



(21)申請案號：105115109

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 06 月 27 日

(51)Int. Cl. : *A61K38/43 (2006.01)*
A61P25/00 (2006.01)

A61K38/51 (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：舒爾人類基因療法公司 (美國) SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC. (US)
 美國

(72)發明人：納托里 法拉 NATOLI, FARAH (US)；朱高忠 ZHU, GAOZHONG (US)；帖略
 珍妮佛 TEREW, JENNIFER (US)；江原 JIANG, YUAN (US)；宗 捷米 TSUNG,
 JAMIE (US)；夏若克 札赫拉 SHAHROKH, ZAHRA (US)；維納格利亞 布萊
 恩 VERNAGLIA, BRAIN (US)；潘金 PAN, JING (US)；菲佛 理查 PFEIFER,
 RICHARD (US)；加萊斯 柏里克斯 CALIAS, PERICLES (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：72 項 圖式數：37 共 156 頁

(54)名稱

於腦脊髓膜內遞送乙醯肝素 N-硫酸酯酶之方法及組合物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR INTRATHECAL DELIVERY OF HEPARAN N-SULFATASE

(57)摘要

本發明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 遞送乙醯肝素 N-硫酸酯酶之穩定調配物。

The present invention relates 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 Heparan N-sulfatase.

指定代表圖：

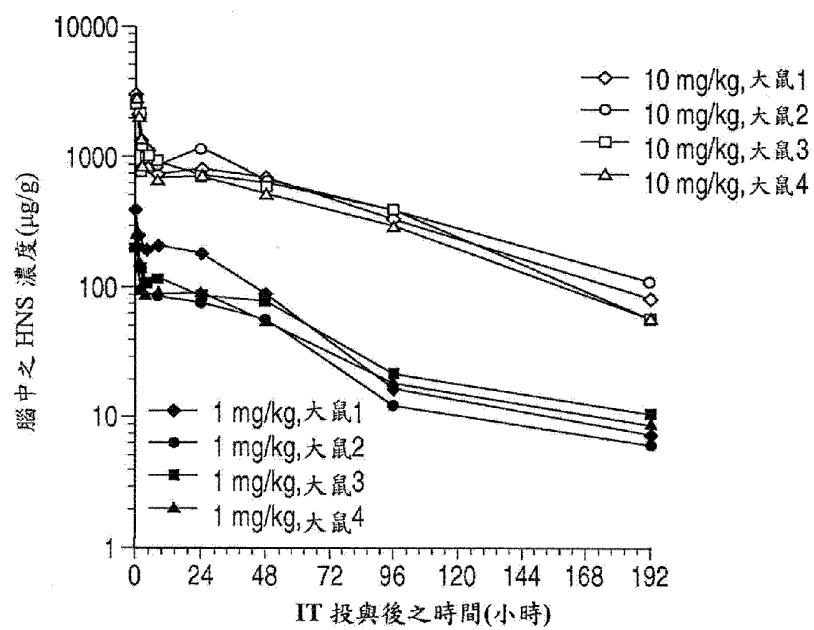


圖18

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

於腦脊髓膜內遞送乙醯肝素N-硫酸酯酶之方法及組合物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR INTRATHECAL

DELIVERY OF HEPARAN N-SULFATASE

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。

【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。

有數種繞開BBB以增強治療劑之腦遞送的方式，包括直接顱內注

射、BBB之短暫通透化及對活性劑進行修飾以改變組織分佈。將治療劑直接注射至腦組織中可完全繞過脈管系統，但主要會遭受由顱內注射及活性劑自投與位點之較差引起之併發症風險(感染、組織損傷、免疫反應)。迄今，由於擴散障壁及可投與之治療劑體積有限，將蛋白質直接投與至腦實質中尚未達成顯著治療效果。曾經由放置於腦實質中之導管利用緩慢長期輸注來研究對流輔助之擴散(Bobo等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 91, 2076-2080 (1994)；Nguyen等人，J. Neurosurg. 98, 584-590 (2003))，但目前沒有一種批准的療法使用該途徑來實施長期療法。另外，放置大腦內導管非常具有侵襲性且不期望作為臨床選擇方案。

亦曾嘗試腦脊髓膜內(IT)注射或將蛋白質投與至腦脊髓液(CSF)中，但尚未獲得治療成功。該治療之主要挑戰一直為活性劑結合腦室之室管膜內層的傾向非常強烈，從而阻止隨後的擴散。目前，沒有一種批准的產品藉由直接投與至CSF中來治療腦遺傳性疾病。

事實上，很多人認為腦表面之擴散障壁以及缺乏有效且方便之遞送方法的障礙太大以致於無法在腦中對任何疾病達成足夠的治療效果。

許多溶酶體貯積症侵襲神經系統，且因此在利用傳統療法治療該等疾病時展示獨特挑戰。通常在受侵襲個體之神經元及腦脊髓膜中累積大量糖胺聚多糖(GAG)，從而導致各種形式之CNS症狀。迄今，尚無一種由溶酶體病症引起之CNS症狀成功地藉由任一可利用之方式得以治療。

因此，仍強烈需要將治療劑有效遞送至腦中。更具體而言，強烈需要將活性劑更有效地遞送至中樞神經系統中以治療溶酶體貯積症。

【發明內容】

本發明尤其提供適於將治療有效量之治療劑遞送至個體CNS中之

醫藥組合物、以及與使用該等醫藥組合物有關之治療方法。由於可投與至中樞神經系統(CNS)中之治療劑的注射體積有限以及該房室中獨特的流體動力學、組成及代謝，預期僅特定組合物適於直接CNS投與以避免不良事件。本發明提供適於任何治療劑之CNS遞送的調配物設計空間(formulation design space)。另外，該調配物設計空間適於蛋白質治療劑之穩定性。

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，其包括乙醯肝素N-硫酸酯酶(HNS)蛋白質、鹽、緩衝劑及聚山梨醇酯表面活性劑。在一些實施例中，HNS蛋白質以高達約100 mg/ml之濃度存在。在一些實施例中，HNS蛋白質以高達約30 mg/ml之濃度存在。在一些實施例中，HNS蛋白質以介於約10-20 mg/ml範圍內之濃度存在。在一些實施例中，HNS蛋白質以約15 mg/ml範圍之濃度存在。

在一些實施例中，HNS蛋白質包括胺基酸序列SEQ ID NO:1。

在一些實施例中，鹽係NaCl。在某些實施例中，NaCl以介於約0-300 mM範圍內之濃度存在。在某些實施例中，NaCl以約145-175 mM之濃度存在。在某些實施例中，NaCl以約145 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。在一些實施例中，聚山梨醇酯表面活性劑係聚山梨醇酯20。在一些實施例中，聚山梨醇酯20以介於約0-0.02%範圍內之濃度存在。在一些實施例中，聚山梨醇酯20以約0.005%之濃度存在。

在一些實施例中，緩衝劑係磷酸鹽。在一些實施例中，磷酸鹽以不大於20 mM之濃度存在。在一些實施例中，磷酸鹽以約5 mM之濃度存在。

在一些實施例中，調配物具有約5.0至8.0之pH。在一些實施例中，調配物具有約6.5至7.5之pH。在一些實施例中，調配物具有約7.0

之pH。

在一些實施例中，調配物進一步包含穩定劑。在某些實施例中，穩定劑選自由以下組成之群：蔗糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、PEG 4000及其組合。在某些實施例中，穩定劑係蔗糖。在某些實施例中，蔗糖以介於約0-2%範圍內之濃度存在。在某些實施例中，蔗糖以介於約1-1.5%範圍內之濃度存在。

在一些實施例中，穩定劑係葡萄糖。在一些實施例中，葡萄糖以介於約0.5-1.0%範圍內之濃度存在。

在一些實施例中，調配物係液體調配物。在一些實施例中，將調配物調配成凍乾之乾燥粉末。

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，其包括濃度高達約30 mg/ml之乙醯肝素N-硫酸酯酶(HNS)蛋白質、濃度為約145-175 mM之NaCl、濃度為約0.005%之聚山梨醇酯20、濃度為約5 mM之磷酸鹽，且其pH為約7.0。在一些實施例中，HNS蛋白質之濃度為約15 mg/ml。在一些實施例中，NaCl之濃度為約145 mM。在一些實施例中，調配物進一步包含濃度為約0-2%之蔗糖。

在又一態樣中，本發明提供用於腦脊髓膜內投與之穩定調配物，其包括濃度高達約30 mg/ml之乙醯肝素N-硫酸酯酶(HNS)蛋白質、濃度為約145 mM之NaCl、濃度為約0.005%之聚山梨醇酯20、濃度為約5 mM之磷酸鹽、濃度為約1-1.5%之蔗糖，且其pH為約7.0。

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，其包含濃度高達約30 mg/ml之乙醯肝素N-硫酸酯酶(HNS)蛋白質、濃度為約145 mM之NaCl、濃度為約0.005%之聚山梨醇酯20、濃度為約5 mM之磷酸鹽、濃度為約0.5-1.0%之葡萄糖，且其pH為約7.0。

在一些實施例中，將調配物調配成凍乾之乾燥粉末。

在另一態樣中，本發明提供包括單一劑型之如本文所述之穩定調

配物之容器。在一些實施例中，容器選自安瓿、或預填充注射器。在一些實施例中，容器係預填充注射器。在一些實施例中，容器係貯器。

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

在另一態樣中，本發明提供治療A型聖菲利波症候群(Sanfilippo A Syndrome)之方法，其包括向需要治療之個體經腦脊髓膜內投與如本文所述之調配物的步驟。

在另一態樣中，本發明提供治療A型聖菲利波症候群之方法，其包括向需要治療之個體經腦脊髓膜內投與調配物的步驟，該調配物包含濃度介於約1-300 mg/ml範圍內之乙醯肝素N硫酸酯酶(HNS)蛋白質、濃度為約154 mM之NaCl、濃度為約0.005%之聚山梨醇酯20，且其pH為約6。

在一些實施例中，經腦脊髓膜內投與之步驟不會在個體中引起實質不良效應。在某些實施例中，腦脊髓膜內投與不會在個體中引起實質適應性T細胞介導之免疫反應。

在某些實施例中，腦脊髓膜內投與調配物可將HNS蛋白質遞送至目標腦組織。在一些實施例中，腦目標組織包含白質及/或灰質中之神經元。在一些實施例中，將HNS蛋白質遞送至神經元、神經膠質細胞、血管周細胞及/或腦脊髓膜細胞。在一些實施例中，將HNS蛋白質進一步遞送至脊髓中之神經元。

在一些實施例中，腦脊髓膜內投與調配物進一步導致HNS蛋白質全身遞送於周圍目標組織中。在某些實施例中，周圍目標組織選自肝、腎、及/或心臟。

在一些實施例中，腦脊髓膜內投與調配物導致於腦目標組織、脊髓神經元及/或周圍目標組織中之溶酶體定位。在某些實施例中，腦

脊髓膜內投與調配物導致腦目標組織、脊髓神經元及/或周圍目標組織中之GAG貯積減少。在某些實施例中，GAG貯積與對照相比減少至少20%、40%、50%、60%、80%、90%、1倍(fold)、1.5倍或2倍。

在一些實施例中，腦脊髓膜內投與調配物導致神經元中之空泡形成減少。在一些實施例中，神經元包含普爾欽細胞(Purkinje cell)。

在一些實施例中，腦脊髓膜內投與調配物導致腦目標組織、脊髓神經元及/或周圍目標組織中HNS酵素活性提高。在某些實施例中，HNS酵素活性與對照相比提高至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。在某些實施例中，提高的HNS酵素活性為至少約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或600 nmol/hr/mg。

在一些實施例中，腰區中之HNS酵素活性提高。在某些實施例中，腰區中提高的HNS酵素活性為至少約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、或10,000 nmol/hr/mg。

在一些實施例中，腦脊髓膜內投與調配物會減小A型聖菲利波症候群中至少一種症狀或特徵之強度、嚴重程度、或頻率、或延遲發作。在某些實施例中，A型聖菲利波症候群之該至少一種症狀或特徵係認知損害；白質損傷；腦實質、神經節、胼胝體及/或腦幹中之血管周間隙擴大；萎縮；及/或腦室擴大。

在一些實施例中，每兩週一次實施腦脊髓膜內投與。在一些實施

例中，每月一次實施腦脊髓膜內投與。在一些實施例中，每兩個月一次實施腦脊髓膜內投與。

在一些實施例中，腦脊髓膜內投與係與靜脈內投與連合使用。在一些實施例中，靜脈內投與頻率小於每月一次。在一些實施例中，靜脈內投與頻率小於每兩個月一次。在一些實施例中，在不存在靜脈內投與下使用腦脊髓膜內投與。

在一些實施例中，在不存在並行免疫抑制療法下使用腦脊髓膜內投與。

【圖式簡單說明】

圖式僅用於說明性目的而非限制性目的；

圖 1 繪示 HNS 之 SEC-HPLC 洗脫曲線的實例性層析圖。(A) 2 mg/mL rhHNS 20 mM 檸檬酸鹽(pH 7.0)之曲線；(B) 2 mg/mL rhHNS 20 mM 檸檬酸鹽(pH 7.0)之按比例放大層析圖，基線(ilc)；(C)在50℃下保持7天後，2 mg/mL rhHNS 20 mM 檸檬酸鹽(pH 7.0)之按比例放大層析圖；(D)在50℃下保持7天後，2 mg/mL 檸檬酸鹽(pH 7.0)之16 min 峰及26 min 二聚體峰之波長掃描的疊加。

圖2繪示各種緩衝劑中及各種pH下rhHNS之pH研究的實例性還原 SDS-PAGE凝膠(A-C)；

圖3繪示各種緩衝劑中及各種pH下rhHNS之pH研究的實例性非還原 SDS-PAGE凝膠(A-C)；

圖4繪示藉由DSC測定之檸檬酸鹽中之實例性pH依賴性熱穩定性。在pH 6.0下，檸檬酸鹽中rhHNS之最高熔融溫度為90℃。rhHNS之熔融溫度在所檢查之每一pH下皆超過70℃；

圖5繪示藉由DSC測定之磷酸鹽中之實例性pH依賴性熱穩定性。含有磷酸鹽之rhHNS調配物顯示在pH 6-7下具有最大熱穩定性。rhHNS之熔融溫度在所檢查之每一pH下皆超過70℃；

圖6繪示在50°C下保持7天後來自離子效應研究之rhHNS調配物的實例性銀染色SDS-PAGE凝膠。使用煮沸10分鐘之試樣運行凝膠(A-B)；

圖7繪示實例性rhHNS溶解度研究。(A) pH對rhHNS溶解度之效應；(B)鹽濃度對rhHNS溶解度之效應。增加pH及氯化鈉似乎增加rhHNS溶解度；

圖8繪示在使用AUC下鹽對於天然狀態rhHNS之效應的實例性研究。(A) 145 mM鹽之效應；(B) 300 mM鹽之效應；

圖9繪示蔗糖含量及凍乾單元對凍乾rhHNS調配物之餅外觀之效應的實例性研究。(A) VirTis lyo單元；上圖，1%蔗糖；下圖，1.5%蔗糖；(B) 1.5%蔗糖；上圖，VirTis lyo單元；下圖，LyoStar lyo單元；

圖10繪示藉由微流成像(MFI)獲得之凍乾rhHNS試樣的實例性微粒影像；

圖11繪示對於在0.22 μm 過濾後含有1.5%蔗糖之預凍乾rhHNS試樣而言，藉由MFI檢測之聚山梨醇酯20對微粒之效應研究的實例性影像；

圖12A繪示實例性結果，其展示在6個月之給藥後，在1.5、4.5及8.3 mg劑量下rhHNS隨時間而變之CSF濃度。圖12B詳述實例性結果，其展示在猴子中在經6個月IT投與1.5、4.5及8.3 mg劑量後，抗HNS抗體在CSF中之濃度。顯示組合之雄性及雌性之數據。圖12C詳述實例性結果，其展示在猴子中在6個月之給藥後，在經6個月IT投與1.5、4.5及8.3 mg劑量後，抗HNS抗體在CSF中之濃度。顯示組合之雄性及雌性之數據。自曲線中排除8.3 mg rhHNS之IT第6次給藥後之兩個最高濃度(32,205 ng/ mL及15,467 ng/ mL)，此乃因在第6次給藥之前未取CSF試樣；

圖13繪示來自經蘇木素及伊紅染色腦脊髓膜及腦實質之組織切片之實例性代表性影像；圖13A繪示實例性結果，其展示在DC猴中侷限於IT導管之嗜中性浸潤之低放大率視圖。圖13B繪示實例性結果，其展示在高劑量(8.3 mg/劑量)猴子腦脊髓膜中嗜伊紅白血球浸潤之高放大率視圖；浸潤之總體嚴重程度與中劑量(4.5 mg/劑量)群組(未顯示)類似。圖13C繪示展示低劑量(1.5 mg/劑量)猴子之高放大率視圖之實例性結果，其顯示血管周間隙(腦實質)中之嗜伊紅白血球。圖13D繪示展示低劑量猴子(1.5 mg/劑量)之實例性結果，其顯示血管周間隙及鄰接實質中之嗜伊紅白血球。圖13E繪示實例性結果，其展示低劑量群組動物脊髓實質中之嗜伊紅白血球(藉由箭號來指示)；該區域中之神經元正常。圖13F繪示實例性結果，其展示低劑量(1.5 mg/劑量)猴子之嗜伊紅白血球及小神經膠質細胞增生區域(箭號指示嗜伊紅白血球；框指示小神經膠質細胞增生區域)。該區域中存在若干較大神經元，其皆正常。比例尺：200 μm ；

圖14繪示實例性結果，其展示rhHNS在猴脊髓及腦中之酵素活性。圖14A及14B繪示實例性結果，其展示在(A)雄性及(B)雌性猴子脊髓中之活性。薄片-3=腰椎，薄片3、6=胸部，且薄片9=頸部；0=導管尖端。圖14C及14D繪示實例性結果，其展示rhHNS在(C)雄性及(D)雌性猴子腦中之活性。將薄片自頭端至尾端進行編號(3至15)。所有組織試樣皆係在最後劑量後約24小時或在最後劑量後4週(對於恢復後動物)採集。DC，裝置對照。數據代表每個治療群組中n=4只猴子之平均值 $\pm$ SEM；

圖15繪示實例性結果，其展示在猴腦及肝中之酵素活性。圖15A繪示實例性結果，其展示rhHNS活性在高劑量(8.3 mg/劑量)群組猴腦中之分佈。顯示腦表面、深層及極深層(腦室周圍)區域之活性倍數變化與內源性程度(DC群組)之對比。所有組織試樣皆係在最後劑量後約

24小時或在最後劑量後4週(對於恢復後動物)採集。數據代表 $n=6$ 只猴子(兩種性別)中腦薄片6及9之平均值 $\pm$ SEM。有兩隻猴子之數據未包括，此乃因在屍體剖檢時發現導管未開放。圖15B顯示rhHNS在猴肝中之活性。所有組織試樣皆係在最後劑量後約24小時或在最後劑量後4週(對於恢復後動物)採集。DC，裝置對照。Rec，恢復後。數據代表除了低劑量(4.5 mg/劑量)雌性群組($n=3$)外，每個治療群組中 $n=4$ 只猴子之平均值 $\pm$ SEM；

圖16繪示實例性結果，其展示在幼年食蟹猴小腦：3個月之中間隊列中之rhHNS定位。圖16A繪示實例性結果，其展示媒劑對照動物(0 mg/劑量)小腦對rhHNS免疫染色呈陰性；20x放大倍數。圖16B繪示實例性結果，其展示低劑量(1.5 mg/劑量)動物小腦顯示僅限於分子層之最低陽性染色；20x放大倍數。圖16C繪示實例性結果，其展示中劑量(4.5 mg/劑量)動物小腦在外顆粒層中顯示最低染色；20x放大倍數。圖16D繪示實例性結果，其展示高劑量(8.3 mg/劑量)動物小腦(包括分子層、外顆粒層及普爾欽細胞)中展示中度染色；20x放大倍數；

圖17繪示實例性研究，其中在以1及10 mg/kg IT給予 124 I-HNS後最初20分鐘內，將rhHNS在頭部區域中之濃度對時間作圖；

圖18繪示實例性研究，其中在以1及10 mg/kg IT給予 124 I-HNS後，將rhHNS在腦中之濃度對時間作圖；

圖19繪示實例性研究，其中在以1及10 mg/kg IT給予 124 I-HNS後，將rhHNS在腦區中之濃度對時間作圖；

圖20繪示實例性研究，其中在以1及10 mg/kg IT給予 124 I-HNS後，將rhHNS在頭部區域中之濃度對時間作圖；

圖21繪示實例性研究，其中在以1及10 mg/kg IT給予 124 I-HNS後，將rhHNS在脊柱近端中之濃度對時間作圖；

圖22繪示實例性研究，其中在以1及10 mg/kg IT給予 124 I-HNS

後，將rhHNS在脊柱中部中之濃度對時間作圖；

圖23繪示實例性研究，其中在以1及10 mg/kg IT給予 ^{124}I -HNS後，將rhHNS在脊柱遠端中之濃度對時間作圖；

圖24繪示實例性研究，其中在以1及10 mg/kg IT給予 ^{124}I -HNS後，將rhHNS在肝中之濃度對時間作圖；

圖25繪示實例性研究，其中在以1及10 mg/kg IT給予 ^{124}I -HNS後，將rhHNS在腦中之濃度對時間作圖(個體(上圖)及平均值 $\pm$ SD(下圖))；

圖26繪示實例性研究，其中在以1及10 mg/kg IT給予 ^{124}I -HNS後，將rhHNS之肝臟濃度對時間作圖(個體(上圖)及平均值 $\pm$ SD(下圖))；

圖27繪示實例性研究，其中在以1及10 mg/kg IT給予 ^{124}I -HNS後，將rhHNS之腎濃度對時間作圖(個體(上圖)及平均值 $\pm$ SD(下圖))；

圖28繪示實例性研究，其中在以1及10 mg/kg IT給予 ^{124}I -HNS後，將rhHNS之心臟濃度對時間作圖(個體(上圖)及平均值 $\pm$ SD(下圖))；

圖29繪示實例性研究，其中在以1及10 mg/kg IT給予 ^{124}I -HNS後，將rhHNS之皮膚濃度對時間作圖(個體(上圖)及平均值 $\pm$ SD(下圖))；

圖30繪示實例性研究，其中在以1及10 mg/kg IT給予 ^{124}I -HNS後，將rhHNS之腦濃度對時間作圖(上圖)，且繪示腦中非房室PK參數之對比(下圖)；

圖31繪示實例性研究，其中在以1及10 mg/kg IT給予 ^{124}I -HNS後，將rhHNS之肝濃度對時間作圖(上圖)，且繪示肝中非房室PK參數之對比(下圖)；

圖32繪示實例性腦脊髓膜內藥物遞送裝置(IDDD)。

圖33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34繪示實例性腦脊髓膜內藥物遞送裝置(IDDD)；

圖35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36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37A繪示患者體內可放置IDDD之實例性位置；圖37B繪示腦脊髓膜內藥物遞送裝置(IDDD)之各個組件；且圖37C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】

定義

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：本文所述術語「改善」意指狀況之預防、降低或緩解、或個體狀況之改良。改善包括(但不需要)病況(例如，A型聖菲利波症候群)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缺陷中之相關蛋白質之濃度或其活性(例如，HNS)。

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，在投與至生物體時對該生物體具有生物效應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，HNS)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之形式(例如，A型聖菲利波症候群)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(subject, individual)、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A型聖菲利波症候群)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(co-solubilizing agent)或鹽(例如鈣鹽)。在一些實施例中，該等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，儘管通常對於非經腸投與藥物而言等滲溶液係較佳的，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。例如，最常見之經批准CNS團注調配組合物係鹽水(150 mM NaCl水溶液)。

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(physiochemical integrity)之全部或大部分)。可在較長時間內(例如，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個月或更長時間)評定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。一般而言，本文所述醫藥組合物經調配以能夠穩定所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。

