



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **125743** (13) **C2**
(51) МПК**A61K 38/46** (2006.01)**A61P 25/28** (2006.01)**A61K 47/34** (2017.01)НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2015 07529	(72) Винахідник(и):	Каліас Перікл (US), Пен Джінг (US), Поуелл Джан (US), Чарнас Лоренс (US), МакКолі Томас (US), Райт Тереза Ліа (US), Пфейфер Річард (US), Шарок Зара (US)
(22) Дата подання заявки:	25.06.2011	(73) Володілець (володільці):	ШАЕ ХЮМЕН ДЖЕНЕТИК ТЕРАПІС, ІНК., 300 Shire Way, Lexington, MA 02421, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	02.06.2022	(74) Представник:	Дубинський Михайло Ілліч, реєстр. №70
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/358,857, 61/495,268, 61/360,786, 61/442,115, 61/435,710, 61/387,862, 61/476,210	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 20090017005 A1, 15.01.2009 US 20060177433 A1, 10.08.2006 US 20050208090 A1, 22.09.2005 US 20040243058 A1, 22.09.2005 WO 2008070769 A1, 12.06.2008 US 4743265 A, 10.05.1988 US 20020099025 A1, 25.07.2002 Intrathecal delivery of protein therapeutics to treat genetic diseases involving the CNS / Z. Shahrokh, P. Calias, L. Charnas // Injectable Drug Delivery: Formulations Focus. ONdrugDelivery. – 2010. - P. 16-20 Penetration, diffusion, and uptake of recombinant human α-L-iduronidase after intraventricular injection into the rat brain. / P.V. Belichenko, P.I. Dickson, M. Passage et al. // Molecular Genetics and Metabolism. – 2005. - Vol. 86. - P. 141–149 Intrathecal administration of AAV vectors for the treatment of lysosomal storage in the brains of MPS I mice / G. Watson, J. Bastacky, P. Belichenko et al. // Gene Therapy. – 2006. - Vol. 13. - P. 917–925
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	25.06.2010, 09.06.2011, 01.07.2010, 11.02.2011, 24.01.2011, 29.09.2010, 15.04.2011		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US, US, US, US, US, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.03.2016, Бюл.№ 5		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	01.06.2022, Бюл.№ 22		
(62) Номер та дата подання попередньої заявки, з якої виділено заявку, позначену кодом (21):	а201214666, 25.06.2011		

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ, ЩО ВКЛЮЧАЄ ФЕРМЕНТ ЗАМІЩЕННЯ ДЛЯ ЛІЗОСОМАЛЬНОГО ФЕРМЕНТУ

(57) Реферат:

UA 125743 C2

Винахід стосується застосування фармацевтичної композиції, що включає фермент заміщення для лізосомального ферменту, у виготовленні лікарського засобу для введення суб'єкту, що страждає на або має схильність до лізосомної хвороби накопичення, асоційованої зі зниженням рівня або активності лізосомального ферменту, де композиція включає лізосомальний фермент, присутній у концентрації 10-150 мг/мл, до 20 мМ фосфату та має рН в діапазоні 5,5-7,0.

ПЕРЕХРЕСНІ ПОСИДАННЯ НА РОДИННІ ЗАЯВКИ

Дана заявка претендує на пріоритет за попередніми заявками на патент США під номерами 61/358,857 з датою подачі 25 червня 2010 р.; 61/360,786 з датою подачі 1 липня 2010 р.; 61/387,862 з датою подачі 29 вересня 2010 р.; 61/435,710 з датою подачі 24 січня 2011 р.; 61/442,115 з датою подачі 11 лютого 2011 р.; 61/476,210 з датою подачі 15 квітня 2011р.; і 61/495,268 з датою подачі 9 червня 2011 р.; кожна з яких включена до даної заявки за допомогою посилання. Родинними для даної заявки є заявки на патент США під заголовком "Способи та композиції для доставки до ЦНС гепаран-N-сульфатази" з такою ж датою подачі; "Способи та композиції для доставки до ЦНС ідуронат-2-сульфатази", та ж дата подачі; "Способи та композиції для доставки до ЦНС β -галактоцереб्रोзидази", та ж дата подачі; "Способи та композиції для доставки до ЦНС арилсульфатази А", та ж дата подачі; "Лікування синдрому Санфіліппо типу В", та ж дата подачі; кожна з яких включена до даної заявки за допомогою посилання.

ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВИНАХОДУ

Замісна ферментна терапія (ЗФТ) включає системне введення суб'єктам природних або рекомбінантних білків і/або ферментів. Схвалені терапевтичні засоби зазвичай вводять суб'єктам внутрішньовенно і зазвичай вони є ефективними при лікуванні соматичних симптомів первинної ферментної недостатності. У результаті обмеженого розподілу введеного внутрішньовенно білка і/або ферменту по клітинах і тканинах центральної нервової системи (ЦНС) лікування захворювань, що мають етіологію, пов'язану з ЦНС, є особливо складним завданням, оскільки введені внутрішньовенно білки і/або ферменти не проникають у достатній мірі через гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ).

Гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ) - це структурна система, яка складається з ендотеліальних клітин, функцією яких є захист центральної нервової системи (ЦНС) від шкідливих речовин у крові, таких як бактерії, макромолекули (наприклад, білки) та інші гідрофільні молекули, шляхом обмеження проникнення подібних речовин через ГЕБ до спинномозкової рідини (СМР) і ЦНС.

Існує декілька способів обійти ГЕБ для покращення доставки терапевтичного агента до мозку, в тому числі пряма внутрішньочерепна ін'єкція, короткочасна пермеабілізація ГЕБ і модифікація активного агента, яка змінює розподіл у тканинах. Пряма ін'єкція терапевтичного агента до тканин мозку повністю обходить судинну систему, але пов'язана в першу чергу з ризиком ускладнень (інфекція, ушкодження тканин, імунна відповідь), які виникають у результаті внутрішньочерепних ін'єкцій і слабкої дифузії активного агента з місця введення. На даний момент пряме введення білків до мозкової речовини не забезпечило значного терапевтичного ефекту внаслідок існування бар'єра для дифузії та обмеженого об'єму складу, який може бути введений. Була вивчена дифузія з конвекцією через катетери, розміщені в паренхімі мозку, з використанням повільної довгострокової інфузії (Bobo, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 2076-2080 (1994); Nguyen, et al. J. Neurosurg. 98, 584-590 (2003)), однак у жодному зі схвалених способів терапії цей підхід не використовується для тривалого лікування. Крім того, розміщення внутрішньомозкових катетерів є вкрай інвазивним і є менш бажаною клінічною альтернативою.

Також були розпочаті спроби здійснити інтратекальну (ІТ) ін'єкцію або введення білків до спинномозкової рідини (СМР), але вони також не призвели до терапевтичного успіху. Однією з основних проблем при такому лікуванні є схильність активної речовини до дуже щільного зв'язування з епендимною вистилкою шлуночка, яке заважає наступній дифузії. У даний час є відсутніми дозволені продукти для лікування генетичного захворювання мозку шляхом прямої доставки агентів до СМР.

Насправді, багато хто вважає, що бар'єр для дифузії на поверхні мозку, а також відсутність ефективних і зручних способів доставки, є занадто суттєвою перешкодою для досягнення відповідного терапевтичного ефекту в головному мозку при лікуванні будь-якого захворювання.

Багато які з лізосомних хвороб накопичення зачіпають нервову систему, що особливо ускладнює лікування цих хвороб за допомогою традиційних методів терапії. Часто зустрічаються значні накопичення глікозоаміногліканів (ГАГ) у нейронах і в мозкових оболонках хворих індивідів, що призводить до різних форм симптомів з боку ЦНС. На сьогоднішній день не відомі випадки успішного лікування симптомів з боку ЦНС, викликаних лізосомними хворобами, з використанням доступних засобів.

Таким чином, залишається велика потреба в ефективній доставці терапевтичних речовин до мозку. Зокрема, існує велика потреба в більш ефективній доставці активних речовин до центральної нервової системи для лікування лізосомних хвороб накопичення.

КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Даний винахід забезпечує ефективний і менш інвазивний підхід для прямої доставки терапевтичних агентів до центральної нервової системи (ЦНС). Зокрема, даний винахід оснований на несподівано виявленому факті, який полягає в тому, що заміщуючий фермент для лізосомних хвороб накопичення може бути прямо введений до спинномозкової рідини (СМР) суб'єкта, що потребує лікування, у високій концентрації (наприклад, більше 3, 4, 5, 10 мг/мл або більше), завдяки чому фермент ефективно й активно проникає через різні поверхні та поширюється в різних областях мозку, включаючи глибокі області мозку. Зовсім несподівано автори даного винаходу продемонстрували, що доставка такої високої концентрації білка може бути досягнута з використанням простих фізіологічних або буферних розчинів, не викликаючи суттєвих побічних ефектів, таких як різко виражена імунна відповідь, у суб'єкта. Таким чином, даний винахід забезпечує високоефективний, клінічно бажаний і зручний для пацієнта підхід для прямої доставки до ЦНС для лікування різних захворювань і розладів, пов'язаних із компонентами ЦНС, зокрема лізосомних хвороб накопичення. Даний винахід являє собою значне досягнення в області спрямованої доставки речовин до ЦНС і замісної ферментної терапії.

Серед іншого, даний винахід належить до способів інтратекального (ІТ) введення терапевтичного агента (наприклад, заміщуючого ферменту) суб'єктові, що потребує лікування. У деяких варіантах реалізації, заміщуючий фермент може бути рекомбінантним, генно-активованим або природним ферментом. У даній заявці терміни "інтратекальне введення", "інтратекальна доставка" або їхні граматичні еквіваленти належать до ін'єкції до спинномозкового каналу (інтратекальний простір, який оточує спинний мозок). У деяких варіантах реалізації, "інтратекальне введення" або "інтратекальна доставка" відповідно до даного винаходу належить до ІТ-введення або доставки через поперековий відділ чи область, тобто до поперекового (люмбального) ІТ-введення або доставки. У даній заявці термін "поперековий відділ" або "поперекова область" належить до області між третім і четвертим поперековими хребцями (нижня частина спини), включаючи L2-S1 відділи хребта. Припускається, що поперекове ІТ-введення або доставка відрізняється від доставки через задню мозочково-мозкову цистерну (тобто ін'єкція через навколишній простір і нижче від мозочка через отвір між черепом і верхньою частиною хребта) тим, що при поперековому ІТ введенні або доставці відповідно до даного винаходу забезпечується краща й більш ефективна доставка до дистального спинного каналу, в той час як доставка через задню мозочково-мозкову цистерну, серед іншого, як правило, не досягає дистального відділу спинномозкового каналу.

У одному аспекті даний винахід належить до способів, які включають стадію інтратекального введення композиції, яка містить фермент, що заміщає лізосомальний фермент, у концентрації більше 5 мг/мл (тобто більше 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75 або 100 мг/мл) суб'єктові, який страждає на або має схильність до лізосомної хвороби накопичення, пов'язаної зі зменшенням рівня або активності лізосомального ферменту.

У деяких варіантах реалізації, композиція додатково містить один або більше з наступних компонентів: (i) буферний агент, (ii) поверхнево-активну речовину або (iii) регулятор тоничності. У деяких варіантах реалізації, композиція має рН приблизно 3,0-8,0 (тобто 4,0-7,5; 5,0-7,5; 5,5-7,7; 5,5-7,0; 6,0-7,0; 6,5-7,5; 6,5-7,0 або 5,5-6,5). У деяких варіантах реалізації композиція включає заміщуючий фермент у вигляді лікарської речовини, яка не є синтетичною СМР.

У деяких варіантах реалізації композицію вводять у вигляді однієї дози об'ємом менше приблизно 15мл (наприклад, менше ніж 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1,5, 1,0 або 0,5 мл).

У деяких варіантах реалізації, інтратекальне введення композиції не призводить до суттєвого негативного ефекту у суб'єкта. У деяких варіантах реалізації, інтратекальне введення композиції не призводить до адаптивної Т-клітинно-опосередкованої імунної відповіді.

У іншому аспекті даний винахід належить до способів, які включають стадію введення композиції, яка містить фермент, що заміщає лізосомальний фермент, суб'єктові, що страждає на або має схильність до лізосомної хвороби накопичення, пов'язаної зі зменшенням рівня або активності лізосомального ферменту, причому введення включає інтратекальне введення композиції при відсутності супутньої імунопригнічуючої терапії. У деяких варіантах реалізації, спосіб не включає індукції імунної толерантності у суб'єкта, якого лікують. У деяких варіантах реалізації, спосіб не включає попереднього лікування або попередньої підготовки суб'єкта шляхом застосування для імуносупресії Т-клітин.

У іншому аспекті даний винахід належить до способів, які включають стадію інтратекального введення суб'єктові, що страждає на або має схильність до лізосомної хвороби накопичення, пов'язаної зі зменшенням рівня або активності лізосомального ферменту, композиції, яка містить фермент, що заміщає лізосомальний фермент, у такій терапевтично ефективній дозі та

з таким інтервалом введення, які забезпечують досягнення щонайменше приблизно 10 % (наприклад, щонайменше приблизно 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 або 95 %) нормальних рівнів або активності лізосомальних ферментів у одній або більше тканинах мозку, спинного мозку й периферичних органах.

5 У деяких варіантах реалізації, одна або більше тканин мозку, до яких доставляється фермент, містить менінгеальну тканину. У деяких варіантах реалізації, менінгеальна тканина вибрана з групи, яка включає м'яку мозкову оболонку, тверду мозкову оболонку й павутинну

10 тканину. У деяких варіантах реалізації, одна або більше тканин мозку, до яких доставляють фермент, включають тканину головного мозку. У деяких варіантах реалізації, тканини головного мозку являють собою поверхневі або неглибокі тканини головного мозку. У деяких варіантах реалізації, поверхневі тканини головного мозку вибрані з групи, яка включає тканини м'якої мозкової оболонки, тканини кори головного мозку, гіпокампу, тканини в межах 4 мм від поверхні

15 головного мозку, простору Вірхова-Робіна (BP), кровоносних судин простору BP, гіпокампу, частин гіпоталамуса на нижній поверхні головного мозку, зорових нервів і трактів, нюхової цибулини і проекцій, і їх комбінацій.

У деяких варіантах реалізації, тканини головного мозку, до яких доставляють фермент, являють собою глибокі тканини головного мозку. У деяких варіантах реалізації, глибокі тканини головного мозку вибрані з групи, яка включає тканини, розташовані глибше кори головного мозку, тканини, що

20 лежать глибше 6 мм від поверхні кори головного мозку, тканини, що лежать глибше 10 мм від поверхні кори головного мозку, проміжного мозку, гіпоталамуса, таламуса, вентрального таламуса (субталамуса), заднього мозку, ніжок мозку, червоного ядра, ядра III черепних нервів, глибокої сірої речовини, сочевицеподібних ядер, базальних гангліїв, хвостатого ядра, шкарлупу,

25 мигдалеподібне тіло, білду кулю і їх комбінації.

У деяких варіантах реалізації, одна або більше тканин мозку, до яких доставляють фермент, включає тканини мозочка. У деяких варіантах реалізації, тканини мозочка вибрані з групи, яка включає тканини молекулярного шару, тканини шару клітин Пуркіньє, тканини зернистого шару, мозочкових ніжок і їх комбінацій. У деяких варіантах, тканини мозочка являють собою глибокі

30 тканини мозочка, вибрані з групи, яка включає тканини шару клітин Пуркіньє, тканини зернистого шару, глибокі тканини білої речовини мозочка і тканини глибоких ядер мозочка.

У деяких варіантах реалізації, одна або більше тканин мозку, до яких доставляють фермент, включає тканини стовбура мозку. У деяких варіантах реалізації, тканини стовбура мозку вибрані з групи, яка включає тканини білої речовини стовбура головного мозку і/або тканини ядер

35 стовбура мозку.

У деяких варіантах реалізації, одна або більше тканин спинного мозку, до яких доставляють фермент, являє собою поверхневі або неглибокі тканини спинного мозку. У деяких варіантах реалізації, поверхневі або неглибокі тканини спинного мозку вибрані з групи, яка включає м'яку оболонку, шляхи білої речовини і тканини в межах 4 мм від поверхні спинного мозку. У деяких

40 варіантах реалізації, одна або більше тканин спинного мозку являють собою глибоку тканину спинного мозку. У деяких варіантах реалізації, глибокі тканини спинного мозку вибрані з групи, яка включає сіру речовину спинного мозку, клітини епендими і тканини, розташовані глибше 4 мм від поверхні спинного мозку.

У деяких варіантах реалізації, одна або більше тканин мозку, до яких доставляють фермент, включає поверхневі або неглибокі тканини. У деяких варіантах, поверхневі або неглибокі тканини вибрані з групи, яка включає м'яку оболонку, тверду оболонку й павутинну тканину мозкової оболонки, тканини м'якої мозкової оболонки, тканини кори головного мозку, тканини в

45 межах 4 мм від поверхні головного мозку, а також їх комбінації.

У деяких варіантах реалізації, тканини, до яких доставляють фермент, включають глибокі

50 тканини. У деяких варіантах реалізації, глибокі тканини мозку вибрані з глибокої білої речовини головного мозку, глибокої сірої речовини спинного мозку, мозолистого тіла, перивентрикулярної тканини, таламуса, базальних гангліїв, проміжного мозку, бахромки, тканин, що лежать глибше кори головного мозку, тканин, що лежать глибше 4 мм від поверхні головного мозку, тканин, що

55 лежать глибше 6 мм від поверхні головного мозку, тканин, що лежать глибше 10 мм від поверхні головного мозку, шару клітин Пуркіньє, тканин зернистого шару, глибокої тканини білої речовини мозочка й глибоких тканин ядер мозочка, і їх комбінацій.

У деяких варіантах реалізації, терапевтично ефективні дози лежать у діапазоні від 0,005 до 100 мг/кг ваги мозку. У деяких варіантах реалізації, терапевтично ефективною дозою є 1 мг/кг ваги мозку (наприклад, більше ніж 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 або 50 мг/кг ваги мозку). У

деяких варіантах реалізації, терапевтично ефективною дозою є доза, більша за 30 мг/кг ваги мозку.

У деяких варіантах реалізації, інтервал введення становить один раз на два тижні. У деяких варіантах реалізації, інтервал введення становить один раз на місяць. У деяких варіантах реалізації, інтервал введення становить один раз на два місяці. У деяких варіантах реалізації, інтервал введення становить два рази на місяць. У деяких варіантах реалізації, інтервал введення становить один раз на тиждень. У деяких варіантах реалізації, інтервал введення становить два або кілька разів на тиждень. У деяких варіантах реалізації, введення є безперервним, наприклад, із використанням тривалої насосної перфузії.

У іншому аспекті даний винахід належить до способів, які включають стадію введення суб'єктові, що страждає від або має схильність до лізосомної хвороби накопичення, пов'язаної зі зниженим рівнем або активністю лізосомального ферменту, композиції, яка містить фермент, що заміщує лізосомальний фермент, причому введення включає інтратекальне введення композиції, що забезпечує доставку заміщуючого ферменту до глибоких тканин мозку, які лежать глибше ніж щонайменше 5 мм від зовнішньої поверхні (наприклад, щонайменше на 6 мм, 7 мм, 8 мм, 9 мм, 10 мм, 11мм, 12 мм або глибше від зовнішньої поверхні), У деяких варіантах реалізації, заміщуючий фермент доставляють до глибоких тканин мозку, які щонайменше на 10 мм нижче від зовнішньої поверхні. У деяких варіантах реалізації, заміщуючий фермент специфічно доставляють до лізосом клітин у глибоких тканинах мозку.

У деяких варіантах реалізації, глибокі тканини мозку, до яких доставляють фермент, вибрані з глибокої білої речовини головного мозку, глибокої сірої речовини спинного мозку, мозолистого тіла, перивентрикулярної тканини, таламуса, бахромки, тканин, що лежать глибше кори головного мозку, тканин, що лежать глибше 4 мм від поверхні головного мозку, тканин, що лежать глибше 6 мм від поверхні головного мозку, тканин, що лежать глибше 10 мм від поверхні головного мозку, шару клітин Пуркінє, тканин зернистого шару, глибокої тканини білої речовини мозочка і ядер глибокої тканини мозочка, і їх комбінацій.

У іншому аспекті даний винахід належить до способів, які включають стадію введення інтратекально суб'єктові, що страждає на або має схильність до лізосомної хвороби накопичення, пов'язаної зі зменшенням рівня або активності лізосомального ферменту, композиції, яка містить фермент, що заміщує лізосомний фермент, який продукується в клітинах людини.

У деяких варіантах реалізації, лізосомна хвороба накопичення вибрана з групи, яка складається з аспартилглюкозамінурії, хвороби накопичення холестеринових ефірів, хвороби Вольмана, цистинозу, хвороби Данона, хвороби Фабрі, ліпогрануломатозу, хвороби Фабера, фукозидозу, галактосіалідозу I/II типу, хвороби Гоше I/II/III типів, глободної клітинної лейкоцистозу, хвороби Краббе, хвороби накопичення глікогену II типу, хвороби Помпі, GM1-гангліозидозу I/II/III типів, SM2-гангліозидозу I типу, хвороби Тея-Сакса, хвороби Сандхофа, SM2-гангліозидозу, α -манозидозу I/II типів, β -манозидозу, метахроматичної лейкоцистозу, муколіпідозу I типу, сіалідозу I/II типів, муколіпідозу I/II типів, муколіпідозу IV типу, I-клітинної анемії, муколіпідозу HIC типу, псевдо-Хурлера поліцистозу, мукополісахаридозу I типу, мукополісахаридозу II типу, синдрому Хантера, мукополісахаридозу IIIA типу, синдрому Санфіліппо A типу, B типу або D типу (мукополісахаридозу IIIB типу, мукополісахаридозу IIIC типу, мукополісахаридозу IIID типу), мукополісахаридозу IVA типу, синдрому Моркіо, мукополісахаридозу IVB типу, мукополісахаридозу VI типу, мукополісахаридозу VII типу, синдрому Слая, мукополісахаридозу IX типу, множинного дефіциту сульфатази, нейронного цероїдного ліпофусцинозу, CLN1 хвороби Баттена, CLN2 хвороби Баттена, хвороби Німана-Піка A/B типів, хвороби Німана-Піка C1 типу, хвороби Німана-Піка C2 типу, пікноцистозу, хвороби Шиндлера I/II типів, хвороби Гоше і хвороби накопичення сілових кислот.

У деяких варіантах реалізації, лізосомна хвороба накопичення вибрана з групи, яка включає синдром Хантера, метахроматичну лейкоцистозу (МЛД), синдром Санфіліппо типу A, синдром Санфіліппо типу B і хворобу глободної клітинної лейкоцистозу (ГЛД). У деяких варіантах реалізації, заміщуючий фермент вибраний із групи, яка включає рекомбінантну ідуридат-2-сульфатазу (IDS), арилсульфатазу A (ASA), гепаран-N-сульфатазу (HNS), альфа-N-ацетилглюкозамінідазу (Naglu) і β -галактозидазу (GLC). У деяких варіантах реалізації, заміщуючий фермент містить залишки маноза-6-фосфату. У деяких варіантах реалізації, заміщуючий фермент являє собою гібридний білок, який містить частину, яка обумовлює спрямовану доставку до лізосом (лізосомний таргетинг).

У деяких варіантах реалізації, заміщуючий фермент доставляють до нейронів, гліальних клітин, периваскулярних клітин і/або менінгеальних клітин. У деяких варіантах реалізації, заміщуючий фермент доставляють потім до нейронів у спинному мозку.

У деяких варіантах реалізації, інтратекальне введення додатково забезпечує системну доставку заміщуючого ферменту до периферичних тканин-мішеней. У деяких варіантах реалізації, периферичні тканини-мішені вибрані з печінки, нирок і/або серця, ендотелію, кісткового мозку й клітин, що походять від кісткового мозку, селезінки, легенів, лімфатичних вузлів, кісток і хрящів, яєчників і сім'яників.

У деяких варіантах реалізації, інтратекальне введення викликає лізосомну локалізацію заміщуючого ферменту в тканинах-мішенях мозку, нейронах спинного мозку і/або периферичних тканинах-мішенях. У деяких варіантах реалізації, інтратекальне введення викликає зниження накопичення ГАГ у тканинах-мішенях мозку, нейронах спинного мозку і/або периферичних тканинах-мішенях. У деяких варіантах реалізації, накопичення ГАГ знижується щонайменше на 20, 40, 50, 60, 80, 90 %, в 1 раз, в 1,5 рази або в 2 рази в порівнянні з контролем.

У деяких варіантах реалізації, інтратекальне введення викликає зменшення вакуолізації в нейронах. У деяких варіантах реалізації, нейрони містять клітини Пуркін'є.

У деяких варіантах реалізації, інтратекальне введення призводить до підвищення ферментативної активності заміщуючого ферменту в тканинах-мішенях мозку, нейронах спинного мозку і/або периферичних тканинах-мішенях. У деяких варіантах реалізації, ферментативна активність підвищується щонайменше в 1 раз, у 2 рази, в 3 рази, в 4 рази, в 5 разів, у 6 разів, у 7 разів, у 8 разів, у 9 разів або в 10 разів у порівнянні з контролем. У деяких варіантах реалізації, підвищена ферментативна активність становить щонайменше приблизно 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 або 600 нмоль/год./мг.

У деяких варіантах реалізації, ферментативна активність підвищується в поперековому відділі. У деяких варіантах реалізації, підвищена ферментативна активність у поперековому відділі становить щонайменше приблизно 500, 600, 700, 800 нмоль/год/мг, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 нмоль/год/мг, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 або 10000 нмоль/год./мг.

У деяких варіантах реалізації, лізосомні хвороби накопичення асоційовані з периферичними симптомами, і зазначений спосіб також включає внутрішньовенне введення заміщуючого ферменту суб'єктові. У деяких варіантах реалізації, внутрішньовенне введення здійснюють не частіше, ніж щотижня (наприклад, не частіше ніж один раз на два тижні, один раз на місяць, один раз на два місяці, один раз на три місяці, один раз на чотири місяці, один раз на п'ять місяців або один раз на шість місяців). У деяких варіантах реалізації, внутрішньовенне введення являє собою введення частіше ніж один раз на місяць, наприклад, два рази на тиждень, щотижня або два рази на місяць. У деяких варіантах реалізації, внутрішньовенне й інтратекальне введення здійснюють у той самий день. У деяких варіантах реалізації, внутрішньовенне й інтратекальне введення не здійснюють протягом деякого періоду часу між введеннями, наприклад, у межах щонайменше 2 днів, у межах щонайменше 3 днів, у межах щонайменше 4 днів, у межах щонайменше 5 днів, у межах щонайменше 6 днів, у межах щонайменше 7 днів або в межах щонайменше одного тижня. У деяких варіантах реалізації, внутрішньовенне й інтратекальне введення здійснюють за графіком, наприклад, змінне введення щотижня, один раз на два тижні, два рази на місяць або щомісяця. У деяких варіантах реалізації, внутрішньовенне введення заміняють інтратекальним введенням у графіку введення, наприклад, при графіку внутрішньовенного введення щотижня, один раз на два тижні, два рази на місяць або щомісячного введення, кожне третє або четверте, або п'яте внутрішньовенне введення в цьому графіку може бути замінене на інтратекальне введення замість внутрішньовенного. У деяких варіантах реалізації, внутрішньовенне введення заміняє інтратекальне введення в графіку введення, наприклад, у графіку інтратекального щотижневого введення, введення один раз на два тижні, введення два рази на місяць або щомісячного введення, кожне третє або четверте, або п'яте введення в цьому графіку може бути замінене на внутрішньовенне введення замість інтратекального введення. У деяких варіантах реалізації, внутрішньовенне й інтратекальне введення здійснюють послідовно, наприклад, спершу здійснюють внутрішньовенне введення (наприклад, щотижня, один раз на два тижні, два рази на місяць або щомісячне, дозування протягом двох тижнів, місяця, двох місяців, трьох місяців, чотирьох місяців, п'яти місяців, шести місяців або року і більше) з наступним інтратекальним введенням (наприклад, щотижня, один раз на два тижні, два рази на місяць або щомісяця, дозування протягом більше двох тижнів, місяця, двох місяців, трьох місяців, чотирьох місяців, п'яти місяців, шести місяців або року чи більше). У деяких варіантах реалізації, інтратекальне введення здійснюють першим (наприклад, щотижня, один раз на два тижні, два рази на місяць, щомісяця, один раз на два місяці, один раз на три місяці, дозування протягом двох тижнів, місяця, двох місяців, трьох місяців, чотирьох місяців, п'яти місяців, шести місяців або року, або

більше) з наступним внутрішньовенним введенням (наприклад, щотижня, один раз на два тижні, два рази на місяць або щомісяця, дозування протягом більше ніж двох тижнів, місяця, двох місяців, трьох місяців, чотирьох місяців, п'яти місяців, шести місяців або року, або більше).

У деяких варіантах реалізації, лізосомні хвороби накопичення пов'язані з периферичними симптомами, і спосіб включає введення заміщуючого ферменту інтратекально, але не включає введення заміщуючого ферменту суб'єктові внутрішньовенно. У деяких варіантах реалізації, інтратекальне введення заміщуючого ферменту полегшує чи послаблює один або більше периферичних симптомів ферментної недостатності у суб'єкта.

У іншому аспекті даний винахід належить до способів лікування синдрому Хантера, які включають стадію внутрішньовенного введення суб'єкту, що потребує лікування, рекомбінантної ідуromат-2-сульфатази (I2S) у такій терапевтично ефективній дозі та з таким інтервалом введення, при яких знижується інтенсивність, тяжкість чи частота або вповільнюється прояв щонайменше одного симптому чи ознаки синдрому Хантера. У деяких варіантах реалізації, щонайменше один симптом чи ознака синдрому Хантера являє собою когнітивний розлад (розлад пізнавальної функції); пошкодження білої речовини; розширення периваскулярного простору в паренхімі головного мозку, гангліїв, мозолистого тіла і/або стовбура мозку; атрофію; і/або вентрикуломегалію.

У ще одному аспекті даний винахід належить до способів лікування метакроматичної лейкодистрофії (МЛД), які включають стадію інтратекального введення суб'єкту, що потребує лікування, рекомбінантної арилсульфатази А (arylsulfatase A, ASA) в такій терапевтично ефективній дозі та з такою періодичністю введення, при яких знижується інтенсивність, тяжкість чи частота або вповільнюється прояв щонайменше одного симптому або ознаки МЛД. У деяких варіантах реалізації, щонайменше один симптом або ознака МЛД являє собою підвищений внутрішньочерепний тиск, гідроцефалію внаслідок атрофії речовини головного мозку, накопичення сульфатованих гліколіпідів у мієлінових оболонках центральної й периферичної нервових систем і у внутрішніх органах, прогресивну демієлінізацію, втрату аксонів у ЦНС і ПНС і/або моторну й пізнавальну дисфункцію.

У іншому аспекті даний винахід належить до способів лікування синдрому Санфіліппо типу А (Санфіліппо А), які включають стадію інтратекального введення суб'єкту, що потребує лікування, рекомбінантної гепаран-N-сульфатази (heparan-N-sulfatase, HNS) у такій терапевтично ефективній дозі та з такою періодичністю введення, при яких знижується інтенсивність, тяжкість чи частота або вповільнюється прояв щонайменше одного симптому або ознаки синдрому Санфіліппо типу А.

У іншому аспекті даний винахід належить до способів лікування синдрому Санфіліппо типу В (Санфіліппо В), які включають стадію інтратекального введення суб'єкту, що потребує лікування, рекомбінантної альфа-N-ацетилглюкозамінідази (alpha-N-acetylglucosaminidase, Naglu) в такій терапевтично ефективній дозі та з такою періодичністю введення, при яких знижується інтенсивність, тяжкість чи частота або вповільнюється прояв щонайменше одного симптому чи ознаки синдрому Санфіліппо типу В.

У деяких варіантах реалізації, щонайменше один симптом чи ознака Санфіліппо А або Санфіліппо В являє собою втрату слуху, розлад розвитку мови, дефіцит моторних навичок, моторну гіперактивність, прогресуючий розлад пізнавальної функції, агресивність і/або розлад сну.

У деяких варіантах реалізації, рекомбінантний фермент Naglu являє собою гібридний білок, який містить Naglu і частину, яка обумовлює спрямовану доставку до лізосом. У деяких варіантах реалізації, частина, яка обумовлює лізосомну доставку, являє собою IGF-II.

У іншому аспекті даний винахід передбачає способи лікування глобально-клітинної лейкодистрофії (ГКЛ), які включають стадію інтратекального введення суб'єкту, що потребує лікування, рекомбінантної β-галактозидази (recombinant β-galactosidase, GLC) у такій терапевтично ефективній дозі та з такою періодичністю введення, при яких знижується інтенсивність, тяжкість чи частота або вповільнюється прояв щонайменше одного симптому чи ознаки ГКЛ. У деяких варіантах реалізації, щонайменше один симптом або ознака ГКЛ являє собою дратівливість, судоми, розумову деградацію, глухоту, сліпоту, міоклонічні судоми, надмірний м'язовий тонус, відставання в розвитку, регресію навичок розвитку, підвищену чутливість, тремор, атаксію, еластичність, епізодичну сильну блювоту, лейкодистрофію, церебральну атрофію, розлад розвитку глобальних клітин і/або демієлінізацію.

У іншому аспекті даний винахід належить до пристроїв для інтратекального введення, які включають порт введення рідини; порожнисту основну частину, яка містить перший отвір для рідини, сполучений із вхідним портом для рідини, і другий отвір для рідини, виконаний із можливістю введення до спинного мозку; і блокуюче пристосування для блокування введення

порожнистої основної частини до спинного мозку. У деяких варіантах реалізації, блокуюче пристосування включає одну або більше опуклостей, виконаних на поверхні порожнистої основної частини, і блокуюче кільце, виконане з можливістю установки над однією або більшим числом опуклостей. У деяких варіантах реалізації, порт введення рідини включає резервуар. У деяких варіантах реалізації, порт введення рідини є таким, що імплантується. У деяких варіантах реалізації, порт введення рідини являє собою ін'єкційний порт. У деяких варіантах реалізації, порт введення рідини являє собою механічний насос.

У даній заявці терміни «приблизно» і «близько» є еквівалентними. Мається на увазі, що будь-які числівники, які використовуються в даній заявці з термінами «приблизно/близько» або без них, охоплюють будь-які відхилення, які є звичайними згідно з оцінкою фахівця.

Інші ознаки, завдання й переваги даного винаходу наведені в докладному описі, який наведений нижче. Однак слід розуміти, що зазначені варіанти реалізації даного винаходу наведені тільки як ілюстрації, а не як обмеження. Різні зміни й модифікації в рамках винаходу стануть очевидними для фахівців у даній області з докладного опису.

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

Графічні матеріали наведені тільки для ілюстрації, а не для обмеження.

На Фігурі 1 представлена типова схема пристрою для інтратекальної доставки лікарських засобів (ПІДЛЗ) з механізмом безпеки.

На Фігурі 2А представлені приклади ділянок на тілі пацієнта, де може бути розміщений ПІДЛЗ; на Фігурі 2В показані різні компоненти пристрою для інтратекальної доставки лікарських засобів (ПІДЛЗ), а на Фігурі 2С показані приклади ділянок на тілі пацієнта для ІТ поперекової ін'єкції.

На Фігурі 3 показані показові результати, що підсумовують дані про наповнювачі, протестовані на дорослих мавпах.

На Фігурі 4 показані показові результати, що ілюструють стабільність hGalC при термічному скринінгу hGalC в залежності від pH.

На Фігурі 5 наведені показові результати, що ілюструють специфічну активність hGalC в залежності від pH.

На Фігурі 6 наведені показові результати, що ілюструють результати термічного скринінгу hGalC в залежності від концентрації солі.

На Фігурі 7 наведені показові результати, які ілюструють швидкість осадження потоків GalC і порівнюють різні іонні сили в 5 мМ Na-фосфатному буфері, pH 6,0. Фігура 7А показує показові результати при використанні 50 мМ NaCl і hGalC. Фігура 7В показує показові результати при використанні 500 мМ NaCl і hGalC. Фігура 7D показує показові результати при використанні 150 мМ NaCl і мишачої GalC.

На Фігурі 8 показані показові результати, що ілюструють профіль ППК (площа під кривою) для GalC в залежності від концентрації солі (1 мг/мл GalC, 5 мМ Na-фосфатний буфер, pH 6,0) (вісь Y = $s \cdot g(s^*)$; вісь X = s^*).

На Фігурі 9 наведені показові результати, що ілюструють серії розведень hGalC в універсальному буфері, pH 6,0 (вісь Y = $g(s^*)/C_0 > (1 \text{ сведберг})$; вісь X = $s^* (\text{сведберг})$).

На Фігурі 10 наведені показові результати, що ілюструють профіль ППК для GalC в залежності від pH (1 мг/мл, 3 мМ цитратний, фосфатний і боратний буфери в 50 мМ NaCl).

На Фігурі 11 наведені показові результати, що ілюструють базовий показ при великому аналізі розподілу (wide distribution analysis, WDA) при найвищих концентраціях при pH 6,0 у 15 мМ фосфаті Na і 150 мМ NaCl.

На Фігурі 12 наведені показові результати, що ілюструють покази при стресі, отримані при WDA-аналізі при найвищих концентраціях при pH 6,0 у 15 мМ фосфаті Na і 150 мМ NaCl.

На Фігурі 13 наведене графічне порівняння й перекривання фонових і стресових зразків GalC.

На Фігурі 14 наведені показові результати, що ілюструють серії розведень hGalC у присутності 1 % NaTC.

На Фігурі 15 наведені показові результати, що ілюструють серії розведень hGalC у присутності 1 % NaTC (1,0 і 0,3 мг/мл).

На Фігурі 16 наведені показові результати, що ілюструють власну флюоресценцію hGalC (1 мг/мл) у різних буферах і при різних pH.

На Фігурі 17 наведені показові результати, що ілюструють круговий дихроїзм hGalC в залежності від pH.

На Фігурі 18 наведені показові результати, що ілюструють середні концентрації радіоактивності в сироватці, крові й червоних кров'яних тільцях у самців щурів Sprague-Dawley після однократного інтратекального введення дози ^{125}I -hGalC.

На Фігурі 19 наведені показові результати, що ілюструють середні концентрації радіоактивності в сироватці, серці, нирках, печінці, легенях, селезінці у самців щурів Sprague-Dawley після однократного інтратекального введення дози ^{125}I -hGalC.

На Фігурі 20 наведені показові результати, що ілюструють середні концентрації радіоактивності в сироватці, серці, нирках, печінці, легенях, селезінці у самців щурів Sprague-Dawley після однократної внутрішньовенної болюсної ін'єкції ^{125}I -hGalC.

На Фігурі 21 наведені показові результати, що ілюструють середні концентрації радіоактивності в сироватці, серці, нирках, печінці, легенях, селезінці у самців щурів Sprague-Dawley після однократного інтратекального введення дози і внутрішньовенної болюсної ін'єкції ^{125}I -hGalC.

На Фігурі 22 наведені показові результати, що ілюструють середні концентрації радіоактивності в сироватці й різних тканинах (жировій тканині (ниркової капсули), наднирниках, кістках (стегових), м'язовій (скелетній), сидничному нерві) у самців щурів Sprague-Dawley після однократного інтратекального введення дози ^{125}I -hGalC.

На Фігурі 23 наведені показові результати, що ілюструють середні концентрації радіоактивності в сироватці та різних тканинах (жировій тканині (ниркової капсули), наднирниках, кістках (стегових), м'язовій (скелетній), сидничному нерві) у самців щурів Sprague-Dawley після однократної внутрішньовенної болюсної ін'єкції ^{125}I -hGalC.

На Фігурі 24 наведені показові результати, що ілюструють середні концентрації радіоактивності в сироватці й різних тканинах (жировій тканині (ниркової капсули), наднирниках, кістках (стегових), м'язовій (скелетній), сидничному нерві) у самців щурів Sprague-Dawley після однократного інтратекального введення дози й внутрішньовенної болюсної ін'єкції ^{125}I -hGalC.

На Фігурі 25 наведені показові результати, що ілюструють середні концентрації радіоактивності в сироватці, спинномозковій рідині й інших тканинах у самців щурів Sprague-Dawley після однократного інтратекального введення дози ^{125}I -1iCa1C.

На Фігурі 26 наведені показові результати, що ілюструють середні концентрації радіоактивності в сироватці, спинномозковій рідині й інших тканинах у самців щурів Sprague-Dawley після однократної внутрішньовенної болюсної ін'єкції ^{125}I -hGalC.

На Фігурі 27 наведені показові результати, що ілюструють середні концентрації радіоактивності в сироватці, спинномозковій рідині та тканинах у самців щурів Sprague-Dawley після однократного інтратекального введення дози й внутрішньовенної болюсної ін'єкції ^{125}I -hGalC.

На Фігурі 28 наведені показові результати, що ілюструють середні концентрації радіоактивності в сироватці й тканинах у самців щурів Sprague-Dawley після однократного інтратекального введення дози ^{125}I -hGalC.

На Фігурі 29 наведені показові результати, що ілюструють середні концентрації радіоактивності в сироватці й тканинах у самців щурів Sprague-Dawley після однократної внутрішньовенної болюсної ін'єкції ^{125}I -hGalC.

На Фігурі 30 наведені показові результати, що ілюструють середні концентрації радіоактивності в сироватці й тканинах у самців щурів Sprague-Dawley після однократного інтратекального введення дози й внутрішньовенної болюсної ін'єкції ^{125}I -hGalC.

На Фігурі 31 наведені показові результати, що ілюструють, що ІП введення gmGalC знижує рівень психозину в мозку у мишей twitcher. Дані являють собою середнє значення $\pm$ СПС при $n = 4$ миші в групі лікування.

На Фігурі 32 наведені показові результати, що ілюструють збільшення виживаності тільки при терапії тільки з використанням ІЦВ і ІЦВ/ІП gmGalC.

На Фігурі 33 наведені показові результати, які ілюструють, що у мишей twitcher рівень психозину в мозку значно знижується після ІЦВ і ІЦВ/ІП ін'єкції.

На Фігурі 34 наведені показові результати, що ілюструють покращення гістологічних маркерів, які спостерігаються у мишей twitcher, оброблених 40 gmGalC. Гліальний фібрилярний кислий білок (ГФКБ) був використаний як маркер астроцитів. Iba 1 був використаний як маркер мікроглії/макрофагів. Лізосомний, пов'язаний із мембраною білок-1 (LAMP-1) був використаний як лізосомний маркер.

На Фігурі 35 наведені показові результати, що ілюструють повторне накопичення психозину після однократної ІЦВ ін'єкції gmGalC або носія.

На Фігурі 36 наведені показові результати, що ілюструють відсоток виживаності мишей twitcher після однократної ІЦВ ін'єкції gmGalC на 19/20 післяпологовий день (ППД). Дані представлено для $n = 8$ у кожній групі.

На Фігурі 37 наведені показові результати, що ілюструють відсоток виживаності мишей, оброблених ІЦВ/ІП з використанням gmGalC і rhGalC.

На Фігурі 38 наведені показові результати, що ілюструють аналіз ходи мишей, які отримували однократну ІЦВ ін'єкцію gmGalC і rhGalC.

На Фігурі 39 наведені показові результати, що ілюструють антигенну відповідь на gmGalC і rhGalC у мишей twitcher.

5 На Фігурі 40 наведені показові результати, що ілюструють рівень психозину в СМР простих собак і собак, яким вводили rhGalC.

На Фігурі 41 наведені показові результати, що ілюструють ІГХ фарбування ін'єктованої IT GalC у головному мозку з використанням поліклональних антитіл групи 1.

10 На Фігурі 42 наведені показові результати, що ілюструють ІГХ фарбування ін'єктованої IT GalC у головному мозку з використанням антитіл групи 2.

На Фігурі 43 наведені показові результати, що ілюструють ІГХ фарбування IT ін'єктованої GalC у головному мозку з використанням мишачих моноклональних антитіл.

На Фігурі 44 наведені показові результати, що ілюструють ІГХ фарбування IT ін'єктованої GalC у головному мозку з використанням мишачих моноклональних антитіл.

15 На Фігурі 45 наведені показові результати, що ілюструють ІГХ фарбування IT ін'єктованої GalC у печінці з використанням мишачих моноклональних антитіл.

На Фігурі 46 наведені показові результати, що ілюструють ІГХ фарбування IT ін'єктованої GalC у печінці з використанням поліклональних антитіл групи 2.

20 На Фігурі 47 наведені показові результати, що ілюструють середні значення активності GalC у головному мозку.

На Фігурі 48 наведені показові результати, що ілюструють середні значення активності GalC у печінці.

На Фігурі 49 наведені показові результати, що ілюструють імунофарбування на GalC у головному мозку при 10х збільшенні.

25 На Фігурі 50 наведені показові результати, що ілюструють імунофарбування на GalC у головному мозку при 40х збільшенні.

На Фігурі 51 наведені показові результати, що ілюструють фарбування на Iba активованої мікроглії при 40х збільшенні.

30 На Фігурі 52 наведені показові результати, що ілюструють фарбування на LFB/PAS у головному мозку при 10х збільшенні.

35 Фігура 53 ілюструє показовий результат ІГХ фарбування на I2S, який демонструє виявлений I2S у нейронах (стрілки) кори великого мозку й мозочка, включаючи шар менінгеальних клітин, які покривають поверхню мозку (стрілки), після інтратекальної ін'єкції 3 доз I2S. ІГХ фарбування на I2S після 2 доз, введених у мозок, було слабшим (фото не показане). Не спостерігали позитивного фарбування на I2S для якого-небудь із типів клітин головному мозку контрольних тварин, яким вводили наповнювач. Збільшення 40х.

40 На Фігурі 54 показаний приклад зворотного розвитку патології в головному мозку мишей ІКО після інтратекально-поперекової ін'єкції I2S. Офарблені Г/Е тканини мозку демонструють численні клітинні вакуолі (стрілки) у контрольних тварин, яким вводили наповнювач. Клітинна вакуолізація зменшена в усьому мозку після 2 доз (фото не показане) і 3 доз, ін'єктованих мишам. Помітне зниження було виявлене після ін'єкції 3 дози. Збільшення 40х.

45 На Фігурі 54 зображений показовий результат імуногістохімічного фарбування LAMP-1, було відмічене суттєве зниження лізосомної активності в мозку після 2 доз (фото не показане) і 3 доз лікування I2S у порівнянні з контрольними тваринами, яким вводили наповнювач. Таке зниження характеризувалося зменшенням кількості LAMP-1-позитивних клітин і невеликою інтенсивністю фарбування у всіх досліджених областях мозку. Збільшення 40х.

50 На Фігурі 56 наведені показові морфометричні результати порівняння середніх значень LAMP-1-позитивної області серед дикого типу (WT), контрольних мишей (що не отримували лікування) і мишей, яким вводили I2S (2 і 3 дози), у корі головного мозку (Кора), хвостатому ядрі (ХЯ), таламусі (Т), білій речовині (БР) і мозочку (М), які підтверджують зменшення LAMP-1-позитивного фарбування у всіх оцінених областях мозку. Дані представлені як середні значення $\pm$ ст. відх. $\# = P < 0,05$; $* = P < 0,01$; $** = P < 0,001$.

55 На Фігурі 57 наведені показові електронні мікрофотографії клітин головного мозку, які показують покращення патології на ультраструктурному рівні. Нейрони мишей, яким вводили наповнювач, мали пластинчасті включення, структуру типу «зеброїдних тілець» і вакуолі, що містять відкладення в формі гранул (вставка), яких було менше у мишей, яким ін'єктували I2S. Олігодендроцити мишей, які отримували наповнювач, показували великі електронно-просвічуючі запасуючі вакуолі (стрілка), в той час як олігодендроцити мишей, яким ін'єктували I2S, мали мінімальну вакуолізацію. Шкала: у нейронах, 2 мкм; в олігодендроцитах 500 нм.

На Фігурі 58 наведені показові імуногістохімічні результати, які демонструють I2S, виявлені в синусоїдальних клітинах печінки після інтратекальної ін'єкції 3 доз I2S. I2S IГХ фарбування після 2 дози, введеної в печінку, було слабшим (фото не показане). Не спостерігалось I2S-позитивного фарбування в печінці контрольних тварин, що отримували наповнювач.

На Фігурі 59 наведена типова тканина печінки. Інтенсивна клітинна вакуолізація й аномально висока лізосомна активність показана з використанням Г/Е фарбування, і інтенсивне імунофарбування на LAMP-1 було виявлене у контрольних тварин, що отримували наповнювач, у порівнянні з WT. Помітне ослаблення клітинної вакуолізації та імунофарбування на LAMP-1 було виявлене після інтратекального введення 3 і 2 (фото не показане) доз I2S. фарбування з використанням Г/Е, яке виявило внутрішньоцитоплазматичну вакуолізацію, майже повністю зникало, при цьому спостерігалась практично нормальна структура клітин печінки. фарбування Г/Е, збільшення 40х; фарбування на LAMP-1, збільшення 20х.

На Фігурі 60 наведені приклади тканин, що представляють головний мозок тваринної групи, яка отримувала дозу 3 мг. I2S-позитивне фарбування спостерігалось в менингеальних клітинах. Збільшення 4х.

На Фігурі 61 наведені приклади тканин, що представляють головний мозок тваринної групи, яка отримувала дозу 30 мг. I2S-позитивне фарбування спостерігалось в нейронах і менингеальних клітинах. Збільшення 4х.

На Фігурі 62 наведені приклади тканин, що представляють головний мозок тваринної групи, яка отримувала дозу 100 мг. I2S-позитивне фарбування в нейронах і менингеальних клітинах було сильнішим, ніж у випадку мишей, що отримували дозу 3 і 30 мг. Збільшення 4х.

На Фігурі 63 наведені приклади тканин, що представляють головний мозок у тваринної групи, яка отримувала дозу 150 мг. Відмічена велика популяція I2S-позитивних нейронів серед сильно позитивних менингеальних клітин.

На Фігурі 64 наведені приклади тканин, що демонструють I2S-позитивні нейрони та гліальні клітини, а також менингеальні клітини всередині I шару головного мозку у тваринної групи, яка отримувала дозу 30 мг. Збільшення 40х.

На Фігурі 65 наведені приклади тканин, що демонструють I2S-позитивні нейрони та гліальні клітини, а також периваскулярні клітини всередині III шару головного мозку у тваринної групи, яка отримувала дозу 30 мг. Збільшення 40х.

На Фігурі 66 наведені приклади тканин, що демонструють I2S-позитивні нейрони та гліальні клітини всередині VI шару головного мозку, які прилягають до білої речовини, у тваринної групи, яка отримувала дозу 30 мг. Збільшення 40х.

На Фігурі 67 наведені приклади тканин, що демонструють сильне I2S-позитивне фарбування нейронів (головний мозок) у тваринної групи, яка отримувала дозу 150 мг. Збільшення 100х.

На Фігурі 68 наведені приклади тканин, що демонструють імунофарбування на I2S шийного відділу спинного мозку у тваринної групи, яка отримувала дозу 150 мг. Збільшення 4х.

На Фігурі 69 наведені приклади тканин, що демонструють сильне імунофарбування на I2S поперекового відділу спинного мозку у тваринної групи, яка отримувала дозу 150 мг. Збільшення 4х.

На Фігурі 70 наведені приклади тканин, що демонструють сильне позитивне імунофарбування на I2S менингеальних клітин, гліальних клітин і епі/пери/ендонеурію (сполучні клітини) в поперековому відділі у тваринної групи, яка отримувала дозу 150 мг. Збільшення 40х.

На Фігурі 71 наведене зображення, яке демонструє, що нейрони в поперековому відділі спинного мозку в групі тварин, що отримувала дозу 150 мг, були в значній мірі I2S-позитивними. Збільшення 40х.

На Фігурі 72 наведені показові результати для печінки в групі тварин, що отримувала дозу 3 мг. Тільки синусоїдальні клітини були I2S-позитивними. Збільшення 40х.

На Фігурі 73 наведені показові результати для печінки в групі тварин, що отримувала дозу 30 мг. I2S-позитивними були синусоїдальні клітини й гепатоцити. Збільшення 40х.

На Фігурі 74 наведені показові результати для печінки в групі тварин, що отримувала дозу 100 мг. I2S імунофарбування було сильним у синусоїдальних клітинах і гепатоцитах. Збільшення 40х.

На Фігурі 75 наведені показові результати для печінки в групі тварин, що отримувала дозу 150 мг. Сильне I2S-позитивне фарбування було виявлене в синусоїдальних клітинах і гепатоцитах. Збільшення 40х.

На Фігурі 76 наведені показові результати для серця в групі тварин, що отримувала дозу 3 мг. імунофарбування на I2S було негативним. Збільшення 40х.

На Фігурі 77 наведені показові результати для серця в групі тварин, що отримувала дозу 30 мг. I2S-позитивними були інтерстиціальні клітини. Збільшення 40х.

На Фігурі 78 наведені показові результати для серця в групі тварин, що отримувала дозу 100 мг. I2S-позитивне фарбування було виявлене для інтерстиціальних клітин. Збільшення 40х.

5 На Фігурі 79 наведені показові результати для серця в групі тварин, що отримувала дозу 150 мг. Було виявлене значне I2S-позитивне фарбування інтерстиціальних клітин. Збільшення 40х.

На Фігурі 80 наведені показові результати для нирки в групі тварин, що отримувала дозу 3 мг. імуофарбування на I2S було негативним. Збільшення 40х.

10 На Фігурі 81 наведені показові результати для нирки в групі тварин, що отримувала дозу 30 мг. I2S-позитивними були клубочкові та інтерстиціальні клітини.

На Фігурі 82 наведені показові результати для нирки в групі тварин, що отримувала дозу 100 мг. Було виявлене посилення I2S-фарбування клубочкових та інтерстиціальних клітин. Збільшення 40х.

15 На Фігурі 83 наведені показові результати для нирки в групі тварин, що отримувала дозу 150 мг. Виявлене 128-позитивне фарбування проксимальних трубчастих, клубочкових та інтерстиціальних клітин. Збільшення 40х.

20 На Фігурі 84 наведені результати імуногістохімічних (ІГХ) досліджень з оцінки тканин ЦНС довгохвостих макак, яким вводили щотижня дози ідуронат-2-сульфатази (I2S). Як було показано методами ІГХ, клітинні відкладення I2S зустрічалися в усій ЦНС. У сірій речовині I2S була виявлена в нейронах головного мозку, мозочка, стовбурі мозку й спинному мозку в усіх групах у залежності від дози. На поверхні сірої речовини груп, що отримували високу дозу, велика кількість нейронів на поверхні кори головного мозку була офарблена I2S-позитивно (на Фігурі 84А). I2S також була виявлена в нейронах таламуса (на Фігурі 84В), гіпокампу (на Фігурі 84С), хвостатого ядра (на Фігурі 84D) і спинного мозку (на Фігурі 84Е). Менінгеальні та периваскулярні клітини були також позитивно офарблені на I2S (на Фігурі 84F). Зазначена шкала відповідає 25 мкм.

На Фігурі 85 наведене графічне порівняння кліренсу ідуронат-2-сульфатази (I2S) у краніальному та спинальному пулах на основі графіка залежності кількості I2S у таких пулах від часу після введення.

30 На Фігурі 86 показане дозозалежне накопичення в сірій речовині у приматів, відмінних від людини, яким інтратекально вводили ідуронат-2-сульфатазу (I2S) протягом шести місяців. Показана інтенсивність фарбування відповідає накопиченню ідуронат-2-сульфатази в таламусі. На Фігурі 86 ядра контрастовані з використанням DAPI й виглядають синіми, а білок (I2S) виглядає зеленим.

35 На Фігурі 87 показане дозозалежне накопичення введеної інтратекально ідуронат-2-сульфатази (I2S) приматам, відмінним від людини, після однократної ін'єкції й після декількох ін'єкцій протягом шести місяців. Показана інтенсивність фарбування відповідає накопиченню білка I2S в корі головного мозку.

40 На Фігурі 88 показана клітинна локалізація ідуронат-2-сульфатази (I2S) в головному мозку приматів. На Фігурі 88А представлений поперечний зріз тканин головного мозку, вилучених із головного мозку приматів, а на Фігурі 88В показані окремі області відділів, які відповідають трьом областям тканин білої речовини (позначені як W1, W2 і W3), білої речовини поблизу шлуночка (VW) і поверхневої сірої речовини (CP) зрізу, ідентифікованого на Фігурі 88А.

45 Фігура 89А-Д ілюструє поглинання нейронами й олігодендроцитами і асоціацію аксонів у приматів при інтратекальному введенні ідуронат-2-сульфатази (I2S) після щомісячних ін'єкцій протягом шестимісячного періоду. Зокрема, Фігура 89А, Фігура 89В, Фігура 89С і Фігура 89D ілюструють офарблені волокна в тканинах головного мозку приматів, яким інтратекально вводили ідуронат-2-сульфатазу (I2S), які відповідно співвідносяться з трьома областями білої речовини (W1, W2 і W3) і областями поверхні сірої речовини, визначеними на Фігурі 87В. Фігура 89А ілюструє поглинання олігодендроцитами інтратекально введеної до тканини білої речовини I2S. На Фігурі 89В і на Фігурі 89С показане поглинання олігодендроцитами та асоціація аксонів при інтратекальному введенні I2S до тканин білої речовини W2 і W3 відповідно. На Фігурі 89В показане поглинання нейронами інтратекально введеної I2S до тканин на поверхні сірої речовини (CP).

55 На Фігурі 90 показана клітинна ідентифікація ідуронат-2-сульфатази в білій речовині поблизу шлуночка (VW) у приматів, відмінних від людини (стрілки зверху ліворуч). Як показано на об'єднаному зображенні (стрілки знизу, праворуч), ідуронат-2-сульфатаза не пов'язана з мієліном (зверху праворуч). На Фігурі 90 ядра контрастовані з використанням DAPI (знизу ліворуч), білок (I2S) проявляється зверху ліворуч.

На Фігурі 91 показане фарбування в тканинах здорових собак породи бігль, яким інтрацеребровентрикулярно (ІЦВ) або інтратекально (ІТ) вводили однократну ін'єкцію ідуронат-2-сульфатази (І2S). Як показано на зображеннях a-h, І2S була широко розподілена по всій сірій речовині в обох випадках, як у ІТ, так і у ІЦВ груп, що було визначено з використанням імуногістохімії (ІГХ). Зображення a і b показують, що в корі головного мозку нейрони позитивно пофарбовані на І2S у всіх шести нейронних шарах, від поверхневого молекулярного шару до глибокого внутрішнього шару в обох групах: ІТ та ІЦВ. Зображення c і d ілюструють, що в корі мозочка груп ІТ та ІЦВ І2S виявлена в нейронах, включаючи клітини Пуркінє. Аналогічно, зображення e і f демонструють, що в обох групах з ІТ та ІЦВ введенням великі популяції нейронів у гіпокампі були позитивно офарблені на І2S. Нарешті, зображення g і h показують, що І2S-позитивні нейрони були також знайдені в таламусі й хвостатому ядрі як у ІТ, так і в ІЦВ групі. На Фігурі 91 фарбування на І2S показане стрілками.

На Фігурі 92 наведена порівняльна ілюстрація тканини мозолистого тіла мишей, нокаутуваних ідуронат-2-сульфатазою (ІКО), які належать до контрольної групи (без обробки) або які отримували І2S інтратекально. Як можна побачити на зображенні, у мишей ІКО, які отримували І2S, спостерігалось зниження клітинної вакуолізації, що є характерною рисою деяких лізосомних хвороб накопичення в мозолистому тілі та зводі тканин І2S-оброблених ІКО мишей.

Фігура 93A ілюструє помітне зниження, при присутності лізосомного зв'язаного з мембраною білка 1 (LAMP-1), патологічного маркера лізосомних хвороб у тканинах на поверхні кори мозку оброблених мишей ІКО (Фігура 93A) в порівнянні з необробленими контрольними мишами ІКО (Фігура 93B) при 20х і 40х збільшенні.

На Фігурі 94 показаний приклад пристрою інтратекальної доставки лікарських засобів (ПІДЛЗ).

На Фігурі 95 показаний приклад низькопрофільної системи доступу PORT-A-CATH®, яка інтратекально імплантується.

На Фігурі 96 показаний приклад пристрою інтратекальної доставки лікарських засобів (ПІДЛЗ).

На Фігурі 97 показаний приклад пристрою інтратекальної доставки лікарських засобів (ПІДЛЗ), який дозволяє вводити в домашніх умовах ферменти до ЦНС при замісній ферментній терапії (ЗФТ).

На Фігурі 98 наведена типова ілюстрація, яка демонструє ефект вакуолізації після однієї внутрішньомозкової ін'єкції ідурсульфазу до нейронів (клітини Пуркінє).

Фігура 99 являє собою приклад активності І2S в мозку в залежності від дози та області.

Фігура 100 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад дані з імуногістохімічної локалізації ідурсульфазу в різних рівнях кори головного мозку.

Фігура 101 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад активність І2S у спинному мозку мавп після інтратекального введення ідурсульфазу.

Фігура 102 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад активність І2S у печінці, серці та нирках мавп після інтратекального введення ідурсульфазу.

На Фігурі 103 показана орієнтовна схема програми випробувань із ескалацією дози Hunter-IT.

Фігура 104 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад вимірювання концентрації І2S у різних зрізах тканин мозку після 30 мг дози. Різні криві відповідають різному часу вимірювання.

Фігура 105 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад вимірювання концентрації І2S після тривалого введення з використанням різних шляхів введення й різних концентрацій продукту.

На Фігурі 106 наведене PET зображення ¹²⁴I-мічена ідурсульфаза-ІТ у мавпах циномолгус при t = 5 годин після IV, IT-L або ICV введення.

Фігура 107 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад дані з концентрації ASA у сироватці після внутрішньовенного введення.

Фігура 108 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад дані з концентрації ASA в сироватці після ІТ поперекового введення.

Фігура 109 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад дані з концентрації ASA в спинномозковій рідині після внутрішньовенного введення.

Фігура 110 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад дані з концентрації ASA в спинномозковій рідині після ІТ поперекового введення.

На Фігурі 111 наведена типова мікрофотографія тканин мозку, мозкових оболонок, інфільтратів (групи з середніми й високими дозами, обидві статі) після лікування.

На Фігурі 112 наведена інша типова мікрофотографія тканин мозку, мозкових оболонок, інфільтратів (групи з середніми й високими дозами, обидві статі) після лікування.

На Фігурі 113 наведена типова мікрофотографія тканин мозку, периваскулярних тканин, інфільтратів (групи з середніми дозами, чоловіки; групи з високими дозами, жінки) після лікування.

На Фігурі 114 наведене показове фарбування, з використанням альціанового синього, спинного мозку імунотолерантних мишей MLD, які отримували rhASAI, і результати, що демонструють зменшення сульфатидів, яке було визначено шляхом фарбування, з використанням альціанового синього, шийного відділу спинного мозку у тварин, які отримали інтратекальні ін'єкції rhASA на 1, 8, 15 і 22 дні в дозі 520 мг/кг ваги мозку, або контрольних мишей, яким вводили наповнювач. Як показано, обробка шляхом інтратекального введення rhASA призводила до зниження накопичення сульфатидів у спинному мозку, у тому числі в шийному відділі спинного мозку.

Фігура 115 ілюструє показовий морфометричний аналіз фарбування, з використанням альціанового синього, відділів хребта у імунотолерантних мишей MLD, оброблених rhASA, і результати, що ілюструють оптичну щільність альціанового синього в усьому спинному мозку (Т-спинний мозок), усій сірій речовині (Т-CP), сірій речовині поперекового відділу (L-CP), сірій речовині шийного відділу (C-CP), усій білій речовині (Т-BP), білій речовині поперекового відділу (L-BP) і білій речовині шийного відділу (C-BP), як визначено з використанням морфометричного аналізу. Статистично значуще зменшення фарбування, показане фарбуванням альціановим синім, було виявлене у тварин, оброблених rhASA, в порівнянні з контрольними мишами, яким вводили наповнювач.

На Фігурі 116 показане типове зменшення фарбування на LAMP у білій речовині (фімбрія) імунотолерантних мишей MLD, оброблених rhASA, наведені показові результати, які ілюструють рівень LAMP-1 у бахромці, визначений із використанням імуногістохімії. Збільшення 20х. Показано, що обробка шляхом інтратекального введення rhASA призводила до зменшення LAMP-1 у білій речовині головного мозку.

На Фігурі 117 наведені результати типового морфометричного аналізу фарбування на LAMP тканин мозку імунотолерантних мишей MLD, що отримували rhASAI, і результати, які ілюструють інтенсивність фарбування на LAMP-1 у мозолистому тілі (CC), бахромці (F), білій речовині мозочка (CB-BP) і стовбурі мозку (BS) тварин, що отримували 20 мг/кг ваги мозку внутрішньовенно rhASA, 300 мг/кг ваги мозку інтратекально rhASA, 520 мг/кг ваги мозку внутрішньовенно rhASA, або контрольних мишей, яким вводили наповнювач.

Фігура 118 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад концентрацію ASA у фрагментах тканин мозку молодих довгохвостих макак (Cynomolgus), яким вводили наповнювач, після введення один раз на два тижні (РДТ) протягом 6 місяців (загальна некропсія).

Фігура 119 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад концентрацію ASA у фрагментах тканин мозку молодих довгохвостих макак після ІТ-введення РДТ rhASAI, 1,8 мг/доза, протягом 6 місяців (загальна некропсія).

Фігура 120 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад концентрацію ASA у фрагментах тканин мозку молодих довгохвостих макак після ІТ-введення РДТ rhASAI, 0,6 мг/доза, протягом 6 місяців (загальна некропсія).

Фігура 121 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад концентрацію rhASA у фрагментах тканин мозку молодих довгохвостих макак після ІТ-введення РДТ rhASAI, 18,6 мг/доза, протягом 6 місяців (загальна некропсія).

Фігура 122 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад концентрацію rhASA у фрагментах тканин мозку молодих довгохвостих макак після ІТ-введення РДТ (ФСБ як контроль) протягом 6 місяців (загальна некропсія).

Фігура 123 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад концентрацію rhASA у фрагментах тканин мозку молодих довгохвостих макак після ІТ-введення РДТ наповнювача протягом 6 місяців (загальна некропсія).

Фігура 124 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад концентрацію rhASA у фрагментах тканин мозку молодих довгохвостих макак після ІТ-введення РДТ rhASAI, 1,8 мг/доза, протягом 6 місяців (загальна некропсія).

Фігура 125 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад концентрацію rhASA у фрагментах тканин мозку молодих довгохвостих макак після ІТ-введення РДТ rhASAI, 6,0 мг/доза, протягом 6 місяців (загальна некропсія).

Фігура 126 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад концентрацію rhASA у фрагментах тканин мозку молодих довгохвостих макак після ІТ-введення РДТ rhASAI, 18,6 мг/доза, протягом 6 місяців (загальна некропсія).

5 Фігура 127 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад концентрацію rhASA в вибраних фрагментах тканин мозку, взятих із поверхні мозку тварин з контрольним пристроєм, тварин, яким вводили наповнювач, 1,8, 6,0 і 18,6 мг (самці й самки розділені, контрольні дані для експерименту з пристроєм являють собою дані, отримані при прижиттєвому розтині, всі інші дані отримані при загальній некропсії).

10 Фігура 128 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад концентрацію rhASA в вибраних фрагментах тканини з глибокої білої речовини мозку тварин з контрольним пристроєм, тварин, яким вводили наповнювач, 1,8, 6,0 і 18,6 мг (самці й самки розділені, контрольні дані для експерименту з пристроєм являють собою дані, отримані при прижиттєвому розтині, всі інші дані отримані при загальній некропсії).

15 Фігура 129 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад концентрацію rhASA в вибраних фрагментах тканини з глибокої сірої речовини мозку тварин із контрольним пристроєм, тварин, яким вводили наповнювач, 1,8, 6,0 і 18,6 мг (самці й самки розділені, контрольні дані для експерименту з пристроєм являють собою дані, отримані при прижиттєвому розтині, всі інші дані отримані при загальній некропсії).

20 Фігура 130 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад концентрацію rhASA в вибраних фрагментах тканини з різних областей мозку тварин з контрольним пристроєм, тварин, яким вводили наповнювач, 1,8 мг, 6,0 мг і 18,6 мг (самці й самки розділені, контрольні дані для експерименту з пристроєм являють собою дані, отримані при прижиттєвому розтині, всі інші дані отримані при загальній некропсії).

25 Фігура 131 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад концентрацію rhASA у відділах хребта молодих довгохвостих макак після ІТ-введення РДТ протягом 6 місяців (прижиттєвий розтин).

Фігура 132 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад концентрацію rhASA в печінці молодих довгохвостих макак після ІТ-введення РДТ протягом 6 місяців (047-021) (прижиттєвий розтин).

30 Фігура 133 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад анатомічне положення фрагментів тканин мозку в підкірковій БР (білій речовині), перивентрикулярній БР (і в глибокій білій речовині) і підкірковій БР.

35 Фігура 134 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад анатомічне положення фрагментів тканин мозку в мозолистому тілі й підкірковій навколомозолистій БР, внутрішній капсулі - Грі, внутрішній капсулі-хвостатому ядрі, глибокій білій речовині, підкірковій БР і корі, шкарлупі й тимчасовій підкірковій БР і корі.

Фігура 135 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад анатомічне положення фрагментів тканин мозку в глибокій сірій речовині, глибокій БР (фронтальних перивентрикулярних і підкіркових) і підкірковій білій речовині й корі - поверхово сагітально.

40 Фігура 136 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад анатомічне положення фрагментів тканин мозку в мозолистому тілі й підкірковій навколомозолистій БР, глибокій підкірковій БР, глибокій сірій речовині, перивентрикулярній БР, підкірковій БР і гіпокампі.

Фігура 137 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад анатомічне положення фрагментів тканин мозку в глибокій БР мозолистого тіла.

45 Фігура 138 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад анатомічне положення фрагментів тканин мозку в підкірковій БР - потиличної долі та білої речовини мозочка, включаючи зубчасті ядра (БР).

50 Фігура 139A ілюструє концентрацію рекомбінантної людської арилсульфатази (ASA) у виділених фрагментах тканин мозку дорослих і молодих довгохвостих макак, яким ін'єктували або наповнювач, або 1,8 мг rhASA чи 18,6мг rhASA. Кожна з Фігур 139A-G відповідає області тканини мозку, показаної на Фігурі 134.

55 Фігура 140A і Фігура 140B є типовими ілюстраціями, які показують порівняння концентрацій рекомбінантної людської арилсульфатази А (ASA), визначеної в глибокій білій (Abuehf 140A) або в глибокій сірій (Фігура 140B) речовині мозку дорослих чи молодих довгохвостих макак, які отримували інтратекальні або інтрацеребровентрикулярні ін'єкції rhASA.

60 Фігура 141A представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад концентрації ASA, визначені в декількох фрагментах тканин, отриманих у молодих (12 місяців від народження) довгохвостих макак, які отримували інтратекальні ін'єкції 18,6мг рекомбінантної людської арилсульфатази А (rhASA). Як показано на обох Фігурах 140A-B, концентрація ASA, доставленої до тканин, була в межах або перевищувала необхідну терапевтичну концентрацію 2,5 нг/мг

rhASA. Анатомічними областями тканин мозку, які відповідають зразкам тканини, показаним на Фігурі 140A і Фігурі 140B, є: підкіркова біла речовина (1); перивентрикулярна біла речовина і глибока біла речовина (2); підкіркова біла речовина (3); підкіркова біла речовина (4); внутрішня капсула (5); хвостате ядро внутрішньої капсули (6); глибока біла речовина (7); підкіркова біла речовина і кора (8); шкарлупа (9); підкіркова біла речовина і кора скроневої долі (10); глибока сіра речовина (11); глибока сіра речовина (12); перивентрикулярна і підкіркова лобова доля (13); підкіркова біла речовина, кіркова поверхнева речовина (14); мозолисте тіло і навколомозолиста підкіркова біла речовина (15); глибока підкіркова біла речовина (16); глибока сіра речовина (17); глибока сіра речовина (18); перивентрикулярна біла речовина (19); глибока підкіркова біла речовина (20); гіпокамп (21); мозолисте тіло (22); глибока біла речовина (23); підкіркова біла речовина, потилична доля (24); і біла речовина мозочка (25).

На Фігурі 142A показані ділянки тканин глибокої білої речовини, отриманої від довгохвостих макак, які отримували інтратекальні ін'єкції 1,8 мг ASA. Фігура 142B ілюструє імуофарбування тканин глибокої білої речовини й розподіл ASA у відповідних клітинах. На Фігурі 142B білок (ASA) показаний у правому нижньому вікні. Фігура 142C ілюструє, що IT введена ASA демонструє органелну колокалізацію в тканинах глибокої білої речовини у довгохвостих макак і, зокрема, у лізосомах. На Фігурі 142C у верхньому лівому вікні показане імуофарбування на ASA.

На Фігурі 143 наведене порівняння розподілу ¹²⁴I-міченої арилсульфатази (ASA) з використанням ПЕТ-сканування через 24 години після IT або ІЦВ введення довгохвостим мавпам ASA, міченої зазначеним способом.

На Фігурі 144 наведене порівняння розподілу ¹²⁴I-міченої ASA відразу після ІЦВ введення довгохвостим макакам і порівняння розподілу IT введеної ¹²⁴I-міченої ASA протягом 2-5 годин. Як показано, IT-введення доставляє ¹²⁴I-мічену ASA до тих самих початкових відділів (цистерна і проксимальний відділ хребта), як це показано для ІЦВ введення.

На Фігурі 145 наведені результати типового ІЦВ та IT-введення на моделі миші.

На Фігурі 146 наведені показові результати, що ілюструють концентрацію HNS у СМР в залежності від часу в дозах 1,5, 4,5 і 8,3 мг після 6 місяців приймання. На Фігурі 146B більш детально показаний показовий результат, який ілюструє концентрацію антитіл до HNS у СМР після 6 місяців IT-введення 1,5, 4,5 і 8,3 мг доз мавпам. Дані для самців і самок об'єднані. На Фігурі 146C більш детально показаний показовий результат, який ілюструє концентрацію антитіл до HNS у СМР після 6 місяців IT-введення 1,5, 4,5 і 8,3 мг доз мавпам після 6 місяців введення. Дані для самців і самок об'єднані. Два найбільш високі значення концентрації (32,205 нг/мл і 15,467 нг/мл), доставлені IT-дозою 6, 8,3 мг HNS, були виключені з графіка, оскільки проби СМР не були взяті перед введенням дози 6.

На Фігурі 147 наведені результати, що демонструють показові зображення зрізів тканин мозкових оболонок і паренхіми мозку, офарблених гематоксиліном і еозином. На Фігурі 147A наведений показовий результат, що ілюструє вид при малому збільшенні нейтрофільних інфільтратів локальних IT катетерів у мавп DC. На Фігурі 147B наведений показовий результат, що ілюструє вид при великому збільшенні еозинофільних інфільтратів у мозкових оболонках мавп, які отримували високі дози (8,3 мг/доза); загальна тяжкість інфільтратів була схожа зі значенням для групи з середньою дозою (4,5 мг/доза) (не показано). На Фігурі 147C наведений показовий результат, що ілюструє вид при великому збільшенні для мавп, які отримували низьку дозу (1,5 мг/доза), показані еозинофіли в периваскулярному просторі (паренхіма мозку). На Фігурі 147D наведений показовий результат для групи мавп, які отримували низьку дозу (1,5 мг/доза), показані еозинофіли в периваскулярному просторі й прилягаючій паренхімі. На Фігурі 147E наведений показовий результат, що ілюструє еозинофіли в паренхімі спинного мозку (показані стрілками) для групи тварин, які отримували низьку дозу; нейрони в цій області є нормальними. На Фігурі 147F наведений показовий результат, що ілюструє еозинофіли й область мікроглії (стрілки вказують на еозинофіли; рамкою показана область мікроглії) у групи мавп, які отримували низьку дозу (1,5 мг/доза). У цій області виявлено кілька нейронів, усі з них є нормальними. Масштабна лінійка: 200 мкм.

На Фігурі 148 наведений показовий результат, що ілюструє активність ферменту HNS у спинному мозку й головному мозку мавп. На Фігурі 148A/B наведений показовий результат, що ілюструє активність у спинному мозку (A) самців і (B) самок мавп. Зріз 3 = поперековий відділ, зрізи 3, 6 = грудний відділ і зріз 9 - шийний відділ; 0 = голівка катетера. На Фігурі 148C/D наведений показовий результат, що ілюструє активність HSN у мозку (C) самців і (D) самок мавп. Зрізи пронумеровані від голови до хвоста (від 3 до 15). Усі зразки тканин були зібрані приблизно після 24 годин після останнього приймання або після 4 тижнів після останнього

приймання, потрібних для відновлення тварин, DC, контрольне спостереження. Дані являють собою середнє значення $\pm$ стандартна помилка середнього при $n = 4$ мавп у групі лікування.

На Фігурі 149 наведений показовий результат, що ілюструє активність ферменту HNS у головному мозку й печінці мавп. На Фігурі 149A наведений показовий результат, що ілюструє розподіл активності HSN у мозку в групі мавп, які отримували високу дозу (8,3 мг/доза). Показані кратні зміни активності в поверхневих, глибоких і дуже глибоких (перивентрикулярних) областях мозку в порівнянні з ендogenous рівнем (група DC). Усі зразки тканин були зібрані приблизно через 24 години після введення останньої дози або через 4 тижні після приймання останньої дози для групи тварин з відновленням. Дані являють собою середнє значення $\pm$ стандартна помилка середнього при $n = 6$ мавп (обидві статі), зрізи мозку 6 і 9. Дані для двох мавп не були включені; при некропсії на катетерах не виявили мітки. На Фігурі 149B показана активність HNS у печінці мавпи. Усі зразки тканин були зібрані приблизно через 24 години після приймання останньої дози або через 4 тижні після приймання останньої дози для групи тварин з відновленням. DC, контрольне спостереження. Рес, група тварин, які видужали. Дані являють собою середнє значення $\pm$ стандартна помилка середнього при $n = 4$ мавп у групі, за винятком групи самок, які отримували низьку дозу (4,5 мг/доза) ($n = 3$).

На Фігурі 150 наведений показовий результат, що ілюструє локалізацію HNS у мозочку молодих довгохвостих макак: 3-місячна група. На Фігурі 150A наведений показовий результат, що ілюструє відсутність імунофарбування на HSN у мозочку контрольних тварин, які отримували наповнювач (0 мг/доза); збільшення 20х. На Фігурі 150B наведений показовий результат, що ілюструє фарбування в мозочку групи тварин, які отримували низьку дозу (1,5 мг/доза), і показує мінімальне позитивне фарбування, обмежене молекулярним шаром; збільшення 20х. На Фігурі 150C наведений показовий результат, що ілюструє фарбування в мозочку групи тварин, які отримували середню дозу (4,5 мг/доза), і показує мінімальне фарбування в зовнішньому зернистому шарі; збільшення 20х. На Фігурі 150D наведений показовий результат, що ілюструє фарбування в мозочку групи тварин, які отримували високу дозу (8,3 мг/доза), яке охоплює молекулярний, зовнішній зернистий шари й клітини Пуркінє; збільшення 20х.

На Фігурі 151 наведений показовий результат вимірювання концентрації HNS у головній області в залежності від часу в перші 20 хвилин після ІТ-введення ^{124}I -HNS 1 і 10 мг/кг.

На Фігурі 152 наведений показовий результат вимірювання концентрації HNS у мозку в залежності від часу після ІТ-введення ^{124}I -HNS 1 і 10 мг/кг.

На Фігурі 153 наведений показовий результат вимірювання концентрації HNS в області мозку в залежності від часу після ІТ-введення ^{124}I -HNS 1 і 10 мг/кг.

На Фігурі 154 наведений показовий результат вимірювання концентрації HNS у головній області в залежності від часу ІТ-введення ^{124}I -HNS 1 і 10 мг/кг.

На Фігурі 155 наведений показовий результат вимірювання концентрації HNS у проксимальному відділі хребта в залежності від часу ІТ-введення ^{124}I -HNS 1 і 10 мг/кг.

На Фігурі 156 наведений показовий результат вимірювання концентрації HNS у серединному відділі хребта в залежності від часу ІТ-введення ^{124}I -HNS 1 і 10 мг/кг.

На Фігурі 157 наведений показовий результат вимірювання концентрації HNS у дистальному відділі хребта в залежності від часу ІТ-введення ^{124}I -HNS 1 і 10 мг/кг.

На Фігурі 158 наведений показовий результат вимірювання концентрації HNS у печінці в залежності від часу ІТ-введення ^{124}I -HNS 1 і 10 мг/кг.

На Фігурі 159 наведений показовий результат вимірювання концентрації HNS у мозку в залежності від часу ІТ-введення ^{124}I -HNS 1 і 10 мг/кг, індивідуальні значення (вгорі) і середнє $\pm$ ст. відх. (внизу).

На Фігурі 160 наведений показовий результат вимірювання печінкової концентрації HNS у залежності від часу ІТ-введення ^{124}I -HNS 1 і 10 мг/кг, індивідуальні значення (вгорі) і середнє $\pm$ ст. відх. (внизу).

На Фігурі 161 наведений показовий результат вимірювання печінкової концентрації HNS в залежності від часу ІТ-введення ^{124}I -HNS 1 і 10 мг/кг, індивідуальні значення (вгорі) і середнє $\pm$ ст. відх. (внизу).

На Фігурі 162 наведений показовий результат вимірювання концентрації HNS у серці в залежності від часу ІТ-введення ^{124}I -HNS 1 і 10 мг/кг, індивідуальні значення (вгорі) і середнє $\pm$ ст. відх. (внизу).

На Фігурі 163 наведений показовий результат вимірювання концентрації HNS в залежності від часу ІТ-введення ^{124}I -HNS 1 і 10 мг/кг, індивідуальні значення (вгорі) і середнє $\pm$ ст. відх. (внизу).

На Фігурі 164 наведений показовий результат вимірювання концентрації HNS у мозку в залежності від часу ІТ-введення ^{124}I -HNS 1 і 10мг/кг (угорі) і порівняння некомпартменталізованих ФК параметрів у мозку (внизу).

На Фігурі 165 наведений показовий результат вимірювання концентрації HNS у печінці в залежності від часу ІТ-введення ^{124}I -HNS 1 і Юмг/кг (угорі) і порівняння некомпартменталізованих ФК параметрів у печінці (внизу).

На Фігурі 166 показані показові первинні фібробласти нормальної людини, використані для вивчення клітинної інтерналізації rhNaglu і Naglu-IGFII. Клітинне поглинання rhNaglu було мінімальним, у той час як клітинне поглинання Naglu-IGFII було дуже яскраво вираженим. Крива насичення інтерналізації Naglu-IGFII свідчить про рецептор-опосередковане поглинання. Таке поглинання інгібувалося з використанням IGFII, але не з використанням маноза-6-фосфату.

На Фігурі 167 наведені показові результати дослідження з використанням конфокальної мікроскопії зразків з використанням фібробластів суб'єкта з хворобою Санфіліппо В (GM01426). Спостерігали велику інтерналізацію Naglu-IGFII та колокалізацію Naglu-IGFII з LAMP-1.

Фігура 168 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад активність Naglu в дикому типі (WT), в Naglu-/- (KO) і в гетерозиготних Naglu+/- (Het) мишах. Загальну недостатність Naglu у мишей із хворобою Санфіліппо В спостерігали в мозку, печінці, нирках і селезінці.

На Фігурі 169 наведений верхній і боковий вид мозку миші, на якому відмічене місце інтрацистеральної ін'єкції (II) та зрізів для гістологічного аналізу. Середина мікрографія, поперечний зріз мозку миші переглядали при їх збільшенні. На нижній мікрографії рамкою виділене поле при 4х збільшенні мікроскопічного зображення. Нижня мікрографія, 4х збільшення гістологічного зрізу. Рамки А і В показують поле при 40х збільшенні мікроскопічного зображення на Фігурі 170 і Фігурі 171.

На Фігурі 170 наведений показовий результат імуногістохімічного фарбування кори головного мозку у мишей із хворобою Санфіліппо В на 7 день після інтрацистеральної ін'єкції (II) при збільшенні 40х. Як rhNaglu, так і Naglu-IGFII демонструють велике клітинне поглинання в нейронах, а також у гліальних клітинах; розподіл і патерн клітинного поглинання був дуже схожим для двох білків (моноклональні антитіла до людського Naglu).

На Фігурі 171 наведене типове імунофарбування на LAMP-1 кори головного мозку при збільшенні 40х. У порівнянні з мозком миші дикого типу підвищення лізосомних відкладень спостерігали в мозку мишей із хворобою Санфіліппо В, які отримували наповнювач, як показано з використанням збільшення позитивних плям при імунофарбуванні на LAMP-1. Обробка мозку як rhNaglu, так і Naglu-IGFII мишей із хворобою Санфіліппо В призводила до зменшення лізосомного накопичення, що було схожим із результатом, отриманим для мишей WT.

Фігура 172А ілюструє велике зменшення клітинної вакуолізації в тканинах білої речовини Naglu-дефіцитних мишей, які отримували інтратекальні ін'єкції Naglu, відносно даних для таких же Naglu-дефіцитних мишей, яким вводили наповнювач. Фігура 172В ілюструє помітне зменшення імунофарбування лізосомного зв'язаного з мембраною білка 1 (LAMP-1) у тканинах білої речовини Naglu-дефіцитних мишей, які отримували інтратекальні ін'єкції Naglu, в порівнянні з такими ж Naglu-недостатніми мишами, яким вводили наповнювач.

На Фігурі 173 наведені кількісні дані й порівняння концентрації LAMP, виміряного в корі головного мозку, хвостатому ядрі й шкарлупі (CP), таламусі (TH), мозочку (CBL) і білій речовині (BP) Naglu-дефіцитних мишей, яким вводили Naglu, в порівнянні з мишами дикого типу і Naglu-недостатніми мишами, яким вводили наповнювач. LAMP-позитивні області в кожному районі проаналізованої тканини мозку надалі зменшувалися після інтратекального введення трьох доз Naglu протягом семиденного курсу (Фігура 173А) в порівнянні з 2 дозами Naglu протягом двотижневого курсу (Фігура 173В).

На Фігурі 174 показана середньосагітальна анатомічна схема ЦНС людини, яка наведена для того, щоб указати місце ІТ ін'єкції у канюльованих щурів дикого типу. Стрілки показують орієнтовне анатомічне розташування ІТ ін'єкції в спинний мозок, звідки брали тканини для імуногістохімічного дослідження.

На Фігурі 175 показана типова активність Naglu в мозку після ІТ ін'єкції. Активність Naglu була значно вища в мозку щурів дикого типу, які отримували ін'єкції Naglu-TAT і Naglu-IGFII.

На Фігурі 176 наведені типове імунофарбування на Naglu кори головного мозку канюльованих щурів дикого типу, які отримували rhNaglu, Naglu-TAT, Naglu-IGFII, Naglu-kif і PerT-Naglu через 24 годин після ІТ ін'єкції, збільшення 20х. Naglu-IGFII був єдиним білком, який показує широке поширення в паренхімі мозку. Клітинне поглинання до нейронів та гліальних клітин відмічене у щурів, які отримували Naglu-IGFII. З іншого боку, у мишей, оброблених rhNaglu, Naglu-TAT, Naglu-kif і PerT-Naglu, білок зберігався в мозкових оболонках (M).

На Фігурі 177 показані зрізи, наведені на Фігурі 176, при більш високому збільшенні. Верхня панель: у канюльованих щурів дикого типу, які отримували rhNaglu, rhNaglu зберігається в мозкових оболонках, позитивне фарбування в паренхімі мозку не виявлене. Нижня панель: у канюльованих щурів дикого типу, які отримували Naglu-IGFII, спостерігали широке поширення в паренхімі мозку і спостерігали клітинне поглинання нейронами та гліальними клітинами.

На Фігурі 178 показаний приклад активності Naglu в мозку і печінці через 24 години після останньої ін'єкції. Серед трьох оброблених груп не виявлено значних відмінностей активності Naglu в мозку, як і активності Naglu в печінці. Цей результат показує, що активність Naglu, виявлена в мозку і печінці, обумовлена багато в чому останньою ін'єкцією, яку проводили за 24 години до умиротворення.

На Фігурі 179 показаний загальний вміст ГАГ у мозку і печінці після IT ін'єкції Naglu-IGFII. Було виявлено прогресуюче збільшення загального вмісту ГАГ у мозку мишей із хворобою Санфіліппо В, яким вводили наповнювач, що відображає накопичувальний ефект із збільшенням віку мишей із Санфіліппо В. Статистично значуще зниження ГАГ у мозку спостерігали в групах, які отримували по три ін'єкції ($p < 0,05$). Статистично значуще зниження ГАГ у мозку спостерігали в групах, які отримували по дві й три ін'єкції ($p < 0,05$). Феномен більш швидкої та більш різкої зміни рівня ГАГ у печінці, ніж у мозку, також спостерігали при IT доставці I2S при синдромі Хантера.

На Фігурі 180 наведений показовий результат аналізу біорозподілу Naglu в мозку мишей із Санфіліппо В після IT ін'єкції. Імунофлуоресцентне фарбування на Naglu виявило білок Naglu-IGFII в мозкових оболонках (M) і паренхімі мозку. Клітинне поглинання спостерігали в групах, які отримували по дві та три ін'єкції. G: гліальні клітини.

Фігура 181 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад коронарний зріз мозку миші. Рамками виділені області, для яких проводили імунофарбування на LAMP-1. Для аналізу ступеня поширення білка й ефективності для імунофарбування на LAMP-1 були вибрані кора головного мозку й підкіркові тканини, такі як хвостаті ядра, таламус і біла речовина.

Фігура 182 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад імунофарбування на LAMP-1 кори головного мозку при 40х збільшенні. У порівнянні з мозком миші дикого типу збільшення лізосомних відкладень спостерігали в мозку мишей із хворобою Санфіліппо В, яким вводили наповнювач, про що свідчать збільшені LAMP-1-позитивні плями. Зменшення лізосомних відкладень після IT ін'єкції Naglu-IGFII було видним на основі зменшення розміру позитивних плям у мозку мишей із хворобою Санфіліппо В, які отримували по дві ін'єкції, і зменшення розміру та кількості позитивних плям у мозку мишей із хворобою Санфіліппо В, які отримували по три ін'єкції.

Фігура 183 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад імунофарбування на LAMP-1 хвостатого ядра, підкіркових ядер (збільшення 40х). Аналогічно тому, що спостерігалось в корі головного мозку, підвищення лізосомних відкладень спостерігали в мозку мишей із хворобою Санфіліппо В, яким вводили наповнювач, як показано з використанням збільшення імунофарбування LAMP-1-позитивних плям. На скорочення лізосомних відкладень після IT ін'єкції Naglu-IGFII вказує зменшення розміру позитивних плям у мозку мишей із хворобою Санфіліппо В, які отримували по дві ін'єкції, і зменшення розміру та кількості позитивних плям у мозку мишей із хворобою Санфіліппо В, які отримували по три ін'єкції.

Фігура 184 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад імунофарбування на LAMP-1 таламуса, ядер середнього мозку (збільшення 40х). На скорочення лізосомних відкладень після IT ін'єкції Naglu-IGFII вказує зменшення розміру позитивних плям у мозку мишей із хворобою Санфіліппо В, які отримували по дві ін'єкції, і зменшення розміру та кількості позитивних плям у мозку мишей із хворобою Санфіліппо В, які отримували по три ін'єкції.

Фігура 185 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад імунофарбування на LAMP-1 білої речовини (збільшення 40х). Поздовжня доріжка з волокон аксонів відокремлює білу речовину від сірої речовини, показаної на Фігурах 181-184. Проте, той самий патерн збільшення лізосомного накопичення спостерігали в мозку мишей із хворобою Санфіліппо В, яким вводили наповнювач, у порівнянні з мишами дикого типу. Про зменшення лізосомного накопичення після IT ін'єкції Naglu-IGFII свідчить зменшення розміру та кількості позитивних плям у мозку мишей із хворобою Санфіліппо В, які отримували по дві та три ін'єкції.

Фігура 186 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад імунофарбування на LAMP-1 кори мозочка. Морфологію кори мозочка можна бачити з високої щільності зернистих нейронів, гіпоклітинного молекулярного шару і одинарного шару нейронів Пуркінє між зернистими нейронами та молекулярним шаром. Нейрони Пуркінє були ідентифіковані за великою цитоплазмою та невеликою кількістю дендритів, які проникають до молекулярного шару.

Фігура 187 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад імунофарбування на Naglu в головному мозку, спинному мозку і печінці. У головному мозку і спинному мозку ін'єктований Naglu був виявлений із використанням ІГХ тільки в мозкових оболонках (М), у інших областях Naglu-позитивне фарбування не було виявлене. У печінці синусоїдальні клітини (S) були Naglu-

позитивними, а в гепатоцитах не було відмічене поглинання Naglu.

Фігура 188 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад імунофарбування на LAMP і фарбування печінки та спинного мозку з використанням Г/Е. У порівнянні з тваринами, які отримували наповнювач, фарбування на LAMP було зменшене як у печінці, так і в спинному мозку у мишей, які отримували Naglu. Фарбування з використанням Г/Е показало, що клітинна вакуолізація в гепатоцитах була зменшена в групі лікування в порівнянні з тваринами, які отримували наповнювач.

Фігура 189 представляє ілюстрацію, яка демонструє як приклад фарбування з використанням Г/Е тканин головного мозку і покращення морфології головного мозку після 6 ІТ ін'єкцій Naglu один раз на два тижні (РДТ) протягом 3 місяців. У обробленому головному мозку клітинна вакуолізація (показана стрілками) в усіх досліджених областях зменшена в порівнянні з групою тварин, які отримували наповнювач.

Фігура 190А і Фігура 190В являють собою показові ілюстрації, які показують імунофарбування на LAMP у різних областях мозку після 6 ІТ-ін'єкцій Naglu протягом 3 місяців. У порівнянні групою з тварин, що отримували наповнювач, ІТ ін'єкції Naglu у мишей із хворобою Санфіліппо В призводили до зниження лізосомної активності в усіх досліджених областях, виявлених імунофарбуванням на LAMP. Таке зниження характеризувалося зменшенням числа LAMP-позитивних клітин, меншим розміром клітин і менш інтенсивним фарбуванням. Помітне зниження було виявлене в областях мозочка і стовбура мозку, розташованих у області хвостатого ядра мозку, близької до спинного мозку в порівнянні з іншими областями мозку. Явне зниження було також виявлене в глибоких областях мозку, в тому числі в білій речовині, гіпокампі й таламусі.

