I698252

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本　**(11)證書號數：TW I698252 B**

(45)公告日： 中華民國 109 (2020) 年 07 月 11 日

(21)申請案號：106127273　(22)申請日： 中華民國 100 (2011) 年 06 月 27 日

(51)Int. Cl.：　*A61K38/43* *(2006.01)*　*A61K38/46* *(2006.01)*
A61K47/18 *(2006.01)*　*A61K47/24* *(2006.01)*
A61K47/26 *(2006.01)*　*A61K9/08* *(2006.01)*
A61K9/19 *(2006.01)*　*A61P25/00* *(2006.01)*

(30)優先權：2010/06/25　美國　61/358,857
2010/07/01　美國　61/360,786
2010/09/29　美國　61/387,862
2011/01/24　美國　61/435,710
2011/02/11　美國　61/442,115
2011/04/15　美國　61/476,210
2011/06/09　美國　61/495,268

(71)申請人：美商舒爾人類基因療法公司 (美國) SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC. (US)
美國

(72)發明人：薩拉馬特米勒納孜拉 SALAMAT-MILLER,NAZILA (US) ；泰勒凱薩琳 TAYLOR,KATHERINE (US) ；坎波列托保羅 CAMPOLIETO,PAUL (US) ；夏若克札赫拉 SHAHROKH,ZAHRA (US) ；潘金 PAN,JING (US) ；恰爾納斯勞倫斯 CHARNAS,LAWRENCE (US) ；萊特德瑞沙莉亞 WRIGHT,TERESA LEAH (US) ；加萊斯柏里克斯 CALIAS,PERICLES (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US　20090017005A1

Hum Mol Genet. 2005 May 1;14(9):1139-52. Epub 2005 Mar 16.

審查人員：簡正芳

申請專利範圍項數：61 項　圖式數：56　共 181 頁

(54)名稱

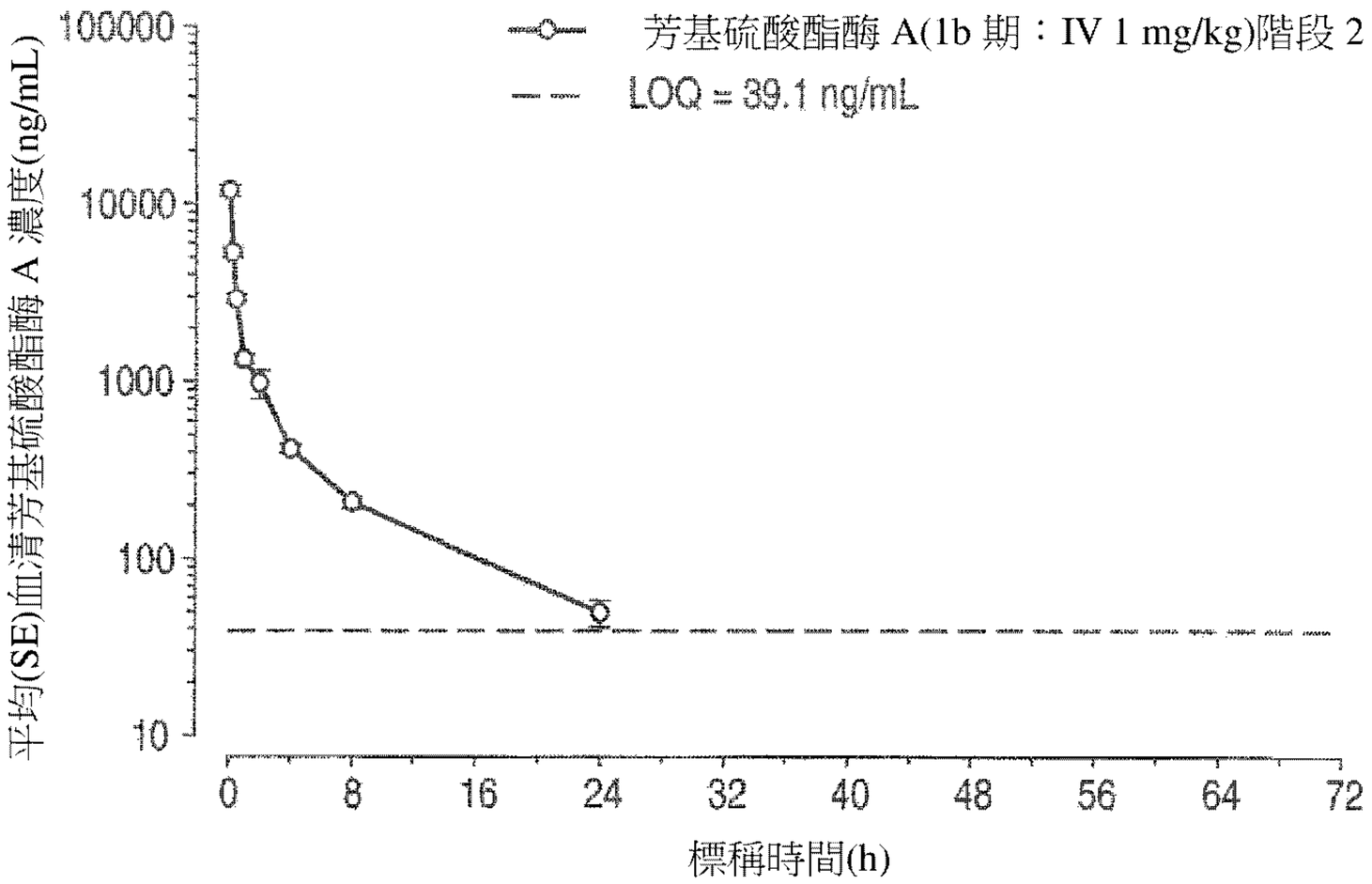
於腦脊髓膜內遞送芳基硫酸酯酶 A 之方法及組合物

(57)摘要

本發明係關於腦脊髓膜內投與溶酶體酵素以有效治療溶酶體貯積症。在一些實施例中，本發明提供用於 IT 遞送芳基硫酸酯酶 A 之穩定調配物。

The present invention related to intrathecal administration of lysosomal enzymes for effective treatment of lysosomal storage diseases. In some embodiments,the invention provides stable formulations for IT delivery of Arylsulfatase A.

指定代表圖：


芳基硫酸酯酶 A(1b 期：IV 1 mg/kg)階段 2
LOQ = 39.1 ng/mL
平均(SE)血清芳基硫酸酯酶 A 濃度(ng/mL)
100000
10000
1000
100
10
0
8
16
24
32
40
48
56
64
72
標稱時間(h)

【圖1】

專利案號：106127273
原申請案號：100122533
公告本
申請日:100年6月27日
I698252
IPC分類: *A61K 38/43* (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

【發明摘要】

【中文發明名稱】

於腦脊髓膜內遞送芳基硫酸酯酶A之方法及組合物

【英文發明名稱】

METHODS AND COMPOSITIONS FOR INTRATHECAL DELIVERY OF ARYLSULFATASE A

【中文】

本發明係關於腦脊髓膜內投與溶酶體酵素以有效治療溶酶體貯積症。在一些實施例中，本發明提供用於IT遞送芳基硫酸酯酶A之穩定調配物。

【英文】

The present invention related to intrathecal administration of lysosomal enzymes for effective treatment of lysosomal storage diseases. In some embodiments, the invention provides stable formulations for IT delivery of Arylsulfatase A.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

於腦脊髓膜內遞送芳基硫酸酯酶A之方法及組合物

【英文發明名稱】

METHODS AND COMPOSITIONS FOR INTRATHECAL DELIVERY OF ARYLSULFATASE A

【技術領域】

【先前技術】

酵素替代療法(ERT)涉及向個體全身投與天然或以重組方式得到之蛋白質及/或酵素。經批准療法通常經靜脈內投與個體，且通常可有效治療由酵素缺陷引起之軀體症狀。由於經靜脈內投與之蛋白質及/或酵素不能充分地跨過血腦障壁(BBB)，故經靜脈內投與之蛋白質及/或酵素至中樞神經系統(CNS)細胞及組織中之分佈很有限，因而治療具有CNS病因之疾病一直尤其具有挑戰性。

血腦障壁(BBB)係由內皮細胞構成之結構系統，其藉由限制血流中之有害物質(例如細菌、大分子(例如，蛋白質)及其他親水性分子)擴散跨過BBB及擴散至下面的腦脊髓液(CSF)及中樞神經系統(CNS)中而起保護CNS遠離該等物質之功能。

全身物質(不管該物質為內源的抑或外源投與的)穿透BBB之能力取決於數個因素。該等因素包括(例如)該物質在BBB兩側之濃度、該物質之尺寸、該物質之親脂性以及該物質對特定活性載體結構之親和力。已經提出以有效遞送治療劑跨過BBB之策略包括受體介導之轉運，由此通過固有主動轉運系統使大分子主動轉運跨過BBB。亦已將

BBB之高滲性開放視為能夠控制BBB以促進治療劑之遞送的技術。亦已將更多侵襲性技術(例如對流增強之治療劑遞送)視為藉由將該等治療劑直接輸注至CNS中而繞開BBB之方式。

儘管認為具有侵襲性，但將治療劑投與至脊髓周圍之腦脊髓膜內間隙中仍然為將治療劑直接投與跨過BBB並投與至下面的CSF中之最常見方式。(Kroin JS, Clin Pharmacokinet (1992) 22(5):319-326。)相對於可全身投與個體之組合物體積，適於腦脊髓膜內投與之組合物體積通常係治療具有CNS病因之某些疾病之重大障礙。通常，對於可投與個體之治療劑總劑量的該等限制會抑制在擬定作用位點達到治療劑之最佳治療濃度的能力。因此，該等限制可使腦脊髓膜內遞送途徑對於懷疑具有CNS病因之許多疾病而言不可行，尤其對於在受侵襲組織(例如，腦)中達到有效治療濃度需要較大劑量治療劑之疾病。

製備濃縮組合物不足以抵消與腦脊髓膜內投與治療劑及在受侵襲組織中達到有效治療濃度有關之限制。製備濃縮組合物通常可造成治療劑之聚集及/或沉澱。可利用之適於CNS投與之醫藥組合物有限進一步使該限制複雜化。因此，業內仍然需要能夠使治療劑增溶且適於將該等治療劑CNS投與至有需要之個體的穩定組合物。亦仍然需要能夠在CNS細胞及組織內達到治療濃度之醫藥組合物(例如，經腦脊髓膜內投與之醫藥組合物)。

【發明內容】

在各態樣中，本發明包括用於腦脊髓膜內投與之穩定調配物，其包含芳基硫酸酯酶A(ASA)蛋白質、鹽及聚山梨醇酯表面活性劑。在一些實施例中，ASA蛋白質係以介於約0-100 mg/ml範圍內之濃度

存在。在一些實施例中，ASA蛋白質係以選自10 mg/ml、30 mg/ml、50 mg/ml或100 mg/ml之濃度存在。在一些實施例中，ASA蛋白質包含胺基酸序列SEQ ID NO:1。在一些實施例中，ASA蛋白質係自人類細胞系產生。在一些實施例中，ASA蛋白質係自CHO細胞產生。

因此，在一態樣中，本發明提供用於腦脊髓膜內投與之穩定調配物，其包括芳基硫酸酯酶A (ASA)蛋白質、鹽及聚山梨醇酯表面活性劑。在一些實施例中，ASA蛋白質係以介於約0-100 mg/ml範圍內之濃度存在。在一些實施例中，ASA蛋白質係以選自10 mg/ml、30 mg/ml或100 mg/ml之濃度存在。

在一些實施例中，ASA蛋白質包含胺基酸序列SEQ ID NO:1。

在一些實施例中，ASA蛋白質係自人類細胞系產生。在某些實施例中，ASA蛋白質係自CHO細胞產生。

在一些實施例中，鹽係NaCl。在某些實施例中，NaCl係以介於約137-154 mM範圍內之濃度存在。在某些實施例中，NaCl係以約154 mM之濃度存在。

在一些實施例中，聚山梨醇酯表面活性劑選自由以下組成之群：聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯80及其組合。在某些實施例中，聚山梨醇酯表面活性劑係聚山梨醇酯20。在某些實施例中，聚山梨醇酯20係以介於約0-0.2%範圍內之濃度存在。在某些實施例中，聚山梨醇酯20係以約0.005%之濃度存在。

在一些實施例中，調配物進一步包含磷酸鹽及/或檸檬酸鹽。在某些實施例中，磷酸鹽及/或檸檬酸鹽係以不大於20 mM之濃度存在。在一些實施例中，調配物具有約5.5-7.0之pH。在某些實施例中，

調配物具有約6.0-6.5之pH。在一些實施例中，調配物具有約6.0之pH。

在一些實施例中，調配物係液體調配物。在一些實施例中，將調配物調配為凍乾劑型。

在一些實施例中，調配物進一步包含蔗糖。

在另一態樣中，本發明提供用於腦脊髓膜內投與之穩定調配物，其包括芳基硫酸酯酶A(ASA)蛋白質、鹽及緩衝劑。在一些實施例中，ASA蛋白質係以介於約0-100 mg/ml範圍內之濃度存在。在一些實施例中，緩衝劑係檸檬酸鹽及/或磷酸鹽。在一些實施例中，檸檬酸鹽及/或磷酸鹽係以不大於約20 mM之濃度存在。

在一些實施例中，調配物進一步包含聚山梨醇酯表面活性劑。在某些實施例中，聚山梨醇酯表面活性劑選自由以下組成之群：聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯80及其組合。在一些實施例中，聚山梨醇酯表面活性劑係以介於約0-0.2%範圍內之濃度存在。在一些實施例中，調配物具有約6.0-6.5之pH。

在又一態樣中，本發明提供包括本文所述穩定調配物之單一劑型之容器。在一些實施例中，容器選自安瓿或預填充注射器。在某些實施例中，容器係預填充注射器。在某些實施例中，容器係貯器。在一些實施例中，預填充注射器選自有烤聚矽氧塗層之硼矽酸鹽玻璃注射器、有噴塗聚矽氧之硼矽酸鹽玻璃注射器或無聚矽氧之塑膠樹脂注射器。

在一些實施例中，穩定調配物係以小於約5.0 mL之體積存在。在一些實施例中，穩定調配物係以小於約3.0 mL之體積存在。

在另一態樣中，本發明提供治療異染性腦白質營養不良(MLD)疾病之方法，其包括向需要治療之個體腦脊髓膜內投與本文所述調配物之步驟。在一些實施例中，腦脊髓膜內投與調配物不會在個體中引起實質不良效應。在某些實施例中，腦脊髓膜內投與調配物不會在個體中引起實質適應性T細胞介導之免疫反應。在一些實施例中，腦脊髓膜內投與調配物使得將ASA蛋白質遞送至深層腦白質之少突膠質細胞中。

在一些實施例中，腦脊髓膜內投與使得MLD疾病之至少一種症狀或特徵之強度、嚴重程度或頻率降低，或使發作延遲。在某些實施例中，MLD病之至少一種症狀或特徵係顱內壓升高、腦外積水、中樞及周圍神經系統之髓鞘中以及內臟器官中之硫酸化糖脂積聚、CNS及PNS內進行性脫髓鞘及軸突損失、及/或運動及認知功能障礙。

在另一態樣中，本發明提供用於腦脊髓膜內投與之系統，其包括輸液裝置；空心體，其具有與該輸液裝置流體連通之第一流量孔及構造用以插入脊髓中之第二流量孔；及用於該空心體緊固插入脊髓中之緊固機構。在一些實施例中，緊固機構包含一或多個安裝於空心體表面上之球形頭及於該一或多個球形頭上可調整之縫合環。在一些實施例中，輸液裝置係可注射座(injectable port)。在一些實施例中，可注射座係可植入的。在某些實施例中，輸液裝置係幫浦。

【圖式簡單說明】

圖1展示在IV投與後血清中之實例性芳基硫酸酯酶A(rhASA)濃度數據；

圖2展示在IT-腰椎投與後血清中之實例性rhASA濃度數據；

圖3展示在IV投與後CSF中之實例性rhASA濃度；

圖4展示在IT-腰椎投與後CSF中之實例性rhASA濃度；

圖5展示緩衝劑及pH對rhASA熱穩定性之效應之實例性分析；

圖6展示在40 ±2℃下保持兩週後對rhASA之實例性SDS-PAGE (Coomassie)分析；

圖7展示在5℃及25℃下保持3個月後對IT調配物中rhASA之實例性SDS-PAGE (Coomassie)分析；

圖8繪示在48小時之攪拌(圖A)及振盪(圖B)後之實例性rhASA原料藥及成品藥外觀；

圖9繪示在攪拌48小時後具有頂隙(n=2)及不具有頂隙(n=1)之實例性rhASA成品藥外觀(不含P20)；

圖10展示實例性數據來顯示在用鹽酸滴定時rhASA原料藥相對於緩衝劑對照之緩衝能力；

圖11展示實例性數據來顯示在用1 M氫氧化鈉滴定時rhASA原料藥相對於緩衝劑對照之緩衝能力；

圖12繪示存於鹽水(pH 6.0)中之隨濃度而變之實例性rhASA試樣；

圖13展示對存於154 mM NaCl(pH 5.9)中之rhASA(pH 5.5流動相)之實例性SEC-HPLC分析；

圖14展示對存於154 mM NaCl(pH 5.9)中之rhASA(pH 7.0流動相)之實例性SEC-HPLC分析；

圖15展示存於154 mM NaCl(pH 5)中之rhASA之基線及11個月穩定性試樣之實例性尺寸排除譜；

圖16繪示治療後腦組織、腦脊髓膜、浸潤(中及高劑量群組，兩種性別)之實例性顯微照片；

圖17繪示治療後腦組織、腦脊髓膜、浸潤(中及高劑量群組，兩種性別)之實例性顯微照片；

圖18繪示治療後腦組織、血管周、浸潤(中等劑量雄性；高劑量雌性)之實例性顯微照片；

圖19繪示對經rhASA治療之免疫耐受性MLD小鼠脊髓之實例性艾爾遜藍染色，其繪示實例性結果，其展示髓硫酯減少，如對動物頸部脊髓之艾爾遜藍染色所測定，該動物在第1、8、15及22天以520 mg/kg腦重量之劑量接受腦脊髓膜內注射之重組hASA或接受媒劑對照。如圖所示，用腦脊髓膜內內注射之重組hASA治療可使頸部脊髓中之髓硫酯積聚減少；

圖20展示對來自經rhASA治療之免疫耐受性MLD小鼠之艾爾遜藍染色脊髓切片的實例性形態測定法分析，其包括實例性結果，該等結果展示艾爾遜藍在總脊髓(T-脊髓)、總灰質(T-GM)、腰部灰質(L-GM)、頸部灰質(C-GM)、總白質(T-WM)、腰部白質(L-WM)及頸部白質(C-WM)中之光學密度，如形態測定法分析所測定。如圖所示，與媒劑對照相比，在經rhASA治療之動物中觀察到艾爾遜藍染色之統計學顯著性降低；

圖21繪示LAMP染色在經rhASA治療之免疫耐受性MLD小鼠白質(海馬傘)中之實例性降低，其繪示實例性結果，其展示LAMP-1在海馬傘中之含量，如免疫組織化學所測定。放大倍數=20X。如圖所示，使用腦脊髓膜內注射rhASA治療可使大腦白質中之LAMP-1減

少；

圖22展示對經rhASA治療之免疫耐受性MLD小鼠腦中之LAMP染色之實例性形態測定法分析，其繪示實例性結果，且該等結果展示在經20 mg/kg靜脈內rhASA、300 mg/kg腦重量之腦脊髓膜內rhASA、520 mg/kg腦重量之靜脈內rhASA或媒劑對照治療之動物胼胝體(CC)、海馬傘(F)、小腦白質(CB-WM)及腦幹(BS)中之LAMP-1染色強度；

圖23展示在EOW IT投藥後，對於6個月之主要屍體剖檢，rhASA在給予媒劑之幼年食蟹猴腦鑽孔中之實例性濃度；

圖24展示在EOW IT給予1.8 mg/劑量之rhASA後，對於6個月之主要屍體剖檢，rhASA在幼年食蟹猴腦鑽孔中之實例性濃度；

圖25展示在EOW IT給予6.0 mg/劑量之rhASA後，對於6個月之主要屍體剖檢，rhASA在幼年食蟹猴腦鑽孔中之實例性濃度；

圖26展示在EOW IT給予以18.6 mg/劑量之rhASA後，對於6個月之主要屍體剖檢，rhASA在幼年食蟹猴腦鑽孔中之實例性濃度；

圖27展示在EOW IT給予(PBS對照)後，對於6個月之恢復後屍體剖檢，ASA在幼年食蟹猴腦鑽孔中之實例性濃度；

圖28展示在EOW IT給予媒劑後，對於6個月之恢復後屍體剖檢，rhASA在幼年食蟹猴腦鑽孔中之實例性濃度。

圖29展示在EOW IT給予1.8 mg/劑量之rhASA後，對於6個月之恢復後屍體剖檢，rhASA在幼年食蟹猴腦鑽孔中之實例性濃度；

圖30展示在EOW IT給予6.0 mg/劑量之rhASA後，對於6個月之恢復後屍體剖檢，rhASA在幼年食蟹猴腦鑽孔中之實例性濃度；

圖31展示在EOW IT給予18.6 mg/劑量之rhASA後，對於6個月之恢復後屍體剖檢，rhASA在幼年食蟹猴腦鑽孔中之實例性濃度；

圖32展示對於裝置對照、媒劑、1.8 mg、6.0 mg及18.6 mg治療動物，rhASA在來自腦表面之所選鑽孔中之實例性濃度。(雄性及雌性分開，裝置對照數據來自恢復後屍體剖檢，所有其他數據來自主要屍體剖檢)；

圖33展示對於裝置對照、媒劑、1.8 mg、6.0 mg及18.6 mg治療動物，rhASA在來自腦深層白質區域之所選鑽孔中之實例性濃度。(雄性及雌性分開，裝置對照數據來自恢復後屍體剖檢，所有其他數據來自主要屍體剖檢)；

圖34展示對於裝置對照、媒劑、1.8 mg、6.0 mg及18.6 mg治療動物，rhASA在來自腦深層灰質區域之所選鑽孔中之實例性濃度。(雄性及雌性分開，裝置對照數據來自恢復後屍體剖檢，所有其他數據來自主要屍體剖檢)；

圖35展示在裝置對照、媒劑、1.8 mg、6.0 mg及18.6 mg治療動物中，rhASA在來自不同區域之所選鑽孔中之實例性濃度。(雄性及雌性組合，裝置對照數據來自恢復後屍體剖檢，所有其他數據來自主要屍體剖檢)；

圖36展示在EOW IT投藥後，對於6個月之恢復後屍體剖檢，rhASA在幼年食蟹猴脊髓區段中之實例性濃度；

圖37展示在EOW IT投藥後，對於6個月之恢復後屍體剖檢，rhASA在幼年食蟹猴肝中之實例性濃度；

圖38展示某些腦鑽孔之實例性解剖學位置；

圖39展示某些腦鑽孔之實例性解剖學位置；

圖40展示某些腦鑽孔之實例性解剖學位置；

圖41展示某些腦鑽孔之實例性解剖學位置；

圖42展示某些腦鑽孔之實例性解剖學位置；

圖43展示某些腦鑽孔之實例性解剖學位置；

圖44A-G展示重組人類芳基硫酸酯酶A(rhASA)在自投與媒劑、1.8 mg rhASA或18.6mg rhASA之成年及幼年食蟹猴之腦組織所提取組織鑽孔中之濃度。圖44A-G中之每一者對應於圖39中所繪示腦組織之區域；

圖45A及B展示在腦脊髓膜內(IT)或大腦室內(ICV)投與rhASA之成年及幼年食蟹猴之深層白質(圖45A)或在深層灰質(圖45B)腦組織中，所檢測重組人類芳基硫酸酯酶A(rhASA)濃度之實例性對比；

圖46A展示在得自IT投與18.6 mg或1.8 mg劑量之重組人類芳基硫酸酯酶A(rhASA)之幼年(<12個月齡)食蟹猴之若干個組織鑽孔中檢測到之rhASA濃度。如圖46A-B二者中所示，遞送至該等組織之rhASA之濃度在2.5 ng/mg蛋白質之目標治療濃度以內，或超過該目標治療濃度。腦組織中對應於圖46A及圖46B中所繪示每一鑽孔編號之解剖學區域係：皮質下白質(1)；腦室周圍白質及深層白質(2)；皮質下白質(3)；皮質下白質(4)；內囊(5)；內囊尾狀核(6)；深層白質(7)；皮質下白質及皮質(8)；豆狀核殼(9)；顳顬皮質下白質及皮質(10)；深層灰質(11)；深層灰質(12)；前腦室周圍及皮質下(13)；皮質下白質，皮質淺表鐮旁(14)；胼胝體及胼胝體周皮質下白質(15)；深層皮質下白質(16)；深層灰質(17)；深層灰質(18)；腦室周圍白質(19)；深層皮質下

白質(20)；海馬(21)；胼胝體(22)；深層白質(23)；皮質下白質，枕葉(24)；及小腦白質(25)；

圖47A展示自IT投與1.8 mg rhASA之食蟹猴提取之深層白質組織區域。圖47B展示對深層白質組織之免疫染色及所揭示rhASA在相關細胞中之分佈。圖47C展示，IT投與之rhASA在食蟹猴之深層白質組織中且具體而言在溶酶體中顯示細胞器共定位。在圖47C中，ASA免疫染色顯示於左上框中；

圖48在將^{124}I標記之芳基硫酸酯酶A(rhASA) IT-或ICV投與食蟹猴後24小時，使用PET掃描對比該經標記rhASA；

圖49展示^{124}I標記ASA在剛ICV投與食蟹猴後之分佈，且對比IT投與之^{124}I標記ASA在2-5小時內之分佈。如圖所示，IT投與將^{124}I標記ASA遞送至與ICV投與所示相同之初始房室(池及脊柱近端)中；

圖50繪示小鼠模型中之實例性ICV及IT投與；

圖51繪示實例性腦脊髓膜內藥物遞送裝置(IDDD)；

圖52繪示實例性PORT-A-CATH®低型腦脊髓膜內植入式輸液系統(low profile intrathecal implantable access system)；

圖53繪示實例性腦脊髓膜內藥物遞送裝置(IDDD)；

圖54繪示實例性腦脊髓膜內藥物遞送裝置(IDDD)，其容許在家投與CNS酵素替代療法(ERT)；

圖55展示具有緊固機構之腦脊髓膜內藥物遞送裝置(IDDD)之實例性簡圖；及

圖56A繪示患者體內可放置IDDD之實例性位置；圖56B繪示腦脊髓膜內藥物遞送裝置(IDDD)之各個組件；且圖56C繪示患者體內用於

IT腰椎注射之實例性插入位置。

【實施方式】

本申請案主張美國臨時專利申請案第61/358,857號(2010年6月25日申請)、第61/360,786號(2010年7月1日申請)、第61/387,862號(2010年9月29日申請)、第61/435,710號(2011年1月24日申請)、第61/442,115號(2011年2月11日申請)、第61/476,210號(2011年4月15日申請)及第61/495,268號(2011年6月9日申請)之優先權，每一案件之全文以引用方式併入本文中。

定義

本發明尤其提供基於緩衝劑、穩定劑、表面活性劑及/或其他賦形劑之蛋白質調配物。本發明調配物提供或增強儲存期間之蛋白質穩定性並提供適於直接遞送至中樞神經系統之調配物。

下文將首先定義某些術語以便更容易地理解本發明。以下術語及其他術語之其他定義陳述於說明書通篇中。

改善：本文所用之術語「改善」意指個體狀況之預防、減弱或緩解，或狀況之改良。改善包括(但不要求)病況(例如，異染性腦白質營養不良(MLD))之完全恢復或完全預防。在一些實施例中，改善包括增加相關疾病組織中缺陷之相關蛋白質(例如，芳基硫酸酯酶)之含量或提高其活性程度。

生物活性：本文所用之片語「生物活性」係指在生物系統中且尤其在生物體中具有活性之任一藥劑之特徵。例如，在投與生物體時對該生物體具有生物效果之藥劑視為具有生物活性。在特定實施例中，倘若蛋白質或多肽具有生物活性，則該蛋白質或多肽中共有蛋白

質或多肽之至少一種生物活性的部分通常稱作「生物活性」部分。

*劑型：*本文所用之術語「劑型」及「單位劑型」係指用於擬治療患者之治療性蛋白質(例如，芳基硫酸酯酶)之物理離散單位。每一單位含有經計算以產生期望治療效果之預定量之活性材料。然而，應理解，組合物之總劑量應由主治醫師在合理的醫學判斷範圍內確定。

*改良、增加或降低：*本文所用之術語「改良」、「增加」或「降低」或語法等效詞表示相對於基線量測(例如相同個體在開始本文所述治療前之量測、或對照個體(或多個對照個體)在不存在本文所述治療時之量測)之值。「對照個體」係患有與所治療個體相同之溶酶體貯積症形式(例如，異染性腦白質營養不良(MLD))之個體，其與所治療個體之年齡大致相同(以確保所治療個體與對照個體之疾病階段相當)。

*個體(individual, subject)、患者：*本文所用之術語「個體(subject, individual)」或「患者」係指人類或非人類哺乳動物個體。所治療個體(individual)(亦稱作「患者」或「個體(subject)」)係患有疾病(例如異染性腦白質營養不良(MLD))之個體(胎兒、幼兒、兒童、少年或成人)。

*連接體：*本文所用之術語「連接體」係指融合蛋白中不在天然蛋白質中特定位置出現且通常經設計以具有撓性或將結構(例如α-螺旋)插入兩個蛋白質部分之間的胺基酸序列。連接體亦稱作間隔體。

*多肽：*一般而言，本文所用之「多肽」係至少兩個藉由肽鍵彼此附接之胺基酸之串。在一些實施例中，多肽可包括至少3至5個胺基酸，每一胺基酸藉助至少一個肽鍵附接至其他胺基酸。彼等熟習此項

技術者應瞭解，多肽有時視情況包括「非天然」胺基酸或仍然能整合至多肽鏈中之其他實體。

*可溶的：*本文所用之術語「可溶的」係指治療劑能夠形成均質溶液。在一些實施例中，治療劑於藉以投與及運送至目標作用位點(例如腦細胞及組織)之溶液中之溶解性足以容許治療有效量之治療劑遞送至目標作用位點。數個因素可影響治療劑之溶解性。例如，可影響蛋白質溶解性之有關因素包括離子強度、胺基酸序列及存在其他輔助溶解劑(co-solubilizing agent)或鹽(例如鈣鹽)。在一些實施例中，醫藥組合物經調配而使該等組合物不包含鈣鹽。在一些實施例中，本發明治療劑可溶於其對應醫藥組合物中。應瞭解，儘管對於非經腸投與藥物而言等滲溶液通常較佳，但使用等滲溶液可能限制一些治療劑且尤其一些蛋白質及/或酵素之充分溶解。已證實輕微高滲溶液(例如多達175 mM氯化鈉於5 mM磷酸鈉中，pH 7.0)及含糖溶液(例如多達2%蔗糖於5 mM磷酸鈉中，pH 7.0)在猴子中有良好耐受性。例如，最常見之經批准CNS團注(bolus)調配組合物係鹽水(150 mM NaCl於水中)。

*穩定性：*本文所用之術語「穩定的」係指治療劑(例如重組酵素)能夠在長時間內保持其治療功效(例如全部或大部分之其預期生物活性及/或生理化學完整性(physiochemical integrity))。可評估長時間內(例如至少1個月、3個月、6個月、12個月、18個月、24個月、30個月、36個月或更久)治療劑之穩定性及醫藥組合物保持該治療劑穩定性的能力。一般而言，本文所述醫藥組合物經調配以能夠穩定一起調配之一或多種治療劑(例如重組蛋白質)，或者減緩或阻止其降解。在

調配物中，穩定調配物係其中治療劑在儲存時及在處理(例如冷凍/解凍，機械混合及凍乾)期間基本上保持其物理及/或化學完整性及生物活性者。對於蛋白質穩定性而言，其可由高分子量(HMW)聚集體之形成、酵素活性之損失、肽片段之產生及電荷曲線之移位測量。

*個體：*本文所用之術語「個體」意指任何哺乳動物，包括人類。在本發明之某些實施例中，個體係成年、少年或幼兒。本發明亦涵蓋在子宮內投與該等醫藥組合物及/或實施該等治療方法。

*實質同源性：*片語「實質同源性」在本文中用於指胺基酸或核酸序列之間之比較。如彼等熟習此項技術者所瞭解，兩個序列若在對應位置中含有同源殘基，則通常將其視為「實質上同源」。同源殘基可為相同殘基。或者，同源殘基可為具有合適的類似結構及/或功能特徵之不同殘基。例如，如彼等熟習此項技術者所熟知，通常將某些胺基酸歸類為「疏水性」或「親水性」胺基酸及/或具有「極性」或「非極性」側鏈。一種胺基酸取代為相同類型之另一種胺基酸通常可視為「同源」取代。

如業內所熟知，胺基酸或核酸序列可使用多種算法中之任一者來比較，包括彼等可在商用電腦程式(例如用於核苷酸序列之BLASTN及用於胺基酸序列之BLASTP、空位BLAST及PSI-BLAST)中獲得者。該等實例性程式闡述於以下文獻中：Altschul等人，Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990；Altschul等人，Methods in Enzymology；Altschul等人，「Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs」，Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997；Baxevanis等人，

Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998；及Misener等人(編輯)，Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology，第132卷)，Humana Press, 1999。除鑑別同源序列外，上述程式通常亦指示同源性程度。在一些實施例中，若兩個序列在相關殘基延伸部分上有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的對應殘基同源，則將其視為實質上同源。在一些實施例中，相關延伸部分係完整序列。在一些實施例中，相關延伸部分係至少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或更多個殘基。

*實質一致性：*片語「實質一致性」在本文中用於指胺基酸或核酸序列之間之比較。如彼等熟習此項技術者所瞭解，兩個序列若在對應位置中含有相同殘基，則通常將其視為「實質上一致」。如業內所熟知，胺基酸或核酸序列可使用多種算法中之任一者來比較，包括彼等可在商用電腦程式(例如用於核苷酸序列之BLASTN及用於胺基酸序列之BLASTP、空位BLAST及PSI-BLAST)中獲得者。該等實例性程式闡述於以下文獻中：Altschul等人，Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990；Altschul等人，Methods in Enzymology；Altschul等人，Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997；Baxevanis等人，Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998；及Misener等人(編輯)，

Bioinformatics Methods and Protocols(Methods in Molecular Biology，第132卷)，Humana Press, 1999。除鑑別一致序列外，上述程式通常亦指示一致性程度。在一些實施例中，若兩個序列在相關殘基延伸部分上有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的對應殘基一致，則將其視為實質上一致。在一些實施例中，相關延伸部分係完整序列。在一些實施例中，相關延伸部分係至少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或更多個殘基。

*適於遞送至CNS中：*關於本發明醫藥組合物，本文所用之片語「適於遞送至中樞神經系統中」或「適於遞送至CNS中」通常係指該等組合物之穩定性、耐受性及溶解性特性，以及該等組合物將其中所含之有效量治療劑遞送至目標遞送位點(例如CSF或腦)的能力。在一些實施例中，若本發明醫藥組合物展示穩定性及耐受性，則該等組合物適於遞送至個體之中樞神經系統中。在一些實施例中，若本發明醫藥組合物展示穩定性及耐受性且能夠溶解其中所含之治療劑，則該等組合物適於遞送至個體之中樞神經系統中。

*治療性部分:*本文所用之術語「治療性部分」係指分子中賦予分子之治療效果之部分。在一些實施例中，治療性部分係具有治療活性之多肽。例如，本發明治療性部分可為可取代天然Naglu蛋白質之多肽。在一些實施例中，本發明治療性部分可為可挽救一或多種與芳基硫酸酯酶缺陷有關之表型的多肽。在一些實施例中，本發明治療性部

分可治療異染性腦白質營養不良(MLD)患者之一或多種症狀。

*治療有效量：*本文所用之術語「治療有效量」係指治療性蛋白質(例如芳基硫酸酯酶A)以適用於任一醫學治療之合理益處/風險比賦予所治療個體治療效果之量。治療效果可為客觀性(即可藉由某種測試或標記測量)或主觀性(即個體給予效果之指示或感覺)。「治療有效量」特別指治療性蛋白質或組合物藉由例如改善與疾病有關症狀、預防或延遲疾病發作、及/或亦降低疾病症狀之嚴重程度或頻率來有效治療、改善或預防期望疾病或病狀、或呈現可檢測之治療或預防效果之量。治療有效量通常以可包含多個單位劑量之給藥方案投與。對於任一特定治療性蛋白質而言，治療有效量(及/或在有效給藥方案內之合適單位劑量)可視(例如)投與途徑、與其他醫藥劑之組合而變化。此外，任一特定患者之特定治療有效量(及/或單位劑量)可視多種因素而定，包括所治療病症及該病症之嚴重程度；所用特定醫藥劑之活性；所用特定組合物；患者之年齡、體重、總體健康狀況、性別及飲食；所用特定融合蛋白之投與時間、投與途徑及/或排泄或代謝速率；治療持續時間；及醫學技術內熟知之類似因素。

*可耐受的：*本文所用之術語「可耐受的」及「耐受性」係指本發明醫藥組合物不在投與該組合物之個體中引發不良反應或另一選擇為不在投與該組合物之個體中引發嚴重不良反應之能力。在一些實施例中，本發明醫藥組合物在投與該等組合物之個體中具有良好耐受性。

*治療(Treatment)：*本文所用之術語「治療(treatment)」(亦稱為「治療(treat或treating)」)係指任何投與治療性蛋白質(例如，溶酶體

酵素)以部分或完全地緩和、改善、減緩、抑制特定疾病、病症及/或病狀(例如，異染性腦白質營養不良(MLD))之一或多種症狀或特徵，延遲其發作，降低其嚴重程度及/或降低其發生率。該治療可針對不呈現相關疾病、病症及/或病狀之體徵之個體及/或針對僅呈現該疾病、病症及/或病狀之早期體徵之個體。或者或另外，該治療可針對呈現相關疾病、病症及/或病狀之一或多個確立體徵之個體。

本發明尤其係關於經腦脊髓膜內投與溶酶體酵素來有效治療溶酶體貯積症。在一些實施例中，本發明提供用於IT遞送芳基硫酸酯酶A之穩定調配物。

在某些實施例中，本文所述醫藥組合物之特徵在於能夠將一或多種用於治療諸如溶酶體貯積症(例如，A型聖菲利波症候群(Sanfilippo syndrome Type A)、B型聖菲利波症候群、亨特氏症候群(Hunter syndrome)、異染性腦白質營養不良及球樣細胞性腦白質營養不良)等疾病之治療劑(例如，以重組方式製備之酵素，例如乙醯肝素N-硫酸酯酶、艾杜糖醛酸鹽(iduronate)-2-硫酸酯酶、α-L-艾杜糖醛酸酶、芳基硫酸酯酶A、α-N-乙醯基葡萄糖胺酶及/或半乳糖腦苷酶)有效遞送至特定目標細胞及組織(例如，以下中之一或多者：灰質、白質、大腦皮質、小腦、普爾欽細胞(Purkinje cell)、小腦中之普爾欽細胞、少突膠質細胞、少突膠質細胞溶酶體以及CNS中之其他特定組織及細胞類型)。

在某些實施例中，醫藥組合物能夠使一或多種治療劑(例如，乙醯肝素N-硫酸酯酶、艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶、α-L-艾杜糖醛酸酶、芳基硫酸酯酶A、α-N-乙醯基葡萄糖胺酶及/或半乳糖腦苷酶)分佈至

CNS之特定細胞及/或組織中，由此治療具有CNS後遺症、表現或病因之疾病(例如，亨特氏症候群或B型聖菲利波症候群)。投與該等醫藥組合物可藉由(例如)調節與該疾病有關之病理來治療或解決該疾病，例如，減少或減弱受溶酶體貯積症侵襲之個體CNS中之細胞空泡形成及/或斑馬細胞(zebra cell)的數量及/或尺寸。

該等醫藥組合物可包括一或多種治療劑及一或多種緩衝劑。在該等醫藥組合物之某些實施例中，治療劑可溶於該組合物中，該組合物穩定且該組合物在經腦脊髓膜內投與該個體後耐受。

在一些實施例中，可將醫藥組合物凍乾。該等組合物包含一或多種治療劑、一或多種緩衝劑、一或多種表面活性劑及一或多種滲透壓調節劑。該等凍乾醫藥組合物可使用稀釋劑(例如，無菌水、注射用抑菌水及/或無菌鹽水溶液)加以復原以使組合物適於投與個體，且尤其適於將治療劑遞送至該個體之中樞神經系統。

若治療劑可溶於某些實施例之水性及凍乾醫藥組合物中，組合物穩定且組合物在經腦脊髓膜內投與個體後耐受，則可認為該等組合物適於將治療劑遞送至該個體之中樞神經系統中。

在一些實施例中，水性醫藥組合物(及在復原時之凍乾醫藥組合物)具有低pH及低磷酸鹽含量。例如，該組合物之pH可呈酸性或小於約7或8。在其他實施例中，水性及凍乾醫藥組合物具有小於約10 mM、小於約20 mM或小於約30 mM之磷酸鹽含量。

水性及凍乾醫藥調配物中之預期治療劑包括蛋白質及/或酵素，其或者可以重組方式加以製備。適宜酵素包括溶酶體酵素(例如，α-N-乙醯基葡萄糖胺酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸

酯酶、α-L-艾杜糖醛酸酶、芳基硫酸酯酶A及半乳糖腦苷酶)。較佳地，該等酵素可溶於醫藥組合物中。在一些特定實施例中，蛋白質及/或酵素不包含修飾(例如，會使該蛋白質更穩定或促進該蛋白質通過BBB之修飾)。

某些實施例係關於適於將治療有效量之蛋白質或酵素(例如，α-N-乙醯基葡萄糖胺酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、α-L-艾杜糖醛酸酶、芳基硫酸酯酶A、半乳糖腦苷酶或艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶)經腦脊髓膜內遞送至個體中樞神經系統、且具體而言個體中樞神經系統內之某些細胞、組織或細胞器之水性及凍乾醫藥組合物。例如，某些實施例係關於包含艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶、約154 mM氯化鈉及約0.005%之聚山梨醇酯20之低pH(例如，約6)組合物。

在某些實施例中，水性醫藥組合物之特徵在於能夠分佈至個體之腦組織及/或細胞中。例如，本發明醫藥組合物能夠分佈至該個體之大腦皮質、尾狀核及豆狀核殼、丘腦、灰質、小腦、神經元及/或普爾欽細胞中。

在其他實施例中，醫藥組合物促進其中包含之一或多種治療劑(例如，用於治療溶酶體貯積症之酵素)之細胞定位。例如，在某些實施例中，醫藥組合物促進或展示治療劑之細胞定位，從而使得治療劑可容易地分佈至患病或目標細胞(例如，患有諸如亨特氏症候群或異染性腦白質營養不良等溶酶體貯積症之個體中的神經元及/或少突膠質細胞)中。在一些特定實施例中，水性醫藥組合物促進或促使其中含有之治療劑分佈至目標細胞或組織之一或多種特定細胞器(例如，溶酶體)中。在其他實施例中，醫藥組合物能夠客觀地改良、改變或

調節一或多種疾病(例如溶酶體貯積症)之臨床病程。例如，在一些實施例中，醫藥組合物減少受侵襲個體(例如，患有亨特氏症候群或異染性腦白質營養不良之個體)之腦組織中之細胞空泡形成。在其他實施例中，醫藥組合物減少受溶酶體貯積症(例如，亨特氏症候群)侵襲之個體之腦組織中特有的柵狀片層體(palisaded lamellar body)或「斑馬體(zebra body)」的存在。

在某些實施例中，醫藥組合物引起或展示一或多種通常與溶酶體貯積症(例如，亨特氏症候群或異染性腦白質營養不良)有關之病理或生物標記之存在或積聚的減少(例如，約5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更多減少)或完全消除。具體而言，該等醫藥組合物引起或展示CNS細胞及組織(例如，神經元及/或少突膠質細胞)中之病理或生物標記的減少或消除。例如，在一些實施例中，在投與個體後，醫藥組合物展示或達成個體CNS細胞及組織(例如，大腦皮質、白質及/或丘腦)中之生物標記溶酶體相關膜蛋白1 (LAMP1)之積聚的減少。

在一些實施例中，本發明係關於減少或消除一或多種與溶酶體貯積症有關之病理或生物標記(例如，LAMP1)之存在或積聚的方法。類似地，一些實施例係關於增加一或多種與溶酶體貯積症有關之病理或生物標記(例如，LAMP1)之降解(或降解速率)的方法。

在其他實施例中，水性醫藥組合物(及在復原時之凍乾醫藥組合物)具有小於約30 mg/mL或介於約10-20 mg/mL之間之蛋白質濃度。該等醫藥組合物之劑量體積通常小於約5.0 mL且較佳小於約3.0 mL。

在某些實施例中，在投與醫藥組合物後，在目標細胞及組織(例

如，腦組織或CSF)中檢測到治療濃度的該等醫藥組合物中含有之治療劑。例如，在投與後(例如，在經腦脊髓膜內投與個體後1週、3天、48小時、36小時、24小時、18小時、12小時、8小時、6小時、4小時、3小時、2小時、1小時、30分鐘或更短時間)，醫藥組合物在個體之CNS組織中達到至少30 μg/ml之濃度。在另一實施例中，醫藥組合物在個體之目標組織或細胞(例如，腦組織或神經元)中達到至少20 μg/ml、至少15 μg/ml、至少10 μg/ml、至少7.5 μg/ml、至少5 μg/ml、至少2.5 μg/ml、至少1 μg/ml或至少0.5 μg/ml之濃度。

在一些涵蓋的實施例中，蛋白質在該醫藥組合物中穩定(例如，在室溫下穩定至少十二個月)。本發明亦涵蓋緩衝劑係以足以使組合物之pH保持介於約5.0與約8.0之間的量存在之水性醫藥組合物(及在復原時之凍乾醫藥組合物)。在某些實施例中，存在於水性醫藥組合物中之緩衝劑係磷酸鈉，且係以足以使組合物之pH保持約7.0的量存在。適宜緩衝劑之實例包括乙酸鹽、琥珀酸鹽、檸檬酸鹽、磷酸鹽及Tris。

水性醫藥組合物可進一步包含一或多種滲透壓調節劑，該等滲透壓調節劑可為鹽或糖(例如，蔗糖、葡萄糖、甘露醇及氯化鈉)。在滲透壓調節劑係蔗糖之情形下，其可以小於約3.0% (w/v)之濃度存在。水性醫藥組合物可進一步包含一或多種表面活性劑(例如，非離子型表面活性劑，例如聚山梨醇酯20及聚山梨醇酯80)。表面活性劑聚山梨醇酯20或80可以小於約0.04% (w/v)或小於約0.005% (w/v)之濃度存在於水性組合物及凍乾組合物中。在一些特定實施例中，水性及凍乾醫藥組合物包含磷酸鈉、聚山梨醇酯20及蔗糖以及重組蛋白質。

某些實施例之水性醫藥組合物(及在復原時之凍乾醫藥組合物)較佳經調配以使得治療劑不會自組合物沉澱出來。在某些實施例中，組合物不含有鈣或其鹽。

較佳者係在投與個體時不會隨時間展示嚴重不良臨床體徵或反應之組合物。在一較佳實施例中，水性醫藥組合物適於將治療劑遞送至個體之腦脊髓液及/或經腦脊髓膜內遞送，由此使治療劑在投與該個體後分佈至該個體之腦組織(例如，大腦皮質、小腦及/或大腦)中。因此，某些實施例之水性及凍乾醫藥組合物較佳係無菌的且利用適當無菌技術投與個體。

本發明亦涵蓋治療患有特徵在於一或多種溶酶體酵素之含量降低之疾病(例如，亨特氏症候群、B型聖菲利波症候群或異染性腦白質營養不良)之個體的方法以及治療患有具有中樞神經系統病因或表現之疾病之個體的方法。在每一情形下，該等方法涵蓋投與本文所述之水性及凍乾醫藥組合物。該疾病可包括(例如)A型聖菲利波症候群、B型聖菲利波症候群、亨特氏症候群、異染性腦白質營養不良及球樣細胞性腦白質營養不良。某些實施例係關於改良、治癒或調節疾病(例如溶酶體貯積症)之進展的方法。具體而言，該等實施例係關於治療被描述成具有一或多種CNS表現之疾病(例如，亨特氏症候群)的方法。例如，在某些實施例中，本發明所揭示方法係關於在向個體(例如，患有亨特氏症候群之個體)經腦脊髓膜內投與艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶後減少受侵襲個體腦組織中之細胞空泡形成。在另一實施例中，本發明所揭示方法係關於減少受溶酶體貯積症(例如，亨特氏症候群或B型聖菲利波症候群)侵襲之個體之腦組織中特有的柵狀片層體

或「斑馬體」的存在。 在一較佳實施例中，投與水性醫藥組合物(及在復原時之凍乾醫藥組合物)之個體係人類。在另一實施例中，人類係新生兒。可直接將該等組合物投與該個體之CNS中(例如，經腦脊髓膜內)。

某些實施例亦包括調配適於將治療劑遞送至個體中樞神經系統中之醫藥組合物的方法。該等方法通常包含評估該治療劑於該醫藥組合物中之溶解性、評估該治療劑於該醫藥組合物中之穩定性及評估該醫藥組合物在經腦脊髓膜內投與個體後之耐受性。

本文所述組合物及方法尤其可用於治療一或多種溶酶體貯積症之神經及軀體後遺症。例如，一些實施例係關於將一或多種治療劑遞送至個體之CNS中(例如，經腦脊髓膜內、經腦室內或經腦池內)以治療溶酶體貯積症(例如，A型聖菲利波症候群、B型聖菲利波症候群、亨特氏症候群、異染性腦白質營養不良及球樣細胞性腦白質營養不良)之CNS或神經後遺症及表現的組合物及方法。某些實施例亦包括治療患有溶酶體貯積症之個體的方法，其中該等方法包含治療該溶酶體貯積症之CNS或神經後遺症及表現的步驟(例如，藉由將一或多種治療劑遞送至個體之CNS中)及治療該溶酶體貯積症之軀體或全身後遺症及表現的步驟(例如，藉由將一或多種治療劑非經腸、經靜脈內、經口、局部或藉由吸入投與個體)。例如，可將組合物經腦脊髓膜內投與個體，由此將一或多種治療劑遞送至個體之CNS中並治療神經後遺症，外加靜脈內投與一或多種治療劑以將該等治療劑遞送至全身循環之細胞及組織(例如，心臟、肺、肝、腎或淋巴結之細胞及組織)中，由此治療軀體後遺症。例如，可向患有溶酶體貯積症(例如，

亨特氏症候群)或受該疾病侵襲之個體每月一次經腦脊髓膜內投與包含一或多種治療劑(例如，艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶)之醫藥組合物以治療神經後遺症，並且每週一次經靜脈內向該個體投與相同或不同治療劑以治療全身或軀體表現。

在一些實施例中，本發明提供治療具有CNS病因之溶酶體貯積症的方法，其藉由向需要治療之個體經腦脊髓膜內投與治療有效量之重組溶酶體酵素來實施。在一些實施例中，本發明可用於治療選自以下疾病之溶酶體貯積症：異染性腦白質營養不良、A型聖菲利波症候群、亨特氏症候群、黏多糖貯積症、B型聖菲利波症候群或球樣細胞性腦白質營養不良。在一些實施例中，適於本發明之溶酶體酵素選自芳基硫酸酯酶A(ASA)、乙醯肝素N-硫酸酯酶、艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶、α-L-艾杜糖醛酸酶、α-N-乙醯基葡萄糖胺酶或半乳糖腦苷酶。

在一些實施例中，本發明提供治療異染性腦白質營養不良之方法，其藉由向需要治療之個體經腦脊髓膜內投與治療有效量之重組ASA來實施。在一些實施例中，治療有效量大於約1 mg/kg腦重量。在一些實施例中，治療有效量大於約10 mg/kg腦重量。在一些實施例中，治療有效量介於約10-100 mg/kg腦重量範圍內。在一些實施例中，每隔一個月經腦脊髓膜內投與一次重組ASA。在一些實施例中，每月經腦脊髓膜內投與一次重組ASA。在一些實施例中，每兩週經腦脊髓膜內投與一次重組ASA。在一些實施例中，本發明方法進一步包含向個體經靜脈內投與重組ASA之步驟。在一些實施例中，適於本發明之重組ASA係重組人類ASA。

某些實施例至少部分係基於以下發現：本文所揭示醫藥組合物

促進一或多種治療劑(例如，以重組方式製備之酵素)有效遞送及分佈至CNS之特定(例如，目標)組織、細胞及/或細胞器中。某些實施例之醫藥組合物及調配物能夠溶解高濃度之治療劑(例如，蛋白質或酵素)，且適於將該等治療劑遞送至個體之CNS中以治療具有CNS成份(component)及/或病因之疾病。本文所述組合物之特徵進一步在於投與至需要其之個體之CNS(例如，經腦脊髓膜內)時具有改良之穩定性及改良之耐受性。

治療性蛋白質

適於本發明之治療性部分可為可取代天然存在之芳基硫酸酯酶A(ASA)蛋白質活性或對一或多種與ASA缺陷有關之表型或症狀進行救治的任一分子或分子之一部分。在一些實施例中，適於本發明之治療性部分係具有與成熟人類ASA蛋白質實質上類似或相同之N-末端及C-末端以及胺基酸序列之多肽。

通常，人類ASA係以處理為成熟形式之前體分子來產生。此處理一般係藉由移除18個胺基酸之信號肽來進行。通常，前體形式亦稱為全長前體或全長ASA蛋白質，其含有507個胺基酸。解離N-末端之18個胺基酸，從而獲得長489個胺基酸之成熟形式。因此，預計ASA蛋白質活性通常不需要N-末端18個胺基酸。典型野生型或天然存在之人類ASA蛋白質之成熟形式(SEQ ID NO:1)及全長前體(SEQ ID NO:2)之胺基酸序列顯示於表44中。

表44. 人類芳基硫酸酯酶A

成熟形式	RPPNIVLIFADDLGYGDLGCYGHPSSTTPNLDQLAAGGLRFTDFYVPVSLCTPS RAALLTGRLPVRMGMYPGVLVPSSRGGLPLEEVTVAEVLAARGYLTGMAGKWHL GVGPEGAFLPPHQGFHRFLGIPYSHDQGPCQNLTCFPPATPCDGGCDQGLVPIP LLANLSVEAQPPWLPGLEARYMAFAHDLMADAQRQDRPFFLYYASHHTHYPQFS

	GQSFAERSGRGPFGDSLMELDAAVGTLMTAIGDLGLLEETLVIFTADNGPETMR MSRGGCSGLLRCGKGTTYEGGVREPALAFWPGHIAPGVTHELASSLDLLPTLAA LAGAPLPNVTLDGFDLSPLLLGTGKSPRQSLFFYPSYPDEVRGVFAVRTGKYKA HFFTQGSAHSDTTADPACHASSSLTAHEPPLLYDLSKDPGENYNLLGGVAGATP EVLQALKQLQLLKAQLDAAVTFGPSQVARGEDPALQICCHPGCTPRPACCHCPD PHA (SEQ ID NO:1)
全長前體	MGAPRSLLLALAAGLAVARPPNIVLIFADDLGYGDLGCYGHPSSTTPNLDQLAA GGLRFTDFYVPVSLCTPSRAALLTGRLPVRMGMYPGVLVPSSRGGLPLEEVTVA EVLAARGYLTGMAGKWHLGVGPEGAFLPPHQGFHRFLGIPYSHDQGPCQNLTCF PPATPCDGGCDQGLVPIPLLANLSVEAQPPWLPGLEARYMAFAHDLMADAQRQ DRPFFLYYASHHTHYPQFSGQSFAERSGRGPFGDSLMELDAAVGTLMTAIGDLGL LEETLVIFTADNGPETMRMSRGGCSGLLRCGKGTTYEGGVREPALAFWPGHIAP GVTHELASSLDLLPTLAALAGAPLPNVTLDGFDLSPLLLGTGKSPRQSLFFYPS YPDEVRGVFAVRTGKYKAHFFTQGSAHSDTTADPACHASSSLTAHEPPLLYDLS KDPGENYNLLGGVAGATPEVLQALKQLQLLKAQLDAAVTFGPSQVARGEDPALQ ICCHPGCTPRPACCHCPDPHA (SEQ ID NO:2)

調配物

傳統用於將治療劑遞送至個體之CNS中之水性醫藥溶液及組合物包括不含緩衝劑之等滲鹽水及Elliott's B溶液(其為人造CSF)。描述CSF相對於Elliott's B溶液之組成之比較包括於下表1中。如表1中所示，Elliott's B溶液之濃度接近等同於CSF之濃度。然而，Elliott's B溶液含有非常低之緩衝劑濃度，且因此可能不能提供穩定治療劑(例如，蛋白質)所需要之足夠緩衝能力，尤其在較長時間內(例如，在儲存條件期間)。此外，Elliott's B溶液含有某些可能與意欲遞送一些治療劑且尤其蛋白質或酵素之調配物不相容的鹽。例如，存在於Elliott's B溶液中之鈣鹽能夠介導蛋白質沉澱且由此降低調配物之穩定性。

表1

溶液	Na^+ mEq/L	K^+ mEq/L	Ca^{++} mEq/L	Mg^{++} mEq/L	$HCO3^-$ mEq/L	Cl^- mEq/L	pH	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

本文所述醫藥組合物經調配以能夠穩定與其一起調配之一或多種治療劑(例如，重組蛋白質)，或另一選擇為減緩或阻止其降解。本文所用之術語「穩定的」係指治療劑(例如，重組酵素)能夠在較長時間內保持其治療功效(例如，其預期生物活性及/或生理化學完整性之全部或大部分)。可在較長時間內(例如，較佳持續至少1個月、3個月、6個月、12個月、18個月、24個月、30個月、36個月或更多個月)評估治療劑之穩定性及醫藥組合物保持該治療劑之穩定性的能力。在調配物之情形下，穩定調配物係其中之治療劑在儲存後及在處理(例如冷凍/解凍、機械混合及凍乾)期間基本上保持其物理及/或化學完整性及生物活性者。對於蛋白質穩定性而言，其可藉由高分子量(HMW)聚集體之形成、酵素活性之損失、肽片段之產生及電荷曲線之移位來量測。

治療劑之穩定性對於保持使該治療劑起到其預期治療功能所需要之特定治療劑濃度範圍特別重要。可在較長時間內相對於治療劑之生物活性或生理化學完整性進一步評估治療劑之穩定性。例如，可比較給定時間點之穩定性與較早時間點(例如，調配後第0天)之穩定性或未調配治療劑之穩定性，且該比較之結果以百分比表示。較佳地，本發明醫藥組合物在較長時間內保持治療劑生物活性或生理化學完整性之至少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%(例如，如在至少約6-12個月內於室溫下或在加速儲存條件下所量測)。

治療劑較佳可溶於本發明醫藥組合物中。當關於本發明治療劑

時，術語「可溶的」係指該等治療劑能夠形成均質溶液。較佳地，治療劑於溶液中之溶解性足以容許將治療有效量之治療劑遞送至目標作用位點，其中將治療劑投與至該溶液中並藉由該溶液轉運至目標作用位點(例如，腦細胞及組織)。數個因素可影響治療劑之溶解性。例如，可影響蛋白質溶解性之有關因素包括離子強度、胺基酸序列及存在其他輔助溶解劑或鹽(例如鈣鹽)。在一些實施例中，醫藥組合物經調配而使該等組合物不包含鈣鹽。

適於凍乾之調配物可含有不同濃度之所關注治療劑。在一些實施例中，調配物可含有濃度在約1 mg/ml至100 mg/ml(例如，約1 mg/ml至50 mg/ml、1 mg/ml至60 mg/ml、1 mg/ml至70 mg/ml、1 mg/ml至80 mg/ml、1 mg/ml至90 mg/ml、1 mg/ml至100 mg/ml、25 mg/ml至100 mg/ml、50 mg/ml至100 mg/ml)範圍內之所關注蛋白質或治療劑。在一些實施例中，在一些實施例中，適於凍乾之調配物可含有濃度為約25 mg/ml、50 mg/ml、75 mg/ml及100 mg/ml之所關注蛋白質。

儘管通常對於非經腸投與藥物而言等滲溶液較佳，但使用等滲溶液可能限制一些治療劑且尤其一些蛋白質及/或酵素之充分溶解。已證實輕微高滲溶液(例如，高達175 mM氯化鈉存於5 mM磷酸鈉中，pH 7.0)及含糖溶液(例如，高達2%蔗糖存於5 mM磷酸鈉中，pH 7.0)在猴子中具有良好耐受性。最常見之經批准CNS團注調配組合物係鹽水(150 mM NaCl水溶液)。

先前已測試數種組合物且展示較差之安全性特徵(safety profile)。(von Specht BU等人，Neurology (1979) 29:848-854；

Grondin R等人，Brain (2002) 125:2191-2201；Gill SS等人，Nature Medicine (2003) 9(5):589-95；Hood DD等人，Anesthesiology (1995) 82(2): 331-43；Sakura SM等人，Anesthesiology (1997) 87(4):771-8；Eisenach JC等人，Pain (2002) 99:599-604；King H等人，Can J Anaesth (1993) 40(5):431-4；Rane K等人，Anesthesiology (1998) 89(5):1108-15；Steven RA等人，Anesthesiology (1993) 78(3):492-7；Dominiquez AR等人，Clin Transl Oncol (2005) 7(6): 232-8；Kim S等人，J. Clin. Oncology (1993) 11(11):2186-2193；Shulman M等人，Reg Anesth (1990) 15(3):142-6；Shulman M等人，Reg Anesth Pain Med (1998) 23(4):395-401)。

本發明醫藥組合物之特徵在於其耐受性。本文所用之術語「可耐受的」及「耐受性」係指本發明醫藥組合物不在投與該組合物之個體中引發不良反應或另一選擇為不在投與該組合物之個體中引發嚴重不良反應之能力。在一些實施例中，本發明醫藥組合物在投與該等組合物之個體中具有良好耐受性。

許多治療劑且尤其本發明之蛋白質及酵素需要受控pH及特定賦形劑以在本發明醫藥組合物中保持其溶解性及穩定性。

下表2給出認為可保持本發明蛋白質治療劑之溶解性及穩定性之蛋白質調配物的典型態樣。

表2

參數	**典型範圍/類型**	**原理**
pH	5至7.5	用於穩定性 有時亦用於溶解性
緩衝劑類型	乙酸鹽、琥珀酸鹽、檸檬酸鹽、組胺酸、磷酸鹽或Tris	保持最佳pH 亦可影響穩定性