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。實例性該等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，上述程式通常亦提供同源性程度之指示。在一些實施例中，若兩個序列之對應殘基的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多在殘基之相關延伸部分上同源，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。實例性該等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，上述程式通常亦提供一致性程度之指示。在一些實施例中，若兩個序列之對應殘基的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多在殘基之相關延伸部分上一致，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：當關於本發明醫藥組合物時，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含有之有效量之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含有之治療劑，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HNS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A型聖菲利波症候群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，HNS)以適用於任一醫學治療之合理益處/風險比賦予對所治療個體之治療效果之量。治療效果可具有客觀性(即，可藉由某種測試或標記量測)或主觀性(即，個體對效應給出指示或對其有所感覺)。具體而言，「治療有效量」係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/或亦減輕疾病症狀之嚴重程度或頻率有效治療、改善或預防期望疾病或病狀、或呈現治療或預防可檢測效果之量。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)可端視(例如)投與途徑、與其他醫藥劑之組合而變化。此外，任一特定患者之具體治療有效量(及/或單位劑量)可端視多種因素而定，包括所治療病症及該病症之嚴重程度；所用具體醫藥劑之活性；所用具體組合物；患者之年齡、體重、總體健康狀況、性別及飲食；所用具體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)以部分地或完全緩和、改善、減緩、抑制特定疾病、病症及/或病狀(例如，A型聖菲利波症候群)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/或針對僅展現該疾病、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用於有效治療溶酶體貯積症之溶酶體酵素。在一些實施例中，本發明提供用於IT遞送乙醯肝素N-硫酸酯酶之穩定調配物。

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、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-乙醯胺基葡萄糖苷酶及/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、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，該等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-乙醯胺基葡萄糖苷酶及/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，藉由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，該組合物係穩定的且該組合物在經腦脊髓膜內投與至該個體時耐受。

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至個體，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，組合物係穩定的且組合物在經腦脊髓膜內投與至個體時耐受，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，該等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-乙醯胺基葡萄糖苷酶、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，該等蛋白質及/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-乙醯胺基葡萄糖苷酶、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，該等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，該等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，該等醫藥組合物促進或展示治療劑之細胞定位，由此該治療劑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，該等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，該等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，該等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，該等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，該等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，在投與至個體後，該等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其中含有之治療劑。例如，在投與後(例如，在經腦脊髓膜內投與至個體後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 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 、至少15 $\mu\text{g/mL}$ 、至少10 $\mu\text{g/mL}$ 、至少7.5 $\mu\text{g/mL}$ 、至少5 $\mu\text{g/mL}$ 、至少2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、至少1 $\mu\text{g/mL}$ 或至少0.5 $\mu\text{g/mL}$ 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之間之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)較佳經調配使得治療劑不會自組合物沉澱出來。在某些實施例中，該等組合物不含有鈣或其鹽。

較佳者係投與至個體後隨時間推移不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，該等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，由此在投與至該個體後治療劑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至個體。

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至該個體之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定該治療劑於該醫藥組合物中之溶解性、評定該治療劑於該醫藥組合物中之穩定性及評定該醫藥組合物在經腦脊髓膜內投與至個體後之耐受性。

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至個體)。例如，可將組合物經腦脊髓膜內投與至個體，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-乙醯胺基葡萄糖苷酶或半乳糖腦苷酶。

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)後具有改良之穩定性及改良之耐受性。

治療

如上文所討論，BBB係限制物質擴散跨過BBB及擴散至下面的CNS中之結構系統。在全身遞送大的大分子(例如外源治療性蛋白質及酵素)後，大多未成功地在CNS之細胞及組織內達到治療劑之治療濃度。例如，嘗試僅全身投與酵素來治療泰-薩克斯病(Tay-Sachs disease)具有有限之治療價值，此乃因該等酵素至CNS之細胞及組織中之分佈較差以及該等酵素以全身方式清除及降解。(von Specht BU等人，Neurology(1979) 29:848-854)。因此，將大分子治療劑遞送跨過BBB並隨後在CSF及CNS組織(例如，腦)中達到及/或保持該等治療劑之有效治療濃度係治療具有特定CNS成份及/或病因之疾病的特定挑戰。具體而言，除非酵素可被有效地遞送至需要的作用位點(例如，腦組織，例如大腦皮質、小腦及/或大腦)，否則酵素替代療法(ERT)對於治療與CNS組織中一或多種酵素病理性缺陷有關之疾病(例如，溶酶體貯積症)的功用及功效仍然有限。

由於BBB之障壁特性及與全身投與治療性蛋白質及/或酵素有關之侷限性，較佳將本文所述醫藥組合物直接投與至個體之CNS中。本

發明醫藥組合物之較佳投與途徑包括(例如)腦脊髓膜內、腦室內、大腦室內及腦池內遞送。

儘管對於溶酶體貯積症之軀體症狀的治療已經取得了一些進展，但對於伴隨該等疾病之通常具有破壞性的神經後遺症尚未取得類似的療法發展。例如，嚴重的亨特氏症候群在受侵襲患者之腦中呈現組織學變化，此可包括萎縮、皮質神經元腫脹、大腦白質減少、血管周間隙擴大及普爾欽細胞樹突腫脹。磁共振成像/光譜研究已顯示，與不患有認知損害者相比，在患有認知損害之患者中包括白質、腦萎縮及腦積水之嚴重彌漫性損傷更常見。(Vedolin, L.等人，AJNR Am J Neuroradiol (2007) 28, 1029-1033)。甚至不患有諸如智力遲鈍或發育遲緩等極度神經後遺症的患者亦顯示具有腦異常，包括萎縮、腦室擴大及血管周間隙擴大。(Matheus, MG等人，Neuroradiology (2004) 46, 666-672。)

因此，某些實施例係關於將一或多種治療劑遞送至CNS細胞之一或多種細胞器(例如，溶酶體)中以治療該等溶酶體貯積症且尤其治療該等溶酶體貯積症之神經後遺症的方法。例如，某些實施例係關於向受亨特氏症候群侵襲之個體之中樞神經系統中投與(例如，經腦脊髓膜內)包含治療有效量之艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶之醫藥組合物，其中該醫藥組合物使得艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶分佈及/或積聚至一或多種受侵襲細胞器(例如溶酶體或粒線體)中。某些實施例係關於治療一或多種溶酶體貯積症(例如，亨特氏症候群或B型聖菲利波症候群)之方法，其藉由減少或消除個體溶酶體內未消化大分子之積聚或另一選擇為減小該等溶酶體之尺寸及數量由此減少或改善細胞功能障礙及其他有關臨床異常來實施。因此，本發明之方法及醫藥組合物可減弱、治癒或改善溶酶體貯積症(例如亨特氏症候群)之CNS表現。可藉由該等方法及組合物治療之其他溶酶體貯積症種類可為熟習此項技術

者例行獲知且例行獲得。(參見例如，Kolodny等人，「Storage Diseases of the Reticuloendothelial System」，Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood, (1998)第5版，第2卷，David G. Nathan及Stuart H. Orkin編輯，W. B. Saunders公司，第1461-1507頁，其內容以引用方式併入本文中。)

可使用本發明方法及組合物治療之較佳溶酶體貯積症包括具有CNS病因或成份之疾病。具有CNS病因或成份之溶酶體貯積症包括(例如且不限於)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。經批准療法之侷限性在於其經靜脈內投與個體且通常僅可有效治療由酵素缺陷引起之軀體症狀。本發明組合物及方法可有利地直接投與至患有具有該CNS病因之疾病之個體的CNS中(例如，經腦脊髓膜內、經腦室內或經腦池內)，由此在CNS之受侵襲細胞及組織(例如，腦)內達到治療濃度，從而克服與傳統的全身投與該等治療劑有關之限制。

某些實施例之醫藥組合物亦可被描述成能夠有效地分佈至CNS細胞及組織中，由此將一或多種治療劑(例如，以重組方式製備之用於治療溶酶體貯積症的酵素)遞送至目標細胞及組織中(或使該一或多種治療劑與目標細胞及組織接觸)。在一些實施例中，該等醫藥組合物能夠促進一或多種治療劑分佈至CNS細胞及組織(例如，神經元)中，由此治療具有CNS表現之疾病(例如，亨特氏症候群)。在某些實施例中，目標組織可包括CSF及/或腦(例如，白質、灰質、大腦皮質、小腦、大腦、穹窿及/或胼胝體)。在某些實施例中，該等醫藥組合物(例如，經腦脊髓膜內投與之I2S)可促進治療劑於一或多種目標細胞(例如，神經元、外顯子、軸突、少突膠質細胞及/或普爾欽細胞)中之細胞定位。在某些實施例中，該等醫藥組合物(例如，經腦脊髓膜內投與之溶酶體酵素)可促進治療劑於目標組織或目標細胞之一或多種細

胞器(例如，溶酶體、粒線體或空泡)中之定位。

在一些實施例中，本發明組合物及方法可經腦脊髓膜內投與，且展示在腦之深層細胞、組織及細胞器中達到缺陷蛋白質或酵素之治療濃度的能力。例如，在一些實施例中，經腦脊髓膜內投與之酵素展示易位動力學，由此酵素在血管周間隙內移動(例如，藉由脈動輔助之對流機制)。另外，與所投與蛋白質或酵素與神經絲之結合有關之主動軸突轉運機制亦可有助於或促進經腦脊髓膜內投與之蛋白質或酵素分佈至中樞神經系統之深層組織中。

本文所述醫藥組合物可有利地促進一或多種治療劑遞送至目標細胞器中。例如，由於溶酶體貯積症(例如亨特氏症候群)之特徵在於受侵襲細胞之溶酶體中積聚糖胺聚多糖(GAG)，故對於治療溶酶體貯積症而言溶酶體係有吸引力的目標細胞器。因此，在某些實施例中，該等醫藥組合物使得或促進其中含有之治療劑分佈至目標細胞且尤其該等目標細胞內之細胞器(例如溶酶體)中。

在某些實施例中，本發明醫藥組合物引起或展示一或多種與溶酶體貯積症有關之病理或生物標記之存在或者積聚減少(例如約5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、97.5%、99%或更多減少)或完全消除。該減少或消除在CNS細胞及組織(例如神經元及少突膠質細胞)中尤其明顯。例如，在一些實施例中，在投與個體時，本發明醫藥組合物展示或達成個體之CNS細胞及組織中(例如大腦皮質、小腦、尾狀核及豆狀核殼、白質及/或丘腦中)生物標記溶酶體相關膜蛋白1(LAMP1)積聚減少。LAMP1係高度表現於溶酶體膜中之糖蛋白，且在許多患有溶酶體貯積症之患者中存在提高。(Meikle等人，Clin Chem. (1997) 43: 1325-1335。) 因此，在患有溶酶體貯積症之患者中存在或不存在LAMP1(例如藉由LAMP染色測定)可提供溶酶體活性之有用指

標及用於診斷及監測溶酶體貯積症之標記。

因此，本發明之一些實施例係關於減少或消除一或多種與疾病(例如溶酶體貯積症)有關之病理或生物標記之存在或積聚的方法。類似地，本發明之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。

本發明組合物及方法亦可用於治療溶酶體貯積症之神經及軀體後遺症。例如，本發明之一些實施例係關於將一或多種治療劑遞送至個體之CNS(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之CNS或神經後遺症及表現、同時亦治療該溶酶體貯積症之全身或軀體表現的組合物及方法。例如，可將一些本發明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，連合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)或受該疾病影響之個體至少每週一次、每兩週一次、每月一次、每兩個月一次或更久地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，同時更頻繁地(例如每天一次、每隔一天一次、每週三次或每週一次)經靜脈內向該個體投與不同治療劑以治療該疾病之全身或軀體表現。

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」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。

本發明組合物及方法通常適用於許多治療劑。在一些實施例中，本發明醫藥組合物及方法包含蛋白質及/或酵素作為治療劑。在本發明一些實施例中，治療劑可為天然或重組衍生之蛋白質及/或酵素。在一些實施例中，治療劑係可用於治療疾病(例如溶酶體貯積症)之天然或重組酵素。例如，在某些實施例中，本發明醫藥組合物包含重組酵素乙醯肝素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-乙醯胺基葡萄糖苷酶或半乳糖腦苷酶中之一或更多者。

本發明方法涵蓋單次以及多次投與有效量之本文所述醫藥組合物。該等醫藥組合物可每隔一定時間投與，此端視個體病狀(例如，溶酶體貯積症)之性質、嚴重程度(severity)及範圍(extent)而定。在一些實施例中，可每隔一定時間週期性地投與有效量之本發明醫藥組合物(例如，一年一次、一年四次、兩個月一次、每月一次、兩週一次、一週一次、一週兩次、一週三次、每天一次、一天兩次、一天三次或四次或更頻繁)。

在某些實施例中，本發明醫藥組合物係無菌的且利用適當無菌技術投與至個體。

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。

本文所用之術語「有效量」主要係基於本發明醫藥組合物中所含有治療劑之總量來確定。通常，有效量足以對個體達成有意義的益處(例如，治療、調節、治癒、預防及/或改善潛在疾病或病狀)。例如，本發明醫藥組合物之有效量可為足以達成期望治療及/或預防效果的量，例如足以調節溶酶體酵素受體或其活性由此治療該溶酶體貯積症或其症狀(例如，在將本發明組合物投與個體後減少或消除「斑馬

體」或細胞空泡形成的存在或發生)的量。通常，投與至有需要之個體的治療劑(例如，重組溶酶體酵素)的量應端視個體特徵而定。該等特徵包括個體之病狀、疾病嚴重程度、總體健康狀況、年齡、性別及體重。熟習此項技術者可容易地能夠端視該等及其他相關因素來確定合適劑量。另外，可視情況利用客觀及主觀分析來確定最佳劑量範圍。

確定治療個體所需要之治療劑的有效量在研發本發明醫藥組合物時係尤其重要的考慮因素。可經腦脊髓膜內投與至個體之有限體積可影響醫藥組合物中治療劑之濃度。在某些實施例中，醫藥組合物中治療劑之濃度足以及在受侵襲之CNS細胞及組織(例如，腦)中達到該治療劑之治療濃度。

例如，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)中達到或檢測到其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至個體後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 $\mu\text{g/mL}$ 之濃度。在某些實施例中，在投與至個體後(例如，在將醫藥組合物經腦脊髓膜內投與至個體後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20 $\mu\text{g/mL}$ 、至少15 $\mu\text{g/mL}$ 、至少10 $\mu\text{g/mL}$ 、至少7.5 $\mu\text{g/mL}$ 、至少5 $\mu\text{g/mL}$ 、至少2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、至少1.0 $\mu\text{g/mL}$ 或至少0.5 $\mu\text{g/mL}$ 之濃度。

在某些實施例中，醫藥組合物中治療劑之濃度係至少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長時間內保持穩定(例如，在室溫下或另一選擇為在36-46°F之冷凍條件下穩定至少12個月)。

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乙醯肝素-N-硫酸酯酶(HNS)蛋白質活性或挽救一或多種與HNS-缺陷有關之表型或症狀的任一分子或分子部分。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HNS蛋白質實質上類似或相同之N-末端及C-末端及胺基酸序列之多肽。

通常，人類HNS係以處理為成熟形式之前體分子產生。此過程通常藉由去除20個胺基酸信號肽來進行。通常，前體形式亦稱作全長前體或全長HNS蛋白質，其含有502個胺基酸。將N-末端20個胺基酸解離，從而產生長度為482個胺基酸之成熟形式。因此，預計對於HNS蛋白質活性而言，通常無需N-末端20個胺基酸。典型野生型或天然存在之人類HNS蛋白質之成熟形式(SEQ ID NO:1)及全長前體(SEQ ID NO:2)的胺基酸序列展示於表1中。

表1. 人類乙醯肝素-N-硫酸酯酶

成熟形式	RPRNALLLLA DDGGFESGAY NNSAIATPHL DALARRSLLF RNAFTSVSSC SPSRASLLTG LPQHQNMGMYG LHQDVHHFNS FDKVRSLPLL LSQAGVRTGI IGKKHVGPEP VYPDFDAYTE ENGSVLQVGR NITRIKLLVR KFLQTQDDRP FFLYVAFHDP HRCGHSQPQY GTFCEKFGNG ESGMGRIPDW TPQAYDPLDV LVPYFVPNTP AARADLAAQY TTVGRMDQGV GLVLQELRDA GVLNDTLVIF TSDNGIPFPS GRNLYWPGT AEPLLVSPE HPKRWGQVSE AYVSLDLTP TILDWFSIPY PSYAIFGSKT
------	--

	IHLTGRSLLP ALEAEPLWAT VFGSQSHHEV TMSYPMRSVQ HRHFRLVHNL NFKMPFPIDQ DFYVSPTFQD LLNRTTAGQP TGWYKDLRHY YYRARWELYD RSRDPHETQN LATDPRFAQL LEMLRDQLAK WQWETHDPWV CAPDGVLEEK LSPQCQPLHN EL (SEQ ID NO:1)
全長前體	MSCPVPACCA LLLVLGLCRARPRNALLLA DDGGFESGAY NNSAIATPHL DALARRSLF RNAFTSVSSC SPSRASLLTG LPQHQNMGMYG LHQDVHHFNS FDKVRSPLLL LSQAGVRTGI IGKKHVGPEP VYPFDAYTE ENGSVLQVGR NITRIKLLVR KFLQTQDDRP FFLYVAFHDP HRCGHSQPQY GTFCEKFGNG ESGMGRIPDW TPQAYDPLDV LVPYFVPNTP AARADLAAQY TTVGRMDQGV GLVLQELRDA GVLNDTLVIF TSDNGIFPFS GRTNLYWPGT AEPLLVSSE HPKRWGQVSE AYVSLDLTP TILDWFSIPY PSYAIFGSKT IHLTGRSLLP ALEAEPLWAT VFGSQSHHEV TMSYPMRSVQ HRHFRLVHNL NFKMPFPIDQ DFYVSPTFQD LLNRTTAGQP TGWYKDLRHY YYRARWELYD RSRDPHETQN LATDPRFAQL LEMLRDQLAK WQWETHDPWV CAPDGVLEEK LSPQCQPLHN EL (SEQ ID NO:2)

因此，在一些實施例中，適於本發明之治療性部分係成熟人類HNS蛋白質(SEQ ID NO:1)。在一些實施例中，適宜治療性部分可為成熟人類HNS蛋白質之同源物或類似物。例如，成熟人類HNS蛋白質之同源物或類似物可為與野生型或天然存在之HNS蛋白質(例如，SEQ ID NO:1)相比含有一或多個胺基酸取代、缺失及/或插入、同時保持實質HNS蛋白質活性之經修飾成熟人類HNS蛋白質。因此，在一些實施例中，適於本發明之治療性部分與成熟人類HNS蛋白質(SEQ ID NO:1)實質上同源。在一些實施例中，適於本發明之治療性部分之胺基酸序列與SEQ ID NO:1至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同源。在一些實施例中，適於本發明之治療性部分與成熟人類HNS蛋白質(SEQ ID NO:1)實質上一致。在一些實

施例中，適於本發明之治療性部分之胺基酸序列與SEQ ID NO:1至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致。在一些實施例中，適於本發明之治療性部分含有成熟人類HNS蛋白質之片段或部分。

另一選擇為，適於本發明之治療性部分係全長HNS蛋白質。在一些實施例中，適宜治療性部分可為全長人類HNS蛋白質之同源物或類似物。例如，全長人類HNS蛋白質之同源物或類似物可為與野生型或天然存在之全長HNS蛋白質(例如，SEQ ID NO:2)相比含有一或多個胺基酸取代、缺失及/或插入、同時保持實質HNS蛋白質活性之經修飾全長人類HNS蛋白質。因此，在一些實施例中，適於本發明之治療性部分與全長人類HNS蛋白質(SEQ ID NO:2)實質上同源。在一些實施例中，適於本發明之治療性部分之胺基酸序列與SEQ ID NO:2至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同源。在一些實施例中，適於本發明之治療性部分與SEQ ID NO:2實質上一致。在一些實施例中，適於本發明之治療性部分之胺基酸序列與SEQ ID NO:2至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致。在一些實施例中，適於本發明之治療性部分含有全長人類HNS蛋白質之片段或部分。如本文所用，全長HNS蛋白質通常含有信號肽序列。

在一些實施例中，治療性蛋白質包括靶向部分(例如，溶酶體靶向序列)及/或膜穿透肽。在一些實施例中，靶向序列及/或膜穿透肽係治療性部分之固有部分(例如，經由化學連接、經由融合蛋白)。在一些實施例中，靶向序列含有甘露糖-6-磷酸鹽部分。在一些實施例

中，靶向序列含有IGF-I部分。在一些實施例中，靶向序列含有IGF-II部分。

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2中。如表2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2

溶液	Na ⁺ mEq/L	K ⁺ mEq/L	Ca ⁺⁺ mEq/L	Mg ⁺⁺ mEq/L	HCO ₃ ⁻ 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所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。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個月或更長時間)評定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定治療劑之穩定性。例如，可對照早期時間點(例如，調配時第0天)之穩定性或對照未經調配治療劑比較給定時間點之穩定性，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)。

該等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，該等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)之範圍內之所關注蛋白質或治療劑。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係較佳的，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3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3

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	保持穩定抵抗介面及剪切
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之磷酸鈉且足以使該水性醫藥組合物之最佳pH保持在約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進行量測。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，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經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)。凍乾調配物中之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之降解/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時通常呈水性形式，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需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」係增加凍乾混合物質量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，月桂基醯胺丙基)；肉豆蔻醯胺丙基-、棕櫚油醯胺丙基-或異硬脂醯胺丙基-二甲胺；甲基椰油醯基牛磺酸鈉或甲基油醯基牛磺酸鈉；及MONAQUATTM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，Pluronic、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(例如彼等闡述於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定：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為較小子樣(increment)以供儲存。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。

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其復原(若凍乾)及/或使用之說明。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。容器可容納調配物，且位於容器上、或與其連接之標籤可指示復原及/或使用之說明。例如，標籤可指示如上所述將調配物復原至蛋白質濃度。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。將稀釋劑及調配物混合後，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、及具有使用說明之包裝插頁。

投與

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至個體之體積，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所限制。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。(參見例如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，沒有自個體對應移除CSF，在人類中總腦脊髓膜內劑量體積限於小於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，此方式可在(例如)動物物種中使用係由於與腦脊髓膜內或腦室內投與相比在小型齧齒類動物中使用此方式後勤方便。

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)。彼等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流體輸液座組成。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，流體輸液座與大腦室內(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劑量之體積投與至個體。

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，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足以治療該疾病之劑量量，如上文所述)投與。本文所用治療有效量

亦稱作治療有效劑量或治療有效劑量量。可治療有效地治療疾病之劑量取決於疾病效應之性質及程度，且可藉由標準臨床技術測定。另外，可視情況採用活體外或活體內分析以有助於鑑別最佳劑量範圍。擬採用之準確劑量亦視投與途徑、及疾病嚴重性而定，且應根據執業醫師之判斷及各患者之情況來決定。有效劑量可自源自活體內或動物模型測試系統之劑量響應曲線外推(例如，如由美國衛生和人類服務部(U.S. Department of Health and Human Services)食品藥品管理局(Food and Drug Administration)及藥品評價與研究中心(Center for Drug Evaluation and Research)在「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體重、約4-20 mg/kg體重、約5-15 mg/kg體重、約5-10 mg/kg體重。

端視個體需要，用於特定個體之有效劑量可隨時間推進而有所變化(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有所惡化，則可增加劑量量。

端視疾病影響之性質及程度以及進行性基礎而定，每隔一定時間持續投與治療有效量之本發明之靶向治療劑(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，兩個月一次、每月一次、一月兩次、三週一次、兩週一次、一週一次、一週兩次、一週三次、或每天一次投與本發明之靶向治療劑(或含有其之組合物或藥劑)。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有所惡化，則可降低劑量之間之間隔。