Фігура 191А і Фігура 191В являють собою показові ілюстрації, що показують ІГХ фарбування на Іba різних областей мозку після 6 ІТ ін'єкцій Naglu протягом 3 місяців, що призводить до активації клітин мікроглії. У порівнянні з групою тварин, що отримували наповнювач, у групі тварин, що отримувала Naglu, не спостерігали зменшення кількості позитивних клітин та інтенсивності фарбування. Однак клітинна морфологія позитивних клітин змінювалася зі зменшенням клітинного розміру в усіх досліджених областях мозку в порівнянні з великими й вакуолізованими клітинами в групі тварин, що отримувала наповнювач (вставки).

Фігура 192А і Фігура 192В являють собою показові ілюстрації, що показують ІГХ на GFAP у різних областях мозку після 6 ІТ-ін'єкцій Naglu протягом 3 місяців, що призводить до активації астроцитів. У порівнянні з групою тварин, що отримували наповнювач, GFAP-позитивне фарбування було зменшене в мозочку та стовбурі мозку і дещо зменшене в інших досліджених областях.

ВИЗНАЧЕННЯ

Для полегшення розуміння даного винаходу нижче надані визначення деяких термінів. Додаткові визначення наступних термінів та інші терміни наведені в тексті опису.

Приблизно або близько: У даній заявці термін "приблизно" або "близько" стосовно одного або більше розглянутих значень належить до значення, яке є близьким до зазначеного еталонного значення. У деяких варіантах реалізації термін "приблизно" або "близько" належить до діапазону значень, які входять до діапазону 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % або менше в будь-якому напрямку (більше або менше) від установленого еталонного значення, якщо не зазначено інше або інше не є очевидним із контексту (окрім випадків, коли таке значення перевищує 100 % від можливого значення).

Покращення: У даній заявці "покращення" означає попередження, скорочення або тимчасове полегшення стану, або покращення стану суб'єкта. Покращення включає, але не обов'язково, повне видужання або повне попередження хворобливого стану. У деяких варіантах реалізації, покращення включає підвищення рівнів відповідного білка або його активності, які є недостатніми у відповідних хворих тканинах.

Біологічна активність: У даній заявці вираз "біологічна активність" належить до характеристики будь-якого агента, який має активність у біологічній системі й, зокрема, в організмі. Наприклад, агент, який при введенні до організму демонструє біологічний вплив на організм, вважається біологічно активним. У конкретних варіантах реалізації, у випадках, коли білок або поліпептид є біологічно активним, ту частину білка або поліпептиду, яка має щонайменше один вид біологічної активності білка або поліпептиду, як правило, називають "біологічно активною" частиною.

Наповнювач: У даній заявці термін "наповнювач" належить до сполуки, яка додає маси ліофілізованій суміші та вносить вклад у фізичну структуру ліофілізованої таблетки (наприклад, полегшує виробництво по суті однорідної ліофілізованої таблетки, яка підтримує структуру з відкритими порами). Приклади таких наповнювачів включають манітол, гліцин, хлорид натрію, гідроксietилкрохмаль, лактозу, сахарозу, трегалозу, поліетиленгліколь і декстран.

Катіон-незалежний маноза-6-фосфатний рецептор (CI-MRP): У даній заявці термін "катіон-незалежний маноза-6-фосфатний рецептор (CI-MRP)" належить до клітинних рецепторів, які зв'язують фрагменти маноза-6-фосфату на попередниках кислих гідролаз у апараті Гольджи, призначених для транспорту до лізосом. На додаток до маноза-6-фосфатів, CI-MRP також зв'язує інші білки, у тому числі IGF-II. CI-MRP також відомий як рецептор "M6P/IGF-II", рецептор "CI-MRP/IGF-IG", "рецептор IGF-II" або "рецептор IGF2". Ці терміни і їхні скорочення використовуються в даній заявці взаємозамінно.

Супутня імунопригнічуюча терапія: У даній заявці термін "супутня імунопригнічуюча терапія" включає будь-які способи імунопригнічуючої терапії, які використовуються як попереднє лікування, прекодиціювання або паралельно зі способом лікування.

Розчинник: У даній заявці термін "розчинник" належить до фармацевтично прийнятної (наприклад, безпечної та нетоксичної для ін'єкції людині) розчиняючої речовини, застосовної для приготування відновлюваного складу. Приклади розчинників включають стерильну воду, бактеріостатичну воду для ін'єкцій (БВІ), буферний розчин (наприклад, фосфатно-сольовий буфер), стерильний фізіологічний розчин, розчин Рінгера або розчин декстрози.

Лікарська форма: У даній заявці термін "лікарська форма" і "дозована лікарська форма" належить до фізично дискретної одиниці терапевтичного білка для лікування пацієнта. Кожна одиниця містить деяку кількість активної речовини, розраховану для отримання бажаного терапевтичного ефекту. Слід розуміти, однак, що загальна доза в композиції буде визначена лікарем у рамках обґрунтованого медичного висновку.

Замісна ферментна терапія (ЗФТ): У даній заявці термін "замісна ферментна терапія (ЗФТ)" належить до будь-якої терапевтичної стратегії, яка коректує дефіцит ферменту з використанням доставки відсутнього ферменту. У деяких варіантах реалізації, відсутній фермент доставляють шляхом інтратекального введення. У деяких варіантах реалізації, відсутній фермент доставляють шляхом інфузії до кров'яного потоку. Після введення фермент поглинається клітинами і транспортується до лізосом, де фермент діє, видаляючи речовини, які накопичуються в лізосомах у результаті ферментної недостатності. Як правило, замісна ферментна терапія лізосомальними ферментами є ефективною, терапевтичні ферменти доставляються до лізосом у клітинах відповідних тканин-мішеней, де проявляється дефект накопичення.

Покращення, збільшення або зменшення: У даній заявці терміни "покращення", "збільшення" або "зменшення" чи граматичні еквіваленти вказують на значення, які співвідносяться зі значеннями базових вимірювань, наприклад, у того ж самого індивіда, до початку обробки/лікування, описаного в даній заявці, або значеннями, виміряними у контрольних індивідів (або декількох контрольних індивідів) при відсутності обробки/лікування, описаного в даній заявці. "Контрольні індивіди" являють собою індивідів, які страждають на ті ж самі форми лізосомної хвороби накопичення, що й індивіди, які проходять лікування, і вони приблизно того ж віку, що й індивіди, які проходять лікування (для того, щоб стадії захворювання індивіда, який проходить лікування, і контрольного індивіда (індивідів) були порівнянними).

Індивід, суб'єкт, пацієнт: У даній заявці терміни "індивід", "суб'єкт" або "пацієнт" належать до людини або тварини, відмінної від людини. Індивід (який також згадується як "пацієнт" або "суб'єкт"), що проходить лікування, являє собою індивіда (плід, немовля, дитину, підлітка або дорослу людину), що страждає на розглянуте захворювання.

Інтратекальне введення: У даній заявці термін "інтратекальне введення" або "інтратекальна ін'єкція" належить до ін'єкції в спинномозковий канал (інтратекальний простір, який оточує спинний мозок). Можуть бути використані різні методики, включаючи, але не обмежуючись перерахованими: латеральну церебровентрикулярну ін'єкцію через трепанаційний отвір або цистернову чи поперекову пунктуру або т.п. У деяких варіантах реалізації, "інтратекальне введення" або "інтратекальна доставка" відповідно до даного винаходу належить до ІТ-введення або доставки через поперекову область або відділ, наприклад, поперекове ІТ-введення або доставка. У даній заявці термін "поперековий відділ" або "поперекова область" належить до області між третім і четвертим поперековими (нижня частина спини) хребцями й, більш строго, відділу хребта L2-S1.

Лінкер: У даній заявці термін "лінкер" належить до амінокислотної послідовності в гібридному білку, крім тієї, яка зустрічається в конкретному положенні в природних білках і. як правило, лінкер сконструйований таким чином, що він є гнучким або являє собою проміжну структуру, таку як α -спіраль, між двома частинами білка. Лінкер також належить до спейсера.

Ліопротектор: У даній заявці термін "ліопротектор" належить до молекули, яка попереджає або зменшує хімічну і/або фізичну нестабільність білка або іншої речовини при ліофілізації та наступному зберіганні. Приклади ліопротекторів включають цукри, такі як сахароза або трегалоза; амінокислоти, такі як глутамат натрію або гістидин; метиламіни, такі як бетаїн; ліотропні солі, такі як сульфат магнію; багатоатомні спирти, такі як трьохатомні або вищі спирти, наприклад, гліцерин, еритрит, гліцерол, арабітол, ксиліт, сорбіт і манітол, пропіленгліколь, поліетиленгліколь; пльороніки; і їх комбінації. У деяких варіантах реалізації, ліопротектор являє собою невідновлений цукор, такий як трегалоза або сахароза.

Лізосомальний фермент: У даній заявці термін "лізосомальний фермент" належить до будь-якого ферменту, який є здатним зменшити накопичені в лізосомах тварин сполуки або який може попередити чи покращити один або більше симптомів лізосомної хвороби накопичення. Лізосомальні ферменти, придатні для даного винаходу, включають як фермент дикого типу, так і модифікований лізосомальний фермент, і вони можуть бути отримані з використанням рекомбінантних і синтетичних методик або можуть бути виділені з природних джерел. Приклади лізосомальних ферментів перераховані в Таблиці 1.

Лізосомна ферментна недостатність: У даній заявці термін "лізосомна ферментна недостатність" належить до групи генетичних захворювань, які є результатом недостатності щонайменше одного ферменту, який є необхідним для руйнування макромолекул (наприклад, ферментних субстратів) до пептидів, амінокислот, моноцукрів, нуклеїнових кислот і жирних кислот у лізосомах. У результаті у індивідів, що страждають на лізосомну ферментну недостатність, накопичуються сполуки в різних тканинах (наприклад, ЦНС, печінці, селезінці, кишечнику, стінках кровоносних судин та в інших органах).

Лізосомна хвороба накопичення: У даній заявці термін "лізосомна хвороба накопичення" належить до будь-якої хвороби в результаті недостатності одного або декількох лізосомальних ферментів, необхідних для метаболізму природних макромолекул. Ці захворювання, як правило, призводять до накопичення незруйнованих молекул у лізосомах, що призводить до збільшення числа запасних гранул (також називаних запасними пухирцями). Ці захворювання й різні приклади описані більш докладно нижче.

Поліпептид: У даній заявці "поліпептид", у цілому, являє собою ланцюжок із щонайменше 2 амінокислот, з'єднаних одна з одною за допомогою пептидного зв'язку. У деяких варіантах реалізації, поліпептид може включати щонайменше 3-5 амінокислот, кожна з яких з'єднана з іншими з використанням щонайменше одного пептидного зв'язку. Фахівцям у даній області відомо, що поліпептиди можуть включати "неприродні" амінокислоти або інші молекули, які, проте, здатні до інтеграції в поліпептидний ланцюг.

Заміщуючий фермент: У даній заявці термін "заміщуючий фермент" належить до будь-якого ферменту, який може діяти як заміщуючий, щонайменше частково, при недостатності або відсутності ферменту при лікуванні хвороби. У деяких варіантах реалізації, термін "заміщуючий фермент" належить до будь-якого ферменту, дія якого може замінювати, щонайменше частково, недостатність або відсутність лізосомальних ферментів при лізосомних хворобах накопичення, що підлягають лікуванню. У деяких варіантах реалізації, заміщуючий фермент дозволяє знизити накопичення речовин у лізосомах ссавців або може попередити чи покращити один або декілька симптомів лізосомної хвороби накопичення. Заміщуючі ферменти, придатні для даного винаходу, включають обидва з ферменту дикого типу і модифікованого лізосомального ферменту та можуть бути отримані з використанням рекомбінантних і синтетичних способів або виділені з природних джерел. Заміщуючий фермент може бути рекомбінантним, синтетичним, ген-активованим або природним ферментом.

Розчинний: У даній заявці термін "розчинний" належить до здатності терапевтичного агента утворювати гомогенний розчин. У деяких варіантах реалізації, розчинність терапевтичного агента в розчині, до якого він введений і з використанням якого він транспортується до ділянки-мішені (наприклад, до клітин і тканин головного мозку), є достатньою для доставки терапевтично ефективної кількості терапевтичного агента до сайту-мішені. Декілька факторів можуть впливати на розчинність терапевтичних агентів. Наприклад, фактори, які можуть впливати на розчинність білка, включають іонну силу, амінокислотну послідовність і наявність інших супутніх косоліобілізуючих агентів або солей (наприклад, солей кальцію). У деяких варіантах реалізації, фармацевтичні композиції складені так, що солі кальцію виключаються з таких композицій. У деяких варіантах реалізації, терапевтичні агенти відповідно до даного

винаходу є розчинними у відповідній фармацевтичній композиції. Слід мати на увазі, що хоча ізотонічні розчини, як правило, є переважними для парентерального введення складів, застосування ізотонічних розчинів може обмежувати адекватну розчинність для деяких терапевтичних агентів і, зокрема, деяких білків і/або ферментів. Було продемонстровано, що злегка гіпертонічні розчини (наприклад, до 175 мМ хлориду натрію в 5 мМ фосфату натрію при рН 7,0) і цукровмісні розчини (наприклад, до 2 % сахарози в 5 мМ фосфату натрію при рН 7,0) добре переносяться мавпами. Наприклад, найпоширенішою прийнятою композицією болюсного складу для ЦНС є фізіологічний розчин (150мМNaClуводі).

Стабільність: У даній заявці термін "стабільність" належить до здатності терапевтичного агента (наприклад, рекомбінантного ферменту) підтримувати його терапевтичну ефективність (наприклад, усю або переважно всю його передбачувану біологічну активність і/або фізико-хімічну цілісність) при тривалому періоді часу. Стабільність терапевтичного агента і здатність фармацевтичної композиції підтримувати стабільність такого терапевтичного агента можуть бути оцінені протягом тривалого періоду часу (наприклад, щонайменше протягом 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36 місяців і більше). Загалом, фармацевтичні композиції згідно з даним винаходом були створені таким чином, щоб вони були здатні стабілізувати або ж сповільнювати чи запобігати деградації одного або більше терапевтичних агентів, поєднаних із ними (наприклад, рекомбінантних білків). У контексті даного винаходу стабільним складом є той, у якому терапевтичний агент по суті зберігає свої фізичну і/або хімічну цілісність і біологічну активність при зберіганні й під час обробки (наприклад, заморожування/відтавання, механічного перемішування й ліофілізації). Стабільність білка може бути оцінена за утворенням високомолекулярних агрегатів, втратою ферментативної активності, формуванням пептидних фрагментів і зміщенням профілів заряду.

Суб'єкт: У даній заявці термін "суб'єкт" означає будь-якого ссавця, включаючи людину. У деяких варіантах реалізації даного винаходу суб'єкт являє собою дорослого, підлітка і немовля. Крім того, даний винахід передбачає введення фармацевтичної композиції і/або здійснення способів лікування внутрішньоутробно.

Суттєва гомологія: У даній заявці словосполучення "суттєва гомологія" належить до порівняння між послідовностями амінокислот або нуклеїнових кислот. Як буде зрозуміло фахівцям у даній області, дві послідовності зазвичай вважаються "по суті гомологічними", якщо вони містять гомологічні залишки у відповідних положеннях. Гомологічні залишки можуть бути однаковими залишками. Крім того, гомологічні залишки можуть бути неідентичними залишками, які мають адекватно близькі структурні і/або функціональні характеристики. Наприклад, як добре відомо фахівцям у даній області, деякі амінокислоти зазвичай класифікують як "гідрофобні" або "гідрофільні" амінокислоти і/або такі, що мають "полярні" або "неполярні" бічні ланцюги. Заміна однієї амінокислоти на іншу того ж типу часто може вважатися "гомологічною" заміною.

Як добре відомо в даній області, амінокислотні послідовності або послідовності нуклеїнових кислот можуть бути порівняні з використанням будь-якого з множини алгоритмів, у тому числі тих, які доступні серед комерційних комп'ютерних програм, таких як BLASTN для нуклеотидних послідовностей і BLASTP, gapped BLAST і PSI-BLAST для амінокислотних послідовностей. Приклади таких програм описані в Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; and Misener, et al., (eds.) Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. На додаток до ідентифікації гомологічних послідовностей, програми, згадані вище, як правило, забезпечують індикацію ступеня гомології. У деяких варіантах реалізації, дві послідовності вважаються дійсно гомологічними, якщо щонайменше 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % або більше їхніх відповідних залишків є гомологічними до відповідної ділянки залишків. У деяких варіантах реалізації, відповідна ділянка залишків є повною послідовністю. У деяких варіантах реалізації, відповідна ділянка складає щонайменше 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 або більше залишків.

Суттєва ідентичність: У даній заявці словосполучення "суттєва ідентичність" належить до порівняння послідовностей амінокислот або нуклеїнових кислот. Як буде зрозуміло фахівцям у даній області, дві послідовності, як правило, вважаються "по суті ідентичними", якщо вони містять однакові залишки у відповідних позиціях. Як добре відомо в даній області, амінокислотні послідовності або послідовності нуклеїнових кислот можуть бути порівняні з використанням

будь-якого з множини алгоритмів, у тому числі тих, які доступні серед комерційних комп'ютерних програм, таких як BLASTN для нуклеотидних послідовностей і BLASTP, gapped BLAST і PSI-BLAST для амінокислотних послідовностей. Приклади таких програм описані в Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; and Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. На додаток до визначення однакових послідовностей, програми, згадані вище, як правило, забезпечують індикацію ступеня ідентичності. У деяких варіантах реалізації, дві послідовності вважаються дійсно ідентичними, якщо не менше 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % або більше їхніх відповідних залишків ідентичні до відповідної ділянки залишків. У деяких варіантах реалізації, відповідна ділянка є повною послідовністю. У деяких варіантах реалізації, відповідна ділянка складає щонайменше 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 або більше залишків.

Синтетична CMP: У даній заявці термін "синтетична CMP" належить до розчину, який має pH, електролітний склад, вміст глюкози і осмос, що відповідають таким характеристикам у спинномозковій рідині. Синтетичну CMP також називають штучною CMP. У деяких варіантах реалізації, синтетична CMP являє собою розчин Елліотта В.

Придатний для доставки до ЦНС: У даній заявці фраза "придатний для доставки до ЦНС" або "придатний для інтратекальної доставки" стосовно фармацевтичної композиції згідно з даним винаходом, як правило, належить до стабільності, переносимості та властивостей розчинності таких композицій, а також до здатності таких композицій доставляти ефективну кількість терапевтичного агента, що міститься в ньому, до цільових місць доставки (наприклад, до CMP або мозку).

Тканини-мішені: У даній заявці термін «тканини-мішені» належить до будь-якої тканини, на яку впливає лізосомна хвороба накопичення, яка розглядається для лікування, або будь-якої тканини, в якій недостатньо лізосомальних ферментів, виражених у нормі. У деяких варіантах реалізації, тканини-мішені включають ті тканини, в яких існує помітна або аномально висока кількість ферменту, субстрату, наприклад, накопичених у клітинних лізосомах тканини, у пацієнтів, що страждають на або мають сприйнятливості до лізосомної хвороби накопичення. У деяких варіантах реалізації, тканини-мішені включають ті тканини, які відображають патології, супутні хвороби, симптоми або функції. У деяких варіантах реалізації, тканини-мішені включають тканини, в яких недостатньо лізосомальних ферментів, як правило, в нормі експресованих на високому рівні. У даній заявці «тканини-мішені» можуть являти собою тканини-мішені головного мозку, тканини-мішені спинного мозку і/або периферичні тканини-мішені. Приклади тканин-мішеней докладно описані нижче.

Терапевтична група/фрагмент: У даній заявці термін "терапевтична група/фрагмент" належить до групи/фрагменту молекули, яка обумовлює терапевтичний ефект молекули, У деяких варіантах реалізації, терапевтична група/фрагмент являє собою поліпептид, що має терапевтичну активність.

Терапевтично ефективна кількість: У даній заявці термін "терапевтично ефективна кількість" належить до кількості терапевтичного білка (наприклад, заміщуючого ферменту), який дає терапевтичний ефект у суб'єкта, що пройшов лікування, відповідно до розумного співвідношення користь/ризик, застосовного для будь-якого медичного лікування. Терапевтичний ефект може бути об'єктивним (тобто вимірюваним із використанням деяких випробувань чи маркерів) або суб'єктивним (тобто суб'єкт проявляє ознаки або відчуває ефект). Зокрема, "терапевтично ефективна кількість" належить до кількості терапевтичного білка або композиції, яка забезпечує лікування, покращення або попередження бажаного захворювання чи стану або демонструє помітний терапевтичний чи профілактичний ефект, такий як покращення симптомів, пов'язаних із хворобою, попередження або затримка прояву захворювання і/або зменшення тяжкості або частоти симптомів захворювання. Терапевтично ефективну кількість зазвичай вводять у режимі введення, який може включати багаторазове введення доз. Для будь-якого конкретного терапевтичного білка, терапевтично ефективна кількість (і/або відповідна доза з ефективним режимом введення) може варіювати, наприклад, у залежності від способу введення, в комбінації з іншими фармацевтичними засобами. Крім того, конкретна терапевтично ефективна кількість (і/або доза) для кожного конкретного пацієнта може залежати від різних факторів, включаючи захворювання, яке лікують, тяжкість захворювання; активність застосовуваного конкретного фармацевтичного агента, конкретного застосовуваного складу; вік, масу тіла, загальний стан здоров'я, стать і дієту пацієнта, час введення, шлях

введення і/або швидкість виведення або метаболізму застосовуваного конкретного гібридного білка, тривалість лікування і подібні фактори, які добре відомі в медицині.

Допустимий/переносимий: У даній заявці терміни "допустимий/переносимий" і "переносимість" належать до здатності фармацевтичних композицій згідно з даним винаходом не викликати побічних реакцій у суб'єкта, якому вводять таку композицію, або, як варіант, не викликати серйозної побічної реакції у суб'єкта, якому вводять таку композицію. У деяких варіантах реалізації, фармацевтична композиція згідно з даним винаходом добре переноситься суб'єктом, якому вводять таку композицію.

Лікування: У даній заявці термін "лікування" (а також "лікувати/обробляти") належить до будь-якого введення терапевтичного білка (наприклад, лізосомального ферменту), яке повністю або частково пом'якшує, покращує стан, знімає, гальмує, затримує настання, зменшує тяжкість і/або зменшує частоту одного чи декількох симптомів або особливостей конкретного захворювання, розладу і/або умови (наприклад, синдрому Хантера, синдрому Санфіліппо типу В). Таке лікування/обробка може проводитися для суб'єкта, який не проявляє ознак відповідного захворювання, розладу і/або стану, який демонструє тільки перші ознаки захворювання, розладу і/або патологічного стану. Як альтернатива або доповнення таке лікування може проводитися для суб'єкта, який має одну або більше виражених ознак відповідного захворювання, розладу і/або патологічного стану.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС

Даний винахід передбачає, серед іншого, покращені способи для ефективної прямої доставки терапевтичних агентів до центральної нервової системи (ЦНС). Як уже обговорювалося вище, даний винахід оснований на несподівано виявленому факті, що заміщуючий фермент для лізосомної хвороби накопичення може бути безпосередньо введений до спинномозкової рідини (ліквору) суб'єкта, що потребує лікування, у високих концентраціях, не викликаючи суттєвих несприятливих ефектів у суб'єкта. Найбільш дивно, автори даного винаходу виявили, що заміщуючий фермент може бути доставлений у простому фізіологічному розчині або буферній композиції без застосування синтетичної СМР. Ще більш несподіваним є те, що інтратекальна доставка відповідно до даного винаходу не призводить до суттєвих побічних ефектів, таких як тяжка імунна відповідь, у суб'єкта. Таким чином, у деяких варіантах реалізації інтратекальну доставку відповідно до даного винаходу можна застосовувати при відсутності супутньої імунопригнічуючої терапії (наприклад, без індукції імунної толерантності з використанням попередньої обробки або попередньої підготовки).

У деяких варіантах реалізації, інтратекальна доставка відповідно до даного винаходу забезпечує ефективну дифузію до різних тканин головного мозку, що призводить до ефективного заміщення ферменту в різних тканинах-мішенях на поверхні головного мозку, до неглибоких і/або глибоких областей головного мозку. У деяких варіантах реалізації інтратекальна доставка відповідно до даного винаходу забезпечує достатню кількість заміщуючого ферменту, який циркулює в периферичній системі кровообігу. У результаті в деяких випадках інтратекальна доставка відповідно до даного винаходу призводить до доставки заміщуючого ферменту до периферичних тканин, таких як печінка, серце й нирки. Цей результат є несподіваним і може бути особливо корисним для лікування лізосомних хвороб накопичення, що зачіпають як ЦНС, так і периферичні компоненти, які, як правило, потребують як регулярного інтратекального введення, так і внутрішньовенного введення. Припускається, що інтратекальна доставка відповідно до даного винаходу може дозволити зменшити дози і/або частоту внутрішньовенної ін'єкції без шкоди для терапевтичного ефекту при лікуванні периферичних симптомів.

Даний винахід забезпечує різні несподівані й корисні ознаки, які забезпечують ефективну та зручну доставку заміщуючого ферменту до різних тканин мозку, що призводить до ефективного лікування лізосомних хвороб накопичення, прояв яких пов'язаний із ЦНС.

Різні аспекти даного винаходу докладно описані в наступних розділах. Використання розділів не призначене для обмеження даного винаходу. Кожний розділ можна застосовувати до будь-якого аспекту даного винаходу. У даній заявці використання "або" означає "і/або", якщо не зазначено інше.

Лізосомні хвороби накопичення і заміщуючі ферменти

Способи згідно з даним винаходом можна застосовувати для лікування будь-яких лізосомних хвороб накопичення, зокрема лізосомних хвороб накопичення, що мають етіологію і/або симптоми ЦНС, включаючи, але не обмежуючись перерахованими: ас партил глюкозам і ну рію, хворобу накопичення холестеринових ефірів, хворобу Вольмана, цистиноз, хворобу Данона, хворобу Фабрі, ліпогрунуломатоз Фарбера, хворобу Фарбера, фукозидоз, галактазидоз I/II типів, хворобу Гоше I/II/III типу, лейкодистрофію глободних клітин, хворобу Краббе, хворобу

накопичення глікогену II, хворобу Помпі, GM1-гангліозидоз I/II/III типу, GM2-гангліозидоз I типу, хворобу Тея-Сакса, GM2-гангліозидоз II типу, хворобу Сандхофа, GM2-гангліозидоз, α -манозидоз I/II типу, β -манозидоз, метахроматичну лейкодистрофію, муколіпідоз типу I, сіалідоз типу I/II, муколіпідоз II/III типу, хворобу клітинних включень, муколіпідоз типу IIIC, муколіпідоз III типу, мукополісахаридоз I типу, мукополісахаридоз II типу, синдром Хантера, мукополісахаридоз IIIA типу, синдром Санфіліппо (тип A, B, C або D), мукополісахаридоз IIIB типу, мукополісахаридоз IIIC типу, мукополісахаридоз IIID типу, мукополісахаридоз IVA типу, синдром Моркіо, мукополісахаридоз IVB типу, мукополісахаридоз VI типу, мукополісахаридоз VII типу, синдром Слая, мукополісахаридоз IX типу, множинний дефіцит сульфатази, нейронний цероїдний ліпофусциноз, хворобу Баттена CLN1, хворобу Баттена CLN2, хворобу Німана-Піка типу A/B, хворобу Німана-Піка типу C1, хворобу Німана-Піка типу C2, пікнодизостоз, хворобу Шиндлера I/II типу, хворобу Гоше і хворобу накопичення сіалових кислот.

У деяких варіантах реалізації, лізосомні хвороби накопичення, які можна лікувати способами згідно з даним винаходом, включають синдром Хантера, метахроматичну лейкодистрофію (МЛД), синдром Санфіліппо типу A, синдром Санфіліппо типу B і лейкодистрофію глободних клітин (ЛГК).

Докладний огляд генетичної етіології, клінічних проявів і молекулярно-біологічних механізмів лізосомних хвороб накопичення докладно викладений у роботі Scriver et al., eds., The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 7.sup.th Ed., Vol. II, McGraw Hill, (1995). Таким чином, ферментна недостатність при вищезгаданих захворюваннях відома фахівцям у даній області, деякі з таких захворювань наведені як приклади в таблиці нижче:

Таблиця 1

Назва хвороби	Недостатність ферменту	Речовини, що накопичуються
Хвороба Помпа	Кисла α 1,4-глюкорозидаза	Глікоген α 1,4-зв'язані олігосахариди
GM1 гангліозидоз	β -галактозидаза	GM ₁ гангліозид
Хвороба Тея-Сакса	β -гексозамінідаза A	GM ₂ гангліозид
GM2 гангліозидоз: AB варіант	GM ₂ активаторний білок	GM ₂ гангліозид
Хвороба Сандхофа	β -гексозамінідаза A і B	GM ₂ гангліозид
Хвороба Фабрі	α -галактозидаза A	глобозиди
Хвороба Гоше	глюкоцереброзидаза	глюкосилцерамід
Метахроматична лейкодистрофія	Арилсульфатаза A	Сульфатиди
Хвороба Краббе	Галактозилцерамідаза	Галактоцереброзид
Хвороба Німана-Піка, типи A і B	Кисла сфінгомеліназа	Сфінгомелін
Хвороба Німана-Піка, тип C	Пошкодження естерифікації холестерину	Сфінгомелін
Хвороба Німана-Піка, тип D	Невідомо	Сфінгомелін
Хвороба Фарбера	Кисла керамідаза	Церамід
Хвороба Вольмана	Кисла ліпаза	Холестеринові ефіри
Синдром Хурлера (MPS 1H)	α -1-ідуронідаза	Гепаран і дерматан, сульфати
Синдром Шая (MPS IS)	α -1-ідуронідаза	Гепаран і дерматан, сульфати
Хурлер-Шай (MPS IH/S)	α -1-ідуронідаза	Гепаран і дерматан, сульфати
Синдром Хантера (MPS II)	Ідуронат сульфатаза	Гепаран і дерматан, сульфати
Синдром Санфіліппо типу A(MPS IIIA)	Гепаран N-сульфатаза	Гепаран сульфатаза
Синдром Санфіліппо типу B (MPS IIIB)	α -N-ацетилглюкозамінідаза	Гепаран сульфатаза
Синдром Санфіліппо типу C (MPS IIC)	Ацетил-CoA-глюкозамінід ацетилтрансфераза	Гепаран сульфатаза
Синдром Санфіліппо типу D(MPS IIID)	Ацетилглюкозамін-6-сульфатаза	Гепаран сульфатаза

Таблиця 1

Назва хвороби	Недостатність ферменту	Речовини, що накопичуються
Моркіо В (MPS IVB)	β -галактозидаза	Кератан сульфат
Марото-Ламі (MPS VI)	Арилсульфатаза В	Дерматан сульфат
Синдром Слая (MPS VII)	β -глюкоронідаза	
α -манозидоз	α -манозидаза	Маноза/олігосахариди
β -манозидоз	β -манозидаза	Маноза/олігосахариди
Фукозидоз	α -L-фукозидаза	Фукозил олігосахариди
Аспартилглюкозамінурия	N-аспартил- β -глюкозоамінідаза	Аспартилглюкозамін аспаоагіни
Сіалідоз (Муколіпідоз I)	α -нейромінідаза	Сіалілолігосахариди
Галактосіалідоз (синдром Голдберга)	Недостатність лізосомного захисного білка	Сіалілолігосахариди
Хвороба Шиндлера	α -N-ацетил-галактозамінідаза	
Муколіпідоз II (I-клітинна хвороба)	N-ацетилглюкозоамін-1-фосфотрансфераза	Гепаран сульфат
Муколіпідоз III (псевдо-Хантер полідистрофія)	Теж, що й при ML II	
Цистиноз	Цистин транспортний білок	Вільний цистин
Хвороба Салла	Сіаловий кислий транспортний білок	Вільна сіалова кислота і глюкуронова кислота
Інфантильна хвороба накопичення сіалових кислот	Сіаловий кислий транспортний білок	Вільна сіалова кислота і глюкуронова кислота
Інфантильний нейро-цереїдний ліпофусциноз	Пальмітоїл-білкова тіоестераза	Ліпофусцини
Муколіпідоз IV	Невідомо	Гангліозиди & гіалуранові кислоти
Просапозин	Сапозини A, B, C і D	

Заміщуючі ферменти

Способи згідно з даним винаходом можна застосовувати для доставки будь-яких заміщуючих ферментів. У даній заявці заміщуючі ферменти, придатні для даного винаходу, можуть включати будь-який фермент, який може діяти як такий, що заміщує, щонайменше частково, активність недостатнього або відсутнього лізосомального ферменту при лізосомній хворобі накопичення, яка підлягає лікуванню. У деяких варіантах реалізації, заміщуючий фермент здатний знизити накопичені речовини в лізосомах, або він може полегшити чи покращити один або декілька симптомів лізосомної хвороби накопичення.

У деяких варіантах реалізації, придатні заміщуючі ферменти можуть являти собою будь-які лізосомальні ферменти, про які відомо, що вони пов'язані з лізосомною хворобою накопичення, яку лікують. У деяких варіантах реалізації, придатні заміщуючі ферменти вибрані з ферментів, перерахованих у таблиці 1. У деяких варіантах реалізації, заміщуючий фермент, придатний для даного винаходу, являє собою ідуронат-2-сульфатазу (I2S), арилсульфатазу (ASA), гепаран-N-сульфатазу (HNS), альфа-N-ацетилглюкозамінідазу (Naglu) або β -галактозидазу (GLC).

У деяких варіантах реалізації, заміщуючий фермент, придатний для даного винаходу, може мати послідовність дикого типу або природну послідовність. У деяких варіантах реалізації, заміщуючий фермент, придатний для даного винаходу, може мати змінену послідовність, по суті ідентичну або гомологічну послідовності дикого типу або природній послідовності (наприклад, таку, що має щонайменше 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 % ідентичності послідовності з послідовністю дикого типу або природною послідовністю).

Заміщуючий фермент, придатний для даного винаходу, може бути отриманий будь-яким доступним способом. Наприклад, заміщуючі ферменти можуть бути отримані рекомбінантним шляхом з використанням системи клітини-хазяїна, в якій експресуються нуклеїнові кислоти, які кодують заміщуючий фермент. Як альтернатива або доповнення, заміщуючі ферменти можуть бути отримані шляхом активації ендегенних генів. Як альтернатива або доповнення, заміщуючі ферменти можуть бути частково або повністю отримані шляхом хімічного синтезу. Як альтернатива або доповнення, заміщуючі ферменти також можуть бути виділені з природних джерел.

При отриманні ферментів рекомбінантним шляхом можна застосовувати будь-яку систему експресії. Наприклад, відомі системи експресії включають, наприклад, яйцеклітини, бакуловіруси, рослини, дріжджі або клітини ссавців.

У деяких варіантах реалізації, ферменти, придатні для даного винаходу, отримують у клітинах ссавців. Необмежуючі приклади клітин ссавців, які можна застосовувати відповідно до даного винаходу, включають лінію мишачої мієломи BALB/c (NSO/I, ECACC No: 85110503); ретинобласти людини (PER.C6, Crucell, Лейден, Нідерланди); лінію CV1 нирок мавпи, трансформовану SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); лінію клітин нирки ембріона людини (293 або 293 клітини, субклоновані для росту в суспензійній культурі, Graham et al., J. Gen Virol, 36:59,1977.); клітинну лінію фібросаркоми людини (наприклад, HT1080); клітини нирок дитинчат хом'яка (BHK, ATCC CCL 10); клітини яєчника китайського хом'ячка +/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216, 1980); клітини Сертолі миші (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251, 1980); клітини нирки мавпи (CV1 ATCC CCL 70); клітини нирки африканської зеленої мавпи (VERO-76, ATCC CRL-1 587); клітини цервікальної карциноми людини (Hela, ATCC CCL 2); клітини нирки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клітини печінки щурів buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клітини легені людини (W138, ATCC CCL 75); клітини печінки людини (Hep G2, HB 8065); клітини пухлини молочної залози миші (MMT 060562, ATCC CCL51); клітини TRI (Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci., 383:44-68, 1982); MRC 5 клітини; клітини FS4 і лінія гепатоми людини (Hep G2).

У деяких варіантах реалізації, запропоновані способи відповідно до даного винаходу застосовують для доставки заміщуючи ферментів, які виробляються клітинами людини. У деяких варіантах реалізації, способи, які пропонуються, відповідно до даного винаходу застосовують для доставки заміщуючих ферментів, які виробляються клітинами CHO.

У деяких варіантах реалізації, заміщуючі ферменти, які доставляються з використанням способу згідно з даним винаходом, містять молекулу, яка зв'язується з рецепторами на поверхні клітин головного мозку, що сприяє поглинанню клітинами і/або націлюванню на лізосоми. Наприклад, такий рецептор може являти собою катіон-незалежний маноза-6-фосфат рецептор (CI-MPR), який зв'язується з залишком маноза-6-фосфату (M6P). Крім того, CI-MPR також зв'язується з іншими білками, у тому числі IGF-II. У деяких варіантах реалізації, заміщуючий фермент, придатний для даного винаходу, містить залишки M6P на поверхні білка. У деяких варіантах реалізації, заміщуючий фермент, придатний для даного винаходу, може містити біс-фосфорильовані олігосахариди, які мають більш високу афінність зв'язування з CI-MPR. У деяких варіантах реалізації, придатний фермент містить щонайменше приблизно 20 %-біс-фосфорильованих олігосахаридів у ферменті. У інших варіантах реалізації, придатні ферменти можуть містити приблизно 10, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 % біс-фосфорильованих олігосахаридів у ферменті. Хоча такі біс-фосфорильовані олігосахариди можуть природно бути присутніми в ферменті, слід зазначити, що ферменти можуть бути модифіковані з отриманням ферментів, які містять такі олігосахариди. Наприклад, придатні заміщуючі ферменти можуть бути модифіковані з використанням деяких ферментів, які здатні каталізувати перенос N-ацетилглюкозаміна-L-фосфату з UDP-GlcNAc в положенні 6' α -1,2-зв'язаних маноз на лізосомальні ферменти. Способи і композиції для отримання і застосування таких ферментів описані, наприклад, Canfield et al. у патенті США №6537785 і патенті США № 6534300, кожний із яких включений до даної заявки за допомогою посилання.

У деяких варіантах реалізації, заміщуючі ферменти для застосування в даному винаході можуть бути кон'юговані або гібридизовані з молекулами, що обумовлюють спрямовану доставку (таргетинг) до лізосом, які здатні зв'язуватися з рецептором на поверхні клітин головного мозку. придатними молекулами для лізосомного таргетингу є IGF-I, IGF-II, RAP, p97 і їх варіанти, гомологи або фрагменти (наприклад, включаючи їх пептиди, що мають послідовність, щонайменше на 70, 75, 80, 85, 90 або 95 % ідентичну послідовності зрілого пептиду людини IGF-I, IGF-II, RAP, p97 дикого типу).

У деяких варіантах реалізації, заміщуючі ферменти, придатні для даного винаходу, не модифіковані для покращення доставки або транспорту таких агентів через ГЕБ і до ЦНС.

Інtrateкальна доставка

Відповідно до даного винаходу заміщуючий фермент доставляють до ЦНС. У деяких варіантах реалізації, заміщуючий фермент доставляють до центральної нервової системи шляхом введення до спинномозкової рідини (ліквору) суб'єктові, що потребує такого лікування. У деяких варіантах реалізації, для доставки бажаного заміщуючого ферменту до СМР застосовують інtrateкальне введення. У даній заявці інtrateкальне введення (також відоме як інtrateкальна ін'єкція) належить до ін'єкції до спинномозкового каналу (інtrateкальний простір, який оточує спинний мозок). Можуть застосовуватися різні методики, включаючи, без обмежень,

церебровентрикулярні ін'єкції через трепанаційний отвір або цистерни, або спинномозкову пункцію, або тому подібне. Приклади способів описані в роботах Lazorthes et al. *Advances in Drug Delivery Systems and Applications in Neurosurgery*, 143-192 і Omay et al., *Cancer Drug Delivery*, 1: 169-179, зміст яких включений до даної заявки за допомогою посилання.

Відповідно до даного винаходу фермент може бути ін'єктований у будь-яку область навколо спинномозкового каналу. У деяких варіантах реалізації, фермент ін'єктують у поперекову область або цистерну, або інтравентрикулярно в простір мозкового шлуночка. У даній заявці термін "поперековий відділ" або "поперекова область" належить до області між третім і четвертим поперековими (нижня частина спини) хребцями й, більш строго, до відділу хребта L2-S1. Як правило, інтратекальні ін'єкції через поперековий відділ або поперекову область також називають "поперековою ІТ доставкою" або "поперековим ІТ-введенням м'я". Термін "цистерна" належить до простору навколо й нижче мозочка через отвір між черепом і у верхній частині хребта. Як правило, інтратекальне введення через цистерну також згадується як "доставка до великої цистерни". Термін "шлуночок мозку" належить до порожнини мозку, яка продовжується в центральному каналі спинного мозку. Як правило, ін'єкції через мозкову порожнину шлуночка називають інтравентрикулярною церебральною (ІЦВ) доставкою.

У деяких варіантах реалізації, "інтратекальне введення" або "інтратекальна доставка" відповідно до даного винаходу належить до поперекового ІТ-введення або доставки, наприклад, доставки між третім і четвертим поперековими (нижня частина спини) хребцями й, більш конкретно, до L2-S1 відділу хребта. Припускається, що поперекове ІТ-введення або доставка відрізняється від доставки до великої цистерни тим, що поперекове ІТ-введення або доставка відповідно до даного винаходу забезпечує кращу й більш ефективну доставку до дистального каналу хребта, у той час як цистернова доставка, крім усього іншого, як правило, не забезпечує доставку складу до дистального каналу хребта.

Стабільні склади для ІТ доставки

У деяких варіантах реалізації, бажані ферменти додають до стабільних складів для інтратекальної доставки. Деякі варіанти реалізації даного винаходу основані, щонайменше частково, на виявленому факті, що різні композиції, описані в даній заявці, сприяють ефективній доставці й розподілу одного або більше терапевтичних агентів (наприклад, ферменту) у тканинах-мішенях, у цільових клітинах і/або органах ЦНС. Серед іншого, композиції, описані в даній заявці, здатні солюбілізувати високі концентрації терапевтичних агентів (наприклад, білків або ферментів) і придатні для доставки таких терапевтичних агентів до ЦНС суб'єктів при лікуванні захворювань, що мають пов'язаний із ЦНС компонент і/або етіологію. Композиції, описані тут, також характеризуються покращеною стабільністю й покращеною переносимістю при введенні до ЦНС суб'єкта (наприклад, інтратекально), що цього потребує.

До даного винаходу для інтратекальної доставки зазвичай застосовували традиційний небуферний ізотонічний сольовий розчин і розчин Елліотта В, який являє собою штучну СМР. Порівняння складу СМР і розчину Елліотта В наведене в Таблиці 2. Як показано в Таблиці 2, концентрації речовин у розчині Елліотта В близькі таким концентраціям у СМР. Розчин Елліотта В, однак, містить дуже низькі концентрації буфера і, відповідно, не може забезпечити адекватну буферну ємність, необхідну для стабілізації терапевтичних агентів (наприклад, білків), особливо протягом тривалого періоду часу (наприклад, у ході зберігання). Крім того, розчин Елліотта В містить деякі солі, які можуть бути несумісними зі складами, призначеними для доставки деяких терапевтичних агентів і, зокрема, білків або ферментів. Наприклад, солі кальцію, присутні в розчині Елліотта В, сприяють осадженню білків і тим самим знижують стабільність складу.

Таблиця 2

Розчин	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	pH	Фосфор	Глюкоза
	мЕкв/л	мЕкв/л	мЕкв/л	мЕкв/л	мЕкв/л	мЕкв/л		мг/л	мг/л
СМР	117-137	2,3	2,2	2,2	22,9	113-127	7,31	1,2-2,1	45-80
Розчин Еліотта В	149	2,6	2,7	2,4	22,6	132	6,0-7,5	2,3	80

Таким чином, у деяких варіантах реалізації, склади, придатні для інтратекальної доставки, відповідно до даного винаходу, не є синтетичною або штучною СМР.

У деяких варіантах реалізації, склади для інтратекальної доставки створені таким чином, що вони є стабільними або ж уповільнюють чи попереджають деградацію одного або більше терапевтичного агента, що входить до їхнього складу (наприклад, рекомбінантних білків). У

даний заявці термін "стабільний" належить до можливості терапевтичного агента (наприклад, рекомбінантного ферменту) підтримувати його терапевтичну ефективність (наприклад, усі або більшість видів передбачуваної біологічної активності і/або фізико-хімічну цілісність) протягом тривалого періоду часу. Стабільність терапевтичного агента і здатність фармацевтичної композиції підтримувати стабільність такого терапевтичного агента може бути оцінена протягом тривалого періоду часу (наприклад, більш переважно протягом щонайменше 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36 місяців і більше). У даному контексті стабільний склад є таким складом, у якому терапевтичний агент по суті зберігає свою фізичну і/або хімічну цілісність і біологічну активність при зберіганні й при проведенні з ним різних операцій (наприклад, у ході заморожування/відтавання, механічного перемішування й ліофілізації). Стабільність білка може бути оцінена на основі утворення високомолекулярних агрегатів, на основі втрати ферментативної активності, формування пептидних фрагментів і за зміщенням профілів заряду.

Стабільність терапевтичного агента має особливо важливе значення. Стабільність терапевтичного агента може бути також оцінена за біологічною активністю і фізико-хімічною цілісністю терапевтичного агента протягом тривалого періоду часу. Наприклад, стабільність у цей момент часу може бути зіставлена зі стабільністю в більш ранній момент часу (наприклад, при створенні складу в день 0) або може бути зіставлена зі стабільністю терапевтичного агента без допоміжних речовин, і результати цього порівняння виражені у відсотках. Переважно фармацевтичні композиції згідно з даним винаходом зберігають щонайменше 100 %, щонайменше 99 %, щонайменше 98 %, щонайменше 97 %, щонайменше 95 %, щонайменше 90 %, щонайменше 85 %, щонайменше 80 %, щонайменше 75 %, щонайменше 70 %, щонайменше 65 %, щонайменше 60 %, щонайменше 55 % або щонайменше 50 % біологічної активності терапевтичного агента або фізико-хімічної цілісності протягом тривалого періоду часу (наприклад, при вимірюванні протягом щонайменше 6-12 місяців, при кімнатній температурі або при спеціальних умовах зберігання).

У деяких варіантах реалізації, терапевтичні агенти (наприклад, бажані ферменти) є розчинними в складах згідно з даним винаходом. Термін "розчинний" стосовно терапевтичних агентів згідно з даним винаходом належить до здатності таких терапевтичних агентів утворювати гомогенний розчин. У переважному варіанті розчинність терапевтичного агента в розчині, в якому його вводять і з яким він транспортується до сайту-мішені дії (наприклад, клітин і тканин головного мозку), є достатньою для доставки терапевтично ефективної кількості терапевтичного агента до цільових ділянок-мішеней. Декілька факторів можуть вплинути на розчинність терапевтичних агентів. Наприклад, відповідні фактори, які можуть вплинути на розчинність білка, включають іонну силу, амінокислотну послідовність і наявність інших супутніх солубілізуючих агентів або солей (наприклад, солей кальцію). У деяких варіантах реалізації, фармацевтичні композиції створені таким чином, що з їхнього складу виключені солі кальцію.

Таким чином, придатні склади для інтратекального введення можуть містити цільовий терапевтичний агент (наприклад, фермент) у різних концентраціях. У деяких варіантах реалізації, придатні склади можуть містити цільовий білок або фермент у концентрації приблизно до 300 мг/мл (наприклад, приблизно до 250 мг/мл, приблизно до 200 мг/мл, приблизно до 150 мг/мл, приблизно до 100 мг/мл, приблизно до 90 мг/мл, приблизно до 80 мг/мл, приблизно до 70 мг/мл, приблизно до 60 мг/мл, приблизно до 50 мг/мл, приблизно до 40 мг/мл, приблизно до 30 мг/мл, приблизно до 25 мг/мл, приблизно до 20 мг/мл, приблизно до 10 мг/мл). У деяких варіантах реалізації, придатні склади можуть містити білок або фермент, що становить інтерес, у концентрації в діапазоні приблизно 0-300 мг/мл (наприклад, приблизно 1-250 мг/мл, приблизно 1-200 мг/мл, приблизно 1-150 мг/мл, приблизно 1-100 мг/мл, приблизно 10-100 мг/мл, приблизно 10-80 мг/мл, приблизно 10-70 мг/мл, приблизно 1-60 мг/мл, приблизно 1-50 мг/мл, приблизно 10-150 мг/мл, приблизно 1-30 мг/мл). У деяких варіантах реалізації, склади, придатні для інтратекальної доставки, можуть містити білок у концентрації приблизно 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 або 300 мг/мл.

У деяких варіантах реалізації застосовують ізотонічні розчини. У деяких варіантах реалізації, злегка гіпертонічні розчини (наприклад, приблизно 300 мМ (наприклад, приблизно 250, 200, 175, 150, 125 мМ) хлориду натрію в 5 мМ фосфаті натрію при рН 7,0) і цукровмісні розчини (наприклад, приблизно 3 % (наприклад, приблизно 2,4, 2,0, 1,5, 1,0 %) сахарози в 5 мМ фосфаті натрію при рН 7,0) демонстрували гарну переносимість у мавп. У деяких варіантах реалізації, придатний склад болюсу для доставки до ЦНС являє собою сольовий розчин (наприклад, 150 мМ NaCl у воді).

Багато терапевтичних агентів, зокрема білки і ферменти згідно з даним винаходом, потребують контрольованого рН і специфічних допоміжних речовин для підтримки їхньої розчинності та стабільності в фармацевтичній композиції згідно з даним винаходом. У Таблиці 3

наведені деякі аспекти прикладів білкових складів, які є важливими для підтримки розчинності й стабільності білкових терапевтичних агентів згідно з даним винаходом.

Таблиця 3

Параметр	Показовий діапазон/Тип	Призначення
pH	5 до 7,5	Для стабілізації Іноді також для розчинності
Тип буфера	ацетат, сукцинат, цитрат, гістидин, фосфат або Трис	Для підтримки оптимального pH Може також впливати на стабілізацію
Концентрація буфера	5-50 мМ	Для підтримки pH Може також стабілізувати й додавати іонної сили
Регулятор тоничності	NaCl, цукри, манітол	Для створення ізоосмотичного або ізотонічного розчинів
Поверхнево-активна речовина	Полісорбіт 20, полісорбіт 80	Для надання стійкості до поверхні розділу і при зміщенні
Інше	Амінокислоти (наприклад, аргінін) приблизно сотні мМ	Для збільшення розчинності та стабільності

5 pH фармацевтичної композиції є додатковим фактором, який здатний змінити розчинність терапевтичного агента (наприклад, ферменту або білка) у водній фармацевтичній композиції. У деяких варіантах реалізації, фармацевтична композиція згідно з даним винаходом містить один або кілька буферів. У деяких варіантах реалізації, композиції відповідно до даного винаходу містять кількість буферів, достатню для підтримки оптимального pH зазначеної композиції

10 приблизно 4,0-8,0, приблизно 5,0-7,5, приблизно 5,5-7,0, приблизно 6,0-7,0 і приблизно 6,0-7,5. У інших варіантах реалізації, буфер містить приблизно 50 мМ (наприклад, приблизно 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 мМ) натрію. придатні концентрації буфера включають, наприклад, ацетат, сукцинат, цитрат, фосфат, інші органічні кислоти і трис(гідроксиметил)амінометан ("Трис")-придатні концентрації буфера можуть становити від 1 до 100 мМ або від 3 до 20 мМ в залежності, наприклад, від буфера і бажаної ізотонічності складу. У деяких варіантах реалізації, придатний агент для буферизації є присутнім у концентрації приблизно 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 або 100 мМ.

У деяких варіантах реалізації, композиції містять ізотонічний агент для підтримки ізотонічності складу. При використанні стосовно ІТ доставки "ізотонічний" означає, що склад, який розглядається, по суті має таку ж осмолярність, як і СМР людини. Ізотонічні склади головним чином мають осмолярність від 240 mOsm/kg до 350 mOsm/kg. Ізотонічність можна виміряти з використанням, наприклад, тиску парів або осмотичної точки заморожування. Приклади ізотонічних агентів, включають, але не обмежуються перерахованими, гліцин, сорбіт, маніт, хлорид натрію й аргінін. У деяких варіантах реалізації, придатні ізотонічні агенти можуть бути присутніми в композиції в концентрації 0,01-5 % (наприклад, 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 або 5,0 %) за вагою.

У деяких варіантах реалізації, складу можуть містити стабілізуючий агент для захисту білка. Як правило, придатним агентом є стабілізуючий, невідновлюючий цукор, такий як сахароза, рафіноза, трегалоза або амінокислота, така як гліцин, аргінін і метіонін. Кількість стабілізуючого агента в складі є головним чином такою, що склад буде ізотонічним. Тим не менш, можуть підходити гіпертонічні складу. Крім того, кількість стабілізуючого агента не повинна бути занадто низькою, такою, при якій має місце неприйнятна деградація/агрегація терапевтичного агента. Приблизні концентрації стабілізуючого агента в композиції можуть варіювати від 1 до 400 мМ (наприклад, від 30 до 300 мМ, від 50 мМ до 100 мМ) або, навпаки, від 0,1 до 15 % (наприклад, від 1 до 10 %, від 5 до 15 %, від 5 до 10%) за вагою. У деяких варіантах реалізації, відношення масової кількості стабілізуючого агента і терапевтичного агента становить приблизно 1:1. У інших варіантах реалізації, співвідношення маси стабілізуючого агента і терапевтичного агента може становити приблизно 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 або 20:1. У деяких варіантах реалізації, придатний для ліофілізації стабілізуючий агент є ліопротектором.

40 Фармацевтичні композиції, складу й пов'язані з ними способи згідно з даним винаходом є корисними для доставки різних терапевтичних агентів до ЦНС суб'єкта (наприклад, інтратекально, інтравентрикулярно або інтрацестернально) і для лікування супутніх

захворювань. Фармацевтичні композиції згідно з даним винаходом є особливо корисними для доставки білків і ферментів для пацієнтів, що страждають від лізосомних хвороб накопичення.

У деяких варіантах реалізації є бажаним додавання поверхнево-активної речовини до складів. Приклади поверхнево-активних речовин включають неіонні поверхнево-активні речовини, такі як полісорбати (наприклад, полісорбат 20 або 80); полоксамери (наприклад, полоксамер 188); тритон; додецилсульфат натрію (SDS); лаурилсульфати натрію; октилглікозиди натрію; лаурилсульфат; мірістил-, лінолеїл- або стеариновий сульфобетаїн; лаурил-, мірістил-, лінолеїл- або стеариновий саркозин; лінолеїл-, мірістил- або цетилбетаїн; лауроамідопропіл; кокамідопропіл, лінолеамідопропіл; мірістамідопропіл; пальмідопропіл або ізостеарамідопропіл-бетаїни (наприклад, лауроамідопропіл); мірістарнідопропіл-, пальмідопропіл- або ізостеарамідопропіл-диметиламіни; натрію метилкокоїл- або динатрію метилофеїл-таурати і серії MONAQUATTM (Mona Industries, Inc, Патерсон, штат Нью-Джерсі), поліетиленгліколь, поліпропілгліколь і співполімери етилену, і пропіленгліколь (наприклад, Pluronic, PF68 і т.д.). Як правило, кількість поверхнево-активної речовини є такою, що вона зменшує агрегацію білка і зводить до мінімуму утворення часток або спінювання. Наприклад, поверхнево-активна речовина може бути присутньою в композиції в концентрації приблизно 0,001-0,5 % (наприклад, приблизно 0,005-0,05 % або приблизно 0,005-0,01 %). Зокрема поверхнево-активна речовина може бути присутньою в композиції в концентрації приблизно 0,005, 0,01, 0,02, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 % або приблизно 0,5 % і т. д.

У деяких варіантах реалізації, придатні склади можуть додатково включати один або більше наповнювачів, зокрема для ліофілізованих складів. "Наповнювач" являє собою сполуку, яка додає маси ліофілізованій суміші й бере участь у формуванні фізичної структури ліофілізованої таблетки. Наприклад, наповнювач може покращувати зовнішній вигляд ліофілізованої таблетки (наприклад, по суті однорідної ліофілізованої таблетки). придатні наповнювачі включають, але не обмежені перерахованими: хлорид натрію, лактозу, маніт, гліцин, сахарозу, трегалозу, гідроксietилкрохмаль. Показові концентрації наповнювачів становлять від 1 до 10 % (наприклад, 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 і 10,0 %).

Склади відповідно до даного винаходу можуть бути оцінені на основі аналізу якості продукції, часу відновлення (якщо склад ліофілізований), якості відновлення (якщо склад ліофілізований), високої молекулярної ваги, вологості й температури склування. Як правило, аналіз якості білка й продуктів включає аналіз швидкості руйнування продукту з використанням методів, які включають, але не обмежені перерахованими: ексклюзійну ВЕРХ (SE-HPLC), катіонообмінну ВЕРХ (CEX-HPLC), рентгенівську дифракцію (РД), модульовану диференціальну скануючу калориметрію (МДСК), ВЕРХ зі зворотною фазою (RP-HPLC), багатокутове світлорозсіювання (MALS), флуоресценцію, поглинання в ультрафіолеті, нефелометрію, капілярний електрофорез (КЕ), електрофорез у ДСН-ПААГ і їх комбінації. У деяких варіантах реалізації, оцінка продукту відповідно до даного винаходу може включати етап оцінки зовнішнього вигляду (зовнішній вигляд рідини або таблетки).

Як правило, склади (ліофілізовані або водні) можуть зберігатися протягом тривалого часу при кімнатній температурі. Температура зберігання може коливатися від 0 °C до 45 °C (наприклад, 4 °C, 20 °C, 25 °C, 45 °C і т. д.). Склади можуть зберігатися протягом періоду від декількох місяців до декількох років. Строк зберігання, як правило, становить 24 місяці, 12 місяців, 6 місяців, 4,5 місяці, 3 місяці, 2 тижні або 1 місяць. Склади можуть зберігатися безпосередньо в контейнері, який застосовується для введення, що дозволяє виключити етап переносу.

Склади можуть зберігатися безпосередньо в ліофілізаційному контейнері (якщо вони ліофілізовані), який може функціонувати як посудина для відновлення, щоб виключити етап передачі. Крім того, ліофілізований лікарський склад може бути дозований із невеликим інкрементом для зберігання. У процесі зберігання в цілому необхідно уникати впливів, які призводять до руйнування білків, у тому числі, без обмежень, впливів сонячних променів, ультрафіолетового випромінювання й інших форм електромагнітного випромінювання, надмірного тепла або холоду, швидкого теплового шоку й механічного шоку.

У деяких варіантах реалізації, склади відповідно до даного винаходу перебувають у рідкій або водній формі. У деяких варіантах реалізації, склади даного винаходу ліофілізують. Подібна ліофілізована композиція може бути відновлена шляхом додавання одного або більше розріджувачів перед введенням суб'єктові. придатні розчинники включають, але не обмежуються перерахованими: стерильну воду, бактеріостатичну воду для ін'єкцій і стерильний фізіологічний розчин. У переважному варіанті, при відновленні терапевтичний агент, що міститься в складі, є стабільним, розчинним і демонструє переносимість при введенні суб'єктові.

Фармацевтичні композиції згідно з даним винаходом характеризуються переносимістю. У даній заявці терміни "переносимий" і "переносимість" належать до здатності фармацевтичної композиції згідно з даним винаходом не викликати небажаної реакції у суб'єкта, якому вводять таку композицію, або, в альтернативному варіанті, не викликати серйозних побічних реакцій у суб'єкта, якому вводять подібну композицію. У деяких варіантах реалізації, фармацевтичні композиції згідно з даним винаходом добре переносяться суб'єктами, яким вводять подібні композиції.

Пристрій для інтратекального введення

Різні пристрої можна застосовувати для інтратекальної доставки відповідно до даного винаходу. У деяких варіантах реалізації, пристрій для інтратекального введення містить порт введення рідини (наприклад, ін'єкційний порт): порожній резервуар (наприклад, катетер), який включає перший отвір для рідини, сполучений із вхідним портом для рідини, і другий отвір для рідини, виконаний із можливістю введення до спинного мозку, і блокуюче пристосування для блокування введення порожнистої основної частини до спинного мозку. Як приклад, але не обмеження, на Фігурі 1 показано, що придатне блокуюче пристосування включає одну або більше опуклостей, виконаних на поверхні порожнистої основної частини, і блокуюче кільце виконане з можливістю установки над однією або більшим числом опуклостей для запобігання вислизанню порожнистої основної частини (наприклад, катетера) зі спинного мозку. У різних варіантах реалізації, порт введення рідини включає резервуар. У деяких варіантах реалізації, порт введення рідини включає механічний насос (наприклад, інфузійний насос). У деяких варіантах реалізації, імплантований катетер з'єднують із резервуаром (наприклад, для болюсної доставки) або з інфузійним насосом. Порт введення рідини може бути таким, що імплантується, або бути зовнішнім.

У деяких варіантах реалізації, інтратекальне введення може бути виконане або з використанням спинномозкової пункції (тобто повільний болюс) або через систему доставки порт-катетер (наприклад, інфузія або болюс). У деяких варіантах реалізації, катетер вводять між пластинками поперекових хребців, і наконечник вставлений до міжоболонкового простору до бажаного рівня (як правило, L3-L4) (На Фігурі 2).

Однократна доза, придатна для інтратекального введення зазвичай є невеликою в порівнянні з внутрішньовенним введенням. Зазвичай інтратекальна доставка відповідно до даного винаходу підтримує баланс складу СМР, а також внутрішньочерепний тиск суб'єкта. У деяких варіантах реалізації, інтратекальна доставка здійснюється при відсутності відповідного вилучення СМР у суб'єкта. У деяких варіантах реалізації, об'єм, придатний для однократної дози, може бути, наприклад, меншим за 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1,5, 1, 0,5 мл, або в деяких варіантах реалізації, об'єм, придатний для однократної дози, може становити приблизно 0,5-5, 0,5-4, 0,5-3, 0,5-2, 0,5-1, 1-3, 1-5, 1,5-3, 1-4 або 0,5-1,5 мл. У деяких варіантах реалізації, інтратекальна доставка відповідно до даного винаходу включає стадію попереднього вилучення необхідної кількості спинномозкової рідини. У деяких варіантах реалізації, перед ІТ-введення м видаляють менше, ніж 10 мл (наприклад, менше ніж 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 мл) СМР. У тих випадках придатний об'єм однократної дози може становити, наприклад, більше 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 або 20 мл.

Різні інші пристрої можуть бути використані для здійснення інтратекального введення терапевтичної композиції. Наприклад, склади, що містять бажані ферменти, можуть бути надані для використання з резервуаром Омайя, який зазвичай застосовують для інтратекального введення лікарських засобів при менінгеальному карциноматозі (Lancet 2: 983-84, 1963). Зокрема в цьому способі вентрикулярну трубку вводять через отвір, сформований у передньому розі спинного мозку, і підключають до резервуара Омайя, встановленого під шкірою голови, і резервуар проколюють підшкірно для інтратекальної доставки заміщуючого ферменту, який вводять до резервуару. Інші пристрої для інтратекального введення терапевтичних композицій або складів описані в патентах США №6217552, включених до даної заявки за допомогою посилання. Крім того, склад може бути введений інтратекально, наприклад, шляхом однократної ін'єкції або інфузії. Слід розуміти, що лікувальна доза може являти собою або одноразову дозу, або багаторазову дозу.

Для ін'єкції склади даного винаходу можуть бути приготовані у вигляді рідких розчинів. Крім того, фермент може входити до складу в твердому вигляді і може бути повторно розчиненим або суспендованим безпосередньо перед застосуванням. Ліофілізовані форми також передбачені. Ін'єкція може бути, наприклад, у вигляді болюсної ін'єкції або безперервної інфузії ферменту (наприклад, із використанням інфузійних насосів).

У одному варіанті реалізації даного винаходу, фермент вводять шляхом латеральної церебровентрикулярної ін'єкції в головний мозок суб'єкта. Ін'єкцію можна здійснити, наприклад,

через трепанаційний отвір у черепі суб'єкта. У іншому варіанті реалізації, фермент і/або інший фармацевтичний склад вводять до шлуночка мозку суб'єкта через хірургічно введений шунт. Наприклад, ін'єкція може бути здійснена в бічні шлуночки, які мають більший розмір. У деяких варіантах реалізації, може бути також здійснена ін'єкція в третій і четвертий шлуночки, розмір яких менший.

У ще одному варіанті реалізації, фармацевтичні композиції, які застосовуються в даному винаході, вводять у вигляді ін'єкцій до великої цистерни або поперекової області суб'єкта.

У іншому варіанті реалізації способу згідно з даним винаходом, фармацевтично прийнятний склад забезпечує безперервну доставку суб'єктові, наприклад, "повільне вивільнення" ферменту або іншої фармацевтичної композиції, яка застосовується в даному винаході, протягом щонайменше одного, двох, трьох, чотирьох тижнів або більш тривалого періоду часу, після того як фармацевтично прийнятні склади вводять суб'єктові.

У даній заявці термін "безперервна доставка" належить до безперервної доставки фармацевтичної композиції згідно з даним винаходом *in vivo* протягом тривалого періоду часу після введення, переважно щонайменше декількох днів, тижня або декількох тижнів. Безперервна доставка композиції може проявлятися, наприклад, у тривалому терапевтичному ефекті ферменту, що вводиться, протягом тривалого періоду часу (наприклад, стійка доставка ферменту може проявлятися в тривалому зменшенні об'єму запасних гранул у суб'єкта). Крім того, безперервна доставка ферменту може проявлятися у виявленні присутності ферменту *in vivo* протягом тривалого періоду часу.

Доставки до тканин-мішеней

Як уже обговорювалося вище, одна з несподіваних і важливих ознак даного винаходу полягає в тому, що терапевтичні агенти, зокрема заміщуючі ферменти, вводяться з використанням способів згідно з даним винаходом, і композиції згідно з даним винаходом здатні ефективно й широко дифундувати через поверхню мозку й проникати до різних шарів або областей мозку, у тому числі до глибоких областей мозку. Крім того, способи згідно з даним винаходом і композиції згідно з даним винаходом належать до ефективної доставки терапевтичних агентів (наприклад, заміщуючих ферментів) до різних тканин або нейронів спинного мозку, у тому числі до поперекової області, до якої важко здійснювати спрямовану доставку з використанням існуючих способів доставки до ЦНС, таких як ІЦВ ін'єкція. Крім того, способи згідно з даним винаходом і композиції згідно з даним винаходом забезпечують доставку достатньої кількості терапевтичних агентів (наприклад, заміщуючих ферментів) у кров і до різних периферичних органів і тканин.

Таким чином, у деяких варіантах реалізації, терапевтичні білки (наприклад, заміщуючі ферменти) надходять до центральної нервової системи суб'єкта. У деяких варіантах реалізації, терапевтичні білки (наприклад, заміщуючі ферменти) надходять до однієї або більше тканин-мішеней головного мозку, спинного мозку і/або периферичного органа. У даній заявці термін "тканина-мішень/цільова тканина" належить до будь-якої тканини, ураженої лізосомною хворобою накопичення, яку лікують, або будь-якої тканини, в якій лізосомний фермент, рівень якого знижений, експресується в нормі. У деяких варіантах реалізації, тканини-мішені включають тканини, в яких виявлена аномально висока кількість субстрату ферменту, наприклад, накопиченого в лізосомах клітин тканини, у пацієнтів, що страждають на або мають схильність до лізосомної хвороби накопичення. У деяких варіантах реалізації, тканини-мішені включають тканини, які демонструють патології, симптоми або ознаки, асоційовані з такою хворобою. У деяких варіантах реалізації, тканини-мішені включають тканини, в яких недостатній лізосомальний фермент у нормі експресується на високому рівні. У даній заявці тканина-мішень може являти собою тканину-мішень головного мозку, тканину-мішень спинного мозку і/або периферичну тканину-мішень. Приклади тканин-мішеней докладно описані нижче.

Тканини-мішені головного мозку

У цілому, головний мозок може бути розділений на різні відділи, шари і тканини. Наприклад, менінгеальні тканини являють собою систему мембран, яка включає центральну нервову систему, у тому числі головний мозок. Мозкові оболонки містять три шари, в тому числі тверду мозкову оболонку, павутинну тканину і м'яку мозкову оболонку. Зазвичай основною функцією мозкових оболонок і спинномозкової рідини є захист центральної нервової системи. У деяких варіантах реалізації, терапевтичний білок відповідно до даного винаходу доставляють до одного або декількох шарів мозкових оболонок.

Головний мозок складається з трьох основних відділів, у тому числі півкуль головного мозку, мозочка і стовбура мозку. Півкулі головного мозку розташовані вище від більшості інших структур головного мозку й покриті корковим шаром. Під півкулями головного мозку лежить

стовбур мозку, який нагадує стебло, до якого прикріплені півкулі головного мозку. У задній частині мозку під півкулями головного мозку і за стовбуром мозку перебуває мозочок.

Проміжний мозок, який знаходиться недалеко від середньої лінії головного мозку і вище від середнього мозку, включає таламус, метаталамус, гіпоталамус, епіталамус, преталамус і претектум. Середній мозок, який також називають мезенцефалоном, містить дах, тегумент, вентрикулярний мезоцелій і церебральні ніжки, червоне ядро і черепні нерви III ядра. Середній мозок пов'язаний із зором, слухом, керуванням рухом, сном/неспанням, уважністю та регуляцією температури.

Області тканин центральної нервової системи, включаючи головний мозок, можуть бути охарактеризовані на основі глибини тканин. Наприклад, тканини ЦНС (наприклад, головний мозок) можуть бути охарактеризовані як поверхневі тканини або неглибокі, тканини середньої глибини і/або глибокі тканини.

Відповідно до даного винаходу терапевтичний білок (наприклад, заміщуючий фермент) може бути доставлений до будь-якої придатної тканини-мішені мозку, пов'язаної з хворобою суб'єкта, яку лікують. У деяких варіантах реалізації, терапевтичні білки (наприклад, заміщуючий фермент) відповідно до даного винаходу доставляють до поверхневих або неглибоких тканин-мішеней мозку. У деяких варіантах реалізації, терапевтичні білки відповідно до даного винаходу доставляються до тканин-мішеней мозку на середній глибині. У деяких варіантах реалізації, терапевтичні білки відповідно до даного винаходу доставляють до глибоких тканин-мішеней мозку. У деяких варіантах реалізації, терапевтичні білки відповідно до даного винаходу доставляють до комбінації поверхневих або неглибоких тканин-мішеней головного мозку, тканин-мішеней головного мозку середньої глибини і/або глибоких тканин-мішеней мозку. У деяких варіантах реалізації, терапевтичні білки відповідно до даного винаходу доставляють до глибоких тканин мозку, що лежать щонайменше на 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 мм і глибше (або внутрішні) від зовнішньої поверхні мозку.

У деяких варіантах реалізації, терапевтичні агенти (наприклад, ферменти) доставляють до однієї або більше поверхневих або неглибоких тканин головного мозку. У деяких варіантах реалізації, цільові поверхневі або неглибокі тканини головного мозку знаходяться в межах 4 мм від поверхні головного мозку. У деяких варіантах реалізації, цільові поверхневі або неглибокі тканини головного мозку вибрані з тканин м'якої мозкової оболонки, кори головного мозку, гіпокампу, простору Вірхова-Робіна, кровоносних судин у просторі ВР, гіпокампу, частин гіпоталамуса на нижній поверхні мозку, зорових нервів і шляхів, нюхової цибулини і проєкцій, і їх комбінацій.

У деяких варіантах реалізації, терапевтичні агенти (наприклад, ферменти) доставляють до однієї або більше глибоких тканин головного мозку. У деяких варіантах реалізації, цільові поверхневі або неглибокі тканини головного мозку розташовані на 4 мм (наприклад 5, 6, 7, 8, 9 або 10 мм) глибше від (або всередині відносно) поверхні головного мозку. У деяких варіантах реалізації, цільові глибокі тканини головного мозку включають кору головного мозку. У деяких варіантах реалізації, цільові глибокі тканини головного мозку включають одну або більше тканин проміжного мозку (наприклад, гіпоталамус, таламус, вентральний таламус, субталамус і т.д.), заднього мозку, сочевицеподібні ядра, базальні ганглії, хвостате ядро, шкарлупу, мигдалеподібне тіло, бліду кулю і їх комбінацій.

У деяких варіантах реалізації, терапевтичні агенти (наприклад, ферменти) доставляють до однієї або більше тканин мозочка. У деяких варіантах реалізації, одна або більше тканин-мішеней мозочка вибрані з групи, яка включає тканини молекулярного шару, тканини шару клітин Пуркін'є, тканини зернистого шару, ніжки мозочка і їх комбінацій. У деяких варіантах реалізації, терапевтичні агенти (наприклад, ферменти) доставляють до однієї або більше глибоких тканин мозочка, включаючи, без обмежень, тканини шару клітин Пуркін'є, тканини зернистого шару клітин, глибокої білої речовини мозочка (наприклад, глибокі відносно зернистого шару клітин) і глибокі тканини ядер мозочка.

У деяких варіантах реалізації, терапевтичні агенти (наприклад, ферменти) доставляють до однієї або більше тканин мозку. У деяких варіантах реалізації, одна або більше тканин-мішеней мозку включають тканини білої речовини стовбура головного мозку і/або тканини ядер стовбура мозку.

У деяких варіантах реалізації, терапевтичні агенти (наприклад, ферменти) доставляють до різних тканин мозку, включаючи, без обмежень, сіру речовину, білу речовину, перивентрикулярні області, м'яку-павутинну оболонку, до мозкової оболонки, кори головного мозку, мозочка, до глибоких тканин кори головного мозку, молекулярного шару, дорсального стріатуму, середнього мозку, глибинних областей моста і довгастого мозку, а також їх комбінацій.

У деяких варіантах, терапевтичні агенти (наприклад, ферменти) надходять до різних клітин у мозку, включаючи, але не обмежуючись перерахованими: нейрони, гліальні клітини, периваскулярні клітини і/або менінгеальні клітини. У деяких варіантах, терапевтичний білок доставляють до олігодендроцитів глибокої білої речовини.

5 Спинний мозок

У цілому, області або тканини спинного мозку можна охарактеризувати в залежності від глибини тканин. Наприклад, тканини спинного мозку можуть бути охарактеризовані як поверхневі або неглибокі тканини, тканини середньої глибини і/або глибокі тканини.

10 У деяких варіантах реалізації, терапевтичні агенти (наприклад, ферменти) доставляють до однієї або більше поверхневих або неглибоких тканин спинного мозку. У деяких варіантах реалізації, цільові поверхневі або неглибокі тканини спинного мозку знаходяться в межах 4 мм від поверхні спинного мозку. У деяких варіантах реалізації, цільові поверхневі або неглибокі тканини спинного мозку включають м'яку оболонку і/або ділянки білої речовини.

15 У деяких варіантах, терапевтичні агенти (наприклад, ферменти) доставляють до однієї або більшого глибоких тканин спинного мозку. У деяких варіантах реалізації, цільові глибокі тканини спинного мозку розташовані всередині на глибині 4 мм від поверхні спинного мозку. У деяких варіантах, цільові глибокі тканини спинного мозку включають сіру речовину спинного мозку і/або епендимні клітини.

20 У деяких варіантах, терапевтичні агенти (наприклад, ферменти) доставляють до нейронів спинного мозку.

Периферичні тканини-мішені

У даній заявці периферичні органи або тканини належать до будь-якого органа або тканини, які не є частиною центральної нервової системи (ЦНС). Периферичні тканини-мішені можуть включати, без обмежень, кровоносну систему, печінку, нирки, серце, ендотелій, кістковий мозок
25 і клітини-похідні кісткового мозку, селезінку, легені, лімфатичні вузли, кістки, хрящі, яєчники і сім'яники. У деяких варіантах, терапевтичні білки (наприклад, заміщуючий фермент) відповідно до даного винаходу доставляють до однієї або більше периферичних тканин.

Біорозподіл і біодоступність

30 У різних варіантах реалізації, після доставки до тканини-мішені терапевтичний агент (наприклад, заміщуючий фермент) локалізується внутрішньоклітинно. Наприклад, терапевтичний агент (наприклад, фермент) може локалізуватися в екзонах, аксонах, лізосомах, мітохондріях і вакуолях клітини-мішені (наприклад, нейрону, такого як клітина Пуркінє). Наприклад, у деяких варіантах реалізації, ферменти, які вводяться інтратекально, характеризуються такою динамікою переміщення, що фермент рухається в периваскулярному просторі (наприклад, шляхом конвективних механізмів із пульсацією). Крім того, поширення
35 білка або ферменту, що вводиться інтратекально, в більш глибоких тканинах центральної нервової системи може забезпечуватися або яким-небудь способом полегшуватися механізмами активного аксонного транспорту, пов'язаними з асоціацією білка або ферменту, що вводиться, з нейрофіламенами.

40 У деяких варіантах реалізації, терапевтичний агент (наприклад, заміщуючий фермент), який доставляється відповідно до даного винаходу, може досягати терапевтично або клінічно ефективного рівня чи активності в різних тканинах-мішенях, описаних у даній заявці. У даній заявці терапевтично або клінічно ефективний рівень чи активність являє собою рівень чи активність, які достатні для надання терапевтичного ефекту в тканині-мішені. Терапевтичний ефект може бути об'єктивним (тобто вимірюваним із використанням ряду тестів чи з використанням маркера) або суб'єктивним (тобто сам суб'єкт повідомляє про ефект або відчуває такий ефект). Наприклад, терапевтично або клінічно ефективний рівень чи активність можуть являти собою рівень чи активність ферменту, які є достатніми для полегшення симптомів, пов'язаних із захворюванням у тканині-мішені (наприклад, накопиченням ГАГ).

50 У деяких варіантах реалізації, терапевтичний агент (наприклад, заміщуючий фермент), який доставляється відповідно до даного винаходу, може досягати рівня або ферментативної активності, що становить щонайменше 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 % від нормального рівня або активності відповідного лізосомального ферменту в тканині-мішені. У деяких варіантах реалізації, терапевтичний агент (наприклад, заміщуючий фермент), який
55 доставляється відповідно до даного винаходу, може досягати рівня або ферментативної активності, яка збільшена щонайменше в 1 раз, у 2 рази, в 3 рази, в 4 рази, 5 разів, 6 разів, 7 разів, 8 разів, 9 разів або 10 разів у порівнянні з контролем (наприклад, ендогенний рівень або активність без лікування). У деяких варіантах реалізації, терапевтичний агент (наприклад, заміщуючий фермент), який доставляється відповідно до даного винаходу, може досягати
60 підвищеного рівня або ферментативної активності щонайменше приблизно 10, 20, 40, 50, 60,

70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 або 600 нмоль/год./мг у тканині-мішені.

У деяких варіантах реалізації, способи згідно з даним винаходом особливо застосовні для спрямованої доставки (таргетингу) в поперекову область. У деяких варіантах реалізації, терапевтичний агент (наприклад, заміщуючий фермент), який доставляється відповідно до даного винаходу, може досягати підвищеного рівня або ферментативної активності в поперековій області, що становить щонайменше приблизно 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 або 10000 нмоль/год./мг.

У цілому, терапевтичні агенти (наприклад, заміщуючий фермент), які доставляються відповідно до даного винаходу, мають досить тривалий період напівжиття в спинномозковій рідині й тканинах головного мозку, спинного мозку і периферичних органів. У деяких варіантах реалізації, терапевтичний агент (наприклад, заміщуючий фермент), який доставляється відповідно до даного винаходу, може мати період напівжиття щонайменше 30 хвилин, 45 хвилин, 60 хвилин, 90 хвилин, 2 години, 3 години, 4 години, 5 годин, 6 годин, 7 годин, 8 годин, 9 годин, 10 годин, 12 годин, 16 годин, 18 годин, 20 годин, 25 годин, 30 годин, 35 годин, 40 годин, до 3 днів, до 7 днів, до 14 днів, до 21 дня або до місяця. У деяких варіантах реалізації, терапевтичний агент (наприклад, заміщуючий фермент), який доставляється відповідно до даного винаходу, може зберігатися на детектованому рівні або при детектованій активності в спинномозковій рідині або крові після 12 годин, 24 годин, 30 годин, 36 годин, 42 годин, 48 годин, 54 годин, 60 годин, 66 годин, 72 годин, 78 годин, 84 годин, 90 годин, 96 годин, 102 годин або тижня після введення. Детектований рівень або детектована активність може бути визначена з використанням різних способів, відомих у даній області.

У деяких варіантах реалізації, терапевтичний агент (наприклад, заміщуючий фермент), який доставляється відповідно до даного винаходу, досягає концентрації щонайменше 30 мкг/мл у тканинах і клітинах ЦНС у суб'єкта після введення (наприклад, через один тиждень, 3 дні, 48 годин, 36 годин, 24 години, 18 годин, 12 годин, 8 годин, 6 годин, 4 години, 3 години, 2 години, 1 годину, 30 хвилин або менше після інтратекального введення фармацевтичної композиції суб'єктові). У деяких варіантах реалізації, терапевтичний агент (наприклад, заміщуючий фермент), який доставляється відповідно до даного винаходу, досягає концентрації щонайменше 20 мкг/мл, щонайменше 15 мкг/мл, щонайменше 10 мкг/мл, щонайменше 7,5 мкг/мл, щонайменше 5 мкг/мл, щонайменше 2,5 мкг/мл, щонайменше 1,0 мкг/мл або щонайменше 0,5 мкг/мл у цільових тканинах або клітинах суб'єкта (наприклад, тканині мозку або нейронів) після введення такому суб'єктові (наприклад, через один тиждень, 3 дні, 48 годин, 36 годин, 24 години, 18 годин, 12 годин, 8 годин, 6 годин, 4 години, 3 години, 2 години, 1 годину, 30 хвилин або менше після інтратекального введення такої фармацевтичної композиції суб'єктові).

Лікування лізосомних хвороб накопичення з використанням інтратекального введення

Лізосомні хвороби накопичення являють собою групу порівняно рідкісних спадкових розладів обміну речовин, які є результатом дефектів функції лізосом. Лізосомні захворювання характеризуються накопиченням нерозщеплених макромолекул, у тому числі субстратів ферментів, у лізосомах (див. Таблицю 1), що призводить до збільшення розмірів та кількості таких лізосом і в остаточному підсумку - до клітинної дисфункції та клінічних аномалій.

Способи згідно з даним винаходом, описані в даній заявці, можуть ефективно полегшувати доставку одного або більше терапевтичних агентів (наприклад, одного або більше заміщуючого ферменту) до органел-мішеней. Наприклад, оскільки лізосомні хвороби накопичення, такі як синдром Хантера, характеризуються накопиченням глікозаміногліканів (ГАГ) у лізосомах уражених клітин, лізосоми являють собою бажані органели-мішені для лікування лізосомних хвороб накопичення.

Способи і композиції згідно з даним винаходом застосовні, зокрема, для лікування захворювань, що мають етіологію ЦНС або зачіпають компоненти ЦНС. Лізосомні хвороби накопичення, що мають етіологію ЦНС або зачіпають компоненти ЦНС, включають, наприклад, без обмеження синдром Санфіліппо типу А, синдром Санфіліппо типу В, синдром Хантера, метахроматичну лейкодистрофію та лейкодистрофію глобоїдних клітин. До даного винаходу традиційні способи терапії мали обмеження, яке полягає в тому, що вони включали тільки внутрішньовенне введення складу суб'єктові і, як правило, були ефективні тільки при лікуванні соматичних симптомів основної ферментної недостатності. Композиції та способи згідно з даним винаходом можна застосовувати безпосередньо в ЦНС пацієнта, який страждає на захворювання з етіологією ЦНС, що забезпечує досягнення терапевтичних концентрацій в уражених клітинах і тканинах центральної нервової системи (наприклад, мозку) і таким чином дозволяє подолати обмеження, пов'язані з традиційним системним введенням таких терапевтичних агентів.

У деяких варіантах реалізації винаходу, способи та композиції згідно з даним винаходом застосовні для лікування як неврологічних, так і соматичних ускладнень або симптомів лізосомних хвороб накопичення. Наприклад, у деяких варіантах реалізації, винахід належить до композицій і способів доставки одного або більше терапевтичного агента до ЦНС суб'єкта (наприклад, інтратекально, інтравентрикулярно або інтрацистернально) для лікування розладів ЦНС або неврологічних ускладнень і проявів лізосомних хвороб накопичення, а також лікування системних або соматичних проявів таких лізосомних хвороб накопичення. Наприклад, деякі композиції згідно з даним винаходом можуть бути введені суб'єктові інтратекально, що таким чином забезпечує доставку одного або більше терапевтичного агента до ЦНС суб'єкта і лікування неврологічних ускладнень, пов'язаних із внутрішньовенним введенням одного або більше терапевтичних агентів для доставки такого терапевтичного агента як до клітин, так і до тканин системного кровотоку (наприклад, клітин і тканин серця, легенів, печінки, нирок і лімфатичних вузлів), що сприяє лікуванню таких соматичних ускладнень. Наприклад, суб'єктові, який страждає на або іншим способом уражений лізосомною хворобою накопичення (наприклад, синдром Хантера), можна вводити фармацевтичну композицію, яка містить один або більше терапевтичних агентів (наприклад, ідуронат-2-сульфатазу), інтратекально щонайменше один раз на тиждень, один раз на два тижні, щомісяця, один раз на два місяці або більше для лікування неврологічних ускладнень, тоді як інший терапевтичний агент вводять суб'єктові внутрішньовенно більш часто (наприклад, один раз на день, через день, три рази на тиждень або щотижня) для лікування системних або соматичних проявів такого захворювання.

Наприклад, у пацієнтів, що страждають на синдром Хантера, проявляються гістологічні зміни в мозку, які можуть включати атрофію, здуття коркових нейронів, зменшення білої речовини головного мозку, розширення периваскулярного простору та здуття дендритів клітин Пуркінє. Дослідження з використанням магнітно-резонансної візуалізації/спектроскопії показали, що тяжкі дифузійні ураження, які зачіпають білу речовину, такі як атрофія мозку, гідроцефалія, більшою мірою поширені у пацієнтів із когнітивними розладами у порівнянні з пацієнтами без таких розладів (Vedolin, L., et al., AJNR Am J Neuroradiol (2007) 28, 1029-1033). Навіть у пацієнтів без укрив виражених неврологічних ускладнень, таких як розумова відсталість або затримка розвитку, була показана наявність аномалій мозку, в тому числі атрофії, вентрикуломегалії та збільшення периваскулярного простору (Matheus, MG, et al., Neuroradiology (2004) 46, 666-672).

Як необмежувачий приклад, мукополісахаридоз IIIA типу (MPS IIIA; синдром Санфіліппо типу А) є найбільш тяжкою формою синдрому Санфіліппо типу А і уражає приблизно 1 на 100000 людей по усьому світу. Синдром Санфіліппо типу А (Санфіліппо А) характеризується дефіцитом ферменту гепаран-N-сульфатази (HNS), екзосульфатази, що беруть участь у лізосомному катаболізмі глікозаміноглікану (ГАГ) гепарансульфату (Neufeld EF, et al. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (2001) pp. 3421-3452). При відсутності цього ферменту, ГАГ гепарансульфат накопичується в лізосомах нейронів і гліальних клітин із меншим накопиченням поза головним мозком.

Як необмежувачий приклад, мукополісахаридоз IIIB типу (MPS IIIB; Санфіліппо синдром типу В) являє собою аутосомно-рецесивний розлад, який характеризується дефіцитом ферменту альфа-N-ацетил-глюкозамінідази (Naglu). При відсутності цього ферменту, ГАГ гепарансульфат накопичується в лізосомах нейронів і гліальних клітин із меншим накопиченням поза головним мозком.

Як необмежувачий приклад, лейкодистрофія глободних клітин (ЛГК) являє собою рідкісну аутосомно-рецесивну хворобу накопичення, викликану дефектом функції галактоцереброзидази (GALC). GALC являє собою розчинний лізосомальний фермент - кислу гідролазу, яка розщеплює галактозилцерамід, нормальний компонент мієліну, на галактозу та церамід, і психозин (галактозилсфінгозин), токсичний побічний продукт синтезу галактозилцераміду, на галактозу та сфінгозин. Недолік GALC призводить до неврологічних уражень центральної та периферичної нервової системи (ЦНС і ПНС відповідно) за двома взаємозалежними, але різними механізмами. Перший механізм веде до надмірного накопичення психозину з наступним апоптозом мієлінізованих клітин. У другому механізмі галактозилцерамід накопичується і фагоцитується активованою мікроглією з утворенням характерних глободних клітин, які й дали назву цьому захворюванню. На відміну від інших лізосомних хвороб накопичення, при яких відбувається накопичення незруйнованого субстрату, при цьому захворюванні, як правило, не відбувається збільшення галактозилцерамідів у нервовій тканині.

Визначальною клінічною ознакою даного захворювання є дегенерація центральної нервової системи (ЦНС), яка призводить до втрати або нездатності набування основних навичок розвитку. Прогресуюче зниження когнітивної здатності завершується деменцією та

передчасною смертю. Хвороба може проявлятися у маленьких дітей (рання ЛГК) або у осіб будь-якого віку (пізня ЛГК). Тривалість життя окремих хворих із раннім початком ЛГК, як правило, не перевищує двох років. Пізня ЛГК може з'явитися у людей будь-якого віку, і характер розвитку цього захворювання може варіювати в значній мірі.

5 Метахроматична лейкодистрофія (МЛ) являє собою аутосомно-рецесивне захворювання, обумовлене недостатністю ферменту арилсульфатази (ASA). ASA, яка кодується геном ARSA людини, являє собою фермент, що розщеплює церебросид-3-сульфат або сфінголіпід 3-О-сульфогалактозилцерамід (сульфатид) на церебросид і сульфат. При відсутності ферменту сульфатиди накопичуються в нервовій системі (наприклад, у мієлінових оболонках, нейронах і

10 гліальних клітинах) і меншою мірою у вісцеральних органах. Наслідком таких молекулярних і клітинних подій є прогресуюча демієлінізація і втрата аксонів у ЦНС і ПНС, що супроводжуються моторними й когнітивними розладами з тяжким клінічним проявом.

Визначальною клінічною ознакою цього захворювання є дегенерація центральної нервової системи (ЦНС), яка призводить до когнітивних розладів (наприклад, розумової відсталості,

15 нервових розладів і сліпоти та ін.).

Як необмежувачий приклад, МЛ може проявлятися у дітей раннього віку (пізня інфантильна форма), при цьому у хворих дітей симптоми проявляються зазвичай відразу після першого року життя (наприклад, приблизно 15-24 місяців), і, як правило, такі діти не живуть більше 5 років. МЛ може проявлятися у дітей (ювенільна форма), при цьому у хворих дітей когнітивні розлади

20 проявляються зазвичай приблизно у віці 3-10 років, а тривалість життя може варіювати (наприклад, у діапазоні 10-15 років після появи симптомів). МЛ може проявлятися у дорослих (доросла форма) і може з'являтися у людей будь-якого віку (наприклад, зазвичай у віці 16 років і більше), а прогресування захворювання може сильно варіювати.

Таким чином, у деяких варіантах реалізації, способи та композиції згідно з даним винаходом

25 забезпечують доставку одного або декількох терапевтичних агентів (наприклад, одного або декількох заміщуючих ферментів) до однієї або більше органели (наприклад, лізосоми) цільових тканин і клітин головного мозку, спинного мозку і/або периферичних органів для здійснення лікування різних лізосомних хвороб накопичення. У даній заявці терміни «лікувати» або «лікування», які використовуються в даній заявці, належать до покращення одного або більше

30 симптомів, асоційованих із захворюванням, запобігання або затримки настання одного або більше симптомів захворювання і/або зменшення тяжкості чи частоти одного або більше симптомів захворювання.

У деяких варіантах, лікування належить до часткового або повного покращення, полегшення, гальмування, затримки початку, зниження тяжкості і/або частоти неврологічних

35 розладів у пацієнта, який страждає на або має сприйнятливості до лізосомної хвороби. У даній заявці термін «неврологічні розлади» включає різні симптоми, пов'язані з розладом центральної нервової системи (наприклад, головного і спинного мозку). Симптоми неврологічних розладів можуть включати, наприклад, затримку розвитку, прогресуючі когнітивні розлади, ослаблення слуху, розлад розвитку мови, дефіцит моторних навичок, гіперактивність, агресивність і/або

40 розлад сну поряд із іншими симптомами.

У деяких варіантах реалізації, лікування належить до зменшення лізосомних відкладень (наприклад, макромолекул, таких як ГАГ) у різних тканинах. У деяких варіантах реалізації, лікування належить до зменшення лізосомних відкладень у тканинах-мішенях мозку, у нейронах спинного мозку і/або периферичній тканині-мішені. У деяких варіантах реалізації, лізосомні

45 відкладення зменшуються приблизно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 % і більше в порівнянні з контролем. У деяких варіантах реалізації, лізосомні відкладення зменшуються щонайменше в 1 раз, 2 рази, 3 рази, 4 рази, 5 разів, 6 разів, 7 разів, 8 разів, 9 разів або 10 разів у порівнянні з контролем. У деяких варіантах реалізації, лізосомне накопичення оцінюють за наявністю лізосомних накопичувальних гранул (наприклад,

50 характерна покресленість).

У деяких варіантах, лікування належить до зниження вакуолізації в нейронах (наприклад, нейронах, що включають клітини Пуркінє). У деяких варіантах реалізації, вакуолізація в нейронах зменшується приблизно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 % і більше в порівнянні з контролем. У деяких варіантах реалізації, вакуолізація

55 зменшується щонайменше в 1 раз, 2 рази, 3 рази, 4 рази, 5 разів, 6 разів, 7 разів, 8 разів, 9 разів або 10 разів у порівнянні з контролем.