緩衝劑濃度	5-50 mM	保持pH 亦可穩定或增加離子強度
滲透壓調節劑	NaCl、糖、甘露醇	使其為等滲透壓或等滲溶液
表面活性劑	聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80	針對介面及剪切保持穩定
其他	數十至數百mM之胺基酸(例如精胺酸)	增強溶解性或穩定性

醫藥組合物之pH係能夠改變治療劑(例如，酵素或蛋白質)於水性醫藥組合物中之溶解性的另一因素，且因此本發明醫藥組合物較佳包含一或多種緩衝劑。在一些實施例中，水性醫藥組合物包含足以使該組合物之最佳pH保持介於約4.0-8.0之間、介於約5.0-7.5之間、介於約5.5-7.0之間、介於約6.0-7.0之間及介於約6.0-7.5之間的量之緩衝劑。在其他實施例中，緩衝劑包含約5-50 mM之間之磷酸鈉且足以使該水性醫藥組合物之最佳pH保持約7.0。適宜緩衝劑包括(例如)乙酸鹽、琥珀酸鹽、檸檬酸鹽、磷酸鹽、其他有機酸及叁(羥甲基)胺基甲烷(「Tris」)。本發明醫藥組合物之緩衝劑濃度及pH範圍在使於成年及幼年猴子中給藥時調配物耐受性最大化中係重要因素。緩衝劑濃度可為約1 mM至約30 mM或約3 mM至約20 mM，此端視(例如)緩衝劑及調配物之期望等滲性而定。在一些實施例中，適宜緩衝劑係以約1 mM、5 mM、10 mM、15 mM、20 mM、25 mM、30 mM或50 mM之濃度存在。

在一些實施例中，調配物含有等滲劑以使調配物保持等滲。通常，所謂「等滲」意指所關注調配物具有與人類血液基本上相同之滲透壓。等滲調配物通常會具有約240 mOsm/kg至約350 mOsm/kg之滲透壓。等滲性可使用(例如)蒸氣壓或冰點型滲透壓計來量測。實例性

等滲劑包括(但不限於)甘胺酸、山梨醇、甘露醇、氯化鈉及精胺酸。在一些實施例中，在一些實施例中，適宜等滲劑可以按重量計約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5.0%)之濃度存在於預凍乾調配物中。在一些實施例中，用於凍乾之調配物含有等滲劑以使預凍乾調配物或復原調配物保持等滲。

在一些實施例中，調配物可含有穩定劑以保護蛋白質。通常，適宜穩定劑係非還原性糖(例如蔗糖、棉子糖、海藻糖)或胺基酸(例如甘胺酸、精胺酸及甲硫胺酸)。凍乾調配物中穩定劑之量通常應使調配物等滲。然而，高滲復原調配物亦可適宜。另外，穩定劑之量不應過低而使治療劑發生不可接受之程度的降解/聚集。調配物中之實例性穩定劑濃度可介於約1 mM至約400 mM(例如，約30 mM至約300 mM及約50 mM至約100 mM)、或另一選擇為以重量計0.1%至15%(例如，1%至10%、5%至15%、5%至10%)之範圍內。在一些實施例中，穩定劑與治療劑之質量量之比率係約1:1。在其他實施例中，穩定劑與治療劑之質量量之比率可為約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20:1。在一些實施例中，適於凍乾之穩定劑亦為凍乾保護劑。

儘管本發明醫藥組合物在投與個體後通常呈水性形式，但在一些實施例中本發明醫藥組合物係凍乾的。該等組合物在投與個體之前必須藉由向其中添加一或多種稀釋劑加以復原。適宜稀釋劑包括(但不限於)無菌水、注射用抑菌水及無菌鹽水溶液。較佳地，在復原醫藥組合物後，其中含有之治療劑穩定，易溶解且在投與個體後展示耐

受性。

在一些實施例中，適於凍乾之調配物可進一步包括一或多種增積劑。「增積劑」係增加凍乾混合物之體積並有助於凍乾餅之物理結構的化合物。例如，增積劑可改良凍乾餅之外觀(例如，基本上均勻之凍乾餅)。適宜增積劑包括(但不限於)氯化鈉、乳糖、甘露醇、甘胺酸、蔗糖、海藻糖、羥乙基澱粉。增積劑之實例性濃度係約1%至約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%及10.0%)。

本發明之醫藥組合物、調配物及相關方法可用於將多種治療劑遞送至個體之CNS中(例如，經腦脊髓膜內、經腦室內或經腦池內)及用於治療有關疾病。本發明醫藥組合物尤其可用於將蛋白質及酵素(例如，酵素替代療法)遞送至患有溶酶體貯積症之個體中。溶酶體貯積症係由溶酶體功能障礙引起之一類相對罕見之遺傳性代謝病症。溶酶體疾病之特徵在於溶酶體內積聚未消化之大分子，此導致該等溶酶體之尺寸及數量增加且最終導致細胞功能障礙及臨床異常。

在一些實施例中，期望將表面活性劑添加至調配物中。實例性表面活性劑包括非離子型表面活性劑，例如聚山梨醇酯(例如，聚山梨醇酯20或80)；泊洛沙姆(poloxamer)(例如，泊洛沙姆188)；Triton；十二烷基硫酸鈉(SDS)；月桂基硫酸鈉；辛基糖苷鈉；月桂基-、肉豆蔻基-、亞油基-或硬脂基-磺基甜菜鹼；月桂基-、肉豆蔻基-、亞油基-或硬脂基-肌胺酸；亞油基-、肉豆蔻基-或鯨蠟基-甜菜鹼；月桂醯胺丙基-、椰油醯胺丙基-、亞油醯胺丙基-、肉豆蔻醯胺丙基-、棕櫚油

醯胺丙基-或異硬脂醯胺丙基-甜菜鹼(例如，月桂醯胺丙基甜菜鹼)；肉豆蔻醯胺丙基-、棕櫚油醯胺丙基-或異硬脂醯胺丙基-二甲胺；甲基椰油醯基牛磺酸鈉或甲基油醯基牛磺酸鈉；及MONAQUAT™系列(Mona Industries公司，Paterson, N.J.)、聚乙二醇、聚丙二醇及乙二醇與丙二醇之共聚物(例如，Pluronics、PF68等)。通常，所添加表面活性劑之量應可減少蛋白質之聚集並使微粒或起泡之形成最小化。例如，表面活性劑可以約0.001-0.5%(例如，約0.005-0.05%或0.005-0.01%)之濃度存在於調配物中。具體而言，表面活性劑可以約0.005%、0.01%、0.02%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%或0.5%等之濃度存在於調配物中。或者或另外，可將表面活性劑添加至凍乾調配物、預凍乾調配物及/或復原調配物中。

其他醫藥上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑(例如闡述於Remington's Pharmaceutical Sciences，第16版，Osol, A.編輯(1980)中者)可包括於調配物(及/或凍乾調配物及/或復原調配物)中，前提為其不會不良地影響調配物之期望特徵。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對接受者無毒，且包括(但不限於)額外緩衝劑；防腐劑；共溶劑；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；螯合劑，例如EDTA；金屬錯合物(例如，Zn-蛋白質錯合物)；生物可降解聚合物，例如聚酯；及/或鹽形成抗衡離子，例如鈉。

本發明調配物可基於以下來評估：產品品質分析、復原時間(若凍乾)、復原品質(若凍乾)、高分子量、水分及玻璃轉變溫度。通常，蛋白質品質及產品分析包括產品降解速率分析，其係使用包括(但不限於)以下之方法來達成：尺寸排除HPLC (SE-HPLC)、陽離子交換-

HPLC (CEX-HPLC)、X-射線繞射(XRD)、調幅式差示掃描量熱法(mDSC)、反相HPLC (RP-HPLC)、多角度光散射(MALS)、螢光、紫外線吸收、濁度測定法、毛細管電泳(CE)、SDS-PAGE及其組合。在一些實施例中，對本發明產品之評價可包括評價外觀(液體或餅外觀)之步驟。

通常，調配物(凍乾或水溶液)可在室溫下儲存較長時間。儲存溫度通常可介於0℃至45℃(例如，4℃、20℃、25℃、45℃等)之範圍內。調配物可儲存數月時間至數年時間。儲存時間通常可為24個月、12個月、6個月、4.5個月、3個月、2個月或1個月。調配物可直接儲存於用於投與之容器中，以省去轉移步驟。

調配物可直接儲存於亦可用作復原器皿之凍乾容器(若凍乾)中，以省去轉移步驟。或者，凍乾產品調配物可量測成較小子樣(increment)以便儲存。儲存通常應避免導致蛋白質降解之環境，包括(但不限於)暴露於陽光、UV輻射、其他形式之電磁輻射、過熱或過冷、快速熱衝擊及機械衝擊。

異染性腦白質營養不良疾病(MLD)之治療

異染性腦白質營養不良疾病(MLD)係因酵素芳基硫酸酯酶A(ASA)缺陷引起之體染色體隱性遺傳病症。ASA係由人類中之ARSA基因編碼，其係酵素將腦苷脂3-硫酸或鞘脂3-O-硫酸半乳糖苷神經醯胺(髓硫酯)分解成腦苷脂及硫酸酯之酵素。在不存在該酵素時，髓硫酯在神經系統(例如，髓鞘、神經元及神經膠質細胞)中積聚且以較低程度在內臟器官中積聚。該等分子及細胞事件之結果係CNS及PNS內之進行性脫髓鞘及軸突損失，且在臨床上伴隨嚴重運動及認知功能障

礙。

此病症之定義性臨床特徵係中樞神經系統(CNS)變性，其引起認知損害(尤其例如智力遲鈍、神經病症及失明)。

MLD本身可在幼兒中呈現(遲發性幼兒型)，其中患病兒童通常在一歲後(例如，在約15-24個月)立即開始呈現症狀，且一般不會活過5歲。MLD本身可出現在兒童中呈現(幼年型)，其中患病兒童通常在約3-10歲前呈現認知損害，且壽命可變(例如，在症狀發作後10-15年範圍內)。MLD本身可在成年中呈現(成年發作型)且可出現在任一年齡之個體中(例如，通常為16歲及更晚)，且疾病進展可顯著不同。

可使用本發明組合物及方法有效治療患有或易患MLD之個體。本文所用之術語「治療(treat或treatment)」係指改善一或多種與疾病有關之症狀、預防或延遲疾病之一或多種症狀之發作及/或降低疾病之一或多種症狀之嚴重程度或頻率。實例性症狀包括(但不限於)顱內壓、腦外積水、中樞及周圍神經系統之髓鞘中以及內臟器官中之硫酸化糖脂積聚、CNS及PNS內之進行性脫髓鞘及軸突損失及/或運動及認知功能障礙。

在一些實施例中，治療係指在MLD患者中部分或完全地緩和、改善、減緩、抑制神經損害、延遲其發作、降低其嚴重程度及/或發生率。本文所用之術語「神經損害」包括與中樞神經系統(例如，腦及脊髓)之損害有關之各種症狀。在一些實施例中，MLD之各種症狀與周圍神經系統(PNS)之損害有關。在一些實施例中，MLD患者之神經損害之特徵在於大肌肉運動功能降低。應瞭解，大肌肉運動功能可藉由任何適宜方法來評估。例如，在一些實施例中，大肌肉運動功能

係使用大肌肉運動功能量表-88 (GMFM-88)總原始分數以相對於運動功能基線之變化來量測。

在一些實施例中，治療係指減少不同組織中之髓硫酯積聚。在一些實施例中，治療係指減少腦目標組織、脊髓神經元及/或周圍目標組織中之髓硫酯積聚。在某些實施例中，髓硫酯積聚與對照相比減少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更多。在一些實施例中，髓硫酯積聚與對照相比減少至至多1/1、1/2、1/3、1/4、1/5、1/6、1/7、1/8、1/9或1/10。應瞭解，髓硫酯貯積可藉由任何適宜方法來評估。例如，在一些實施例中，髓硫酯貯積係藉由艾爾遜藍(Alcian blue)染色來量測。在一些實施例中，髓硫酯貯積係藉由LAMP-1染色來量測。

在一些實施例中，治療係指神經元(例如，含有普爾欽細胞之神經元)中之空泡形成減少。在某些實施例中，神經元中之空泡形成與對照相比減少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更多。在一些實施例中，空泡形成與對照相比減少至至多1/1、1/2、1/3、1/4、1/5、1/6、1/7、1/8、1/9或1/10。

在一些實施例中，治療係指各種組織中之ASA酵素活性增強。在一些實施例中，治療係指腦目標組織、脊髓神經元及/或周圍目標組織中之ASA酵素活性增強。在一些實施例中，ASA酵素活性與對照相比增強約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%或更多。在一些實施例中，ASA酵素活性與對照相比增強至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。在一些實施例中，增強之ASA酵素活性係至少約10 nmol/hr/mg、20 nmol/hr/mg、40 nmol/ hr/mg、50 nmol/hr/mg、60 nmol/hr/mg、70 nmol/hr/mg、80 nmol/hr/mg、90 nmol/hr/mg、100 nmol/hr/mg、150 nmol/hr/mg、200 nmol/hr/mg、250 nmol/hr/mg、300 nmol/hr/mg、350 nmol/hr/mg、400 nmol/hr/mg、450 nmol/hr/mg、500 nmol/hr/mg、550 nmol/hr/mg、600 nmol/hr/mg或更高。在一些實施例中，腰區中之ASA酵素活性增強。在一些實施例中，腰區中增強之ASA酵素活性係至少約2000 nmol/hr/mg、3000 nmol/hr/mg、4000 nmol/hr/mg、5000 nmol/hr/mg、6000 nmol/hr/mg、7000 nmol/hr/mg、8000 nmol/hr/mg、9000 nmol/hr/mg、10,000 nmol/hr/mg或更高。

在一些實施例中，治療係指認知能力損失之進展減慢。在某些實施例中，認知能力損失之進展與對照相比減慢約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更多。在一些實施例中，治療係指發育遲緩減輕。在某些實施例中，發育遲緩與對照相比減輕約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更多。

在一些實施例中，治療係指存活(例如存活時間)延長。例如，治療可延長患者之預期壽命。在一些實施例中，本發明之治療可使患者

之預期壽命與一或多個患有類似疾病之未治療對照個體之平均預期壽命相比延長超過約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約100%、約105%、約110%、約115%、約120%、約125%、約130%、約135%、約140%、約145%、約150%、約155%、約160%、約165%、約170%、約175%、約180%、約185%、約190%、約195%、約200%或更多。在一些實施例中，本發明之治療使患者之預期壽命與一或多個患有類似疾病之未治療對照個體之平均預期壽命相比延長超過約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約2年、約3年、約4年、約5年、約6年、約7年、約8年、約9年、約10年或更長時間。在一些實施例中，本發明之治療使患者長期存活。本文所用之術語「長期存活」係指存活時間或預期壽命長於約40年、45年、50年、55年、60年或更多年。

本文所用之術語「改良」、「增加」或「降低」表示相對於對照之值。在一些實施例中，適宜對照係基線量測，例如相同個體在開始本文所述治療前之量測、或對照個體(或多個對照個體)在不存在本文所述治療時之量測。「對照個體」係與所治療個體之年齡大致相同及/或性別相同(以確保所治療個體與對照個體之疾病階段相當)之患有相同形式MLD(例如遲發性幼兒型、幼年型或成年發作型)之個體。

所治療個體(individual)(亦稱作「患者」或「個體(subject)」)係患有MLD或可能罹患MLD之個體(胎兒、幼兒、兒童、少年或成人)。個體可具有殘餘內源ASA呈現及/或活性，或無可量測活性。例如，

患有MLD之個體之ASA呈現程度可為正常ASA呈現程度之約30-50%以下、約25-30%以下、約20-25%以下、約15-20%以下、約10-15%以下、約5-10%以下、約0.1-5%以下。

在一些實施例中，個體係最近診斷患有該疾病之個體。通常，早期治療(診斷後盡可能快地開始治療)對於使疾病之影響最小化及使治療之益處最大化而言係至關重要的。

投與

本發明之靶向治療劑(或含有其之組合物或藥劑)係以治療有效量(即，在每隔一定時間投與時，足以藉由(例如)改善與疾病有關之症狀、預防該疾病或延遲其發作、及/或亦降低該疾病之症狀之嚴重程度或頻率來治療該疾病之劑量量，如上文所述)投與。本文所用之治療有效量亦稱作治療有效劑量或治療有效劑量量。對於疾病治療而言治療上有效的劑量將取決於疾病影響之性質及程度，且可藉由標準臨床技術確定。另外，可視情況採用活體外或活體內分析來幫助確定最佳劑量範圍。擬採用之準確劑量亦將取決於投與途徑及疾病之嚴重性，且應根據執業醫師之判斷及各患者之情況來確定。可自得自活體外或動物模型測試系統之劑量反應曲線來推斷有效劑量(例如，如由美國衛生及人類服務部(U.S. Department of Health and Human Services)食品與藥品管理局(Food and Drug Administration)及藥品評價與研究中心(Center for Drug Evaluation and Research)於「Guidance for Industry: Estimating Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers」，Pharmacology and Toxicology, 2005年7月中所述，其全部內容以引用方式併入本文

中)。

在一些實施例中，治療有效量可為(例如)約0.01-25 mg/kg體重、約1-20 mg/kg、約4-20 mg/kg、約5-15 mg/kg、約5-10 mg/kg。

用於特定個體之有效劑量可端視個體需要隨時間而變化(例如，增加或降低)。例如，在身體性疾病或應力情況下，或若疾病症狀惡化，則可增加劑量量。

端視疾病影響之性質及程度，每隔一定時間持續投與治療有效量之本發明靶向治療劑(或含有其之組合物或藥劑)。本文所用以一「間隔」投與指示週期性投與治療有效量(與一次性劑量相區分)。該間隔可藉由標準臨床技術來確定。在一些實施例中，本發明之靶向治療劑(或含有其之組合物或藥劑)係兩個月一次、每月一次、每月兩次、每三週一次、每兩週一次、每週一次、每週兩次、每週三次或每日一次投與。單一個體之投與間隔不一定係固定間隔，且可隨時間而變，端視該個體之需要而定。例如，在身體性疾病或應力情況下，或若疾病症狀惡化時，則劑量間之間隔可縮短。

在投與某些實施例之醫藥組合物後，可在目標細胞及組織(例如，腦組織或CSF)中達到或檢測到該等組合物中含有之治療劑的治療濃度。在某些實施例中，在投與後(例如，在將醫藥組合物經腦脊髓膜內投與個體後1週、3天、48小時、36小時、24小時、18小時、12小時、8小時、6小時、4小時、3小時、2小時、1小時、30分鐘或更短時間)，醫藥組合物在個體之CNS組織及細胞中達到至少30 μg/ml之濃度。

端視疾病影響之性質及程度，每隔一定時間持續投與治療有效

量之芳基硫酸酯酶。本文所用以一「間隔」投與指示週期性投與治療有效量(與一次性劑量相區分)。該間隔可藉由標準臨床技術來確定。在一些實施例中，治療劑係兩個月一次、每月一次、每月兩次、每三週一次、每兩週一次、每週一次、每週兩次、每週三次或每日一次投與。單一個體之投與間隔不一定係固定間隔，且可隨時間而變，端視該個體之需要而定。例如，在身體性疾病或應力情況下，若抗芳基硫酸酯酶抗體存在或增加，或若疾病症狀惡化，則劑量之間之間隔可縮短。

本文所用之術語「兩個月一次」意指每兩個月投與一次(即，每兩個月一次)；術語「每月一次」意指每月投與一次；術語「每三週一次」意指每三週投與一次(即，每三週一次)；術語「每兩週一次」意指每兩週投與一次(即，每兩週一次)；術語「每週一次」意指每週投與一次；且術語「每日一次」意指每天投與一次。

在某些實施例中，在投與個體後(例如，在將醫藥組合物經腦脊髓膜內投與個體後1週、3天、48小時、36小時、24小時、18小時、12小時、8小時、6小時、4小時、3小時、2小時、1小時、30分鐘或更短時間)，該等醫藥組合物在該個體之目標組織或細胞(例如，腦組織或神經元)中達到至少50 μg/ml、至少45 μg/ml、至少40 μg/ml、至少35 μg/ml、至少30 μg/ml、25 μg/ml 、20 μg/ml、至少15 μg/ml、至少10 μg/ml、至少7.5 μg/ml、至少5 μg/ml、至少2.5 μg/ml、至少1.0 μg/ml或至少0.5 μg/ml之濃度。在某些實施例中，治療劑在醫藥組合物中之濃度係至少100 mg/mL、至少95 mg/mL、至少90 mg/mL、至少80 mg/mL、至少75 mg/mL、至少70 mg/mL、至少65 mg/mL、至少60

mg/mL、至少55 mg/mL、至少50 mg/mL、至少45 mg/mL、至少40 mg/mL、至少35 mg/mL、至少30 mg/mL、至少25 mg/mL、至少20 mg/mL、至少15 mg/mL、至少10 mg/mL、至少5 mg/mL、至少2.5 mg/mL、至少1 mg/mL或小於1 mg/mL。較佳地，該治療劑可溶於本發明醫藥組合物中。較佳地，本發明醫藥組合物在較長時間內保持穩定(例如，在室溫下或另一選擇為在4-8℃之冷凍條件下穩定至少12個月)。

儘管已根據某些實施例詳細闡述了本文所述之某些化合物、組合物及方法，但以下實例僅用於闡釋本發明化合物且不意欲對其進行限制。

醫藥組合物係以治療有效量來投與(即，在每隔一定時間投與時，足以藉由(例如)改善與疾病有關之症狀、預防該疾病或延遲其發作、及/或亦降低疾病之症狀之嚴重程度或頻率來治療該疾病之劑量量，如上文所述)。本文所用之治療有效量亦稱作治療有效劑量或治療有效劑量量。對於疾病治療而言治療上有效的劑量將取決於疾病影響之性質及程度，且可藉由標準臨床技術確定。另外，可視情況採用活體外或活體內分析來幫助確定最佳劑量範圍，例如彼等在下文所例示者。擬採用之準確劑量亦將取決於投與途徑及疾病之嚴重性，且應根據執業醫師之判斷及各患者之情況來確定。例如，在一些實施例中，用於靜脈內投與之芳基硫酸酯酶之治療有效量係用於腦脊髓膜內投與之芳基硫酸酯酶之治療有效量的約1.5倍、約2倍、約2.5倍、約2.5倍、約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍、約5倍、約5.5倍、約6倍、約6.5倍、約7倍、約7.5倍、約8倍、約8.5倍、約9倍、約9.5倍、

約10倍或更多。可自得自活體外或動物模型測試系統之劑量反應曲線來推斷有效劑量(例如，如由美國衛生及人類服務部食品與藥品管理局及藥品評價與研究中心於「Guidance for Industry: Estimating Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers」，Pharmacology and Toxicology, 2005年7月中所述，其全部內容以引用方式併入本文中)。

在一些實施例中，治療有效量可(例如)大於約0.01 mg/kg體重、大於約0.05 mg/kg、大於約0.1 mg/kg、大於約0.5 mg/kg、大於約1.0 mg/kg、大於約1.5 mg/kg、大於約2.0 mg/kg、大於約2.5 mg/kg、大於約5.0 mg/kg、大於約7.5 mg/kg、大於約10 mg/kg、大於約12.5 mg/kg、大於約15 mg/kg、大於約17.5 mg/kg、大於約20 mg/kg、大於約22.5 mg/kg、或大於約25 mg/kg。在一些實施例中，治療有效量可為約0.01-25 mg/kg體重、約0.01-20 mg/kg、約0.01-15 mg/kg、約0.01-10 mg/kg、約0.01-7.5 mg/kg、約0.01-5 mg/kg、約0.01-4 mg/kg、約0.01-3 mg/kg、約0.01-2 mg/kg、約0.01-1.5 mg/kg、約0.01-1.0 mg/kg、約0.01-0.5 mg/kg、約0.01-0.1 mg/kg、約1-20 mg/kg、約4-20 mg/kg、約5-15 mg/kg、約5-10 mg/kg。在一些實施例中，治療有效量係約0.01 mg/kg體重、約0.05 mg/kg、約0.1 mg/kg、約0.2 mg/kg、約0.3 mg/kg、約0.4 mg/kg、約0.5 mg/kg、約0.6 mg/kg、約0.7 mg/kg、約0.8 mg/kg、約0.9 mg/kg、約1.0 mg/kg、約1.1 mg/kg、約1.2 mg/kg、約1.3 mg/kg、約1.4 mg/kg、約1.5 mg/kg、約1.6 mg/kg、約1.7 mg/kg、約1.8 mg/kg、約1.9 mg/kg、約2.0 mg/kg、約2.5 mg/kg、約3.0 mg/kg、約4.0 mg/kg、約5.0 mg/kg、約6.0 mg/kg、約7.0

mg/kg、約8.0 mg/kg、約9.0 mg/kg、約10.0 mg/kg、約11.0 mg/kg、約12.0 mg/kg、約13.0 mg/kg、約14.0 mg/kg、約15.0 mg/kg、約16.0 mg/kg、約17.0 mg/kg、約18.0 mg/kg、約19.0 mg/kg、約20.0 mg/kg或更多。在一些實施例中，治療有效量不大於約30 mg/kg體重、不大於約20 mg/kg、不大於約15 mg/kg、不大於約10 mg/kg、不大於約7.5 mg/kg、不大於約5 mg/kg、不大於約4 mg/kg、不大於約3 mg/kg、不大於約2 mg/kg或不大於約1 mg/kg或更低。

用於特定個體之有效劑量可端視個體需要隨時間而變化(例如，增加或降低)。例如，在身體性疾病或應力情況下，若抗芳基硫酸酯酶抗體存在或增加，或若疾病症狀惡化，則劑量量可增加。

在另一實例中，可在療程開始時給予負荷劑量(例如，初始較高劑量)之治療組合物，隨後投與降低之維持劑量(例如，較低後續劑量)之治療組合物。不期望受限於任何理論，預計負荷劑量會清除脂肪物質在組織中(例如，在肝中)之初始且通常大量之積聚，且維持劑量可防止初始清除後脂肪物質之累積。

應瞭解，治療之負荷劑量及維持劑量量、間隔及持續時間可藉由任一可用方法來確定，例如彼等在本文中所例示者及彼等業內已知者。在一些實施例中，負荷劑量量為約0.01-1 mg/kg體重、約0.01-5 mg/kg、約0.01-10 mg/kg、約0.1-10 mg/kg、約0.1-20 mg/kg、約0.1-25 mg/kg、約0.1-30 mg/kg、約0.1-5 mg/kg、約0.1-2 mg/kg、約0.1-1 mg/kg或約0.1-0.5 mg/kg。在一些實施例中，維持劑量量係約0-10 mg/kg體重、約0-5 mg/kg、約0-2 mg/kg、約0-1 mg/kg、約0-0.5 mg/kg、約0-0.4 mg/kg、約0-0.3 mg/kg、約0-0.2 mg/kg、約0-0.1

mg/kg。在一些實施例中，經給定時間(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12個月或更多個月)及/或給定劑量數(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30或更多次劑量)，每隔一定時間向個體投與負荷劑量，隨後投與維持劑量。在一些實施例中，維持劑量介於0-2 mg/kg體重、約0-1.5 mg/kg、約0-1.0 mg/kg、約0-0.75 mg/kg、約0-0.5 mg/kg、約0-0.4 mg/kg、約0-0.3 mg/kg、約0-0.2 mg/kg或約0-0.1 mg/kg範圍內。在一些實施例中，維持劑量係約0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8或2.0 mg/kg體重。在一些實施例中，經1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12個月或更多個月投與維持劑量。在一些實施例中，經1、2、3、4、5、6、7、8、9、10年或更多年投與維持劑量。在一些實施例中，無限期(例如，終生)投與維持劑量。

本文所用之術語「組合療法」係指彼等在重疊方案中投與兩種或更多種醫藥劑，從而使個體同時暴露於兩種藥劑之情形。芳基硫酸酯酶(或含有芳基硫酸酯酶之組合物或藥劑)可單獨投與，或結合其他藥劑來投與，例如抗組胺藥(例如，苯海拉明(diphenhydramine))或免疫抑制劑(例如，考布他汀(combretastatin) A-4、黴酚酸(mycophenolic acid)、噴司他丁(pentostatin)、奈拉濱(nelarabine)或米托蒽醌(mitoxantrone))或其他抵抗抗芳基硫酸酯酶抗體之免疫治療劑。

熟習此項技術者已知之任一免疫抑制劑皆可與本發明組合療法一起使用。該等免疫抑制劑包括(但不限於)環孢素(cyclosporine)、FK506、雷帕黴素(rapamycin)、CTLA4-Ig及抗TNF劑(例如依那西普

(etanercept))(例如，參見Moder, 2000, Ann. Allergy Asthma Immunol. 84, 280-284；Nevins, 2000, Curr. Opin. Pediatr. 12, 146-150；Kurlberg等人，2000, Scand. J. Immunol. 51, 224-230；Ideguchi等人，2000, Neuroscience 95, 217-226；Potteret等人，1999, Ann. N.Y. Acad. Sci. 875, 159-174；Slavik等人，1999, Immunol. Res. 19, 1-24；Gaziev等人，1999, Bone Marrow Transplant. 25, 689-696；Henry, 1999, Clin. Transplant. 13, 209-220；Gummert等人，1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10, 1366-1380；Qi等人，2000, Transplantation 69, 1275-1283)。已證實抗IL2受體(α亞單位)抗體達珠單抗(daclizumab)(例如賽尼哌TM.(Zenapax.TM.))可有效用於移植患者中，其亦可用作免疫抑制藥劑(例如，參見Wiseman等人，1999, Drugs 58, 1029-1042；Beniaminovitz等人，2000, N. Engl J. Med. 342, 613-619；Ponticelli等人，1999, Drugs R. D. 1, 55-60；Berard等人，1999, Pharmacotherapy 19, 1127-1137；Eckhoff等人，2000, Transplantation 69, 1867-1872；Ekberg等人，2000, Transpl. Int. 13, 151-159)。其他免疫抑制劑包括(但不限於)抗CD2(Branco等人，1999, Transplantation 68, 1588-1596；Przepiorka等人，1998, Blood 92, 4066-4071)、抗CD4(Marinova-Mutafchieva等人，2000, Arthritis Rheum. 43, 638-644；Fishwild等人，1999, Clin. Immunol. 92, 138-152)及抗CD40配體(Hong等人，2000, Semin. Nephrol. 20, 108-125；Chirmule等人，2000, J. Virol. 74, 3345-3352；Ito等人，2000, J. Immunol. 164, 1230-1235)。

術語「結合」表示在芳基硫酸酯酶(或含有芳基硫酸酯酶之組合物)之前、大致同時或之後投與藥劑。例如，可將藥劑混合至含有芳

基硫酸酯酶之組合物中，且由此與芳基硫酸酯酶同時投與；另一選擇為，可在不混合之情形下同時投與藥劑(例如，藉由在亦投與芳基硫酸酯酶之靜脈管線上「借道(piggybacking)」遞送藥劑，或反之亦然)。在另一實例中，可在投與芳基硫酸酯酶後之較短時間範圍內(例如，在24小時內)單獨(例如，不混合)投與藥劑。在一些實施例中，芳基硫酸酯酶(或含有芳基硫酸酯酶之組合物)係結合經設計以降低抗半乳糖腦苷酶(GalC)抗體之量或預防其產生之免疫抑制或免疫治療方案來投與。例如，可使用與血友病患者所用方案(Nilsson等人(1988) N. Engl. J. Med., 318:947-50)類似之方案來減少抗芳基硫酸酯酶抗體。此一方案可用於具有抗芳基硫酸酯酶抗體或有具有該等抗體之風險之個體。在一些實施例中，在第一次投與芳基硫酸酯酶之前開始免疫抑制或免疫治療方案，以使產生抗芳基硫酸酯酶抗體之可能性降至最低。可將熟習此項技術者已知之免疫抑制劑之任一組合與本發明組合療法一起使用。

套組

本發明提供套組或其他製品，其含有本發明調配物並提供本發明調配物之復原(若凍乾)及/或使用說明。套組或其他製品可包括容器。適宜容器包括(例如)瓶子、小瓶及注射器。容器可自諸如玻璃或塑膠等各種材料形成。容器容納調配物，且位於容器上或與其連接之標籤可指示用於復原及/或使用之說明。例如，標籤可指示將調配物復原至上述蛋白質濃度。標籤可進一步指示調配物可用於或意欲用於(例如)IT投與。容納調配物之容器可為多用途小瓶，該多用途小瓶容許重複投與(例如，投與2-6次)調配物。套組或其他製品可進一步包括

含有適宜稀釋劑(例如，BWFI)之第二容器。將稀釋劑與調配物混合後，復原調配物中之最終蛋白質濃度通常為至少25 mg/ml(例如，至少25 mg/ml、至少50 mg/ml、至少75 mg/ml、至少100 mg/ml)。套組或其他製品可進一步包括自商業及使用者角度考慮合宜之其他材料，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針、注射器及帶有使用說明之包裝插頁。

藉由參照下列實例來更全面地理解本發明。然而，該等實例不應解釋為限制本發明之範圍。所有文獻引文皆以引用方式併入本文中。

治療劑之腦脊髓膜內投與通常藉由腰椎穿刺術(即，緩慢團注)或經由座-導管(port-catheter)遞送系統(即，輸注或團注)來實施。使植入的導管連接至貯器(用於團注遞送)或輸注幫浦(植入或在外部)。導管最通常插入於腰椎板之間，且尖端向上穿過腦脊髓膜間隙至期望節段(通常為L3-L4)。儘管認為具有侵襲性，但將治療劑投與至脊髓周圍之腦脊髓膜內間隙中仍然為將治療劑直接且有效地遞送跨過BBB並遞送至下面的CSF中之最常見方式。(參見Kroin JS, Clin Pharmacokinet (1992) 22(5):319-326，其全部內容以引用方式併入本文中。)

相對於可經靜脈內投與個體之體積，適於腦脊髓膜內投與之體積通常係治療具有CNS病因之某些疾病之特有障礙。治療劑之腦脊髓膜內遞送進一步受保持CSF組成之微妙平衡以及保持個體顱內壓之限制。例如，在人類中，治療劑之腦脊髓膜內團注遞送體積通常限於0.5-1 mL。(例如，參見Grouls RJE等人，General considerations in the formulation of drugs for spinal delivery. Spinal Drug Delivery，第15

章，Elsevier Science(Yaksh, TL編輯) 1999，其全部內容以引用方式併入本文中。)此外，在沒有自個體對應移除CSF時，在人類中總腦脊髓膜內劑量之體積限於小於3 mL。

本發明醫藥組合物亦可用於將治療劑經腦室內遞送至個體之CNS中(即，直接投與至腦室中)。腦室內遞送可經由Ommaya氏貯器或其他類似輸液座(access port)加以促進，該貯器或其他類似輸液座可植入於位於個體頭頂部在頭皮與骨膜之間之袋狀物中，其中將導引導管直接放置於腦室中。(Nutts JG等人，Neurology (2003) 60:69-73。)本發明亦涵蓋將治療劑投與至小腦延髓池(cerebellomedullary cistern或cisterna magna)之CSF中，由於在小型齧齒類動物中，與腦脊髓膜內或腦室內投與相比，此方式後勤方便，故此方式可用於(例如)動物物種中。

本發明之靶向治療劑(或含有其之組合物或藥劑)可藉由任一適當途徑投與。在一些實施例中，經靜脈內投與本發明之靶向治療劑(或含有其之組合物或藥劑)。在一些實施例中，經腦脊髓膜內投與本發明之靶向治療劑(或含有其之組合物或藥劑)。熟習此項技術者應瞭解，腦脊髓膜內藥物遞送可由用於腦脊髓膜內遞送之許多機構組成。在一些實施例中，腦脊髓膜內藥物遞送可由腰椎注射組成。在一些實施例中，經由腦脊髓膜內藥物遞送裝置(IDDD)經腦脊髓膜內投與本發明之靶向治療劑(或含有其之組合物或藥劑)。在一些實施例中，腦脊髓膜內藥物遞送可由與大腦室內(ICV)導管流體連通之微幫浦組成。在其他實施例中，腦脊髓膜內藥物遞送可由與導管流體連通之皮下輸液座組成。在此實施例中，經由具有大腦室內(ICV)導管之腦脊

髓膜內藥物遞送裝置(IDDD)經腦脊髓膜內投與本發明之靶向治療劑(或含有其之組合物或藥劑)。在此實施例中，輸液座與大腦室內(ICV)導管流體連通。在一些實施例中，經由腦脊髓膜內藥物遞送裝置(IDDD)經腦脊髓膜內投與本發明之靶向治療劑(或含有其之組合物或藥劑)。若需要，可同時使用一種以上途徑。

本發明之水性醫藥組合物較佳以通常小於4.0 mL、小於3.0 mL、小於2.5 mL、小於2.0 mL、小於1.5 mL、小於1.0 mL、小於0.5 mL或小於0.25 mL劑量之體積投與個體。

儘管已根據某些實施例詳細闡述了本文所述之某些化合物、組合物及方法，但以下實例僅用於闡釋本發明化合物且不意欲對其進行限制。

除非明確指示相反含義，否則本文在說明書及申請專利範圍中所用冠詞「一(a及an)」應理解為包括複數性含義。除非上下文中明確表示相反或其他含義，否則若一個、一個以上、或所有群組成員皆存在於、用於或相關於給定產物或過程，則可認為在群組之一或多個成員之間包括「或」之技術方案或說明滿足此條件。本發明包括其中恰好只有一個群組成員存在於、用於給定產物或過程或與給定產物或過程相關的實施例。本發明亦包括其中一個以上或所有的群組成員皆存在於、用於給定產物或過程或與給定產物或過程相關的實施例。此外，應瞭解，除非另有說明或除非對熟習此項技術者而言矛盾或不一致係顯而易見的，否則本發明涵蓋其中將一或多項所列技術方案之一或多種限制、要素、條款、說明性術語等引入附屬於相同基礎技術方案(或任一其他相關技術方案)之另一技術方案中的所有變化、組合及

置換。如果以列表形式(例如，以馬庫西群組(Markush group)或類似格式)給出要素，則應瞭解，本發明亦揭示每個要素亞組並且可自該群組中移除任何要素。應瞭解，通常，如果稱本發明或本發明之態樣包含特定要素、特徵等，則本發明之某些實施例或本發明之態樣由該等要素、特徵等組成或主要由其組成。為簡潔起見，在本文中未以過多語言具體陳述該等實施例之每一情形。亦應瞭解，可自申請專利範圍中明確排除本發明之任一實施例或態樣，不管在說明書中是否敍述該明確排除。在本文中提及以闡述本發明之背景及提供關於本發明實施之額外細節的出版物、網站及其他參考材料以引用方式併入本文中。

實例

實例1：IT投與芳基硫酸酯酶A之毒理學

為評估經腦脊髓膜內投與之其他重組酵素分佈至CNS細胞及組織中的能力，實施GLP研究以自毒理學及安全藥理學角度評價在幼年(小於12個月齡)食蟹猴中經1個月時間腦脊髓膜內(IT)投與之重組製備人類芳基硫酸酯酶A(rhASA)之重複劑量。製備rhASA調配物，並調配於154 mM NaCl、0.005%聚山梨醇酯20 (pH 6.0)之媒劑中。

為達成此目的，如下表6中所示，將9只雄性及9只雌性幼年食蟹猴根據體重隨機分配至三個治療群組之一中。該等動物(劑量1之1只雄性動物除外)每隔一週接受0.6 mL之0、3或31 mg/mL rhASA短期IT輸注(總劑量為0、1.8或18.6 mg)，每只動物總共給藥三次。監測體重、臨床觀察、神經及體格檢查、臨床病理學、眼科檢查及毒理動力學取樣。在第29、30或31天(最後一次IT劑量後約24小時)，對所有動

物進行屍體剖檢。收穫所選組織，保存並用顯微鏡進行檢查。

表6

群組	動物數量	標稱劑量濃度 (mg/mL)	劑量體積(mL)	投與劑量(mg)
1	3M, 3F	0	0.6	0
2	3M, 3F	3	0.6	1.8
3	3M, 3F	31	0.6	18.6

藉由ELISA分析食蟹猴之CNS組織中檢測到之rhASA的濃度，並與正常人類rhASA濃度(對應於約2.5 ng/mg組織)之10%的治療目標進行比較。自食蟹猴之不同腦區域提取組織試樣或鑽孔，並進一步分析rhASA之存在。圖24展示提取鑽孔之組織。鑽孔之組織試樣反映rhASA之濃度增加，如圖25A-G中所反映，且自大腦皮質至深層白質及深層灰質存在沈積梯度。

使用來自六隻經IT及ICV投與途徑二者投與18.6 mg劑量rhASA之猴子之相同鑽孔檢測的rhASA濃度顯示於圖26A-B中。在腦脊髓膜內-(IT)或大腦室內(ICV)投與rhASA之成年及幼年食蟹猴之深層白質(圖25A)與深層灰質(圖26B)腦組織中檢測到之rhASA濃度相當。

隨後分析自成年及幼年食蟹猴之腦提取之鑽孔組織試樣以測定沈積於所提取組織試樣中之rhASA的濃度，並將該等濃度與2.5 ng rhASA/mg蛋白質(對應於健康個體中之正常rhASA濃度之10%)之目標治療濃度進行比較。如圖27A中所示，在所分析之每一組織試樣鑽孔中，經IT投與18.6 mg劑量之rhASA可使rhASA濃度超過2.5 ng/mg蛋白質之目標治療濃度。類似地，當向幼年食蟹猴經IT投與1.8 mg劑量之rhASA時，所分析之每一組織試樣鑽孔展示不超過或超過2.5 ng/mg蛋

白質之治療濃度的rhASA濃度，且中值rhASA濃度高於測試之所有組織鑽孔之治療目標(圖27B)。

為確定經IT投與之rhASA是否分佈至相關細胞中，對來自經IT投與1.8 mg ASA之食蟹猴之深層白質中圖28A所示區域之組織進行分析。如圖28B所繪示，深層白質組織之免疫染色揭示rhASA分佈於食蟹猴之少突膠質細胞中。類似地，圖28C繪示，經IT投與之rhrASA在食蟹猴之深層白質組織中顯示共定位。具體而言，在染色狀態下，目標細胞器(例如溶酶體)中之共定位非常明顯(圖28C)，從而支持以下結論：經IT投與之rhASA能夠分佈至相關CNS細胞、組織及細胞器(包括少突膠質細胞之溶酶體)中。上述內容支持以下結論：對於rhASA遞送而言，亦發現ICV與IT遞送之間之差異極小。

實例2：使用放射性標記蛋白質之生物分佈

製備經正電子發射體^{124}I標記之rhASA，並調配於154 mM NaCl、0.005%聚山梨醇酯20 (pH 6.0)之媒劑中。將等效於3 mg rhASA(對應於約38 mg/kg腦)之體積之調配物經由大腦室內(ICV)及腦脊髓膜內(IT)投與途徑投與成年食蟹猴。對食蟹猴進行高解析度PET掃描成像研究(microPET P4)以測定所投與^{124}I標記rhASA之分佈。

PET成像數據(圖29)展示，經ICV及IT投與之^{124}I標記rhASA均有效分佈至CNS組織中，且特定言之，經由IT-腰椎導管投與之^{124}I標記rhASA立即均勻散佈於整個脊柱長度之腦脊髓液(CSF)中。具體而言，如圖29中所繪示，在ICV及IT投與後，在個體食蟹猴之CNS組織(包括腦、脊髓及CSF)中檢測到治療濃度之^{124}I標記rhASA。在該等CNS組織中且尤其在腦組織中檢測到之rhASA濃度超過2.5 ng/mg蛋白

質之目標治療濃度。

儘管對於IT及ICV投與途徑二者之rhASA蛋白質之分佈相當，但ICV導致脊柱內之沈積顯著較少，如圖29所顯示。

在投與調配物後24小時，經ICV及IT投與之^{124}I標記ASA二者均有效地分佈至CNS組織中。具體而言，在IT投與後24小時，12.4%的投與劑量位於顱區中，相比之下，16.7%的ICV投與劑量位於顱區中。因此，經IT投與rhASA時，在該等CNS組織且尤其腦組織中檢測到之rhASA濃度與經ICV投與相同劑量後檢測到之濃度接近。

如圖30中所示，經ICV注射^{124}I標記rhASA導致注射體積立即轉移至小腦延髓池、橋池、腳間池及脊柱近端中。同樣如圖30中所示，在2-5 hr內，IT投與將^{124}I標記rhASA遞送至與ICV投與所顯示相同之初始房室(池及脊柱近端)中。在ICV-及IT投與後24小時，^{124}I標記rhASA之分佈相當，如圖31中所示。因此，與小分子藥物不同，上述結果表明ICV投與rhASA相對於IT投與rhASA之優勢極小。

該等結果證實，可利用侵襲性較低之IT投與途徑將rhASA遞送至個體，且由此在目標細胞及組織中達成治療濃度。

溶酶體貯積症係因酵素缺乏或酵素缺陷導致異常受質積聚而引起之一類遺傳病症。儘管靜脈內投與重組酵素可有效地減輕與數種該等疾病有關之周圍症狀，但預期靜脈內投與該等重組酵素不會顯著影響與大多數溶酶體貯積症有關之CNS表現。例如，重組人類艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶(艾杜硫酶，Elaprase®；Shire Human Genetic Therapies公司，Lexington，MA)已批准用於治療亨特氏症候群之軀體症狀，但對於神經病學表現(可包括發育遲緩及進行性精神損害)之治

療尚無藥理學療法。此部分係由於I2S之性質所致，I2S係較大的分子量為約76 kD之高度糖基化酵素，且其在靜脈內投與後不能越過血腦障壁。

因此，本發明者已承接項目以研究重組人類酵素之腦脊髓膜內調配物之腦脊髓膜內(IT)遞送，該等重組人類酵素係例如艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶(I2S)、芳基硫酸酯酶A(rhASA)及α-N-乙醯基葡萄糖胺酶(Naglu)。本文提供之結果最先證實，經IT-腰椎投與重組溶酶體蛋白質可將大部分所投與蛋白質遞送至腦中，且尤其使該等蛋白質廣泛沈積於食蟹猴及犬二者之腦及脊髓神經元中。CNS組織之免疫組織化學分析證實，該蛋白質靶向溶酶體，溶酶體係溶酶體貯積症中之病理學糖胺聚多糖積聚位點。此外，亨特氏症候群之IKO小鼠模型、B型聖菲利波症候群之Naglu-缺陷小鼠模型以及異染性腦白質營養不良(MLD)之ASA基因敲除小鼠模型中展示之形態改良對經IT投與之酵素分佈至合適組織中且轉運至合適細胞房室及細胞器中的觀察作了補充。

觀察到經IT-腰椎及ICV投與I2S後檢測到之腦分佈模式類似，此表明CSF存在總體流動(bulk flow)及有效再混合。因此，在臨床環境中，IT及ICV投與途徑二者均可能係可行的，然而，IT投與後在脊髓中觀察到I2S沈積，此在解決溶酶體貯積症(例如亨特氏症候群)之脊髓後遺症及成份方面明顯有利。而且，脊髓注射座之侵襲性較低，且預期更適於長期使用，尤其在兒科個體中。

藉由上文PET成像研究觀察到之血管周細胞染色及蛋白質易位動力學證據表明，酵素在血管周間隙內可能係藉由脈動輔助之對流機制

來移動。觀察到I2S與神經絲結合(其指示主動軸突轉運)表明另一轉運機制。推測後者開始於蛋白質與神經元甘露糖-6-磷酸鹽(M6P)受體之相互作用，該等受體廣泛呈現於脊髓及腦之細胞上，且在直接投與至腦實質後可使I2S酵素易於被目標細胞吸收。(Begley等人，Curr Pharm Des (2008) 14:1566-1580)。

儘管先前已藉由活體內間接方法及活體外成像暗示溶酶體酵素之軸突轉運，但本研究提供經由CSF遞送之非病毒或呈現酵素之軸突轉運的最早直接證據。因此，自CSF至腦表面及深入至腦組織中之蛋白質遞送似乎依賴於主動轉移過程，先前未闡述或闡明該等主動轉移過程可用於將蛋白質或酵素遞送至腦細胞、組織及細胞器中。

流行觀點認為，實質間質及CSF之流動動力學會阻止經IT-腰椎投與之蛋白質分佈至腦白質中，與之相反，本研究明確證實，經IT遞送溶酶體酵素可使蛋白質分佈及積聚在所有腦組織中，且沈積於目標細胞之溶酶體房室(其為病理學糖胺聚多糖積聚位點)中。(例如，參見Fenstermacher等人，Ann N Y Acad Sci (1988) 531:29-39；及DiChiro等人，Neurology (1976) 26:1-8。)加上IT-腰椎遞送之侵襲性較低的性質，該途徑提供將生物治療劑遞送至腦中(尤其在兒童中)之臨床相關手段。

實例3：芳基硫酸酯酶A用於IT投與之調配物

此實例概述構建rhASA(芳基硫酸酯酶A)之高濃度液體劑型以及原料藥及成品藥之調配物以經由腦脊髓膜內(IT)投與途徑治療異染性腦白質營養不良(MLD)之工作。

穩定性數據顯示，原料藥及成品藥之鹽水調配物(不含PBS 20)在< -65℃下保持18個月後及在2-8℃下保持18個月後穩定。在此蛋白質

之醫藥研發期間，由於計劃將其遞送至CNS中，故在受限緩衝劑及賦形劑條件下研究rhASA之溶解性及穩定性。先前已實施調配物研發研究以研發靜脈內(IV)調配物。基於該等實驗之結果，選擇在10 mM檸檬酸鹽-磷酸鹽緩衝劑(pH 5.5，含有137 mM NaCl及0.15%泊洛沙姆(poloxomer) 188)中含有30 mg/ml rhASA之調配物作為主要IV調配物。亦在三種調配物中調配rhASA用於IT遞送且在該等條件下研究此蛋白質之穩定性數據。採用得自一個位點之上游材料產物之rhASA批次。結果顯示，在2-8℃下，rhASA在含有0.005%聚山梨醇酯20(P20)(pH 6.0)之154 mM氯化鈉溶液中可穩定至少18個月。另外，已實施研究來證實針對冷凍-解凍及攪動誘導降解之穩定性。

純化研發批料，將其超濾並透析過濾(UF/DF)至10 mM檸檬酸鹽/磷酸鹽、137 mM NaCl(pH 5.5)中，之後將其以約40 mg/mL之濃度UF/DF至最終鹽水溶液中。UF/DF作業概述於表7中。

表7：根據Xcellerex-Derived用於UF/DF作業之選定調配物

調配物	起始緩衝劑及UF/DF至鹽水中	添加劑
A	10 mM檸檬酸鹽/磷酸鹽, 137 mM NaCl, pH 5.5。隨後UF/DF至154 mM NaCl中。最終pH 5.9	0.005%聚山梨醇酯20*
B	10 mM檸檬酸鹽/磷酸鹽, 137 mM NaCl, pH 5.5。隨後UF/DF至5 mM磷酸鈉、145 mM NaCl(pH 6.0)中。最終pH 6.0	0.005%聚山梨醇酯20*
C	10 mM檸檬酸鹽/磷酸鹽, 137 mM NaCl, pH 5.5。隨後UF/DF至10 mM檸檬酸鹽/磷酸鹽、137 mM NaCl(pH 7.0)中，且第二次UF/DF至154 mM NaCl中。最終pH 6.5	0.005%聚山梨醇酯20*

rhASA

將以40 mg/mL rhASA調配於10 mM檸檬酸鹽-磷酸鈉及137 mM NaCl(pH 5.6)中之rhASA透析至五種用於IT調配前探究之調配物中(表

8)。

表8：用於IT相容性調配物篩選之選定緩衝劑

調配物編號	緩衝物質	pH
1	154 mM NaCl *	5.9
2	154 mM NaCl **	7.0
3	5 mM磷酸鹽緩衝劑，含有145 mM NaCl	6.0
4	5 mM磷酸鹽緩衝劑，含有145 mM NaCl	7.0
5	1 mM磷酸鹽緩衝劑，含有2 mM $CaCl_2$及137 mM NaCl	7.0

方法

對於藉由差示掃描量熱法(DSC)進行之熔化溫度(Tm)測定，以60℃/hr之掃描速率及10-110℃之溫度範圍採用毛細管DSC微熱量計(MicroCal)。自蛋白質掃描值減去緩衝劑基線。針對每一試樣之蛋白質濃度(藉由在280 nm下之紫外吸收來量測且使用0.69 (mg/mL)-1.cm-1之消光係數)將掃描值正規化。對於初始短期穩定性試驗，將rhASA原料藥在40℃下保持兩週或在40℃下保持一個月。將另一短期穩定性試樣在2-8℃下放置3個月。過濾試樣(Millipore, P/N SLGV033RS)且將0.5 mL等分試樣分配至具有13 mm Flurotec塞子之2 mL中。

使用DSC來研究調配組合物(表8)對Tm(熱誘導變性之溫度中點)之效應。不同調配組合物之Tm值顯示於圖5中。大多數調配物之Tm值呈現類似展開溫度，但對於調配於5 mM磷酸鈉及154 mM NaCl(pH 7.0)或1 mM磷酸鈉及2 mM $CaCl_2$與137 mM NaCl(pH 7.0)中之rhASA，觀察到低Tm值。

亦研究rhASA之熱誘導降解在所選五種調配物(表8)中之影響。將試樣在40℃下儲存2週或一個月，或在2-8℃下儲存3個月。對在40

℃下儲存2週之試樣進行SDS-PAGE (Coomassie)分析以檢測調配於5 mM磷酸鈉及154 mM NaCl(pH 7.0)以及1 mM磷酸鈉及2 mM $CaCl_2$及137 mM NaCl(pH 7.0)中之rhASA之碎裂(圖6)。在其他調配物中未觀察到該降解。

分裂產物之存在與藉由RP-HPLC在相同時間點觀察到之主峰百分比較低一致(表10)。亦觀察到，調配於1 mM PBS及2 mM $CaCl_2$(pH 7.0)中之rhASA在開始時及在短期暴露於熱應力條件後未能維持其pH。

使用Waters HPLC系統進行尺寸排除及反相HPLC分析。對於初始SEC-HPLC分析，將50 μg rhASA注射至Agilent Zorbax GF-250管柱(4.6 mm×250 mm)上並以0.24 mL/min等度運行，其中使用100 mM檸檬酸鈉(pH 5.5)之流動相(八聚體檢測)且檢測波長為280 nm。使用100 mM檸檬酸鈉(pH 7.0)之流動相條件(二聚體檢測)來重複分析。

所有緩衝劑更換及濃度研究皆係使用Centricon-Plus 20 (Millipore, 10 kDa MWCO)來實施。

調配前篩選研究–緩衝物質及pH之影響

由於已批准用於CNS投與之溶液組合物數量有限，故僅選擇五種如表8中所列示之等滲溶液組合物進行篩選。

pH記憶

在選擇用於長期穩定性之緩衝劑之前，實施兩個「pH記憶」實驗來研究交換至鹽水溶液中之蛋白質緩衝劑是否能維持原始緩衝劑之pH。在初始實驗中，首先將約8 mg/mL之rhASA透析至10 mM檸檬酸鹽-磷酸鹽及137 mM NaCl(pH值為5.5或7.0)中，之後第二次透析至鹽

水溶液中。在第二實驗中，將rhASA透析至10 mM檸檬酸鹽-磷酸鹽及137 mM NaCl(pH值為5.5或7.0)中，且隨後進行緩衝劑交換並在鹽水溶液中濃縮至約35 mg/mL。

在將調配於10 mM檸檬酸鹽-磷酸鹽及137 mM NaCl(pH值為5.5或7.0)中之rhASA透析至鹽水溶液中時，未觀察到濁度增加。最終鹽水溶液之pH與其所暴露之先前檸檬酸鹽-磷酸鹽緩衝劑之類似pH。在將調配於以檸檬酸鹽-磷酸鹽為主之緩衝劑(pH值為5.5或pH 7.0)中之rhASA透析至鹽水中且隨後使用Centricon濃縮至約35 mg/mL時，蛋白質鹽水溶液之pH分別自pH 5.5變至5.8或自pH 7.0變至6.8。兩種濃縮rhASA鹽水溶液呈輕微乳白色且OD320值在0.064 (pH 6.8)至0.080 (pH 5.5)範圍內。

賦形劑選擇

在所選擇之所有五種溶液組合物中以0.005%之最終濃度包括聚山梨醇酯20 (P20)。根據0.005% P20用於CNS遞送其他Shire蛋白質之活體內耐受性之先前經驗來選擇表面活性劑。製備5% P20 (v/v)溶液且以適宜體積添加至每一蛋白質調配物中以獲得0.005%之最終濃度。

調配物穩健性研究-穩定性研究

基於自不同緩衝劑及pH值篩選獲得之初步結果，選擇三種溶液組合物進行長期穩定性研究(試樣製備如表8所述)。在所提出調配物(表9)中開始為期一年之研究。在每一時間點藉由SEC-HPLC、RP-HPLC、OD320、蛋白質濃度、pH、比活性、SDS-PAGE (Coomassie)及外觀來分析穩定性試樣。

表9-用於長期穩定性研究之調配物

調配物	含有0.005%聚山梨醇酯20之調配組合物	研究條件
A	154 mM NaCl, pH 5.9	5℃、25℃、40℃及在≤-65℃下之冷凍基線
B	5 mM磷酸鈉、145mM NaCl, pH 6.0	
C	154 mM NaCl, pH 6.5	

表10：所選調配物在40±2℃下保持2週後之穩定性

調配物	外觀	蛋白質濃度 (mg/mL)	OD320	SEC-HPLC (主峰%)，pH 5.5	SEC-HPLC (主峰%)，pH 7.0	RP-HPLC (主峰%)	pH	比活性 (U/mg)
鹽水，pH 5.9								
基線	鮮明至輕微乳白色	29.9	0.044	>99.9	99.7	99.8	5.6	74
應力	鮮明至輕微乳白色	31.1	0.062	99.8	99.6	99.9	5.7	88
鹽水，pH 7.0								
基線	鮮明至輕微乳白色	29.0	0.038	>99.9	99.6	>99.9	6.7	83
應力	鮮明至輕微乳白色	32.1	0.041	99.1	99.7	97.0	6.5	66
5 mM PBS, pH 6.0								
基線	鮮明至輕微乳白色	29.8	0.058	>99.9	99.7	99.9	5.9	102
應力	鮮明至輕微乳白色	30.5	0.076	98.8	99.7	99.7	5.9	95
5 mM PBS, pH 7.0								
基線	鮮明至輕微乳白色	29.7	0.035	>99.9	99.7	>99.7	6.9	86
應力	輕微乳白色至乳白色	30.5	0.041	95.4	99.4	98.0	6.8	94
1 mM PBS, pH 7.0及2 mM $CaCl_2$, pH 7.0								
基線	鮮明至輕微乳白色	27.5	0.040	>99.9	99.7	>99.9	5.6	90
應力	輕微乳白色至乳白色	27.7	0.042	94.8	99.8	99.0	6.6	93

對於應力試樣未觀察到比活性有顯著變化(表10)。對於調配於5 mM磷酸鈉及154 mM NaCl(pH 7.0)中之2週熱應力試樣，尺寸排除HPLC分析檢測到一定降解。在使用pH 5.5流動相條件(其誘導rhASA與八聚體結合)之SEC-HPLC中該降解更明顯。在該等流動相條件下，在pH 7.0下調配於1 mM PBS及2 mM CaCl2中之rhASA亦呈現顯著降

解。

在40℃下暴露1個月後，SDS-PAGE顯示調配於5 mM PBS(pH 7.0)及1 mM PBS(pH 7.0)及2 mM $CaCl_2$中之試樣出現碎裂(數據未顯示)。與此觀察結果一致，藉由RP-HPLC及SEC-HPLC亦觀察到儲存在該兩種pH 7調配物中之試樣之主峰百分比降低(表11)。然而，僅觀察到調配於5 mM PBS(pH 7.0)中之rhASA之比活性降低。

表11：所選IT調配物在40±2℃下保持1個月後之穩定性

調配物	外觀	蛋白質濃度 (mg/mL)	OD320	SEC-HPLC (主峰%)，pH 5.5	SEC-HPLC (主峰%)，pH 7.0	RP-HPLC (主峰%)	pH	比活性 (U/mg)
鹽水，pH 5.9								
基線	鮮明至輕微乳白色	29.9	0.044	>99.9	99.7	99.8	5.6	74
應力	鮮明至輕微乳白色	28.3	0.061	>99.9	99.5	99.9	5.7	107
鹽水，pH 7.0								
基線	鮮明至輕微乳白色	29.0	0.038	>99.9	99.6	>99.9	6.7	83
應力	鮮明至輕微乳白色	25.7	0.189	95.7	99.8	99.5	6.6	100
5 mM PBS, pH 6.0								
基線	鮮明至輕微乳白色	29.8	0.058	>99.9	99.7	99.9	5.9	102
應力	鮮明至輕微乳白色	28.0	0.059	>99.9	99.6	99.9	6.0	94
5 mM PBS, pH 7.0								
基線	鮮明至輕微乳白色	29.7	0.035	>99.9	99.7	>99.9	6.9	86
應力	輕微乳白色至乳白色	27.3	0.142	91.8	89.6	97.1	6.9	48
1 mM PBS, pH 7.0及2 mM $CaCl_2$								
基線	鮮明至輕微乳白色	27.5	0.040	>99.9	99.7	>99.9	5.6	90
應力	輕微乳白色至乳白色	28.3	0.053	90.6	88.7	97.9	6.7	133

在2-8℃下儲存3個月後，rhASA在所有調配物中保留其活性(表12)。另外，rhASA維持>99.8%之主峰面積，如藉由SEC-HPLC在兩種流動相條件下所評估。在2-8℃下保持3個月之穩定性數據概述於表12中。

表12：所選IT緩衝劑在2-8℃下保持3個月後之穩定性

調配物	外觀	蛋白質濃度 (mg/mL)	OD320	SEC-HPLC (主峰%)，pH 5.5	SEC-HPLC (主峰%)，pH 7.0	RP-HPLC (主峰%)	pH	比活性 (U/mg)
鹽水，pH 5.9								
基線	鮮明至輕微乳白色	29.9	0.044	>99.9	99.7	99.8	5.6	74
應力	鮮明至輕微乳白色	29.4	0.056	99.8	>99.9	99.9	5.6	97
鹽水，pH 7.0								
基線	鮮明至輕微乳白色	29.0	0.038	>99.9	99.6	>99.9	6.7	83
應力	鮮明至輕微乳白色	25.5	0.040	99.8	>99.9	>99.9	6.6	127
5 mM PBS, pH 6.0								
基線	鮮明至輕微乳白色	29.8	0.058	>99.9	99.7	99.9	5.9	102
應力	鮮明至輕微乳白色	29.9	0.045	99.8	>99.9	>99.9	5.9	109
5 mM PBS, pH 7.0								
基線	鮮明至輕微乳白色	29.7	0.035	>99.9	99.7	>99.9	6.9	86
應力	鮮明至輕微乳白色	29.0	0.038	99.8	>99.9	>99.9	6.9	110
1 mM PBS, pH 7.0及2 mM $CaCl_2$								
基線	鮮明至輕微乳白色	27.5	0.040	>99.9	99.7	?99.9	5.6	90
應力	鮮明至輕微乳白色	28.0	0.042	99.8	99.9	>99.9	6.6	105

