharmacol.(2008)6,179-192)。这可能是两种组件的结果:一个与所述剂量施用程序或者体积相关,以及另一个与蛋白质的IT施用相关。

[0435] 在BBB渗透性中的所述瞬时变化(在剂量组和对照之间没有显著的差异,在给药24小时后,在所述主要的尸检),不伴有任何的临床体征。

[0436] 似乎有倾向于更高平均CSF rhHNS水平的剂量相关趋势;在给定的剂量水平,在所述CSF中的平均rhHNS浓度似乎维持在相同的范围,尽管抗HNS抗体水平在所述血清和CSF中增加。

[0437] 在rhHNS-给药的青少年猴子的脑和脊髓中,观察到轻微至最小平均严重程度度的脑膜细胞浸润。这种在媒介物给药的对照中指出的微观变化,表明某些应答与IT导管放置有关,以及对外源蛋白质的非特异炎症应答也一样。将生物学的/蛋白质引进到IT空间,特别是其渗透到所述CNS,几乎总是引起某些程度的炎症应答(Hovland DN,et al.Toxicol.Pathol.(2007)35,1013-1029;Butt MT,Toxicol.Pathol.(2011)39,213-219),其中,如果存在的数量损坏连接组织,将代表不良影响。在目前的研究中,尽管如此,这些细胞(主要是嗜酸性粒细胞)似乎代表了组织反应/渗透的标记物,并且没有发现作为不良反应的足够数量。所述rhHNS-相关变化似乎没有与在所述脑、脊髓或者神经节中的任何不良结构微观变化相关。在所述脑、脊髓或者神经节中没有神经元坏死。

[0438] 在一些猴子中,在所述脊髓的背侧束中的变化与药物递送设备相关,其包括神经

纤维退化、导管束纤维化、以及所述脊髓的压缩；这些变化都被认为与rhHNS-不相关，因为他们所述IT导管附近发生。所述IT腰椎药物递送设备没有被特殊地设计（以在青少年猴子中植入），其比人类具有较小的IT空间。在IT研究中，来自对照（设别和/或生理盐水-给药）动物的微观评估数据的回顾性分析得出结论：一些极小程度的脑膜浸润和导管束相关的炎症、纤维化和神经胶质过多症，以及脊髓神经纤维退化是可见的（Butt MT, Toxicol.Pathol.(2011)39,213-219）。

[0439] 抗-测试制品抗体的评估是所述毒性研究的重要方面，因为中和或结合抗体对所述测试制品的清除或生物分布有潜在影响（Ponce RP, et al.Regul.Toxicol.Pharmacol.(2009)54,164-182）。在这项研究中，由于剂量相关和定量相似的rhHNS酶活性水平在所述脑和脊髓中（在所述3-个月中间时期和6-个月队列）没有被指出，并且在所述CSF中的平均rhHNS浓度似乎维持在相同的范围，尽管如此，在所述血清和CSF中的抗HNS抗体水平增加，我们得出结论没有见到中和活性。

[0440] 在脊髓、脑和肝脏中似乎有倾向于更高水平的rhHNS酶活性的趋势，这在所述腰区的脊髓中的注射位点附近最高，并且在所述脑中是均匀的，而且从吻端至尾端、以及在右半球和左半球之间没有显著的差异。在所述6-个月队列的所述脑和脊髓组织中，没有rhHNS累积的证据被指出，与所述3-个月中间时期队列相比。尽管倾向于增加分布的趋势在表面样本中被指出，腰椎-IT施用的rhHNS渗透入所述脑的深部、脑室周围。在所述肝脏中的所述rhHNS酶活性，意味着所述rhHNS在IT递送之后的系统性重新分布；（在所述关键毒性研究中，在评估临床和解剖学病理参数后）在所述肝脏中没有观察到rhHNS-相关的不良影响。

[0441] 一般而言，免疫组织化学结果证实了与剂量相关免疫反应性的所述酶组织活性，所述剂量相关免疫反应性在所述脊髓、脑软膜蛛网膜脑膜、以及在所述脑膜直接邻近去的神经组织（神经元、胶质细胞）中观察到。在推注IT注射或者短期IT注射后，有良好的灰质渗透的大脑和小脑。尽管在更深部结构（例如所述基底神经节、或者丘脑/下丘脑的所述中央区域、中脑、或者脑桥/延髓）中，免疫反应性不明显；但是酶活性结果表明：腰椎-IT施用的rhHNS渗透到所述脑的深部、脑室周围区域。因此，免疫组织化学对于检测测试制品的生物分布，可能是较不敏感的技术。在Kupffer细胞和肝脏的内皮细胞（能够吞噬作用的细胞）中，免疫反应性是明显的，但是薄壁组织细胞（肝细胞）不明显。

[0442] 在青少年猴子中，所述6-个月重复剂量IT毒性研究的6-个月重复/恢复队列分析表明：在所述3-个月中间使其和6-个月牺牲猴子中的rhHNS-相关变化是可比的，包括：生命参数，临床和解剖学病理，在CSF和血清中的rhHNS和抗HNS抗体的浓度，以及rhHNS在脊髓、脑和肝脏中的分布/亚细胞定位。在所述恢复牺牲的猴子中，rhHNS影响或者缺乏、或者显著减少。因此，未观察到不良效应水平是8.3mg/剂，所述最高施用剂量。

[0443] 在CSF细胞结构和蛋白质浓度中监测的变化似乎与在组织病理学评估上指出的所述形态变化可靠地相关，并且可能在使用rhHNS进行IT处理后的患者中是有用的；这些变化被认为是与IT-施用蛋白质的预期反应，并且在所述恢复期后大程度地消退。来自动物模型的这些数据提供了执行IT疗法（作为溶酶体贮积症神经学表现的治疗策略）的置信度。这种青少年非人类灵长类毒理学研究表明：通过IT腰椎药物递送设备施用rhHNS施用至儿科患者的可行性和耐受性。所述非不良CNS病理和不良临床体征的缺乏支持了最近的研究医药产品档案，并且表明了：IT施用rhHNS可以安全地和有效地治疗Sanfillippo A综合症

症状。

[0444] 下文提供了：在这个实施例中描述的（在多个实验中使用的）示例性方法和材料。

[0445] 研究设计和rhHNS给药

[0446] 所述猴子被随机成5个治疗组；组1未处理（植入设备对照[DC]，端口和导管）并且没有用媒介物或测试制品给药。组2-5接受0.6mL的0、2.5、7.5或13.8mg/mL rhHNS（即，总剂量0、1.5、4.5、或者8.3mg），IT，EOW。4只猴子/性别/组在3个月（中间时期尸检；在所述第6次给药后24小时）被尸检，4只猴子/性别/组（除了所述DC组，其在3个月尸检）在给药的6个月尸检（主要的尸检；在所述第12次给药后的24小时），并且所述剩余的4只猴子/性别/组在1-个月恢复期的结束时被尸检。在尸检时，选定的组织被收集、加工和显微镜观察。

[0447] rhHNS在IT制剂媒介物中提供，其含有5mM磷酸钠、145mM氯化钠和0.005%聚山梨醇酯20（pH 7.0）。每隔一周给药的rhHNS按照短期注射施用（超过约11分钟）：0.6mL（4分钟），然后用一阵0.5mL磷酸盐-缓冲的生理盐水（PBS）（7分钟）。在所述媒介物对照组中的猴子仅接受IT制剂；DC猴子接收PBS（pH 7.2）IT。

[0448] 临床评估

[0449] 临床体征和发病率以及死亡率观察至少每天记录两次，从所述第一次给药开始。测量体重：在手术之前、在手术的那天、在所述研究期间的每周、以及在尸检的时候。每天监测采食量，从手术前开始。体格检查（心率、呼吸、体温、听诊、步态、性情、腹部触诊、淋巴结和总体外观）和神经病学的（意识水平、追踪）检测在所述研究启动前、在所述研究期间的每个月、以及在所述尸检之前进行。也评估了运动功能、脑反射（瞳孔、眨眼角膜反射），以及脊髓反射（感官脚、膝反射、皮肤的、本体感受和尾部反射）。心（动）电图描记器（ECG；导联I、II和III）和眼科学检查在rhHNS的所述第一次给药之前、以及在所述中间时期（3-个月）或者所述主要的（6-个月）尸检之前的一周完成。眼科检查通过直接检眼镜进行，所述猴子用氯胺酮盐酸（IM，8mg/kg）使其镇静，并且所述眼睛用1%托品酰胺散瞳。

[0450] 临床病理

[0451] 在研究开始前，在IT给药1、3、5、7、9和11、中恢复之后，以及在尸检时，从禁食猴子收集血液样品（以进行血液学和血清化学）。尿液样本通过平移捕捉收集，在给药前、在给药期间和恢复期间一月一次、以及在尸检前。CSF样本通过腰椎导管收集（以进行总细胞计数和化学分析）：在手术时、以及在IT给药1、3、5、7、9和11、中恢复之后的24小时，以及在尸检时；有时，由于部分导管堵塞，样本不能收集。因为高于预期CSF白血球计数被指出，所述3-个月给药5CSF样本从每组中一半的猴子处收集（在给药前），并且在给药后24小时从剩余的猴子处。所述给药前的样本收集发生在给药前至少一天，以免显著改变刚给药前所述CSF体积。对于所述6-个月和恢复期的猴子，用于总细胞计数和化学分析的CSF从每组中一半的猴子处收集（在给药前），并且在给药后24小时从剩余的猴子处。如果猴子由于堵塞而没有抽样导管，在尸检时执行脊髓穿刺（小脑延髓池）。

[0452] rhHNS分析

[0453] 用于rhHNS分析的血液样本从外周静脉收集：在IT给药2、4、6、8、10、12、之前和之后的24小时，中恢复时，以及在尸检时。CSF样本通过腰椎导管收集：在给药2、4、6、8、10、12、中恢复之前和之后的24小时，以及在尸检时。rhHNS浓度通过酶连接的免疫吸附测定法测定。所述捕捉抗体是多克隆兔抗-HNS IgG，并且所述检测抗体是所述相同兔抗-HNS IgG的

辣根过氧化物酶共轭缀物。所述LOD为0.22ng/mL;因此,所述LOQ被计算为0.66ng/mL。血清和CSF样本血清被一式两份筛选,以1:100和1:5稀释;超过校准曲线高端的样品被进一步稀释和重新测试。抗-HNS抗体分析

[0454] 抗体分析的血液从外周静脉收集:在IT给药2、4、6、8、10、12之前,中恢复时,以及在尸检时。用于抗体分析的CSF样本在手术时收集,并通过所述腰椎导管:在IT给药2、4、6、8、10、12之前约1周,中恢复时,以及在尸检时。使用Meso Scale Discovery(MSD®)技术电化学发光电桥测试法检测抗HNS抗体。所述分析对于从任意物种的抗HNS抗体以及免疫球蛋白同种异型来说,是一种通用的、但是敏感的筛选方法。所述LOD为5ng/mL,并且所述样本被一式两份地筛选(以1:20稀释),产生100ng/mL的有效检测灵敏度。超过校准曲线高端的样品被进一步稀释和重新测试。

[0455] 尸检和组织制备

[0456] 猴子经历完全尸检:在所述最终IT给药后的24小时(主要的尸检),或者在所述1-个月恢复期结束时(恢复的尸检)。所用的猴子用氯胺酮盐酸(IM,8mg/kg)使其镇静,并且维持在异氟醚/氧气混合物中,并且接受IV推注的肝素钠(200IU/kg)。猴子通过左心室灌注,室温在生理盐水中的0.001%亚硝酸钠,以速率200ml/min,持续12min(~2400ml)。在收集后,组织样本用10%中性福尔马林缓冲液固定,以进行组织病理学检查/免疫组织化学分析,或者在干冰上冷冻,并且在-60℃或者更低温度贮存,以进行rhHNS活性分析。

[0457] 所述脑在脑模型(MBM-2000C,ASI Instruments,Inc.,Warren,MI)中切片,以3-mm灌装切片厚度。所述切片被编号,在最吻端的切片被指定为切片1。切片1、4、7、10、13和16被加工用于组织病理学分析,并且切片2、5、8、11、14和17(如果有的话)被加工用于免疫组织化学。切片3、6、9、12和15被冷冻以用于rhHNS活性分析。所述脊髓(颈椎、胸椎和腰椎部分)被切成1-cm的切片。所述第一切片和每个第三切片后被加工用于组织病理学评估,并且所述第二切片和每个第三切片后被加工用于免疫组织化学分析。所述第三切片和每个第三切片后被冷冻用于rhHNS分析。调整所述切片的分布,使得所述含有所述鞘内导管尖端(切片0)的切片在福尔马林中固定,并进行组织病理分析。~5g肝脏的重复样本(取自两个单独的叶)被冷冻,以进行rhHNS分析,并且~5g的另外样本被固定已进行免疫组织化学分析。

[0458] 组织病理

[0459] 脑、脊髓、背部脊髓神经根/神经节、坐骨神经、胫神经和腓肠神经,完整的组织清单(对于这个物种的临床前期药物安全性研究期间是典型的),以及任意的肉眼损害在所有猴子尸检中收集。组织切片用石蜡包埋,并用苏木精和曙红染色(除了下文指出的任何特定染色/包埋程序之外),以进行综合微观评估。

[0460] 准备好的石蜡块的脑切片(来自所述设备和媒介物对照组、以及所述高剂量猴子)用Fluoro-Jade B(一种增加神经元退化评估的敏感性的染料)染色,并进行Bielschowsky's银染(一种允许直接可视化轴突、树突和神经丝的程序)。所述Fluoro-Jade B染色的切片在荧光灯照明下检查,使用异硫氰酸荧光素过滤器锥。

[0461] 脊髓被连续地切片,在所述颈部、胸部和腰部采用横向和斜向切片,(在每个水平一个检查切片),包括在导管尖端的切片;额外的横向切片取自马尾区。背神经根和神经节(中颈的、中胸的和中腰的)被加工和检查。外周神经(坐骨神经、胫神经和腓肠神经)被纵向切片、石蜡包埋和用苏木精和曙红(H&E)染色。横截面在俄中二次固定(postfixed),然后包

埋在Spurr's树脂中,切片(2 μ m)并用甲苯胺蓝染色。一系列脊髓切片、以及背部脊髓神经根和神经节(来自所述设备和媒介物对照组、以及所述高剂量猴子)用Bielschowsky's银染色。来自这些组的脊髓切片也用抗-胶质纤维酸性蛋白染色(一种允许直接可视化星形胶质细胞和它们的加工的染料)。

[0462] 制备用于定量分析的组织提取物

[0463] 冷冻脑切片3、6、9、12和15通过分离所述左和右半球进行解剖。表面组织取自距所述表面测量4mm,在每个半球剩余的组织被认为是深部组织。如果存在(例如切片6和切片9),额外的脑室周围样本被从所述冠状切片切断。因为只有一半的脑(所述右侧)被加工(所述左侧保持冷冻),所述切片导致产生2至3个样本:右表面、右深部和如果存在的右脑室周围(即,脑室深部;Vdeep)。小脑和脑干组织,如果存在,在分离所述半球之前被分离,并被单个地加工。脊髓切片相似地被制备、称重和均质化。

[0464] 组织切片在裂解缓冲液(1ml/0.25g组织)中均质化,用10mM Tris,5mM 乙烯乙二醇四乙酸、0.1% Igepal、添加 α 完整蛋白酶抑制剂迷你平板(Alpha Complete protease inhibitor minitab)(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)配制,使用TeenA Lysing Matrix A管或者圆锥形聚丙烯管。样品在Fastprep-24自动化均质器(MP Biomedicals, Solon, OH)或者PowerGen Model 125动力均质器(Omni International, Kennesaw, GA)中加工40秒。一旦均质化,使样品进行5次冻融循环,使用乙醇/干冰浴,并37 $^{\circ}$ C水浴,然后在4 $^{\circ}$ C离心以衬垫组织残骸,上层清液在-80 $^{\circ}$ C储存知道分析。rhHNS活性使用特定的底物(4-甲基伞形基- α -D-N-磺基氨基葡萄糖苷)和2-步骤荧光测定法测定。

[0465] 免疫组织化学的组织加工和染色

[0466] 6个福尔马林固定的3-mm厚度冠状脑切片(切片编号2、5、8、11、14和17),来自每只猴子,从吻端至尾端被编号成1至6。通常,切片1-4含有基底核/丘脑/中脑和大脑,并且所述尾端的切片含有小脑和脑干(延髓)组织。脑、脊髓和肝脏(取自与H&E以及所述多种特定染色相同的石蜡块)进行rhHNS的免疫组织化学染色。特定的小鼠单克隆抗体(克隆2C7;Maine Biotech, Portland, ME)用于IT-施用的rhHNS细胞内吸收的检测;这种试剂被表明与内源性食蟹猴rhHNS没有交叉反应性。阴性对照施用不相关的小鼠IgG进行。去石蜡包埋的切片与初级小鼠抗HNS抗体一起过夜孵育,在2至8 $^{\circ}$ C。添加次级山羊抗-小鼠生物素化的免疫球蛋白G,并在37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。添加抗生物素蛋白/生物素化的辣根过氧化物酶复合物,并在37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。切片在过氧化物酶底物二氨基联苯胺溶液中孵育,直至达到预期的染色强度。核用苏木精复染色。

[0467] 统计分析

[0468] 分析体重、体重变化、采食量、呼吸率、体温、心率、CSF细胞计数、CSF化学、临床病理数据、尿液数据、以及绝对和相对脏器重量,通过方差分析以及Dunnett's检验(比较所述设备和媒介物对照组与每种rhHNS-给药组)。另外,所述数据分析将所述两个对照组彼此进行了比较。分析双尾检验的显著性水平为5%和1%。所有的数据以平均值 $\pm$ 标准差的形式呈现。

[0469] 实施例5. 乙酰肝素N-硫酸酯酶生物分布和药代动力学研究

[0470] 在这个实施例中的所述实验被设计为测定rhHNS在大鼠中的组织分布,在单一静脉内或鞘内给药后(1或者10mg/kg)的rhHNS。例如,此外,这些实验的目的是使用正电子放

射断层造影术(PET)来表征rhHNS在大鼠中的生物分布(BD)性质;以比较当以不同途径(IV或者IT)和不同剂量(1或者10mg/kg)给药时的rhHNS分布模式;并测定在每种感兴趣器官中按这些给药方案的rhHNS药代动力学性能。

[0471] 研究了¹²⁴I-硫酸胺酶(rhHNS)的药代动力学(PK)和生物分布(BD)属性,通过组织PET成像,在大鼠中单一静脉内(IV)或鞘内(IT)施用1或者10mg/kg的¹²⁴I-HNS。从动态图像(在第一个20分钟)和静态图像(在IV或者IT给药后的0.05(仅对于IT施用)、1、2、4、8、24、48、96和192小时),获得在感兴趣器官的放射性实时数据。

[0472] 在这项研究中,施用4组中的每个(1mg/kg IV,1mg/kg IT,10mg/kg IV和10mg/kg IT)。测量放射性实时数据:在IV施用以后的所述头部、脑(包括脑脊髓液,CSF)、脊椎和肝脏区;以及在IV施用以后的所述血液、脑(包括CSF)、肝脏、肾脏、心脏(包括肺脏)和皮肤。所述数据通过¹²⁴-碘的衰变半衰期(100.2小时)校正,表示为:感兴趣区域注射剂量(%ID)的百分比或者%ID每克成像组织(%ID/g),然后归一化为200克体重。在感兴趣区域给药蛋白质的总量(ug)或者浓度(ug/g)从相应的%ID或者%ID/g数据计算。

[0473] 在IT给药后的第一个20分钟,在所述头部区域的rhHNS的总量,以0.002/min-0.011/min(λ_z)的恒定速率减少(在1和10mg/kg)。在这个报告中,对于在所述两个剂量和两个施用途径之间的药代动力学比较(更多信息参见结果部分),没有使用清除率和分布统计。从所述脑中消除的恒定速率基本上相同,在两个测试剂量(λ_z :0.016/hr相对于0.014/hr,分布对应于1和10mg/kg),和具有有大约2天的相似半衰期(通过IT给药后的多达192小时的静态图像测定)。所述C_{max}和AUC(0-最终或者0-无限)的值与施用的剂量成正比。在1至10mg/kg的剂量范围(在这些IT单一给药方案中给出)中表明了线性PK行为。从所述脊椎的近端至远端切片(两个剂量水平都)观察到了浓度梯度。