У деяких варіантах реалізації, лікування згідно з даним винаходом призводить до зниження (наприклад, приблизно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 95, 97,5, 99 % або більше) вмісту або повного усунення, або, в альтернативному варіанті, відкладання одного

60 чи більше патологічного або біологічного маркера, асоційованого з лізосомними хворобами

накопичення. Таке зниження або усунення можуть бути особливо помітні в клітинах і тканинах центральної нервової системи (наприклад, нейронах і олігодендроцитах). Наприклад, у деяких варіантах реалізації, при введенні суб'єктові фармацевтична композиція згідно з даним винаходом викликає або обумовлює скорочення накопичення біомаркера лізосомного білка 1 (LAMP1), асоційованого з мембраною, у клітинах і тканинах ЦНС у суб'єкта (наприклад, у корі головного мозку, мозочку, хвостатому ядрі й шкарлупі, білій речовині і/або таламусі). LAMP1 являє собою глікопротеїн, який експресується на високому рівні на мембранах лізосом, і його рівень підвищений у багатьох пацієнтів із лізосомними хворобами накопичення (Meikle, et al. Clin Chem. (1997)43:1325-1335). Отже, присутність або відсутність LAMP1 у хворих (наприклад, визначена з використанням фарбування на LAMP1) із лізосомною хворобою накопичення може служити показником лізосомної активності й маркером для діагностики та моніторингу лізосомних хвороб накопичення.

Таким чином, деякі варіанти реалізації даного винаходу належать до способів зниження або усунення одного чи більше патологічного або біологічного маркера, асоційованого із захворюванням (наприклад, лізосомною хворобою накопичення). Крім того, деякі варіанти реалізації даного винаходу належать до способів збільшення руйнування (або швидкості руйнування) одного чи більше патологічних або біологічних маркерів (наприклад, LAMP1), асоційованих із лізосомними хворобами накопичення.

У деяких варіантах реалізації, лікування належить до зниження прогресування втрати когнітивної здатності. У деяких варіантах, прогресування втрати пізнавальної здатності зменшується приблизно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 % і більше в порівнянні з контролем. У деяких варіантах, лікування належить до зниження затримки в розвитку. У деяких варіантах, затримка розвитку зменшується приблизно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 % і більше в порівнянні з контролем.

У деяких варіантах реалізації, лікування належить до збільшення виживаності (наприклад, тривалості життя). Наприклад, лікування може призводити до збільшення тривалості життя пацієнтів. У деяких варіантах реалізації, лікування згідно з даним винаходом призводить до збільшення тривалості життя пацієнтів більше ніж на приблизно 5 %, приблизно 10 %, приблизно 15%, приблизно 20%, приблизно 25 %, приблизно 30%, приблизно 35 %, приблизно 40 %, приблизно 45 %, приблизно 50 %, приблизно 55 %, приблизно 60 %, приблизно 65 %, приблизно 70 %, приблизно 75 %, приблизно 80 %, приблизно 85 %, приблизно 90 %, приблизно 95 %, приблизно 100 %, приблизно 105 %, приблизно 110%, приблизно 115 %, приблизно 120 %, приблизно 125 %, приблизно 130 %, приблизно 135 %, приблизно 140 %, приблизно 145 %, приблизно 150 %, приблизно 155 %, приблизно 160 %, приблизно 165 %, приблизно 170 %, приблизно 175 %, приблизно 180 %, приблизно 185 %, приблизно 190 %, приблизно 195 %, приблизно 200 % або більше в порівнянні з середньою тривалістю життя одного або більше пацієнтів, які страждають на таке ж захворювання, але не піддавалися лікуванню. У деяких варіантах реалізації, лікування згідно з даним винаходом призводить до збільшення тривалості життя пацієнта більше ніж на 6 місяців, приблизно на 7 місяців, приблизно на 8 місяців, приблизно на 9 місяців, приблизно на 10 місяців, приблизно на 11 місяців, приблизно на 12 місяців, приблизно на 2 роки, приблизно на 3 роки, приблизно на 4 роки, приблизно на 5 років, приблизно на 6 років, приблизно на 7 років, приблизно на 8 років, приблизно на 9 років, приблизно 10 років або більше в порівнянні з середньою тривалістю життя одного або більше пацієнтів, які страждають на таке ж захворювання, але не піддавалися лікуванню. У деяких варіантах реалізації, лікування відповідно до даного винаходу призводить до тривалої виживаності пацієнта. У даній заявці термін "тривала виживаність" належить до виживаності або тривалості життя більше 40 років, 45 років, 50 років, 55 років, 60 років або довше.

Терміни "покращити", "збільшити" або "зменшити" в даній заявці вказують на значення відносно контролю. У деяких варіантах реалізації, придатний контроль являє собою базове (фонове) вимірювання, наприклад, вимірювання у того ж індивіда до початку лікування, описаного в даній заявці, або вимірювання у контрольного індивіда (або декількох контрольних індивідів) при відсутності лікування, описаного в даній заявці. "Контрольний індивід" являє собою індивіда, що страждає на таке ж захворювання, приблизно такого ж віку і/або статі, як і індивід, що отримує лікування (для того, щоб стадії захворювання індивіда, що отримує лікування, і контрольного індивіда (індивідів) були порівнянними).

Індивід (також називаний «пацієнтом» або «суб'єктом»), що отримує лікування, являє собою індивіда (плід, немовля, дитину, підлітка або дорослу людину), який має захворювання або має ймовірність розвитку захворювання. Такий індивід може мати залишкову ендегенну експресію і/або активність лізосомальних ферментів, або вимірювана активність ендегенних

лізосомальних ферментів може бути відсутньою. Наприклад, індивід, що має синдром Санфіліппо типу А. може мати рівень експресії HNS, який становить менше 30-50 %, менше приблизно 25-30 %, менше приблизно 20-25 %, менше приблизно 15-20 %, менше приблизно 10-15 %, менше приблизно 5-10 %, менше приблизно 0,1-5 % від нормального рівня експресії HNS.

Імунна толерантність

Як правило, інтратекальне введення терапевтичного агента (наприклад, заміщуючого ферменту) відповідно до даного винаходу не викликає тяжких побічних ефектів у суб'єкта. У даній заявці тяжкі побічні ефекти включають, але не обмежені перерахованим: суттєву імунну відповідь, токсичність або смерть. У даній заявці термін «суттєва імунна відповідь» належить до тяжких або серйозних форм імунних відповідей, таких як адаптивна Т-клітинна імунна відповідь.

Таким чином, у багатьох варіантах реалізації, способи відповідно до даного винаходу не включають проведення супутньої імунопригнічуючої терапії (тобто будь-якої імунопригнічуючої терапії, яка використовується як попереднє лікування/попередня обробка або одночасно зі способом даного винаходу). У деяких варіантах реалізації, способи згідно з даним винаходом не пов'язані з індукцією імунної толерантності у суб'єкта, який проходить лікування. У деяких варіантах реалізації, способи відповідно до даного винаходу включають попереднє лікування або попередню обробку суб'єкта із застосуванням агентів, які імуносупресують Т-клітини.

У деяких варіантах реалізації, інтратекальне введення терапевтичних агентів може викликати імунну відповідь проти цих агентів. Таким чином, у деяких варіантах реалізації, може бути необхідним викликати у суб'єкта, що отримує заміщуючий фермент, толерантність до замісної ферментної терапії. Імунна толерантність може бути індукована із застосуванням різних способів, відомих у даній області. Наприклад, може бути призначений початковий 60-денний режим приймання агента, який імуносупресує Т-клітини, такого як циклоспорин А (Csa), і антипроліферативного агента, такого як азатіоприн (Aza), у комбінації зі щотижневими інтратекальними інфузіями малих доз бажаного заміщуючого ферменту.

У комбінованому лікуванні згідно з даним винаходом можна застосовувати будь-який імуносупресуючий агент, відомий фахівцям у даній області. Такі імуносупресуючі агенти включають, але не обмежені перерахованими: циклоспорин, FK506, рапаміцин, CTLA4-Ig і агенти, що діють проти TNF, такі як етанерцепт (див., наприклад, Moder, 2000. Ann. Allergy Asthma Immunol. 84, 280-284; Nevins, 2000, Curr. Opin. Pediatr. 12, 146-150; Kurlberg et al., 2000, Scand. J. Immunol. 51, 224-230; Ideguchi et al., 2000, Neuroscience 95, 217-226; Potteret et al., 1999, Ann. N.Y. Acad. Sci. 875, 159-174; Slavik et al., 1999, Immunol. Res. 19, 1-24; Gaziev et al., 1999, Bone Marrow Transplant. 25, 689-696; Henry, 1999, Clin. Transplant. 13, 209-220; Gummert et al., 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10, 1366-1380; Q\ et al., 2000, Transplantation 69, 1275-1283). Як імуносупресуючі агенти також можна застосовувати антитіло до рецептора IL2 (альфа-субодиниці) – даклізумаб (наприклад, Zenapax™), який показав ефективність у пацієнтів після трансплантації (див., наприклад, Wiseman et al., 1999, Drugs 58, 1029-1042; Beniaminovitz et al., 2000, N. Engl. J. Med. 342, 613-619; Ponticelli et al., 1999, Drugs R. D. 1, 55-60; Berard et al., 1999, Pharmacotherapy 19, 1127-1137; Eckhoff et al., 2000, Transplantation 69, 1867-1872; Ekberg et al., 2000, Transpl. Int. 13, 151-159). Інші імуносупресуючі агенти включають, але не обмежені перерахованими, ліганди, що діють проти CD2 (Branco et al., 1999, Transplantation 68, 1588-1596; Przepiorka et al., 1998, Blood 92, 4066-4071), проти CD4 (Marinova-Mutafchieva et al., 2000, Arthritis Rheum. 43, 638-644; Fishwild et al., 1999, Clin. Immunol. 92, 138-152) і проти CD40 (Hong et al., 2000, Semin. Nephrol. 20, 108-125; Chirmule et al., 2000, J. Virol. 74, 3345-3352; Ito et al., 2000, J. Immunol. 164, 1230-1235).

Введення

Способи згідно з даним винаходом передбачають як однократне, так і множинне введення терапевтично ефективної кількості терапевтичних агентів (наприклад, заміщуючих ферментів), описаних у даній заявці. Терапевтичні агенти (наприклад, заміщуючі ферменти) можна вводити через регулярні проміжки часу, в залежності від характеру, ступеня тяжкості й стану суб'єкта (наприклад, лізосомної хвороби накопичення). У деяких варіантах реалізації, терапевтично ефективну кількість терапевтичного агента (наприклад, заміщуючого ферменту) згідно з даним винаходом можна вводити інтратекально періодично через рівні проміжки часу (наприклад, один раз на рік, один раз на півроку, один раз на п'ять місяців, один раз на три місяці, один раз на два місяці, щомісяця (один раз на місяць), раз на два тижні, щотижня).

У деяких варіантах, інтратекальне введення можна застосовувати в комбінації з іншими шляхами введення (наприклад, внутрішньовенно, підшкірно, внутрішньом'язово, парентерально, трансдермально або через слизову оболонку (наприклад, перорально або назально)). У деяких варіантах реалізації, такі інші способи введення (наприклад,

внутрішньовенне введення) можуть здійснюватися не частіше ніж раз на два тижні, один раз на місяць, один раз на два місяці, один раз на три місяці, один раз на чотири місяці, один раз на п'ять місяців, один раз на шість місяців, щорічно.

У даній заявці термін «терапевтично ефективна кількість» в основному визначають на основі загальної кількості терапевтичного агента, який міститься в фармацевтичній композиції згідно з даним винаходом. Як правило, терапевтично ефективна кількість є достатньою для досягнення значущого сприятливого ефекту у суб'єкта (наприклад, лікування, модуляція, виліковування, запобігання і/або покращення розглянутого захворювання або патологічного стану). Наприклад, терапевтично ефективна кількість може являти собою кількість, достатню для досягнення бажаного терапевтичного і/або профілактичного ефекту, наприклад, кількість, достатню для модуляції лізосомних рецепторів, ферментів або їхньої активності, для лікування лізосомної хвороби накопичення або її симптомів (наприклад, зменшення або усунення наявності чи поширення «смугастих тілець» або клітинної вакуолізації після введення композиції згідно з даним винаходом суб'єктові). Як правило, кількість терапевтичного агента (наприклад, рекомбінантного лізосомального ферменту), який вводиться суб'єктові, що цього потребує, буде залежати від характеристик суб'єкта. Такі характеристики включають стан, ступінь тяжкості захворювання, загальний стан здоров'я, вік, стать і масу тіла суб'єкта. Фахівець у даній області зможе легко визначити потрібні дозування в залежності від цих та інших факторів. Крім того, можна застосовувати як об'єктивні, так і суб'єктивні тести для визначення оптимального діапазону дози.

Терапевтично ефективну кількість зазвичай вводять, використовуючи введення, яке включає множину однократних доз. Для будь-якого конкретного терапевтичного білка терапевтично ефективна кількість (і/або відповідна доза в межах ефективного режиму введення) може варіювати, наприклад, у залежності від шляху введення, комбінації з іншими фармацевтичними засобами. Крім того, конкретна терапевтично ефективна кількість (і/або доза) для кожного конкретного пацієнта може залежати від різних факторів, у тому числі від конкретного розладу, який лікують, і тяжкості захворювання; активності конкретного застосовуваного фармацевтичного засобу; конкретної застосовуваної фармацевтичної композиції, віку, маси тіла, загального стану здоров'я, статі й раціону пацієнта, часу введення, шляху введення і/або швидкості виведення або метаболізму конкретного застосовуваного гібридного білка, тривалості лікування та інших подібних факторів, добре відомих фахівцям у області медицини.

У деяких варіантах реалізації, терапевтично ефективна доза перебуває в діапазоні від приблизно 0,005 мг/кг ваги головного мозку до 500 мг/кг ваги головного мозку, наприклад, від приблизно 0,005 мг/кг ваги головного мозку до 400 мг/кг ваги головного мозку, від приблизно 0,005 мг/кг ваги головного мозку до 300 мг/кг ваги головного мозку, приблизно від 0,005 мг/кг ваги головного мозку до 200 мг/кг ваги головного мозку, приблизно від 0,005 мг/кг ваги головного мозку до 100 мг/кг ваги головного мозку, приблизно від 0,005 мг/кг ваги головного мозку до 90 мг/кг ваги головного мозку, приблизно від 0,005 мг/кг ваги головного мозку до 80 мг/кг ваги головного мозку, приблизно від 0,005 мг/кг ваги головного мозку до 70 мг/кг ваги головного мозку, приблизно від 0,005 мг/кг ваги головного мозку до 60 мг/кг ваги головного мозку, приблизно від 0,005 мг/кг ваги головного мозку до 50 мг/кг ваги головного мозку, приблизно від 0,005 мг/кг ваги головного мозку до 40 мг/кг ваги головного мозку, приблизно від 0,005 мг/кг ваги головного мозку до 30 мг/кг ваги головного мозку, приблизно від 0,005 мг/кг ваги головного мозку до 25 мг/кг ваги головного мозку, приблизно від 0,005 мг/кг ваги головного мозку до 20 мг/кг ваги головного мозку, приблизно від 0,005 мг/кг ваги головного мозку до 15 мг/кг ваги головного мозку, приблизно від 0,005 мг/кг ваги головного мозку до 10 мг/кг ваги головного мозку.

У деяких варіантах реалізації, терапевтично ефективна доза більша ніж приблизно 0,1 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 0,5 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 1,0 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 3 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 5 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 10 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 15 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 20 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 30 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 40 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 50 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 60 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 70 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 80 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 90 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 100 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 150 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 200 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 250 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 300 мг/кг ваги

головного мозку, більша ніж приблизно 350 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 400 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 450 мг/кг ваги головного мозку, більша ніж приблизно 500 мг/кг ваги головного мозку.

- У деяких варіантах реалізації, терапевтично ефективні дози також можуть бути визначені в мг/кг ваги тіла. Як зрозуміло фахівцям в даній області, вага мозку і вага тіла можуть корелювати. Dekaban AS. "Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights," Ann Neurol 1978; 4:345-56. Таким чином, у деяких варіантах реалізації, дозування можуть бути перетворені, як показано в Таблиці 4.

Таблиця 4

Перетворення дозувань

Кореляція між вагою головного мозку, вагою тіла і віком у чоловіків		
Вік (роки)	Вага головного мозку (кг)	Вага тіла (кг)
3 (31-43 місяців)	1,27	15,55
4-5	1,30	19,46

У деяких варіантах реалізації, терапевтично ефективні дози також можуть бути визначені в мг/15 см³ СМР. Як зрозуміло фахівцям в даній області, терапевтично ефективні дози, розраховані на основі ваги головного мозку і ваги тіла, можуть бути перетворені в мг/15 см³ СМР. Наприклад, об'єм СМР у дорослої людини становить приблизно 150мл (Johanson CE, et al. "Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease," Cerebrospinal Fluid Res. 2008 May 14;5:10). Таким чином, ін'єкція в дозі від 0,1 мг до 50 мг білка для дорослої людини буде становити приблизно від 0,01 мг/15 см³ СМР (0,1 мг) до 5,0 мг/15 см³ СМР (50 мг) дорослої людини.

Слід також розуміти, що для будь-якого конкретного суб'єкта конкретні режими введення повинні бути скоректовані з часом відповідно до індивідуальних потреб і думки фахівця або особи, що здійснює контроль над проведенням замісної ферментної терапії, і діапазони дозувань, установлені в даному документі, наведені тільки для прикладу й не призначені для обмеження об'єму або обмеження здійснення на практиці заявленого винаходу.

Набори

Даний винахід також передбачає набори або інші вироби, які містять склад згідно з даним винаходом та інструкції з його відновлення (якщо склад ліофілізований) і/або застосування. Набори або інші вироби можуть містити контейнер, ПІДЛЗ, катетер і будь-які інші вироби, пристрої або устаткування, застосовні для інтратекального введення й пов'язаних із ним операцій. придатні контейнери включають, наприклад, пляшки, флакони, шприци (наприклад, попередньо заповнені шприци), ампули, картриджі, резервуари або шприци «lyo-jects». Контейнер може бути виготовлений з різних матеріалів, таких як скло або пластик. У деяких варіантах реалізації, контейнер являє собою попередньо заповнений шприц. придатні попередньо заповнені шприци включають, але не обмежені перерахованим: шприци з боросилікатного скла з термічно обробленим силіконовим покриттям, шприци з боросилікатного скла з нанесеним шаром силікону або пластикові шприци без силікону.

Як правило, контейнер може включати склад і етикетку, прикріплену або прикладену до контейнера, на якій можуть бути зазначені інструкції з відновлення і/або застосування складу. Наприклад, на етикетці може бути зазначено, що склад необхідно відновити до концентрації білка, описаної вище. Етикетка може також містити інформацію про те, для чого застосовний або призначений склад, наприклад, для ІТ-введення. У деяких варіантах реалізації, контейнер може містити одну дозу стабільного складу, який містить терапевтичний агент (наприклад, заміщуючий фермент). У різних варіантах реалізації, разова доза стабільного складу присутня в об'ємі менше 15, 10, 5,0, 4,0, 3,5, 3,0, 2,5, 2,0, 1,5, 1,0 або 0,5 мл. Крім того, контейнер, що містить склад, може являти собою флакон для багаторазового застосування, який дозволяє проводити повторні введення (наприклад, від 2-6 введень) складу. Набори або інші вироби можуть додатково включати другий контейнер, який містить придатний розчинник (наприклад, БВІ, фізіологічний розчин, буферний розчин). Після змішування з розчинником і підготовки складу кінцева концентрація білка у відновленому складі, як правило, становить не менше 1 мг/мл (наприклад, щонайменше 5 мг/мл, щонайменше 10 мг/мл, щонайменше 25 мг/мл, щонайменше 50 мг/мл, щонайменше 75 мг/мл, щонайменше 100 мг/мл). Набори або інші вироби можуть додатково включати інші речовини, бажані з комерційної точки зору і з точки зору

зручності користувача, в тому числі інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки, ПІДЛЗ, катетери, шприци і вкладиші з інструкціями з застосування.

Даний винахід буде більш зрозумілим при розгляді наступних прикладів. Приклади не повинні розглядатися як такі, що обмежують об'єм даного винаходу. Усі процитовані джерела включені за допомогою посилань.

ПРИКЛАДИ

Приклади інтратекальної доставки білка GalC

ПРИКЛАД 1: ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЛІКАРСЬКОЇ ФОРМИ GALC ДЛЯ ІНТРАТЕКАЛЬНОЇ ДОСТАВКИ

У даному прикладі описані фізико-хімічні властивості GalC, оскільки це допомагає зрозуміти її поведінку та стабільність у розчинах у різних умовах під час інтратекальної (ІТ) доставки зазначеного білка.

Серед іншого, в даному прикладі описана лікарська форма GalC, яка потрібна для успішної ІТ доставки GalC. Згідно з деякими варіантами реалізації, дана лікарська форма містить 5 мМ фосфату Na+150мМ NaCl, pH 6,0 + 0,005 % полісорбату 20. Згідно з деякими варіантами реалізації, дана лікарська форма містить < 5 мМ, < 10 мМ, < 15 мМ і < 20 мМ фосфату Na. Згідно з деякими варіантами реалізації, дана лікарська форма має pH $\geq 5,5$ і pH $\leq 7,0$ при концентрації NaCl 150 мМ.

Системи доставки на основі ФБР (фосфатного буферного розчину) з різною молярною концентрацією фосфатів і pH тестували на дорослих довгохвостих макаках (Фігура 3). Розчини з 5 мМ фосфату й pH у діапазоні 5,5-7,0 не чинили ніякої небажаної дії, а розчини з 20 мМ фосфату й pH у діапазоні 7,0-7,5 і з 10-20 мМ фосфату й pH 7,5-8,0 чинили небажану дію на мавп (Фігура 3). Термостабільність hGalC (1 мг/мл) у буфері з 3 мМ цитрату, фосфату й борату з 50 мМ NaCl досліджували як функцію pH у діапазоні pH 5,0-8,0 (Фігура 4). Питому активність hGalC вимірювали в початковому стані (20-25 °C) і після 2 тижнів зберігання при 40 °C, причому максимальна питома активність зберігалася при pH 6,0-6,5 (Фігура 4). Крім того, питому активність hGalC вимірювали після 3 місяців зберігання при 5 °C, максимальна питома активність зберігалася при pH 6,0-6,5 (Фігура 5). Температуру плавлення hGalC вимірювали як функцію pH (Таблиця 5), а також вимірювали в незалежності від інших параметрів у різних лікарських формах (Таблиця 6).

Таблиця 5:

Температура плавлення hGalC (1 мг/мл) як функція pH

pH універсального буфера	Тпл. (°C)
4.5*	61.6
5.0*	63.0
6.0	60.8
6.5	58.9
7.0	57.3
7.5	56.5

*[GalC] < 1 мг/мл внаслідок осадження

Таблиця 6:

Температура плавлення hGalC (1 мг/мл) у різних лікарських формах

Лікарська форма (pH 6,0)	Tm (°C)
5 мМ фосфату, 50 мМ NaCl	61,6
5 мМ фосфату, 150 мМ NaCl	60,2
5 мМ фосфату, 500 мМ NaCl	59,5
5 мМ фосфату, 5 % декстроза	63,8
5 мМ фосфату, 150 мМ NaCl, 1 % NaTC	56,8

Також термостабільність hGalC, яка визначається за питоною активністю hGalC приблизно після 3 тижнів зберігання при 5 °C і після 2 тижнів зберігання при 40 °C, оцінювали як функцію концентрації солей (Фігура 6). Результати показали, що hGalC зберігає максимальну питому

активність після 3 тижнів зберігання при 5 °C при різних концентраціях солі в діапазоні від 5 мМ фосфату, 50 мМ NaCl (у даній заявці скорочено позначається як 5 + 50) до 50 мМ фосфату, 150 мМ NaCl (у даній заявці скорочено позначається як 50 + 150) при pH 6,5 (Фігура 6).

Аналіз hGalC методом осадження

Визначення швидкості осадження являє собою спосіб аналітичного ультрацентрифугування (АУЦ), при якому вимірюють швидкість, з якою молекули переміщуються у відповідь на відцентрову силу, що генерується в центрифугі, і даний спосіб корисний для визначення асоційованого стану білка в розчині. У першому циклі визначення швидкості осадження застосовували серію розведень GalC людини в 5 мМ фосфаті Na, pH 6,0 з 150 мМ NaCl (Фігура 7), щоб оцінити в зазначеній пробі самоасоціацію і/або неідеальність. Для зазначеної серії розведень будували нормовані $g(s^*)$ графіки (залежність $g(s^*)$ від s^*) при кожній концентрації. Загальне зміщення кривих убік більш низького значення s при розведенні вказує на дисоціацію, і дана система є швидко оборотною системою, що самоасоціюється. З порівняння різних значень іонної сили (Фігура 7A, B і C) видно, що при збільшенні іонної сили набори кривих зміщуються убік більш низьких значень s , що вказує на те, що іонні взаємодії також беруть участь у процесі асоціації і що самоасоціація зменшується при більш високих концентраціях солі.

Одночасно проводили цикл осадження для GalC миші при 150 мМ NaCl і порівнювали з hGalC. З порівняння відповідних значень іонної сили (150мМ NaCl) видно, що вільна енергія самоасоціації mGalC нижча, ніж енергія самоасоціації hGalC. Криві на Фігурі 7 обрізали на рівні приблизно 20S, щоб більш чітко показати дисоціацію; однак, коли зазначені цикли аналізували з використанням аналізу широкого розподілу (АШР), а результати будували у вигляді графіків на логарифмічній шкалі, можна було явно побачити більші агрегати ($s^* > 20S$). Агрегація з утворенням великих олігомерів (Фігура 8) особливо чітко видима при 50 мМ NaCl, трохи менш виражена - при 10 мМ NaCl і значно знижується, але все ще є - при 500 мМ NaCl при pH 6,0. Крива АШР для максимальної концентрації для кожного зі значень іонної сили представлена на Фігурі 8.

Самоасоціація є універсальному буфері при pH 6,0

При зазначених умовах в універсальному буфері самоасоціація, очевидно, має ту ж величину, що й у фосфатному буфері, pH 6,0, що видно на Фігурі 9, Також вивчалася дія pH на енергетику самоасоціації hGalC в універсальному буфері. Серійне розведення проводили при pH 4,5; 5,0; 6,0; 6,5; 7,0 і 7,5. Проби при pH 4,5 і 5,0 були нерозчинними і по суті 100 % hGalC осаджувалося, і в надосадовій рідині нічого не виявлялося.

Вплив pH чітко проілюстрований на Фігурі 10, де найменший ступінь самоасоціації спостерігається при pH 7,5, а значна самоасоціація спостерігається при pH 6,0. Ця тенденція аналогічна тому, що спостерігалось при різних значеннях іонної сили при більш високому pH. Підвищення і іонної сили, і pH призводить до зміщення рівноваги убік більш дрібних олігомерів при максимальній концентрації (приблизно при 1,0 мг/мл для всіх). Зниження концентрації за допомогою серійних розведень 1/3 (див. Фігуру 7) призводить до зміщення рівноваги в найменших молекулах, які, очевидно, мають коефіцієнт седиментації близько 5,2S. Пік, який з'являється приблизно на 10-13S, ймовірно відповідає тетрамеру типу 5S. Спроби апроксимації зазначених даних моделлю самоасоціації дотепер не закінчилися успіхом, ймовірно внаслідок внутрішньої мікрогетерогенності, яка виникає через змінний ступінь глікозилювання.

Самоасоціація в універсальному буфері при pH 6,0

Проби, які піддали впливу, та початкові проби GalC при 5 мМ Na фосфату, pH 6,0, з 150 мМ NaCl порівнювали в експерименті з серійними розведеннями (червоний→синій→зелений→чорний). Результати для найменшої концентрації (чорний) -0,03 мг/мл згладжували, тому зазначена крива виглядає менш шумною. У пробі, яку піддали впливу, є присутнім агрегат із розміром приблизно $\ln(s^*) = 3,0$ (~20S), тобто він присутній у значно більш високій концентрації, ніж у початковій пробі. Він становить майже постійну фракцію зазначеної проби, на що вказує збереження при розведенні на нормованих графіках (Фігура 11, Фігура 12, Фігура 13). Отже, він є необоротним агрегатом із молярною масою 500 кД/моль.

hGalC з таурохлоратом у розчині

У таурохлораті натрію (NaTC) (1 %) самоасоціація значно зменшується. Основна границя зміщується убік більш низьких значень s , і пригнічується більш висока олігомеризація (Фігура 14).

hGalC з 5 % декстозою

Додавання 5 % декстози до GalC в 5мМ Na фосфаті, pH 6,0, призводило до утворення великих агрегатів (Фігура 15). Пік на 18S відповідає мінімальній молярній масі приблизно 440 кДа, а пік на 56S відповідає мінімальній молярній масі 2,4 кДа, причому «хвіст» піка поширюється за 150S, що відповідає молярним масам більше 10,0 МДа. При розведенні від 1,0

до 0,3 мг/мл зазначений характер кривої змінюється дуже незначно, що вказує на те, що утворення даних олігомерів в основному необоротне в часовій шкалі експерименту з осадженням, тобто в періоді 5-6 годин.

Власна флуоресценція hGalC

Дослідження власної флуоресценції hGalC (із застосуванням 23 Тгр) проводили з метою оцінки впливу рН і концентрації солі на молекулярні взаємодії (Фігура 16 і Фігура 17). Молекулярні взаємодії були мінімальними (максимальна відносна флуоресценція на довжині хвилі 330 - 350 нм) або в 500 мМ NaCl, або в 1 % NaTC (Фігура 16). Спостерігалися незначні зміни вторинної структури з залежністю від рН. Осадження спостерігалось при рН 4,5 і 5,0 (Фігура 17).

Висновок

Для оцінки відносної розчинності hGalC і mGalC застосовували спосіб із застосуванням поліетиленгліколь (ПЕГ)-індукованої твердої фази (Middaugh et al., J. Biol. Chem. 1979, 254, 367-370). Зазначений спосіб дозволяє кількісно вимірювати відносну розчинність білків. Вимірювання розчинності проводили шляхом введення буферних розчинів (5 мМ фосфату натрію з 150 мМ NaCl, рН 6,0) кожної GalC до розчинів із різними концентраціями ПЕГ (10кДа). Графіки залежності логарифму розчинності білка від концентрації ПЕГ демонстрували лінійний характер. Щоб одержати умовне насичення розчину кожного білка, проводили екстраполяцію умовного насичення розчину до нульової концентрації ПЕГ. Порівняння умовного насичення розчину mGalC і hGalC не виявило ніяких відмінностей. У експериментах з оцінки розчинності hGalC після 3 тижнів зберігання при 2-8 °С (в 5мМ фосфаті натрію з різними концентраціями солі, рН 6,0-6,5) не виявлялося ні осадження, ні втрати активності. Для лікарської форми 5 мМ фосфату Na + 150 мМ NaCl, рН 6,0, була отримана розчинність ~30 мг/мл, і після 50 днів зберігання при 2-8 °С ніякого осаду не спостерігалось.

Дані про AUC (площа під кривою залежності) вказують на те, що «нативний» стан GalC -це залежна від концентрації оборотна асоціація з утворенням олігомерів більш високого порядку. Біофізичні дані вказують на функціональну та структурну значущість олігомерів більш високого порядку. При більш високих значеннях рН активність зберігається менш довгостроково, значення T_m є нижчим і система є більш однорідною, що визначають за AUC. У 5 мМ фосфаті натрію з 150 мМ NaCl, рН 6,0, ймовірно існує рівновага між мономерами, тримерами й олігомерами більш високого порядку. Крім того, рН не здійснює серйозного впливу на профілі AUC у діапазоні рН 6,5-7,5. У цілому, система GalC є швидко оборотною системою з високим ступенем самоасоціації в тестованих буферах.

ПРИКЛАД 2: ФАРМАКОКІНЕТИКА І РОЗПОДІЛ РАДІОАКТИВНОСТІ В ТКАНИНАХ ЩУРІВ СПРАГ-ДОУЛІ ПІСЛЯ ОДНОКРАТНОГО ІНТРАТЕКАЛЬНОГО ВВЕДЕННЯ АБО ОДНОКРАТНОЇ ВНУТРІШНЬОВЕННОЇ БОЛЮСНОЇ ІН'ЄКЦІЇ ¹²⁵I-hGalC

У даному прикладі наведені показові результати, що ілюструють фармакокінетику і розподіл ¹²⁵I-hGalC у тканинах щурів Спраг-Дулі після однократного інтратекального введення або однократної внутрішньовенної болюсної ін'єкції. Вимірювали концентрацію та вміст радіоактивності в цільній крові, сироватці, еритроцитах, спинно-мозковій рідині (СМР) та тканинах і за отриманим даними проводили фармакокінетичний аналіз без компартментів. Були вибрані інтратекальний і внутрішньовенний шляхи введення, оскільки вони є передбачуваними шляхами введення у людини. Рівень доз вибирали на основі потенційного впливу у людини, існуючих даних про токсичність та фармакокінетику і на основі деяких обмежень, що накладаються тестованою речовиною. Для дослідження вибрали щурів, оскільки вони є загальноприйнятим видом для досліджень фармакокінетики й розподілу в тканинах. Кількість тварин, застосовуваних у даному дослідженні, була мінімальною необхідною для адекватної оцінки очікуваної варіабельності в кожний момент часу й для вирішення експериментальних завдань.

Матеріали і методи

Система для проведення досліджень

82 самці щурів Спраг-Дулі (*Rattus norvegicus*) були отримані від компанії «Charles River Canada Inc.» (Сент-Констант, Квебек, Канада) 15 квітня 2009 р. На початку лікування вік тварин становив приблизно 10-11 тижнів. Ще 9 самців щурів були отримані від компанії «Charles River Canada» 28 квітня 2009 р.; вік зазначених тварин становив приблизно 9 тижнів після прибуття; їх наявність була потрібна, щоб забезпечити достатню кількість канюльованих тварин для завершення введення препарату в дослідженні.

Маса тіла самців щурів на початку лікування варіювала в діапазоні від 342 до 453 г. Маса тіла всіх самців щурів, за винятком одного, при введенні препарату виходила за межі діапазону, установленого в протоколі (250-350 г), однак визнали, що це незначне відхилення не повинне

вплинути на одержувані дані, оскільки тварини були здорові, а доза, яку вводили, ґрунтувалася на реальній масі тіла.

Вміст тварин

Після прибуття до PCS-MTL усіх тварин піддавали загальному фізикальному огляду, який проводив кваліфікований член ветеринарної бригади. У тварин, що надійшли, не виявили ніяких значущих аномалій. Тварин розміщали окремо в клітках із нержавіючої сталі з дном із дрової сітки й автоматичним клапаном подачі води. Програма покращення середовища відповідала належній стандартній операційній процедурі. На кожній клітці було чітке маркування з кольоровим кодуванням дослідження, групи, номерів і статі тварин. Кожну тварину однозначно ідентифікували з використанням системи для татування AIMS®. Умови навколишнього середовища під час проведення дослідження перебували під контролем, і цільова температура й вологість становили 19-25 °C і 30-70 % відповідно. Світловий період становив 12 годин світла та 12 годин темряви за винятком тих випадків, коли його переривали у зв'язку з запланованими діями.

Рацион

Усі тварини мали вільний доступ до стандартної сертифікованої гранульованої лабораторної їжі (Сертифікована їжа для гризунів 5002 PMI: «PMI Nutrition International Inc.») за винятком часу проведення призначених процедур. Максимально допустиму концентрацію домішок у раціоні (наприклад, важких металів, афлатоксину, органічних фосфатів, хлоропідних вуглеводнів, поліхлорованих біфенілів) контролювали виробники і проводили її стандартний аналіз. Воду з міського водопроводу, придатну для споживання людьми (профільтровану через бактеріостатичний полікарбонатний фільтр із діаметром пор 0,5 мкм), тварини одержували в необмеженій кількості за винятком моментів часу, коли проводилися призначені процедури. Припускалося, що серед речовин, які надходять із їжею, немає відомих домішок, які могли б перешкоджати досягненню цілей даного дослідження.

Акліматизація та рандомізація

Між надходженням тварин і проведенням операції з установки інтратекального катетера проходило щонайменше 6 днів (для тварин, які надійшли 15 квітня 2009 р.) або 3 дні (для тварин, які надійшли 28 квітня 2009 р.), що забезпечувало акліматизацію тварин до фізичних умов та умов навколишнього середовища. Під час періоду акліматизації всіх тварин зважували й рандомізували на основі комп'ютерної процедури рандомізації. Рандомізацію проводили після поділу на категорії за масою тіла. Тварин із крайніми значеннями маси тіла до груп не розподіляли.

Тварин розподілили до груп дослідження наступним чином:

Таблиця 7

Номер групи	Шлях введення і доза		Передбачуваний об'єм введення		Номер тварини
	Внутрішньовенний	Інтратекальний	Внутрішньовенний (мл/кг)	Інтратекальний (мл)	Самці
1	-	60 мкг	-	0,02	1001-1024
2	1 мг/кг	-	3,33	-	2001-2024
3 ^a	1 мг/кг	60 мкг	3,33	0,02	3001-3024

^a В/в препарат вводили в межах 5 хвилин від моменту інтратекального введення препарату.

Кожний щур у групах 1 і 2 одержував номінальну дозу радіоактивної речовини приблизно 3 мкКюрі/тварина. Кожний щур у групі 3 одержував номінальну дозу радіоактивної речовини приблизно 6 мкКюрі/тварина.

Лікарська форма для інтратекального введення

Лікарську форму для інтратекального введення готували в день першого введення інтратекальної дози. Відміряли необхідну кількість розчину ¹²⁵I-hGalC і додавали до необхідної кількості розчину hGalC без мітки. Додавали відміряний об'єм основи і всю суміш акуратно перемішували. Готували розчин із концентрацією 3 мг/мл і з цільовим рівнем радіоактивності приблизно 150 мкКюрі/мл. Одержувану лікарську форму фільтрували через фільтр із низьким зв'язуванням білків (фільтрувальна установка GV PVDF 0,22 мкм) до стерильної посудини і зберігали в холодильнику (2-8 °C), захищаючи від дії світла, до моменту застосування для введення.

Лікарська форма для внутрішньовенного введення

Лікарську форму для внутрішньовенного введення готували в день першого введення внутрішньовенної дози. Відміряли необхідну кількість розчину ^{125}I -hGalC і додавали до необхідної кількості розчину hGalC без мітки. Додавали відміряний об'єм основи і всю суміш акуратно перемішували. Готували розчин з концентрацією 0,3 мг/мл і з цільовим рівнем радіоактивності приблизно 3 мкКюрі/мл. Одержувану лікарську форму фільтрували через фільтр із низьким зв'язуванням білків (фільтрувальна установка GV PVDF 0,22 мкм) до стерильної посудини та зберігали в холодильнику (2-8 °C), захищаючи від дії світла, до моменту застосування для введення.

Аналіз лікарських форм

Кожну лікарську форму з радіоактивною міткою аналізували в лабораторії PCS-MTL у кожний із днів введення препарату методом рідинної сцинтиляційної спектроскопії з метою визначення концентрації радіоактивної речовини до лікування та після лікування. Концентрацію радіоактивної речовини визначали шляхом готування відповідних розведень зазначеної лікарської форми в основі та аналізували аліквоти кожного розведення в подвійному екземплярі. Після завершення аналізу (включаючи повторний аналіз) лікарські форми, що залишилися, викидали.

Розрахунки питомої активності тестованого препарату

Питому активність тестованого препарату в лікарській формі розраховували за середнім (перед введенням і після введення) вимірюваним рівнем радіоактивності й загальною масою тестованого препарату (на основі запропонованої концентрації) в лікарській формі.

Клінічне спостереження

Усіх тварин оглядали два рази на день для оцінки смертності й погіршення стану здоров'я, а також для виявлення реакцій на лікування в період акліматизації та в періоди лікування, за винятком днів прибуття й закінчення дослідження, у які тварин оглядали один раз на день. Один раз на тиждень проводили розширені обстеження.

Маса тіла

Масу тіла окремих тварин вимірювали один раз під час акліматизації, перед операцією і за один день до введення препарату. Повідомлялася тільки маса тіла, зареєстрована за один день до введення препарату.

Операція

Між надходженням тварин і операцією проходило щонайменше 6 днів (або 3 дні для 9 додаткових тварин), щоб тварини встигнули адаптуватися до умов навколишнього середовища в лабораторії. Усім тваринам, включаючи резервних тварин, робили внутрішньом'язову ін'єкцію антибіотика бензатин-пеніциліну G + прокаїн-пеніциліну G в день проведення операції й повторно - через 2 дні після операції. Як правило, перед операцією і приблизно через 8 годин після першого введення, а також надалі, якщо представлялося необхідним, підшкірно вводили 0,05 мг/кг бупренорфіну. Деяким тваринам бупренорфін вводили приблизно через 6 годин, а не через 8-12 годин після першого введення. З урахуванням часу напіввиведення бупренорфіну у щурів дане відхилення від протоколу не повинне впливати на здоров'я зазначених тварин і, отже, не повинне впливати на достовірність даних, отриманих у даному дослідженні.

Тварин готували до операції, збригаючи вовну від черепа до задньо-грудного відділу шиї. Перед операцією тварин піддавали анестезії з використанням газової суміші ізофлурану/кисню й тримали під ізофлурановою анестезією протягом усього хірургічного втручання. Перед операцією і після закінчення хірургічного втручання, ще під анестезією, до кожного ока вводили м'який зволожуючий очний засіб. Перед операцією і ще два рази приблизно з 24-годинним інтервалом після першого введення кожній тварині вводили протизапальний препарат (карпрофен у дозі 5 мг/кг) за допомогою підшкірної ін'єкції.

Тварину поміщали на стереотаксичний стіл. Розріз шкіри довжиною приблизно 2 см робили, починаючи з заднього краю черепа в напрямку до шиї. М'язи в дорсальному відділі шиї розділяли, щоб дістатися до атланта-потиличної мембрани. Для більш легкого доступу до мембрани застосовували ретрактор. У атланта-потиличній мембрані робили розріз і повільно вводили інтратекальний катетер у напрямку назад доти, доки катетер не досягав положення в поперековому відділі. Надлишкову рідину видаляли з використанням ватяних паличок і висушували атланта-потиличну мембрану. Відразу ж після цього для закріплення груші катетера на мембрану наносили клейку речовину. Коли клей підсихав і катетер був міцно закріплений, ретрактор забирали. Робили невелику петлю для закріплення катетера на черепі, а грушу катетера фіксували швом з матеріалу, що не розсмоктується. Коли катетер був закріплений, його проводили через поперековий відділ дорсально, де робили розріз, щоб установити порт доступу. Його фіксували до зазначеного місця швом з матеріалу, що не розсмоктується.

Перед зашиванням м'язів шиї рану промивали 2 мл теплої фізіологічного розчину (тобто приблизно 37,5 °C). М'язи зашивали з використанням простих вузлових швів з матеріалу, що розсмоктується. Область розташування порту доступу промивали 2 мл теплої фізіологічного розчину і шкіру зашивали з використанням безперервного підшкірного шва з матеріалу, що розсмоктується. Після операції й один раз на день надалі на операційне поле наносили мазь із антибіотиком доти, доки в цьому не відпадала необхідність.

Мертвий об'єм катетера й порту доступу визначали під час операції. Прохідність катетера перевіряли один раз під час передлікувального періоду, який триває від дня операції до дня введення препарату.

Лікування

Між хірургічною установкою катетера/порту доступу й початком лікування проходило щонайменше 7 днів, щоб відбулося адекватне відновлення. Перед інтратекальним введенням препарату за необхідності область розташування порту доступу голили. Ділянку проколу мили хлоргексидинуглюконатом та водою і протирали його марлею, змоченою в стерильній воді, після чого три рази протирали 10 % повідон-йодом. Порт доступу проколювали голкою, приєднаною до дозувального шприца, і повільно вводили досліджуваний препарат. Після введення ділянку протирали йодом, щоб обмежити забруднення.

У 1-ий день дослідження тваринам групи 1 вводили складену, як зазначено форму ^{125}I -hGalC шляхом повільної інтратекальної болюсної ін'єкції в порт доступу, розташований під шкірою в поперековому відділі, після чого порт промивали 0,04 мл фізіологічного розчину, щоб доставити цільову дозу 60 мкг/тварину і дозу радіоактивності приблизно 3 мкКюрі/тварину.

На 2-ий день дослідження тваринам групи 3 вводили складену, як зазначено форму ^{125}I -hGalC шляхом повільної інтратекальної болюсної ін'єкції в порт доступу, розташований під шкірою в поперековому відділі, після чого порт промивали 0,04 мл фізіологічного розчину, щоб доставити цільову дозу 60 мкг/тварина й дозу радіоактивності приблизно 3 мкКюрі/тварина. Під час повільної інтратекальної болюсної ін'єкції, що триває 5 хвилин, тварини групи 3 також одержували препарат внутрішньовенно через внутрішньовенний катетер у хвостовій вені (3,33 мл/кг), після чого катетер промивали 0,6 мл фізіологічного розчину, щоб доставити цільову дозу 1 мг/тварина й дозу радіоактивності приблизно 3 мкКюрі/тварина.

На 3-ий день дослідження тваринам групи 2 вводили складену, як зазначено форму ^{125}I -hGalC шляхом внутрішньовенної ін'єкції через внутрішньовенний катетер у хвостовій вені (3,33 мл/кг), після чого катетер промивали 0,6 мл фізіологічного розчину, щоб доставити цільову дозу 1 мг/тварину й дозу радіоактивності приблизно 3 мкКюрі/тварину.

Об'єм, який вводили, розраховували на основі останнього практично виміряного показника маси тіла кожної тварини. Реєстрували масу шприців, заповнених складеною, як зазначено формою ^{125}I -hGalC, а також масу порожніх шприців після введення препарату тварині. Дозу, введену кожній тварині, розраховували на основі маси нетто лікарської форми, видавленої зі шприца, і виміряної концентрації радіоактивності в дозі препарату.

Під час введення препарату поряд завжди була марля, щоб промочувати будь-які невеликі кількості лікарської форми, які витікають назад, і втрати тестованого препарату враховувалися за допомогою рідинної сцинтиляційної спектроскопії відповідно до особливого способу, застосовуваного в даному проєкті. Шприци та внутрішньовенні катетери, застосовувані при введенні складеної, як зазначено форми тестованого препарату, зберігали. Внутрішньовенні катетери й вибрані порти доступу/катетери для інтратекального введення аналізували, визначаючи рівень радіоактивності відповідно до особливого способу, застосовуваного в даному проєкті.

Відбір проб

Кров/сироватка і тканини

Термінальну пробу крові (максимально можливий об'єм) відбирали через 10 хвилин, 30 хвилин і 1, 3, 6, 24, 48 і 96 годин після введення препарату у 3 тварин/групу для груп 1 і 3. У групі 3 інтратекальне введення передувало внутрішньовенному введенню, і час відбору термінальних проб крові відрховувався від часу внутрішньовенного введення. Термінальні проби крові відбирали з черевного відділу аорти шурів (групи 1, 2 та 3 і у 3 резервних тварин), яких до цього піддали евтаназії за допомогою ізофлуранової анестезії, шляхом кровопускання з черевного відділу аорти. Приблизно 3 мл крові (групи 1, 2 і 3) переносили до відповідної пробірки з $\text{K}_3\text{-EDTA}$ для одержання проб цільної крові та зберігали на сухому льоді до обробки. Для груп 2 і 3, а також у резервних тварин ще 1,5 мл крові переносили до пробірки з цитратом натрію для оцінки протромбінового часу (ПТЧ), активованого часткового тромбoplastинового часу (АЧТЧ) і фібриногену. Проби крові зберігали на сухому льоді до проведення центрифугування при 2700 об/хв. і 4 °C протягом 15 хвилин. Проби плазми зберігали

замороженими приблизно при -80°C до транспортування й аналізу в лабораторії, призначеної заявником. Плазма, відібрана у резервних тварин, повинна була виступати в ролі порожньої проби при оцінці ПТЧ, АЧТЧ та фібриногену. У тих випадках, коли отриманого об'єму крові було недостатньо для проведення всіх оцінок (групи 1, 2 і 3), пріоритетом було визначення

5 радіоактивності в крові.

Кров, що залишилася (групи 1, 2 і 3), переносили до пробірок із активатором згортання для одержання сироватки і перед центрифугуванням крові давали згорнутися при кімнатній температурі протягом періоду приблизно 30 хвилин. Проби, відібрані при кімнатній температурі, застосовували для оцінки згортання крові від тварин, що не одержували препарат.

10 Після знекровлювання у 3 тварин/момент часу з груп 1-3 відбирали наступні тканини: жирову тканину (нирковий жир), наднирники, кісткову тканину (стегова кістка), головний мозок, очі, вуха, нирки, товсту кишку, вміст товстої кишки, печінку, легені, м'язи (скелетні), сідничний нерв, тонку кишку, вміст тонкої кишки, спинний мозок (з поперекового, грудного, шийного відділів), селезінку, шлунок, вміст шлунка, щитовидну/паращитовидну залозу, вміст сечового

15 міхура.

При заборі тканини зважували, потім обробляли й аналізували для оцінки загальної радіоактивності. Усі перераховані вище тканини, а також термінальну пробу крові й сироватки, також відбирали у резервних тварин, і застосовували їх для оцінки фонового рівня радіоактивності. Частину тушок, що залишилася, зберігали замороженими (від -10°C до -20°C) в призначеному для цього морозильнику, що забезпечувало розпад радіоактивності перед утилізацією як біологічних відходів. Тушки першої тварини для кожного моменту часу з групи 1 і 3 діставали з морозильника, розморожували, видаляли порт доступу та катетер, промивали водою й перевіряли на залишкову радіоактивність.

20

Спинномозкова рідина

25

Проби спинномозкової рідини (СМР) відбирали у всіх тварин при розтині безпосередньо перед евтаназією. Трьох тварин/момент часу з груп 1-3 піддавали евтаназії через 10 хвилин, 30 хвилин і 1, 3, 6, 24, 48 і 96 годин після введення препарату. Пробу (максимально можлива кількість) відбирали через мостомозочкову цистерну; щоб утримувати голову співвісно, потрібно було застосовувати стереотаксичний стіл. СМР переносили до плоскої пробірки й поміщали на

30

сухий лід. Частину проби (приблизно 20 мкл) обробляли й аналізували, оцінюючи загальний вміст радіоактивності. Також проби СМР відбирали у резервних тварин для визначення фонового рівня радіоактивності.

Визначення фонового рівня радіоактивності

35

Кров, сироватку й тканини, відібрані у резервної тварини, застосовували для визначення фонового рівня радіоактивності для проб крові, сироватки й тканин від тварин із груп 1, 2 і 3. СМР, відібрану у резервної тварини, застосовували для визначення фонового рівня радіоактивності для проб СМР.

Обробка проб для вимірювання радіоактивності

40

Після відбору всі проби зважували, за винятком крові, плазми, сироватки і СМР. Для всіх груп для аналізу радіоактивності брали по дві зважені аліквоти по 100 мкл цільної крові, відібраної в K_3 -ЕДТА. Осадження білків із застосуванням трихлороцтової кислоти (ТХО) у цільній крові проводили наступним чином: еквівалентний об'єм 15 % водного розчину ТХО додавали до двох зважених аліквот цільної крові по 100 мкл. Проби (100 мкл цільної крові + 100 мкл ТХО) перемішували за допомогою струшування, потім центрифугували при 4°C приблизно протягом

45

15 хвилин при 10000 об/хв. і зливали надосадову рідину до окремої пробірки. І надосадову рідину, і осад аналізували на вміст радіоактивності.

Кров для відбору сироватки витримували при кімнатній температурі приблизно протягом 30 хвилин, щоб відбулося згортання, перед тим як центрифугувати при 4°C і 2700 об/хв. (відносна відцентрова сила становить 1250) приблизно протягом 10 хвилин, щоб відокремити сироватку.

Проби сироватки потім зберігали на сухому льоді до розливання аліквот для аналізу радіоактивності (2×100 мкл відважених аліквот). Еритроцитарну масу (отриману після відділення плазми) зберігали на сухому льоді до обробки з метою аналізу радіоактивності. Сироватку, що залишилася, зберігали замороженою (від -10°C до -20°C). По дві зважені аліквоти по 100 мкл цільної крові й еритроцитів (отриманих після відділення сироватки, змішаних із еквівалентним об'ємом деіонізованої води (маса/об'єм) і гомогенізованих із використанням емульгатора Політрон) розчиняли в Солуені-350, знебарвлювали перекисом водню (30 % маса/об'єм) і змішували з рідиною для сцинтиляційного аналізу радіоактивності.

50

55

Осад, отриманий із цільної крові при обробці ТХО, розчиняли в 35 % гідроксидтетраметиламонії (ГТМА), знебарвлювали перекисом водню (30 % маса/об'єм) і змішували з рідиною для сцинтиляційного вимірювання радіоактивності. Вміст сечового міхура,

60

надосадову рідину з крові, обробленої ТХО, по дві зважені аліквоти лікарських форм (розведених) і сироватки змішували безпосередньо з рідиною для сцинтиляційного вимірювання радіоактивності. По дві зважені аліквоти СМР (приблизно 10 мкл/аліквоту) розчиняли в 35 % ГТМА перед змішуванням з рідиною для сцинтиляційного вимірювання радіоактивності.

5 Проби тканини розчиняли в 35 % ГТМА. Потім по дві аліквоти змішували безпосередньо зі сцинтилюючою рідиною перед вимірюванням радіоактивності. Вміст кишечника гомогенізували з відомим об'ємом води. По дві зважені аліквоти гомогенатів вмісту товстої кишки (ВТК), вмісту шлунка (ВШ) і вмісту тонкої кишки (ВТНК) розчиняли в 35 % ГТМА та змішували з рідиною для сцинтиляційного вимірювання радіоактивності.

10 Вимірювання радіоактивності

Вимірювання радіоактивності проводили методом рідинної сцинтиляційної спектроскопії відповідно до стандартної операційної процедури (СОП). У кожній пробі підрахунок імпульсів проводили протягом 5 хвилин або до досягнення помилки двох сигма порогу 0,1 %, в залежності від того, що наступало раніше. Усі імпульси переводили в абсолютну радіоактивність (число розпадів на хвилину) за допомогою автоматичної корекції на гасіння на основі зміщення спектра зовнішнього стандарту. Зі значень числа розпадів на хвилину для всіх проб віднімали відповідні фонові значення числа розпадів на хвилину. Після віднімання фонові активності, проби, які проявляли радіоактивність меншу від або рівну фоновим значенням, розглядали як нульові при всіх наступних маніпуляціях.

20 Аналіз даних

Концентрація радіоактивності

Усі вимірювання радіоактивності вводили до стандартної комп'ютерної програми для роботи з базами даних (Debra, версія 5.2) для розрахунків концентрації радіоактивності (число розпадів на хвилину/г і екв. маси/г) та відсотка від введеної радіоактивності в пробі. Об'ємну радіоактивність у крові, сироватці, тканинах і СМР у розпадах на хвилину/г і екв. маси/г розраховували на основі вимірюваної питомої активності (число розпадів на хвилину/г або відповідні одиниці маси) тестованого препарату з радіоактивною міткою в розчинах лікарської форми. Об'ємну радіоактивність у пробах крові переводили в екв. мас/мл на основі щільності крові щурів. Загальний вміст у тканинах розраховували для повної маси органів.

30 Фармакокінетика

Фармакокінетичний (ФК) профіль загальної радіоактивності в крові, сироватці, СМР і тканинах досліджували з використанням аналізу без розділення на компартменти і при цьому аналізували залежність концентрації від часу з використанням комп'ютерної програми, що пройшла валідацію (Winnonlin, версія 3.2, «Pharsight Corp.», Маунтін-В'ю, Каліфорнія, США). Моделі вибирали на основі внутрішньовенного і позасудинного шляху введення. Значення концентрації, зафіксовані як такі, що не детектуються, або такі, що не піддаються кількісному визначенню, не оцінювали; їх обробляли як відсутні проби. У кожний момент часу дані про концентрації одержували на різних тваринах і для генерації складеного фармакокінетичного профілю застосовували середні значення.

40 Відбір проб через 10 хвилин у групі 1 (тварини № 1001, 1002, 1003) і групі 2 (тварини №2001, 2002, 2003), а також відбір проб через 48 годин у групі 1 (тварини № 1019, 1020) зробили з відхиленням більше ніж на 10 % або 6 хвилин від номінального моменту часу. Зазначене відхилення від протоколу не вплинуло на достовірність дослідження або отриманих даних, оскільки при аналізі фармакокінетики розраховували й застосовували середній час.

45 Площу під кривою залежності концентрації радіоактивності від часу (AUC) розраховували з використанням лінійного методу трапецій (лінійної інтерполяції). На практиці фазу кінцевого виведення в профілі ФК визначали на основі лінії найкращої відповідності (R^2), застосовуючи щонайменше три кінцеві спостережувані значення концентрацій. Нахил фази кінцевого виведення розраховували на основі логарифмічної регресії з застосуванням незважених значень концентрацій. Параметри, основані на визначенні k_{el} не наводилися, якщо коефіцієнт змішаної кореляції (R^2) був меншим за 0,8 або якщо екстраполяція AUC до нескінченності давала більше ніж 20 % від загальної площі.

Результати

Аналіз лікарських форм (Таблиця 8)

55 У кожний із днів введення препарату аліквоти кожної лікарської форми аналізували методом рідинної сцинтиляційної спектроскопії до введення препарату всім групам та після введення, і в ході зазначеного аналізу розраховували питому активність тестованої речовини. Сумарна середня концентрація радіоактивності ($\pm$ СВ) в лікарській формі для інтратекального введення становила для групи 1 - $345,4 \times 106 \pm 4,92 \times 106$ розпадів на хвилину/г (155,60 мкКюрі/г), а для групи 3 - $334,4 \times 106 \pm 5,87 \times 106$ розпадів на хвилину/г (150,62 мкКюрі/г). Сумарна середня

- 5 концентрація радіоактивності в лікарській формі для внутрішньовенного введення становила для групи 2 - $4,4 \times 106 \pm 4,22 \times 105$ розпадів на хвилину/г (1,97 мкКюрі/г), а для групи 3 - $4,7 \times 106 \pm 2,31 \times 105$ розпадів на хвилину/г (2,11 мкКюрі/г). Розрахункова питома активність тестованої речовини в лікарській формі для інтратекального введення склала 51,16 мкКюрі/мг для дози в групі 1 і 49,53 мкКюрі/мг для дози в групі 3. Розрахункова питома активність тестованої речовини в лікарській формі для внутрішньовенного введення склала 6,53 мкКюрі/мг для дози в групі 2 і 6,99 мкКюрі/мг для дози в групі 3.

Таблиця 8:

Підсумкові результати оцінки концентрації радіоактивності в лікарських формах методом рідинної сцинтиляційної спектроскопії

№ групи	Шлях введення	Відбір проб	Середня концентрація радіоактивності		
			(число розпадів на хвилину/г)		(мкКюрі/г)
			Середнє $\pm$ СВ	КВ	Середнє
1	Інтратекально	До введення	348445137 $\pm$ 3391878	0,97 %	156,96
		Після введення	342426851 $\pm$ 4484476	1,31 %	154,25
		Сумарно	345435994 $\pm$ 4924300	1,43 %	155,60
2	Внутрішньовенна болюсна ін'єкція	До введення	4091887 $\pm$ 61669	1,51 %	1,84
		Після введення	4672629 $\pm$ 430335	9,21 %	2,10
		Сумарно	4382258 $\pm$ 421765	9,62 %	1,97
3	Інтратекально	До введення	332418463 $\pm$ 3013337	0,91 %	149,74
		Після введення	336332353 $\pm$ 7582128	2,25 %	151,50
		Сумарно	334375408 $\pm$ 5868250	1,75 %	150,62
3	Внутрішньовенна болюсна ін'єкція	До введення	4E27255 $\pm$ 92785	1,92 %	2,17
		Після введення	4545578 $\pm$ 247903	5,45 %	2,05
		Сумарно	4686417 $\pm$ 231271	4,93 %	2,11

- 10 Маса тіла тварин і доза, яку вводили (Таблиця 9)
- 15 Середня маса тіла щурів у групах 1, 2 і 3 за один день до введення препарату становила 405 г (розкид 373 г - 452 г), 410 г (розкид 367 г - 453 г) і 395 г (розкид 342 г - 444 г) відповідно. Розрахункова середня доза ^{125}I -hGalC, яку вводили інтратекально тваринам із групи 1, склала $41 \pm 0,014$ мкг/тварина, що було еквівалентно дозі радіоактивної речовини $2,12 \pm 0,72$ мкКюрі/тварина. Середня доза I-hGalC, яку вводили внутрішньовенним шляхом тваринам із групи 2, склала $1,00 \pm 0,02$ мкг/тварина ($2,69 \pm 0,14$ мкКюрі/тварина). Для групи 3 розрахункова середня доза ^{125}I -hGalC, яку вводили інтратекально і внутрішньовенно, склала $1,08 \pm 0,04$ мкг/тварина ($5,72 \pm 0,31$ мкКюрі/тварина).

Таблиця 9

Середня в групі маса тіла і вказівка доз ^{125}I -hGalC, які вводили самцям щурів Спраг-Дулі

Група	Маса тіла (кг)	Шлях введення	Радіоактивність					
			Розпадів на хвилину/г	мкКюрі/тварина	мкКюрі/кг	мг/тварина	мг/кг	Мкг/тварина
1	0,405±0,022	ІТ	1715057±1600366	2,12±0,72	5,26±1,86	0,041±0,014	0,102 ±0,037	41
2	0,410±0,021	ВВ	5961365±306654	2,69±0,14	6,55±0,15	0,411±0,022	1,00 ±0,023	
3 ^b	0,395±0,027	ІТ і ВВ	12698351±686160	5,72±0,31	14,5±0,62	0,425±0,034	1,08 ±0,042	

Середня доза речовини та радіоактивної речовини у щурів із групи 1 була нижчою (приблизно на 32 і 29 % відповідно), ніж цільовий рівень доз, і це є відхиленням від протоколу. Однак оскільки в усіх розрахунках застосовували реальні дози, дані більш низькі значення, як припускається, не повинні вплинути на достовірність дослідження й отриманих у ньому даних.

Клінічні спостереження

У жодного з щурів після інтратекального введення ^{125}I -hGalC у дозі 60 мкг/тварина і/або внутрішньовенного введення в дозі 1 мг/кг ніяких пов'язаних із препаратом клінічних ознак не відмічалось.

Оцінка згортання крові

У ранні моменти часу (10 хвилин і 6 годин після введення препарату) було відмічено, що кров, відібрана у тварин, які одержали препарат, протягом 30 хвилин згортається не повністю. Однак кров, відібрана у 3 резервних тварин, які не одержували препарат, згорталася легко, що вказує на певне перешкоджання процесу згортання з боку тестованої речовини. Час згортання, менший або більший за 30 хвилин, є відхиленням від протоколу. Однак для деяких проб був потрібний більш тривалий час на згортання, щоб одержати деяку кількість сироватки для аналізу. Аналіз отриманих результатів не виявив кореляції між значеннями концентрації, отриманими в сироватці, і часом, необхідним для згортання крові. Отже, такий збільшений або зменшений час згортання не впливав на достовірність дослідження й отриманих у ньому даних.

Фармакокінетика сумарної радіоактивності в крові, сироватці, еритроцитах, СМР і тканинах

Сумарна концентрація радіоактивності в крові, сироватці її еритроцитах (Таблиця 10, Таблиця 11, Таблиця 12, Фігури 18-21)

Середні концентрації речовини з радіоактивною міткою в сироватці самців щурів після інтратекального і/або внутрішньовенного введення ^{125}I -hGalC наведені в Таблиці 10. Середні концентрації речовини з радіоактивною міткою в цільній крові й еритроцитах наведені в Таблиці 11. Графічно усереднені дані представлені на Фігурі 18. Середній відсоток радіоактивності, відновленої в надосадовій рідині й осаді крові після осадження ТХО, наведені в Таблиці 12.

Група 1 (середня доза, яку вводили інтратекально, 41 мкг/тварина)

Після інтратекального введення максимальна середня концентрація (C_{max}) речовини з радіоактивною міткою в сироватці й крові спостерігалася через 3 години після введення ($0,108 \pm 0,026$ мкгекв/г і $0,093 \pm 0,023$ мкгекв/г відповідно). Рівень радіоактивності в крові залишався практично сталим від 3 до 6 годин після введення, рівень радіоактивності в сироватці дещо знижувався. Згодом концентрація радіоактивності в сироватці та крові падала і ставала нижчою від межі визначення (МВ) через 48 годин після введення препарату. Стосовно еритроцитів, C_{max} спостерігалася через 6 годин після введення і становила $0,089 \pm 0,024$ мкгекв/г. Згодом концентрація радіоактивності в еритроцитах падала й ставала нижчою від МВ через 48 годин після введення препарату. Середнє відношення радіоактивності в крові й сироватці при інтратекальному введенні було меншим за 1 протягом усього періоду дослідження (розкид від 0,7 до 0,9), що вказує на те, що речовина з радіоактивною міткою не була пов'язана головним чином з еритроцитами. Значення відношення радіоактивності в еритроцитах і сироватці (розкид від 0,8 до 0,9) також підтвердили, що радіоактивність не була пов'язана головним чином з еритроцитами. Відсоток дози, який виявляли в крові, оцінювали на основі стандартного відношення об'єму крові/маси тіла (тобто 0,64 мл/кг). При t_{max} (час, при якому має місце максимальна концентрація радіоактивності) з еритроцитами було пов'язано приблизно 6 % введеної дози.

Група 2 (середня доза, яку вводили внутрішньовенно, 1,00 мг/кг)

Після внутрішньовенного введення максимальна середня концентрація ($C_{\max}$) речовини з радіоактивною міткою в сироватці ($14,864 \pm 0,853$ мкгекв/г) і крові ($10,228 \pm 0,447$ мкг екв/г) спостерігалася через 10 хвилин після введення (тобто перший аналізований момент часу). Згодом концентрація радіоактивності в сироватці та крові повільно падала, але все ще виявлялася через 96 годин після введення (сироватка: $0,088 \pm 0,006$ мкгекв/г, 0,59 % від $C_{\max}$; кров: $0,051 \pm 0,002$ мкгекв/г, 0,50 % від $C_{\max}$), причому оцінюваний відсоток дози знижувався з 68,4 % до 0,3%. Стосовно еритроцитів, $C_{\max} = 5,136 \pm 1,529$ мкг екв/г спостерігалася через 10 хвилин після введення. Згодом концентрація радіоактивності в еритроцитах падала і ставала нижчою від МВ через 96 годин після введення препарату. Середнє відношення радіоактивності в крові й сироватці після внутрішньовенного введення було меншим за 1 протягом усього періоду дослідження (розкид від 0,6 до 0,8), що вказує на те, що речовина з радіоактивною міткою не була пов'язана головним чином з еритроцитами. Значення відношення радіоактивності в еритроцитах і сироватці (розкид від 0,4 до 0,6) також підтвердили, що радіоактивність не була пов'язана головним чином з еритроцитами.

Група 3 (доза, яку вводили інтратекально після внутрішньовенного введення: 1,08 мг/кг (сумарна доза))

Після інтратекального введення (цільова доза 60 мкг/тварина) і внутрішньовенного введення (1 мг/кг) максимальна середня концентрація ($C_{\max}$) речовини з радіоактивною міткою в сироватці ($14,675 \pm 0,810$ мкгекв/г) і крові ($9,974 \pm 0,558$ мкгекв/г) спостерігалася через 10 хвилин після введення (тобто перший аналізований момент часу). Згодом концентрація радіоактивності в сироватці й крові повільно падала, але все ще виявлялася через 96 годин після введення (сироватка: $0,077 \pm 0,010$ мкгекв/г, 0,52 % від $C_{\max}$; кров: $0,037 \pm 0,033$ мкг екв/г, 0,37 % від $C_{\max}$), причому екстрапольований відсоток дози знижувався з 32,6 до 0,1 %. Стосовно еритроцитів, $C_{\max} = 6,113 \pm 1,748$ мкгекв/г спостерігалася через 10 хвилин після введення. Згодом концентрація радіоактивності в еритроцитах падала й ставала нижчою від межі кількісного визначення через 96 годин після введення препарату. Речовина з радіоактивною міткою не була пов'язана головним чином з еритроцитами, на що вказує середнє відношення радіоактивності в крові та сироватці і середнє відношення радіоактивності в еритроцитах та сироватці, яке було меншим за 1 (варіювало від 0,7 до 0,8 і від 0,4 до 0,7 відповідно).

Таблиця 10а

Середньогрупова концентрація радіоактивності в сироватці самців щурів Спраг-Дулі після однократного інтратекального введення ^{125}I -hGalC

Група 1: При середній дозі 41 мкг/тварина		
Момент часу	Концентрація радіоактивності	
	Розпадів на хвилину/г	мкг екв/г
10 хв.	504±462	0,004±0,004
30 хв.	4125±2327	0,036±0,020
1 год.	5705±1535	0,050±0,014
3 год.	12311±2960	0,108±0,026
6 год.	11473±2596	0,101±0,023
24 год.	884±122	0,008±0,001
48 год.	0±0	0,000±0,000
96 год.	0±0	0,000±0,000

Таблиця 10б

Середньогрупова концентрація радіоактивності в сироватці самців щурів Спраг-Доулі після однократної внутрішньовенної болюсної ін'єкції ^{125}I -hGalC

Група 2: При середній дозі 1,00 мг/кг		
Момент часу	Концентрація радіоактивності	
	Розпадів на хвилину/г	мкг екв/г
10 хв.	215632±12377	14,864±0,853
30 хв.	157259±14339	10,840±0,988
1 год.	106804±6790	7,362±0,468
3 год.	47009±3754	3,240±0,259
6 год.	31898±2417	2,199±0,167
24 год.	6584±194	0,454±0,013
48 год.	3523±503	0,243±0,035
96 год.	1278±86	0,088±0,006

Таблиця 10в

Середньогрупова концентрація радіоактивності в сироватці самців щурів Спраг-Доулі після однократної інтратекальної дози та внутрішньовенної болюсної ін'єкції ^{125}I -hGalC

Група 3: При середній дозі 1,08 мг/кг		
Момент часу	Концентрація радіоактивності ^a	
	Розпадів на хвилину/г	мкг екв/г
10 хв.	227675±12574	14,675±0,810
30 хв.	171721±10165	11,069±0,655
1 год.	127621±7785	3,226±0,502
3 год.	66561±1164	4,290±0,075
6 год.	54374±4044	3,505±0,261
24 год.	8894±686	0,573±0,044
48 год.	3622±458	0,233±0,030
96 год.	1199±157	0,077±0,010

Таблиця 11а

Середньогрупова концентрація радіоактивності та вміст радіоактивності в крові й відношення радіоактивності в крові/у сироватці самців щурів Спраг-Доулі після однократного інтратекального введення ^{125}I -hGalC

Група 1: При середній дозі 41 мкг/тварина					
Момент часу	Концентрація радіоактивності ^a				
	Розпадів на хвилину/г	мкг екв/г	мкг екв/мл	Відношення в крові/у сироватці	Відсоток дози
10 хв.	210±364	0,002±0,003	0,002±0,003	0,696 ^b	0,074±0,128
30 хв.	3579±1918	0,032±0,017	0,033±0,013	0,878±0,029	1,822±0,351
1 год.	4933±1446	0,043±0,013	0,046±0,013	0,860±0,027	3,890±0,253
3 год.	10617±2586	0,093±0,023	0,098±0,024	0,862±0,006	5,582±0,554
6 год.	10530±2507	0,093±0,022	0,097±0,023	0,917±0,035	4,664±0,576
24 год.	677±118	0,006±0,001	0,006±0,001	0,764±0,032	0,600±0,114
48 год.	0±0	0,000±0,000	0,000±0,000	н/з	0,000±0,000
96 год.	0±0	0,000±0,000	0,000±0,000	н/з	0,000±0,000

Таблиця 11б

Середньогрупова концентрація радіоактивності та вміст радіоактивності в крові й відношення радіоактивності в крові/у сироватці самців щурів Спраг-Доулі після однократної внутрішньовенної болюсної ін'єкції ^{125}I -hGalC

Група 2: При середній дозі 1,00 мг/кг					
Момент часу	Концентрація радіоактивності ^a				
	Розпадів на хвилину/г	мкг екв/г	мкг екв/мл	Відношення в крові у сироватці	Відсоток дози
10 хв.	148373±6430	10,228±0,447	10,739±0,469	0,688±0,012	68,393±3,453
30 хв.	107195±5739	7,389±0,396	7,759±0,415	0,683±0,036	49,317±1,788
1 год.	77163±694	5,319±0,048	5,585±0,051	0,724±0,040	36,460±0,174
3 год.	35469±3124	2,445±0,215	2,567±0,226	0,754±0,007	16,355±1,166
6 год.	24364±1639	1,679±0,113	1,763±0,119	0,764±0,007	11,184±0,612
24 год.	4794±160	0,330±0,011	0,347±0,011	0,729±0,030	2,218±0,076
48 год.	2259±233	0,156±0,016	0,163±0,017	0,644±0,028	1,042±0,141
96 год.	738±29	0,051±0,002	0,053±0,003	0,579±0,052	0,341±0,011

Таблиця 11в

Середньогрупова концентрація радіоактивності та вміст радіоактивності в крові й відношення радіоактивності в крові/у сироватці самців щурів Спраг-Доулі після однократної інтратекальної дози і внутрішньовенної болюсної ін'єкції ^{125}I -hGalC

Група 3: При середній дозі 1,08 мг/кг					
Момент часу	Концентрація радіоактивності ^a				
	Розпадів на хвилину/г	мкг екв/г	мкг екв/мл	Відношення в крові / у сироватці	Відсоток дози
10 хв.	154742±8651	9,974±0,558	10,473±0,586	0,680±0,009	32,599±1,331
30 хв.	117563±4922	7,578±0,317	7,957±0,333	0,685±0,013	24,596±1,523
1 год.	92086±2812	5,936±0,181	6,233±0,191	0,723±0,022	19,132±1,432
3 год.	52419±244	3,379±0,016	3,548±0,016	0,788±0,017	11,283±0,344
6 год.	43097±4071	2,778±0,262	2,917±0,276	0,792±0,019	9,263±0,836
24 год.	6561±78	0,423±0,005	0,444±0,006	0,740±0,054	1,345±0,080
48 год.	2362±398	0,152±0,026	0,160±0,027	0,650±0,029	0,465±0,083
96 год.	581±513	0,037±0,033	0,039±0,035	0,684±c	0,124±0,109

Таблиця 11г

Середньогрупова концентрація радіоактивності та вміст радіоактивності в еритроцитах і відношення радіоактивності в еритроцитах/у сироватці самців щурів Спраг-Доулі після однократного інтратекального введення ^{125}I -hGalC

Група 1: При середній дозі 41 мкг/тварина ^a				
Момент часу	Концентрація радіоактивності ^a			
	Розпадів на хвилину/г	мкг екв/г	Відношення в еритроцитах/у сироватці	Відсоток дози
10 хв.	0±0	0,000±0,000	н/з	0,000±0,000
30 хв.	3044±1261	0,027±0,011	0,793±0,148	0,213±0,067
1 год.	4454±1396	0,039±0,012	0,773±0,059	0,357±0,336
3 год.	9768±2664	0,086±0,023	0,789±0,031	0,734±0,300
6 год.	10086±2682	0,089±0,024	0,876±0,083	0,616±0,200
24 год.	287±497	0,003±0,004	0,841 ^b	0,044±0,075
48 год.	0±0	0,000±0,000	н/з	0,000±0,000

Продовження таблиці 11г				
Момент часу	Концентрація радіоактивності ^a			
	Розпадів на хвилину/г	мкг екв/г	Відношення в еритроцитах/у сироватці	Відсоток дози
96 год.	0±0	0,000±0,000	н/з	0,000±0,000

Таблиця 11д

Середньогрупова концентрація радіоактивності та вміст радіоактивності в еритроцитах і відношення радіоактивності в еритроцитах/у сироватці самців щурів Спраг-Дуулі після однократної внутрішньовенної болюсної ін'єкції ¹²⁵I-hGalC

Група 2: При середній дозі 1,00 мг/кг				
Концентрація радіоактивності ^a				
Момент часу	Розпадів на хвилину/г	мкг екв/г	Відношення в еритроцитах/у сироватці	Відсоток дози
10 хв	74506±22185	5,136±1,529	0,350±0,119	4,110±2,794
30 хв.	59201±14694	4,081±1,013	0,377±0,086	2,600±1,087
1 год	52799±23155	3,639±1,596	0,487±0,196	3,229±2,403
3 год	28039±3432	1,933±0,237	0,599±0,083	1,709±0,734
6 год	19662±2540	1,355±0,175	0,616±0,057	1,143±0,315
24 год	3714±292	0,256±0,020	0,564±0,040	0,164±0,111
48 год	1619±482	0,112±0,033	0,453±0,082	0,076±0,064
96 год	0±0	0,000±0,000	н/з	0,000±0,000

Таблиця 11е

Середньогрупова концентрація радіоактивності та вміст радіоактивності в еритроцитах і відношення радіоактивності в еритроцитах/у сироватці самців щурів Спраг-Дуулі після однократної інтратекальної дози та внутрішньовенної болюсної ін'єкції ¹²⁵I-hGalC

Група:5: При середній дозі 1,08 мг/кг				
Концентрація радіоактивності ^a				
Момент часу	Розпадів на хвилину/г	мкг екв/г	Відношення в еритроцитах/у сироватці	Відсоток дози
10 хв	94843±27122	6,113±1,748	0,414±0,104	3,640±1,162
30 хв	65477±23687	4,220±1,527	0,378±0,117	2,266±1,583
1 год	61906±14623	3,990±0,943	0,489±0,130	2,253±1,300
3 год	38985±8524	2,513±0,549	0,586±0,128	0,992±0,458
6 год	37327±4497	2,406±0,290	0,685±0,038	1,479±0,417
24 год	5250±334	0,338±0,022	0,591±0,032	0,139±0,070
48 год	2109±319	0,136±0,021	0,581±0,022	0,060±0,017
96 год	0±0	0,000±0,000	н/з	0,000±0,000

Таблиця 12а

Середній відсоток радіоактивності, що відновлюється в надосадовій рідині й осаді при центрифугуванні крові, відібраної у самців щурів Спраг-Доулі після однократного інтратекального введення ^{125}I -hGalC

Група 1: При середній дозі 0,10мг/кг		
Момент часу	Відсоток радіоактивності ^а , що відновлюється	
	Осад	Надосадова рідина
10 хв.	100±0	0±0
30 хв.	75,1±10,7	24,9±10,7
1 год.	71,8±11,7	28,2±11,7
3 год.	81,2±2,38	18,8±2,38
6 год.	67,3±13,5	32,7±13,5
24 год.	100±0	0±0
48 год.	100±0	0±0
96 год.	100±0	0±0

Таблиця 12б

Середній відсоток радіоактивності, що відновлюється в надосадовій рідині й осаді при центрифугуванні крові, відібраної у самців щурів Спраг-Доулі після однократної внутрішньовенної болюсної ін'єкції ^{125}I -hGalC

Група 2: При середній дозі 1,00 мг/кг		
Момент часу	Відсоток радіоактивності ^а , що відновлюється	
	Осад	Надосадова рідина
10 хв.	99,2±0,03	0,85±0,03
30 хв.	97,5±0,32	2,48±0,32
1 год.	95,8±0,56	4,23±0,56
3 год.	92,5±0,17	7,49±0,17
6 год.	90,7±0,45	9,26±0,45
24 год.	100±0	0±0
48 год.	100±0	0±0
96 год.	100±0	0±0

Таблиця 12в

Середній відсоток радіоактивності, що відновлюється в надосадовій рідині й осаді при центрифугуванні крові, відібраної у самців щурів Спраг-Доулі після однократної інтратекальної дози та внутрішньовенної болюсної ін'єкції ^{125}I -hGalC

Група 3: При середній дозі 1,08 мг/кг		
Момент часу	Відсоток радіоактивності ^а , що відновлюється	
	Осад	Надосадова рідина
10 хв	99,0±0,11	1,02±0,11
30 хв	95,9±0,49	4,07±0,49
1 год	94,5±0,56	5,55±0,56
3 год	88,1±5,34	11,9±5,34
6 год	88,9±1,03	11,1±1,03
24 год	90,7±3,48	9,33±3,48
48 год	100±0	0±0
96 год	100±0	0±0

¹²⁵I, що осаджується, в цільній крові (Таблиця 12)

Середні значення відновлення радіоактивності в осаді й надосадовій рідині після осадження цільної крові з використанням трихлороцтової кислоти (ТХО) для груп 1, 2 і 3 наведені в Таблиці 12. При застосуванні 15% водного розчину ТХО для осадження білків у цільній крові радіоактивність виявлялася головним чином у осаді крові (в діапазоні від 100 до 67 % у групі 1; від 100 до 91 % у групі 2; від 100 до 88 % у групі 3), що вказує на те, що більша частина радіоактивності в циркулюючій крові була асоційована з білком і, отже, не відповідає вільному ^{125}I йоду.

Концентрація радіоактивності в тканинах і спинномозковій рідині (СМР) (Таблиця 13, Таблиця 14, Таблиця 15, фігури 19-30).

Середні значення концентрації радіоактивності в тканинах і СМР щурів після однократного введення дози ^{125}I -hGalC інтратекально і/або внутрішньовенно наведені в Таблиці 13. Усереднені дані графічно представлені на Фігурах 19-30. Середнє відношення радіоактивності в тканинах/у сироватці наведене в Таблиці 14, а відновлення введеної дози в тканинах. СМР, а також у вмісті шлунково-кишкового тракту й сечового міхура наведене в Таблиці 15.