在25℃之加速條件下儲存3個月後，亦評價調配於鹽水(pH 7.0)及1 mM PBS(pH 7.0)及2 mM $CaCl_2$中之rhASA。如圖7所示，rhASA在該

等調配物中出現少量碎裂(強度與0.5% BSA雜質加入物(spike)大致相等)。

該等調配前探究共同證實，rhASA在5.5至6.0範圍內之pH之下可維持穩定性。在所有使用pH 7.0調配物溶液之研究中，rhASA皆顯示碎裂作為其一降解途徑。在pH 7.0下獲得之IT調配物候選者之熱應力結果與在pH 7.0下獲得之IV調配物(10 mM檸檬酸-磷酸鈉及137 mM NaCl)之熱應力結果類似，其中亦觀察到碎裂。基於該等研究，選擇以下三種調配物(如表9中所示)進行長期穩定性研究。

冷凍-解凍研究

藉由在Vertis Genesis 35EL凍乾機支架上以0.1℃/min實施三個自環境溫度至-50℃之受控冷凍-解凍循環來進行冷凍-解凍實驗。將以30 mg/mL調配於五種溶液組合物(表8)之每一者中之原料藥之1 mL等分試樣分配至3 mL玻璃小瓶中以用於此研究。

在所有冷凍-解凍研究中皆使用原料藥(38±4 mg/mL)。對於小規模控制速率冷凍-解凍實驗，將原料藥之2 mL等分試樣分配至具有20 mm Flurotec塞子之5 mL玻璃小瓶中。冷凍-解凍應力實驗係在Virtis Genesis 35EL凍乾機支架上或在控制速率冷凍器(Tenney Jr Upright Test Chamber，型號：TUJR-A-VERV)支架上實施。以0.1℃/ min之冷凍及解凍速率(使用控制速率冷凍器)或0.1℃/min之冷凍速率及0.03℃/min之解凍速率(使用凍乾機)來實施三個冷凍至-50℃並解凍至25℃之循環。對於大型冷凍-解凍研究，將90 mL原料藥分配至250 mL聚碳酸酯瓶中。對於在乾冰上之冷凍-解凍研究，將3 mL原料藥分配至具有或不具有聚丙烯螺紋蓋之5 mL聚碳酸酯(Biotainer P/N 3500-05)小瓶

中。在≤-65℃下將試樣冷凍過夜且隨後置於封閉桶之乾冰上。對於該等實驗，使用含有相同試樣體積之有塞玻璃小瓶作為研究對照。對於經稀釋原料藥之冷凍-解凍研究，將1及5 mg/mL之1 mL等分試樣分配至2 mL聚丙烯管中並在≤-65℃下冷凍。隨後在實驗台(bench top)上使冷凍試樣解凍。將該循環重複至多10次以模擬在處理參照標準等分試樣時可能出現之任何潛在應力。

在3個控制速率冷凍及解凍(0.1℃/min)循環後測定冷凍-解凍在所提出含有0.005% P20之調配物中對rhASA品質之影響。未觀察到rhASA外觀有變化且使用SEC或RP-HPLC方法未鑑別出可溶聚集體或降解產物。另外，在還原性SDS-PAGE分析中未觀察到碎裂或聚集譜帶(數據未顯示)。表13概述該等研究之結果。

表13：小規模冷凍-解凍對rhASA原料藥品質之影響

調配物	外觀	蛋白質濃度 (mg/mL)	SEC-HPLC (主峰%)，pH 5.5	SEC-HPLC (主峰%)，pH 7.0	RP-HPLC (主峰%)	pH	比活性 (U/mg)
鹽水，pH 5.9							
基線	鮮明至輕微乳白色	29.9	NT*	NT	NT	5.6	102
應力	鮮明至輕微乳白色	29.4	>99.9	99.6	99.4	5.5	86
鹽水，pH 7.0							
基線	鮮明至輕微乳白色	29.0	NT	NT	NT	6.7	94
應力	鮮明至輕微乳白色	25.0	>99.9	99.6	99.2	6.6	96
5 mM PBS, pH 6.0							
基線	鮮明至輕微乳白色	29.8	NT	NT	NT	5.9	92

應力	鮮明至輕微乳白色	31.1	>99.9	99.7	99.5	5.9	95
5 mM PBS, pH 7.0							
基線	鮮明至輕微乳白色	29.7	NT	NT	NT	6.9	99
應力	鮮明至輕微乳白色	29.9	>99.9	99.6	99.0	6.9	112
1 mM PBS, pH 7.0及2 mM $CaCl_2$							
基線	鮮明至輕微乳白色	27.5	NT	NT	NT	5.6	90
應力	鮮明至輕微乳白色	27.3	>99.9	99.6	99.3	6.7	103

*未測試

以一式三份對2 mL等分試樣原料藥實施之小規模控制速率冷凍-解凍研究之結果概述於表14中。未觀察到原料藥品質有變化。經冷凍及解凍原料藥之外觀與基線試樣之外觀相當。未觀察到蛋白質濃度或材料純度降低。

表14：小規模冷凍-解凍對RHASA原料藥品質之影響

冷凍/解凍速率	**基線**	**0.1℃/min冷凍-0.1℃/min解凍 使用控制速率冷凍器**	**0.1℃/min冷凍-0.03℃/min解凍 使用凍乾機**
外觀	輕微乳白色至乳白色	輕微乳白色至乳白色	輕微乳白色至乳白色
蛋白質濃度(mg/mL)	42	37	36
在320 nm下之光密度	0.044	0.045	0.043
SEC-HPLC(主峰%)	99.6%	99.7%	99.7%
RP-HPLC(主峰%)	>99.9%	>99.9%	>99.9%
pH	5.9	5.9	5.9
比活性 (U/mg)	65	69	71

所有實驗皆證實rhASA在冷凍-解凍後可維持其品質屬性。應注

意，1 mg/mL rhASA試樣在10個冷凍-解凍循環後觀察到活性及反相主峰百分比有輕微降低趨勢，如表15中所示。

表15：小規模冷凍-解凍對稀釋至1 MG/ML之RHASA原料藥之影響

試樣	基線	1個F/T循環	3個F/T循環	5個F/T循環	10個F/T循環
蛋白質濃度 (mg/mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
在320 nm下之光密度	0.013	0.005	0.010	0.006	0.017
SEC-HPLC(主峰%)	99.5%	99.5%	99.5%	99.5%	99.6%
RP-HPLC(主峰%)	99.2%	99.2%	99.1%	99.0%	98.9%
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
比活性 (U/mg)	78	76	75	69	65

攪動研究

將以30 mg/mL調配於含有P20之所選五種溶液組合物(表8)之每一者中之無菌過濾蛋白質的1.0 mL等分試樣分配至具有13 mm Flurotec塞子之3 mL玻璃小瓶中。將小瓶側放在Labline軌道式振盪器上並以100 rpm振盪24小時。然後在隨後之24小時振盪期間將設定增加至200 rpm。

為評估rhASA對攪動之敏感性，對濃度分別為35.4 mg/mL及30 mg/mL之原料藥及成品藥二者實施振盪及攪拌研究。對於該等研究，將1.0 mL等分試樣之原料藥分配至具有13 mm Flurotec塞子之3 mL玻璃小瓶中。在最初8小時中每隔一小時檢查經攪動小瓶，且隨後在第24及48小時檢查。在首次出現混濁跡象時取出小瓶並加以分析。記錄試樣之外觀並使用pH、SEC-HPLC、比活性及OD320來分析試樣。以一式三份實施成品藥攪動研究(在154 mM NaCl (pH 6.0)及0.005% P20中)且與一份重複試樣之原料藥(在154 mM NaCl(pH 6.0)中)進行對

比。亦重複實施振盪研究且在鹽水調配物中不包括P20。對於該等研究，將30 mg/mL成品藥之1 mL或3 mL等分試樣分配至3 mL小瓶中以研究振盪以及頂隙體積對rhASA品質之影響。對於該等振盪研究，使用220 rpm之速度。

所實施IV調配物研發研究中對rhASA之初始振盪研究證實了表面活性劑之存在的潛在益處。對於IT調配物研發，選擇0.005% P20且包括在用於振盪研究之調配物中。在以100 rpm振盪15-24小時後，未觀察到任一調配物出現可見變化且振盪速度提高至200 rpm。在總計以100及200 rpm振盪48小時後，在所提出之候選調配物中，未觀察到經振盪試樣出現外觀變化。在此階段後分析該等試樣且結果概述於表16中。藉由任一分析皆未觀察到變化。SDS-PAGE Coomassie亦呈現，經振盪試樣無其他高或低分子量譜帶(數據未顯示)。

表16：所選IT調配物之振盪研究結果

調配物	外觀	蛋白質濃度 (mg/mL)	OD320	SEC-HPLC (主峰%)，pH 5.5*	RP-HPLC (主峰%)	比活性 (U/mg)
鹽水，pH 5.9						
基線	鮮明至輕微乳白色	29.9	0.044	NT**	NT	111
應力	鮮明至輕微乳白色	28.5	0.041	>99.9	99.9	111
鹽水，pH 7.0						
基線	鮮明至輕微乳白色	29.0	0.038	NT	NT	115
應力	鮮明至輕微乳白色	24.7	0.032	>99.9	>99.9	110
5 mM PBS, pH 6.0						
基線	鮮明至輕微乳白色	29.8	0.058	NT	NT	103

應力	鮮明至輕微乳白色	30.4	0.047	>99.9	99.9	116
5 mM PBS, pH 7.0						
應力	鮮明至輕微乳白色	29.7	0.035	NT	NT	92
基線	鮮明至輕微乳白色	26.5	0.029	>99.9	99.9	110
1 mM PBS, pH 7.0及2 mM $CaCl_2$						
基線	鮮明至輕微乳白色	27.5	0.040	NT	NT	147
應力	鮮明至輕微乳白色	27.0	0.038	>99.9	99.9	107

*由於管柱問題，在7.0之流動相pH下，未獲得二聚體形式之SEC譜。

**未測試

在最初4小時攪拌中，未觀察到原料藥(在154 mM NaCl(pH 6.0))或成品藥(在154 mM NaCl(pH 6.0)及0.005% P20中)出現外觀變化。在攪拌6小時後，原料藥及成品藥二者皆變得稍微混濁(數據未顯示)。在調配物中不存在P20時，在攪拌48小時後混濁更顯著。另外，暴露於振盪之原料藥及成品藥在24小時後變混濁。圖8顯示在48小時後之攪動觀察結果。

表17及表18概述攪動研究之觀察結果。

表17：RHASA原料藥及成品藥(含有P20)在攪拌後之外觀

小時	經攪拌原料藥	經攪拌成品藥
基線	無色，乳白色，無微粒	無色，乳白色，無微粒
2	無變化	無變化
4	無變化	無變化
6	1-2個小片，稍微混濁	纖維狀物質，稍微混濁
8	1-2個小片，稍微混濁	纖維狀物質，稍微混濁

24	1-2個小片，極混濁	纖維狀物質，混濁
48	1-2個小片，極混濁	纖維狀物質，極混濁

表18：RHASA原料藥及成品藥(含有P20)在振盪後之外觀

小時	經振盪原料藥	經振盪成品藥
基線	無色，乳白色，無微粒	無色，乳白色，無微粒
2	無變化	無變化
4	無變化	無變化
6	無變化	無變化
8	無變化	無變化
24	1-2 小片	1-2個纖維
48	纖維狀物質	1-2個纖維

亦藉由OD320、pH、比活性、RP-HPLC及SEC-HPLC來分析經攪動試樣。結果顯示於表19及表20中。總之，在攪拌及振盪後未觀察到rhASA品質出現顯著變化，但外觀例外。

表19：振盪48小時對原料藥及成品藥之影響

冷凍/解凍速率	基線	振盪48 hr之原料藥 (n=1)	振盪48 hr之成品藥 (n=3)
在320 nm下之光密度	0.080	0.053	0.048
SEC-HPLC(主峰%)	99.7%	99.7%	99.7%
RP-HPLC(主峰%)	>99.9%	>99.9%	>99.9%
pH	6.0	6.0	5.9
比活性 (U/mg)	96	71	72

在將含有0.005% P20之成品藥攪拌6小時後，三份重複試樣中之一者變渾濁。取出此試樣並將另外兩個試樣攪拌至多48小時。表20展示一式兩份試樣之平均數據。

表20：攪拌48小時對原料藥及成品藥之影響

冷凍/解凍速率	基線	攪拌6 hr之原料藥(n=1)	攪拌48 hr之成品藥(n=2)
在320 nm下之光密度	0.080	0.244	0.103
SEC-HPLC(主峰%)	99.7%	99.7%	99.7%
RP-HPLC(主峰%)	>99.9%	>99.9%	>99.9%
pH	6.0	6.0	6.0
比活性 (U/mg)	69	73	73

基於該等結果及可見觀察結果，由於需要連續攪拌約4小時(在5號設定下)及連續劇烈振盪(在220 rpm下)8小時才能使外觀出現變化，故原料藥及成品藥對攪動誘導降解並不易感。

用成品藥在不存在P20時重複振盪研究。對於該等研究，用1 mL或3 mL成品藥填充每一小瓶以研究振盪以及頂隙體積對rhASA品質之影響。對於3 mL小瓶中之1 mL填充物，經8小時以220 rpm振盪未觀察到成品藥之外觀變化(n=2，數據未顯示)。無頂隙小瓶(n=1)顯示以快於具有較大頂隙之小瓶之速率形成較小小片、少量纖維及絮狀物質。48小時之觀察結果顯示於圖9中。

可見結果亦概述於表21及表22中。

表21：對於3 ML小瓶中之1 ML填充物，在振盪48小時後，不存在聚山梨醇酯20之成品藥之外觀

小時	經振盪成品藥 MLD-200L-001，不含P20	經振盪成品藥 MLD-200L-003，不含P20	對照_經振盪成品藥 MLD-200L-001，含有P20
基線	無色，微乳白色，基本無微粒		
2	無變化	無變化	無變化
4	無變化	無變化	無變化
6	無變化	無變化	無變化
8	無變化	無變化	無變化

24	絮狀物	大量絮狀物	無變化
48	絮狀物	大量絮狀物	無變化

表22：對於3 ML小瓶中之3 ML填充物，在振盪48小時後，不存在聚山梨醇酯20之成品藥之外觀

小時	經振盪成品藥 MLD-200L-001，不含P20	對照_經振盪成品藥 MLD-200L-001，含有P20
基線	無色，微乳白色，基本無微粒	
2	無變化	無變化
4	較小小片，少量纖維及絮狀物	無變化
6	較小小片，少量纖維及絮狀物	無變化
8	較小小片，少量纖維及絮狀物	無變化
24	較小小片，少量纖維及絮狀物	無變化
48	較小小片，少量纖維及絮狀物	無變化

未觀察到蛋白質濃度變化。另外，對於1 mL或3 mL填充體積，使用SEC-HPLC未檢測到可溶聚集體(表23及表24)。還原性SDS-PAGE (Coomassie)分析未檢測到任何高或低分子量譜帶(數據未顯示)。

表23：對於3 ML小瓶中之1 ML填充物，將不存在聚山梨醇酯20之成品藥振盪48小時之結果

分析	基線	振盪24 hr後之成品藥(n=2)，不含P20	振盪48 hr後之成品藥(n=2)，不含P20	對照(n=1)，含有P20
濃度(mg/mL)	32.3	32.9	33.8	31.8
在320 nm下之光密度	0.164	0.160	0.163	0.169
SEC-HPLC(主峰%)	99.5	99.5	99.5	99.6
pH	6.1	6.1	6.0	6.0
比活性 (U/mg)	64	63	62	72

表24：對於3 ML小瓶中之3 ML填充物，將不存在聚山梨醇酯20之成

品藥振盪48小時之結果

分析	基線	振盪4 hr後之成品藥(n=1)，不含P20	振盪48 hr後之成品藥(n=1)，不含P20	對照(n=1)，含有P20
濃度(mg/mL)	31.02	34.4	32.1	32.6
在320 nm下之光密度	0.152	0.163	0.166	0.151
SEC-HPLC(主峰%)	99.6	99.6	99.6	99.6
pH	6.0	6.0	5.9	6.0
比活性 (U/mg)	70	64	65	71

緩衝能力研究

為測定rhASA之緩衝能力，以一式三份用稀酸或稀鹼來滴定產物。將38 mg/mL或30 mg/mL(後者模擬成品藥)原料藥之10 mL等分試樣置於20 mL玻璃小瓶中並向其中添加微攪拌棒。將1 N鹽酸(HCl)之1 μL等分試樣添加至蛋白質溶液中，混合內容物並記錄pH。添加1 μL HCl加入物以繼續實驗，且在量測間期不沖洗pH探針以避免任何稀釋，直至達成約5.5之pH。以一式三份實施實驗且並列滴定含有150 mM氯化鈉之5 mM磷酸鹽緩衝劑(pH 6.0)以供對比。類似地，用1 M氫氧化鈉(NaOH)滴定兩種濃度之原料藥直至達成約6.5之最終pH。為研究rhASA中任何殘留磷酸鹽之存在，藉由感應耦合式電漿質譜法(ICP-MS)來分析原料藥。亦研究經稀釋rhASA原料藥之緩衝能力以確保溶液之pH值在蛋白質溶液稀釋後不變。在1.5 mL埃彭道夫管(eppendorf tube)中製備介於30 mg/mL至1 mg/mL範圍內之稀釋試樣，且在開始稀釋時及在2-8℃下儲存一週後量測pH值。

稀酸及稀鹼滴定研究之結果顯示rhASA溶液具有足夠緩衝能力。對於使用HCl之滴定研究，最初添加之約2 μL 1 M酸不改變原料藥或

緩衝劑對照之pH。然而，增加酸體積顯示緩衝劑之pH與rhASA原料藥相比顯著降低。在添加13 μL 19 M HCl後，緩衝劑對照之pH比原料藥之pH低2 pH單位。在此實驗中亦包括30 mg/mL之原料藥濃度以模擬成品藥濃度。圖10展示在用酸滴定時，rhASA原料藥與5 mM磷酸鈉緩衝劑(pH 6.3)及150 mM氯化鈉相比之緩衝能力。

在維持pH方面，用氫氧化鈉滴定rhASA原料藥顯示相對不同之結果(圖11)。在原料藥與緩衝劑對照之間，pH之變化速率無顯著不同。

基於所觀察到之結果，且不期望受限於任何理論，由於天冬胺酸、麩胺酸及組胺酸側鏈能用作質子受體及/或供體以維持溶液pH，故rhASA可能有助於溶液之緩衝能力。先前在調配前探究期間，在發現「pH記憶」效應時，亦觀察到此蛋白質之緩衝能力。在實驗室規模及在大規模作業二者中，已若干次證實pH之保持。該兩個實驗之結果共同表明，rhASA在鹽水中之緩衝能力比在酸性方向(acidic direction)上更顯著。根據文獻，對較低pH值之緩衝能力直接指示在給定蛋白質內之天冬胺酸及麩胺酸殘基數多於組胺酸殘基。儘管不期望受限於任何理論，此實際上可係芳基硫酸酯酶A之情形，其中總計有45個麩胺酸以及天冬胺酸殘基，與之相比，有18個組胺酸殘基。

原料藥之緩衝能力亦可歸因於殘留結合磷酸鹽，使用ICP-MS顯示原料藥中存在該磷酸鹽。表25展示存於三種不同LSDL原料藥批次中之殘留磷酸鹽之量。此數據亦確認先導規模過程中超濾及透析過濾步驟之一致性。

表25：殘留磷酸鹽在LSDL所製造原料藥中之量

rhASA批號	磷酸鹽濃度(ppm)
001	27
002	31
003	31

為進一步理解此蛋白質之緩衝能力，亦研究稀釋對pH之影響。在用鹽水將rhASA原料藥稀釋至較低蛋白質濃度後，未觀察到原料藥之pH值變化。隨後，將經稀釋原料藥在2-8℃下儲存一週，之後記錄pH量測值。表26概述該數據。結果顯示，稀釋及在2-8℃下儲存對經稀釋原料藥之pH值無影響。該等觀察結果進一步支持酸及鹼滴定研究之結論，該結論顯示調配於鹽水中之rhASA原料藥具有足夠緩衝能力。

表26：經稀釋RHASA原料藥之PH值

原料藥目標濃度(mg/mL)	使用A280量測之原料藥濃度(mg/mL)	開始時之pH值	在2-8℃下儲存一週後之pH值
37.0	38.8	6.00	6.20
30.0	33.4	6.07	6.10
25.0	28.3	6.04	6.09
20.0	20.1	6.02	6.12
10.0	9.2	6.04	6.10
5.0	4.5	6.03	6.11
1.0	1.0	6.00	6.07

在rhASA稀釋及pH之研究期間，觀察到經稀釋試樣之乳白色顯示濃度依賴性降低，即具有較高濃度之rhASA試樣與濃度較低之試樣(其具有幾乎透明之外觀)相比乳白色更濃。圖12呈現觀察到之經稀釋rhASA之外觀。1 mg/mL rhASA溶液顯示類似於水之外觀，而30 mg/mL之外觀評估為介於參照懸浮液II與III或III與IV之間。

穩定性研究

對於穩定性研究，在0.005%聚山梨醇酯20存在及不存在下將原料藥以38±4 mg/mL調配於154 mM NaCl(pH 6.0)中且將成品藥以30±3 mg/mL調配於154 mM NaCl(pH 6.0)中。將原料藥之1 mL等分試樣分配至具有聚丙烯螺旋蓋之5 mL聚碳酸酯瓶中並儲存在≤-65℃、-15℃至-25℃及2-8℃下。將成品藥之1.0 mL至1.1 mL等分試樣分配至具有13 mm Flurotec塞子之3 mL玻璃小瓶中並儲存在2-8℃、25±2℃及40±2℃下。在初始穩定性研究中，將成品藥小瓶以直立取向儲存，且在使用不含P20之成品藥之後續研究中變為倒立取向。在每一時間點，藉由SEC-HPLC、RP-HPLC、OD320、蛋白質濃度、pH、比活性、SDS-PAGE (Coomassie)及外觀來測試穩定性試樣。每年一次實施肽圖、聚糖圖及甲醯甘胺酸百分比。另外，亦在應力及加速條件下實施後續分析。

調配前研究、冷凍-解凍研究及攪動研究之結果共同表明，僅三種調配物適於進一步研發。在0.005% P20存在下，在該三種調配物中開始長期穩定性研究。表27、表28及表29概述三種調配物在所選時間點之穩定性數據。

表27：154 MM NACL(PH 5.9)中之RHASA在2-8℃下之長期穩定性

測試	基線	3m	6m	11m
外觀	鮮明至輕微乳白色	鮮明至輕微乳白色	鮮明至輕微乳白色	鮮明至輕微乳白色
蛋白質濃度(mg/mL)	25.6	24.3	26.5	27.3
SEC-HPLC(主峰%)，pH 5.5	>99.9	99.8	99.9	99.8
SEC-HPLC(主峰%)，pH 7.0	99.1	99.0	99.4	99.7
RP-HPLC(主峰%)	99.6	99.7	99.8	>99.9
pH	5.9	6.0	6.0	6.0

比活性 (U/mg)	95	79	90	87
SDS-Page (Coomassie)	符合參照標準，且無新譜帶之強度大於1%分析對照	符合	符合	符合

表28：154 MM NACL(PH 7.0)中之RHASA在2-8℃下之長期穩定性

測試	**基線**	**3m**	**6m**	**11m**
外觀	鮮明至輕微乳白色	鮮明至輕微乳白色	鮮明至輕微乳白色	鮮明至輕微乳白色
蛋白質濃度(mg/mL)	27.3	26.9	28.1	29.2
SEC-HPLC(主峰%)，pH 5.5	99.9	97.5	99.8	>99.9
SEC-HPLC(主峰%)，pH 7.0	99.4	99.0	99.2	99.8
RP-HPLC(主峰%)	99.6	99.7	99.9	>99.9
pH	6.5	6.6	6.7	6.5
比活性 (U/mg)	112	88	98	86
SDS-Page (Coomassie)	符合參照標準，且無新譜帶之強度大於1%分析對照	符合	符合	符合

表29：5 MM磷酸鹽緩衝劑及145 MM NACL(PH 6.0)中之RHASA在2-8℃下之長期穩定性

測試	**基線**	**3m**	**6m**	**11m**
外觀	鮮明至輕微乳白色	鮮明至輕微乳白色	鮮明至輕微乳白色	鮮明至輕微乳白色
蛋白質濃度(mg/mL)	27.9	27.4	27.1	29.3
SEC-HPLC(主峰%)，pH 5.5	99.9	97.8	99.8	99.9
SEC-HPLC(主峰%)，pH 7.0	98.9	98.9	99.2	99.9
RP-HPLC(主峰%)	99.7	99.6	99.8	>99.9
pH	5.9	6.0	6.0	5.9
比活性 (U/mg)	87	88	95	90
SDS-Page (Coomassie)	符合參照標準，且無新譜帶之強度大於1%分析對照	符合	符合	符合

經長達11個月在2-8℃下實施之穩定性研究表明，在原型調配物中可維持rhASA之品質。存於鹽水(pH 5.9)中之rhASA之代表性尺寸排

除HPLC譜顯示於圖13及14中。在2-8℃下儲存11個月後，尺寸排除HPLC未檢測到rhASA之締合狀態有任何顯著變化。

總之，在2-8℃下儲存11個月後可維持成品藥在所有三種候選調配物中之品質。

實例4-毒理學

該實例自毒理學及安全藥理學角度闡釋經6個月時間段腦脊髓膜內(IT)投與之rhASA之重複劑量。用於該研究之IT測試物質係rhASA。將36只雄性及36只雌性食蟹猴隨機分配至5個治療群組中。群組1中之動物係未經治療之植入裝置對照(座及導管)，且未給予媒劑或測試物質；然而，以與測試物質給藥時間表匹配之時間表給予該等動物0.6 mL PBS。群組2-5中之動物每隔一週(即總共給藥12次)經IT輸注接受0.6 mL 0、3、10或31 mg/mL之rhASA(總劑量為0、1.8、6.0或18.6 mg)。在6個月時(最後一次IT劑量後24小時)對動物進行屍體剖檢，且在為期4週之恢復期結束時對其餘4只動物/性別/群組進行屍體剖檢。收穫所選組織，保存並用顯微鏡進行檢查。

通常，可將測試物質相關變化分成兩種主要類型，且在所有劑量量(1.8、6.0及18.6 mg/劑量)下均存在。腦脊髓膜、腦實質、脊髓實質、三叉神經節及有時候脊神經根/神經節(或該等結構周圍之神經外膜)中之浸潤(白血球浸潤，通常具有大量嗜伊紅白血球成份)增加。不期望受限於任何理論，將此增加解釋為由於在腦脊髓膜內間隙及神經系統組織中存在測試物質(蛋白質)所致。在有些動物中，脊髓及腦中之小神經膠質細胞出現輕微病灶性增加(在任何高劑量動物中均未觀察到小神經膠質細胞增生)。不期望受限於任何理論，兩類形態變化

皆解釋為對測試物質之存在的反應。在任何動物中均不存在神經元壞死的證據。測試物質相關變化與腦、脊髓、脊神經根或神經節中之任何生物不良反應皆無關。具體而言，不存在神經元壞死或生物學上重要之神經膠質反應的證據。在非神經系統組織中不存在測試物質相關損傷。

為期1個月之恢復期(停藥期)後，測試物質相關變化已完全消退或限於與測試物質之存在有關之發炎反應之先前增加的殘餘。在恢復後動物中不存在不良形態影響。基於指定半定量染色評分之盲法顯微鏡檢查，在終點屠宰時，對於所有測試物質治療群組，在腦及脊髓中之各種細胞類型(神經元除外)中，芳基硫酸酯酶A(rhASA；測試物質)之免疫組織化學染色均增強。在肝之庫弗細胞(Kupffer cell)中此增強亦非常明顯。為期1個月之恢復期後，測試物質治療動物(所有劑量群組)之rhASA染色已回到對照(裝置及/或媒劑對照)程度。在一隻低劑量恢復雄性動物中，大腦皮質中存在多處星形細胞增生及神經元損失病灶，表明多個區域先前缺血。儘管該動物中該等損傷之確切發病機制尚不明確，但在任何其他測試物質治療動物(包括接受10X劑量之高劑量動物)中不存在類似損傷表明，該等損傷與測試物質無關。

用於該研究之IT測試物質係rhASA。將36只雄性及36只雌性食蟹猴隨機分配至5個治療群組中。群組1中之動物係未經治療之植入裝置對照(座及導管)，且未給予媒劑或測試物質；然而，以與測試物質給藥時間表匹配之時間表給予該等動物0.6 mL PBS。群組2-5中之動物每隔一週(即總共給藥12次)經IT輸注接受0.6 mL 0、3、10或31 mg/mL之rhASA(總劑量為0、1.8、6.0或18.6 mg)。在6個月時(最後一次IT劑

量後24小時)對動物進行屍體剖檢，且在為期4週之恢復期結束時對其餘4只動物/性別/群組進行屍體剖檢。收穫所選組織，保存並用顯微鏡進行檢查。下表反映與該研究之病理學態樣有關之研究設計。

在屠宰時，在腦模具(brain matrix)中將腦切成約3 mm厚度之冠狀薄片。將第一薄片及之後每隔一個薄片固定於福馬林(formalin)中以用於組織病理學評價及免疫組織化學分析。將腦處理成全冠狀切片。該等切片最少包括以下腦區。

- 皮質(包括額葉皮質、頂葉皮質、顳葉皮質及枕葉皮質)：腦切片1至8(及薄片9，存在時)
- 皮質(嗅球及/或梨狀葉)：腦切片1至3
- 底神經節(包括尾狀核及豆狀核殼)：腦切片3及4
- 邊緣系統(包括海馬及扣帶回)：腦切片4及5
- 腦/下丘腦及中腦區(包括黑質)：腦切片4及5
- 腦、腦橋及延髓：腦切片6至8(及薄片9，存在時)。

該等腦切片以切片1至8/9(切片9係由測試機構針對一些動物提供)列示於數據表中。各動物之切片略微有變化。上文提供之腦切片(1至8/9)係各個解剖學區域之近似位置。該等腦切片以個別切片列示於數據表中，且附有與該切片有關之診斷以方便將來可能再審查載玻片(若需要)。在數據解釋期間，比較各腦解剖學位點(如上文所列示)以鑒定任何獨特的測試物質影響(即為特定腦區所特有)。在TPS時，將所有動物之所有腦切片包埋於石蠟中，以5微米切片，用蘇木素及伊紅(H&E)染色並用顯微鏡檢查。另外，將對照及高劑量動物之腦用Fluoro-Jade B(此染色劑使對腦之神經元變性之評價靈敏性增強)及

Bielschowsky銀染色劑(此程序使得軸突、樹突及神經元絲可直接可視化)染色，並進行檢查。

將脊髓(頸部、胸部及腰部)切成1釐米切片。將第一薄片及之後每隔一個薄片固定於福馬林中以用於組織病理學評價及免疫組織化學分析。將所有動物之脊髓區段(頸部、胸部(包括導管尖端)及腰部)以約5微米切片，用H&E染色並進行檢查，其中在每一節段取橫切片及斜切片。將來自對照及高劑量群組之連續脊髓切片另外用Bielschowsky銀染色劑及抗GFAP(一種免疫組織化學染色劑，其使得星形細胞及其突起可直接可視化)染色。

將背部脊神經根及神經節(在中頸部(mid-cervical)、胸正中(mid-thoracic)及中腰部(mid-lumbar)取樣)包埋於石蠟中，其中連續切片用H&E染色。另外，將來自對照及高劑量群組之連續切片用Bielschowsky銀染色劑染色。

對於所有動物之坐骨神經、脛神經及腓腸神經切片：將各神經之縱切片包埋於石蠟中，以約5微米切片並用H&E染色。將各神經之橫切片後固定於鋨中，包埋於Spurr樹脂中，以約1至2微米切片並用甲苯胺藍(toluidine blue)染色。鋨後固定及樹脂包埋可更好地保存周圍神經中之髓磷脂，且因此可更詳細地對神經進行檢查。

亦將屍體剖檢時自所有動物採集之所有組織以及收穫之肉眼損傷包埋於石蠟中，用H&E染色，並用顯微鏡檢查。藉由TPS實施組織病理學處理及評價以及免疫組織化學分析。

芳基硫酸酯酶A(rhASA)染色

由研究發起者提供陽性對照載玻片。該等載玻片係注射rhASA之

小鼠的肝切片。所有該等陽性對照載玻片均顯示在肝中之庫弗細胞(竇狀隙巨噬細胞)中存在rhASA之充足證據。將該等陽性對照載玻片與該研究之其他載玻片一起儲存。對rhASA染色切片之所有評價最初均在不瞭解動物治療群組下實施。此係藉由以下方式來實施：最初由病理學家觀察rhASA染色載玻片，此時標籤上之動物編號被隱藏起來(由瞭解所評價實際動物之助手隱藏)，在評價期間口述評分(嚴重程度等級)，並由同一助手立即將該染色評分(嚴重程度等級)記錄至數據表中。隨後由該研究之神經病理學家及助手核實動物ID以確保輸入數據準確。實施此程序之目的在於在判斷免疫組織化學染色劑之總染色強度以檢測細胞內rhASA時不引入任何偏見。將所有腦及脊髓切片中神經元、腦脊髓膜巨噬細胞、血管周巨噬細胞及神經膠質細胞(星形細胞及小神經膠質細胞，但可能主要為小神經膠質細胞)之相對染色程度分級。將各群組之各腦及脊髓層面上之平均嚴重程度評分加和(按群組)，並以總和記錄在標題為腦(總體、rhASA染色)及脊髓(總體、rhASA染色)之組織下。

通常，腦神經元中之rhASA染色係大腦皮質及腦中其他核區域中之神經元的量度。腦脊髓膜巨噬細胞中之rhASA染色係腦脊髓膜巨噬細胞吸收測試物質及/或腦脊髓膜巨噬細胞中之內源rhASA的證據。血管周巨噬細胞之rhASA染色係腦/脊髓中之巨噬細胞吸收rhASA(或內源rhASA)之量度，但是應注意腦及脊髓中之血管周間隙(Virchow-Robins間隙)與腦脊髓膜相連。通常，神經膠質細胞中rhASA染色之等級主要係測試物質被吸收至/測試物質透入灰質及/或白質(尤其大腦皮質，放射冠係大腦皮質下方之白質)中之量度。白質中之rhASA染色

似乎出現在星形細胞及小神經膠質細胞中。

使用以下分級方案來給各種細胞類型(神經元、神經膠質細胞、巨噬細胞)之rhASA染色程度評分。

等級解釋(佔可染色細胞之%)

1小於10%

2大於10%至25%

3大於25%至50%

4大於50%至75%

5大於75%

應注意，該方案並非嚴格定量。將其用作有效的半定量方法來評估腦及脊髓之rhASA染色程度。該研究之神經病理學家注意到，並非所有神經元區域均具有同等之rhASA染色。還注意到，在一些對照動物中存在內源神經元染色，而且即使在對照動物中脈絡叢細胞及背根神經節之神經元亦往往具有強烈rhASA染色。未給脈絡叢及背根神經節之染色分級，但該研究之神經病理學家將其記錄為突出，即使在對照動物中亦如此。

注：所有劑量群組：低劑量= 1.8 mg/劑量；中等劑量= 6.0 mg/劑量；高劑量= 18.6 mg/劑量。除所有劑量群組(雄性及雌性；見下文)之肝中之rhASA染色增強以外，在非神經系統組織中不存在測試物質相關損傷。

終點屠宰動物(6個月EOW給藥)：rhASA染色切片

在以下組織/細胞類型中，rhASA染色增強。當考慮測試物質對特定劑量群組中之特定細胞類型之rhASA染色程度的影響時，將並存

的媒劑對照及裝置對照(與恢復後屠宰動物一起屠宰)中之染色程度視為對照。

腦、腦脊髓膜、巨噬細胞(所有劑量群組，雄性及雌性)

•腦、血管周、巨噬細胞(所有劑量群組，雄性及雌性)

•腦、神經膠質細胞(所有劑量群組，雄性及雌性)

•脊髓、腦脊髓膜、巨噬細胞(所有劑量群組，雄性及雌性)

•脊髓、血管周、巨噬細胞(所有劑量群組，雄性及雌性)

•脊髓、神經膠質細胞(中等劑量及高劑量，雄性及雌性)

•肝、庫弗細胞(所有劑量群組，雄性及雌性)

由於存在內源染色，故腦及脊髓神經元中之rhASA染色程度最難以明確界定。rhASA染色證實在腦脊髓膜及腦/脊髓血管周巨噬細胞以及神經膠質細胞中之rhASA含量始終增加。對照與測試物質治療動物之神經元rhASA染色間不存在可檢測到之差異。

恢復後屠宰動物(6個月EOW給藥，之後1個月不給藥)

通常，在屍體剖檢之前給予為期1個月之停藥期的動物中測試物質相關變化完全消退或顯著減少。存在以下顯微鏡下變化，其發生率及/或嚴重程度表明可能與測試物質有關。

與測試物質相關之顯微鏡下變化(恢復後動物)

•腦、腦脊髓膜、浸潤(中等劑量及高劑量群組，兩種性別)(圖16及圖17)

•腦、腦脊髓膜、浸潤、嗜伊紅白血球%(中等劑量雄性；高劑量雌性)

•腦、血管周、浸潤(中等劑量雄性；高劑量雌性)(圖18)

•腦、血管周、浸潤、嗜伊紅白血球%(中等劑量雄性；高劑量雌性)

•腦、灰質、浸潤(所有劑量群組，兩種性別)

•腦、灰質、浸潤、嗜伊紅白血球%(低劑量雄性)

•腦、灰質、嗜伊紅白血球、壞死(低劑量雄性)

•脊髓、腦脊髓膜、浸潤(中等劑量及高劑量雄性；低劑量及高劑量雌性)

•脊髓、腦脊髓膜、浸潤、嗜伊紅白血球%(中等劑量雄性；低劑量雌性)

•脊髓、灰質、浸潤(低劑量雌性)

•脊髓、灰質、浸潤、嗜伊紅白血球%(低劑量雌性)

•背根神經節及根、神經外膜、浸潤(中等劑量雌性)

•脊神經根及神經節、浸潤、嗜伊紅白血球(中等劑量及高劑量雄性；所有劑量，雌性)

•三叉神經節、浸潤、嗜伊紅白血球(中等劑量雄性及雌性)

將所有該等變化均解釋成係在終點屠宰動物中觀察到之增加之發炎變化的殘餘。與在終點屠宰動物中一樣，沒有證據表明在一些恢復後動物中仍然存在之發炎細胞浸潤增加係正造成任何不良效應之形態變化。在非神經系統組織中不存在測試物質相關損傷。

恢復後屠宰動物(6個月EOW給藥，之後1個月不給藥)：rhASA染色

與裝置及/或媒劑對照相比，未顯示在恢復雄性或雌性動物中rhASA染色有所增強。在低劑量、中等劑量及高劑量恢復雄性動物之腦中，與裝置及/或媒劑對照相比，實際上顯示一些細胞類型之rhASA

染色減弱(此在各治療群組間有變化)。造成此現象之原因(包括此現象是否為實際效應)尚不明確。一種可能之解釋為，投與外源rhASA可能造成內源rhASA之產生一定程度地降低。在雄性動物之脊髓中不存在類似發現。在恢復後雄性及雌性動物中，肝中之染色與在對照中所觀察到之類似。

通常，可將測試物質相關變化分成兩種主要類型，且在所有劑量量(1.8、6.0及18.6 mg/劑量)下均存在。

腦脊髓膜、腦實質、脊髓實質、三叉神經節及有時候脊神經根/神經節(或該等結構周圍之神經外膜)中之浸潤(白血球浸潤，通常具有大量嗜伊紅白血球成份)增加。將此增加解釋為由於在腦脊髓膜內間隙及神經系統組織中存在測試物質(蛋白質)所致。

在有些動物中，脊髓及腦中之小神經膠質細胞出現輕微病灶性增加(在任何高劑量動物中均未觀察到小神經膠質細胞增生)。將兩種類型之形態變化解釋為對測試物質之存在之反應。在任何動物中均不存在神經元壞死的證據。測試物質相關變化與腦、脊髓、脊神經根或神經節中之任何生物不良反應皆無關。具體而言，不存在神經元壞死或生物學上重要之神經膠質反應的證據。在非神經系統組織中不存在測試物質相關損傷。為期1個月之恢復期(停藥期)後，測試物質相關變化已完全消退或限於與測試物質之存在有關之發炎反應之先前增加的殘餘。在恢復後動物中不存在不良形態影響。

基於指定半定量染色評分之盲法顯微鏡檢查，對於所有測試物質治療群組，在腦及脊髓中之各種細胞類型(神經元除外)中，芳基硫酸酯酶A(rhASA；測試物質)之免疫組織化學染色均增強。在肝之庫

弗細胞中此增強亦非常明顯。為期1個月之恢復期後，測試物質治療動物(所有劑量群組)之rhASA染色已回到對照(裝置及/或媒劑對照)程度。在一隻低劑量恢復雄性動物中，大腦皮質中存在多處星形細胞增生及神經元損失病灶，表明多個區域先前缺血。儘管該動物中該等損傷之確切發病機制尚不明確，但在任何其他測試物質治療動物(包括接受10X劑量之高劑量動物)中不存在類似損傷表明，該等損傷與測試物質無關。嚴格基於該研究中之肉眼及顯微鏡下發現(針對經石蠟包埋、蘇木素及伊紅染色之切片)，無可觀察到之不良效應的量(NOAEL)為18.6 mg。

實例5-藥物代謝動力學數據

6個月動物數據

該實例提供rhASA及抗rhASA血清抗體(來自Northern Biomedical Research公司)之血清及CSF濃度的解釋性分析。

該實例之目的係自毒理學及安全藥理學角度評價幼年(小於12個月齡)食蟹猴中腦脊髓膜內(IT)投與之rhASA之重複劑量。在6個月時間段內總共給藥12次。在最後一次給藥後24小時或1個月對動物進行屍體剖檢。研究設計顯示於表30中。

表30：研究設計

研究設計					
群組	動物編號	標稱劑量濃度(mg/mL)	所投與濃度(mg)	動物編號，6個月後屠宰	動物編號，1個月恢復後屠宰
1	4M, 4F	DC	0	-	4M, 4F
2	8M, 8F	0	0	4 M, 3 F[a]	4M, 4F
3	8M, 8F	3	1.8	4 M, 4 F	4M, 4F
4	8M, 8F	10	6.0	4 M, 4 F	4M, 4F
5	8M, 8F	31	18.6	4 M, 4 F	4M, 4F

DC=裝置對照；群組1中之動物未給予媒劑或測試物質。

[a] 編號為044之媒劑對照動物由於導管洩漏而在第50天提前屠宰。

分析方法-抗體分析

使用經驗證之方法來實施食蟹猴血清及CSF中抗rhASA抗體之定量。簡言之，分析時先封阻MSD抗生蛋白鏈菌素塗敷板，隨後與生物素標記之rhASA一起培育。洗滌步驟後，將稀釋試樣、校準物質及QC添加至板中並進行培育。再次洗滌步驟後，添加SULFO TAG標記之藥物並進行培育。實施最後的洗滌步驟，並添加MSD讀取緩衝劑(read buffer)。立即讀取板。使用SOFTMax Pro模板來分析以相對發光單位(RLU)計之信號數據。

血清及CSF濃度

使用經驗證之方法來實施食蟹猴血清及CSF中rhASA之定量。該方法係基於酵素連結免疫吸附分析(ELISA)技術。簡言之，用針對重組人類芳基硫酸酯酶A(ASA)產生之兔多株抗體(SH040)來塗敷微量滴定板。在與ASA參照標準物及測試試樣一起培育後，藉由結合辣根過氧化物酶(HRP)之抗ASA單株抗體(純系19-16-3)來檢測結合ASA之蛋白質。隨後將該板與HRP之受質TMB一起培育。藉由添加2 N硫酸(H_2SO_4)來終止該酵素-受質反應，並在450 nm吸收波長及655 nm參照波長下量測每個孔之吸光度。利用相同板中之rhASA校準曲線來計算試樣中之ASA濃度。

按群組及性別概述之rhASA之血清濃度、rhASA之CSF濃度、抗rhASA血清抗體濃度、抗rhASA CSF抗體濃度及抗體之存在率顯示於下表33-39中。

表33：食蟹猴中rhASA之血清濃度之概述

群組1：媒劑對照	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
在第2次給藥之前	0	0	4	0	0	4
在第2次給藥之後	0	0	4	0	0	4
在第4次給藥之前	0	0	4	0	0	4
在第4次給藥之後	0	0	4	0	0	4
在第6次給藥之前	0	0	4	0	0	4
在第6次給藥之後	0	0	4	0	0	4
在第8次給藥之前	0	0	4	0	0	4
在第8次給藥之後	0	0	4	0	0	4
在第10次給藥之前	0	0	4	0	0	4
在第10次給藥之後	0	0	4	0	0	4
在第12次給藥之前	0	0	4	0	0	4
在第12次給藥之後	0	0	4	0	0	4
恢復期中間((Mid Recovery))	0	0	4	0	0	4
恢復後屍體剖檢	0	0	4	0	0	4

群組2：0 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
在第2次給藥之前	0	0	8	0	0	7
在第2次給藥之後	0	0	8	0	0	7
在第4次給藥之前	0	0	8	0	0	7
在第4次給藥之後	0	0	8	0	0	7
在第6次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第6次給藥之後	0	0	8	0	0	8

在第8次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第8次給藥之後	0	0	8	0	0	8
在第10次給藥之前	0	0	8	0	0	7
在第10次給藥之後	0	0	8	0	0	7
在第12次給藥之前	0	0	8	0	0	7
在第12次給藥之後(在6個月屍體剖檢之前)	0	0	8	0	0	8
恢復期中間	0	0	4	0	0	4
恢復後屍體剖檢	0	0	4	0	0	4

表33(續)：食蟹猴中rhASA之血清濃度的概述

群組3：1.8 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
在第2次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第2次給藥之後	49.2	46.8	8	40.3	27.3	8
在第4次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第4次給藥之後	0	0	8	0	0	8
在第6次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第6次給藥之後	0	0	8	0	0	8
在第8次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第8次給藥之後	0	0	8	0	0	8
在第10次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第10次給藥之後	0	0	8	0	0	8
在第12次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第12次給藥之後(在6個月屍體剖檢之前)	0	0	8	0	0	8
恢復期中間	0	0	4	0	0	4
恢復後屍體剖檢	0	0	4	0	0	4

群組4：6.0 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
在第2次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第2次給藥之後	173.6	69.5	8	143.2	89.0	8
在第4次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第4次給藥之後	17	49	8	63.8	119.9	8
在第6次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第6次給藥之後	0	0	8	0	0	8
在第8次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第8次給藥之後	0	0	8	0	0	8
在第10次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第10次給藥之後	0	0	8	0	0	8
在第12次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第12次給藥之後(在6個月屍體剖檢之前)	0	0	8	0	0	8
恢復期中間	0	0	4	0	0	4
恢復後屍體剖檢	0	0	4	0	0	4

表33(續)：食蟹猴中rhASA之血清濃度的概述

群組5：18.6 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
在第2次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第2次給藥之後	348.0	272.9	8	562.3	204.3	8
在第4次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第4次給藥之後	105.7	274.6	8	172.0	141.3	8
在第6次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第6次給藥之後	20.4	38.4	8	88.6	121.4	8

在第8次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第8次給藥之後	0	0	8	54.0	89.4	8
在第10次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第10次給藥之後	0	0	8	6	18	8
在第12次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第12次給藥之後(在6個月屍體剖檢之前)	0	0	8	0	0	8
恢復期中間	0	0	4	0	0	4
恢復後屍體剖檢	0	0	4	0	0	4

表34：食蟹猴中CSF濃度之概述

群組1：媒劑對照	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
在第2次給藥之前	0	0	4	0	0	4
在第2次給藥之後	0	0	4	0	0	4
在第4次給藥之前	0	0	4	0	0	4
在第4次給藥之後	0	0	4	0	0	4
在第6次給藥之前	0	0	4	0	0	4
在第6次給藥之後	0	0	4	0	0	4
在第8次給藥之前	0	0	4	0	0	4
在第8次給藥之後	0	0	4	0	0	4
在第10次給藥之前	0	0	4	0	0	4
在第10次給藥之後	0	0	3	0	0	4
在第12次給藥之前	0	0	3	0	0	4
在第12次給藥之後	0	0	3	0	0	4
恢復期中間	0	0	3	0	0	4
恢復後屍體剖檢	0	0	4	0	0	4

群組2：0 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
在第2次給藥之前	0	0	6	0	0	7
在第2次給藥之後	0	0	5	0	0	7
在第4次給藥之前	0	0	5	0	0	6
在第4次給藥之後	0	0	5	0	0	5
在第6次給藥之前	0	0	5	0	0	5
在第6次給藥之後	0	0	5	0	0	5
在第8次給藥之前	0	0	5	0	0	5
在第8次給藥之後	0	0	5	0	0	5
在第10次給藥之前	0	0	4	0	0	5
在第10次給藥之後	0	0	4	0	0	5
在第12次給藥之前	0	0	4	0	0	5
在第12次給藥之後(在6個月屍體剖檢之前)	0	0	5	0	0	5
恢復期中間	0	0	2	0	0	3
恢復後屍體剖檢	0	0	4	0	0	4

表34(續)：食蟹猴中CSF濃度之概述

群組3：1.8 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
在第2次給藥之前	42491	59255	7	42217	47300	6
在第2次給藥之後	95886	22626	7	125717	61723	6
在第4次給藥之前	17664	24372	6	50829	41891	6
在第4次給藥之後	106783	42823	6	138400	49908	6
在第6次給藥之前	39400	50105	4	45817	38404	6
在第6次給藥之後	95275	12836	4	104080	37423	5
在第8次給藥之前	25799	31589	4	58086	43821	5

在第8次給藥之後	148750	34664	4	119200	66556	5
在第10次給藥之前	25927	31380	4	30380	30328	5
在第10次給藥之後	89975	29494	4	105200	44603	5
在第12次給藥之前	29746	34267	4	82780	65906	5
在第12次給藥之後(在6個月屍體剖檢之前)	32030	39155	7	47331	49015	6
恢復期中間	0	0	3	0	0	2
恢復後屍體剖檢	0	0	4	0	0	4
群組4：6.0 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
在第2次給藥之前	75203	67002	8	146979	233673	6
在第2次給藥之後	360000	179276	8	267667	103369	6
在第4次給藥之前	58064	77210	8	53285	73340	5
在第4次給藥之後	369250	241251	8	305517	152232	6
在第6次給藥之前	77253	91407	8	97987	146762	6
在第6次給藥之後	418600	200098	5	369000	232238	5
在第8次給藥之前	66342	80374	5	11592	23072	4
在第8次給藥之後	329400	209841	5	340500	135128	4
在第10次給藥之前	119420	148408	5	74031	104609	2
在第10次給藥之後	412000	149278	5	245500	161927	2
在第12次給藥之前	68651	92902	5	74577	105251	2
在第12次給藥之後(在6個月屍體剖檢之前)	141833	173933	7	58986	99016	4
恢復期中間	0	0	3	0	NA	1
恢復後屍體剖檢	0	0	4	0	0	4

表34(續)：食蟹猴中CSF濃度之概述

群組5：18.6 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
在第2次給藥之前	289917	291188	7	201339	250774	8
在第2次給藥之後	734429	298352	7	920143	448409	7
在第4次給藥之前	150238	210302	7	169895	185675	6
在第4次給藥之後	984857	570039	7	965167	425924	6
在第6次給藥之前	265479	252067	7	288879	226889	6
在第6次給藥之後	758143	102009	7	1270000	558533	6
在第8次給藥之前	190529	240081	7	196021	199396	6
在第8次給藥之後	1003429	538271	7	989800	585072	5
在第10次給藥之前	176297	272500	7	168864	191087	6
在第10次給藥之後	1013000	390673	7	773400	103717	5
在第12次給藥之前	142334	196793	5	430542	436534	6
在第12次給藥之後(在6個月屍體剖檢之前)	291525	350251	7	252142	381200	6
恢復期中間	0	0	3	0	0	2
恢復後屍體剖檢	0	0	4	0	0	4

表35：血清中抗rhASA抗體濃度之概述

群組1：媒劑對照	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/Ml		ng/mL	ng/mL	
在第2次給藥之前	0	0	4	0	0	4
在第4次給藥之前	0	0	4	0	0	4
在第6次給藥之前	0	0	4	0	0	4
在第8次給藥之前	0	0	4	0	0	4
在第10次給藥之前	0	0	4	0	0	4
在第12次給藥之前	0	0	4	0	0	4
恢復期中間	0	0	4	0	0	4
恢復後屍體剖檢	0	0	4	0	0	4

群組2：0 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
在第2次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第4次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第6次給藥之前	0	0	8	0	0	7
在第8次給藥之前	0	0	8	0	0	7
在第10次給藥之前	0	0	8	0	0	7
在第12次給藥之前	0	0	8	0	0	7
屍體剖檢(在最後一次給藥後24 hr)	0	0	4	0	0	4
恢復期中間	0	0	4	0	0	4
恢復後屍體剖檢	0	0	4	0	0	4

群組3：1.8 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	N
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
在第2次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第4次給藥之前	18409	21371	8	27648	37504	8
在第6次給藥之前	75913	64863	8	85625	79871	8
在第8次給藥之前	132163	95576	8	151900	97818	8
在第10次給藥之前	392338	606626	8	290675	186213	8
在第12次給藥之前	499438	735028	8	524438	569523	8
屍體剖檢(在最後一次給藥後24 hr)	261625	157865	4	733550	928411	4
恢復期中間	339250	265888	4	377175	218955	4
恢復後屍體剖檢	712500	1107129	4	295525	174718	4

表35(續)：血清中抗rhASA抗體濃度之概述

群組4：6.0 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	N
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
在第2次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第4次給藥之前	30419	30561	8	64000	89510	8
在第6次給藥之前	143693	128094	8	191750	150511	8
在第8次給藥之前	325750	190651	8	305850	224707	8
在第10次給藥之前	669125	515458	8	832188	846241	8
在第12次給藥之前	946125	651530	8	1060775	1088889	8
屍體剖檢(在最後一次給藥後24 hr)	713500	598812	4	1047568	1132048	4
恢復期中間	1566000	708132	4	975500	1149734	4
恢復後屍體剖檢	1113250	554510	4	793000	991450	4

群組5：18.6 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	N
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
在第2次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第4次給藥之前	56873	39107	8	39994	53411	8
在第6次給藥之前	311638	237796	8	193263	208952	8
在第8次給藥之前	482875	270130	8	399363	360425	8
在第10次給藥之前	1006750	857916	8	866875	894776	8
在第12次給藥之前	1419000	1382276	8	1341500	1373771	8
屍體剖檢(在最後一次給藥後24 hr)	165000	147463	4	407300	268570	4
恢復期中間	2884250	1363128	4	2101500	2090420	4
恢復後屍體剖檢	2504250	1118042	4	1506000	1524682	4

表36：CSF中抗rhASA抗體濃度之概述

群組1：媒劑對照	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
手術	0	0	4	0	0	4
在第2次給藥之前	0	0	4	0	0	4
在第4次給藥之前	0	0	4	0	0	4
在第6次給藥之前	0	0	4	0	0	4
在第8次給藥之前	0	0	4	0	0	4
在第10次給藥之前	0	0	4	0	0	4
在第12次給藥之前	0	0	3	0	0	4
恢復期中間	0	0	3	0	0	4
恢復後屍體剖檢	0	0	4	0	0	4

群組2：0 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
手術	0	0	7	0	0	6
在第2次給藥之前	0	0	6	0	0	7
在第4次給藥之前	0	0	5	0	0	6
在第6次給藥之前	0	0	5	0	0	5
在第8次給藥之前	0	0	5	0	0	5
在第10次給藥之前	0	0	4	0	0	5
在第12次給藥之前	0	0	4	0	0	5
屍體剖檢(在最後一次給藥後24 hr)	0	0	3	0	0	2
恢復期中間	0	NA	1	0	0	3
恢復後屍體剖檢	0	0	4	0	0	4

群組3：1.8 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
手術	0	0	7	0	0	8
在第2次給藥之前	0	0	7	0	0	6
在第4次給藥之前	0	0	6	41	101	6
在第6次給藥之前	685	1317	4	632	1413	5
在第8次給藥之前	2238	2596	4	2180	4875	5
在第10次給藥之前	3393	5038	4	5560	12433	5
在第12次給藥之前	6436	8266	4	12700	28398	5
屍體剖檢(在最後一次給藥後24 hr)	14848	12401	4	21442	32382	4
恢復期中間	29307	40617	3	18700	283	2
恢復後屍體剖檢	21060	30010	3	13078	7181	4

表36(續)：CSF中抗rhASA抗體濃度之概述

群組4：6.0 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
手術	0	0	7	0	0	8
在第2次給藥之前	0	0	7	0	0	6
在第4次給藥之前	99	172	7	84	187	5
在第6次給藥之前	1117	1862	8	1473	2775	6
在第8次給藥之前	3987	5580	5	20824	27320	4
在第10次給藥之前	6600	9679	5	2715	1237	2
在第12次給藥之前	5285	7279	5	955	1237	2
屍體剖檢(在最後一次給藥後24 hr)	16870	16350	4	63000	63000	3
恢復期中間	66233	42238	3	16800	NA	1
恢復後屍體剖檢	53600	14388	3	28880	29890	4

群組5：18.6 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
手術	0	0	7	0	0	6
在第2次給藥之前	0	0	7	0	0	8
在第4次給藥之前	102	192	7	0	0	6
在第6次給藥之前	233	351	7	1506	3234	6
在第8次給藥之前	3378	5931	7	6367	9865	6
在第10次給藥之前	16327	24035	7	19567	27542	6
在第12次給藥之前	11596	16406	5	15143	24351	6
屍體剖檢(在最後一次給藥後24 hr)	5168	7427	4	12135	10341	4
恢復期中間	54700	26439	3	46315	62770	2
恢復後屍體剖檢	50725	29217	4	37790	35967	4

表37：rhASA之血清及CSF濃度，雄性及雌性組合(ng/mL)

群組1：媒劑對照	血清rhASA (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
	整個群組			整個群組		
時間點	平均值	SD	n	平均值	SD	n
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
在第2次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第2次給藥之後	0	0	8	0	0	8
在第4次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第4次給藥之後	0	0	8	0	0	8
在第6次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第6次給藥之後	0	0	8	0	0	8
在第8次給藥之前	0	0	8	0	0	8

在第8次給藥之後	0	0	8	0	0	8
在第10次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第10次給藥之後	0	0	8	0	0	7
在第12次給藥之前	0	0	8	0	0	7
在第12次給藥之後	0	0	8	0	0	7
恢復期中間	0	0	8	0	0	7
恢復後屍體剖檢	0	0	8	0	0	8

群組2：0 mg	血清rhASA (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
	整個群組			整個群組		
時間點	平均值	SD	n	平均值	SD	n
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
在第2次給藥之前	0	0	16	0	0	13
在第2次給藥之後	0	0	16	0	0	12
在第4次給藥之前	0	0	16	0	0	11
在第4次給藥之後	0	0	16	0	0	10
在第6次給藥之前	0	0	15	0	0	10
在第6次給藥之後	0	0	15	0	0	10
在第8次給藥之前	0	0	15	0	0	10
在第8次給藥之後	0	0	15	0	0	10
在第10次給藥之前	0	0	15	0	0	9
在第10次給藥之後	0	0	15	0	0	9
在第12次給藥之前	0	0	15	0	0	9
在第12次給藥之後(在6個月屍體剖檢之前)	0	0	15	0	0	10
恢復期中間	0	0	8	0	0	5
恢復後屍體剖檢	0	0	8	0	0	8

表37(續)：rhASA之血清及CSF濃度，雄性及雌性組合(ng/mL)

群組3：1.8 mg	血清rhASA (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
	整個群組			整個群組		
時間點	平均值	SD	n	平均值	SD	n
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
在第2次給藥之前	0	0	16	42365	51844	13
在第2次給藥之後	44.7	37.3	16	109654	45639	13
在第4次給藥之前	0	0	16	34247	36982	12
在第4次給藥之後	0	0	16	122592	47311	12
在第6次給藥之前	0	0	16	43250	40831	10
在第6次給藥之後	0	0	16	100167	27992	9
在第8次給藥之前	0	0	16	43736	40298	9
在第8次給藥之後	0	0	16	132333	53926	9
在第10次給藥之前	0	0	16	28401	28890	9
在第10次給藥之後	0	0	16	98433	37220	9
在第12次給藥之前	0	0	16	59209	58253	9
在第12次給藥之後(在6個月屍體剖檢之前)	0	0	16	39092	42786	13
恢復期中間	0	0	8	0	0	5
恢復後屍體剖檢	0	0	8	0	0	8

群組4：6.0 mg	血清rhASA (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
	整個群組			整個群組		
時間點	平均值	SD	n	平均值	SD	n
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
在第2次給藥之前	0	0	16	105964	157408	14
在第2次給藥之後	158.4	78.7	16	320429	153832	14
在第4次給藥之前	0	0	16	56226	72638	13
在第4次給藥之後	40.6	91.7	16	341936	203284	14
在第6次給藥之前	0	0	16	86139	113563	14
在第6次給藥之後	0	0	16	393800	206033	10
在第8次給藥之前	0	0	16	42009	65286	9

在第8次給藥之後	0	0	16	334333	169995	9
在第10次給藥之前	0	0	16	106452	130375	7
在第10次給藥之後	0	0	16	364429	160707	7
在第12次給藥之前	0	0	16	70344	87227	7
在第12次給藥之後(在6個月屍體剖檢之前)	0	0	16	111707	151129	11
恢復期中間	0	0	8	0	0	4
恢復後屍體剖檢	0	0	8	0	0	8

表37(續)：rhASA之血清及CSF濃度，雄性及雌性組合(ng/mL)