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)中達到或檢測到其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至個體後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HNS。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HNS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」意指每三個週投與一次(即，每三個週一次)；術語「每兩週一次」意指每兩個週投與一次(即，每兩個週一次)；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，在投與至個體後(例如，在將醫藥組合物經腦脊髓膜內投與至個體後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，醫藥組合物中之治療劑之濃度為至少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長時間內保持穩定(例如，在室溫下或另一選擇為在4-8°C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(即，在每隔一定時間投與時，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足以治療該疾病之劑量，如上文所述)投與。本文所用治療有效量亦稱作治療有效劑量或治療有效劑量。可治療有效地治療疾病之劑量取決於疾病效應之性質及程度，且可藉由標準臨床技術測定。另外，可視情況採用活體外或活體內分析以有助於鑑別最佳劑量範圍，例如彼等在下文中例示者。擬採用之準確劑量亦視投與途徑、及疾病嚴重性而定，且應根據執業醫師之判斷及各患者之情況來決定。例如，在一些實施例中，HNS之靜脈內投與治療有效量為HNS之腦脊髓膜內投與治療有效量的約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倍或更多倍。有效劑量可自源自活體內或動物模型測試系統之劑量響應曲線外推(例如，如由美國衛生和人類服務部(U.S. Department of Health and Human Services)食品藥品管理局(Food and Drug Administration)及藥品評價與研究中心(Center for Drug Evaluation and Research)在「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)大於約0.01 mg/kg體重、大於約0.05 mg/kg體重、大於約0.1 mg/kg體重、大於約0.5 mg/kg體重、大於約1.0 mg/kg體重、大於約1.5 mg/kg體重、大於約2.0 mg/kg體重、大於約2.5 mg/kg體重、大於約5.0 mg/kg體重、大於約7.5 mg/kg體重、大於約10 mg/kg體重、大於約12.5 mg/kg體重、大於約15 mg/kg體重、大於約17.5 mg/kg體重、大於約20 mg/kg體重、大於約22.5 mg/kg體重、或大於約25 mg/kg體重。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體重、約0.01-15 mg/kg體重、約0.01-10 mg/kg體重、約0.01-7.5 mg/kg體重、約0.01-5 mg/kg體重、約0.01-4 mg/kg體重、約0.01-3 mg/kg體重、約0.01-2 mg/kg體重、約0.01-1.5 mg/kg體重、約0.01-1.0 mg/kg體重、約0.01-0.5 mg/kg體重、約0.01-0.1 mg/kg體重、約1-20 mg/kg體重、約4-20 mg/kg體重、約5-15 mg/kg體重、約5-10 mg/kg體重。在一些實施例中，治療有效量為約0.01 mg/kg體重、約0.05 mg/kg體重、約0.1 mg/kg體重、約0.2 mg/kg體重、約0.3 mg/kg體重、約0.4 mg/kg體重、約0.5 mg/kg體重、約0.6 mg/kg體重、約0.7 mg/kg體重、約0.8 mg/kg體重、約0.9 mg/kg體重、約1.0 mg/kg體重、約1.1 mg/kg體重、約1.2 mg/kg體重、約1.3 mg/kg、約1.4 mg/kg體重、約1.5 mg/kg體重、約

1.6 mg/kg體重、約1.7 mg/kg體重、約1.8 mg/kg體重、約1.9 mg/kg體重、約2.0 mg/kg體重、約2.5 mg/kg體重、約3.0 mg/kg體重、約4.0 mg/kg體重、約5.0 mg/kg體重、約6.0 mg/kg體重、約7.0 mg/kg體重、約8.0 mg/kg體重、約9.0 mg/kg體重、約10.0 mg/kg體重、約11.0 mg/kg體重、約12.0 mg/kg體重、約13.0 mg/kg體重、約14.0 mg/kg體重、約15.0 mg/kg體重、約16.0 mg/kg體重、約17.0 mg/kg體重、約18.0 mg/kg體重、約19.0 mg/kg體重、約20.0 mg/kg體重、或更高。在一些實施例中，治療有效量不大於約30 mg/kg、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體重或更小。

端視個體需要，用於特定個體之有效劑量可隨時間推進而有所變化(例如，增加或降低)。例如，在身體性疾病或應力情況下，或若抗HNS抗體存在或增加，或若疾病症狀惡化，則可增加劑量。

在另一實施例中，可在治療過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，後續較低劑量)之治療組合物。不期望受限於任何理論，預計負荷劑量會消除脂肪物質在組織中(例如，在肝中)之初始及(通常)大量積聚，且維持劑量可防止初始消除後脂肪物質之累積。

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

5 mg/kg體重、約0-2 mg/kg體重、約0-1 mg/kg體重、約0-0.5 mg/kg體重、約0-0.4 mg/kg體重、約0-0.3 mg/kg體重、約0-0.2 mg/kg體重、約0-0.1 mg/kg體重。在一些實施例中，在給定時間(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或更多劑量)下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，維持劑量之範圍為0-2 mg/kg體重、約0-1.5 mg/kg體重、約0-1.0 mg/kg體重、約0-0.75 mg/kg體重、約0-0.5 mg/kg體重、約0-0.4 mg/kg體重、約0-0.3 mg/kg體重、約0-0.2 mg/kg體重、或約0-0.1 mg/kg體重。在一些實施例中，維持劑量為約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」係指在重疊方案中投與兩種或更多種不同醫藥劑從而使個體同時暴露於兩種藥劑的彼等情形。可單獨、或結合其他藥劑投與HNS(或含有HNS之組合物或藥劑)，該等藥劑係(例如)抗阻胺藥(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、噴司他丁(pentostatin)、奈拉濱(nelarabine)或米托蒽醌(mitoxantrone))或抵抗抗HNS抗體之其他免疫治療劑。

熟習此項技術者已知之任一免疫抑制劑可與本發明之組合療法一起使用。該等免疫抑制劑包括但不限於環孢菌素(cyclosporine)、FK506、雷帕黴素(rapamycin)、CTLA4-Ig、及諸如依那西普(etanercept)等抗TNF劑(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 ; Potter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)。抗IL2受體(α 亞單位)抗體達珠單抗(daclizumab)(例如賽尼哌TM.(Zenapax.TM.))已證實可有效用於移植患者中, 其亦可用作免疫抑制劑(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)。額外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「與...結合」表示藥劑在HNS(或含有HNS之組合物)之前、大致同時、或之後投與。例如, 可將藥劑混合至含有HNS之組合物中, 且由此與HNS同時投與; 另一選擇為, 可在並不混合之情形下同時投與藥劑(例如, 藉由在亦投與HNS之靜脈管線上「附帶」遞送藥劑, 或反之亦然)。在另一實例中, 可單獨(例如, 並不混合)、但在投與HNS後短時間範圍內(例如, 在24小時內)投與藥劑。在一些實施例

中，結合經設計以減小抗HNS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HNS(或含有HNS之組合物)。例如，可使用與彼等用於血友病患者中之方案(Nilsson等人，(1988) *N. Engl. J. Med.*, 318:947-50)類似之方案來減少抗HNS抗體。此一方案可用於具有抗HNS抗體或處於具有抗HNS抗體之風險中的個體中。在一些實施例中，免疫抑制或免疫治療方案開始於首次投與HNS之前以將產生抗HNS抗體之可能性降至最低。熟習此項技術者已知之免疫抑制劑的任一組合皆可與本發明組合療法一起使用。

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。

應理解，在本文說明書及申請專利範圍中使用之冠詞「一(a及an)」除非明確指示相反情形否則包括複數個指示物。除非上下文中指示相反情形或另有說明，否則若一個、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，則可認為在群組的一或多個成員間包括「或」的技術方案或說明係適合表述該情形的。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，應理解，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，則應理解，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。應理解，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。亦應理解，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敘述該特定排除。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。

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範圍。所有文獻引文皆以引用方式併入本文中。

實例

實例1：HNS調配物

將本實例中之實驗設計成預調配研究之一部分以檢查乙醯肝素-N-硫酸酯酶(HNS)在各種調配條件(包括pH、離子強度、及意欲經腦脊髓膜內遞送之緩衝劑類型)中之穩定性。

發現HNS通常係呈其天然狀態之二聚體(Bielicki等人，*Journal of Biochemistry*, 1998, 329, 145-150)。HNS二聚體之分子量為115 kDa。在尺寸排除層析(SEC)期間，HNS通常以二聚體形式洗脫出。在SDS-PAGE凝膠上進行試驗時，HNS表現為二聚體形式，除非在裝載至凝膠上之前將試樣加熱至100℃，在此情形下其表現為單體形式(62 kDa)。HNS之全長及成熟序列分別展示於下表6及表7中。成熟HNS序列含有5個半胱胺酸殘基(加下劃線)，此可容許具有兩個內部二硫鍵及一個游離半胱胺酸。

表6：全長HNS之序列

MSCVPACCA	LLLVLGLCRA	RPRNALLLLA	DDGGFESGAY	NNSAIATPHL
DALARRSLLF	RNAFTSVSSC	SPSRASLLTG	LPQHQNGMYG	LHQDVHHFNS
FDKVRSLPLL	LSQAGVRTGI	IGKKHVGPEP	VYPFDFAYTE	ENGSVLQVGR

NITRIKLLVR	KFLQTQDDRP	FFLYVAFHDP	HRC <u>G</u> HSQPQY	GTF <u>C</u> EKFGNG
ESGMGRIPDW	TPQAYDPLDV	LVPYFVPNT	AARADLAAQY	TTVGRMDQGV
GLVLQELRDA	GVLNDTLVIF	TSDNGIPFPS	GRTNLYWPGT	AEPLLVSSE
HPKRWGQVSE	AYVSLDLTP	TILDWFSIPY	PSYAIFGSKT	IHLTGRSLLP
ALEAEPLWAT	VFGSQSHHEV	TMSYPMRSVQ	HRHFRLVHNL	NFKMPFPIDQ
DFYVSPTFQD	LLNRTTAGQP	TGWYKDLRHY	YYRARWELYD	RSRDPHETQN
LATDPRFAQL	LEMLRDQLAK	WQWETHDPWV	<u>C</u> APDGVLEEK	LSPQ <u>C</u> QPLHN

EL (SEQ ID NO:2)

表7：成熟HNS (rhHNS)之序列

RPRNALLLLA	DDGGFESGAY	NNSAIATPHL	DALARRSLLF	RNAFTSVSS <u>C</u>
SPSRASLLTG	LPQHQNMGMYG	LHQDVHHFNS	FDKVRSLPLL	LSQAGVRTGI
IGKKHVGPE	VYPFDFAYTE	ENGSVLQVGR	NITRIKLLVR	KFLQTQDDRP
FFLYVAFHDP	HRC <u>G</u> HSQPQY	GTF <u>C</u> EKFGNG	ESGMGRIPDW	TPQAYDPLDV
LVPYFVPNT	AARADLAAQY	TTVGRMDQGV	GLVLQELRDA	GVLNDTLVIF
TSDNGIPFPS	GRTNLYWPGT	AEPLLVSSE	HPKRWGQVSE	AYVSLDLTP
TILDWFSIPY	PSYAIFGSKT	IHLTGRSLLP	ALEAEPLWAT	VFGSQSHHEV
TMSYPMRSVQ	HRHFRLVHNL	NFKMPFPIDQ	DFYVSPTFQD	LLNRTTAGQP
TGWYKDLRHY	YYRARWELYD	RSRDPHETQN	LATDPRFAQL	LEMLRDQLAK
WQWETHDPWV	<u>C</u> APDGVLEEK	LSPQ <u>C</u> QPLHN	EL (SEQ ID NO:1)	

在此實例中，檢查下列調配參數：(1) pH為3-8之檸檬酸鹽調配物及pH為5-8之磷酸鹽調配物中之pH；(2)緩衝劑：檸檬酸鈉緩衝劑(pH 3.0-8.0)及磷酸鈉緩衝劑(pH 5.0-8.0)，其皆在20 mM濃度下；及(3)離子強度：NaCl (0-300 mM)。

此實例中所述之所有預調配研究皆係在1-2 mg/mL之低蛋白質濃度下實施。

為分析在各種應力下產生之調配產物及降解產物，使用SEC-HPLC、SDS-PAGE、差示掃描量熱法(DSC)、濁度(OD 320)及酵素活性分析。

通常，SDS-PAGE結果展示在低pH (pH 3)下調配物之碎裂，而較高pH調配物展示較小碎裂。藉由DSC對熔融溫度實施評價顯示，含有

檸檬酸鹽及磷酸鹽之rhHNS調配物在6-7之pH範圍下具有最大熱穩定性。酵素活性結果顯示含有檸檬酸鹽之rhHNS調配物在所有評價之pH值下在50℃下儲存7天後變得失活。含有磷酸鹽之rhHNS調配物(pH 6-7)在50℃下儲存7天後保留顯著活性。然而，高分子量峰(「16分鐘峰」，如藉由SEC所發現)在pH 7-8下最大，但在相同調配物之單獨製劑中不會總是能觀察到此峰。

亦評價離子強度(0-300 mM NaCl)對rhHNS調配物穩定性之效應。在50℃之加速穩定性條件下儲存7天之試樣的SDS-PAGE凝膠顯示，其碎裂並不大於內部批次對照。含有檸檬酸鹽之rhHNS調配物顯示在50℃下保持7天後活性完全損失，不管離子強度如何。含有磷酸鹽之rhHNS調配物在50-300 mM NaCl中保留顯著活性。然而，16分鐘峰(SEC)在50-150 mM NaCl範圍中最大。

方法

pH對rhHNS穩定性之效應

使用透析(Piece Slide-A-Lyzer，PN編號66383，批號HK107537)將rhHNS(9.2 mg/mL，存於10 mM磷酸鈉、138 mM氯化鈉中，pH 7.0)緩衝劑交換至20 mM檸檬酸鈉(pH範圍為3.0至8.0)、及20 mM磷酸鈉(pH範圍為6.0至8.0)中。每一交換緩衝劑中之目標最終蛋白質濃度皆為2.0 mg/mL。將該等溶液以0.5 mL各自等分至2.0 mL玻璃小瓶(West Pharmaceuticals，目錄編號：6800-0314，批號：30809A2001)中，且然後在50℃、25℃及2-8℃室中培育。在7、14及28天後，抽取試樣以用於分析聚集(SEC-HPLC)、碎裂(SDS-PAGE)、濁度(OD320)及酵素活性。

根據上述相同程序重複在磷酸鹽緩衝劑中之後續pH研究，然而，使用批號為SS10之rhHNS。初始磷酸鹽研究之pH範圍較窄，因此重複研究以納入較寬pH範圍。

OD320

藉由實施OD320量測來測定rhHNS試樣之濁度。藉由Molecular Devices SpectraMax Plus 384在2 mg/mL下於0.2 cm光路長度比色皿中量測試樣。每一測試之所用總體積為30 μ l。

SEC-HPLC

對於rhHNS之SEC-HPLC分析而言，使用Superdex管柱200 (10/300 GL, PN: 17-5175-01, GE Healthcare)。流動相係以0.5 mL/min流速流動之磷酸鹽緩衝鹽水(25 mM磷酸鈉，150 mM氯化鈉，pH 6)。注射體積為30 μ l(1 mg/mL，自2 mg/mL在各自緩衝劑中稀釋)。每一注射之運行時間為50分鐘且檢測波長為214 nm。

SDS-PAGE

此方法評價rhHNS在還原及變性條件下之碎裂及聚集。將rhHNS試樣與SDS緩衝劑(最終濃度= 0.5 mg/mL)混合，且添加DTT(僅還原試樣)。將試樣加熱至100 $^{\circ}$ C保持5分鐘。將試樣煮沸5分鐘以上可使rhHNS碎裂。在8-16%梯度之丙烯醯胺凝膠(目錄編號：EC6045BOX)上使用10 μ g之rhHNS試樣裝載每一泳道。將凝膠在150V下運行且然後與Gel Code Blue Coomassie染色劑一起培育過夜(在搖動下)。使用水將凝膠脫色1小時，然後實施掃描。

活性分析

用於rhHNS之活性分析係兩步反應。在第一反應中，乙醯肝素-N-硫酸酯酶將受質脫硫。在第二反應中，藉由添加 α -葡糖苷酶來進一步水解， α -葡糖苷酶可釋放然後可量測之4-MU。以1:210將rhHNS稀釋至10 μ g/mL之最終分析濃度。對於磷酸鹽緩衝劑pH研究，對分析進行修改且以1:24將rhHNS稀釋至約100 μ g/mL之最終分析濃度。

DSC

在Microcalorimeter儀器(MicroCal VP-DSC)上實施差示掃描量熱

法(DSC)量測。所測試之rhHNS試樣為0.5 mg/mL。將溫度平衡至10℃，且然後以1°/分鐘斜升至100℃。

離子強度對HNS穩定性之效應

使用透析(Piece Slide-A-Lyzer批號HK107537)將rhHNS緩衝劑交換至20 mM檸檬酸鹽緩衝劑(pH 6.0，具有0-300 mM範圍之氯化鈉)、及20 mM磷酸鹽緩衝劑(pH 7.0，具有0-300 mM範圍之氯化鈉)。每一交換緩衝劑中之目標最終蛋白質濃度為2.0 mg/mL。將該等溶液以0.5 mL各自等分至2.0 mL玻璃小瓶(West Pharmaceuticals，目錄編號：6800-0314，批號：30809A2001)中，且然後在50℃、25℃及2-8℃室中培育。在7、14及28天後，抽取試樣以用於分析聚集(SEC-HPLC)、碎裂(SDS-PAGE)、濁度(OD 320)及酵素活性。

結果

pH對HNS穩定性之效應

OD320及外觀

量測濁度之OD 320值的結果示於下表8中。在含有磷酸鹽(pH 7)或檸檬酸鹽(pH 3-6)之rhHNS調配物之加速穩定性條件下，濁度並無顯著變化。然而，在pH 8.0下之試樣(在磷酸鹽及檸檬酸鹽調配物中)、及在pH 7.0下之檸檬酸鹽試樣顯示在50℃下保持7天後濁度有所增加。在光盒(M.W. Technologies，INC，型號：MIH-DX)下實施外觀檢查且所有調配物皆表現為保持澄清、無色及不含可視微粒。

表8. pH研究之OD320匯總

儲存條件	調配物	OD 320
ILC	2 mg/mL HNS，20 mM檸檬酸鹽，pH 3.0	0.005
50℃，7天	2 mg/mL HNS，20 mM檸檬酸鹽，pH 3.0	0.006
25℃，14天	2 mg/mL HNS，20 mM檸檬酸鹽，pH 3.0	0.007
5℃，28天	2 mg/mL HNS，20 mM檸檬酸鹽，pH 3.0	0.003

ILC	2 mg/mL HNS , 20 mM檸檬酸鹽 , pH 4.0	0.002
50°C , 7天	2 mg/mL HNS , 20 mM檸檬酸鹽 , pH 4.0	0.006
25°C , 14天	2 mg/mL HNS , 20 mM檸檬酸鹽 , pH 4.0	0.009
5°C , 28天	2 mg/mL HNS , 20 mM檸檬酸鹽 , pH 4.0	0.000
ILC	2 mg/mL HNS , 20 mM檸檬酸鹽 , pH 5.0	0.002
50°C , 7天	2 mg/mL HNS , 20 mM檸檬酸鹽 , pH 5.0	0.004
25°C , 14天	2 mg/mL HNS , 20 mM檸檬酸鹽 , pH 5.0	0.004
5°C , 28天	2 mg/mL HNS , 20 mM檸檬酸鹽 , pH 5.0	0.004
ILC	2 mg/mL HNS , 20 mM檸檬酸鹽 , pH 6.0	0.000
50°C , 7天	2 mg/mL HNS , 20 mM檸檬酸鹽 , pH 6.0	0.002
25°C , 14天	2 mg/mL HNS , 20 mM檸檬酸鹽 , pH 6.0	0.001
5°C , 28天	2 mg/mL HNS , 20 mM檸檬酸鹽 , pH 6.0	0.000
ILC	2 mg/mL HNS , 20 mM檸檬酸鹽 , pH 7.0	0.001
50°C , 7天	2 mg/mL HNS , 20 mM檸檬酸鹽 , pH 7.0	0.017
25°C , 14天	2 mg/mL HNS , 20 mM檸檬酸鹽 , pH 7.0	0.002
5°C , 28天	2 mg/mL HNS , 20 mM檸檬酸鹽 , pH 7.0	-0.001
ILC	2 mg/mL HNS , 20 mM檸檬酸鹽 , pH 8.0	0.000
50°C , 7天	2 mg/mL HNS , 20 mM檸檬酸鹽 , pH 8.0	0.018
25°C , 14天	2 mg/mL HNS , 20 mM檸檬酸鹽 , pH 8.0	0.002
5°C , 28天	2 mg/mL HNS , 20 mM檸檬酸鹽 , pH 8.0	-0.001
ILC	2 mg/mL HNS , 20 mM磷酸鹽 , pH 7.0	0.000
50°C , 7天	2 mg/mL HNS , 20 mM磷酸鹽 , pH 7.0	0.005
25°C , 14天	2 mg/mL HNS , 20 mM磷酸鹽 , pH 7.0	0.000
5°C , 28天	2 mg/mL HNS , 20 mM磷酸鹽 , pH 7.0	0.001
ILC	2 mg/mL HNS , 20 mM磷酸鹽 , pH 8.0	0.002
50°C , 7天	2 mg/mL HNS , 20 mM磷酸鹽 , pH 8.0	0.023
25°C , 14天	2 mg/mL HNS , 20 mM磷酸鹽 , pH 8.0	0.002
5°C , 28天	2 mg/mL HNS , 20 mM磷酸鹽 , pH 8.0	0.001

SEC-HPLC

rhHNS之SEC洗脫特徵的代表性層析圖示於圖1A-1C中。基線試樣主要含有三個峰，其中保留時間分別為約22 min、約26 min、及約32 min。有時，其亦具有在約34 min下之峰。藉由SEC-LS證實，在26 min下之主峰係二聚體。其他峰之性質尚未得知。

來自第一pH研究之SEC數據匯總於下表9中。總而言之，所有調配物在應激條件(50℃)以及加速條件(25℃)及即時儲存條件(2-8℃)下基本上具有較小變化。然而，在50℃下保持7天後，含有檸檬酸鹽或磷酸鹽之rhHNS調配物(pH 6-8)產生保留時間為16 min之高分子量峰。在含有磷酸鹽之rhHNS調配物(pH 7.0)中，16 min峰佔總面積之約2%。然而，在離子強度研究中製得之相同調配物僅含有約0.1%。

表9. 來自pH研究之SEC-HPLC數據匯總

儲存條件	調配物描述	16 Min峰%	二聚體%
ILC	20 mM檸檬酸鹽，pH 3.0	0	99.8
7天，50℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 3.0	0	99.9
14天，25℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 3.0	0	99.7
1個月，5℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 3.0	0	99.7
ILC	20 mM檸檬酸鹽，pH 4.0	0	99.8
7天，50℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 4.0	0	99.8
14天，25℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 4.0	0	99.6
1個月，5℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 4.0	0	99.5
ILC	20 mM檸檬酸鹽，pH 5.0	0	99.8
7天，50℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 5.0	0	99.8
14天，25℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 5.0	0	99.6
1個月，5℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 5.0	0	99.5
ILC	20 mM檸檬酸鹽，pH 6.0	0	99.8
7天，50℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 6.0	0.3	99.0
14天，25℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 6.0	0	99.6
1個月，5℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 6.0	0	99.3
ILC	20 mM檸檬酸鹽，pH 7.0	0	99.8
7天，50℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 7.0	0.9	98.6
14天，25℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 7.0	0	99.6
1個月，5℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 7.0	0	99.2
ILC	20 mM檸檬酸鹽，pH 8.0	0	99.8
7天，50℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 8.0	0.5	98.7
14天，25℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 8.0	0	99.6

1個月，5℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 8.0	0	99.4
ILC	20 mM磷酸鹽，pH 7.0	0	99.8
7天，50℃	20 mM磷酸鹽，pH 7.0	2.0	97.2
14天，25℃	20 mM磷酸鹽，pH 7.0	0	99.6
1個月，5℃	20 mM磷酸鹽，pH 7.0	0	99.5
ILC	20 mM磷酸鹽，pH 8.0	0	99.8
7天，50℃	20 mM磷酸鹽，pH 8.0	1.0	98.8
14天，25℃	20 mM磷酸鹽，pH 8.0	0	99.7
1個月，5℃	20 mM磷酸鹽，pH 8.0	0	99.4

為證實此現象，在較寬pH範圍內重複磷酸鹽緩衝劑中之pH研究且SEC數據匯總於下表10中。在此研究中，16分鐘峰並不存在於在50℃下保持7天後之pH 5緩衝劑中，但實際上存在於pH為6-8之調配物中，該16分鐘峰隨pH增加而增加。添加聚山梨醇酯20 (0.05%)並不顯著影響16分鐘峰之大小。有趣的是，在自鹽水溶液透析至pH 5調配物中進行製備期間，儘管pH 5調配物不含穩定性試樣中之此峰，但有顯著量之rhHNS發生沉澱。