Таблиця 13а

Середньогрупова концентрація радіоактивності в тканинах, спинномозковій рідині самців щурів Спраг-Дулі після однократного інтратекального введення ^{125}I -hGalC

Група 1: При середній дозі 41 мкг/тварина				
Проба	Концентрація радіоактивності, мкг екв/г ^a			
	10 хв.	30 хв.	1 год.	3 год.
Жирова тканина (жир нирок)	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,005±0,004
Наднирники	0,000±0,000	0,014±0,006	0,017±0,006	0,021±0,005
Стегнова кістка	0,000±0,000	0,011±0,006	0,016±0,005	0,040±0,012
Головний мозок	0,000±0,000	0,003±0,003	0,004±0,004	0,005±0,001
Спинномозкова рідина (СМР)	0,000 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b	0,000±0,000
Очі	0,000±0,000	0,006±0,004	0,011±0,003	0,027±0,006
Серце	0,001±0,002	0,014±0,006	0,017±0,005	0,028±0,006
Нирки	0,004±0,004	0,042±0,023	0,052±0,014	0,096±0,018
Товста кишка	0,000±0,000	0,009±0,004	0,011±0,003	0,024±0,010
Печінка	0,000±0,000	0,012±0,007	0,015±0,006	0,029±0,008
Легені	0,002±0,003	0,020±0,010	0,027±0,008	0,058±0,014
М'язи (скелетні)	0,000±0,000	0,007±0,003	0,010±0,002	0,014±0,003
Сідничний нерв	0,000±0,000	0,008±0,008	0,012±0,011	0,043±0,017
Тонка кишка	0,000±0,000	0,011±0,005	0,016±0,005	0,046±0,013
Спинний мозок (поперековий, грудний, шийний відділи)	0,000±0,000	0,004±0,004	0,006±0,002	0,009±0,001
Селезінка	0,000±0,000	0,014±0,008	0,019±0,006	0,040±0,010
Шлунок	0,003±0,002	0,022±0,010	0,037±0,017	0,203±0,101
Щитовидна/паращитовидна залоза	0,020±0,019	0,149±0,083	0,278±0,147	2,031±1,228

Проба	Концентрація радіоактивності, мкг гкв/г ^a			
	6 год.	24 год.	48 год.	96 год.
Жирова тканина (жир нирок)	0,006±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Надирники	0,020±0,002	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Стегнова кістка	0,041±0,007	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Головний мозок	0,004±0,001	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Спинномозкова рідина (СМР)	0,000 ^b	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Очі	0,024±0,003	0,001±0,001	0,000±0,000	0,000±0,000
Серце	0,026±0,004	0,001±0,002	0,000±0,000	0,000±0,000
Нирки	0,082±0,012	0,012±0,001	0,008±0,002	0,000±0,000
Товста кишка	0,024±0,003	0,002±0,002	0,000±0,000	0,000±0,000
Печінка	0,030±0,008	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Легені	0,055±0,012	0,004±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
М'язи (скелетні)	0,012±0,002	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Сідничний нерв	0,050±0,013	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Тонка кишка	0,041±0,015	0,004±0,001	0,000±0,000	0,000±0,000
Спинний мозок (поперековий, грудний, шийний відділи)	0,008±0,003	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Селезінка	0,036±0,007	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Шлунок	0,163±0,060	0,008±0,001	0,003±0,000	0,002±0,001
Щитовидна/пара щитовидна залоза	2,453±0,554	4,126±1,073	4,127±1,635	1,527±1,585

Таблиця 136

Середньогрупова концентрація радіоактивності в тканинах, спинномозковій рідині самців щурів
Спраг-Доул після однократної внутрішньовенної болюсної ін'єкції ¹²⁵I-hGalC

Група 2: При середній дозі 1,00 мг/кг				
Проба	Концентрація радіоактивності, мкг екв/г ^a			
	10 хв.	30 хв.	1 год.	3 год.
Жирова тканина (жир нирок)	0,138±0,054	0,158±0,019	0,128±0,007	0,092±0,008
Надирники	8,827±2,435	7,090±0,547	4,360±0,574	1,873±0,070
Стегнова кістка	1,568±0,013	1,584±0,223	1,286±0,166	0,887±0,090
Головний мозок	0,252±0,041	0,236±0,017	0,195±0,018	0,083±0,002
Спинномозкова рідина (СМР)	0,137±0,238	0,000±0,000	0,000 ^b	0,210±0,363
Очі	0,110±0,010	0,307±0,016	0,406±0,027	0,344±0,049
Серце	1,215±0,122	1,108±0,039	0,999±0,052	0,558±0,093
Нирки	3,027±0,330	2,072±0,139	2,288±0,149	1,657±0,190
Товста кишка	0,320±0,072	0,467±0,110	0,492±0,103	0,397±0,031
Печінка	11,335±1,436	8,688±0,788	5,904±0,367	3,590±0,192
Легені	11,584±0,906	20,529±2,125	18,436±3,906	8,526±0,815
М'язи (скелетні)	0,120±0,011	0,261±0,039	0,275±0,025	0,189 ±0,007
Сідничний нерв	0,173±0,023	0,336±0,108	0,584±0,059	0,689±0,056
Тонка кишка	0,424±0,004	0,591±0,031	0,786±0,125	0,832±0,166
Спинний мозок (поперековий, грудний, шийний відділи)	0,293±0,028	0,272±0,000	0,277±0,008	0,142±0,010
Селезінка	6,595±0,625	5,952±1,316	4,187±0,311	2,010±0,333
Шлунок	0,433±0,088	0,939±0,204	1,430±0,076	2,404 ±0,139
Щитовидна/паращитовидна залоза	4,485±1,194	22,335±2,598	37,990±11,900	147,644±56,596

Проба	Концентрація радіоактивності, мкг екв/г ^a			
	6 год.	24 год.	48 год.	96 год.
Жирова тканина (Жир нирок)	0,077±0,007	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,008
Надирники	1,213±0,031	0,339±0,033	0,142±0,013	0,074±0,010
Стегнова кістка	0,726±0,053	0,106±0,016	0,034±0,030	0,000±0,000
Головний мозок	0,066±0,009	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Спинномозкова рідина (СМР)	0,185±0,321	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Очі	0,336±0,080	0,033±0,006	0,000±0,000	0,000±0,000
Серце	0,440±0,032	0,075 ±0,011	0,040±0,002	0,000±0,000
Нирки	1,418±0,108	0,337±0,021	0,199±0,009	0,099±0,010
Товста кишка	0,376±0,077	0,054±0,009	0,026±0,003	0,000±0,000
Печінка	3,179±0,188	1,020±0,091	0,506±0,046	0,126±0,014
Легені	3,187±0,079	2,958±1,012	0,325±0,114	0,069±0,003
М'язи (скелетні)	0,153±0,018	0,00±0,014	0,000±0,000	0,000±0,000
Сідничний нерв	0,643±0,063	0,025±0,043	0,000±0,000	0,000±0,000
Тонка кишка	0,691±0,121	0,094±0,025	0,041±0,012	0,000±0,000
Спинний мозок (поперековий, грудний, шийний відділи)	0,128±0,017	0,014±0,013	0,000±0,000	0,000 = 0,000
Селезінка	1,667±0,091	0,565±0,046	0,250±0,038	0,111±0,009
Шлунок	1,638±0,310	0,180±0,057	0,047±0,005	0,015±0,013
Щитовидна/паращитовидна залоза	287,423±177,568	280,829±84,988	294,521±52,953	218,917±45,098

Таблиця 13в

Середньогрупова концентрація радіоактивності в тканинах, спинномозковій рідині самців щурів Спраг-Дуулі після однократної інтратекальної дози і внутрішньовенної болюсної ін'єкції ¹²⁵I-hGalC

Група 3: При середній дозі 1,08 мг/кг				
Проба	Концентрація радіоактивності, мкг екв/г ^a			
	10 хв.	30 хв.	1 год.	3 год.
Жирова тканина (жир нирок)	0,140±0,029	0,176±0,051	0,188±0,020	0,161±0,008
Надирники	9,567±1,678	5,487±1,129	4,368±0,930	2,010±0,331
Стегнова кістка	1,227±0,137	1,707±0,160	1,571±0,071	1,261±0,030
Головний мозок	0,283±0,062	0,276±0,010	0,230±0,008	0,153±0,023
Спинномозкова рідина (СМР)	2,087±2,512	0,380±0,371	0,598±1,035	0,105±0,182
Очі	0,110±0,018	0,372±0,042	0,539±0,019	0,611±0,079
Серце	1,034±0,049	1,315±0,156	1,188±0,028	0,845±0,039
Нирки	2,864±0,353	3,324±0,265	3,390±0,183	2,822±0,020
Товста кишка	0,261±0,026	0,567±0,051	0,716±0,098	0,681±0,102
Печінка	10,181±0,600	8,475±0,204	6,237±0,341	3,740±0,055
Легені	3,133±0,350	5,162±0,564	5,305±0,194	2,727±0,198
М'язи (скелетні)	0,119±0,006	0,297±0,011	1,041±0,009	0,298±0,015
Сідничний нерв	0,244±0,037	0,558±0,023	0,994±0,096	1,043±0,057
Тонка кишка	0,304±0,093	0,778±0,037	1,149±0,110	1,401±0,152
Спинний мозок (поперековий, грудний, шийний відділи)	0,327±0,062	0,319±0,025	0,285±0,044	0,227±0,019
Селезінка	5,042±0,902	4,721±0,302	3,740±0,406	2,186±0,218
Шлунок	0,465±0,068	1,028±0,175	2,450±0,569	4,454±1,455
Щитовидна/паращитовидна залоза	1,191±1,542	21,727±8,873	30,411±18,766	139,771±37,999

Проба	Концентрація радіоактивності, мкг екв/г ^a			
	6 год	24 год	48 год	96 год
Жирова тканина (жир нирок)	0,131±0,005	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Наднирники	1,412±0,137	0,301±0,014	0,118±0,013	0,069±0,016
Стегнова кістка	1,165±0,066	0,148±0,012	0,029±0,026	0,000±0,000
Головний мозок	0,098±0,012	0,000 ± 0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Спинномозкова рідина (СМР)	0,000 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b	0,000 = 0,000
Очі	0,574±0,085	0,064±0,006	0,010±0,009	0,000 = 0,000
Серце	0,723±0,057	0,101±0,008	0,038 ±0,007	0,006±0,011
Нирки	2,046±0,229	0,515±0,019	0,249±0,029	0,124±0,005
Товста кишка	0,726±0,173	0,074±0,014	0,027±0,004	0,000±0,000
Печінка	3,156±0,143	0,996±0,035	0,418±0,036	0,137±0,018
Легені	1,830±0,133	0,223±0,007	0,076±0,020	0,033±0,008
М'язи (скелетні)	0,253±0,029	0,032±0,002	0,000±0,000	0,000±0,000
Сідничний нерв	1,039±0,133	0,056±0,098	0,000±0,000	0,000±0,000
Тонка кишка	1,102±0,101	0,136±0,027	0,033±0,008	0,000±0,000
Спинний мозок (поперековий, грудний, шийний відділи)	0,202±0,032	0,026±0,003	0,000±0,000	0,000±0,000
Селезінка	1,648±0,109	0,395±0,017	0,152±0,009	0,083±0,009
Шлунок	4,242±1,361	0,463±0,357	0,064±0,014	0,031±0,005
Щитовидна/паращитовидна залоза	182,099±38,422	296,957±57,793	199,316±26,285	43,962±23,164

Таблиця 3а

Середньогрупове відношення радіоактивності в тканинах, спинномозковій рідині/у сироватці самців щурів Спраг-Дулі після однократного інтратекального введення ¹²⁵I-hGalC

Група 1: При середній дозі 41 мкг/тварина				
Проба	Відношення радіоактивності в тканинах і СМР/у сироватці ^a			
	10 хв	30 хв	1 год.	3 год.
Жирова тканина(жир нирок)	н/з	н/з	н/з	0,071 ^b
Наднирники	н/з	0,421±0,116	0,324±0,033	0,196±0,012
Стегнова кістка	н/з	0,308±0,010	0,319±0,038	0,369±0,028
Головний мозок	н/з	0,097 ^b	0,110±0,018	0,045±0,006
Спинномозкова рідина (СМР)	н/з	н/з	н/з	н/з
Очі	н/з	0,177±0,032	0,216±0,020	0,253±0,007
Серце	0,333	0,412±0,076	0,329±0,008	0,265±0,012
Нирки	0,976	1,157±0,040	1,036±0,062	0,895±0,058
Товста кишка	н/з	0,249±0,027	0,220±0,023	0,220±0,048
Печінка	н/з	0,351±0,028	0,302±0,036	0,265±0,015
Легені	0,576	0,565±0,050	0,533±0,034	0,532±0,003
М'язи (скелетні)	н/з	0,197±0,032	0,192±0,011	0,134±0,021
Сідничний нерв	н/з	0,249 ^b	0,317 ^b	0,382±0,074
Тонка кишка	н/з	0,318±0,035	0,312±0,035	0,426±0,018
Спинний мозок (поперековий, грудний, шийний відділи)	н/з	0,144 ^b	0,117±0,017	0,082±0,010
Селезінка	н/з	0,395±0,036	0,382±0,013	0,368±0,007
Шлунок	0,577	0,627±0,072	0,723±0,252	1,801±0,619
Щитовидна/паращитовидна залоза	4,443	4,035±0,750	5,680±2,612	17,423±8,215

Проба	Відношення радіоактивності в тканинах і СМР/у сироватці ^a			
	6 год.	24 год.	48 год.	96 год.
Жирова тканина(жир нирок)	0,057±0,012	н/з	н/з	н/з
Надирники	0,197±0,026	н/з	н/з	н/з
Стегнова кістка	0,407±0,022	н/з	н/з	н/з
Головний мозок	0,040±0,005	н/з	н/з	н/з
Спинномозкова рідина (СМР)	н/з	н/з	н/з	н/з
Очі	0,245±0,023	0,284 ^b	н/з	н/з
Серце	0,258±0,022	0,343 ^b	н/з	н/з
Нирки	0,821±0,066	1,491±0,128	н/з	н/з
Товста кишка	0,250±0,074	0,395 ^b	н/з	н/з
Печінка	0,293±0,029	н/з	н/з	н/з
Легені	0,547±0,009	0,489±0,105	н/з	н/з
М'язи (скелетні)	0,115±0,013	н/з	н/з	н/з
Сідничний нерв	0,496±0,030	н/з	н/з	н/з
Тонка кишка	0,400±0,059	0,550±0,021	н/з	н/з
Спинний мозок (поперековий, грудний, шийний відділи)	0,079±0,009	н/з	н/з	н/з
Селезінка	0,357±0,009	н/з	н/з	н/з
Шлунок	1,604±0,478	1,085±0,155	н/з	н/з
Щитовидна/паращитовидна залоза	24,297±0,831	527,002±100,186	н/з	н/з

Таблиця 146

Середньогрупове відношення радіоактивності в тканинах, спинномозковій рідині/у сироватці самців щурів Спраг-Дулі після однократної внутрішньовенної болюсної ін'єкції ¹²⁵I-hGalC

Група 2: При середній дозі 1,00 мг/кг				
Проба	Відношення радіоактивності в тканинах і СМР/у сироватці ^a			
	10 хв	30 хв	1 год.	3 год.
Жирова тканина(жир нирок)	0,009±0,003	0,015±0,003	0,017±0,001	0,028±0,003
Надирники	0,589±0,133	0,654±0,010	0,594±0,089	0,580±0,039
Стегнова кістка	0,106±0,006	0,146±0,019	0,174±0,012	0,273±0,008
Головний мозок	0,017±0,002	0,022±0,003	0,027±0,002	0,026±0,002
Спинномозкова рідина (СМР)	0,028 ^b	в/з	н/з	0,188 ^b
Очі	0,007±0,001	0,028±0,002	0,055±0,008	0,106±0,009
Серце	0,082±0,004	0,103±0,006	0,136±0,007	0,171±0,016
Нирки	0,203±0,011	0,266±0,019	0,311±0,015	0,512±0,043
Товста кишка	0,022±0,004	0,043±0,009	0,067±0,012	0,123±0,019
Печінка	0,766±0,119	0,802±0,026	0,805±0,085	1,110±0,055
Легені	0,781±0,070	1,903±0,100	2,496±0,452	2,642±0,316
М'язи (скелетні)	0,008±0,001	0,024±0,004	0,037±0,002	0,059±0,004
Сідничний нерв	0,012±0,002	0,032±0,012	0,080±0,009	0,213±0,007
Тонка кишка	0,029±0,002	0,064±0,007	0,107±0,019	0,255±0,032
Спинний мозок (поперековий, грудний, шийний відділи)	0,019±0,002	0,025±0,002	0,038±0,001	0,044±0,007
Селезінка	0,443±0,016	0,547±0,090	0,571±0,075	0,618±0,065
Шлунок	0,029±0,004	0,086±0,013	0,194±0,012	0,743±0,028
Щитовидна/паращитовидна залоза	0,305±0,092	2,074±0,319	5,106±1,355	46,707±21,839

Проба	Відношення радіоактивності в тканинах і СМР/у сироватці ^a			
	6 год.	24 год.	48 год.	96 год.
Жирова тканина(жир нирок)	0,035±0,003	н/з	н/з	н/з
Надирники	0,554±0,045	0,747±0,061	0,593±0,104	0,845±0,120
Стегнова кістка	0,330±0,004	0,234±0,030	0,225 ^b	н/з
Головний мозок	0,030±0,002	н/з	н/з	н/з
Спинномозкова рідина (СМР)	0,232 ^b	н/з	н/з	н/з
Очі	0,152±0,024	0,073±0,012	н/з	н/з
Серце	0,200±0,010	0,165±0,024	0,167±0,025	н/з
Нирки	0,649±0,086	0,741±0,025	0,833±0,169	1,118±0,086
Товста кишка	0,171±0,035	0,119±0,020	0,109±0,008	н/з
Печінка	1,449±0,096	2,245±0,142	2,109±0,302	1,440±0,229
Легені	1,453±0,071	6,505±2,210	1,345±0,431	0,780±0,033
М'язи (скелетні)	0,069±0,005	0,052 ^b	н/з	н/з
Сідничний нерв	0,292±0,011	0 169 ^b	н/з	н/з
Тонка кишка	0,316±0,065	0,207±0,057	0,175±0,070	н/з
Спинний мозок (поперековий, грудний, шийний відділи)	0,058±0,003	0,047 ^b	н/з	н/з
Селезінка	0,762±0,084	1,247±0,134	1,030±0,098	1,263±0,069
Шлунок	0,774±0,176	0,397±0,129	0,197±0,047	0,263 ^b
Щитовидна/паращитовидна залоза	124,616±86,507	615,613±169,527	1231,684±285,895	2484,660±471,907

Таблиця 14в

Середньогрупове відношення радіоактивності в тканинах, спинномозковій рідині/у сироватці самців щурів Спраг-Дулі після однократної інтратекальної дози і внутрішньовенної болюсної ін'єкції ¹²⁵I-hGalC

Група 3: При середній дозі 1,08 мг/кг				
Проба	Відношення радіоактивності в тканинах і СМР/у сироватці ^a			
	10 хв	30 хв	1 год.	3 год.
Жирова тканина(жир нирок)	0,010±0,002	0,016±0,005	0,023±0,003	0,037±0,002
Надирники	0,649±0,076	0,493±0,072	0,589±0,077	0,468±0,069
Стегнова кістка	0,083±0,006	0,155±0,012	0,191±0,013	0,294±0,005
Головний мозок	0,019±0,003	0,025±0,001	0,028±0,003	0,035±0,005
Спинномозкова рідина (СМР)	0,204 ^b	0,053 ^b	0,221 ^b	0,072 ^b
Очі	0,007±0,001	0,034±0,005	0,066±0,007	0,143±0,021
Серце	0,071±0,001	0,119±0,015	0,145±0,011	0,197±0,012
Нирки	0,195±0,013	0,302±0,041	0,413±0,022	0,658±0,016
Товста кишка	0,018±0,002	0,051±0,005	0,087±0,011	0,159±0,023
Печінка	0,694±0,007	0,768±0,061	0,759±0,023	0 872±0,024
Легені	0,214±0,030	0,465±0,025	0,646±0,045	0,635±0,036
М'язи (скелетні)	0,008±0,001	0,027±0,002	0,050±0,003	0,070±0,005
Сідничний нерв	0,017±0,003	0,050±0,004	0,122±0,018	0,243±0,012
Тонка кишка	0,021±0,007	0,071±0,007	0,140±0,016	0,326±0,029
Спинний мозок (поперековий, грудний, шийний відділи)	0,022±0,005	0,029±0,001	0,035±0,007	0,053±0,004
Селезінка	0,342±0,044	0,427±0,036	0,455±0,044	0,510±0,049
Шлунок	0,032±0,005	0,094±0,020	0,300±0,078	1,039±0,348
Щитовидна/паращитовидна залоза	0,217±0,108	1,960±0,776	3,781±2,521	32,561±8,787

Проба	Відношення радіоактивності в тканинах і СМР/у сироватці ^a			
	6 год.	24 год.	48 год.	96 год.
Жирова тканина(жир нирок)	0,038±0,003	н/з	н/з	н/з
Наднирники	0,405±0,059	0,527±0,029	0,514±0,108	0,918±0,317
Стегнова кістка	0,333±0,006	0,258±0,026	0,183 ^b	н/з
Головний мозок	0,028±0,001	н/з	н/з	н/з
Спинномозкова рідина (СМР)	н/з	н/з	н/з	н/з
Очі	0,163±0,012	0,113±0,019	0,063 ^b	н/з
Серце	0,206±0,001	0,177±0,018	0,164±0,008	0,246 ^b
Нирки	0,583±0,022	0,900±0,037	1,071±0,104	1,623±0,270
Товста кишка	0,207±0,044	0,131±0,031	0,116±0,018	н/з
Печінка	0,902±0,028	1,744±0,121	1,815±0,316	1,770±0,023
Легені	0,522±0,009	0,391±0,040	0,321±0,044	0,428±0,084
М'язи (скелетні)	0,072±0,011	0,056±0,008	н/з	н/з
Сідничний нерв	0,296±0,016	0,293 ^b	н/з	н/з
Тонка кишка	0,314±0,008	0,239±0,063	0,140±0,019	н/з
Спинний мозок (поперековий, грудний, шийний відділи)	0,057±0,007	0,046±0,009	н/з	н/з
Селезінка	0,471±0,033	0,692±0,067	0,661±0,104	1,087±0,230
Шлунок	1,206±0,373	0,807±0,616	0,274±0,032	0,405±0,112
Щитовидна/паращитовидна залоза	52,475±13,382	525,335±143,883	854,144±52,674	571,341±305,367

Таблиця 15а

Середньогруповий вміст радіоактивності в тканинах, спинномозковій рідині, вмісті шлунково-кишкового тракту й сечового міхура у самців щурів Спраг-Довлі після однократного інтратекального введення¹²⁵I-hGalC

Група 1: При середній дозі 41 мкг/тварина				
Проба	Відсоток дози ^a			
	10 хв	30 хв	1 год.	3 год.
Наднирники	0,000±0,000	0,002±0,000	0,004±0,000	0,003±0,001
Головний мозок	0,000±0,000	0,010±0,009	0,027±0,024	0,023±0,003
Спинномозкова рідина (СМР)	0,000 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b	0,000±0,000
Очі	0,000±0,000	0,000±0,000	0,011±0,002	0,017±0,001
Серце	0,002±0,003	0,037±0,003	0,066±0,009	0,077±0,004
Нирки	0,027±0,025	0,252±0,086	0,553±0,057	0,632±0,104
Печінка	0,000±0,000	0,417±0,057	0,748±0,108	0,907±0,181
Легені	0,003±0,005	0,055±0,009	0,122±0,021	0,166±0,013
Сідничний нерв	0,000±0,000	0,001±0,001	0,002±0,002	0,003±0,001
Спинний мозок (поперековий, грудний, шийний відділи)	0,000±0,000	0,004±0,004	0,013±0,001	0,012±0,000
Селезінка	0,000±0,000	0,024±0,009	0,054±0,010	0,066±0,011
Щитовидна/паращитовидна залоза	0,001±0,001	0,007±0,002	0,024±0,012	0,108±0,021
Шлунково-кишковий тракт:				
Тонка кишка	0,000±0,000	0,193±0,054	0,364±0,069	0,763±0,107
Вміст тонкої кишки	0,000±0,000	0,399±0,062	0,778±0,084	2,611±0,291
Товста кишка	0,000±0,000	0,090±0,018	0,165±0,037	0,238±0,070
Вміст товстої кишки	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,598±0,114
Шлунок	0,008±0,007	0,086±0,009	0,216±0,094	0,836±0,336
Вміст шлунка	0,000±0,000	0,489±0,052	1,774±0,326	5,004±0,346
Вміст сечового міхура	0,003±0,003	0,110±0,030	0,156±0,077	1,207±1,029

Проба	Відсоток дози ^a			
	6 год.	24 год.	48 год.	96 год.
Наднирники	0,002±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Головний мозок	0,015±0 001	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Спинномозкова рідина (СМР)	0,000 ^b	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Очі	0,013±0,003	0,001±0,001	0,000±0,000	0,000±0,000
Серце	0,056±0,006	0,005±0,008	0,000±0,000	0,000±0,000
Нирки	0,452±0,115	0,130±0,034	0,059±0,007	0,029±0,006
Печінка	0,775±0,078	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Легені	0,132±0 019	0,019±0,005	0,000±0,000	0,000±0000
Сідничний нерв	0,003±0,001	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Спинний мозок (поперековий, грудний, шийний відділи)	0,009±0,001	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Селезінка	0,048±0,007	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0000
Щитовидна/паращитовидна залоза	0,125±0,037	0,348±0,013	0,195±0,075	0,086±0,023
Шлунково-кишковий тракт:				
Тонка кишка	0,571±0,165	0,117±0,027	0,000±0,000	0,000±0,000
Вміст тонкої кишки	1,740±0,925	0,385±0,045	0,000±0,000	0,000±0,000
Товста кишка	0,199±0,022	0,029±0,025	0,000±0,000	0,000±0,000
Вміст товстої кишки	0,864±0,100	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Шлунок	0,557±0,117	0,059±0,023	0,015±0,002	0,009±0,007
Вміст шлунка	3 996±1,013	0,758±0,167	0,122±0,107	0,000±0,000
Вміст сечового міхура	0,525±0 264	0,178±0,130	0,014 ^b	0,021±0,028

Таблиця 156

Середньогруповий вміст радіоактивності в тканинах, спинномозковій рідині, вмісті шлунково-кишкового тракту й сечового міхура у самців щурів Спраг-Доулі після однократної внутрішньовенної болюсної ін'єкції ¹²⁵I-hGalC

Група 2: При середній дозі 1,00 мг/кг				
Проба	Відсоток дози ^a			
	10 хв	30 хв	1 год.	3 год.
Наднирники	0,113±0,023	0,117±0,022	0,059±0,009	0,026±0,002
Головний мозок	0,129±0,022	0,120±0,011	0,098±0,005	0,044±0,001
Спинномозкова рідина (СМР)	0,001±0,002	0,000±0,000	0,000 ^b	0,001±0,001
Очі	0,007±0,001	0,021±0,001	0,028±0,007	0,024±0,005
Серце	0,382±0,055	0,319±0,018	0,292±0,025	0,161±0,024
Нирки	2,168±0,172	1,966±0,081	1,658±0,014	1,168±0,068
Печінка	41,711±3,901	31,161±1,934	20,702±1,140	13,029±0,875
Легені	4,024±0,305	7,047±0,512	6,456±1,094	2,842±0,24S
Сідничний нерв	0,001±0,001	0,003±0,003	0,004±0,001	0,006±0,003
Спинний мозок (поперековий, грудний, шийний відділи)	0,045±0,005	0,042±0,008	0,039±0,003	0,023±0,002
Селезінка	1,234±0,045	1,014±0,093	0,784±0,123	0,393±0,013
Щитовидна/паращитовидна залоза	0,024±0,001	0,100±0,009	0,186±0,050	0,947±0,340
Шлунково-кишковий тракт:				
Тонка кишка	0,749±0,121	1,477±0,237	1,548±0,186	1,535±0,191
Вміст тонкої кишки	0,530±0,056	1,921±0,346	3,737±1,427	5,446±2,102
Товста кишка	0,327±0,072	0,470±0,076	0,529±0,065	0,412±0,008
Вміст товстої кишки	0,000±0,000	0,345±0,029	0,517±0,135	0,782±0,083
Шлунок	0,176±0,032	0,437±0,050	0,632±0,047	0,992±0,059
Вміст шлунка	0,343±0,127	1,537±0,287	5,330±0,937	10,263±1,971
Вміст сечового міхура	0,100±0,041	0,409±0,179	0,675±0,660	0 943±0,571

Проба	Відсоток дози ^a			
	6 год.	24 год.	48 год.	96 год.
Наднирники	0,019±0,002	0,005±0,001	0,002±0,000	0,001±0,000
Головний мозок	0,034±0,004	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Спинномозкова рідина (СМР)	0,003±0,005	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Очі	0,023±0,007	0,002±0,001	0,000±0,000	0,000±0,000
Серце	0,121±0,007	0,022±0,003	0,012±0,001	0,000±0,000
Нирки	0,909±0,076	0,251±0,006	0,140±0,003	0,072±0,002
Печінка	10,311±0,361	3,891±0,283	1,980±0,065	0,498±0,016
Легені	1,027±0,037	0,991±0,289	0,112±0,037	0,023±0,001
Сідничний нерв	0,004±0,000	0,000±0,001	0,000±0,000	0,000±0,000
Спинний мозок (поперековий, грудний, шийний відділи)	0,017±0,002	0,002±0,001	0,000±0,000	0,000±0,000
Селезінка	0,362±0,028	0,100±0,003	0,046±0,010	0,022±0,001
Щитовидна/паращитовидна залоза	1,405±0,830	1,333±0,115	1,440±0,604	0,997±0,329
Шлунково-кишковий тракт:				
Тонка кишка	1,537±0,436	0,175±0,033	0,074±0,031	0,000±0,000
Вміст тонкої кишки	3,051±0,706	0,500±0,184	0,254±0,101	0,000±0,000
Товста кишка	0,380±0,063	0,054±0,007	0,030±0,003	0,000±0,000
Вміст товстої кишки	1,055±0,116	0,396±0,058	0,155±0,134	0,000±0,000
Шлунок	0,744±0,196	0,078±0,023	0,021±0,003	0,006±0,005
Вміст шлунка	8 294±0,670	1,055±0,057	0,296±0,159	0,000±0,000
Вміст сечового міхура	1,531±1,303	0,079 ^b	0,019±0,021	0,007±0,002

Таблиця 15в

Середньогруповий вміст радіоактивності в тканинах, спинномозковій рідині, вмісті шлунково-кишкового тракту й сечового міхура у самців щурів Спраг-Дуулі після однократної інтратекальної дози та внутрішньовенної болюсної ін'єкції ¹²⁵I-hGalC

Група 3: При середній дозі 1,08 мг/кг				
Проба	Відсоток дози ^a			
	10 хв	30 хв	1 год.	3 год.
Наднирники	0,066±0,013	0,037±0,010	0,032±0,003	0,015±0,002
Головний мозок	0,071±0,009	0,071±0,007	0,058±0,002	0,039±0,008
Спинномозкова рідина (СМР)	0 046±0,071	0,002±0,002	0,010±0,017	0,002±0,003
Очі	0,004±0,001	0,012±0,002	0,018±0,001	0,021±0,003
Серце	0,147±0,008	0,138±0,020	0,165±0,008	0,136±0,014
Нирки	1,005±0,107	1,157±0,073	1,179±0,061	0,985±0,006
Печінка	18,955±0,723	14,647±0,420	10,032±1,037	6,754±0,213
Легені	0,506±0,053	0,811±0,104	0,371±0,037	0,457±0,031
Сідничний нерв	0 001±0,000	0,002±0,000	0,003±0,001	0,003±0,002
Спинний мозок (поперековий, грудний, шийний відділи)	0,028±0,007	0,025±0,005	0,023±0,005	0,018±0,004
Селезінка	0,468±0,027	0,435±0,037	0,329±0,032	0,217±0,007
Щитовидна/паращитовидна залоза	0,008±0,004	0,055±0,019	0,073±0,041	0,392±0,071
Шлунково-кишковий тракт:				
Тонка кишка	0,286±0,046	0,641±0,033	1,118±0,264	1,176±0,044
Вміст тонкої кишки	0,288±0,037	1,150±0,013	2,414±0,038	4,314±1,755
Товста кишка	0,131±0,013	0,272±0,015	0,360±0,032	0,335±0,051
Вміст товстої кишки	0,000±0,000	0,212±0,070	0,351±0,059	0,696±0,181
Шлунок	0,100±0,017	0,206±0,034	0,493±0,124	0,931±0,293
Вміст шлунка	0,161±0,029	0,806±0,191	2,870±1,090	8,789±1,443
Вміст сечового міхура	0,029±0,021	0,182±0,251	0,334±0,663	0,273±0,087

Проба	Відсоток дози ^a			
	6 год.	24 год.	48 год.	96 год.
Наднирники	0,010±0,002	0,002±0,000	0,001±0,000	0,001±0,000
Головний мозок	0,024±0,003	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Спинномозкова рідина (СМР)	0,000 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b	0,000±0,000
Очі	0,019±0,004	0,002±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Серце	0,106±0,008	0,015±0,001	0,005±0,001	0,001±0,002
Нирки	0,689±0,063	0,183±0,013	0,081±0,007	0,048±0,002
Печінка	5,085±0,292	1,653±0,097	0,757±0,043	0,281±0,022
Легені	0,297±0,011	0,038±0,001	0,012±0,003	0,006±0,002
Сідничний нерв	0,004±0,001	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Спинний мозок (поперековий, грудний, шийний відділи)	0,016±0,003	0,002±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Селезінка	0,146±0,020	0,039±0,003	0,015±0,003	0,009±0,000
Щитовидна/паращитовидна залоза	0,496±0,064	0,973±0,162	0,567±0,088	0,124±0,088
<u>Шлунково-кишковий тракт:</u>				
Тонка кишка	0,954±0,153	0,125±0,046	0,032±0,007	0,000±0,000
Вміст тонкої кишки	2,054±0,707	0,298±0,019	0,113±0,039	0,000±0,000
Товста кишка	0,359±0,097	0,036±0,009	0,013±0,002	0,000±0,000
Вміст товстої кишки	0,971±0,095	0,290±0,115	0,041±0,071	0,000±0,000
Шлунок	0,943±0,323	0,102±0,084	0,014±0,004	0,008±0,002
Вміст шлунка	3,501±3,698	0,610±0,365	0,175±0,053	0,000±0,000
Вміст сечового міхура	0,114±0,034	0,199±0,266	0,003±0,002	0,005±0,008

Група 1 (середня доза для інтратекального введення - 41 мкг/тварина)

- Після інтратекального введення досліджували загальний розподіл ¹²⁵I-міченої речовини у всіх тканинах, однак рівень радіоактивності в СМР був нижчим від межі кількісного визначення (МКВ). Максимальна середня концентрація I-міченої речовини в тканинах самців щурів спостерігалася через 48 годин після введення в щитовидній/паращитовидній залозі (4,127±1,635 мкг екв/г) і через 3 години після введення в шлунок (0,203±0,101 мкг екв/г), нирках (0,096±0,014 мкг екв/г) і легенях (0,058±0,014 мкг екв/г). У інших тканинах рівень радіоактивної речовини був нижчим і значення t_{max} , які зазвичай спостерігалися, становили 3 і 6 годин після введення. Мінімальні значення C_{max} спостерігалися в головному мозку (0,005±0,001 мкг екв/г) і жировій тканині нирок (0,006±0,000 мкг екв/г). Через 48 і 96 годин після введення рівень радіоактивності в більшості тканин був нижчим від межі визначення і виключення склали тільки щитовидна/паращитовидна залоза, нирки й шлунок. Через 96 годин після введення максимальна середня концентрація спостерігалася в щитовидній/паращитовидній залозі (1,927±1,585 мкг екв/г, 46,7 % від C_{max}), далі йшли нирки (0,005±0,001 мкг екв/г, 5,2 % від C_{max}) і шлунок (0,002±0,001 мкг екв/г, 1 % від C_{max}).

- Відношення радіоактивності в тканинах/у сироватці в основному було нижчим за 1 для зазначених тканин до 24 годин після інтратекального введення препарату. Виключення склали щитовидна/паращитовидна залоза, нирки й шлунок. Через 48 і 96 годин після введення відношення радіоактивності в тканинах/у сироватці розрахувати не вдавалося, оскільки концентрації в сироватці були нижчими від МКВ.

- Рівень радіоактивності, визначеної в усіх тканинах, становив менше 1 % від введеної дози, і максимальна зі спостережуваних частка була в печінці (0,91 %) через 3 години після введення. Через 1 годину після введення частки вище 1 % від введеної дози виявлялися тільки у вмісті шлунка (1,8 %). Через 3 години після введення частки вище 1 % від введеної дози виявлялися у вмісті тонкої кишки (2,6 %), вмісті шлунка (5,0 %) і вмісті сечового міхура (1,2 %). Через 6 годин після введення частки вище 1 % від введеної дози виявлялися у вмісті тонкої кишки (1,7 %) і вмісті шлунка (4,0 %). Через 96 годин після введення невелика кількість пов'язаної з ¹²⁵I-hGalC радіоактивності (менше 0,1 %) все ще виявлялася в нирках, щитовидній/паращитовидній залозі, вмісті шлунка й сечового міхура, і максимальне значення спостерігалася в щитовидній/паращитовидній залозі (0,09 %).

Група 2 (середня доза для внутрішньовенного введення - 1,00 мг/кг)

- Після внутрішньовенного введення максимальна середня концентрація (C_{max}) радіоактивно-міченої речовини в тканинах щурів групи 2 спостерігалася в щитовидній/паращитовидній залозі (294,521±52,953 мкг екв/г; через 48 годин після введення), далі йшли легені (20,629±2,125 мкг

екв/г; 30 хвилин після введення), печінка ($11,335 \pm 1,436$ мкг екв/г; 10 хвилин після введення), наднирники ($8,827 \pm 2,435$ мкг екв/г; 10 хвилин після введення), селезінка ($6,595 \pm 0,625$ мкг екв/г; 10 хвилин після введення) і нирки ($3,027 \pm 0,330$ мкг екв/г; 10 хвилин). Значення $t_{\max}$ для зазначених тканин становили 10 хвилин і 3 години після введення, за винятком щитовидної/паращитовидної залози (48 годин після введення). Мінімальні значення $C_{\max}$ радіоактивності спостерігалися в жирі нирок ($0,158 \pm 0,019$ мкг екв/г), СМР ($0,210 \pm 0,363$ мкг екв/г), головному мозку ($0,252 \pm 0,041$ мкг екв/г), скелетних м'язах ($0,275 \pm 0,025$ мкг екв/г) і спинному мозку ($0,293 \pm 0,028$ мкг екв/г). Через 96 годин після введення радіоактивність усе ще виявлялася в 7 з 18 аналізованих тканин, і максимальні середні концентрації виявлялися в щитовидній/паращитовидній залозі ($218,917 \pm 45,098$ мкг екв/г, 74,3 % від $C_{\max}$), далі йшла печінка ($0,126 \pm 0,014$ мкг екв/г, 1,1 % від $C_{\max}$), селезінка ($0,111 \pm 0,009$ мкг екв/г, 1,7 % від $C_{\max}$) і нирки ($0,099 \pm 0,010$ мкг екв/г, 3,3 % від $C_{\max}$).

Через 10 хвилин після введення середнє відношення радіоактивності в тканинах/у сироватці було нижчим за 1 для всіх аналізованих тканин. Через 30 хвилин і 1 годину після введення середнє відношення радіоактивності в тканинах/у сироватці було вищим за 1 у легенях і щитовидній/паращитовидній залозі. Через 3 і 6 годин після введення середнє відношення радіоактивності в тканинах/у сироватці було вищим за 1 у печінці, легенях і щитовидній/паращитовидній залозі. Через 24 і 48 годин після введення в печінці, легенях, селезінці й щитовидній/паращитовидній залозі середнє відношення радіоактивності в тканинах/у сироватці було вищим за 1. Через 96 годин після введення середнє відношення радіоактивності в тканинах/у сироватці було вищим за 1 в нирках, печінці, селезінці й щитовидній/паращитовидній залозі. Максимальне відношення радіоактивності в тканинах/у сироватці спостерігалось в щитовидній/паращитовидній залозі (2485 через 96 годин), легенях (6,5 через 24 години) і печінці (2,2 через 24 години).

Стосовно частки від введеної радіоактивності, максимальні середні значення серед зазначених тканин спостерігалися в печінці (41,7 % через 10 хвилин після введення), легенях (7,0 % через 30 хвилин), нирках (2,2 % через 10 хвилин), тонкій кишці (1,5 % через 1 годину) і щитовидній/паращитовидній залозі (1,4 % через 48 годин). У вмісті шлунково-кишкового тракту максимальні середні значення становили 10,3 % від дози у вмісті шлунка (через 3 години після введення), 5,4 % у вмісті тонкої кишки (через 3 години після введення) і 1,1 % у вмісті товстої кишки (через 3 години). Через 96 годин після введення максимальна частка від введеної дози виявлялася в щитовидній/паращитовидній залозі (1,0 %), печінці (0,5 %) і нирках (0,1 %). У зазначений момент часу після введення препарату у вмісті шлунка й сечового міхура залишалося менше 0,01 % від введеної дози.

Група 3 (інтратекальне введення й наступне внутрішньовенне введення: 1,08 мг/кг (сумарна доза))

Після інтратекального і внутрішньовенного введення максимальна середня концентрація ($C_{\max}$) радіоактивно-міченої речовини в тканинах щурів групи 3 спостерігалася в щитовидній/паращитовидній залозі ($296,957 \pm 57,793$ мкг екв/г; через 24 години після введення), далі йшла печінка ($10,181 \pm 0,600$ мкг екв/г; 10 хвилин після введення), наднирники ($9,567 \pm 1,678$ мкг екв/г; 10 хвилин після введення), легені ($5,305 \pm 0,194$ мкг екв/г; 1 година після введення), селезінка ($5,042 \pm 0,902$ мкг екв/г; 10 хвилин після введення), шлунок ($4,454 \pm 1,455$ мкг екв/г; 3 години після введення), нирки ($3,390 \pm 0,183$ мкг екв/г; 1 година) і СМР ($2,087 \pm 2,912$ мкг екв/г; 10 хвилин). Значення $t_{\max}$ для зазначених тканин становили 10 хвилин і 3 години після введення, за винятком кишечника (6 годин після введення) і щитовидної/паращитовидної залози (24 години після введення). Мінімальні значення $C_{\max}$ радіоактивності спостерігалися в жирі нирок ($0,188 \pm 0,020$ мкг екв/г), головному мозку ($0,283 \pm 0,062$ мкг екв/г), спинному мозку ($0,327 \pm 0,062$ мкг екв/г) і скелетних м'язах ($0,411 \pm 0,009$ мкг екв/г). Через 96 годин після введення радіоактивність усе ще виявлялася в 8 з 18 аналізованих тканин, і максимальні середні концентрації виявлялися в щитовидній/паращитовидній залозі ($43,962 \pm 23,164$ мкг екв/г, 14,8 % від $C_{\max}$), далі йшла печінка ($0,137 \pm 0,018$ мкг екв/г, 1,3 % від $C_{\max}$), нирки ($0,124 \pm 0,005$ мкг екв/г, 3,7 % від $C_{\max}$), селезінка ($0,083 \pm 0,009$ мкг екв/г, 1,6 % від $C_{\max}$) і наднирники ($0,069 \pm 0,016$ мкг екв/г, 0,7 % від $C_{\max}$).

Через 10 хвилин після введення середнє відношення радіоактивності в тканинах/у сироватці було нижчим за 1 для всіх аналізованих тканин. Через 30 хвилин і 1 годину після введення середнє відношення радіоактивності в тканинах/у сироватці було вищим за 1 в щитовидній/паращитовидній залозі. Через 3 і 6 годин після введення середнє відношення радіоактивності в тканинах/у сироватці було вищим за 1 в шлунку і щитовидній/паращитовидній залозі. Через 24 години після введення в печінці й щитовидній/паращитовидній залозі середнє відношення радіоактивності в тканинах/у сироватці було вищим за 1. Через 48 і 96 годин після

введення середнє відношення радіоактивності в тканинах/у сироватці було вищим за 1 в нирках, печінці й щитовидній/паращитовидній залозі, а також у селезінці (96 годин). Максимальне відношення радіоактивності в тканинах/у сироватці спостерігалось в щитовидній/паращитовидній залозі (854 через 96 годин), печінці (1,8 через 48 годин) і нирках (1,6 через 96 годин).

Стосовно частки від введеної радіоактивності, максимальні середні значення серед зазначених тканин спостерігалися в печінці (19,0 % через 10 хвилин після введення), нирках (1,2 % через 1 годину) і тонкій кишці (1,2 % через 3 години). У вмісті шлунково-кишкового тракту максимальні середні значення склали 8,8 % від введеної дози у вмісті шлунка (через 3 години після введення). 4,3 % у вмісті тонкої кишки (через 3 години після введення) і 1,0 % у вмісті товстої кишки (6 годин). Через 96 годин після введення максимальна частка від введеної дози виявлялася в печінці (0,3 %), У щитовидній/паращитовидній залозі (0,1 %) і нирках (0,05 %). У зазначений момент часу після введення препарату в наднирниках, серці, легенях, селезінці, вмісті шлунка і сечового міхура залишалося менше 0,01 % від введеної дози.

Фармакокінетика радіоактивності в крові, сироватці, еритроцитах, СМР і тканинах (Таблиця 13 і Таблиця 17)

Усереднені фармакокінетичні показники радіоактивності в крові, сироватці, еритроцитах, СМР і тканинах щурів після однократного інтратекального і/або внутрішньовенного введення ^{125}I -hGalC наведені в Таблиці 16 і Таблиці 17.

Таблиця 16а

Кінетичний профіль сумарної радіоактивності в крові, сироватці й еритроцитах самців щурів
Спраг-Доулі після однократного інтратекального введення ^{125}I -hGalC

Сироватка								
Група 1: При середній дозі 41 мкг/тварина								
$t_{\max}$ (год.)	$C_{\max}$ (мкг екв/г)	t_{last} (год.)	$AUC_{0-\text{last}}$ (мкг екв•год./г)	k (год $^{-1}$)	R^2	$t_{1/2}$ (год.)	$AUC_{0-\infty}$ (мкг екв•год./г)	% Екстраполяції $AUC_{0-\infty}$
3	0,108	24	1,48	0,130	0,988	5,34	1,54	4,00
Кров								
$t_{\max}$ (год.)	$C_{\max}$ (мкг екв/г)	t_{last} (год.)	$AUC_{0-\text{last}}$ (мкг екв•год./г)	k (год $^{-1}$)	R^2	$t_{1/2}$ (год.)	$AUC_{0-\infty}$ (мкг екв•год./г)	% Екстраполяції $AUC_{0-\infty}$
3	0,0930	24	1,33	0,138	0,983	5,02	1,37	3,16
Еритроцити								
$t_{\max}$ (год.)	$C_{\max}$ (мкг екв/г)	t_{last} (год.)	$AUC_{0-\text{last}}$ (мкг екв•год./г)	k (год $^{-1}$)	R^2	$t_{1/2}$ (год.)	$AUC_{0-\infty}$ (мкг екв•год./г)	% Екстраполяції $AUC_{0-\infty}$
6	0,0890	24	1,24	0,170	0,980	4,08	1,25	1,41

Таблиця 16б:

Кінетичний профіль сумарної радіоактивності в крові, сироватці й еритроцитах самців щурів
Спраг-Доулі після однократної внутрішньовенної болюсної ін'єкції ^{125}I -hGalC

Сироватка										
Група 2: При середній дозі 1,00 мг/кг										
$t_{\max}$ (год.)	$C_{\max}$ (мкг екв/г)	t_{last} (год.)	$AUC_{0-\text{last}}$ (мкг екв•год./г)	k (год $^{-1}$)	R^2	$t_{1/2}$ (год.)	$AUC_{0-\infty}$ (мкг екв•год./г)	% Екстраполя- ції $AUC_{0-\infty}$	V_x (мл/кг)	CL (мл/год./кг)
0	20,1	96	71,1	0,0226	0,997	30,7	75,0	5,21	591	13,3
Кров										
$t_{\max}$ (год.)	$C_{\max}$ (мкг екв/г)	t_{last} (год.)	$AUC_{0-\text{last}}$ (мкг екв•год./г)	k (год $^{-1}$)	R^2	$t_{1/2}$ (год.)	$AUC_{0-\infty}$ (мкг екв•год./г)	% Екстраполя- ції $AUC_{0-\infty}$	V_x (мл/кг)	CL (мл/год./кг)
0	14,0	96	51,2	0,0256	0,994	27,1	53,2	3,75	735	18,8

Еритроцити										
t_{max} (год.)	C_{max} (мкг екв/г)	t_{last} (год.)	$AUC_{0-tlast}$ (мкг екв•год./г)	k (год ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (год.)	$AUC_{0-\infty}$ (мкг екв•год./г)	% Екстраполя- ції $AUC_{0-\infty}$	V_x (мл/кг)	CL (мл/год./кг)
0	6,40	48	33,9	0,0635	0,941	10,9	35,7	4,94	441	28,0

Таблиця 16в:

Кінетичний профіль сумарної радіоактивності в крові, сироватці й еритроцитах самців щурів
Спраг-Доулі після однократного інтратекального і внутрішньовенного болюсного введення ¹²⁵I-
hGalC

Сироватка										
Група 3: При середній дозі 1,08 мг/кг										
t_{max} (год.)	C_{max} (мкг екв/г)	t_{last} (год.)	$AUC_{0-tlast}$ (мкг екв•год./г)	k (год ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (год.)	$AUC_{0-\infty}$ (мкг екв•год./г)	% Екстраполя- ції $AUC_{0-\infty}$	V_x (мл/кг)	CL (мл/год./кг)
0	16,9	96	89,8	0,0272	0,983	25,5	92,6	3,06	429	11,7
Кров										
t_{max} (год.)	C_{max} (мкг екв/г)	t_{last} (год.)	$AUC_{0-tlast}$ (мкг екв•год./г)	k (год ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (год.)	$AUC_{0-\infty}$ (мкг екв•год./г)	% Екстраполя- ції $AUC_{0-\infty}$	V_x (мл/кг)	CL (мл/год./кг)
0	11,4	96	66,9	0,0332	0,990	20,9	68,0	1,64	478	15,9
Еритроцити										
t_{max} (год.)	C_{max} (мкг екв/г)	t_{last} (год.)	$AUC_{0-tlast}$ (мкг екв•год./г)	k (год ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (год.)	$AUC_{0-\infty}$ (мкг екв•год./г)	% Екстраполя- ції $AUC_{0-\infty}$	V_x (мл/кг)	CL (мл/год./кг)
0	7,36	48	49,2	0,0721	0,947	9,61	51,0	3,69	293	21,2

Таблиця 17а

Кінетичний профіль сумарної радіоактивності в тканинах і спинномозковій рідині самців щурів
Спраг-Доулі після однократного інтратекального введення ¹²⁵I-hGalC

Група 1: При середній дозі 41 мкг/тварина										
	t_{max} (год.)	C_{max} (мкг екв/г)	t_{last} (год.)	$AUC_{0-tlast}$ (мкг екв•год./г)	k (год ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (год.)	$AUC_{0-\infty}$ (мкг екв•год./г)	% Екстрапо- ляції $AUC_{0-\infty}$	
Жирова тканина (жир нирок)	6	0,0060	6	0,0215	a	a	a	a	a	a
Наднирники	3	0,0210	6	0,109	a	a	a	a	a	a
Кістка (стегова)	6	0,0410	6	0,136	a	a	a	a	a	a
Головний мозок	3	0,0050	6	0,0247	a	a	a	a	a	a
Спинномозкова рідина (СМР)	b	0,000	b	0,000	b	b	b	b	b	b
Очі	3	0,0270	24	0,345	0,164	0,990	4,23	0,351	1,74	
Серце	3	0,0280	24	0,379	0,167	0,987	4,16	0,355	1,56	
Нирки	3	0,0960	96	1,84	0,0118	0,979	58,6	2,27	18,6	
Товста кишка	3	0,0240	24	0,347	0,125	0,933	5,54	0,363	4,40	
Печінка	6	0,0300	6	0,141	a	a	a	a	a	
Легені	3	0,0580	24	0,801	0,134	0,937	5,18	0,831	3,60	
М'язи (скелетні)	3	0,0140	6	0,0983	a	a	a	a	a	
Сідничний нерв	6	0,0500	6	0,201	a	a	a	a	a	
Тонка кишка	3	0,0460	24	0,606	0,121	0,992	5,74	0,639	5,18	
Спинний мозок	3	0,0090	6	0,0436	a	a	a	a	a	

Таблиця 17а

Кінетичний профіль сумарної радіоактивності в тканинах і спинномозковій рідині самців щурів
Спраг-Доулі після однократного інтратекального введення ^{125}I -hGalC

Група 1: При середній дозі 41 мкг/тварина									
	$t_{\max}$ (год.)	$C_{\max}$ (мкг екв/г)	t_{last} (год.)	$AUC_{0-t_{\text{last}}}$ (мкг екв•год./г)	k (год ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (год.)	$AUC_{0-\infty}$ (мкг екв•год./г)	% Екстрапо- ляції $AUC_{0-\infty}$
(поперековий, грудний, шийний відділи)									
Селезінка	3	0,0400	6	0,133	a	a	a	a	a
Шлунок	3	0,203	96	2,60	0,017 7	0,831	39,1	2,71	4,16
Щитовидна/паращитовидна залоза	48,1	4,13	96	313	c	0,892	c	c	35,2

^a Немає результатів, що підлягають реєстрації, оскільки кінцева фаза не ідентифікована

^b Показники ФК не оцінюються, оскільки проби були < МКВ.

^c Значення не наводяться, оскільки $AUC_{0-\infty}$ екстрапольовані більше ніж на 20 %, або R^2 були < 0,8.

Таблиця 17б

Кінетичний профіль сумарної радіоактивності в тканинах і спинномозковій рідині самців щурів
Спраг-Доулі після однократної внутрішньовенної болюсної ін'єкції ^{125}I -hGalC

Група 2: При середній дозі 1 мг/кг									
	$t_{\max}$ (год.)	$C_{\max}$ (мкг екв/г)	t_{last} (год.)	$AUC_{0-t_{\text{last}}}$ (мкг екв•год./г)	k (год ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (год.)	$AUC_{0-\infty}$ (мкг екв•год./г)	% Екстрапо- ляції $AUC_{0-\infty}$
Жирова тканина (жир нирок)	0,5	0,158	6	0,617	a	0,920	a	a	56,0
Наднирники	0	10,9	96	43,1	0,0201	0,927	34,6	46,8	7,89
Кістка (стегова)	0,5	1,58	48	15,3	0,0777	0,965	8,92	15,7	2,79
Головний мозок	0	0,268	6	0,735	a	0,897	a	a	26,8
Спинномозкова рідина (СМР)	3	0,210	6	0,854	b	b	b	b	b
Очі	1	0,406	24	5,35	0,113	0,981	6,15	5,64	5,19
Серце	0	1,33	48	10,2	0,0726	0,909	9,54	10,8	5,12
Нирки	0	3,18	96	40,7	0,0167	0,988	41,6	46,7	12,7
Товста кишка	1	0,492	48	7,30	0,0658	0,938	10,5	7,70	5,14
Печінка	0	14,6	96	1,00	0,0290	1,00	23,9	105	4,15
Легені	0,5	20,6	96	165	0,0497	0,939	13,9	167	0,832
М'язи (скелетні)	1	0,275	24	2,64	0,154	0,996	4,50	2,69	1,93
Сідничний нерв	3	0,689	24	9,62	0,166	0,987	4,18	9,77	1,54
Тонка кишка	3	0,832	48	13,2	0,0693	0,932	10,0	13,8	4,29
Спинний мозок (поперековий, грудний, шийний відділи)	0	0,315	24	2,39	0,115	0,991	6,04	2,51	4,87
Селезінка	0	7,27	96	56,1	0,0218	0,964	31,8	61,2	8,33
Шлунок	3	140	96	31,9	0,0330	0,945	21,0	32,3	1,41
Щитовидна/паращитовидна залоза	48	295	96	249S9	b	b	b	b	b

^a Значення не наводяться, оскільки $AUC_{0-\infty}$ екстрапольовані більше ніж на 20 %, або R^2 були < 0,8

^b Немає результатів, що підлягають реєстрації, оскільки кінцева фаза не ідентифікована.

Таблиця 17в

Кінетичний профіль сумарної радіоактивності в тканинах і спинномозковій рідині самців щурів Спраг-Доулі після однократного інтратекального та внутрішньовенного болюсного введення ^{125}I -hGalC

Група 3: При середній дозі 1,08 мг/кг									
	$t_{\max}$ (год.)	$C_{\max}$ (мкг екв/г)	t_{last} (год.)	$AUC_{0-\text{last}}$ (мкг екв•год./г)	k (год ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (год.)	$AUC_{0-\infty}$ (мкг екв•год./г)	% Екстрапо- ляції $AUC_{0-\infty}$
Жирова тканина (жир нирок)	1	0,188	6	0,954	a	0,999	a	a	65,6
Наднирки	0	12,6	96	43,9	0,0354	0,835	19,6	45,8	4,25
Кістка (стегнова)	0,5	1,71	48	21,9	0,0869	0,985	7,98	22,3	1,50
Головний мозок	0	0,287	6	1,03	a	0,992	a	a	36,1
Спинномозкова рідина (СМР)	0	4,89	6	1,94	a	0,775	a	a	5,95
Очі	3	0,611	48	9,88	0,0947	0,988	7,32	9,99	1,06
Серце	0,5	1,32	96	15,7	0,0391	1,00	17,7	15,9	0,967
Нирки	1	3,39	96	57,9	0,0190	0,960	36,4	64,4	10,1
Товста кишка	6	0,726	48	12,4	0,0764	0,911	9,07	12,8	2,77
Печінка	0	11,2	96	96,5	0,0269	0,986	25,7	102	5,00
Легені	1	5,31	96	44,1	0,0252	0,932	27,5	45,4	288
М'язи (скелетні)	1	0,411	24	4,37	0,110	0,997	6,31	4,66	6,25
Сідничний нерв	3	1,04	24	15,6	0,147	0,983	4,71	16,0	2,38
Тонка кишка	3	1,40	48	20,2	0,0851	0,974	8,14	20,6	1,88
Спинний мозок (поперековий, грудний, шийний відділи)	0	0,331	24	3,52	0,105	0,994	6,58	3,77	6,55
Селезінка	0	5,21	96	46,9	0,0347	0,860	20,0	49,3	4,85
Шлунок	3	4,45	96	72,1	0,0557	0,353	12,4	72,6	0,766
Щитовидна/паращитовидна залоза	24	297	96	16776	0,0272	0,982	25,4	18390	8,78

^a Значення не наводяться, оскільки $AUC_{0-\infty}$ екстрапольовані більше ніж на 20 %, або R^2 були < 0,8.

Кров, сироватка й еритроцити

- Після інтратекального введення (група 1: 41 мкг/тварина) середня розрахункова площа під кривими залежності радіоактивності від часу від нуля до останньої вимірюваної точки ($AUC_{0-\text{last}}$) для сироватки, цільної крові та еритроцитів склали 1,48 мкг екв•год./г, 1,33 мкг екв•год./г та 1,24 мкг екв•год./г відповідно. Надані для радіоактивності в сироватці, цільній крові та еритроцитах значення передбачуваного термінального $t_{1/2}$ склали 5,34, 5,02 та 4,08 годин відповідно. Розрахункова константа швидкості елімінації k склали 130 год.⁻¹, 0,138 год.⁻¹ та 0,170 год.⁻¹ у сироватці, цільній крові та еритроцитах відповідно. Розрахункові $AUC_{0-\infty}$ у сироватці, цільній крові та еритроцитах склали 1,54 мкг екв•год./г, 1,37 мкг екв•год./г та 1,25 мкг екв•год./г відповідно. Період елімінації радіоактивності з сироватки, цільної крові та еритроцитів був чітко визначений, на що вказували дуже низькі значення відсотка екстраполяції (4,0; 3,2 та 1,4 % відповідно), необхідні для розрахунків $AUC_{0-\infty}$.
- Після внутрішньовенного введення (група 2: 1,00 мг/кг) середні значення $AUC_{0-\text{last}}$ для сироватки, цільної крові та еритроцитів склали 71,1 мкг екв•год./г, 51,2 мкг екв•год./г та 33,9 мкг екв•год./г, а значення передбачуваного термінального $t_{1/2}$ склали 30,7; 27,1 та 10,9 годин відповідно. Розрахункові значення k склали 0,0226 год.⁻¹, 0,0256 год.⁻¹ та 0,0635 год.⁻¹ у сироватці, цільній крові та еритроцитах відповідно. Період елімінації радіоактивності з сироватки, цільної крові та еритроцитів був чітко визначений, і розрахункові $AUC_{0-\infty}$ склали 75,0 мкг екв•год./г (екстраполяція 5,21 %), 53,2 мкг екв•год./г (екстраполяція 3,75 %) та 35,7 мкг екв•год./г (екстраполяція 4,94 %) у сироватці, цільній крові та еритроцитах відповідно.

Передбачуваний об'єм розподілу (V_z) був найбільшим у цільній крові (735 мл/кг), дещо меншим у сироватці (591 мл/кг) й еритроцитах (441 мл/кг). Кліренс досліджуваної речовини за оцінками склав 13,3 мл/год./кг для сироватки і 18,8 мл/год./кг для цільної крові.

Після інтратекального і внутрішньовенного введення (сумарна доза 1,08 мг/кг) тваринам групи 3 середні значення $AUC_{0-t_{last}}$ для сироватки, цільної крові та еритроцитів склали 89,8 мкг екв•год/г, 66,9 мкг екв•год/г та 49,2 мкг екв•год/г відповідно. Значення передбачуваного термінального $t_{1/2}$ радіоактивності в сироватці, цільній крові та еритроцитах склали 25,5; 20,9 та 9,61 годин відповідно, а значення k склали 0,0272 год.⁻¹, 0,0332 год.⁻¹ і 0,0721 год.⁻¹. У цьому випадку також період елімінації радіоактивності для всіх трьох матриць був чітко визначений, і розрахункові $AUC_{0-\infty}$ склали 92,6 мкг екв•год/г, 68,0 мкг екв•год/г та 51,0 мкг екв•год/г (екстраполяція 3,06, 1,64 та 3,69 %) у сироватці, цільній крові та еритроцитах відповідно. V_z був найбільшим у цільній крові (478 мл/кг), дещо меншим у сироватці (429 мл/кг) і еритроцитах (293 мл/кг). Значення кліренсу склали 15,9 мл/год./кг для цільної крові й 11,7 мл/год./кг - для сироватки.

Тканини

Максимальні значення $AUC_{0-t_{last}}$ у тканинах у щурів після інтратекального введення ¹²⁵I-hGalC (група 1: 41 мкг/тварина) спостерігалися в щитовидній й/паращитовидній залозі (313 мкг екв•год/г), далі йшли шлунок (2,60 мкг екв•год/г) і нирки (1,84 мкг екв•год/г). Для декількох тканин оцінити k або будь-які показники, що обчислюються на основі k (тобто $t_{1/2}$ і $AUC_{0-\infty}$), було неможливо, оскільки % екстраполяції AUC до нескінченності був більше 20 % або через відсутність даних у термінальній фазі. Для тих тканин, де k можна було визначити (очі, серце, нирки, товста кишка, легені, тонка кишка і шлунок), вона варіювала в діапазоні від 0,01 до 0,17 год.⁻¹, а $t_{1/2}$, як правило, варіював у діапазоні від 4 до 6 год., і виключення склали нирки - 58,6 год. та шлунок - 39,1 год.

Після внутрішньовенного введення (група 2: 1,00 мг/кг) максимальні значення $AUC_{0-t_{last}}$ спостерігалися в щитовидній/паращитовидній залозі (24989 мкг екв•год/г), далі йшли легені (165 мкг екв•год/г), печінка (100 мкг екв•год/г), селезінка (56,1 мкг екв•год/г), наднирники (43,1 мкг екв•год/г) і нирки (40,7 мкг екв•год/г). Мінімальні значення $AUC_{0-t_{last}}$ спостерігалися в жировій тканині нирок (0,617 мкг екв•год/г) і головному мозку (0,735 мкг екв•год/г). Показники, що розраховуються на основі k , не наводилися для тканин, у яких фаза елімінації була не чітко визначеною (щитовидна/паращитовидна залоза і СМР) або де екстраполяція $AUC_{0-\infty}$ становила більше 20 % (жирова тканина нирок і головний мозок). Тільки для печінки і легенів значення $AUC_{0-\infty}$ були вищими, ніж значення для сироватки (75 мкг екв•год/г). Максимальні з зафіксованих значень $AUC_{0-\infty}$ були виявлені в легенях (167 мкг екв•год/г; екстраполяція 0,832 %), далі йшли печінка (105 мкг екв•год/г; екстраполяція 4,15 %), селезінка (61,2 мкг екв•год/г; екстраполяція 8,33 %), наднирники (46,8 мкг екв•год/г; екстраполяція 7,89 %) і нирки (46,7 мкг екв•год/г; екстраполяція 12,7 %).

Мінімальні розрахункові значення $AUC_{0-\infty}$ були в спинному мозку (2,51 мкг екв•год/г; екстраполяція 4,87 %), далі йшли м'язи (2,69 мкг екв•год/г; екстраполяція 1,93 %) і очі (5,64 мкг екв•год/г; екстраполяція 5,19 %). Найбільше з розрахованих значень $t_{1/2}$ серед тканин було в нирках - 41,6 годин, далі йшли наднирники - 34,6 годин і селезінка - 31,8 годин. Найменше з зафіксованих значень $t_{1/2}$ було в сідничному нерві - 4,18 годин.

У групі 3 після інтратекального і внутрішньовенного введення (1,08 мг/кг, сумарна доза) максимальні значення $AUC_{0-t_{last}}$ спостерігалися в щитовидній й/паращитовидній залозі (16776 мкг екв•год/г), далі йшли печінка (96,5 мкг екв•год/г), шлунок (72,1 мкг екв•год/г), нирки (57,9 мкг екв•год/г), селезінка (46,9 мкг екв•год/г), легені (44,1 мкг екв•год/г) і наднирники (43,9 мкг екв•год/г). Мінімальні значення $AUC_{0-t_{last}}$ спостерігалися в жировій тканині нирок (0,954 мкг екв•год/г) і головному мозку (1,03 мкг екв•год/г). Показники, що розраховуються на основі k , не наводилися для тканин, у яких екстраполяція $AUC_{0-\infty}$ становила більше 20 % (жирова тканина нирок і головний мозок) або R^2 був нижчим за 0,8 (СМР). Тільки для щитовидної/паращитовидної залози та печінки значення $AUC_{0-\infty}$ були вищими, ніж значення для сироватки (92,6 мкг екв•год/г). Максимальні з зафіксованих значень $AUC_{0-\infty}$ були виявлені в щитовидній/паращитовидній залозі (18390 мкг екв•год/г; екстраполяція 8,78 %), далі йшли печінка (102 мкг екв•год/г; екстраполяція 5,0 %), шлунок (72,6 мкг екв•год/г; екстраполяція 0,766 %), нирки (64,4 мкг екв•год/г; екстраполяція 10,1 %), селезінка (49,3 мкг екв•год/г; екстраполяція 4,85 %), наднирники (45,8 мкг екв•год/г; екстраполяція 4,25 %) і легені (45,4 мкг екв•год/г; екстраполяція 2,88 %). Мінімальні розрахункові значення $AUC_{0-\infty}$ були в спинному мозку (3,77 мкг екв•год/г; екстраполяція 6,55 %), далі йшли м'язи (4,66 мкг екв•год/г; екстраполяція 6,25 %). Найбільше з розрахованих значень $t_{1/2}$ серед тканин було в нирках - 41,6

годин, далі йшли легені - 27,5 годин, печінка - 25,7 годин і щитовидна/паращитовидна залоза - 25,4 годин. Найменше з зафіксованих значень $t_{1/2}$ було в сідничному нерві - 4,71 години.

Обговорення

Після інтратекального введення максимальні середні значення концентрації радіоактивності в сироватці та цільній крові спостерігалися через 3 години після введення, що вказує на відносно швидкий розподіл пов'язаної з дозою речовини у великому колі кровообігу. Після внутрішньовенного введення максимальні середні значення концентрації радіоактивності в сироватці та цільній крові спостерігалися в перший момент часу, в який робили вимірювання. Концентрація в сироватці завжди була вищою, ніж у цільній крові, що відобразилося на відношенні радіоактивності в крові/у сироватці, вищому за 1. Це вказує на те, що в жодній із груп у жодний із моментів часу після введення пов'язана з дозою речовина не була пов'язана головним чином з еритроцитами. Після осадження білків крові з використанням ТХО радіоактивність виявлялася головним чином в осаді, що вказує на те, що більша частина радіоактивності в циркулюючій крові була пов'язана з білками і, отже, спостережуваний розподіл радіоактивності в основному не відображав кінетики вільного йоду-125.

Порівняння групи 2 (доза для внутрішньовенного введення 1,00 мг/кг) і групи 3 (сумарна доза для інтратекального та внутрішньовенного введення 1,08 мг/кг) показало, що концентрації в цільній крові в групі 3, очевидно, були досить близькі до концентрацій у групі 2. Зменшення радіоактивності в обох матрицях для обох груп також було досить схожим, що оцінювали за відношенням радіоактивності в крові/у сироватці. Порівняння $AUC_{0-t_{last}}$ і $AUC_{0-\infty}$ для сироватки та крові групи 2 і групи 3 показало, що вплив пов'язаної з дозою речовини був дещо вищим у тварин групи 3.

У групі 1 рівень радіоактивності в СМР був дуже низьким - це результат, який, як представляється, не узгоджується з результатом прямого введення тестованої речовини до інтратекального простору, хоча в головному мозку спостерігався дуже низький рівень. Однак радіоактивність виявлялася у великому колі кровообігу й у системних тканинах незабаром після введення, що вказує на те, що пов'язана з дозою речовина достатньо швидко розподілялася з інтратекального простору після введення. Більш високий рівень радіоактивності у вмісті шлунка й кишечника вказує на те, що пов'язана з дозою речовина екскретувалася з калом, хоча пряме вимірювання в екскретах у даному дослідженні не проводили. Крім того, високий рівень радіоактивності у вмісті сечового міхура також вказує на екскрецію з сечею. Крім високого рівня радіоактивності в щитовидній/паращитовидній залозі, який, як припускається, відображає втрату йодної мітки та збереження мітки в даній тканині, а не розподіл/збереження самої тестованої речовини, високий рівень радіоактивності спостерігався в печінці, легенях, наднирниках, селезінці та нирках - тканинах, які ймовірно беруть участь у метаболізмі і/або екскреції тестованої речовини.

У групах 2 і 3 розподіл радіоактивності був загальним і великим до першого моменту часу після введення препарату. Максимальна концентрація зазвичай була пов'язана з печінкою, легенями, нирками, селезінкою, наднирниками і, особливо, зі щитовидною/паращитовидною залозою. Таким чином, характер розподілу радіоактивності в тканинах усіх трьох груп був в основному схожим. Також високий рівень радіоактивності спостерігався в щитовидній/паращитовидній залозі всіх тварин, особливо з урахуванням помітного наростання концентрації при збільшенні часу після введення, що ймовірно вказує на втрату йодної мітки та збереження мітки в даній тканині, а не розподіл/збереження самої тестованої речовини. У ранні моменти часу після введення рівень радіоактивності в СМР був вищим у зазначених групах, ніж у групі 1, що вказує на те, що радіоактивно мічена речовина здатна проходити через гематоенцефалічний бар'єр. У цій групі рівень радіоактивності був дещо вищим, ніж у групі 2, також у ранні моменти часу після введення, що вказує на те, що зазначена концентрація обумовлена тестованою речовиною, яка розподілилася з внутрішньовенної дози, і речовиною, безпосередньо введеною до інтратекального простору. Отже, значення, нижчі від МКВ, які спостерігаються в групі 1, можуть пояснюватися дуже низькими концентраціями в дуже маленьких об'ємах проб, що виявляються нижчими від чутливості даного методу аналізу.

Відношення радіоактивності в тканинах/у сироватці через 96 годин після введення препарату зазвичай було меншим за 1 у більшості тканин, що вказує на те, що пов'язана з дозою речовина розподілялася в тканині й зазвичай виводилася більш легко з тканин, ніж із сироватки. Для всіх груп вплив пов'язаної з дозою речовини в більшості тканин (оцінюваний за $AUC_{0-t_{last}}$) був меншим, ніж у сироватці.

Висновки

Концентрацію радіоактивності в крові, сироватці, еритроцитах, СМР і тканинах визначали після однократного інтратекального введення (номінальна доза 60 мкг/тварина) і/або

внутрішньовенного болюсного введення ^{125}I -hGalC самцям щурів (номінальні концентрації 1 мг/кг).

Максимальні спостережувані значення концентрації радіоактивності як у сироватці, так і в цільній крові мали місце через 3 години після інтратекального введення препарату, що вказує на відносно швидке проникнення до великого кола кровообігу, або в перший момент часу після введення (10 хвилин) після внутрішньовенного введення. Концентрація в сироватці була вищою, ніж у крові, що вказує на те, що пов'язана з дозою речовина не асоційована головним чином з еритроцитами. Розподіл радіоактивності був загальним і великим до першого моменту часу після введення препарату, і, в цілому, характер розподілу в тканині був схожим у всіх трьох групах. У всіх групах вплив у більшості тканин пов'язаної з дозою речовини (оцінюваний за $\text{AUC}_{0-\text{last}}$) був меншим, ніж у сироватці. Висока концентрація радіоактивності в щитовидній/паращитовидній залозі для всіх трьох груп, як припускається, відображає втрату йодної мітки та збереження мітки в даній тканині, а не розподіл/збереження самої тестованої речовини в зазначеній тканині. Через 96 годин після внутрішньовенного введення радіоактивність усе ще виявляється в декількох із досліджуваних тканин.

ПРИКЛАД 3: ДОКЛІНІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

ІНТРАЦЕРЕБРОВЕНТРИКУЛЯРНОГО/ВНУТРІШНЬОЧЕРЕВИННОГО ВВЕДЕННЯ rmGalC І ТРИВАЛОЇ ВИЖИВАНOSTІ У МИШЕЙ ЛІНІЇ TWITCHER

У даному прикладі продемонстрований один варіант реалізації доклінічного дослідження, який ілюструє тривалу виживаність у мишей лінії Twitcher, забезпечену щотижневими ВЧ (внутрішньочеревинними) ін'єкціями rmGalC. У цьому варіанті реалізації була відмічена посилена мієлінізація сідничного нерва поряд зі зниженням рівня психозину покращенням загальної моторики (тобто ходи). Згідно з деякими варіантами реалізації, миші лінії Twitcher, яких лікували шляхом однократного інтрацеребровентрикулярного (ІЦВ) або ІЦВ/ВЧ введення rmGalC, демонстрували підвищену виживаність, і рівень психозину у них знижувався до 63 %. Позитивні результати за важливими кінцевими показниками (тобто виживаність, рівень психозину в головному мозку) після однократного тільки ІЦВ введення rmGalC і мінімальне покращення зазначених кінцевих точок при додаванні системного введення (ІЦВ/ВЧ) вказують на те, що при лікуванні глобійдно-клітинної лейкодистрофії (ГКД) єдиним доцільним варіантом є режим введення тільки до ЦНС.

Введення

Глобійдно-клітинна лейкодистрофія (ГКД) являє собою аутосомно-рецесивну лізосомну хворобу накопичення, яка виникає з частотою 1:100000 немовлят (1,9:100000 немовлят у Скандинавських країнах). Будучи прогресуючим розладом периферичної (ПНС) і центральної нервової системи (ЦНС) ГКД є наслідком генетичної мутації, яка викликає недостатність активності ферменту галактоцереброзидази (GalC), який розщеплює ліпідні субстрати [тобто галактозилцераміди до галактози тацераміду, галактозилсфінгозин (психозин) до галактози та сфінгозину]. Зазначений розлад характеризується повною втратою олігодендроцитів і мієліну, а також наявністю галактозилцерамід-поглинаючих макрофагів ("глобійдних" клітин).

Клінічні ознаки зазначеного захворювання проявляються в двох формах: інфантильній і пізній. Інфантильна форма ГКД (також називана хворобою Краббе) виникає у 90 % від усіх пацієнтів з діагнозом недостатності GalC, і симптоми зазвичай спостерігаються в перші 3-6 місяців після народження; є повідомлення про прояв симптомів у перші 2-3 тижні життя (Wenger, D.A. et al., 2001, Galactosylceramide Lipidosis: Globoid Cell Leukodystrophy (Krabbe Disease), in The Metabolic i Molecular Bases of Inherited Disease, C.R. Scriver, Beaudet, A. L., Sly, W.S., i Valle, D, Editor. 2001, McGraw-hill. p. 3669-3687; включена до даної заявки за допомогою посилання). Пізній варіант зазначеного захворювання зазвичай проявляється клінічно у віці 10 років, однак є повідомлення про пацієнтів, яким діагноз був поставлений у 40 років (Wenger, D.A. et al., 2001, Galactosylceramide Lipidosis: Globoid Cell Leukodystrophy (Krabbe Disease), in The Metabolic i Molecular Bases of Inherited Disease, C.R. Scriver, Beaudet, A. L., Sly, W.S., i Valle, D, Editor. 2001, McGraw-hill. p. 3669-3687; включена до даної заявки за допомогою посилання). Зниження функції у пацієнтів із пізньою формою захворювання відбувається поступово протягом декількох років.

Пацієнтам, що страждають лізосомальними хворобами накопичення (ЛХН), такими як хвороба Гоше, хвороба Фабрі та синдром Хантера, приносить користь системна замісна ферментна терапія (ЗФТ) (Wenger, D.A. et al., 2001, Galactosylceramide Lipidosis: Globoid Cell Leukodystrophy (Krabbe Disease), in The Metabolic i Molecular Bases of Inherited Disease, C.R. Scriver, Beaudet, A. L., Sly, W.S., i Valle, D, Editor. 2001, McGraw-hill. p. 3669-3687; Neufeld, E.F., 2004, Enzyme Replacement therapy. Lysosomal disorders of the Brain, ed. F.M.a.W. Platt, S.V. 2004: Oxford University Press. 327-338; Desnick, R.J., 2004. J. Inherit. Metab. Dis., 27(3): p. 385-410; yci

публікації включені до даної заявки за допомогою посилання). ЗФТ при ГКД не дозволяла подолати тремтіння, ймовірно через те, що зазначене захворювання уражає і ПНС, і ЦНС. Сучасні способи лікування пацієнтів із ГКД включають трансплантацію гематопоетичних клітин (ТГК), однак зазначена процедура має свої обмеження через суттєві небажані явища (тобто 30 % смертність у зв'язку з лікуванням, імунопригнічуюча терапія на все життя) і має ефективність тільки у пацієнтів, у яких ще не розвинулися симптоми.

Мишей лінії Twitcher є найпоширенішою експериментальною моделлю для вивчення ГКД на тваринах, і більшість робіт із даного захворювання зроблена саме на них (Wenger, D.A., 2000, *Mol. Med. Today*, 6(11): р. 449-451; включена до даної заявки за допомогою посилання), але є й інші моделі ГКД на основі існуючих у природі тварин, охарактеризованих у різному ступені. Спонтанна мутація має місце у вест-хайленд-уайт/керн-тер'єрів (Kobayashi T., et al., 1980, *Brain Res.*, 202:479-83; включена до даної заявки за допомогою посилання), у овець дорсет (Pritchard D., et al., 1980, *Vet. Patkol.*, 17:399-405), домашніх кішок (Johnson K., 1970, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 157:2057-64; включена до даної заявки за допомогою посилання) і нижчих приматів (Baskin G., et al., 1998, *Lab Anim. Sci.*, 48:476-82; включена до даної заявки за допомогою посилання).

Перші дослідження з алогенними трансплантами нервів продемонстрували, що здатність до покращення функції шванівських клітин у периферичних нервах у мишей лінії Twitcher була обумовлена заповненням ферменту в алогенному трансплантаті клітин лінії Twitcher *in situ* і що є можливим довгострокове відновлення ушкоджених периферичних мієлінізуючих клітин у лінії Twitcher. Однак зазначену методику не вдалося поширити на лікування мишей лінії Twitcher (Baskin G., et al., 1998, *Lab Anim. Sci.*, 48:476-82; включена до даної заявки за допомогою посилання). У хворих мишей ТГК продемонструвала значне збільшення тривалості життя, однак була зареєстрована різна ефективність, від 44 днів до більш ніж 100 днів (у мишей, які витримуються в умовах, що сприяють продукції мієліну) (Lin, D., et al., 2007, *Mol. Ther.*, 15(1): р. 44-52; Hoogerbrugge, P.M., et al., 1998, *J. Clin. Invest.*, 81(6): р. 1790-4; обидві публікації включені до даної заявки за допомогою посилання). Типова тривалість життя мишей без лікування в даних дослідженнях становить приблизно 40 днів.

У цьому та інших дослідженнях ні швидкість повторної мієлінізації, ні наявність патології головного мозку у мишей, яких піддавали лікуванню, не покращувалися в порівнянні з контролем без лікування (Yeager A., et al., 1984, *Science*, 225:1052-4; Toyoshima, E., et al., 1986, *J. Neurol. Sci.*, 74(2-3), р. 307-18; обидві публікації включені до даної заявки за допомогою посилання). Субстратне інгібування, спрямоване на синтез сфінгозину, з використанням L-циклосерину, або одне, або в комбінації з пересадкою гематопоетичних клітин, збільшує тривалість життя у мишей лінії Twitcher (Levine S., et al., 2000, *J. Neurosci. Res.*, 60:231-6; Biswas S., et al., 2003, *Neurosci. Lett.*, р. 347:33-6; обидві публікації включені до даної заявки за допомогою посилання). L-циклосерин є занадто токсичним для застосування у людини на відміну від D-циклосерину, який показаний при лікуванні тривожності. Експерименти з генною терапією показали можливість генерування ферменту в трансфектованих клітинах і збільшення тривалості життя у мишей лінії Twitcher або при монотерапії, або в комбінації з пересадкою гематопоетичних клітин (Lin, D., et al., 2007, *Mol. Ther.*, 15(1): р. 44-52; включена до даної заявки за допомогою посилання). Зниження рівня субстрату, пересадка гематопоетичних клітин і генна терапія мають найбільшу ефективність, коли їх застосовують у тварин до розвитку симптомів, і не виявляють впливу або виявляють лише обмежений вплив на захворювання з симптомами, що проявилися. Отже, ЗФТ може бути доцільним варіантом вибору при лікуванні ГКД, особливо у пацієнтів, у яких симптоми ще не розвинулися.

Результати

Замісна ферментна терапія з системним введенням мишачого GalC, отриманого з hEK 293 (rmGalC; 5 мг/кг), який вводили периферично шляхом багаторазових внутрішньочеревинних (ВЧ) ін'єкцій, збільшувала тривалість життя мишей лінії Twitcher і знижувала накопичення психозину на 15 % у порівнянні з тваринами, що одержували тільки основу (Таблиця 18, Фігура 31).

Таблиця 18

ВЧ введення gmGalC збільшує виживаність у мишей лінії Twitcher

Групи за рівнем доз	Вживаність (дні)			Аналіз Манна-Уїтні (в порівнянні з основою)
	Середнє	Розкид		
		Мін.	Макс.	
Без лікування	42,6	39	45	0,49
Основа	43,2	37	48	н/з
1 мг/кг	43,0	40	46	0,61
5 мг/кг	48,9	46	54	0,0003
10 мг/кг	49,2	47	54	0,0003

Миші, яким ВЧ вводили gmGalC, демонстрували кращі результати при тестуванні ходи, і результати гістопатологічного дослідження сідничного нерва також були кращими в порівнянні з тваринами, яких не піддавали лікуванню. Периферичне (ВЧ) введення gmGalC призводило до мінімальної доставки до головного мозку, що викликає легке зниження рівня психозину в головному мозку і, очевидно, не відбувалося ніяких змін результатів гістопатологічного дослідження головного мозку. Отже, результати, які спостерігалися у мишей лінії Twitcher при багаторазовому системному введенні gmGalC (ВЧ) один раз на тиждень (5 мг/кг), призводили до сприятливої дії на виживаність, невеликого зниження рівня психозину в головному мозку і покращення загальної моторики.

Однократне ІЦВ і комбіноване ІЦВ/ВЧ введення gmGalC у мишей лінії Twitcher

Результати показують, що тварини групи, яка одержувала високі дози ІЦВ/ВЧ, виживали в середньому протягом 50 днів (120 мкг/5 мг/кг), тоді як тварини, які одержували тільки основу, виживали тільки протягом 36 днів (Фігура 32). Миші, які одержували gmGalC тільки ІЦВ, демонстрували дозозалежний середній час виживання - 42 дні (40 мкг) і 48 днів (120 мкг). Однократна ІЦВ ін'єкція дози 120 мкг призводила до зниження рівня психозину в головному мозку (Фігура 33). Хоча ІЦВ/ВЧ введення не давало ніякого додаткового сприятливого ефекту відносно зниження рівня психозину в порівнянні з тільки ІЦВ введенням, зниження рівня психозину на 48 %, яке спостерігалось при комбінованому режимі, було значущо нижчим, ніж зниження, яке спостерігалось тільки при ВЧ введенні один раз на тиждень (15 %). Крім того, при введенні 40 мкг ІЦВ спостерігалось покращення результатів гістологічного дослідження головного мозку в ділянках дистальніше ділянки ін'єкції (Фігура 34). Зазначені результати підтверджують активність і біорозподіл gmGalC у головному мозку після прямого ІЦВ введення. Однак миші, що одержували gmGalC ІЦВ шляхом, не демонстрували відновлення морфології або мієлінізації волокон сідничного нерва, а демонстрували лише слабе покращення загальної моторики (тобто аналіз ходи). Значуще покращення стосовно важливих кінцевих точок (тобто виживаність, рівень психозину в головному мозку) після однократного тільки ІЦВ введення gmGalC вказує на те, що достатньої концентрації ферменту у великому колі кровообігу не створюється.

Параметри введення в клінічних умовах; швидкість повторного накопичення психозину у мишей лінії Twitcher

У спробі визначити придатний діапазон доз на мишах лінії Twitcher проводили наступні дослідження:

- Визначення швидкості повторного накопичення психозину в головному мозку у мишей лінії Twitcher після однократної ІЦВ ін'єкції на 19-ий день після народження (ДПН).

- Дослідження з підбору доз із застосуванням комбінованого внутрішньочеревинного (ВЧ) та інтрацеребровентрикулярного (ІЦВ) введення gmGalC мишам лінії Twitcher

Щоб оцінити швидкість повторного накопичення психозину в центральній нервовій системі, мишам лінії Twitcher однократно ІЦВ вводили 12 мкг або 40 мкг gmGalC на 19-ий ДПН. Групи мишей (n=3) умертвлювали через 24 години після ін'єкції (20-ий ДПН) і потім далі кожні три дні. Тканини головного мозку відбирали й передавали для визначення рівня психозину, гістопатологічного дослідження й аналізу активності ферментів. Підгрупу тварин залишали для спостереження для оцінки виживаності (n=8), а аналіз загальної моторики (аналіз ходи) проводили на 40-ий ДПН.

Рівень психозину в гомогенаті головного мозку після однократної ІЦВ ін'єкції оцінювали за допомогою мас-спектрометрії ("LCMS Ltd.", Північна Кароліна), і результати показали швидке зниження рівня психозину в перші 24 год. після введення gmGalC (Фігура 35). Тенденція до

зниження рівня психозину зберігалася протягом 24 год. після введення ферменту. Крім того, зниження концентрації психозину, очевидно, було дозозалежним протягом зазначеного періоду в порівнянні з тваринами, які одержували тільки основу: тварини, що одержували основу (середня концентрація психозину: 4,5 нг/мл); тварини, що одержували 12 мкг gmGalC (середня концентрація психозину: 2,5 нг/мл); тварини, що одержували 40 мкг gmGalC (середня концентрація психозину: 1,6 нг/мл). Цікаво, що підвищення рівня психозину, яке спостерігали в групах обох доз до кінця дослідження (дні 28-32 після лікування) вказують на те, що ЗФТ не буде успішною, якщо препарат вводити один раз на місяць. Можливо, необхідне більш часте введення препарату. Через малу кількість тварин у кожний момент відбору проб варіабельність результатів була очевидною. Однак на основі зазначених результатів ясно, що повторне накопичення психозину виникає приблизно через 4 тижні (28 днів).

Результати аналізу часу виживання показали, що тварини і в групі, що одержувала 12 мкг/мл, і в групі, що одержувала 40 мкг/мл, демонстрували медіану виживаності 48 днів (12 мкг/мл) і 50,5 днів (40 мкг/мл), тварини, що одержували тільки основу, -40 днів (Фігура 36). Несподівано миші, що одержували 40 мкг GalC людини (rhGalC), продемонстрували позитивну виживаність тільки 42 дні в порівнянні з виживаністю тварин, що одержували тільки основу, 40 днів. Причини такої зниженої ефективності rhGalC невідомі, але будуть обговорюватися в наступному розділі. Однак на основі результатів даного дослідження очевидно, що навіть при більш низьких дозах gmGalC є ефективною стосовно збільшення виживаності в моделі на мишах лінії Twitcher.

Показники введення в клінічних умовах: дослідження з підбору доз gmGalC і rhGalC на мишах лінії Twitcher

Попередні результати показали, що миші лінії Twitcher, які одержували ІЦВ/ВЧ gmGalC (120 мкг і 5 мкг/кг), жили на 14 днів довше, ніж тварини, які одержували тільки основу. Однак миші лінії Twitcher, які одержували препарат тільки в формі ін'єкцій безпосередньо до ЦНС, демонстрували дозозалежне збільшення середньої виживаності на 12 днів (120 мкг ІЦВ) і 6 днів (40 мкг ІЦВ). Доза 120 мкг, яка вводиться до мозку миші, переводиться в дозу 300 мкг/кг, яка вводиться до мозку пацієнта; отже, було важливим досліджувати ефективність більш низьких доз gmGalC. Крім того, на мишах лінії Twitcher оцінювали ефективність початкової партії rhGalC. Групам мишей один раз на тиждень робили ВЧ ін'єкції gmGalC (5 мг/кг), починаючи з 10-го ДПН, плюс однократну ІЦВ ін'єкцію або 12 мкг (30 мг/кг маси мозку), або 26 мкг (60 мг/кг маси мозку) gmGalC чи rhGalC на 19-ий ДПН. На 39-ий ДПН підгрупу мишей (n=3/групу) умертвлювали для відбору тканин (головного мозку, сидничного нерва, печінки, сироватки). Тканину головного мозку передавали для оцінки рівня психозину, гістопатологічного дослідження й кількісної оцінки активності ферменту. Частину тварин залишали (n=8) для спостереження за виживаністю й аналізу ходи.

Обговорення

Результати даного дослідження з підбору доз вказують на позитивний ефект введення gmGalC з тенденцією до залежності від дози (Фігура 37). Комбіновані дози gmGalC 12 мкг/5 мкг/кг і 26 мкг/5 мкг/кг збільшують середню тривалість життя мишей лінії Twitcher до 44,5 і 45,5 днів відповідно при тривалості життя 40,5 днів у тварин, що одержували тільки основу. Не було позитивного впливу доз rhGalC 12 мкг/5 мкг/кг (38 днів) і 26 мкг/5 мкг/кг (39,5 днів) на виживаність. Доза rhGalC 26 мкг/5 мкг/кг збільшувала тривалість життя хворих мишей лінії Twitcher на 1,5 дні, однак жодна з доз rhGalC не збільшувала виживаність тварин ні на один день у порівнянні з тваринами, що одержували тільки основу (Фігура 37). Як спостерігалася раніше у тварин, що одержували gmGalC системно (ВЧ), покращення ходи спостерігалася у всіх тварин, яким gmGalC вводили в комбінації ІЦВ/ВЧ, тоді як тварини, що одержували однократну ІЦВ ін'єкцію, демонстрували менш виражений позитивний вплив на рухову функцію (Фігура 38). Як і у випадку позитивного впливу на тривалість життя, у мишей, що одержували rhGalC, не відмічалася позитивного впливу на ходу. Однак було показано, що питома активність rhGalC становила приблизно 33 % від активності gmGalC in vitro (Таблиця 19). Отже, дані результати вказують, що навіть при більш низьких дозах gmGalC має місце позитивний ефект як на виживаність, так і на рухову функцію, і підтверджують можливість ЗФТ при ГКД. Очевидно, що повторне накопичення психозину настає приблизно через 4 тижні (28 днів).

Активність rmGalC і rhGalC

Партія	Середня активність (мкмоль/год./мг)	% rmGalC
rmGalC R5 (3,44 мг/мл)	154,48±87,5	н/з
rhGalC Lot 73 (8,74 мг/мл)	51,35±16,2	33

Слід очікувати антигенності rmGalC і rhGalC, оскільки миші лінії Twitcher є нульовою моделлю [тобто вони являють собою імунологічний матеріал із негативною перехресною реакцією/(CRIM)-негативні]. У цілому максимальний титр антитіл у сироватці у мишей, що одержували rhGalC (ІЦВ/ВЧ режим), був значно вищим, ніж у мишей, що одержували rmGalC (порівнянний ІЦВ/ВЧ режим) (Фігура 39). Хоча антитіла також були присутніми у мишей, що одержували ін'єкції безпосередньо до ЦНС, максимальний титр був у них у кілька разів нижчим, ніж у тварин, що одержували препарат ІЦВ/ВЧ. Існує можливість того, що будуть продукуватися нейтралізуючі антитіла.

Були розпочаті дослідження на собаках із недостатністю GalC, щоб охарактеризувати антигенність rhGalC. У даному дослідженні хворі тварини (6 тижнів від народження) одержували 2 мг/кг один раз на тиждень BV і/або 2,25 мг (30 мг/кг маси мозку) інтратекально GalC людини або тільки основу. Додатково препарат вводили через 8 тижнів і далі один раз на місяць до кінця дослідження (приблизно до віку 16 тижнів). Перед евтаназією відбирали СМР для оцінки утворення антитіл і рівня психозину (Фігура 40).

Попередні дослідження з рекомбінантною гепарин-N-сульфатазою людини в моделі MPSIIIA на вівчарках продемонстрували значущу гуморальну відповідь на ендogenous фермент, що призвело до необхідності толеризації тварин у зазначеному дослідженні. Однак попередні результати аналізу СМР тварин, яких раніше не лікували і які одержували rhGalC, демонструють явне зниження рівня психозину в порівнянні з контрольними групами без лікування (Фігура 40).

ПРИКЛАД 4: ГІСТОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ТА ПЕЧІНКИ /МІЧЕННЯ GalC, ЯКУ ВВОДИЛИ МИШАМ ІТ

У даному прикладі описаний один варіант реалізації hGalC і mGalC, які вводили мишам інтратекально, та відповідне визначення й локалізація антитіла до GalC у різних тканинах.

Схема експерименту:

Група	N	Препарат	Доза (мкг)	Об'єм, який вводили (мкл)	Шлях	Частота	Умертвіння
A	6	Контроль - основа	0	10 мкл	ІТ	Три ін'єкції один раз на тиждень	Через 24 години після останньої ін'єкції
B	6	hGalC (дослідження)	100				
C	6	hGalC (PD)					
D	6	mGalC					

Відбір тканин і гістологічне фарбування

Для гістологічного аналізу були доступні тканини тільки від трьох тварин із групи В і С відповідно. Проби з головного мозку й печінки фіксували в 10 % нейтральному буферному формаліні з наступним поміщенням у парафін. Для імуногістохімічного фарбування (ІГХ) І2S з метою визначення білків, які вводили, готували парафінові зрізи товщиною 5 мкм. Для ІГХ фарбування GalC застосовували три анти-GalC антитіла.

1. Мишаче моноклональне антитіло (згенероване в лабораторії д-ра Екмана)
2. Поліклональне антитіло кролика (згенероване групою 1)
3. Поліклональне антитіло кролика (згенероване групою 2)

Для мічення цільових білків застосовували високочутливий спосіб посилення флуоресценції з використанням АВС (авідин-біотин-пероксидазний комплекс) + тираміду. Результати фарбування були представлені як зелене фарбування OaIC-позитивних клітин і синє контрастне фарбування ядер, а фонові області були чорними.

Результати

Поліклональні антитіла групи 1 мали сильну перехресну реактивність із ендogenous білками в головному мозку мишей. Навіть у головному мозку контрольних тварин, що одержували тільки основу, усі клітини в ЦНС мали сильне позитивне фарбування. Білки, які вводили, не ідентифікувалися на такому сильно офарбленому фоні (Фігура 41). Поліклональні антитіла групи 2 мали більш слабку перехресну реактивність із ендogenous білками в головному мозку мишей, але клітини в ЦНС контрольних тварин, що одержували тільки основу, все-таки мали позитивне фарбування. Білки, які вводили, не виявлялися на зазначеному фоні (Фігура 42). Мишачі моноклональні антитіла мали прийнятну специфічність, і в головному мозку контрольних тварин (тільки основа) сигнали були набагато нижчими (дані не показані). Після ІТ ін'єкції всі білки виявлялися в оболонках на поверхні головного мозку. У клітинах ЦНС (нейрони та клітини глії) hGalC і групи 1, і групи 2 виявлялися в областях під оболонками мозку, і відносно більш сильний сигнал був у тварин, що одержували hGalC групи 1. У головному мозку тварин, що одержували mGalC, не виявлялося ніяких позитивно офарблених нейронів або клітин глії (Фігура 43). У мозочку hGalC викликала фарбування в оболонках і на поверхні зернистої зони, тоді як mGalC такого фарбування не викликала (Фігура 44). Мишачі моноклональні антитіла працювали в головному мозку мишей, але проявляли сильну перехресну реактивність із синусоїдальними клітинами печінки, і їх не можна було застосовувати для оцінки клітинного захоплення білків, які вводили ІТ, в печінці (Фігура 45). Поліклональні антитіла групи 2 демонстрували специфічність у тканинах печінки, і в головному мозку контролю, що одержував тільки основу, сигнал був набагато нижчим. Усі білки, що вводяться ІТ, виявлялися як у синусоїдальних клітинах, так і в гепатоцитах печінки після введення препарату, а кількість позитивно офарблених клітин і сигнал у тварин, що одержували hGalC групи 1, були меншими (Фігура 46). Хоча в жодній із груп, що одержували препарат, не було виявлено більш високої активності GalC, позитивне фарбування виявлялося в оболонках мозку й у клітинах ЦНС у навколишніх областях, що вказує на те, що ІГХ є чутливою при визначенні білків, які вводили, що були захоплені на клітинному рівні (Фігура 47). У печінці mGalC демонструвала більш високу активність, однак ІГХ фарбування з використанням антитіла групи 2 виявило дуже незначні відмінності між mGalC і hGalC (Фігура 48). Низька визначувана активність антитіла групи 1 стосовно hGalC узгоджувалася з низьким спостережуваним рівнем ІГХ фарбування.

Висновки

Після ІТ-введення всі білки, які вводили, виявлялися в оболонках мозочка при ІГХ офарбленні. У клітинах ЦНС (нейрони та клітини глії) виявлялося клітинне захоплення введеної hGalC і групи 1, і групи 2, і відносно більш сильний сигнал був у головному мозку тварин групи 1, що одержували hGalC. Ніяких позитивно офарблених нейронів і клітин глії в головному мозку тварин, що одержували mGalC, не виявлялося. У мозочку, крім позитивного сигналу в оболонках, введений hGalC і групи 1, і групи 2 виявлявся в шарах клітин на поверхні зернистої зони. У печінці тварин усіх груп, що одержували активний препарат, білки, які вводили, виявлялися в синусоїдальних клітинах і гепатоцитах, що вказує на підсумкове захоплення інтратекально введеної І2S системою кровообігу. mGalC і hGalC групи 2 давали однаково сильний сигнал при офарбленні в порівнянні з hGalC групи 1.

ПРИКЛАД 5: ГІСТОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ТА ПЕЧІНКИ /МІЧЕННЯ GalC, ЯКУ ВВОДИЛИ ІТ СОБАКАМ

У даному прикладі описаний один варіант реалізації GalC, яку вводили собакам інтратекально, і відповідні визначення та локалізація антитіла до GalC у головному мозку. Згідно з даним варіантом реалізації, білок, який вводили ІТ, виявлявся в оболонках мозку й області поверхневого шару кори під оболонками. Білок, який вводили ІЦВ, виявлявся в перивентрикулярних областях (Фігура 49). ІГХ фарбування на GalC показало дифузійний позаклітинний характер фарбування в корі після ІТ-введення, причому в нейронах сигнал був негативним (обведено кружечками) (Фігура 50). У перивентрикулярних областях після ІЦВ введення й у корі після ІТ-введення спостерігалася обмежене зменшення числа активованих клітин мікроглії з позитивним Іba-фарбуванням (Фігура 51). У корі при офарбленні барвником luxol-fast-blue/парааміносалициловою кислотою в групі, яка одержувала тільки основу, ніяких морфологічних змін (глобоїдні клітини) не виявлялося, і між групами ніяких відмінностей не спостерігалася. Кількість глобоїдних клітин (стрілка), маркованих шляхом фарбування Іba, знижувалася після ІЦВ введення препарату до 4 обмежених ділянок перивентрикулярних областей (Фігура 52).

Приклади ІТ доставки білка І2S

ПРИКЛАД 6: БІОРОЗПОДІЛ І2S, ЯКА ДОСТАВЛЯЄТЬСЯ ІТ

Основне завдання даного дослідження полягало в тому, щоб визначити, чи можна доставити рекомбінантну І2S (ідуронат-2-сульфатазу) людини до головного мозку дорослих

мишей із МБД (міофасціальним больовим дисфункціональним синдромом) II при інтратекальному введенні до поперекового відділу.

Таблиця 20

Шість груп самців мишей у віці 8-12 тижнів одержували наступне лікування:

Група	К-сть	Штам	Лікування	Об'єм	Доза	Доза/масу мозку	Шлях введення
A	3	ІКО	I2S	10 мкл	260 мкг	520 мг/кг	ІТ-поперековий
B	3	ІКО	I2S	10 мкл	260 мкг	520 мг/кг	ІТ-поперековий
C	3	ІКО	Без лікування	н/з	н/з	н/з	н/з
D	1	ІКО	I2S	10 мкл	260 мкг	520 мг/кг	ІТ-поперековий
E	3	ІКО	Без лікування	н/з	н/з	н/з	н/з
F	3	C57B1/6	Без лікування	н/з	н/з	н/з	н/з

5 Схема введення: тваринам робили до 3 ін'єкцій ідурсульфазу (10 мкл) інтратекальним шляхом до поперекового відділу:

- групи A & D: були введено 3 дози I2S у дні 1, 8 і 15
- група B: були введено 2 дози I2S у дні 1 і 8
- групи C & E: контрольні миші (ІКО), яких не піддавали лікуванню
- група F: контрольні миші дикого типу, яких не піддавали лікуванню

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Тварини:

15 Мишей розміщали в групах до 4 особин у клітці в приміщенні для утримання з 12-годинним циклом світло-темрява. Протягом усього експерименту миші одержували корм для гризунів (Labdiet-5001, Сент-Луїс, Міссурі) і воду (Lehington, вода з міського водопроводу Масачусетса, очищена шляхом зворотного осмосу) у необмеженій кількості. Догляд за тваринами відповідав рекомендаціям, описаним у Інструкції з утримання та використання лабораторних тварин (National Academy Press, Washington D.C., 1996). Використовували колонію молодняку ІКО одержували від чотирьох гетерозиготних самок мишей - носіїв мутації ІКО, яких одержали з лабораторії д-ра Джозефа Мюнзера (Університет Північної Кароліни). Самок-носіїв схрещували з самцями мишей початкової лінії C57BL/6 (C57BL/6NTac, Taconic, Гудзон, Нью-Йорк), одержуючи гетерозиготних самок і гемізиготних самців з нокаутом, а також однопомічених самців і самок дикого типу. Генотип усього потомства визначали за допомогою ПЛР тканинної ДНК. Усі тварини, застосовувані в даному експерименті, були самцями, у яких був ідентифікований гемізиготний ІКО (-/0), або однопоміченими самцями дикого типу (ДТ) (+/0) у віці від 8 до 12 тижнів.

Ідурсульфаза:

30 Двадцять два мілілітри I2S [рекомбінантної ідурсульфазу людини] діалізували за допомогою чотирьох змін 2 л фізіологічного розчину на фосфатному буфері (ФБР). Потім I2S концентрували на колонці Vivaspın і повторно суспендували в кінцевому об'ємі ФБР 1 мл, після чого піддавали стерильній фільтрації з застосуванням фільтра з діаметром пор 0,2 мкм. Кінцева концентрація становила 51 мг/мл.

Інтратекальні ін'єкції в поперековий відділ:

35 Дорослих мишей піддавали анестезії за допомогою внутрішньочеревинної ін'єкції 1,25 % 2,2,2-трибромметанолу (авертину) в концентрації 200-300 мл/10 грамів маси тіла (250-350 мг/кг). Шерсть на спині видаляли від основи хвоста до області лопаток, і обголену область протирали тампоном зі скрабом на основі повідину/бетадину і далі - спиртом. Над попереково-крижовим відділом хребта робили маленький розріз шкіри по серединній лінії (1-2 см) і знаходили місце перетину серединної лінії спини та ближчого до голови краю крил клубової кістки (одиначна клубова кістка). М'яз у клубовій ямці (середній сідничний) являє собою м'яз у формі серця, і дві сторони верхівки "серця" вказують приблизне розташування крил клубової кістки. Голку 32 калібру, приєднану до герметичного скляного шприца Гамільтона об'ємом 10-20 мкл, вводили доти, доки не виникав опір з боку кістки, що лежить нижче. Потім проводили ін'єкцію 10 мкл тестованої речовини з приблизною швидкістю 2 мкл/20 секунд (10 мкл/2 хвилини). Розріз шкіри зашивали шляхом накладення кліпс, як слід, і тварині давали відновитися в реабілітаційній камері перед поверненням до відповідної клітки.

Гістологічне дослідження:

Тварин умертвлювали через годину після останньої ін'єкції.

Тканини головного мозку і печінки відбирали й фіксували в 10 % нейтральному буферному формаліні, потім обробляли й поміщали в парафін. Для фарбування гематоксиліном/еозином (Г/Е) та імуногістохімічного фарбування (ІГХ) готували парафінові зрізи товщиною п'ять мікрометрів.