群組5：18.6 mg	血清rhASA (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
	整個群組			整個群組		
時間點	平均值	SD	n	平均值	SD	n
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
在第2次給藥之前	0	0	16	242676	264338	15
在第2次給藥之後	455.1	257.8	16	827286	378379	14
在第4次給藥之前	0	0	16	159311	191264	13
在第4次給藥之後	138.8	213.7	16	975769	488021	13
在第6次給藥之前	0	0	16	276279	231010	13
在第6次給藥之後	54.5	93.8	16	994385	453568	13
在第8次給藥之前	0	0	16	193064	213058	13
在第8次給藥之後	27.0	67.1	16	997750	531567	12
在第10次給藥之前	0	0	16	172866	228817	13
在第10次給藥之後	3.2	13	16	913167	319975	12
在第12次給藥之前	0	0	16	299538	365275	11
在第12次給藥之後(在6個月屍體剖檢之前)	0	0	16	273348	349718	13
恢復期中間	0	0	8	0	0	5
恢復後屍體剖檢	0	0	8	0	0	8

表38：血清及CSF抗rhASA抗體，雄性及雌性組合(ng/mL)

群組1：媒劑對照	血清抗rhASA抗體(ng/mL)			CSF抗rhASA抗體(ng/mL)		
	整個群組			整個群組		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
手術				0	0	8
在第2次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第4次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第6次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第8次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第10次給藥之前	0	0	8	0	0	8
在第12次給藥之前	0	0	8	0	0	7
恢復期中間	0	0	8	0	0	7
恢復後屍體剖檢	0	0	8	0	0	8

群組2：0 mg	血清抗rhASA抗體(ng/mL)			CSF抗rhASA抗體(ng/mL)		
	整個群組			整個群組		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
手術				0	0	13
在第2次給藥之前	0	0	16	0	0	13
在第4次給藥之前	0	0	16	0	0	11
在第6次給藥之前	0	0	15	0	0	10
在第8次給藥之前	0	0	15	0	0	10
在第10次給藥之前	0	0	15	0	0	9
在第12次給藥之前	0	0	15	0	0	9
屍體剖檢(在最後一次給藥後24 hr)	0	0	8	0	0	5
恢復期中間	0	0	8	0	0	4
恢復後屍體剖檢	0	0	8	0	0	8

表38(續)：血清及CSF抗rhASA抗體，雄性及雌性組合(ng/mL)

群組3：1.8 mg	血清抗rhASA抗體(ng/mL)			CSF抗rhASA抗體(ng/mL)		
	整個群組			整個群組		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
手術				0	0	15
在第2次給藥之前	0	0	16	0	0	13
在第4次給藥之前	23028	29871	16	21	72	12
在第6次給藥之前	80769	70467	16	656	1284	9
在第8次給藥之前	142031	93979	16	2206	3796	9
在第10次給藥之前	341506	436656	16	4597	9386	9
在第12次給藥之前	511938	635340	16	9916	20970	9
屍體剖檢(在最後一次給藥後24 hr)	497588	666122	8	18145	22972	8
恢復期中間	358213	226397	8	25064	29302	5
恢復後屍體剖檢	504013	766860	8	16499	18552	7

群組4：6.0 mg	血清抗rhASA抗體(ng/mL)			CSF抗rhASA抗體(ng/mL)		
	整個群組			整個群組		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
手術				0	0	15
在第2次給藥之前	0	0	16	0	0	13
在第4次給藥之前	47209	66899	16	93	170	12
在第6次給藥之前	167721	137276	16	1269	2205	14
在第8次給藥之前	315800	201572	16	11470	19344	9
在第10次給藥之前	750656	682110	16	5490	8143	7
在第12次給藥之前	1003450	868860	16	4048	6328	7
屍體剖檢(在最後一次給藥後24 hr)	880534	857199	8	36640	45439	7
恢復期中間	1270750	938646	8	53875	42430	4
恢復後屍體剖檢	953125	763122	8	39474	26274	7

表38(續)：血清及CSF抗rhASA抗體，雄性及雌性組合(ng/mL)

群組5：18.6 mg	血清抗rhASA抗體(ng/mL)			CSF抗rhASA抗體(ng/mL)		
	整個群組			整個群組		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
時間點	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
手術				0	0	13
在第2次給藥之前	0	0	16	0	0	15
在第4次給藥之前	48433	46054	16	55	146	13
在第6次給藥之前	252450	224723	16	821	2204	13
在第8次給藥之前	441119	310702	16	4757	7781	13
在第10次給藥之前	936813	849893	16	17822	24652	13
在第12次給藥之前	1380250	1331905	16	13531	20189	11
屍體剖檢(在最後一次給藥後24 hr)	286150	238760	8	8652	9129	8
恢復期中間	2492875	1686472	8	51346	36819	5
恢復後屍體剖檢	2005125	1347857	8	44258	31114	8

表39：屍體剖檢時抗RHASA抗體之存在率

群組	**血清抗體陽性動物 (陽性動物/總測試動物)**				**CSF抗體陽性動物 (陽性動物/總測試動物)**			
	M		F		M		F	
	6個月屍體剖檢	恢復後屍體剖檢	6個月屍體剖檢	恢復後屍體剖檢	6個月屍體剖檢	恢復後屍體剖檢	6個月屍體剖檢	恢復後屍體剖檢
1 (DC)	NA	0/4	NA	0/4	NA	0/4	NA	0/4
2 (媒劑)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/3	0/4	0/2	0/4
3 (1.8 mg IT)	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/3	3/4	4/4
4 (6.0 mg IT)	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/3	2/3	4/4
5 (18.6 mg IT)	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4	4/4	4/4

食蟹猴血清中rhASA之定量極限係39.1 ng/mL，且來自群組1及2

之所有血清試樣均低於定量極限(BQL)，見表33。在第2、4、6、8、10及12次給藥之前及第2、4、6、8、10及12次給藥後24小時(6個月屍體剖檢)、恢復期中間及恢復後屍體剖檢之前，測試rhASA之血清含量。在第2、4、6、8、10及12次給藥之前、第12次給藥之後、恢復期中間及恢復後屍體剖檢之前，在群組3(1.8 mg/劑量)、群組4(6.0 mg/劑量)及群組5(18.6 mg/劑量)中不能檢測到rhASA含量。在第2次給藥之後，血清中之rhASA含量與劑量相關。在第4次給藥(群組3)、第6次給藥(群組3及4)以及第8次及第10次給藥(群組3及4及群組5雄性)之後，不能檢測到rhASA含量。在第4次給藥之後在群組4(6.0 mg/劑量)中及在第4次及第6次給藥之後在群組5(18.6 mg/劑量)雄性動物中及在第4、6、8及10次給藥之後在群組5雌性動物中，rhASA之血清含量降低。此血清rhASA含量之明顯降低可能與抗rhASA抗體之濃度增加有關。在此研究中，考慮到試樣可變性及群組數量較小，rhASA之血清含量無明顯性別差異。

食蟹猴CSF中rhASA之定量極限係19.5 ng/mL，且來自群組1及2之所有CSF試樣均為BQL，見表34。在第2、4、6、8、10及12次給藥之前及第2、4、6、8、10及12次給藥之後(6個月屍體剖檢)在所有給藥群組之CSF中均可檢測到rhASA。在給藥後(在給藥後約24小時)含量較高，且與劑量相關。CSF中之含量遠遠高於血清中之含量。在此研究中，考慮到試樣可變性及群組數量較小，rhASA之CSF含量無明顯性別差異。在所有給藥群組中，在恢復期中間及恢復後屍體剖檢之前不能檢測到rhASA。對於rhASA治療群組，在第12次給藥(屍體剖檢)時採集物之CSF含量低於在第8及11次給藥之後的含量。屍體剖檢時rhASA含量較低之可能原因包括，相比於以存活期間(in-life)給藥間

隔取樣(在給藥之前或之後獲取最多0.5 mL用於測定rhASA濃度)，屍體剖檢時獲取之體積較大(總共約2.25 mL，用於細胞計數、化學、rhASA及抗rhASA抗體分析)。另外，一些動物在屍體剖檢時導管未開放，且經由CM分接頭(tap)而非經由導管來獲取試樣。與經由導管取樣相比，該途徑始終得到較低之rhASA濃度。此可能係由於首尾方向之CSF總體流動有限，已公認此現象在諸如猴子及人類等豎直站立動物中存在(例如，熟習此項技術者已熟知，CSF之組成成份在整個個體壽命期間呈現明顯首尾梯度)。

在某一時間點，在用rhASA治療之每一動物之血清中皆檢測到抗rhASA抗體，見表35。若抗rhASA抗體之含量高於定量極限(78.1 ng/mL)，則將動物界定為呈抗rhASA抗體陽性。在血清轉化後，動物仍然呈抗rhASA抗體陽性。在第2次給藥前之時間點，沒有動物呈抗rhASA抗體陽性。除編號為026之雄性動物(群組4；6.0 mg/劑量)外，所有rhASA動物在第4次給藥前之時間點均呈血清抗rhASA抗體陽性。編號為026之雄性動物在第6次給藥前之時間點呈血清抗體陽性。在群組5 (18.6 mg/kg)中，屍體剖檢抗體試樣具有較低之抗體含量。此明顯降低可能係由於存在干擾分析之rhASA所致。中等劑量及高劑量群組(6.0及18.6 mg/劑量)中之效價通常高於低劑量動物(1.8 mg/劑量)。存在抗rhASA抗體係使用重組人類蛋白質治療食蟹猴之預期結果[i]。考慮到結果之可變性，不存在明顯性別差異。

在CSF中可檢測到抗rhASA抗體之所有動物在血清中亦可檢測到rhASA抗體，但編號為049(群組3；1.8 mg/劑量)及057(群組4；6.0 mg/劑量)之雌性動物除外。抗體濃度及存在率之可變性使得不能測定劑量反應。若抗rhASA抗體之含量高於定量極限(78.1 ng/mL)，則將動

物界定為呈抗rhASA抗體陽性。

血清及CSF中rhASA及抗rhASA抗體含量之雄性及雌性組合值顯示於表36及表37中。組合雄性及雌性結果與上文討論之個別性別類似。

實例6-功效

在該實例中，將11只野生型對照(mASA +/+ hASA -/-)小鼠分配至群組A中且未接受治療。將三十四(34)只hASAC69S/ASA -/-小鼠分配至5個劑量群組中之每一群組中，且在第1、9、15/16及22天接受媒劑(群組B)或20 mg/kg(靜脈內[IV]；群組C)或0.04、0.12及0.21 mg(分別為群組D、E及F)劑量之rhASA(rhASA)。所有IV劑量均經由尾部靜脈投與。所有腦脊髓膜內(IT)劑量均以輸注形式以12 μL體積以2 μL/20秒之大致範圍投與(表40)。

表40：研究設計

群組	動物編號	動物類型	治療	劑量	途徑	總注射數	屠宰	以mg/kg腦重量計之劑量[a]
A	11	野生型對照(mASA +/+ hASA -/-)	無	NA	NA	NA	NA	NA
B	9	hASAC69S/ASA -/-	媒劑對照	媒劑	IT腰椎	4 (第1、9、15/16[b]及22天)	在第四次給藥後24小時	0
C	5		rhASA	20 mg/kg	IV(尾部靜脈)			NA
D	5		rhASA	0.04 mg	IT腰椎			100
E	5		rhASA	0.12 mg	IT腰椎			300
F	10		rhASA	0.21 mg	IT腰椎			520

NA=不適用；IT=腦脊髓膜內；IV=靜脈內。

[a] 小鼠之腦重量係約0.0004 kg。

[b] 群組C、D及E係在第15天給藥；群組B及E係在第16天給藥。

ASA基因敲除小鼠hASAC69S/ASA(-/-)係公認的MLD模型，且已用於測試適於該疾病之潛在治療。腦脊髓膜內途徑係人類之擬定投與途徑。已在MLD小鼠中針對該化合物及類似化合物對靜脈內投與途徑進行測試。增加靜脈內對照群組作為預期在周圍器官中出現之組織學變化之陽性對照。動物接受100、300或520 mg/kg腦重量(分別為0.04、0.12、0.21 mg)之rhASA。選擇用於該研究之正規化至腦重量之劑量量對應於計劃在人類中使用或已在毒理學研究中或在先前溶酶體貯積症功效模型中使用之劑量。預期該等劑量不會具有任何毒性。

接收

物種	小鼠(小家鼠(Mus musculus))
品系	hASAC69S/ASA (-/-)小鼠及野生型對照
年齡	到達時約14-17個月
群組數量	6
動物數量	34只ASA基因敲除小鼠+ 11只野生型對照

到達後，檢查每只動物以評估健康狀況。

圈養

將動物分群組圈養在帶有CareFresh紙墊料及水瓶之高溫聚碳酸酯濾蓋飼養籠中。每只籠子使用指明項目、群組及動物編號以及性別之籠卡清晰標記。使用打耳號系統(ear punch system)來唯一地標識每只動物。依照聯邦指南治療動物。

動物居室環境及光週期之目標條件如下：

溫度	22℃ ±3℃

濕度　　50%±20%

光照循環　　12小時光及12小時暗

在劑量投與期間及之後，可暫時中斷光週期以進行預定活動。業內認為該等中斷不影響此研究之結果或品質。

將獲得之所有野生型動物(11只)分配至群組A中，且編號為35至45。在適應環境期間，在將ASA (-/-) hASA (+/-)動物自籠子中取出時分配以連續編號(1至34)，稱重並打耳號。隨後在2011年1月3日使用Research Randomizer (www.randomizer.org)將動物分配至各治療群組中。將前9個編號分配至群組B，接下來的5個分配至群組C，接下來的5個分配至群組D，接下來的5個分配至群組E，且最後10個分配至群組F。如下表41來分配動物：

表41：動物分配

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

[a] 編號為19之動物在給藥時無法找到。

[b] 編號為3之動物在開始給藥之前死亡。

測試物質及媒劑

測試物質

身份　　rhASA

說明　　人類重組芳基硫酸酯酶A(rhASA)

儲存條件	約4℃
媒劑	
身份	rhASA媒劑(154 mM NaCl、0.005%聚山梨醇酯20，pH約為6.0)
儲存條件	約4℃

媒劑之製備

按提供狀態使用媒劑。在實驗台(bench top)上(環境溫度)使媒劑升溫。媒劑升溫後，藉由輕輕旋動及顛倒使物質混合。未使瓶子形成渦流或予以振盪。在獲取物質之前使瓶子乾燥。將任何剩餘媒劑放回到冰箱(1℃-8℃)中。

劑量調配物之製備

將rhASA用媒劑稀釋以達到需要的濃度。在實驗臺上(環境溫度)使測試物質升溫。測試物質升溫後，藉由輕輕旋動及顛倒使物質混合。未使瓶子形成渦流或予以振盪。

注射液示蹤染料：

使用紅外染料(例如IRDye®, LI-COR Biosciences, Lincoln, NE)來示蹤注射液。已在腦脊髓膜內注射中使用諸如該染料等染料作為腦脊髓膜內投與後之存活程序(survival procedure)。在投與之前將染料與測試物質混合；將1 μL 1奈莫耳染料添加至測試物質中。除紅外染料外，還使用1 μL FD&C藍色1號(0.25%)來示蹤注射液。該藍色染料係常見之食物添加劑，且通常認為安全無毒性。

rhASA或媒劑之腰骶部IT注射

群組B、D、E及F中之動物在第1、9、15或16及22天接受腦脊髓

膜內注射。

使用1.25% 2,2,2三溴乙醇(Avertin)以200-300 μL/10克體重(250-350 mg/kg)藉由腹膜內注射使成年小鼠麻醉。使用剪刀除去介於尾巴底部與肩胛骨之間的背部毛髮。依次利用帕維酮(povidine)/聚維酮碘(betadine)及異丙醇擦洗來清洗剃毛區域。在腰骶部脊柱上方切出中線皮膚小切口(1-2 cm)，並確定背部中線與回腸(複數形式ilea，單數形式ileum)翼狀物之頭側的交點。髂窩中之肌肉(臀中肌)係呈心臟形狀之肌肉。「心臟」頂部兩側接近回腸翼狀物之位置。插入附接至氣密性10-20 μL玻璃Hamilton注射器之32號針，直至感覺到來自下方骨骼之阻力。以約2 μL/20秒(12 μL/2分鐘)之速率注射10 μL測試物質、1 μL紅外染料及1 μL FD&C藍色1號(總注射體積為12 μL)。使用創傷夾來閉合皮膚切口。藉由成像以確定紅外染料以及可見藍色染料是否分佈遍及CNS來判斷注射是否成功。成像後，使動物在恢復室中恢復。

rhASA之靜脈內注射

群組C中之動物在第1、9、15及22天接受靜脈內注射。

IV注射時，使用異氟醚將動物麻醉(若需要)，並放置於保定器(restrainer)中。藉由用手指輕輕拍打尾部使其升溫來使尾部靜脈擴張。隨後使用70%乙醇擦拭注射位點。或者，將動物放置於暖室(40℃)中待1-1.5分鐘。使用28至30號針來注射測試物質。注射體積為5-10 mL/kg。

在第四次給藥後約24小時，將群組B-F中之動物無痛致死。如下文所詳述對動物實施不同的組織採集程序。群組A中之動物未進行治

療；然而，在2011年1月27日或28日將其無痛致死，並如下文所詳述實施組織採集程序。

血清(所有動物)

在異氟醚麻醉下經由眶後穿刺自所有動物(群組A-F)採集終末血液試樣(約0.5 mL)。將玻璃管放置於眼眶中，輕輕穿透眼後區域且由此破壞位於眼後之靜脈引流。藉由毛細管作用及/或重力流動來採集血液。採集血液後，向眼眶施壓以終止出血。

將全血試樣處理成血清並在低於-80℃下冷凍。將血清儲存於-80℃下並針對抗體進行分析。

用於光學顯微鏡檢查研究之組織(群組A-F；每個群組5只小鼠)

採集血液後，經由CO_2窒息將動物無痛致死。在灌注及冷凍之前，採集自尾巴剪下的片段(snip)以用於可能的基因分型。暴露圍心腔。用冰冷冷藏之肝素化鹽水溶液(1 U/mL肝素鈉存於0.9% NaCl中，無菌過濾)且隨後用約4℃之4%低聚甲醛穿心灌注每個群組之三隻(3)小鼠。取出腦，並將腹部切開以進一步暴露內臟。除自尾巴剪下的片段予以冷凍外，將腦及屠體放置於低聚甲醛中。

用於脂質分析之組織(群組A、B及F；分別為6只、4只及5只動物)

採集血液後，經由CO_2窒息將動物無痛致死。在灌注及冷凍之前，採集自尾巴剪下的片段以用於可能的基因分型。暴露圍心腔。脂質分析時，用冰冷冷藏之肝素化鹽水溶液(1 U/mL肝素鈉存於0.9% NaCl中，無菌過濾)穿心灌注每個群組之4至6只小鼠。採集用於脂質分析之實例性組織顯示於表42中。

表42：採集用於脂質分析之組織

採集用於脂質分析之組織	
腦(分離左半球及右半球並稱重)	腎(2)
脊髓(自脊柱取出)	
坐骨神經(2)(剖離肌肉)	自尾巴剪下的片段(在灌注之前)

採集後，將組織稱重並隨後冷凍(在乾冰上或藉由放置於-80℃冷凍器中)。將腦分成左半球及右半球。右半球用於藉由MS實施脂質分析。對左半球進行可能的N-乙醯基-L-天冬胺酸鹽(NAA)分析。將組織儲存於-80℃下直至分析(見表43)。

表43：試樣儲存條件

試樣類型	儲存溫度
血清	在約-80℃下冷凍
用於脂質分析之組織	在約-80℃下冷凍
自尾巴剪下的片段	在約-80℃下冷凍
用於光學顯微鏡檢查之組織	約4℃

rhASA減少MLD小鼠脊髓(尤其在白質中)中之髓硫酯貯積，圖19。脊髓之形態測定法分析顯示，艾爾遜藍染色之光學密度在給予rhASA後在統計學上顯著降低，圖20。經rhASA治療之MLD小鼠亦在腦中呈現降低之溶酶體活性，圖21。與媒劑治療動物相比，此降低在高劑量群組(0.21 mg-520 mg/kg腦重量)中在統計學上顯著，圖22。

大於1週歲之免疫耐受性MLD小鼠(hASAC69S/ASA(-/-))接受rhASA之腦脊髓膜內-腰椎投與，每週一次，持續4週(總共給藥4次)。劑量係媒劑(154 mM NaCl、0.005%聚山梨醇酯20，pH約為6.0)、0.04、0.12、0.21 mg/劑量(正規化劑量分別為100、300及520 mg/kg腦重量)。在終末時間點，藉由對腦及脊髓內之髓硫酯清除率以及溶酶體活性實施免疫組織化學評估來評價功效。使用靶向組織中之髓硫酯

的艾爾遜藍染色劑對脊髓及腦切片進行染色。亦對腦切片進行染色以分析溶酶體相關膜蛋白(LAMP)之存在，該蛋白質係溶酶體過程之指示劑。另外，對脊髓(頸部、胸部及腰部)及腦之艾爾遜藍及LAMP染色切片實施形態測定法分析。

該等初步結果證實rhASA之腦脊髓膜內腰椎投與的功效。與媒劑對照小鼠相比，rhASA治療之MLD小鼠呈現疾病組織學標記改良之證據，例如腦中之髓硫酯貯積減少(藉由艾爾遜藍染色觀察到)以及溶酶體活性降低。在投與位點(脊髓)附近以及在腦之遠端部分中觀察到該等組織病理學變化。

實例7-生物分佈2

概述

在該研究中，將36只雄性及36只雌性幼年食蟹猴(開始時小於12個月)分配至5個劑量群組中之每一群組中，並每隔一週以0(裝置對照；給予動物0.6 mL PBS)、0(媒劑對照)、1.8、6.0或18.6 mg(分別為群組1、2、3、4及5)劑量接受rhASA，持續6個月，總共給藥12次。所有劑量均以輸注形式以0.6 mL體積投與，隨後經約10分鐘用0.5 mL PBS沖洗(表44)。

表44：研究設計

研究設計					
群組	動物編號	標稱劑量濃度(mg/mL)	所投與濃度(mg)	動物編號，6個月後屠宰	動物編號，1個月恢復後屠宰
1	4M, 4F	DC	0	-	4M, 4F
2	8M, 8F	0	0	4 M, 3 F[a]	4M, 4F
3	8M, 8F	3	1.8	4 M, 4 F	4M, 4F
4	8M, 8F	10	6.0	4 M, 4 F	4M, 4F
5	8M, 8F	31	18.6	4 M, 4 F	4M, 4F

DC=裝置對照；群組1中之動物未給予媒劑或測試物質。

[a] 編號為044之媒劑對照動物由於導管洩漏而在第50天提前屠宰。

材料及方法

組織採集

在腦模具中將腦切成3 mm厚度之冠狀薄片。將各腦切成全冠狀薄片，包括：新皮質(包括額葉皮質、頂葉皮質、顳葉皮質及枕葉皮質)；舊皮質(嗅球及/或梨狀葉)；基底神經節(包括尾狀核及豆狀核殼)；邊緣系統(包括海馬及扣帶回)；丘腦/下丘腦、中腦區(包括黑質)；小腦、腦橋及延髓。獲得各組織試樣(經由4 mm活檢鑽孔器)之位置顯示於圖32-37中。圖32-37中之影像係自University of Wisconsin and Michigan State Comparative Mammalian Brain Collections(亦稱為National Museum of Health and Medicine)獲得。鑽孔編號22未採集，因為該結構在屍體剖檢期間不存在。在利用酵素連結免疫吸附分析實施rhASA分析之前，將所有腦試樣冷凍並儲存於-60℃或更低溫度下。

將第一腦薄片及之後每隔一個薄片固定於福馬林中以用於組織病理學評價及免疫組織化學分析。將第二腦薄片及之後每隔一個薄片冷凍以用於測試物質濃度分析。在冷凍之前，自偶數編號之測試物質分析腦薄片之右側部分取腦試樣以用於生物分佈分析。屍體剖檢時對腦試樣之位置拍照，並記錄腦薄片編號。使用4 mm圓形鑽孔器或解剖刀切割來獲得該等試樣以使所採集白質的量最佳化。將所有鑽孔冷凍並儲存於-60℃或更低溫度下以用於測試物質分析。將其餘腦薄片冷凍並儲存於-60℃或更低溫度下以用於可能的測試物質分析。鑽孔位置顯示於附錄B中。

將脊髓(頸部、胸部及腰部)切成1釐米切片。將第一薄片及此後每隔一個薄片固定於福馬林中以用於組織病理學及免疫組織化學分析。將第二脊髓薄片及之後每隔一個薄片冷凍並儲存於-60℃或更低溫度下以用於測試物質分析。調整薄片之分佈以將含有腦脊髓膜內導管之尖端之薄片(薄片0)固定在福馬林中並進行組織病理學分析。

腦、肝及脊髓提取物之製備以及rhASA濃度之測定

腦鑽孔、脊髓及肝試樣係利用符合美國食品與藥品管理局(FDA)良好實驗室規範(Good Laboratory Practice) (GLP)條例21 CFR(第58部分)及適用的中西部生物研究標準操作程序之經驗證方法來進行分析。將組織試樣在裂解緩衝劑中均質化，離心以除去任何組織碎片，並儲存於-80℃下直至進行分析。勻漿之可溶性部分中的rhASA濃度係使用多株兔抗體SH040作為俘獲抗體且使用結合HRP(辣根過氧化物酶)之抗ASA單株抗體19-16-3作為檢測抗體藉由ELISA來測定。在洗滌步驟除去未結合之物質後，四甲基聯苯胺(TMB)受質溶液在結合HRP之抗體存在下與過氧化物反應而產生比色信號，該比色信號與初始步驟中與抗ASA抗體結合之ASA的量成比例。自標準曲線內推各組織勻漿中所得rhASA的量。

亦藉由二喹啉甲酸(BCA)蛋白質測定分析來分析試樣以獲得蛋白質在未知試樣中之濃度。各試樣之蛋白質濃度係藉由內推白蛋白標準曲線來測定。隨後將rhASA濃度結果正規化成組織提取物中之總蛋白質，如藉由二喹啉甲酸分析所測定。

對於媒劑、1.8 mg/劑量、6.0 mg/劑量及18.6 mg/劑量群組而言，所有鑽孔之ASA含量分別顯示於圖23、圖24、圖25及圖26中。對於裝

置對照、媒劑、1.8 mg/劑量、6.0 mg/劑量及18.6 mg/劑量群組而言，恢復後動物之所有鑽孔之ASA含量分別顯示於圖27、圖28、圖29、圖30及圖31中。

在腦表面(腦脊髓膜)附近獲得之所選鑽孔之ASA含量顯示於圖32中。認為含有最深層腦白質之所選鑽孔之ASA含量顯示於圖33中。白質係由有髓鞘神經細胞突起(或軸突)之纖維束構成。大部分物質來自深層腦灰質之所選鑽孔顯示於圖34中。與白質相比，灰質含有神經細胞體。對於各劑量群組，來自表面、深層白質及深層灰質之所選鑽孔之ASA值顯示於圖35中。

脊髓濃度數據顯示於圖36中。

肝濃度數據顯示於圖37中。

在一些情形下，裝置對照群組及給予媒劑之對照群組之肝、脊髓及腦中之ASA濃度含量可以量測。肝及脊髓中之含量低於任一rhASA治療群組(圖23、圖32及圖33)。在裝置對照及給予媒劑之動物中量測之rhASA含量體現用於ELISA之抗rhASA抗體與天然食蟹猴蛋白質間之交叉反應性。裝置對照及媒劑組織中之報告值不代表組織中食蟹猴rhASA之定量值，此乃因抗體與食蟹猴ASA間之交叉反應性程度未知以及分析標準物使用rhASA之事實。然而，不期望受限於任何理論，不同組織及解剖學區域中食蟹猴ASA之相對量顯示的可變性可以解釋裝置對照與給予媒劑之組織中檢測到之ASA含量的變化。

對於1.8、6.0及18.6 mg/劑量群組，脊髓薄片中之ASA含量分別介於160-2352、1081-6607及1893-9252 ng/mg蛋白質(雄性)以及0-3151、669-6637及1404-16424 ng/mg蛋白質(雌性)範圍內(圖32)。腰區

脊柱中之ASA含量高於頸區。在rhASA治療群組中，在肝中檢測到之ASA蛋白質的含量具有劑量反應性，且在媒劑群組中此含量非常低。對於1.8、6.0及18.6 mg/劑量群組，平均ASA含量分別為88、674及2424(雄性)以及140、462及1996 ng/mg蛋白質(雌性)(圖33)。

總之，在自給予rhASA之群組之脊髓薄片及肝製備的試樣中，ASA含量似乎與劑量相關。所測試多個腦區展示ASA含量與rhASA投與之間有明確的劑量關係，而其他腦區較不確定。通常，腦中之ASA含量隨rhASA劑量增加而增加。

實例8：藥物代謝動力學及生物分佈研究

本研究之目的係評價在腦脊髓膜內(IT)及靜脈內(IV)投與至食蟹猴後，各種治療性替代酵素之藥物代謝動力學(PK)及生物分佈。

在該研究中，將帶有開放腦脊髓膜內-腰椎(IT-L)導管及腦脊髓膜內-小腦延髓池(IT-CM)導管之總共12只雄性及12只雌性食蟹猴按體重隨機分配至四個治療群組中以用於1a期(I2S投與)及1b期(ASA投與)研究。

對於該兩期研究，在給藥後以指定間隔採集血液及CSF(自IT-CM導管採集)。在自1a期採集最後試樣後，在開始1b期之前允許動物有7天的清除期。

在自1b期採集最後試樣後，在開始2期之前允許動物有7天的清除期。將來自1b期之總共12只雄性及12只雌性食蟹猴按體重隨機分配至12個治療群組中：I2S(群組1a-6a)及ASA(群組1b-6b)。

在IT-L投與後，血清中ASA之絕對生物利用度為約30-40%。相比之下，在CSF中僅0.5%之IV劑量可被生物利用。

在IT-L投與後，血清中ASA之暴露量以超比例方式增加。

在IT-L投與後，CSF中ASA之暴露量以低於比例之方式隨劑量增加而增加。對血清中rhASA之PK參數、血清及CSF中rhASA之PK參數以及生物利用度之概述顯示於表45-47中。

表45-食蟹猴血清中ASA之PK參數的概述

平均值（CV%）	血清芳基硫酸酯酶A			
	芳基硫酸酯酶A (1B期：IV 1 MG/KG)	芳基硫酸酯酶A (1B期：IT-L 1.8 MG)	芳基硫酸酯酶A (1B期：IT-L 6 MG)	芳基硫酸酯酶A (1B期：IT-L 18.6 MG)
N	8	6	8	8
AUC0-T (NG•H/ML)	10505 (16.9)	2219 (41.9)	10352 (31.9)	17583 (28.2)
AUC0-∞ (NG•H/ML)	11069 (17.2)	NC (NC)B	9634 (28.9)C	20789 (27.8)D
CMAX (NG/ML)	11911 (20.0)	363 (40.4)	1160 (29.9)	1621 (25.1)
TMAXA (H)	0.08 (0.08, 0.08)	4.00 (2.00, 4.00)	4.00 (1.00, 4.00)	3.00 (1.00, 4.00)
T1/2 (H)	6.55 (31.8)	NC (NC)B	6.77 (21.4)C	7.40 (32.8)D
CL或CL/F (ML/H)	261 (17.0)	NC (NC)B	654 (25.0)C	944 (25.4)D
VZ或VZ/F (ML)	2418 (32.4)	NC (NC)B	6523 (41.3)C	9686 (25.8)D

表46-食蟹猴CSF中ASA之PK參數的概述

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

表47-血清及CSF中ASA之生物利用度

	絕對生物利用度比較		
	芳基硫酸酯酶A (1B期：IT-L 1.8 mg)	**芳基硫酸酯酶A (1B期：IT-L 6 mg)**	**芳基硫酸酯酶A (1B期：IT-L 18.6 mg)**
Fab (%)	NC	39.9	27.3

在IT-L投與後，血清中ASA之生物利用度為約30-40%。相比之下，在CSF中僅0.5%的藉由IV途徑投與之劑量可被生物利用。CSF:血清分配比例顯示於表48中。

表48-CSF:血清分配比例

CSF：血漿分配比例			
芳基硫酸酯酶A (1B期：IV 1 MG/KG)	**芳基硫酸酯酶A (1B期:IT-L 1.8 MG)**	**芳基硫酸酯酶A (1B期：IT-L 6 MG)**	**芳基硫酸酯酶A (1B期:IT-L 18.6 MG)**
0.74	**NC**	**445**	**452**

實例9-MLD患者之治療

可利用通過(例如)IT遞送直接CNS投與來有效地治療MLD患者。此實例闡釋多中心劑量遞增研究，其經設計以評價每隔一週(EOW)總共持續40週經由腦脊髓膜內藥物遞送裝置(IDDD)向遲發性幼兒型MLD患者投與多達3種劑量量之rhASA的安全性。各種適於人類治療之實例性腦脊髓膜內藥物遞送裝置繪示於圖45-48中。

將招收至多20名患者：

隊列1：5名患者(最低劑量)

隊列2：5名患者(中等劑量)

隊列3：5名患者(最高劑量)

隨機選取5名患者不作治療。

基於以下入選標準來選擇用於該研究之患者：(1)在30月齡之前出現首發症狀；(2)篩選時能走動(界定為能夠獨自站起來及在一隻手有支撐的情況下向前走10步)；(3)篩選時存在神經病學體徵。通常，具有造血幹細胞移植史之患者不包括在內。

在患有遲發性幼兒型MLD之兒童中測定藉由IT注射投與遞增劑量之rhASA達40週之安全性。另外，評估rhASA對大肌肉運動功能之臨床活性、及單次及重複劑量在血清及腦脊髓液(CSF)中之藥物代謝動力學及濃度。

儘管已根據某些實施例詳細闡述了本文所述之某些化合物、組合物及方法，但以下實例僅用於闡釋本發明化合物且不意欲對其進行限制。

除非明確指示相反含義，否則本文在說明書及申請專利範圍中所用冠詞「一(a及an)」應理解為包括複數性含義。除非上下文中明確表示相反或其他含義，否則若一個、一個以上、或所有群組成員皆存在於、用於或相關於給定產物或過程，則可認為在群組之一或多個成員之間包括「或」之技術方案或說明滿足此條件。本發明包括其中恰好只有一個群組成員存在於、用於給定產物或過程或與給定產物或過程相關的實施例。本發明亦包括其中一個以上或所有的群組成員皆存在於、用於給定產物或過程或與給定產物或過程相關的實施例。此外，應瞭解，除非另有說明或除非對熟習此項技術者而言矛盾或不一致係顯而易見的，否則本發明涵蓋其中將一或多項所列技術方案之一或多種限制、要素、條款、說明性術語等引入附屬於相同基礎技術方案(或任一其他相關技術方案)之另一技術方案中的所有變化、組合及

置換。如果以列表形式(例如，以馬庫西群組或類似格式)給出要素，則應瞭解，本發明亦揭示每個要素亞組並且可自該群組中移除任何要素。應瞭解，通常，如果稱本發明或本發明之態樣包含特定要素、特徵等，則本發明之某些實施例或本發明之態樣由該等要素、特徵等組成或主要由其組成。為簡潔起見，在本文中未以過多語言具體陳述該等實施例之每一情形。亦應瞭解，可自申請專利範圍中明確排除本發明之任一實施例或態樣，不管在說明書中是否敍述該明確排除。在本文中提及以闡述本發明之背景及提供關於本發明實施之額外細節的出版物、網站及其他參考材料以引用方式併入本文中。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 美商舒爾人類基因療法公司

<120> 於腦脊髓膜內遞送芳基硫酸酯酶 A 之方法及組合物

<130> 2006685-0026

<140> 100122533
<141> 2011-06-27

<150> 61/358,857
<151> 2010-06-25

<150> 61/360,786
<151> 2010-07-01

<150> 61/387,862
<151> 2010-09-29

<150> 61/435,710
<151> 2011-01-24

<150> 61/442,115
<151> 2011-02-11

<150> 61/476,210
<151> 2011-04-15

<150> 61/495,268
<151> 2011-06-09

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 489
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

Arg Pro Pro Asn Ile Val Leu Ile Phe Ala Asp Asp Leu Gly Tyr Gly
1 5 10 15

Asp Leu Gly Cys Tyr Gly His Pro Ser Ser Thr Thr Pro Asn Leu Asp
20 25 30

Gln Leu Ala Ala Gly Gly Leu Arg Phe Thr Asp Phe Tyr Val Pro Val
35 40 45

Ser Leu Cys Thr Pro Ser Arg Ala Ala Leu Leu Thr Gly Arg Leu Pro
50 55 60

Val Arg Met Gly Met Tyr Pro Gly Val Leu Val Pro Ser Ser Arg Gly
65 70 75 80

Gly Leu Pro Leu Glu Glu Val Thr Val Ala Glu Val Leu Ala Ala Arg
85 90 95

Gly Tyr Leu Thr Gly Met Ala Gly Lys Trp His Leu Gly Val Gly Pro
100 105 110

Glu Gly Ala Phe Leu Pro Pro His Gln Gly Phe His Arg Phe Leu Gly
115 120 125

Ile Pro Tyr Ser His Asp Gln Gly Pro Cys Gln Asn Leu Thr Cys Phe
130 135 140

Pro Pro Ala Thr Pro Cys Asp Gly Gly Cys Asp Gln Gly Leu Val Pro
145 150 155 160

Ile Pro Leu Leu Ala Asn Leu Ser Val Glu Ala Gln Pro Pro Trp Leu
165 170 175

Pro Gly Leu Glu Ala Arg Tyr Met Ala Phe Ala His Asp Leu Met Ala
180 185 190

Asp Ala Gln Arg Gln Asp Arg Pro Phe Phe Leu Tyr Tyr Ala Ser His
195 200 205

His Thr His Tyr Pro Gln Phe Ser Gly Gln Ser Phe Ala Glu Arg Ser
210 215 220

Gly Arg Gly Pro Phe Gly Asp Ser Leu Met Glu Leu Asp Ala Ala Val
225 230 235 240

Gly Thr Leu Met Thr Ala Ile Gly Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Thr
245 250 255

Leu Val Ile Phe Thr Ala Asp Asn Gly Pro Glu Thr Met Arg Met Ser
260 265 270

Arg Gly Gly Cys Ser Gly Leu Leu Arg Cys Gly Lys Gly Thr Thr Tyr
275 280 285

Glu Gly Gly Val Arg Glu Pro Ala Leu Ala Phe Trp Pro Gly His Ile
290 295 300

Ala Pro Gly Val Thr His Glu Leu Ala Ser Ser Leu Asp Leu Leu Pro
305 310 315 320

Thr Leu Ala Ala Leu Ala Gly Ala Pro Leu Pro Asn Val Thr Leu Asp
325 330 335

Gly Phe Asp Leu Ser Pro Leu Leu Leu Gly Thr Gly Lys Ser Pro Arg
340 345 350

Gln Ser Leu Phe Phe Tyr Pro Ser Tyr Pro Asp Glu Val Arg Gly Val
355 360 365

Phe Ala Val Arg Thr Gly Lys Tyr Lys Ala His Phe Phe Thr Gln Gly
370 375 380

Ser Ala His Ser Asp Thr Thr Ala Asp Pro Ala Cys His Ala Ser Ser
385 390 395 400

Ser Leu Thr Ala His Glu Pro Pro Leu Leu Tyr Asp Leu Ser Lys Asp
405 410 415

Pro Gly Glu Asn Tyr Asn Leu Leu Gly Gly Val Ala Gly Ala Thr Pro
420 425 430

Glu Val Leu Gln Ala Leu Lys Gln Leu Gln Leu Leu Lys Ala Gln Leu
435 440 445

Asp Ala Ala Val Thr Phe Gly Pro Ser Gln Val Ala Arg Gly Glu Asp

450 455 460

Pro Ala Leu Gln Ile Cys Cys His Pro Gly Cys Thr Pro Arg Pro Ala
465 470 475 480

Cys Cys His Cys Pro Asp Pro His Ala
485

<210> 2
<211> 507
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Met Gly Ala Pro Arg Ser Leu Leu Leu Ala Leu Ala Ala Gly Leu Ala
1 5 10 15

Val Ala Arg Pro Pro Asn Ile Val Leu Ile Phe Ala Asp Asp Leu Gly
20 25 30

Tyr Gly Asp Leu Gly Cys Tyr Gly His Pro Ser Ser Thr Thr Pro Asn
35 40 45

Leu Asp Gln Leu Ala Ala Gly Gly Leu Arg Phe Thr Asp Phe Tyr Val
50 55 60

Pro Val Ser Leu Cys Thr Pro Ser Arg Ala Ala Leu Leu Thr Gly Arg
65 70 75 80

Leu Pro Val Arg Met Gly Met Tyr Pro Gly Val Leu Val Pro Ser Ser
85 90 95

Arg Gly Gly Leu Pro Leu Glu Glu Val Thr Val Ala Glu Val Leu Ala
100 105 110

Ala Arg Gly Tyr Leu Thr Gly Met Ala Gly Lys Trp His Leu Gly Val
115 120 125

Gly Pro Glu Gly Ala Phe Leu Pro Pro His Gln Gly Phe His Arg Phe
130 135 140

Leu Gly Ile Pro Tyr Ser His Asp Gln Gly Pro Cys Gln Asn Leu Thr
145 150 155 160

Cys Phe Pro Pro Ala Thr Pro Cys Asp Gly Gly Cys Asp Gln Gly Leu
165 170 175

Val Pro Ile Pro Leu Leu Ala Asn Leu Ser Val Glu Ala Gln Pro Pro
180 185 190

Trp Leu Pro Gly Leu Glu Ala Arg Tyr Met Ala Phe Ala His Asp Leu
195 200 205

Met Ala Asp Ala Gln Arg Gln Asp Arg Pro Phe Phe Leu Tyr Tyr Ala
210 215 220

Ser His His Thr His Tyr Pro Gln Phe Ser Gly Gln Ser Phe Ala Glu
225 230 235 240

Arg Ser Gly Arg Gly Pro Phe Gly Asp Ser Leu Met Glu Leu Asp Ala
245 250 255

Ala Val Gly Thr Leu Met Thr Ala Ile Gly Asp Leu Gly Leu Leu Glu
260 265 270

Glu Thr Leu Val Ile Phe Thr Ala Asp Asn Gly Pro Glu Thr Met Arg
275 280 285

Met Ser Arg Gly Gly Cys Ser Gly Leu Leu Arg Cys Gly Lys Gly Thr
290 295 300

Thr Tyr Glu Gly Gly Val Arg Glu Pro Ala Leu Ala Phe Trp Pro Gly
305 310 315 320

His Ile Ala Pro Gly Val Thr His Glu Leu Ala Ser Ser Leu Asp Leu
325 330 335

Leu Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Gly Ala Pro Leu Pro Asn Val Thr
340 345 350

Leu Asp Gly Phe Asp Leu Ser Pro Leu Leu Leu Gly Thr Gly Lys Ser
355 360 365

Pro Arg Gln Ser Leu Phe Phe Tyr Pro Ser Tyr Pro Asp Glu Val Arg
370 375 380

Gly Val Phe Ala Val Arg Thr Gly Lys Tyr Lys Ala His Phe Phe Thr
385 390 395 400

Gln Gly Ser Ala His Ser Asp Thr Thr Ala Asp Pro Ala Cys His Ala
405 410 415

Ser Ser Ser Leu Thr Ala His Glu Pro Pro Leu Leu Tyr Asp Leu Ser
420 425 430

Lys Asp Pro Gly Glu Asn Tyr Asn Leu Leu Gly Gly Val Ala Gly Ala
435 440 445

Thr Pro Glu Val Leu Gln Ala Leu Lys Gln Leu Gln Leu Leu Lys Ala
450 455 460

Gln Leu Asp Ala Ala Val Thr Phe Gly Pro Ser Gln Val Ala Arg Gly
465 470 475 480

Glu Asp Pro Ala Leu Gln Ile Cys Cys His Pro Gly Cys Thr Pro Arg
485 490 495

Pro Ala Cys Cys His Cys Pro Asp Pro His Ala
500 505

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種穩定調配物之用途，其係用於製備治療異染性腦白質營養不良(MLD)病之藥物，其中藥物係用於大腦室內(ICV)投與至需治療之個體，且其中該調配物包含：

濃度為或大於約5 mg/ml之芳基硫酸酯酶A(ASA)蛋白質，且其中該調配物包含不大於50 mM之磷酸鹽。

【第2項】

如請求項1之用途，其中該調配物進一步包含鹽及/或聚山梨醇酯表面活性劑。

【第3項】

如請求項1或2之用途，其中該調配物之大腦室內(ICV)投與不會在該個體中引起實質不良效應。

【第4項】

如請求項1或2之用途，其中該調配物之大腦室內(ICV)投與不會在該個體中引起實質適應性T細胞介導之免疫反應。

【第5項】

如請求項1或2之用途，其中該調配物之大腦室內(ICV)投與使得該ASA蛋白質遞送至一或多個腦組織。

【第6項】

如請求項5之用途，其中該ASA蛋白質係被遞送至深層腦白質之少突膠質細胞中。

【第7項】

如請求項5之用途，其中ASA蛋白質係被遞送至神經元、神經膠

質細胞、腦脊髓膜巨噬細胞及/或血管周巨噬細胞。

【第8項】

如請求項5之用途，其中該ASA蛋白質係被進一步遞送至脊髓內之神經元。

【第9項】

如請求項1或2之用途，其中該調配物之大腦室內(ICV)投與進一步使得該ASA蛋白質全身遞送至周圍目標組織。

【第10項】

如請求項9之用途，其中該周圍目標組織係選自肝、腎及/或心臟。

【第11項】

如請求項1或2之用途，其中該調配物之腦脊髓膜內投與導致腦目標組織、脊髓神經元及/或周圍目標組織中的溶酶體定位。

【第12項】

如請求項11之用途，其中該調配物之大腦室內(ICV)投與導致髓硫酯積聚與對照組相比減少至少20%。

【第13項】

如請求項1或2之用途，其中該調配物之大腦室內(ICV)投與導致CNS及PNS內的進行性脫髓鞘及軸突損失減少。

【第14項】

如請求項1或2之用途，其中該調配物之大腦室內(ICV)投與使得該腦目標組織、脊髓神經元及/或周圍目標組織中之ASA酵素活性增強。

【第15項】

如請求項14之用途，其中該ASA酵素活性與對照組相比增強至少1倍。

【第16項】

如請求項14之用途，其中該增強之ASA酵素活性係至少約10 nmol/hr/mg。

【第17項】

如請求項14之用途，其中腰區中之ASA酵素活性增強。

【第18項】

如請求項17之用途，其中該腰區中增強之ASA酵素活性係至少約2000 nmol/hr/mg。

【第19項】

如請求項1或2之用途，其中該調配物之大腦室內(ICV)投與使得該MLD病之至少一種症狀或特徵之強度、嚴重程度或頻率降低，或發作延遲。

【第20項】

如請求項19之用途，其中該MLD病之至少一種症狀或特徵係顱內壓升高、腦外積水、中樞及周圍神經系統中之髓鞘以及內臟器官中之硫酸化糖脂積聚、CNS及PNS內進行性脫髓鞘及軸突損失、及/或運動及認知功能障礙。

【第21項】

如請求項1或2之用途，其中該大腦室內(ICV)投與係與靜脈內投與合併使用。

【第22項】

如請求項21之用途，其中該靜脈內投與頻率係不多於每月一次。

【第23項】

如請求項1或2之用途，其中該大腦室內(ICV)投與係在沒有靜脈內投與的存在下使用。

【第24項】

如請求項1或2之用途，其中該大腦室內(ICV)投與每兩週一次、每月一次或每兩個月一次進行。

【第25項】

如請求項1或2之用途，其中該大腦室內(ICV)投與係在沒有並行的免疫抑制治療的存在下使用。

【第26項】

如請求項1或2之用途，其中該ASA蛋白質係以約5至100 mg/ml範圍之濃度存在。

【第27項】

如請求項26之用途，其中該ASA蛋白質係以約5至50 mg/m之濃度存在。

【第28項】

如請求項26之用途，其中該ASA蛋白質係以30 mg/ml之濃度存在。

【第29項】

如請求項1或2之用途，其中該ASA蛋白質包含胺基酸序列SEQ ID NO:1。

【第30項】

如請求項2之用途，其中該鹽係約0-300 mM範圍濃度之NaCl。

【第31項】

如請求項30之用途，其中該NaCl係以約137 mM至154 mM範圍之濃度存在。

【第32項】

如請求項30之用途，其中該NaCl係以約154 mM之濃度存在。

【第33項】

如請求項2之用途，其中該聚山梨醇酯表面活性劑選自由以下組成之群：聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯80及其組合。

【第34項】

如請求項2之用途，其中該聚山梨醇酯表面活性劑係聚山梨醇酯20且係以約0至0.2%範圍之濃度存在。

【第35項】

如請求項2之用途，其中該聚山梨醇酯20係以約0.005%之濃度存在。

【第36項】

如請求項1之用途，其中該穩定調配物包含不大於20 mM濃度之磷酸鹽。

【第37項】

如請求項1或2之用途，其中該調配物具有約3至8.0之pH。

【第38項】

如請求項1或2之用途，其中該調配物係：

(i)液體調配物，或

(ii)被調配成凍乾粉末。

【第39項】

如請求項1或2之用途，其中該調配物包含聚山梨醇酯表面活性劑且進一步包含穩定劑。

【第40項】

如請求項39之用途，其中該穩定劑係選自由蔗糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、PEG 4000、組胺酸、精胺酸、離胺酸、磷脂質及其組合組成之群。

【第41項】

一種用於大腦室內(ICV)投與之穩定調配物，其包含大於約5 mg/ml濃度之芳基硫酸酯酶A(ASA)蛋白質，及其中該調配物包含不大於50 mM之磷酸鹽。

【第42項】

如請求項41之穩定調配物，其中該ASA蛋白質包含胺基酸序列SEQ ID NO:1。

【第43項】

如請求項41或42之穩定調配物，其中該調配物進一步包含鹽。

【第44項】

如請求項43之穩定調配物，其中該鹽係約0-300 mM範圍濃度之NaCl。

【第45項】

如請求項44之穩定調配物，其中該NaCl係以約137 mM至154 mM範圍之濃度存在。

【第46項】

如請求項44之穩定調配物，其中該NaCl係以約154 mM之濃度存在。

【第47項】

如請求項41或42之穩定調配物，其中該調配物進一步包含聚山梨醇酯表面活性劑。

【第48項】

如請求項47之穩定調配物，其中該聚山梨醇酯表面活性劑選自由以下組成之群：聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯80及其組合。

【第49項】

如請求項48之穩定調配物，其中該聚山梨醇酯表面活性劑係聚山梨醇酯20且係以約0至0.2%範圍之濃度存在。

【第50項】

如請求項48之穩定調配物，其中該聚山梨醇酯20係以約0.005%之濃度存在。

【第51項】

如請求項41或42之穩定調配物，其中該穩定調配物包含不大於20 mM濃度之磷酸鹽。

【第52項】

如請求項41或42之穩定調配物，其中該調配物具有約3至8.0之pH。

【第53項】

如請求項41或42之穩定調配物，其中該調配物係：

(i)液體調配物，或

(ii)被調配成凍乾粉末。

【第54項】

如請求項41或42之穩定調配物，其中該調配物包含聚山梨醇酯表面活性劑且進一步包含穩定劑。

【第55項】

如請求項54之穩定調配物，其中該穩定劑係選自由蔗糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、PEG 4000、組胺酸、精胺酸、離胺酸、磷脂質及其組合組成之群。

【第56項】

一種容器，其包含如請求項41至55中任一項之穩定調配物之單一劑型。

【第57項】

如請求項56之容器，其中該容器係選自安瓿、小瓶、筒、貯器、乾燥冷凍注射器(lyo-ject)或預填充注射器。

【第58項】

如請求項56之容器，其中該容器係預填充注射器。

【第59項】

如請求項58之容器，其中該預填充注射器係選自有烤聚矽氧塗層之硼矽酸鹽玻璃注射器、有噴塗聚矽氧之硼矽酸鹽玻璃注射器，或無聚矽氧之塑膠樹脂注射器。

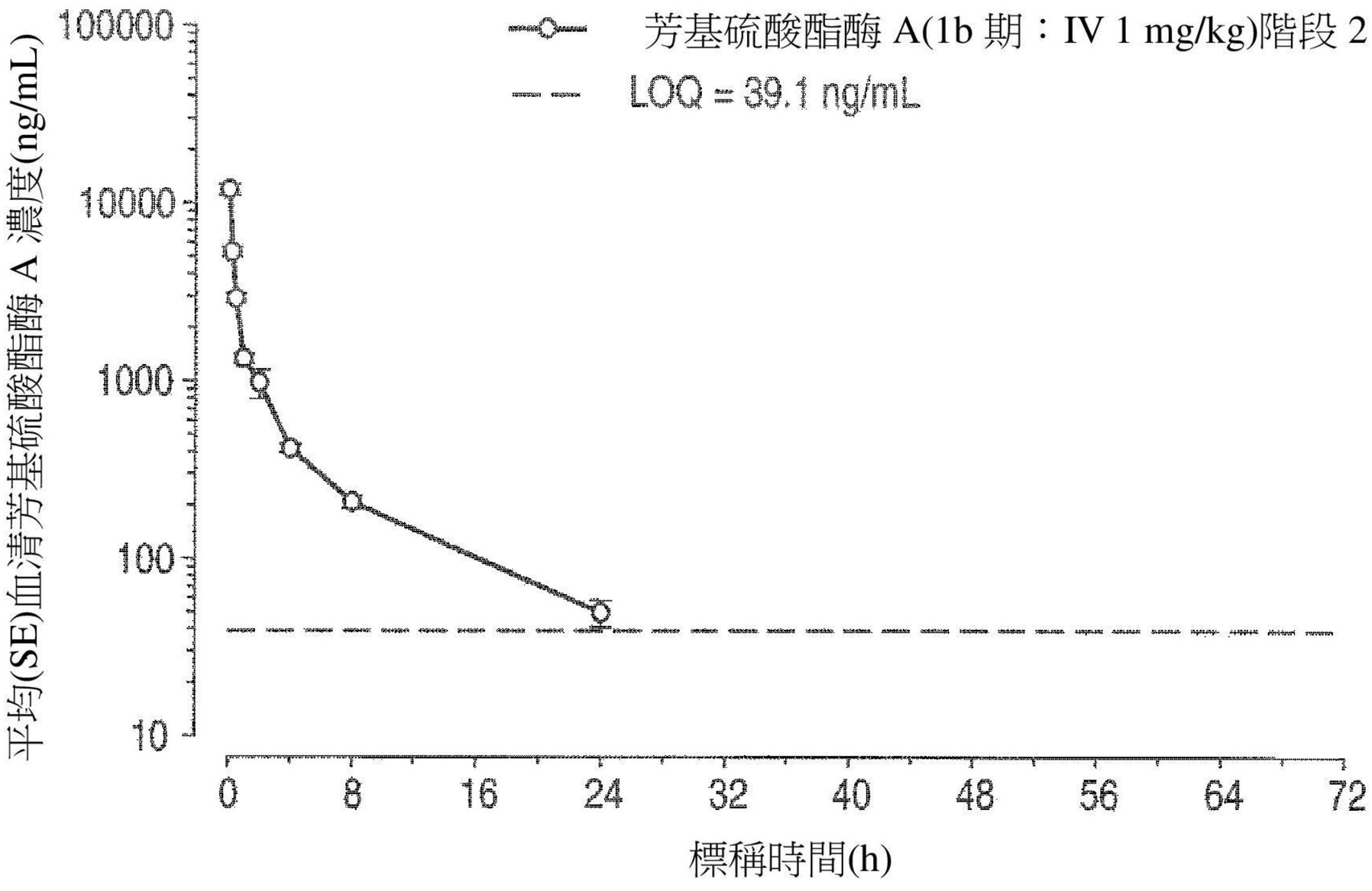
【第60項】

如請求項56之容器，其中該穩定調配物係以小於約50.0 mL之體積存在。

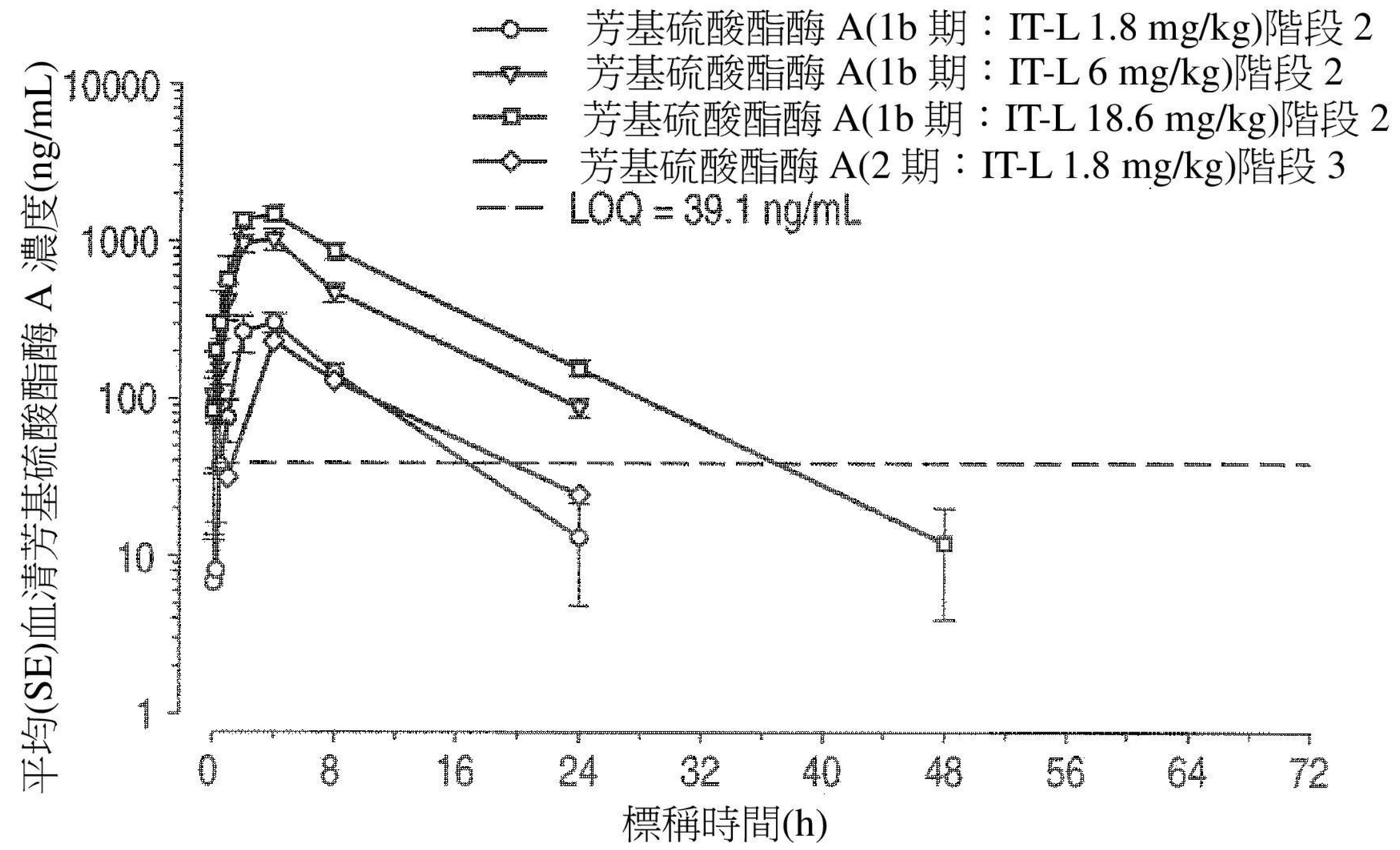
【第61項】

如請求項56之容器，其中該穩定調配物係以小於約5.0 mL之體積存在。

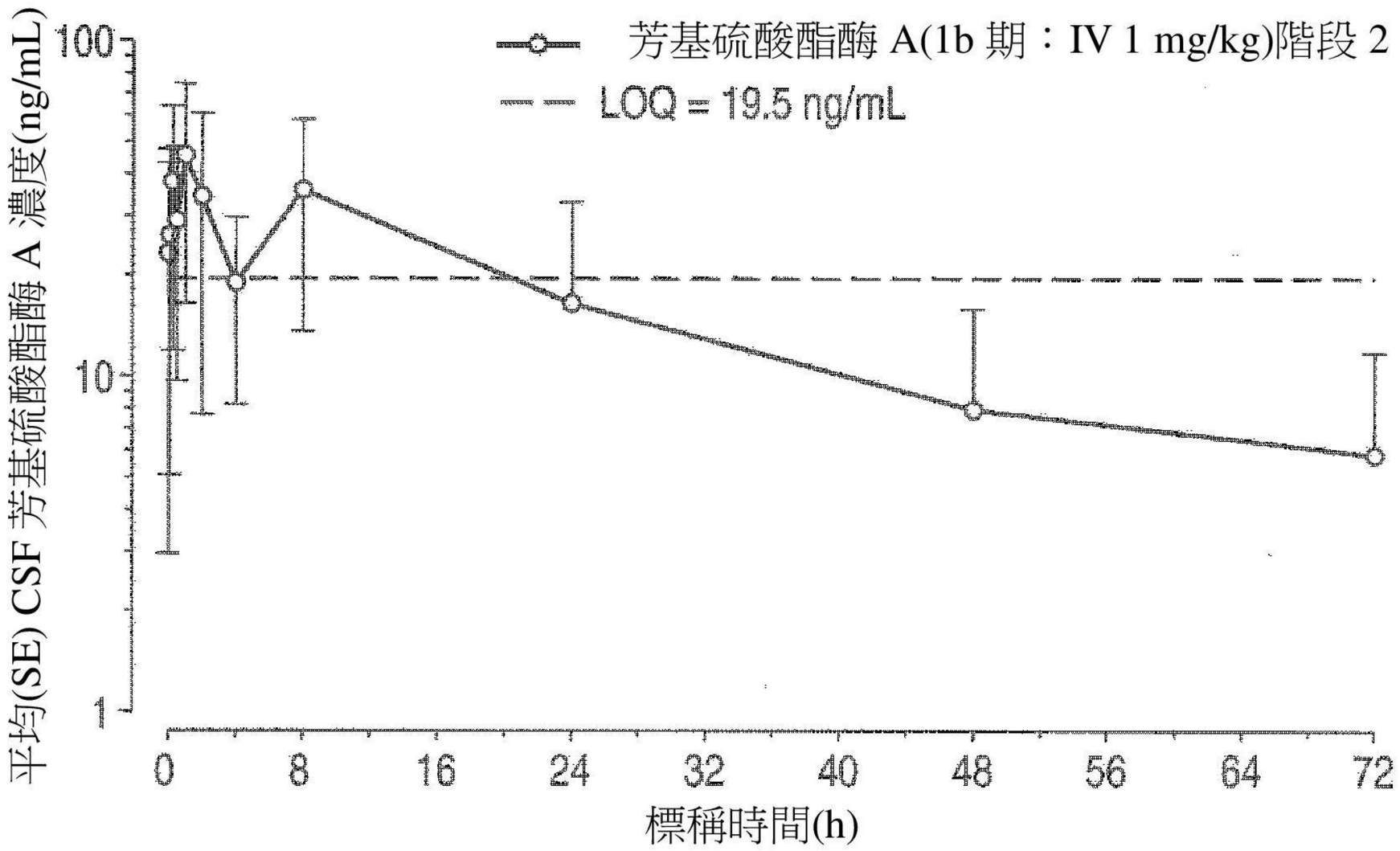
【發明圖式】


芳基硫酸酯酶 A(1b 期：IV 1 mg/kg)階段 2
LOQ = 39.1 ng/mL
平均(SE)血清芳基硫酸酯酶 A 濃度(ng/mL)
100000
10000
1000
100
10
0
8
16
24
32
40
48
56
64
72
標稱時間(h)