[0474] 在IT给药后,rhHNS蛋白质在所述肝脏中是可测量的:在1mg/kg多达96小时,以及在10mg/kg的rhHNS多达192小时。在所述肝脏中的浓度,1mg/kg的2小时达到顶峰,10mg/kg的7小时达到顶峰。所述消除(在1mg/kg)为0.030±0.011/hr(平均值 λ_z),其与在10mg/kg(λ_z 0.017±0/hr)(p=0.10)显著不同,以及相应的t_{1/2}(28相对于42小时,分别对应于1和10mg/kg的剂量)。

[0475] 在IV给药以后,在肝脏、肾脏、心脏和皮肤的所述消除半衰期为:对肝脏47±10和38±13小时,对于肾脏54±25和29±16小时,对于心脏36±15和42±19小时,以及对于皮肤40±21和31±13小时,分别对应于1和10mg/kg;而在所述脑中的半衰期为71±23和60±53小时。对于肝脏、皮肤、肾脏、心脏和脑的C_{max}的平均值为:在1mg/kg为9.6、0.30、0.25、0.22和0.08ug/g;以及在10mg/kg为132、7.9、3.9、3.7和1.8ug/g。在从个体动物得到C_{max}值以后,相对于剂量进行归一化,所述C_{max}/剂量值(在10mg/kg)显著高于在这些器官中的1mg/kg(大多数p值<0.05,对肝脏p=0.06)。所述肝脏、皮肤、肾脏、心脏和大脑的所述AUC_{last}值为:在1mg/kg为525、16、14、9和7hr.ug/g;以及在10mg/kg为6747、276、183、201和86hr.ug/g。在归一化以后,所述AUC_{last}/剂量值在10mg/kg显著高于1mg/kg,在皮肤中(p<0.01),在心脏中略微不同(p=0.06),并且在肝脏、脑和肾脏中不显著(所有p值>0.34)。

[0476] 当所述剂量的rhHNS被注射,鞘内施用比静脉施用导致的脑暴露大3个数量级。所述消除半衰期在脑中:IT为2天,IV施用为3天。尽管如此,在IT给药后的肝暴露与在rhHNS的所述相同剂量IV给药后近似。对于肝脏的所述暴露(C_{max}和AUC_{last}),通过IT/IV,在1mg/kg

和10mg/kg,范围为0.4-1.2。

[0477] 实验设计

[0478] 在大多数溶酶体贮积症中,所述中枢神经系统(CNS)是脆弱的,并且在一些类型的这些疾病中是严重损坏的,例如Sanfilippo(黏多糖贮积症III)、异染性脑白质营养不良(MLD)和亨特综合症。如本文描述的,这也是考虑到的:由于当外围施用通过血-脑屏障的渗透较差,直接施用酶蛋白质进入所述CNS可能使它们在中枢神经组织中的浓度增加,并进一步增强它们的治疗效果。在这项研究中,研究鞘内(IT,或者小脑延髓池)施用,并将其与IV施用在不同剂量水平进行了比较。

[0479] PET是非侵入性的、重复的和定量的技术,提供了随时间推移、在所述感兴趣器官中动态变化的药物浓度。来自靶器官(活性位点,而不是血液循环中)的动态浓度-时间数据是有价值的,并且与所述给药药物的生物活性直接相关。进一步的,来自动物PET研究在组织暴露中的信息,可以用于指导在人类中首次剂量的选择。

[0480] 材料和方法

[0481] 测试制品

[0482] 肝素N-硫酸酯酶(rhHNS)被配制成浓度20mg/mL的rhHNS,在5mM磷酸钠缓冲剂中,145mM氯化钠,pH 7.0。所述材料通过RP-HPLC纯化,含有98.7%的肝素N-硫酸酯酶,具有99.9%的二聚体。rhHNS用¹²⁴I标记。

[0483] 样品来源

[0484] 放射性图像来自在IV和IT给药¹²⁴I-H-N-硫酸酯酶之后的大鼠,在1和10mg/kg。

[0485] 动物

[0486] 16只雄性Sprague-Dawley大鼠从Charles River实验室购买(190±60g,n=16),并且被分配到4个组(n=4)。单一IV或者IT注射,在两个不同剂量(1mg/kg和10mg/kg),被给予至每个组的这些大鼠中(总共4组)。所述剂量和注射体积根据每个动物的体重个体化。在所述两个IV-处理组中,通过IV注射戊巴比妥钠(以35mg/kg的剂量)使其镇静。静脉内剂量的注射通过经尾静脉的推注。在两个IT-处理组中,动物通过腹膜内使用戊巴比妥钠(以50mg/kg的剂量)麻醉。鞘内剂量使用超过1分钟,在经过寰枕膜的小脑延髓池。所述实际施用的放射性通过PET测量,并且作为注射剂量。

[0487] 实验和/或分析方法

[0488] 获得动态图像(每2分钟):在所述第一个20分钟,在所述心脏(包括所述肺脏)、肝脏和肾脏(在IV注射后)区域中;以及在所述头部区域在IT施用这两种剂量之后。静态图像的获得:在所述区域包括脑(包括脑脊髓液,CSF)、肝脏、肾脏、心脏(包括所述肺脏)、肌肉、皮肤和骨骼,在IV-处理组中;以及在IT-处理动物的所述头部、脑(包括CSF)和肝脏区域,在给药后的0.05(仅适用于IT组)、1、2、4、8、24、48、96和192小时。重新构建所述图像,并将所述三个主体切片融合成一张图像。

[0489] 数据分析

[0490] PET数据以毫微居里(nCi),每mL(对液体)或者每克(对组织)表示。相对活性从在静态图像中的所述脑、肝脏、肾脏、骨骼肌、胃、心脏(带肺)和皮肤区域获得。在整个头部或者脑区域的绝对活性从接受IT注射的动物获得。每毫米脊柱的放射性在IT注射的动物中测定,在三个选定的切片:近端(颈部),中间(对肝脏的上边缘),和远端脊柱(距离含隔室蛋白

质的远端1厘米)。

[0491] 所有数据通过 ^{124}I (100.2小时)的衰变半衰期校正,并且归一化为注册功效,基于 ^{124}I 来源的校准(具有外部测量活性)。所述数据然后被表达为整个区域(所述头和脑)的注射剂量(%ID)的百分比,或者%ID每克(%ID/g)的组织,然后归一化为200克体重[数据归一化:(%ID或者%ID/g)/体重的所述动物 $\times$ 200]。采用所述归一化,以减少所述数据的变异性,因为在每个组中仅使用4只动物。

[0492] 在这个实施例中,rhHNS蛋白质浓度或者量使用所述注射到每个动物的蛋白质剂量,进行计算:蛋白质浓度(ug/g)=(%ID/g) $\times$ (mg/kg的注射剂量 $\times$ 1000 $\times$ 0.2);在感兴趣区域中的给药蛋白质总量(ug)=%ID $\times$ (mg/kg的注射剂量 $\times$ 1000 $\times$ 0.2),此处所述注射剂量为1mg/kg或者10mg/kg,并且0.2是体重的归一化因子。每个PK参数的组平均值和标准差的计算,基于所述4组中的每组中的单个非房室化数据(non-compartmental data)。进行学生t-检验,以比较 λ_z 、 $t_{1/2}$ 、 $C_{\max}$ 和AUC的值,在所述两个测试剂量之间和所述两个施用途径之间。统计显著性被定义为p-值小于0.05($p < 0.05$)。

[0493] 结果

[0494] 计算在下面的表、图和PK分析中的rhHNS的量(ug)或者浓度(ug/g),通过将所述注射的蛋白质剂量(1mg/kg或者10mg/kg)乘以相应的%ID或者%ID/g值。

[0495] 用 ^{124}I -HNS(以1和10mg/kg的剂量)鞘内治疗

[0496] 在所述头部区域中的所述给药蛋白质的量(ug)(来自动态图像)被绘制,作为时间的函数,在图17中。在所述脑区域中的所述浓度(ug/g)(来自静态图像)被绘制,作为时间的函数,在图18中。在所述脑和头部区域的注射蛋白质的量(ug)(来自静态图像)与时间被绘制,分别为图19和图20中。在近端、中间和远端的脊柱处的浓度-时间曲线(ug/mm),在图21至图23中示出。图24示出了:在IT施用 ^{124}I -HNS后(在1和10mg/kg),在所述肝脏中rhHNS浓度(ug/g)随时间的变化。

[0497] 通过非房室(WinNonlin 5.2,Pharsight,Mountain View,CA)分析总量-时间(ug)或者浓度-时间(ug/g)数据。从每个单个动物的数据,评估所述PK参数,例如消除的恒定速率(λ_z),顶峰浓度($C_{\max}$),终末衰变期($t_{1/2}$),在曲线以下的面积(AUC_{last} 和 $\text{AUC}_{0-\infty}$)以及其它。

[0498] 评估清除率和分布容积(参见附录3),但是,在这个报告中,它们不用于在所述两个剂量之间和所述两个施用途径之间的PK比较,其原因有二:(1)这项研究关注在固体组织中rhHNS的生物分布,而不是血液PK;以及(2)在所述脑区域中的放射性是来自所述脑组织(固体)和CSF(液体)的总量,其在这项研究中不能彼此分离。评估所述 λ_z ,并且用于比较,因为它表明了每单位时间排除的所述注射剂量的百分比。

[0499] 计算所述组平均值和标准差(SD),并在所述测试剂量之间进行比较。所述PK参数在下文表23中列出。

[0500] 表23.以1和10mg/kg的 ^{124}I -HNS进行IT和IV给药之后的多种器官中,非房室的PK参数(组平均值 $\pm$ SD)总结。

[0501]

1 mg/kg IT	脑 (ug/g)*		肝脏		脑 (ug) [#]		头部 (ug) [#]		近端的		中部的		远端的	
参数	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
λ_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

[0502] 10mg/kg IT

[0503]

λ_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	-

[0504]

1 mg/kg IV	脑 (ug/g)*		肝脏		肾脏		心脏		皮肤	
λ_z	0.011	0.005	0.015	0.003	0.016	0.009	0.021	0.006	0.021	0.010

[0505]

$t_{1/2}$	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

[0506] 10mg/kg IV

[0507]

λ_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

[0508] 在给药后的第一个20分钟能够,在所述头部区域的rhHNS的总量(ug):在1mg/kg时,以0.002-0.011每分钟(λ_z , 0.005 $\pm$ 0.004/min)的恒定速率减少;在10mg/kg时,以0.003-0.010每min(0.007 $\pm$ 0.003/min)的恒定速率减少。这些消除的恒定速率在这两个剂量水平没有显著差异($p=0.57$,图17)。

[0509] 对脑的所述浓度-时间曲线(ug/g,从0.05至192小时)表明为双阶段属性(图18)。

所述早期阶段持续约2小时。所述末期阶段遵循一级动力学。从所述脑中消除的恒定速率在两个测试剂量(0.0016 ± 0.003 和 0.014 ± 0.001 每小时)是非常相似的,并具有非常相似大约2天的半衰期(45 ± 7 和 49 ± 4 小时,分别在1和10mg/kg)。当所述剂量从1增加至10mg/kg,所述顶峰浓度的值(257 ± 90 和 2628 ± 265 ug/g)以及AUClast(8393 ± 2457 和 83962 ± 10083 hr.ug/g,分别在1和10mg/kg)增加约10倍。这些观察现象表明了:在(在这些IT单一剂量方案给与的)1至10mg/kg的剂量范围的线性PK行为。在IT给药后的3分钟(T_{max}),所述顶峰浓度在所述脑中出现。

[0510] 在所述脑和头部中的总量-时间曲线(ug从0.05至192小时)遵循与在脑中观察到的浓度-时间曲线(ug/g)相同的二阶段模式(图19和图20)。在所述脑区域中的 C_{max} 值显著低于在所述头部区域中的(69 ± 8 相对于 200 ± 0 ,在1mg/kg, $p < 0.01$;以及 836 ± 117 相对于 1844 ± 314 ug, $p < 0.01$,在10mg/kg)。所述消除的恒定速率为:对脑分别为 0.017 ± 0.002 /hr和 0.014 ± 0.001 /hr,对头部区域分别为 0.016 ± 0.002 和 0.010 ± 0.001 /hr,在相应的1和10mg/kg。所述平均值的残留时间值为:对脑为 42 ± 5 相对于 51 ± 5 小时($p = 0.048$),以及对于所述头部为 45 ± 7 相对于 70 ± 9 小时($p < 0.01$),分别对应于1和10mg/kg。这些观察现象表明了:所述给药蛋白质从两个区域中消除,较低剂量比较高剂量都更快。所述半衰期平均值42至70小时的范围,在IT给药1mg/kg和10mg/kg的rhHNS后。

[0511] 在两个剂量水平,从所述脊柱的近端、至中间和远端切片,都可以观察到浓度梯度(未显示数据)。在IT给药后,观察到所述顶峰浓度(ug/mm的脊椎柱):在所述近端大约30分钟(0至1小时),在所述中间(1至4小时)(除了已知大鼠为24小时),以及在所述远端切片(1至8小时)。在这些切片中的半衰期是可变的(平均值 $t_{1/2}$:对所述近端 32 ± 13 和 45 ± 18 小时,对所述中间 39 ± 16 和大约50小时,以及对所述脊柱远端切片 30 ± 12 和大约123小时,分别对应于1mg/kg和10mg/kg)。顶峰浓度的平均值与在这三个切片的每个的剂量大致成正比,在1和10mg/kg的 ^{124}I -HNS(0.5相对于6.0、0.2相对于0.9、以及0.1相对于0.5ug/mm;分别对应于所述脊柱的近端、中间和远端切片)。AUClast的所述平均值遵循与观察到的顶峰浓度相同的比例模式(9.5相对于83、6.8相对于35、以及2相对于38hr.ug/mm,分别对应于近端的、中间的和远端的切片)。

[0512] 尽管rhHNS在大多数外周器官中不是可检测的,但是它在肝脏中在IT给药后早至1小时(在给药后的所述第一个成像时间点),在1mg/kg至96小时(四只动物中的三只),在10mg/kg至192小时(所有四只大鼠),是可测量的(图24)。在所述肝脏中的所述浓度达到所述顶峰,在IT给药1mg/kg后的2小时,以及IT给药10mg/kg后的7小时,这遵循具有一级动力学的消除阶段。消除的所述恒定速率:在1mg/kg(λ_z 0.030 ± 0.011 /hr)快于10mg/kg(λ_z 0.017 ± 0 /hr)($p = 0.10$);伴随相应较短的 $t_{1/2}$ (28 ± 16 相对于 42 ± 1 小时,分别对应于1和10mg/kg的剂量, $p = 0.76$)。AUClast值在1mg/kg,减少大约40倍(相比与在10mg/kg的值)(分别地, 204 ± 50 相对于 7987 ± 3276 ug/g)。

[0513] ^{124}I -HNS在1和10mg/kg的剂量进行的静脉内治疗

[0514] 在脑、肝脏、肾脏、心脏(包括肺组织)和皮肤中的浓度被标绘(作为时间的函数),在IV给药1和10mg/kg的rhHNS后,分别显示在图25至图29。由于这些器官的第一静态成像时间点为在给药后的1小时,在这项研究中没有观察到这些浓度-时间曲线的起始阶段。对于所述肝脏、肾脏、心脏和皮肤的浓度-时间曲线,显示了平坦的阶段(在给药后从1至8小时)。

该平坦阶段在给药后在脑中持续24小时,意味着:脑吸收所述IV给药蛋白质慢于外周器官。剩余的数据显示了接近一级动力学的末期消除阶段。

[0515] 在所述肝脏、肾脏、心脏和皮肤中的消除半衰期为:对肝脏 47 ± 10 和 38 ± 13 小时,对肾脏 54 ± 25 和 29 ± 16 小时,对心脏 36 ± 15 和 42 ± 19 小时,以及对皮肤 40 ± 21 和 31 ± 13 小时,分别对应于在1和10mg/kg;同时在所述脑中的半衰期为 71 ± 23 和 60 ± 53 小时(在10mg/kg组中的大鼠3被排除,因为没有充分的数据来测定 $t_{1/2}$),分别对应于在1和10mg/kg。在这些器官中在1和10mg/kg之间没有显著性差异,例外的是对肾脏 p 值 <0.03 。

[0516] 对于所述肝脏、皮肤、肾脏、心脏和大脑的平均值和 C_{max} 为:9.6、0.3、0.25、0.22、和0.08ug/g(在1mg/kg),以及132、7.9、3.9、3.7和1.8ug/g(在10mg/kg)。对于这些器官,在10mg/kg的 C_{max} 与在1mg/kg相应值的比率为14、26、16、17和23。在将来自个体动物的所述 C_{max} 值相对于剂量归一化后,在所有这些器官中,所述 C_{max} /剂量值在10mg/kg显著高于在1mg/kg(大多数 p 值 <0.05 ,对于肝脏 $p=0.06$)。对于肝脏、皮肤、肾脏、心脏和大脑的AUClast值为:525、16、14、9.3和7hr.ug/g(在1mg/kg);以及6747、276、183、201和86hr.ug/g(在10mg/kg)。对这些器官,AUClast在10mg/kg与AUClast在1mg/kg相应值的比率分别为13、17、13、22和12。在归一化后,所述AUClast/剂的值在10mg/kg显著高于1mg/kg,在所述皮肤中($p < 0.01$);略微不同地,在所述心脏中($p=0.06$);并且与在所述肝脏、脑和肾脏中(所有 p 值 > 0.34)显著不同。

[0517] 这些观察现象意味着:(1)在大多数器官中的半衰期为大约2天,例外的是所述脑(大约3天);(2)在所述肝脏中每克暴露大于所述皮肤、心脏和肾脏(其大于所述脑);(3)伴随10倍增加,在剂量(10/1mg/kg),来自所有测试器官的 C_{max} 值在10mg/kg增加超过10倍(比在1mg/kg)。

[0518] 在所述脑中的顶峰浓度在IV给药后1-24小时(T_{max})达到。

[0519] IV相对于IT治疗的比较

[0520] 在图30和图31中,分别比较了在IV和IT施用后(在1和10mg/kg),在所述脑和肝脏中的浓度-时间曲线。在所述脑中,通过IT/IV,在1和10mg/kg, C_{max} 的比率分别为3212和1501。这些AUC0-192hr的比率为1136和978。这些观察现象表明:当相同剂量的rhHNS被注射时,鞘内施用导致所述脑比静脉施用约大3个数量级的暴露。在所述脑中的消除半衰期为:IT 2天(45和49小时,在1和10mg/kg),以及IV 3天(71和60小时,在1和10mg/kg),在两个施用剂量水平。

[0521] 尽管如此,在IT给药后的肝暴露与IV给药后的相似,在相同剂量的rhHNS。在肝脏中 C_{max} 的比率(通过IT/IV,在1mg/kg和10mg/kg)为0.5和0.8,并且AUClast的比率分别为0.4和1.2。

[0522] 结论

[0523] 在大鼠中,在单一静脉内或者鞘内施用1或者10mg/kg的 ^{124}I -硫酸胺酶后,通过组织PET成像,研究 ^{124}I -硫酸胺酶(rhHNS)的药代动力学和生物分布属性。在感兴趣区域中,在给药后0.05、1、2、4、8、24、48、96和192小时,动态地(所述第一个20分钟)和静态地获得浓度-时间数据。通过在IT给药后的动态成像,在所述头部区域中的rhHNS总量,以0.005/min-0.007/min(平均值 λ_z)近似的恒定速率减少(在所述第一个20分钟中)。通过静态成像,从所述脑的消除速率,在两个测试剂量(λ_z :0.016/hr相对于0.014/hr,分别对应于1和10mg/

kg),基本相同,并且伴随近似的半衰期(大约2天)。

[0524] C_{max} 和AUClast的值与所述施用剂量成正比,并且在所述1至10mg/kg的剂量范围(在这些IT单一给药方案中给予的)表现了线性的PK行为。

[0525] 在两个剂量水平,从所述近端至远端,都观察到浓度梯度。

[0526] 在IT给药后,所述顶峰浓度在大约20分钟观察到(在近端),1至4小时(在中间),以及1至8小时(在远端切片)。在脊椎柱的不同切片中表明了线性PK行为。