5 фарбування гематоксиліном і еозином:

Зрізи головного мозку офарблювали Г/Е. У результаті фарбування ядра виглядали пурпурними, а цитоплазма - від рожевої до червоної. Препарати, офарблені Г/Е, застосовували для гістопатологічної морфологічної оцінки.

Імуногістохімія:

10 Для оцінки біорозподілу I2S депарафінізовані та регідратовані зрізи головного мозку й печінки інкубували протягом ночі з моноклональними антитілами миші 2C4-2B2 (Maine Biotechnology Services, Портленд, Мен) до рекомбінантної I2S людини, щоб визначити введену I2S (або невідповідний IgG як антитіло негативного контролю; Vector Laboratories, Барлінгейм, Каліфорнія). Після інкубації протягом ночі при 2-8 °C додавали антимішачий IgG вівці, кон'югований із пероксидазою хрину. Після додаткової інкубації протягом 30 хвилин при 37 °C додавали розчин із міткою Тирамід Алекса фтор 488 (Invitrogen Corp., Карлсбад, Каліфорнія) та інкубували суміш ще 10 хвилин. Зрізи накривали покривними стеклами із застосуванням середовища для утримання з захистом від вицвітання (Vectashield; Vector Laboratories), яке містить 1,5 мкг/мл 4'-6-діамідино-2-феніліндолу (DAPI) як контрастного барвника для ядер, і розглядали під багатоканальним флуоресцентним мікроскопом Nikon. У результаті фарбування I2S-позитивні клітини виглядали зеленими з синіми ядрами, а фонові області виглядали чорними.

25 Для аналізу ефективності зрізи головного мозку й печінки офарблювали анти-LAMP-1 (асоційований із лізосомами мембранний білок як маркер лізосом) IgG щура (Santa Cruz Biotechnology, Санта-Крус, Каліфорнія) як первинним антитілом. Як негативний контроль застосовували невідповідне антитіло IgG щура. Для ампліфікації цільового маркера застосовували спосіб на основі ABC (набори з авідин-біотин-пероксидазним комплексом від компанії Vector Labs Барлінгейм, Каліфорнія).

30 Якщо коротко, депарафінізовані зрізи регідратовали та інкубували з зазначеним первинним антитілом. Після інкубації протягом ночі при 2-8 °C додавали вторинний біотинільований антищурячий IgG кролика (Vector Labs Барлінгейм, Каліфорнія) та інкубували 30 хвилин при 37 °C, потім проби промивали й обробляли авідин-біотин-пероксидазним комплексом (Vector Laboratories) протягом 30 хвилин. Для розвитку фарбування як хромаген застосовували 3,3'-діамінобензидин тетрахлорид (ДАБ). Зрізи потім піддавали контрастному офарбленню гематоксиліном і накривали покривними стеклами. У результаті фарбування LAMP-1-позитивні клітини виглядали коричневими, а ядра - синіми.

Відбирали показові фотографії та аналізували площу LAMP-1-позитивних клітин із використанням програми Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Inc., Біфезда, Меріленд), потім проводили порівняльний статистичний аналіз із застосуванням критерію Стюдента.

40 Спосіб електронної мікроскопії:

Тканини головного мозку від тварин, які одержали 3 дози I2S, фіксували в 2,5 % параформальдегіді (ПФА)/2,5 % глутаральдегіді в 0,1М натрій-какодилатного буфера (pH 7,4) при 4 градусах протягом ночі. Потім проби відмивали в какодилатному буфері (0,1М, pH 7,4) і потім фіксували в тетроксиді осмію, дегідратовували в спиртах та пропіленоксиді й поміщали в смолу Епон. Ультратонкі зрізи нарізали з товщиною 100 нм, офарблювали цитратом свинцю й аналізували під просвічуючим електронним мікроскопом Tecnai™ G² Spirit BioTWIN.

Результати

У головному мозку тварин, що одержували тільки основу, I2S методом імуногістохімії (ІГХ) не виявлялася. На відміну від цього у тварин, що одержували I2S, клітини оболонки мозку, нейрони великих півкуль і мозочка були офарблені на I2S позитивно. Сигнал фарбування був сильнішим у тварин, що одержали 3 дози (Фігура 53).

У тканинах головного мозку мишей ІКО, що одержували тільки основу, в усьому головному мозку виявлялася вакуолізація клітин - гістопатологічна ознака лізосомальної хвороби накопичення, на відміну від тварин дикого типу. У мишей ІКО, що одержували I2S, мало місце повсюдне зниження вакуолізації клітин від поверхні кори великих півкуль, хвостатого ядра, таламуса, мозочка до білої речовини в порівнянні з тваринами, що не одержували препарату (Фігура 54). фарбування на асоційований із лізосомами мембранний білок-1 (LAMP-1) як маркера активності лізосом і хворобливого стану виявило підвищену активність лізосом у клітинах мікроглії, оболонки мозку й периваскулярних клітинах мишей ІКО, що одержували тільки основу, в порівнянні з тваринами дикого типу (Фігура 55). У мишей, що одержували I2S

інтратекально, мало місце виражене зниження імунного фарбування на LAMP-1. Зазначене зниження характеризувалося зменшенням числа LAMP-1-позитивних клітин і більш світлим фарбуванням. Зазначене зниження виявлялося у всьому головному мозку від поверхні кори великих півкуль, хвостатого ядра, таламуса, мозочка до білої речовини (Фігура 56) у тварин, що одержали як 2, так і 3 дози I2S. Морфометричний аналіз імунного фарбування на LAMP-1 різних областей головного мозку підтвердив, що мало місце значуще зниження LAMP-1-позитивного фарбування у всіх досліджуваних областях головного мозку (Фігура 56).

Електронно-мікроскопічне дослідження клітин головного мозку у мишей ІКО, які одержували тільки основу, виявило збільшені вакуолі, що містять аморфні гранули з накопиченою речовиною і включення з пластинчастими й зебраподібними структурами. Зазначені типові патологічні ознаки лізосомального накопичення на ультраструктурному рівні знижувалися у мишей, що одержували I2S інтратекально (Фігура 57).

У печінці у тварин, що одержували тільки основу, позитивного фарбування на I2S не було. У мишей, що одержували I2S інтратекально, велика кількість введеної I2S явно виявлялася в синусоїдальних клітинах (Фігура 58), що вказує на те, що I2S, введена до інтратекального простору, циркулювала в СМР і потім всмоктувалася шляхом арахноїдальної грануляції до кровоносної системи.

У тканинах печінки мишей ІКО, що одержували тільки основу, на основі Г/Е фарбування й сильного імунного фарбування на LAMP-1 були продемонстровані виражена вакуолізація клітин і аномально висока активність лізосом у порівнянні з мишами дикого типу. Після інтратекального введення I2S було виявлено значуще зниження вакуолізації клітин та імунне фарбування на LAMP-1 у печінці. фарбування Г/Е виявило внутрішньоцитоплазматичну вакуолізацію, яка майже повністю зникла, і структура клітин печінки була майже нормальною (Фігура 59).

Мишам ІКО рекомбінантну I2S людини вводили інтратекально до поперекового відділу для доставки до головного мозку, і I2S, яку вводили, викликала повсюдне покращення гістопатологічних ознак у різних відділах головного мозку:

- I2S, яку вводили, виявлялася в клітинах оболонок мозку й у нейронах головного мозку.
- Знижувала вакуолізацію клітин у всьому головному мозку, що визначалося за допомогою як світлової, так і електронної мікроскопії.
- Знижувала рівень лізосомального маркера LAMP-1 у всьому головному мозку.
- I2S, яку вводили інтратекально, проходила до периферичних кровоносних судин і викликала покращення в печінці як по морфології, так і за рівнем гістологічного маркера.

ПРИКЛАД 7: ТОКСИКОЛОГІЯ ІНТРАТЕКАЛЬНОЇ ДОСТАВКИ I2S

У даному прикладі проілюстровані клінічні ознаки, асоційовані з ідурсульфазою, яку вводили один раз на місяць у формі інтратекальної болюсної ін'єкції довгохвостим макакам. Для досягнення даного результату 14 самців яванських макак випадковим чином розподіляли до п'яти лікувальних груп, як зазначено в наступній Таблиці 21.

Таблиця 21

Схема експерименту

Група	Кількість тварин	Номінальна доза (мг)	Об'єм дози (мл)
1	3	0	1
2	3	3	1
3	3	30	1
4	3	150	1
5	2	100	1

Тварини з усіх груп одержували препарат із частотою три рази на місяць ІТ на рівні поперекового відділу хребта. Дозу в об'ємі 1 мл вимивали з системи катетера за допомогою 0,3 мл ФБР. За один-два дні до кожного введення препарату з ІТ-порту доступу на рівні мостомозочкової цистерни відбирали приблизно 2 мл СМР. У зазначений час також відбирали проби крові (2 мл). У тварин із групи 5 кров (2 мл) і СМР (0,1 мл) відбирали перед введенням препарату, а також через 0,5, 1, 2, 4, 8, 24 і 48 годин після введення першої дози препарату. Клінічні ознаки реєстрували щонайменше два рази на день. Розтин проводили приблизно через 24 години після введення третьої дози, при цьому відбирали та зберігали вибрані тканини.

У 1-ий день усі три тварини з групи 4 (150 мг) проявляли мінімальне підтягування задніх кінцівок у перші 3-12 хвилин після введення, що тривало протягом 5-15 хвилин; зазначена

ознака, як припускається, пов'язана з тестованою речовиною. Змін маси тіла, споживання їжі й показників неврологічного/фізикального обстеження, які можна було б пов'язати з тестованою речовиною, не виникало.

Представлений аналіз проб сироватки і СМР, а також аналіз розчину препарату, який вводили. У різних тканинах, отриманих від довгохвостих макак, спостерігався розкид активності ендогенної ідурсульфазу; у головному й спинному мозку ендогенна активність була вищою, ніж у досліджуваних периферичних органах, включаючи печінку, серце й нирки. Введення ідурсульфазу було асоційоване з дозозалежним підвищенням активності ідурсульфазу в різних областях головного мозку, а також у стовбурі головного мозку й спинному мозку. ІТ доставка не призводила до визначуваних відмінностей між правою і лівою півкулями мозку. Мало місце явне дозозалежне збільшення активності ідурсульфазу в наступних органах: головний мозок, печінка, серце й нирки. Імунне фарбування на ідурсульфазу в головному мозку продемонструвало дозозалежне підвищення інтенсивності фарбування. У групі, що одержувала 3 мг, спостерігалось фарбування клітин оболонки мозку й обмеженого числа клітин глії під оболонками; у тварин лікувальної групи, що одержувала 3 мг, не спостерігалось явного фарбування нейронів. У спинному мозку фарбування на ідурсульфазу було позитивним та дозозалежним, і максимальна інтенсивність фарбування була в поперековому відділі, де здійснювали ІТ-введення ідурсульфазу. Інтенсивність фарбування на ідурсульфазу в печінці, нирках і серці була дозозалежною та узгоджувалася з підвищеною активністю ідурсульфазу в зазначених органах.

Насамкінець необхідно відзначити, що ІТ-введення ідурсульфазу в дозах до 150 мг з частотою один раз на місяць не викликає небажаних ефектів. Таким чином, рівнем відсутності спостережуваних небажаних ефектів (NOAEL)бує визнаний рівень 150 мг - максимальна доза, тестована в даному дослідженні. Введення ідурсульфазу було пов'язане з дозозалежним підвищенням активності ідурсульфазу в ЦНС і підвищенням рівня в печінці, нирках і серці, що як наслідок розвивалося.

Тестовану речовину - ідурсульфазу - постачали в формі розчинів для введення в 154 мМ NaCl, 0,005 % полісорбату 20, рН 5,3-6,1. Номінальні концентрації в розчинах для введення, що постачаються, становили 0,3, 30 або 150 мг/мл. Тестовану речовину зберігали в морозильнику при температурі від -82 °C до -79 °C. Як агент для промивання катетера після введення дози і після послідовного відбору проб СМР застосовували фосфатно-сольовий буфер (ФБР) рН 7,2. ФБР одержували від компанії Gibco, Invitrogen Corporation.

Підготовка тестованої речовини

У перший день введення препарату в кожний інтервал часу по одному флакону кожної концентрації виймали з морозильної шафи (-80 °C) і давали розморозитися на робочому столі при кімнатній температурі. Як тільки розчин розморозувався, флакони для груп 1, 2 і 3 маркували, зважували й по 1 мл розчину відбирали через фільтр із діаметром пор 0,22 мкл для кожної тварини, якій планували зробити ін'єкцію. Після того, як усі дози були введені, зазначені флакони зважували повторно й забирали в холодильник.

На наступний день (день введення препарату для тварини 003, група 4 і група 5) розчин для введення для груп 1 і 4 брали з холодильника й залишали на робочому столі, щоб препарат досягнув кімнатної температури. При досягненні кімнатної температури флакони з препаратом для груп 1 і 4 зважували, флакон для групи 4 маркували і по 1 мл розчину відбирали через фільтр для кожної тварини, якій планували зробити ін'єкцію в групах 1 і 4. Розчин для введення для групи 5 потім готували шляхом введення відповідної кількості розчину для групи 4 і групи 1 (основи) до поліпропіленового флакона. Кількість, яку додавали з розчинів для груп 1 і 4, реєстрували. Зазначений розчин перемішували шляхом акуратного перекидання флакона, і дози об'ємом 1-2 мл для тварин із групи 5 відбирали через фільтр. Флакони з препаратом для груп 1 і 4 повторно зважували після завершення введення препарату і флакони (групи 1-5) забирали в морозильник.

Чотирнадцять тварин випадковим чином розподіляли до груп лікування, описаних у Таблиці 21.

ІТ шлях введення був вибраний, оскільки даний шлях передбачається застосовувати у людини. Дози ідурсульфазу, які були вибрані для даного дослідження (3, 30, 100 і 150 мг/мл), вибирали, щоб оцінити біорозподіл різних доз ферменту в центральній нервовій системі (ЦНС) нижчих приматів після трьох послідовних ІТ болюсних ін'єкцій у поперековий відділ із частотою один раз на місяць.

Клінічні спостереження

Загальна частота клінічних ознак була мінімальною. Протягом усього дослідження у жодної тварини з групи] (контроль), групи 2 (2 мг), групи 3 (30 мг) або групи 5 (100 мг) не було клінічних ознак, які розглядалися б як такі, що пов'язані з тестованою речовиною.

У день 1 усі тварини з групи 4 (150 мг) (012-014) проявляли мінімальне підтягування задніх кінцівок у перші 3-12 хвилин після введення, що тривало протягом 5-15 хвилин. Зазначена ознака, як припускається, була пов'язана з тестованою речовиною, і вона не спостерігалася в жодній із груп, що одержували більш низькі дози. Не було ніяких інших клінічних ознак, що виникали безпосередньо після введення першої дози або в зазначені дні безпосередньо після введення тестованої речовини. Єдиною додатковою ознакою, яку спостерігали у тварин групи 4, був єдиний епізод блювоти у тварини 013 у день 35.

Введення тестованої речовини в формі однократної інтратекальної болюсної ін'єкції не було пов'язане з якими-небудь макроскопічними або мікроскопічними змінами, якщо не враховувати зміни, властиві імплантації пристроїв для доставки лікарських засобів. Усі групи, включаючи контрольну групу, демонстрували мікроскопічні зміни в оболонках мозку, які являють собою запальну реакцію на систему доставки лікарських препаратів. У тварин, що одержували дози тестованої речовини 30 мг і більше, була тенденція до більш вираженого еозинофільного компонента в запальній реакції в оболонках мозку, але дана відмінність не була визнана біологічно значущою.

Оскільки відмінності між тваринами, що одержували тільки основу і тестовану речовину, були такими слабкими, рівнем відсутності спостережуваних небажаних ефектів (NOAEL) був визнаний рівень 150 мг - максимальна доза, тестована в даному дослідженні.

Загальна запальна реакція в оболонках мозку в усіх групах (включаючи контроль) була дещо більш вираженою, ніж та, що спостерігалася раніше в дослідженні інтратекального шляху введення такої ж тривалості у мавп. Однак було зроблено припущення, що можливо це було пов'язано з деякими властивостями основи або впливом введення препарату за 24 години до розтину.

фарбування головного мозку на ідурсульфазу було позитивним у всіх тварин, що одержували препарат, за винятком тварин із групи 3 мг, і максимальна інтенсивність фарбування виявлялася в групі, що одержувала 150 мг (Фігури 60, 61, 62 і 63). У групі, що одержувала 3 мг, позитивне фарбування спостерігалось тільки в клітинах оболонок мозку й невеликому числі клітин глії під оболонками; у нейронах введеної ідурсульфазу не виявлялося. У групах, що одержували більш високі дози (30, 100 і 150 мг), сильне позитивне фарбування на ідурсульфазу демонстрували великі популяції нейронів великих півкуль, а також клітини оболонок мозку, клітини глії й периваскулярні клітини. Імунне фарбування на ідурсульфазу виявило широкий розподіл введеної ідурсульфазу в нейронах великих півкуль, починаючи від нейронів у шарі I на поверхні поруч із оболонками мозку і закінчуючи нейронами в більш глибокому шарі VI, сусідньому з білою речовиною (Фігури 64, 65 і 66). Виражене фарбування нейронів спостерігалось в групі, що одержувала 150 мг (Фігура 67). У всіх тварин (групи доз 30-150 мг) не виявлялося виражених відмінностей у результатах імунного фарбування на нейрональну ідурсульфазу між переднім, середнім і заднім відділами головного мозку.

фарбування на ідурсульфазу було позитивним у спинному мозку всіх тварин, і максимальна інтенсивність фарбування була в поперековому відділі (Фігури 68 і 69). Імунне фарбування на ідурсульфазу також було дозозалежним. У групі, що одержувала 150 мг, сильне позитивне фарбування на ідурсульфазу демонстрували нейрони, клітини оболонок мозку, клітини глії, периваскулярні клітини та клітини епі/пери/ендонеурію (сполучні клітини), який оточує нервові волокна (Фігури 70 і 71).

У печінці у всіх тварин позитивне фарбування на ідурсульфазу виявлялося в синусоїдальних клітинах (купферівських клітинах і клітинах ендотелію). Однак у гепатоцитах тварин із групи, що одержувала 3 мг препарату (Фігура 72), ідурсульфазу не виявлялася, тоді як у групах, що одержували більш високі дози, позитивне фарбування на ідурсульфазу в гепатоцитах виявлялося, і максимальна інтенсивність фарбування була у тварин групи, що одержувала 150 мг (Фігури 73, 74 і 75).

У групі, що одержувала 3 мг препарату, позитивного фарбування на ідурсульфазу не було (Фігура 76). На відміну від цього в групах, що одержували 30, 100 і 150 мг, клітини інтерстицію демонстрували позитивне фарбування на ідурсульфазу, і виражене фарбування спостерігалось в групі, що одержувала 150 мг, - відносно числа позитивно-офарблених клітин та інтенсивності фарбування (Фігури 77, 78 і 79).

Нирки

У тварин із групи, що одержувала 3 мг, ідурсульфазу або не виявлялася, або виявлялися малі її кількості (Фігура 80). Однак у групах, що одержували 30 і 100 мг, позитивне фарбування

на ідурсульфазу демонстрували клітини клубочків і клітини інтерстицію (Фігури 81 і 82). У групі, що одержувала 150 мг, крім вираженого фарбування клітин клубочків і клітин інтерстицію, імунне фарбування на ідурсульфазу виявило додатково фарбування клітин проксимальних каналців (Фігура 83).

5 ОБГОВОРЕННЯ

Не було пов'язаних із тестованою речовиною клінічних ознак або впливу на масу тіла, споживання їжі й показники неврологічного/фізикального обстеження.

У 1-ий день тварини з групи 4 (150 мг) проявляли мінімальне підтягування задніх кінцівок у перші 3-12 хвилин після введення, що тривало протягом 5-15 хвилин; зазначена ознака, як припускається, була пов'язана з тестованою речовиною. Введення ідурсульфазу було асоційоване з дозозалежним підвищенням активності ідурсульфазу в різних областях головного мозку, а також у стовбурі головного мозку та спинному мозку. Максимальний рівень інтенсивності фарбування в спинному мозку спостерігався в поперековому відділі, де відбувалося ІТ-введення ідурсульфазу.

ІТ-введення ідурсульфазу призводило також до системного впливу з дозозалежним збільшенням інтенсивності фарбування в печінці, нирках і серці. У тварин, що одержували дози тестованої речовини 30 мг і більше, була тенденція до більш вираженого еозинофільного компоненту в запальній реакції в оболонках мозку.

ІТ-введення ідурсульфазу в дозах до 150 мг із частотою один раз на місяць не викликало небажаних ефектів. Таким чином, рівнем відсутності спостережуваних небажаних ефектів (NOAEL) був визнаний рівень 150 мг - максимальна доза, тестована в даному прикладі. Введення ідурсульфазу було пов'язане з дозозалежним підвищенням активності ідурсульфазу в ЦНС і підвищенням рівня в печінці, нирках та серці, що розвивалося як наслідок.

ПРИКЛАД 8: ФК (У СИРОВАТЦІ ТА СМР) І2S, ЩО ДОСТАВЛЯЄТЬСЯ ІНТРАТЕКАЛЬНО

У даному прикладі описаний аналіз сироватки та спинномозкової рідини (СМР), проведений у рамках 6-місячного дослідження токсичності ідурсульфазу, яку вводили один раз на місяць у формі болюсної інтратекальної ін'єкції в поперековий відділ і один раз на тиждень у формі болюсної внутрішньовенної ін'єкції довгохвостим макакам, з метою визначення концентрації тестованої речовини (ТР).

30 СХЕМА ЕКСПЕРИМЕНТУ

Мета даного дослідження полягала в оцінці багатократного інтратекального (ІТ) введення ідурсульфазу (І2S) протягом шести місяців з точки зору токсикології та фармакологічної безпеки. Схема експерименту показана в Таблиці 22.

Таблиця 22

Схема експерименту

№ групи	Кількість тварин	ВВ доза (мг/кг)	Кількість ВВ доз	ІТ доза (мг/кг)	Кількість ІТ доз
1	6	DC (фізіологічний розчин)	23	DC (ФБР)	6
2	12	0 (ВВ основа)	23	0 (ІТ основа)	6
3	12	0,5	23	3	6
4	6	0,5	23	30	6
5	12	0,5	23	100	6

DC = контроль пристрою: тварини в групі 1 не одержували ні основи, ні тестованої речовини.

Тестована речовина

Ідентифікація: ідурсульфазу для ВВ введення № серії FDC06-001 (2,0 мг/мл)

ІТ-введення - ідурсульфазу (0 мг/мл)

ідурсульфазу (3 мг/мл)

40 ідурсульфазу (30 мг/мл)

ідурсульфазу (100 мг/мл).

Способи кількісного визначення:

Аналізи з метою визначення концентрації ідурсульфазу проводили методом ELISA (твердофазний імуноферментний аналіз). До множення на коефіцієнт розведення межа визначення (МВ) = 1,25 нг/мл. Скринінг проб проводили при розведенні 1:50, отже, чутливість аналізу складала 62,5 нг/мл. Проби, що виходять за межі калібрування, також розводили й

тестували повторно при відповідному розведенні, яке давало значення в межах калібрувальної кривої. Вибрані проби аналізували додатково шляхом визначення активності ферментів. МВ для зазначеного визначення становить 0,18 МОд/мл при мінімальному розведенні проби 1:150.

У всіх тварин із груп 1 і 2, які одержували фізіологічний розчин або основу відповідно, рівень ідурсульфазу в крові перебував у діапазоні від 138 нг/мл і < 62,5 нг/мл (або < МВ) протягом усього ВВ та ІТ-введення. З 200 протестованих проб СМР, відібраних у тварин із груп 1 і 2, у 62 був продемонстрований рівень І2S, вищий від МВ. З них 7 значень були високими (> 1000 нг/мл). У ще одній пробі, відібраній перед 3-ю ІТ дозою, рівень І2S був вищим від 1000 нг/мл. Потім проби тестували на активність ідурсульфазу. У кожному випадку результати визначення активності вказували на наявність І2S, і коли розраховували приблизну концентрацію І2S на основі рівнів активності, результати були в межах 20 % розкиду відносно отриманих з використанням ELISA з антигеном (див. Таблицю 23). Також за допомогою визначення активності ферменту тестували додаткові вибрані випадковим чином проби СМР із результатами ELISA з антигеном, нижчими від МВ, щоб виключити будь-яку неспецифічну активність.

Таблиця 23

Результати дослідження проб СМР

Номер тварини	Група	Доза	К-сть доз	Шлях введення	Момент часу	Результати ELISA (нг/мл)	Результати визначення активності (МОд/мл)	Розрахункові нг/мл на основі активності	Розрахунковий % від виміряного
003	1	Фіз. розчин	5	ІТ	Перед введенням	1392	4,7	1173	119 %
003	1	Фіз. розчин	6	ІТ	Перед введенням	7322	29,9	7469	96 %
004	1	Фіз. розчин	2	ІТ	Через 2 год.	17045	62,1	15527	110 %
006	1	Фіз. розчин	6	ІТ	Через 4 год.	16435	70,7	17682	93 %
006	1	Фіз. розчин	1	ІТ	Перед введенням	1320	5,3	1319	100 %
0016	2	Основа	1	ІТ	Через 2 год.	3070	11	2743	112 %
017A	2	Основа	3	ВВ	Через 4 год.	2236	8,8	2194	102 %
046	5	100 мг/кг	3	ІТ	Перед введенням	2086	7	1750	119 %

У зазначеному дослідженні проби сироватки і СМР аналізували з метою визначення концентрації ідурсульфазу. Проби сироватки відбирали за графіком:

ВВ дози: перед введенням препарату і через 2 години після введення дози 1-10, перед введенням препарату і через 4 години після введення дози 11-23, і при розтині.

ІТ дози: перед введенням препарату і через 2 години після введення дози 1 і 2, перед введенням препарату і через 4 години після введення дози 3-6, і при розтині.

Проби СМР відбирали за графіком:

ВВ дози: перед введенням препарату і через 2 години після введення дози 1, і через 4 години після введення дози 3 і 6.

ІТ дози: перед введенням препарату і через 2 години після введення дози 1 і 2, перед введенням препарату і через 4 години після введення дози 3-6, і при розтині.

У цілому представляється, що з сироватки ідурсульфаза виводиться швидше, ніж зі СМР. Рівень ідурсульфазу у тварин із груп 1 і 2, які одержували фізіологічний розчин або основу відповідно, в усі тестовані моменти часу був нижчим від або рівним 138 нг/мл. У деяких тварин зазначений рівень був нижчим від межі визначення (МВ).

Менше число проб СМР від тварин із груп 1 і 2 демонстрували значення вищі від МВ, 7 проб склали помітне виключення - рівень у них був високим (> 1000 нг/мл). У одній із проб, відібраних

у однієї тварини перед ІТ-введення м дози 3, рівень ідурсульфазі також був вищим за 1000 нг/мл.

Проби, що продемонстрували такі результати, які не відповідають загальній тенденції, піддали повторному аналізу й підтвердили результат. Крім того, в зазначених пробах проводили аналіз активності ферменту ідурсульфазі. Результати вимірювання активності також підтвердили високий рівень ідурсульфазі з відхиленням не більше ніж на 20 % від результату, отриманого способом визначення маси ідурсульфазі (Таблиця 23).

Специфічність визначення активності верифікували в даній групі проб шляхом випадкового тестування проб СМР із результатами визначення маси ідурсульфазі нижчими від МВ і підтвердили, що рівень ідурсульфазі в зазначених пробах дійсно був нижчим від МВ (дані не показані).

ПРИКЛАД 9: БІОРОЗПОДІЛ І2S ПІСЛЯ ІТ ДОСТАВКИ

Після успішної демонстрації того, що інтратекальне введення є ефективним шляхом доставки І2S до тканин ЦНС, були проведені додаткові дослідження з метою визначення, чи здатна І2S, яку вводять ІТ, розподілятися в глибоких тканинах головного мозку, і якою є клітинна локалізація І2S, введеної ІТ. Лікарську форму рекомбінантної ідуронат-2-сульфатази (І2S) людини готували й розводили в основі з 154 мМ NaCl, 0,005 % полісорбату 20 при рН 6,0.

Дози 3 мг, 30 мг або 100 мг І2S вводили приматам, відмінним від людини, один раз на місяць через інтратекальний порт, який імплантували, протягом шести місяців підряд. Схема дослідження в загальному вигляді представлена в Таблиці 24 нижче.

Таблиця 24

Група	n	ВВ доза(мг/кг) ^a	ІТ доза (мг) ^a	Останній день дослідження (кількість тварин)	
				6 місяців	Відновлення
1	6	DC (ФР)	DC (ФБР)	6	-
2	12	0 (основа)	0 (ІТ основа)	6	6
3	12	0,5	3	6	6
4	6	0,5	30	6	-
5	12	0,5	100	6	6

^a Ідурсульфазі, якщо не зазначено інше. DC (контроль пристрою); ІТ (інтратекально); ВВ (внутрішньовенно); ФР (фізіологічний розчин); ФБР (фосфатно-сольовий буфер, рН 7,2).

Багатократне введення І2S приматам, відмінним від людини, один раз на місяць протягом 6 місяців добре переносилося при максимальній із тестованих доз, і з ним не було пов'язано ніяких значущих небажаних токсичних явищ. Через двадцять дві години після введення шостої й останньої дози І2S випробуваних нижчих приматів умертвлювали й відбирали тканини ЦНС, які надалі досліджували.

Як було визначено імуногістохімічним (ІГХ) методом, мало місце велике внутрішньоклітинне відкладання І2S у всіх клітинах і тканинах ЦНС. Білок І2S визначався у всіх тканинах головного мозку ІГХ методом, і мав місце градієнт відкладання від кори великих півкуль до білої речовини шлуночків. У сірій речовині І2S виявлялася в нейронах великих півкуль, мозочка, стовбура мозку й спинного мозку у всіх груп із залежністю від дози. У поверхневій сірій речовині груп, що одержували більш високі дози, велика кількість нейронів у поверхневій корі демонструвала позитивне фарбування на І2S (Фігура 84А). Також І2S виявлялася в нейронах таламуса (Фігура 84В), гіпокампа (Фігура 84С), хвостатого ядра (Фігура 84D) і спинного мозку (Фігура 84Е). Клітини оболонки мозку і периваскулярні клітини також демонстрували позитивне фарбування на І2S (Фігура 84F).

Як показано на Фігурі 85 і Фігурі 86, явно є присутнім розподіл ІТ введеної І2S у тканинах ЦНС і, зокрема, відкладання в сірій речовині, таламусі, корі великих півкуль випробуваних нижчих приматів. Крім того, Фігура 86 і Фігура 87 ілюструють, що ІТ введена І2S дозозалежно накопичується в позначених тканинах ЦНС випробуваних нижчих приматів. фарбування на сумісну локалізацію також виявило, що ІТ-введення І2S асоційоване з нейронами й олігодендроцитами. Також ІТ введена І2S розподіляється й локалізується в усьому мозочку випробуваних нижчих приматів, що підтверджується на Фігурі 88. Зокрема, Фігури 89А-Д ілюструють захоплення І2S нейронами і її асоціацію з аксонами після ІТ-введення випробуваним приматам, відмінним від людини, на що вказує фарбування філаментів. Також особливий інтерес представляє те, що дане дослідження ілюструє, що І2S є селективною

відносно нейронів, і такі нейрони полегшують розподіл введеної інтратекально І2S до глибоких тканин головного мозку, та, очевидно, є асоційованою з аксональними структурами, що вказує на антероградний аксональний транспорт І2S.

У Таблиці 25 нижче представлені фармакокінетичні дані для різних шляхів введення та доз у окремому дослідженні на тваринах.

Таблиця 25

Доза	AUC _{last}	Маса тіла	Маса головного мозку	Доза	
одиниці	год.*нг/мл	кг	кг	мг/кг МТ	мг/кг МГМ
0,5 мг/кг	8331	2,7	0,1	0,5	5
1 мг, ІТ	1933	3,1	0,1	0,32	10
10 мг, ІТ	31316	2,7	0,1	3,66	100
30 мг, ІТ	140345	2,9	0,1	10,34	300

¹²⁴I-мічену І2S вводили тестованим тваринам, як зазначено в Таблиці 26 нижче, а результати ПЕТ-сканування представлені на Фігурі 106.

Таблиця 26

Група	Тварин/групу	Шлях введення	Тестована речовина	Доза
1	1	ІЦВ	[124I]-ідурсульфаз	3 мг
2	4	ІТ-П	[124I]-ідурсульфаз	3 мг
3	4	ВВ	[124I]-ідурсульфаз	0,1 мг/кг
4	4	ВВ	[124I]-ідурсульфаз	1 мг/кг

Також дані дослідження продемонстрували ідентифікацію ІТ введеної І2S у клітинах тканини білої речовини головного мозку поблизу шлуночків випробуваних нижчих приматів після ІТ-введення. Хоча щільність фарбування на І2S у білій речовині була в цілому нижчою, ніж у сірій речовині, І2S виявлялася в олігодендроцитах (Фігура 90). Зокрема Фігура 90 ілюструє ідентифікацію ІТ введеної І2S у клітинах тканини білої речовини головного мозку, а також демонструє, що І2S, очевидно, не асоційована з мієліном.

Крім того, що був продемонстрований розподіл ІТ введеної І2S у глибоких тканинах головного мозку, дані дослідження також підтвердили локалізацію І2S у цільових органах і, що важливо, локалізацію І2S у лізосомах, тобто органах, які уражаються при лізосомальній хворобі накопичення, такий як синдром Хантера. Зокрема І2S була локалізована в лізосомах, а також виявлялася в аксонах. Фігура 90 ілюструє локалізацію ІТ введеної І2S у лізосомах олігодендроцитів випробуваних нижчих приматів, що підтверджує, що ІТ введена І2S може розподілятися в глибоких тканинах головного мозку і здатна до клітинної локалізації.

Щоб визначити, чи зберігає доставлена І2S біологічну активність, рівень І2S у головному мозку вимірювали шляхом визначення питомої активності. Активність у головному мозку у групи, що одержувала ІТ 3 мг, через 24 години після введення останньої дози явно не відрізнялася від фонового рівня у тварин з групи контролю пристрою і з групи, що одержувала тільки основу. Активність ферменту в головному мозку тварин, що одержували ІТ 30 мг і 100 мг, була вищою від фонового рівня на момент розтину (через 24 години після введення). Додаткове тестування, проведене для визначення локалізації доставки І2S у головному мозку, представлено на Фігурі 104 і в Таблиці 27 нижче.

Таблиця 27:

Локалізація проб

Номер проби	Структура	Кількість препаратів	Номер проби	Структура	Кількість препаратів
1	Кора великих півкуль-поверхневий (L)	4	14	Таламус (L)	8
2	Кора великих півкуль-поверхневий (R)	4	15	Таламус (R)	8
3	Хвостате ядро (R)	6	16	Гіпоталамус (L)	8
4	Хвостате ядро (L)	6	17	Гіпоталамус (R)	8
5	Corpus callosum	6	18	Гіпокамп (L)	8
6	Кора великих півкуль (лобова)-поверхневий (L)	8	19	Гіпокамп (R)	8
7	Кора великих півкуль (лобова)-поверхневий (R)	8	20	Біларечовина-глибокий (L)	10
8	Біла речовина-поверхневий (L)	8	21	Біларечовина-поверхневий (R)	10
9	Біла речовина-поверхневий (R)	8	22	Мозолисте тіло	10
10	Біла речовина-глибокий (L)	8	23	Біларечовина-глибокий (L)	12
11	Біла речовина-глибокий (R)	8	24	Біларечовина-глибокий (R)	12
12	Кора великих півкуль (скронева)-поверхневий (L)	8	25	Мозочок (R)	14
13	Кора великих півкуль (скронева)-поверхневий (R)	8			

ПРИКЛАД 10: БІОРОЗПОДІЛ ПІСЛЯ ІТ ДОСТАВКИ У СОБАК ПОРОДИ БІГЛЬ

Характер розподілу І2S, який спостерігався у вищевикладеному прикладі, також підтвердився у здорових собак породи бігль, які одержували однократні дози ІТ або ІЦВ шляхом. Самців собак породи бігль випадковим чином розподіляли до двох груп із використанням генерованих комп'ютером чисел (група 1 (ІЦВ), N=3; група 2 (ІТ); N=4). Усім тваринам вживляли катетери до субарахноїдального простору в поперековому відділі хребта або до лівого бічного шлуночка головного мозку (для введення препарату) і мостомозочкової цистерни (для відбору проб). Усі катетери закінчувалися в підшкірному титановому порті доступу. Для контролю хірургічного втручання без введення препарату служив ще один собака.

Однократну болюсну ін'єкцію 1 мл І2S (30 мг/мл в 20 мМ фосфату натрію, рН 6,0; 137 мМ хлориду натрію; 0,02 % полісорбату-20) робили ІТ або ІЦВ, після чого промивали катетер 0,3 мл фосфатно-сольового буфера (ФБР, рН 7,2). Проводили спостереження за клінічними ознаками і здійснювали умертвіння через 24 години після введення препарату. Відбирали проби тканини з головного і спинного мозку для кількісного визначення І2S, яке проводили за допомогою ELISA, оцінки активності ферменту І2S та ІГХ, і порівнювали результати для різних груп дослідження.

І2S демонструвала широкий розподіл у сірій речовині в групах із ІТ та ІЦВ введенням, що визначили за допомогою ІГХ. У корі великих півкуль нейрони демонстрували позитивне фарбування на І2S у всіх шести шарах нейронів, від поверхневого молекулярного шару до глибокого внутрішнього шару в групах із ІТ та ІЦВ введенням, що проілюстровано на Фігурі 91 (зображення а і с). У корі великих півкуль у групах із ІТ та ІЦВ введенням І2S виявлялася в нейронах, включаючи клітини Пуркінє, що проілюстровано на Фігурі 91 (зображення с і d). У групах, що одержували препарат як ІТ, так і ІЦВ, велика популяція нейронів у гіпокампі демонструвала позитивне фарбування на І2S, що проілюстровано на Фігурі 91 (зображення е і f). І2S-позитивні нейрони також виявлялися в таламусі й хвостатому ядрі обох груп, що проілюстровано на Фігурі 91 (зображення g і h).

Таким чином, дані дослідження підтверджують, що ферменти, які доставляються ІТ, здатні розподілятися в глибоких шарах клітин і тканин головного мозку, а також підтверджують

застосовність ферментів, що доставляються ІТ, таких як І2S, для лікування проявів лізосомних хвороб накопичення з боку ЦНС, таких як синдром Хантера.

ПРИКЛАД 11: ЕФЕКТИВНІСТЬ І2S IN VIVO ПРИ ІТ ДОСТАВЦІ

Модель мишей із недостатністю ідуронат-2-сульфатази

Після демонстрації того, що І2S, яку вводили ІТ, здатна розподілятися в глибоких тканинах головного мозку і що є можливою клітинна локалізація І2S, були проведені додаткові дослідження, щоб визначити терапевтичну ефективність І2S, введену ІТ. Для вивчення здатності І2S, введенної ІТ, модифікувати прогресування захворювання, була створена модель синдрому Хантера на мишах із нокаутом за ідуронат-2-сульфатазою (ІКО), створеним способами генної інженерії. Модель мишей із нокаутом за І2S розробляли з використанням спрямованого руйнування локусу І2S, яке призводило до накопичення глікозаміногліканів (ГАГ) у тканинах і органах. Модель мишей ІКО проявляє багато з фізичних особливостей синдрому Хантера, які спостерігаються у людей, включаючи характерні грубі риси обличчя та дефекти скелета. Крім того, модель мишей ІКО демонструє підвищений рівень глікозаміногліканів (ГАГ) у сечі та тканинах у всьому організмі, а також масштабну вакуолізацію в клітинах, яка виявляється гістопатологічно.

У даному дослідженні комерційну І2S (Елапраза®) концентрували й повторно суспендували в фосфатно-сольовому буфері (ФБР). І2S (10 мкл; 26 мг/мл) вводили шести групам самців мишей ІКО у віці 8-12 тижнів. Групам А і В (N=3) інтратекально вводили три дози 260 мкг І2S (у дні 1, 8 і 15) і дві дози 260 мкг І2S (у дні 1 і 8) відповідно. Групі D також інтратекально вводили три дози 260 мкг у дні 1, 8 і 15. Групи С і Е (N=3) служили контролем без введення препарату, а група F (N=3) служила контролем дикого типу без введення препарату. Контрольним мишам вводили основу без І2S. Мишей умертвлювали через 1 годину після останньої ін'єкції, після чого готували тканини для імуногістохімічного (ІГХ) дослідження й гістопатологічного аналізу.

Після третьої ін'єкції у мишей, що одержували І2S, відбувалося велике зниження вакуолізації клітин у поверхневому шарі кори великих півкуль, хвостатому ядрі, таламусі й мозочку в порівнянні з мишами, що одержували тільки основу. Після ІТ-введення зниження вакуолізації також спостерігалось в білій речовині. Розподіл І2S у тканині головного мозку мишей ІКО було явним після ІТ-введення.

У мишей ІКО, що одержували три дози І2S ІТ шляхом, значуще зниження вакуолізації в клітинах ЦНС також було продемонстроване як методом світлової, так і електронної мікроскопії. Після ІТ-введення І2S значуще зниження вакуолізації в клітинах було явним у порівнянні з мишами ІКО, які не одержували лікування, що вказує на те, що І2S, яку вводили ІТ, здатна модифікувати прогресування захворювання. Як проілюстровано на Фігурі 92, у мозолистому тілі та зводі головного мозку мишей ІКО після ІТ-введення І2S мало місце явне зниження вакуолізації клітин.

Крім того, електронна мікроскопія продемонструвала зменшення присутніх включень накопичення в нейронах сірої речовини та вакуолізації в олігодендроцитах білої речовини. Зокрема, миші ІКО після ІТ-введення І2S демонстрували зменшення числа оточених стінкою пластинчастих тілець ("зеброподібних" тілець), які є характерними для деяких лізосомних хвороб накопичення. Зокрема, на Фігурі 57 представлена електронограма, яка ілюструє зниження числа характерних зеброподібних тілець у нейронах мишей ІКО, яким вводили І2S, у порівнянні з мишами ІКО, які не одержували лікування. Аналогічно на Фігурі 57 представлена електронограма олігодендроцитів у мозолистому тілі.

Крім того, ІТ-введення І2S мишам ІКО також продемонструвало виражене зниження імунного фарбування на патологічний біомаркер лізосомних хвороб - асоційований із лізосомами мембранний білок-1 (LAMP-1) - показник активності лізосом і статусу захворювання, у поверхневому шарі кори великих півкуль, хвостатому ядрі, таламусі, мозочку й білій речовині. Як проілюстровано на Фігурі 93А, значуще зниження імунного фарбування на LAMP-1 є очевидним у тканині на поверхні кори великих півкуль мишей ІКО, що одержували лікування, у порівнянні з поверхнею кори великих півкуль контрольних мишей ІКО, яка представлена на Фігура 93В. Це відображає покращення гістопатологічних ознак захворювання.

На Фігурі 56 подані кількісні характеристики й порівняння концентрації LAMP-1, виміряної в мкм² площі тканини головного мозку. Морфометричний аналіз імунного фарбування на LAMP-1 різних відділів мозку підтвердив, що має місце значуще зниження позитивного фарбування на LAMP-1 у всіх оцінюваних областях головного мозку. Як показано на Фігурі 56, у тканині кожної оцінюваної області головного мозку (кора, хвостате ядро і шкарлупа (CP), таламус (TH), мозочок (CBL) і біла речовина (WM)) у мишей ІКО, що одержували препарат, площа LAMP-позитивного фарбування зменшувалася в порівнянні з контрольними ІКО мишами, що не одержували препарат, і наближалася до площі LAMP-позитивного фарбування у мишей дикого

типу. Особливо примітно, що площа LAMP-позитивного фарбування в кожній аналізованій області головного мозку далі знижувалася при збільшенні тривалості лікування.

Зниження аномально високої активності лізосом корелює з суттєвим покращенням морфологічних показників у всіх областях головного мозку. Зазначені результати підтверджують, що I2S, яку вводили IT, здатна модифікувати прогресування лізосомних хвороб накопичення в моделі мишей ІКО, отриманих способами генної інженерії, а також дають додаткове підтвердження здатності ферменту, який вводили IT, такого як I2S, боротися з проявами лізосомних хвороб накопичення з боку ЦНС, таких як синдром Хантера.

ПРИКЛАД 12: ЛІКУВАННЯ ПАЦІЄНТІВ ІЗ СИНДРОМОМ ХАНТЕРА

Для ефективного лікування пацієнтів із синдромом Хантера можна застосовувати введення лікарських препаратів безпосередньо до ЦНС, наприклад, IT доставку. Даний приклад ілюструє багатоцентрове дослідження зі збільшенням дози, спрямоване на оцінку безпеки 3 рівнів доз I2S, які вводили один раз на два тижні (p/2 тиж.) протягом 40 тижнів через пристрій інтратекальної доставки лікарських засобів (ПІДЛЗ) пацієнтам із інфантильною формою хвороби Хантера. Різні варіанти пристроїв інтратекальної доставки лікарських засобів, застосованих для лікування людей, показані на Фігурах 89-92.

Усього в дослідження було включено до 20 пацієнтів:

Група 1: 5 пацієнтів (мінімальна доза).

Група 2: 5 пацієнтів (середня доза)

Група 3: 5 пацієнтів (максимальна доза)

5 пацієнтів були рандомізовані до групи, що не одержувала препарат.

Для участі в дослідженні пацієнтів відбирали на основі наступних критеріїв включення: (1) наявність перших симптомів до настання віку 30 місяців; (2) ходячий стан на момент скринінгу (визначається як здатність самостійно вставати й проходити вперед 10 кроків (при підтримці за одну руку); (3) наявність неврологічних ознак у момент скринінгу. Зазвичай включають пацієнтів із трансплантацією гемопоетичних стовбурних клітин у анамнезі.

Визначали безпеку доз I2S, що збільшувалися, які вводили шляхом IT ін'єкцій протягом 40 тижнів дітям із пізнім початком інфантильної форми хвороби Хантера. Крім того, оцінювали клінічну активність I2S відносно загальної моторики, а також фармакокінетику препарату в сироватці та концентрації в спинномозковій рідині (СМР).

IT доставка білка rhASA

ПРИКЛАД 13: ТОКСИКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ РЕКОМБІНАНТНОЇ ASA, ЩО ДОСТАВЛЯЄТЬСЯ IT

Щоб оцінити здатність інших ферментів, що вводяться інтратекально, до розподілу в клітинах і тканинах ЦНС, проводили дослідження відповідно до GLP (належної лабораторної практики), в якому оцінювали багаторатне інтратекальне (IT) введення рекомбінантної арилсульфатази А людини (rhASA) з точки зору токсикології та фармакологічної безпеки протягом одного місяця у молодих (молодше 12 місяців) довгохвостих макак. Лікарську форму rhASA готували і складали із застосуванням основи з 154 mM NaCl, 0,005 % полісорбату 20 при pH 6,0.

Для досягнення мети дослідження дев'ять самців і дев'ять самок молодих довгохвостих макак випадковим чином розподіляли в залежності від маси тіла до однієї з трьох груп, як зазначено в Таблиці 28. Зазначені тварини (за винятком 1 самця в групі дози 1) одержували короткострокову інфузію об'ємом 0,6 мл із 0, 3 або 31 мг/мл rhASA (сумарна доза 0, 1,8 або 18,6 мг) один раз на два тижні - усього три дози на одну тварину. Стежили за масою тіла, клінічними ознаками, показниками неврологічного й фізикального обстеження, даними лабораторної діагностики, даними офтальмологічного обстеження і токсикокінетичними пробами. Усіх зазначених тварин піддавали розтину в день 29, 30 або 31 (~24 години після останнього IT-введення препарату). Вибрані тканини відбирали, зберігали й піддавали мікроскопічному дослідженню.

Таблиця 28

Група	Кількість тварин	Номинальна концентрація в дозі (мг/мл)	Об'єм дози (мл)	Доза, яку вводили (мг)
1	3М, 3Ж	0	0,6	0
2	3М, 3Ж	3	0,6	1,8
3	3М, 3Ж	31	0,6	18,6

Концентрації rhASA, які виявлялися в тканинах ЦНС довгохвостих макак, визначали за допомогою ELISA і порівнювали з терапевтичним цільовим значенням 10 % від нормальної концентрації rhASA у людини, що відповідає приблизно 2,5 нг/мг тканини. Проби тканини або біопсичні зразки вилучали з різних областей головного мозку довгохвостих макак і далі аналізували на наявність rhASA. Фігури 133-138 ілюструють тканини, з яких брали біопсію. Отримані при біопсії проби тканини продемонстрували збільшення концентрації rhASA, що відображено на Фігурі 139A-G, і був виявлений градієнт відкладання від кори великих півкуль до глибоких шарів білої речовини й глибоких шарів сірої речовини.

Концентрації rhASA, які виявлялися з використанням однакової біопсії, як при ІТ, так і при ІЦВ шляху введення у 6 мавп, що одержували дозу rhASA 18,6 мг, проілюстровані на Фігурі 140A-B. Концентрації rhASA, які виявлялися в глибоких шарах білої речовини (Фігура 140A) і в глибоких шарах сірої речовини (Фігурі 140B) головного мозку дорослих і молодих довгохвостих макак, що одержували rhASA інтратекально (ІТ) або інтрацеребровентрикулярно (ІЦВ), були порівнянними.

Потім отримані при біопсії проби тканини головного мозку дорослих і молодих довгохвостих макак аналізували з метою визначення концентрації rhASA, яка відкладалася у вилученій пробі тканини, та порівнювали отримані концентрації з терапевтичною цільовою концентрацією 2,5 нг rhASA на 1 мг білка (відповідає 10 % від нормальної концентрації rhASA у здорової людини).

Як проілюстровано на Фігурі 141 А, у кожній аналізованій пробі тканини, отриманій при біопсії, ІТ-введення rhASA в дозі 18,6 мг призводило до концентрації rhASA, яка перевищувала цільову терапевтичну концентрацію 2,5 нг/мг білка. Аналогічно, коли rhASA в дозі 1,8 мг ІТ вводили молодим довгохвостим макакам, у кожній аналізованій пробі тканини, отриманій при біопсії, концентрація rhASA була в межах або перевищувала цільову терапевтичну концентрацію 2,5 нг/мг білка, а медіани концентрації rhASA були вищими від терапевтичного цільового рівня для тестованих тканин, отриманих при біопсії (Фігура 141B).

Щоб визначити, чи розподілилася ІТ введена rhASA у відповідних клітинах, аналізували тканину з глибоких шарів білої речовини яванської макаки, що одержувала rhASA в дозі 1,8 мг ІТ, з області, показаної на Фігурі 142A. Імунне фарбування глибоких шарів білої речовини виявило розподіл rhASA в олігодендроцитах довгохвостих макак, що ілюструє Фігура 142B. Аналогічно, Фігура 142C ілюструє, що ІТ введена rhASA демонструє сумісну локалізацію в глибоких шарах білої речовини довгохвостих макак. Зокрема, при офарбленні очевидна сумісна локалізація з цільовими органелами, такими як лізосома (Фігура 142C), що підтверджує висновок про те, що rhASA, введена ІТ, здатна розподілятися у відповідних клітинах, тканинах і органелах ЦНС, включаючи лізосоми олігодендроцитів.

ПРИКЛАД 14: ПОРІВНЯННЯ ІЦВ ТА ІТ-введення

rhASA, мічену випромінювачем позитронів ^{124}I , готували і складали із застосуванням основи з 154 mM NaCl, 0,005 % полісорбату 20 при рН 6,0. Дорослим довгохвостим макакам інтрацеребровентрикулярно (ІЦВ) та інтратекально (ІТ) вводили об'єм лікарської форми, еквівалентний 3 мг rhASA (який відповідає приблизно 38 мг/кг головного мозку). Довгохвостих макак піддавали позитронно-емісійній томографії з високою роздільною здатністю (мікроПЕТ Р4) з метою оцінки розподілу введеної ^{124}I -міченої rhASA.

Дані ПЕТ (Фігура 143) підтверджують, що ^{124}I -мічена rhASA, яку вводили ІТ, ефективно розподілялася в тканині ЦНС, і, зокрема, ^{124}I -мічена rhASA, яку вводили через ІТ-катетер у поперековому відділі, негайно й рівномірно поширювалася спинномозковою рідиною (СМР) по всій довжині хребта. Зокрема, як показано на Фігурі 143, після ІЦВ та ІТ-введення в тканинах ЦНС випробуваних довгохвостих макак, включаючи головний мозок, спинний мозок і СМР, виявлялися терапевтичні концентрації ^{124}I -міченої rhASA. Концентрації rhASA, які виявлялися в зазначених тканинах ЦНС і зокрема в тканинах головного мозку, перевищували цільову терапевтичну концентрацію 2,5 нг/мг білка.

Хоча розподіл білка rhASA був порівняним при ІТ та ІЦВ шляху введення, ІЦВ шлях введення призводив до значно меншого відкладання в хребетному стовпі, що підтверджується Фігурою 143.

Через двадцять чотири години після введення лікарської форми, яку вводили як ІЦВ, так і ІТ, ^{124}I -мічена rhASA ефективно розподілялася в тканині ЦНС. Зокрема, через двадцять чотири години після ІТ-введення 12,4 % введеної дози виявлялося в головному відділі, тоді як при ІЦВ введенні в головному відділі виявлялося 16,7 % від введеної дози. Відповідно, концентрації rhASA, які виявлялися в зазначених тканинах ЦНС і зокрема в тканинах головного мозку, у випадку ІТ-введення rhASA наближалися до концентрацій, які виявлялися після ІЦВ введення такої ж дози.

ІЦВ ін'єкція ¹²⁴I-міченої rhASA призводить до негайного переносу введеного об'єму до мостомозочкової цистерни, мостової цистерни, міжніжкової цистерни та проксимального відділу хребта, як проілюстровано на Фігурі 144. На Фігурі 144 також проілюстрований той факт, що через 2-5 годин після ІТ-введення ¹²⁴I-мічена rhASA доставляється до тих же початкових компартментів (цистерн і проксимального відділу хребта), доставка до яких була показана і при ІЦВ введенні. Через двадцять чотири години після як ІЦВ, так і ІТ-введення розподіл ¹²⁴I-міченої rhASA в області цистерн і проксимального відділу хребта був порівняним, що проілюстровано на Фігурі 145.

Зазначені результати підтверджують, що rhASA можна доставляти до організму суб'єкта із застосуванням менш інвазивного ІТ шляху введення і при цьому досягати терапевтичних концентрацій у клітинах та тканинах-мішенях.

Лізосомальні хвороби накопичення являють собою сімейство генетичних розладів, які викликаються відсутністю або дефектом ферменту і які призводять до аномального накопичення субстратів. Хоча периферичні симптоми, пов'язані з деякими із зазначених захворювань, можна ефективно полегшувати шляхом внутрішньовенного введення рекомбінантних ферментів, не можна очікувати, що внутрішньовенне введення таких рекомбінантних ферментів значно вплине на прояви з боку ЦНС, пов'язані з більшістю лізосомних хвороб накопичення. Наприклад, рекомбінантна ідуронат-2-сульфатаза людини (ідурсульфатаза, Елапаза®; "Shire Human Genetic Therapies, Inc.", Лексингтон, Масачусетс) схвалена для лікування соматичних симптомів синдрому Хантера, але не є засобом медикаментозної терапії неврологічних проявів синдрому Хантера, які включають затримку розвитку та прогресуюче зниження розумової діяльності. Почасти це пов'язано з природою І2S, яка являє собою великий фермент із високим ступенем глікозилювання і з молекулярною масою приблизно 76 кДа, який не проходить через гематоенцефалічний бар'єр після внутрішньовенного введення.

Таким чином, автори даного винаходу розробили програму для вивчення інтратекальної доставки лікарських форм для інтратекального введення рекомбінантних ферментів людини, наприклад, таких як ідуронат-2-сульфатаза (І2S), арилсульфатаза (rhASA) і альфа-N-ацетилглікозамідаза (Naglu). Результати, представлені в даній заявці, оприлюднюються вперше, щоб продемонструвати, що ІТ-введення рекомбінантних лізосомальних ферментів до поперекового відділу призводить до доставки суттєвої частки білка, який вводили, до головного мозку і зокрема призводить до масштабного відкладання таких білків у нейронах головного мозку та спинного мозку як у довгохвостих макак, так і у собак. Імуногістохімічний аналіз тканин ЦНС продемонстрував, що білки направляються до лізосом, - ділянки патологічного накопичення глікозаміногліканів при лізосомальних хворобах накопичення. Крім того, морфологічні покращення, продемонстровані в моделі синдрому Хантера на мишах ІКО, у моделі хвороби Санфіліппо типу В на Naglu-дефіцитних мишах і в моделі метахроматичної лейкодистрофії (МЛД) на нокаутних мишах, підтверджують той експериментальний факт, що фермент, який вводять ІТ, розподіляється у відповідних тканинах і транспортується до відповідних компартментів і органел клітини.

Подібності характеру розподілу, який спостерігався після ІТ та ІЦВ введення І2S, дозволяють припустити масове пересування й активне перемішування СМР. Таким чином, у клінічних умовах і ІТ, і ІЦВ шляхи введення є потенційно застосовними, однак відкладання І2S у спинному мозку, яке спостерігалось після ІТ-введення, забезпечує явну перевагу даного шляху введення при боротьбі зі спинномозковими наслідками й компонентами лізосомних хвороб накопичення, таких як синдром Хантера. Крім того, порти для ін'єкцій у спинний мозок є менш інвазивними і припускається, що вони більше підходять для тривалого застосування, особливо у педіатричних пацієнтів.

Дані, отримані при офарбленні периваскулярних клітин і при оцінці динаміки транслокації білків, які спостерігалися при вищезгаданих ПЕТ дослідженнях, вказують на те, що фермент рухається периваскулярним простором, ймовірно за допомогою конвекційних механізмів, які супроводжуються пульсацією. На основі спостережуваного взаємозв'язку І2S з нейрофіламентами можна припустити, що додатковим механізмом транспорту є аксональний транспорт. Останній, ймовірно, починається зі взаємодії білка з нейрональними рецепторами маноза-6-фосфату (М6Р), які повсюдно експресуються в клітинах спинного та головного мозку і які при прямому введенні до паренхіми головного мозку можуть призводити до того, що фермент І2S буде легко всмоктуватися до клітини-мішені (Begley, et al., Curr Pharm Des (2008) 14: 1566-1580).

Хоча вказівки на аксональний транспорт лізосомальних ферментів раніше вже одержували непрямыми методами *in vivo* і шляхом візуалізації *in vitro*, у даних дослідженнях були отримані

перші прямі підтвердження аксонального транспорту невірусних або експресованих ферментів, що доставляються через СМР. Таким чином, доставка білків зі СМР до поверхні головного мозку з більш глибоких тканин головного мозку очевидно залежить від процесів активного переносу, жоден із яких раніше не був описаний або пояснений для доставки білків чи ферментів до клітин, тканин і органел головного мозку.

На противагу переважній точці зору про те, що динаміка потоку в інтерстиції паренхіми й СМР може перешкоджати розподілу білків, що вводяться інтратекально до поперекового відділу, у білій речовині головного мозку, дані дослідження явно демонструють, що ІТ доставка лізосомальних ферментів призводить до розподілу і накопичення білка в усіх тканинах головного мозку й до відкладання їх у лізосомальному компартменті клітин-мішеней, які є ділянкою патологічного накопичення глікозаміногліканів (див., наприклад, Fenstermacher et al., Ann N Y Acad Sci (1988) 531:29-39 and Dichiro et al., Neurology (1976) 26:1-8). У сукупності з менш інвазивним характером ІТ-поперекової доставки даний шлях введення забезпечує клінічно значущий спосіб доставки біопрепаратів до головного мозку, зокрема у дітей.

ПРИКЛАД 15: ТОКСИКОЛОГІЯ

У даному прикладі проілюстроване багаторазове інтратекальне (ІТ) введення rhASA протягом 6 місяців з точки зору токсикології та фармакологічної безпеки. У даному дослідженні тестованою речовиною, яку вводили ІТ, була rhASA. 36 самців і 36 самок довгохвостих макак випадковим чином розподіляли до п'яти лікувальних груп. Тваринні групи 1 служили контролем вживлення пристрою (порт і катетер) без введення препарату, і їм не вводили ні основу, ні тестовану речовину; зазначеним тваринам вводили 0,6 мл ФБР за графіком, який відповідає графіку введення тестованої речовини. Тваринам груп 2-5 робили ІТ інфузії 0,6 мл розчину з 0, 3, 10 або 31 мг/мл rhASA (сумарна доза 0, 1,8, 6,0 або 18,6 мг) один раз на два тижні (тобто усього 12 доз). Тварин піддавали розтині через 6 місяців (через 24 години після останнього ІТ-введення препарату), а 4 тварин/стать/групу, що залишилися, піддавали розтині наприкінці 4-тижневого періоду відновлення. Вибрані тканини відбирали, зберігали й піддавали мікроскопічному дослідженню.

У цілому, зміни, які викликалися тестованою речовиною, можна було віднести до двох основних типів, і виникали вони при всіх рівнях доз (1,8, 6,0 або 18,6 мг/дозу). Збільшення інфільтратів (лейкоцитів, зазвичай із вираженням еозинофільним компонентом) у оболонках мозку, паренхімі головного мозку, паренхімі спинного мозку, трійничному вузлі й рідко в корінцях спинномозкових нервів/спінальних гангліях (або епіневрії, який оточує зазначені структури). Зазначене збільшення інтерпретували як таке, що пов'язане з наявністю тестованої речовини (білка) в інтратекальному просторі й у тканинах нервової системи. Легке осередкове збільшення числа клітин мікроглії в спинному і головному мозку у деяких тварин (мікрогліоз не спостерігався у жодної тварини, що одержувала високу дозу). Обидві категорії морфологічних змін інтерпретували як реакцію на наявність тестованої речовини. У жодної тварини не було ознак некрозу нейронів. Ніякі пов'язані з тестованою речовиною зміни не були пов'язані з якими-небудь біологічно значущими небажаними реакціями в головному і спинному мозку, корінцях спинномозкових нервів або гангліях. Більш конкретно, не було виявлено ніяких ознак некрозу нейронів або біологічно значущої реакції з боку глії. У тканинах поза нервовою системою ніяких пов'язаних із тестованою речовиною уражень не було.

Після місячного періоду відновлення (період без введення препарату) зміни, які викликалися тестованою речовиною, або повністю врегульовувалися, або зводилися до залишкового збільшення запальної реакції, пов'язаного з наявністю тестованої речовини. У тварин, що пройшли період відновлення, ніяких небажаних морфологічних ефектів не було. За даними сліпого мікроскопічного дослідження, в якому напівкількісно оцінювали ступінь фарбування, імуногістохімічне фарбування на арилсульфатазу А (rhASA; тестована речовина) при кінцевому розтині збільшувалося в головному та спинному мозку в клітинах різних типів, за винятком нейронів, у всіх групах, що одержували тестовану речовину. Зазначене збільшення також було явним у купферівських клітинах печінки. Після місячного періоду відновлення фарбування на rhASA у тварин, що одержували тестовану речовину (групи всіх доз), поверталось до контрольного рівня (контроль введення пристрою/контроль із введенням основи). У одного самця з групи, що одержувала низьку дозу, виявлялися множинні осередки астроцитозу та втрати нейронів у корі великих півкуль, що вказує на множинні області попередньої ішемії. Хоча точний патогенез зазначених уражень у даної тварини не ясний, відсутність аналогічних уражень у яких-небудь інших тварин, що одержували тестовану речовину, включаючи тих тварин, які одержували в 10 разів більш високу дозу, говорить про те, що зазначені ураження не були пов'язані з тестованою речовиною.

У даному дослідженні тестованою речовиною, яку вводили ІТ, була rhASA. 36 самців і 36 самок довгохвостих макак випадковим чином розподіляли до п'яти лікувальних груп. Тваринні групи 1 служили контролем вживлення пристрою (порт і катетер) без введення препарату, і їм не вводили ні основу, ні тестовану речовину; однак зазначеним тваринам вводили 0,6 мл ФБР за графіком, який відповідає графіку введення тестованої речовини. Тваринам груп 2-5 робили ІТ інфузії 0,6 мл розчину з 0, 3, 10 або 31 мг/мл rhASA (сумарна доза 0, 1,8, 6,0 або 18,6 мг) один раз на два тижні (тобто усього 12 доз). Тварин піддавали розтину через 6 місяців (через 24 години після останнього ІТ-введення препарату), а 4 тварин/стать/групу, що залишилися, піддавали розтину наприкінці 4-тижневого періоду відновлення. Вибрані тканини відбирали, зберігали й піддавали мікроскопічному дослідженню. У нижченаведеній таблиці представлена схема експерименту, оскільки вона має відношення до патологічного аспекту даного дослідження.

Під час розтину звільняли матрикс головного мозку, зрізаючи фронтальний зріз товщиною приблизно 3 мм. Перший зріз і далі кожний наступний зріз фіксували в формаліні для гістопатологічної оцінки та імуногістохімічного аналізу. З головним мозком працювали в формі повних фронтальних зрізів. Зазначені зрізи включали щонайменше наступні відділи головного мозку.

- Зрізи нової кори головного мозку (включаючи лобові, тім'яні, скроневі й потиличні долі): від 1 до 8 (і зріз 9, якщо був присутній).

- Зрізи прадавньої кори головного мозку (нюхові цибулини і/або грушоподібна доля): від 1 до 3.

- Зрізи базальних гангліїв головного мозку (включаючи хвостате ядро і шкарлупу): від 1 до 3.

- Зрізи лімбічної системи головного мозку (включаючи гіпокамп і поясні звивини): 4 і 5.

- Зрізи таламуса/гіпоталамуса й областей середнього мозку головного мозку: 4 і 5.

- Зрізи мозочка, моста й довгастого мозку головного мозку: від 6 до 8 (і зріз 9, якщо був присутній).

Зрізи головного мозку перераховані в таблиці даних під номерами 1-8/9 (зріз 9 надавався тестуючою лабораторією для деяких тварин). Одержання зрізів дещо відрізнялося у різних тварин. Зрізи головного мозку (1-8/9), зазначені вище, мали приблизне розташування в різних анатомічних областях. Зрізи головного мозку перераховані в таблиці даних як окремі зрізи, із вказівкою діагнозу, що належить до даного зрізу, щоб полегшити можливий подальший аналіз зрізів (якщо такий буде проводитися). Під час інтерпретації даних індивідуальні анатомічні ділянки головного мозку (перераховані вище) порівнювали, щоб ідентифікувати унікальні ефекти тестованої речовини (тобто унікальні для конкретного відділу головного мозку). Для дослідження токсичності всі зрізи головного мозку від усіх тварин поміщали в парафін, нарізали з кроком 5 мікрон, офарблювали гематоксиліном і еозином (Г/Е) та проводили мікроскопічне дослідження. Крім того, головний мозок контрольних тварин і тварин із групи, що одержувала високу дозу, офарблювали Fluoro-Jade B (барвник, що підвищує чутливість оцінки на дегенерацію нейронів у головного мозку) і срібним барвником Більшовського (спосіб, який дозволяє прямо візуалізувати аксони, дендрити й філаменти нейронів) і проводили оцінку.

Зі спинного мозку (шийний, грудний і поперековий відділи) виготовляли зрізи товщиною один сантиметр. Перший зріз і кожний наступний зріз фіксували в формаліні для гістопатологічної оцінки й імуногістохімічного аналізу. Зрізи спинного мозку (шийний, грудний (включаючи кінчик катетера) і поперековий відділ) у всіх тварин розрізали з кроком приблизно 5 мікрон, офарблювали Г/Е й досліджували поперечний і косий зріз, отриманий на кожному рівні. Серії зрізів спинного мозку від контрольних тварин і тварин, що одержували високі дози, додатково офарблювали срібним барвником Більшовського (імуногістохімічний барвник, який дозволяє прямо візуалізувати зірчасті клітини та їхні відростки).

Задні корінці спинномозкових нервів і ганглії (взяті з середини шийного, середини грудного й середини поперекового відділу) поміщали в парафін та серії зрізів офарблювали Г/Е. Крім того, серії зрізів, отриманих від контрольних тварин і тварин, що одержували високі дози, офарблювали срібним барвником Більшовського.

Для зрізів сидничого, великогомілкового й литкового нерва, отриманих від усіх тварин: поздовжній зріз кожного нерва поміщали в парафін, одержували зрізи з приблизним кроком 5 мікронів і офарблювали Г/Е. Поперечний зріз кожного нерва згодом фіксували в осмії, поміщали в смолу Спурра, одержували зрізи з приблизним кроком 1-2 мікрони й офарблювали толудіновим синім. Наступна фіксація в осмії та поміщення в смолу забезпечує більш надійне збереження мієліну в периферичних нервах, а отже, є можливим більш докладне дослідження нерва.

Усі відібрані тканини та осередки макроскопічних уражень, відібрані при розтині у всіх тварин, також поміщали в парафін, офарблювали Г/Е і піддавали мікроскопічному дослідженню. Гістопатологічна обробка й оцінка, а також імуногістохімічний аналіз проводили за допомогою TPS.

5 Методи: фарбування на арилсульфатазу А (rhASA)

Зрізи для позитивного контролю надавав спонсор. Зазначені зрізи являли собою зрізи печінки мишей, яким вводили rhASA. На зрізах для позитивного контролю були отримані достатні підтвердження того, що rhASA є присутньою в купферівських клітинах (синусоїдальних макрофагах) у печінці. Зрізи для позитивного контролю зберігали з іншими зрізами, отриманими в ході даного дослідження. Усі види оцінки офарблених на rhASA зрізів спочатку проводили сліпим способом відносно лікувальної групи, до якої належала тварина. Це досягалося завдяки тому, що патоморфолог спочатку реєстрував показники фарбування на rhASA на зрізах, і при цьому маркування із вказівкою номера тварини було від нього сховане (з використанням асистента, який знав, зріз якої тварини аналізується), диктував бал (ступінь тяжкості) під час оцінки, а той же асистент відразу ж записував бал фарбування (ступінь тяжкості) до таблиць даних. Щоб гарантувати точність введення даних, потім ідентифікаційний номер тварини звіряли невропатолог дослідження й зазначений асистент. Дану процедуру проводили так, щоб не вносити ніякої необ'єктивності в оцінку загальної інтенсивності фарбування імуногістохімічним барвником при визначенні внутрішньоклітинної rhASA. У всіх зрізах головного і спинного мозку оцінювали відносний ступінь фарбування нейронів, оболонкових макрофагів, периваскулярних макрофагів і клітин глії (астроцитів і клітин мікроглії, але, ймовірно, переважно клітин мікроглії). Середні бали тяжкості на кожному рівні головного і спинного мозку для кожної групи підсумовували (по групах) і реєстрували у вигляді загального фарбування на rhASA в графі тканин головного мозку і загального фарбування на rhASA в графі спинного мозку.

25 У цілому, фарбування на rhASA в нейронах головного мозку служило показником відносно нейронів кори великих півкуль та інших ядер у головному мозку. фарбування на rhASA в оболонкових макрофагах вказувало на захоплення тестованої речовини оболонковими макрофагами і/або на ендогенну rhASA в оболонкових макрофагах. фарбування на rhASA периваскулярних макрофагів служило показником захоплення rhASA (або ендогенної rhASA) макрофагами в головному/спинному мозку, хоча слід зазначити, що периваскулярний простір у головному і спинному мозку (простір Вірхова-Робіна) сполучається з оболонками головного мозку. У цілому, оцінка інтенсивності фарбування на rhASA в клітинах глії переважно служила показником захоплення тестованої речовини/проникнення тестованої речовини до сірої і/або білої речовини, особливо до кори великих півкуль (променистий вінець у білій речовині під корою великих півкуль). фарбування на rhASA в білій речовині, очевидно, відповідало астроцитам і клітинам мікроглії.

Для оцінки ступеня фарбування на rhASA клітин різних типів (нейронів, клітин глії, макрофагів), застосовували наступну оцінювальну шкалу.

Пояснення до шкали (% від можливого фарбування клітин)

- 40 1 - менше 10 %
 2 - більше 10, до 25 %
 3 - більше 25, до 50 %
 4 - більше 50, до 75 %
 5 - більше 75 %.

45 Слід зазначити, що зазначена шкала не є строго кількісною. Її застосовували як ефективний напівкількісний спосіб оцінки фарбування на rhASA тканин головного і спинного мозку. Невропатолог дослідження помітив, що не всі області нейронів проявляли однакове фарбування на rhASA. Також було відмічено, що у деяких контрольних тварин мало місце ендогенне фарбування нейронів і що клітини судинного сплетення й нейрони гангліїв задніх корінців мали тенденцію до сильного фарбування на rhASA навіть у контрольних тварин. фарбування судинного сплетення і гангліїв задніх корінців не оцінювали за зазначеною шкалою, але невропатолог дослідження відзначив, що воно було вираженим, навіть у контрольних тварин.

55 Примітка: групи, що одержували всі дози: низька доза = 1,8 мг/дозу; середня доза = 6,0 мг/дозу; висока доза = 18,6 мг/дозу. У тканинах поза нервовою системою не було уражень, пов'язаних із тестованою речовиною, за винятком підвищеного фарбування на rhASA у печінці в групах, що одержували всі дози (самці та самки; див. нижче).

УМЕРТВІННЯ ТВАРИН НАПРИКІНЦІ ДОСЛІДЖЕННЯ (ВВЕДЕННЯ ПРЕПАРАТУ ПРОТЯГОМ 6 МІСЯЦІВ ОДИН РАЗ НА ДВА ТИЖНІ): фарбування ЗРІЗІВ НА rhASA

У наступних типах тканин/клітин мала місце підвищена інтенсивність фарбування на rhASA. При оцінці дії тестованої речовини на ступінь фарбування на rhASA в конкретному типі клітин у групі, що одержувала конкретну дозу, для порівняння оцінювали рівень фарбування в супутньому контролі основи та контролі вживлення пристрою (умертвлення одночасно з тваринами, які пройшли період відновлення).

Головний мозок, оболонки мозку, макрофаги (групи, що одержували всі дози, самці й самки)
 • Головний мозок, периваскулярний простір, макрофаги (групи, що одержували всі дози, самці й самки)

Головний мозок, клітини глії (групи, що одержували всі дози, самці й самки)
 Спинний мозок, оболонки мозку, макрофаги (групи, що одержували всі дози, самці й самки)
 Спинний мозок, периваскулярний простір, макрофаги (групи, що одержували всі дози, самці й самки)

Спинний мозок, клітини глії (групи, що одержували середню й високу дози, самці й самки)
 Печінка, купферівські клітини (групи, що одержували всі дози, самці й самки)

Через ендогенне фарбування було найбільш важко визначити точно рівень фарбування на ARSA в нейронах головного та спинного мозку. Був продемонстрований незмінно підвищений рівень rhASA в макрофагах оболонок мозку і периваскулярних макрофагах головного/спинного мозку, а також у клітинах глії. Помітних відмінностей у офарбленні на rhASA нейронів у контрольних тварин і тварин, що одержували тестовану речовину, виявлено не було.

УМЕРТВІННЯ ТВАРИН ПІСЛЯ ПЕРІОДУ ВІДНОВЛЕННЯ (ВВЕДЕННЯ ПРЕПАРАТУ ПРОТЯГОМ 6 МІСЯЦІВ ОДИН РАЗ НА ДВА ТИЖНІ Й НАСТУПНИЙ ПЕРІОД ВІДНОВЛЕННЯ ТРИВАЛІСТЮ ОДИН МІСЯЦЬ БЕЗ ВВЕДЕННЯ ПРЕПАРАТУ)

У цілому у тварин, які перед розтином відновлювалися протягом одного місяця без введення препарату, зміни, пов'язані з тестованою речовиною, або повністю врегульовувалися, або помітно зменшувалися. Були присутніми наступні мікроскопічні зміни з частотою/тяжкістю, яка вказує на можливий взаємозв'язок із тестованою речовиною.

Мікроскопічні зміни, пов'язані з тестованою речовиною (тварини, що пройшли період відновлення)

- Головний мозок, оболонки мозку, інфільтрати (групи, що одержували середню й високу дози, обидві статі) (Фігура 111 і Фігура 112)

- Головний мозок, оболонки мозку, інфільтрати, % еозинофілів (самці, що одержували середню дозу; самки, що одержували високу дозу)

- Головний мозок, периваскулярний простір, інфільтрати (самці, що одержували середню дозу; самки, що одержували високу дозу) (Фігура 113)

- Головний мозок, периваскулярний простір, інфільтрати, % еозинофілів (самці, що одержували середню дозу; самки, що одержували високу дозу)

- Головний мозок, сіра речовина, інфільтрати (групи, що одержували всі дози, обидві статі)

- Головний мозок, сіра речовина, інфільтрати, % еозинофілів (самці, що одержували низьку дозу)

- Головний мозок, сіра речовина, еозинофіли, некроз (самці, що одержували низьку дозу)

- Спинний мозок, оболонки мозку, інфільтрати (самці, що одержували середню й високу дози; самки, що одержували низьку й високу дози)

- Спинний мозок, оболонки мозку, інфільтрати, % еозинофілів (самці, що одержували середню дозу; самки, що одержували низьку дозу)

- Спинний мозок, сіра речовина, інфільтрати (самки, що одержували низьку дозу)

- Спинний мозок, сіра речовина, інфільтрати, % еозинофілів (самки, що одержували низьку дозу)

- Задні корінці й ганглії спинномозкових нервів, епіневрій, інфільтрати (самки, що одержували середню дозу)

- Корінці й ганглії спинномозкових нервів, інфільтрати, еозинофіли (самці, що одержували середню й високу дози; самки, що одержували всі дози)

- Трійничний вузол, інфільтрати, еозинофіли (самці й самки, що одержували середню дозу)

Усі зазначені зміни інтерпретували як залишкові явища виражених запальних змін, що виявляються у тварин, умертвлених після закінчення введення препарату. Хоча у тварин, умертвлених після закінчення введення препарату, не було ознак виражених інфільтратів запальних клітин, вони все-таки були присутніми у деяких тварин, що пройшли період відновлення, вказуючи на морфологічні зміни, які викликали якісь небажані ефекти. У тканинах поза нервовою системою уражень, пов'язаних із тестованою речовиною, не виявлялося.

УМЕРТВІННЯ ТВАРИН ПІСЛЯ ПЕРІОДУ ВІДНОВЛЕННЯ (ВВЕДЕННЯ ПРЕПАРАТУ ПРОТЯГОМ 6 МІСЯЦІВ ОДИН РАЗ НА ДВА ТИЖНІ Й НАСТУПНИЙ ПЕРІОД ВІДНОВЛЕННЯ ТРИВАЛІСТЮ ОДИН МІСЯЦЬ БЕЗ ВВЕДЕННЯ ПРЕПАРАТУ): фарбування НА ARSA

У самців і самок, що пройшли період відновлення, у порівнянні з контролем вживлення пристрою та контролем основи ніяких вказівок на більш сильне фарбування на rhASA не було. У головному мозку самців, що одержували низьку, середню й високу дози та пройшли період відновлення, у деяких типах клітин (вони варіювали серед лікувальних груп) були реальні вказівки на більш сильне фарбування на rhASA в порівнянні з контролем вживлення пристрою і контролем основи. Причина цього не ясна, у тому числі не ясно, чи здійснювало це реальну дію. Одне з можливих пояснень може полягати в тому, що введення екзогенної rhASA може призводити до зниження вироблення ендогенної rhASA. У спинному мозку зазначених самців аналогічного результату не було. У самців і самок, що пройшли період відновлення, фарбування сріблом давало результат, аналогічний результату в контролях.

У цілому, зміни, пов'язані з тестованою речовиною, можна було віднести до двох основних типів, і вони були присутніми при всіх рівнях доз (1,8, 6,0 і 18,6 мг/дозу).

Збільшення інфільтратів (лейкоцити, зазвичай із вираженим еозинофільним компонентом) у оболонках мозку, паренхімі головного мозку, паренхімі спинного мозку, трійничному вузлі й рідко - у корінцях/гангліях спинномозкових нервів (або епіневрії, що оточує зазначені структури).

Зазначене збільшення інтерпретували як пов'язане з наявністю тестованої речовини (білка) в інтратекальному просторі й у тканинах нервової системи.

Легке осередкове збільшення числа клітин мікроглії в спинному та головному мозку у деяких тварин (мікрогліоз не спостерігався у жодної тварини, що одержувала високу дозу). Обидві категорії морфологічних змін інтерпретували як реакцію на наявність тестованої речовини. У жодної тварини не було ознак некрозу нейронів. На момент написання даного проміжного звіту оцінка офарблених на rhASA зрізів ще проводиться. Ніякі пов'язані з тестованою речовиною зміни не були пов'язані з якими-небудь біологічно значущими небажаними реакціями в головному та спинному мозку, корінцях спинномозкових нервів або гангліях. Більш конкретно, не було виявлено ніяких ознак некрозу нейронів або біологічно значущої реакції з боку глії. У тканинах поза нервовою системою ніяких пов'язаних із тестованою речовиною уражень не було. Після місячного періоду відновлення (період без введення препарату) зміни, які викликалися тестованою речовиною, або повністю врегульовувалися, або зводилися до залишкового збільшення запальної реакції, пов'язаного з наявністю тестованої речовини. У тварин, що пройшли період відновлення, ніяких небажаних морфологічних ефектів не було.

За даними сліпого мікроскопічного дослідження, в якому напівкількісно оцінювали ступінь фарбування, імуногістохімічне фарбування на арилсульфатазу А (rhASA; тестована речовина) збільшувалося в головному і спинному мозку в клітинах різних типів, за винятком нейронів, у всіх групах, що одержували тестовану речовину. Зазначене збільшення також було явним у купферівських клітинах печінки. Після місячного періоду відновлення фарбування на rhASA у тварин, що одержували тестовану речовину (групи всіх доз), поверталось до контрольного рівня (контроль введення пристрою/контроль із введенням основи). У одного самця з групи, що одержувала низьку дозу, виявлялися множинні осередки астроцитозу і втрати нейронів у корі великих півкуль, що вказує на множинні області попередньої ішемії. Хоча точний патогенез зазначених уражень у даної тварини не ясний, відсутність аналогічних уражень у яких-небудь інших тварин, які одержували тестовану речовину, включаючи тих тварин, які одержували дозу в 10 разів вищу, говорить про те, що зазначені ураження не були пов'язані з тестованою речовиною. На момент випуску даного попереднього звіту і строго ґрунтуючись на макроскопічних та мікроскопічних результатах (на зрізах тканин, поміщених у парафін, офарблених гематоксиліном і еозином), отриманих у даному дослідженні, рівнем відсутності спостережуваних небажаних ефектів (NOAEL) був визнаний рівень 18,6 мг.

ПРИКЛАД 16: ФАРМАКОКІНЕТИЧНІ ДАНІ

Результати 6-місячного введення

У даному прикладі описаний інтерпретований аналіз концентрацій rhASA і сироваткових анти-rhASA-антитіл (від компанії "Northern Biomedical Research, Inc.") у сироватці та СМР.

Мета даного прикладу полягала в оцінці багатократного інтратекального (ІТ) введення rhASA з точки зору токсикології та фармакологічної безпеки у молодих (молодше 12 місяців) довгохвостих макак. Усього за період шість місяців вводили 12 доз. Тварин піддавали розтину через 24 години після введення останньої дози препарату. Схема експерименту показана в Таблиці 29.

Таблиця 29:

Схема експерименту в дослідженні 047-021 (rhASA 1-09-015)

Схема експерименту					
Група	К-сть тварин	Номинальна концентрація в дозі (мг/мл)	Доза, яку вводили (мг)	К-сть тварин, умертвлених через 6 місяців	К-сть тварин, умертвлених після місячного періоду відновлення
1	4М, 4Ж	DC	0	-	4М, 4Ж
2	8М, 8Ж	0	0	4М, 3Ж ^a	4М, 4Ж
3	8М, 8Ж	3	1,8	4М, 4Ж	4М, 4Ж
4	8М, 8Ж	10	6,0	4М, 4Ж	4М, 4Ж
5	8М, 8Ж	31	18,6	4М, 4Ж	4М, 4Ж

DC = контроль пристрою; тварини в групі 1 не одержували ні основи, ні тестованої речовини.

^a Тварина № 044 з групи контролю введення основи померла в день 50 через витік у катетері.

Способи кількісного визначення - аналіз антитіл

Кількісне визначення анти-rhASA-антитіл у сироватці та СМР довгохвостих макак проводили з використанням способу, що пройшов валідацію. Якщо коротко, кількісне визначення починали з блокування планшета, покритого стрептавідином MSD, після чого проводили інкубацію з rhASA, міченою біотином. Після етапу відмивання до планшета додавали розведені проби, калібрувальні стандарти і стандарти для контролю якості та інкубували його. Після додаткового етапу промивання додавали лікарську речовину, мічену SULFO TAG, та інкубували. Проводили остаточний етап відмивання й додавали буфер зчитування MSD. Зчитування показників із планшета проводили негайно. Дані про сигнал у відносних одиницях люмінесценції (RLU) аналізували з використанням шаблонів Softmax Pro.

Концентрації в сироватці та СМР

Кількісне визначення анти-rhASA-антитіл у сироватці та СМР довгохвостих макак проводили з використанням методу, що пройшов валідацію. Зазначений спосіб оснований на технології твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA). Якщо коротко, титраційний мікропланшет покривали поліклональними антитілами кролика (SH040), що утворювалися на рекомбінантну арилсульфатазу А людини (rhASA). Після інкубації зі стандартним зразком rhASA і тестованими пробамі білок rhASA, що зв'язався, виявляли з використанням кон'югованого з пероксидазою хрину (ПХ) анти-ASA моноклонального антитіла (клон 19-16-3). Потім планшет інкубували з субстратом ПХ, TMB. Зазначену реакцію "фермент-субстрат" зупиняли шляхом додавання 2Н сірчаної кислоти (H₂SO₄), і поглинання кожної лунки визначали на довжині хвилі 150 нм із опорною довжиною хвилі 655 нм. Концентрації rhASA в пробах розраховували на основі калібрувальної кривої для rhASA, зареєстрованої в тому ж планшеті.

Підсумкові дані про концентрації rhASA в сироватці наведені в Таблиці 30.

Підсумкові дані про концентрації rhASA у СМР наведені в Таблиці 31.

Підсумкові дані про концентрації анти-rhASA-антитіл у сироватці наведені в Таблиці 32.

Підсумкові дані про концентрації анти-rhASA-антитіл у СМР наведені в Таблиці 33.

Частоти виявлення антитіл в залежності від групи і статі наведені в Таблиці 36.