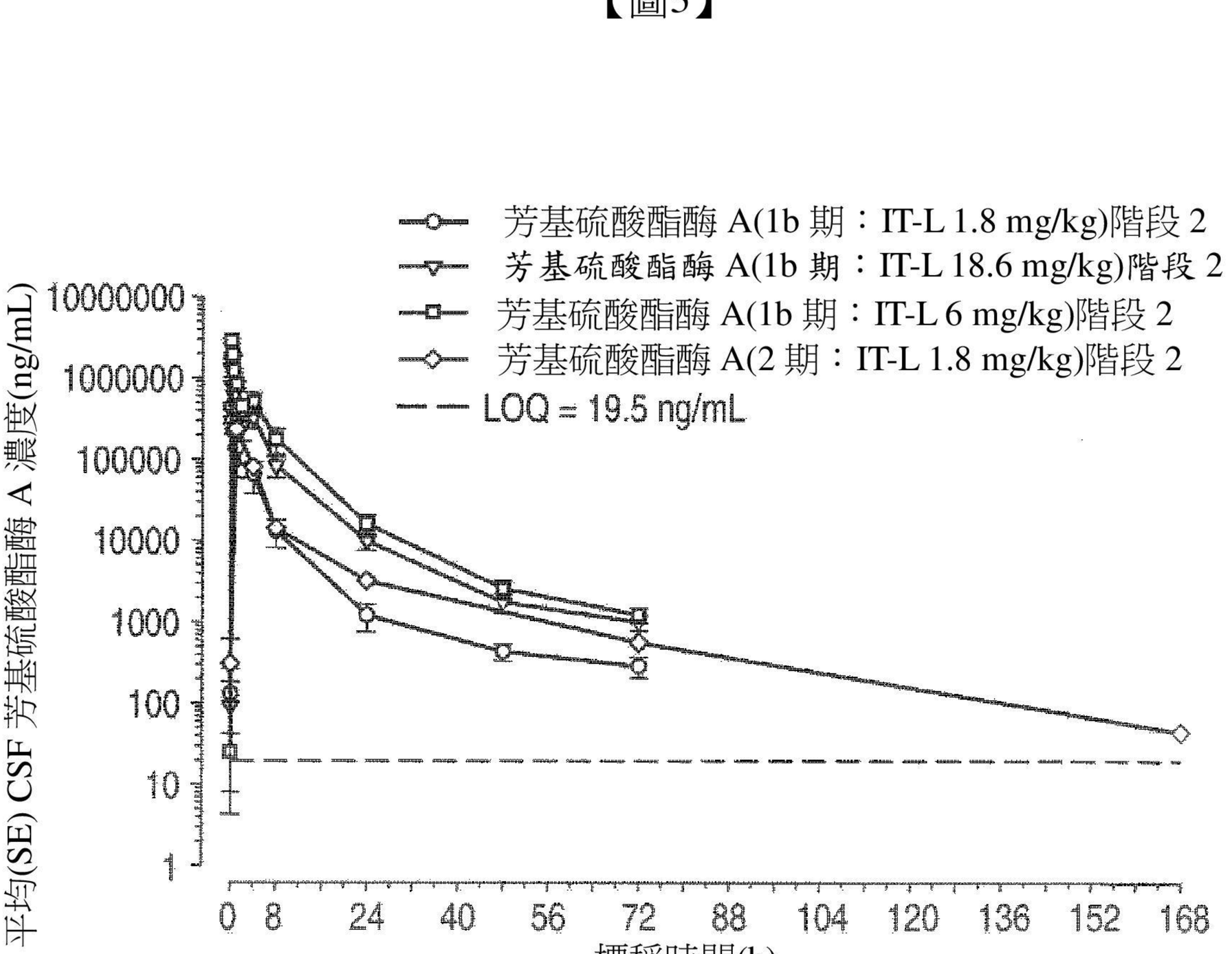
【圖1】


芳基硫酸酯酶 A(1b 期：IT-L 1.8 mg/kg)階段 2
芳基硫酸酯酶 A(1b 期：IT-L 6 mg/kg)階段 2
芳基硫酸酯酶 A(1b 期：IT-L 18.6 mg/kg)階段 2
芳基硫酸酯酶 A(2 期：IT-L 1.8 mg/kg)階段 3
LOQ = 39.1 ng/mL
平均(SE)血清芳基硫酸酯酶 A 濃度(ng/mL)
10000
1000
100
10
1
0
8
16
24
32
40
48
56
64
72
標稱時間(h)

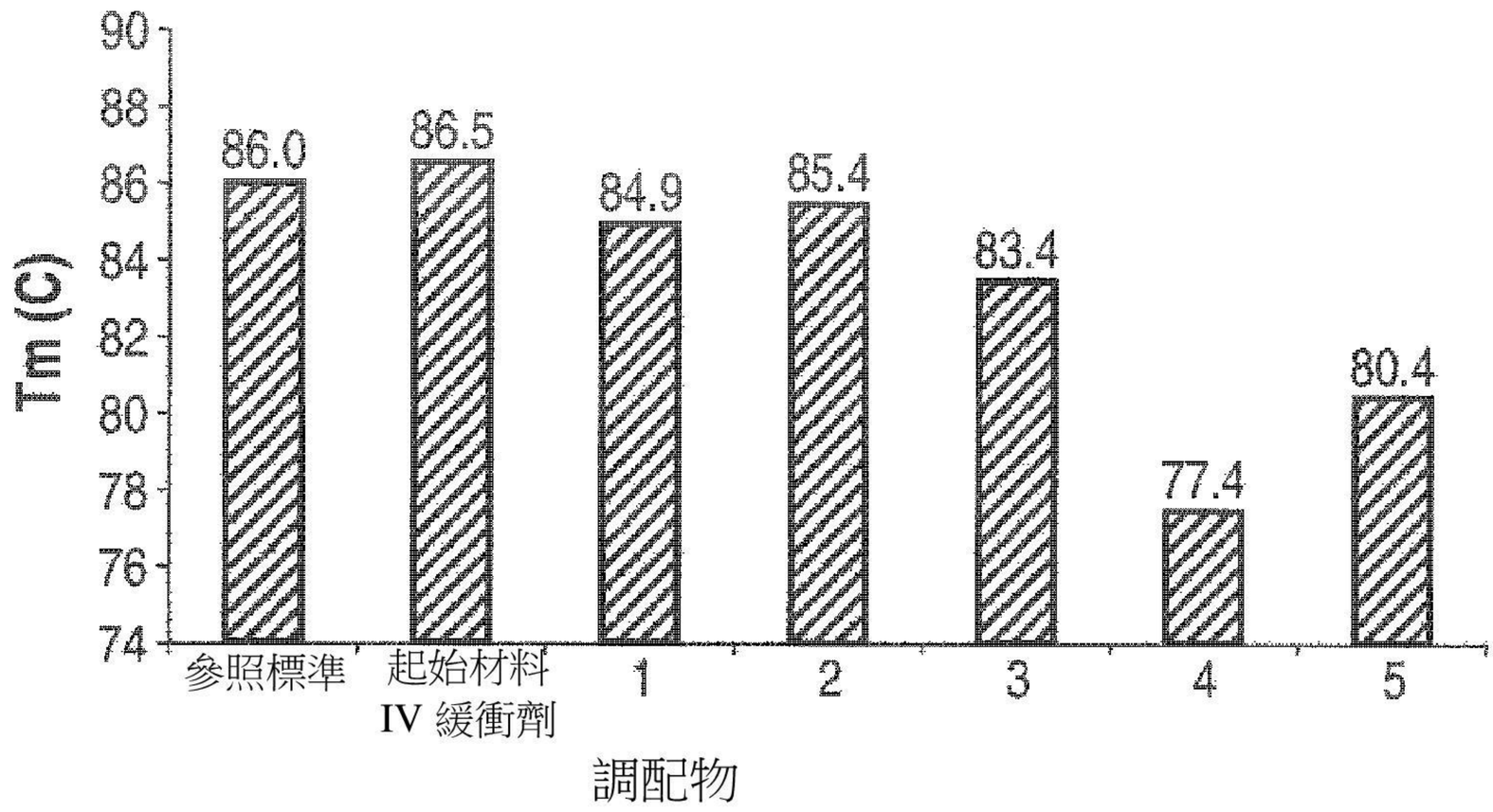
【圖2】


芳基硫酸酯酶 A(1b 期：IV 1 mg/kg)階段 2
LOQ = 19.5 ng/mL
平均(SE) CSF 芳基硫酸酯酶 A 濃度(ng/mL)
100
10
1
0
8
16
24
32
40
48
56
64
72
標稱時間(h)

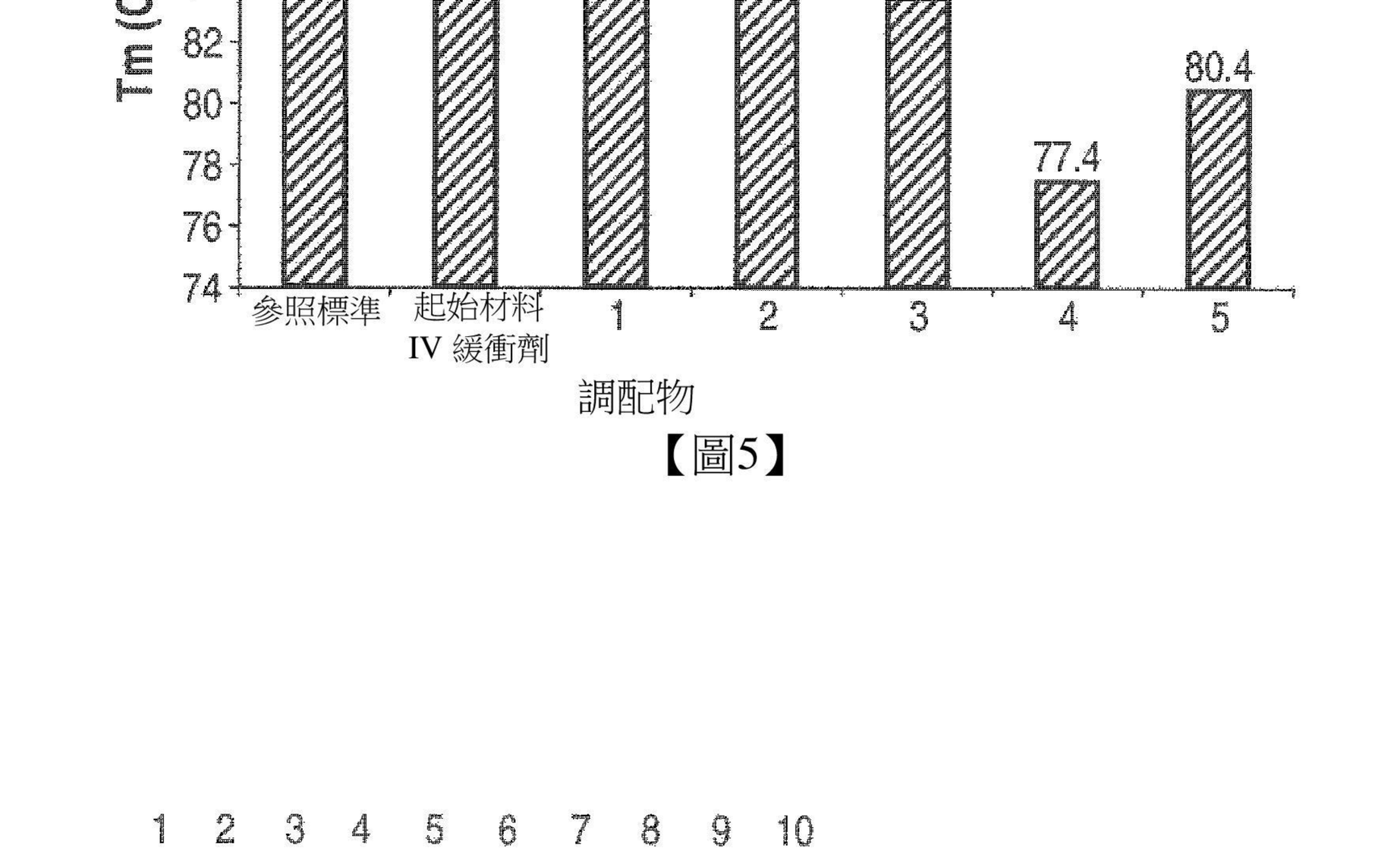
【圖3】


芳基硫酸酯酶 A(1b 期：IT-L 1.8 mg/kg)階段 2
芳基硫酸酯酶 A(1b 期：IT-L 18.6 mg/kg)階段 2
芳基硫酸酯酶 A(1b 期：IT-L 6 mg/kg)階段 2
芳基硫酸酯酶 A(2 期：IT-L 1.8 mg/kg)階段 2
LOQ = 19.5 ng/mL
平均(SE) CSF 芳基硫酸酯酶 A 濃度(ng/mL)
10000000
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0
8
24
40
56
72
88
104
120
136
152
168
標稱時間(h)

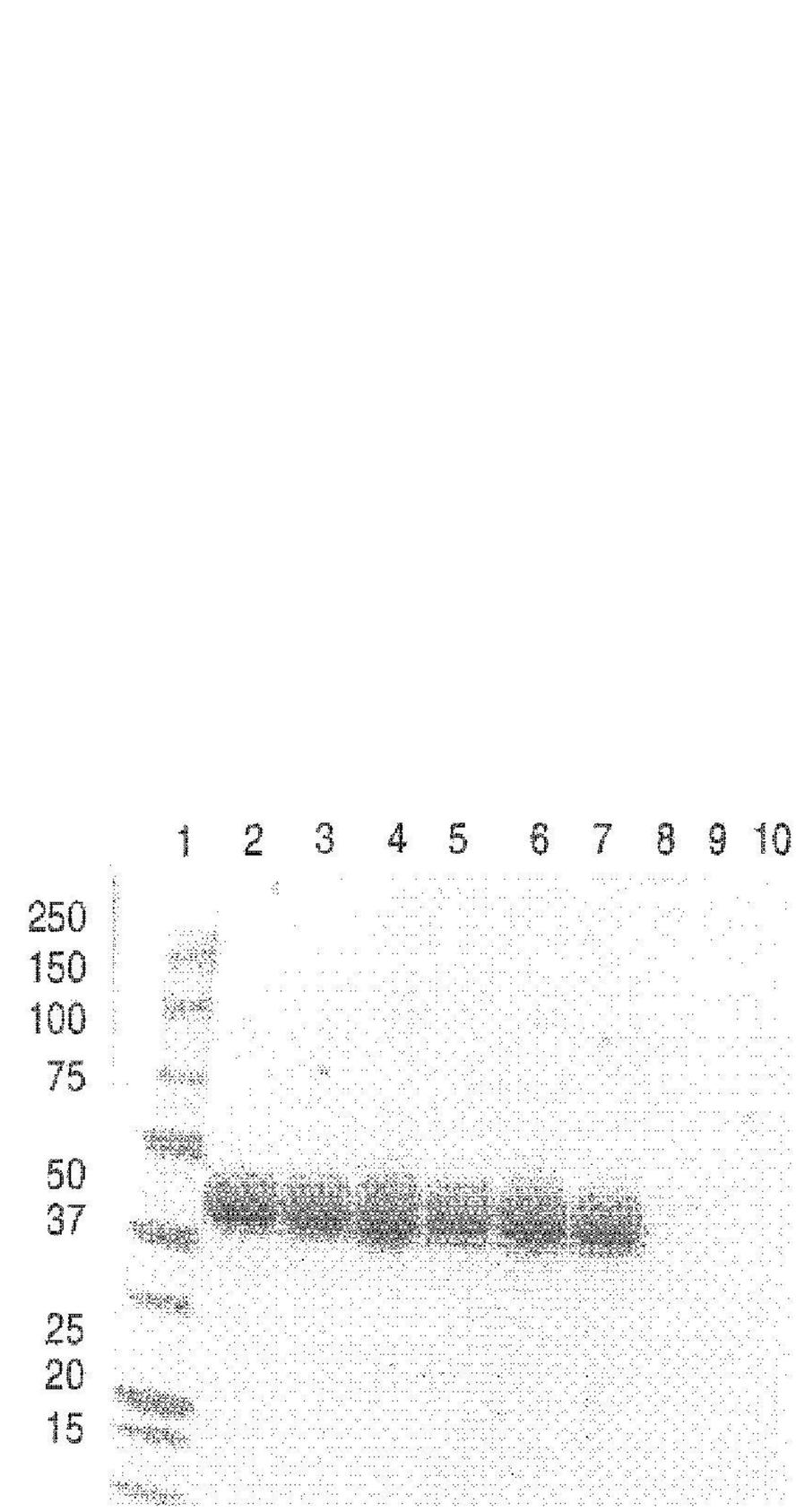
【圖4】


Tm (C)
90
88
86
84
82
80
78
76
74
86.0
86.5
84.9
85.4
83.4
77.4
80.4
參照標準
起始材料
1
2
3
4
5
IV 緩衝劑
調配物

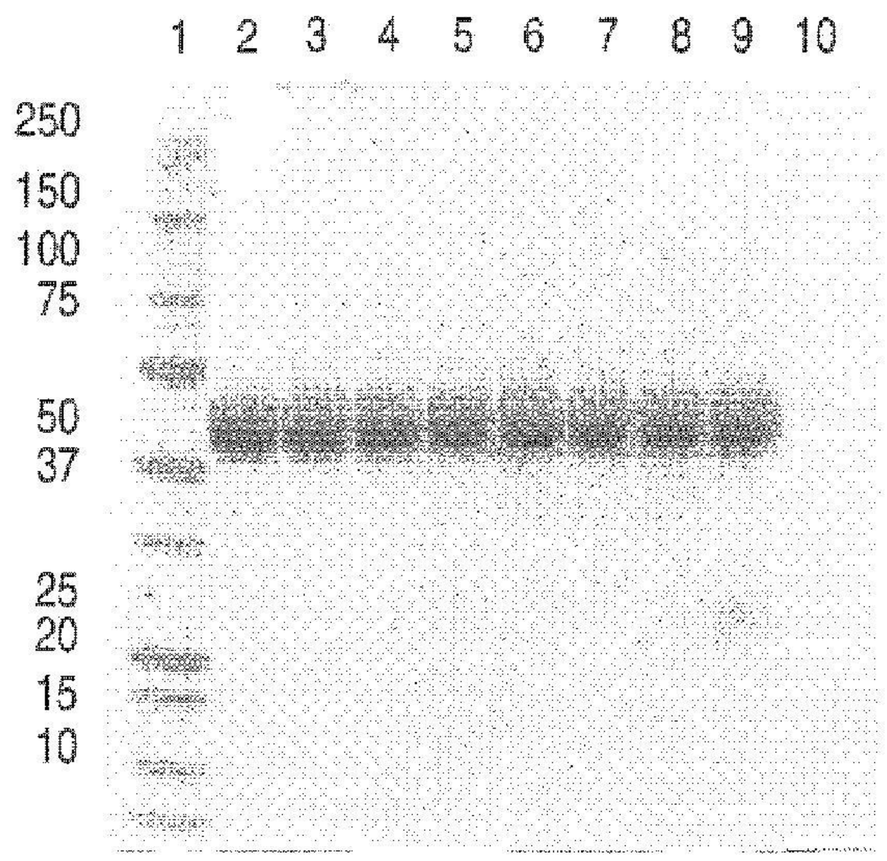
【圖5】


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
250
150
100
75
50
37
25
20
泳道 試樣
1 分子量標記
2 空白
3 參照標準, BR14
4 鹽水 , pH 5.9
5 鹽水 , pH 7.0
6 5 mM PBS, pH 6.0
7 5 mM PBS, pH 7.0
8 1 mM PBS + CaCl2, pH 7.0
9 0.5% BSA
10 空白

【圖6】

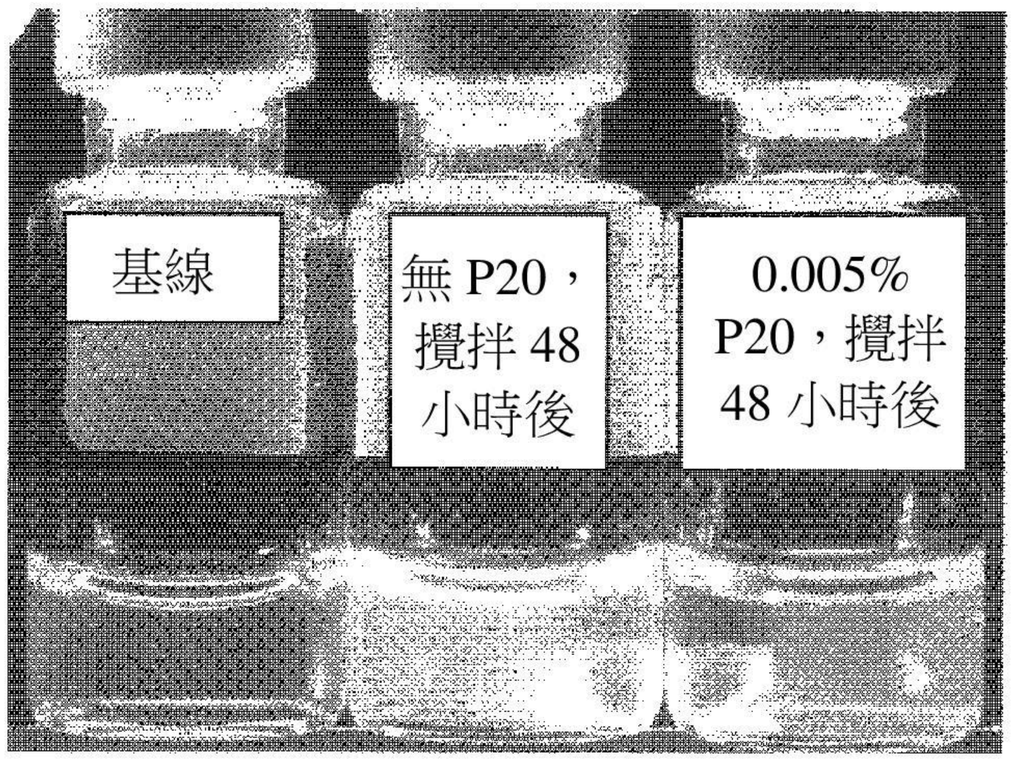


泳道	試樣
1	分子量標記
2	參照標準
3	基線，鹽水 , pH 5.9
4	5°C, 3M, 鹽水 , pH 5.9
5	基線，鹽水 , pH 7.0
6	5°C, 3M, 鹽水 , pH 7.0
7	25°C, 3M,鹽水 , pH 7.0
8	0.5% BSA
9	空白
10	空白



泳道	試樣
1	分子量標記
2	參照標準
3	基線 , PBS, pH 6.0
4	5°C, 3M, PBS, pH 6.0
5	基線 , PBS, pH 7.0
6	5°C, 3M, PBS, pH 7.0
7	基線 , 1 mM PBS, pH 7.0 w/$CaCl_2$
8	5°C, 3M, 1 mM PBS, pH 7.0 w/$CaCl_2$
9	25°C, 3M, 1 mM PBS, pH 7.0 w/$CaCl_2$
10	0.5% BSA

【圖7】

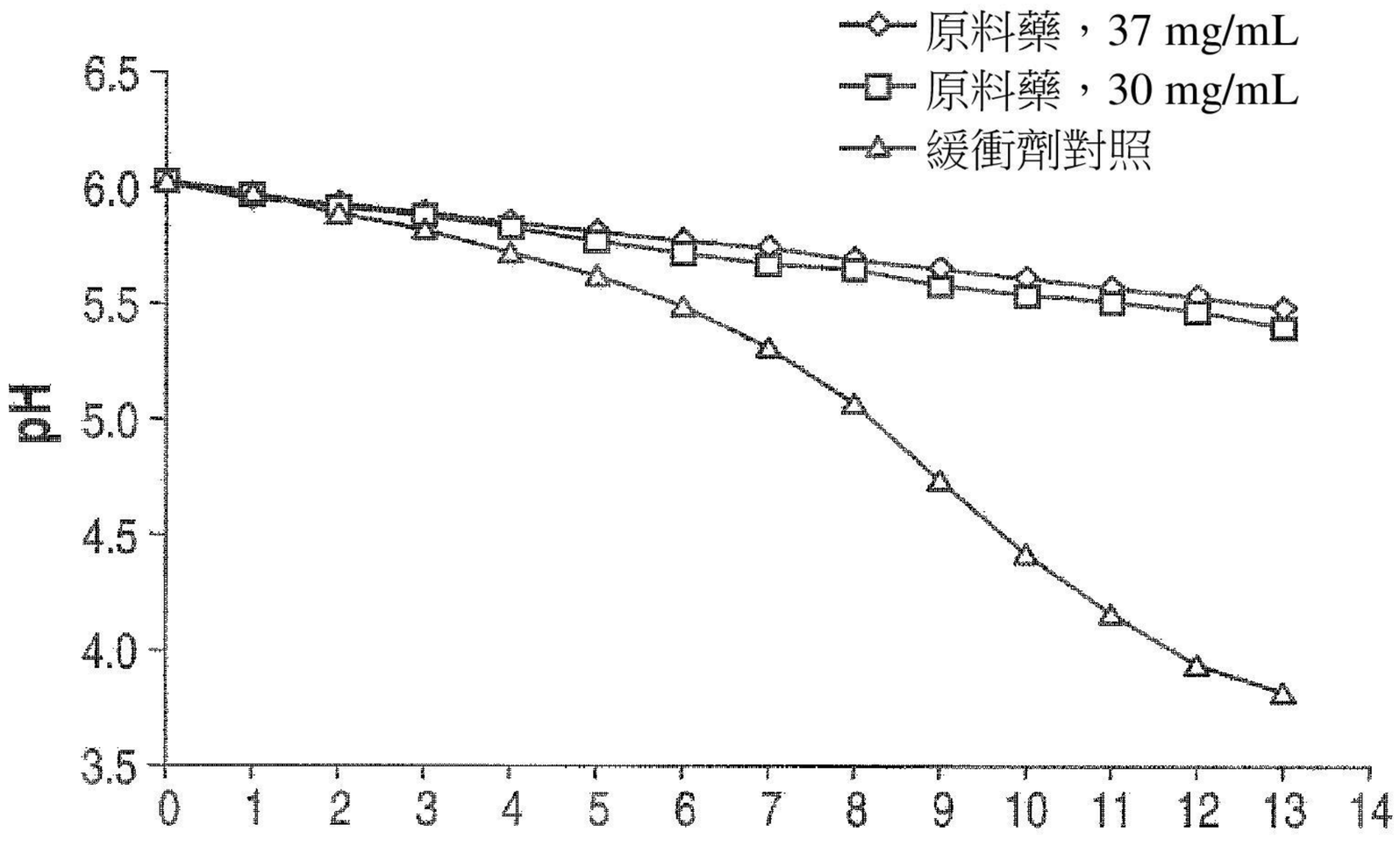

基線
無 P20，攪拌 48 小時後
0.005% P20，攪拌 48 小時後

基線
無 P20，振盪 48 小時後
0.005% P20，振盪 48 小時後

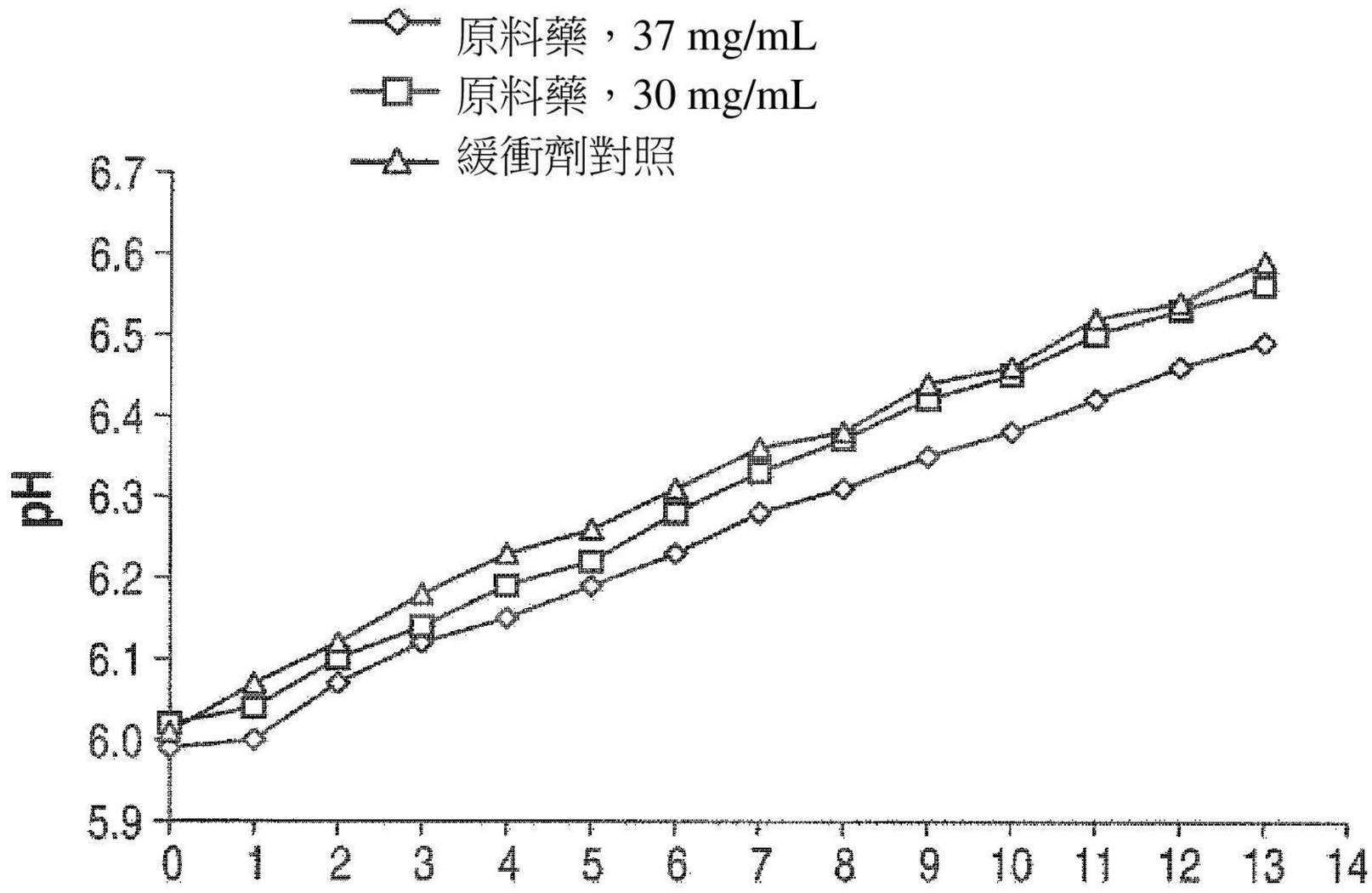
【圖8】

無頂隙
有頂隙
L 鹽水，3 ml
基線
L 鹽水，3 ml
兩次振盪，第 2 次
L 鹽水，1 ml
基線
Eng L 鹽水
兩次振盪，第 2 次
Eng L 鹽水
次振盪，第 3 次

【圖9】


原料藥，37 mg/mL
原料藥，30 mg/mL
緩衝劑對照
pH
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
HCl 體積(μL)

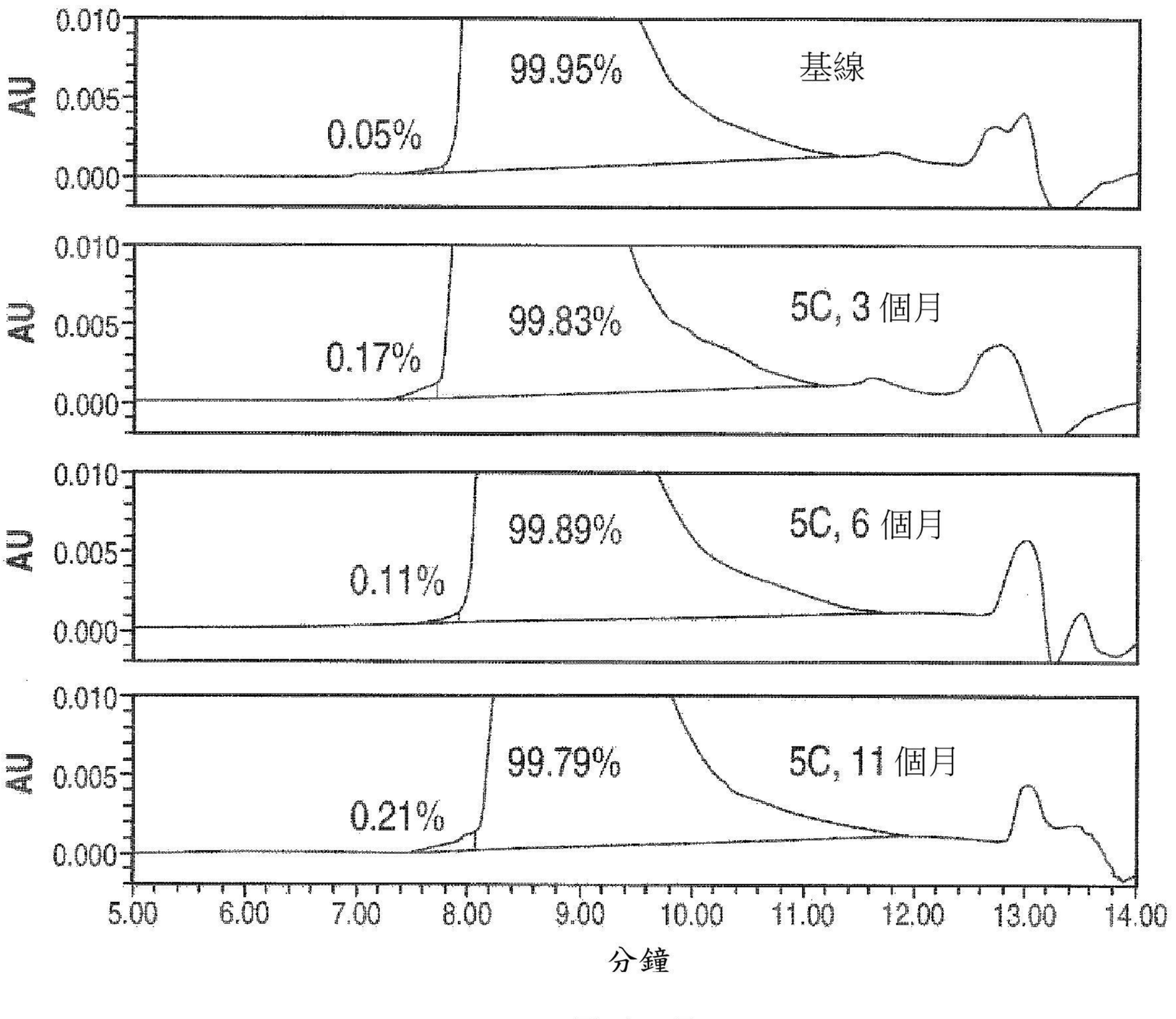
【圖10】


原料藥，37 mg/mL
原料藥，30 mg/mL
緩衝劑對照
pH
6.7
6.6
6.5
6.4
6.3
6.2
6.1
6.0
5.9
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
NaOH體積(μL)

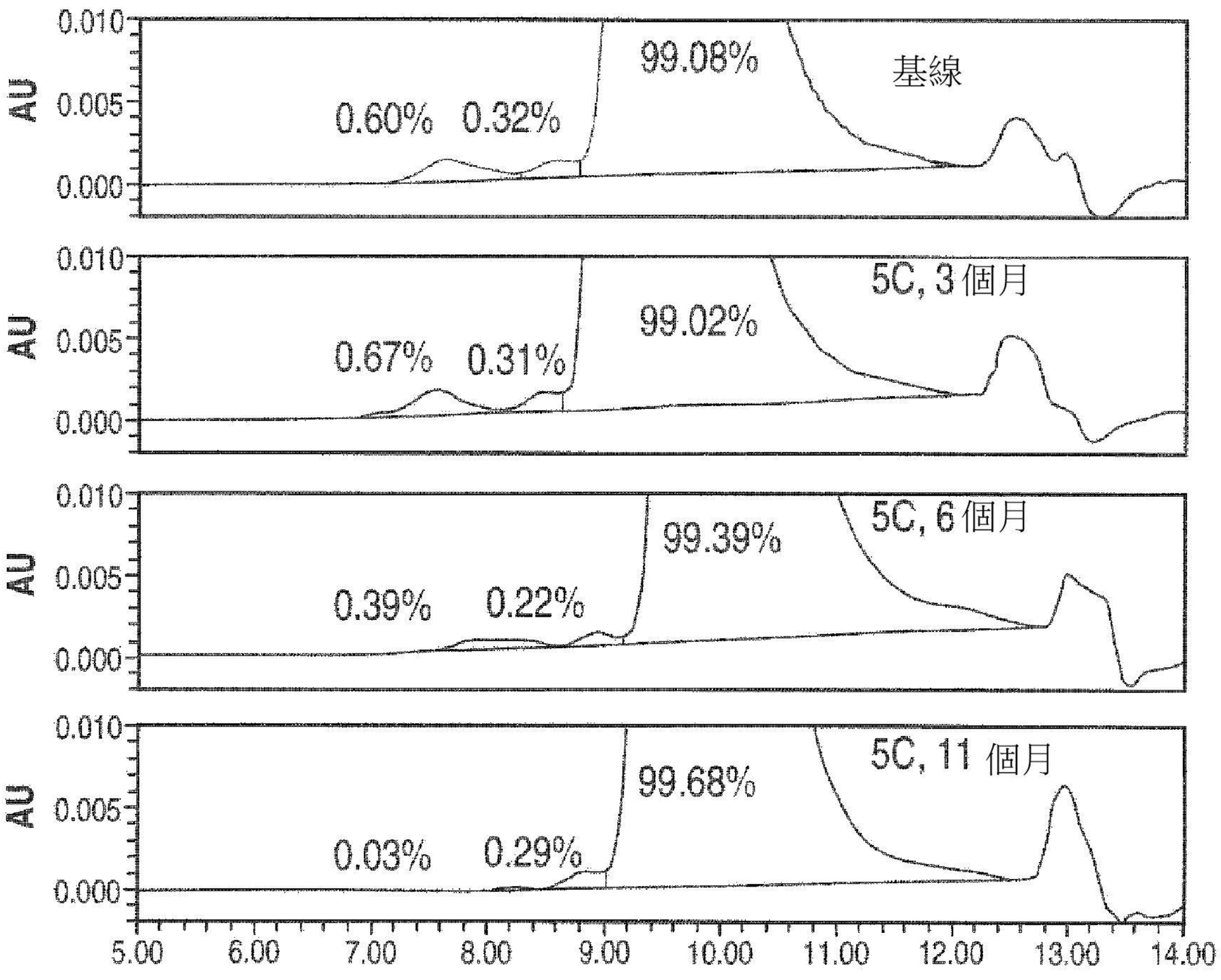
【圖11】

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

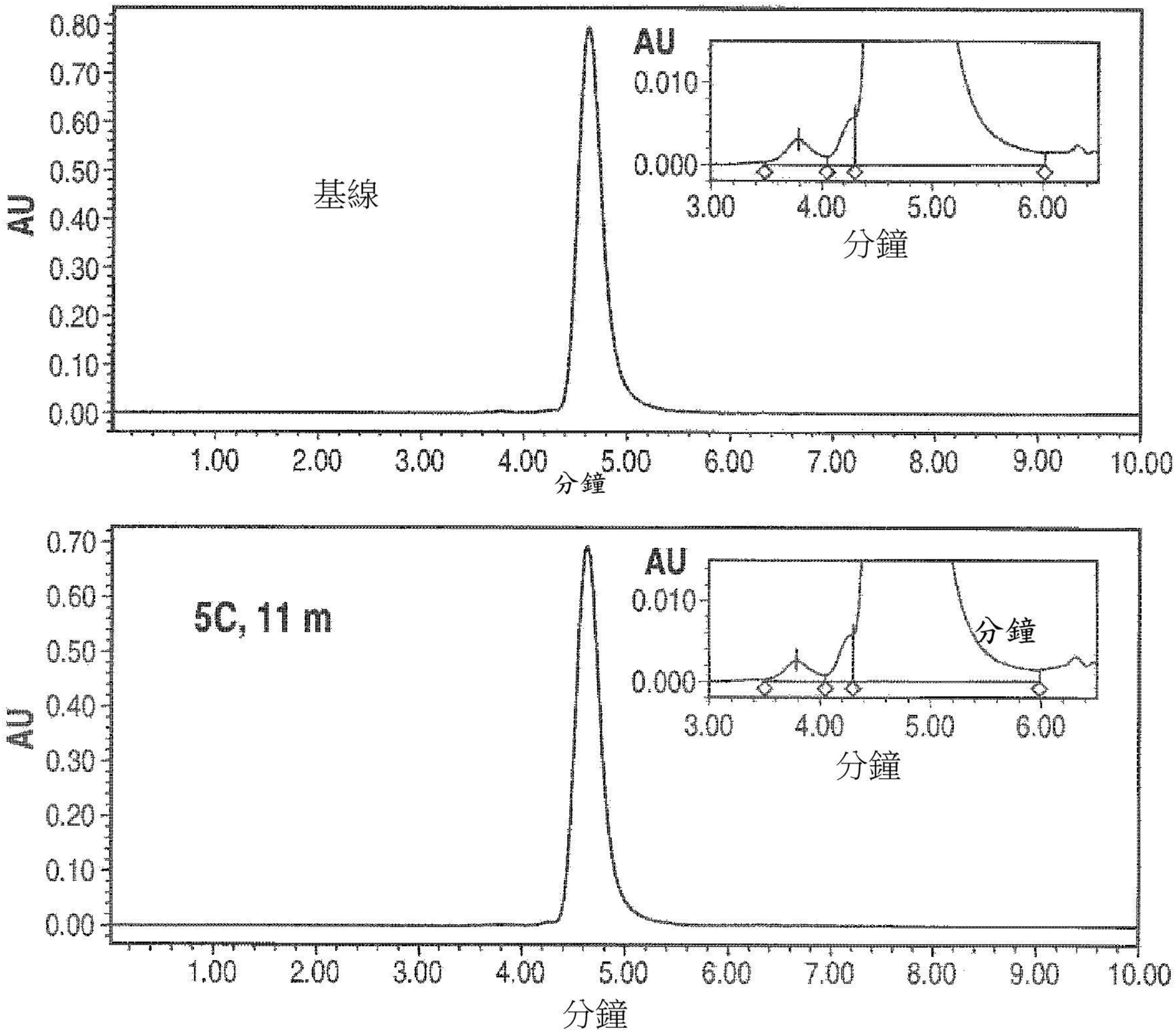
【圖12】


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

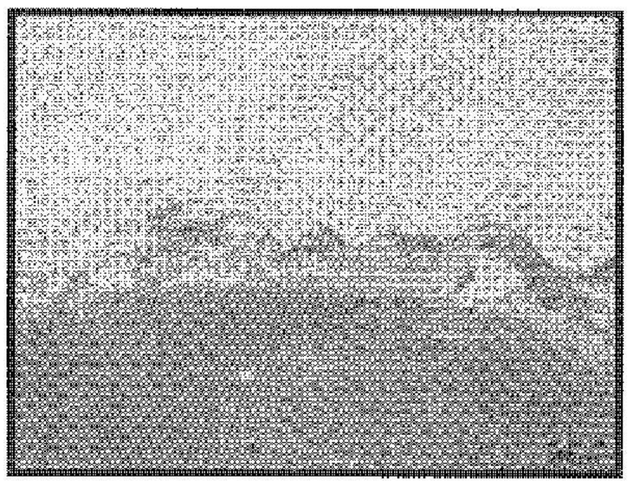
【圖13】


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

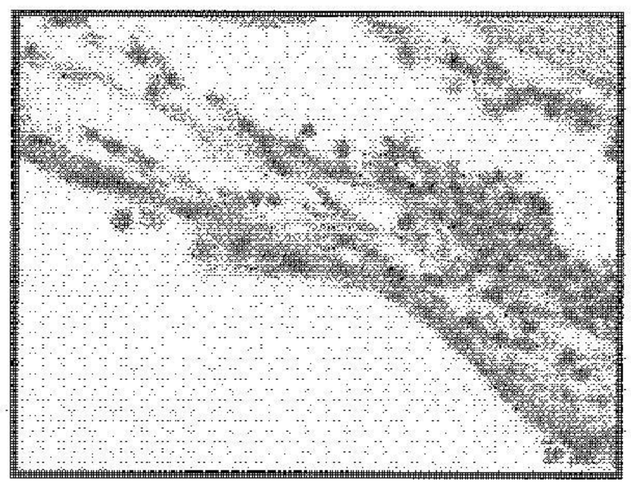
【圖14】


基線
AU
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
分鐘
AU
0.010
0.000
3.00
4.00
5.00
6.00
分鐘
5C, 11 m
AU
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
分鐘
AU
0.010
0.000
3.00
4.00
5.00
6.00
分鐘

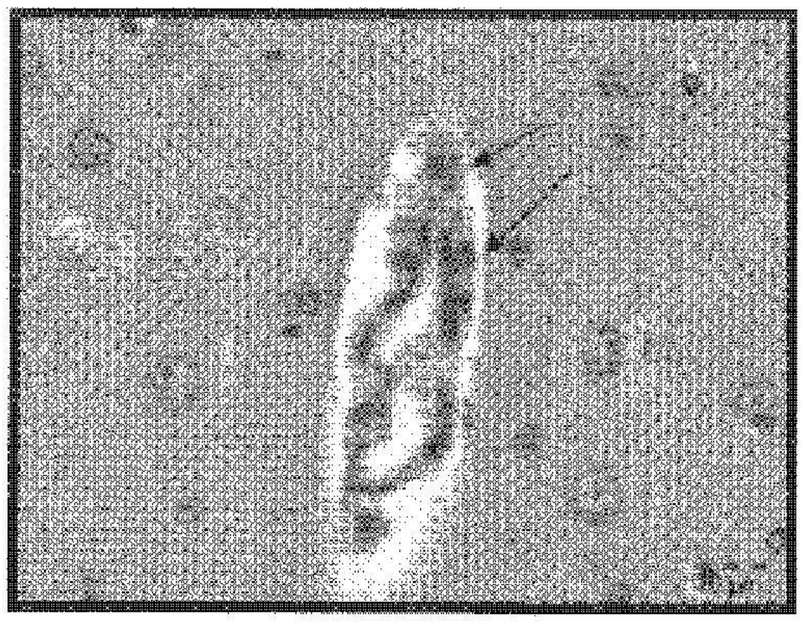
【圖15】



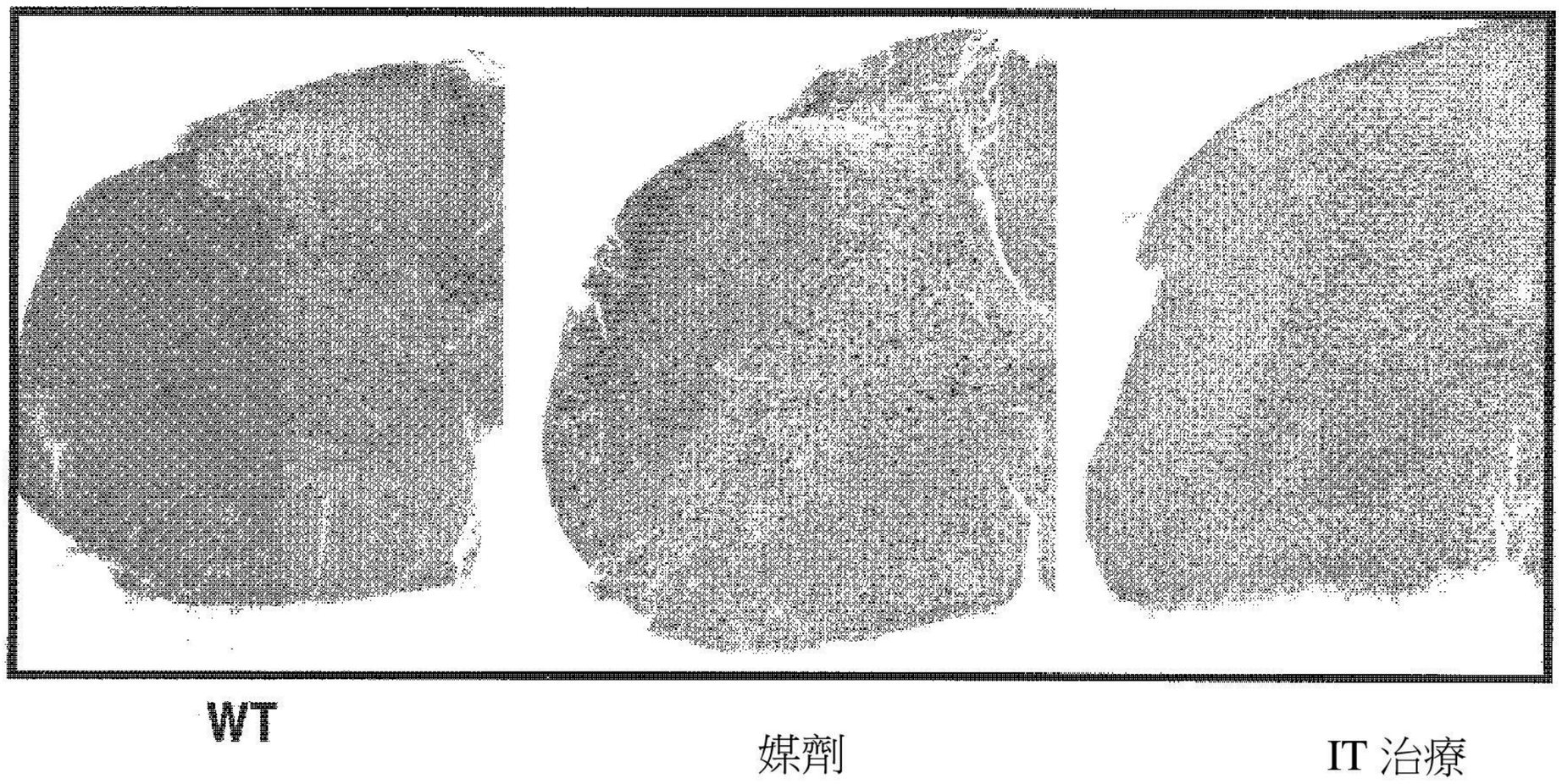
【圖16】



【圖17】

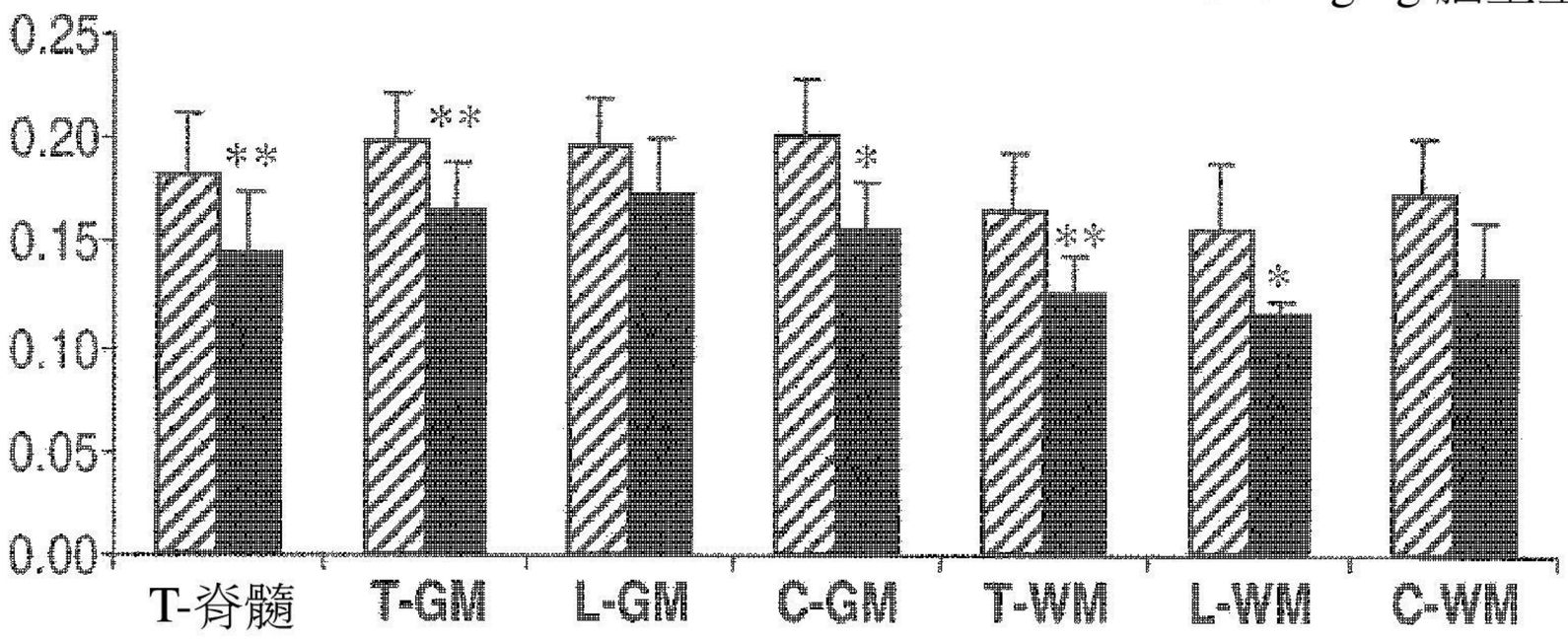


【圖18】



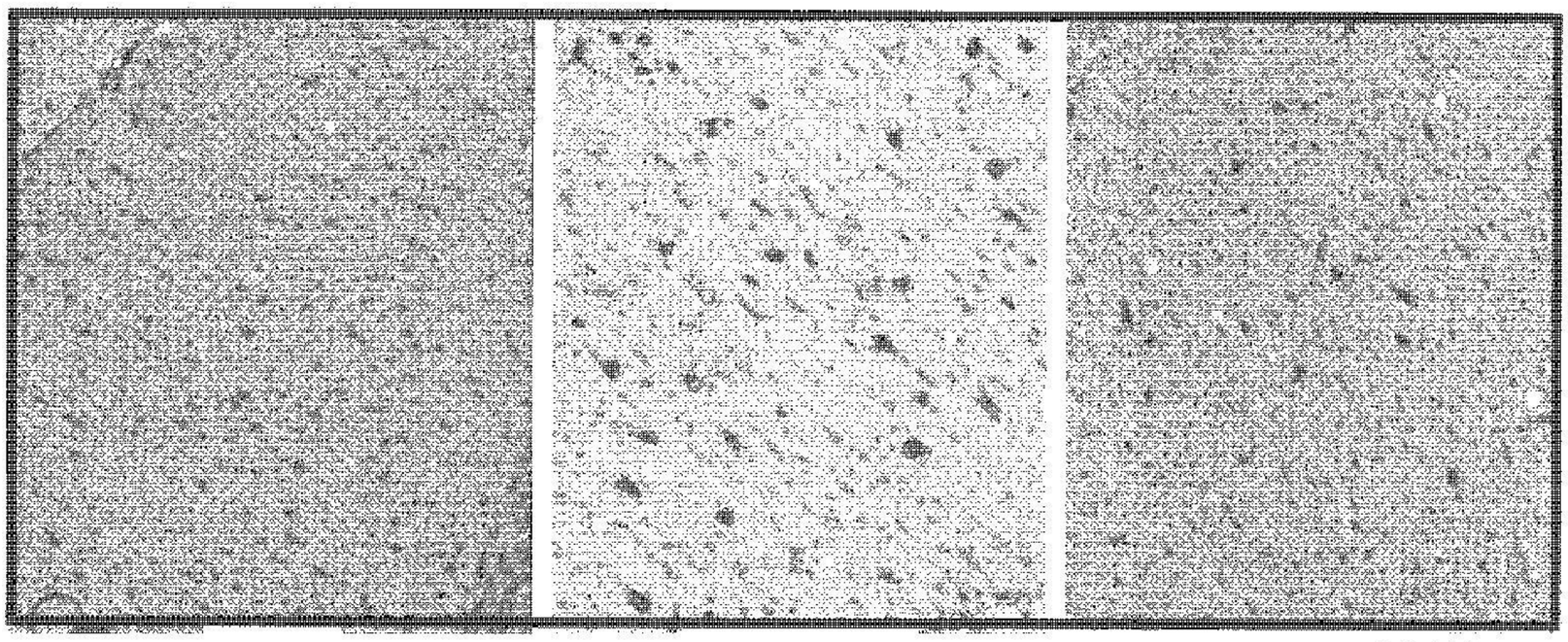
WT =野生型，IT 治療小鼠接受 4 次 520 mg/kg 腦重量之每週劑量之 rhASA1 (0.21 mg)，4X 放大倍數。

【圖19】



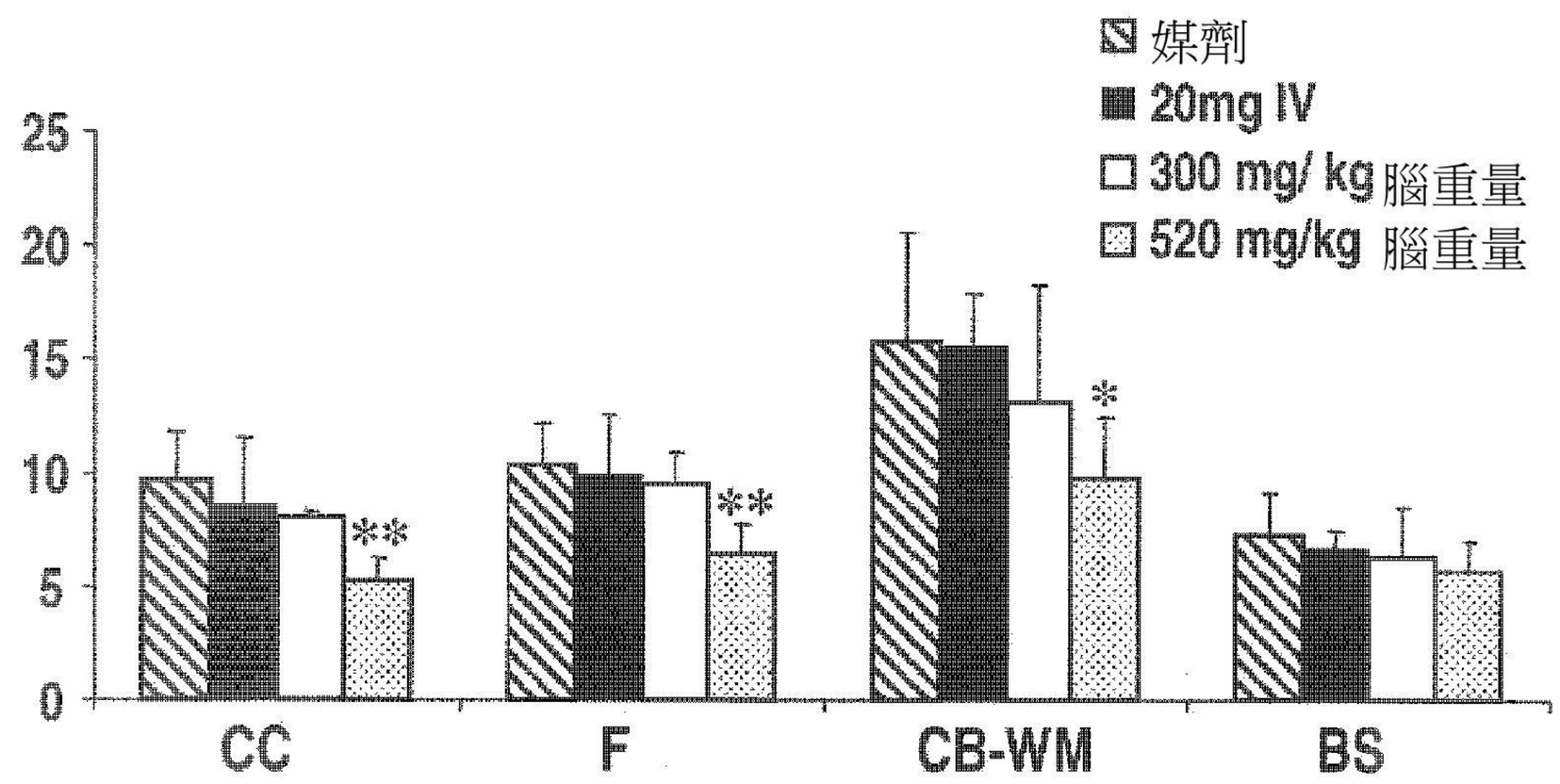
**P<0.001；*P<0.05；
T-脊髓 = 總脊髓；
T-GM = 總灰質；
L-GM = 腰部灰質；
C-GM = 頸部灰質；
T-WM = 總白質；
L-WM = 腰部白質；
C-WM = 頸部白質