[0527] 在IT给药后,rhHNS蛋白质在肝脏中是可测量的,从较早时间多达96小时(在1mg/kg),以及192小时(在10mg/kg)。所述消除速率在1mg/kg(λ_z 0.030/hr)高于10mg/kg(λ_z 0.017/hr),伴随相应的较短 $t_{1/2}$ (在较低剂量)(28 ± 16 相对于 42 ± 1 小时,分别在1和10mg/kg的剂量)。

[0528] 在IV给药后,在所述肝脏、肾脏、心脏和皮肤中的消除半衰期为:对于肝脏 47 ± 10 和 38 ± 13 小时,对于肾脏 54 ± 25 和 29 ± 16 小时,对于心脏 36 ± 15 和 42 ± 19 小时,以及对于皮肤 40 ± 21 和 31 ± 13 小时,分别在1和10mg/kg;同时在所述脑中的半衰期为 71 ± 23 和 60 ± 53 小时。对于所述肝脏、皮肤、肾脏、心脏和大脑的 C_{max} 平均值为:9.6、0.30、0.25、0.22和0.08ug/g(在1mg/kg),以及132、7.9、3.9、3.7和1.8ug/g(在10mg/kg)。在将来自个体动物的所述 C_{max} 值相对于剂量归一化后,在所有这些器官中,所述 C_{max} /剂量值(在10mg/kg)显著高于在1mg/kg,(大多数p值 <0.05 ,对于肝脏 $p=0.06$)。对于所述肝脏、皮肤、肾脏、心脏和大脑的AUClast值为:525、16、14、9.3和7hr.ug/g(在1mg/kg);以及6747、276、183、201和86hr.ug/g(在10mg/kg)。在归一化后,所述AUClast/剂量值(在10mg/kg)显著高于在1mg/kg(在皮肤中)($p<0.01$),与在心脏中略微不同($p=0.06$),并且与在肝脏、脑和肾脏中(所有p值 >0.34)显著不同。

[0529] 实施例6.用rhHNS治疗Sanfilippo A(San A)患者

[0530] 可以使用通过例如IT递送直接施用CNS,以有效治疗San A患者。这个实施例解释了多剂量递增研究,其被设计以评估:多达3个剂量水平每隔一周(EOW),持续40周的rhHNS施用(通过鞘内药物递送设备(IDDD))至San A患者的安全性。适合于人类治疗的多种示例性鞘内药物递送设备在图32-35中描述。

[0531] 在一个特定的实施例中,招募至多16例患者:

[0532] 队列1:4例患者(最低剂量-10mg)

[0533] 队列2:4例患者(中剂量-30mg)

[0534] 队列3:4例患者(最高剂量-100mg)

[0535] 4例患者被随机分配至没有治疗组或者使用设备。

[0536] Sanfilippo综合症类型A患者通常表现意识和神经发育损伤,包括早期发育的重要事件(例如,走路、讲话、如厕训练)的延缓、智力缺陷、活动过度、听力损失、言语发展障碍、运动技能缺陷、活动过度、攻击性和/或睡眠障碍等等。所有的迹象可以是评判标准的部分。进行此研究的所述患者的选定是基于以下包含的标准:(1)3-18岁的年龄;(2)小于77的智商、或者在过去的3年内15至30IQ点的下降;(3)没有CSF shut或者控制不佳的癫痫症以及(4)没有并发病呈现麻醉和/或手术风险。

[0537] 在患有晚婴型Sanfilippo综合症类型A的儿童中,通过IT注射施用rhHNS,6个月,测定了递增剂量rhHNS的安全性。登记和逐步递增应该非常缓慢,以提供患者安全性的充分

评估。另外,评估了rhHNS对粗大运动功能的临床活性、血清中单一和重复剂量药代动力学、以及在脑脊髓液(CSF)中的浓度。

[0538] 本研究的目的是评估rhHNS递增剂量的安全性和耐受性,以及所述IDDD的安全性、耐受性和长期通畅性。此外,也评估了:在单一和重复IT剂量后的rhHNS浓度(包括在CSF和血液中),以及rhHNS对CF生物标记物和泌尿GAG的影响。进一步的评估包括:rhHNS对临床参数的影响,包括生理学和神经认知评估、神经功能和脑结构容积。此外,也可以评估:治疗对日常生活的影响,以及在生物标记物和症状之间的关系。

[0539] 通常地, Sanfilippo综合症类型A患者的治疗,通过IT递送rhHNS导致GAG在多种组织(例如神经系统、肾脏、胆囊,和其它器官)中累积减少。

[0540] 虽然本文描述的某复合物、组合物和方法已经根据某实施方案进行特定的描述,但是所述实施例仅用于解释本发明的复合物,并且不用于限制必须与其相同。

[0541] 所述冠词“a”和“an”,如本文在说明书中和权利要求书中使用的,除非清楚地表明与之相反,应该被理解为包括其复数形式。在某组的一个或多个成员之间包括“或者”的权利要求或者描述,被认为:如果一个、一个或多个、或所有组成员存在、被采用或者以其它方式与给定的产品或过程相关,那么就是符合的;除非从上下文中表示相反或者其它方式明显地指出。本发明包括这样的实施方案:其中所述组的只有一个成员存在、或者被采用、或者以其它方式与给定的产品或过程相关。本发明也包括这样的实施方案:其中多个、或者整个组成员存在、或者被采用、或者以其他方式与给定的产品或过程相关。而且,应该理解,本发明包括来自一条或多条所列出的权利要求所有的变型、组合、以及置换,其中一种或多种限制、元素、条款、描述性术语等,其根据所述相同权利基础(或者相关、任意其它权利要求)被引入到另一权利要求,除非其它方式指出或者除非其对于本领域技术人员将明显地出现矛盾或者不一致。当元素以列表形式呈现(例如在Markush基团中或者类似的形式)时,应该理解,所述元素的每个亚组也是包括在内地被公开,并且任何元素可以从所述组删除。应该理解,一般而言,当本发明、或者本发明的某些方面,被指出包括特定的元素、特征等,那么本发明或者本发明的方面的某些实施方案、或者基本含有这些元素、特征等。为了简化这些实施方案,本文没有在每个案例中具体提出这么多的单词。应该理解,本发明的任意实施方案或者方面可以被清楚地从所述权利要求排出,无论所述具体的排除是否在本说明书中叙述。本文所引用的所述公开文本、网址和其它参考材料,为了描述本发明的背景、以及提供关于其实践的其它细节;都通过参考的方式引入本文。

序列表

<110> 夏尔人类遗传性治疗公司
 <120> 乙酰肝素N-硫酸酯酶CNS 递送的方法和组合物
 <130> 044534-8008CN02
 <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 版本3.5
 <210> 1
 <211> 482
 <212> PRT
 <213> 智人
 <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	
[0002]	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		
[0003]	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> 智人

<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

[0004] 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

[0005]

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				
[0006]	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											