Таблиця 30

Підсумкові дані про концентрації rhASA в сироватці довгохвостих макак

Група 1: Контроль із введенням основи	Самці			Самки		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Перед введенням дози 2	0	0	4	0	0	4
Після введення дози 2	0	0	4	0	0	4
Перед введенням дози 4	0	0	4	0	0	4
Після введення дози 4	0	0	4	0	0	4
Перед введенням дози 6	0	0	4	0	0	4
Після введення дози 6	0	0	4	0	0	4

Таблиця 30

Підсумкові дані про концентрації rhASA в сироватці довгохвостих макак

Група 1: Контроль із введенням основи	Самці			Самки		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Перед введенням дози 8	0	0	4	0	0	4
Після введення дози 8	0	0	4	0	0	4
Перед введенням дози 10	0	0	4	0	0	4
Після введення дози 10	0	0	4	0	0	4
Перед введенням дози 12	0	0	4	0	0	4
Після введення дози 12	0	0	4	0	0	4
Середина періоду відновлення	0	0	4	0	0	4
Розтин після періоду відновлення	0	0	4	0	0	4

Група 2: 0 мг	Самці			Самки		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Перед введенням дози 2	0	0	8	0	0	7
Після введення дози 2	0	0	8	0	0	7
Перед введенням дози 4	0	0	8	0	0	7
Після введення дози 4	0	0	8	0	0	7
Перед введенням дози 6	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 6	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 8	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 8	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 10	0	0	8	0	0	7
Після введення дози 10	0	0	8	0	0	7
Перед введенням дози 12	0	0	8	0	0	7
Після введення дози 12 (перед розтином після закінчення 6 місяців)	0	0	8	0	0	8
Середина періоду відновлення	0	0	4	0	0	4
Розтин після періоду відновлення	0	0	4	0	0	4

Таблиця 30 (продовження)

Підсумкові дані про концентрації rhASA у сироватці довгохвостих макак

Група 3: 1,8 мг	Самці			Самки		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Перед введенням дози 2	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 2	49,2	46,8	8	40,3	27,3	8
Перед введенням дози 4	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 4	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 6	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 6	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 8	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 8	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 10	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 10	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 12	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 12 (перед розтином після закінчення 6 місяців)	0	0	8	0	0	8
Середина періоду відновлення	0	0	4	0	0	4
Розтин після періоду відновлення	0	0	4	0	0	4

Група 4: 6,0 мг	Самці			Самки		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Перед введенням дози 2	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 2	173,6	69,5	8	143,2	89,0	8
Перед введенням дози 4	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 4	17	49	8	63,8	119,9	8
Перед введенням дози 6	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 6	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 8	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 8	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 10	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 10	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 12	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 12 (перед розтином після закінчення 6 місяців)	0	0	8	0	0	8
Середина періоду відновлення	0	0	4	0	0	4
Розтин після періоду відновлення	0	0	4	0	0	4

Таблиця 30 (продовження)

Підсумкові дані про концентрації rhASA у сироватці довгохвостих макак

Група 5: 18,6 мг	Самці			Самки		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Перед введенням дози 2	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 2	348,0	272,9	8	562,3	204,3	8
Перед введенням дози 4	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 4	105,7	274,6	8	172,0	141,3	8
Перед введенням дози 6	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 6	20,4	38,4	8	88,6	121,4	8
Перед введенням дози 8	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 8	0	0	8	54,0	89,4	8
Перед введенням дози 10	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 10	0	0	8	6	18	8
Перед введенням дози 12	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 12 (перед розтином після закінчення 6 місяців)	0	0	8	0	0	8
Середина періоду відновлення	0	0	4	0	0	4
Розтин після періоду відновлення	0	0	4	0	0	4

Таблиця 31:

Підсумкові дані про концентрації rhASA у СМР довгохвостих макак

Група 1: Контроль із введенням основи	Самці			Самки		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Перед введенням дози 2	0	0	4	0	0	4
Після введення дози 2	0	0	4	0	0	4
Перед введенням дози 4	0	0	4	0	0	4
Після введення дози 4	0	0	4	0	0	4
Перед введенням дози 6	0	0	4	0	0	4
Після введення дози 6	0	0	4	0	0	4
Перед введенням дози 8	0	0	4	0	0	4
Після введення дози 8	0	0	4	0	0	4
Перед введенням дози 10	0	0	4	0	0	4
Після введення дози 10	0	0	3	0	0	4
Перед введенням дози 12	0	0	3	0	0	4
Після введення дози 12	0	0	3	0	0	4
Середина періоду відновлення	0	0	3	0	0	4
Розтин після періоду відновлення	0	0	4	0	0	4

Група 2: 0 мг	Самці			Самки		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Перед введенням дози 2	0	0	6	0	0	7
Після введення дози 2	0	0	5	0	0	7
Перед введенням дози 4	0	0	5	0	0	6
Після введення дози 4	0	0	5	0	0	5
Перед введенням дози 6	0	0	5	0	0	5
Після введення дози 6	0	0	5	0	0	5
Перед введенням дози 8	0	0	5	0	0	5
Після введення дози 8	0	0	5	0	0	5
Перед введенням дози 10	0	0	4	0	0	5
Після введення дози 10	0	0	4	0	0	5
Перед введенням дози 12	0	0	4	0	0	5
Після введення дози 12 (перед розтином після закінчення 6 місяців)	0	0	5	0	0	5
Середина періоду відновлення	0	0	2	0	0	3
Розтин після періоду відновлення	0	0	4	0	0	4

Таблиця 31 (продовження)

Підсумкові дані про концентрації rhASA у СМР довгохвостих макак

Група 3: 1,8 мг	Самці			Самки		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Перед введенням дози 2	42491	59255	7	42217	47300	6
Після введення дози 2	95886	22626	7	125717	61723	6
Перед введенням дози 4	17664	24372	6	50829	41891	6
Після введення дози 4	106783	42823	6	138400	49908	6
Перед введенням дози 6	39400	50105	4	45817	38404	6
Після введення дози 6	95275	12836	4	104080	37423	5
Перед введенням дози 8	25799	31589	4	58086	43821	5
Після введення дози 8	148750	34664	4	119200	66556	5
Перед введенням дози 10	25927	31380	4	30380	30328	5
Після введення дози 10	89975	29494	4	105200	44603	5
Перед введенням дози 12	29746	34267	4	82780	65906	5
Після введення дози 12 (перед розтином після закінчення 6 місяців)	32030	39155	7	47331	49015	6
Середина періоду відновлення	0	0	3	0	0	2
Розтин після періоду відновлення	0	0	4	0	0	4
Група 4: 6,0 мг	Самці			Самки		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Перед введенням дози 2	75203	67002	8	146979	233673	6
Після введення дози 2	360000	179276	8	267667	103369	6
Перед введенням дози 4	58064	77210	8	53285	73340	5
Після введення дози 4	369250	241251	8	305517	152232	6
Перед введенням дози 6	77253	91407	8	97987	146762	6
Після введення дози 6	418600	200098	5	369000	232238	5
Перед введенням дози 8	66342	80374	5	11592	23072	4
Після введення дози 8	329400	209841	5	340500	135128	4
Перед введенням дози 10	119420	148408	5	74031	104609	2
Після введення дози 10	412000	149278	5	245500	161927	2
Перед введенням дози 12	68651	92902	5	74577	105251	2
Після введення дози 12 (перед розтином після закінчення 6 місяців)	141833	173933	7	58986	99016	4
Середина періоду відновлення	0	0	3	0	НЗ	1
Розтин після періоду відновлення	0	0	4	0	0	4

Таблиця 31 (продовження)

Підсумкові дані про концентрації rhASA у СМР довгохвостих макак

Група 5: 18,6 мг	Самці			Самки		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Перед введенням дози 2	289917	291188	7	201339	250774	8
Після введення дози 2	734429	298352	7	920143	448409	7
Перед введенням дози 4	150238	210302	7	169895	185675	6
Після введення дози 4	984857	570039	7	965167	425924	6
Перед введенням дози 6	265479	252067	7	288879	226889	6
Після введення дози 6	758143	102009	7	1270000	558533	6
Перед введенням дози 8	190529	240081	7	196021	199396	6
Після введення дози 8	1003429	538271	7	989800	585072	5
Перед введенням дози 10	176297	272500	7	168864	191087	6
Після введення дози 10	1013000	390673	7	773400	103717	5
Перед введенням дози 12	142334	196793	5	430542	436534	6
Після введення дози 12 (перед розтином після закінчення 6 місяців)	291525	350251	7	252142	381200	6
Середина періоду відновлення	0	0	3	0	0	2
Розтин після періоду відновлення	0	0	4	0	0	4

Таблиця 32

Підсумкові дані про концентрації анти-rhASA-антитіл у сироватці

Група 1: Контроль із введенням основи	Самці			Самки		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Перед введенням дози 2	0	0	4	0	0	4
Перед введенням дози 4	0	0	4	0	0	4
Перед введенням дози 6	0	0	4	0	0	4
Перед введенням дози 8	0	0	4	0	0	4
Перед введенням дози 10	0	0	4	0	0	4
Перед введенням дози 12	0	0	4	0	0	4
Середина періоду відновлення	0	0	4	0	0	4
Розтин після періоду відновлення	0	0	4	0	0	4

Група 2: 0 мг	Самці			Самки		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Перед введенням дози 2	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 4	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 6	0	0	8	0	0	7
Перед введенням дози 8	0	0	8	0	0	7
Перед введенням дози 10	0	0	8	0	0	7
Перед введенням дози 12	0	0	8	0	0	7
Розтин (через 24 години після введення останньої дози)	0	0	4	0	0	4
Середина періоду відновлення	0	0	4	0	0	4
Розтин після періоду відновлення	0	0	4	0	0	4

Таблиця 32 (продовження)

Підсумкові дані про концентрації анти-rhASA-антитіл у сироватці

Група 3: 1,8 мг	Самці			Самки		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	N
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Перед введенням дози 2	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 4	18409	21371	8	27648	37504	8
Перед введенням дози 6	75913	64863	8	85625	79871	8
Перед введенням дози 8	132163	95576	8	151900	97818	8
Перед введенням дози 10	392338	606626	8	290675	186213	8
Перед введенням дози 12	499438	735028	8	524438	569523	8
Розтин (через 24 години після введення останньої дози)	261625	157865	4	733550	928411	4
Середина періоду відновлення	339250	265888	4	377175	218955	4
Розтин після періоду відновлення	712500	1107129	4	295525	174718	4

Група 4: 6,0 мг	Самці			Самки		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	N
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Перед введенням дози 2	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 4	30419	30561	8	64000	89510	8
Перед введенням дози 6	143693	128094	8	191750	150511	8
Перед введенням дози 8	325750	190651	8	305850	224707	8
Перед введенням дози 10	669125	515458	8	832188	846241	8
Перед введенням дози 12	946125	651530	8	1060775	1088889	8
Розтин (через 24 години після введення останньої дози)	713500	598812	4	1047568	1132048	4
Середина періоду відновлення	1566000	708132	4	975500	1149734	4
Розтин після періоду відновлення	1113250	554510	4	793000	991450	4

Група 5: 18,6 мг	Самці			Самки		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	N
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Перед введенням дози 2	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 4	56873	39107	8	39994	53411	8
Перед введенням дози 6	311638	237796	8	193263	208952	8
Перед введенням дози 8	482875	270130	8	399363	360425	8
Перед введенням дози 10	1006750	857916	8	866875	894776	8
Перед введенням дози 12	1419000	1382276	8	1341500	1373771	8
Розтин (через 24 години після введення останньої дози)	165000	147463	4	407300	268570	4
Середина періоду відновлення	2884250	1363128	4	2101500	2090420	4
Розтин після періоду відновлення	2504250	1118042	4	1506000	1524682	4

Підсумкові дані про концентрації анти-rhASA-антитіл у СМР

Група 1: Контроль із введенням основи	Самці			Самки		
	Середнє	З	n	Середнє	З	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Операція	0	0	4	0	0	4
Перед введенням дози 2	0	0	4	0	0	4
Перед введенням дози 4	0	0	4	0	0	4
Перед введенням дози 6	0	0	4	0	0	4
Перед введенням дози 8	0	0	4	0	0	4
Перед введенням дози 10	0	0	4	0	0	4
Перед введенням дози 12	0	0	3	0	0	4
Середина періоду відновлення	0	0	3	0	0	4
Розтин після періоду відновлення	0	0	4	0	0	4

Група 2: 0 мг	Самці			Самки		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Операція	0	0	7	0	0	6
Перед введенням дози 2	0	0	6	0	0	7
Перед введенням дози 4	0	0	5	0	0	6
Перед введенням дози 6	0	0	5	0	0	5
Перед введенням дози 8	0	0	5	0	0	5
Перед введенням дози 10	0	0	4	0	0	5
Перед введенням дози 12	0	0	4	0	0	5
Розтин (через 24 години після введення останньої дози)	0	0	3	0	0	2
Середина періоду відновлення	0	НЗ	1	0	0	3
Розтин після періоду відновлення	0	0	4	0	0	4

Група 3: 1,8 мг	Самці			Самки		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Операція	0	0	7	0	0	8
Перед введенням дози 2	0	0	7	0	0	6
Перед введенням дози 4	0	0	6	41	101	6
Перед введенням дози 6	685	1317	4	632	1413	5
Перед введенням дози 8	2238	2596	4	2180	4875	5
Перед введенням дози 10	3393	5038	4	5560	12433	5
Перед введенням дози 12	6436	8266	4	12700	28398	5
Розтин (через 24 години після введення останньої дози)	14848	12401	4	21442	32382	4
Середина періоду відновлення	29307	40617	3	18700	283	2
Розтин після періоду відновлення	21060	30010	3	13078	7181	4

Таблиця 33 (продовження)

Підсумкові дані про концентрації анти-rhASA-антитіл у СМР

Група 4: 6,0 мг	Самці			Самки		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Операція	0	0	7	0	0	8
Перед введенням дози 2	0	0	7	0	0	6
Перед введенням дози 4	99	172	7	84	187	5
Перед введенням дози 6	1117	1862	8	1473	2775	6
Перед введенням дози 8	3987	5580	5	20824	27320	4
Перед введенням дози 10	6600	9679	5	2715	1237	2
Перед введенням дози 12	5285	7279	5	955	1237	2
Розтин (через 24 години після введення останньої дози)	16870	16350	4	63000	63000	3
Середина періоду відновлення	66233	42238	3	16800	НЗ	1
Розтин після періоду відновлення	53600	14388	3	28880	29890	4

Група 5: 18,6 мг	Самці			Самки		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Операція	0	0	7	0	0	6
Перед введенням дози 2	0	0	7	0	0	8
Перед введенням дози 4	102	192	7	0	0	6
Перед введенням дози 6	233	351	7	1506	3234	6
Перед введенням дози 8	3378	5931	7	6367	9865	6
Перед введенням дози 10	16327	24035	7	19567	27542	6
Перед введенням дози 12	11596	16406	5	15143	24351	6
Розтин (через 24 години після введення останньої дози)	5168	7427	4	12135	10341	4
Середина періоду відновлення	54700	26439	3	46315	62770	2
Розтин після періоду відновлення	50725	29217	4	37790	35967	4

Таблиця 34

Концентрації rhASA у сироватці та СМР, об'єднані дані самців і самок (нг/мл)

Група 1: Контроль із введенням основи	rhASA у сироватці (нг/мл)			rhASA у СМР (нг/мл)		
	Група в сукупності			Група в сукупності		
Момент часу	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Перед введенням дози 2	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 2	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 4	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 4	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 6	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 6	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 8	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 8	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 10	0	0	8	0	0	8
Після введення дози 10	0	0	8	0	0	7
Перед введенням дози 12	0	0	8	0	0	7
Після введення дози 12	0	0	8	0	0	7
Середина періоду відновлення	0	0	8	0	0	7
Розтин після періоду відновлення	0	0	8	0	0	8

Група 2: 0 мг	rhASA у сироватці (нг/мл)			rhASA у CMP (нг/мл)		
	Група в сукупності			Група в сукупності		
Момент часу	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Перед введенням дози 2	0	0	16	0	0	13
Після введення дози 2	0	0	16	0	0	12
Перед введенням дози 4	0	0	16	0	0	11
Після введення дози 4	0	0	16	0	0	10
Перед введенням дози 6	0	0	15	0	0	10
Після введення дози 6	0	0	15	0	0	10
Перед введенням дози 8	0	0	15	0	0	10
Після введення дози 8	0	0	15	0	0	10
Перед введенням дози 10	0	0	15	0	0	9
Після введення дози 10	0	0	15	0	0	9
Перед введенням дози 12	0	0	15	0	0	9
Після введення дози 12 (перед розтином після закінчення 6 місяців)	0	0	15	0	0	10
Середина періоду відновлення	0	0	8	0	0	5
Розтин після періоду відновлення	0	0	8	0	0	8

Таблиця 34 (продовження)

Концентрації rhASA у сироватці та CMP, об'єднані дані самців і самок (нг/мл)

Група 3: 1,8 мг	rhASA у сироватці (нг/мл)			rhASA у CMP (нг/мл)		
	Група в сукупності			Група в сукупності		
Момент часу	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Перед введенням дози 2	0	0	16	42365	51844	13
Після введення дози 2	44,7	37,3	16	109654	45639	13
Перед введенням дози 4	0	0	16	34247	36982	12
Після введення дози 4	0	0	16	122592	47311	12
Перед введенням дози 6	0	0	16	43250	40831	10
Після введення дози 6	0	0	16	100167	27992	9
Перед введенням дози 8	0	0	16	43736	40298	9
Після введення дози 8	0	0	16	132333	53926	9
Перед введенням дози 10	0	0	16	28401	28890	9
Після введення дози 10	0	0	16	98433	37220	9
Перед введенням дози 12	0	0	16	59209	58253	9
Після введення дози 12 (перед розтином після закінчення 6 місяців)	0	0	16	39092	42786	13
Середина періоду відновлення	0	0	8	0	0	5
Розтин після періоду відновлення	0	0	8	0	0	8

Група 4: 6,0 мг	rhASA у сироватці (нг/мл)			rhASA у CMP (нг/мл)		
	Група в сукупності			Група в сукупності		
Момент часу	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Перед введенням дози 2	0	0	16	105964	157408	14
Після введення дози 2	158,4	78,7	16	320429	153832	14
Перед введенням дози 4	0	0	16	56226	72638	13
Після введення дози 4	40,6	91,7	16	341936	203284	14
Перед введенням дози 6	0	0	16	86139	113563	14
Після введення дози 6	0	0	16	393800	206033	10
Перед введенням дози 8	0	0	16	42009	65286	9
Після введення дози 8	0	0	16	334333	169995	9
Перед введенням дози 10	0	0	16	106452	130375	7
Після введення дози 10	0	0	16	364429	160707	7
Перед введенням дози 12	0	0	16	70344	87227	7
Після введення дози 12 (перед розтином після закінчення 6 місяців)	0	0	16	111707	151129	11
Середина періоду відновлення	0	0	8	0	0	4
Розтин після періоду відновлення	0	0	8	0	0	8

Таблиця 34 (продовження)

Концентрації rhASA у сироватці та CMP, об'єднані дані самців і самок (нг/мл)

Група 5: 18,6 мг	rhASA у сироватці (нг/мл)			rhASA у CMP (нг/мл)		
	Група в сукупності			Група в сукупності		
Момент часу	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Перед введенням дози 2	0	0	16	242676	264338	15
Після введення дози 2	455,1	257,8	16	827286	378379	14
Перед введенням дози 4	0	0	16	159311	191264	13
Після введення дози 4	138,8	213,7	16	975769	488021	13
Перед введенням дози 6	0	0	16	276279	231010	13
Після введення дози 6	54,5	93,8	16	994385	453568	13
Перед введенням дози 8	0	0	16	193064	213058	13
Після введення дози 8	27,0	67,1	16	997750	531567	12
Перед введенням дози 10	0	0	16	172866	228817	13
Після введення дози 10	3,2	13	16	913167	319975	12
Перед введенням дози 12	0	0	16	299538	365275	11
Після введення дози 12 (перед розтином після закінчення 6 місяців)	0	0	16	273348	349718	13
Середина періоду відновлення	0	0	8	0	0	5
Розтин після періоду відновлення	0	0	8	0	0	8

Таблиця 35

Концентрація анти-rhASA-антитіл у сироватці та СМР, об'єднані дані самців і самок (нг/мл)

Група 1: Контроль із введенням основи	Анти-rhASA-антитіла в сироватці (нг/мл)			Анти-rhASA-антитіла в СМР(нг/мл)		
	Група в сукупності			Група в сукупності		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Операція				0	0	8
Перед введенням дози 2	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 4	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 6	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 8	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 10	0	0	8	0	0	8
Перед введенням дози 12	0	0	8	0	0	7
Середина періоду відновлення	0	0	8	0	0	7
Розтин після періоду відновлення	0	0	8	0	0	8

Група 2: 0 мг	Анти-rhASA-антитіла в сироватці (нг/мл)			Анти-rhASA-антитіла в СМР (нг/мл)		
	Група в сукупності			Група в сукупності		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Операція				0	0	13
Перед введенням дози 2	0	0	16	0	0	13
Перед введенням дози 4	0	0	16	0	0	11
Перед введенням дози 6	0	0	15	0	0	10
Перед введенням дози 8	0	0	15	0	0	10
Перед введенням дози 10	0	0	15	0	0	9
Перед введенням дози 12	0	0	15	0	0	9
Розтин (через 24 години після введення останньої дози)	0	0	8	0	0	5
Середина періоду відновлення	0	0	8	0	0	4
Розтин після періоду відновлення	0	0	8	0	0	8

Таблиця 35 (продовження)

Концентрація анти-rhASA-антитіл у сироватці та СМР, об'єднані дані самців і самок (нг/мл)

Група 3: 1,8 мг	Анти-rhASA-антитіла в сироватці (нг/мл)			Анти-rhASA-антитіла в СМР (нг/мл)		
	Група в сукупності			Група в сукупності		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Операція				0	0	15
Перед введенням дози 2	0	0	16	0	0	13
Перед введенням дози 4	23028	29871	16	21	72	12
Перед введенням дози 6	80769	70467	16	656	1284	9
Перед введенням дози 8	142031	93979	16	2206	3796	9
Перед введенням дози 10	341506	436656	16	4597	9386	9
Перед введенням дози 12	511938	635340	16	9916	20970	9
Розтин (через 24 години після введення останньої дози)	497588	666122	8	18145	22972	8
Середина періоду відновлення	358213	226397	8	25064	29302	5
Розтин після періоду відновлення	504013	766860	8	16499	18552	7

Група 4: 6,0 мг	Анти-rhASA-антитіла в сироватці (нг/мл)			Анти-rhASA-антитіла в СМР (нг/мл)		
	Група в сукупності			Група в сукупності		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Операція				0	0	15
Перед введенням дози 2	0	0	16	0	0	13
Перед введенням дози 4	47209	66899	16	93	170	12
Перед введенням дози 6	167721	137276	16	1269	2205	14
Перед введенням дози 8	315800	201572	16	11470	19344	9
Перед введенням дози 10	750656	682110	16	5490	8143	7
Перед введенням дози 12	1003450	868860	16	4048	6328	7
Розтин (через 24 години після введення останньої дози)	880534	857199	8	36640	45439	7
Середина періоду відновлення	1270750	938646	8	53875	42430	4
Розтин після періоду відновлення	953125	763122	8	39474	26274	7

Таблиця 35 (продовження)

Концентрація анти-rhASA-антитіл у сироватці та СМР, об'єднані дані самців і самок (нг/мл)

Група 5: 18,6 мг	Анти-rhASA-антитіла в сироватці (нг/мл)			Анти-rhASA-антитіла в СМР (нг/мл)		
	Група в сукупності			Група в сукупності		
	Середнє	СВ	n	Середнє	СВ	n
Момент часу	нг/мл	нг/мл		нг/мл	нг/мл	
Операція				0	0	13
Перед введенням дози 2	0	0	16	0	0	15
Перед введенням дози 4	48433	46054	16	55	146	13
Перед введенням дози 6	252450	224723	16	821	2204	13
Перед введенням дози 8	441119	310702	16	4757	7781	13
Перед введенням дози 10	936813	849893	16	17822	24652	13
Перед введенням дози 12	1380250	1331905	16	13531	20189	11
Розтин (через 24 години після введення останньої дози)	286150	238760	8	8652	9129	8
Середина періоду відновлення	2492875	1686472	8	51346	36819	5
Розтин після періоду відновлення	2005125	1347857	8	44258	31114	8

Таблиця 36

Частота виявлення антитіл при розтині

Група	Тварини з сироваткою, позитивною за антитілами (позитивні/всього протестовано)				Тварини зі СМР, позитивною за антитілами (позитивні/всього протестовано)			
	М		Ж		М		Ж	
	Розтин після закінчення 6 місяців	Розтин після періоду відновлення	Розтин після закінчення 6 місяців	Розтин після періоду відновлення	Розтин після закінчення 6 місяців	Розтин після періоду відновлення	Розтин після закінчення 6 місяців	Розтин після періоду відновлення
1 (DC)	НЗ	0/4	НЗ	0/4	НЗ	0/4	НЗ	0/4
2 (основа)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/3	0/4	0/2	0/4
3 (1,8 мг ІТ)	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/3	3/4	4/4
4 (6,0 мг ІТ)	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/3	2/3	4/4
5 (18,6 мг ІТ)	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4	4/4	4/4

- Межа кількісного визначення rhASA у сироватці довгохвостих макак становить 39,1 нг/мл, і у всіх пробах сироватки з груп 1 і 2 концентрації були вищими від межі кількісного визначення (МКВ), див. Таблицю 30. Рівень rhASA у сироватці визначали перед введенням доз 2, 4, 6, 8, 10 та 12 і через 24 години після введення зазначених доз (розтин після закінчення 6-місячного періоду), у середині періоду відновлення і перед розтином після періоду відновлення. Рівень rhASA у групі 3 (1,8 мг/дозу), групі 4 (6,0 мг/дозу) і групі 5 (18,6 мг/дозу) був таким, що його неможливо було визначити, перед введенням доз 2, 4, 6, 8, 10 і 12, після введення дози 12, у середині періоду відновлення та перед розтином після періоду відновлення. Після введення дози 2 рівень rhASA був дозозалежним. Після введення дози 4 (група 3), дози 6 (групи 3 і 4) і дози 8 та 10 (групи 3 і 4 та самці групи 5) рівень rhASA був таким, що його неможливо було визначити. Рівень rhASA в сироватці знижувався в групі 4 (6,0 мг/дозу) після введення дози 4 і в групі 5 (18,6 мг/дозу) після доз 4 та 6 у самців, і після введення доз 4, 6, 8 та 10 у самок. Зазначене передбачуване зниження рівня rhASA у сироватці могло бути пов'язане зі збільшенням концентрації анти-rhASA-антитіл.

Явних статевих відмінностей у рівні rhASA у сироватці виявлено не було з урахуванням варіабельності між пробами і малого числа груп у даному дослідженні.

Межа кількісного визначення rhASA у СМР довгохвостих макак становить 19,5 нг/мл, і у всіх пробах СМР із груп 1 і 2 концентрації були BQL, див. Таблицю 31. Концентрація rhASA була такою, яку можливо було визначити, в СМР перед введенням доз 2, 4, 6, 8, 10 та 12 і після введення всіх зазначених доз (розтин після закінчення 6-місячного періоду) у всіх групах, що одержували препарат. Зазначений рівень був вищим після введення доз (приблизно через 24 години після введення) і залежав від дози. Рівень rhASA у СМР був набагато вищим, ніж у сироватці. Явних статевих відмінностей у рівні rhASA у сироватці виявлено не було з урахуванням варіабельності між пробами і малого числа груп у даному дослідженні. У всіх групах, що одержували препарат, у середині періоду відновлення й перед розтином після періоду відновлення rhASA не виявлялася. Рівень rhASA у СМР при відборі під час дози 12 (розтин) у групах, що одержували rhASA, був нижчим, ніж рівень після дози 8 і 11. Можливі причини більш низького рівня rhASA при розтині включають взяття об'єму (~2,25 мл всього для визначення лейкоцитарної формули, біохімії, рівня rhASA і анти-rhASA-антитіл) при розтині, більшого, ніж об'єм, що відбирається в моменти часу прижиттєвого відбору проб (до 0,5 мл перед або після введення дози для оцінки концентрації rhASA). Крім того, у деяких тварин при розтині просвіт катетера був закритим, і проби відбирали за допомогою спинномозкової пункції, а не через катетер. У пробах, відібраних таким шляхом, визначувані концентрації rhASA були незмінно нижчими, ніж у пробах, відібраних через катетер. Імовірно, це пов'язано з обмеженням ретроградальним напрямком об'ємного потоку СМР, який, як передбачається, має місце у тварин із вертикальною орієнтацією тіла, таких як мавпи, і людей (наприклад, добре відомо, що компоненти СМР проявляють виражений ретроградальний градієнт протягом усього життя особи).

У кожної тварини, що одержувала rhASA, в який-небудь момент часу в сироватці виявлялися анти-rhASA-антитіла, див. Таблицю 32. Тварин вважали позитивними за анти-rhASA-антитілами, якщо рівень анти-rhASA-антитіл був вищим від межі кількісного визначення (78,1 нг/мл). Після того, як тварини ставали сероконвертованими, вони залишалися позитивними за анти-rhASA-антитілами. У момент часу перед введенням дози 2 жодна тварина не була позитивною за анти-rhASA-антитілами. Усі тварини, що одержували rhASA, за винятком самця № 026 (група 4; 6,0 мг/дозу), демонстрували анти-rhASA-антитіла в сироватці в момент часу перед введенням дози 4. Самець № 026 був позитивним за анти-rhASA-антитілами в сироватці в момент часу перед введенням дози 6. У групі 5 (18,6 мг/кг) у пробах, відібраних при розтині, рівень антитіл був нижчим. Зазначене передбачуване зниження може бути пов'язане з присутністю rhASA, що перешкоджає кількісному визначенню. У цілому титр був вищим у групах, що одержували високі й середні дози (6,0 і 18,6 мг/дозу), ніж у тварин, що одержували низьку дозу (1,8 мг/дозу). Присутність анти-rhASA-антитіл - результат, очікуваний на основі даних лікування довгохвостих макак рекомбінантними білками людини¹. З урахуванням варіабельності результатів, явних статевих відмінностей виявлено не було.

У всіх тварин із рівнем анти-rhASA-антитіл у СМР, який можливо було визначити, був також таким, що можливо визначити, рівень анти-rhASA-антитіл у сироватці, за винятком самок № 049 (група 3; 18,6 мг/дозу) і № 057 (група 4; 6,0 мг/дозу). Варіабельність концентрації антитіл і частота їх утворення перешкоджала визначенню залежності "доза-відповідь". Тварин вважали позитивними за анти-rhASA-антитілами, якщо рівень анти-rhASA-антитіл був вищим від межі кількісного визначення (78,1 нг/мл).

Об'єднані для самців і самок значення рівня rhASA у сироватці та СМР і рівня анти-rhASA-антитіл наведені в Таблиці 34 і Таблиці 35. Об'єднані для самців і самок результати подібні до результатів для кожної окремої статі, які обговорювалися вище.

ПРИКЛАД 17: ЕФЕКТИВНІСТЬ

У даному прикладі 11 контрольних мишей дикого типу (mASA +/- hASA -/-) розподілили до групи А, яка не одержувала препарат. Тридцять чотири (34) миші hASAC69S/ASA -/- розподілили до 5 різних груп, що одержували основу (група В) або rhASA в дозах 20 мг/кг (внутрішньовенно [BV]; група С), 0,04, 0,012 і 0,21 мг (групи D, E і F відповідно) у дні 1, 9, 15/16 і 22. Усі внутрішньовенні дози вводили до хвостової вени. Усі інтратекальні (IT) дози вводили у вигляді інфузії в об'ємі 12 мкл із приблизною швидкістю 2 мкл/20 секунд (Таблиця 37).

Таблиця 37

Схема експерименту

Група	К-сть тварин	Тип тварин	Препарат	Доза	Шлях введення	Загальна к-сть ін'єкцій	Умерт-віння	Доза в мг/кг маси головного мозку ^a
A	11	Контроль дикого типу (mASA +/- hASA -/-)	Немає	н/з	н/з	н/з	н/з	н/з
B	9	hASAC69S/ ASA -/-	Контроль із введенням основи	основа	ІТ поперековий відділ	4 (Дні 1, 9, 15/16 ^b і 22)	Через 24 години після введення четвертої дози	0
C	5		rhASA	20 мг/кг	ВВ (хвостова вена)			н/з
D	5		rhASA	0,04 мг	ІТ поперековий відділ			100
E	5		rhASA	0,12 мг	ІТ поперековий відділ			300
F	10		rhASA	0,21 мг	ІТ поперековий відділ			520

Н/з = не застосовне; ІТ = інтратекально; ВВ = внутрішньовенно.

^a Маса головного мозку у миші становить приблизно 0,0004 кг.

^b Групи C, D і E одержували препарат у день 15; групи B і E одержували препарат у день 16.

- 5 Миші з нокаутованим геном ASA-hASAC69S/ASA(-/-) - є загальноприйнятною моделлю метакроматичної лейкоцистозії, і їх широко застосовують для тестування потенційних засобів лікування зазначеного захворювання. Інтратекальний шлях введення є планованим шляхом введення у людини. Внутрішньовенний шлях введення тестували для даної сполуки та аналогічної сполуки у мишей із метакроматичною лейкоцистозією. Контрольну групу із внутрішньовенним введенням додали як позитивний контроль для оцінки гістологічних змін, очікуваних у периферичних органах. Тварини одержували 100, 300 або 520 мг/кг маси головного мозку (0,04, 0,12 або 0,21 мг відповідно) rhASA. Вибраний для даного дослідження рівень доз, нормований на масу головного мозку, відповідає дозам, які планується застосовувати у людини, або він застосовувався в токсикологічних дослідженнях чи в попередніх моделях лізосомних хвороб накопичення для оцінки ефективності. Очікується, що зазначені дози не мають якої-небудь токсичності.

- 15 Об'єкт
Вид Миша (Mm musculus)
Лінія миші hASAC69S/ASA (-/-) і контроль дикого типу
Вік після прибуття приблизно 14-17 місяців
К-сть груп 6
К-сть тварин 34 миші, нокаутні за ASA, + 11 контрольних тварин дикого типу
Після прибуття кожну тварину оглядали, оцінюючи стан її здоров'я.

- 20 Вміст
Тварин утримували групами в клітках із полікарбонату з верхом-фільтром, підстилка була виконана з паперу CareFresh, у клітках стояли флакони з водою. Кожну клітку чітко маркували з використанням таблички із вказівкою проекту, групи, номерів тварин і їхньої статі. Кожну тварину ідентифікували унікальним кодом із застосуванням системи проколювання вушної раковини.

Цільові умови навколишнього середовища в приміщенні, де утримували тварин, і світловий період були наступними:

Температура 22 °C ± 3 °C
Вологість 50 % ± 20 %
Цикл світло-темрява 12 годин світла і 12 годин темряви

Усіх наявних у розпорядженні тварин дикого типу (11) розподілили до групи А, і їм присвоїли номери від 35 до 45. Тваринам із генотипом ASA (-/-) hASA (+/-) присвоїли номери по порядку (від 1 до 34), для чого їх брали з їхніх кліток, зважували і здійснювали проколювання вушної раковини в період акліматизації. Потім тварин розподіляли до груп лікування з використанням інструмента Research Randomizer (www.randomizer.org) 3 січня 2011 р. Перші 9 номерів були присвоєні групі В, наступні 5 - групі С, наступні 5 - групі D, наступні 5 - групі Е і останні 10 номерів - групі F. Тварин розподілили до груп наступним чином:

Таблиця 38

Розподіл тварин до груп

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

^a Тварину № 19 не могли знайти під час введення препарату.

^b Тварина № 3 загинула до початку введення препарату.

Тестована речовина і основа

Тестована речовина

Найменування rhASA

Опис рекомбінантна арилсульфатаза А людини (ARSA)

Умови зберігання приблизно 4 °C

Основа

Найменування основа для rhASA (154 mM NaCl, 0,005 % полісорбат 20, pH~6,0)

Умови зберігання приблизно 4 °C

Приготування основи

Зазначену основу застосовували у встановленому порядку. Її нагрівали на поверхні робочого стола (кімнатна температура). Як тільки основа нагрівалася, речовину змішували за допомогою акуратного обертання й перевертання флаконів. Флакони не збовтували й не струшували. Перед відбором речовини флакон висушували. Будь-який залишок основи повертали до холодильника (від 1 °C до 8 °C),

Приготування лікарської форми для введення

rhASA розводили в основі з одержанням необхідної концентрації. Тестовану речовину нагрівали на поверхні робочого стола (кімнатна температура). Як тільки тестована речовина нагрівалася, її змішували за допомогою акуратного обертання й перевертання флаконів. Флакони не збовтували й не струшували.

Барвники для відстеження речовини, яку вводили:

Для відстеження речовини, яку вводили, застосовували барвник, що поглинає в інфрачервоній області (такий як IRDye®, "LI-COR Biosciences", Лінкольн, Небраска). Такі барвники широко застосовувалися при інтратекальних ін'єкціях як спосіб оцінки "виживаності" речовини після інтратекального введення. Зазначений барвник змішували з тестованою речовиною перед введенням; до тестованої речовини додавали 1 нм барвника в об'ємі 1 мл. Для відстеження речовини, яку вводили, крім барвника, що поглинає в інфрачервоній області, застосовували 1 мкл FD&C blue № 1 (0,25 %). Зазначений синій барвник є загальноприйнятою харчовою добавкою і, в цілому, вважається безпечним і нетоксичним.

ІТ-введення rhASA або основи до попереково-крижового відділу

Тваринам із груп В, D, Е і F робили інтратекальні ін'єкції в дні 1, 9, 15 або 16 і 22.

Дорослих мишей піддавали анестезії за допомогою внутрішньочеревинної ін'єкції 1,25 % 2,2,2-трибромметанолу (авертину) в концентрації 200-300 мл/10 грамів маси тіла (250-350 мг/кг).

Шерсть на спині зрізали від основи хвоста до області лопаток з використанням ножиців. Обголену область протирали тампоном зі скрабом на основі повідину/бетадину і далі - ізопропіловим спиртом. Над попереково-крижовим відділом хребта робили маленький розріз шкіри по серединній лінії (1-2 см) і знаходили місце перетину серединної лінії спини та ближчого до голови краю крил клубової кістки (одиначна клубова кістка). М'яз у клубовій ямці (середня сіднична) являє собою м'яз у формі серця. Дві сторони верхівки "серця" вказують приблизне розташування крил клубової кістки. Голку 32 калібру, приєднану до герметичного скляного шприца Гамільтона об'ємом 10-20 мкл, вводили доти, доки не виникав опір з боку кістки, що лежить нижче. Потім проводили ін'єкцію 10 мкл тестованої речовини, 1 мкл барвника, що поглинає в інфрачервоній області, та 1 мкл FD&C blue № 1 (сумарний об'єм, який вводили, 12 мкл) із приблизною швидкістю 2 мкл/20 секунд (12 мкл/2 хвилини). Розріз шкіри зашивали шляхом накладення кліпс. Успішність введення оцінювали за допомогою візуалізації, визначаючи, чи розподілився барвник, що поглинає в інфрачервоній області, а також синій барвник у ЦНС. Після візуалізації тварині давали відновитися в реабілітаційній камері.

Внутрішньовенна ін'єкція rhASA

Тваринам із групи С робили внутрішньовенні ін'єкції в дні 1,9, 15 і 22.

Для проведення BB ін'єкцій тварин піддавали анестезії з використанням ізофлурану, за необхідності, і поміщали до обмежувача. Для розширення хвостової вени, хвіст розігрівали, акуратно постукуючи по ньому пальцем. Ділянку ін'єкції протирали 70 % етанолом. Як альтернатива, тварину поміщали до теплої камери (40 °C) на 1-1,5 хвилини. Для введення тестованої речовини застосовували голку 28-30 калібру. Об'єм, який вводили, становив 5-10 мл/кг.

Приблизно через 24 години після введення четвертої дози, тварин із груп В-F піддавали евтаназії. Далі проводили різні процедури відбору тканин у тварин, як описано нижче. Тваринам із групи А ніяких препаратів не вводили; однак їх піддали евтаназії 27 або 28 січня 2011 р., і були виконані процедури відбору тканин, як описано нижче.

Сироватка (усі тварини)

Термінальну пробу крові (приблизно 0,5 мл) відбирали у всіх тварин (групи А-F) за допомогою ретроорбітальної пункції під ізофлурановою анестезією. До очної ямки вводили скляну трубку, акуратно проводили її до області за очним яблуком і тим самим порушували венозний відтік за очним яблуком. Кров збиралася завдяки капілярному ефекту і/або руху самопливом. Після відбору крові на очну ямку надавлювали, щоб припинити кровотечу.

Проби цільної крові обробляли, одержували сироватку й заморожували її при < -80 °C. Сироватку зберігали при -80 °C і аналізували на наявність антитіл.

Тканини для дослідження під світловим мікроскопом (групи А-F; 5 мишей на групу)

Після відбору крові тварин піддавали евтаназії за допомогою удушення CO₂. Перед перфузією відбирали фрагмент хвоста й заморожували його для можливого генотипування. Порожнину перикарда піддавали обробці. Трьом (3) мишам на групу проводили транскардіальну перфузію гепаринізованим фізіологічним розчином (1 Од/мл гепарину натрію в 0,9 % NaCl, після стерильної фільтрації), охолодженим на льоді, а потім 4 % параформальдегідом приблизно при 4 °C. Вилучали головний мозок і розкривали черевну порожнину для наступної роботи з внутрішніми органами. Головний мозок і тушку поміщали в параформальдегід, за винятком фрагмента хвоста, який заморожували.

Тканини для аналізу ліпідного складу (групи А, В і F; тварини 6, 4 і 5 відповідно)

Після відбору крові тварин піддавали евтаназії за допомогою удушення CO₂. Перед перфузією відбирали фрагмент хвоста й заморожували його для можливого генотипування. Порожнину перикарда піддавали обробці. Для аналізу ліпідного складу 4-6 мишам на групу проводили транскардіальну перфузію гепаринізованим фізіологічним розчином (1 Од/мл гепарину натрію в 0,9 % NaCl, після стерильної фільтрації), охолодженим на льоді.

Таблица 39

Тканини, що відбираються для аналізу ліпідного складу

Тканини, що відбираються для аналізу ліпідного складу	
Головний мозок (розділений на ліву та праву півкулю і зважений)	Нирки (2)
Спинний мозок (вилучений із хребта)	
Сідничний нерв (2) (відділений від м'язів)	Фрагмент хвоста (перед перфузією)

- При відборі тканини зважували, а потім заморожували або на сухому льоді, або поміщаючи в морозильник із температурою -80°C . Головний мозок розділяли на ліву й праву півкулю. Праву півкулю застосовували для аналізу ліпідного складу методом МС. Ліва півкуля 5 призначалася для можливого аналізу на N-ацетил-L-аспартат (NAA). Тканини зберігали при -80°C до проведення аналізу.

Таблиця 40

Умови зберігання проб

Тип проби	Температура зберігання
сироватка	заморожена приблизно при -80°C
тканини для аналізу ліпідного складу	заморожені приблизно при -80°C
фрагменти хвоста	заморожені приблизно при -80°C
тканини для світлової мікроскопії	приблизно 4°C

- rhASA знижувала накопичення сульфатидів у спинному мозку мишей із МЛД, особливо в білій речовині, Фігура 114. Морфометричний аналіз спинного мозку продемонстрував, що оптична щільність фарбування альціановим синім статистично значущо знижувалася після введення rhASA, Фігура 115. У мишей із МЛД, що одержували rhASA, також була знижена активність лізосом у головному мозку, Фігура 116. Зазначене зниження було статистично значущим у групі, що одержувала високу дозу (0,21 мг - 520 мг/кг маси головного мозку) у порівнянні з мишами, що одержували тільки основу, Фігура 117.

- Імунотолерантні миші з МЛД (hASAC69S/ASA(-/-)) старші 1 року одержували rhASA інтратекально до поперекового відділу один раз на тиждень протягом 4 тижнів (усього 4 дози). Дози включали основу (154 mM NaCl, 0,005 % полісорбату 20, pH~6,0), 0,04, 0,12, 0,21 мг/дозу (нормовані дози становили 100, 300, 520 мг/кг маси головного мозку відповідно). У термінальні моменти часу ефективність визначали за допомогою імуногістохімічної оцінки кліренсу сульфатидів і активності лізосом у головному та спинному мозку. Зрізи спинного та головного мозку офарблювали альціановим синім, який націлений на сульфатиди в тканинах. Зрізи головного мозку також офарблювали на наявність асоційованого з лізосомами мембранного білка (LAMP) як індикатора лізосомальних процесів. Крім того, на зрізах спинного та головного мозку, офарблених альціановим синім і LAMP, проводили морфометричний аналіз.

- Зазначені попередні результати демонструють ефективність інтратекального введення rhASA до поперекового відділу. У порівнянні з мишами, що одержували тільки основу, у мишей із МЛД, що одержували rhASA, були отримані підтвердження покращення на основі гістологічних маркерів захворювання, таких як скорочення накопичення сульфатидів (виявляється за фарбуванням альціановим синім), і лізосомальної активності в головному мозку. Зазначені гістопатологічні зміни спостерігалися поблизу ділянки введення (поперековий відділ спинного мозку), у дистальних відділах спинного мозку, а також у дистальних відділах головного мозку.

ПРИКЛАД 18: БІОРОЗПОДІЛ 2

- Короткий огляд

- У даному дослідженні 36 самців і 36 самок молодих довгохвостих макак (вік < 12 місяців на початку дослідження) випадковим чином розподіляли до 5 лікувальних груп, і вони одержували rhASA у дозах 0 (контроль вживлення пристрою; тварини одержували 0,6 мл ФБР), 0 (контроль із введенням основи), 1,8, 6,0 або 18,6 мг (групи 1, 2, 3, 4 і 5 відповідно) один раз на два тижні протягом 6 місяців: усього 12 доз. Усі дози вводили в формі інфузії в об'ємі 0,6 мл, після чого пристрій введення промивали 0,5 мл ФБР приблизно протягом 10 хвилин (Таблиця 41).

Схема експерименту

Група	К-сть тварин	Номинальна концентрація в дозі (мг/мол)	Доза, яку вводили (мг)	К-сть тварин, умертвлених через 6 місяців	К-сть тварин, умертвлених після місячного періоду відновлення
1	4М, 4Ж	DC	0	-	4М, 4Ж
2	8М, 8Ж	0	0	4М, 3Ж ^a	4М, 4Ж
3	8М, 8Ж	3	1.8	4М, 4Ж	4М, 4Ж
4	8М, 8Ж	10	6,0	4М, 4Ж	4М, 4Ж
5	8М, 8Ж	31	18,6	4М, 4Ж	4М, 4Ж

DC = контроль пристрою; тварини в групі 1 не одержували ні основи, ні тестованої речовини.

^a Тварина № 044 з групи контролю введення основи померла в день 50 через витік у катетері.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Відбір тканин

5 Головні мозок нарізали в спеціальному середовищі з товщиною фронтального зрізу приблизно 3 мм. З кожного головного мозку одержували повні фронтальні зрізи, що включають нову кору (включаючи кору лобових, тім'яних, скроневих і потиличних долей), прадавню кору (нюхові цибулини і/або грушоподібну долі), базальні ганглії (включаючи хвостате ядро й шкарлупу), лімбічну систему (включаючи гіпокамп і поясні звивини), таламус, гіпоталамус, 10 відділи середнього мозку (включаючи чорну речовину), мозочок, міст і довгастий мозок. Місця, звідки були отримані індивідуальні проби тканини (через біопсичний прокол 4 мм), показані на Фігурах 133-138. Зображення на Фігурах 133-138 отримані з Університету Вісконсину та Мічиганської Державної Порівняльної Колекції Мозку Ссавців (також називаної Національним музеєм здоров'я та медицини). Зразок із проколу № 22 не відбирали, оскільки даної структури 15 не було під час розтину. Усі проби тканин головного мозку заморожували і зберігали при -60 °C або нижче до проведення аналізу на rhASA з використанням твердофазного імуноферментного аналізу.

Перший зріз головного мозку і далі кожний наступний зріз фіксували в формаліні для гістопатологічної оцінки й імуногістохімічного аналізу. Другий зріз головного мозку й кожний 20 наступний другий зріз заморожували для аналізу тестованої речовини. Перед заморожуванням проби тканин головного мозку для аналізу біорозподілу брали з правої частини зрізів головного мозку для аналізу тестованої речовини під парними номерами. Локалізацію проб головного мозку фотографували при розтині й записували номери зрізів головного мозку. Проби відбиралися або через 4 мм круговий прокол, або через розріз, виконаний скальпелем, щоб 25 оптимізувати кількість білої речовини, яку відбирали. Усі біопсичні зразки заморожували при -60 °C або нижче для проведення аналізу тестованої речовини. Залишок зрізу головного мозку заморожували і зберігали при -60 °C або нижче для можливого проведення аналізу тестованої речовини.

30 Зі спинного мозку (шийний, грудний і поперековий відділи) виготовляли зрізи товщиною один сантиметр. Перший зріз і кожний наступний зріз фіксували в формаліні для гістопатологічної оцінки й імуногістохімічного аналізу. Другий зріз спинного мозку й кожний наступний другий зріз заморожували і зберігали при -60 °C або нижче для аналізу тестованої речовини. Розподіл зрізів коректували так, щоб зріз із кінчиком інтратекального катетера (зріз 0) можна було фіксувати в формаліні й піддавати гістопатологічному аналізу.

35 Приготування екстрактів головного мозку, печінки п стінного мозку та визначення концентрації rhASA

40 Біопсичні зразки головного мозку, проби спинного мозку й печінки аналізували з використанням способу, що пройшов валідацію відповідно до принципів Належної лабораторної практики (GLP) Управління з контролю харчових продуктів і лікарських препаратів США (FDA) 21 CFR, Частина 58 та відповідно до застосовних Стандартних операційних процедур біологічних досліджень на Середньому Заході. Проби тканини гомогенізували в лізуючому буфері, центрифугували для видалення уламків тканин і зберігали при -80 °C до проведення аналізу. Концентрацію rhASA у розчинних фракціях гомогенатів визначали з використанням ELISA із застосуванням поліклонального антитіла кролика SH040 як іммобілізованого антитіла і

кон'югованого з ПХ (пероксидазою хрину) моноклонального анти-ASA-антитіла 19-16-3 як детекторного антитіла. Після етапу відмивання, спрямованого на видалення речовини, що не зв'язалася, розчин субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) реагував із пероксидазою в присутності ПХ-кон'югованого антитіла, формуючи колориметричний сигнал, який був пропорціональним кількості rhASA, зв'язаній анти-ASA-антитілом на першому етапі. Підсумкову кількість rhASA у гомогенаті кожної тканини обчислювали шляхом інтерполяції стандартної кривої.

Проби також аналізували з використанням способу визначення білків за участю біцинхонінової кислоти (BCA), щоб дізнатися концентрацію білка в пробі. Концентрацію білка в кожній пробі визначали шляхом інтерполяції стандартної кривої для альбуміну. Потім результати визначення концентрації rhASA нормували на загальний вміст білка в екстрактах тканини, який визначили за допомогою способу за участю біцинхонінової кислоти.

Рівень rhASA у всіх біопсичних зразках для груп, що одержували основу, 1,8мг/дозу, 6,0 мг/дозу і 18,6 мг/дозу, показаний на Фігурі 118, Фігурі 119, Фігурі 120 і Фігурі 121 відповідно. Рівень rhASA у всіх біопсичних зразках у тварин, що пройшли період відновлення з груп контролю введення пристрою, основи, 1,8 мг/дозу, 6,0 мг/дозу і 18,6 мг/дозу, показаний на Фігурі 122, Фігурі 123, Фігурі 124, Фігурі 125 і Фігурі 126 відповідно.

Рівень rhASA у вибраних біопсичних зразках, які відбирали поблизу поверхні (оболонки мозку) головного мозку показаний на Фігурі 127. Рівень rhASA у вибраних біопсичних зразках, які, як припускається, повинні містити в основному глибокі шари білої речовини головного мозку, показаний на Фігурі 128. Біла речовина складається з пучків мієлінізованих нервових клітин (або аксонів). Вибрані пучки, які містять в основному глибокі шари білої речовини головного мозку, показані на Фігурі 129. Сіра речовина містить тіла нервових клітин, на відміну від білої речовини. Значення концентрації rhASA у вибраних біопсичних зразках з поверхні, з глибоких шарів білої речовини і глибоких шарів сірої речовини для кожної групи показані на Фігурі 130.

Дані про концентрацію в спинному мозку наведені на Фігурі 131.

Дані про концентрацію в печінці наведені на Фігурі 132.

У деяких випадках рівень rhASA в печінці, спинному й головному мозку групи контролю пристрою та контрольної групи, що одержує основу, був таким, що його можливо було визначити. Рівень у печінці й спинному мозку був нижчим, ніж у кожній із груп, що одержували rhASA. Рівень rhASA у групі контролю пристрою та контрольній групі, що одержує основу, відображає перехресну реактивність між анти-rhASA-антитілом, яке застосовується в ELISA, з нативним білком довгохвостих макак. Наведені значення в тканинах групи контролю пристрою та контрольної групи, що одержує основу, не відображають кількісних показників rhASA в тканинах довгохвостих макак, оскільки ступінь перехресної реактивності між антитілом і rhASA довгохвостих макак невідомий і у зв'язку з тим фактом, що в стандартах аналізу застосовується rhASA. Однак коливання рівня rhASA, які виявляються між тканинами групи контролю пристрою та контрольної групи, що одержує основу, можна інтерпретувати як демонстровану варіабельність відносних кількостей rhASA у довгохвостих макак у різних тканинах і анатомічних відділах.

Рівень rhASA в зрізах спинного мозку варіював у діапазоні 160-2352, 1081-6607 і 1893-9252 нг/мг білка у самців та в діапазоні 0-3151, 669-6637 і 1404-16424 нг/мг у самок із груп, що одержували 1,8, 6,0 і 18,6мг/дозу відповідно (Фігура 127). Рівень rhASA був вищим у поперековому відділі спинного мозку, ніж у шийному відділі. Рівень білка rhASA, який визначався в печінці, у групах, що одержували rhASA, залежав від дози й був дуже низьким у групі, що одержувала основу. Середній рівень rhASA становив 88, 674 і 2424 у самців та 140, 462 і 1996 нг/мг білка у самок для груп, що одержували 1,8, 6,0 і 18,6 мг/дозу відповідно (Фігура 128).

У цілому, представляється, що рівень rhASA залежить від дози в пробах, приготовлених зі зрізів спинного мозку й печінки тварин із груп, що одержували rhASA. У багатьох із тестованих відділів спинного мозку була продемонстрована залежність рівня rhASA від дози, яку вводили, хоча в інших відділах залежність від дози була менш визначеною. У цілому, рівень rhASA в головному мозку підвищувався зі збільшенням дози rhASA.

ПРИКЛАД 19: ФАРМАКОКІНЕТИКА (ФК) І БІОРОЗПОДІЛ rhASA. ПОРІВНЯННЯ ІТ ТА ВВ ВВЕДЕННЯ

Мета даного дослідження полягала в оцінці фармакокінетики (ФК) і біорозподілу різних ферментів для замісної ферментної терапії після інтратекального (ІТ) та внутрішньовенного (ВВ) введення довгохвостим макакам.

У даному дослідженні всього дванадцять самців і самок довгохвостих макак із інтратекальним катетером у поперековому відділі (ІТ-П) випадковим чином розподіляли в

залежності від маси тіла до чотирьох лікувальних груп для Фази 1a (введення I2S) і Фази 1b (введення rhASA).

У обох фазах проби крові та СМР (з ІТ-П катетера) відбирали через задані інтервали часу після введення препарату. Після відбору останніх проб у Фазі 1a тварин залишали на 7-денний період відмивання, після чого починали Фазу 1b.

Після відбору останніх проб у Фазі 1b тварин залишали на 7-денний період відмивання, після чого починали Фазу 2. Усього 12 самців і самок довгохвостих макак із Фази 1b випадковим чином розподіляли в залежності від маси тіла до дванадцяти лікувальних груп для одержання I2S (групи 1a-6a) і rhASA (групи 1b-6b).

Абсолютна біодоступність rhASA у сироватці після ІТ-П введення склала -30-40 %. На відміну від цього, при ВВ введенні біодоступними в СМР були лише 0,5 % від введеної дози.

Вплив rhASA у сироватці після ІТ-П введення збільшувався більше, ніж пропорційно дозі.

Після ІТ-П введення вплив rhASA у СМР при збільшенні дози зростав менше, ніж пропорційно дозі.

Таблиця 42

Підсумкові ФК показники rhASA у сироватці довгохвостих макак

Середнє (КВ %)	Арилсульфатаза А у сироватці			
	Арилсульфатаза А (Фаза1b:ВВ 1 мг/кг)	Арилсульфатаза А (Фаза 1b: ІТ-П 1,8 мг)	Арилсульфатаза А (Фаза1b: ІТ-П 6 мг)	Арилсульфатаза А (Фаза 1b: ІТ-П 18,6 мг)
N	8	6	8	8
AUC _{0-t} , (нг•год/мл)	10505 (16,9)	2219 (41,9)	10352 (31,9)	17583 (28,2)
AUC _{0-∞} , (нг•год./мл)	11069 (17,2)	НВ (НВ)b	9634 (28,9)c	20789 (27,8)d
C _{max} (нг/мл)	11911 (20,0)	363 (40,4)	1160 (29,9)	1621 (25,1)
T _{max} (год.)	0,08 (0,08, 0,08)	4,00 (2,00, 4,00)	4,00 (1,00, 4,00)	3,00 (1,00, 4,00)
t _{1/2} (год.)	6,55 (31,8)	НВ (НВ)b	6,77 (21,4)c	7,40 (32,8)d
CL або CL/F (мл/год.)	261 (17,0)	НВ (НВ)b	654 (25,0)c	944 (25,4)d
V _z або V _z /F (мл)	2418 (32,4)	НВ (НВ)b	6523 (41,3)c	9686 (25,8)d

Таблиця 43

Підсумкові ФК показники rhASA у СМР довгохвостих макак

Середнє (КВ %)	Арилсульфатаза А у СМР			
	Арилсульфатаза А (Фаза1b:ВВ 1 мг/кг)	Арилсульфатаза А (Фаза 1b: ІТ-П 1,8 мг)	Арилсульфатаза А (Фаза1b: ІТ-П 6 мг)	Арилсульфатаза А (Фаза 1b: ІТ-П 18,6 мг)
N	4	6	8	8
AUC _{0-t} , (нг•год/мл)	1629 (179,8)	1267266 (86,6)	5334329 (68,8)	8028775 (71,2)
AUC _{0-∞} , (нг•год./мл)	8221 (НВ)b	1595942 (79,1)c	4291829 (84,2)d	9406664 (64,5)e
C _{max} (нг/мл)	69,3 (94,2)	345167 (48,7)	1039079 (73,6)	1841125 (62,8)
T _{max} (год.)	6,00 (1,00,8,00)	0,08 (0,08, 4,00)	0,29 (0,08, 4,00)	2,04 (0,08, 4,00)
t _{1/2} (год.)	37,6 (НВ)b	23,6 (68,3)c	17,1 (31,3)d	13,4 (29,3)e
CL або CL/F (мл/год.)	392 (НВ)b	1,95(74,1)c	38,1 (214,8)d*	3,04 (66,1)e
V _z або V _z /F (мл)	21237 (НВ)b	80,6 (110,4)c	1090 (215,1)d	67,6 (81,2)e

Таблиця 44

Біодоступність rhASA у сироватці та СМР

Порівняння абсолютної біодоступності			
	Арилсульфатаза А (Фаза 1b: ІТ-П 1,8 мг)	Арилсульфатаза А (Фаза 1b: ІТ-П 6 мг)	Арилсульфатаза А (Фаза 1b: ІТ-П 18,6 мг)
Fabs (%)	НВ	39,9	27,3

Біодоступність rhASA у сироватці після ІТ-П введення складала - 30-40 %. На відміну від цього, при ВВ введенні біодоступними в СМР були лише 0,5 % від введеної дози.

Таблиця 45

Розподіл СМР: сироватка

Розподіл СМР: сироватка			
Арилсульфатаза А (Фаза 1b: ВВ 1 мг/кг)	Арилсульфатаза А (Фаза 1b: ІТ-П 1,8 мг)	Арилсульфатаза А (Фаза 1b: ІТ-П 6 мг)	Арилсульфатаза А (Фаза1b: ІТ-П 18,6 мг)
0,74	НВ	445	452

5 ПРИКЛАД 20: ЛІКУВАННЯ ПАЦІЄНТІВ ІЗ МЛД

Пряме введення до ЦНС, наприклад, за допомогою ІТ доставки, можна застосовувати для ефективного лікування пацієнтів із МЛД. Даний приклад ілюструє багатоцентрове дослідження зі збільшенням дози, спрямоване на оцінку безпеки 3 рівнів доз rhASA, що вводяться один раз на два тижні (р/2 тижн.) протягом 40 тижнів через пристрій інтратекальної доставки лікарських засобів (ПІДЛЗ) пацієнтам із інфантильною формою МЛД. Різні варіанти пристроїв інтратекальної доставки лікарських засобів, які застосовуються для лікування людей, показані на Фігурі 94, Фігурі 95, Фігурі 96 і Фігурі 97.

Усього в дослідження було включено до 20 пацієнтів:

Група 1: 5 пацієнтів (мінімальна доза).

Група 2: 5 пацієнтів (середня доза).

Група 3: 5 пацієнтів (максимальна доза).

5 пацієнтів були рандомізовані до групи, що не одержує препарату.

Для участі в дослідженні пацієнтів відбирали на основі наступних критеріїв включення: (1) наявність перших симптомів до настання віку 30 місяців; (2) ходячий стан на момент скринінгу (визначається як здатність самостійно вставати й проходити вперед 10 кроків (при підтримці за одну руку)); (3) наявність неврологічних ознак у момент скринінгу. Зазвичай пацієнтів із трансплантацією гемопоетичних стовбурних клітин в анамнезі виключають.

Визначають безпеку доз rhASA, що збільшуються, які вводили шляхом ІТ ін'єкцій, протягом 40 тижнів дітям із пізнім початком інфантильної форми МЛД. Крім того, оцінюють клінічну активність rhASA відносно загальної моторики, а також фармакокінетику однократних і багаторазових доз препарату в сироватці та концентрації в спинномозковій рідині (СМР).

Приклади ІТ доставки HNS

ПРИКЛАД 21: ХРОНІЧНЕ ІНТРАТЕКАЛЬНЕ ВВЕДЕННЯ ГЕПАРАН-N-СУЛЬФАТАЗИ

У даному прикладі продемонстровано, що інтратекальне введення можна застосовувати для ефективного доставки лізосомального ферменту, такого як рекомбінантна гепаран-N-сульфатаза людини (rhHNS), до тканин головного мозку для боротьби з неврологічними симптомами мукополісахаридозу IIIA (МПС IIIA; синдром Санфіліппо типу А), які є визначальною особливістю даного розладу. Експерименти, описані в даному прикладі, демонструють, що хронічне ІТ-введення rhHNS добре переносилося і призводило до дозозалежної активності ферменту в головному, спинному мозку та печінці.

Якщо коротко, лікарська форма рекомбінантної гепаран-N-сульфатази людини (rhHNS) для інтратекального (ІТ) введення була розроблена для лікування неврологічних симптомів мукополісахаридозу IIIA (МПС IIIA; синдром Санфіліппо типу А), які є визначальною особливістю даного розладу. Оскільки середній вік пацієнтів із МПС IIIA становить 4,5 роки, базові токсикологічні дослідження застосування HNS проводили на молодих довгохвостих макаках із метою оцінки впливу на головний мозок, що розвивається. Мавпам вживляли інтратекальний (ІТ) пристрій введення лікарських засобів до поперекового відділу і проводили через нього короткострокові інфузії один раз на два тижні (1,5, 4,5 або 8,3 мг/дозу HNS протягом 6 місяців; 12 доз), а контроль введення пристрою та контроль із введенням основи одержував фосфатно-сольовий буфер або основу відповідно. По вісім тварин із кожної групи піддавали розтину через 3 і 6 місяців (групу контролю введення пристрою піддавали розтину через 3 місяці), а 8 тварин із групи контролю і з трьох груп різних доз HNS піддавали розтину через 1 місяць після введення останньої ІТ дози. Ніяких пов'язаних із HNS клінічних ознак або яскраво виражених уражень центральної нервової системи не спостерігалось. У порівнянні з контрольними групами в оболонках мозку/пери неврїї, що оточує головний/спинний мозок, виявлялися клітинні інфільтрати малої або мінімальної тяжкості, які корелювали з тимчасовим збільшенням числа лейкоцитів, переважно еозинофілів, у спинномозковій рідині (СМР), які в основному

врегулювалися через 1 місяць після введення дози. Зазначені зміни не були асоційовані з якими-небудь небажаними морфологічними змінами в головному або спинному мозку. Очевидно, мала місце тенденція до більш високого рівня HNS у СМР і більш високого рівня активності HNS у тканинах головного, спинного мозку та печінки. Рівнем відсутності спостережуваних небажаних ефектів був рівень 8,3 мг/дозу, який вводили один раз на два тижні, тобто максимальна доза, яку вводили, що вказує на те, що HNS можна безпечно вводити інтратекально в різних концентраціях, включаючи концентрації вище 8,3 мг/дозу.

Синдром Санфіліппо типу А

Мукополісахаридоз типу IIIA (МПС IIIA; синдром Санфіліппо типу А), рідкісна лізосомна хвороба накопичення, яка уражає людей у всьому світі з частотою 1:100000 і яка розвивається внаслідок відсутності або недостатньої функції гепаран-N-сульфатази (HNS) (Neufeld EF, et al. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (2001) pp. 3421-3452) - екзосульфатази, що бере участь у лізосомальному катаболізмі глікозаміноглікан (ГАГ)-гепаран-сульфату. При відсутності зазначеного ферменту, ГАГ-гепаран-сульфат накопичується в лізосомах нейронів і клітин глії, а за межами головного мозку накопичення відбувається менш інтенсивно. Визначальною клінічною ознакою зазначеного розладу є дегенерація центральної нервової системи (ЦНС), яка призводить до випадання або неможливості досягнення основних етапів розумового й фізичного розвитку. Прогресивне зниження когнітивної здатності у підсумку призводить до деменції та ранньої смертності.

ІТ доставка rhHNS

Оскільки середній вік пацієнтів із МПС IIIA становить 4,5 роки, базові токсикологічні дослідження застосування HNS проводили на молодих довгохвостих макаках (вибір виду, оснований на генетичній і анатомічній подібності з людиною) з метою оцінки впливу на головний мозок, що розвивається. Еквівалентність віку мавп і людини згідно з літературними даними варіює в діапазоні від 7,6 до 12,1 місяців у мавп, що прирівнюються до віку 30-40 місяців у дітей (Hood RD, Developmental and Reproductive Toxicology: A practical approach (2006) p. 276). Як складову частину вирішення зазначеного завдання проводили 6-місячне токсикологічне дослідження на молодих довгохвостих макаках, у якому оцінювали ІТ-введення до поперекового відділу хребта. При виборі рівня доз і дизайну 6-місячного дослідження багаторазових доз на довгохвостих макаках керувалися даними, отриманими в попередньому 1-місячному дослідженні токсичності на довгохвостих макаках. Наскільки нам відомо, дане дослідження є першим дослідженням із хронічним ІТ-введенням засобів ЗФТ приматам молодого віку, відмінним від людини.

У даному дослідженні застосовували 56 самців і 56 самок молодих довгохвостих макак (*Macaca fascicularis*) у віці приблизно від 6 до 9 місяців із приблизною масою від 0,82 до 1,81 кг. Як харчування мавпи щодня одержували по 15 брикетів сертифікованого РМІ корму для приматів 5048 (Річмонд, Індіана). Воду подавали в будь-якій кількості через автоматичну систему фільтрації води, але подачу води припиняли в періоди відбору проб сечі. Мавп після прибуття розміщали по групах (по дві в клітці) на період 2-4 тижні в клітках із нержавіючої сталі, за винятком 3-місячних мавп; зазначених мавп розміщали по одній у клітках із нержавіючої сталі. Протягом усього дослідження всіх мавп розміщали по одній у клітках із нержавіючої сталі у кімнатах із контрольованою температурою та вологістю при світловому періоді 12 годин світла: 12 годин темряви.

Перед початком дослідження всім мавпам хірургічним шляхом імплантували підшкірний (ПШ) порт та ІТ катетери. Перед операцією вводили преднізолон натрію сукцинат (ВВ, 30 мг/кг) і флуніксин меглюмін (внутрішньом'язово [ВМ], 2 мг/кг). Мавп попередньо готували, вводячи ПШ атропіну сульфат (90,04 мг/кг), проводили седацію ВМ кетаміном гідрохлоридом (8 мг/кг), інтубували й забезпечували подачу кисню приблизно 1 л/хв і 2,0 % ізофлурану. Над задніми відростками поперекових хребців (L₄, L₅ або L₆) робили розріз і проводили геміламінектомію для введення поліуретанового катетера, що звужується (довжина 25 см, зовнішній діаметр 0,9 мм x внутрішній діаметр 0,5 мм, із шістьма бічними отворами діаметром 0,33 мм), на рівні L₃, L₄ або L₅. Через маленький дуральний отвір вводили катетер і просували його приблизно на 10 см уперед до області з'єднання поперекового і грудного відділу. ПШ порт із титану з'єднували з ІТ катетером і вводили до тканин підшкірно. Правильне розташування катетера підтверджували за допомогою мієлограми, отриманої з використанням Isovue-300 (0,8 мл; "Bracco Diagnostics, Inc.", Принстон, Нью-Джерсі). Після відновлення після операції мавпи одержували буторфанол тартрат (ВМ, 0,05 мг/кг) і цефтіофур натрію (ВМ, 5,0 мг/кг два рази на день протягом 2 днів).

У даному прикладі HNS вводили в основі для ІТ-введення, яка включає 5 мМ фосфату натрію, 145 мМ хлориду натрію і 0,005 % полісорбату 20 (pH 7,0). Дози HNS вводили один раз на два тижні в формі короткострокової інфузії, яка триває приблизно одинадцять хвилин: 0,6 мл

(4 хвилини) і наступне промивання 0,5 мл фосфатно-сольовим буфером (ФБР) (7 хвилин). Мавпи в групі контролю основи одержували тільки основу для ІТ-введення ; мавпи DC одержували ІТ ФБР (рН 7,2).

Захворюваність і смертність

Не було жодного випадку летального результату або раннього умертвіння, пов'язаного з HNS. При введенні препарату або під час щоденних спостережень не було виявлено ніяких пов'язаних із HNS клінічних ознак. Ненормальне положення, сверблячка шкіри, тремор і атаксія, які спостерігалися під час і після введення, зникали протягом від декількох хвилин до 4 годин після введення та розглядалися як реакція на об'єм, а не як реакція на HNS або основу. Клінічні ознаки, які спостерігалися під час введення препарату й безпосередньо після нього, мали порівнянну частоту в контрольних групах (DC і/або група, що одержувала основу); вказівок на залежність "доза-відповідь" не було. У цілому, частота клінічних ознак при введенні препарату знижувалася при введенні кожної наступної дози. Не виникало пов'язаних із HNS змін маси тіла, споживання їжі, а також фізікальних і неврологічних ознак або змін ЕКГ чи даних офтальмологічного дослідження.

Клінічна патологія

У жоден із інтервалів не виникало змін гематології, біохімії крові, згортання крові або показників аналізу сечі, оцінюваних як такі, що пов'язані з HNS.

Кількість клітин і біохімія СМР

Через 24 години після введення препарату у всіх групах, включаючи DC (контроль дози) і 0 мг/кг, відбувалося дозозалежне збільшення середньої кількості лейкоцитів у СМР. Відбувалося загальне збільшення кількості лейкоцитів при кожній дозі, яку вводили. Відбір СМР приблизно у половини мавп перед введенням препарату показав, що зазначені ефекти зменшувалися за два тижні з моменту введення попередньої дози. Після введення дози 5, крім збільшення кількості лейкоцитів, спостерігався більш високий середньогруповий рівень білка й альбуміну в СМР у самців, що одержували 4,5 і 8,3 мг/дозу (до 4-5-кратного збільшення), в порівнянні з середнім значенням до введення препарату ($P \leq 0,05$ у порівнянні з DC і 0 мг/кг); у самок у групах, що одержували HNS, виявлялася менш виражена тенденція.

Аналіз концентрацій HNS і антитіл до нього

Зазвичай середній рівень HNS у сироватці у всіх групах дослідження в усі моменти часу був нижчим від межі визначення (МВ). Концентрація HNS у СМР мавп в DC і групі контролю основи зазвичай була нижчою від межі кількісного визначення (МКВ). Хоча статистичного аналізу не проводили, очевидно мала місце тенденція до залежності від дози у бік більш високих середніх рівнів HNS у СМР груп, що одержували 1,5, 4,5 і 8,3 мг/дозу. Середній рівень HNS у СМР перед введенням препарату був значно нижчим, ніж рівень HNS у СМР після його введення. Середні концентрації HNS в 6-місячній групі (обидві статі) наприкінці дослідження (основний розтин і розтин після періоду відновлення) наведені в Таблиці 46. При даному рівні доз, концентрації HNS у СМР, очевидно, зберігаються в тому ж діапазоні (Фігура 146A), незважаючи на рівень анти-HNS антитіл у сироватці та СМР, який продовжує рости протягом усього дослідження.

Таблиця 46

Концентрації HNS у СМР наприкінці дослідження (основний розтин і розтин після періоду відновлення)

Група	Основний розтин		Розтин після періоду відновлення	
	n	Середнє $\pm$ СВ ^a (нг/мл)	n	Середнє $\pm$ СВ (нг/мл)
Основа	8	-	8	НП
1,5 мг ІТ	8	516366 $\pm$ 1024084	8	НП
4,5 мг ІТ	7	377460 $\pm$ 304996	7	НП
8,3 мг ІТ	8	419492 $\pm$ 345975	8	НП

СМР, спинномозкова рідина; HNS, гепаран-N-сульфатаза людини; n = кількість проб з рівнем, вищим від МКВ; ІТ, інтратекально; СВ, стандартне відхилення. ^a проби, відібрані приблизно через 24 години після введення препарату. НП = немає проб, застосованих для аналізу, або проби з рівнем, нижчим від МКВ.

У 6-місячній групі/групі, що пройшла період відновлення, у жоден із моментів часу у жодної мавпи з групи контролю пристрою (тільки ФБР) або з групи, що одержувала тільки основу, не утворювалося анти-HNS антитіл у сироватці або СМР. Проби сироватки та СМР, відібрані у всіх

мавп із груп, що одержували 1,5, 4,5 і 8,3 мг/дозу перед дослідженням (для СМР) і перед введенням дози 2, були негативними (< МКВ) відносно анти-HNS-антитіл. До кінця дослідження проби сироватки всіх мавп були позитивними відносно анти-HNS-антитіл.

5 Проби СМР усіх мавп із груп, що одержували 1,5 і 8,3 мг/дозу, і шести мавп із групи, що одержувала 4,5 мг/дозу, були позитивними відносно анти-HNS антитіл в один або більше моментів часу. Оскільки у двох мавп із групи, що одержувала 4,5 мг/дозу, пробу не відбирали ні в один із моментів часу, включаючи розтин, зазначені результати, очевидно, вказують на те, що у всіх мавп, що одержували HNS, формувалася гуморальна імунна відповідь.

10 При всіх трьох рівнях доз концентрацію анти-HNS антитіл у сироватці визначали після дози 2, і після введення дози 4 рівень значно підвищувався. Хоча статистичного аналізу не проводили, очевидно, мала місце тенденція до залежності від дози убік більш високої концентрації анти-HNS антитіл; до кінця дослідження рівень антитіл був порівняним у всіх 3 групах, що одержували HNS (Фігура 146B). Рівень анти-HNS антитіл у сироватці завжди був вищим, ніж у СМР, протягом усього дослідження (від 9 до 236-кратного перевищення

15 концентрації антитіл у сироватці над концентрацією в СМР); максимальне відношення концентрацій у сироватці/СМР (98 і 236 разів) спостерігалось при рівні дози 8,3 мг на ранній стадії введення препарату (6 і 10 тижнів).

20 Концентрація анти-HNS антитіл у сироватці збільшувалася в 9, 16 і 16 разів при дозах 1,5 мг, 4,5 мг і 8,3 мг відповідно у початковий період введення препарату (від 6 до 14 тижнів). Протягом того ж періоду концентрація антитіл у СМР збільшувалася в 30, 41 і 52 рази при дозах 1,5 мг, 4,5 мг і 8,3 мг відповідно (Фігура 146B); після місячного періоду відновлення суттєвий рівень залишався (Таблиця 47).

Таблиця 47

Концентрація анти-HNS антитіл у СМР при закінченні дослідження (основний розтин і розтин після періоду відновлення)

Група	Основний розтин ^a		Розтин після періоду відновлення	
	п	Середнє ± СВ (нг/мл)	п	Середнє ± СВ (нг/мл)
Основа	8	-	8	-
1,5 мг ІТ	8	351456 ± 244171	8	299512 ± 226654
4,5 мг ІТ	7	147187 ± 213095	7	193045 ± 157896
8,3 мг ІТ	8	185227 ± 315858	8	238727 ± 185785

СМР, спинномозкова рідина; HNS, геперан-N-сульфатаза людини; ІТ, інтратекально; п, кількість проб з рівнем, вищим від МКВ; СВ, стандартне відхилення. ^a Проби, відібрані приблизно за 1 тиждень до введення препарату.

25 У СМР анти-HNS-антитіла з'являлися пізніше, ніж у сироватці (Фігура 146C). Ніяких явних дозозалежних відмінностей у концентрації антитіл у сироватці або СМР не спостерігалось (статистичний аналіз не проводився через маленький розмір вибірки); помітних відмінностей у гуморальній відповіді між самцями й самками не було.

30 У присутності анти-HNS антитіла в СМР середні концентрації HNS у СМР, очевидно, зберігалися, що вказує на те, що присутність анти-HNS антитіл у сироватці та СМР не змінює рівень концентрацій HNS, яку вводили ІТ. Аналіз 6-місячної групи/групи, яка пройшла період відновлення, з 6-місячним періодом введення препарату, показує, що концентрація анти-HNS антитіл у проміжний період через 3 місяці та в групі, умертвленій через 6 місяців, була порівнянною (Фігура 146C).

35 Макроскопічні й гістопатологічні ознаки

40 При всіх рівнях доз (але не для всіх інтервалів умертвіння, незалежно від статі, не дозозалежно) в паренхімі головного мозку (переважно в сірій речовині), спинного мозку (у сірій і білій речовині), задніх корінцях/гангліях спинномозкових нервів (тільки у самців, що одержували середню дозу) були присутніми еозинофільні інфільтрати (Фігура 147A, Фігура 147B-D). Зазначені інфільтрати інтерпретували як вторинні відносно інфільтратів у оболонках мозку/периневрії і/або відносно присутності (проникнення) HNS до паренхіми зазначеної тканини. Хоча мали місце численні зміни запального типу, очевидно, мавпи переносили введення HNS, і припускається, що зазначені інфільтрати не були пов'язані з і не викликали

45 ознак некрозу/дегенерації нейронів та реакції на введення HNS з боку глії.

Мікрогліоз у сірій речовині головного та спинного мозку в комбінації з клітинними інфільтратами, переважно еозинофільними, були відносно частим явищем у раніше проведеному 1-місячному дослідженні токсичності у молодих довгохвостих макак; зазначені зміни були відносно рідкісними під час проміжного вмертвіння через 3 місяці в 6-місячному дослідженні, але залишкові ознаки такої реакції могли ще спостерігатися в групі, умертвленій через 6 місяців (Фігура 147F). Реакції з боку мікроглії зазвичай виникали відносно рано у відповідь на центральне введення (або введення з центральною реакцією) деяких тестованих речовин (зазвичай на основі білків). Еозинофільні інфільтрати дійсно корелювали з підвищеною кількістю еозинофілів у СМР мавп, що одержували HNS, хоча зазначені клітини не були присутніми в такій кількості, яка могла б викликати небажану реакцію.

При всіх рівнях доз у більшості груп, що одержували HNS, незалежно від статі, у задніх корінцях/гангліях спинномозкових нервів були присутніми еозинофільні інфільтрати. Зазначені інфільтрати в різних тканинах нервової системи інтерпретували як вторинні відносно інфільтратів у оболонках мозку/периневрії і/або відносно присутності (проникнення) HNS до паренхіми зазначеної тканини. У мавп, умертвлених після періоду відновлення, пов'язані з HNS ефекти зазвичай або були відсутніми, або знижувалися до контрольного рівня. Деякі зміни, такі як мікрогліоз у спинному мозку, після періоду відновлення повністю врегульовувалися. Очевидно, жодна з пов'язаних із HNS змін не була асоційована з якими-небудь небажаними структурними мікроскопічними змінами в головному або спинному мозку. Ні в спинному, ні в головному мозку, ні в гангліях не відмічалася некрозу нейронів.

Активність ферменту HNS

У 6-місячній групі/групі, що пройшла період відновлення, активність ферменту HNS у спинному і головному мозку групи, що одержувала тільки основу (0,0-0,154 нмоль/год/мг білка), була подібною до рівня активності, показаного в тканинах групи, умертвленої через 3 місяці (проміжний аналіз) (0,0-0,154 нмоль/год/мг білка). Рівень активності ферменту був вищим у спинному мозку (в поперековому відділі приблизно на порядок вищий), ніж рівень, який визначався в головному мозку або печінці, у групах, що одержували 4,5 мг і 8,3 мг/дозу, які демонстрували подібні між собою рівні. Активність ферменту HNS у зрізах спинного мозку варіювала в діапазоні 3,9-18,6; 13,1-67,1 і 3,6-69,2 нмоль/год/мг білка у самців (Фігура 148A) та 1,8-16,2; 4,5-61,2 і 21,1-66,0 нмоль/год/мг білка у самок (Фігура 148B) для груп, що одержували 1,5, 4,5 і 8,3 мг/дозу відповідно. У тканинах спинного мозку після місячного періоду відновлення рівень активності ферменту повертався до рівня, який узгоджується зі значеннями, отриманими для контролю, що одержував тільки основу.

Активність ферменту HNS у зрізах головного мозку варіювала в діапазоні 0,03-16,0; 0,30-55,7 і 0,15-21,2 нмоль/год/мг білка у самців (Фігура 148C) та 0,04-5,1; 0,0-14,4 і 0,9-33,2 нмоль/год/мг білка у самок (Фігура 148D) для груп, що одержували 1,5, 4,5 і 8,3 мг/дозу відповідно. У тканинах головного мозку після періоду відновлення рівень активності ферменту повертався до рівня, який узгоджується з контрольними значеннями.

Кратність змін активності для різних областей головного мозку в порівнянні з ендегенним рівнем (група DC) показана на Фігурі 149A. Хоча в поверхневих пробах була відмічена тенденція до підвищеного розподілу, можна показати, що HNS, яку вводили ІТ до поперекового відділу, проникала до перивентрикулярних областей головного мозку.

У 6-місячній групі/групі, що пройшла період відновлення, середній рівень активності ферменту в печінці склав 0,50; 2,41 і 6,65 нмоль/год/мг білка у самців та 1,04; 4,15 і 7,62 нмоль/год/мг білка у самок із груп, що одержували 1,5, 4,5 і 8,3 мг/дозу відповідно (Фігура 149B). Рівень у мавп із контрольної групи, що одержувала тільки основу, склав 0,089 нмоль/год/мг білка у самців і 0,083 нмоль/год/мг білка у самок. Після періоду відновлення рівень активності HNS у печінці був порівнянним із початковим контрольним рівнем у групах, що одержували всі дози.

Імуногістохімія

У групах, умертвлених через 3 місяці (проміжний аналіз) і через 6 місяців/групі, що пройшла період відновлення, доставка HNS до ЦНС за допомогою болюсної ІТ ін'єкції призводила до доставки тестованої речовини до тканин м'якої та арахноїдальної оболонок спинного і головного мозку. У мавп, які одержували HNS ІТ, імунореактивний матеріал був присутнім у макрофагах оболонок мозку та периваскулярних макрофагах (головний/спинний мозок) і періодично був присутнім у популяції нейронів і клітин глії. Відсутність фарбування у контрольних мавп, що одержували тільки основу (Фігура 150A), продемонструвала специфічність антитіла відносно HNS людини. Як правило, зазначена імунореактивність була дозозалежною (тобто відповідно до напівкількісної шкали оцінок відмічалася збільшення імуногістохімічного фарбування, яке було зазвичай дозозалежним). Доставка HNS до ЦНС за допомогою болюсної ІТ ін'єкції

призводила до позитивного імунного фарбування в корі великих півкуль і мозочку (Фігура 150B-D); однак не виявлялося явної постійної імунореактивності в області хвостатого ядра/шкарлупи, середнього мозку або більш глибоких відділах моста або довгастого мозку. Імунореактивність була явною у печінці (у клітинах висилки синусоїдних капілярів, включаючи куперівські клітини, але не в гепатоцитах) усіх мавп, яким вводили HNS. Імунореактивність не виявлялася у однієї самки, яка померла рано (група 4,5 мг/дозу) через витоки в катетері, які не можна було ліквідувати.

У групі, що одержувала 1,5 мг/дозу, спостерігалось по суті повне відновлення за винятком печінки й оболонки головного і спинного мозку, у яких виявлялася деяка залишкова імунореактивність. При більш високих дозах (4,5 і 8,3 мг/дозу) інтенсивність і частота імунореактивності була нижчою, ніж при закінченні введення препарату. При всіх рівнях доз рівень HNS у спинному, головному мозку та печінці наближався до рівня, який спостерігається в контролі, що одержував тільки основу, після місячного періоду відновлення.

У даному дослідженні IT-введення HNS один раз на 2 тижні протягом 6 місяців добре переносилося. Ніяких помітних змін маси тіла, клінічного стану, результатів офтальмологічного/неврологічного/фізикального обстеження, ЕКГ маси органів або макроскопічного вигляду органів не виникало. Виявлені результати обмежувалися тимчасовими змінами показників лабораторної діагностики СМР, що супроводжувалися легкими або помірними інфільтратами в оболонках мозку та епідуральним запаленням, з повним оберненням після періоду відновлення у всіх групах, крім групи, що одержувала максимальну дозу. Спостерігався великий розподіл HNS в усьому головному і спинному мозку.

IT-введення HNS один раз на 2 тижні викликало запальну реакцію, яка характеризувалася залишковою лейкоцитарною інфільтрацією та виходом альбуміну, що відмічалися при розтині через 24 години після введення препарату. Не будемо вдаватися в теорію, але це, ймовірно, відображає тимчасове, локалізоване й неповне відкриття гематоенцефалічного бар'єра, пов'язане зі зміною властивостей щільних контактів поблизу кінчика катетера, що призводить до входу лейкоцитів і білків плазми до СМР (Simard JM, et al. *Lancet Neurol.* (2007) 6, 258-268; Stamatovic SM, et al. *Curr. Neuropharmacol.* (2008) 6, 179-192). Це може бути наслідком двох компонентів: один пов'язаний із процедурами введення препарату або об'єму, а інший пов'язаний із IT-введенням білків.

Тимчасові зміни проникності гематоенцефалічного бар'єра (немає значущих відмінностей між групами, що одержували різні дози, і контрольними групами при основному розтині через 24 години після введення дози) не супроводжувалися ніякими клінічними ознаками.

Очевидно, є дозозалежна тенденція до більш високого рівня HNS у СМР; при даному рівні дози середні концентрації HNS у СМР, очевидно, зберігаються в тому ж діапазоні, незважаючи на підвищення рівня анти-HNS антитіл у сироватці та СМР.

У головному та спинному мозку молодих мавп, що одержували HNS, спостерігалися клітинні інфільтрати в оболонках мозку від низького до мінімального середнього ступеня тяжкості. Зазначена мікроскопічна зміна також відмічалася у контрольних тварин, які одержували тільки основу, що вказує на те, що деякі з реакцій були пов'язані з установкою IT катетера, а також неспецифічною запальною реакцією на чужорідний білок. Введення біологічного препарату/білка до IT простору, особливо того, який проникає до ЦНС, майже завжди викликає запальну реакцію певного ступеня (Hovland DN, et al. *Toxicol. Pathol.* (2007) 35, 1013-1029; Butt MT, *Toxicol. Pathol.* (2011) 39, 213-219), і якщо її ступінь такий, що ушкоджуються сусідні тканини, то вона може являти собою небажаний ефект. Однак у даному дослідженні зазначені клітини (переважно еозинофіли), очевидно, були маркером реакції/проникнення в тканину й не виявлялися в такій кількості, яку можна було оцінити як небажаний ефект. Жодна з пов'язаних із HNS змін, очевидно, не була асоційована з небажаними структурними мікроскопічними змінами в головному або спинному мозку. Некроз нейронів не відмічався ні в спинному, ні в головному мозку, ні в гангліях.

Оцінка рівня антитіл до тестованої речовини є важливим аспектом досліджень токсичності через потенційний вплив нейтралізуючих або зв'язуючих антитіл на виведення або біорозподіл тестованої речовини (Ponce RP, et al. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* (2009) 54, 164-182). Оскільки в головному та спинному мозку тварин, умертвлених через 3 місяці (проміжний аналіз) і через 6 місяців, виявлялися дозозалежні та кількісно близькі рівні активності ферменту HNS, і середня концентрація HNS у СМР, очевидно, зберігалася в тому ж діапазоні, незважаючи на підвищення рівня анти-HNS антитіл у сироватці та СМР, у даному дослідженні нейтралізуюча активність не передбачається. Очевидно, є дозозалежна тенденція до більш високого рівня активності ферменту HNS у спинному, головному мозку та печінці, який був максимальним поблизу ділянки

ін'єкції в поперековому відділі спинного мозку й рівномірним у головному мозку, і не було значущих відмінностей у ростокаудальному напрямку, а також між правою і лівою півкулями.

У тканинах головного та спинного мозку 6-місячної групи в порівнянні з 3-місячною проміжною групою ніяких ознак акумуляції HNS не відмічалось. Хоча в поверхневих пробах спостерігалася тенденція до підвищеного розподілу, HNS, яку вводили ІТ до поперекового відділу, проникала до більш глибоких перивентрикулярних областей головного мозку. Активність ферменту HNS у печінці вказує на те, що HNS зазнає повторного системного розподілу після ІТ доставки; після оцінки клінічних і патологічних параметрів у базових дослідженнях токсичності в печінці ніяких пов'язаних із HNS небажаних ефектів виявлено не було.

У цілому, результати імуногістохімічного дослідження підтвердили дані про активність ферменту в тому, що дозозалежна імунореактивність спостерігалася в спинному і головному мозку в м'якій і арахноїдальній оболонках та в нервовій системі (нейрони, клітини глії) у безпосередній близькості від оболонок мозку. Після болюсної ІТ ін'єкції або короткострокової ІТ інфузії відмічалось хороше проникнення до сірої речовини. Хоча явної імунореактивності в більш глибоких структурах, таких як базальні ганглії або центральні області таламуса/гіпоталамуса, середнього мозку або моста/довгастого мозку, не було, результати визначення активності ферменту показують, що введена ІТ до поперекового відділу HNS проникає до глибоких, перивентрикулярних областей головного мозку. Таким чином, імуногістохімічне дослідження може бути менш чутливим способом визначення біорозподілу тестованої речовини. Мала місце явна імунореактивність у купферівських клітинах і клітинах ендотелію (клітини, здатні до фагоцитозу) печінки, але не в клітинах паренхіми (гепатоцити).

Аналіз токсичності 6-місячного багатократного ІТ-введення молодим довгохвостим макакам у 6-місячній групі/групі, що пройшла період відновлення, виявив, що пов'язані з HNS зміни при 3-місячному проміжному аналізі та при розтині через 6 місяців були порівнянними, включаючи прижиттєві показники, показники лабораторної діагностики й патологічної анатомії, концентрацію HNS і анти-HNS антитіл у СМР та сироватці й розподіл/субклітинну локалізацію HNS у спинному, головному мозку та печінці. У мавп, яких піддали розтину після періоду відновлення, ефекти HNS або були відсутніми, або суттєво скорочувалися. Таким чином, рівнем відсутності спостережуваних небажаних ефектів був визнаний рівень 8,3 мг/дозу - максимальна з доз, що вводилися.

Моніторинг змін насиченості клітинами і концентрацій білка у СМР, очевидно, достовірно корелює з морфологічними змінами, відміченими при гістопатологічній оцінці, та може бути корисним інструментом при ІТ введенні HNS пацієнтам; зазначені зміни були визнані передбачуваною реакцією на ІТ-введений білок, і вони в основному врегульовувалися після періоду відновлення. Зазначені дані, отримані в моделі на тварин, вселяють упевненість у застосовності ІТ терапії як стратегії лікування неврологічних проявів лізосомних хвороб накопичення. Дане токсикологічне дослідження на молодих нижчих приматах продемонструвало допустимість і переносимість введення HNS через пристрій ІТ доставки лікарських засобів у поперековому відділі у педіатричних пацієнтів. Відсутність несприятливих патологічних змін у ЦНС і небажаних клінічних ознак підтвердила схвалення досьє досліджуваного лікарського препарату й показало, що ІТ введена HNS може бути безпечною та ефективною при лікуванні симптомів з боку ЦНС синдрому Санфіліппо типу А.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Приклади матеріалів і методів, які застосовувалися в ході різних експериментів, описаних у зазначених прикладах, перераховані нижче.

Схема експерименту і введення HNS

Мавп випадковим чином розподіляли до п'яти груп: групу 1 не піддавали лікуванню (контроль вживлення пристрою [DC], порту й катетера) і не вводили їй ні основи, ні тестованої речовини. Групи 2-5 одержували 0, 2,5, 7,5 або 13,8 мг/мл HNS у 0,6 мл ІТ (тобто загальна доза 0, 1,5, 4,5 або 8,3 мг) один раз на два тижні. Чотири мавпи/стать/групу піддавали розтину через 3 місяці (проміжний розтин; через 24 години після 6-ої дози), чотири мавпи/стать/групу піддавали розтину (за винятком групи DC, в якій розтин проводили через 3 місяці) через 6 місяців введення препарату (основний розтин; через 24 години після 12-ої дози) і чотири мавпи/стать/групу, що залишилися, піддавали розтину наприкінці місячного періоду відновлення. При розтині відбирали вибрані тканини, обробляли їх і піддавали мікроскопічному дослідженню.

HNS вводили в основі для ІТ лікарських форм, яка складається з 5 мМ фосфату натрію, 145 мМ хлориду натрію та 0,005 % полісорбату 20 (pH 7,0). Один раз на два тижні дози HNS вводили в формі короткострокової інфузії протягом приблизно одинадцяти хвилин: 0,6 мл (4

хвилини) і наступне промивання 0,5 мл фосфатно-сольовим буфером (ФБР) (7 хвилин). Мавпи в групі контролю основи одержували тільки основу для ІТ-введення ; мавпи DC одержували ІТ ФБР (рН 7,2).

Спостереження за клінічними ознаками

Спостереження за клінічними ознаками, а також оцінку захворюваності та смертності проводили щонайменше два рази на день, починаючи із введення першої дози. Масу тіла вимірювали перед операцією, один раз на тиждень під час дослідження і при розтині. Споживання їжі відслідковували щодня, починаючи з моменту часу до операції. Дані об'єктивної оцінки (частота серцевих скорочень, подих, температура тіла, аускультация, хода, положення, пальпація живота, лімфатичні вузли й зовнішній вигляд) і неврологічного обстеження (рівень свідомості, прокладання шляху) реєстрували до початку дослідження, один раз на місяць під час дослідження і перед розтином. Також оцінювали рухові функції, рефлекси рівня головного мозку (зіничний рефлекс, моргання й рогівковий рефлекс) і рефлекси рівня спинного мозку (чутливість ступнів, колінний рефлекс, шкірний, пропріоцептивний і хвостовий рефлекс). Електрокардіографію (ЕКГ, відведення I, II і III) та офтальмологічне обстеження проводили перед введенням першої дози HNS і за тиждень до проміжного (3 місяці) та основного (6 місяців) розтину. Офтальмологічне обстеження проводили з використанням непрямого офтальмоскопа, мавп піддавали садації з використанням кетаміну гідрохлориду (BM, 8 мг/кг) і очі розширювали 1 % тропікамідом.

Клінічна патологія

Проби крові для гематологічного дослідження і біохімії крові відбирали у мавп натщесерце перед початком дослідження, після ІТ-введення доз 1, 3, 5, 7, 9 і 11, у середині періоду відновлення та при розтині. Проби сечі відбирали шляхом уловлювання струменя перед введенням препарату, один раз на місяць у період введення й період відновлення, і перед розтином. Проби СМР для оцінки загальної кількості клітин і біохімічного аналізу відбирали через катетер у поперековому відділі під час операції, а також через 24 години після ІТ-введення доз 1, 3, 5, 7, 9, 11, у середині періоду відновлення та при розтині; іноді проби не відбирали через часткову непрохідність катетера. Оскільки відмічалася більш висока, ніж очікувалося, кількість лейкоцитів, проби СМР у групи проміжного 3-місячного розтину після дози 5 відбирали у половини мавп у кожній групі до введення препарату, а у половини, що залишилися, - через 24 години після введення препарату. Відбір проб до введення препарату проводили щонайменше за 1 день до введення дози, так що це не виявляло значного впливу на об'єм СМР безпосередньо перед введенням препарату. У мавп, умертвлених через 6 місяців, і у мавп, умертвлених після періоду відновлення, проби СМР для оцінки загальної кількості клітин і біохімічного аналізу відбирали у половини мавп у кожній групі до введення препарату, а у половини, що залишилися, - через 24 години після введення препарату. Якщо у мавпи не можна було відібрати проби з катетера через його непрохідність, при розтині проводили спинномозкову пункцію (мостомозочкова цистерна).

Аналіз HNS

Проби крові для аналізу HNS відбирали з периферичної вени перед введенням і через 24 години після ІТ-введення доз 2, 4, 6, 8, 10, 12, у середині періоду відновлення і при розтині. Проби СМР відбирали через катетер у поперековому відділі перед введенням і через 24 години після ІТ-введення доз 2, 4, 6, 8, 10, 12, у середині періоду відновлення і при розтині. Концентрацію HNS визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу. Як іммобілізоване антитіло застосовували поліклональне анти-HNS антитіло кролика IgG, а як детекторне антитіло застосовували кон'югат того ж анти-HNS IgG кролика з пероксидазою хрину. MB склала 0,22 нг/мл; таким чином, розрахункова МКВ склала 0,66 нг/мл. Проби сироватки і СМР піддавали скринінгу в подвійному екземплярі в розведеннях 1:100 і 1:5; проби, в яких концентрація виходила за межі калібрувальної кривої, розводили додатково й тестували повторно.

Аналіз на анти-HNS антитіла

Проби крові для аналізу на анти-HNS антитіла відбирали з периферичної вени приблизно за 1 тиждень до ІТ-введення доз 2, 4, 6, 8, 10, 12, у середині періоду відновлення і при розтині. Проби СМР для аналізу на антитіла відбирали через катетер у поперековому відділі приблизно за 1 тиждень до ІТ-введення доз 2, 4, 6, 8, 10, 12, у середині періоду відновлення і при розтині. Для визначення анти-HNS антитіл застосовували технологію Meso Scale Discovery (MSD®), основу на електрохемілюмінесцентному мостовому вимірюванні. Зазначений спосіб аналізу є універсальним, але чутливим способом скринінгу для визначення анти-HNS антитіл, що утворюються у будь-яких видів, і підходить для всіх ізотипів імуноглобулінів. MB склала 5 нг/мл, і зазначені проби піддавали скринінгу в подвійному екземплярі в розведенні 1:20, що

призводило до ефективної чутливості аналізу 100 нг/мл. Проби, в яких показники виходили за межі калібрувальної кривої, розводили додатково й тестували повторно.

Розтин і підготовка тканин

Мавп піддавали повному розтину або через 24 години після ІТ-введення останньої дози (основний розтин), або після закінчення місячного періоду відновлення (розтин після відновлення). Усім мавпам проводили седацію гідрохлоридом кетаміну (ВМ, 8 мг/кг), підтримували подачу суміші ізофлурану/кисню і вводили їм ВВ болюсно гепарин натрію (200 МОд/кг). Через лівий шлуночок серця мавп проводили перфузію 0,001 % нітриту натрію в фізіологічному розчині кімнатної температури зі швидкістю 200 мл/хв протягом 12 хв (~2400 мл). Після відбору проб тканин, їх фіксували в 10 % нейтральному буферному формаліні для гістопатологічного дослідження/імуногістохімічного аналізу або заморожували на сухому льоді та зберігали при температурі -60 °С або нижче для аналізу активності HNS.

Зрізи головного мозку робили з матрикса головного мозку (MBM-2000C, «ASI Instruments, Inc.», Уоррен, Мічиган), зрізуючи фронтальний зріз товщиною приблизно 3 мм. Зазначені зрізи нумерували і самому роstralьному зрізу присвоювали номер 1. Зрізи 1, 4, 7, 10, 13 і 16 підготовляли для гістопатологічного дослідження, а зрізи 2, 5, 8, 11, 14 і 17 (якщо такі були) підготовляли для імуногістохімічного дослідження. Зрізи 3, 6, 9, 12 і 15 заморожували для оцінки активності HNS. Зі спинного мозку (шийний, грудний і поперековий відділи) виготовляли зрізи товщиною один сантиметр. Перший зріз і кожний наступний третій зріз підготовляли для гістопатологічної оцінки, а другий зріз і кожний наступний третій зріз підготовляли для імуногістохімічного аналізу. Третій зріз і кожний наступний третій зріз заморожували для оцінки активності HNS. Розподіл зрізів коректували так, щоб зріз із кінчиком інтратекального катетера (зріз 0) можна було фіксувати в формаліні й піддавати гістопатологічному аналізу. Проби печінки в подвійному екземплярі масою ~5 г відбирали з двох різних частин і заморожували для оцінки активності HNS, і додаткові проби масою ~5 г фіксували для імуногістохімічного аналізу.