【圖20】

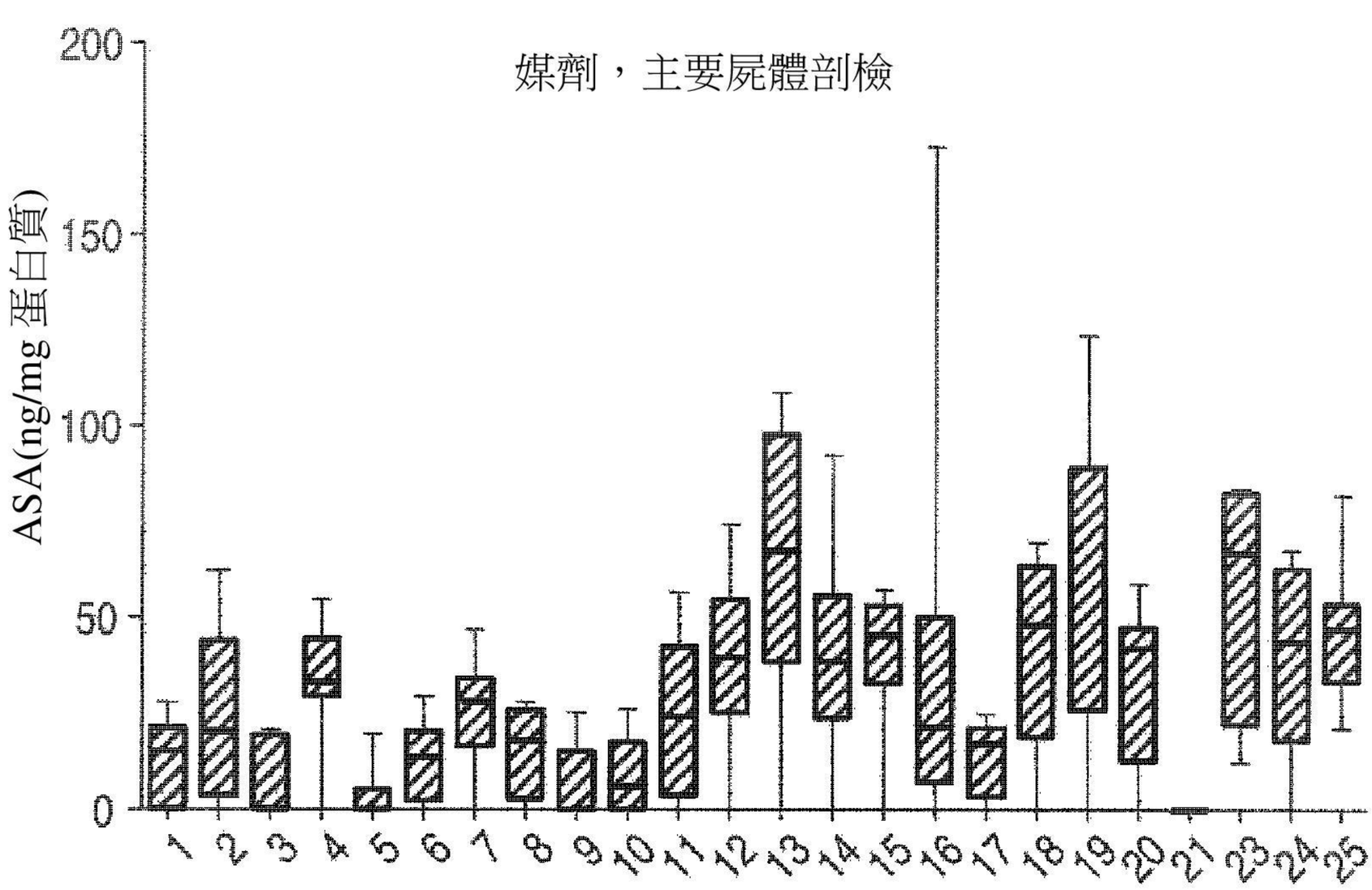


WT =野生型，IT 治療小鼠接受 4 次 520 mg/kg 腦重量之每週劑量之 rhASA1 (0.21 mg)，20X 放大倍數。

【圖21】

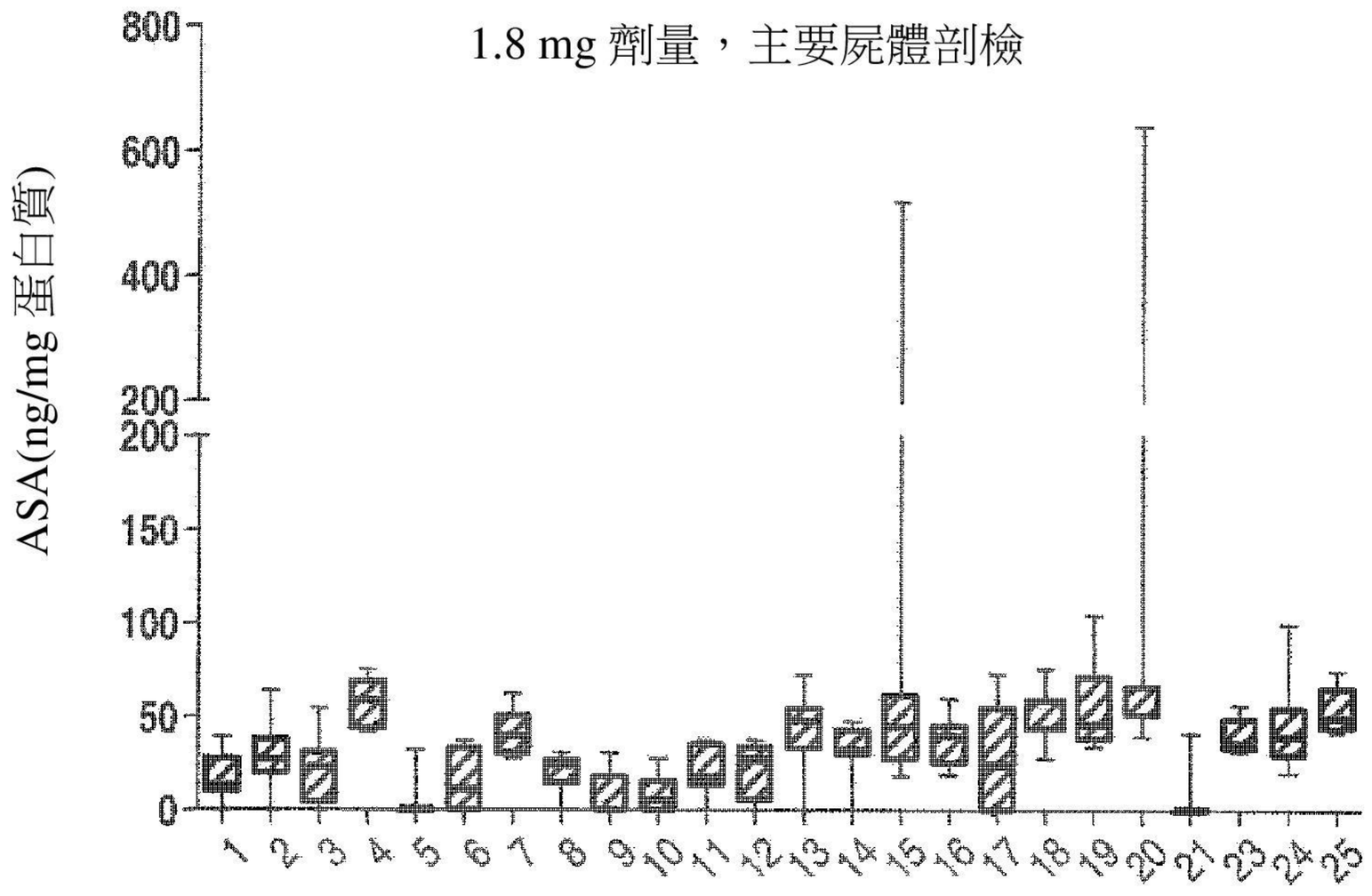

媒劑
20mg IV
300 mg/ kg 腦重量
520 mg/kg 腦重量
25
20
15
10
5
0
CC
F
CB-WM
BS

【圖22】

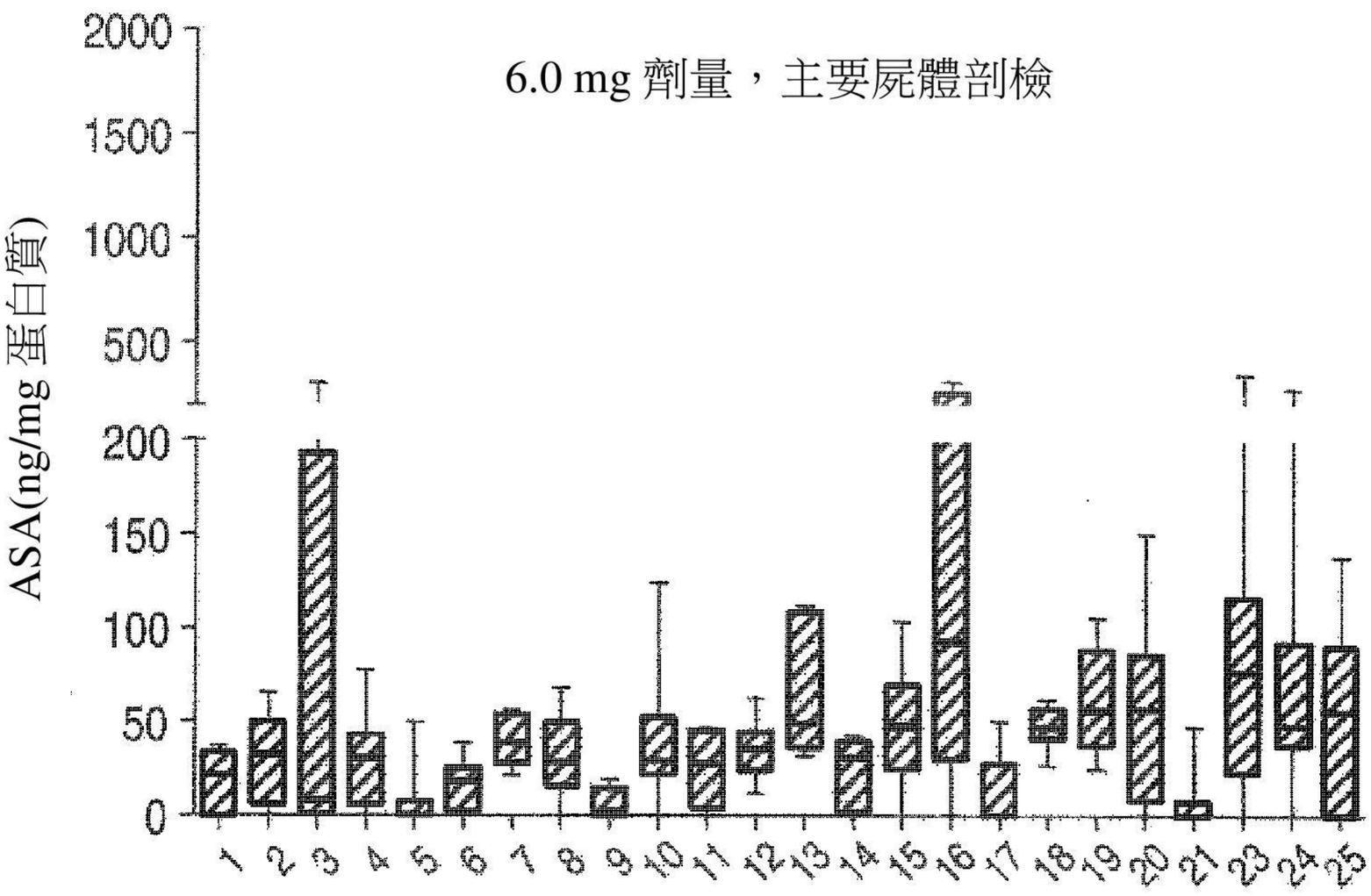

媒劑，主要屍體剖檢
ASA(ng/mg 蛋白質)
200
150
100
50
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 23 24 25

鑽孔編號

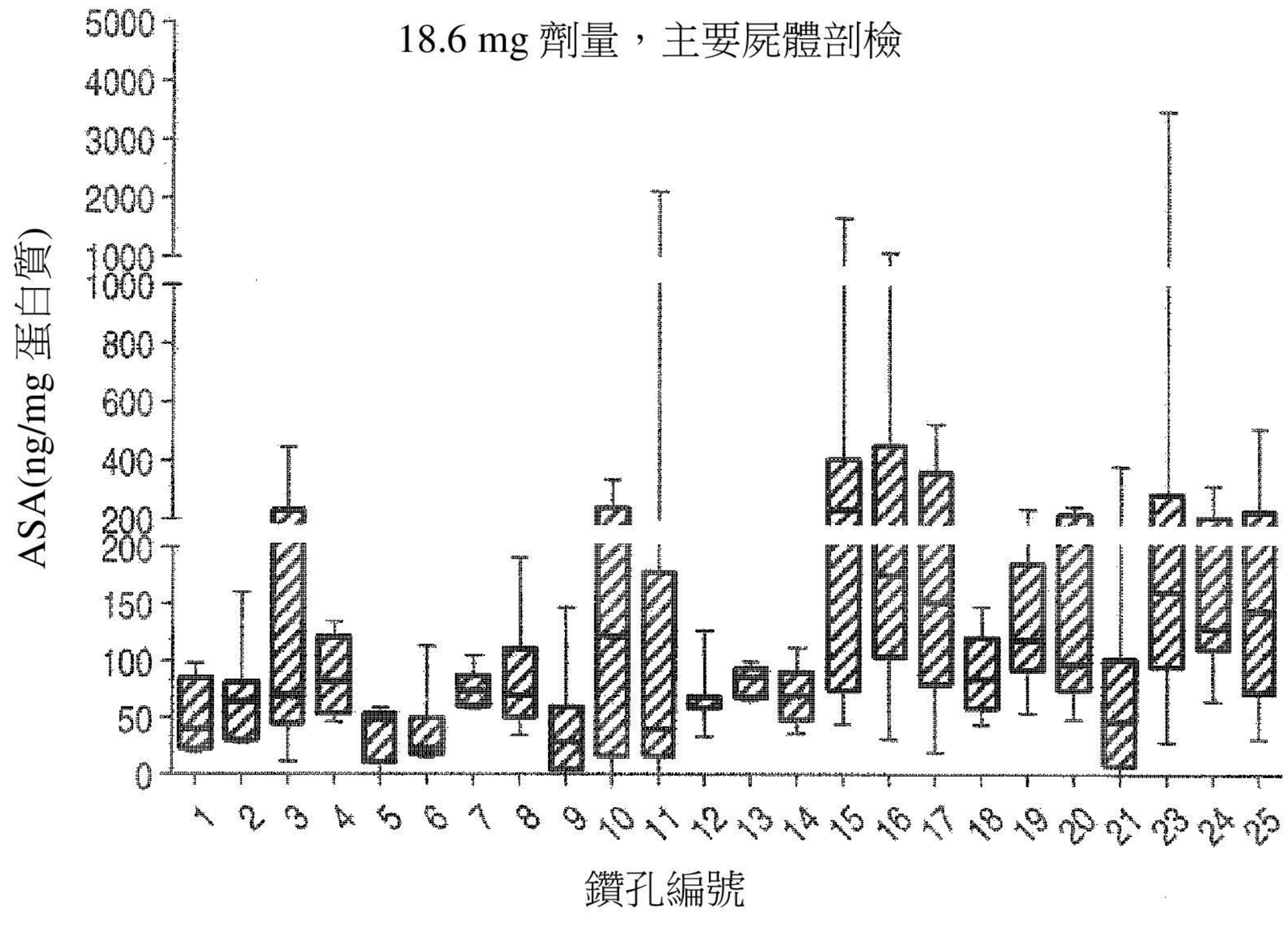
【圖23】


1.8 mg 劑量，主要屍體剖檢
ASA(ng/mg 蛋白質)
800
600
400
200
200
150
100
50
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 23 24 25
鑽孔編號

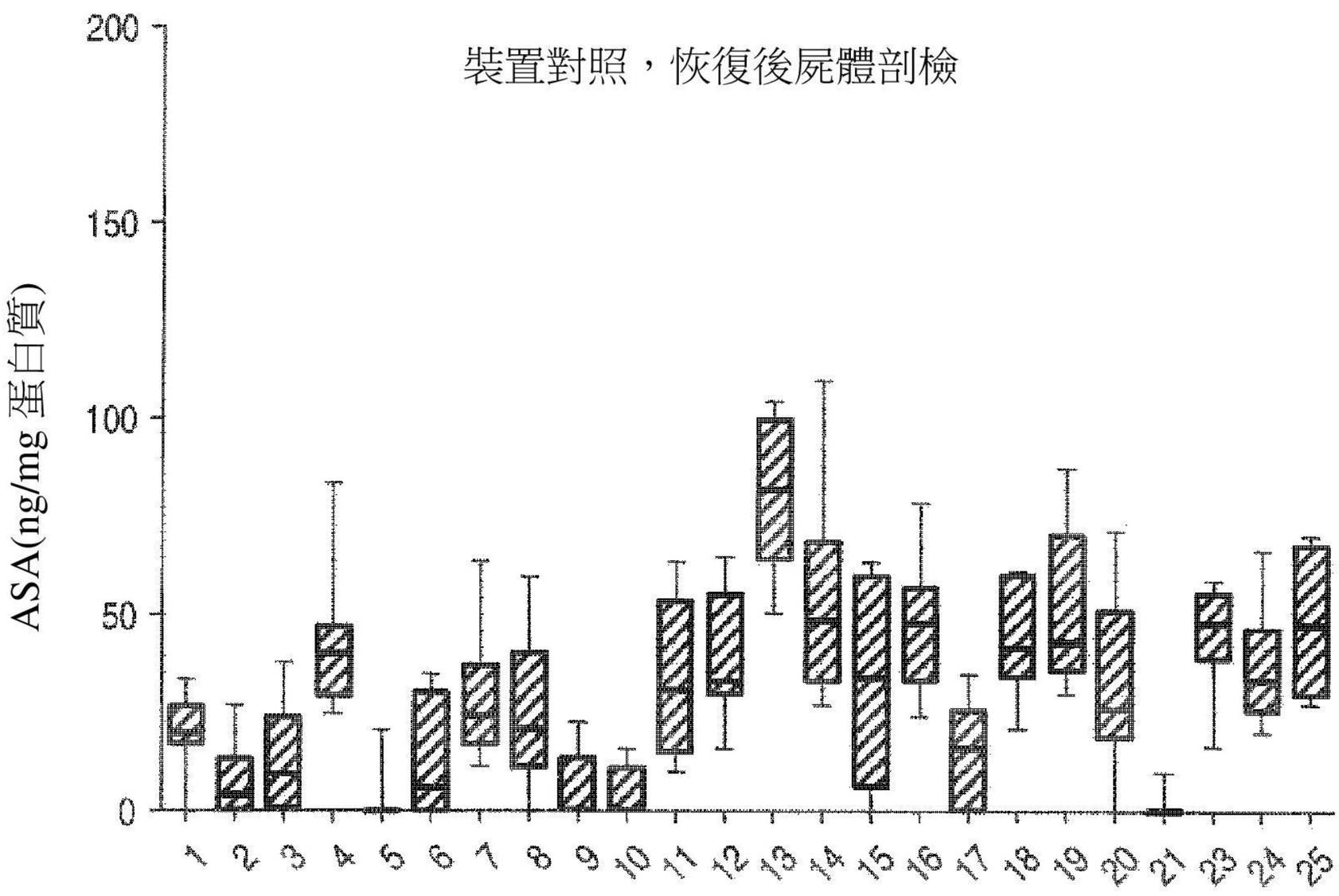
【圖24】


6.0 mg 劑量，主要屍體剖檢
ASA(ng/mg 蛋白質)
2000
1500
1000
500
200
150
100
50
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 23 24 25
鑽孔編號

【圖25】

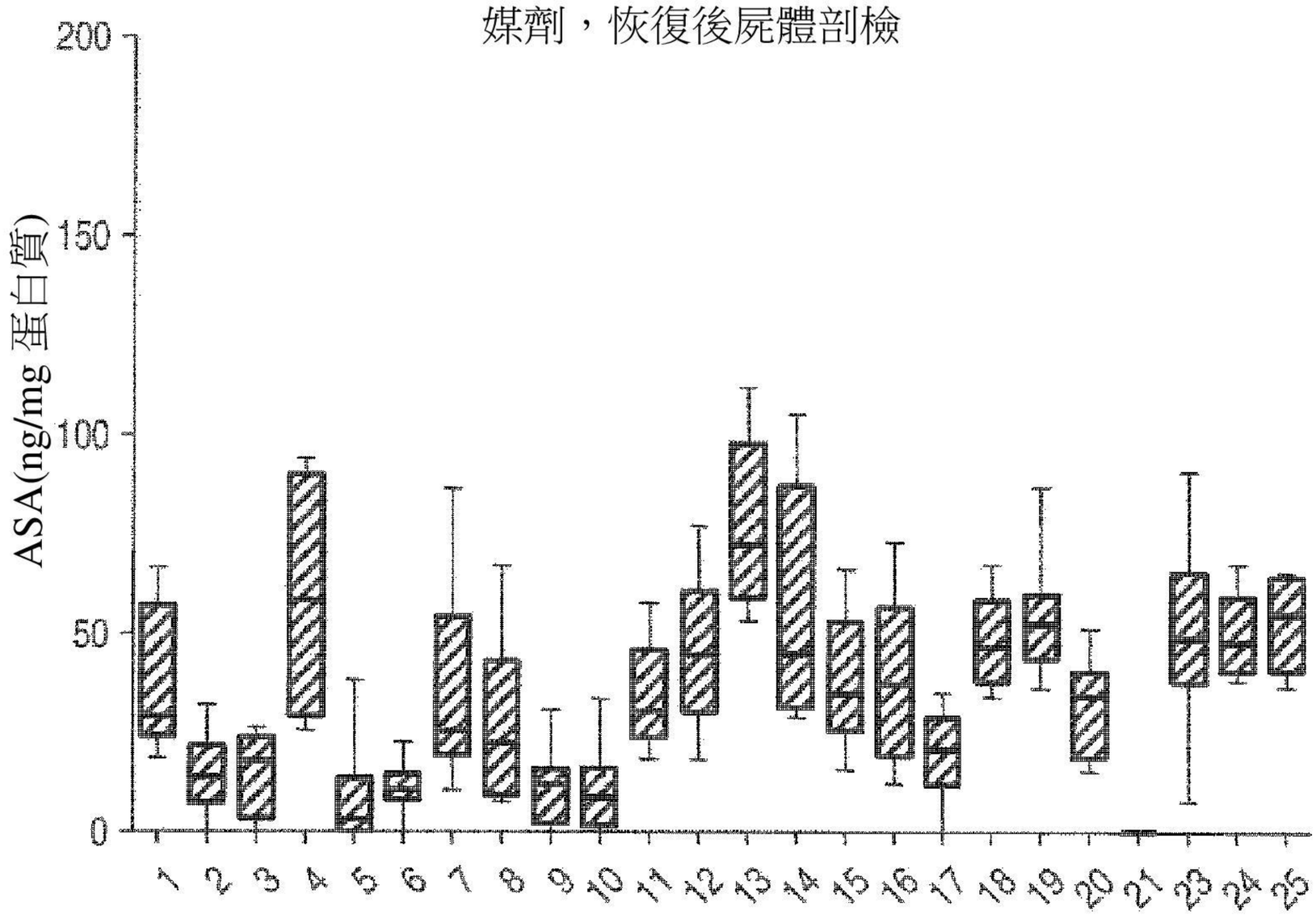

18.6 mg 劑量，主要屍體剖檢
ASA(ng/mg 蛋白質)
5000
4000
3000
2000
1000
1000
800
600
400
200
200
150
100
50
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 23 24 25
鑽孔編號

【圖26】


裝置對照，恢復後屍體剖檢
ASA(ng/mg 蛋白質)
200
150
100
50
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 23 24 25
鑽孔編號

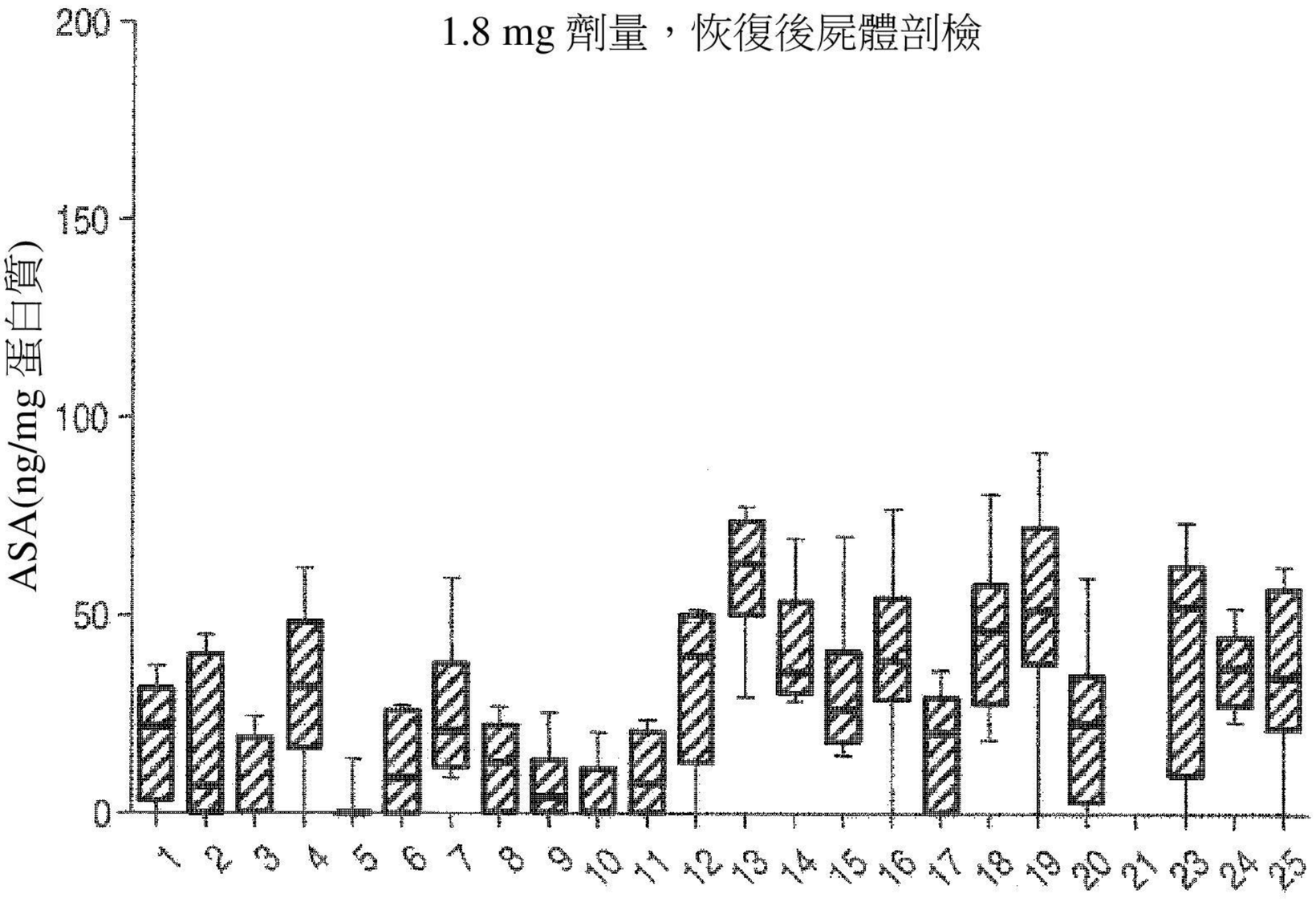
【圖27】

媒劑，恢復後屍體剖檢



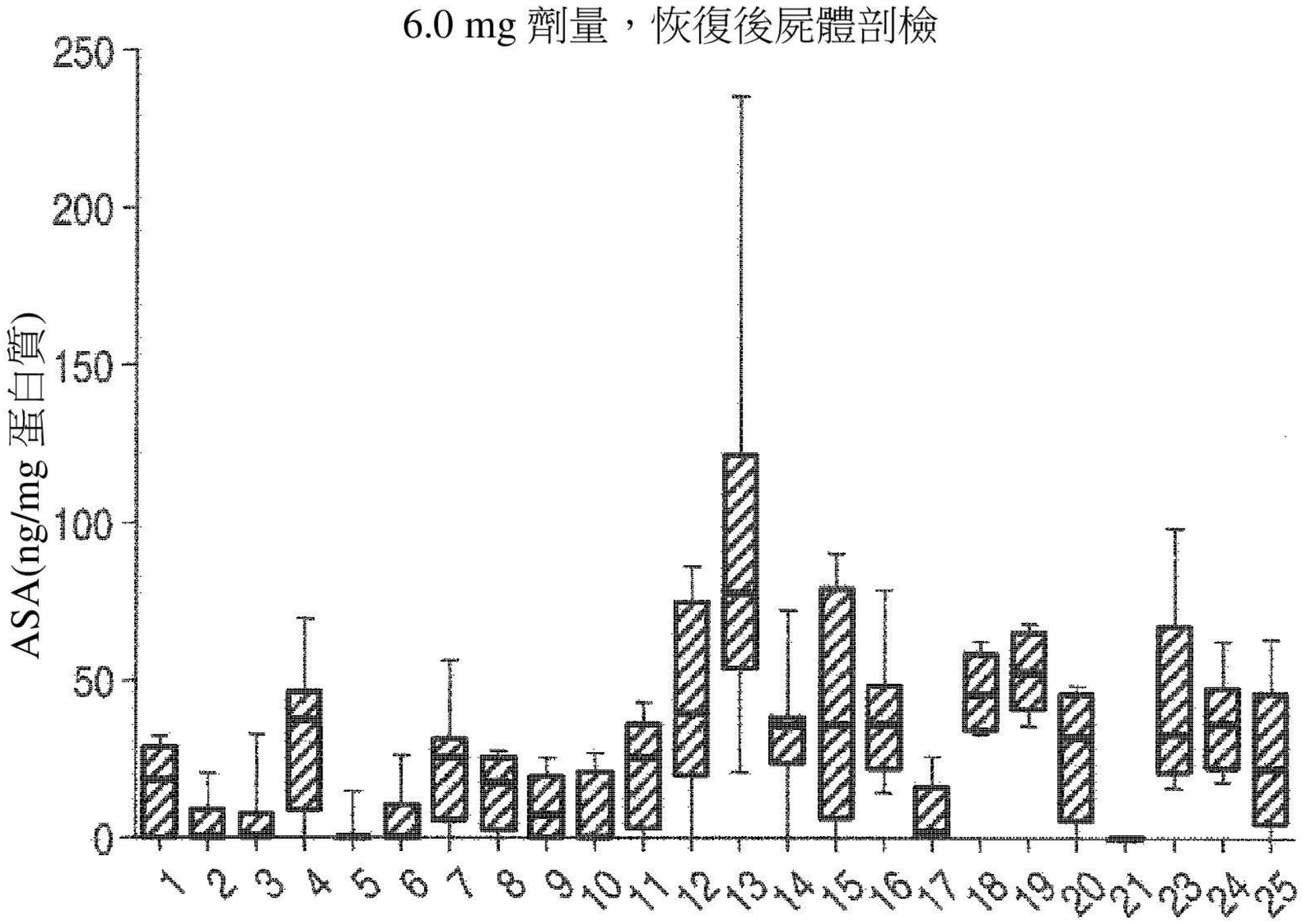
【圖28】

1.8 mg 劑量，恢復後屍體剖檢



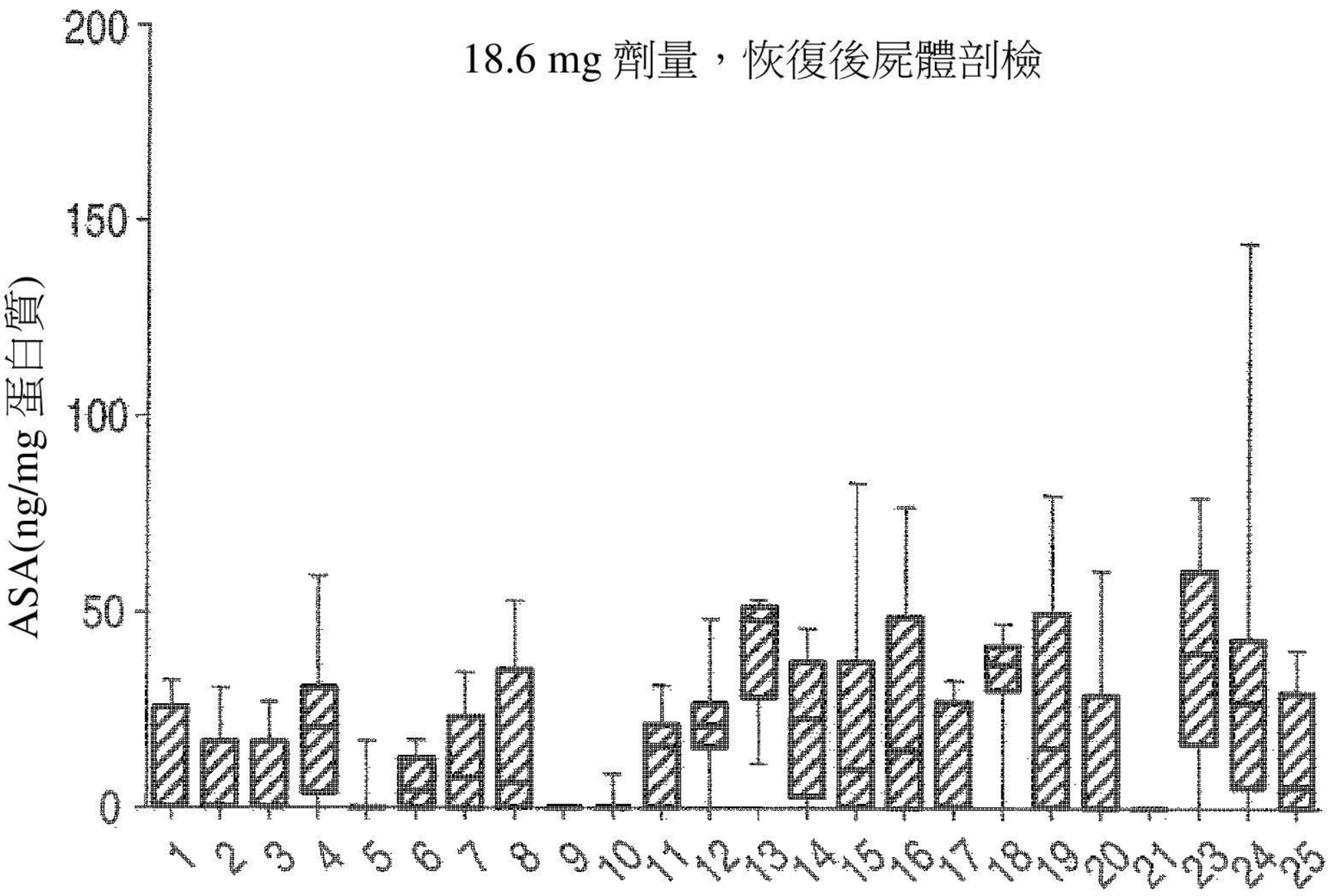
【圖29】

6.0 mg 劑量，恢復後屍體剖檢

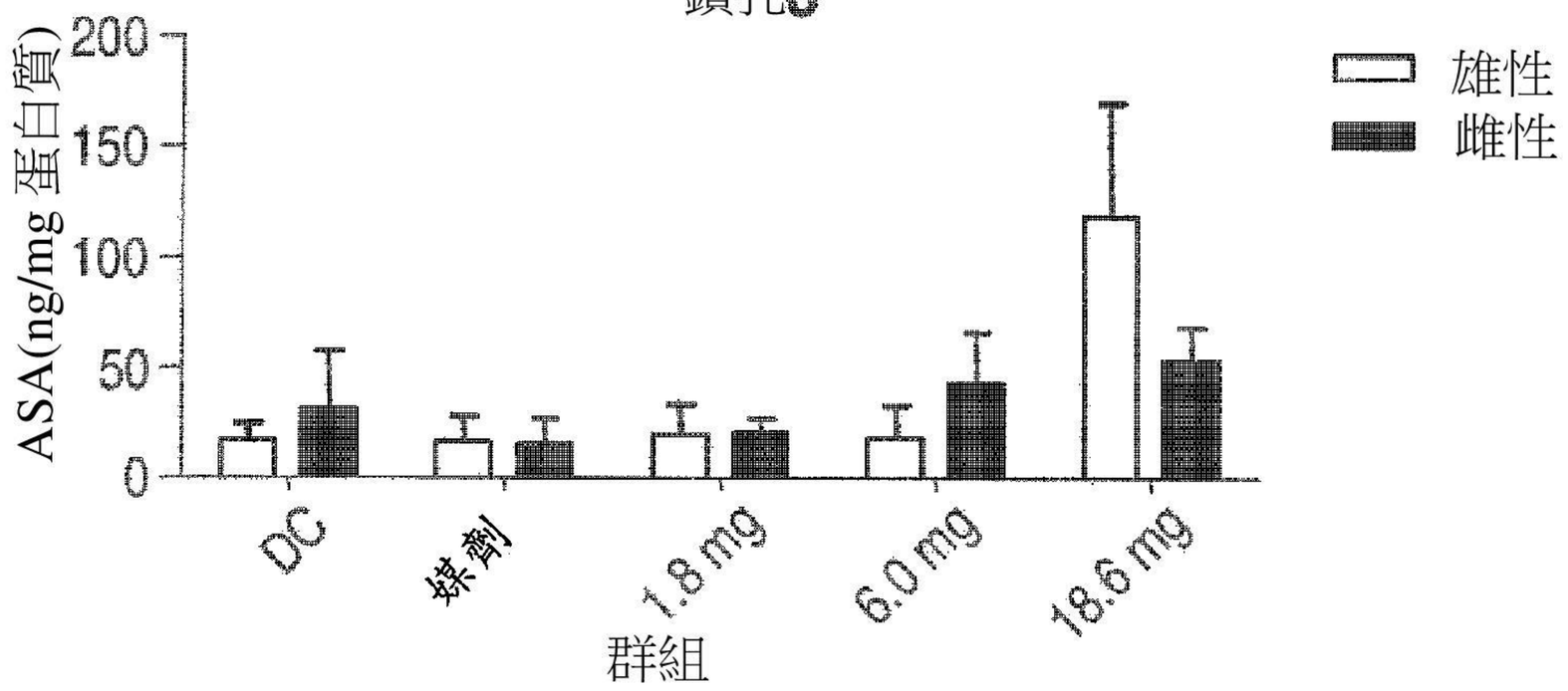


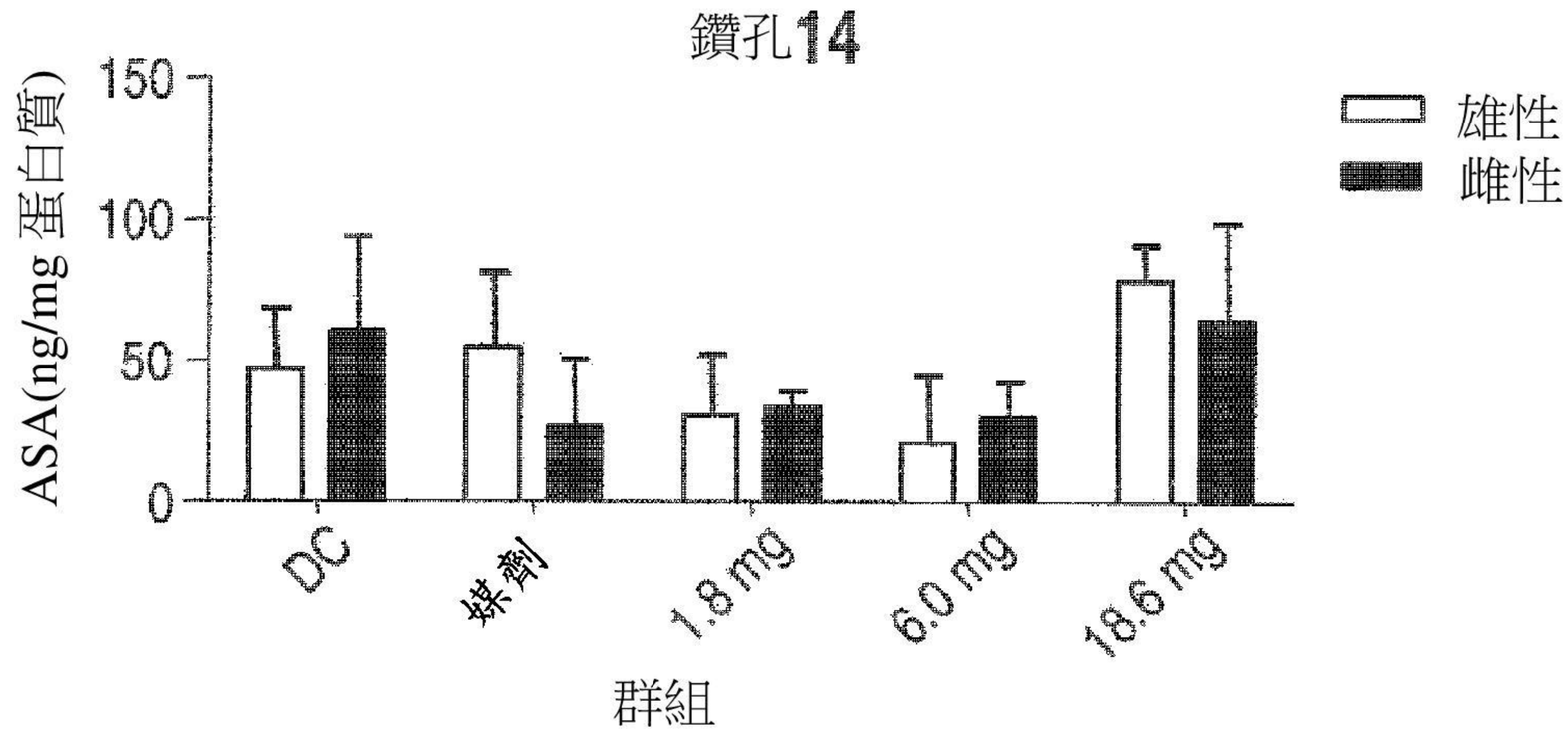
【圖30】

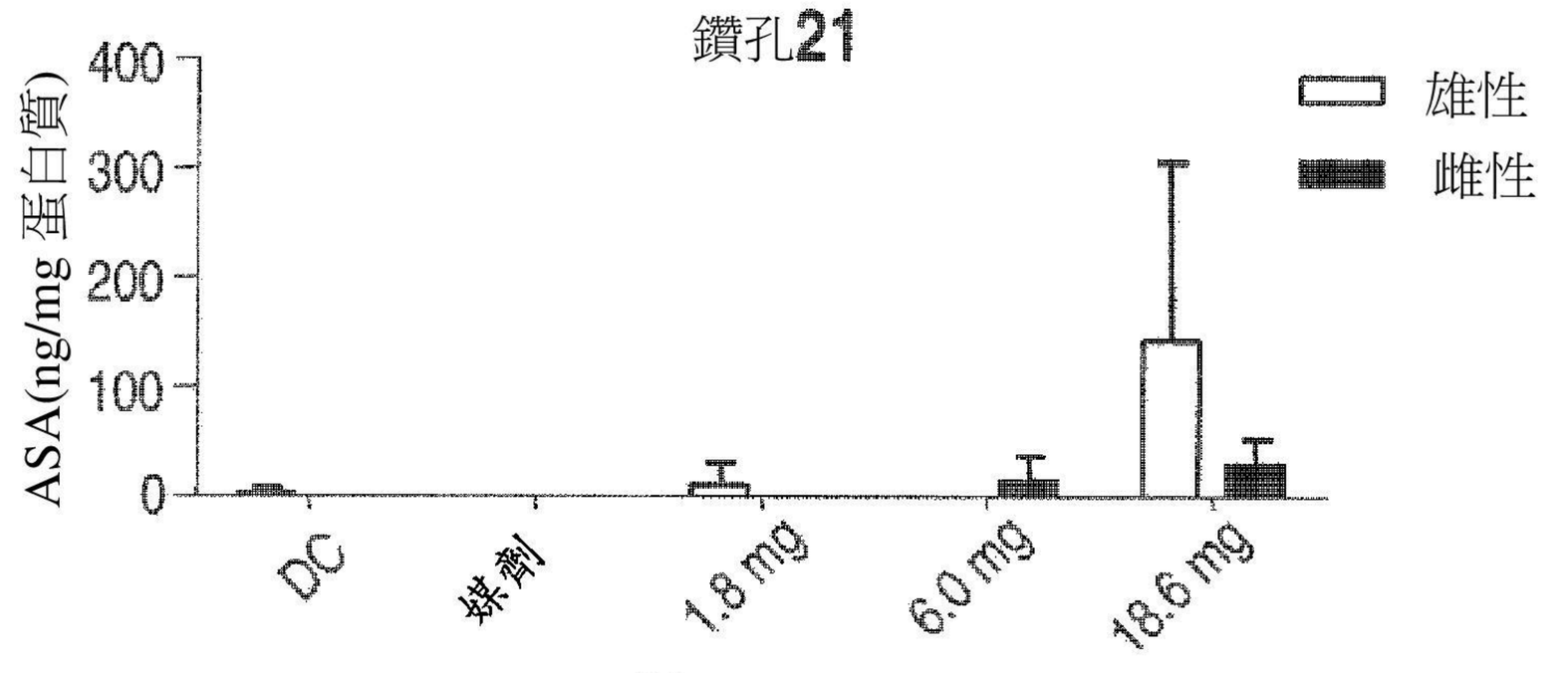
18.6 mg 劑量，恢復後屍體剖檢



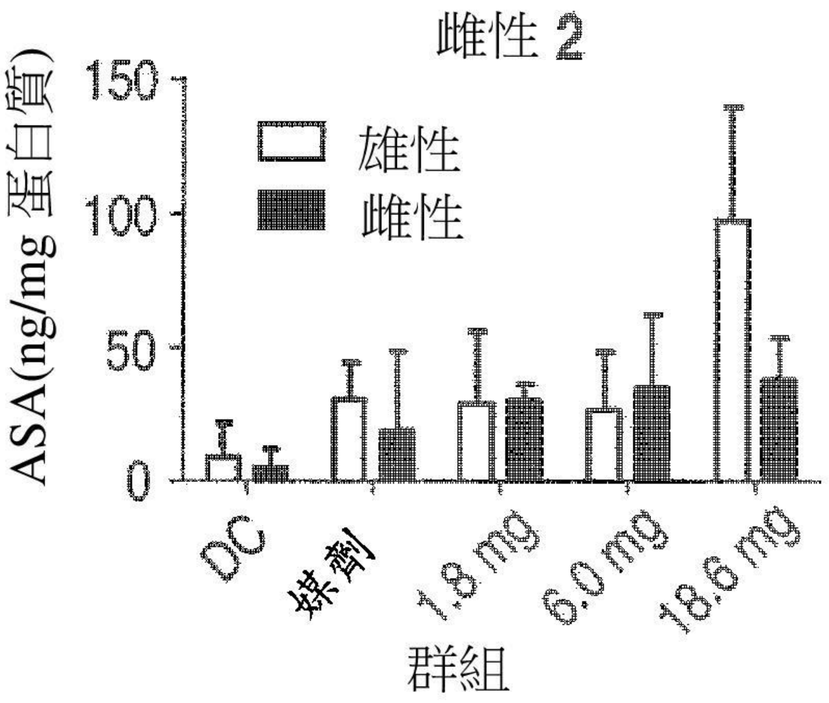
【圖31】

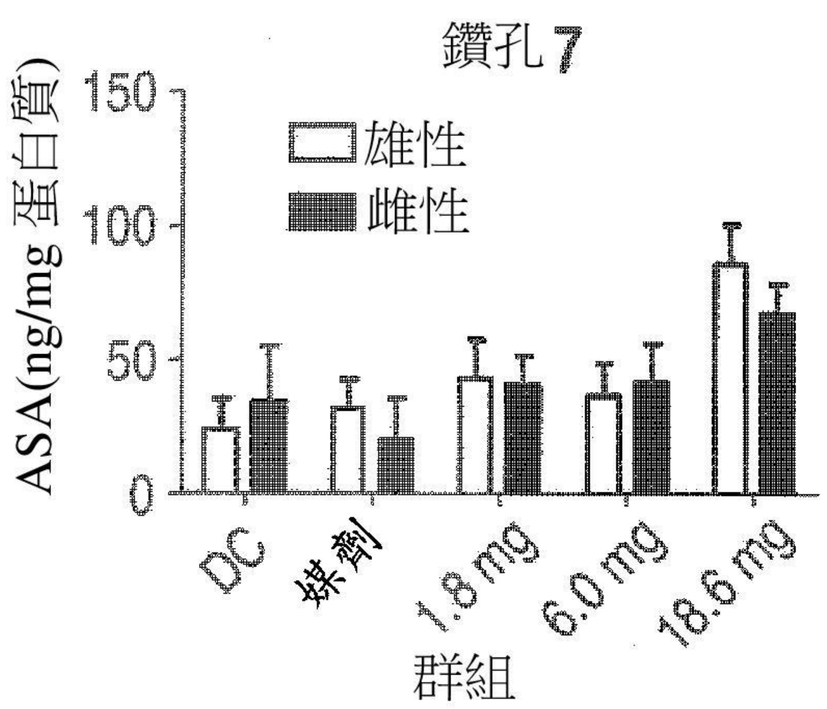

鑽孔8
ASA(ng/mg 蛋白質)
200
150
100
50
0
DC
媒劑
1.8 mg
6.0 mg
18.6 mg
群組
雄性
雌性

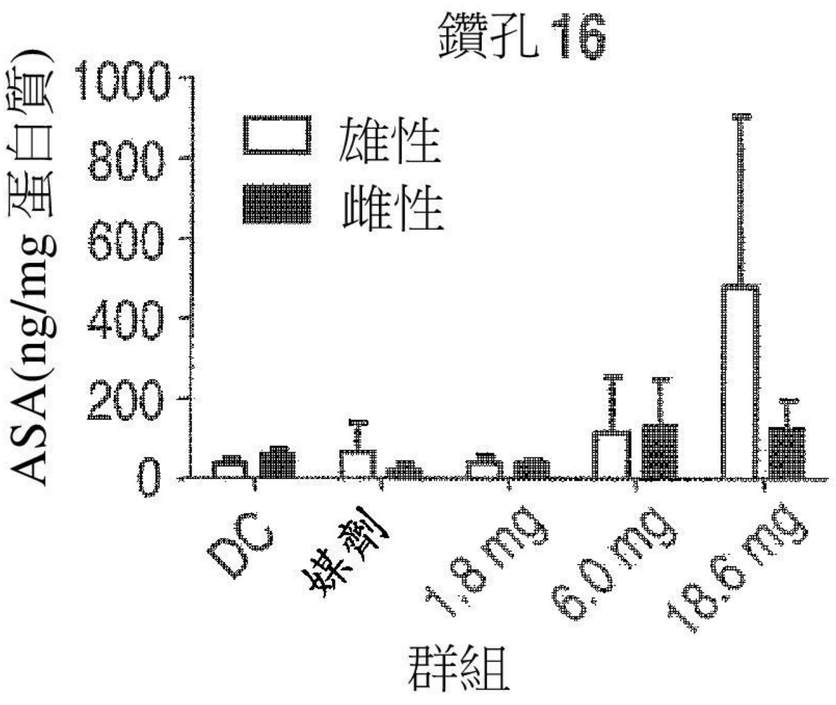

鑽孔14
ASA(ng/mg 蛋白質)
150
100
50
0
DC
媒劑
1.8 mg
6.0 mg
18.6 mg
群組
雄性
雌性

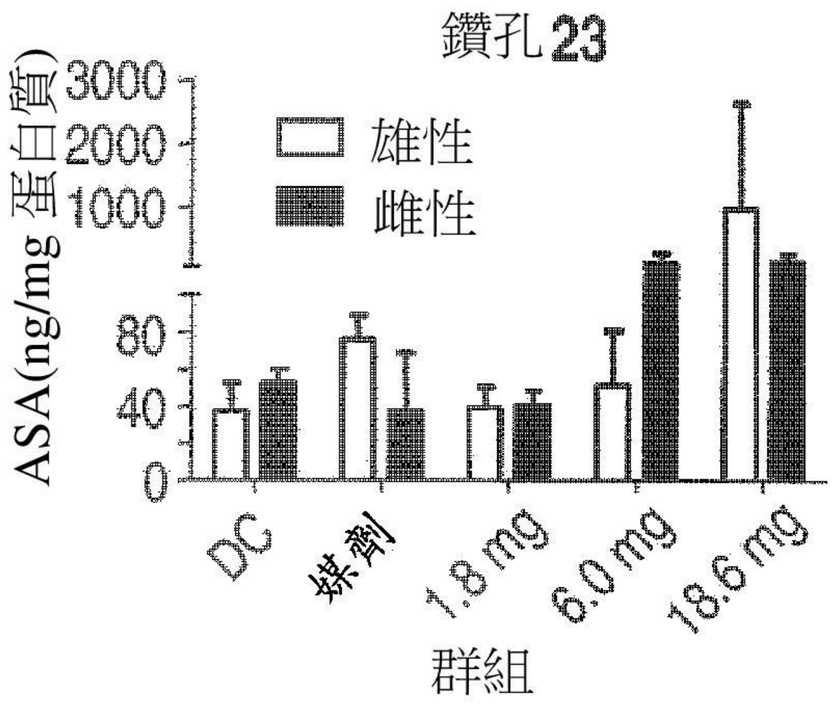

鑽孔21
ASA(ng/mg 蛋白質)
400
300
200
100
0
DC
媒劑
1.8 mg
6.0 mg
18.6 mg
群組
雄性
雌性

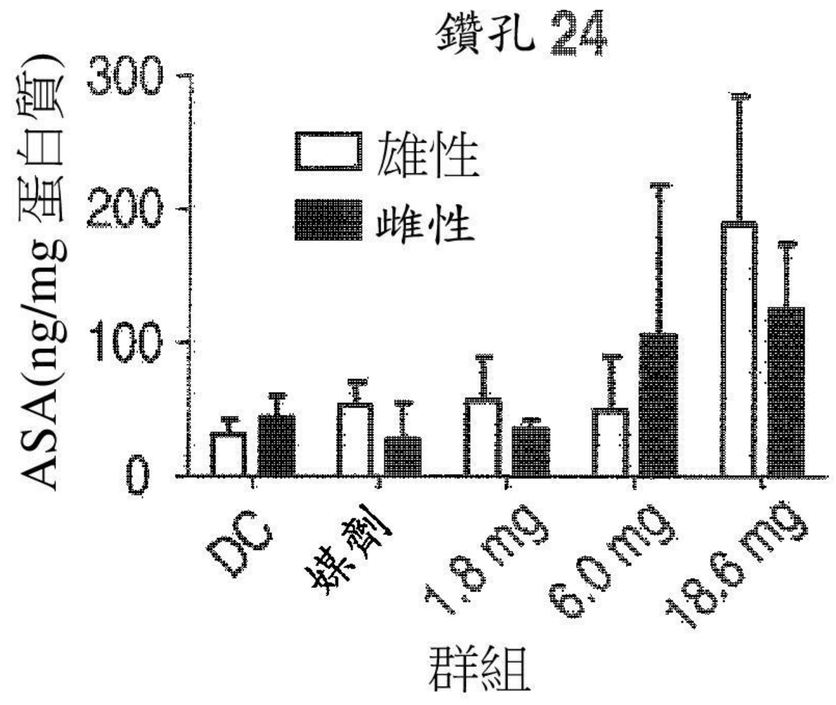
【圖32】


雌性 2
ASA(ng/mg 蛋白質)
150
100
50
0
雄性
雌性
DC
媒劑
1.8 mg
6.0 mg
18.6 mg
群組

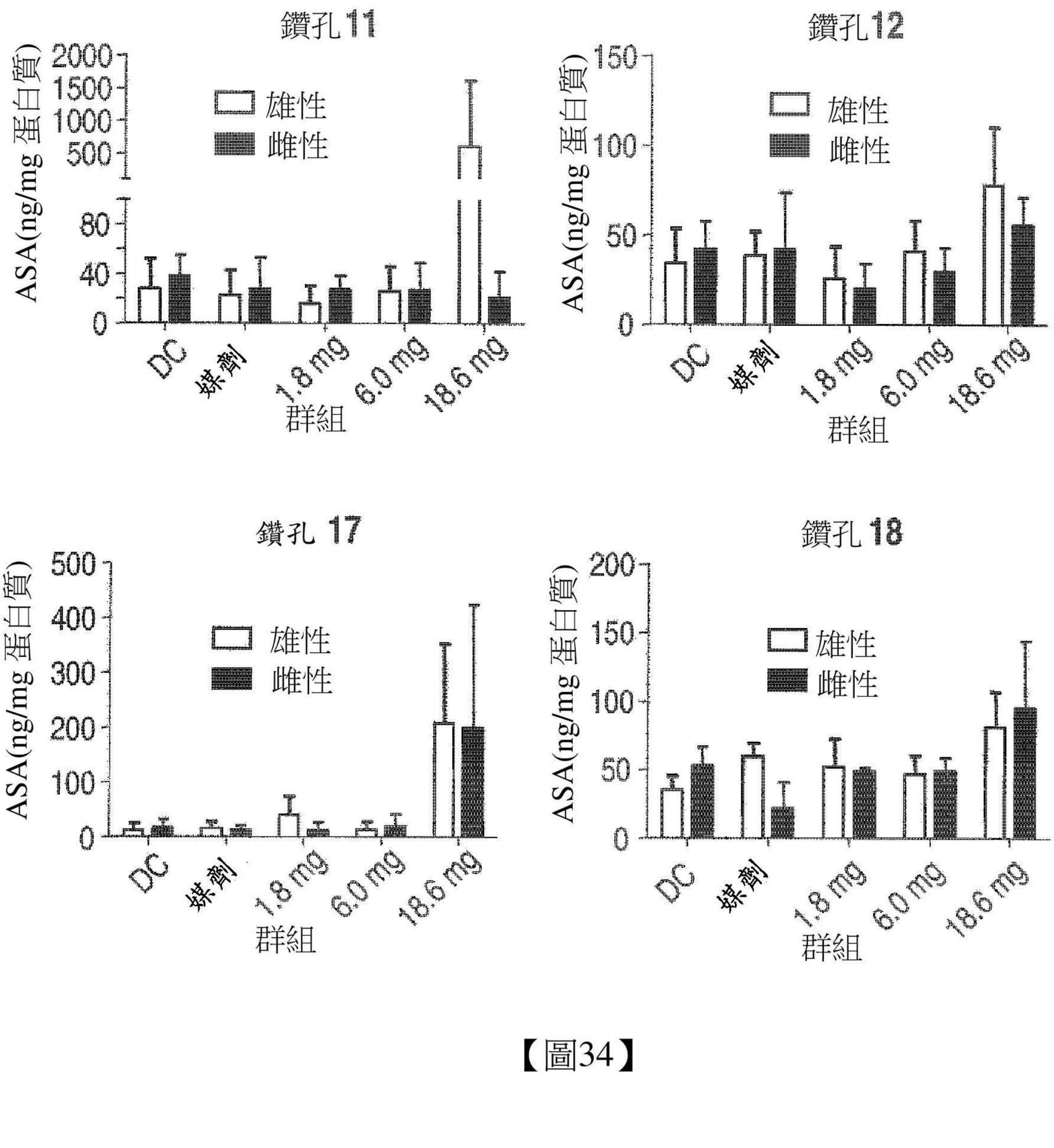

鑽孔 7
ASA(ng/mg 蛋白質)
150
100
50
0
雄性
雌性
DC
媒劑
1.8 mg
6.0 mg
18.6 mg
群組


鑽孔 16
ASA(ng/mg 蛋白質)
1000
800
600
400
200
0
雄性
雌性
DC
媒劑
1.8 mg
6.0 mg
18.6 mg
群組

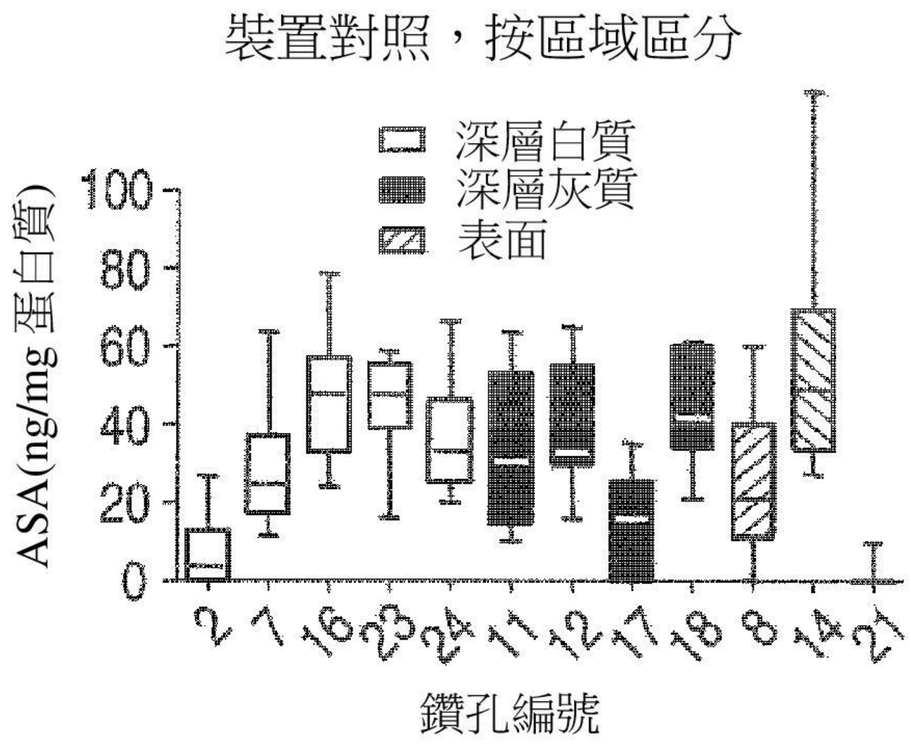

鑽孔 23
ASA(ng/mg 蛋白質)
3000
2000
1000
80
40
0
雄性
雌性
DC
媒劑
1.8 mg
6.0 mg
18.6 mg
群組

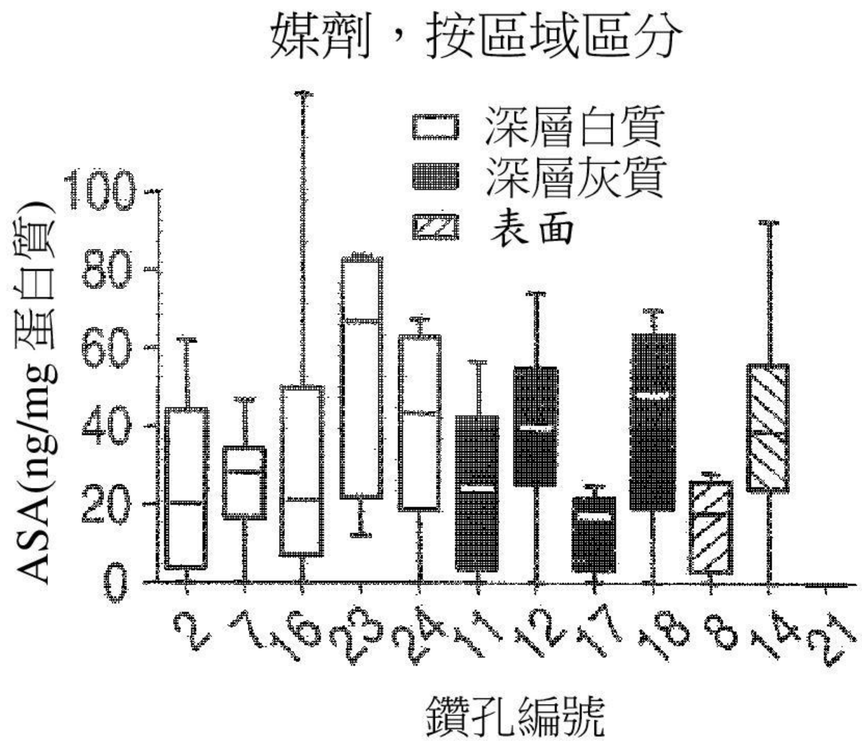

鑽孔 24
ASA(ng/mg 蛋白質)
300
200
100
0
雄性
雌性
DC
媒劑
1.8 mg
6.0 mg
18.6 mg
群組

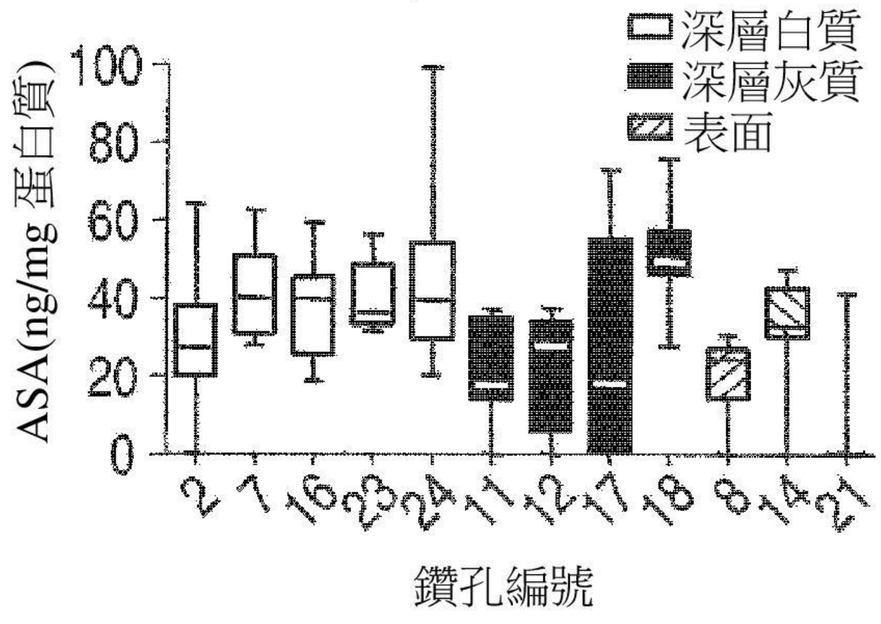
【圖33】

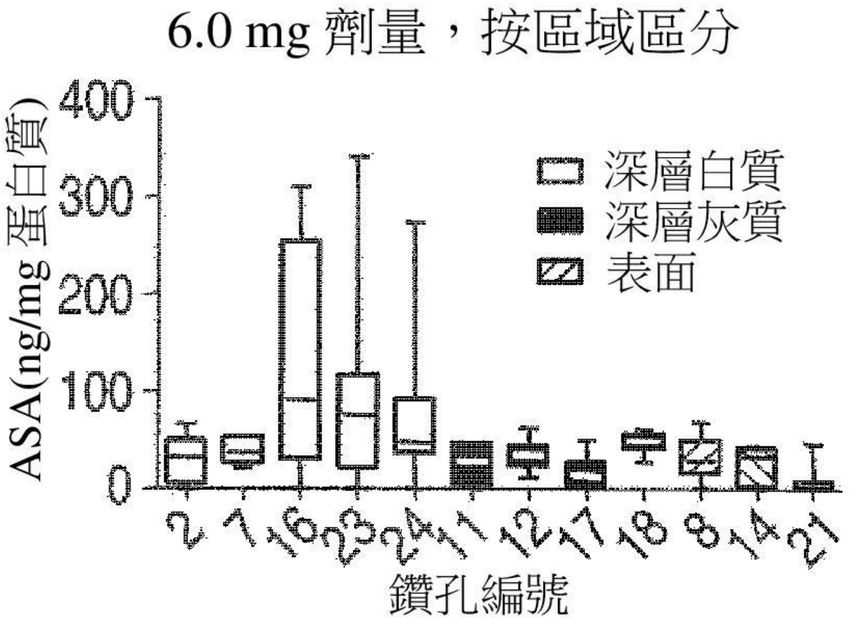


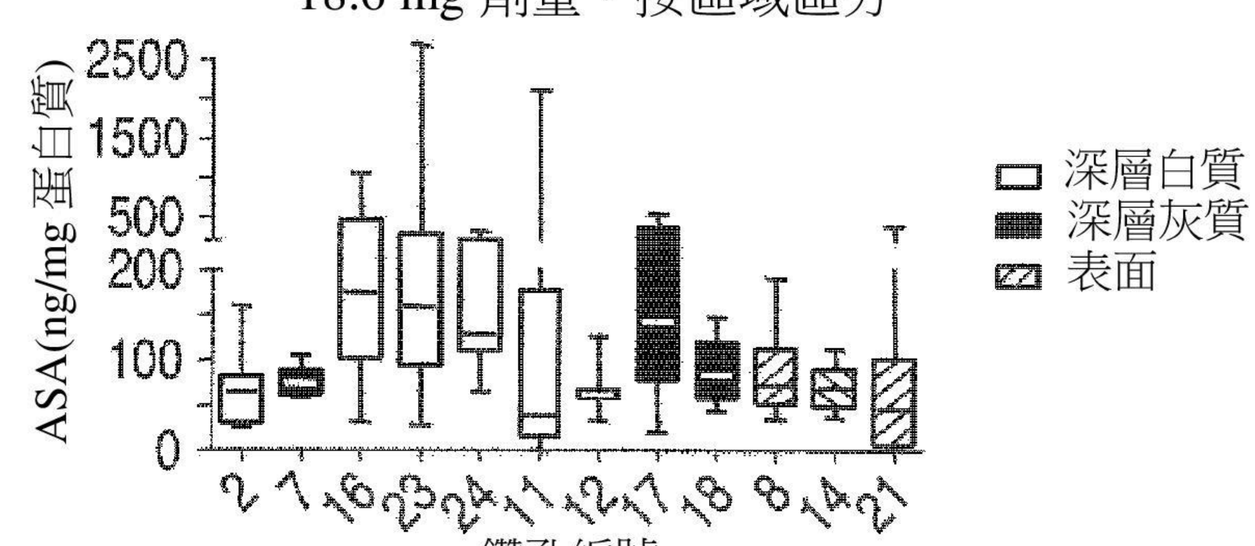
【圖34】


裝置對照，按區域區分
深層白質
深層灰質
表面
ASA(ng/mg 蛋白質)
100
80
60
40
20
0
2 1 16 23 24 11 12 17 18 8 14 21
鑽孔編號