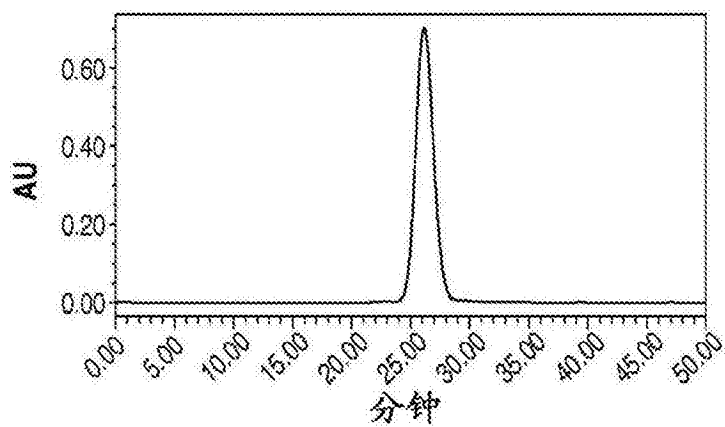


图1A

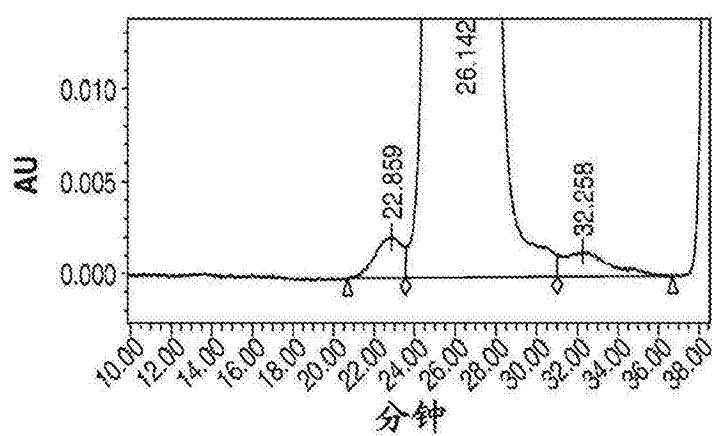


图1B

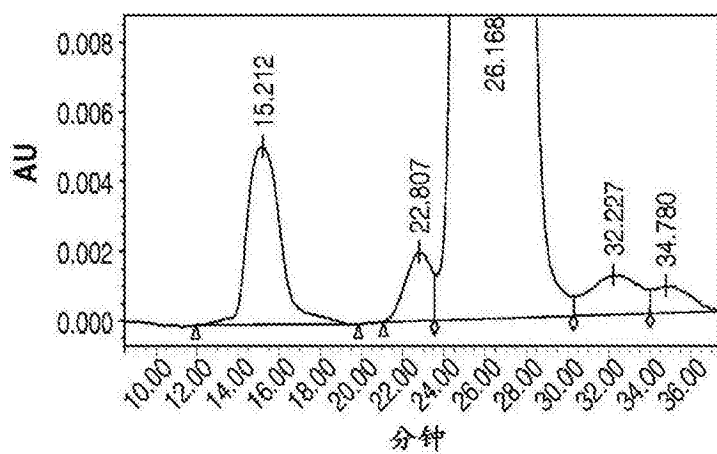


图1C

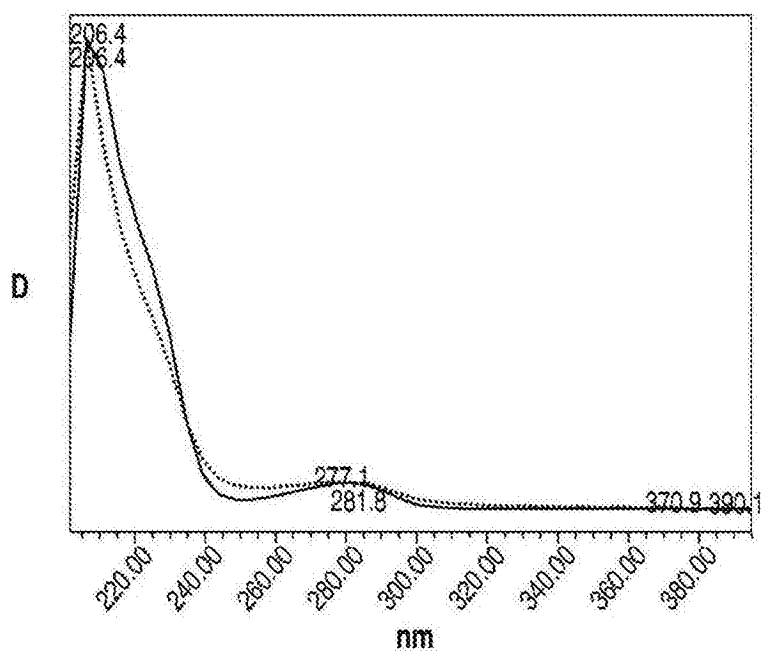


图1D

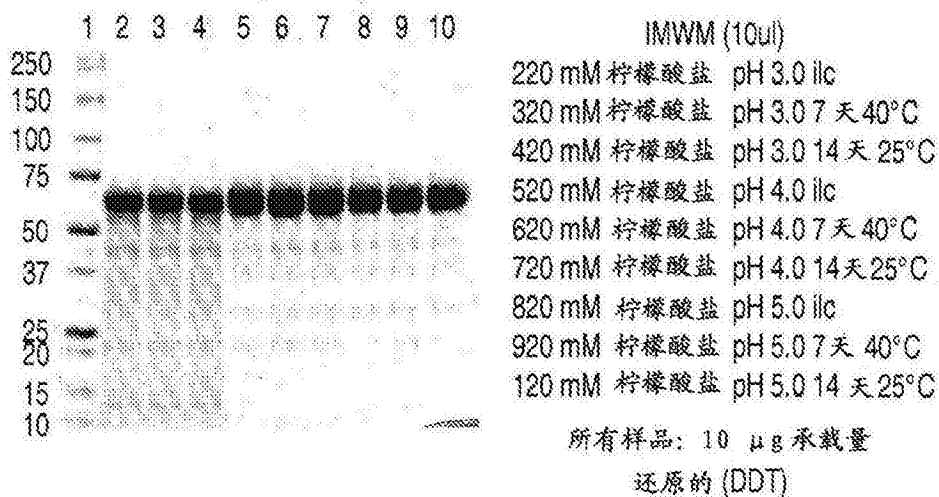


图2A

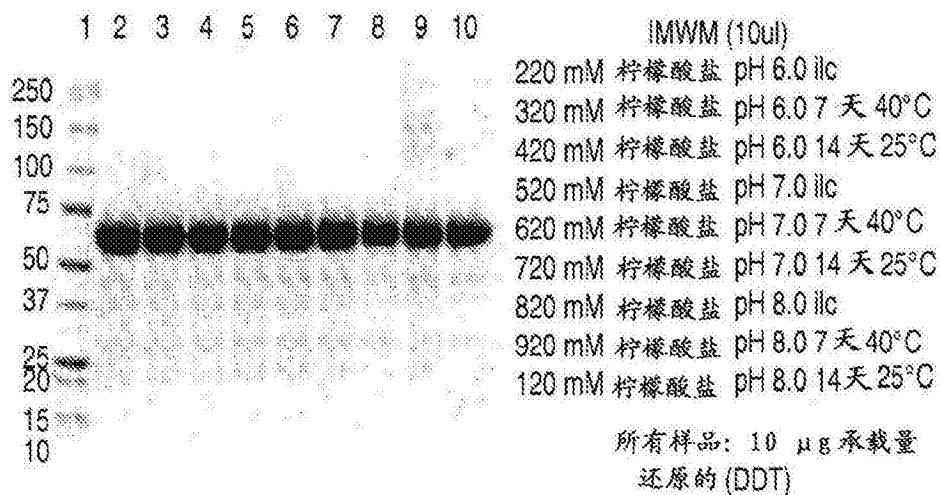


图2B

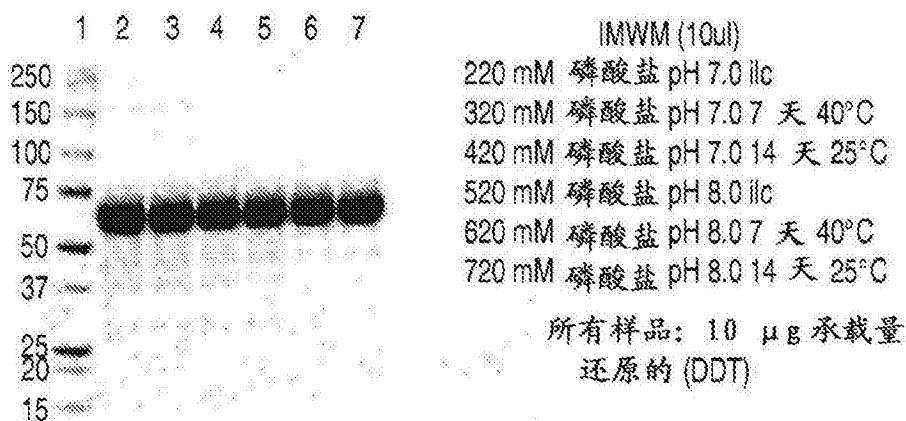


图2C

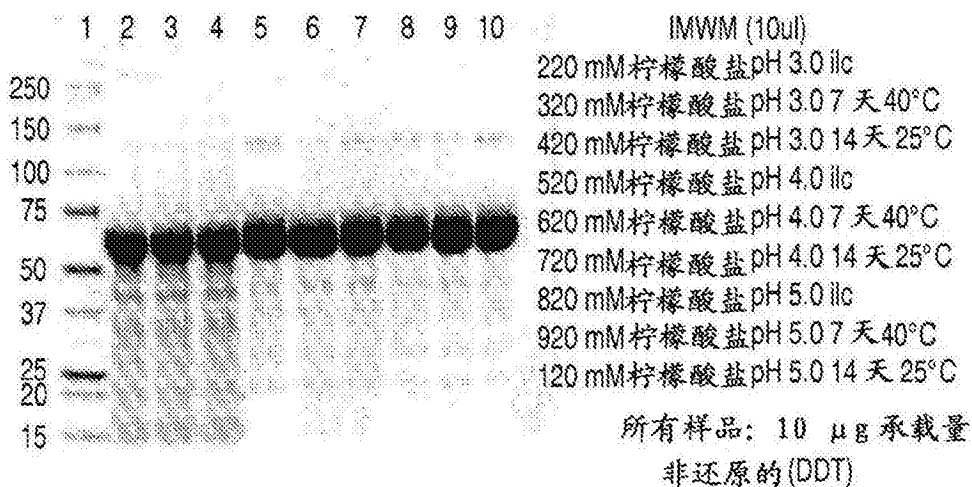


图3A

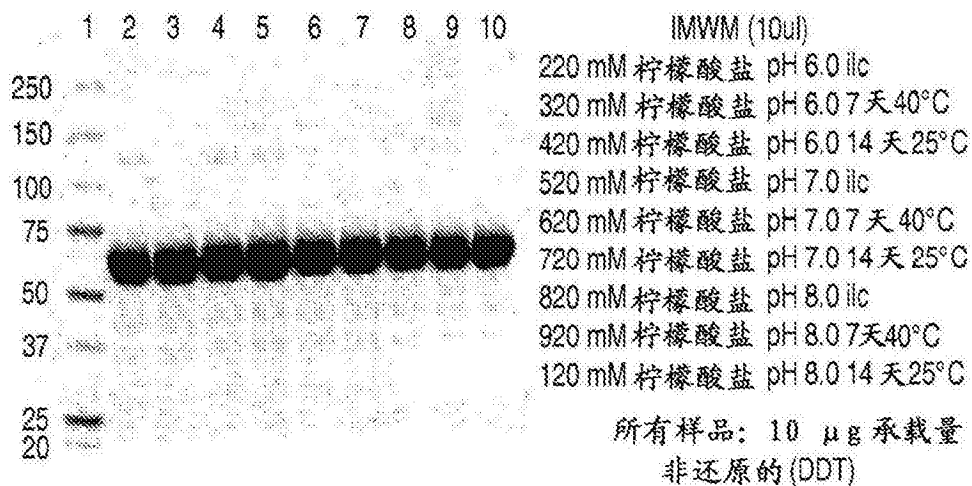


图3B

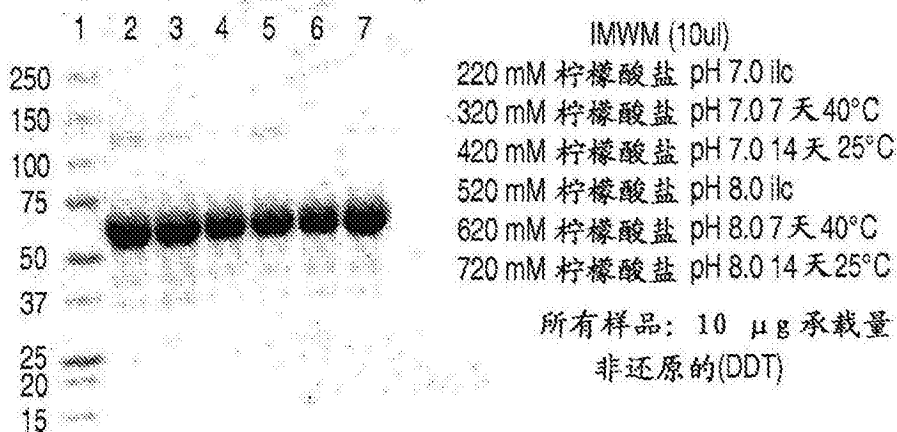


图3C

在柠檬酸盐中 HNS 的 pH 依赖性熔化

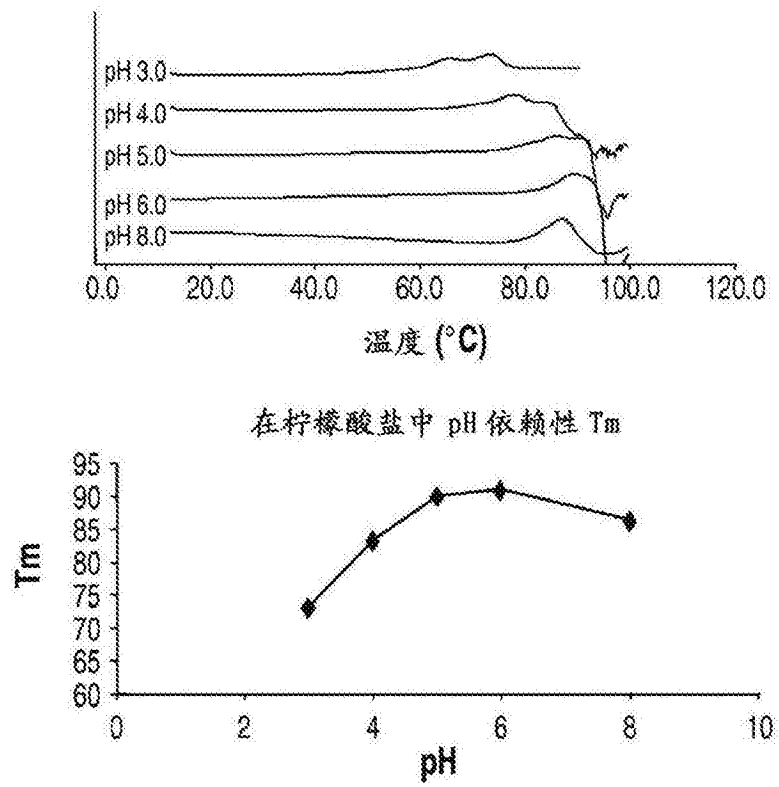


图4

在磷酸盐中 HNS 的 pH 依赖性熔化

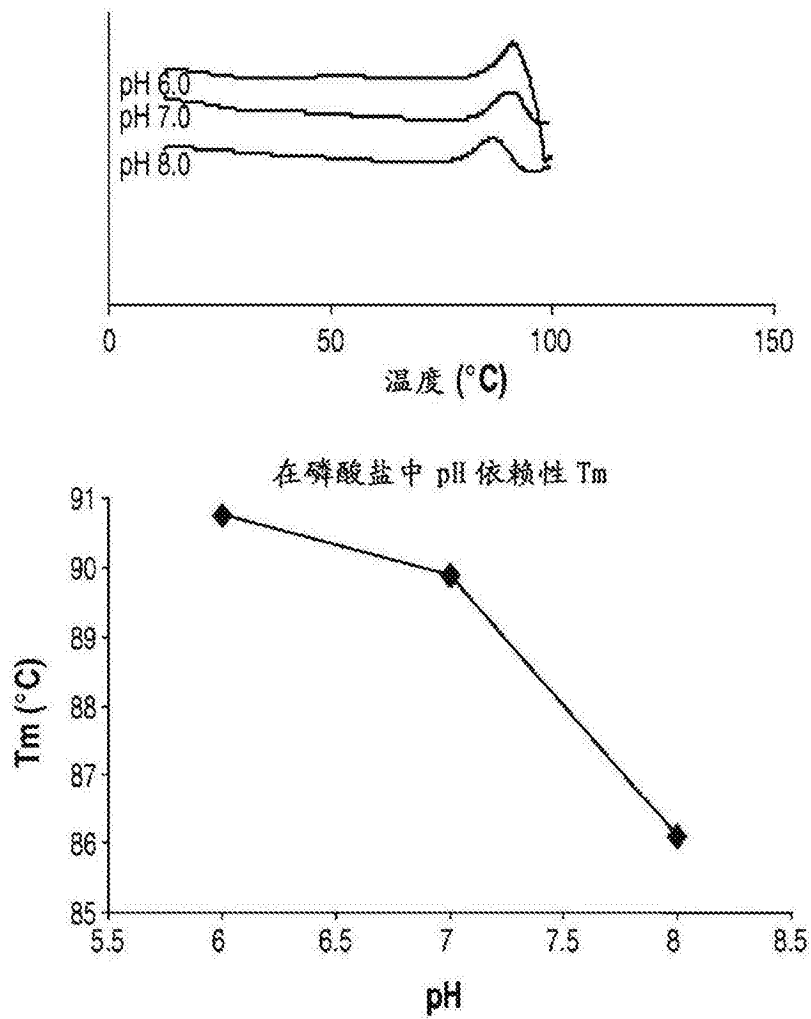


图5

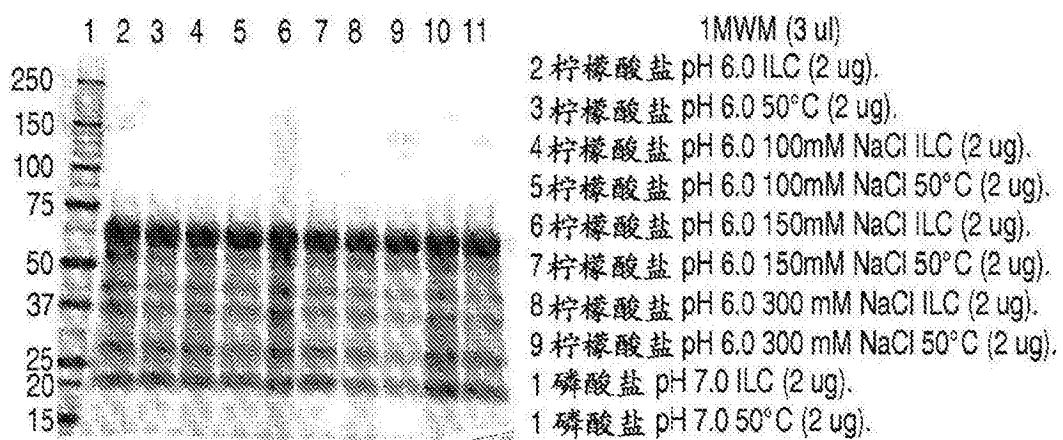


图6A

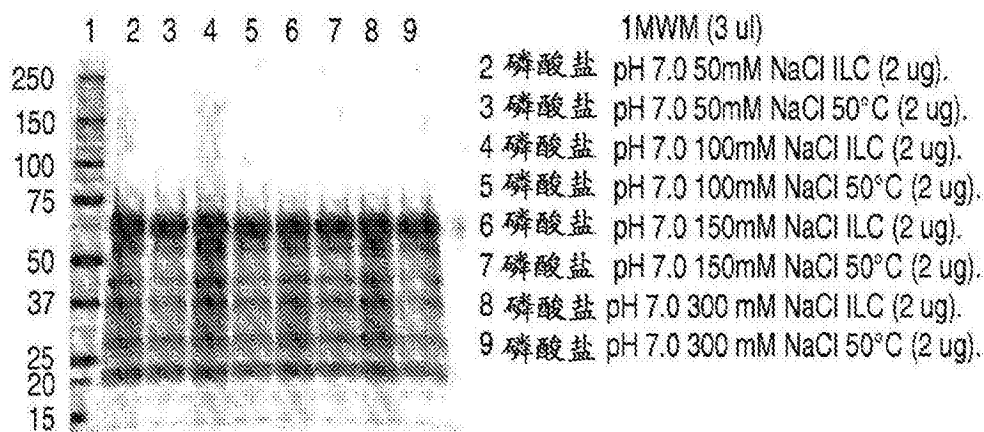


图6B

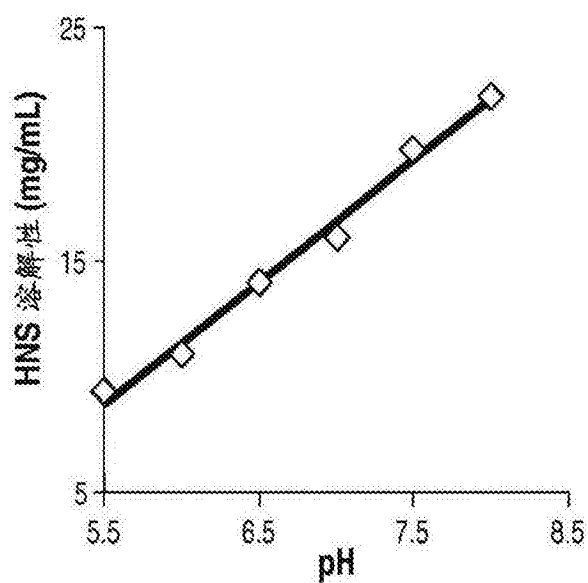


图7A

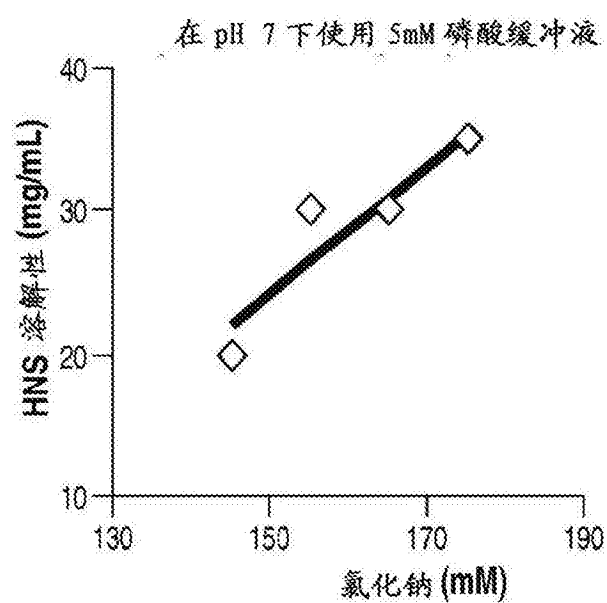


图7B

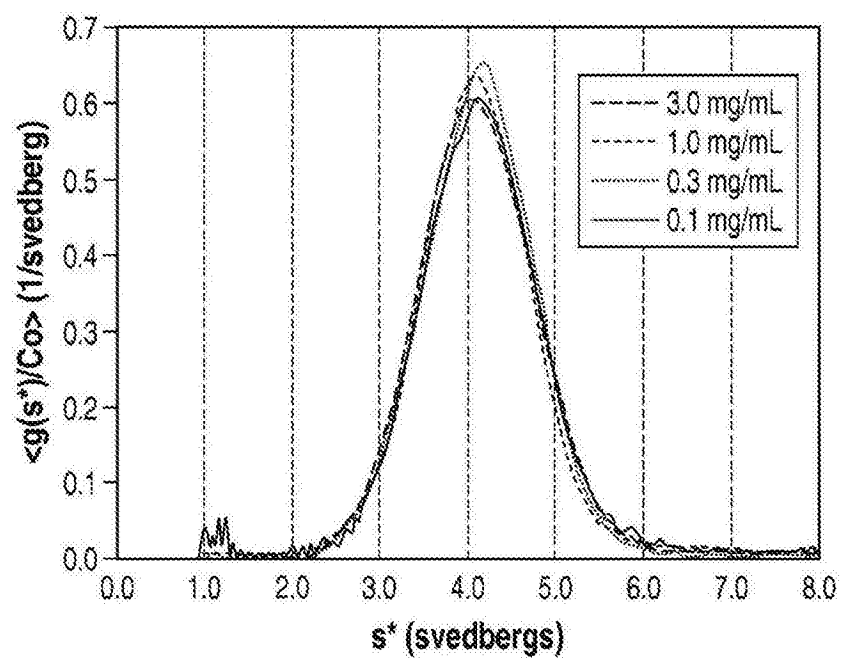


图8A

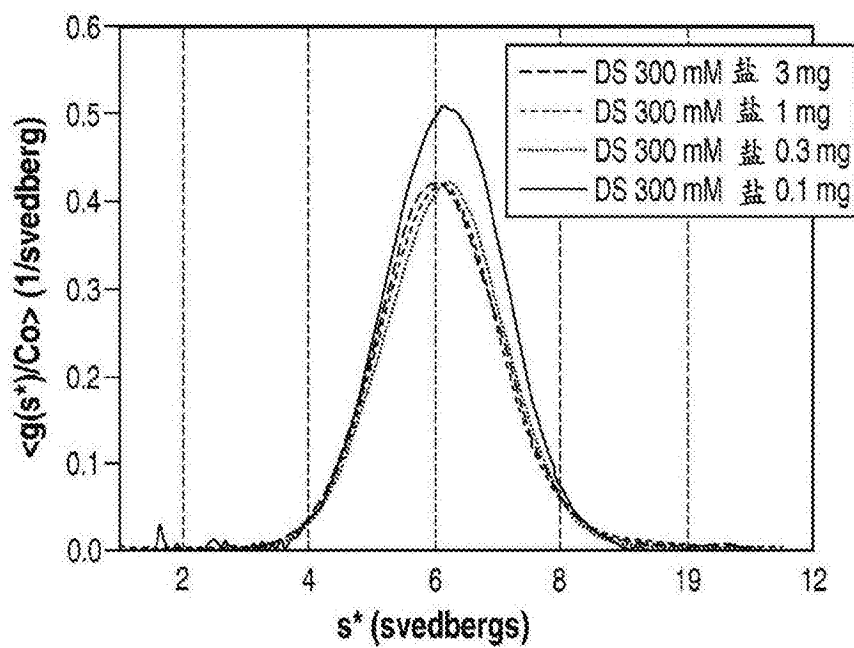


图8B