表10. 來自重複磷酸鹽緩衝劑pH研究之SEC-HPLC數據匯總

儲存條件	調配物描述	16 min峰 %	二聚體 %
5℃，7天	2 mg/mL HNS，20 mM磷酸鹽，pH 5.0	0.0	98.4
50℃，7天	2 mg/mL HNS，20 mM磷酸鹽，pH 5.0	0.0	99.3
5℃，7天	2 mg/mL HNS，20 mM磷酸鹽，pH 6.0	0.0	99.0
50℃，7天	2 mg/mL HNS，20 mM磷酸鹽，pH 6.0	0.2	99.1
5℃，7天	2 mg/mL HNS，20 mM磷酸鹽，pH 7.0	0.0	98.8
50℃，7天	2 mg/mL HNS，20 mM磷酸鹽，pH 7.0	0.6	98.8
5℃，7天	2 mg/mL HNS，20 mM磷酸鹽，pH 7.0，0.05%聚山梨醇酯20	0.0	98.9
50℃，7天	2 mg/mL HNS，20 mM磷酸鹽，pH 7.0，0.05%聚山梨醇酯20	0.8	98.0
5℃，7天	2 mg/mL HNS，20 mM磷酸鹽，pH 8.0	0.0	99.1
50℃，7天	2 mg/mL HNS，20 mM磷酸鹽，pH 8.0	1.6	97.6

初步表徵結果證實16分鐘峰具有指示蛋白質之波譜，該波譜按比例放大時與rhHNS二聚體峰之波譜充分重疊(圖1D)。在藉由SEC-LS檢查時，16分鐘峰顯示 > 1 MDa之表觀分子量。可能需要其他表徵來瞭解此峰之性質。

酵素活性

來自第一pH研究之活性數據匯總示於下表5中。在50℃下保持7天之加速穩定性條件下，在所有含檸檬酸鹽調配物(pH 3-8)中，rhHNS失去大部分酵素活性，而含有磷酸鹽之rhHNS調配物(pH 7-8)則保留活性。在25℃及5℃下，存於檸檬酸鹽及磷酸鹽緩衝劑中之所有rhHNS調配物均保留大部分活性。含有檸檬酸鹽之rhHNS調配物(pH 3.0)似乎具有較低總活性值。來自磷酸鹽中之重複pH研究的活性數據匯總於表11及12中。所有rhHNS調配物(pH 5-7)在50℃下保持7天後保留84-100%之酵素活性，只是rhHNS調配物(pH 8.0)損失65%之活性。

表11. 來自第一pH研究之活性匯總

儲存條件	調配物描述	活性，nmol/mg/hr
ILC	20 mM檸檬酸鹽，pH 3.0	639
7天，50℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 3.0	29
14天，25℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 3.0	920
1個月，5℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 3.0	794
ILC	20 mM檸檬酸鹽，pH 4.0	2178
7天，50℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 4.0	43
14天，25℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 4.0	1998
1個月，5℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 4.0	2123
ILC	20 mM檸檬酸鹽，pH 5.0	1901
7天，50℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 5.0	72
14天，25℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 5.0	1779
1個月，5℃	20 mM檸檬酸鹽，pH 5.0	2194

ILC	20 mM檸檬酸鹽，pH 6.0	2316
7天，50°C	20 mM檸檬酸鹽，pH 6.0	80
14天，25°C	20 mM檸檬酸鹽，pH 6.0	2026
1個月，5°C	20 mM檸檬酸鹽，pH 6.0	2122
ILC	20 mM檸檬酸鹽，pH 7.0	2312
7天，50°C	20 mM檸檬酸鹽，pH 7.0	115
14天，25°C	20 mM檸檬酸鹽，pH 7.0	2009
1個月，5°C	20 mM檸檬酸鹽，pH 7.0	2205
ILC	20 mM檸檬酸鹽，pH 8.0	2221
7天，50°C	20 mM檸檬酸鹽，pH 8.0	44
14天，25°C	20 mM檸檬酸鹽，pH 8.0	2071
1個月，5°C	20 mM檸檬酸鹽，pH 8.0	2505
ILC	20 mM磷酸鹽，pH 7.0	640
7天，50°C	20 mM磷酸鹽，pH 7.0	1200
14天，25°C	20 mM磷酸鹽，pH 7.0	1749
1個月，5°C	20 mM磷酸鹽，pH 7.0	1391
ILC	20 mM磷酸鹽，pH 8.0	1451
7天，50°C	20 mM磷酸鹽，pH 8.0	1125
14天，25°C	20 mM磷酸鹽，pH 8.0	1620
1個月，5°C	20 mM磷酸鹽，pH 8.0	1492

表12. 來自重複pH研究之活性匯總

儲存條件	調配物描述	活性，nmol/mg/hr
°C，7天	2 mg/mL HNS，20 mM磷酸鹽，pH 5.0	4201
50°C，7天	2 mg/mL HNS，20 mM磷酸鹽，pH 5.0	3952
5°C，7天	2 mg/mL HNS，20 mM磷酸鹽，pH 6.0	3923
50°C，7天	2 mg/mL HNS，20 mM磷酸鹽，pH 6.0	4131
5°C，7天	2 mg/mL HNS，20 mM磷酸鹽，pH 7.0	4107
50°C，7天	2 mg/mL HNS，20 mM磷酸鹽，pH 7.0	3841
5°C，7天	2 mg/mL HNS，20 mM磷酸鹽，pH 7.0，0.05% 聚山梨醇酯20	4952
50°C，7天	2 mg/mL HNS，20 mM磷酸鹽，pH 7.0，0.05%	4173

	聚山梨醇酯20	
5°C, 7天	2 mg/mL HNS, 20 mM磷酸鹽, pH 8.0	4729
50°C, 7天	2 mg/mL HNS, 20 mM磷酸鹽, pH 8.0	1590

來自pH研究之HNS調配物的SDS-PAGE凝膠

實例性SDS-PAGE凝膠示於圖2及圖3中。來自pH研究之還原凝膠示於圖2中，且展示含有檸檬酸鹽之調配物(pH 3)中之碎裂帶。pH為4-8之所有其他調配物皆類似且僅在約60 kDa下展示主要(單體)帶，只是在pH 8.0檸檬酸鹽緩衝劑中在40°C下保持7天後展示一些高MW聚集物。圖3展示來自pH研究之非還原凝膠。同樣，使用含有檸檬酸鹽之rhHNS調配物(pH 3)可看到碎裂。

基於該等結果，顯而易見，rhHNS天然二聚體主要係非共價結合，此乃因存在或不存在還原劑並不影響主帶之位置。然而，較小125 kDa二聚體帶主要存在於非還原試樣中，從而表明此帶係共價結合之非天然二聚體。在ILC及25°C試樣中，非天然二聚體帶較40°C試樣更加顯著。

來自pH研究之DSC數據

圖4展示檸檬酸鹽之pH依賴性熱穩定性，如藉由DSC所測定。存於檸檬酸鹽中之rhHNS在pH 6.0下之最高熔融溫度為90°C。含有磷酸鹽之rhHNS調配物顯示在pH 6-7下具有最大熱穩定性。rhHNS之熔融溫度在所檢查每一pH下皆超過70°C。

離子強度對rhHNS穩定性之效應

濁度及外觀

OD320值之匯總示於下表13中。並未觀察到試樣之濁度隨時間推進而變化，且該等濁度值並無溫度依賴性變化。試樣之外觀在每一時間點皆保持不變。所用試樣皆表現為澄清、無色、及不可視微粒

表13. 離子效應之OD320

試樣	調配物	OD 320
ILC	10 mM檸檬酸鹽，pH 6.0	0.001
50℃，7天	10 mM檸檬酸鹽，pH 6.0	0.006
25℃，14天	10 mM檸檬酸鹽，pH 6.0	0.005
5℃，28天	10 mM檸檬酸鹽，pH 6.0	0.003
ILC	10 mM檸檬酸鹽，pH 6.0，100 mM NaCl	0.002
50℃，7天	10 mM檸檬酸鹽，pH 6.0，100 mM NaCl	0.009
25℃，14天	10 mM檸檬酸鹽，pH 6.0，100 mM NaCl	0.004
5℃，28天	10 mM檸檬酸鹽，pH 6.0，100 mM NaCl	0.001
ILC	10 mM檸檬酸鹽，pH 6.0，150 mM NaCl	0.001
50℃，7天	10 mM檸檬酸鹽，pH 6.0，150 mM NaCl	0.007
25℃，14天	10 mM檸檬酸鹽，pH 6.0，150 mM NaCl	0.003
5℃，28天	10 mM檸檬酸鹽，pH 6.0，150 mM NaCl	0.001
ILC	10 mM檸檬酸鹽，pH 6.0，300 mM NaCl	0.001
50℃，7天	10 mM檸檬酸鹽，pH 6.0，300 mM NaCl	0.006
25℃，14天	10 mM檸檬酸鹽，pH 6.0，300 mM NaCl	0.006
5℃，28天	10 mM檸檬酸鹽，pH 6.0，300 mM NaCl	0.003
ILC	10 mM磷酸鹽，pH 7.0	0.002
50℃，7天	10 mM磷酸鹽，pH 7.0	0.009
25℃，14天	10 mM磷酸鹽，pH 7.0	0.005
5℃，28天	10 mM磷酸鹽，pH 7.0	0.002
ILC	10 mM磷酸鹽，pH 7.0，50 mM NaCl	0.001
50℃，7天	10 mM磷酸鹽，pH 7.0，50 mM NaCl	0.009
25℃，14天	10 mM磷酸鹽，pH 7.0，50 mM NaCl	0.003
5℃，28天	10 mM磷酸鹽，pH 7.0，50 mM NaCl	0.002
ILC	10 mM磷酸鹽，pH 7.0，100 mM NaCl	0.002
50℃，7天	10 mM磷酸鹽，pH 7.0，100 mM NaCl	0.009
25℃，14天	10 mM磷酸鹽，pH 7.0，100 mM NaCl	0.004
5℃，28天	10 mM磷酸鹽，pH 7.0，100 mM NaCl	0.002
ILC	10 mM磷酸鹽，pH 7.0，150 mM NaCl	0.002
50℃，7天	10 mM磷酸鹽，pH 7.0，150 mM NaCl	0.004
25℃，14天	10 mM磷酸鹽，pH 7.0，150 mM NaCl	0.002
5℃，28天	10 mM磷酸鹽，pH 7.0，150 mM NaCl	0.001
ILC	10 mM磷酸鹽，pH 7.0，300 mM NaCl	0.002

50°C, 7天	10 mM磷酸鹽, pH 7.0, 300 mM NaCl	0.010
25°C, 14天	10 mM磷酸鹽, pH 7.0, 300 mM NaCl	0.005
5°C, 28天	10 mM磷酸鹽, pH 7.0, 300 mM NaCl	0.003

SEC-HPLC

表14展示來自離子效應研究之SEC-HPLC數據匯總。在50°C下保持7天後，所有調配物除16 min峰外皆具有較小變化。在檸檬酸鹽緩衝劑中，16分鐘峰面積百分比介於0.1 %與0.3 %之間，且NaCl含量並無特定增加或降低趨勢。然而，在磷酸鹽緩衝劑中，16分鐘峰百分比在50 mM至150 mM之離子強度下增至約0.5 %。在較低及較高離子強度下，16分鐘峰降至約0.1%。

表14.離子強度效應之SEC-HPLC數據匯總

儲存條件	調配物描述	16 Min峰%	二聚體%
ILC	檸檬酸鹽, pH 6.0	0	99.3
7天, 50°C	檸檬酸鹽, pH 6.0	0.24	99.2
14天, 25°C	檸檬酸鹽, pH 6.0	0	99.4
1個月, 5°C	檸檬酸鹽, pH 6.0	0	99.5
ILC	檸檬酸鹽, pH 6.0, 100 mM NaCl	0	99.3
7天, 50°C	檸檬酸鹽, pH 6.0, 100 mM NaCl	0.10	99.3
14天, 25°C	檸檬酸鹽, pH 6.0, 100 mM NaCl	0	99.1
1個月, 5°C	檸檬酸鹽, pH 6.0, 100 mM NaCl	0	99.4
ILC	檸檬酸鹽, pH 6.0, 150 mM NaCl	0	99.8
7天, 50°C	檸檬酸鹽, pH 6.0, 150 mM NaCl	0.22	99.5
14天, 25°C	檸檬酸鹽, pH 6.0, 150 mM NaCl	0	99.2
1個月, 5°C	檸檬酸鹽, pH 6.0, 150 mM NaCl	0	99.5
ILC	檸檬酸鹽, pH 6.0, 300 mM NaCl	0	99.5
7天, 50°C	檸檬酸鹽, pH 6.0, 300 mM NaCl	0.04	99.6
14天, 25°C	檸檬酸鹽, pH 6.0, 300 mM NaCl	0	99.4
1個月, 5°C	檸檬酸鹽, pH 6.0, 300 mM NaCl	0	99.3
ILC	磷酸鹽, pH 7.0	0	99.3
7天, 50°C	磷酸鹽, pH 7.0	0.11	99.1
14天, 25°C	磷酸鹽, pH 7.0	0	99.2

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

酵素活性

表15展示在50°C下保持7天之加速條件下rhHNS穩定性之離子效應的活性數據匯總。含有檸檬酸鹽之rhHNS調配物在加速條件下僅保留8-30%之活性，不管離子強度如何。含有具有0-300 mM NaCl之磷酸鹽的rhHNS調配顯示在加速條件下保留較高總活性(45-70%)。

表15. 離子強度效應研究之活性匯總

儲存條件	調配物描述	活性，nmol/mg/hr
ILC	檸檬酸鹽，pH 6.0	1725
7天，50°C	檸檬酸鹽，pH 6.0	144
ILC	檸檬酸鹽，pH 6.0，100 mM NaCl	1715
7天，50°C	檸檬酸鹽，pH 6.0，100 mM NaCl	303
ILC	檸檬酸鹽，pH 6.0，150 mM NaCl	1475
7天，50°C	檸檬酸鹽，pH 6.0，150 mM NaCl	250
ILC	檸檬酸鹽，pH 6.0，300 mM NaCl	2059

7天, 50°C	檸檬酸鹽, pH 6.0, 300 mM NaCl	619
ILC	磷酸鹽, pH 7.0	1661
7天, 50°C	磷酸鹽, pH 7.0	766
ILC	磷酸鹽, pH 7.0, 50 mM NaCl	1441
7天, 50°C	磷酸鹽, pH 7.0, 50 mM NaCl	784
ILC	磷酸鹽, pH 7.0, 100 mM NaCl	1290
7天, 50°C	磷酸鹽, pH 7.0, 100 mM NaCl	875
ILC	磷酸鹽, pH 7.0, 150 mM NaCl	1297
7天, 50°C	磷酸鹽, pH 7.0, 150 mM NaCl	839
ILC	磷酸鹽, pH 7.0, 300 mM NaCl	1338
7天, 50°C	磷酸鹽, pH 7.0, 300 mM NaCl	693

SDS-PAGE

圖6展示來自在50°C下保持7天後之離子效應研究之rhHNS調配物的銀染色SDS-PAGE凝膠。使用煮沸10分鐘之試樣運行該等凝膠，由此在凝膠上看到之碎裂可歸因於10 min煮沸，此乃因在隨後研究中，在將rhHNS煮沸5分鐘時觀察不到碎裂。

具有0-300 mM NaCl之檸檬酸鹽調配物及具有0-300 mM NaCl之磷酸鹽調配物皆展示60 kDa下之一級單體帶。與在50°C下保持7天之試樣相比，rhHNS調配物之內部批次對照(在-80°C下儲存)似乎顯示更顯著之片段分帶。總之，離子強度並不影響SDS凝膠上之帶型。

結論

研究結果證實，用於調配物篩選之指示一級穩定性之分析係酵素活性及HPLC-SEC分析。DSC數據顯示rhHNS在pH 6-7下具有最大熱穩定性且T_m值為約90°C。檸檬酸鹽緩衝劑中之rhHNS顯示在所有pH及離子強度下在加速條件下活性皆顯著損失，從而表明檸檬酸鹽係不可接受之調配物緩衝劑。關於磷酸鹽之結果顯著較佳，其可在pH 6-7下於加速條件下保留最大活性。例如，含有100-150 mM NaCl之磷酸鹽調配物在加速條件下顯示最大活性保留。然而，SEC-HPLC中之高

分子量(16分鐘)峰在pH 6-8及50-150 mM之離子強度下於加速條件下最大。

進一步實施額外調配實驗以更好地理解16分鐘峰之起因。另外，進一步實施研究以比較磷酸鹽調配物與非緩衝鹽水調配物之穩定性、及較低與較高蛋白質濃度之穩定性。

實例2：用於RHHNS之液體調配物

設計此實例中之實驗以優化意欲腦脊髓膜內遞送之rhHNS調配物之溶解度。如本文所述，腦脊髓膜內藥物遞送需要注射少量液體體積，且因此需要較高濃度之蛋白質溶液。然而，rhHNS通常具有等電點範圍為5.1至6.5之異種電荷特徵，此會影響其溶解性。本實例中之研究提供關於pH及氯化鈉濃度對rhHNS產物溶解度之效應的資訊。

如圖7中可看到，增加pH或鹽濃度(例如，氯化鈉)可增加rhHNS溶解度。藉由使用不同鹽濃度(145 mM或300 mM)調配之rhHNS之分析型超離心(AUC)來分析天然狀態的rhHNS。如圖8中可看到，rhHNS含有均質分子且在145 mM至300 mM之鹽濃度及pH 7下維持相同結構。總而言之，該等結果表明增加NaCl濃度使得可增加rhHNS之溶解度。

鑑別兩種液體調配物以用於進一步研究，包括高鹽液體調配物(15 mg/mL rhHNS，175 mM NaCl，5 mM磷酸鹽，0.005%聚山梨醇酯20，pH 7.0)；及含蔗糖調配物(15 mg/mL rhHNS，2%蔗糖，145 mM NaCl，5 mM磷酸鹽，0.005%聚山梨醇酯20，pH 7.0)。

實例3：用於rhHNS之凍乾調配物

設計此實例中之實驗以優化用於rhHNS之凍乾調配物及條件。特定而言，該等研究提供關於調配物對於產物穩定性之效應的資訊，包括凍乾餅之外觀、rhHNS酵素活性、及凍乾產物之化學完整性。

將rhHNS調配至基於各種磷酸鹽之凍乾調配物中。檢查下列調配

參數：(1)穩定劑：葡萄糖(0.5-1%)或蔗糖(1-1.5%)；及(2)表面活性劑：聚山梨醇酯20 (0.02-0.005%)。在所測試之所有調配物中使用下列參數：(3) 15 mg/mL rhHNS；(4) 145 mM NaCl；(5) 5 mM磷酸鹽；(6) pH 7.0。

根據表16中之條件凍乾實例性調配物：

表16：實例性凍乾循環

總凍乾時間- 4天	
冷凍/退火	
冷凍	以0.25°C/min至-20°C
保持	-20°C，保持5 hr.
繼續冷凍	以0.25°C/min至-50°C
保持	-50°C，保持3 hr.
一級乾燥	
升溫	以0.5°C/min至-25°C並抽真空至60 mT
保持	-25°C及60 mT，保持50 hr.
二級乾燥	
升溫	以0.3°C/min至20°C且使N ₂ 壓力至150 mT
保持	20°C及150 mT，保持6 hr.

據觀察，含葡萄糖調配物具有較長復原時間(>30分鐘)，但可維持化學穩定性(數據未顯示)。

含有1%蔗糖之rhHNS凍乾調配物在2-8°C下具有15個月之數據且在25°C/40°C下具有3個月之數據(如下表17中所示)，其表明SEC、RP、及SDS-PAGE之變化≤1%。

表17. 1%蔗糖凍乾調配物穩定性

測試	凍乾前	凍乾後	5±3°C		25±2°C	40±2°C
			3 M	15 M	3 M	0.5 M
餅外觀	NA	白色、固體餅	白色、固體餅	白色、固體餅	白色、固體餅	白色、固體餅
水分含量	NA	0.5%	NA	NA	NA	NA

復原時間	NA	<60 sec	<60 sec	<60 sec	<60 sec	<60 sec
復原溶液之外觀	乳白色，無色w/o顆粒	乳白色，無色w/o顆粒	乳白色，無色w/o顆粒	乳白色，無色w/o顆粒	乳白色，無色w/o顆粒	乳白色，無色w/o顆粒
pH	7.2	7.2	7.3	NA	7.2	7.2
蛋白質濃度 (mg/mL)	14.8	14.8	NA	15.3	14.6	14.0
比活性 (U/mg)	71	62	NA	78	85	78
SEC 主峰%	99.9%	99.8%	99.6%	99.5%	99.6%	99.5%
RP-HPLC 主峰%	99.0%	98.9%	98.4%	98.5%	98.7%	98.5%
SDS-PAGE	一致	一致	一致	下頻帶略有增加 (<1%)	一致	一致

含有1.5%蔗糖之rhHNS凍乾調配物在2-8℃下具有14個月之數據且在25℃下具有3個月之數據(如下表18中所示)，其表明SEC、RP、及SDS-PAGE之變化 $\leq 0.2\%$ 。

表18. 1.5%蔗糖凍乾調配物穩定性

測試	凍乾前	凍乾後	5±3℃	25±2℃	40±2℃	
			3M	3M	1M	3M
餅外觀	NA	白色、固體餅	白色、固體餅	白色、固體餅	白色、固體餅	白色、固體餅
水分含量	NA	0.5%	NA	NA	NA	NA
復原時間	NA	<60 sec	<60 sec	<60 sec	<60 sec	<60 sec
復原溶液之外觀	乳白色，無色w/o顆粒	乳白色，無色w/o顆粒	乳白色，無色w/o顆粒	乳白色，無色w/o顆粒	乳白色，無色w/o顆粒	乳白色，無色w/o顆粒
pH	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9
蛋白質濃度 (mg/mL)	16.1	14.2	15.7	15.4	16.6	15.4
比活性 (U/mg)	176	210	149	122	169	139
SEC	99.9%	99.8%	99.8%	99.6%	99.6%	99.0%

主峰%						
RP-HPLC 主峰%	99.2%	99.0%	98.8%	98.5%	98.0%	97.7%
SDS-PAGE	一致	一致	一致	下頻帶略有 增加(<1%)	一致	下頻帶略有 增加 (約1%)

觀察凍乾餅之餅外觀及完整性(例如，回熔)。如圖9A中可看到，使用1.5%蔗糖調配之凍乾餅之餅收縮率大於彼等使用1.0%蔗糖調配者。使用1.5%蔗糖調配之凍乾餅亦對不同凍乾單元更敏感，例如VirTis單元對LyoStar單元(圖9B)。

單獨實驗組證實，增加蔗糖可增加餅收縮率，如下表19中所示。

表19. 具有不同蔗糖濃度之rhHNS穩定性及餅外觀的對比

測試	自基線之變化					
	1%蔗糖		1.25%蔗糖	1.5%蔗糖		
長期(5°C)	22M	12M	6M	21M	5M	
SEC	0.4%	0.2%	0.1%	0.1%	0%	
RP	0.5%	0.5%	0.5%	0.3%	0.5%	
SDS-PAGE	<1%	<1%	<1%	0%	0%	
加速(25°C)	22M	12M	6M	21M	12M	
SEC	0.4%	0.2%	0.1%	0.1%	0%	
RP	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0%	
SDS-PAGE	<1%	1%	1%	0%	0%	
應力數據(40°C)	0.5M	1M	3M	1M	0.5M	1M
SEC	0.5%	0.4%	1%	0.1%	0.1%	0.2%
RP	0.5%	0.5%	1.5%	0.1%	0.5%	0.2%
SDS-PAGE	<1%	<1%	>1%	1%	0%	0%
餅外觀	微小收縮率		較小收縮率	較大收縮率		

總而言之，該等數據證實，增加rhHNS凍乾調配物中之蔗糖濃度與穩定性增加以及凍乾餅收縮率增加有關。

藉由微流成像(MFI)觀察復原凍乾調配物中微粒之存在。實例性

微粒影像繪示於圖10中。如圖10中可看到，在復原含有1%及1.5%蔗糖之凍乾調配物及儲存後會觀察到較大微粒。

在0.22 μm 過濾後，觀察預凍乾調配物中微粒之存在。如圖11中可看到，存在聚山梨醇酯20 (P20)可防止在0.22 μm 過濾後產生在不存在P20時產生之蛋白質樣絮凝劑。因此，P20在過濾期間可有效防止微粒形成及/或保護rhHNS蛋白質。其他研究顯示，存在P20可有效減少在rhHNS調配物中存在冷凍-解凍誘導之微粒以及凍乾誘導之微粒(數據未顯示)。

凍乾條件

研究凍乾循環條件以測定對於rhHNS凍乾調配物之效應。例如，一級乾燥溫度自-38℃至-20℃有所變化，且藉由酵素活性、SEC、RP、及餅外觀來測定rhHNS凍乾調配物之穩定性。該等分析之實例性結果示於下表20中。