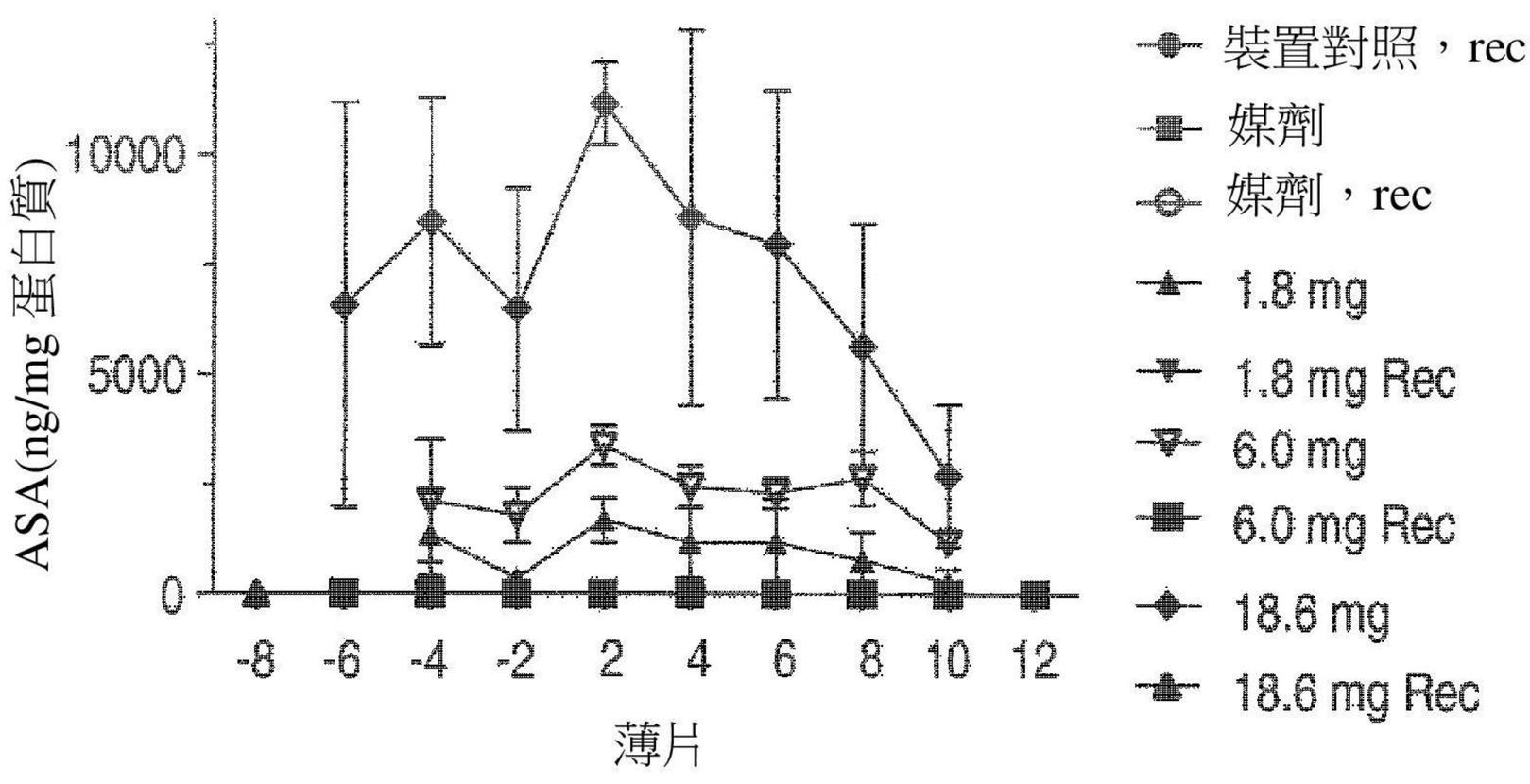

媒劑，按區域區分
深層白質
深層灰質
表面
ASA(ng/mg 蛋白質)
100
80
60
40
20
0
2 1 16 23 24 11 12 17 18 8 14 21
鑽孔編號

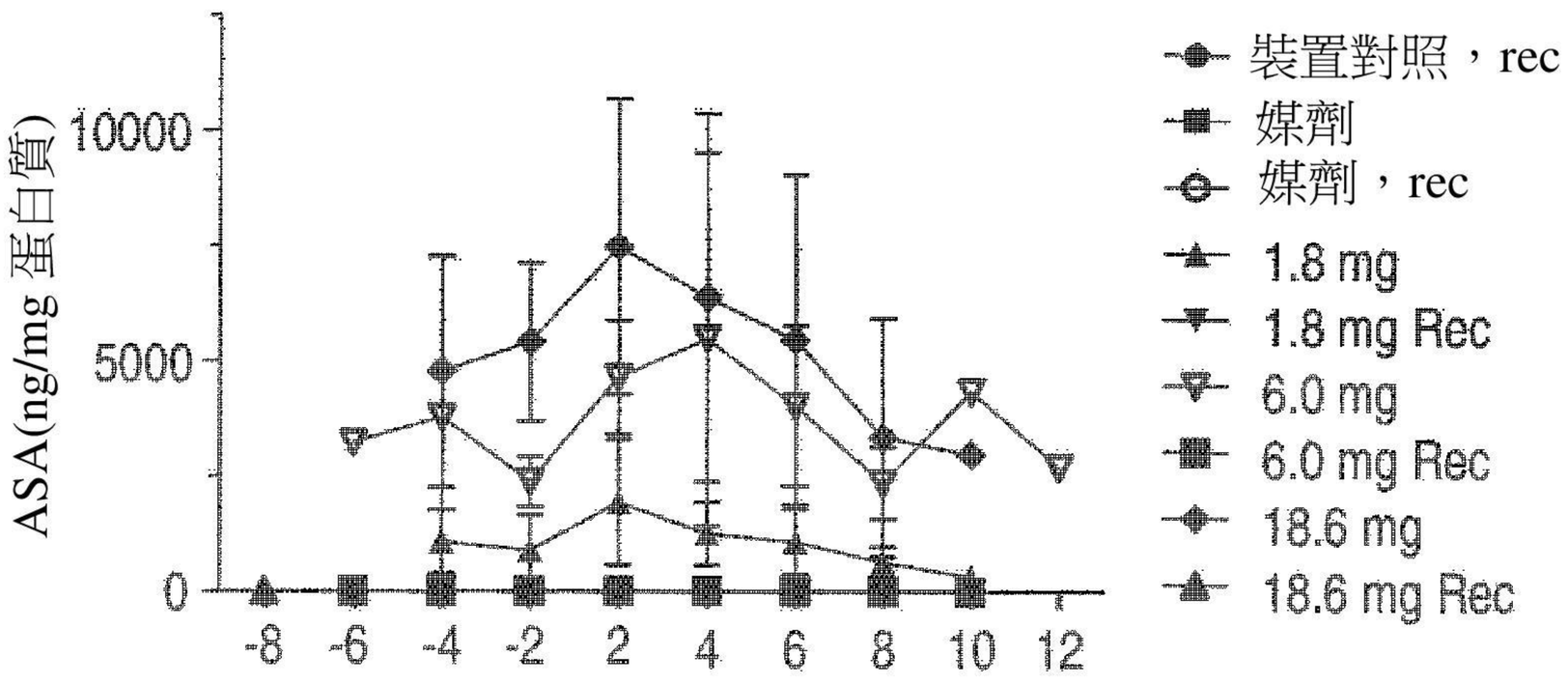

1.8 mg 劑量，按區域區分
深層白質
深層灰質
表面
ASA(ng/mg 蛋白質)
100
80
60
40
20
0
2 1 16 23 24 11 12 17 18 8 14 21
鑽孔編號


6.0 mg 劑量，按區域區分
深層白質
深層灰質
表面
ASA(ng/mg 蛋白質)
400
300
200
100
0
2 1 16 23 24 11 12 17 18 8 14 21
鑽孔編號

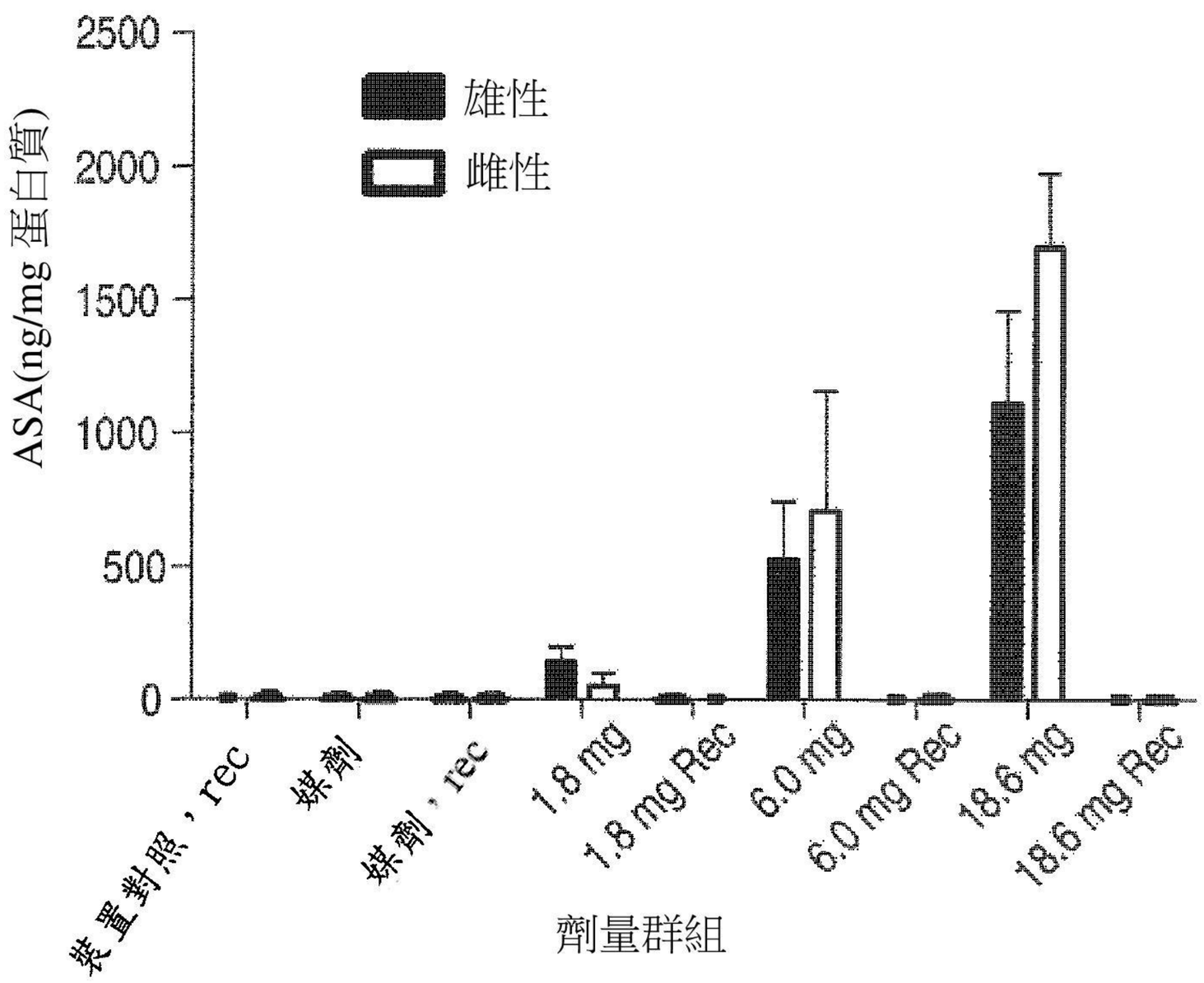

18.6 mg 劑量，按區域區分
深層白質
深層灰質
表面
ASA(ng/mg 蛋白質)
2500
1500
500
200
100
0
2 1 16 23 24 11 12 17 18 8 14 21
鑽孔編號

【圖35】


ASA(ng/mg 蛋白質)
10000
5000
0
-8
-6
-4
-2
2
4
6
8
10
12
薄片
裝置對照，rec
媒劑
媒劑，rec
1.8 mg
1.8 mg Rec
6.0 mg
6.0 mg Rec
18.6 mg
18.6 mg Rec


ASA(ng/mg 蛋白質)
10000
5000
0
-8
-6
-4
-2
2
4
6
8
10
12
薄片
裝置對照，rec
媒劑
媒劑，rec
1.8 mg
1.8 mg Rec
6.0 mg
6.0 mg Rec
18.6 mg
18.6 mg Rec

【圖36】

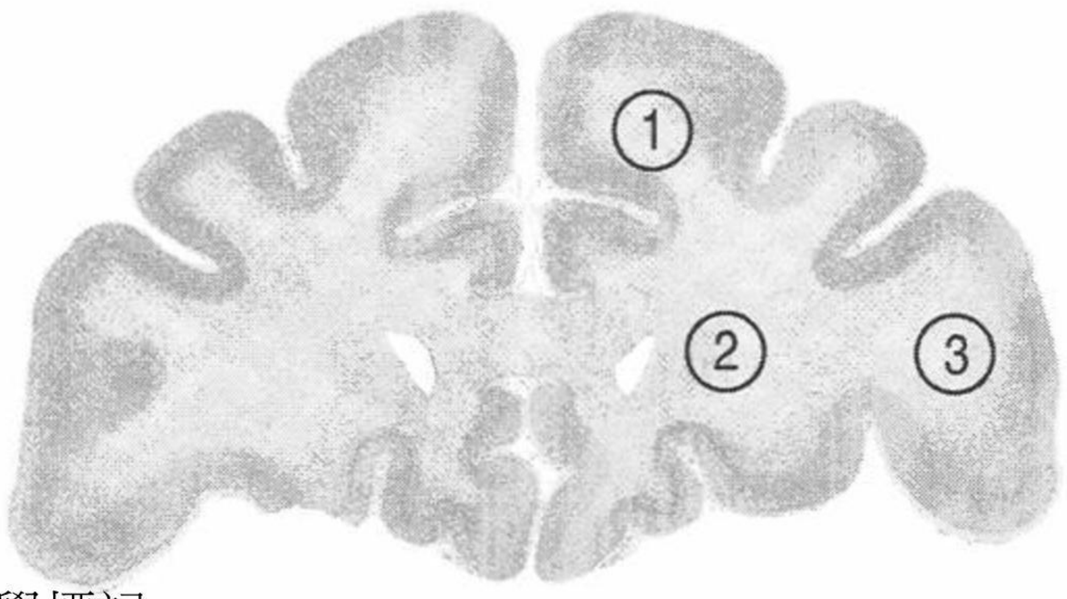

2500
2000
1500
1000
500
0
ASA(ng/mg 蛋白質)
雄性
雌性
裝置對照，rec
媒劑
媒劑，rec
1.8 mg
1.8 mg Rec
6.0 mg
6.0 mg Rec
18.6 mg
18.6 mg Rec
劑量群組

【圖37】

62-133

458 號

薄片 4



解剖學標記

1. 皮質下 WM
2. 腦室周圍 WM 及深層白質
3. 皮質下 WM

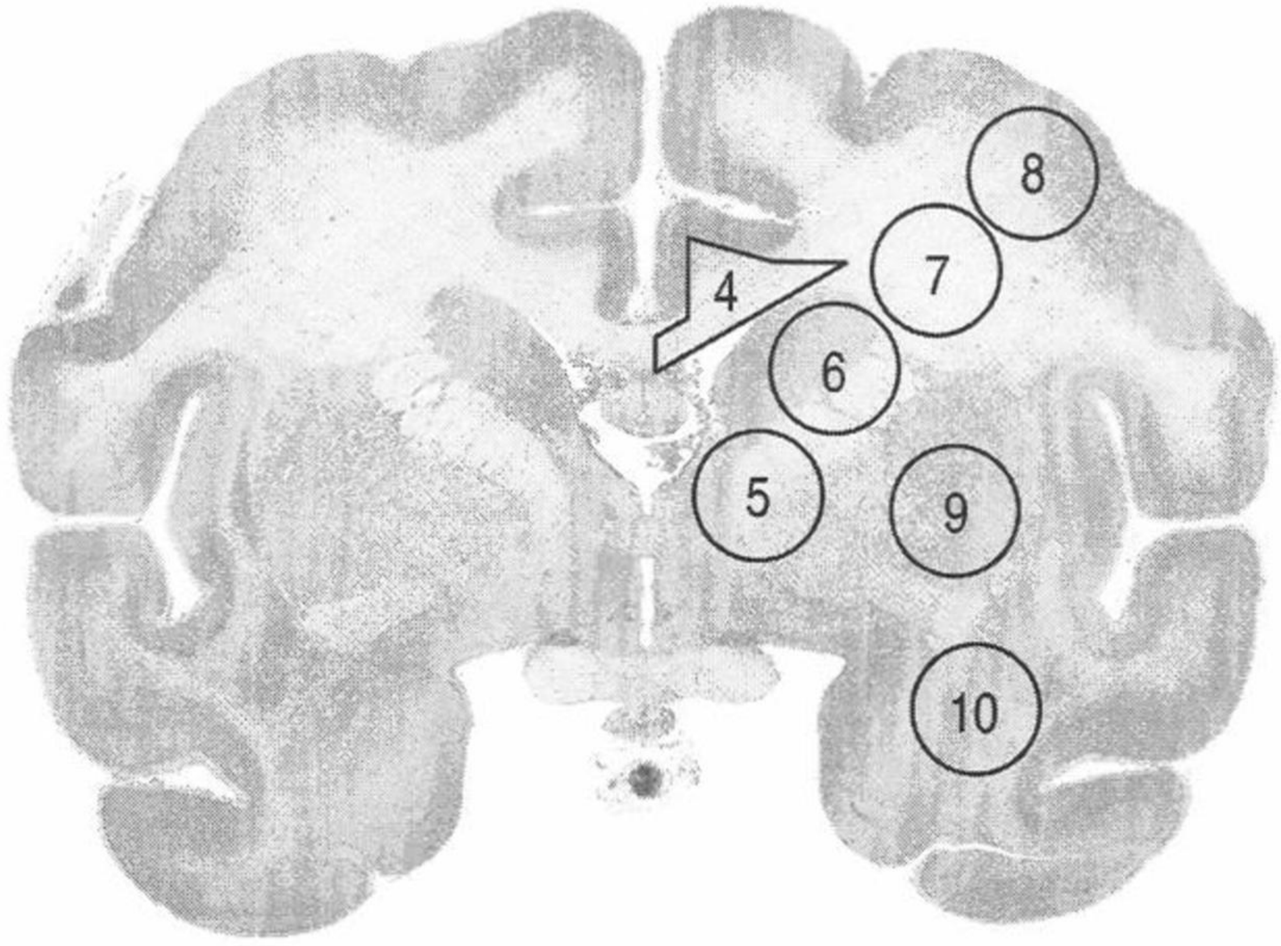
1 cm

【圖38】

62-133

薄片 6

780 號



1 cm

解剖學標記

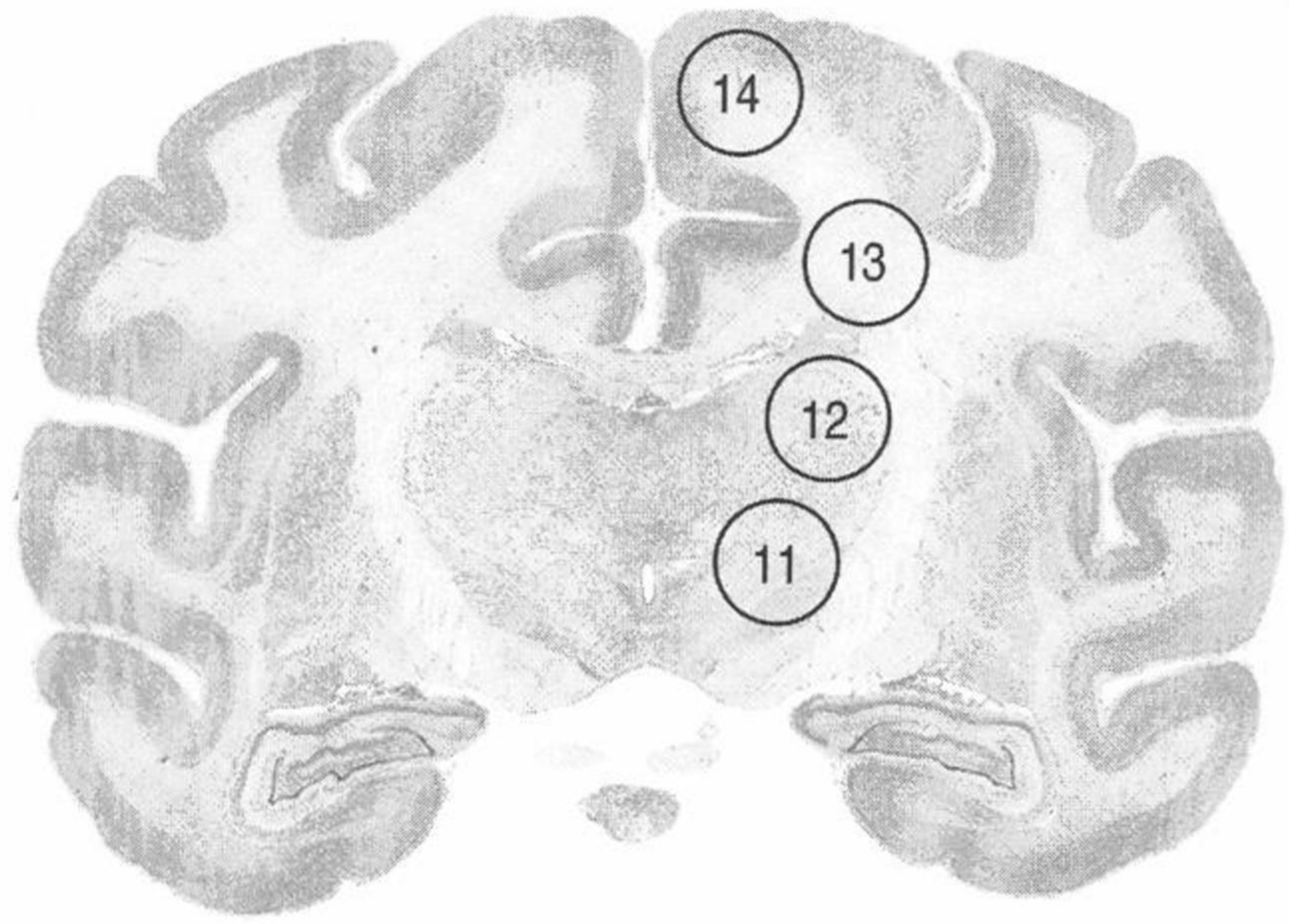
4. 胼胝體及胼胝體周皮質下 WM
5. 內囊，GPi
6. 內囊，尾狀核
7. 深層白質
8. 皮質下 WM 及皮質
9. 豆狀核殼
10. 顳顬皮質下 WM 及皮質

【圖39】

62-133

薄片 8

962 號



1 cm

解剖學標記

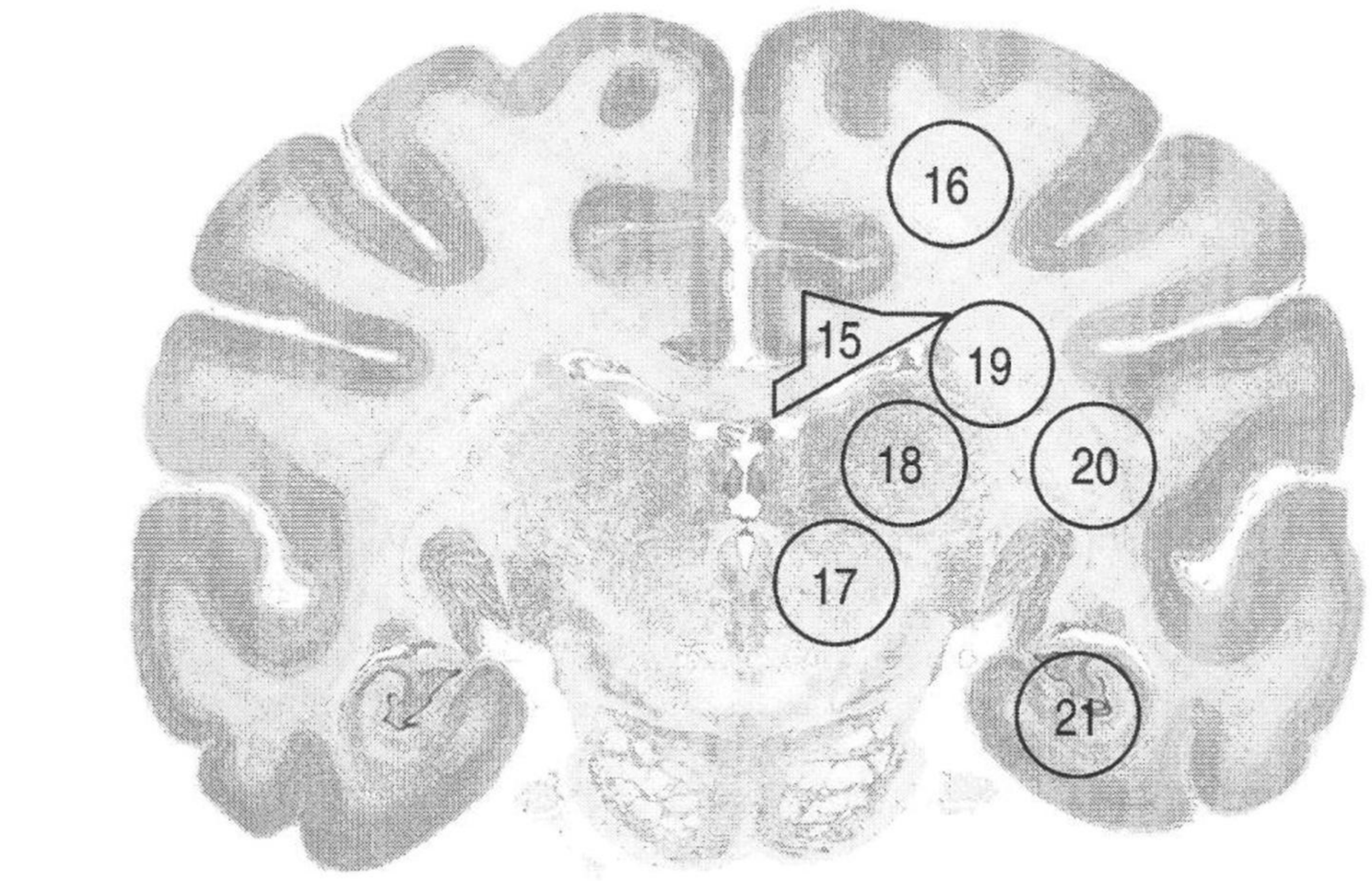
11. 深層灰質
12. 深層灰質
13. 深層 WM，前腦室周圍及皮質下
14. 皮質下白質及皮質，淺表矢狀位

【圖40】

62-133

薄片 10

1102 號



解剖學標記

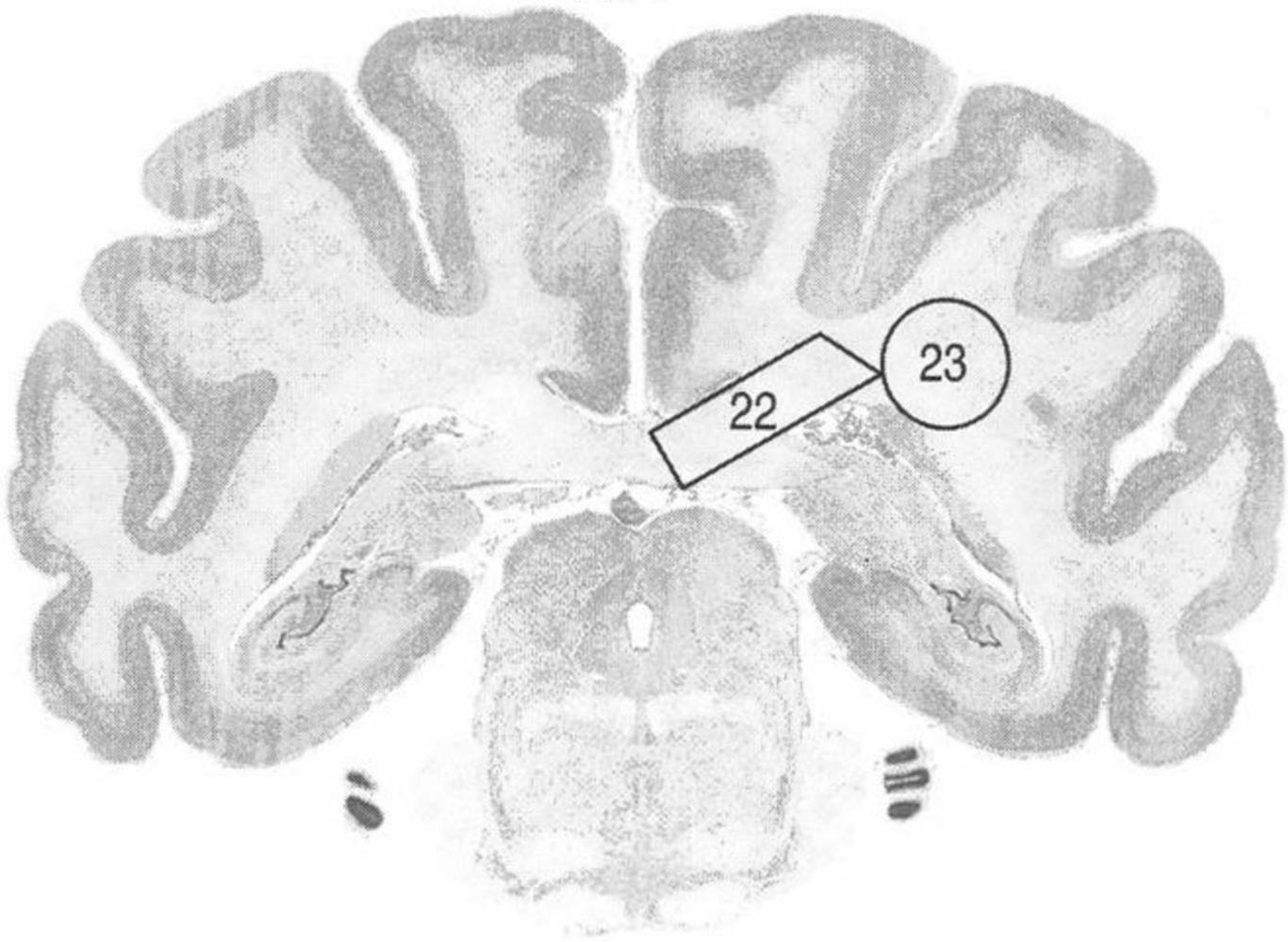
15. 胼胝體及胼胝體周皮質下 WM
16. 深層皮質下 WM
17. 深層灰質
18. 深層灰質
19. 腦室周圍 WM
20. 皮質下 WM
21. 海馬

【圖41】

62-133

薄片 12

1240 號



解剖學標記

22. 胼胝體

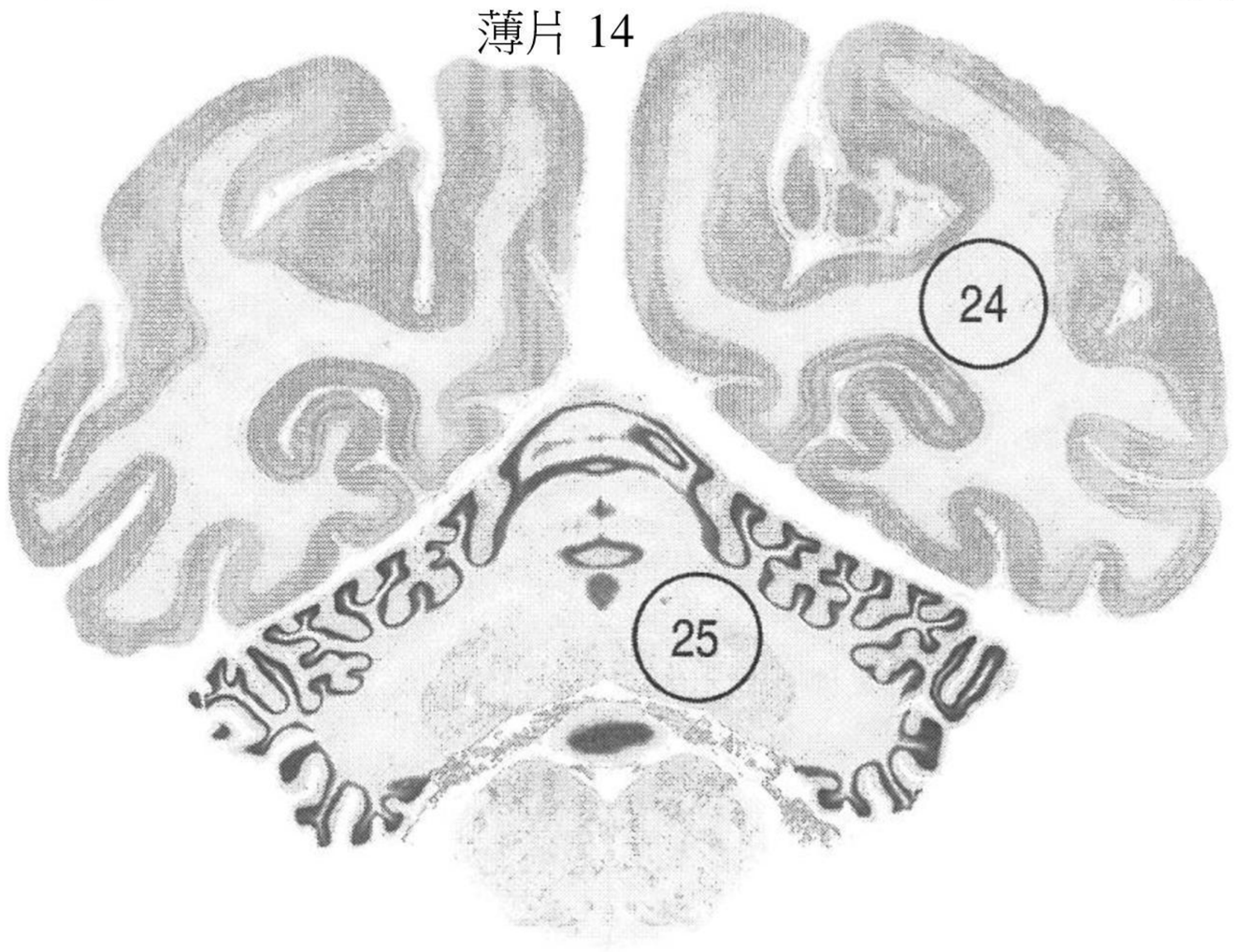
23. 深層 WM

【圖42】

62-133

1486 號

薄片 14

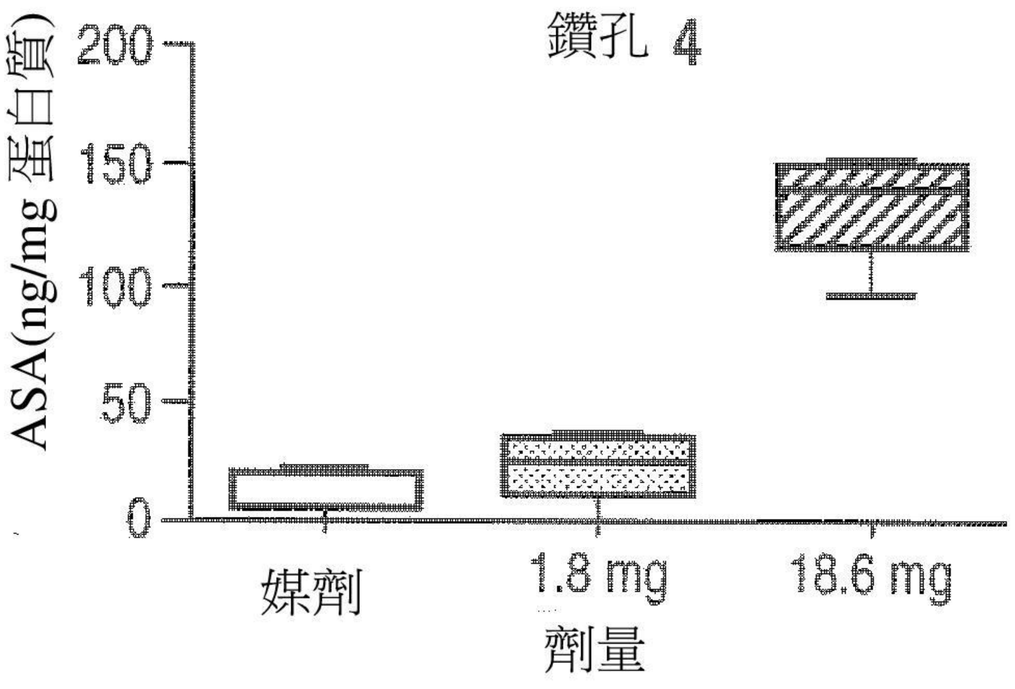


1 cm

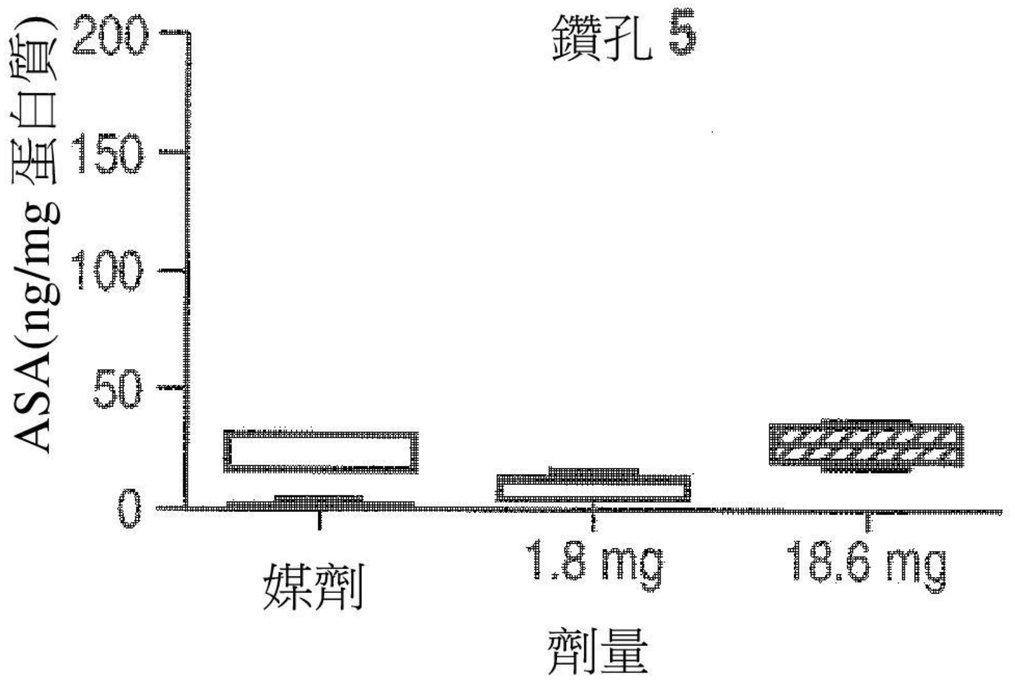
解剖學標記

24. 皮質下 WM，枕葉
25. 小腦白質，包括齒狀核(WM)