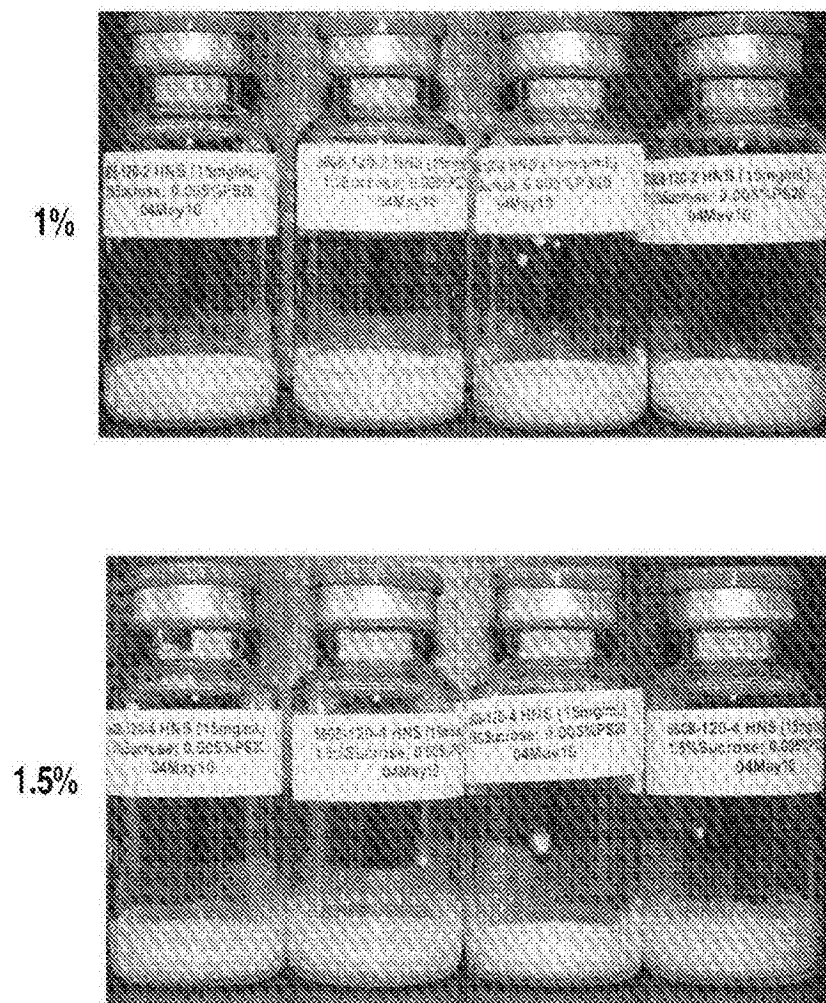


图9A

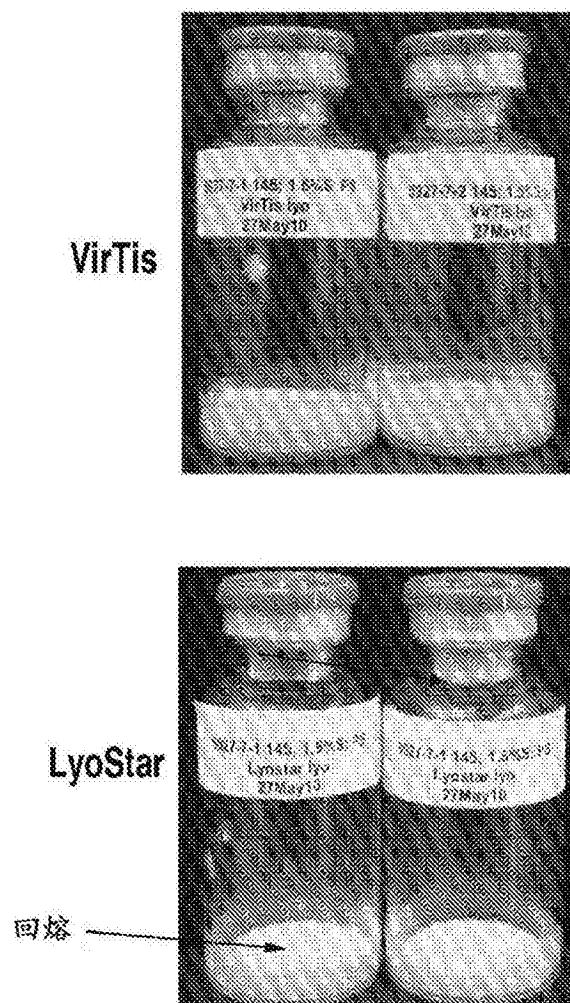


图9B

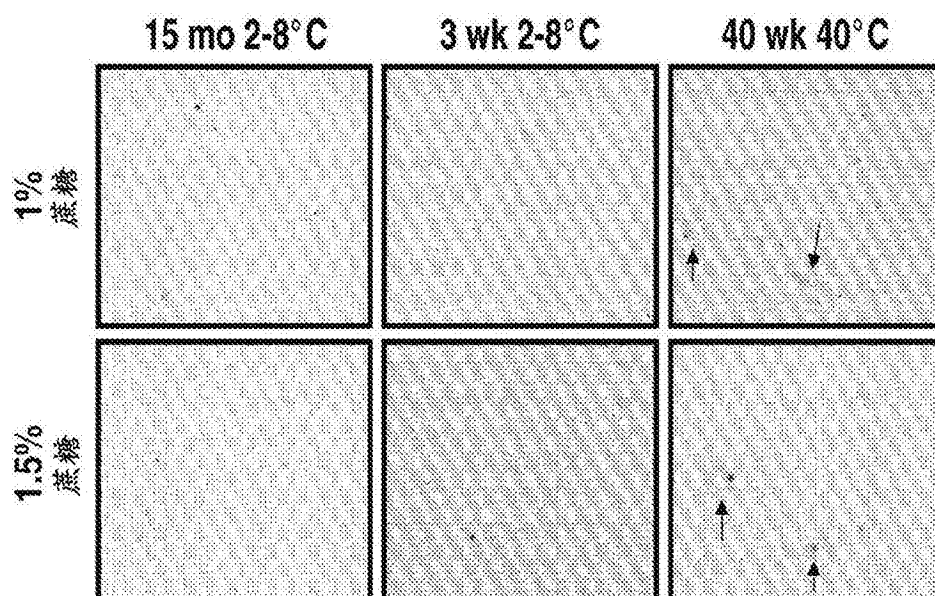


图10

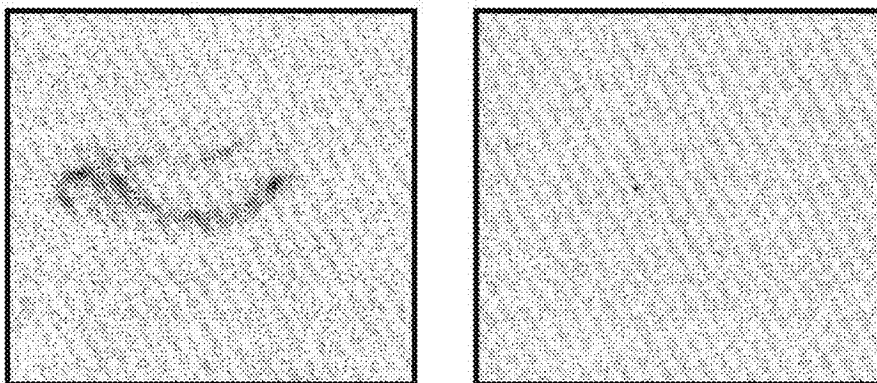
在 0.22 μm 过滤之后没有 P20在 0.22 μm 过滤之后有 P20

图11

在 CSF 中作为时间的函数的 HNS 浓度的图谱

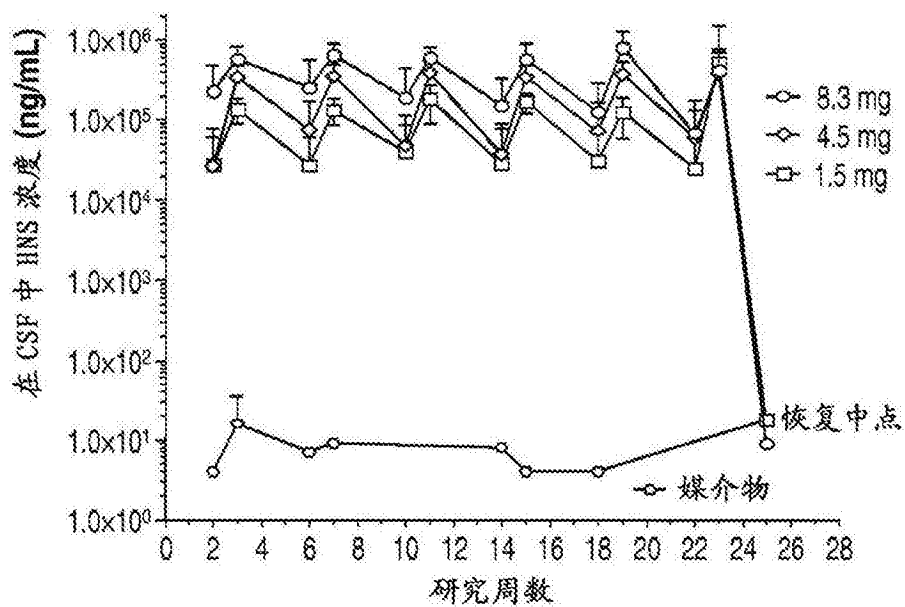


图12A

在血清比对 CSF 中作为时间的函数的抗体浓度的图谱

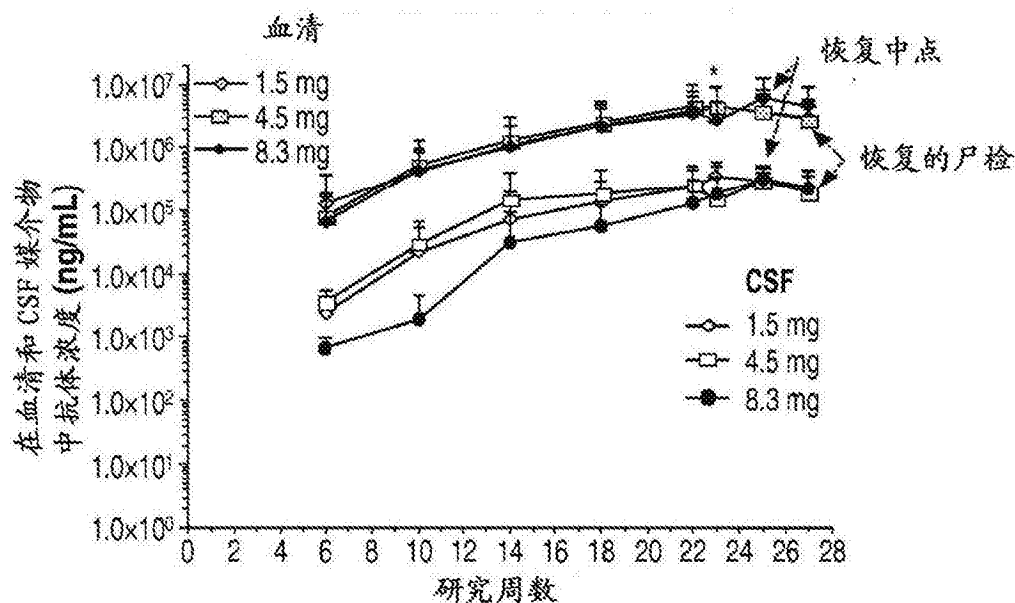


图12B

在重复 IT 给药所有三剂量水平之后在血清和 CSF 中的抗体浓度

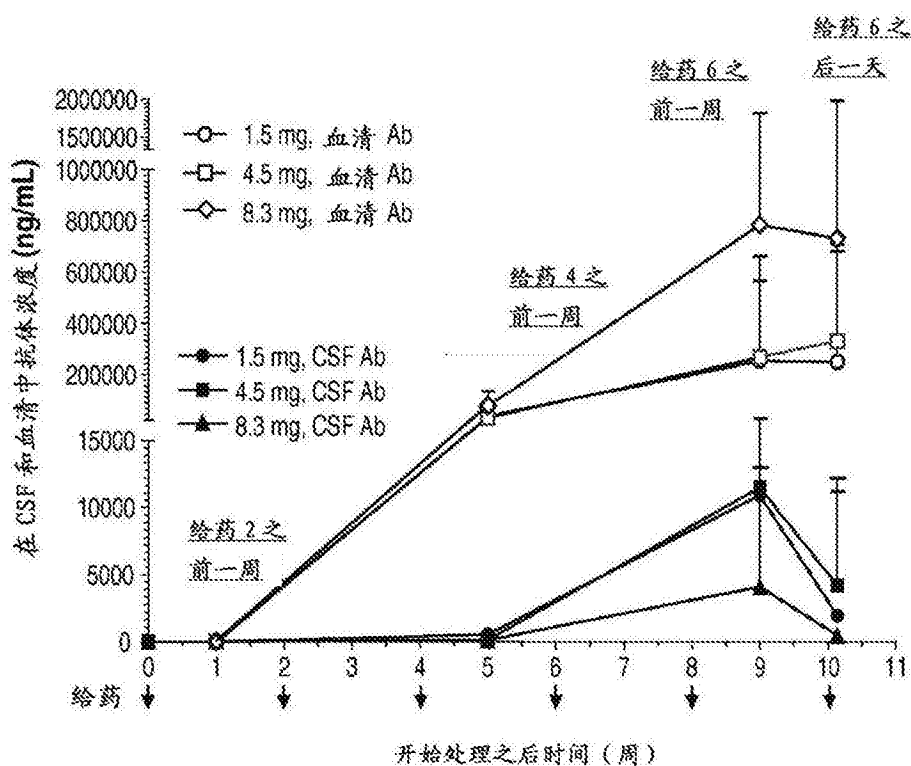


图12C

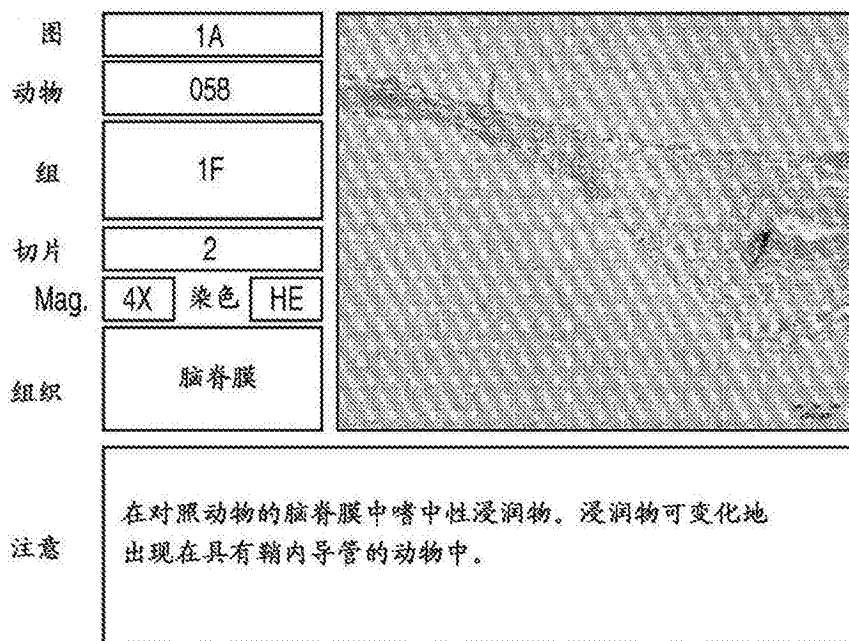


图13A

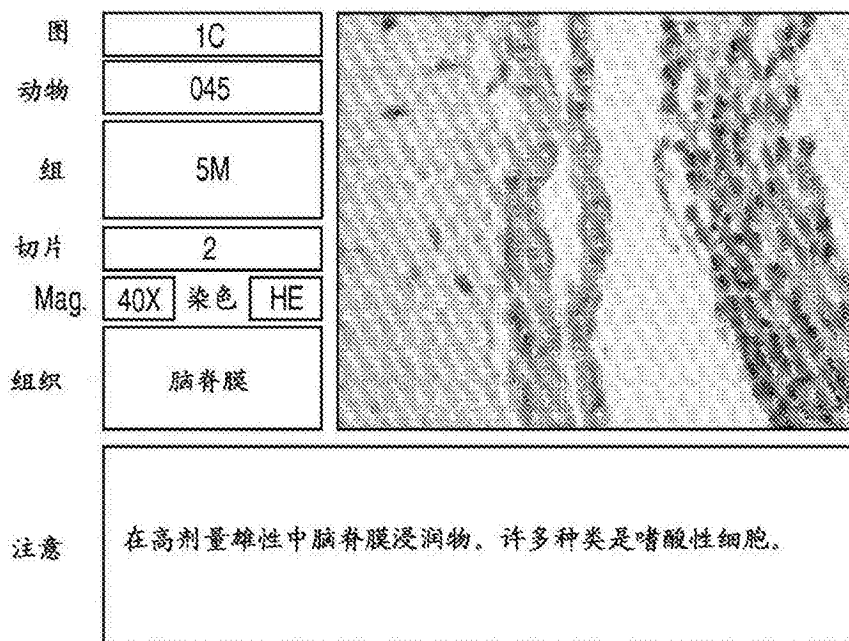


图13B

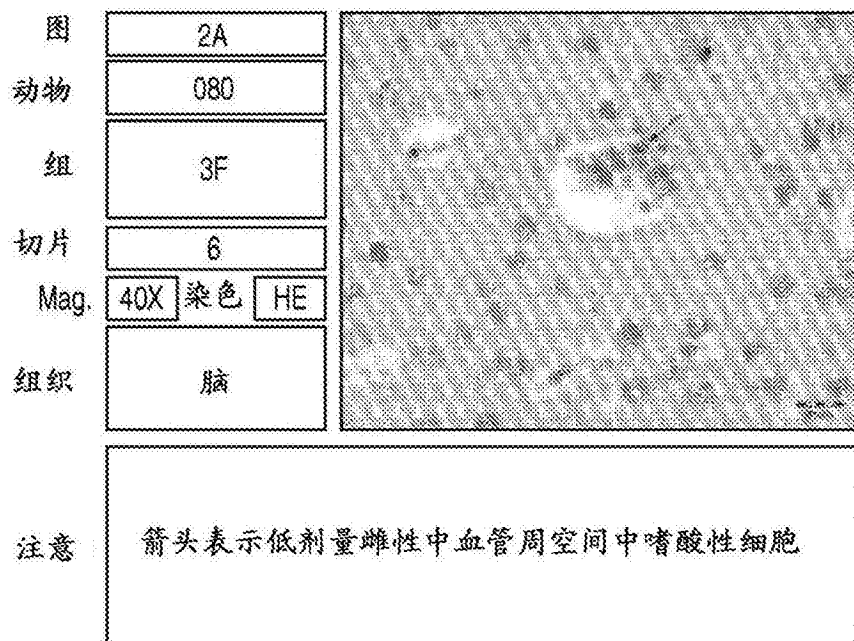


图13C

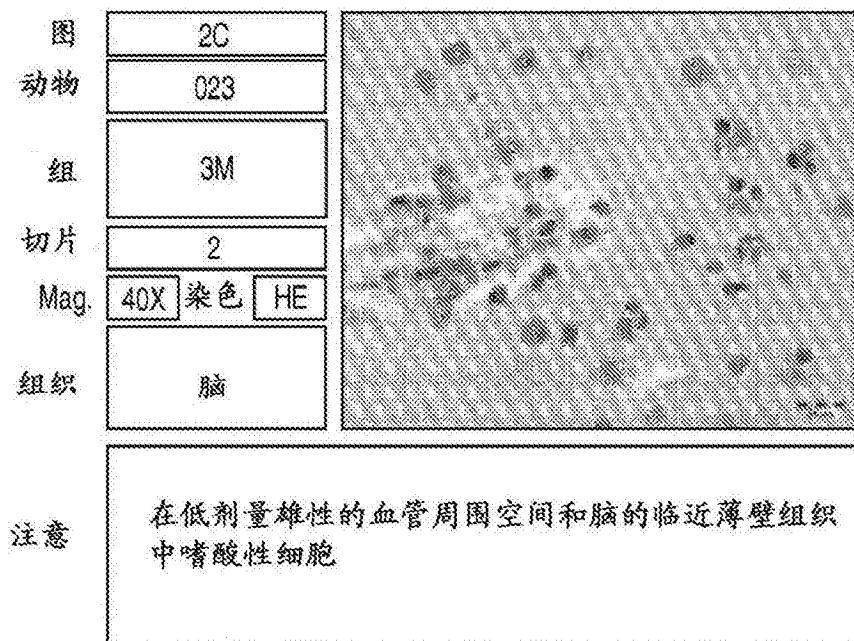


图13D

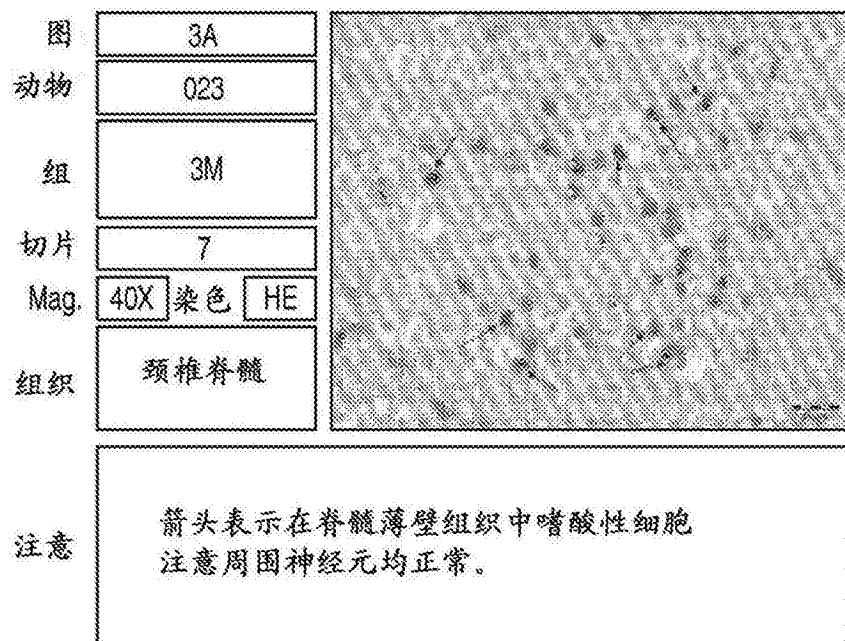


图13E

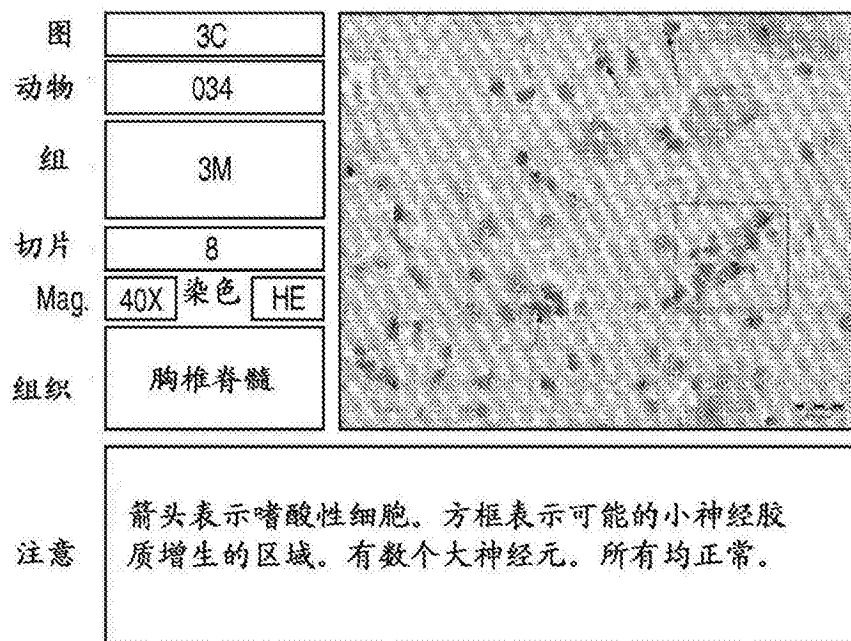


图13F

在给药 6 个月之后在雄性食蟹猴的脊椎中
HNS 酶活性 (nmol/hr/mg 蛋白)

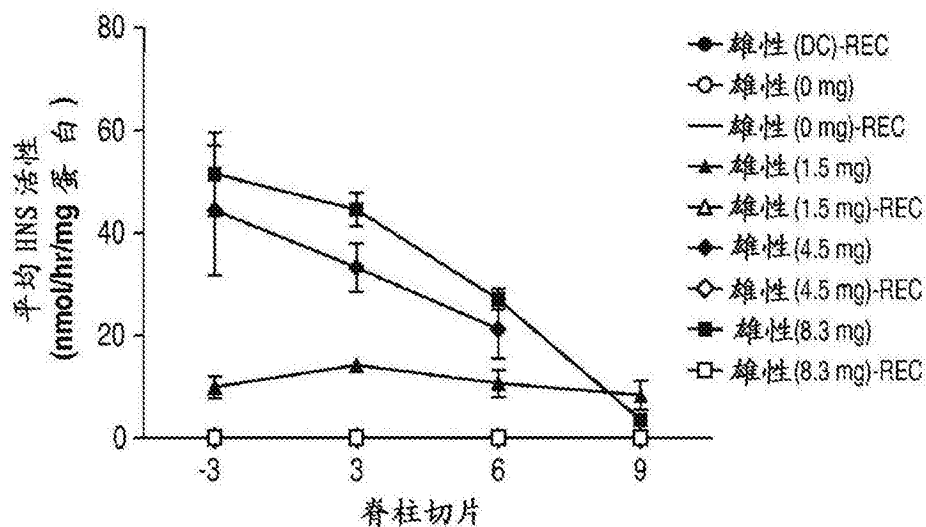


图14A

在给药 6 个月之后在雌性食蟹猴的脊椎中
HNS 酶活性 (nmol/hr/mg 蛋白)