表20.一級乾燥對1.5%蔗糖凍乾調配物之效應

測試	(-38℃)			(-30℃)		(-25℃)		(-23℃)		(-20℃)	
	凍乾前	凍乾後	40℃	凍乾後	40℃	凍乾後	40℃	凍乾後	40℃	凍乾後	40℃
			0.5M		1M		0.5M		0.5M		0.5M
活性	246	285	236	227	125	141	124	160	128	249	157
SEC	99.8	99.8	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.6	99.8
RP	98.8	98.8	98.5	98.8	NT	99.2	NT	99.1	98.8	98.9	99.0
2-10 μm	NT	2958	1395	7593	4013	1550	3188	869	942	1235	4650
餅收縮率	NA	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

可以看到，在-38℃至-20℃之一級乾燥溫度範圍內觀察到穩定性特徵並無顯著區別。凍乾餅外觀顯示餅收縮率在-20℃之一級乾燥溫度下有所增加。在含有1.25%及1.0%蔗糖之凍乾調配物中亦觀察到類似結果(數據未顯示)。

實例4：乙醯肝素N-硫酸酯酶之長期腦脊髓膜內投與

此實例顯示，可使用腦脊髓膜內投與來將溶酶體酵素(例如重組

人類乙醯肝素N-硫酸酯酶(rhHNS))有效遞送至腦組織中，以治療黏多糖貯積症IIIA(MPS IIIA；聖菲利波症候群)之神經症狀，即該病症之定義性臨床特徵。此實例中所述之實驗顯示，長期IT投與rhHNS具有良好耐受，且在腦、脊髓及肝中可檢測到劑量相關酵素活性。

總之，已研發出重組人類乙醯肝素N-硫酸酯酶(rhHNS)之腦脊髓膜內(IT)調配物用於治療黏多糖貯積症IIIA(MPS IIIA；聖菲利波症候群)之神經症狀，即該病症之定義性臨床特徵。由於MPS IIIA患者之平均年齡係4.5歲，故對rhHNS之關鍵毒理學研究是在幼年食蟹猴中進行，以評價對發育中腦之效應。將腦脊髓膜內(IT)-腰椎藥物遞送裝置植入猴子且每隔一週藉由短期輸注給藥(1.5、4.5或8.3 mg/劑量rhHNS，持續6個月；12次劑量)，其中裝置及媒劑對照分別接受磷酸鹽緩衝鹽水或媒劑。在第3及6個月對每群組8個動物(4只/性別)進行屍體剖檢(在第3個月進行裝置-對照群組屍體剖檢)，且在最終IT劑量後1個月對8只媒劑群組動物及3只rhHNS給藥群組動物進行屍體剖檢。未觀察到rhHNS相關臨床體徵或肉眼中樞神經系統損傷。與對照相比，在腦/脊髓周圍之腦脊髓膜/神經束膜中存在平均嚴重程度為輕度至最低度之細胞浸潤，此與腦脊髓液(CSF)白血球(主要係嗜伊紅白血球)之短暫增加有關，其在最終劑量後1個月時基本消退。該等變化與腦或脊髓之任何不良形態變化無關。在腦、脊髓及肝中似乎存在趨向較高平均CSF rhHNS含量之劑量相關性趨勢，且組織中之rhHNS活性程度似乎存在劑量相關性趨勢。無可觀察到之不良效應的量係每隔一週給予8.3 mg/劑量，即所投與之最高劑量，從而表明可以不同濃度(包括高於8.3 mg/劑量之濃度)安全地腦脊髓膜內投與rhHNS。

聖菲利波A疾病

黏多糖貯積症型IIIA(MPS IIIA；聖菲利波A疾病)係罕見的溶酶體貯積症，其影響世界人口之約十萬分之一，其係由於不存在乙醯肝

素N-硫酸酯酶(HNS)或該酵素之功能缺陷所致(Neufeld EF等人, The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (2001), 第3421-3452頁), 該酵素係硫酸乙醯肝素糖胺聚多糖(GAG)之溶酶體分解代謝中涉及之外硫酸酯酶。在不存在此酵素時, 硫酸乙醯肝素GAG在神經元及神經膠質細胞之溶酶體中積聚, 且在腦外積聚較少。此病症之定義性臨床特徵係中樞神經系統(CNS)變性, 其導致喪失或不能達成主要的發育里程碑。進行性認知衰退在癡呆及早死中達到極點。

rhHNS之IT遞送

由於MPS IIIA患者之平均年齡係4.5歲, 故對rhHNS之關鍵毒理學研究係在幼年食蟹猴(基於與人類之遺傳及解剖類似性來選擇物種)中進行, 以評價對發育中腦之效應。文獻中所引用之猴子與人類之年齡等價性介於以下範圍內: 7.6個月至12.1個月對應於30至40個月齡之兒童(Hood RD, Developmental and Reproductive Toxicology: A practical approach (2006), 第276頁)。作為此努力之一部分, 在幼年食蟹猴中進行6個月之毒理學研究以評價rhHNS之IT腰椎投與。根據先前之1個月的幼年食蟹猴毒性研究中獲得之數據來指導6個月之重複劑量幼猴研究之劑量選擇及設計。根據迄今已知之數據, 此係涉及在幼年非人靈長類動物中長期IT投與ERT之首次研究。

在此研究中使用56只雄性及56只雌性幼年食蟹猴(長尾獼猴(*Macaca fascicularis*)), 其係約6至9個月齡且重0.82至1.81 kg。每天餵給猴子15塊經PMI鑒定的靈長類動物飼料5048(Richmond, IN)。水可經由過濾自動水系統隨意獲得且在尿液採集期間不給水。在猴子到達後, 將猴子在不銹鋼籠中分組圈養(每籠兩隻)2至4週, 但將3個月齡之猴子單獨圈養在不銹鋼籠中。在研究期間, 將所有猴子圈養在溫度及濕度受控且具有12小時光及12小時暗之循環之室內的單獨不銹鋼籠中。

在研究開始前，為所有猴子手術植入SC座及IT導管。在手術前投與潑尼松龍琥珀酸鈉(Prednisolone sodium succinate)(IV, 30 mg/kg)及氟尼辛葡甲胺(flunixin meglumine)(肌肉[IM], 2 mg/kg)。用SC硫酸阿托品(atropine sulfate) (0.04 mg/kg)對猴子進行預處理，用IM氯胺酮HCl (ketamine HCl) (8 mg/kg)鎮靜，插管，且維持在約1 L/min之氧及2.0%異氟醚下。在腰椎(L₄、L₅或L₆)之背突上進行切口並實施半椎板切除術以在L₃、L₄或L₅處插入錐形聚胺基甲酸酯導管(長25 cm, 0.9 mm外徑×0.5 mm內徑，具有6個直徑0.33 mm之側孔)。經由小硬膜切口插入導管且向前進入約10 cm到達胸腰連接區域。將鈦SC座附接至IT導管並植入SC組織中。使用Isovue-300(0.8 mL; Bracco Diagnostics公司, Princeton, NJ)藉由脊髓攝影檢查來確認導管之適當放置。在自手術恢復後，猴子接受酒石酸丁啡喃(butorphanol tartrate) (IM, 0.05 mg/kg)及頭孢噻呋鈉(ceftiofur sodium)(IM, 5.0 mg/kg, 每天兩次, 2天)。

在此實例中，在包括5 mM磷酸鈉、145 mM氯化鈉及0.005%聚山梨醇酯20 (pH 7.0)之IT調配物媒劑中提供rhHNS。以短期輸注形式經約11分鐘投與rhHNS之EOW劑量：0.6 mL(4分鐘)，之後用0.5 mL磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)沖洗(7分鐘)。媒劑對照群組中之猴子僅接受IT調配物；DC猴子接受PBS (pH 7.2) IT。

發病率及死亡率

未發生rhHNS相關死亡或提前屠宰。在給藥時或在每天的觀察期間未觀察到rhHNS相關臨床體徵。在給藥期間及給藥後觀察到之錯位、瘙癢、震顫及共濟失調在數分鐘至約4小時之投與內消退，且可將其視為體積相關性反應而非對rhHNS或媒劑之反應。在給藥期間觀察到及在給藥後立即觀察到之臨床體徵在對照群組(給予DC及/或給予媒劑之群組)中亦可以相當發生率觀察到；無證據顯示劑量反應。通

常，在給藥時，臨床體徵隨每一後續劑量而降低。體重、攝食量以及身體及神經發現無rhHNS相關變化，或ECG或眼科檢查無變化。

臨床病理學

在任一間隔中，血液學、血清化學、凝結物或尿液分析參數皆無視為與rhHNS相關之變化。

CSF細胞計數及化學

在給藥後24小時，所有群組(包括DC及0 mg/劑量群組)之平均CSF白血球計數皆出現劑量相關性增加。投與每一劑量時白血球計數皆普遍增加。在給藥前自約一半之猴子採集之CSF顯示，該等效應在前一劑量後2週內減輕。在第5次給藥後，除了白血球增加以外，觀察到在4.5及8.3 mg/劑量群組中，給予rhHNS之雄性動物相對於給藥前平均值(相對於DC及0 mg/劑量群組， $P \leq 0.05$)具有較高群組平均CSF總蛋白質及白蛋白質(最高4至5倍)；在給予rhHNS之雌性動物群組中，趨勢顯然較弱。

rhHNS濃度及抗體分析

通常，所有測試群組在所有時間點之血清平均rhHNS含量皆小於檢測極限(LOD)。在給予DC及給予媒劑之對照群組中，猴子CSF中之rhHNS濃度一般低於定量極限(LOQ)。儘管未實施統計學分析，但在1.5、4.5及8.3 mg/劑量群組中似乎存在趨向較高平均CSF rhHNS含量之劑量相關性趨勢。給藥前CSF平均rhHNS含量顯著低於給藥後CSF含量。在研究結束時(主要及恢復後屍體剖檢)，6個月隊列(兩種性別)之平均rhHNS濃度概述於表21中。在給定劑量下，不論抗HNS抗體在血清及CSF中之含量如何(其在整個研究期間持續升高)，rhHNS在CSF中之平均濃度似乎維持在相同範圍內(圖12A)。

表21：在研究結束時(主要及恢復後屍體剖檢)之CSF rhHNS濃度

群組	主要屍體剖檢		恢復後屍體剖檢	
	n	平均值±SD ^a (ng/ mL)	n	平均值±SD (ng/ mL)
媒劑	8	-	8	NA
1.5 mg IT	8	516,366±1,024,084	8	NA
4.5 mg IT	7	377,460±304,996	7	NA
8.3 mg IT	8	419,492±345,975	8	NA

CSF，腦脊髓液；HNS，人類乙醯肝素N-硫酸酯酶；n=高於LOQ之試樣數；IT，腦脊髓膜內；SD，標準偏差。

^a=在給藥後約24小時採集之試樣。

NA=無可用於分析之試樣或低於LOQ之試樣。

在6個月/恢復後隊列中，在裝置對照群組(僅PBS)或彼等給予媒劑之群組中，在所測試任一時間點，所有猴子皆未在血清或CSF中產生抗HNS抗體。在1.5、4.5及8.3 mg/劑量群組中，在研究前(CSF)及在第2次給藥之前所採集之血清及CSF試樣中，所有猴子之抗HNS抗體皆測試為陰性(<LOD)。截止到研究結束時，所有猴子之血清中抗HNS抗體皆測試為陽性。

在一或多個時間點，1.5 mg/劑量及8.3 mg/劑量群組中之所有猴子及4.5 mg/劑量群組8只猴子中6只猴子之CSF抗HNS抗體測試為陽性。由於4.5 mg群組中有兩隻猴子在任一時間點(包括屍體剖檢)皆未採集試樣，故該等結果似乎可表明，所有給予rhHNS之猴子皆產生抗體反應。

在所有三種劑量下，在第2次給藥後檢測血清中之抗HNS抗體濃度，且含量在第4次給藥後顯著增加。儘管未實施統計學分析，但似乎存在趨向較高血清抗體濃度之劑量相關性趨勢；截止到研究結束

時，在3個rhHNS給藥群組中之含量相當(圖12B)。在此研究之時程期間，血清中之抗HNS抗體含量始終高於CSF(血清/CSF抗體濃度為9至236倍)；在8.3 mg劑量下，在較早給藥過程中(6及10週)，觀察到血清對CSF濃度之最高比率(98及236倍)。

在給藥早期(第6週至第14週)，在1.5 mg、4.5 mg及8.3 mg/劑量下，血清中之抗HNS抗體濃度分別增加9倍、16倍及16倍。在相同時期中，在1.5 mg、4.5 mg及8.3 mg/劑量下，CSF抗體濃度分別增加30倍、41倍及52倍(圖12B)；在1個月之無給藥恢復期後，仍有大量抗體存留(表22)。

表22：在研究結束時(主要及恢復後屍體剖檢)之CSF抗HNS抗體濃度

群組	主要屍體剖檢 ^a		恢復後屍體剖檢	
	n	平均值±SD (ng/ mL)	n	平均值±SD (ng/ mL)
媒劑	8	-	8	-
1.5 mg IT	8	351,456±244,171	8	299,512±226,654
4.5 mg IT	7	147,187±213,095	7	193,045±157,896
8.3 mg IT	8	185,227±315,858	8	238,727±185,785

CSF，腦脊髓液；HNS，人類乙醯肝素N-硫酸酯酶；IT，腦脊髓膜內；n，高於定量極限之試樣數；SD，標準偏差。

^a在給藥前約1週時採集之試樣。

抗HNS抗體在CSF中之出現晚於血清(圖12C)。未觀察到血清或CSF中之抗體濃度存在表觀劑量相關性差異(由於樣本數較小，未實施統計學分析)；在雄性與雌性之間，抗體反應無可觀察到之差異。

在CSF中之抗HNS抗體存在下，rhHNS在CSF中之平均濃度似乎

維持不變，從而表明抗HNS抗體在血清及CSF中之存在不改變IT給予之rhHNS之濃度量。對6個月重複劑量投與rhHNS之6個月/恢復後隊列分析表明，3個月之中間隊列與6個月屠宰之猴子隊列之抗HNS抗體濃度相當(圖12C)。

肉眼及組織病理學發現

在所有劑量下(雖然並非在所有屠宰間隔中，無性別特異性，且並非以劑量相關方式)，在腦實質(主要係灰質)、脊髓(灰質及白質)、背部脊神經根/神經節及三叉神經節(僅中等劑量的雄性動物)(圖13A-E)中皆存在嗜伊紅白血球浸潤(圖13)。該等浸潤似乎繼發於腦脊髓膜/神經束膜浸潤及/或組織實質內rhHNS之存在(滲透)之浸潤。儘管出現多種發炎型變化，但猴子似乎可耐受rhHNS之投與且認為該等浸潤皆無關於或皆不引起神經系統實質中之不良形態變化。具體而言，無神經元壞死/變性之證據且無與rhHNS投與相關之神經膠質反應。

腦及脊髓灰質中之小神經膠質細胞增生與細胞浸潤(主要係嗜伊紅白血球浸潤)有關，其在先前實施之1個月幼猴毒性研究中相對常見；該等變化在6個月研究中截止到3個月中間屠宰時相對少見，但在6個月隊列中仍可觀察到此一反應之殘餘證據(圖13F)。在對一些(通常以蛋白質為主)中樞性投與(或中樞反應性)測試物質之反應中，小神經膠質細胞反應往往係相對較早之事件。在給予rhHNS之猴子中，嗜伊紅白血球浸潤與嗜伊紅白血球數量在CSF中之增加有關，但該等細胞所存在之數量不足以引發不良反應。

在大多數給予rhHNS之群組中(與性別無關)，在所有劑量下，皆在背部脊神經根/神經節中觀察到嗜伊紅白血球浸潤。該等在不同神經系統組織中之浸潤似乎繼發於腦脊髓膜/神經束膜浸潤及/或組織實質內rhHNS之存在(滲透)之浸潤。在恢復後屠宰猴子中，rhHNS相關效應通常不存在或降低至對照程度。在恢復期後，一些變化(例如

脊髓中之小神經膠質細胞增生)完全消退。似乎rhHNS相關變化皆與腦或脊髓中之任何不良結構性顯微鏡下變化無關。在腦、脊髓或神經節中未觀察到神經元壞死。

脊髓中之神經纖維變性及神經膠質細胞增生似乎繼發於IT導管之放置及/或存在。該等變化在對照及給予rhHNS之群組之間相對類似。在脊神經根中，許旺(Schwann)細胞(周圍神經系統之成髓鞘細胞)增生及神經纖維變性存在於對照及給予rhHNS之猴子中。該等變化源於在放置導管時對一或多個脊神經根之損害。

HNS酵素活性

在6個月/恢復後隊列中，給予媒劑之群組的脊髓及腦中之rhHNS酵素活性(0.0-0.154 nmol/hr/mg蛋白質)類似於3個月之中間隊列之組織中所示活性程度(0.0-0.0.154 nmol/hr/mg蛋白質)。脊柱中之酵素活性程度高於在腦或肝中所量測之程度(在腰椎中高約一個數量級)，4.5 mg及8.3 mg/劑量群組具有類似活性程度。對於1.5、4.5及8.3 mg/劑量群組，脊髓薄片中之rhHNS酵素活性分別在以下範圍內：3.9-18.6、13.1-67.1及3.6-69.2 nmol/hr/mg蛋白質(雄性，圖14A)，以及1.8-16.2、4.5-61.2及21.1-66.0 nmol/hr/ mg蛋白質(雌性，圖14B)。在脊髓組織中，在1個月之恢復期後，酵素活性程度回到與媒劑對照值一致之程度。

對於1.5、4.5及8.3 mg/劑量群組，腦薄片中之rhHNS酵素活性分別在以下範圍內：0.03-16.0、0.30-55.7及0.15-21.2 nmol/hr/mg蛋白質(雄性，圖14C)，以及0.04-5.1、0.0-14.4及0.9-33.2 nmol/hr/mg蛋白質(雌性，圖14D)。在腦組織中，在恢復後，酵素活性程度回到與對照值一致之程度。

不同腦區域中之活性相對於內源性程度(DC群組)之倍數變化展示於圖15A中。儘管在表面試樣中觀察到趨向增加分佈之趨勢，但顯示

腰椎-IT投與之rhHNS可滲透至腦之腦室周圍區域。

對於1.5、4.5及8.3 mg/劑量群組，在6個月隊列/恢復後隊列中，肝中之平均活性程度分別為0.50、2.41及6.65 nmol/hr/mg蛋白質(雄性)以及1.04、4.15及7.62 nmol/hr/mg蛋白質(雌性)(圖15B)。媒劑對照猴子中之活性程度為0.089 nmol/hr/mg蛋白質(雄性)及0.083 nmol/hr/mg蛋白質(雌性)。在恢復期後，對於所有給藥群組而言，肝中之rhHNS活性程度與基線對照程度相當。

免疫組織化學

在3個月之中間隊列及6個月/恢復後隊列中，經由IT團注將rhHNS遞送至CNS使得將免疫反應性測試物質遞送至脊髓及腦之軟膜蛛網膜組織中。在接受IT rhHNS之猴子中，免疫反應性物質恆定地存在於腦脊髓膜及血管周巨噬細胞(腦/脊髓)中且可變地存在於相鄰神經膠質及神經元細胞群中。在給予媒劑之對照猴子中缺少染色(圖16A)表明抗體對人類HNS之特異性。通常，免疫反應性具有劑量相關性(即，使用半定量分級量表，可觀察到免疫組織化學染色以一般劑量依賴方式增加)。經由IT團注將rhHNS遞送至CNS使得在大腦皮質及小腦中達成陽性免疫染色(圖16B-D)；然而，在尾狀/豆狀核殼區域、中腦或腦橋或髓質之較深層區域中，免疫反應性並非始終顯著。免疫反應性在所有投與rhHNS之猴子之肝(在竇內皮細胞中，包括庫弗細胞(Kupffer cell)，但並非肝細胞)中顯著。在一個雌性提前屠宰動物(4.5 mg/劑量群組)中，免疫反應性因導管洩漏且無法修復而不顯著。

在1.5 mg/劑量群組中，顯然已基本上完全恢復，但肝以及腦及脊髓之腦脊髓膜除外，其中一些殘餘免疫反應性仍然顯著。在較高劑量(4.5及8.3 mg/劑量)下，免疫反應性之強度及發生率低於給藥結束時。在1個月之恢復期後，在所有劑量下，rhHNS在脊髓、腦及肝中之含量近似於彼等在給予媒劑之對照中所觀察到者。

討論

在此研究中，經6個月EOW遞送IT投與之rhHNS通常具有良好耐受性。未觀察到體重、臨床狀態、眼科/神經/體格檢查、ECG、器官重量或肉眼器官外觀出現顯著變化。發現僅限於CSF臨床病理學之短暫變化，其伴隨輕度至低度腦脊髓膜浸潤及硬膜發炎，且在恢復期後在除最高劑量群組以外之所有群組中，該等變化幾乎完全逆轉。觀察到rhHNS在整個腦及脊髓中廣泛分佈。

EOW IT投與rhHNS引發發炎反應，其特徵在於在給藥後24小時及屍體剖檢時觀察到殘餘白血球浸潤及白蛋白質滲漏。不期望受限於任何具體理論，此可能反映與導管尖端附近之緊密連接的變化有關之短暫、局部且不完全之BBB開放，從而導致白血球及血漿蛋白質進入CSF(Simard JM等人，Lancet Neurol. (2007) 6, 258-268；Stamatovic SM等人，Curr. Neuropharmacol. (2008) 6, 179-192)。此可係兩個因素之結果：一者與劑量投與程序或體積相關，另一者與蛋白質之IT投與相關。

BBB滲透性之短暫變化(在給藥後24小時在主要屍體剖檢時，在給藥群組與對照之間無顯著差異)不伴隨任何臨床體徵。

對於較高平均CSF rhHNS含量似乎存在劑量相關性趨勢；在給定劑量下，儘管血清及CSF中之抗HNS抗體含量逐漸增加，rhHNS在CSF中之平均濃度似乎維持在相同範圍內。

在給予rhHNS之幼猴之腦及脊髓中觀察到平均嚴重程度為輕度至最低度之腦脊髓膜細胞浸潤。在給予媒劑之對照中亦觀察到此顯微鏡下變化，表明一些反應與IT導管放置以及針對外源蛋白質之非特異性發炎反應有關。將生物質/蛋白質引入IT空間中(尤其可滲透CNS者)幾乎總是引發一定程度之發炎反應(Hovland DN等人，Toxicol. Pathol. (2007) 35, 1013-1029；Butt MT, Toxicol. Pathol. (2011) 39, 213-219)，

若其存在之數量損害相鄰組織，則其代表不良作用。然而，在當前研究中，該等細胞(主要係嗜伊紅白血球)似乎代表組織反應/滲透之標記且發現其數量不足以定性為不良作用。似乎rhHNS相關變化皆與腦或脊髓中之任何不良結構性顯微鏡下變化無關。在腦、脊髓或神經節中未觀察到神經元壞死。

在一些猴子中，在脊髓中與藥物遞送裝置有關之背部管道中存在一定變化，包括神經纖維變性、導管纖維化、及脊髓壓縮；不應認為該等變化因存在於IT導管附近而與rhHNS有關。IT腰椎藥物遞送裝置並不特異性設計用於幼猴中之IT植入，幼猴之IT空間小於人類。來自IT研究中對照(裝置及/或給予鹽水)動物之顯微鏡下評價數據的回顧分析斷定，可發現少許極小程度之腦脊髓膜浸潤及導管相關性發炎、纖維化、及神經膠質細胞增生、及脊髓神經纖維變性(Butt MT, Toxicol. Pathol. (2011) 39, 213-219)。

評價抗測試物質抗體係毒性研究之一重要態樣，此乃因中和或結合抗體對測試物質之清除率或生物分佈具有潛在影響(Ponce RP等人, Regul. Toxicol. Pharmacol. (2009) 54, 164-182)。在此研究中，由於在3個月之中間隊列及6個月隊列之腦及脊髓中觀察到劑量相關且數量上類似之rhHNS酵素活性程度，且儘管血清及CSF中之抗rhHNS抗體含量逐漸增加，但rhHNS在CSF中之平均濃度似乎維持在相同範圍內，吾人推斷出並未發現中和活性。