Гістопатологія

При розтині у всіх мавп брали головний, спинний мозок, задні корінці спинномозкових нервів/ганглії, сідничний, великогомілковий і литковий нерви, повний перелік тканин (типовий для доклінічних досліджень безпеки такої тривалості й у такого виду) і осередків макроскопічних уражень. Зрізи тканин поміщали в парафін та офарблювали гематоксиліном і еозином (поряд із будь-якими спеціальними процедурами фарбування/поміщення, зазначеними нижче) для всесторонньої мікроскопічної оцінки.

Зрізи мозку з підготовлених парафінових блоків від тварин із груп контролю пристрою та контролю основи, а також від мавп, що одержували високу дозу, офарблювали Fluoro-Jade B (барвник, що підвищує чутливість оцінки на дегенерацію нейронів у головному мозку) і срібним барвником Більшовського (спосіб, який дозволяє прямо візуалізувати аксони, дендрити й філаменти нейронів). Офарблені Fluoro-Jade B зрізи досліджували при флуоресцентному освітленні з застосуванням фільтр-куба з флуоресцинніотіоціанату.

Зрізи спинного мозку одержували послідовним зрізанням; поперечні й косі зрізи брали з шийного, грудного й поперекового відділів (на кожному рівні досліджували один зріз), включаючи зрізи біля кінчика катетера; додатковий поперечний зріз одержували з області кінського хвоста. Задні корінці спинномозкових нервів і ганглії (з середини шийного, середини грудного й середини поперекового відділу) обробляли та досліджували. Периферичні нерви (сідничний, великогомілковий і литковий) розрізали, одержуючи поздовжній зріз, та офарблювали гематоксиліном і еозином (Г/Е). Поперечні зрізи згодом фіксували в осмії, поміщали в смолу Спурра, одержували зрізи (2 мкм) і офарблювали толуїдиновим синім. Послідовні зрізи спинного мозку, а також задніх корінців спинномозкових нервів/гангліїв, із груп контролю пристрою і контролю основи, а також із групи, що одержувала високу дозу, офарблювали срібним барвником Більшовського. Зрізи спинного мозку тварин із зазначених груп також офарблювали антигліальним фібрилярним кислим білком, тобто імуногістохімічним барвником, який дозволяє прямо візуалізувати зірчасті клітини і їхні відростки.

Підготовка екстрактів тканин до кількісного аналізу

Заморожені зрізи головного мозку з номерами 3, 6, 9, 12 і 15 розсікали, відокремлюючи ліву півкулю від правої. Поверхневу тканину відбирали, відкладаючи 4 мм від поверхні, а тканину, що залишилася, в кожній півкулі вважали глибокою тканиною. Із фронтальних зрізів вирізали додаткові проби перивентрикулярної тканини, якщо такі були присутніми (наприклад, зрізи 6 і 9). Оскільки обробці піддавали тільки половину головного мозку (праву половину, а ліву половину зберігали замороженою), при виготовленні зрізів одержували від двох до трьох проб на зріз: поверхню правої половини, глибокий шар правої половини й паравентрикулярну область правої половини, якщо вона була присутньою (тобто глибокий шар шлуночка, Vdeerp). Тканини мозочка

і стовбура головного мозку, якщо вони були присутніми, ізолювали до розділення півкуль і обробляли їх окремо. Зрізи спинного мозку готували аналогічним чином, зважували й гомогенізували.

Проби тканин гомогенізували в лікуючому буфері (1 мл/0,25 мг тканини), змішаному з 10 мМ трис, 5 мМ етилендіамінтетраоцтовою кислотою, 0,1 % ігепалу з додаванням мінітаблеток повного інгібітору протеаз альфа (Roche Diagnostics, Індіанapolis, Індіана) із застосуванням пробірок Teena Lysing Matrix A або конічних поліпропіленових пробірок. Проби обробляли протягом 40 секунд у автоматичному гомогенізаторі Fastprep-24 («MP Biomedicals», Солон, Оклохома) або в механічному гомогенізаторі Powergen, модель 125 («Omni International», Кеннесо, Джорджія). Відразу після гомогенізації проби піддавали п'яти циклам заморожування-розморожування з використанням бані з етанолу/сухого льоду і водяної бані з температурою 37 °C, потім центрифугували, щоб осадити уламки тканин; надосадову рідину зберігали при -80 °C до проведення аналізу. Активність HNS визначали з використанням специфічного субстрату (4-метилумбеліферил- α -D-N-сульфоглюкозамінід) із 2-стадійним флуориметричним аналізом.

Обробка тканин і фарбування для імуногістохімічного аналізу

Шість фіксованих у формаліні фронтальних зрізів головного мозку (зрізи під номерами 2, 5, 8, 11, 14 і 17) товщиною 3 мм від кожної мавпи нумерували від 1 до 6 у напрямку від голови до хвоста. Як правило, зрізи 1-4 містили тканини базальних ядер/таламуса/гіпоталамуса/середнього мозку й великих півкуль, а два хвостові зрізи містили тканини мозочка й стовбура головного мозку (довгастого мозку). Зрізи головного, спинного мозку та печінки (з тих же парафінових блоків, які застосовували для фарбування Г/Е та різними спеціальними барвниками) офарблювали для імуногістохімічного аналізу HNS. Для визначення внутрішньоклітинного захоплення HNS, яку вводили IT, застосовували специфічне моноклональне антитіло миші (клон 2C7; «Maine Biotech», Портленд, Мен); зазначений реагент не демонстрував перехресної реактивності з ендогенною HNS довгохвостих макак. Негативні контролю проводили із застосуванням невідповідного IgG миші. Депарафінізовані зрізи інкубували з первинним анти-HNS антитілом миші протягом ночі при 2-8 °C. Додавали вторинний антимишачий біотинільований імуноглобулін G вівці та інкубували протягом 30 хвилин при 37 °C. Додавали комплекс авідин/біотинільована пероксидаза хрину та інкубували протягом 30 хвилин. Зрізи інкубували з розчином субстрату пероксидази хрину діамінобензидину доти, доки не розвивалася бажана інтенсивність фарбування. Ядра піддавали контрастному офарбленню гематоксиліном.

Статистичний аналіз

Масу тіла, зміну маси тіла, споживання їжі, частоту подиху, температуру тіла, частоту серцевих скорочень, кількість клітин у СМР, біохімію СМР, дані лабораторної діагностики, показники аналізу сечі, а також абсолютну й відносну масу органів аналізували за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу й порівняння з групами контролю пристрою та контролю основи з кожної з груп, що одержували HNS, із застосуванням критерію Даннета. Крім того, проводили статистичний аналіз для порівняння двох контрольних груп одна з одною. Аналіз був двостороннім при рівні значущості 5 % і 11 %. Усі дані представлені як середнє $\pm$ стандартне відхилення.

ПРИКЛАД 22: ДОСЛІДЖЕННЯ БІОРОЗПОДІЛУ І ФАРМАКОКІНЕТИКИ ГЕПАН-Н-СУЛЬФАТАЗИ

Експерименти, описані в даному прикладі, були спрямовані на визначення розподілу HNS у тканинах щурів після однократного внутрішньовенного або інтратекального введення (1 або 10 мг/кг) HNS. Наприклад, серед іншого, мета даних експериментів полягала в тому, щоб охарактеризувати властивості біорозподілу (БР) HNS у щурів із застосуванням позитронно-емісійної томографії (ПЕТ); порівняти характер розподілу HNS при різних шляхах введення (ВВ або IT) та при різних дозах (1 або 10 мг/кг); і визначити фармакокінетичні властивості HNS у кожному з розглянутих органів при зазначених режимах введення.

Профілі фармакокінетики (ФК) і біорозподілу (БР) ^{124}I -сульфамідази (HNS) вивчали за допомогою ПЕТ тканин у щурів після однократного внутрішньовенного (ВВ) або інтратекального (IT) введення 1 або 10 мг/кг ^{124}I -HNS. Дані залежності радіоактивності від часу в розглянутому відділі одержували з динамічних зображень у перші 20 хвилин і зі статичних зображень через 0,05 (тільки для IT-введення), 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 і 192 години після ВВ і IT-введення препарату.

У даному дослідженні брали участь по чотири щури в кожній групі (1 мг/кг ВВ, 1 мг/кг IT, 10 мг/кг ВВ і 10 мг/кг IT). Залежність радіоактивності від часу реєстрували в голові, головному мозку (включаючи спинномозкову рідину, СМР), в області хребта й області печінки після IT-введення; і в крові, головному мозку (включаючи СМР), печінці, нирках, серці (включаючи

легені) і шкірі після ВВ введення. Зазначені дані коректували на період напіврозпаду 124-йоду (100,2 годин), виражали у відсотках від дози, яку вводили (% ВД), для розглянутого відділу або % ВД на грам (% ВД/г) візуалізованих тканин, а потім нормували на масу тіла, яка дорівнює 200 грамів. Загальну кількість (мкг) або концентрацію (мкг/г) дози білка в розглянутому відділі

5 розраховували на основі відповідних даних % ВД або % ВД/г.
У перші 20 хвилин після ІТ-введення загальна кількість HNS у головному відділі знижувалася зі сталою швидкістю 0,002/хв - 0,011/хв (λ_z) при дозі 1 і 10 мг/кг. Швидкість кліренсу та об'єм розподілу для порівняння фармакокінетики між двома дозами і двома шляхами введення в даному звіті не застосовували (див. розділ «Результати» для більш докладної інформації). Сталі швидкості виведення з головного мозку по суті були однакові при двох тестованих дозах (λ_z : 0,016/год і 0,014/год для дози 1 і 10 мг/кг відповідно) при близькому часі напіввиведення близько двох днів, визначеному за статичними зображеннями до 192 годин після ІТ-введення. Значення C_{max} і AUC (0-last або 0- ∞) були пропорційними дозам, які вводили. У діапазоні доз 1-10 мг/кг при даних режимах із однократним ІТ-введенням була показана лінійна фармакокінетична поведінка. При обох рівнях доз спостерігалися градієнти концентрацій від проксимальних до дистальних зрізів хребта.

Після ІТ-введення рівень білка HNS кількісно визначався протягом 96 годин при 1 мг/кг і до 192 годин при 10 мг/кг HNS. Концентрації в печінці досягали максимуму через 2 години при 1 мг/кг і через 7 годин при 10 мг/кг. Швидкість виведення склала $0,030 \pm 0,011$ /год (середнє λ_z) при 1 мг/кг, що незначно відрізнялося від швидкості виведення при 10 мг/кг ($\lambda_z = 0,017 \pm 0$ /год) ($p = 0,10$), з відповідним 11/2 (28 і 42 години при дозах 1 і 10 мг/кг відповідно).

Після ВВ введення період напіввиведення в печінці, нирках, серці й шкірі склав 47 ± 10 і 38 ± 13 годин для печінки, 54 ± 25 і 29 ± 16 годин для нирок, 36 ± 15 і 42 ± 19 годин для серця та 40 ± 21 і 31 ± 13 годин для шкіри при 1 і 10 мг/кг відповідно; хоча період напіввиведення в головному мозку склав 71 ± 23 і 60 ± 53 години. Середні значення C_{max} для печінки, шкіри, нирок, серця й головного мозку склали 9,6; 0,30; 0,25; 0,22 і 0,08 мкг/г при дозі 1 мг/кг та 132; 7,9; 3,9; 3,7 і 1,8 мкг/г при дозі 10 мг/кг. Після того, як значення C_{max} для окремих тварин нормували на дозу, значення $C_{max}/\text{дозу}$ при 10 мг/кг були значно вищими ніж при 1 мг/кг у всіх органах (максимальні значення $p < 0,05$, $p = 0,06$ для печінки). Значення AUC_{last} для печінки, шкіри, нирок, серця й головного мозку склали 525, 16, 14, 9 і 7 год.мкг/г при 1 мг/кг; та 6747, 276, 183, 201 і 86 год.мкг/г при 10 мг/кг. Після нормування значення $AUC_{last}/\text{дозу}$ при 10 мг/кг були значно вищими ніж при 1 мг/кг у шкірі ($p < 0,01$), мінімально відрізнялися в серці ($p = 0,06$) і незначучо відрізнялися в печінці, головному мозку й нирках (усі значення $p > 0,34$).

При введенні однієї і тієї ж дози інтратекальне введення призводило до впливу в головному мозку, вищого на 3 порядки, ніж внутрішньовенне введення. Час напіввиведення в головному мозку склав 2 дні при ІТ та 3 дні при ВВ введенні. Однак вплив у печінці після ІТ-введення був близьким до впливу при ВВ введенні при тій же дозі HNS. Відношення впливу (C_{max} і AUC_{last}) на печінку при ІТ/ВВ введенні при дозі 1 мг/кг і 10 мг/кг було в діапазоні 0,4-1,2.

Схема експерименту

40 При більшості лізосомних хвороб накопичення ушкодженню піддається центральна нервова система (ЦНС), і при деяких типах зазначених захворювань ушкодження в ЦНС є серйозними, наприклад, при синдромі Санфіліппо типу А або В (мукополісахаридоз III), метахроматичній лейкоцистозії (МЛД) і синдромі Хантера. Як описано в даній заявці, припускається, що через погане проникнення через гематоенцефалічний бар'єр при периферичному введенні пряме введення білків-ферментів до ЦНС може підвищити їхні концентрації в тканинах центральної нервової системи та як наслідок підсилити їхню терапевтичну дію. У даному дослідженні інтратекальне введення (ІТ, або до мостомозочкової цистерни) досліджували й порівнювали з ВВ введенням при різному рівні доз.

ПЕТ є неінвазивним, відтворюваним і кількісним способом відстеження динамічних змін концентрації лікарського препарату в часі в розглянутих органах. Дані динамічної залежності концентрації від часу в органах-мішенях (активних ділянках, а не в кровоносному руслі) піддаються оцінці й прямо пов'язані з біологічною активністю лікарського препарату, який вводили. Крім того, інформацію про вплив у тканинах, отриману в ПЕТ-дослідженні на тваринах, можна застосовувати для підбору першої дози у людини.

Матеріали та методи

Тестовані речовини

Гепаран-N-сульфатазу (HNS) готували в концентрації 20 мг/мл HNS в 5 мМ фосфатно-натрієвого буфера з 145 мМ хлориду натрію при рН 7,0. Зазначений матеріал очищали з використанням 3Ф-ВЕРХ (високоєфективна рідинна хроматографія зі зворотною фазою), і він

містив 98,7 % гепаран-N-сульфатази, де відсоток димерів становив 99,9 %. HNS мітили з використанням ^{124}I йоду.

Джерело проб

Зображення радіоактивності одержували на щурах після ВВ і ІТ-введення ^{124}I -H-N-сульфатази в дозах 1 і 10 мг/кг.

Тварини

Шістнадцять самців щурів Спраг-Дуулі були отримані з Charles River Laboratories (190 ± 60 г, $n = 16$), і їх розділили на 4 групи ($n = 4$). Кожній групі зазначених щурів (усього 4 групи) робили ВВ або ІТ ін'єкції з двома різними дозами (1 мг/кг і 10 мг/кг). Дозу та об'єм, який вводили, підбирали індивідуально на основі маси тіла кожної тварини. У двох групах, що одержували препарат ВВ, садацію індукували шляхом ВВ введення фенобарбіталу натрію в дозі 35 мг/кг. Внутрішньовенні дози вводили в формі болюсів через хвостову вену. У двох групах, що одержували препарат ІТ, тварин піддавали анестезії шляхом внутрішньочеревинного введення фенобарбіталу натрію в дозі 50 мг/кг. Інtrateкальні дози вводили протягом 1 хв на рівні мостомозочкової цистерни через атланта-потиличну мембрану. Реально введену радіоактивність вимірювали за допомогою ПЕТ, і дане значення застосовували як значення введенної дози.

Експериментальні методи і/або методи аналізу

Після ВВ ін'єкції в перші 20 хвилин одержували динамічні зображення (кожні 2 хвилини) в областях серця (включаючи легені), печінки й нирок; при ІТ введенні обох доз - також області голови. Статистичні зображення одержували в областях, включаючи головний мозок (включаючи спинномозкову рідину, СМР), печінку, нирки, серце (включаючи легені), м'язи, шкіру й кістку в групі, що одержувала препарат ВВ; і в області голови, головного мозку (включаючи СМР) і печінки - у тварин, що одержували препарат ІТ, через 0,05 (тільки для груп ІТ-введення), 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 і 192 години після введення препарату. Зазначені зображення реконструювали, і три виміри поєднували в одне зображення.

Аналіз даних

Дані ПЕТ виражали в наноКюрі (нКі) на мілілітр (для рідини) або на грам (для тканини). У статичних зображеннях відносну активність одержали для відділів головного мозку, печінки, нирок, скелетних м'язів, шлунка, серця (з легенями) і шкіри. Для тварин, що одержували ІТ ін'єкції, була отримана абсолютна активність для цілої області голови або головного мозку. У тварин, що одержували ІТ ін'єкції, визначали радіоактивність на міліметр хребетного стовпа в трьох вибраних відділах хребта: проксимальний (шия), середній (навпроти верхнього краю печінки) і дистальний (на 1 см від дистального кінця білок-вмісного компартмента).

Усі дані коректували на період напіврозпаду ^{124}I (100,2 годин) і нормували на реєстровану ефективність на основі калібрування з джерелом ^{124}I при активності, яку вимірювали зовні. Потім зазначені дані виражали у відсотках від дози, яку вводили, (% ВД) для розглянутого відділу (голова або головний мозок) або % ВД на грам (% ВД/г) тканини, а потім нормували на масу тіла, яка дорівнює 200 грамів [нормування даних: (% ВД або % ВД/г) / маса тіла тварини $\times$ 200]. Зазначене нормування вводили, щоб зменшити варіабельність даних, оскільки в кожній групі було всього по чотири тварин.

У даному прикладі концентрацію або кількість білка HNS розраховували на основі дози білка, яку вводили кожній тварині: концентрація білка (мкг/г) = (% ВД/г) $\times$ (мг/кг введенної дози $\times$ 1000 $\times$ 0,2); загальна кількість білка (мкг), яку вводили, в розглянутій області = % ВД $\times$ (мг/кг введенної дози $\times$ 1000 $\times$ 0,2), де доза, яку вводили, становила 1 мг/кг або 10 мг/кг, а 0,2 - коефіцієнт нормування на масу тіла. Середньогрупове значення і стандартне відхилення для кожного ФК параметра розраховували на основі індивідуальних даних аналізу без розподілу на компартменти в кожній із чотирьох груп. Для порівняння значень λ_z , $t_{1/2}$, $C_{\max}$ і AUC між двома тестованими дозами й двома шляхами введення застосовували t-критерій Ст'юдента. Статистичну значущість визначали як значення p нижче 0,05 ($p < 0,05$).

Результати

Кількість (мкг) і концентрацію (мкг/г) HNS, які наводяться в наступних таблицях, на фігурах і при аналізі ФК, розраховували шляхом множення дози білка (1 мг/кг або 10 мг/кг), яку вводили, на відповідні значення % ВД або % ВД/г.

Інtrateкальне введення ^{124}I -HNS у дозах 1 і 10 мг/кг

Кількість введенного білка (мкг) в області голови, оцінена на основі динамічних зображень, відкладали на графіку як функцію від часу (Фігура 151). Концентрацію (мкг/г) в області головного мозку, оцінену на основі статичних зображень, відкладали на графіку як функцію від часу (Фігура 152). Загальну кількість введенного білка (мкг) в області головного мозку й голови, оцінену на основі статичних зображень, відкладали на графіку як функцію від часу (Фігура 153 і

154 відповідно). Криві залежності концентрації від часу (мкг/мм) у проксимальному, середньому й дистальному відділі хребта показані на Фігурах 155-157. На Фігурі 158 показані зміни концентрації HNS (мкг/г) у часі в печінці після IT-введення ^{124}I -HNS у дозах 1 мг/кг або 10 мг/кг.

5 Залежності загальної кількості від часу (мкг) або концентрації від часу (мкг/г) аналізували в моделі без урахування компартментів (Winnonlin 5.2, Pharsight, Маунтін-В'ю, Каліфорнія). ФК параметри, такі як стала швидкість виведення (λ_z), максимальна концентрація ($C_{\max}$), термінальний час напіввиведення ($t_{1/2}$), площа під кривою (AUC_{last} і $AUC_{0-\infty}$), оцінювали на основі даних кожної конкретної тварини.

10 Оцінювали також швидкість кліренсу та об'єм розподілу, однак їх не застосовували для порівняння ФК між двома дозами й двома шляхами введення в даному звіті з двох причин: (1) дане дослідження було спрямоване головним чином на оцінку біорозподілу HNS у твердих тканинах, а не оцінку ФК у крові; і (2) радіоактивність в області головного мозку була сумою радіоактивності в тканинах головного мозку (твердих) і СМР (рідина), які не можна було розділити в рамках даного дослідження. Оцінювали значення λ_z і застосовували його для

15 порівняння, оскільки воно відображає відсоток введеної дози, виведеної за одиницю часу. Середньогрупові значення і стандартне відхилення (СВ) розраховували й порівнювали між двома тестованими дозами. ФК параметри наведені в Таблиці 48 нижче.

Таблиця 48

1 мг/кг IT	Головний мозок (мкг/г)*		Печінка		Головний мозок (мкг)#		Голова (мкг)#		Проксимальний		Середній		Дистальний	
	Середнє	СВ	Середнє	СВ	Середнє	СВ	Середнє	СВ	Середнє	СВ	Середнє	СВ	Середнє	СВ
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	8? 16	782	9	3	7	3	2	1
$AUC_{0-\infty}$	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 мг/кг 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	1	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	-
$AUC_{0-\infty}$	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	-

20

1 мг/кг BV	Головний мозок (мкг/г)*		Печінка		Нирки		Серце		Шкіра	
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
$AUC_{0-\infty}$	9	3	576	138	16	6	10	3	18	5
MRT_{last}	61	16	47	5	47	18	36	13	41	16

10 мг/кг BB

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
$AUC_{0-\infty}$	118	98	7171	3029	198	131	230	110	292	43
MRT_{last}	43	32	40	14	33	21	41	18	33	13

У перші 20 хвилин після введення загальна кількість (мкг) HNS у головному відділі знижувалася зі сталою швидкістю 0,002/хв - 0,011/хв (λ_z : 0,005 $\pm$ 0,004/хв) при дозі 1 мг/кг і швидкістю 0,003-0,010 на хвилину (0,007 $\pm$ 0,003/хв) при дозі 10 мг/кг. Зазначені сталі швидкості виведення не відрізнялися значущо при даних двох рівнях доз ($p = 0,57$, Фігура 151).

Крива залежності концентрації від часу (мкг/г від 0,05 до 192 годин) для головного мозку продемонструвала двофазний профіль (Фігура 152). Рання фаза триває приблизно дві години. Термінальна фаза відповідає кінетиці першого порядку. Постійні швидкості виведення з головного мозку були дуже близькими при двох тестованих дозах (0,0016 $\pm$ 0,003 і 0,014 $\pm$ 0,001 на годину) з близьким часом напіввиведення близько двох днів (45 $\pm$ 7 і 49 $\pm$ 4 годин при 1 і 10 мг/кг відповідно). Значення максимальної концентрації (257 $\pm$ 90 і 2628 $\pm$ 265 мкг/г) і AUC_{last} (8393 $\pm$ 2457 і 83962 $\pm$ 10083 год.мкг/г при 1 і 10 мг/кг відповідно) збільшувалися приблизно вдесятеро, коли дозу збільшували з 1 до 10 мг/кг. Дані результати вказують на лінійну поведінку ФК в діапазоні доз від 1 до 10 мг/кг, які вводили в рамках зазначеного однократного ІТ режиму введення. Після ІТ-введення максимальна концентрація створюється в головному мозку через 3 хвилини (T_{max}).

Крива залежності загальної кількості від часу (мкг від 0,05 до 192 годин) в області голови й головного мозку продемонструвала двофазний характер, як і криві залежності концентрації від часу (мкг/г) у головному мозку (Фігура 153 і Фігура 154). Значення C_{max} в області головного мозку були значно нижчими, ніж у області голови (69 $\pm$ 8 і 200 $\pm$ 0 при 1 мг/кг, $p < 0,01$; та 836 $\pm$ 117 і 1844 $\pm$ 314 мкг, $p < 0,01$ при 10 мг/кг відповідно). Сталі швидкості виведення склали 0,017 $\pm$ 0,002/год і 0,014 $\pm$ 0,001/год для головного мозку та 0,016 $\pm$ 0,002 і 0,010 $\pm$ 0,001/год для області голови при 1 і 10 мг/кг відповідно. Значення середнього залишкового часу життя склали 42 $\pm$ 5 і 51 $\pm$ 5 годин для головного мозку ($p = 0,048$) та 45 $\pm$ 7 і 70 $\pm$ 9 години для голови ($p < 0,01$) при 1 і 10 мг/кг відповідно. Дані результати вказують на те, що введений білок виводився з обох областей швидше при більш низькій дозі, ніж при високій дозі. Середній час напіввиведення в зазначених областях після ІТ-введення 1 мг/кг і 10 мг/кг HNS був у діапазоні від 42 до 70 годин.

При обох рівнях доз спостерігався градієнт концентрації від проксимального до середнього й до дистального відділів хребта (дані не показані). Після ІТ-введення максимальна концентрація (мкг/мм хребетного стовпа) відмічалася приблизно через 30 хвилин (від 0 до 1 години) у проксимальному, від 1 до 4 годин у середньому (за винятком одного щура, у якого вона досягалася через 24 години) і від 1 до 8 годин у дистальному відділі. Час напіввиведення в зазначених відділах був варіабельним (середній $t_{1/2}$: 32 $\pm$ 13 і 45 $\pm$ 18 годин для проксимального, 39 $\pm$ 16 і приблизно 50 годин для середнього та 30 $\pm$ 12 і приблизно 123 години для дистального відділу хребта при 1 мг/кг і 10 мг/кг відповідно). Середні значення максимальної концентрації були приблизно пропорційні дозам у кожному із зазначених відділів при дозах 1 і 10 мг/кг ^{124}I -HNS (0,5 і 6,0; 0,2 і 0,9 та 0,1 і 0,5 мкг/мм у проксимальному, середньому та дистальному відділах хребта відповідно). Середні значення AUC_{last} також демонстрували ту пропорційність, яка спостерігалася у випадку максимальних концентрацій (9,5 і 83; 6,8 і 35 та 2 і 38 год.мкг/мм у проксимальному, середньому й дистальному відділах хребта відповідно).

Навіть незважаючи на те, що HNS не виявлялася в більшості периферичних органів, вона була такою, що можливо визначити, в печінці, починаючи з 1 години (перший момент часу для візуалізації після введення препарату) і до 96 годин (у трьох із чотирьох тварин) при 1 мг/кг і до 192 годин (у всіх чотирьох щурів) при 10 мг/кг після ІТ-введення (Фігура 158). Концентрації в печінці досягали максимуму через 2 години після ІТ-введення дози 1 мг/кг та через 7 годин після ІТ-введення дози 10 мг/кг, після чого наступала фаза виведення з кінетикою першого порядку. Постійні швидкості виведення були більшими при 1 мг/кг ($\lambda_z = 0,030 \pm 0,011$ /год), ніж при дозі 10 мг/кг ($\lambda_z = 0,017 \pm 0$ /год) ($p = 0,10$), з відповідним більш низьким $t_{1/2}$ (28 $\pm$ 16 і 42 $\pm$ 1 години при дозах 1 і 10 мг/кг відповідно, $p = 0,76$). Значення AUC_{last} при 1 мг/кг було нижчим приблизно в 40 разів, ніж при 10 мг/кг (204 $\pm$ 50 і 7987 $\pm$ 3276 мкг/г відповідно).

Внутрішньовенне введення ^{124}I -HNS у дозах 1 і 10 мг/кг

Концентрацію в головному мозку, печінці, нирках, серці (включаючи легені) та шкірі відкладали на графіку як функцію від часу після ВВ введення HNS у дозі 1 і 10 мг/кг, що показано на Фігурах 159-163 відповідно. Оскільки першим моментом часу одержання статичного зображення зазначених органів була одна година, початкову фазу залежності концентрації від часу в даному дослідженні спостерігати не вдалося. Криві залежності концентрації від часу для печінки, нирок, серця й шкіри демонстрували плоску ділянку від 1 до 8 годин після ВВ введення. Дана плоска ділянка тривала 24 години на головному мозку після введення препарату, що вказує на те, що головний мозок захоплює введений ВВ білок повільніше, ніж периферичні органи. Інші дані показують, що термінальна фаза виведення приблизно відповідає кінетиці першого порядку.

Період напіввиведення в печінці, нирках, серці й шкірі склав 47 ± 10 і 38 ± 13 годин для печінки, 54 ± 25 і 29 ± 16 годин для нирок, 36 ± 15 і 42 ± 19 годин для серця та 40 ± 21 і 31 ± 13 годин для шкіри при 1 і 10 мг/кг відповідно; хоча період напіввиведення в головному мозку склав 71 ± 23 і 60 ± 53 години (щур 3 з групи 10 мг/кг виключили через недостатність даних для визначення $t_{1/2}$) при 1 і 10 мг/кг відповідно. Зазначені сталі швидкості виведення різнилися значущо при дозах 1 і 10 мг/кг у зазначених органах, і виключення склали нирки, значення $p < 0,03$.

Середні значення C_{max} для печінки, шкіри, нирок, серця й головного мозку склали 9,6; 0,3; 0,25; 0,22 і 0,08 мкг/г при дозі 1 мг/кг та 132, 7,9, 3,9, 3,7 і 1,8 мкг/г при дозі 10 мг/кг. Відношення C_{max} при 10 мг/кг до відповідних значень при 1 мг/кг склали 14, 26, 16, 17 і 23 для зазначених органів. Після того, як значення C_{max} для окремих тварин нормували на дозу, значення $C_{max}/\text{дозу}$ при 10 мг/кг були значно вищими, ніж при 1 мг/кг у всіх органах (максимальні значення $p < 0,05$, $p = 0,06$ для печінки). Значення AUC_{last} для печінки, шкіри, нирок, серця і головного мозку склали 525, 16, 14, 9 і 7 год.мкг/г при 1 мг/кг; та 6747, 276, 183, 201 і 86 год.мкг/г при 10 мг/кг. Відношення AUC_{last} при 10 мг/кг до відповідних значень AUC_{last} при 1 мг/кг склали 13, 17, 13, 22 і 12 для зазначених органів відповідно. Після нормування значення $AUC_{last}/\text{дозу}$ при 10 мг/кг були значно вищими, ніж при 1 мг/кг у шкірі ($p < 0,01$), мінімально відрізнялися в серці ($p = 0,06$) і незначущо відрізнялися в печінці, головному мозку й нирках (усі значення $p > 0,34$).

Дані результати показують, що (1) час напіввиведення в більшості органів становив приблизно 2 дні, за винятком головного мозку (приблизно 3 дні); (2) вплив на грам печінки був вищим, ніж на грам шкіри, серця й нирок, які були вищими, ніж у головному мозку; (3) при десятикратному перевищенні дози (10/1 мг/кг) значення C_{max} у всіх тестованих органах збільшувалися більше ніж у 10 разів у порівнянні з дозою 1 мг/кг.

Максимальна концентрація в головному мозку досягалася через 1-24 години (T_{max}) після ВВ введення.

Порівняння ВВ та ІТ-введення

Криві залежності концентрації від часу в головному мозку й печінці після ВВ та ІТ-введення доз 1 і 10 мг/кг порівнюються на Фігурі 164 і 165 відповідно. Відношення C_{max} у головному мозку при ІТ/ВВ введенні доз 1 і 10 мг/кг склали 3212 і 1501 відповідно. Зазначені відношення для $AUC_{0-192 \text{ год}}$ склали 1136 і 978. Дані результати показують, що коли вводили ту саму дозу HNS, інтратекальне введення призводило до впливу в головному мозку, більшого приблизно на 3 порядки, ніж призводило внутрішньовенне введення. Час напіввиведення в головному мозку склав 2 дні (45 і 49 годин при 1 і 10 мг/кг) при ІТ та 3 дні (71 і 60 годин при 1 і 10 мг/кг) при ВВ введенні при обох рівнях доз. Однак вплив у печінці після ІТ-введення був близьким до впливу після ВВ введення тієї ж дози HNS. Відношення C_{max} у печінці при ІТ/ВВ введенні 1 мг/кг і 10 мг/кг склали 0,5 і 0,8, а відношення AUC_{last} склали 0,4 і 1,2 відповідно.

Висновки

Профілі фармакокінетики й біорозподілу ^{124}I -сульфамідази (HNS) вивчали за допомогою ПЕТ тканин у щурів після однократного внутрішньовенного або інтратекального введення 1 або 10 мг/кг ^{124}I -сульфамідази. Дані залежності радіоактивності від часу одержували динамічним шляхом (у перші 20 хвилин) і статичним шляхом, одержуючи зображення розглянутих відділів через 0,05, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 і 192 години після введення препарату. Згідно з динамічними зображеннями в перші 20 хвилин після ІТ-введення загальна кількість HNS в області голови знижувалася з близькою сталою швидкістю 0,005/хв - 0,007/хв (середнє λ_z). Згідно зі статичними зображеннями, швидкості виведення з головного мозку були по суті однаковими при двох тестованих дозах (λ_z : 0,016/год і 0,014/год для 1 і 10 мг/кг відповідно) з близьким часом напіввиведення приблизно два дні.

Значення C_{max} і AUC_{last} були пропорційними дозі, яку вводили, і в діапазоні доз 1-10 мг/кг, які вводили в однократному ІТ режимі введення, була показана лінійна ФК поведінка.

При обох рівнях доз спостерігався градієнт концентрації від проксимального до дистального відділу хребта.

Після ІТ-введення максимальна концентрація відмічалася приблизно через 20 хвилин у проксимальному, через 1-4 години в середньому та через 1-8 годин у дистальному відділі. У різних відділах хребта також була показана лінійна ФК поведінка.

Після ІТ-введення рівень білка HNS кількісно визначався, починаючи з найбільш ранніх моментів часу до 96 годин при 1 мг/кг і до 192 годин при 10 мг/кг. Швидкість виведення при 1 мг/кг ($\lambda_z = 0,030/\text{год}$) була вищою, ніж швидкість виведення при 10 мг/кг ($\lambda_z = 0,017/\text{год}$), з відповідним більш коротким $t_{1/2}$ (28 ± 16 і 42 ± 1 години при дозах 1 і 10 мг/кг відповідно).

Після ВВ введення період напіввиведення в печінці, нирках, серці й шкірі склав 47 ± 10 і 38 ± 13 годин для печінки, 54 ± 25 і 29 ± 16 годин для нирок, 36 ± 15 і 42 ± 19 годин для серця та 40 ± 21 і 31 ± 13 годин для шкіри при 1 і 10 мг/кг відповідно; хоча період напіввиведення в головному мозку склав 71 ± 23 і 60 ± 53 години. Середні значення $C_{\max}$ для печінки, шкіри, нирок, серця і головного мозку склали 9,6; 0,30; 0,25; 0,22 і 0,08 мкг/г при дозі 1 мг/кг та 132; 7,9; 3,9; 3,7 і 1,8 мкг/г при дозі 10 мг/кг. Після того, як значення $C_{\max}$ для окремих тварин нормували на дозу, значення $C_{\max}/\text{дозу}$ при 10 мг/кг були значно вищими, ніж при 1 мг/кг у всіх перерахованих органах (максимальні значення $p < 0,05$, $p = 0,06$ для печінки). Значення AUC_{last} для печінки, шкіри, нирок, серця і головного мозку склали 525, 16, 14, 9 і 7 год.мкг/г при 1 мг/кг та 6747, 276, 183, 201 і 86 год.мкг/г при 10 мг/кг. Після нормування значення $AUC_{\text{last}}/\text{дозу}$ при 10 мг/кг були значно вищими, ніж при 1 мг/кг у шкірі ($p < 0,01$), мінімально відрізнялися в серці ($p = 0,06$) та незначучо відрізнялися в печінці, головному мозку й нирках (усі значення $p > 0,34$).

ПРИКЛАД 23: ЛІКУВАННЯ ПАЦІЄНТІВ ІЗ СИНДРОМОМ САНФІЛІППО ТИПУ А (САНФІЛІППО А) З ВИКОРИСТАННЯМ HNS

Пряме введення до ЦНС, наприклад, за допомогою ІТ доставки, можна застосовувати для ефективного лікування пацієнтів із синдромом Санфіліппо типу А. Даний приклад ілюструє багатоцентрове дослідження зі збільшенням дози, спрямоване на оцінку безпеки 3 рівнів доз rhHNS, які вводили один раз на два тижні (р/2 тижні) протягом 40 тижнів через пристрій інтратекальної доставки лікарських засобів (ПІДЛЗ) пацієнтам із синдромом Санфіліппо типу А. Різні варіанти пристроїв інтратекальної доставки лікарських засобів, застосованих для лікування людей, показані на Фігурах 94-97.

Усього в дослідження було включено до 20 пацієнтів:

Група 1: 5 пацієнтів (мінімальна доза)

Група 2: 5 пацієнтів (середня доза)

Група 3: 5 пацієнтів (максимальна доза)

5 пацієнтів були рандомізовані до групи, що не одержує препарат.

Для участі в дослідженні пацієнтів відбирали на основі наступних критеріїв включення:

Визначають безпеку доз HNS, що збільшуються, які вводили шляхом ІТ ін'єкцій протягом 40 тижнів пацієнтам із синдромом Санфіліппо типу А. Крім того, оцінюють клінічну активність HNS стосовно когнітивних функцій, а також фармакокінетику однократних і багатократних доз препарату в сироватці та концентрації в спинномозковій рідині (СМР).

ПРИКЛАДИ ІТ ДОСТАВКИ NAGLU-IGFII

ПРИКЛАД 24: ДОСЛІДЖЕННЯ rhNaglu I Naglu-IGFII IN VITRO

Механізм клітинного захоплення кожного з варіантів Naglu вивчали із застосуванням двох ліній фібробластів від пацієнтів із синдромом Санфіліппо В GM02391 (P359L) і GM 01426 (E153K) та лінії фібробластів від здорової людини. Дослідники традиційно використовують фібробласти для дослідження клітинного захоплення лізосомальних ферментів, оскільки зазначена лінія клітин експресує рецептори M6P.

Дослідження клітинного захоплення проводили шляхом інкубації фібробластів з rhNaglu або Naglu-IGFII протягом чотирьох годин при 37 °С. Після інкубації клітини промивали й лізували, потім у лізатах клітин визначали активність ферменту Naglu. Інкубація фібробластів з rhNaglu призводила до появи кількості ферменту всередині клітин, яка ледве визначалася. Напроти, інкубація фібробластів з Naglu-IGFII призводила до значного рівня ферменту всередині клітин (Фігура 166). Кількість інтерналізованого Naglu-IGFII досягала насичення, коли кількість ферменту, яку застосовували для інкубації, збільшували. Дозозалежне захоплення, що насичується, є типовою ознакою рецептор-опосередкованого клітинного захоплення. Крім того, інтерналізацію Naglu-IGFII не інгібувало введення екзогенного M6P, але повністю інгібувало введення екзогенного IGFII (Фігура 166). Зазначений результат вказує на те, що інтерналізація Naglu-IGFII в фібробластах залежить від рецептора M6P/IGFII і не залежить від глікозилування.

Також проводили експеримент із метою вивчення спрямованої міграції rhNaglu і Naglu-IGFII до лізосом. У даному дослідженні застосовували фібробласти від пацієнтів із синдромом Санфіліппо В (GM01426). Визначення rhNaglu і Naglu-IGFII проводили за допомогою фарбування клітин поліклональним антитілом до Naglu людини після початкової інкубації зазначених білків із зазначеними клітинами. Для визначення лізосом застосовували імуофлуоресцентне фарбування на LAMP-1 (асоційований із лізосомами мембранний білок 1). Сумісну локалізацію rhNaglu і Naglu-IGFII з лізосомами візуалізували на конфокальному мікроскопі (Фігура 167).

Масштабна інтерналізація Naglu-IGFII спостерігалася після 4-годинної інкубації зазначеного білка з зазначеними клітинами, була продемонстрована сумісна локалізація Naglu-IGFII з лізосомами. Навпроти, rhNaglu не демонструвала локалізацію в тих же часових рамках і не спостерігалася сумісної локалізації з лізосомами. Зазначений результат дає додаткове підтвердження того, що Naglu-IGFII інтерналізується до клітин і транспортується до потрібного компартменту клітини - до лізосом. Визначений час напівжиття інтерналізованого Naglu-IGFII у фібробластах пацієнтів із синдромом Санфіліппо В склав 1,5 дні (дані не показані).

ПРИКЛАД 25: ДОСЛІДЖЕННЯ IN VIVO У МОДЕЛЯХ НА МИШАХ

Канюльовані щури дикого типу (wt)

Крім моделі синдрому Санфіліппо В на мишах, для молекулярного скринінгу in vivo також застосовували щурів дикого типу з канюлею, модель тварин без недостатності. Канюльованим щурам wt хірургічним шляхом вживляли канюлю до поперекового та нижнього грудного відділу спинного мозку і через канюлю проводили однократну ін'єкцію 35 мкл у СМР. Критерії, які оцінювали при молекулярному скринінгу з застосуванням зазначеної моделі на тваринах, включали активність Naglu та імуногістохімічне дослідження головного і спинного мозку.

Модель синдрому Санфіліппо типу В на мишах

Модель синдрому Санфіліппо типу В на мишах (миші Naglu^{-/-}, миші Санфіліппо В) була створена Е. Neufeld із співавт. (Li HH, et al., PNAS 96(25): 14505-14510; 1999). 6-ий екзон гена Naglu миші руйнували шляхом вставки селектованого маркера - гена стійкості до неоміцину. Одержувана в результаті гомозиготна миша Naglu^{-/-} була повністю дефіцитною за Naglu (Фігура 168), і у неї в печінці й нирках відбувається повна акумуляція ГАГ. Незважаючи на повний дефіцит Naglu, зазначені миші в цілому здорові, і тривалість життя становить 8-12 місяців. Зміни експресії інших лізосомальних ферментів виникають приблизно у віці 5 місяців, зазначені зміни включають компенсаторне збільшення рівня β-галактозидази, α-глюкозидази, β-глюкуронідази і β-гексозамідази в печінці й головному мозку, підвищення рівня α-L-ідуронідази в печінці, але не в головному мозку, та зниження рівня нейрамінідази в печінці й головному мозку. Летальний результат зазвичай настає внаслідок затримки сечі та інфекцій сечовивідних шляхів. У літературі описані численні дослідження на моделі синдрому Санфіліппо типу В на мишах, спрямовані на опис патологічних змін при синдромі Санфіліппо типу В. Є повідомлення про те, що фенотип, пов'язаний із патологією ЦНС у мишей Naglu^{-/-}, має знижену активність у віці 4,5 місяці, але гіперактивність спостерігали також і у мишей іншого віку.

Описані нейропатологічні зміни у мишей Naglu^{-/-} включають вакуолі та тільки включення в нейронах, макрофагах і клітинах епітелію, що видно при ЕМ (електронній мікроскопії). Зазначені патологічні зміни зазвичай починають виникати до 33 дня після народження й прогресивно погіршуються в міру того, як тварина стає старшою. При гістопатологічному аналізі також можна продемонструвати активовані зірчасті клітини й клітини мікроглії. Біохімічний аналіз двох гангліозидів, GM2 і GM3, продемонстрував 5-кратне і 9-кратне збільшення їхнього рівня в головному мозку (Оскільки GM2 і GM3 не є прямими субстратами Naglu, і може бути важко продемонструвати значуще зниження після ЗФТ протягом короткого періоду часу, їх не застосовують як кінцеві біомаркери для експериментальної перевірки концепції).

Біохімічний аналіз проводили за допомогою вимірювання активності ферменту Naglu і рівнів ГАГ, гістопатологічний аналіз проводили з використанням імуногістохімічного фарбування з антитілом до Naglu людини, анти-LAMP-1 антитілом, анти-Iba-1 антитілом і анти-GFAP антитілом. Антитілом до Naglu людини, яке застосовували в даному дослідженні, було моноклональне антитіло миші, яке не зв'язується з ендегенною Naglu миші або мутованою Naglu у мишей із синдромом Санфіліппо типу В. При імуноному офарбленні на LAMP-1 застосовували антитіло, яке зв'язується з білком мембрани лізосом, асоційованим із лізосомами мембранним білком-1. При офарбленні на Iba-1 застосовували антитіло, яке зв'язується з іонізованим кальцій-зв'язуючим адапторним білком, який є специфічним для клітин мікроглії та макрофагів. При офарбленні на GFAP (гліальний фібрилярний кислий білок) застосовували антитіло, яке зв'язується з гліальним фібрилярним кислим білком, який є специфічним для астроцитів.

Скринінг біологічної активності *in vivo* при внутрішньочерепному (ВЧп) введенні мишам із синдромом Санфіліппо В

Мета даного дослідження полягала в оцінці біологічної активності ферментів Naglu *in vivo*. У даному дослідженні білки вводили за допомогою внутрішньочерепної ін'єкції в головний мозок мишам із синдромом Санфіліппо В. Вік мишей із синдромом Санфіліппо В для даного дослідження підбирали близьким до 8 тижнів. ВЧп шлях введення є найкращим сценарієм для оцінки ефективності зазначених молекул. Оцінювали здатність білків Naglu до захоплення нейронами й до скорочення лізосомального накопичення. Для оцінки біорозподілу застосовували імуногістохімічний спосіб, а лізосомальне накопичення описували за кількістю та об'ємом позитивного фарбування із застосуванням імунного фарбування на LAMP-1.

ВЧп ін'єкцію здійснювали у вигляді прямої ін'єкції через череп мишам із синдромом Санфіліппо В у кору правої півкулі. Кожній тварині вводили два мікролітри або 35 мкг білка Naglu. Умертвіння тварин проводили через 7 днів після ін'єкції. Час умертвіння заздалегідь визначили на основі пробного дослідження, в якому умертвіння тварин проводили через 3, 7 і 14 днів після ін'єкції. На основі даних пробного дослідження було визначено, що 7 днів після ін'єкції - оптимальний час для імуногістохімічного дослідження. Зрізи головного мозку одержували в поперечному напрямку (Фігура 169) та проводили імунне фарбування на Naglu і LAMP-1. Клітинне захоплення і нейронами, і клітинами глії у мишей із синдромом Санфіліппо В, що одержували rhNaglu і Naglu-IGFII, було продемонстроване з використанням імуногістохімічного способу із застосуванням антитіл до Naglu людини (Фігура 170 і Фігура 171). Стосовно клітинного захоплення, значущих відмінностей між мишами з синдромом Санфіліппо В, що одержували rhNaglu і Naglu-IGFII, не спостерігалось. Крім того, імунне фарбування на LAMP-1 тканини головного мозку у мишей, що одержували rhNaglu і Naglu-IGFII, вказує на значущий рівень зниження лізосомального накопичення. Рівень зниження лізосомального накопичення у груп, що одержували як rhNaglu, так і Naglu-IGFII, був майже однаковим із рівнем, який виявляли у здорових мишей wt.

Також зниження лізосомального накопичення спостерігалось у мишей із синдромом Санфіліппо В, що одержували Naglu-TAT, Naglu-Kif і PerT-Naglu, які вводили шляхом ВЧп ін'єкції (дані не показані). Дане дослідження продемонструвало біологічну активність *in vivo* усіх варіантів Naglu.

У окремому дослідженні миші з дефіцитом Naglu IT одержували основу або, як альтернативу, дози рекомбінантного гібридного білка Naglu-IgF-II (Naglu) в ФБР один раз на тиждень, один раз на два або один раз на три тижні. Як контроль дикого типу без введення препарату служила група мишей дикого типу, яким вводили основу без Naglu. Мишей умертвлювали через 24 години після останньої ін'єкції, після чого тканини підготовляли до імуногістохімічного (ІГХ) та гістопатологічного аналізу.

Розподіл Naglu в тканині головного мозку у мишей із дефіцитом Naglu був явним після IT-введення рекомбінантної Naglu. Як проілюстровано на Фігурі 172A, IT-введення рекомбінантної Naglu мишам із дефіцитом Naglu призводило до масштабного зниження вакуолізації клітин у тканинах білої речовини в порівнянні з мишами з дефіцитом Naglu, які одержували IT основу. Аналогічно і як проілюстровано на Фігурі 172B, морфометричний аналіз виявив виражене зниження імунного фарбування на LAMP-1 у тканинах білої речовини мишей, які одержували препарат, у порівнянні з мишами з дефіцитом Naglu, які не одержували препарат, що відображає покращення патологічних ознак захворювання.

Як показано на Фігурах 173A-B, у кожній оцінюваній зоні головного мозку (кора, хвостате ядро й шкарлупа (CP), таламус (TH), мозочок (CBL) і біла речовина (WM)) LAMP-позитивна зона скорочувалася у мишей, які одержували Naglu, в порівнянні з контрольними мишами з дефіцитом Naglu та наближалася до розміру LAMP-позитивної зони мишей дикого типу. Особливо примітним є те, що LAMP-позитивні площі в кожній аналізованій зоні тканини головного мозку ще більше скорочувалася після IT-введення двох або трьох доз (Фігура 173B) у порівнянні з однієї дозою (Фігура 173A) Naglu.

Зазначені результати підтверджують, що Naglu, введена IT, здатна модифікувати прогресування лізосомних хвороб накопичення, таких як синдром Санфіліппо типу В, у моделі мишей із дефіцитом Naglu, що дає додаткове підтвердження здатності ферментів, введених IT, таких як Naglu, боротися з проявами з боку ЦНС, асоційованими з лізосомальними хворобами накопичення, такими як синдром Санфіліппо типу В.

Молекулярний скринінг за допомогою інтратекального (IT) введення канюльованим щурам wt

У даному дослідженні прямо імітований спосіб введення лікарських препаратів через порт. Білок Naglu вводили за допомогою ІТ ін'єкцій канюльованим щурам wt, щоб визначити біорозподіл в паренхімі головного мозку.

Канюлю зазначеним тваринам установлювали у верхньому поперековому та нижньому грудному відділі спинного мозку (Фігура 174). Тваринам вводили 35 мкл або 385 мкг rhNaglu, Naglu-TAT, Naglu-IGFII і PerT-Naglu через зазначену канюлю (через обмежену розчинність Naglu-Kif вводили тільки в кількості 38,5 мкг, що в 10 разів менше, ніж доза інших варіантів Naglu). Умертвіння проводили через 14 год і 24 год після ін'єкцій.

Відбирали тканини головного і спинного мозку та проводили вимірювання активності Naglu. У головному мозку тварин, що одержували Naglu-TAT і Naglu-IGFII, активність ферменту була вищою, ніж у тварин, що одержували rhNaglu і всі інші варіанти Naglu (Фігура 175). У вигляді загальної тенденції активність Naglu була значно вищою в спинному мозку, ніж у головному мозку у всіх тварин, що одержували препарати (дані не показані). Зазначене явище може вказувати на те, що білки захоплювалися більшою мірою в ділянці, розташованій ближче до місця ІТ ін'єкції.

Імуногістохімічний аналіз показав, що біорозподіл у групі, що одержувала Naglu-IGFII, в головному мозку через 24 години після ІТ ін'єкцій був більш масштабним, ніж у групах, що одержували інші варіанти Naglu (Фігура 176 і Фігура 177). У тварин, що одержували rhNaglu, зазначений білок виявлявся в оболонках мозку тільки в головному мозку. У відділі спинного мозку ІГХ дослідження показало деякий ступінь клітинного захоплення rhNaglu в нейронах сірої речовини, але цей ступінь був набагато нижчим, ніж ступінь захоплення Naglu-IGFII нейронами спинного мозку (дані не показані).

У групі, що одержувала ІТ Naglu-TAT, хоча при біохімічному аналізі активність Naglu в тканинах головного мозку і була найвищою, ІГХ не показала ніякого проникнення Naglu-TAT до паренхіми головного мозку, крім збереження в оболонках мозку. Крім Naglu-IGFII, всі інші варіанти Naglu не продемонстрували біорозподілу за межами оболонок мозку, що є вагомим доказом залежності клітинного захоплення в головному мозку від рецепторів M6P/IGFII після ІТ-введення. Зазначене дослідження показало, що провідною молекулою для розробки препаратів від синдрому Санфіліппо В є Naglu-IGFII.

ПРИКЛАД 26: ДОСЛІДЖЕННЯ З МЕТОЮ ПІДТВЕРДЖЕННЯ КОНЦЕПЦІЇ З ЗАСТОСУВАННЯМ Naglu-IGFII

Схема експерименту

Дослідження з метою підтвердження концепції було розроблене таким чином, щоб показати біорозподіл та обернення лізосомального накопичення після ІТ ін'єкції Naglu-IGFII у мишей із синдромом Санфіліппо В. У рамках даного дослідження три групи мишей із синдромом Санфіліппо В у віці 8 тижнів одержували ІТ ін'єкції Naglu-IGFII. При кожній ІТ ін'єкції вводили об'єм 10 мкл або 260 мкг Naglu-IGFII. Усього було три лікувальні групи - група, що одержувала 1 ін'єкцію, група, що одержувала 2 ін'єкції, та група, що одержувала 3 ін'єкції. У групі 1 ін'єкції тварини однократно одержували дозу білка в день 0. Тварин умертвлювали через 24 години після ін'єкції. У групі 2 ін'єкцій ІТ ін'єкції вводили в день 0 та день 7 і тварин умертвлювали через 24 години після останньої ін'єкції. У групі 3 ін'єкцій ІТ ін'єкції вводили в день 0, день 7 та день 14 і тварин умертвлювали через 24 години після останньої ін'єкції. Також були включені три групи, що одержували тільки основу. У контрольних групах, які одержували тільки основу, миші з синдромом Санфіліппо В одержували ін'єкції основи з тими ж інтервалами часу, що й групи, які одержували препарат, і їх умертвлювали за таким же графіком, як і в лікувальних групах.

Для оцінки результату дослідження, проводили як біохімічний, так і гістологічний аналіз. Біологічний аналіз включав оцінку активності Naglu з метою визначення кількості ферменту в тканинах, а також оцінку загального вмісту ГАГ, щоб визначити скорочення лізосомального накопичення. Для біохімічного аналізу двома цільовими тканинами були печінка і головний мозок (Фігура 178 і Фігура 179). Гістологічний аналіз включав фарбування тканин Г/Е для морфологічної оцінки (дані не показані) та імуногістохімічне фарбування з застосуванням антитіла до Naglu людини, LAMP, Iba і GFAP (дані для фарбування на Iba і GFAP не показані).

Антитілом до Naglu людини, яке застосовували в даному дослідженні, було моноклональне антитіло миші, яке не зв'язується з ендогенною Naglu миші або мутованою Naglu у мишей із синдромом Санфіліппо типу В. При імунному офарбленні на LAMP-1 застосовували антитіло, яке зв'язується з білком мембрани лізосом, асоційованим із лізосомами мембранним білком. При офарбленні на Iba-1 застосовували антитіло, яке зв'язується з іонізованим кальцій-зв'язуючим адапторним білком, який є специфічним для клітин мікроглії та макрофагів. При офарбленні на GFAP (гліальний фібрилярний кислий білок) застосовували антитіло, що зв'язується з гліальним фібрилярним кислим білком, який є специфічним для астроцитів.

Показові мікроскопічні зображення імунофлуоресценції Naglu показані на Фігурі 181. На Фігурі 181 показаний показовий схематичний зріз головного мозку. Навіть незважаючи на те, що Naglu-IGFII виявлялася в корі великих півкуль, яка ближча до оболонок мозку, вона не виявлялася в таких підкіркових відділах, як хвостате ядро, таламус і біла речовина (дані не показані). Оскільки імунне фарбування на LAMP-1, Iba-1 і GFAP тих же підкіркових областей все-таки продемонструвало обернення лізосомального накопичення, було зроблене припущення, що негативне імунне фарбування на Naglu глибоких відділів мозку, ймовірно, було пов'язане з чутливістю імунофлуоресценції Naglu.

Показові мікроскопічні зображення імунного фарбування на LAMP-1 показані на Фігурах 182-186. Щоб продемонструвати ступінь розподілу білка й ефективність для імуногістологічного аналізу, були вибрані кора великих півкуль і такі підкіркові відділи, як хвостате ядро, таламус і біла речовина, а також кора мозочка. Результати імунного фарбування на Iba-1 і GFAP (дані не показані) показали, що результат, який спостерігали при імунному офарбленні на LAMP-1, відображав поєднувальний ефект змін у клітинах мікроглії та астроцитах - двох типах клітин, які за повідомленнями уражаються в моделі синдрому Санфіліппо В на мишах (Li 2002, Ohmi 2002) поряд із нейронами. Через технічні обмеження імунне фарбування на LAMP-1 не дозволяло виявити лізосомальне накопичення в нейронах. Зазвичай для найбільш успішної візуалізації накопичення в нейронах, таких як вакуолі та включення, застосовують електронну мікроскопію (ЕМ не включена до даного дослідження).

Слід розуміти, що ідентифікація типів клітин обмежувалася нейронами і клітинами глії. Зазвичай нейрони ідентифікували за відносно великим і блідим ядром, яке містило одне або більше інтенсивно офарблених ядерець і часто - офарблену цитоплазму. Клітини глії зазвичай ідентифікували за маленькими інтенсивно офарбленими ядрами і блідою цитоплазмою. Розрізнення різних типів клітин глії, таких як зірчасті клітини, клітини мікроглії, епіндимальні клітини і олігодендроцити, зазвичай краще проводити шляхом фарбування специфічними маркерами на різні типи клітин.

Крім скорочення лізосомального накопичення, яке виявляється при імунному офарбленні на LAMP-1, імунне фарбування на Iba-1 показало зменшення розміру й числа відростків клітин мікроглії, а імунне фарбування на GFAP показало зменшення розміру й довжини/числа відростків астроцитів у корі великих півкуль, хвостатому ядрі, таламусі й білій речовині, а також у корі мозочка після ІТ ін'єкцій Naglu-IGFII (дані не показані). Крім того, гістопатологічний аналіз, проведений шляхом фарбування Г/Е (гематоксиліном і еозином) тканин головного мозку з тих же областей, які досліджували імуногістохімічно, продемонстрував скорочення вакуолей у клітинах глії після 3 ІТ ін'єкцій Naglu-IGFII. Усі результати, що згадуються вище, також вказують на дозозалежний ефект ІТ ін'єкцій Naglu-IGFII.

Біохімічний аналіз мишей із синдромом Санфіліппо В після ІТ ін'єкцій Naglu-IGFII виявив активність Naglu в головному мозку та печінці. Ефективність Naglu-IGFII була продемонстрована за зменшенням загальної кількості ГАГ у головному мозку та печінці. Імуногістохімічний аналіз продемонстрував біорозподіл Naglu-IGFII в паренхімі головного мозку. Імунне фарбування на LAMP-1, Iba-1, GFAP і гістопатологічний аналіз із застосуванням фарбування Г/Е виявив скорочення лізосомального накопичення, зменшення розміру й відростків у клітин мікроглії та астроцитів не тільки в області кори великих півкуль, але також у підкіркових відділах, білій речовині й корі мозочка головного мозку.

Висновки

Крім іншого, було продемонстровано, що гібридний білок Naglu-IGFII проявляє ферментативну активність *in vitro* стосовно субстрату, який має структуру, близьку до структури нативного субстрату Naglu. Дослідження клітинного захоплення *in vitro* продемонструвало, що молекула захоплюється клітинами при участі рецептора M6P/IGFII і незалежно від глікозилювання M6P. Було показано, що інтерналізований білок Naglu-IGFII локалізований разом із лізосомами. Було показано, що Naglu-IGFII скорочує лізосомальне накопичення *in vivo* після ВЧп ін'єкції мишам із синдромом Санфіліппо В. У порівнянні з rhNaglu та іншими гібридними білками й модифікаціями Naglu, Naglu-IGFII перевершує їх усіх за проникненням до паренхіми головного мозку щурів дикого типу з канюлею після ІТ ін'єкції. Крім того, ІТ-введення Naglu-IGFII мишам із синдромом Санфіліппо В продемонструвало великий розподіл за межі оболонок мозку; і в корі великих півкуль, і в підкіркових відділах спостерігалось обернення лізосомального накопичення. У сукупності перераховані дані вказують на те, що Naglu-IGFII є кандидатом у препарати для лікування синдрому Санфіліппо В.

ПРИКЛАД 27: ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ, ФАРМАКОКІНЕТИКИ (ФК) І БІОРОЗПОДІЛУ В ТКАНИНАХ NAGLU-IGFII, ЯКУ ВВОДИЛИ ІТ

Дослідження з метою підтвердження правильності концепції на мишах

Трьом групам мишей Naglu (-/-) ($n = 3$) вводили 10 мкл, що містять 260 мкг Naglu-IGFII, в формі болюсної ІТ ін'єкції в поперековий відділ. Доза 260 мкг відповідає 520 мг/кг маси головного мозку (мозок миші = 0,0005 кг). Одній групі ін'єкцію здійснювали в день 0 і умиртвлювали через 24 години після ін'єкції. Другій групі ін'єкцію здійснювали в день 0 та 7 і умиртвлювали через 24 години після останньої ін'єкції. Третій групі ін'єкцію здійснювали в день 0, 7 та 14 і умиртвлювали через 24 години після останньої ін'єкції. Кожна група, яка одержувала Naglu-IGFII, була доповнена відповідною контрольною групою, яка одержувала основу, щоб контролювати вплив віку/тяжкості захворювання.

Активність ферменту Naglu в головному мозку та печінці була близькою в усіх трьох групах, що одержували Naglu-IGFII. При порівнянні активності ферменту Naglu в головному мозку та печінці, в печінці була виявлена активність, вища більш ніж у 10 разів. Оскільки рівень активності ферменту Naglu в головному мозку та печінці був порівнянним через 1, 3 і 6 місяців введення препарату в пробних дослідженнях токсичності у щурів і молодих мавп, припускалося, що деяка частина дози rhNaglu, яку вводили мишам Naglu (-/-), може доставлятися не ІТ, а скоріше системно. Проте, загальний рівень ГАГ у головному мозку продемонстрував статистично значуще зниження після 3 ІТ ін'єкцій ($p < 0,05$). У печінці спостерігалася тенденція до залежності від дози відносно загального рівня ГАГ, яка була статистично значущою ($p < 0,05$) у групах, що одержували 2 або 3 дози.

Після ІТ ін'єкції розподіл Naglu-IGFII спостерігався далеко за межами оболонки мозку, у паренхімі головного мозку, але глибокі підкіркові відділи були негативними при імунному офарбленні анти-Naglu антитілом. Зниження лізосомальної активності, яка визначалася за імунним фарбуванням на асоційований із лізосомами мембранний білок (LAMP), спостерігалася тільки в групах, що одержували 2 і 3 дози. Області зниження лізосомальної активності включали кору великих півкуль і глибокі підкіркові відділи - хвостате ядро, таламус і білу речовину. Таким чином, зниження різних показників імунного фарбування у тварин, які одержували Naglu-IGFII, вказує на те, що можуть бути присутніми терапевтичні рівні Naglu, незважаючи на відсутність імунного фарбування анти-Naglu. Зменшення запальної реакції виявлялося за зменшенням імунного фарбування астроцитів на антигліальний фібрилярний кислий білок (GFAP) і за зменшенням фарбування клітин мікроглії/макрофагів на кальцій-зв'язуючий адапторний білок (Iba) тільки в групах, що одержували 2 і 3 дози. Області аналізу включали кору великих півкуль і глибокі підкіркові відділи - хвостате ядро, таламус і білу речовину.

Дослідження на щурах

Як вид гризунів для токсикологічної оцінки ІТ-введення Naglu-IGFII були вибрані щури С-Д. У результаті, шістнадцяти щурам (по вісім на статі) вводили рекомбінантний Naglu-IGFII в максимальній допустимій дозі (МДД) та приблизно $\frac{1}{4}$ і $\frac{1}{2}$ від МДД (низькі і середні дози відповідно) один раз на 4 дні, всього 8 доз.

Дослідження ФК/біорозподілу однократних доз проводили на щурах, щоб визначити концентрацію в СМР і сироватці або розподіл у тканинах відповідно, після ІТ-П введення самцям і самкам тварин.

Токсикологічні дослідження спрямовані на оцінку ІТ-П введення Naglu-IGFII з точки зору токсикології та фармакологічної безпеки (безпека для нервової, дихальної та серцево-судинної системи) як у самців, так і самок. Токсикологічна оцінка в зазначених дослідженнях включає спостереження за клінічними ознаками, масою тіла, споживанням їжі, лабораторну діагностику, відповідну оцінку фармакологічної безпеки (за фізикальним обстеженням і електрокардіографією), макроскопічну й мікроскопічну оцінку тканин. Відбирають обмежену кількість проб СМР і сироватки й аналізують їх на наявність Naglu-IGFII, а також на антитіла до тестованої речовини. Розподіл Naglu-IGFII в тканині та субклітинну локалізацію Naglu-IGFII кількісно оцінюють за активністю ферменту та імуногістохімічно відповідно. Крім того, вибрані дослідження включають період відновлення для оцінки оборотності або потенційних віддалених проявів будь-яких виявлених значущих токсикологічних змін.

Дослідження на мавпах

Як вид негризунів для токсикологічної оцінки ІТ-введення Naglu-IGFII були вибрані яванські макаки, оскільки вони генетично й анатомічно близькі людям, і, отже, припускається, що це найбільш придатний вид. З урахуванням того, що планована популяція пацієнтів для участі в клінічних дослідженнях лікування синдрому Санфіліппо типу В - це діти, хронічне 6-місячне токсикологічне дослідження проводили на молодих довгохвостих макаках із пристроєм інтратекальної доставки лікарських засобів (ПІДЛЗ) для введення Naglu-IGFII. На початку дослідження молоді яванські макаки зазвичай були молодше 1 року (приблизно 7-9 місяців) і важили від 900 г до 1500 г. Дані, отримані в дослідженні токсичності 1-місячного багатократного введення молодим довгохвостим макакам, допомогли при виборі рівня доз і схеми

експерименту для 6-місячного дослідження на молодих довгохвостих маках. Токсикологічні дослідження багатократного введення спрямовані на імітування очікуваного клінічного шляху введення (ІТ-П болюсне) і частоти введення (один раз на два тижні; р/2 тижні) протягом 1-6 місяців.

5 Як описувалося вище, токсикологічні дослідження спрямовані на оцінку ІТ-П введення Naglu-IGFII з точки зору токсикології та фармакологічної безпеки (безпека для нервової, дихальної й серцево-судинної системи) як у самців, так і самок. Токсикологічна оцінка в зазначених дослідженнях включає спостереження за клінічними ознаками, масою тіла, споживанням їжі, лабораторну діагностику, відповідну оцінку фармакологічної безпеки (за фізикальним обстеженням і електрокардіографією), макроскопічну й мікроскопічну оцінку тканин. Відбирають обмежену кількість проб СМР і сироватки та аналізують їх на наявність Naglu-IGFII, а також на антитіла до тестованої речовини. Розподіл Naglu-IGFII в тканині та субклітинну локалізацію Naglu-IGFII кількісно оцінюють за активністю ферменту та імуногістохімічним способом відповідно. Крім того, вибрані дослідження включають період відновлення для оцінки оборотності або потенційних віддалених проявів будь-яких виявлених значущих токсикологічних змін.

ПРИКЛАД 28: ІНТРАТЕКАЛЬНЕ ВВЕДЕННЯ NAGLU-IGFII ОДИН РАЗ НА ДВА ТИЖНІ

У даному прикладі передбачається визначити допустимість ІТ-введення 6 ін'єкцій (3-місячне дослідження) один раз на два тижні в поперековий відділ мишам у моделі Naglu -/-. Зазначений режим введення може мати більш високу клінічну значущість, ніж введення один раз на тиждень.

У дослідженні застосовували самців і самок мишей Naglu -/- у віці вісім тижнів у відповідності з наступною схемою експерименту:

Таблиця 49

Схема експерименту ІТ доставки Naglu-IGFII р/2 тижні

Група	N	Препарат	Доза	Частота	Умертвіння
A	3	Основа	НЗ	ІТ ін'єкція р/2 тижні протягом 3 місяців (усього 6 ін'єкцій)	Через 24 год після останньої ін'єкції
B	6	Naglu-IGFII	60 мг/кг маси головного мозку (30 мкг)	ІТ ін'єкція р/2 тижні протягом 3 місяців (усього 6 ін'єкцій)	Через 24 год після останньої ін'єкції

Проводили фізіологічні дослідження, включаючи оцінку активності Naglu в печінці, головному мозку й сироватці, визначення анти-Naglu антитіл у сироватці та BCA оцінку в печінці й головному мозку. Проводили гістологічні дослідження, включаючи IPX Naglu у головному, спинному мозку й печінці, і фарбування на LAMP у головному й спинному мозку.

30 Головний, спинний мозок і печінку відбирали й фіксували в 10 % нейтральному буферному формаліні. Для гістологічного фарбування готували парафінові зрізи з кроком 5 мкм. Для визначення клітинного захоплення білка, який вводили, застосовували імуногістохімічне (ІГХ) фарбування на Naglu. Для відстеження морфологічних змін застосовували фарбування Г/Е. Для оцінки гістопатологічного покращення застосовували: LAMP - індикатор лізосомальної активності та статусу захворювання, GFAP і Iba-1 - два маркери патології ЦНС стосовно активованих астроцитів і клітин мікроглії.

35 Імунне фарбування головного, спинного мозку й печінки на Naglu у мишей, які одержували тільки основу, і мишей, які одержували Naglu-IGFII, продемонструвало, що в головному та спинному мозку введена Naglu виявлялася в оболонках мозку (М) тільки при ІГХ, але в жодному іншому відділі позитивного фарбування на Naglu не визначалося (Фігура 187). У печінці позитивно офарбленими на Naglu були синусоїдальні клітини (S), а в гепатоцитах (H) захоплення Naglu не виявлялося.

40 Імунне фарбування на LAMP, а також фарбування Г/Е печінки й спинного мозку мишей, які одержували тільки основу, і мишей, які одержували Naglu-IGFII, продемонструвало, що в порівнянні з мишами, які одержували тільки основу, фарбування LAMP знижувалося по всій печінці та спинному мозку мишей, які одержували Naglu. фарбування Г/Е продемонструвало, що вакуолізація в гепатоцитах явно знижувалася у груп, які одержували препарат, у порівнянні з тваринами, які одержували тільки основу (Фігура 188 і Фігура 189).

50 фарбування Г/Е головного мозку мишей, які одержували тільки основу, і мишей, які одержували Naglu-IGFII, продемонструвало морфологічне покращення в головному мозку після

6 ІТ ін'єкцій Naglu-IGFII, які проводили один раз на два тижні протягом 3 місяців. У головному мозку тварин, що одержували препарат, вакуолізація клітин (показана стрілками) знижувалася у всіх досліджуваних областях у порівнянні з групою, що одержувала тільки основу (Фігура 190).

ІГХ на LAMP у різних відділах головного мозку після 6 ІТ ін'єкцій Naglu-IGFII, які проводили один раз на два тижні протягом 3 місяців, продемонструвало, що в порівнянні з групою, яка одержувала тільки основу, ІТ-введення Naglu мишам із SFB призводило до зниження лізосомальної активності у всіх досліджуваних областях, що визначали за імунним фарбуванням на LAMP (Фігура 190). Зазначене зниження характеризувалося зменшенням кількості LAMP-позитивних клітин, зменшенням розміру клітин і більш світлим фарбуванням. Значуще в порівнянні з іншими відділами головного мозку зниження було виявлене в мозочку і стовбурі головного мозку, який розташований у нижній частині головного мозку, наближений до спинного мозку. Також явне зниження було виявлене в глибоких відділах головного мозку, включаючи білу речовину, гіпокамп і таламус.

ІГХ на Iba в різних відділах головного мозку після 6 ІТ ін'єкцій Naglu, проведених протягом 3 місяців, виявило активацію клітин мікроглії (Фігура 191). У порівнянні з групою, що одержувала тільки основу, зниження кількості позитивно офарблених клітин та інтенсивності фарбування в групі, що одержувала Naglu, не спостерігалось. Однак змінювалася клітинна морфологія позитивно офарблених клітин мікроглії та зменшувався розмір клітин у всіх досліджуваних областях головного мозку в порівнянні з великими й вакуолізованими клітинами в групі, що одержувала тільки основу (урізання).

ІГХ на GFAP у різних відділах головного мозку після 6 ІТ ін'єкцій Naglu, які проводили протягом 3 місяців, виявило активацію астроцитів (Фігура 192). У порівнянні з групою, що одержувала тільки основу, позитивне фарбування на GFAP знижувалося в мозочку і стовбурі головного мозку та злегка знижувалося в інших досліджуваних відділах.

Стосовно клітинного захоплення, зазначені дані демонструють, що в головному і спинному мозку Naglu виявлялася в клітинах оболонки мозку тільки після 6 ІТ ін'єкцій Naglu-IGFII, які проводили один раз на два тижні протягом 3 місяців. Naglu не виявлялася ІГХ способом у жодній із інших областей головного і спинного мозку. У печінці позитивне фарбування на Naglu виявлялося в синусоїдальних клітинах. У головному і спинному мозку після 6 ІТ ін'єкцій Naglu-IGFII, які проводили один раз на два тижні протягом 3 місяців, по всьому головному і спинному мозку спостерігалось гістопатологічне покращення, навіть незважаючи на те, що введена Naglu не виявлялася ІГХ способом. фарбування Г/Е продемонструвало зниження вакуолізації клітин у всіх досліджуваних відділах головного мозку. фарбування на LAMP знижувалося в спинному мозку всіх тварин, що одержували препарат, та у всіх досліджуваних відділах головного мозку, включаючи білу речовину, гіпокамп і таламус, які є глибокими зонами головного мозку, з вираженим зниженням у мозочку і стовбурі головного мозку груп, що одержували Naglu-IGFII. Менш інтенсивний характер фарбування на GFAP у астроцитах узгоджувався з фарбуванням на LAMP, хоча зниження фарбування на GFAP було не настільки суттєвим, як на LAMP. фарбування на Iba-1 продемонструвало зменшення розміру клітин мікроглії в усіх досліджуваних відділах головного мозку. У печінці фарбування Г/Е продемонструвало зниження вакуолізації з вираженим зниженням фарбування на LAMP у груп, що одержували Naglu.

ПРИКЛАД 29: ЛІКУВАННЯ ПАЦІЄНТІВ ІЗ СИНДРОМОМ САНФІЛІППО ТИПУ В

Пряме введення до ЦНС, наприклад, за допомогою ІТ доставки, можна застосовувати для ефективного лікування пацієнтів із синдромом Санфіліппо типу В. Даний приклад ілюструє багатоцентрове дослідження зі збільшенням дози, спрямоване на оцінку безпеки 3 рівнів доз Naglu-IGFII і/або rhNaglu, які вводили один раз на два тижні (р/2 тижні) протягом 40 тижнів через пристрій інтратекальної доставки лікарських засобів (ПІДЛЗ) пацієнтам із синдромом Санфіліппо типу В. Різні варіанти пристроїв інтратекальної доставки лікарських засобів, застосованих для лікування людей, показані на Фігурах 94-97.

Усього в дослідження було включено до 20 пацієнтів:

Група 1: 5 пацієнтів (мінімальна доза)

Група 2: 5 пацієнтів (середня доза)

Група 3: 5 пацієнтів (максимальна доза)

5 пацієнтів були рандомізовані до групи, що не одержує препарат.

Для участі в дослідженні пацієнтів відбирали на основі наступних критеріїв включення:

Визначають безпеку доз Naglu-IGFII, що збільшуються, які вводили шляхом ІТ ін'єкцій, протягом 40 тижнів пацієнтам із синдромом Санфіліппо типу В. Крім того, оцінюють клінічну активність Naglu-IGFII і/або rhNaglu відносно когнітивних функцій, а також фармакокінетику однократних і багаторазових доз препарату в сироватці та концентрації в спинномозковій рідині (СМР).

Зазвичай терапевтично ефективну кількість Naglu-IGFII і/або rhNaglu вводять інтратекально з регулярними інтервалами, в залежності від природи і ступеня ефектів захворювання, на постійній основі. Термін «введення з певними інтервалами» у даній заявці означає, що терапевтично ефективну кількість вводять періодично (на відміну від введення однократної дози). Зазначений інтервал можна визначити з використанням стандартних клінічних способів. Згідно з деякими варіантами реалізації, rhNaglu вводять інтратекально один раз на два місяці, один раз на місяць, два рази на місяць, один раз на три тижні, один раз на два тижні, один раз на тиждень, два рази на тиждень, три рази на тиждень або один раз на день. Інтервал введення для конкретного індивідуума не обов'язково повинен бути фіксованим інтервалом, а може варіювати в часі в залежності від потреб індивідуума. Наприклад, у момент соматичного захворювання чи стресу, якщо з'являються анти-Naglu антитіла або зростає їхній рівень, або якщо симптоми захворювання погіршуються, інтервал між дозами можна зменшувати.

Хоча певні сполуки, композиції та способи, які описуються в даній заявці, були описані специфічно в рамках певних варіантів реалізації, наступні приклади служать тільки для ілюстрування сполук згідно з даним винаходом, але не повинні обмежуватися тільки цими сполуками.

Застосовувані в даному документі в описі та в доданій формулі винаходу форми однини, якщо явно не зазначено інше, включають множину. Умови формули винаходу або опису, в яких зустрічається «або» між одним або більше членами групи, вважаються задоволеними, якщо один, більше одного або вся група членів присутні, використовуються або іншим чином належать до даного продукту чи способу, якщо не зазначено протилежне або інше не впливає явно з контексту. Даний винахід включає варіанти реалізації, в яких один член зазначеної групи точно присутній, використовується або іншим чином належить до даного продукту або способу. Даний винахід також включає варіанти реалізації, в яких більше одного або ціла група членів присутня, використовується або іншим чином належить до даного продукту чи способу. Крім того, слід розуміти, що даний винахід охоплює всі варіанти, комбінації й перетворення, в яких одне або більше обмежень, елементів, умов, описових виразів та ін., з одного або більше перерахованих пунктів формули винаходу введені до іншого пункту формули винаходу, залежного від того ж основного пункту формули винаходу (або, якщо це є значущим, кожного іншого пункту формули винаходу), якщо не зазначено інше або якщо фахівцеві в даній області техніки не очевидно, що може виникнути протиріччя чи невідповідність. Коли елементи присутні в переліках (наприклад, група Маркуша або аналогічна форма), слід розуміти, що також розкривається кожна підгрупа елементів і будь-які елементи з даної групи можна видалити. Слід розуміти, що зазвичай там, де даний винахід або аспекти винаходу описуються як такі, що містять конкретні елементи, ознаки та ін., певні варіанти реалізації даного винаходу або аспектів винаходу включають чи по суті включають такі елементи, ознаки та ін. З метою спрощення в даній заявці зазначені варіанти реалізації не були в кожному випадку описані так буквально. Слід розуміти, що будь-який варіант реалізації або аспект даного винаходу можна в явній формі виключити з формули винаходу, незалежно від того, чи обмежене таке конкретне виключення в описі. Публікації, інтернет-сайти та інші довідкові матеріали, на які посилається даний документ із метою опису рівня техніки в області винаходу та для надання додаткових подробиць стосовно його впровадження в практику, включені до даного документа за допомогою посилання.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Застосування фармацевтичної композиції, що включає фермент заміщення для лізосомального ферменту, у виготовленні лікарського засобу для введення суб'єкту, що страждає на або має схильність до лізосомної хвороби накопичення, асоційованої зі зниженням рівня або активності лізосомального ферменту, яке **відрізняється** тим, що композиція включає лізосомальний фермент, присутній у концентрації 10-150 мг/мл, до 20 мМ фосфату та має рН в діапазоні 5,5-7,0.

2. Застосування за п. 1, у якому фермент присутній у концентрації 10 мг/мл.

3. Застосування за п. 1, у якому фермент присутній у концентрації 30 мг/мл.

4. Застосування за будь-яким з пп. 1-3, у якому фосфат присутній у концентрації до 10 мМ.

5. Застосування за будь-яким з пп. 1-3, у якому фосфат присутній у концентрації до 5 мМ.

6. Застосування за будь-яким з пп. 1-5, у якому композиція має рН близько 6.

7. Застосування за п. 1, у якому композиція додатково включає поверхнево-активну речовину та регулятор тонічності.