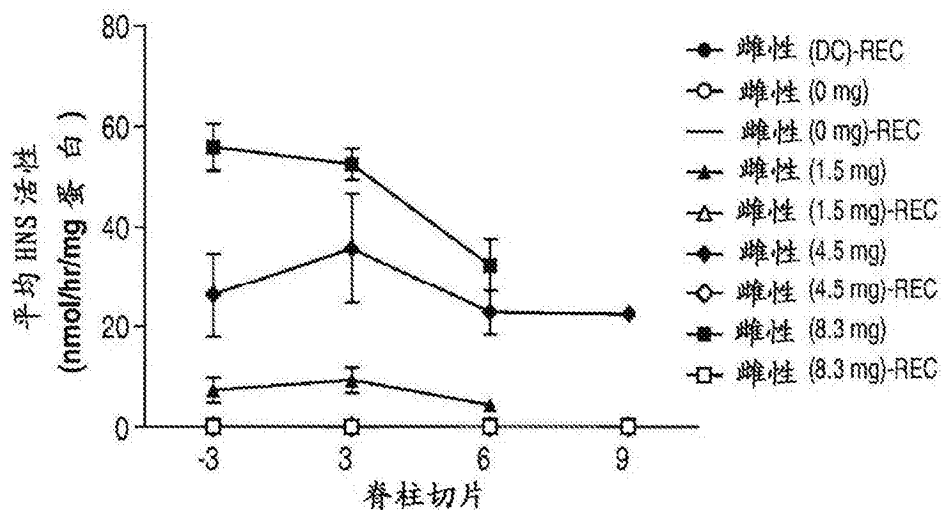


图14B

在 6 个月的给药之后在雄性食蟹猴中作为酶活性
表达的脑 rhHNS 浓度

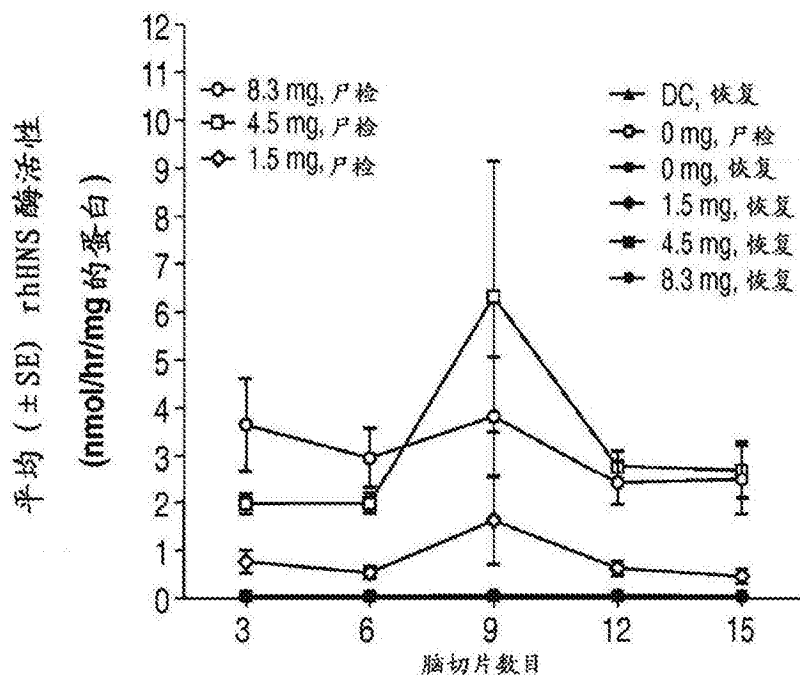


图14C

在 6 个月的给药之后在雌性食蟹猴中作为酶活性
表达的脑 rhHNS 浓度

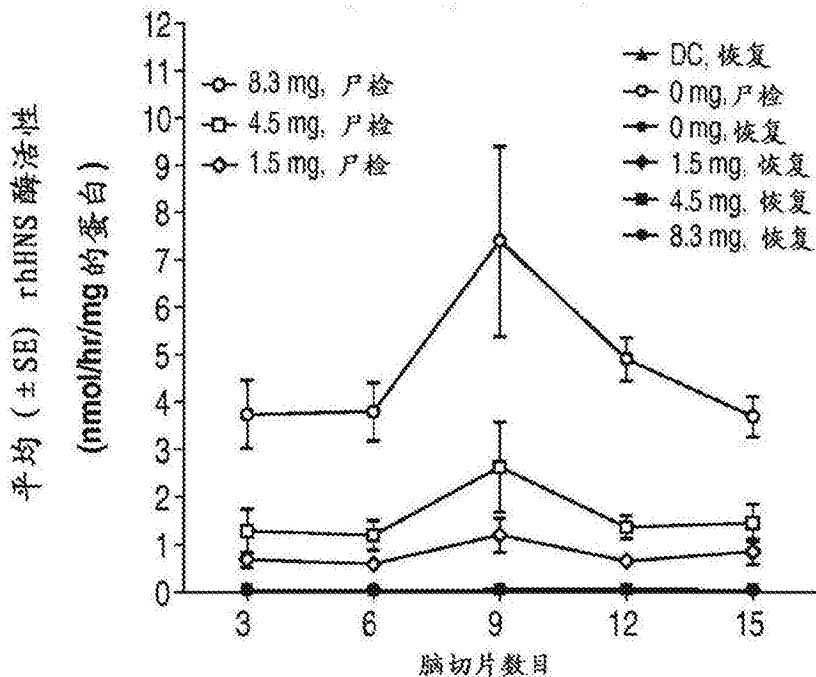


图14D

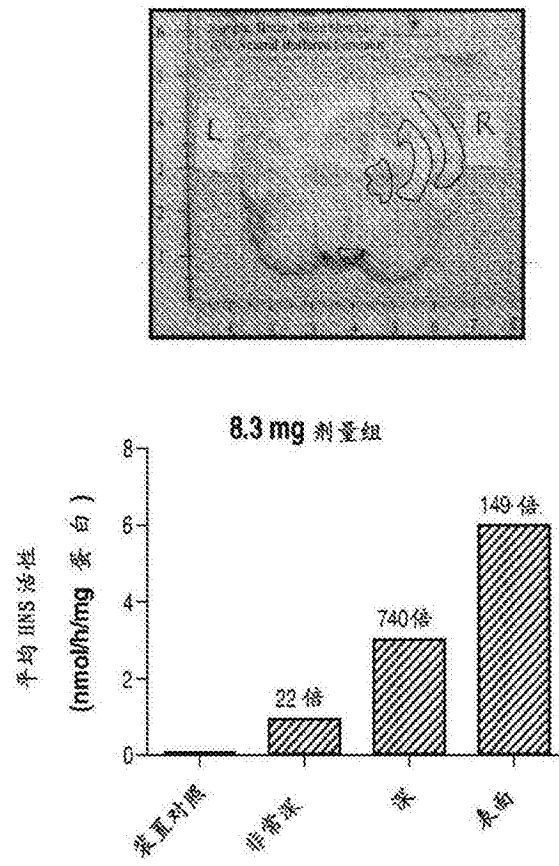


图15A

在6个月和1个月恢复期之后在食蟹猴肝脏中
平均HNS酶活性 (nmol/hr/mg 蛋白)