在脊髓、腦及肝中似乎存在趨向較高rhHNS酵素活性程度之劑量相關性趨勢，該活性程度在脊髓腰區中之注射位點附近最高且在腦中均勻，其在頭端至尾端以及在右半球與左半球之間無顯著差異。與3個月之中間隊列相比，在6個月隊列之腦及脊髓組織中未觀察到rhHNS積聚之證據。儘管在表面試樣中觀察到趨向增加分佈之趨勢，但腰椎-IT投與之rhHNS滲透至腦之深層腦室周圍區域中。肝中之

rhHNS酵素活性表明rhHNS在IT遞送後全身性重分佈；在關鍵毒性研究中評價臨床及解剖學病理學參數後，在肝中未觀察到rhHNS相關性不良作用。

通常，由於在脊髓及腦軟膜蛛網膜腦脊髓膜中及在緊鄰腦脊髓膜之神經組織(神經元、神經膠質細胞)中觀察到劑量相關之免疫反應性，故免疫組織化學結果確證組織酵素活性。在IT團注或短期IT輸注後，在大腦及小腦中出現良好灰質滲透。儘管免疫反應性在較深層結構(例如基底神經節或丘腦/下丘腦之中心區域、中腦或腦橋/髓質)中不明顯，故酵素活性結果表明，腰椎-IT投與之rhHNS滲透至腦之深層腦室周圍區域中。因此，對於檢測測試物質之生物分佈，免疫組織化學可能係靈敏性較差之技術。免疫反應性在肝之庫弗細胞及內皮細胞(能進行吞噬作用之細胞)中顯著，但在實質細胞(肝細胞)中不顯著。

在幼猴中進行之6個月重複劑量IT毒性研究中之6個月/恢復後隊列分析表明，在3個月之中間隊列及6個月之屠宰猴子中，rhHNS相關變化相當，包括存活期間參數、臨床及解剖學病理學、rhHNS及抗rhHNS抗體在CSF及血清中之濃度以及rhHNS在脊髓、腦及肝中之分佈/亞細胞定位。在恢復後屠宰猴子中，rhHNS效應不存在或顯著降低。因此，在6個月之幼猴研究中，無可觀察到之不良效應的量係8.3 mg/劑量，即所投與之最高劑量。

監測CSF細胞構成及蛋白質濃度之變化似乎與在組織病理學評價中觀察到之形態變化可靠相關，且可用於經rhHNS IT治療之患者；可將該等變化視為對IT投與之蛋白質之預期反應且其在恢復期後基本消退。該等來自動物模型之數據為業內追求IT療法作為溶酶體貯積症之神經表現之治療策略建立信心。此幼年非人類靈長類動物毒理學研究證實了經由IT腰椎藥物遞送裝置向兒科患者投與rhHNS之可行性及耐受性。無害CNS病理學及不良臨床體徵之缺乏支持近期研究性醫藥產

品之文件批准且表明，IT投與之rhHNS可安全有效地治療聖菲利波A型症候群之CNS症狀。

下文提供用於此實例中所述之各種實驗之實例性材料及方法。

研究設計及rhHNS給藥

將猴子隨機化至5個治療群組中；群組1未經治療(植入裝置對照[DC]，座及導管)且未給予媒劑或測試物質。群組2至5 EOW接受0.6 mL之0、2.5、7.5或13.8 mg/mL rhHNS IT(即，總劑量為0、1.5、4.5或8.3 mg)。在3個月時(中間屍體剖檢；在第六劑量後24小時)對4只猴子/性別/群組進行屍體剖檢，在6個月之給藥時(主要屍體剖檢；在第12劑量後24小時)對4只猴子/性別/群組(除DC群組外，其係在3個月時進行屍體剖檢)進行屍體剖檢，且在1個月之恢復期結束時對剩餘4只猴子/性別/群組進行屍體剖檢。在屍體剖檢時，收穫、處理並用顯微鏡檢查所選組織。

rhHNS係在由5 mM磷酸鈉、145 mM氯化鈉及0.005%聚山梨醇酯20 (pH 7.0)組成之IT調配物媒劑中提供。rhHNS之每隔一週劑量係以短期輸注形式經約11分鐘來投與：0.6 mL(4分鐘)，之後用0.5 mL磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)沖洗(7分鐘)。媒劑對照群組中之猴子僅接受IT調配物；DC猴子接受PBS (pH 7.2) IT。

臨床評價

自第一劑量開始每天至少兩次記錄臨床體徵及發病率及死亡率之觀察結果。在手術前、在手術當天、在研究期間每週及在屍體剖檢時量測體重。在手術前開始每天監測攝食量。在研究開始前、在研究期間每個月及在屍體剖檢前實施體格檢查(心率、呼吸、體溫、聽診、步態、性情、腹診、淋巴結及全身狀態)及神經檢查(意識能級、追蹤)。亦評定運動功能、大腦反射(瞳孔、眨眼及角膜反射)及脊髓反射(感覺足部、膝跳反射、皮膚、本體感受性及尾反射)。在rhHNS第一

劑量之前及在中間(3個月)或主要(6個月)屍體剖檢前一週內完成心電圖(ECG；導程I、II及III)及眼科檢查。藉由間接檢眼鏡來實施眼科檢查，用氯胺酮HCl (IM, 8 mg/kg)使猴子鎮靜且用1%托吡卡胺擴張眼睛。

臨床病理學

在研究開始前、在第1、3、5、7、9及11次IT給藥後、恢復期中間及在屍體剖檢時自禁食猴子採集血液試樣以供血液學及血清化學分析。在給藥前、在給藥及恢復期期間每月一次以及屍體剖檢前經由集尿盤採集尿樣。在手術時、在第1、3、5、7、9、11次IT給藥後24小時、恢復期中間以及屍體剖檢時經由腰椎導管採集CSF試樣以供總細胞計數及化學分析；有時因局部導管阻塞而採集不到試樣。因觀察到高於預期之CSF白血球計數，在給藥前自每個群組中一半猴子採集3個月劑量之5個CSF試樣，且在給藥後24小時自剩餘猴子採集。在給藥前至少1天採集給藥前試樣以在即將給藥前不顯著改變CSF體積。對於6個月及恢復猴子，在給藥前自每個群組中之一半猴子採集CSF以供總細胞計數及化學分析，且在給藥後24小時自剩餘猴子採集。若猴子之導管因阻塞而無法採樣，則在屍體剖檢時實施脊髓穿刺(小腦延髓池)。

rhHNS分析

在第2、4、6、8、10、12次IT給藥之前及之後24小時；在恢復期中間及在屍體剖檢時自周圍靜脈採集血液試樣以供rhHNS分析。在第2、4、6、8、10、12次IT給藥之前及之後24小時、在恢復期中間及在屍體剖檢時經由腰椎導管採集CSF試樣。藉由酶聯免疫吸附分析來測定rhHNS濃度。俘獲抗體係多株兔抗HNS IgG，且檢測抗體係同一兔抗HNS IgG之辣根過氧化物酶偶聯物。LOD係0.22 ng/ mL；因此，LOQ計算為0.66 ng/ mL。一式兩份以1:100及1:5稀釋度篩選血清及



CSF試樣；進一步稀釋超過校準曲線最高點之試樣並再次測試。

抗HNS抗體分析

在第2、4、6、8、10、12次IT給藥之前約1週；在恢復期中間及在屍體剖檢時自周圍靜脈採集血液以供抗體分析。在手術時採集CSF試樣以供抗體分析，且在第2、4、6、8、10、12次IT給藥之前約1週；在恢復期中間；及在屍體剖檢時經由腰椎導管來採集。使用 Meso Scale Discovery (MSD[®])技術電化學發光橋測試來檢測抗HNS抗體。該分析係自任何物種及所有免疫球蛋白同種型篩選抗HNS抗體之通用且靈敏之方法。LOD係5 ng/ mL，且一式兩份以1:20稀釋度篩選試樣，從而獲得100 ng/ mL之有效分析靈敏度。進一步稀釋超過校準曲線最高點之試樣並再次測試。

屍體剖檢及組織製備

在最終IT劑量後24小時(主要屍體剖檢)或在1個月之恢復期結束時(恢復後屍體剖檢)對猴子進行全面屍體剖檢。用氯胺酮HCl (IM, 8 mg/kg)使所有猴子鎮靜，將其維持在異氟醚/氧混合物中，且接受IV團注之肝素鈉(200 IU/kg)。經12 min以200 mL/min之速率(約2400 mL)經由左心室向猴子灌注室溫之存於鹽水中之0.001%亞硝酸鈉。在採集後，將組織試樣固定在10%中性緩衝之福馬林中以供組織病理學檢查/免疫組織化學分析，或在乾冰上冷凍並儲存在 -60°C 或更低溫度下以供rhHNS活性分析。

在腦模具(MBM-2000C, ASI Instruments公司，Warren, MI)中以3 mM之冠狀薄片厚度切割腦。將薄片編號，最頭端薄片指定為薄片1。處理薄片1、4、7、10、13及16以供組織病理學分析，且處理薄片2、5、8、11、14及17(若可用)以供免疫組織化學分析。冷凍薄片3、6、9、12及15以供rhHNS活性分析。將脊髓(頸部、胸部及腰部部分)切成1 cm切片。處理第一薄片及之後每隔兩個薄片以供組織病理學評價，

且處理第二薄片及之後每隔兩個薄片以供免疫組織化學分析。將第三薄片及之後每隔兩個薄片冷凍以供rhHNS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。自兩個單獨葉取約5 g肝之一式兩份試樣並將其冷凍用於rhHNS分析，且固定約5 g之另一試樣以供免疫組織化學分析。

組織病理學

在屍體剖檢時自所有猴子收穫腦、脊髓、背部脊神經根/神經節、坐骨神經、脛神經及腓腸神經、完整組織列表(通常用於在此物種中此持續時間之臨床前藥物安全性研究)及任何肉眼損傷。將組織切片包埋於石蠟中並用蘇木素及伊紅染色(除下文所述之任何專用染色/包埋程序外)以供綜合顯微鏡下評價。

用Fluoro-Jade B(提高評價神經元變性之靈敏度之染色劑)及Bielschowsky銀(使得軸突、樹突及神經元絲纖維可直接可視化之程序)對裝置及媒劑對照群組以及高劑量猴子之來自所製備石蠟塊之腦切片進行染色。在螢光照明下使用異硫氰酸螢光素濾色塊來檢查Fluoro-Jade B染色載玻片。

將脊髓連續切片，其中在頸部、胸部及腰區取橫切片及斜切片(在每一位準檢查一個薄片)，包括導管尖端處之切片；自馬尾區取另一橫切片。處理並檢查背部脊髓根及神經節(中頸部、胸正中及中腰部)。將周圍神經(坐骨神經、脛神經及腓腸神經)縱向切片，包埋於石蠟中並用蘇木素及伊紅(H&E)染色。將橫切片後固定在鐵中，包埋在Spurr樹脂中，切片(2 μ m)並用甲苯胺藍染色。用Bielschowsky銀對來自裝置及媒劑對照群組及高劑量群組之連續脊髓切片以及背部脊神經根及神經節進行染色。亦使用抗神經膠質纖維酸性蛋白質對該等群組之脊髓切片進行染色，其係使得可直接可視化星形細胞及其過程之免疫組織化學染色劑。

製備組織提取物以供定量分析

藉由分離左右半球來解剖冷凍腦薄片3、6、9、12及15。藉由自表面量測4 mM來取得表面組織，且每個半球中之剩餘組織視為深層組織。若存在(例如，薄片6及9)，則自冠狀薄片切下另一腦室周圍試樣。由於僅處理一半腦(右側，左側保持冷凍)，故每個薄片之切片獲得兩個至三個試樣：右側表面、右側深層及(若存在)右側腦室周圍(即，腦室深層；V深層)。若存在小腦及腦幹組織，則在分離半球前將其分離並獨立處理。以類似方式製備脊髓切片，稱重並均質化。

使用TeenA溶胞基質A管或圓錐形聚丙烯管在與10 mM Tris、5 mM 乙二胺四乙酸、補加有 α 蛋白酶完全抑制劑小錠劑(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)之0.1% Igepal一起調配之溶胞緩衝劑(1 mL/0.25 g組織)中均質化組織試樣。在Fastprep-24自動化均質器(MP Biomedicals, Solon, OH)或PowerGen 125型動力均質器(Omn International, Kennesaw, GA)中將試樣處理40秒。在均質化後，使用乙醇/乾冰浴及37°C水浴對試樣進行5個冷凍-解凍循環，且隨後在4°C下離心以沉澱組織碎屑；在分析前將上清液儲存在-80°C下。使用特異性受質(4-甲基傘形酮(umbelliferyl)-(-D-N-磺基胺基葡萄糖苷))利用兩步式螢光分析來測定rhHNS活性。

組織處理及染色以供免疫組織化學

將來自每只猴子之6個福馬林固定之3 mM厚冠狀腦薄片(薄片編號2、5、8、11、14及17)自頭端至尾端編號為1至6。通常，薄片1至4含有基底核/丘腦/中腦及大腦，且尾端兩個薄片含有小腦及腦幹(延髓)組織。將腦、脊髓及肝切片(來自與用於H&E及各種專用染色之彼等相同之石蠟塊)免疫組織化學染色以供rhHNS分析。使用特異性小鼠單株抗體(純系2C7；Maine Biotech, Portland, ME)來檢測IT投與之rhHNS之細胞內吸收；此試劑顯示與內源食蟹猴rhHNS無交叉反應

性。使用無關小鼠IgG實施陰性對照。將去石蠟載玻片與一級小鼠抗HNS抗體在2至8℃下一起培育過夜。添加二級山羊抗小鼠生物素化免疫球蛋白G並在37℃下培育30分鐘。添加抗生物素蛋白質/生物素化辣根過氧化物酶複合物並培育30分鐘。將載玻片在過氧化物酶受質二胺基聯苯胺溶液中培育直至產生期望染色強度。用蘇木素對核進行對比染色。

統計學分析

藉由單向方差分析及使用鄧奈特(Dunnett)測試對比裝置及媒劑對照群組與每一給予rhHNS之群組來分析體重、體重變化、攝食量、呼吸速率、體溫、心率、CSF細胞計數、CSF化學、臨床病理學數據、尿液數據以及絕對及相對器官重量。另外，統計學分析將兩個對照群組彼此對比。分析係用於5%及1%顯著水準之雙尾分析。所有數據皆表示為平均值±標準偏差。

實例5：乙醯肝素N-硫酸酯酶生物分佈及藥物代謝動力學研究

此實例中之實驗經設計以測定在單次靜脈內或腦脊髓膜內劑量(1或10 mg/kg)之rhHNS後rhHNS在大鼠中之組織分佈。例如，該等實驗之目的尤其係使用正電子發射斷層攝影術(PET)來表徵rhHNS在大鼠中之生物分佈(BD)特性；對比rhHNS在以不同途徑(IV或IT)及不同劑量(1或10 mg/kg)給予時之分佈模式；以及測定在該等給藥方案中rhHNS在每一所關注器官中之藥物代謝動力學特性。

藉由在大鼠中在單次靜脈內(IV)或腦脊髓膜內(IT)投與1或10 mg/kg ^{124}I -HNS後實施組織PET成像來研究 ^{124}I -磺醯胺酶(rhHNS)之藥物代謝動力學(PK)及生物分佈(BD)曲線。自IV或IT給藥後最初20 min內之動態影像及在0.05(僅對於IT投與)、1、2、4、8、24、48、96及192小時之靜態影像獲得所關注區域中之放射性-時間數據。

在此研究中使用4個群組(1 mg/kg IV、1 mg/kg IT、10 mg/kg IV

及10 mg/kg IT)中每一群組中之4只大鼠。在IT投與後，在頭部、腦(包括腦脊髓液，CSF)、脊柱及肝區域中量測放射性-時間數據；且在IV投與後，在血液、腦(包括CSF)、肝、腎、心臟(包括肺)及皮膚中量測。藉由¹²⁴-碘之衰變半衰期(100.2小時)來校正數據，表示為所關注區域之注射劑量百分比(%ID)或成像組織之%ID/克(%ID/g)，且隨後針對200克體重進行正規化。根據對應%ID或%ID/g數據來計算所給予蛋白質在所關注區域中之總量(μg)或濃度(μg/g)。

在1及10 mg/kg下，在IT給藥後之最初20 min內，rhHNS在頭部區域中之總量以0.002/min-0.011/min (λ_z)之恆定速率降低。在此報告中，清除率及分佈容積不用於兩種劑量及兩種投與途徑之間之藥物代謝動力學對比(更多資訊參見結果部分)。在兩種測試劑量下，自腦消除之恆定速率基本上相同(λ_z ：對於1及10 mg/kg，分別為0.016/hr與0.014/hr)，且具有約2天之類似半衰期，如藉由在IT給藥後至多192小時之靜態成像所測定。C_{max}值及AUC值(0-最後一個可測定濃度(0-last)或0-無窮大)與所投與劑量成比例。在該等IT單次給藥方案中給予之1至10 mg/kg之劑量範圍內指明線性PK特徵。在兩種劑量下，自脊柱之近端至遠端部分觀察到濃度梯度。

在IT給藥後，在1 mg/kg rhHNS下至多96小時，且在10 mg/kg rhHNS下至多192小時，肝中之rhHNS蛋白質係可量測的。在1 mg/kg下第2小時及在10 mg/kg下第7小時，肝中之濃度達到峰值。在1 mg/kg下消除為 0.030 ± 0.011 /hr(平均 λ_z)，其與在10 mg/kg下無顯著不同(λ_z 0.017 ± 0 /hr) ($p=0.10$)，且具有對應 $t_{1/2}$ (在1及10 mg/kg劑量下，分別為28小時與42小時)。

在1及10 mg/kg下，在IV給藥後，在肝、腎、心臟及皮膚中之消除半衰期分別為 47 ± 10 及 38 ± 13 小時(肝)、 54 ± 25 及 29 ± 16 小時(腎)、 36 ± 15 及 42 ± 19 小時(心臟)以及 40 ± 21 及 31 ± 13 小時(皮膚)；而腦中之半

衰期為 71 ± 23 及 60 ± 53 小時。肝、皮膚、腎、心臟及腦之 C_{max} 平均值係9.6、0.30、0.25、0.22及0.08 $\mu\text{g/g}$ (1 mg/kg)以及132、7.9、3.9、3.7及1.8 $\mu\text{g/g}$ (10 mg/kg)。在將個別動物之 C_{max} 值針對劑量進行正規化後，在所有該等器官中，在10 mg/kg下之 C_{max} /劑量值顯著高於在1 mg/kg下(大多數 p 值 <0.05 ，肝之 $p=0.06$)。肝、皮膚、腎、心臟及腦之AUClast值係525、16、14、9及7 hr. $\mu\text{g/g}$ (1 mg/kg)；以及6747、276、183、201及86 hr. $\mu\text{g/g}$ (10 mg/kg)。在正規化後，在10 mg/kg下之AUClast/劑量值在皮膚中顯著高於在1 mg/kg下($p<0.01$)，在心臟中略有不同($p=0.06$)，且在肝、腦及腎中無顯著不同(所有 p 值 >0.34)。

在注射相同劑量之rhHNS時，腦脊髓膜內投與所產生之腦暴露比靜脈內投與大3 log。腦中之消除半衰期係2天(IT投與)及3天(IV投與)。然而，在相同劑量之rhHNS下，在IT給藥後之肝臟暴露與在IV給藥後類似。藉由IT/IV投與1 mg/kg及10 mg/kg之肝暴露(C_{max} 及AUClast)在0.4-1.2範圍內。

實驗設計

中樞神經系統(CNS)在大多數溶酶體貯積症中易受損且在一些類型之該等疾病(例如聖菲利波症候群(黏多糖貯積症III)、異染性腦白質營養不良(MLD)及亨特氏症候群)中嚴重受損。如本文所述，由於在周圍投與時穿過血腦障壁之滲透較差，故預期將酶性蛋白質直接投與至CNS中可提高其在中樞神經組織中之濃度並進一步增強其治療效果。在此研究中，研究腦脊髓膜內(IT，或小腦延髓池)投與並在不同劑量下將其與IV投與進行對比。

PET係非侵入性、可重複之定量技術，其提供在所關注器官中藥物濃度隨時間之動態變化。來自目標器官(活性位點，而非在血液循環中)之動態濃度-時間數據係有價值的，且與所給予藥物之生物活性直接相關。此外，可使用來自動物PET研究之關於組織暴露之資訊來

指導人類中第一劑量之選擇。

材料及方法

測試物質

肝素N-硫酸酯酶(rhHNS)係在pH 7.0下以20 mg/mL rhHNS之濃度在5 mM磷酸鈉緩衝劑中與145 mM氯化鈉一起調配。藉由RP-HPLC純化該材料且其含有98.7%之肝素N-硫酸酯酶，其中99.9%係二聚體。使用¹²⁴碘來標記rhHNS。

試樣來源

在以1及10 mg/kg IV及IT給予¹²⁴I-H-N-硫酸酯酶後，自大鼠獲得放射性影像。

動物

16只雄性Sprague-Dawley大鼠購自Charles River Laboratories (190±60 g, n=16)，且將其分為4個群組(n=4)。在該等大鼠之每個群組中(總計4個群組)以兩種不同劑量(1 mg/kg及10 mg/kg)單一IV或IT注射。基於每只動物的體重將劑量及注射體積個別化。在兩個IV治療群組中，藉由以35 mg/kg劑量IV注射戊巴比妥鈉來誘導鎮靜狀態。經由尾靜脈團注注射靜脈內劑量。在兩個IT治療群組中，藉由以50 mg/kg劑量腹膜內投與戊巴比妥鈉來麻醉動物。腦脊髓膜內劑量係經1 min在小腦延髓池層面上經由環枕膜投與。實際投與之放射性係藉由PET來量測，且用作注射劑量。

實驗及/或分析方法

在IV注射後，在最初20分鐘內在心臟(包括肺)、肝及腎區域中獲得動態影像(每2 min)；且在IT投與兩種劑量後，在頭部區域中獲得動態影像。在IV治療群組中，靜態成像係在包括腦(包括腦脊髓液，CSF)、肝、腎、心臟(包括肺)、肌肉、皮膚及骨在內之區域中獲得；且在IT治療動物中，係在0.05(僅適用於IT群組)、1、2、4、8、24、

48、96及192小時給藥後在頭部、腦(包括CSF)及肝區域中獲得。重建該等影像並將三個體層融合至一個影像中。

數據分析

PET數據表示為奈居裏(nCi)/ mL(流體)或奈居裏(nCi)/克(組織)。在靜態影像中獲得腦、肝、腎、骨骼肌、胃、心臟(及肺)及皮膚區域之相對活性。對於接受IT注射之動物，獲得完整頭部或腦區域中之絕對活性。在IT注射動物中，在所選三個區段處測定每毫米脊柱之放射性：近端(頸部)、中間(抵靠肝之上邊緣)及遠端(距離含蛋白質房室之遠端1 cm)脊柱。

藉由 ^{124}I 之衰變半衰期(100.2小時)來校正所有數據且基於利用 ^{124}I 源及外部量測活性校準來正規化以記錄功效。然後將數據表示為完整區域(頭部及腦)之注射劑量百分比(%ID)或組織之%ID/克(%ID/g)，且隨後針對200克體重進行正規化[數據正規化：(%ID或%ID/g)/動物體重 $\times$ 200]。由於每個群組中僅使用4只動物，故採用正規化來減少數據可變性。

在此實例中，rhHNS蛋白質濃度或數量係使用每只動物之注射蛋白質劑量來計算：蛋白質濃度($\mu\text{g/g}$)=(%ID/g) $\times$ (注射劑量之 $\text{mg/kg}\times 1000\times 0.2$)；所給予蛋白質在所關注區域中之總量(μg)=%ID $\times$ (注射劑量之 $\text{mg/kg}\times 1000\times 0.2$)，此處注射劑量係1 mg/kg 或10 mg/kg ，且0.2係體重之正規化因子。每一PK參數之群組平均值及標準偏差係基於四個群組中每一者之個別非房室數據來計算。實施司徒登氏(Student) t-測試以對比兩個測試劑量及兩種投與途徑之間之 λ_z 、 $t_{1/2}$ 、 C_{max} 及AUC值。統計顯著性定義為p-值小於0.05($p<0.05$)。