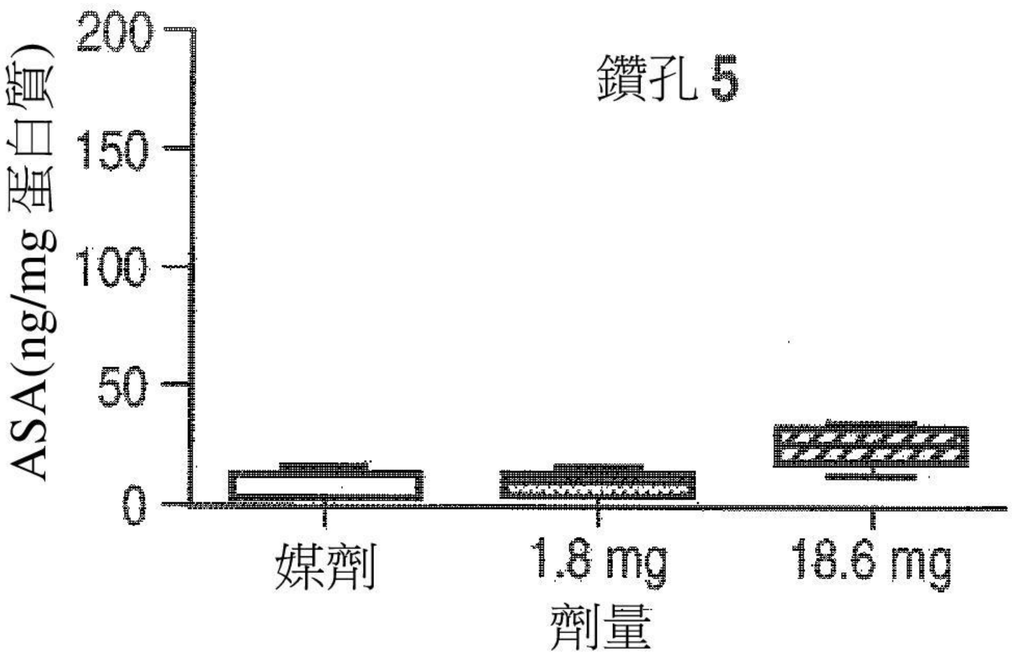
【圖43】



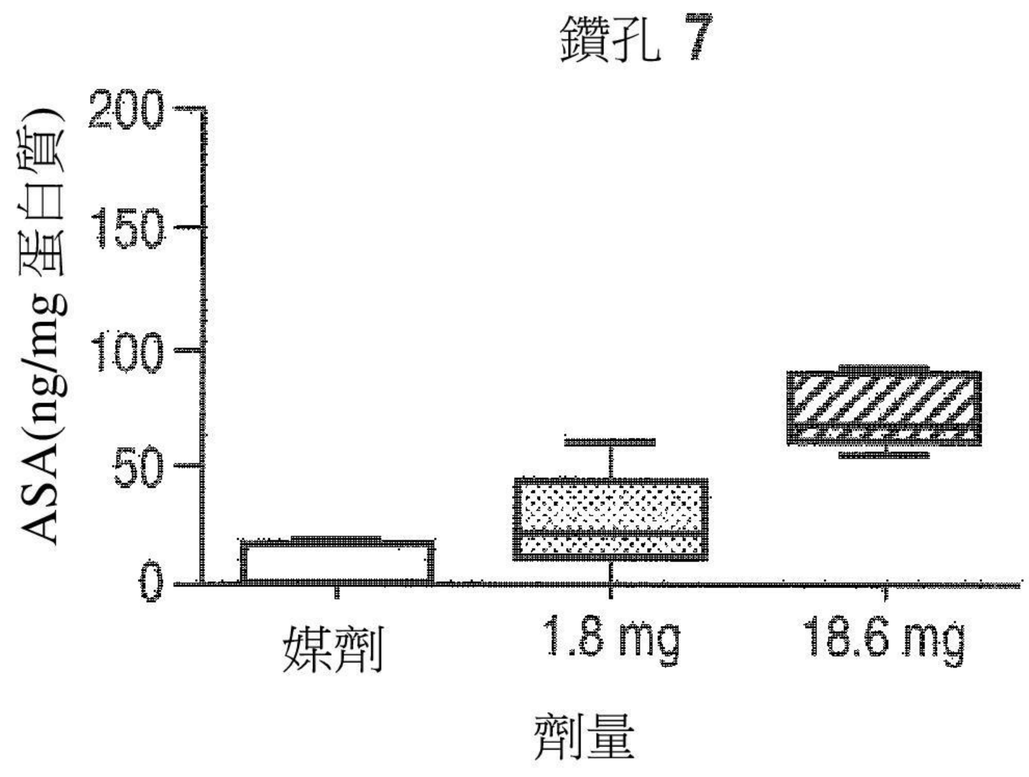
【圖44A】



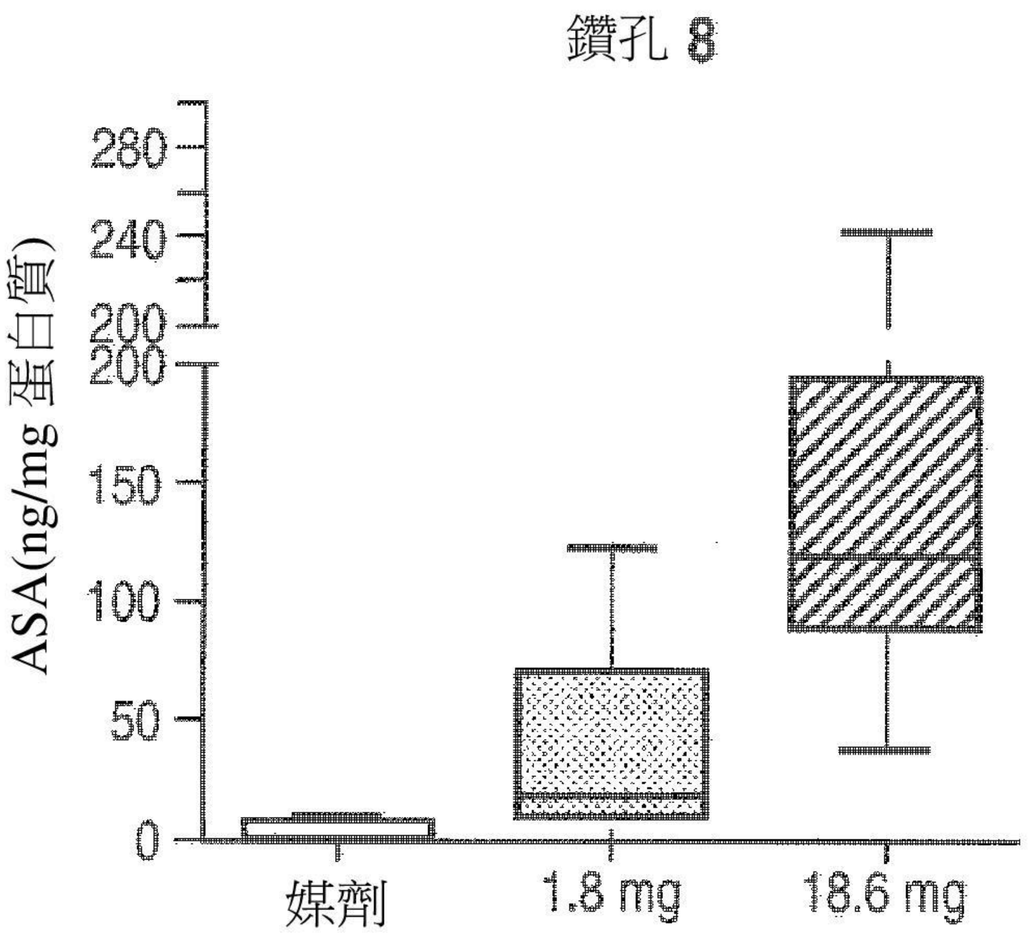
【圖44B】



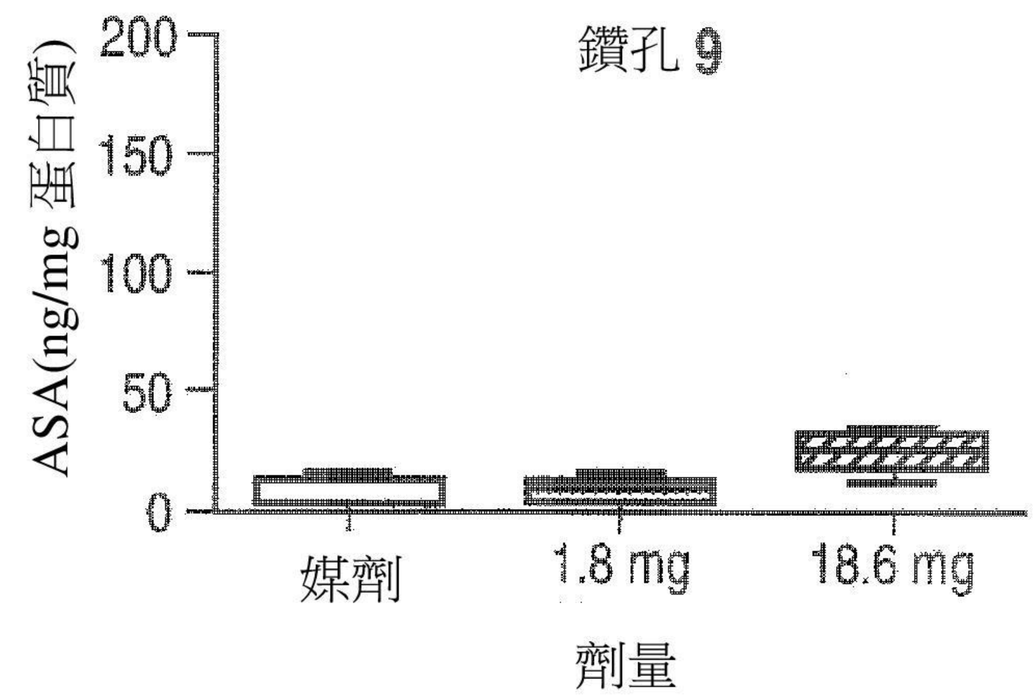
【圖44C】


鑽孔 7
ASA(ng/mg 蛋白質)
200
150
100
50
0
媒劑
1.8 mg
18.6 mg
劑量

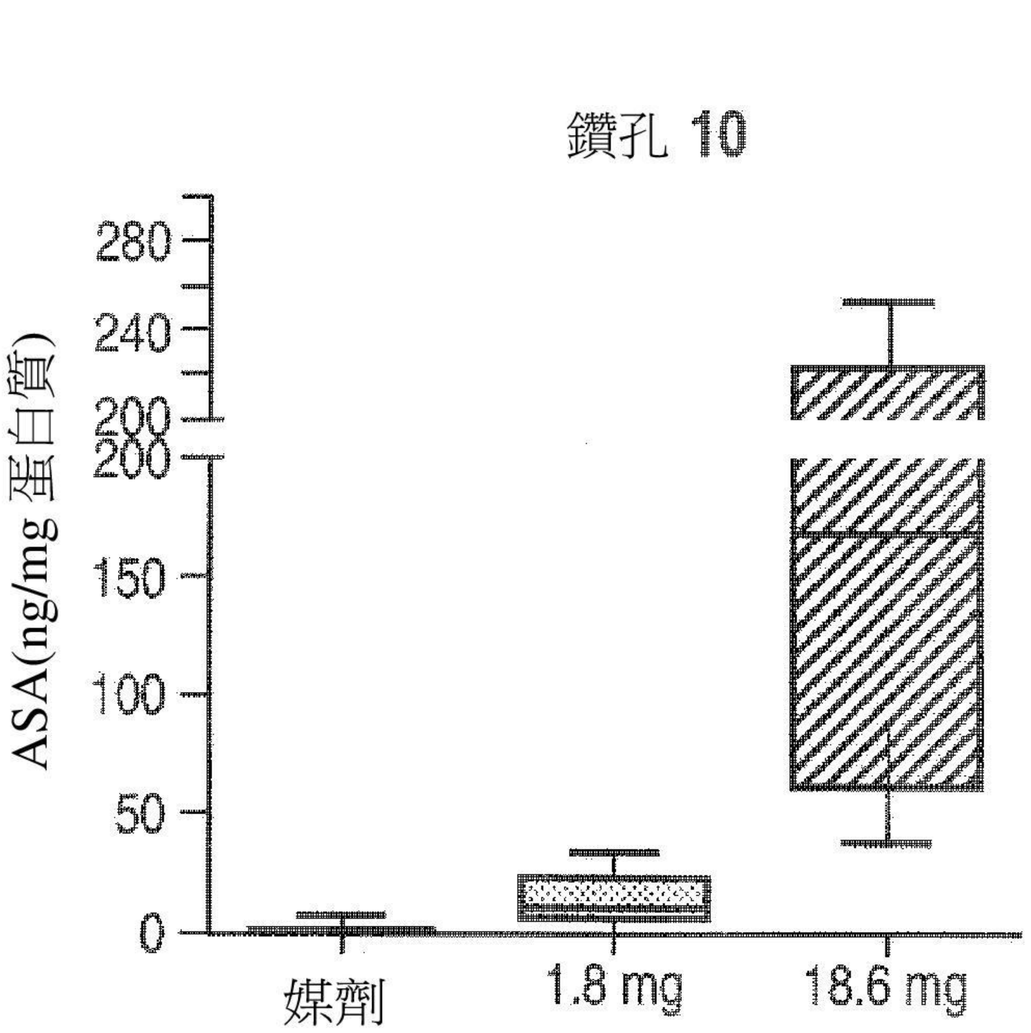
【圖44D】


鑽孔 8
ASA(ng/mg 蛋白質)
280
240
200
200
150
100
50
0
媒劑
1.8 mg
18.6 mg
劑量

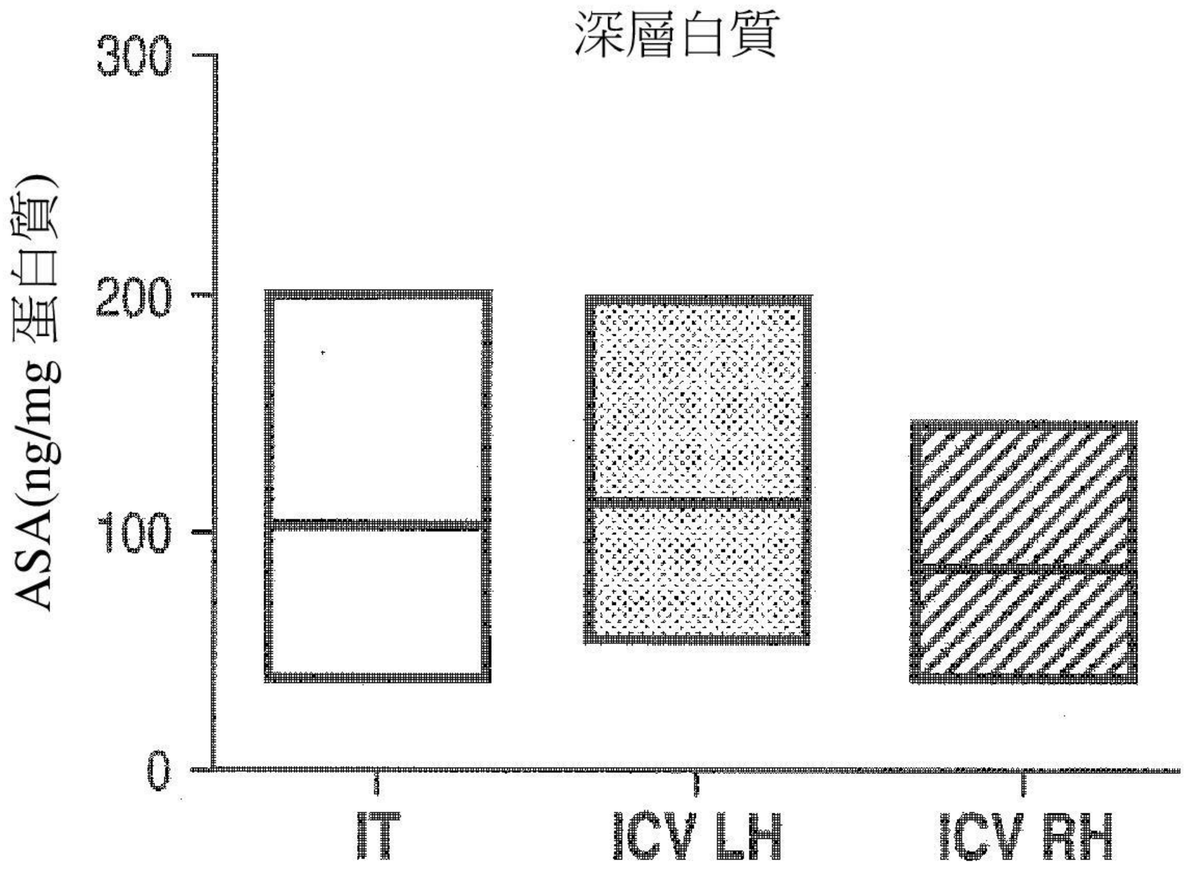
【圖44E】


鑽孔 9
ASA(ng/mg 蛋白質)
200
150
100
50
0
媒劑
1.8 mg
18.6 mg
劑量

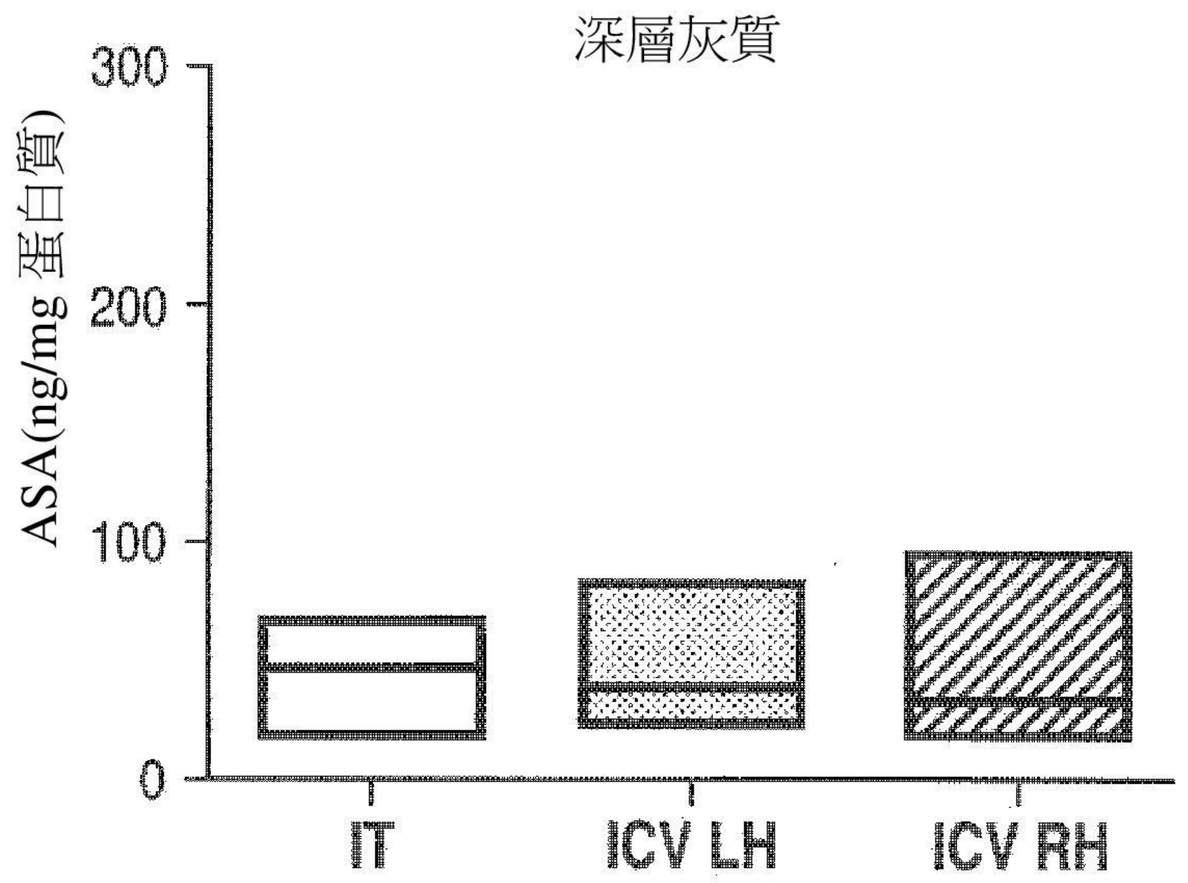
【圖44F】


鑽孔 10
ASA(ng/mg 蛋白質)
280
240
200
200
150
100
50
0
媒劑
1.8 mg
18.6 mg
劑量

【圖44G】

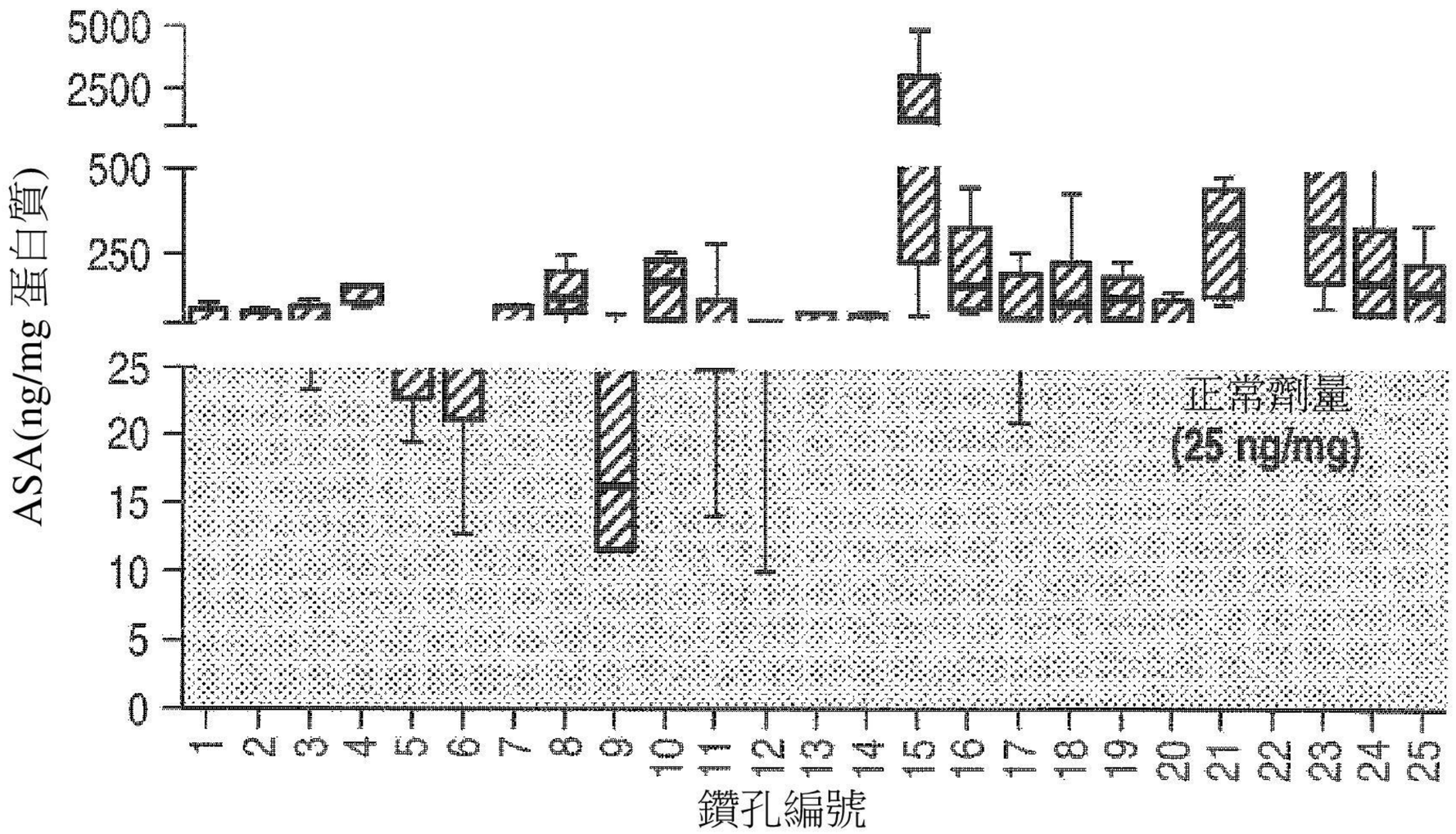

深層白質
ASA(ng/mg 蛋白質)
300
200
100
0
IT
ICV LH
ICV RH

【圖45A】

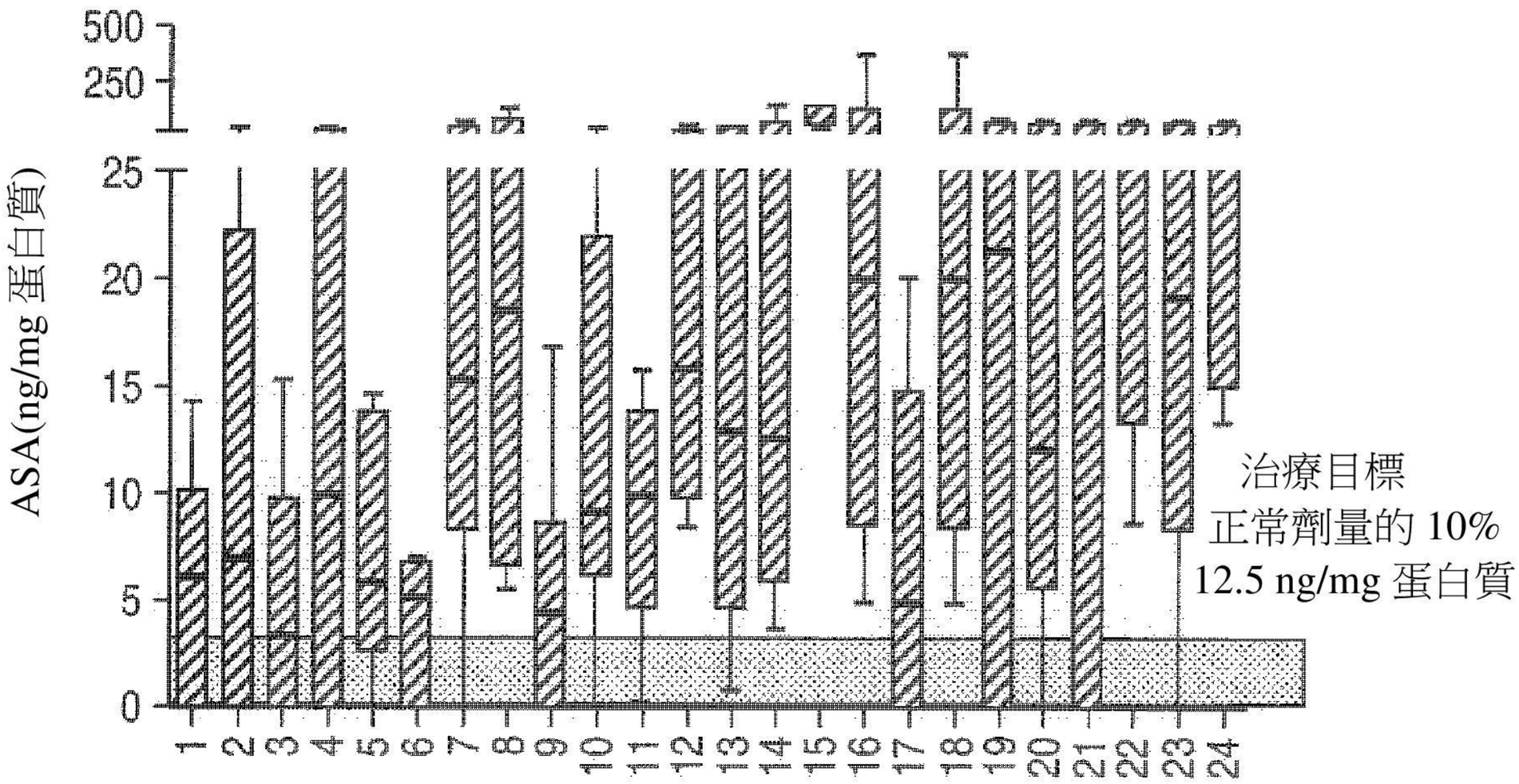

深層灰質
ASA(ng/mg 蛋白質)
300
200
100
0
IT
ICV LH
ICV RH

【圖45B】

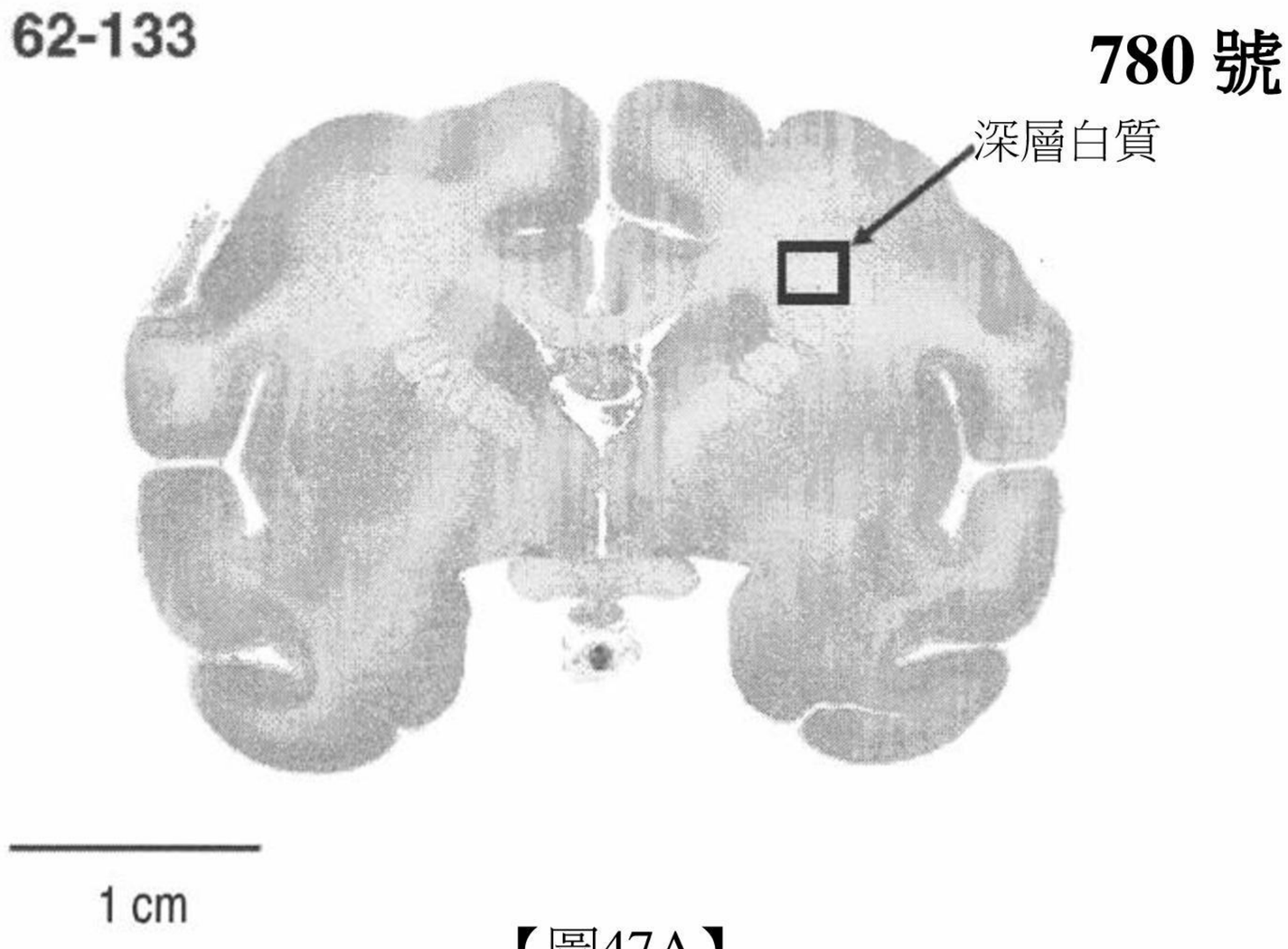
18.6 劑量



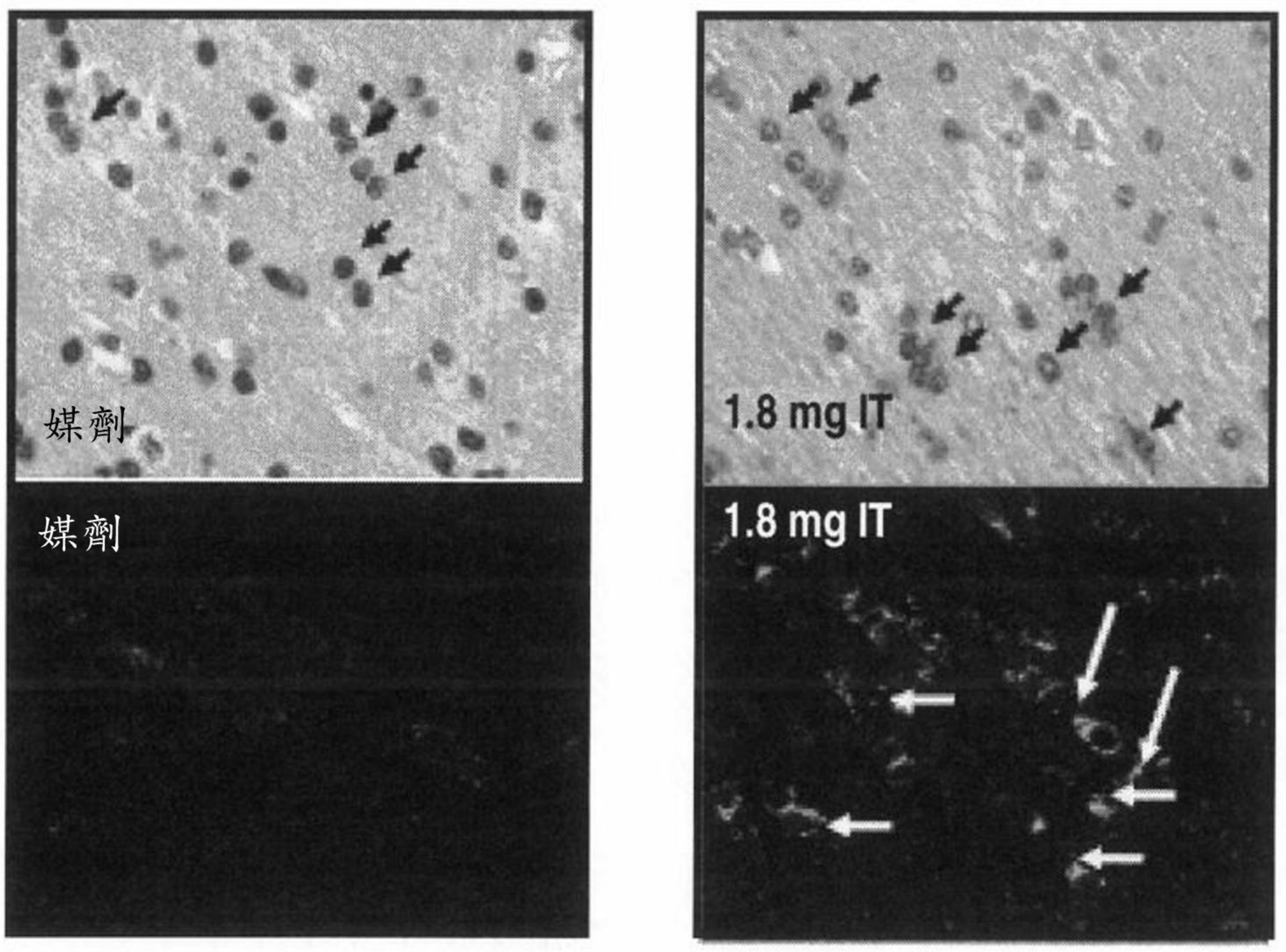
【圖46A】



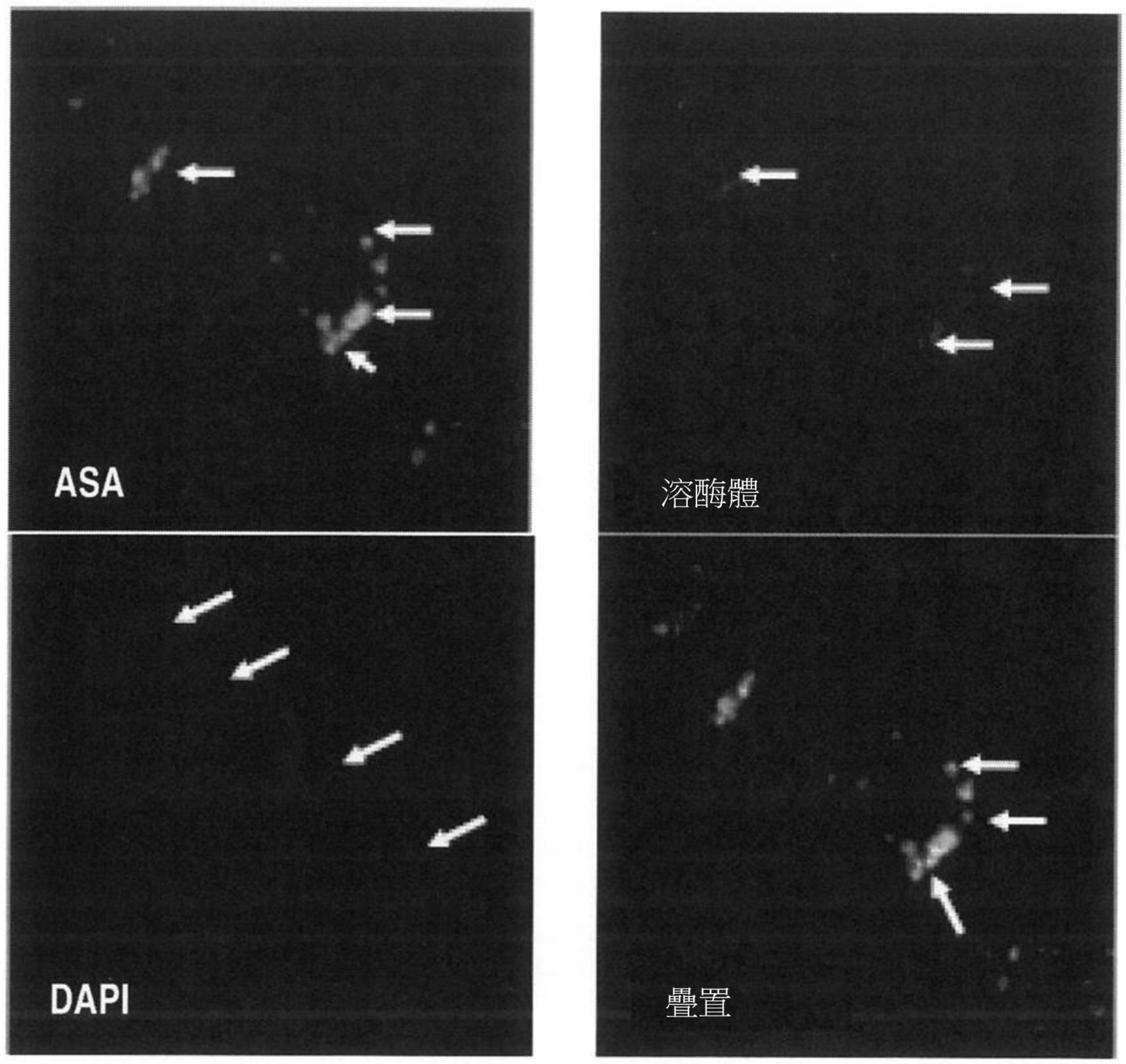
【圖46B】



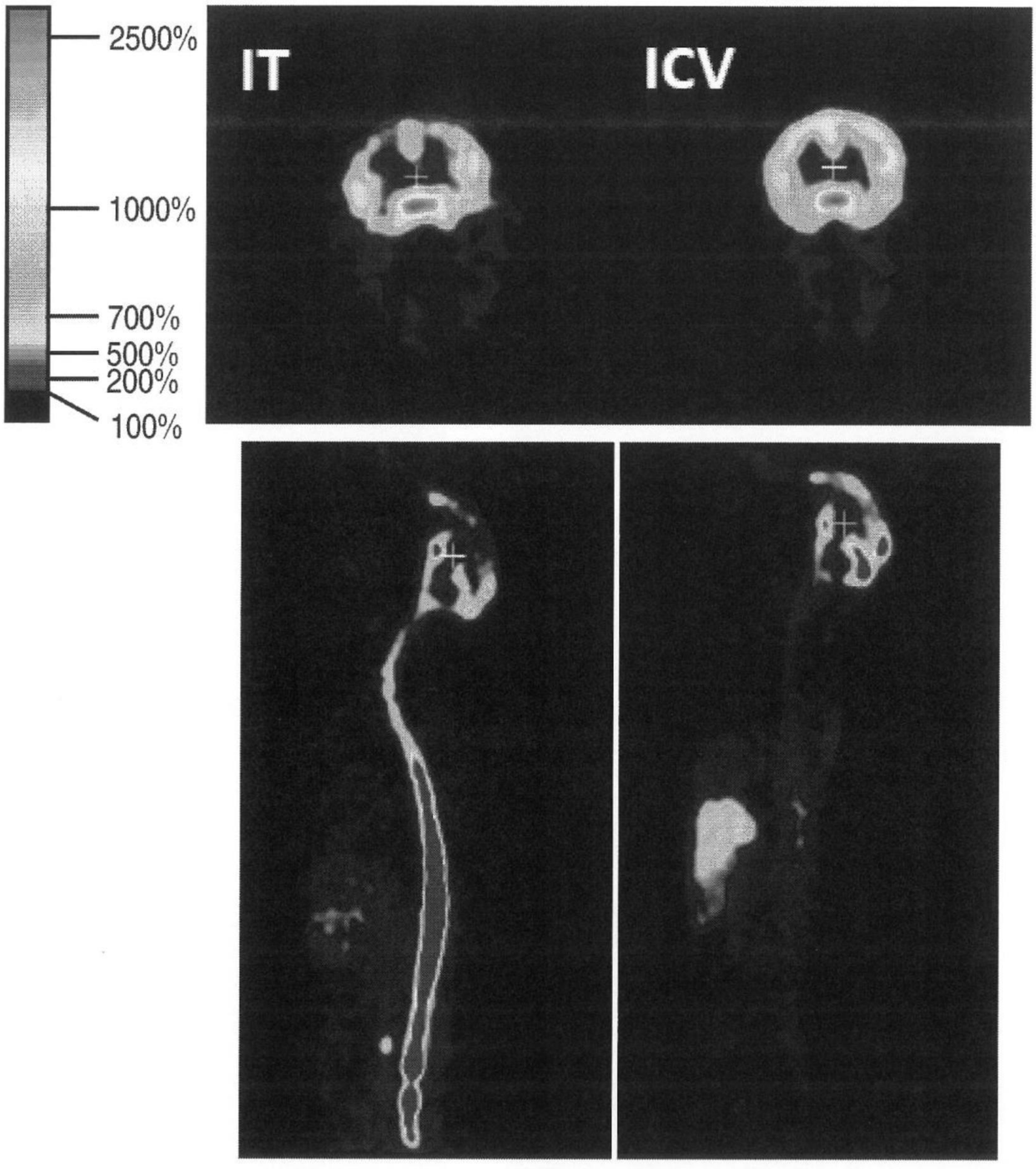
【圖47A】



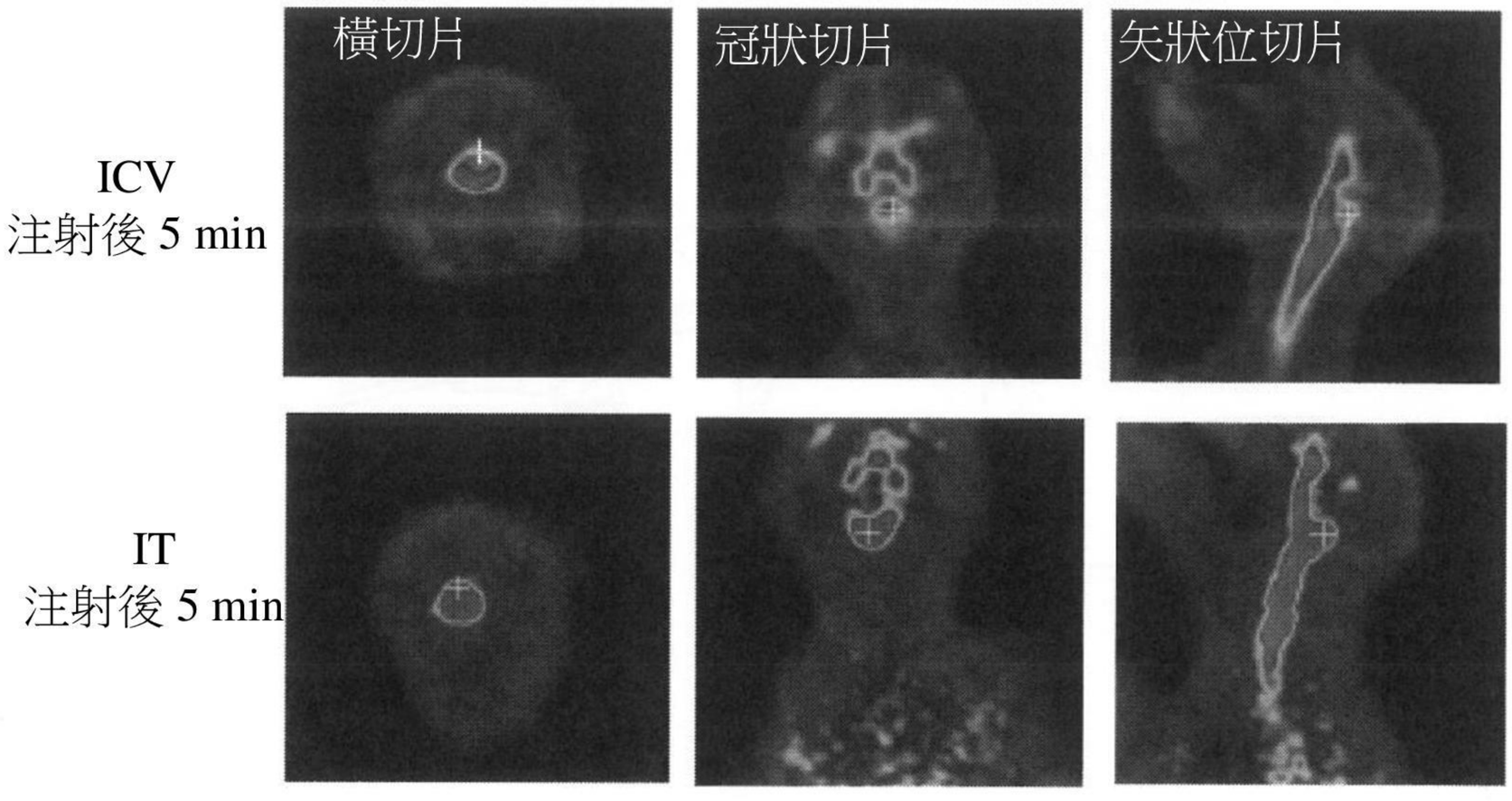
【圖47B】



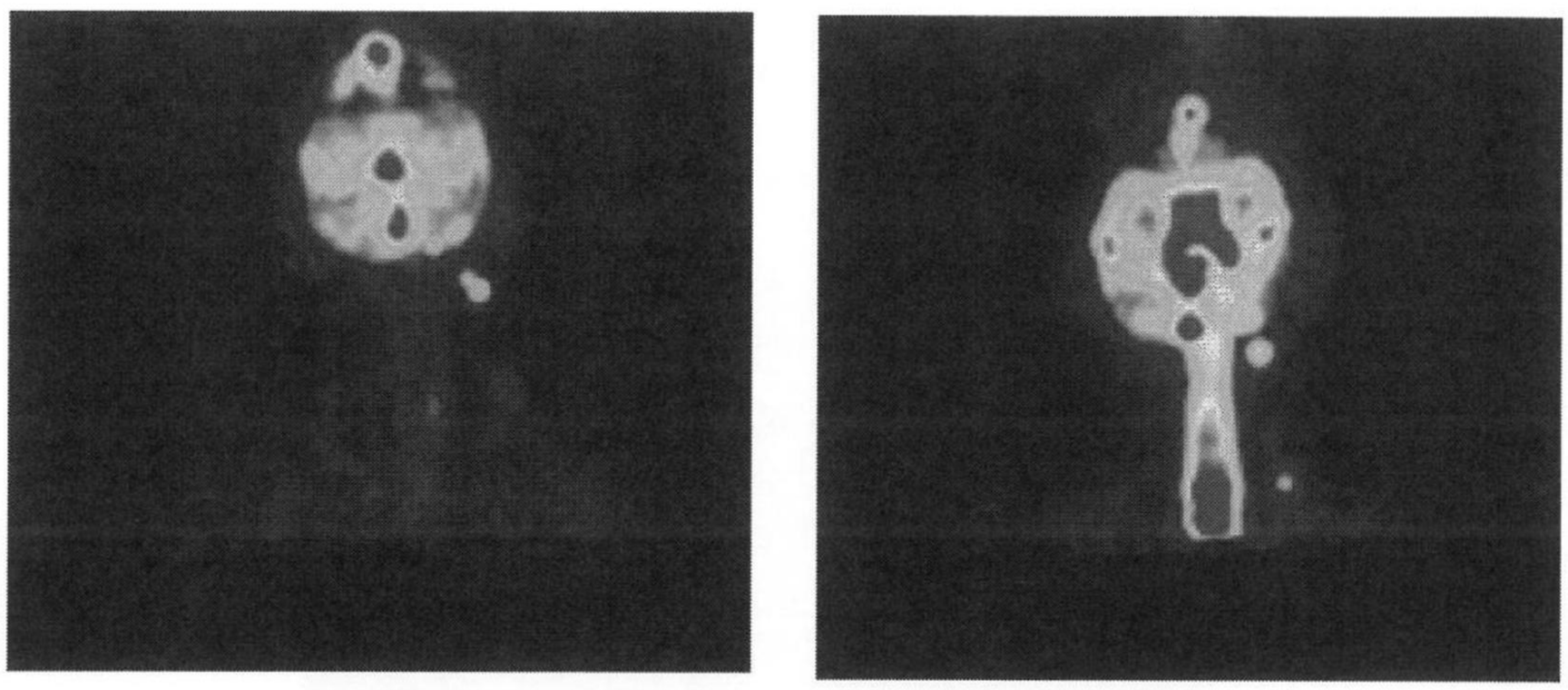
【圖47C】



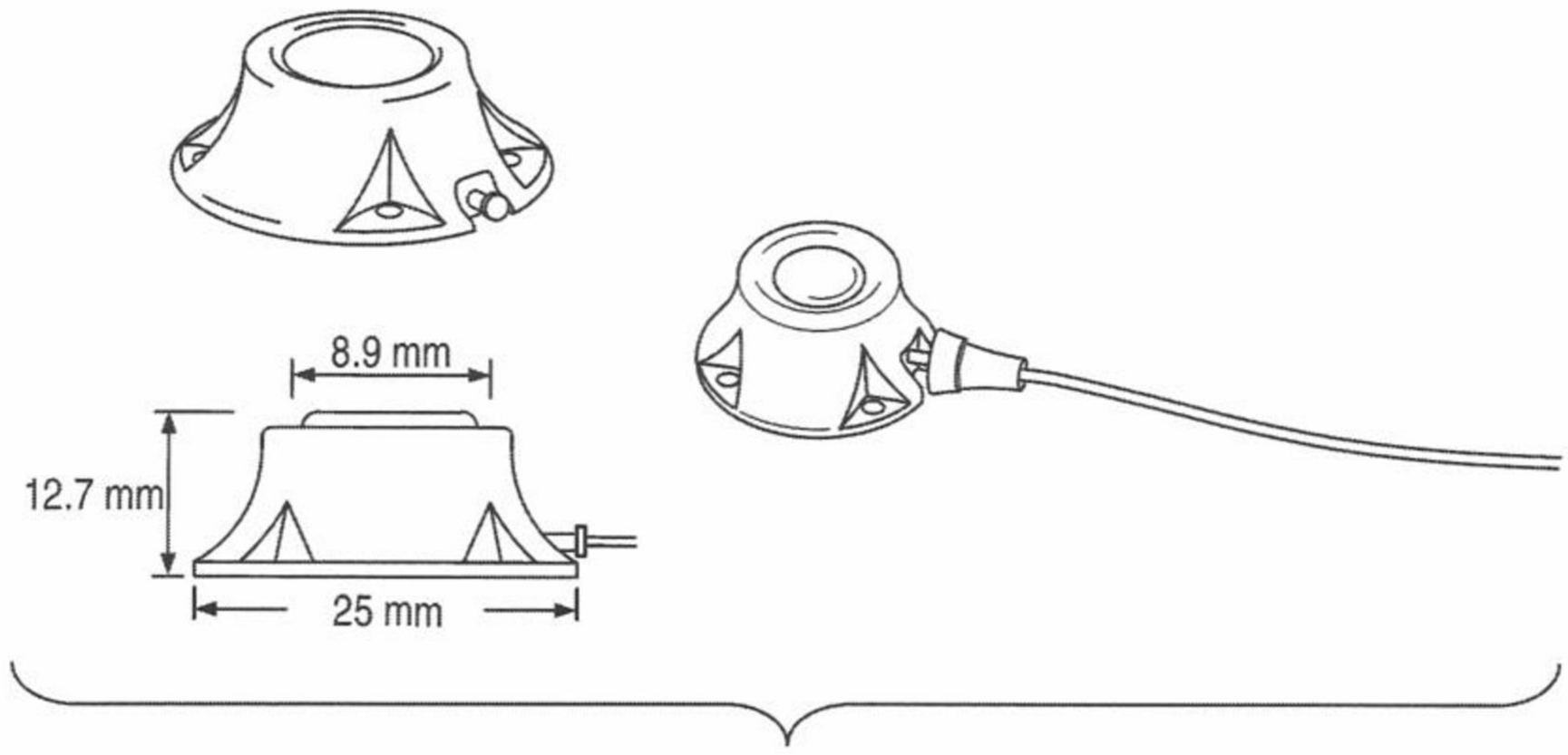
【圖48】



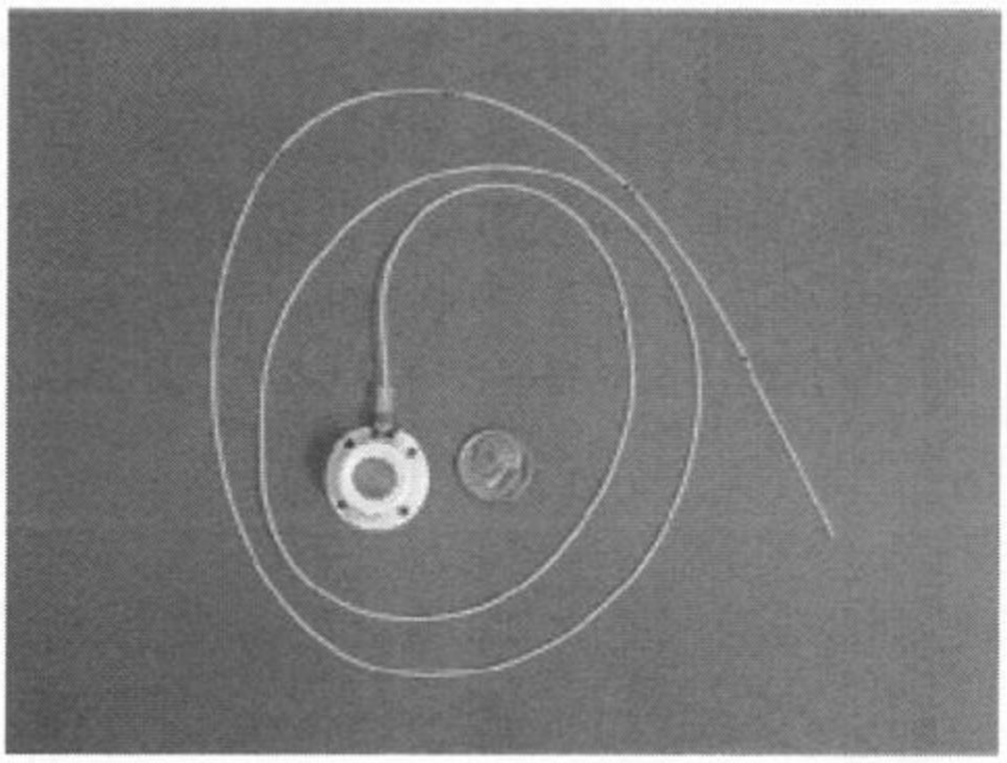
【圖49】



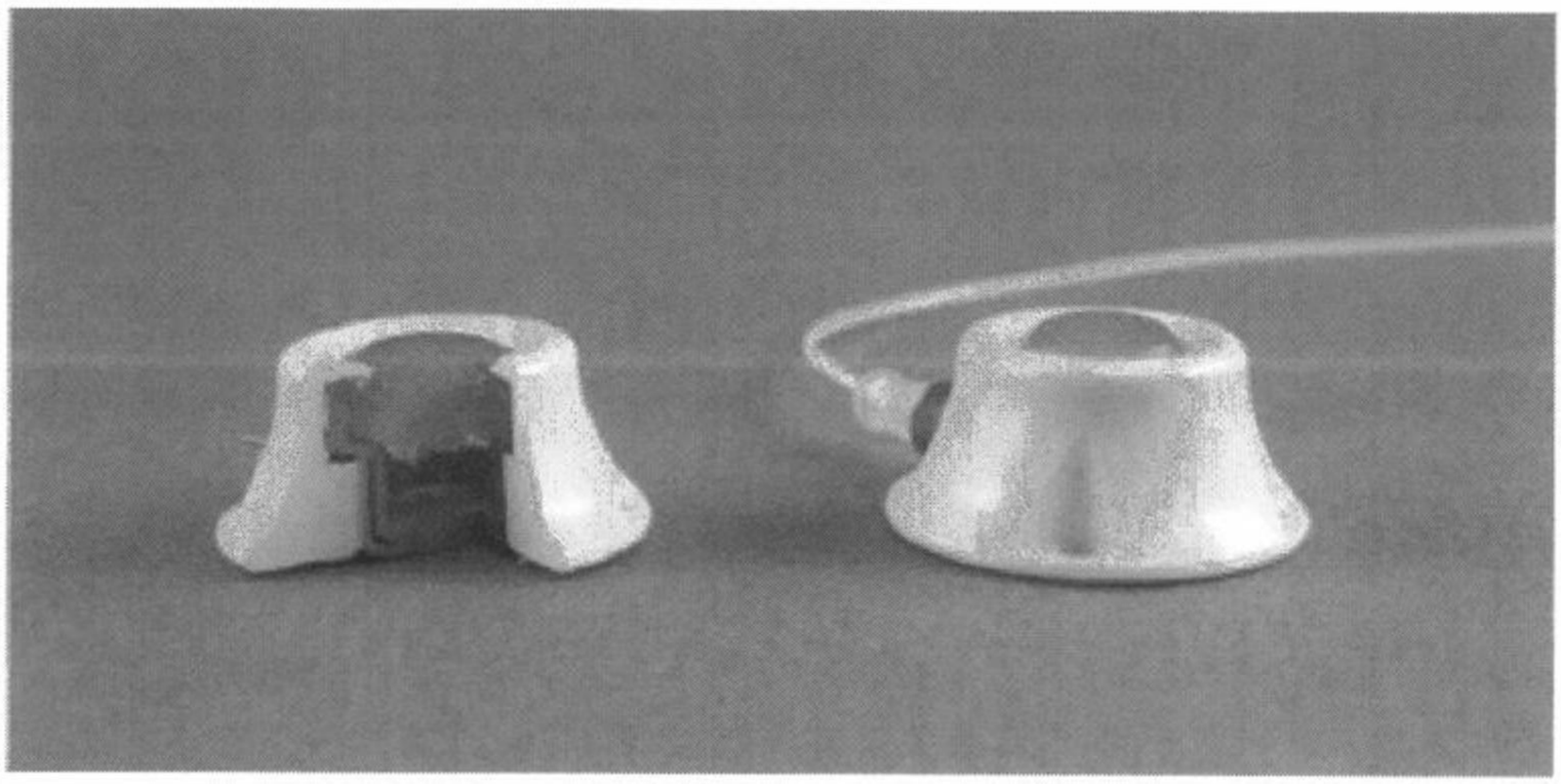
【圖50】



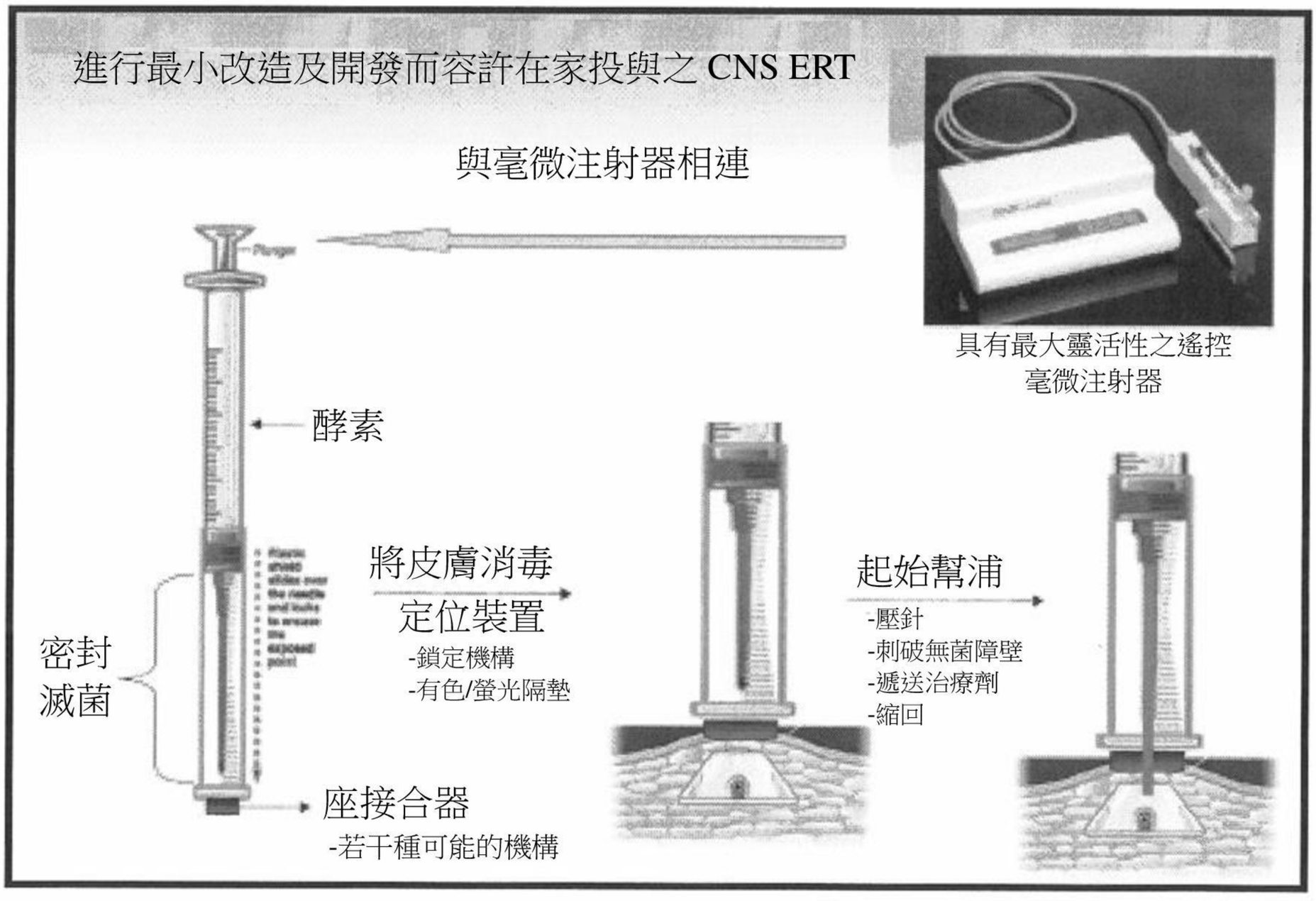
【圖51】



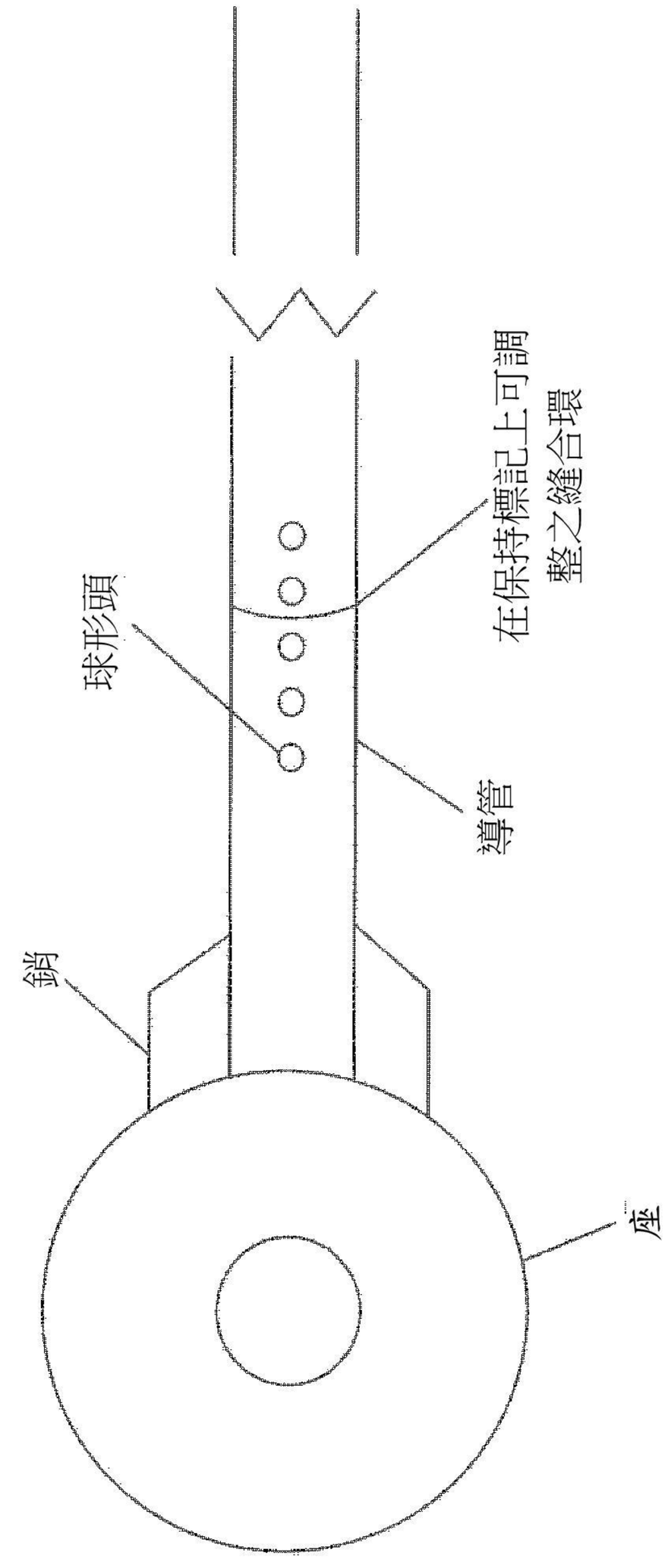
【圖52】



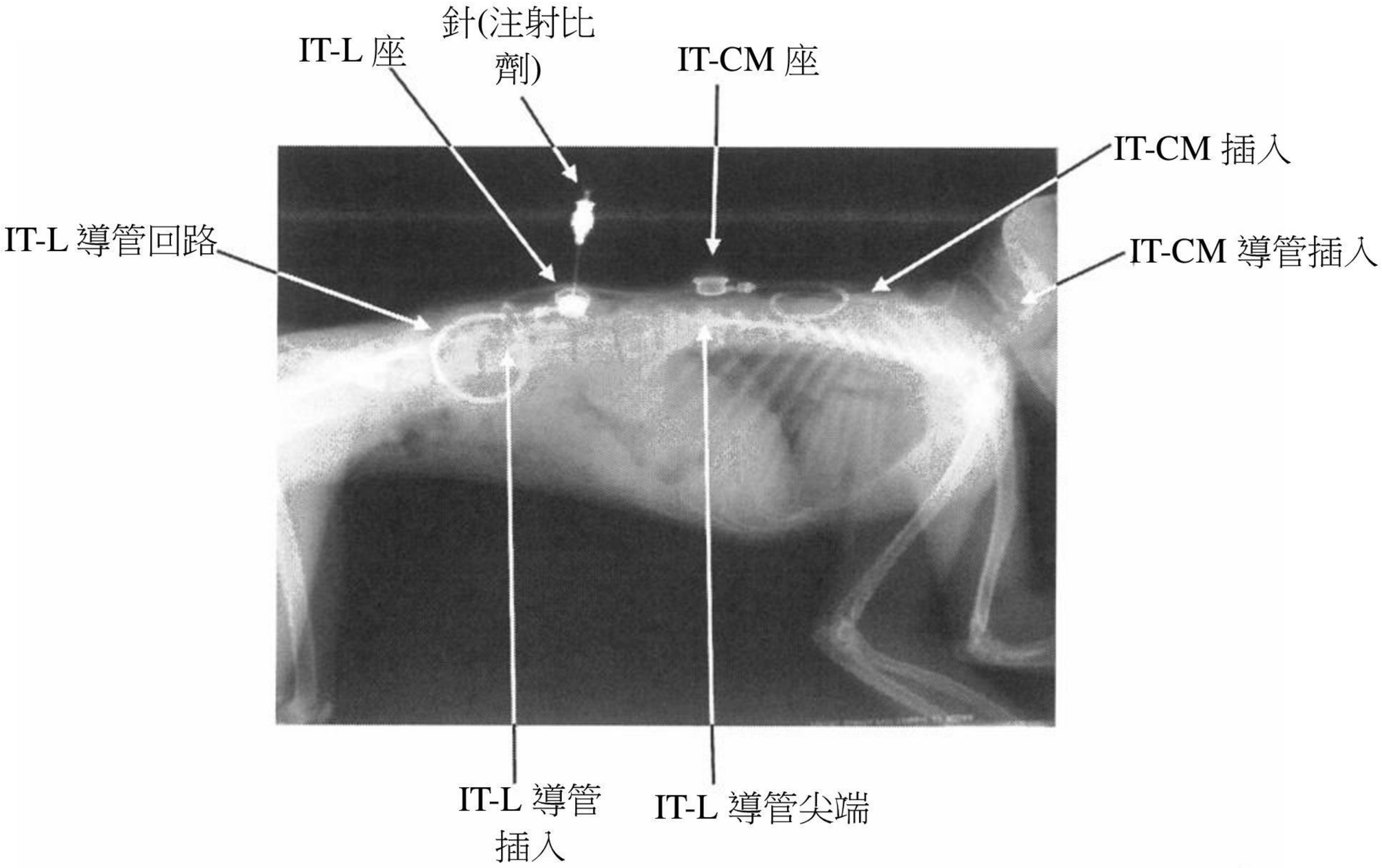
【圖53】


進行最小改造及開發而容許在家投與之 CNS ERT
與毫微注射器相連
具有最大靈活性之遙控
毫微注射器
酵素
密封
滅菌
將皮膚消毒
定位裝置
-鎖定機構
-有色/螢光隔墊
座接合器
-若干種可能的機構
起始幫浦
-壓針
-刺破無菌障壁
-遞送治療劑
-縮回

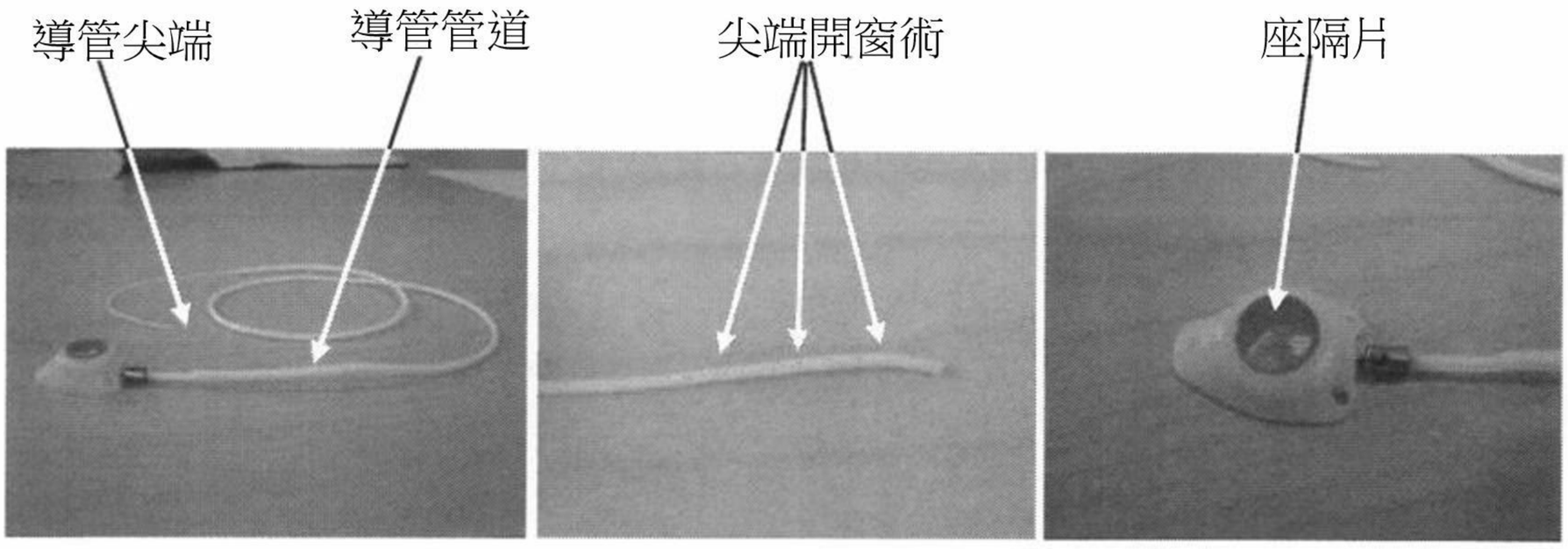
【圖54】



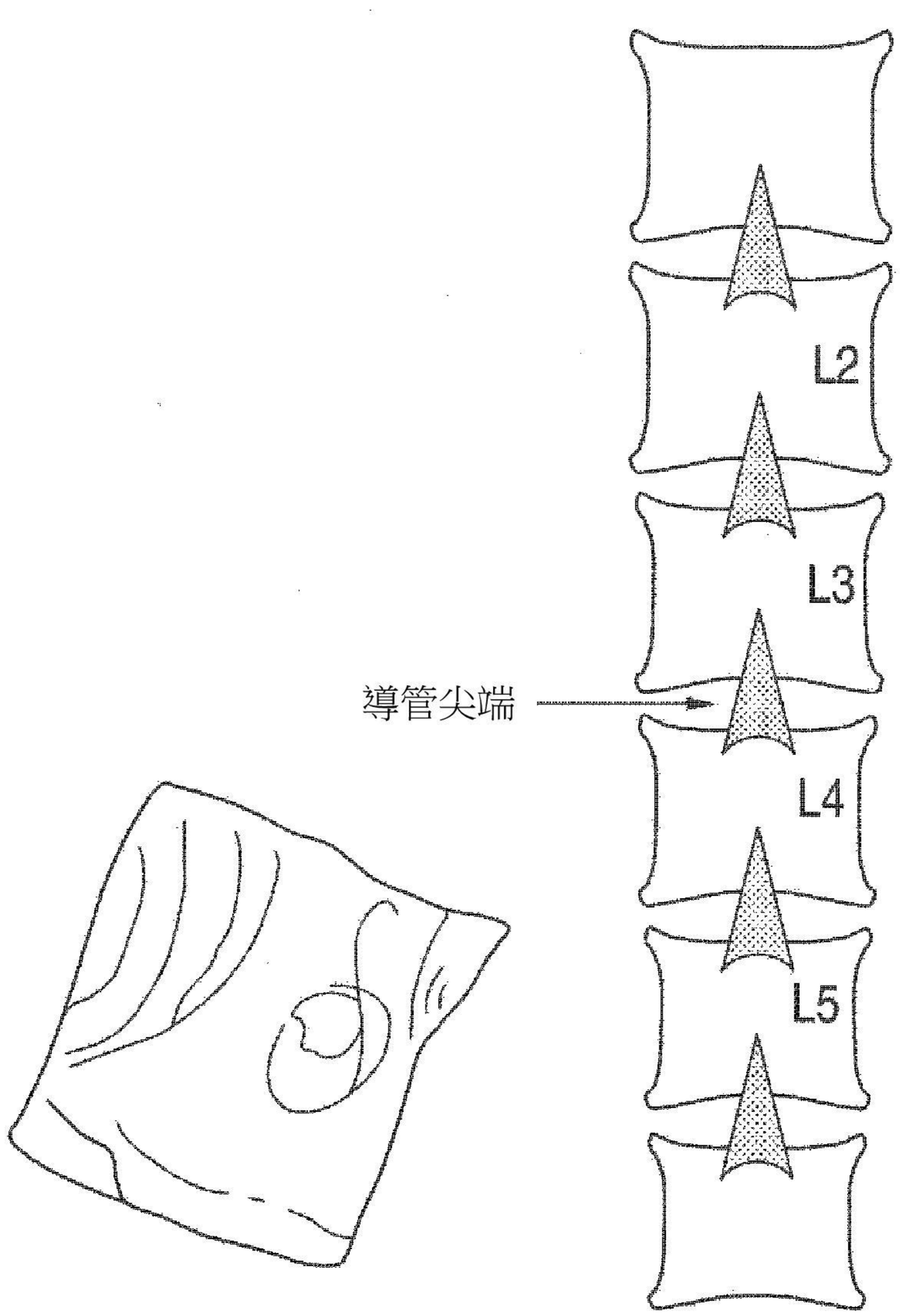
【圖55】


IT-L 座
針(注射比劑)
IT-CM 座
IT-CM 插入
IT-L 導管回路
IT-CM 導管插入
IT-L 導管插入
IT-L 導管尖端

【圖56A】


導管尖端
導管管道
尖端開窗術
座隔片

【圖56B】



【圖56C】