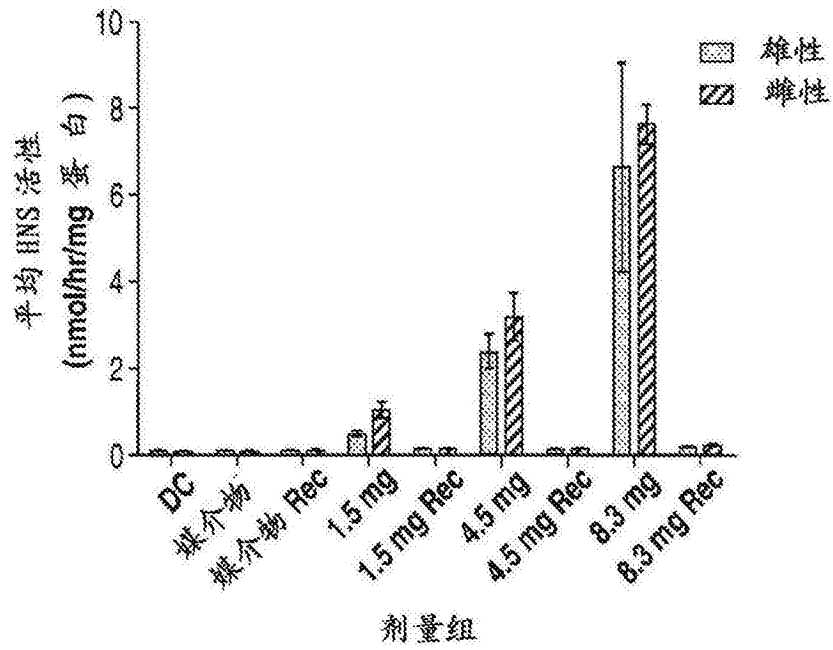


图15B



图16A

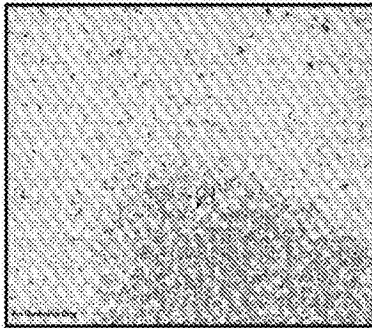


图16B



图16C

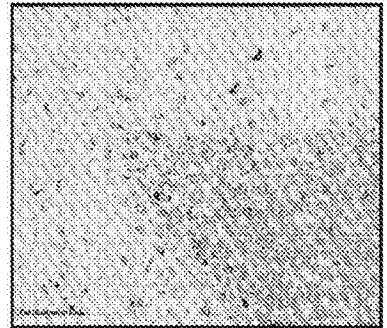


图16D

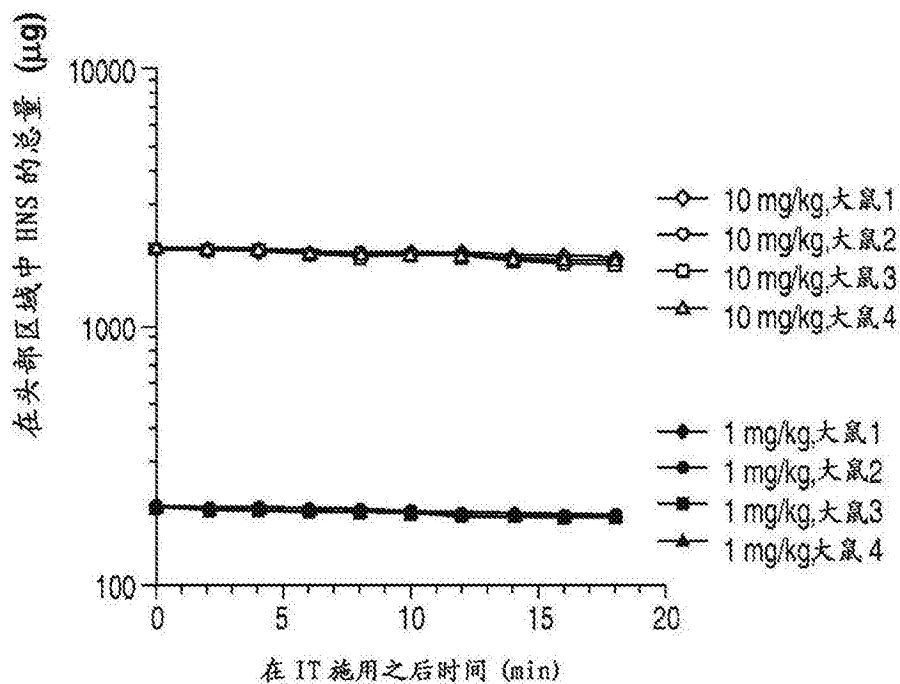


图17

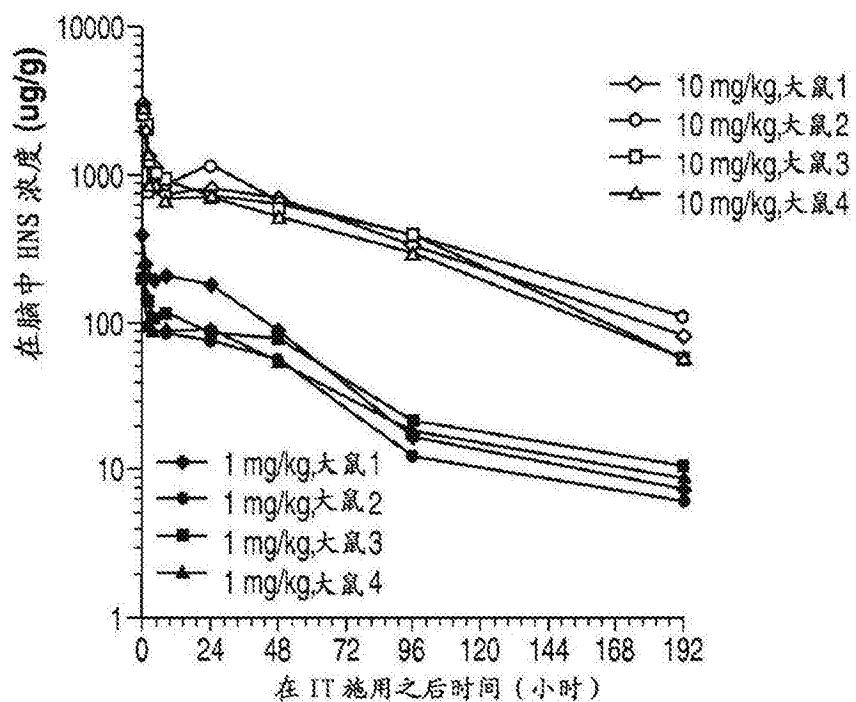


图18

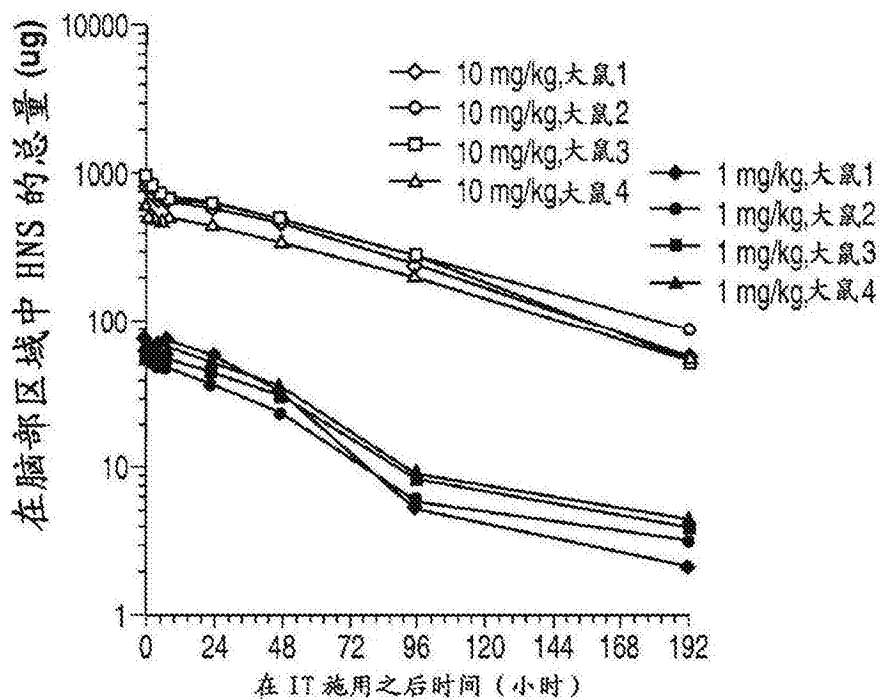


图19

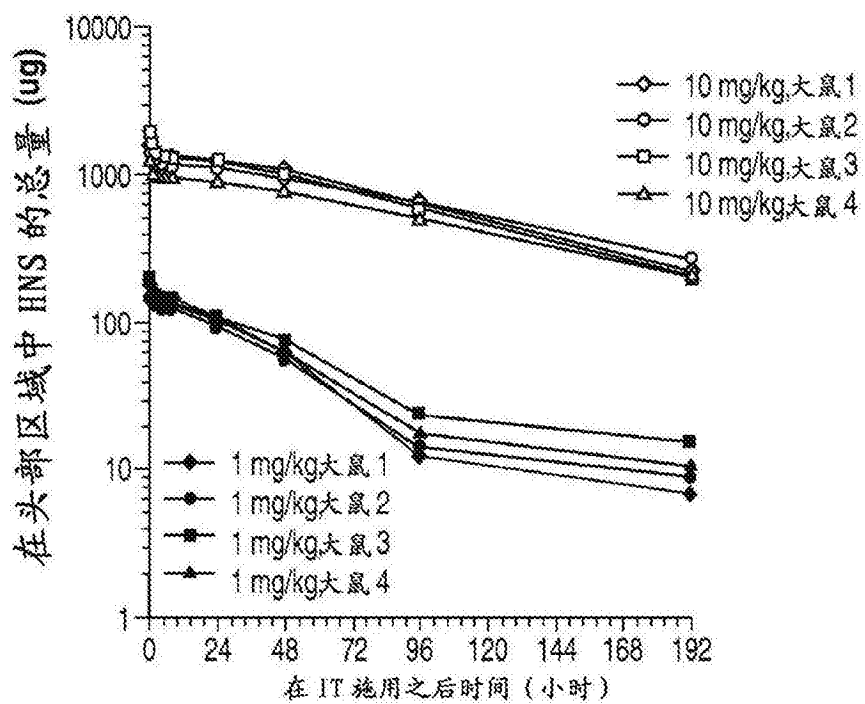


图20

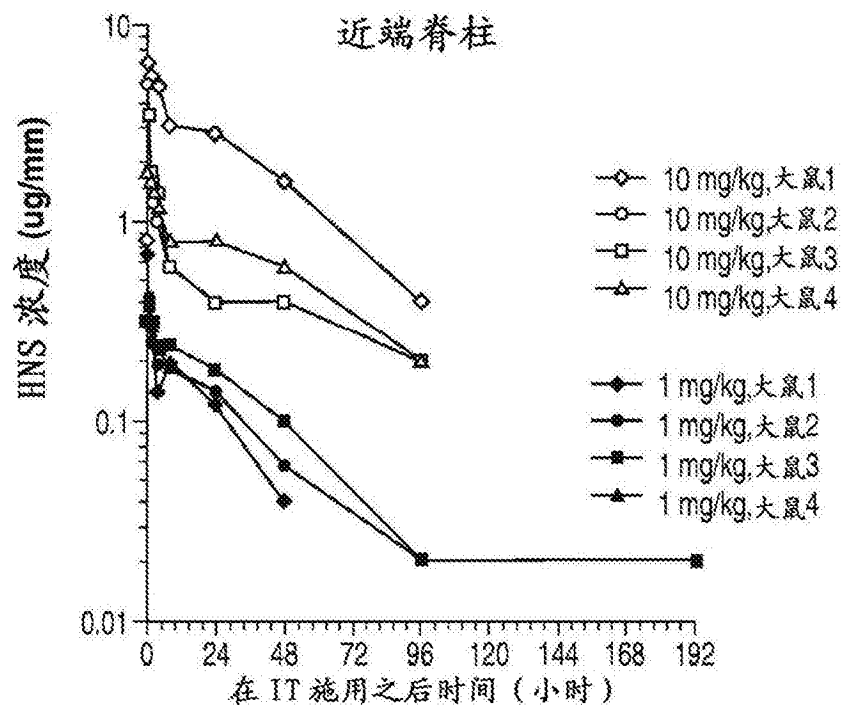


图21

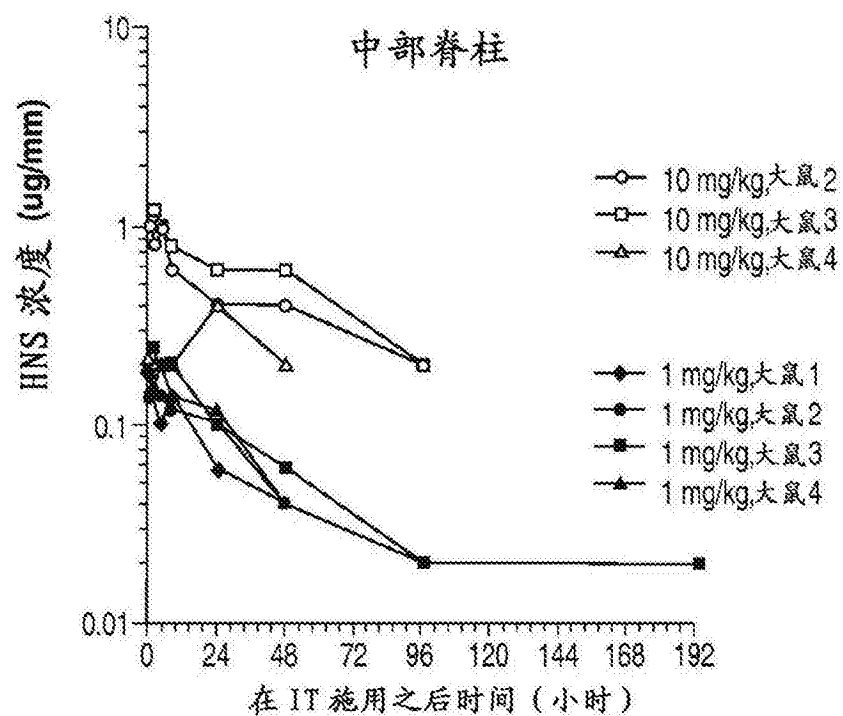


图22

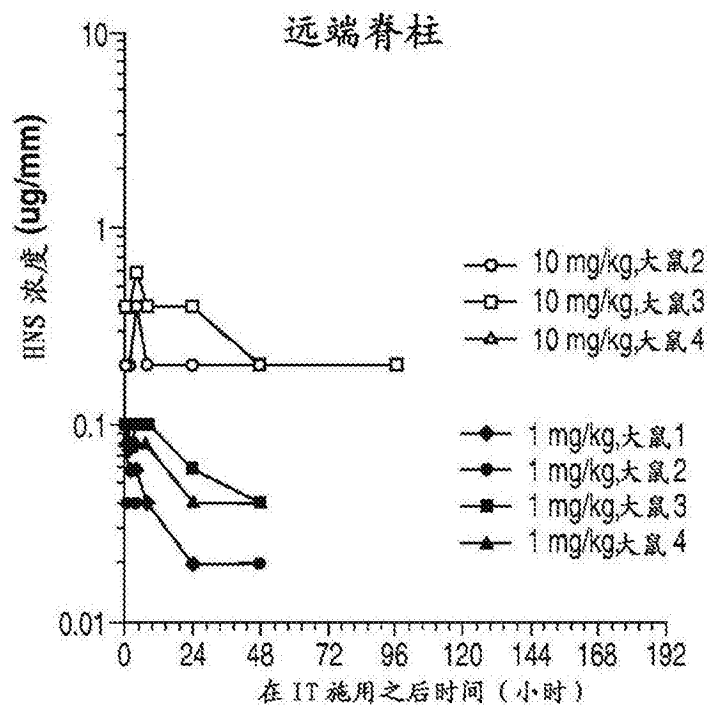


图23

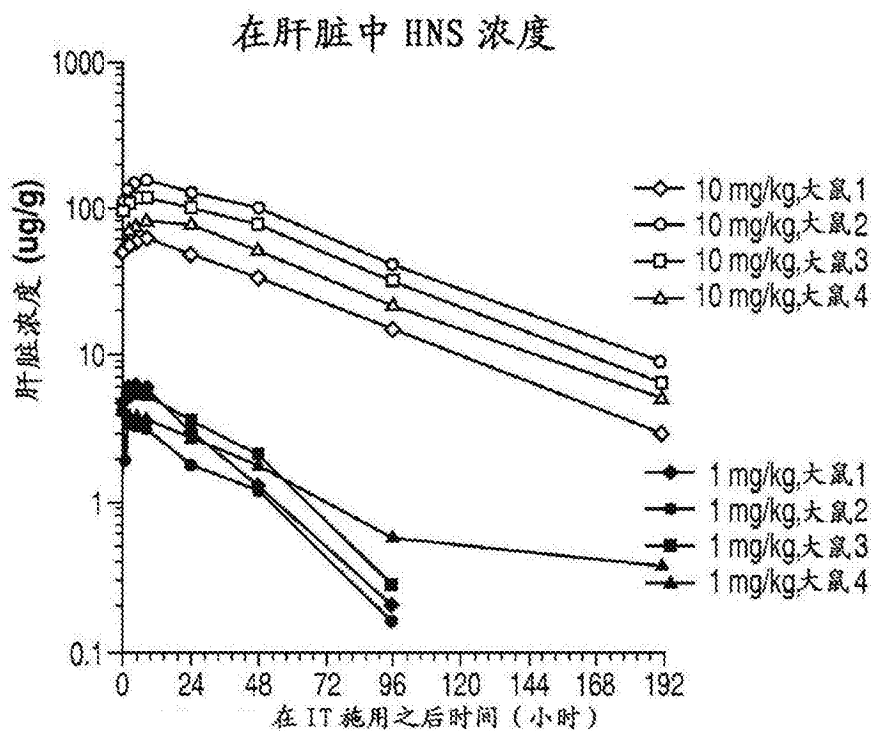


图24

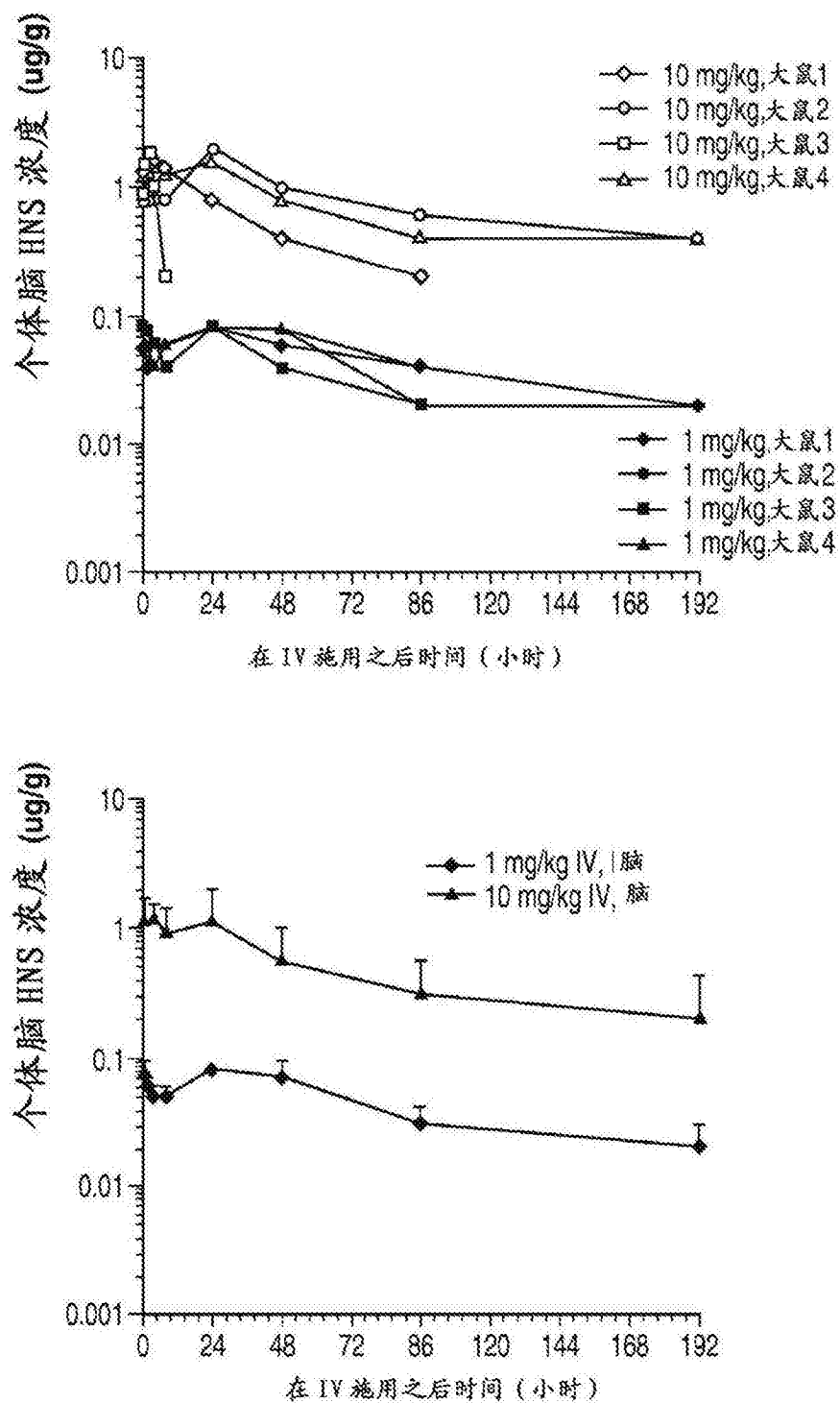


图25

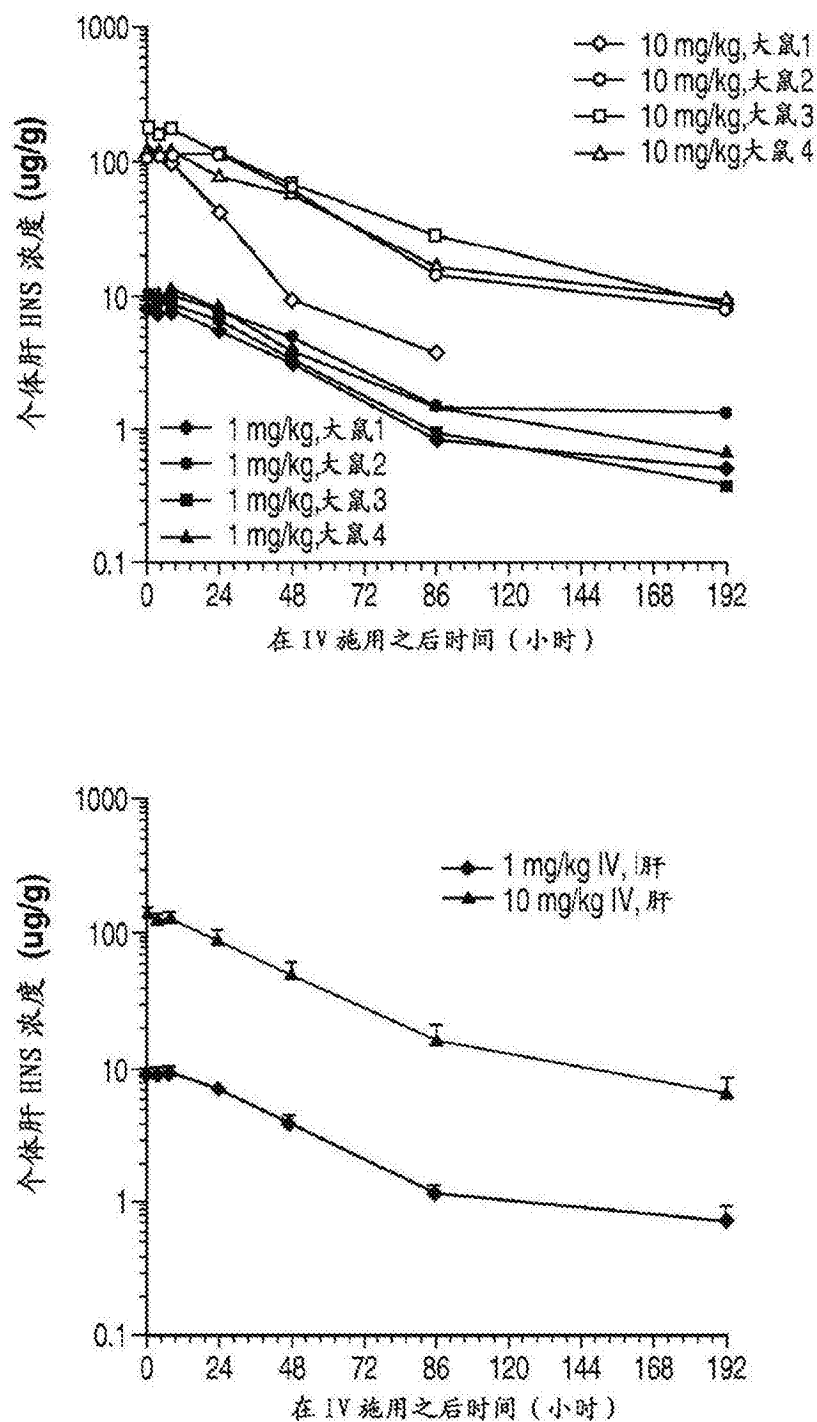


图26

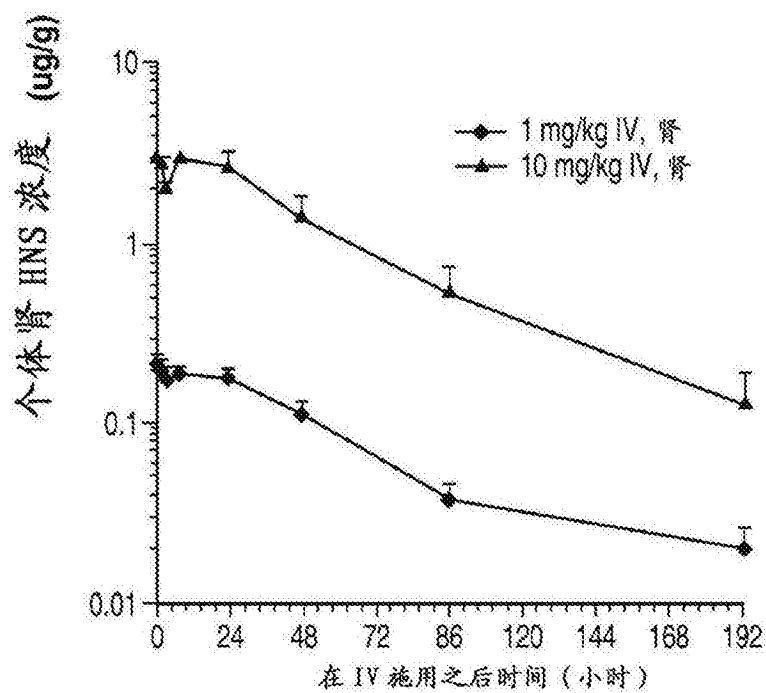
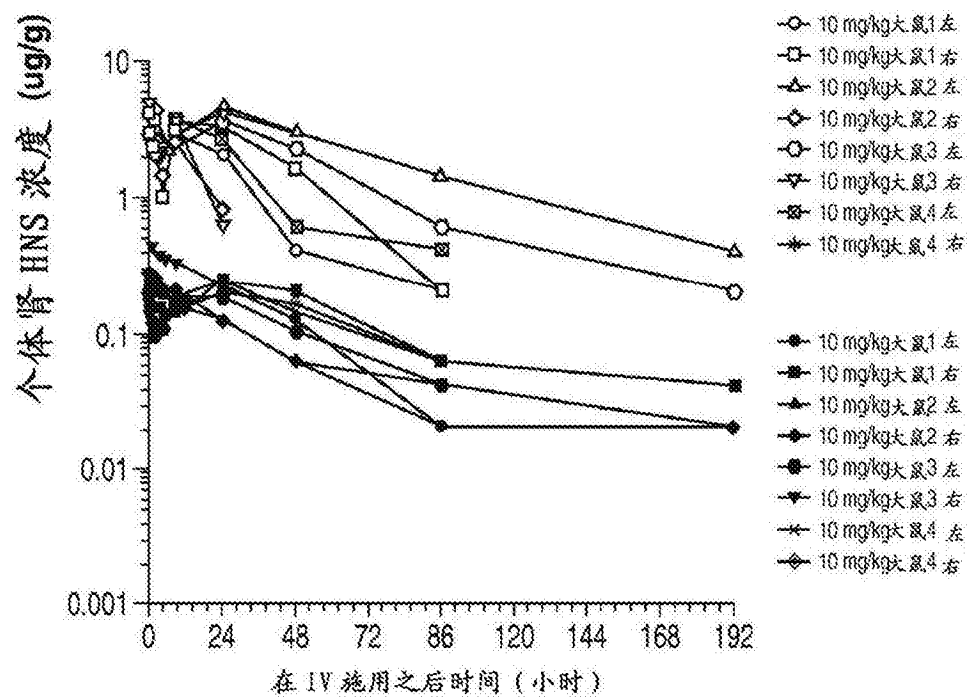