結果

以下表格、圖及PK分析中之rhHNS數量(μg)或濃度($\mu\text{g/g}$)係藉由

將注射蛋白質劑量(1 mg/kg或10 mg/kg)乘以%ID或%ID/g之對應值來計算。

以1及10 mg/kg劑量使用 ^{124}I -HNS之腦脊髓膜內治療

在圖17中，將動態影像中所給予蛋白質(μg)在頭部區域中之數量繪製為時間函數。在圖18中，將靜態影像中腦區中之濃度($\mu\text{g/g}$)繪製為時間函數。在圖19及圖20中，將靜態影像中注射蛋白質(μg)在腦及頭部區域中之總量分別對時間作圖。脊柱近端、中間及遠端之濃度-時間曲線($\mu\text{g/mm}$)展示於圖21至圖23中。圖24展示在以1及10 mg/kg IT投與 ^{124}I -HNS後，肝中rhHNS濃度($\mu\text{g/g}$)隨時間之變化。

藉由非房室模型(WinNonlin 5.2, Pharsight, Mountain View, CA)來分析總量-時間(μg)或濃度-時間($\mu\text{g/g}$)數據。PK參數(例如恆定消除速率(λ_z)、峰值濃度(C_{max})、終末半衰期($t_{1/2}$)、曲線下面積(AUC_{last} 及 $\text{AUC}_{0-\text{inf}}$)及其他參數)係根據每一個別動物之數據來估計。

估計清除率及分佈容積(參見附錄3)，然而，其在此報告中不用於兩個劑量及兩種投與途徑之間之PK對比，原因有二：(1)此研究集中於rhHNS在實體組織中之生物分佈而非血液PK；及(2)腦區中之放射性係彼等來自腦組織(固體)及CSF(液體)者之總和，其在研究中無法相互分離。評價 λ_z 並用於對比，此乃因其指示每時間單位中消除之注射劑量百分比。

計算並對比兩種測試劑量之群組平均值及標準偏差(SD)。將該等PK參數製為下表23。

表23.在IT及IV給予1及10 mg/kg ^{124}I -HNS後各器官中非房室PK參數(群組平均值 $\pm$ SD)的匯總

1 mg/kg IT	腦($\mu\text{g/g}$)*		肝		腦(μg) [#]		頭(μg) [#]		近端		中間		遠端	
參數	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
λ_z	0.016	0.003	0.030	0.011	0.017	0.002	0.016	0.002	0.025	0.012	0.020	0.008	0.028	0.016

t _{1/2}	45	7	28	16	42	5	45	7	32	13	39	16	30	12
T _{max}	0.1	0.0	2.3	1.3	2.0	4.0	0.1	0.0	0.3	0.5	1.8	1.5	1.0	0.0
C _{max}	257.0	89.9	4.9	1.3	68.6	8.0	200.1	0.0	0.5	0.1	0.2	0.0	0.1	0.0
AUC _{last}	8393	2457	204	50	3809	622	8216	782	9	3	7	3	2	1
AUC _{inf}	8942	2416	216	57	4030	643	8904	1069	11	3	8	3	3	2
MRT _{last}	46	6	32	13	44	5	46	5	31	17	34	20	16	5

10 mg/kg IT

λ _z	0.014	0.001	0.017	0.000	0.014	0.001	0.010	0.001	0.018	0.008	0.014	-	0.006	-
t _{1/2}	49	4	42	1	51	5	70	9	45	18	50	-	123	-
T _{max}	0.1	0.0	7.0	2.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.3	0.5	8.7	13.3	8.0	-
C _{max}	2628	265	105	41	836	117	1844	314	6	4	1	0	1	-
AUC _{last}	83962	10083	7987	3276	59115	8624	128751	15723	83	67	35	20	38	-
AUC _{inf}	89460	12098	8345	3424	63836	9466	151405	15123	98	66	60	-	73	-
MRT _{last}	56	1	51	1	58	2	65	3	31	2	32	7	61	-

1 mg/kg IV	腦(ug/g)*		肝		腎		心臟		皮膚	
λ _z	0.011	0.005	0.015	0.003	0.016	0.009	0.021	0.006	0.021	0.010
t _{1/2}	71	23	47	10	54	25	36	15	40	21
T _{max}	7	12	5	4	10	12	2	1	5	4
C _{max}	0.1	0.0	9.6	1.5	0.2	0.1	0.2	0.0	0.3	0.1
AUC _{last}	7	2	525	104	14	5	9	3	16	4
AUC _{inf}	9	3	576	138	16	6	10	3	18	5
MRT _{last}	61	16	47	5	47	18	36	13	41	16

10 mg/kg IV

λ _z	0.102	0.180	0.021	0.012	0.035	0.024	0.020	0.010	0.026	0.012
t _{1/2}	60.5	53.1	37.8	13.4	28.4	16.4	41.6	18.6	31.0	12.7
T _{max}	13	12	2	1	12	11	16	9	3	1
C _{max}	1.8	0.2	131.6	26.8	3.9	0.7	3.7	0.7	7.9	2.3
AUC _{last}	86	66	6747	2837	183	123	201	89	276	40
AUC _{inf}	118	98	7171	3029	198	131	230	110	292	43
MRT _{last}	43	32	40	14	33	21	41	18	33	13

在給藥後之最初20 min內，rhHNS在頭部區域中之總量(μg)以0.002-0.011/min (λ_z, 0.005±0.004/min)(在1 mg/kg下)及0.003-0.010/min

($0.007 \pm 0.003/\text{min}$)(在10 mg/kg下)之恆定速率降低。該等恆定消除速率在該兩種劑量下無顯著不同($p=0.57$ ，圖17)。

腦之濃度-時間曲線($\mu\text{g/g}$ ，自0.05至192小時)顯示二相性特徵(圖18)。早期持續約2小時。末期遵循一級動力學。自腦消除之恆定速率在兩個測試劑量下極為類似(每小時 0.0016 ± 0.003 及 0.014 ± 0.001)且具有約2天之類似半衰期(在1及10 mg/kg下分別為 45 ± 7 及 49 ± 4 小時)。在劑量自1 mg/kg增加至10 mg/kg時，峰值濃度值(257 ± 90 及 $2628 \pm 265 \mu\text{g/g}$)及AUClast(在1及10 mg/kg下分別為 8393 ± 2457 及 $83962 \pm 10083 \text{ hr} \cdot \mu\text{g/g}$)提高約10倍。該等觀察顯示在該等IT單次給藥方案中在1至10 mg/kg劑量範圍內之線性PK特徵。在IT給藥後3 min (T_{max})，腦中出現峰值濃度。

在腦及頭部區域中，總量-時間曲線(μg ，0.05至192小時)遵循與腦中之濃度-時間曲線($\mu\text{g/g}$)所顯示者相同之二相性模式(圖19及圖20)。腦區中之 C_{max} 值顯著低於頭部區域(在1 mg/kg下係 69 ± 8 對 200 ± 0 ， $p < 0.01$ ；且在10 mg/kg下係 836 ± 117 對 $1844 \pm 314 \mu\text{g}$ ， $p < 0.01$)。在1及10 mg/kg下，腦中之恆定消除速率分別係 $0.017 \pm 0.002/\text{hr}$ 及 $0.014 \pm 0.001/\text{hr}$ ，且頭部區域分別係 0.016 ± 0.002 及 $0.010 \pm 0.001/\text{hr}$ 。在1及10 mg/kg下，腦中之平均殘餘時間值分別係 42 ± 5 小時對 51 ± 5 小時($p=0.048$)，且頭部分別係 45 ± 7 小時對 70 ± 9 小時($p < 0.01$)。該等觀察表明，在較低劑量下所給予蛋白質自兩個區域中之消除快於在較高劑量下。在IT給予1 mg/kg及10 mg/kg之rhHNS後，該等區域中之平均半衰期在42至70小時範圍內。

在兩種劑量下，自脊柱之近端至中間及至遠端區段觀察到濃度梯度(數據未顯示)。在IT給藥後，在30 min左右(0至1小時)(近端區段)、1至4小時(中間區段，除1只大鼠係24小時以外)及1至8小時(遠端區段)觀察到峰值濃度(脊柱之 $\mu\text{g/mm}$)。該等區段中之半衰期可變(平

均 $t_{1/2}$ ：在1 mg/kg及10 mg/kg下分別為 32 ± 13 及 45 ± 18 小時(脊柱之近端區段)， 39 ± 16 及約50小時(中間區段)，以及 30 ± 12 及約123小時(遠端區段))。在1及10 mg/kg之 ^{124}I -HNS下，該三個區段中每一者之峰值濃度平均值與劑量大致成比例(在脊柱之近端、中間及遠端區段分別為0.5對6.0、0.2對0.9及0.1對0.5 $\mu\text{g}/\text{mm}$)。AUClast之平均值遵循與在峰值濃度中觀察到者相同之成比例模式(在近端、中間及遠端區段分別為9.5對83、6.8對35及2對38 hr. $\mu\text{g}/\text{mm}$)。

即使rhHNS在大多數周圍器官中不可檢測，在IT給藥後自早至1小時(給藥後之第一成像時間點)至96小時(4只動物中之3只)(1 mg/kg)及至192小時(所有4只大鼠)(10 mg/kg)，其在肝中亦可量測(圖24)。在IT給予1 mg/kg後2小時及在IT給予10 mg/kg後7小時，肝中之濃度達到峰值，之後係具有一級動力學之消除期。恆定消除速率在1 mg/kg下(λ_z $0.030\pm 0.011/\text{hr}$)快於在10 mg/kg下(λ_z $0.017\pm 0/\text{hr}$) ($p=0.10$)，且具有對應之較短 $t_{1/2}$ (在1及10 mg/kg劑量下分別為 28 ± 16 對 42 ± 1 小時， $p=0.76$)。在1 mg/kg下之AUClast值相對於在10 mg/kg下降低約40倍(分別為 204 ± 50 對 7987 ± 3276 $\mu\text{g}/\text{g}$)。

以1及10 mg/kg劑量使用 ^{124}I -HNS之靜脈內治療

將腦、肝、腎、心臟(包括肺組織)及皮膚中之濃度繪製為在IV給予1及10 mg/kg rhHNS之後之時間函數，分別如圖25至圖29中所示。由於該等器官之第一靜態成像時間點係給藥後1小時，故在此研究中無法觀察到該等濃度-時間曲線之初期。肝、腎、心臟及皮膚之濃度-時間曲線在IV給藥後1至8小時顯示平坦期。在腦中，此平坦期在給藥後持續24小時，表明腦吸收IV給予之蛋白質慢於周圍器官。其餘數據顯示大致具有一級動力學之終末消除期。

在1及10 mg/kg下，肝、腎、心臟及皮膚中之消除半衰期分別係 47 ± 10 及 38 ± 13 小時(肝)、 54 ± 25 及 29 ± 16 小時(腎)、 36 ± 15 及 42 ± 19 小時

(心臟)以及 40 ± 21 及 31 ± 13 小時(皮膚)；而在1及10 mg/kg下，腦中之半衰期分別係 71 ± 23 及 60 ± 53 小時(因數據不足以測定 $t_{1/2}$ 而排除10 mg/kg群組中之大鼠3)。在該等器官中，未觀察到1 mg/kg與10 mg/kg之間之半衰期具有統計差異，但在腎中除外， p 值 < 0.03 。

肝、皮膚、腎、心臟及腦之 C_{max} 平均值係9.6、0.3、0.25、0.22及0.08 $\mu\text{g/g}$ (1 mg/kg)以及132、7.9、3.9、3.7及1.8 $\mu\text{g/g}$ (10 mg/kg)。對於該等器官，在10 mg/kg下之 C_{max} 與在1 mg/kg下之對應值之比係14、26、16、17及23。在將個別動物之 C_{max} 值針對劑量進行正規化後，在所有該等器官中，在10 mg/kg下之 C_{max} /劑量值顯著高於在1 mg/kg下(大多數 p 值 < 0.05 ，肝中 $p=0.06$)。肝、皮膚、腎、心臟及腦中之AUClast值在1 mg/kg下係525、16、14、9.3及7 hr. $\mu\text{g/g}$ ；且在10 mg/kg下係6747、276、183、201及86 hr. $\mu\text{g/g}$ 。對於該等器官，在10 mg/kg下之AUClast值與在1 mg/kg下之對應AUClast值之比分別係13、17、13、22及12。在正規化後，在10 mg/kg下之AUClast/劑量值在皮膚中顯著高於在1 mg/kg下($p<0.01$)，在心臟中略有不同($p=0.06$)，且在肝、腦及腎中無顯著不同(所有 p 值 > 0.34)。

該等觀察表明：(1)大多數器官中之半衰期係約2天，但在腦中除外(約3天)；(2)在肝中每克之暴露大於在皮膚、心臟及腎中，後者又大於腦中；(3)劑量增加10倍(10/1 mg/kg)，在10 mg/kg下所測試所有器官之 C_{max} 值皆比在1 mg/kg下增加超過10倍。

在IV給藥後1-24小時(T_{max})，在腦中達到峰值濃度。

IV與IT治療之對比

在圖30及圖31中分別對比在以1及10 mg/kg IV及IT投與後腦及肝中之濃度-時間曲線。在腦中，在1及10 mg/kg下，IT/IV之 C_{max} 之比分別係3212及1501。該等AUC_{0-192hr}之比係1136及978。該等觀察表明，在注射相同劑量之rhHNS時，腦脊髓膜內投與產生之腦暴露比靜

脈內投與大約3 log。在兩種劑量下，腦中之消除半衰期係2天(在1及10 mg/kg下係45及49小時，IT投與)及3天(在1及10 mg/kg下係71及60小時，IV投與)。

然而，在相同劑量之rhHNS下，在IT給藥後之肝臟暴露與在IV給藥後類似。在肝中，在1 mg/kg及10 mg/kg下，IT/IV之C_{max}之比分別係0.5及0.8，且AUC_{last}之比分別係0.4及1.2。

結論

藉由在單次靜脈內或腦脊髓膜內投與1或10 mg/kg之¹²⁴I-磺醯胺酶後，大鼠中之組織PET影像來研究¹²⁴I-磺醯胺酶(rhHNS)之藥物代謝動力學及生物分佈曲線。以動態方式(最初20 min)及靜態方式(在給藥後0.05、1、2、4、8、24、48、96及192小時)來獲得所關注區域中之濃度-時間數據。藉由在IT給藥後動態成像，rhHNS在頭部區域中之總量在最初20 min內以0.005/min-0.007/min(平均λ_z)之類似恆定速率降低。藉由靜態成像，自腦中消除之速率在兩個測試劑量下基本相同(λ_z：對於1及10 mg/kg分別係0.016/hr與0.014/hr)，且具有約2天之類似半衰期。

C_{max}及AUC_{last}值與投與劑量成比例，且在該等IT單次給藥方案中給予之1至10 mg/kg之劑量範圍內顯示線性PK特徵。

在兩種劑量下自脊柱近端至遠端觀察到濃度梯度。

在IT給藥後，在近端區段係在約20 min時，在中間區段係在1至4小時時，且在遠端區段係在1至8小時時觀察到峰值濃度。在脊柱不同區段中亦顯示線性PK特徵。

在IT給藥後，rhHNS蛋白質在肝中自極早時間至至多96小時(1 mg/kg)及192小時(10 mg/kg)係可量測的。在1 mg/kg下消除速率(λ_z 0.030/hr)快於在10 mg/kg下(λ_z 0.017/hr)，且在較低劑量下具有對應較短t_{1/2}(在1及10 mg/kg劑量下分別為28±16與42±1小時)。

在IV給藥後，在1及10 mg/kg下，肝、腎、心臟及皮膚中之消除半衰期分別係 47 ± 10 及 38 ± 13 小時(肝)、 54 ± 25 及 29 ± 16 小時(腎)、 36 ± 15 及 42 ± 19 小時(心臟)以及 40 ± 21 及 31 ± 13 小時(皮膚)；而腦中之半衰期係 71 ± 23 及 60 ± 53 小時。肝、皮膚、腎、心臟及腦之C_{max}平均值係9.6、0.30、0.25、0.22及0.08 $\mu\text{g/g}$ (1 mg/kg)以及132、7.9、3.9、3.7及1.8 $\mu\text{g/g}$ (10 mg/kg)。在將個別動物之C_{max}值針對劑量進行正規化後，在所有該等器官中，在10 mg/kg下之C_{max}/劑量值顯著高於在1 mg/kg下(大多數p值 <0.05 ，肝之p=0.06)。肝、皮膚、腎、心臟及腦之AUC_{last}值係525、16、14、9.3及7 hr. $\mu\text{g/g}$ (1 mg/kg)；以及6747、276、183、201及86 hr. $\mu\text{g/g}$ (10 mg/kg)。在正規化後，在10 mg/kg下之AUC_{last}/劑量值在皮膚中顯著高於在1 mg/kg下(p <0.01)，在心臟中略有不同(p=0.06)，且在肝、腦及腎中無顯著不同(所有p值 >0.34)。

實例6. 使用RHHNS來治療聖菲利波A (SAN A)型患者

可使用經由(例如)IT遞送直接CNS投與來有效治療San A型患者。此實例闡釋多中心劑量遞增研究，其經設計以評價在總計40週內每隔一週(EOW)經由腦脊髓膜內藥物遞送裝置(IDDD)將至多3種劑量量之rhHNS投與San A型患者之安全性。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32-35中。

在一特定實例中，招收至多16名患者：

隊列1：4名患者(最低劑量- 10 mg)

隊列2：4名患者(中劑量- 30 mg)

隊列3：4名患者(最高劑量- 100 mg)

隨機選取4名患者不作治療或使用裝置。

A型聖菲利波症候群患者通常顯示認知及神經發育損傷，其尤其包括早期發育里程碑(例如，行走、說話、排便訓練)延遲、智力缺陷、活動過度、聽力損失、言語發展受損、運動技能缺陷、活動過

度、進攻性及/或睡眠障礙。所有適應症皆可為試驗準則之一部分。基於納入下列準則來選擇用於研究之患者：(1)年齡為3-18歲；(2)智商(intelligence quotient)小於77或在過去3年IQ點下降15至30；(3)無CSF分流或控制不良之癲癇發作及(4)無呈現麻醉及/或手術風險之並存病。

測定在患有遲發性幼兒型A型聖菲利波症候群之兒童中藉由IT注射投與遞增劑量之rhHNS達6個月之安全性。招收及遞增應極為緩慢以提供患者安全之全面評定。另外，亦評定rhHNS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。

研究目標係評價遞增劑量之rhHNS的安全性及耐受性、以及IDDD之安全性、耐受性及長期通暢率。另外，亦評價CSF及血液中的單一及重複IT劑量後rhHNS之濃度、以及rhHNS對CF生物標記及尿GAG之效應。其他評價包括rhHNS對臨床參數(例如生理學及神經認知評定)、神經功能及腦結構容積之效應。另外，可評價治療對日常生活之影響以及生物標記與症狀間之關係。

通常，藉由IT遞送rhHNS來治療A型聖菲利波症候群患者可減少GAG在各種組織(例如，神經系統、腎、膽囊、及其他器官)中之積聚。

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。

應瞭解，在本文說明書及申請專利範圍中使用之冠詞「一(a及an)」除非明確指示相反情形否則包括複數個指示物。除非上下文中指示相反情形或另有說明，否則若一個、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，則可認為

在群組之一或多個成員間包括「或」的技術方案或說明係適合表述該情形的。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敘述該特定排除。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。

【序列表】

<110> 美商舒爾人類基因療法公司

<120> 於腦脊髓膜內遞送乙醯肝素 N-硫酸酯酶之方法及組合物

<130> 2006685-0028

<140> TW 100122532

<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> 482

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Arg Pro Arg Asn Ala Leu Leu Leu Leu Ala Asp Asp Gly Gly Phe Glu
1 5 10 15

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

Leu Ala Arg Arg Ser Leu Leu Phe Arg Asn Ala Phe Thr Ser Val Ser
35 40 45

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

Gln Asn Gly Met Tyr Gly Leu His Gln Asp Val His His Phe Asn Ser
65 70 75 80

Phe Asp Lys Val Arg Ser Leu Pro Leu Leu Ser Gln Ala Gly Val
85 90 95

Arg Thr Gly Ile Ile Gly Lys Lys His Val Gly Pro Glu Thr Val Tyr
100 105 110

Pro Phe Asp Phe Ala Tyr Thr Glu Glu Asn Gly Ser Val Leu Gln Val
115 120 125

Gly Arg Asn Ile Thr Arg Ile Lys Leu Leu Val Arg Lys Phe Leu Gln
 130 135 140
 Thr Gln Asp Asp Arg Pro Phe Phe Leu Tyr Val Ala Phe His Asp Pro
 145 150 155 160
 His Arg Cys Gly His Ser Gln Pro Gln Tyr Gly Thr Phe Cys Glu Lys
 165 170 175
 Phe Gly Asn Gly Glu Ser Gly Met Gly Arg Ile Pro Asp Trp Thr Pro
 180 185 190
 Gln Ala Tyr Asp Pro Leu Asp Val Leu Val Pro Tyr Phe Val Pro Asn
 195 200 205
 Thr Pro Ala Ala Arg Ala Asp Leu Ala Ala Gln Tyr Thr Thr Val Gly
 210 215 220
 Arg Met Asp Gln Gly Val Gly Leu Val Leu Gln Glu Leu Arg Asp Ala
 225 230 235 240
 Gly Val Leu Asn Asp Thr Leu Val Ile Phe Thr Ser Asp Asn Gly Ile
 245 250 255
 Pro Phe Pro Ser Gly Arg Thr Asn Leu Tyr Trp Pro Gly Thr Ala Glu
 260 265 270
 Pro Leu Leu Val Ser Ser Pro Glu His Pro Lys Arg Trp Gly Gln Val
 275 280 285
 Ser Glu Ala Tyr Val Ser Leu Leu Asp Leu Thr Pro Thr Ile Leu Asp
 290 295 300
 Trp Phe Ser Ile Pro Tyr Pro Ser Tyr Ala Ile Phe Gly Ser Lys Thr
 305 310 315 320
 Ile His Leu Thr Gly Arg Ser Leu Leu Pro Ala Leu Glu Ala Glu Pro
 325 330 335
 Leu Trp Ala Thr Val Phe Gly Ser Gln Ser His His Glu Val Thr Met
 340 345 350
 Ser Tyr Pro Met Arg Ser Val Gln His Arg His Phe Arg Leu Val His
 355 360 365
 Asn Leu Asn Phe Lys Met Pro Phe Pro Ile Asp Gln Asp Phe Tyr Val
 370 375 380
 Ser Pro Thr Phe Gln Asp Leu Leu Asn Arg Thr Thr Ala Gly Gln Pro
 385 390 395 400
 Thr Gly Trp Tyr Lys Asp Leu Arg His Tyr Tyr Tyr Arg Ala Arg Trp
 405 410 415
 Glu Leu Tyr Asp Arg Ser Arg Asp Pro His Glu Thr Gln Asn Leu Ala
 420 425 430
 Thr Asp Pro Arg Phe Ala Gln Leu Leu Glu Met Leu Arg Asp Gln Leu
 435 440 445