图27

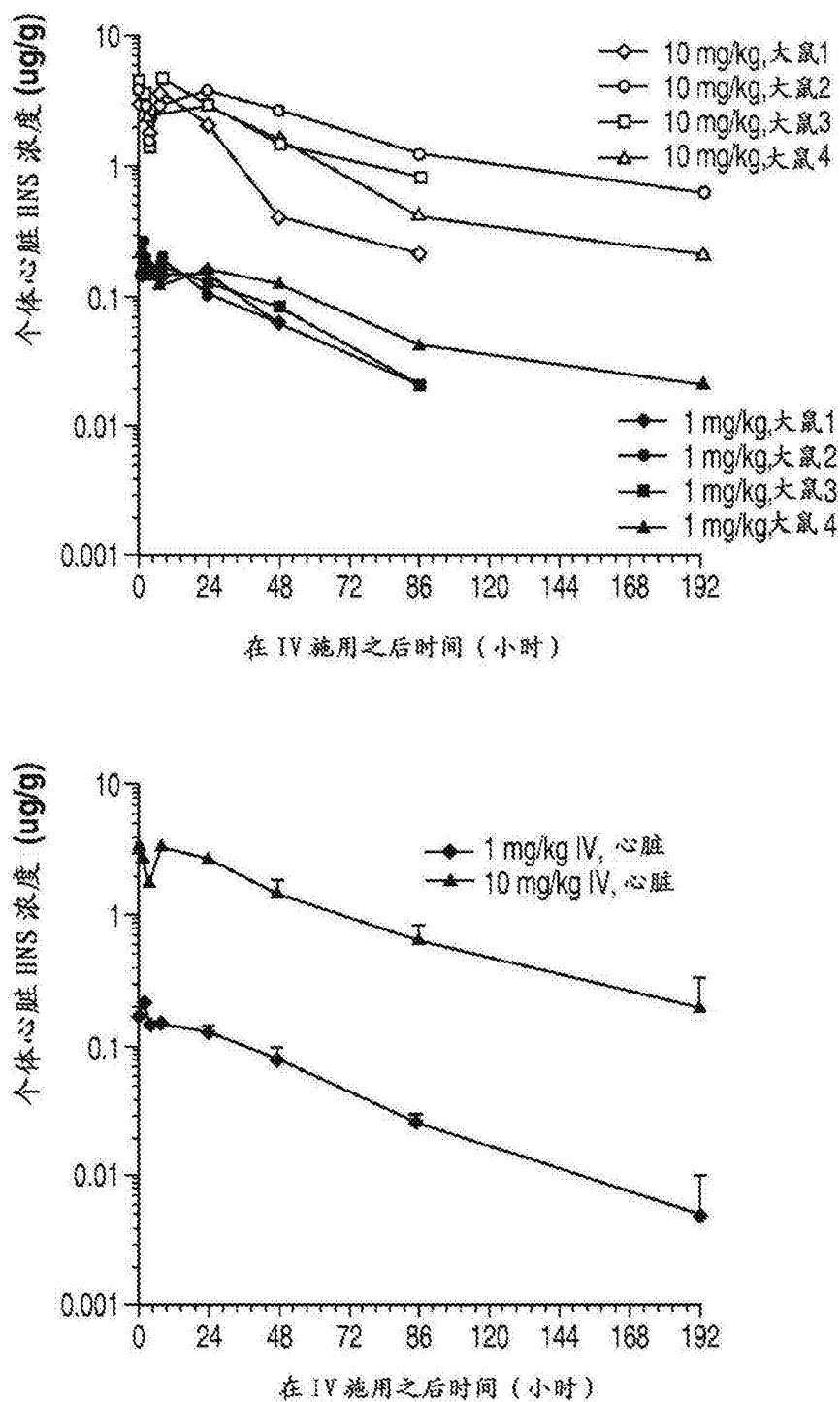


图28

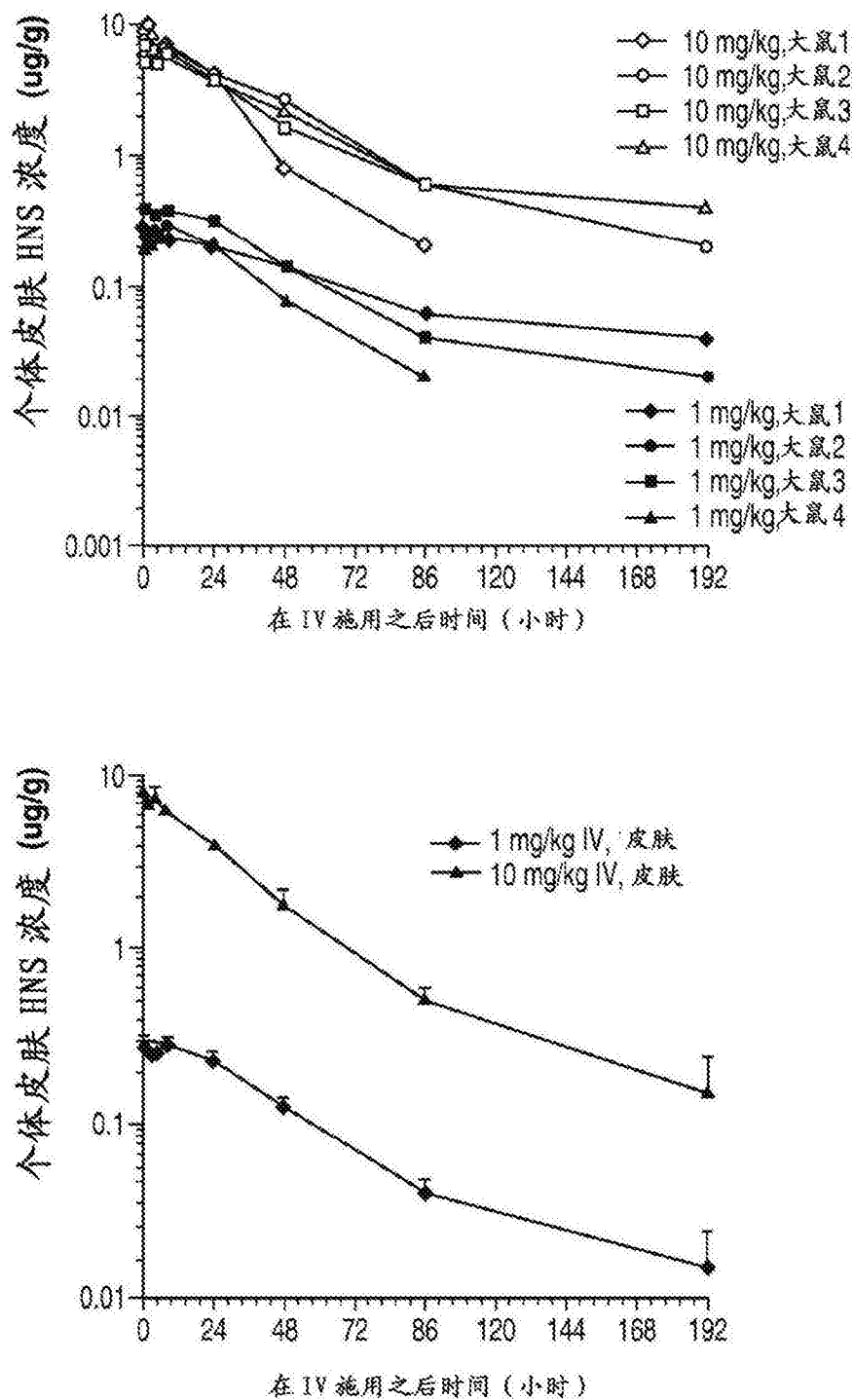
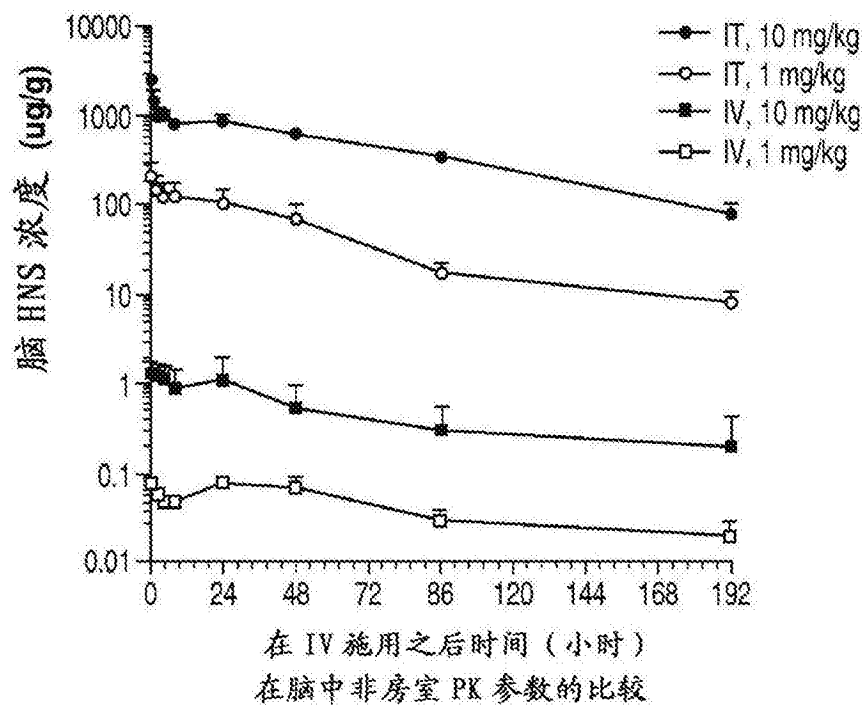
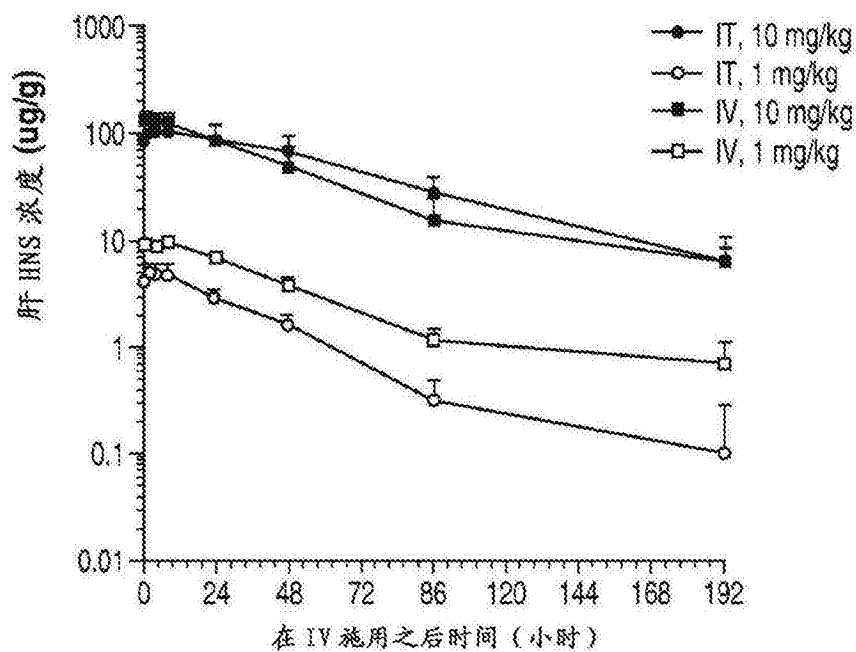


图29



	参数	单位	IT		IV		比率
			均值	SD	均值	SD	
1 mg/kg	λ_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	λ_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

图30



在肝中非房室 PK 参数的比较

	参数	单位	IT		IV		比率
			均值	SD	均值	SD	
1 mg/kg	λ_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	λ_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

图31

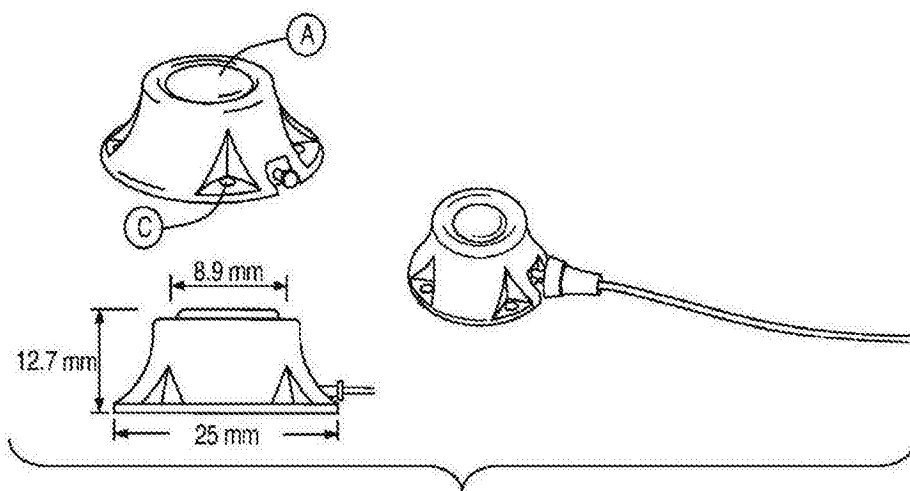


图32

Port-A-Cath 低调鞘内植入入口系统

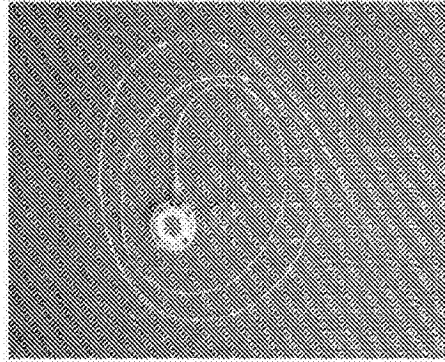


图33

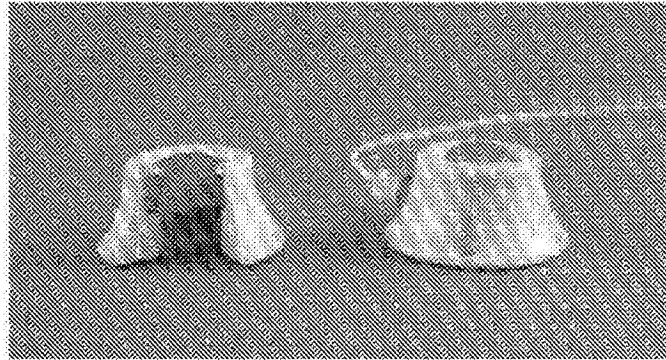


图34

使用最少工程技术和显影以
使可家庭施用 CNS ERT

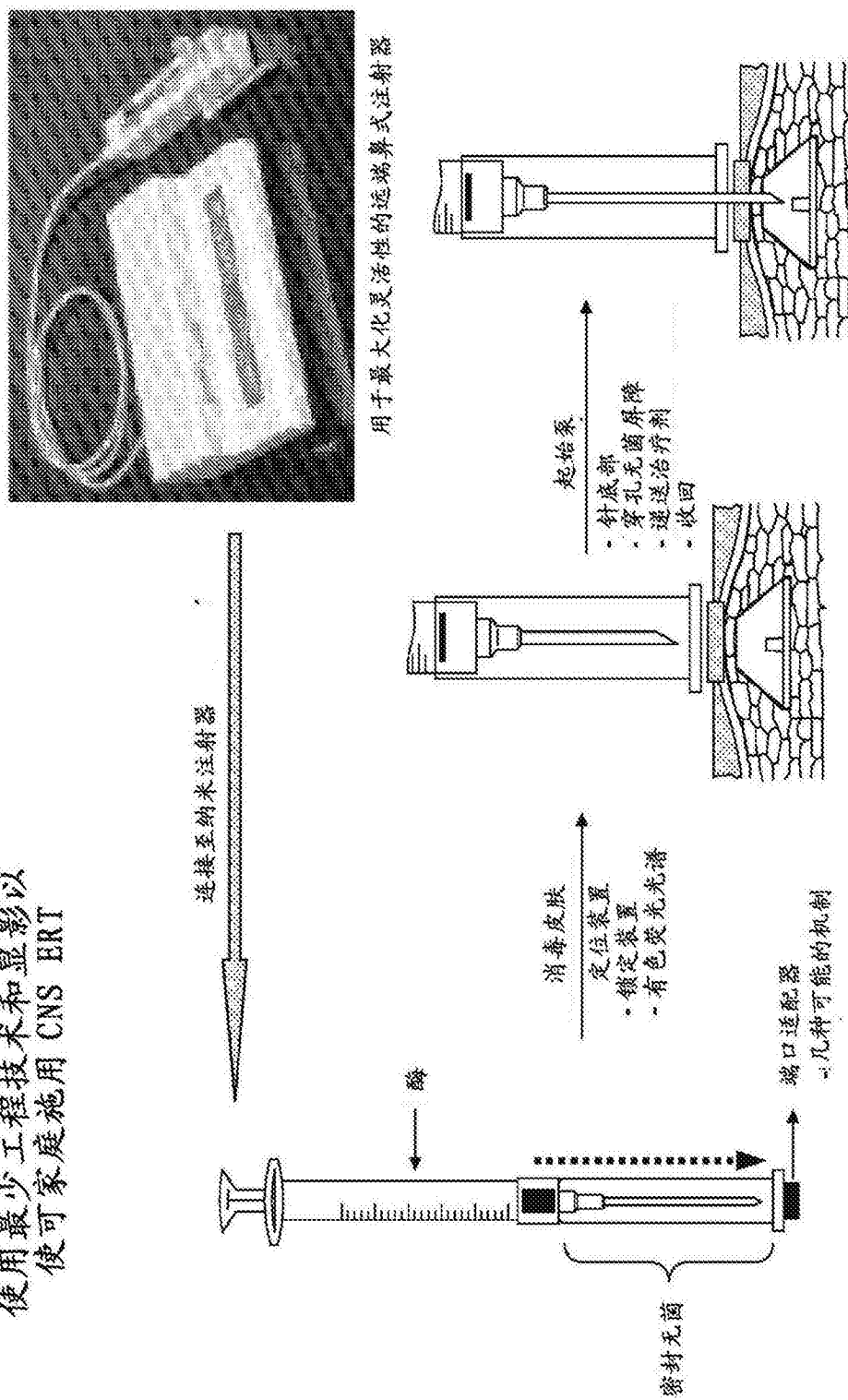


图35

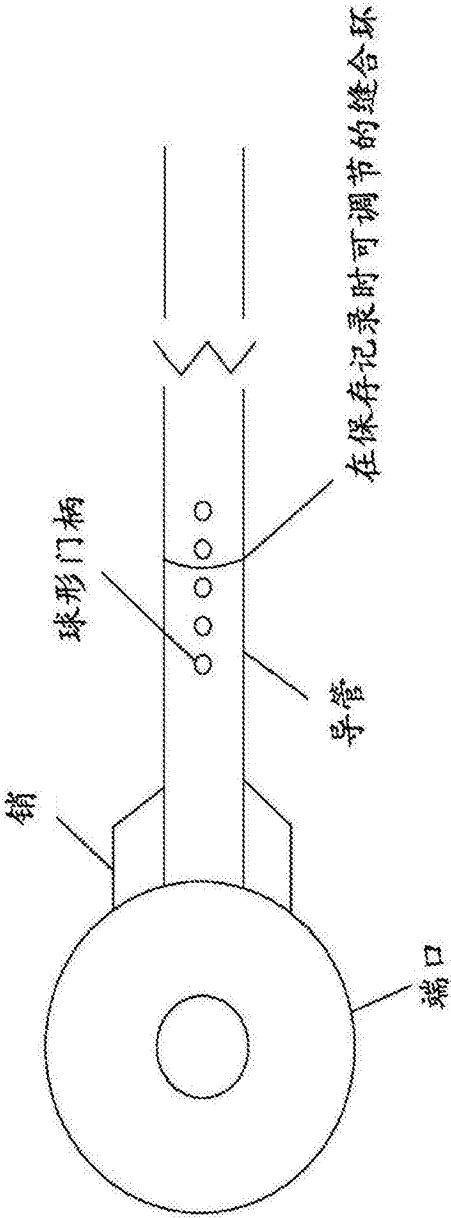


图36

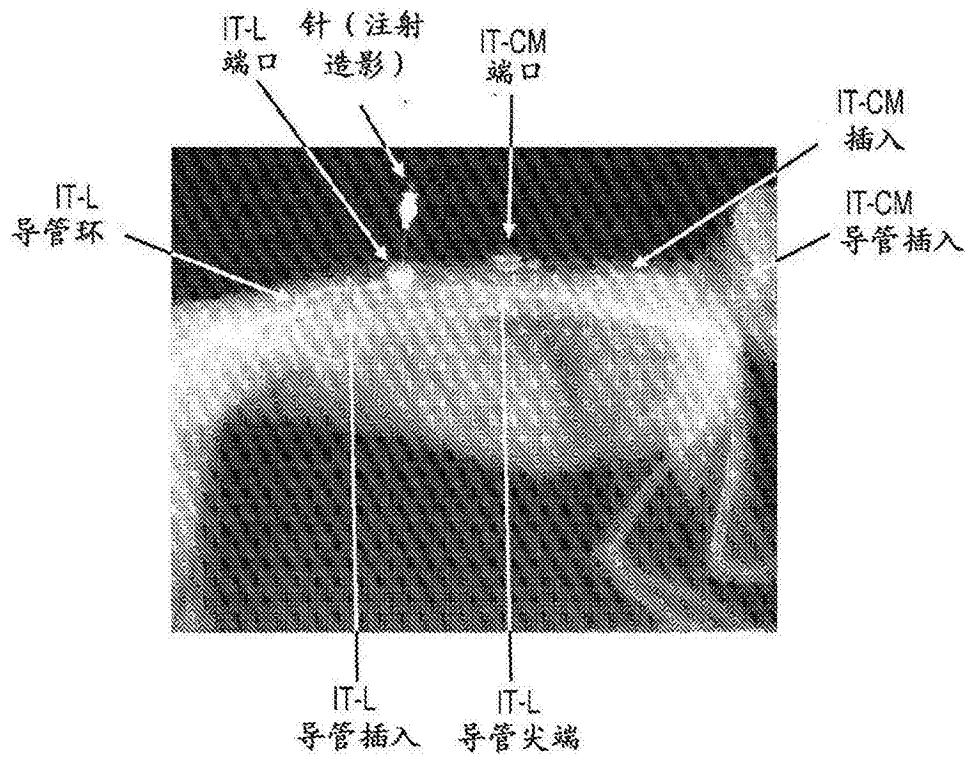


图37A

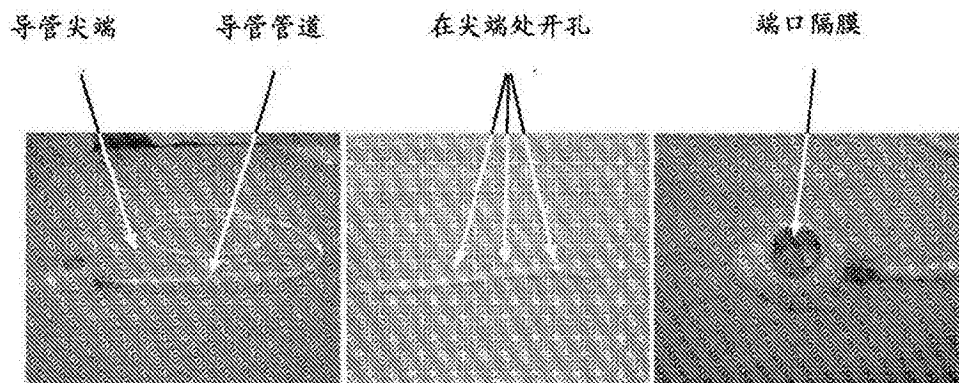


图37B

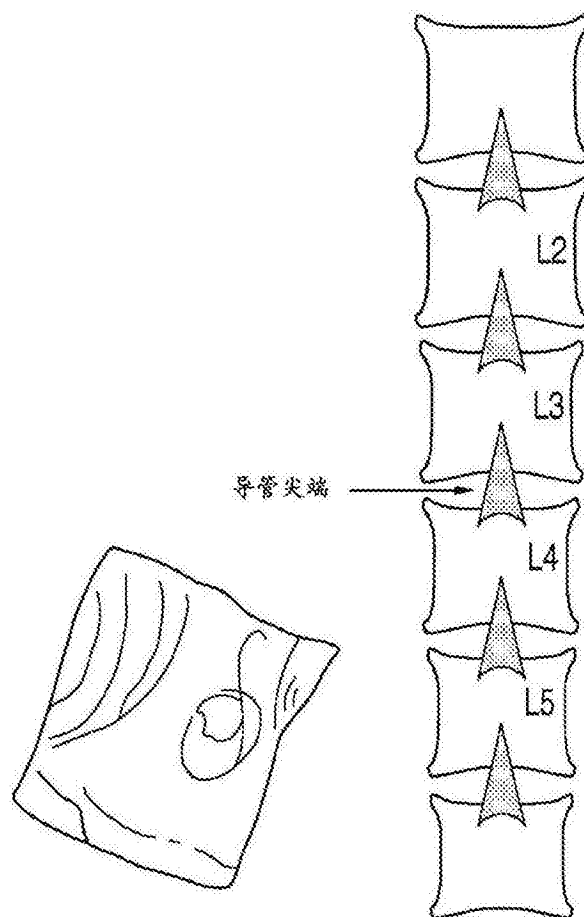


图37C