Ala Lys Trp Gln Trp Glu Thr His Asp Pro Trp Val Cys Ala Pro Asp
 450 455 460

Gly Val Leu Glu Glu Lys Leu Ser Pro Gln Cys Gln Pro Leu His Asn
 465 470 475 480

Glu Leu

<210> 2
 <211> 502
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 2

Met Ser Cys Pro Val Pro Ala Cys Cys Ala Leu Leu Leu Val Leu Gly
 1 5 10 15

Leu Cys Arg Ala Arg Pro Arg Asn Ala Leu Leu Leu Leu Ala Asp Asp
 20 25 30

Gly Gly Phe Glu Ser Gly Ala Tyr Asn Asn Ser Ala Ile Ala Thr Pro
 35 40 45

His Leu Asp Ala Leu Ala Arg Arg Ser Leu Leu Phe Arg Asn Ala Phe
 50 55 60

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

Leu Pro Gln His Gln Asn Gly Met Tyr Gly Leu His Gln Asp Val His
 85 90 95

His Phe Asn Ser Phe Asp Lys Val Arg Ser Leu Pro Leu Leu Leu Ser
 100 105 110

Gln Ala Gly Val Arg Thr Gly Ile Ile Gly Lys Lys His Val Gly Pro
 115 120 125

Glu Thr Val Tyr Pro Phe Asp Phe Ala Tyr Thr Glu Glu Asn Gly Ser
 130 135 140

Val Leu Gln Val Gly Arg Asn Ile Thr Arg Ile Lys Leu Leu Val Arg
 145 150 155 160

Lys Phe Leu Gln Thr Gln Asp Asp Arg Pro Phe Phe Leu Tyr Val Ala
 165 170 175

Phe His Asp Pro His Arg Cys Gly His Ser Gln Pro Gln Tyr Gly Thr
 180 185 190

Phe Cys Glu Lys Phe Gly Asn Gly Glu Ser Gly Met Gly Arg Ile Pro
 195 200 205

Asp Trp Thr Pro Gln Ala Tyr Asp Pro Leu Asp Val Leu Val Pro Tyr
 210 215 220

Phe Val Pro Asn Thr Pro Ala Ala Arg Ala Asp Leu Ala Ala Gln Tyr
 225 230 235 240

Thr Thr Val Gly Arg Met Asp Gln Gly Val Gly Leu Val Leu Gln Glu
 245 250 255
 Leu Arg Asp Ala Gly Val Leu Asn Asp Thr Leu Val Ile Phe Thr Ser
 260 265 270
 Asp Asn Gly Ile Pro Phe Pro Ser Gly Arg Thr Asn Leu Tyr Trp Pro
 275 280 285
 Gly Thr Ala Glu Pro Leu Leu Val Ser Ser Pro Glu His Pro Lys Arg
 290 295 300
 Trp Gly Gln Val Ser Glu Ala Tyr Val Ser Leu Leu Asp Leu Thr Pro
 305 310 315 320
 Thr Ile Leu Asp Trp Phe Ser Ile Pro Tyr Pro Ser Tyr Ala Ile Phe
 325 330 335
 Gly Ser Lys Thr Ile His Leu Thr Gly Arg Ser Leu Leu Pro Ala Leu
 340 345 350
 Glu Ala Glu Pro Leu Trp Ala Thr Val Phe Gly Ser Gln Ser His His
 355 360 365
 Glu Val Thr Met Ser Tyr Pro Met Arg Ser Val Gln His Arg His Phe
 370 375 380
 Arg Leu Val His Asn Leu Asn Phe Lys Met Pro Phe Pro Ile Asp Gln
 385 390 395 400
 Asp Phe Tyr Val Ser Pro Thr Phe Gln Asp Leu Leu Asn Arg Thr Thr
 405 410 415
 Ala Gly Gln Pro Thr Gly Trp Tyr Lys Asp Leu Arg His Tyr Tyr Tyr
 420 425 430
 Arg Ala Arg Trp Glu Leu Tyr Asp Arg Ser Arg Asp Pro His Glu Thr
 435 440 445
 Gln Asn Leu Ala Thr Asp Pro Arg Phe Ala Gln Leu Leu Glu Met Leu
 450 455 460
 Arg Asp Gln Leu Ala Lys Trp Gln Trp Glu Thr His Asp Pro Trp Val
 465 470 475 480
 Cys Ala Pro Asp Gly Val Leu Glu Glu Lys Leu Ser Pro Gln Cys Gln
 485 490 495
 Pro Leu His Asn Glu Leu
 500

201701899

發明摘要

※ 申請案號：105115109 (由100122532分拆)

※ 申請日：100.6.27 ※IPC 分類：A61K 38/43 (2006.01)

A61K 38/51 (2006.01)

【發明名稱】

A61P 25/00 (2006.01)

於腦脊髓膜內遞送乙醯肝素N-硫酸酯酶之方法及組合物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR INTRATHECAL

DELIVERY OF HEPARAN N-SULFATASE

【中文】

本發明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遞送乙醯肝素N-硫酸酯酶之穩定調配物。

【英文】

The present invention relates 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 Heparan N-sulfatase.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（18）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

（無）

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）

申請專利範圍

1. 一種用於腦脊髓膜內投與之穩定調配物，其包含乙醯肝素N-硫酸酯酶(HNS)蛋白質、鹽、緩衝劑及聚山梨醇酯表面活性劑。
2. 如請求項1之穩定調配物，其中該HNS蛋白質係以多達約100 mg/mL之濃度存在。
3. 如請求項1之穩定調配物，其中該HNS蛋白質係以多達約30 mg/mL之濃度存在。
4. 如前述請求項中任一項之穩定調配物，其中該HNS蛋白質係以介於約10 mg/mL至20 mg/mL範圍內之濃度存在。
5. 如前述請求項中任一項之穩定調配物，其中該HNS蛋白質係以約15 mg/mL範圍之濃度存在。
6. 如前述請求項中任一項之穩定調配物，其中該HNS蛋白質包含胺基酸序列SEQ ID NO:1。
7. 如前述請求項中任一項之穩定調配物，其中該鹽係NaCl。
8. 如請求項7之穩定調配物，其中該NaCl係以介於約0至300 mM之間之濃度存在。
9. 如請求項8之穩定調配物，其中該NaCl係以約145 mM至175 mM之濃度存在。
10. 如請求項9之穩定調配物，其中該NaCl係以約145 mM之濃度存在。
11. 如前述請求項中任一項之穩定調配物，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。
12. 如請求項11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。

13. 如請求項12之穩定調配物，其中該聚山梨醇酯20係以介於約0至0.02%範圍內之濃度存在。
14. 如請求項13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。
15. 如前述請求項中任一項之穩定調配物，其中該緩衝劑係磷酸鹽。
16. 如請求項15之穩定調配物，其中該磷酸鹽係以不大於20 mM之濃度存在。
17. 如請求項16之穩定調配物，其中該磷酸鹽係以約5 mM之濃度存在。
18. 如前述請求項中任一項之穩定調配物，其中該調配物具有約5.0至8.0之pH。
19. 如請求項18之穩定調配物，其中該調配物具有約6.5至7.5之pH。
20. 如請求項19之穩定調配物，其中該調配物具有約7.0之pH。
21. 如前述請求項中任一項之穩定調配物，其中該調配物進一步包含穩定劑。
22. 如請求項21之穩定調配物，其中該穩定劑選自由以下組成之群：蔗糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、PEG 4000及其組合。
23. 如請求項22之穩定調配物，其中該穩定劑係蔗糖。
24. 如請求項23之穩定調配物，其中該蔗糖係以介於約0至2%範圍內之濃度存在。
25. 如請求項24之穩定調配物，其中該蔗糖係以介於約1%至1.5%範圍內之濃度存在。
26. 如請求項21之穩定調配物，其中該穩定劑係葡萄糖。
27. 如請求項26之穩定調配物，其中該葡萄糖係以介於約0.5%至1.0%範圍內之濃度存在。
28. 如前述請求項中任一項之穩定調配物，其中該調配物係液體調配

物。

29. 如請求項1至27中任一項之穩定調配物，其中將該調配物調配成凍乾之乾燥粉末。
30. 一種用於腦脊髓膜內投與之穩定調配物，其包含濃度多達約30 mg/mL之乙醯肝素N-硫酸酯酶(HNS)蛋白質、濃度約145 mM至175 mM之NaCl、濃度約0.005%之聚山梨醇酯20、濃度約5 mM之磷酸鹽，且其pH為約7.0。
31. 如請求項30之穩定調配物，其中該HNS蛋白質之濃度為約15 mg/mL。
32. 如請求項30或31之穩定調配物，其中該NaCl之濃度為約145 mM。
33. 如請求項30至32中任一項之穩定調配物，其中該調配物進一步包含濃度約0至2%之蔗糖。
34. 一種用於腦脊髓膜內投與之穩定調配物，其包含濃度多達約30 mg/mL之乙醯肝素N-硫酸酯酶(HNS)蛋白質、濃度約145 mM之NaCl、濃度約0.005%之聚山梨醇酯20、濃度約5 mM之磷酸鹽、濃度約1%至1.5%之蔗糖，且其pH為約7.0。
35. 一種用於腦脊髓膜內投與之穩定調配物，其包含濃度多達約30 mg/mL之乙醯肝素N-硫酸酯酶(HNS)蛋白質、濃度約145 mM之NaCl、濃度約0.005%之聚山梨醇酯20、濃度約5 mM之磷酸鹽、濃度約0.5%至1.0%之葡萄糖，且其pH為約7.0。
36. 如請求項34或35之穩定調配物，其中將該調配物調配成凍乾之乾燥粉末。
37. 一種容器，其包含如請求項1至36中任一項之穩定調配物的單一劑型。
38. 如請求項37之容器，其中該容器選自安瓿或預填充注射器。

39. 如請求項38之容器，其中該容器係預填充注射器。
40. 如請求項38之容器，其中該容器係貯器。
41. 如請求項37至40中任一項之容器，其中該穩定調配物係以小於約5.0 mL之體積存在。
42. 如請求項41之容器，其中該穩定調配物係以小於約3.0 mL之體積存在。
43. 一種治療A型聖菲利波症候群(Sanfilippo A Syndrome)之方法，其包含以下步驟：

向需要治療之個體經腦脊髓膜內投與如請求項1至36中任一項之調配物。
44. 一種治療A型聖菲利波症候群之方法，其包含以下步驟：

向需要治療之個體經腦脊髓膜內投與調配物，該調配物包含濃度介於約1 mg/mL至300 mg/mL範圍內之乙醯肝素N硫酸酯酶(HNS)蛋白質、濃度約154 mM之NaCl、濃度約0.005%之聚山梨醇酯20，且其pH為約6。
45. 如請求項43或44之方法，其中該經腦脊髓膜內投與之步驟不會在該個體中引起實質不良效應。
46. 如請求項45之方法，其中該腦脊髓膜內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。
47. 如請求項43至46中任一項之方法，其中該調配物經腦脊髓膜內投與使得該HNS蛋白質遞送至目標腦組織。
48. 如請求項47之方法，其中該腦目標組織包含白質及/或灰質中之神經元。
49. 如請求項47或48之方法，其中該HNS蛋白質遞送至神經元、神經膠質細胞、血管周圍細胞及/或腦脊髓膜細胞。
50. 如請求項43至49中任一項之方法，其中該HNS蛋白質進一步遞送

至脊髓中之神經元。

51. 如請求項43至50中任一項之方法，其中該調配物經腦脊髓膜內投與進一步使得該HNS蛋白質全身遞送於周圍目標組織中。
52. 如請求項51之方法，其中該等周圍目標組織選自肝、腎、及/或心臟。
53. 如請求項43至52中任一項之方法，其中該調配物經腦脊髓膜內投與達到在腦目標組織、脊髓神經元及/或周圍目標組織中之溶酶體定位。
54. 如請求項43至53中任一項之方法，其中該調配物經腦脊髓膜內投與使得該等腦目標組織、脊髓神經元及/或周圍目標組織中之GAG貯積減少。
55. 如請求項54之方法，其中該GAG貯積與對照相比減少至少20%、40%、50%、60%、80%、90%、1倍(fold)、1.5倍或2倍。
56. 如請求項43至55中任一項之方法，其中該調配物經腦脊髓膜內投與使得神經元中之空泡形成減少。
57. 如請求項56之方法，其中該等神經元包含普爾欽細胞(Purkinje cells)。
58. 如請求項43至53中任一項之方法，其中該調配物經腦脊髓膜內投與使得該等腦目標組織、脊髓神經元及/或周圍目標組織中HNS酵素活性提高。
59. 如請求項58之方法，其中該HNS酵素活性與對照相比提高至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。
60. 如請求項58或59之方法，其中該提高的HNS酵素活性為至少約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 或600 nmol/hr/mg 。

61. 如請求項58之方法，其中在腰區中該HNS酵素活性提高。
62. 如請求項61之方法，其中在該腰區中該提高的HNS酵素活性為至少約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 、 或10,000 nmol/hr/mg 。
63. 如請求項43至62中任一項之方法，其中該調配物經腦脊髓膜內投與使得該A型聖菲利波症候群中至少一種症狀或特徵之強度、嚴重程度、或頻率降低，或延遲發作。
64. 如請求項63之方法，其中該A型聖菲利波症候群之該至少一種症狀或特徵係認知損害；白質損傷；腦實質、神經節、胼胝體及/或腦幹中之血管周圍間隙擴大；萎縮；及/或腦室擴大。
65. 如請求項43至62中任一項之方法，其中該腦脊髓膜內投與每兩週實施一次。
66. 如請求項43至62中任一項之方法，其中該腦脊髓膜內投與每月實施一次。
67. 如請求項43至62中任一項之方法，其中該腦脊髓膜內投與每兩個月實施一次。
68. 如請求項43至67中任一項之方法，其中該腦脊髓膜內投與係與靜脈內投與連合使用。
69. 如請求項68之方法，其中該靜脈內投與頻率不多於每月一次。
70. 如請求項68之方法，其中該靜脈內投與頻率不多於每兩個月一次。
71. 如請求項43至67中任一項之方法，其中在無靜脈內投與的情況下

使用該腦脊髓膜內投與。

72. 如請求項43至71中任一項之方法，其中在無並行免疫抑制療法的情況下使用該腦脊髓膜內投與。

圖式

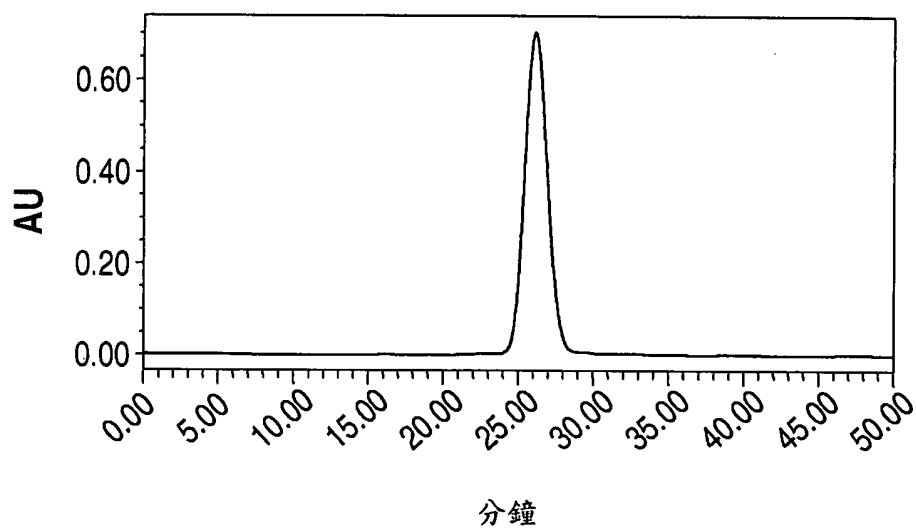


圖1A

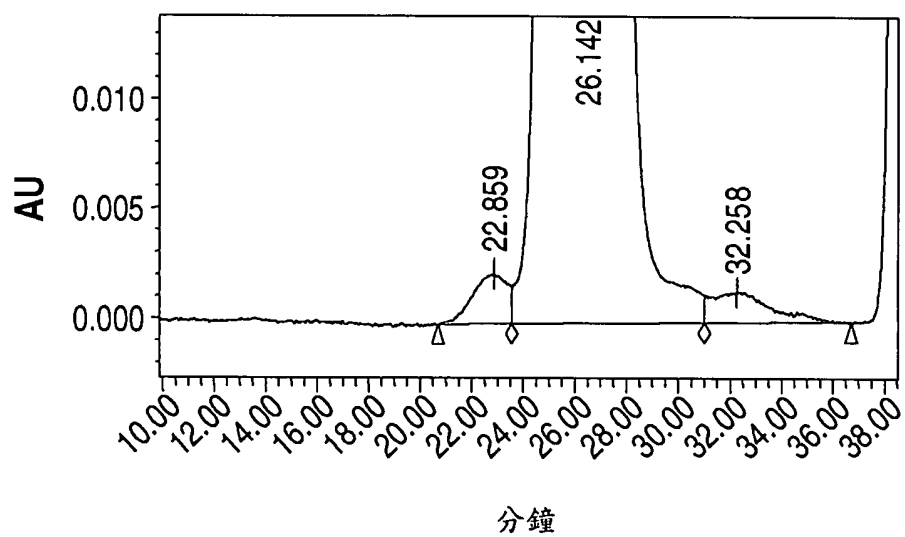


圖1B

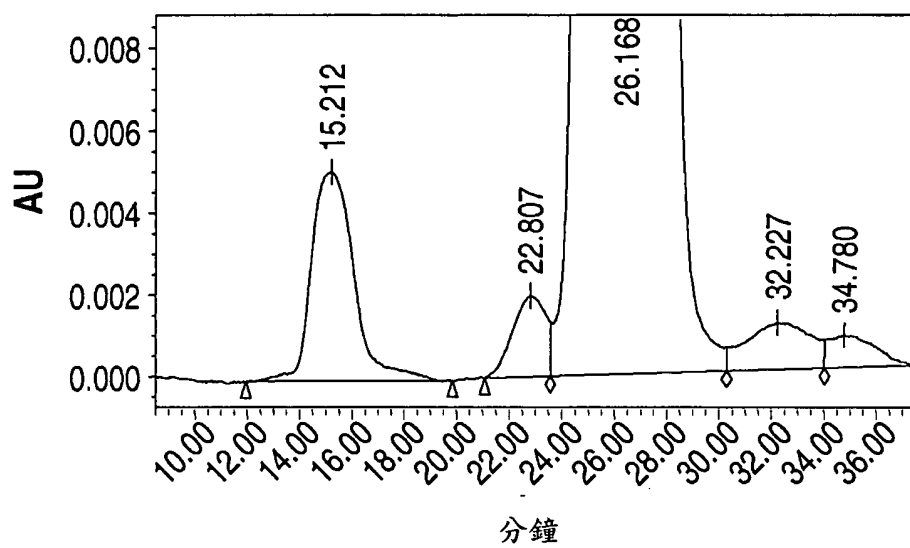


圖1C

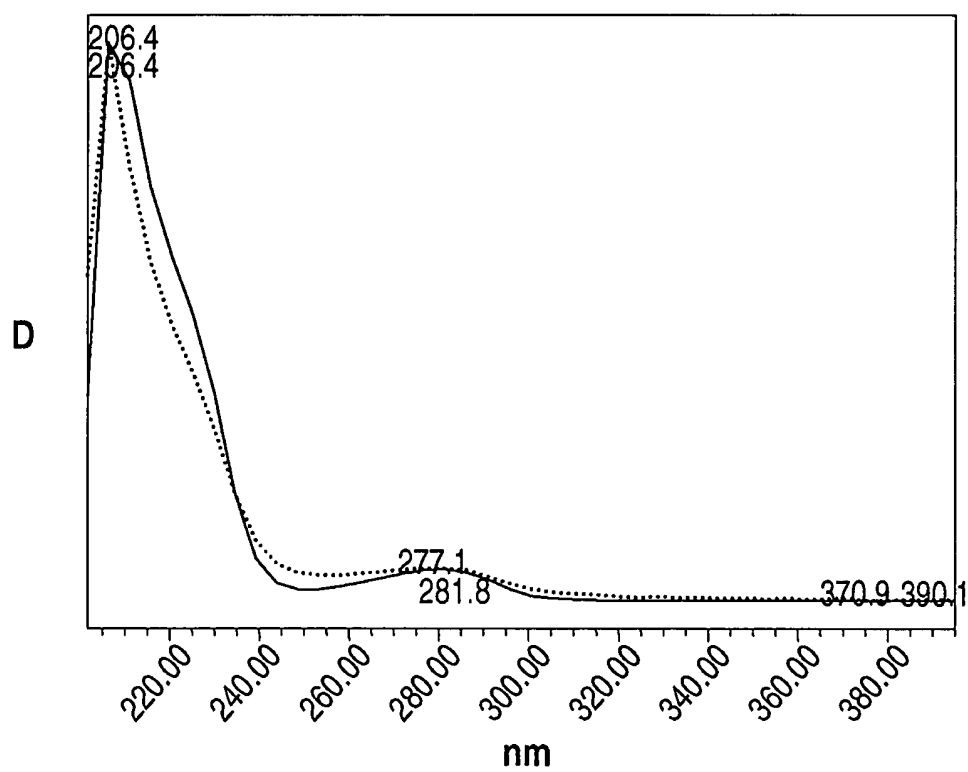


圖1D

申請專利範圍

1. 一種穩定調配物之用途，其係用於製造用以治療A型聖菲利波症候群(Sanfilippo A Syndrome)的藥劑，其中該藥劑係用於腦脊髓膜內投與至需要治療之個體中，且其該調配物包含
乙醯肝素N-硫酸酯酶蛋白質，其濃度係為或大於約5 mg/mL，且其中該調配物包含不大於50 mM之磷酸鹽。
2. 如請求項1之用途，其中該乙醯肝素N-硫酸酯酶蛋白質之投與劑量為至少10 mg。
3. 一種用於腦脊髓膜內投與之穩定調配物，其包含濃度係為或大於約5 mg/mL之乙醯肝素N-硫酸酯酶(HNS)蛋白質，且其中該調配物包含不大於50 mM之磷酸鹽。
4. 如請求項3之穩定調配物，其中該HNS蛋白質係以約5-100 mg/mL之濃度範圍存在。
5. 如請求項3之穩定調配物，其中該HNS蛋白質係以約5-30 mg/mL之濃度範圍存在。
6. 如請求項3之穩定調配物，其中該HNS蛋白質係以約5-20 mg/mL之濃度範圍存在。
7. 如請求項3之穩定調配物，其中該HNS蛋白質係以約15 mg/mL之濃度存在。
8. 如請求項3之穩定調配物，其中該HNS蛋白質包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列。
9. 如請求項3之穩定調配物，其中該調配物包含鹽。
10. 如請求項9之穩定調配物，其中該鹽係NaCl。
11. 如請求項10之穩定調配物，其中該NaCl係以約0-300 mM之濃度

範圍存在。

12. 如請求項10之穩定調配物，其中該NaCl係以約145-175 mM之濃度範圍存在。
13. 如請求項10之穩定調配物，其中該NaCl係以約145 mM之濃度存在。
14. 如請求項3之穩定調配物，其中該調配物包含聚山梨醇酯表面活性劑。
15. 如請求項14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。
16. 如請求項14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，且該聚山梨醇酯20係以約0-0.05%之濃度範圍存在。
17. 如請求項14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，且該聚山梨醇酯20係以約0.02%內之濃度存在。
18. 如請求項14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，且該聚山梨醇酯20係以約0.005%之濃度存在。
19. 如請求項3之穩定調配物，其中該磷酸鹽係以不大於20 mM之濃度存在。
20. 如請求項19之穩定調配物，其中該磷酸鹽係以約5 mM之濃度存在。
21. 如請求項3之穩定調配物，其中該調配物具有約5.0-8.0、約6.5-7.5或約7.0之pH。
22. 如請求項3之穩定調配物，其中該調配物進一步包含穩定劑。
23. 如請求項22之穩定調配物，其中該穩定劑選自由以下組成之群：蔗糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、PEG 4000、組胺酸、精胺酸及其組合。

24. 如請求項23之穩定調配物，其中該穩定劑係蔗糖，且其中該蔗糖係以約0-10%之濃度範圍存在。
25. 如請求項23之穩定調配物，其中該穩定劑係蔗糖，且其中該蔗糖係以約0.5-2.0%之濃度範圍存在。
26. 如請求項23之穩定調配物，其中該穩定劑係葡萄糖，且其中該葡萄糖係以約0.5-1.0%之濃度範圍存在。
27. 如請求項3之穩定調配物，其中該調配物係
 - (i) 液體調配物，或
 - (ii) 經調配成凍乾之乾燥粉末。
28. 如請求項3之穩定調配物，其中該調配物包含濃度範圍為約5-30 mg/mL之乙醯肝素N-硫酸酯酶(HNS)蛋白質、濃度範圍為約145-175 mM之NaCl、濃度為約0.02%之聚山梨醇酯20、濃度為約5 mM之磷酸鹽，且其pH為約7.0。
29. 如請求項28之穩定調配物，其中
 - (i) 該HNS蛋白質之濃度為約15 mg/mL，及/或
 - (ii) 該NaCl之濃度為約145 mM。
30. 如請求項28之穩定調配物，其中該調配物包含濃度為約145 mM之NaCl，及
 - (i) 濃度範圍為約0.5-2%之蔗糖，或
 - (ii) 濃度範圍為約0.5-1.0%之葡萄糖。
31. 如請求項3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，且其係以約0.005-0.2%之濃度範圍存在。
32. 如請求項3之穩定調配物，其中該調配物係經調配成凍乾之乾燥粉末。
33. 一種容器，其包含如請求項3至32中任一項之穩定調配物的單一劑型。

34. 如請求項33之容器，其中該容器選自安瓿、預填充注射器、小瓶或貯器。
35. 如請求項33之容器，其中該容器係小瓶。
36. 如請求項33之容器，其中該穩定調配物係以小於約4.0 mL之體積存在。
37. 如請求項33之容器，其中該穩定調配物係以小於約5.0 mL之體積存在。