8. Застосування за п. 7, у якому поверхнево-активна речовина включає полісорбат або полуксамер.
9. Застосування за п. 8, у якому полісорбат або полуксамер представлено у концентрації від 0,005 до 0,2 %.
- 5 10. Застосування за п. 8, у якому полісорбат або полуксамер представлено у концентрації від 0,005 до 0,02 %.
11. Застосування за будь-яким з пп. 1-10, у якому композиція призначена для введення в об'ємі однієї дози, меншому за 5 мл або меншому за 3 мл.
12. Застосування за будь-яким з пп. 1-11, у якому фермент доставляють до глибоких тканин мозку щонайменше на 10 мм глибше від зовнішньої поверхні або фермент заміщення специфічно доставляють до лізосом глибоких тканин мозку.
- 10 13. Застосування за п. 12, у якому фермент доставляють в дозі:
(i) від 0,005 до 100 мг/кг маси мозку;
(ii) більший за 1 мг/кг маси мозку;
- 15 (iii) більший за 10 мг/кг маси мозку; або
(iv) більший за 30 мг/кг маси мозку.
14. Застосування за будь-яким з пп. 1-13, де фермент заміщення:
(i) містить залишки маноза-6-фосфату (М6Р);
(ii) являє собою гібридний білок, який містить групу, яка забезпечує спрямовану доставку до лізосом.
- 20 15. Застосування за будь-яким з пп. 1-14, у якому композицію вводять інтратекально.
16. Застосування за будь-яким з пп. 1-15, у якому композицію вводять внутрішньошлуночково.
17. Застосування за будь-яким з пп. 1-16, у якому
(i) лізосомна хвороба накопичення вибрана з групи, яка включає синдром Хантера, метакроматичну лейкодистрофію (МЛ), синдром Санфіліппо типу А, синдром Санфіліппо типу В і лейкодистрофію глободних клітин (ЛГК), та фермент заміщення необов'язково вибраний з групи, яка включає рекомбінантні ідуонат-2-сульфатазу (I2S), арилсульфатазу А (АSА), гепаран-N-сульфатазу (HNS), альфа-N-ацетилглюкозамінідазу (Naglu) і β-галактозидазу (GLC).
- 25

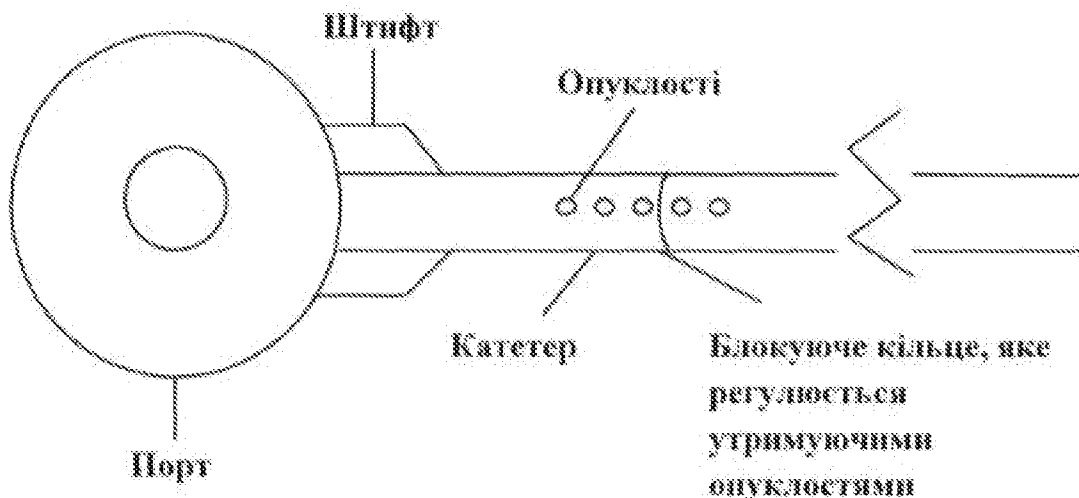


Fig. 1

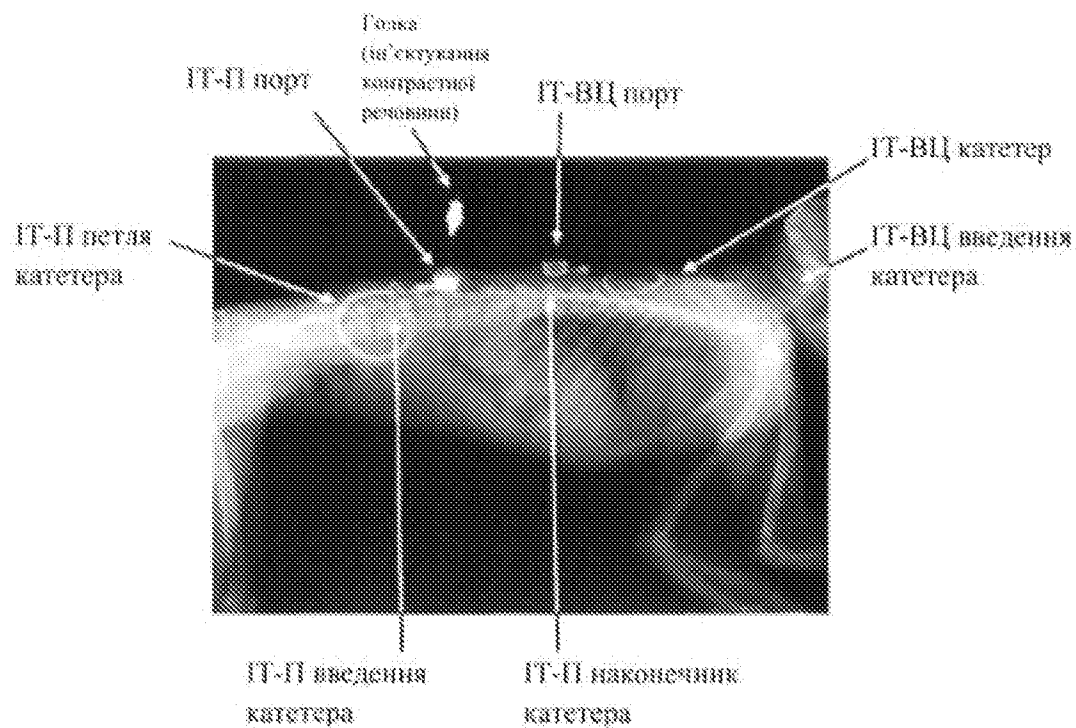


Fig. 2A

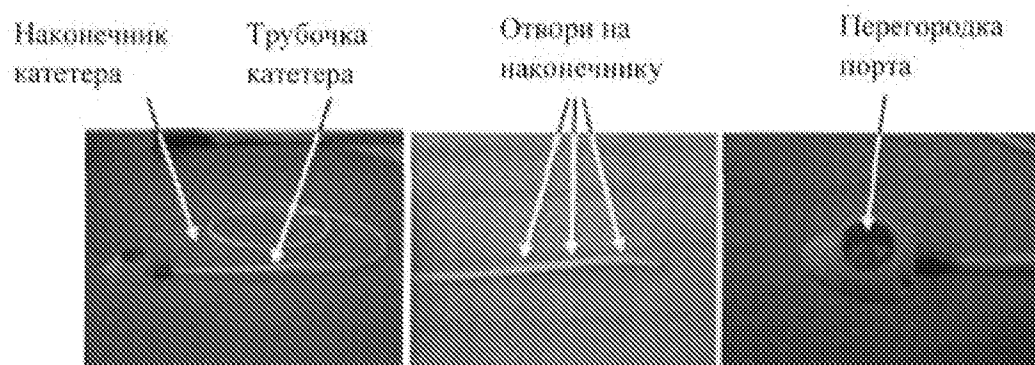
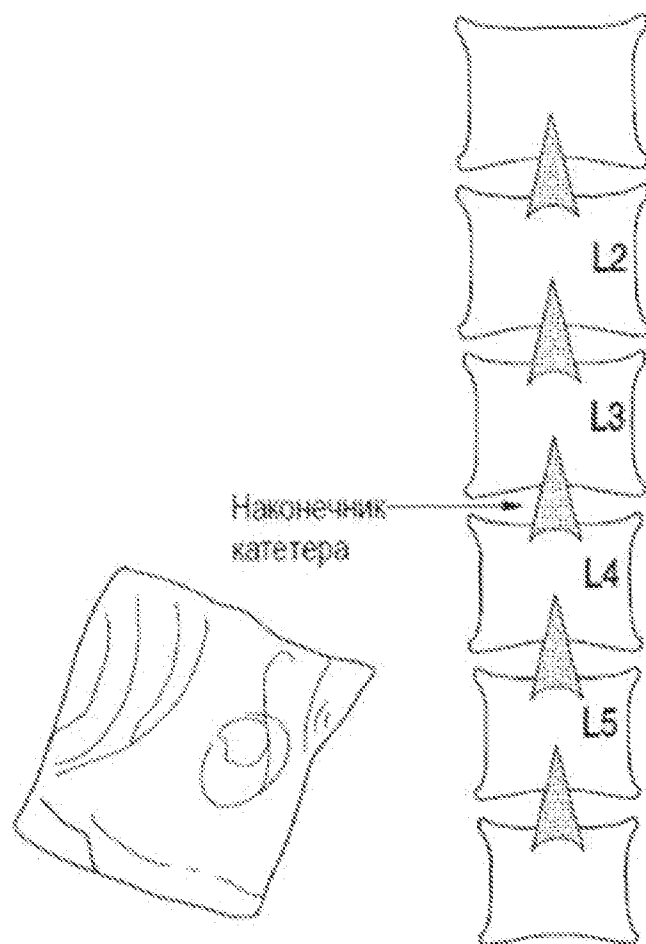
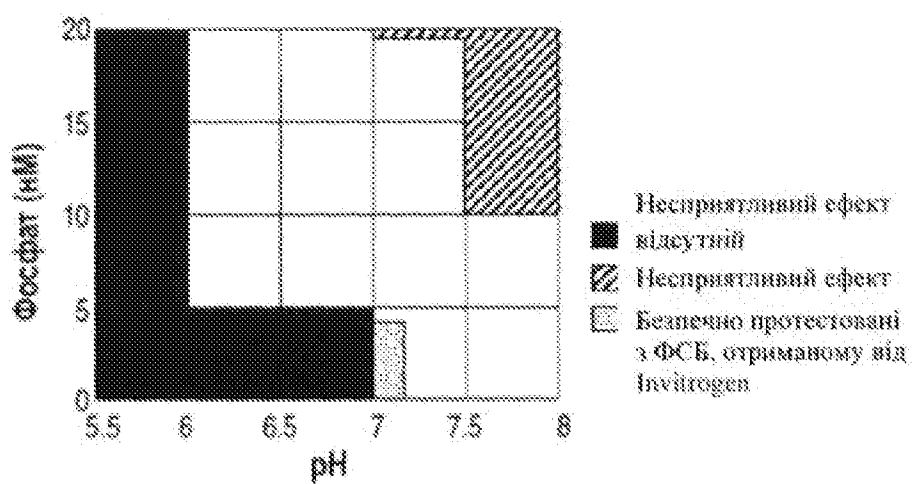


Fig. 2B

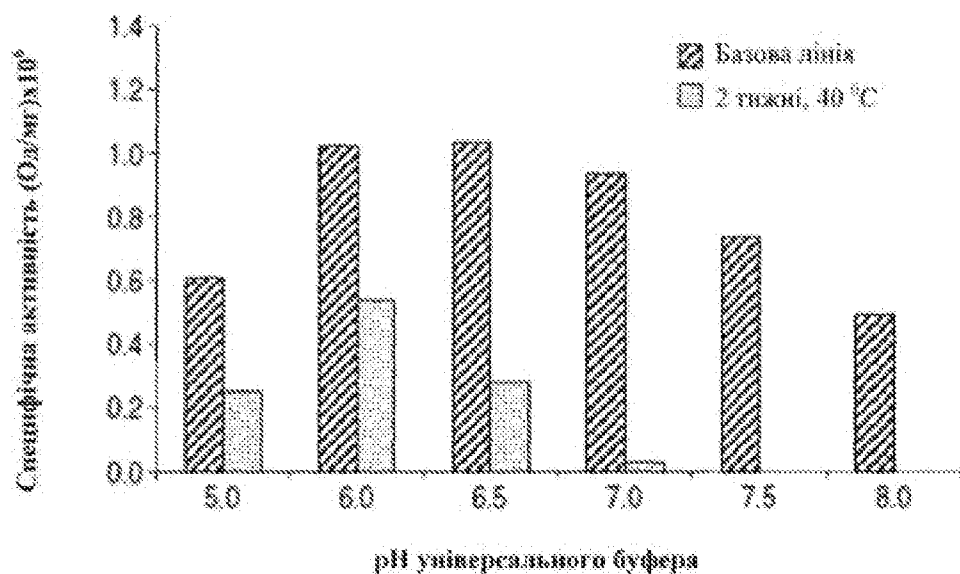


Фіг. 2С



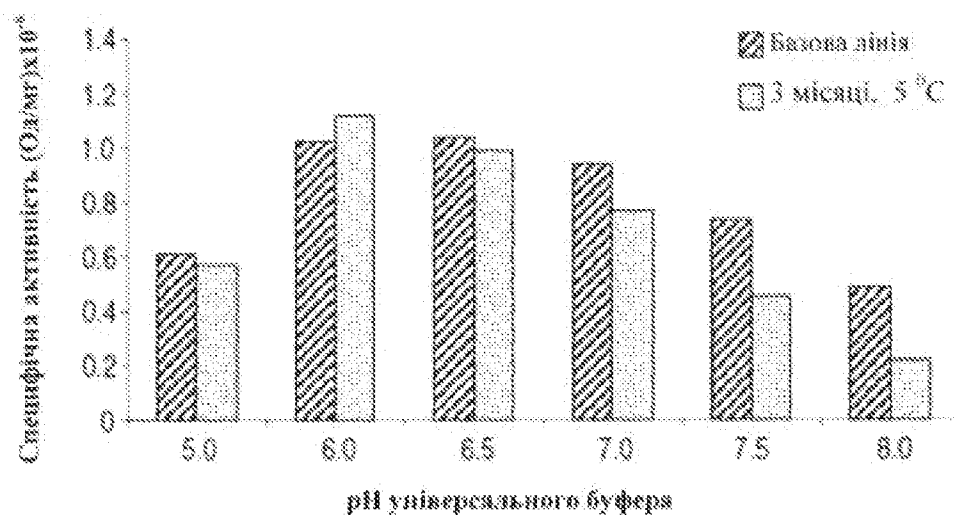
Фіг. 3

Інформація про наповнювачі, протестовані на дорослих мавпах



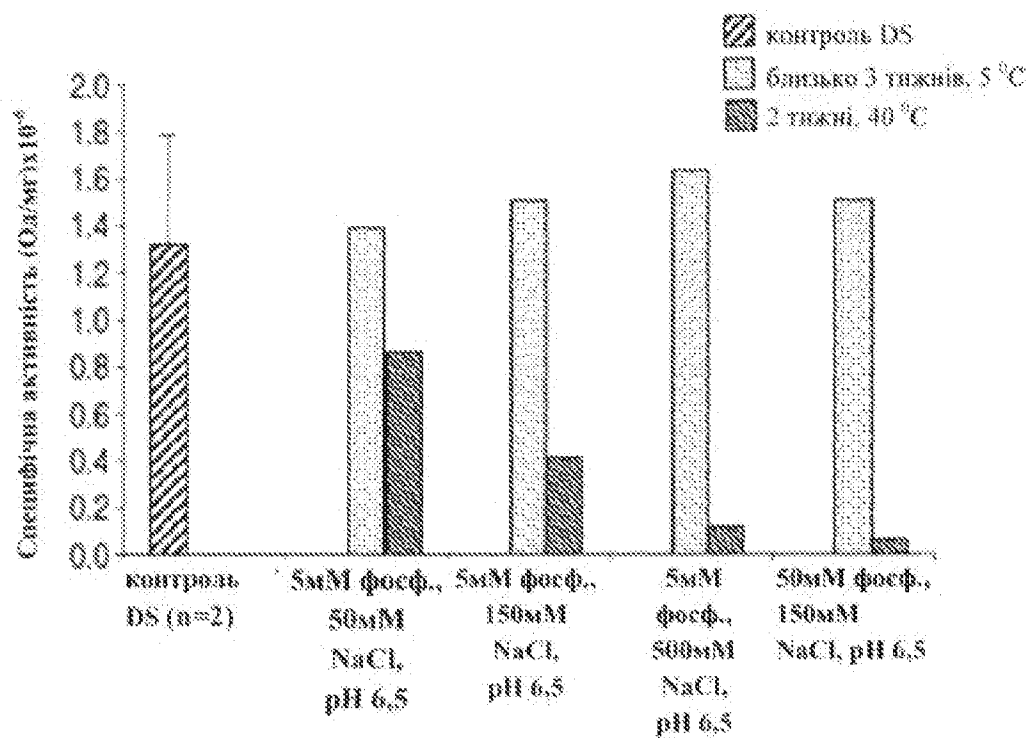
Фіг. 4А

Термічний скринінг hGalC у залежності від pH
1 мг/мл GalC в 3 мМ цитратному, фосфатному і боратному буфері з 50 мМ NaCl

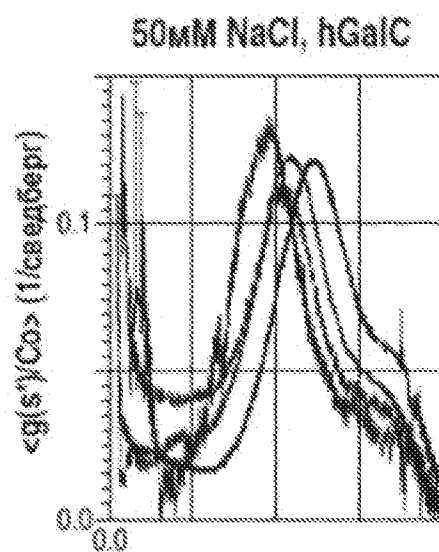


Фіг. 4В

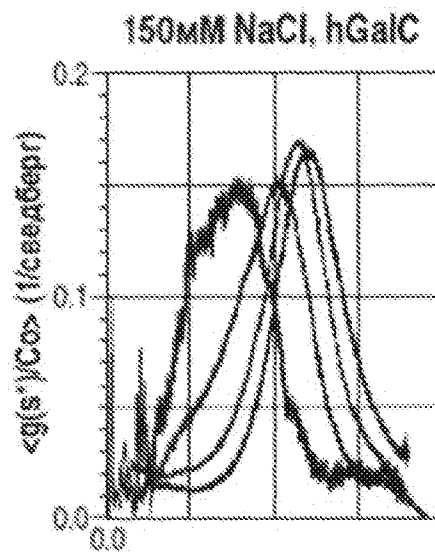
Питома активність hGalC у залежності від pH
1 мг/мл GalC в 3 мМ цитратному, фосфатному і боратному буфері з 50 мМ NaCl



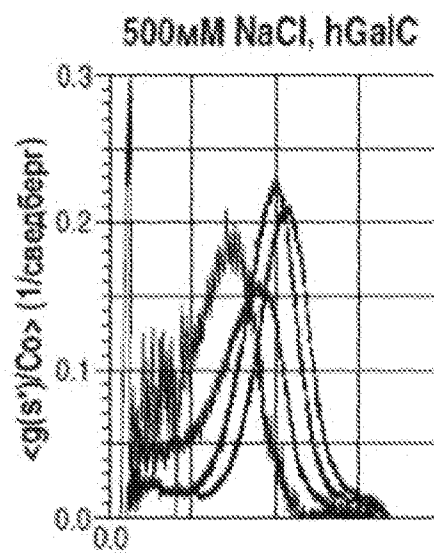
Фиг. 5



Фиг. 6A



Φir. 6B



Φir. 6C

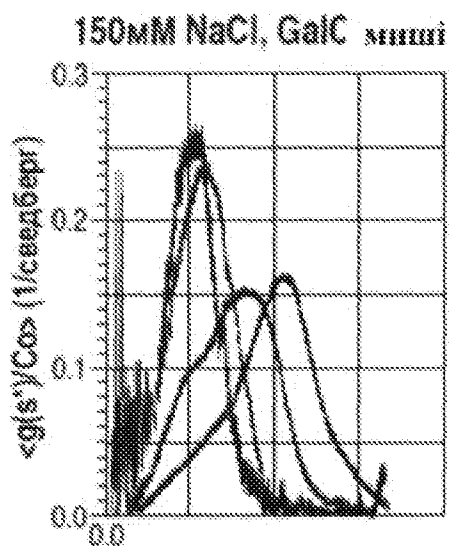


Fig. 6D

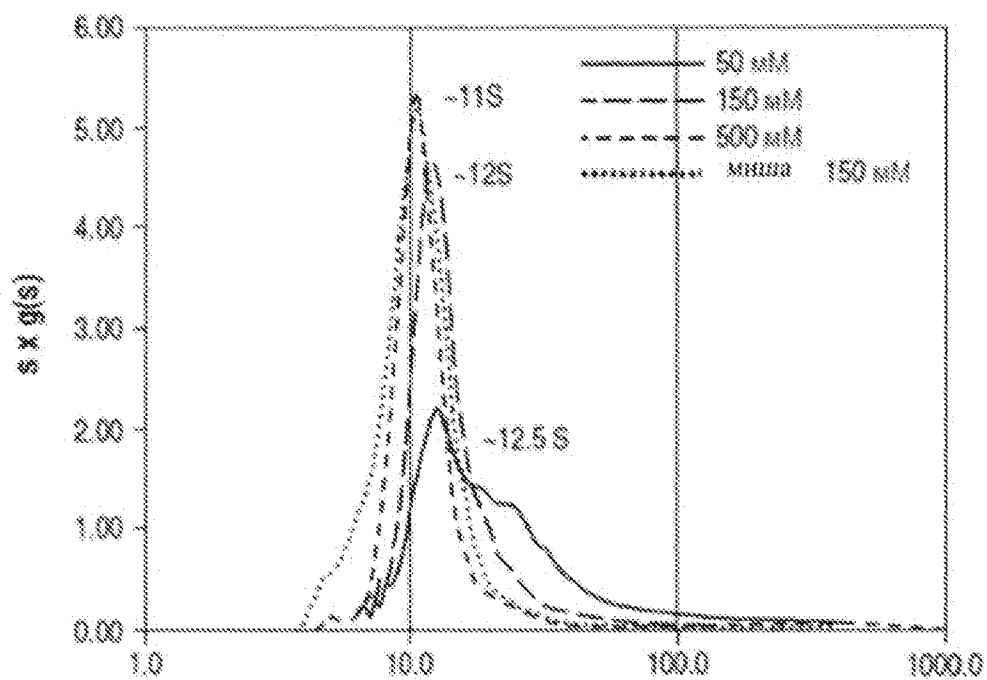
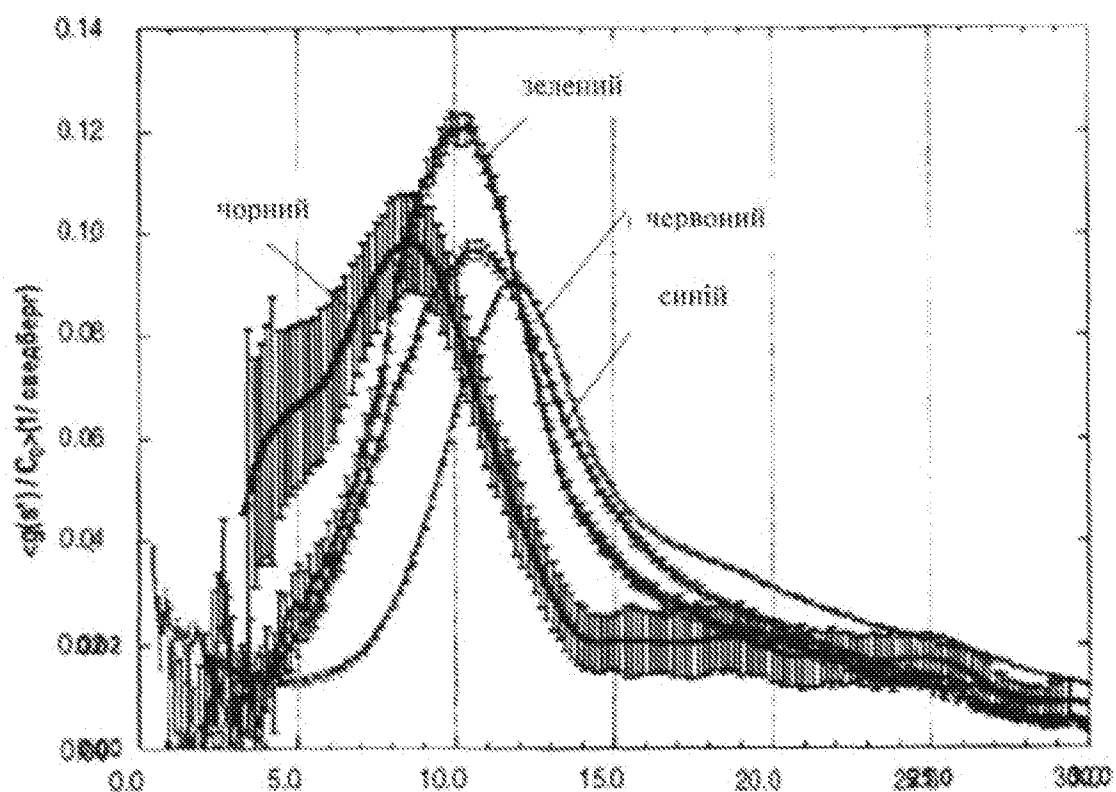
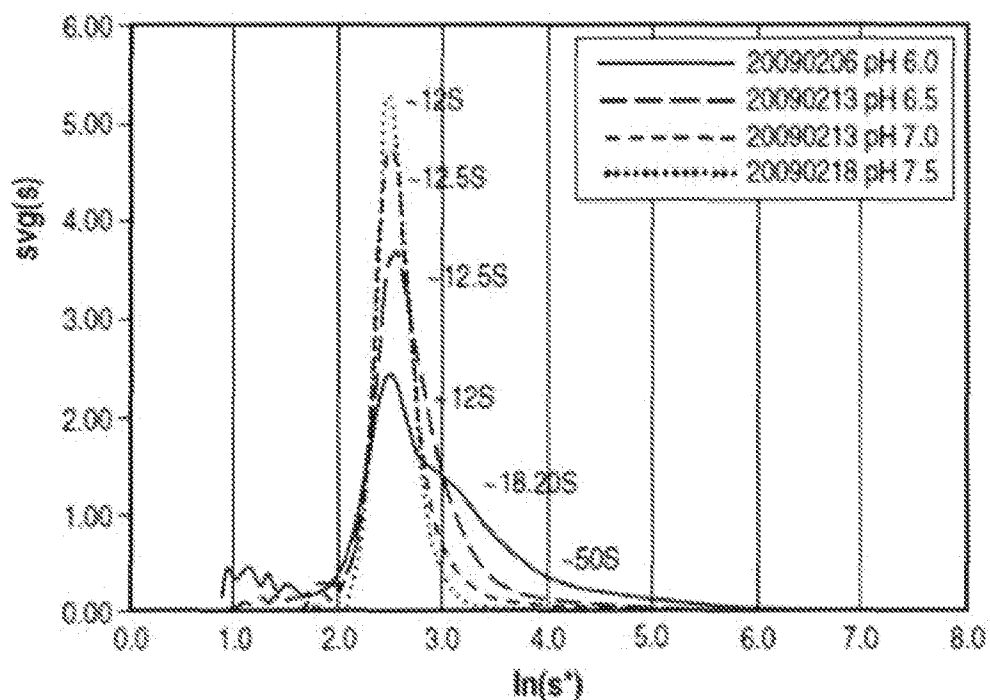


Fig. 7

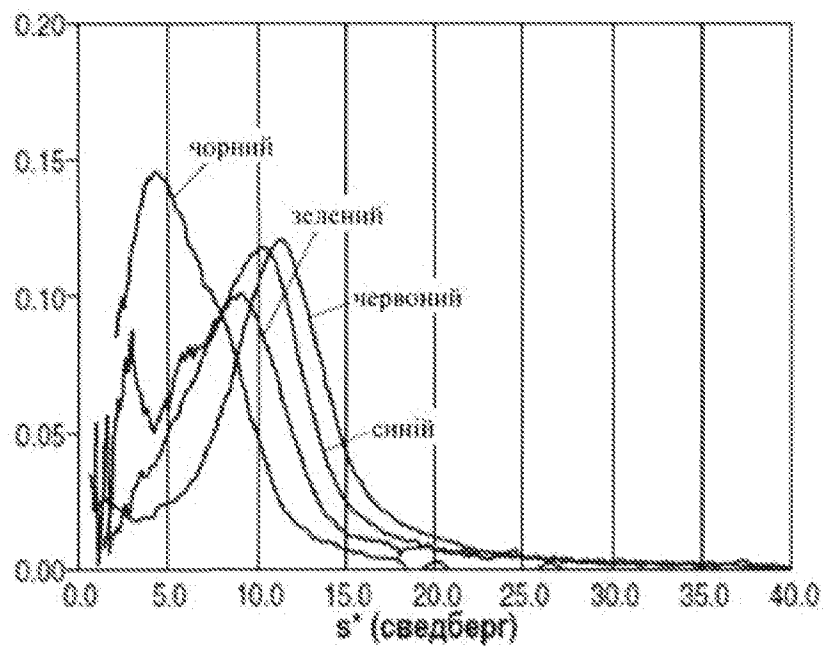
Профіль ППК в залежності від концентрації солі
1 мг/мл, 5 мМ Na фосфату, рН 6,0



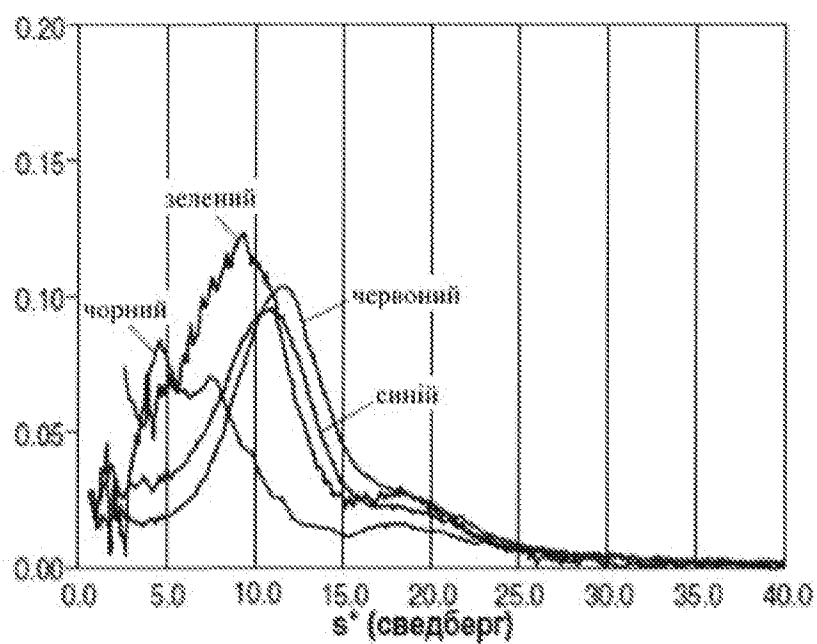
Фіг. 8
Серія розбавлень hGalC в універсальному буфері



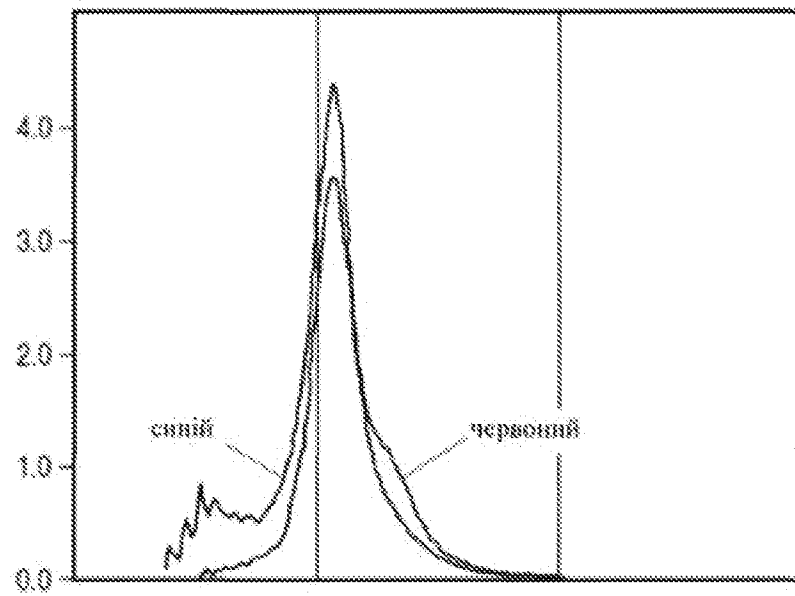
Фіг. 9
Профіль ППК в залежності від pH
1 мг/мл, 3 мМ цитратного, фосфатного і боратного буфера з 50 мМ NaCl



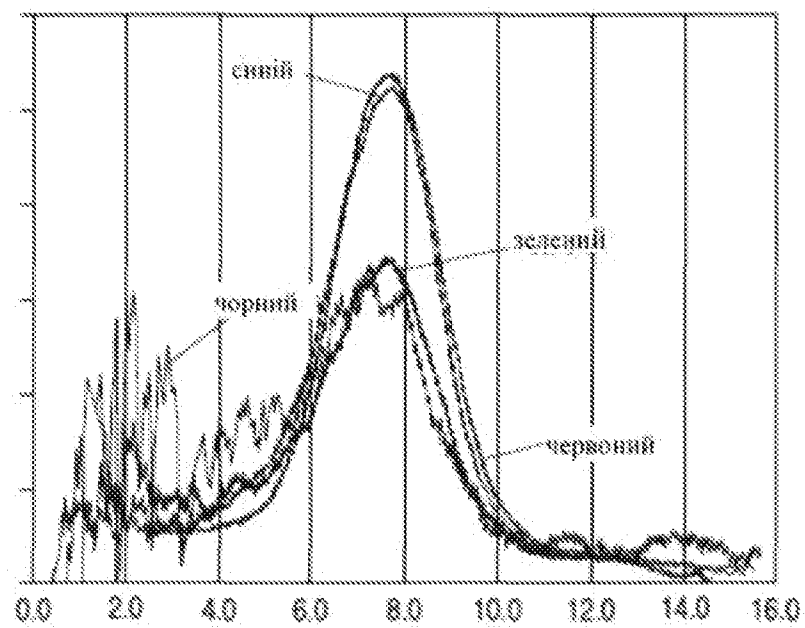
Фіг. 10А
Базова лінія



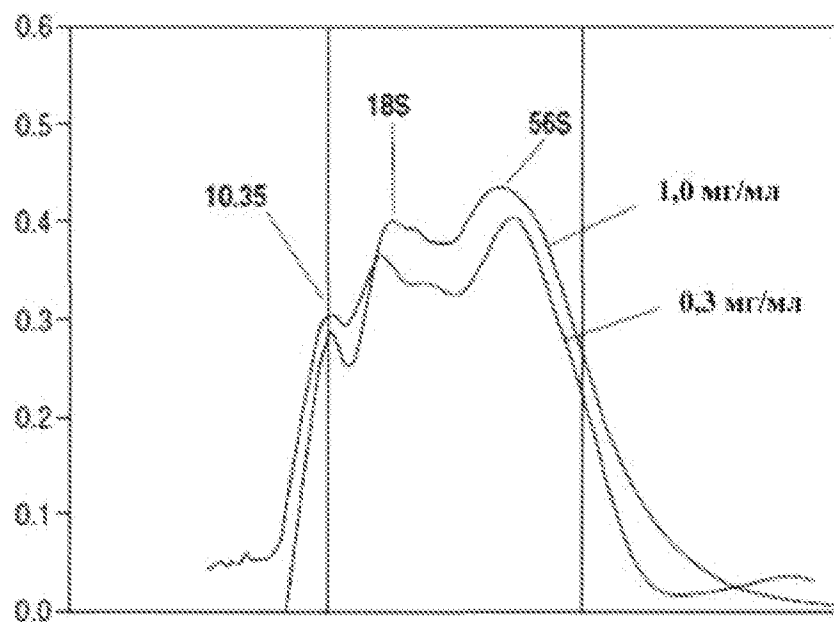
Фіг. 10В
У стані стресу



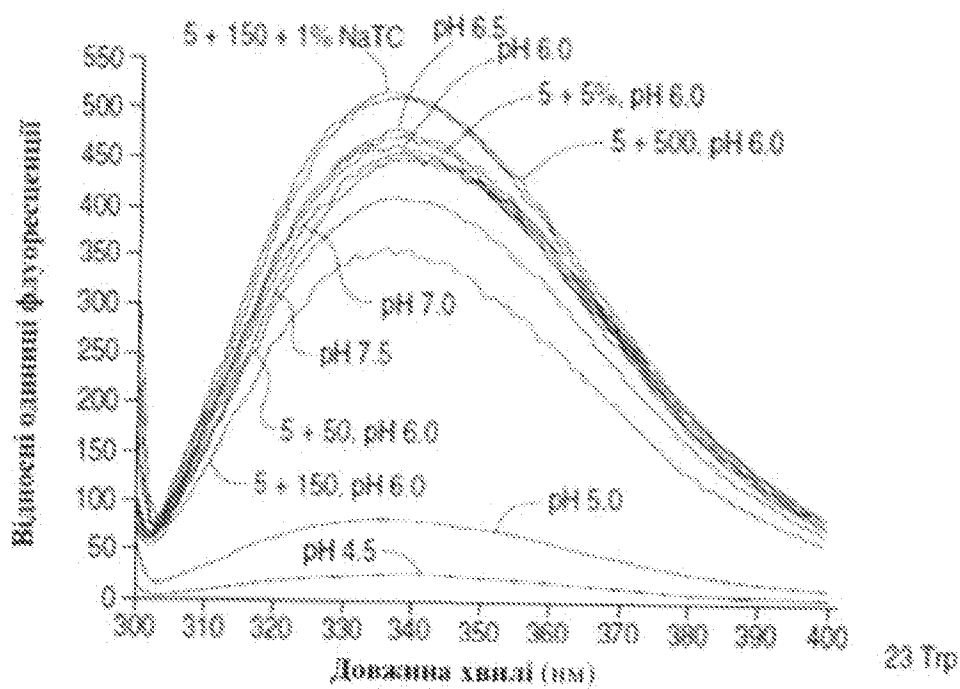
Фиг. 11



Фиг. 12

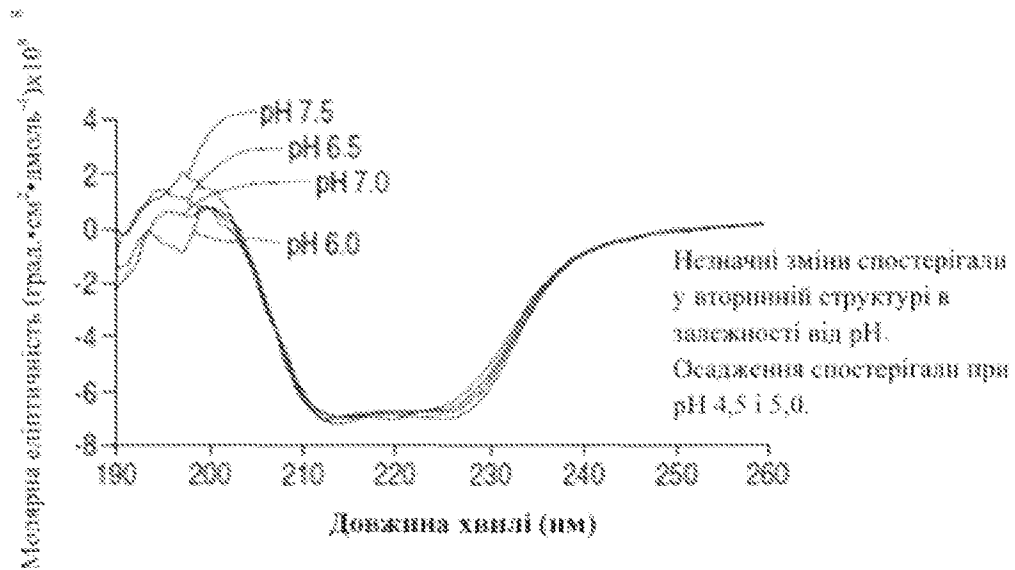


Фіг. 13



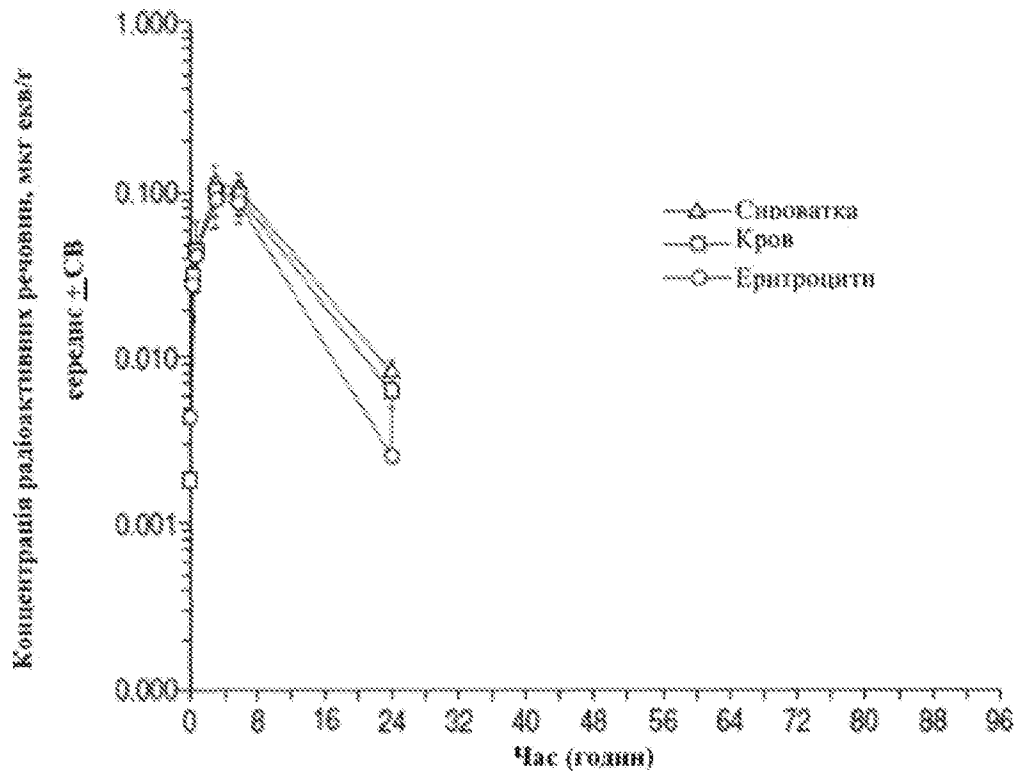
Фіг. 14А

Дослідження автофлуоресценції hGalC
1 мг/мл у різних буферах і при різних рН



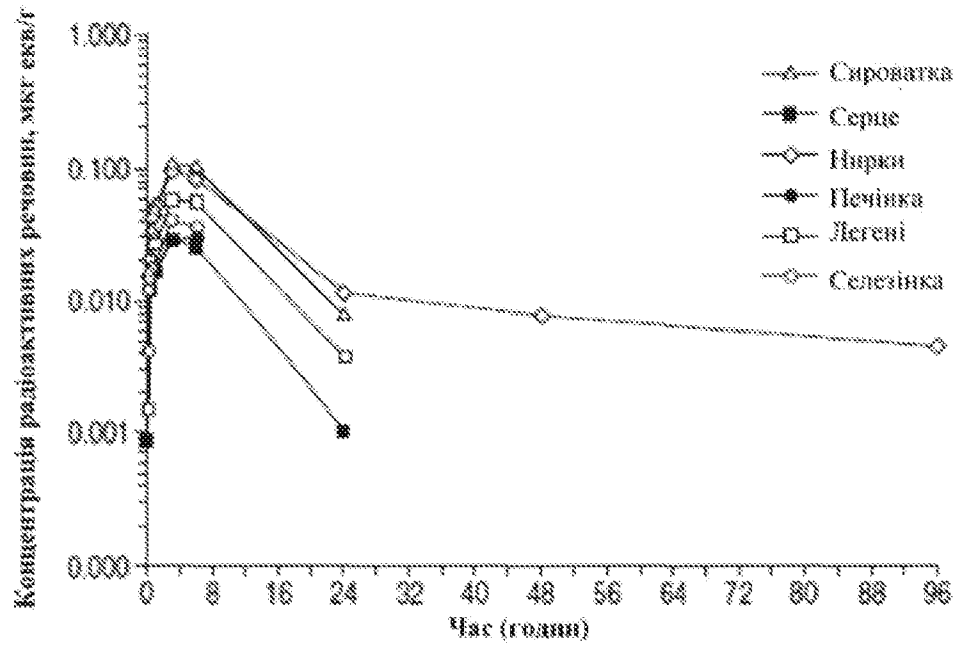
Фіг. 14В

Круговий дихроїзм hGalC у залежності від рН
1 мг/мл GalC у 3 мМ цитратного, фосфатного і боратного буфера з 50 мМ NaCl

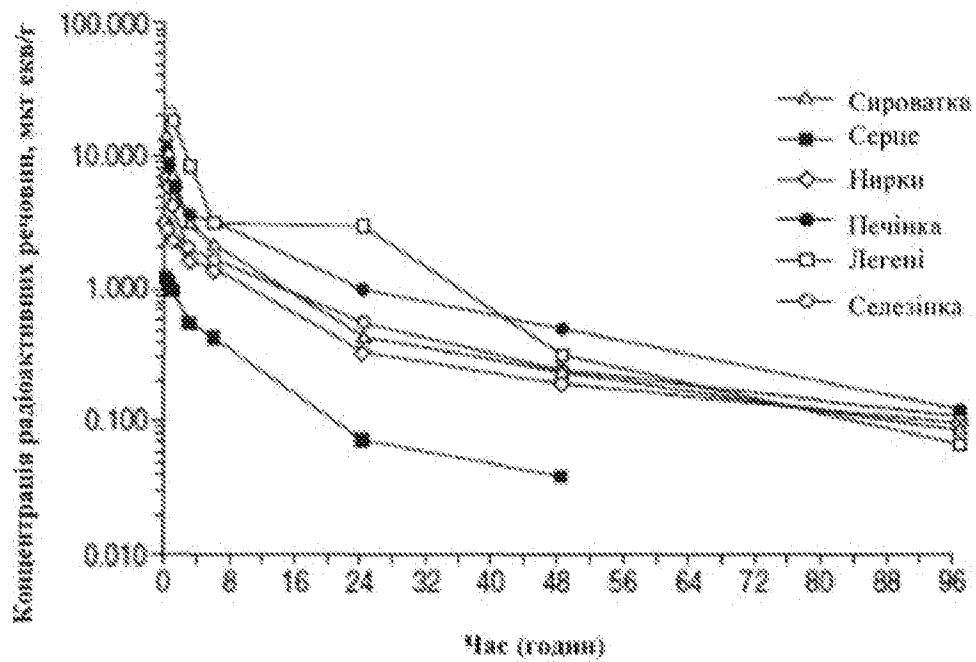


Фіг. 15

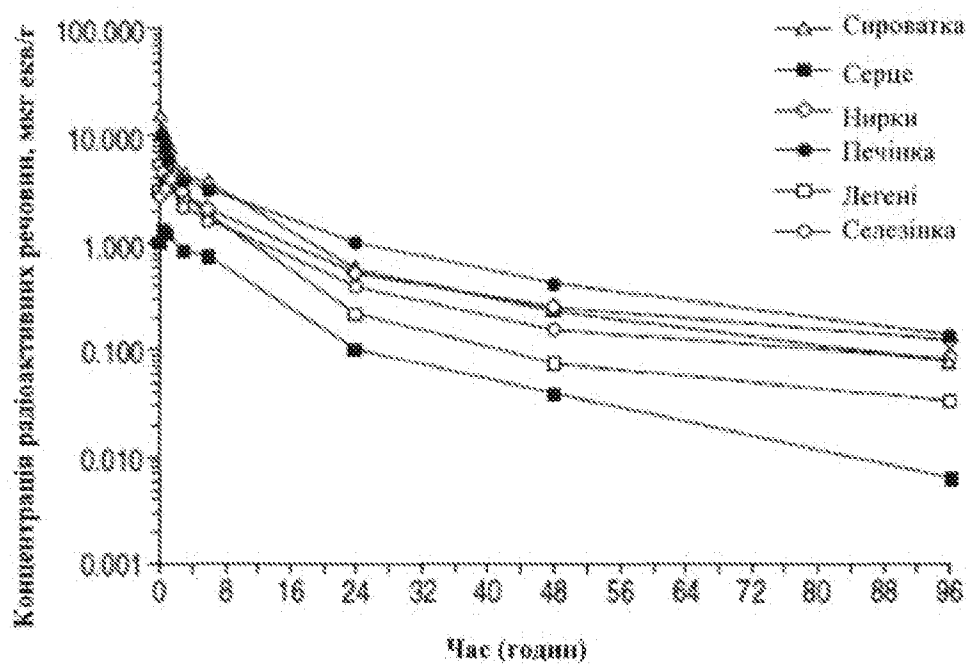
Група 1: при середній дозі 41 мкг/тварина



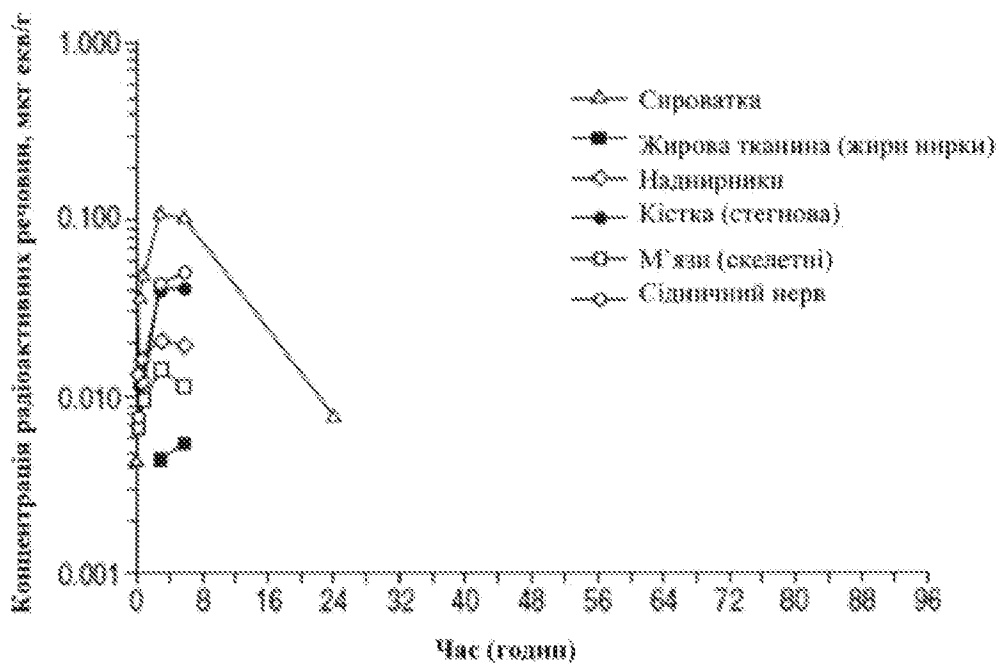
Фіг. 16А
Група 1: при середній дозі 41 мкг/тварина



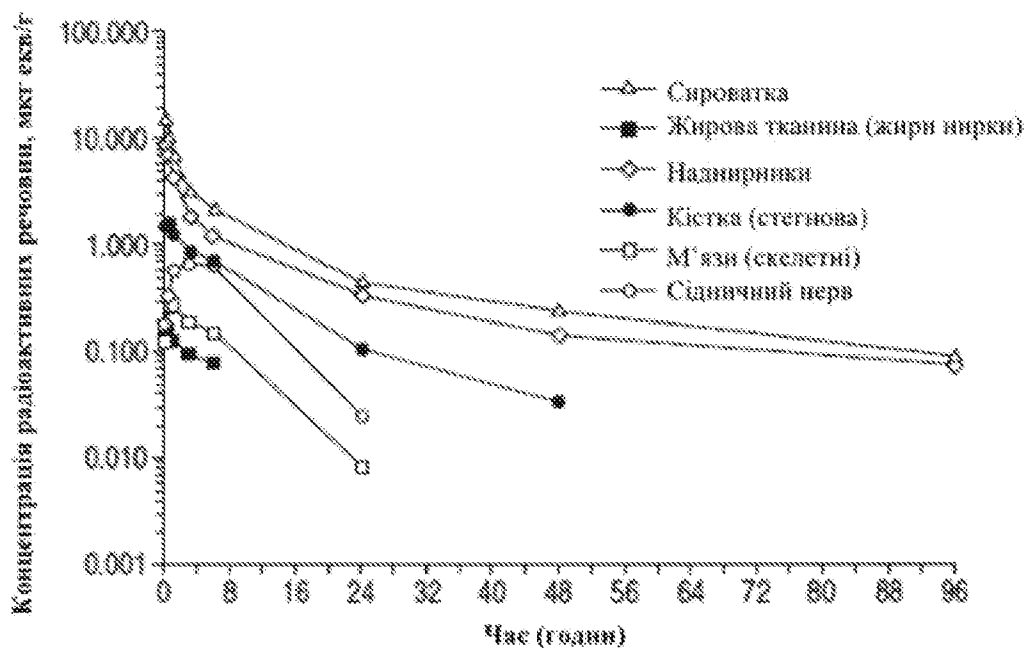
Фіг. 16В
Група 2: при середній дозі 1,00 мг/кг



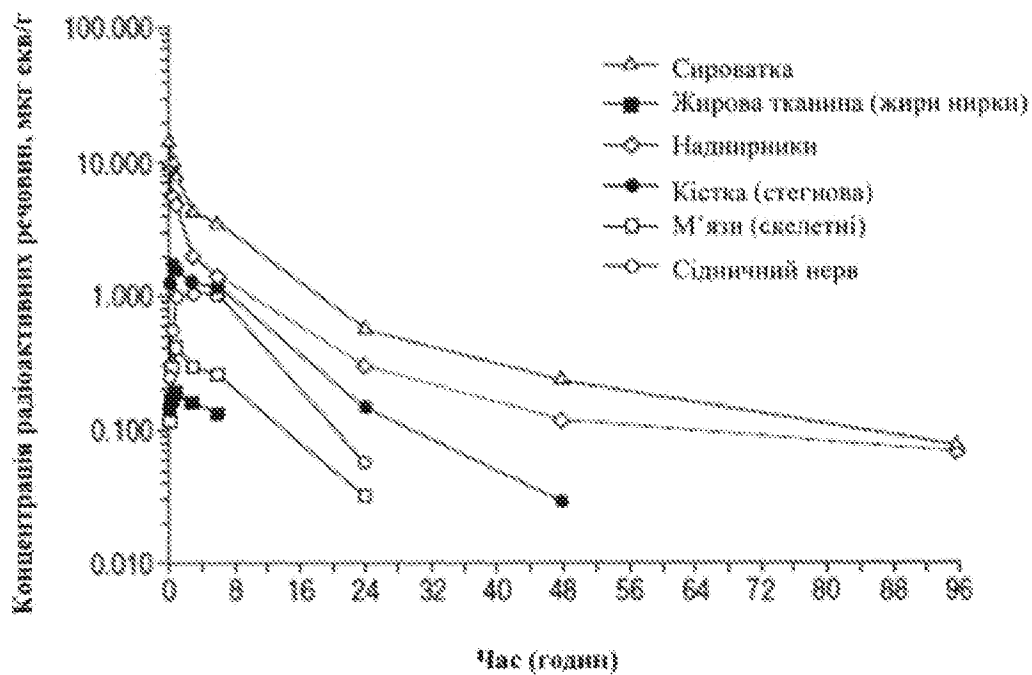
Фіг. 16С
Група 3: при середній дозі 1,08 мкг/тварина



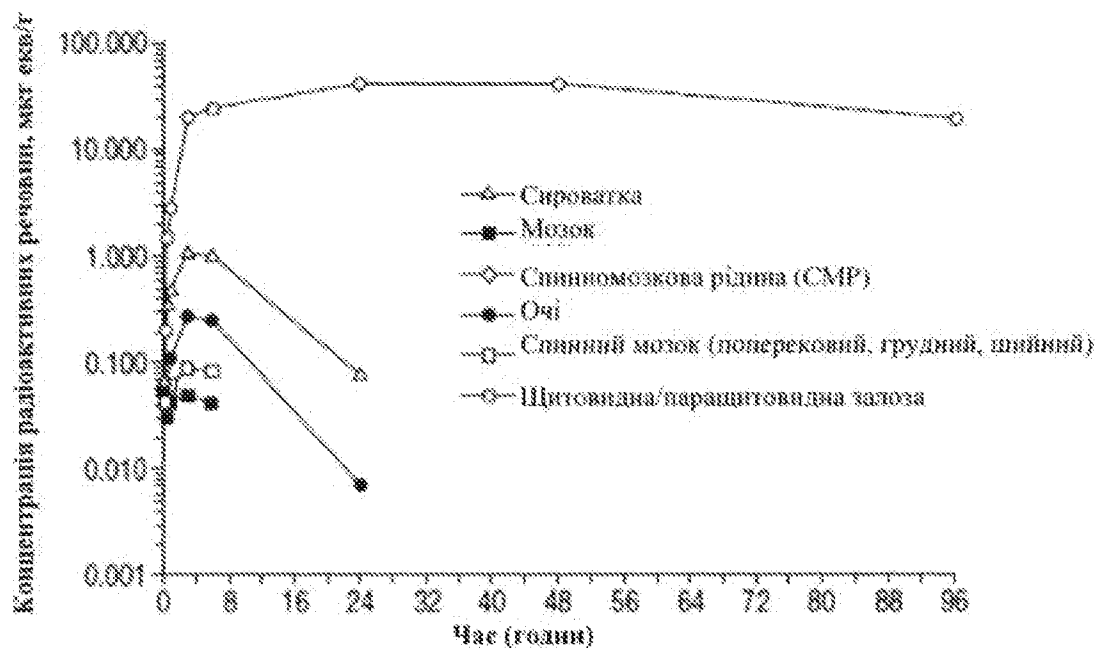
Фіг. 17А
Група 1: при середній дозі 41 мкг/тварина



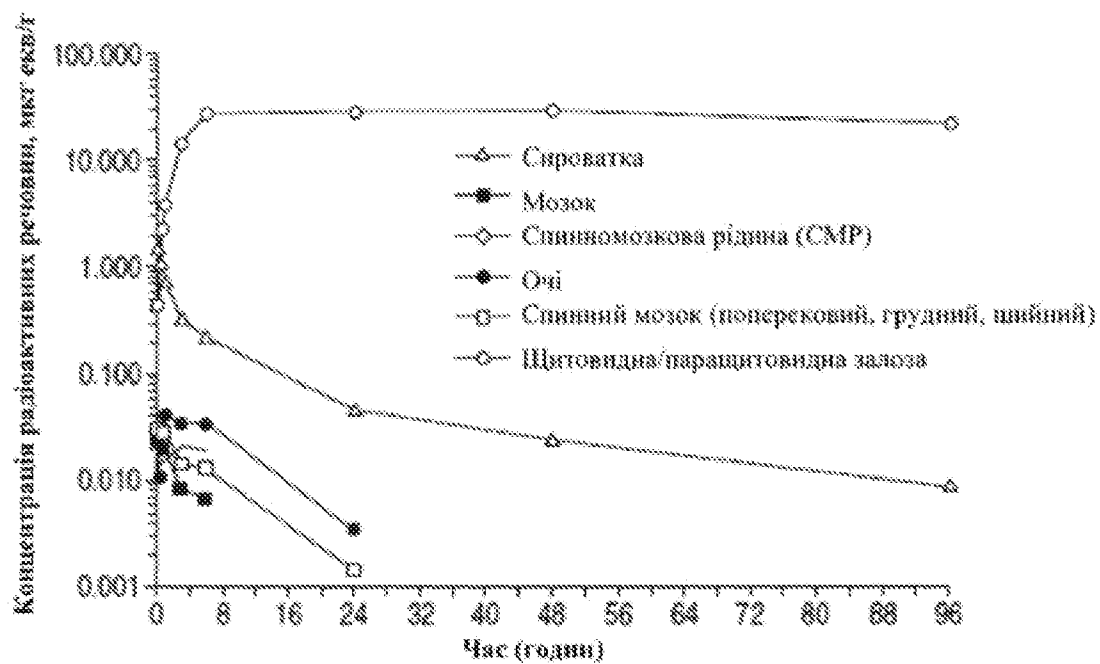
Фіг. 17В
Група 2: при середній дозі 1,00 мг/кг



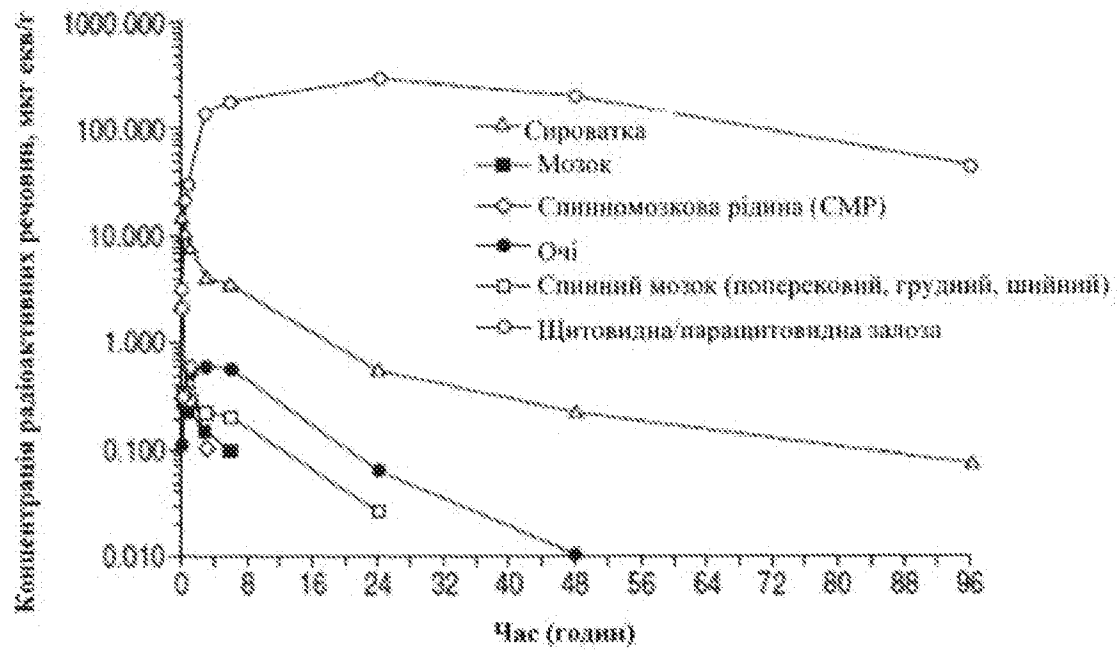
Фіг. 17С
Група 3: при середній дозі 1,08 мкг/тварина



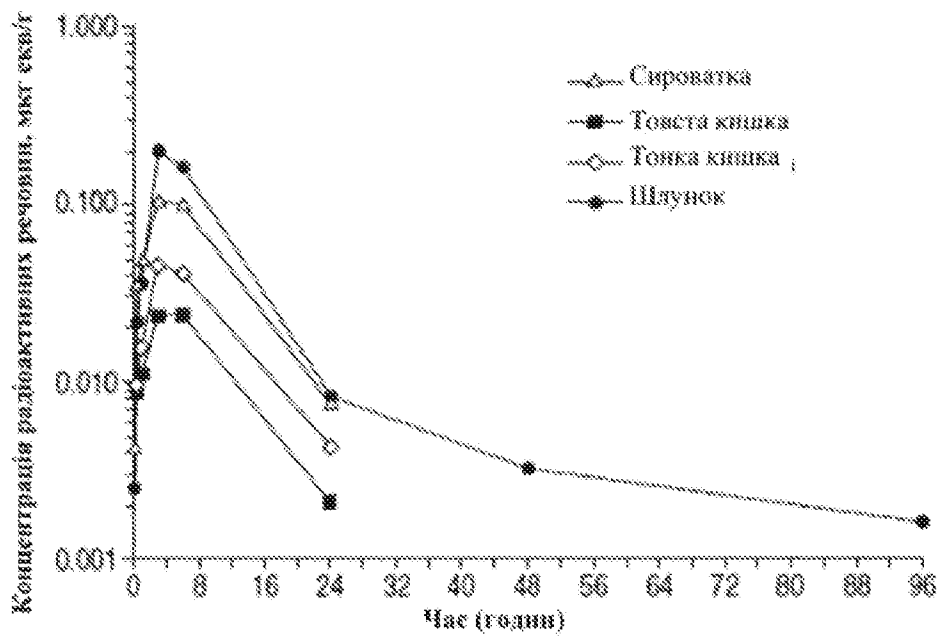
Фіг. 18А
Група 1: при середній дозі 41 мкг/тварина



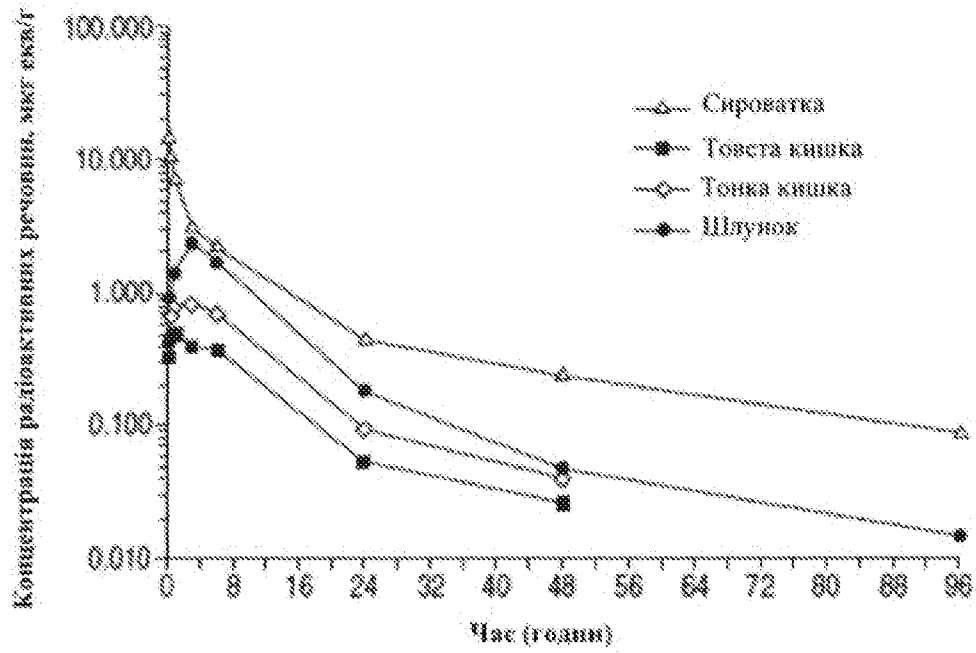
Фіг. 18В
Група 2: при середній дозі 1,00 мг/кг



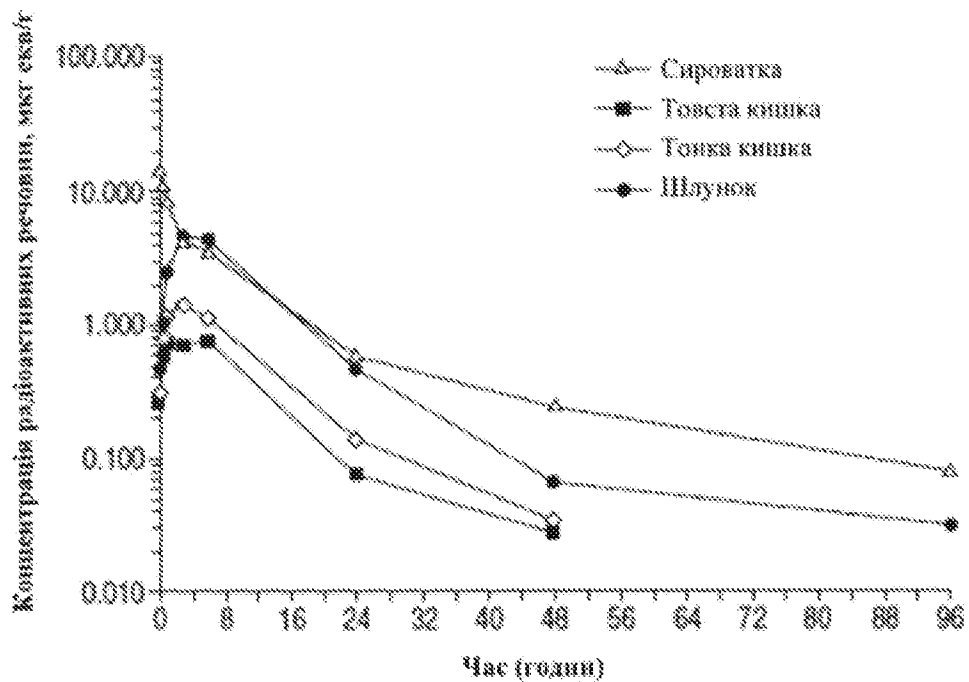
Фіг. 18С
Група 3: при середній дозі 1,08 мкг/тварина



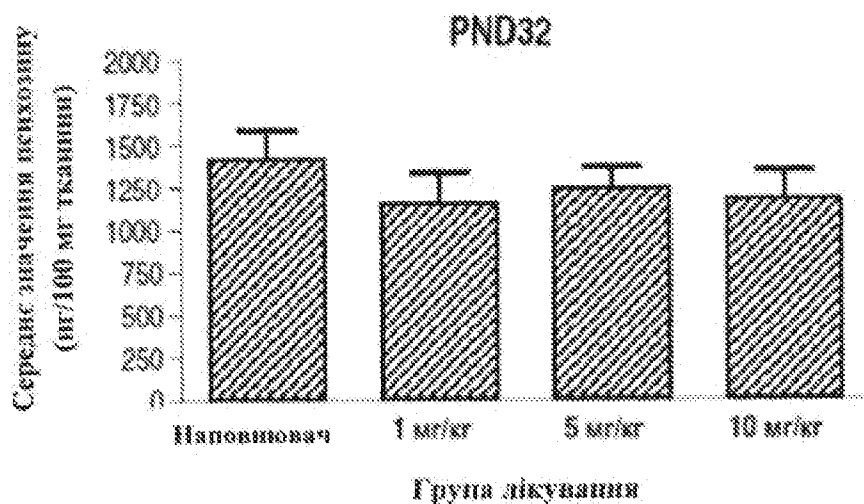
Фіг. 19А
Група 1: при середній дозі 41 мкг/тварина



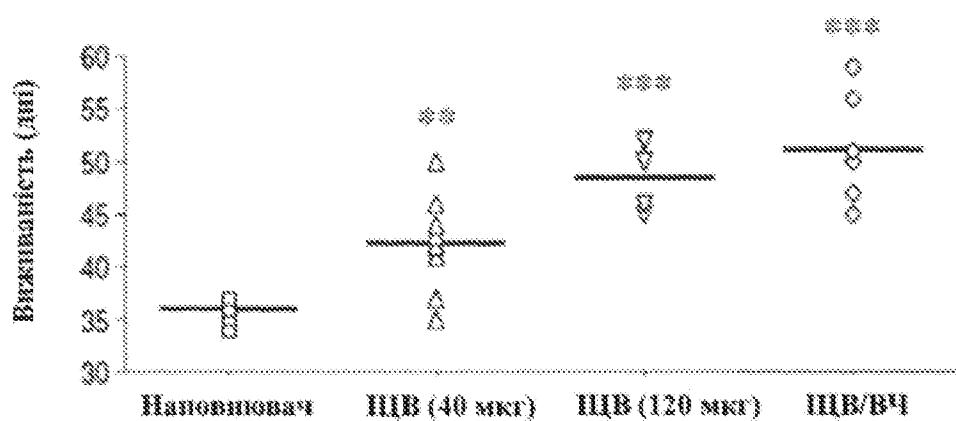
Фіг. 19В
Група 2: при середній дозі 1,00 мг/кг



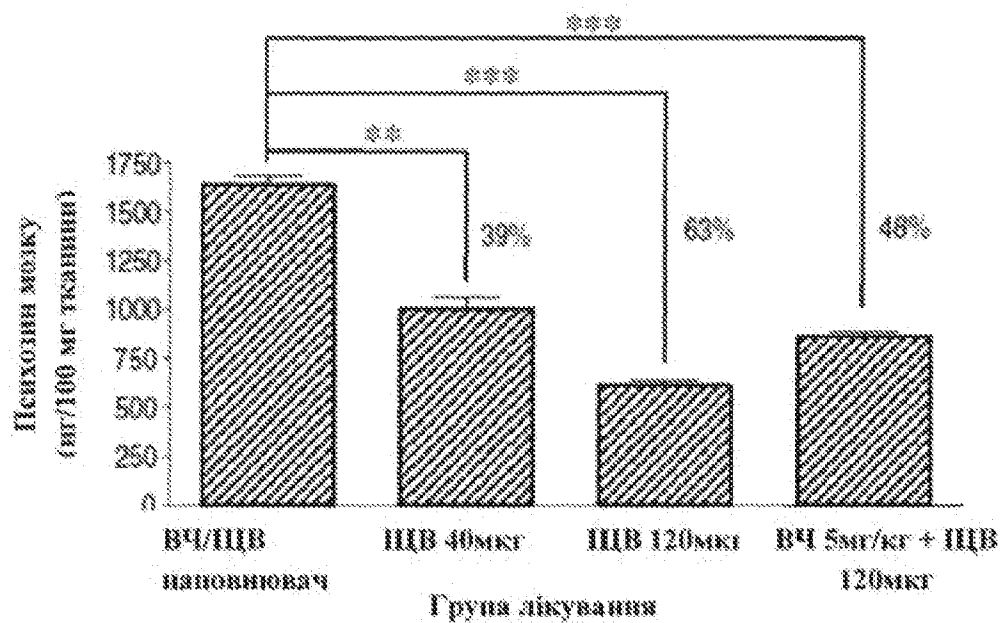
Фіг. 19С
Група 3: при середній дозі 1,08 мкг/тварина



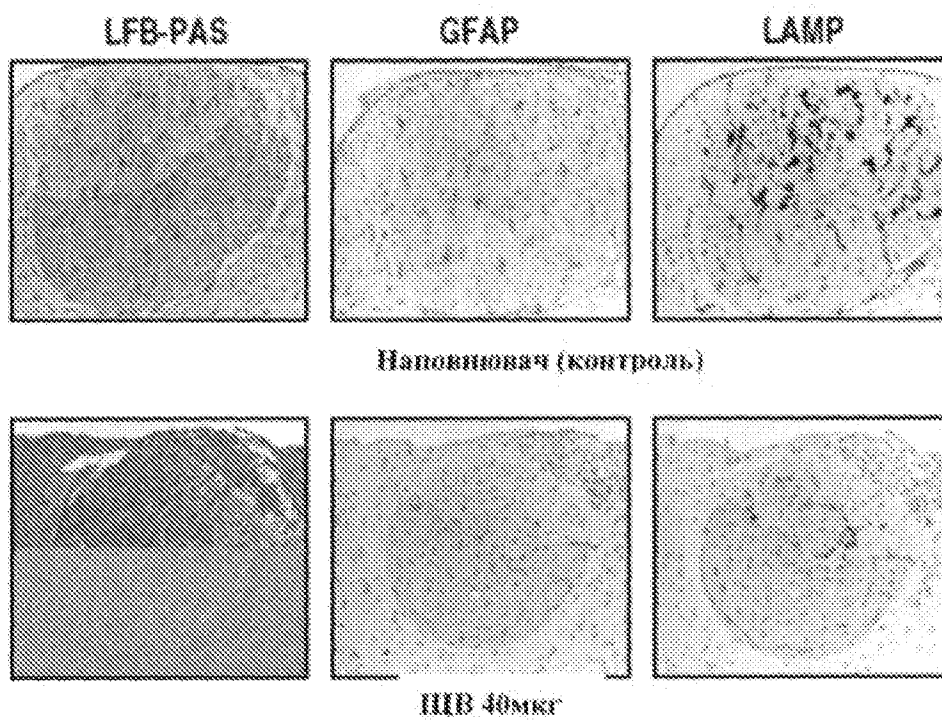
Фіг. 20



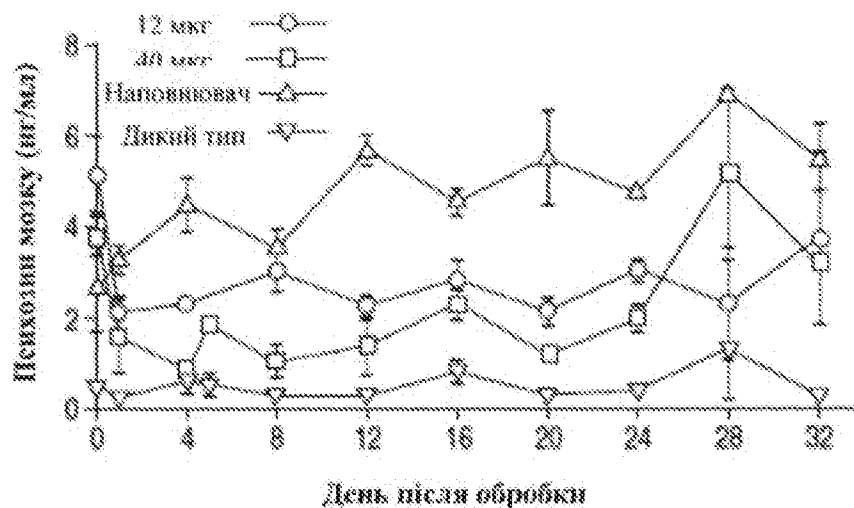
Фіг. 21



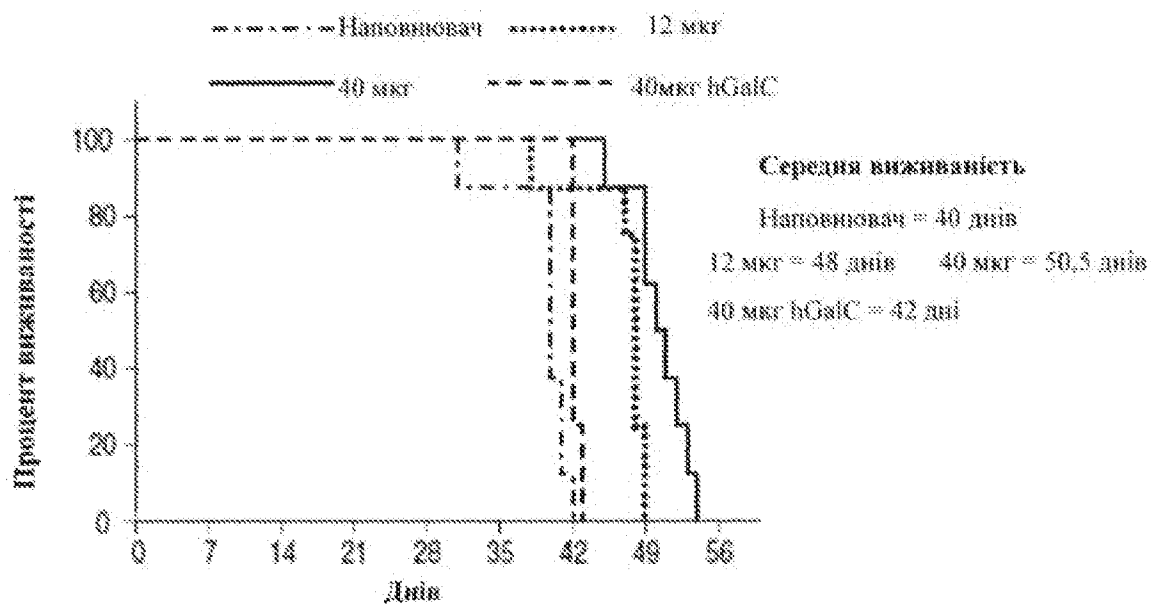
Фіг. 22



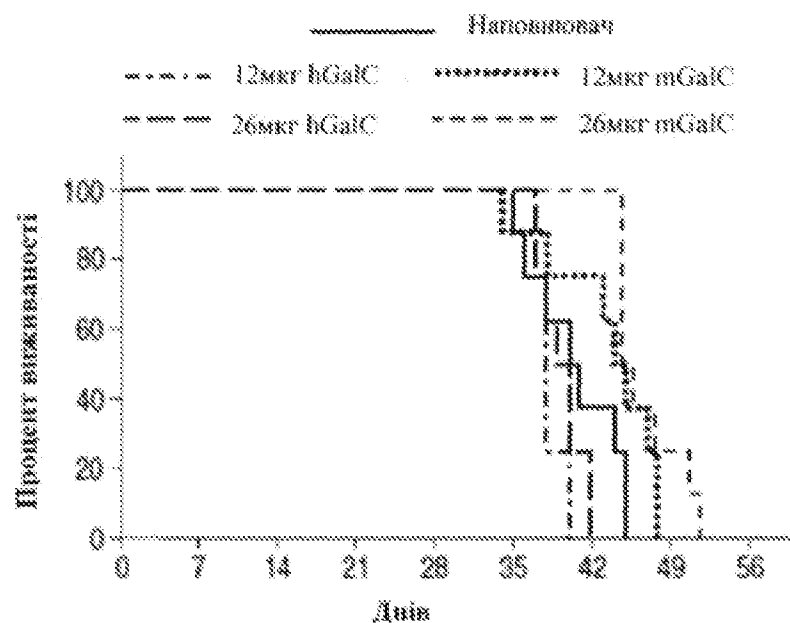
Фіг. 23



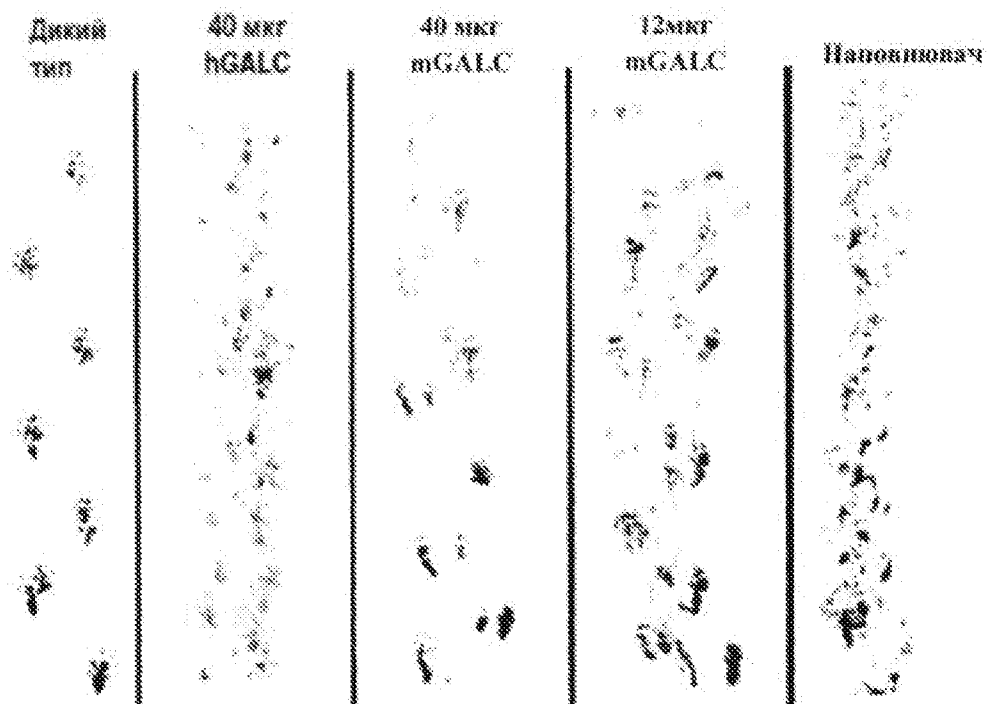
Фіг. 24



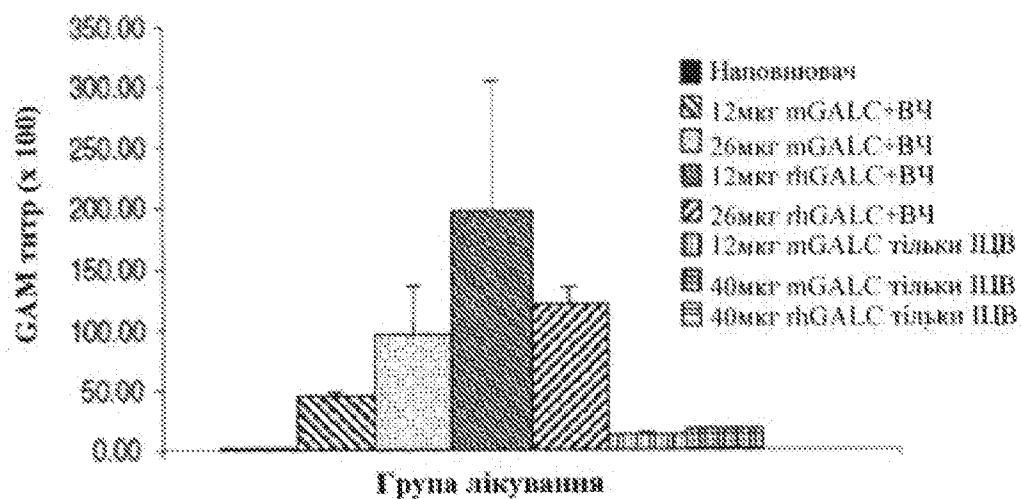
Фіг. 25



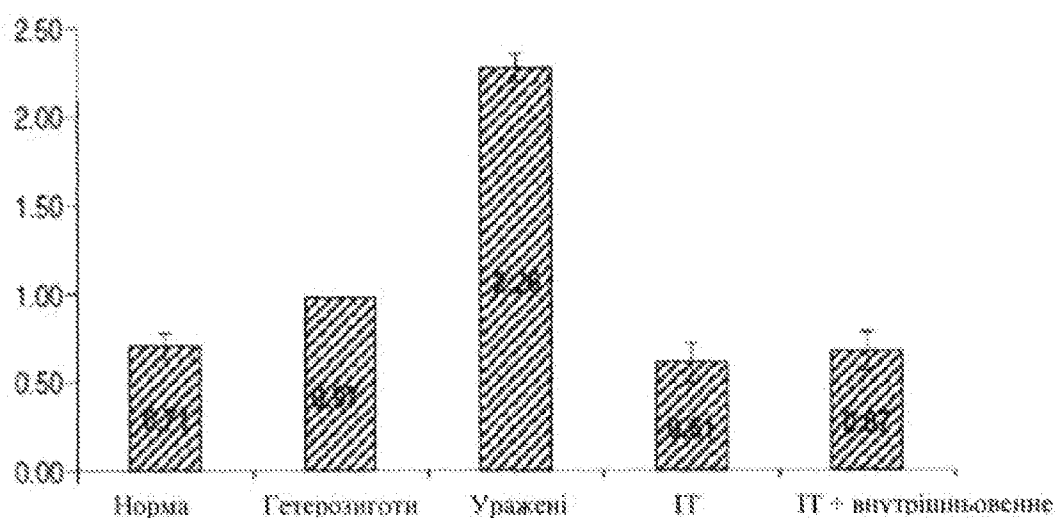
Фиг. 26



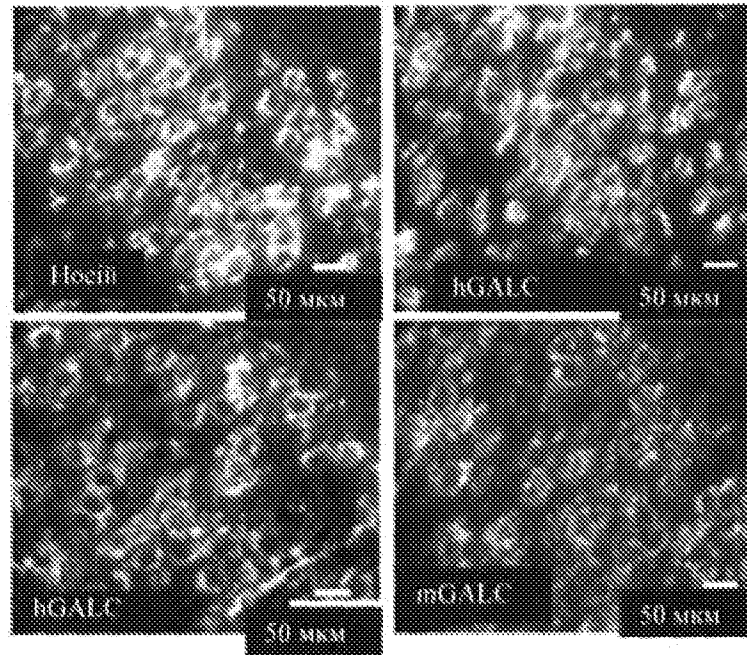
Фиг. 27



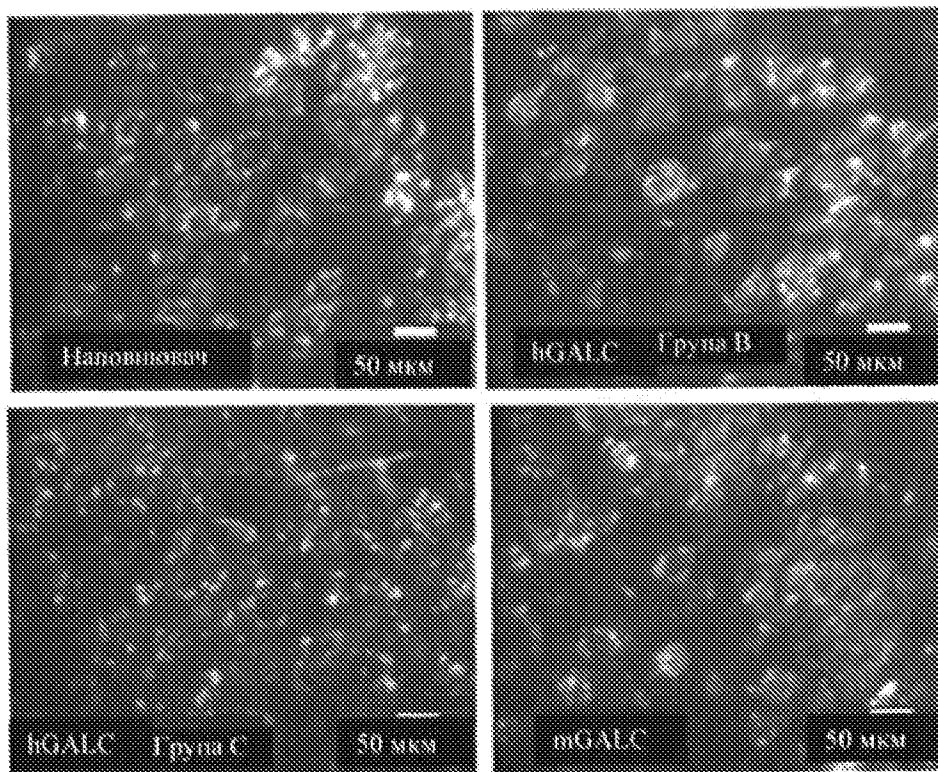
Фіг. 28
Рівень антитіл анти-GALC



Фіг. 29
Собача модель Краббе: рівень психозину в SMP (нг/мл)



Фиг. 30



Фиг. 31

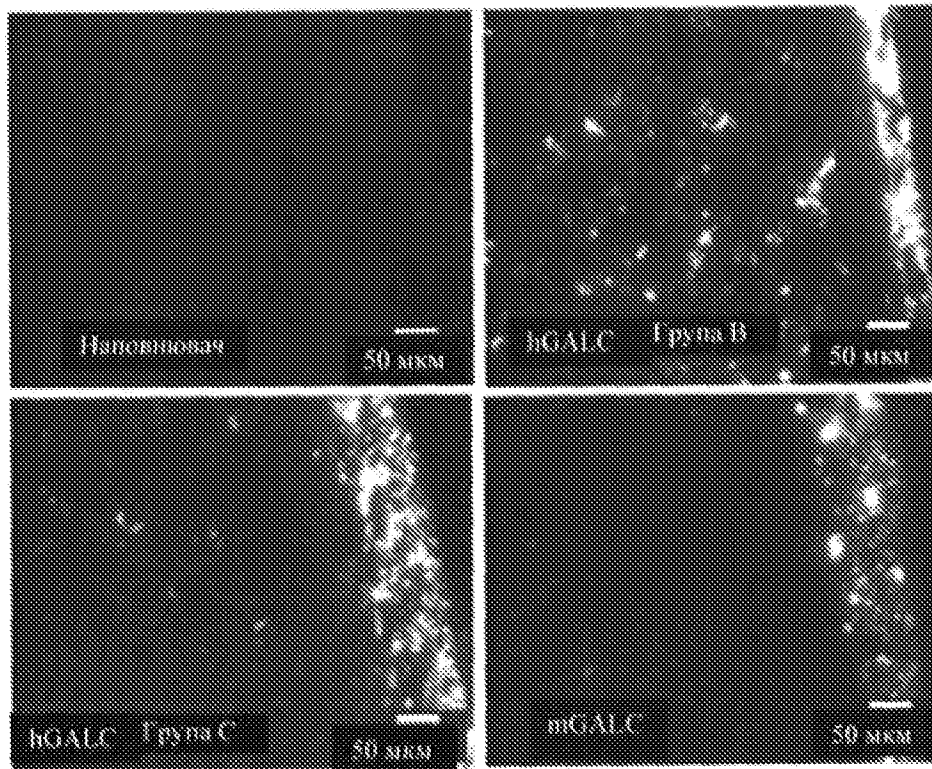


Fig. 32

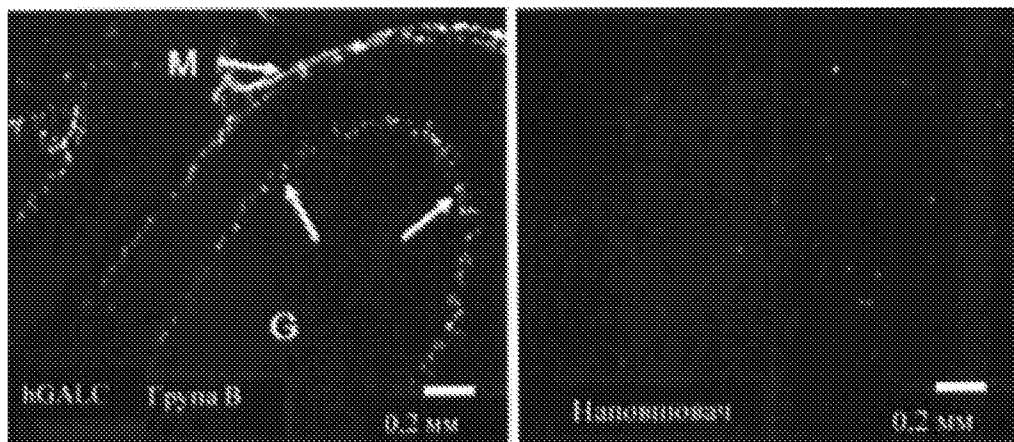
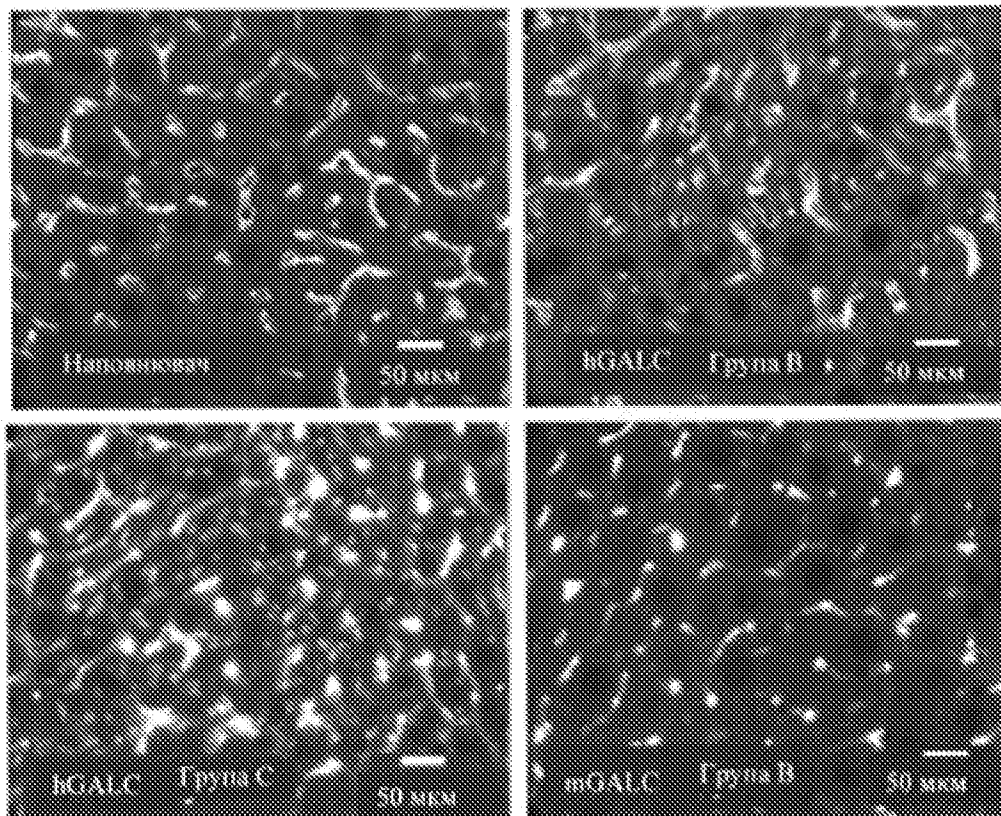
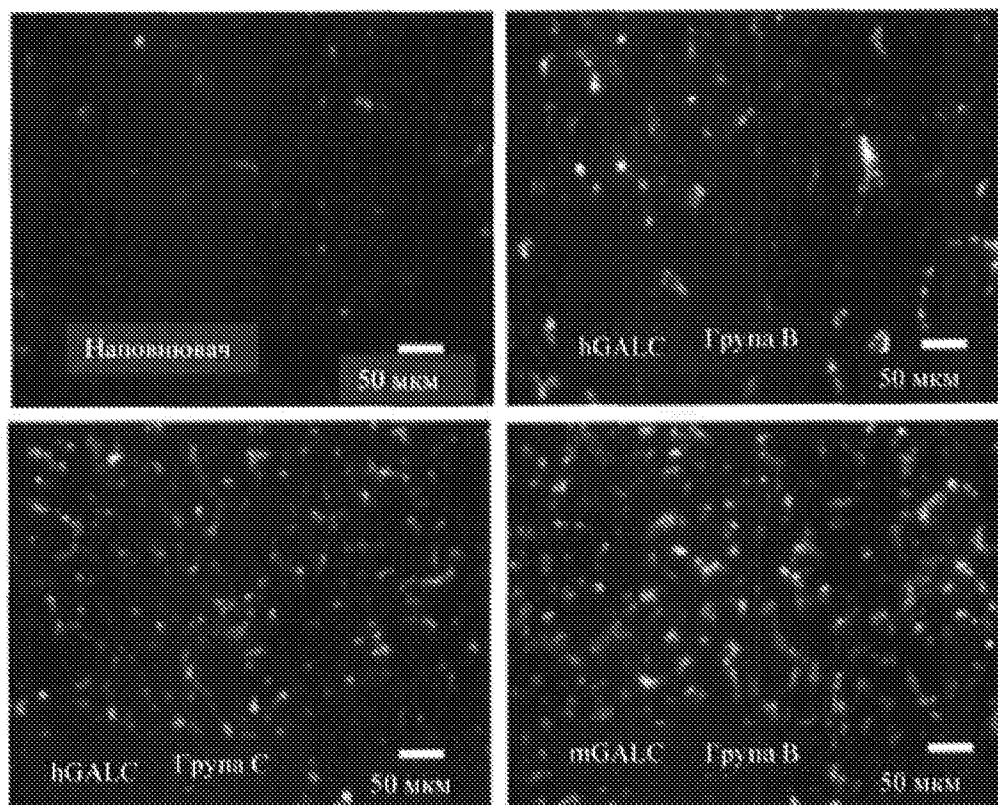


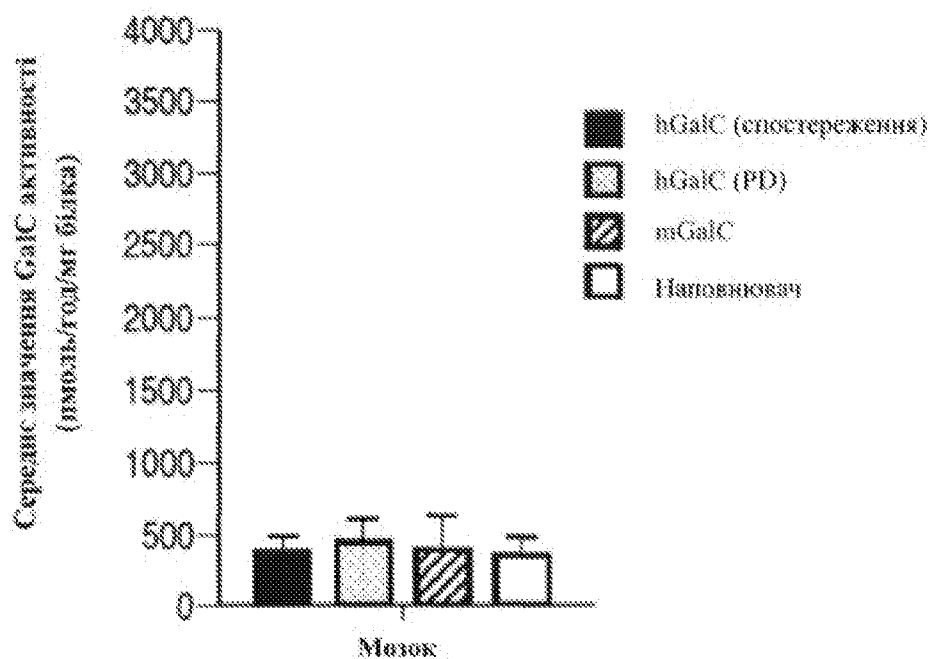
Fig. 33



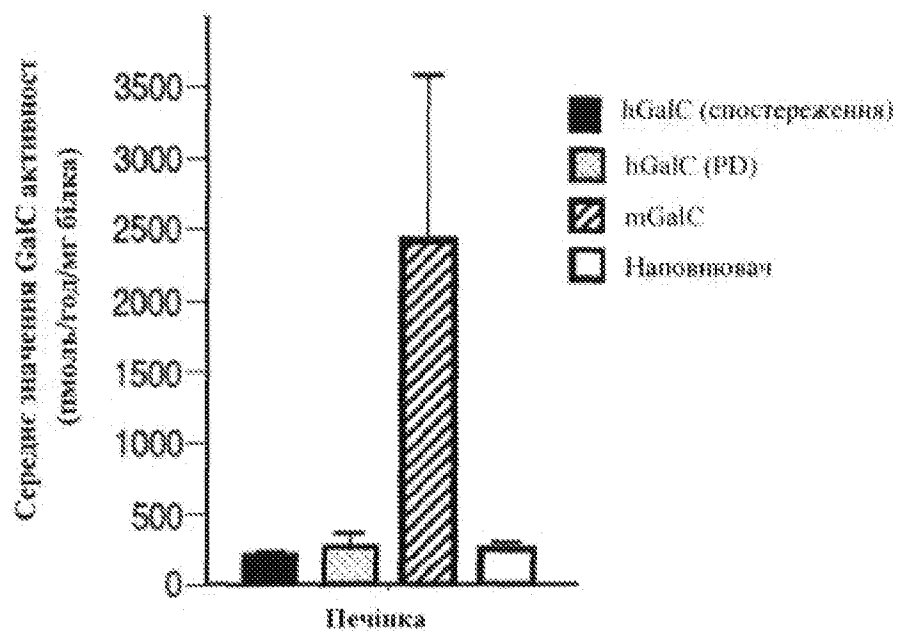
Фиг. 34



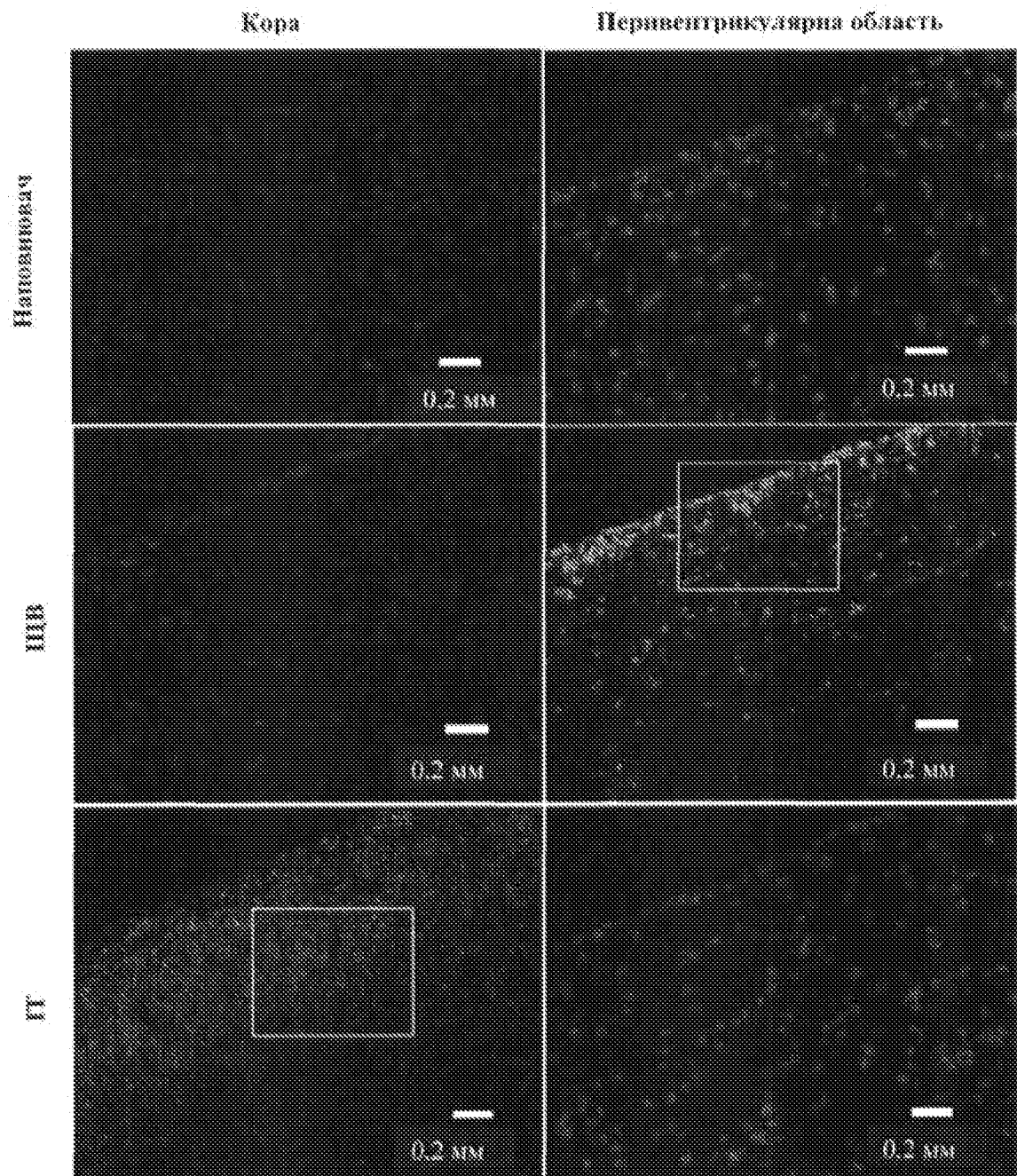
Фиг. 35



Фіг. 36А
Мозок

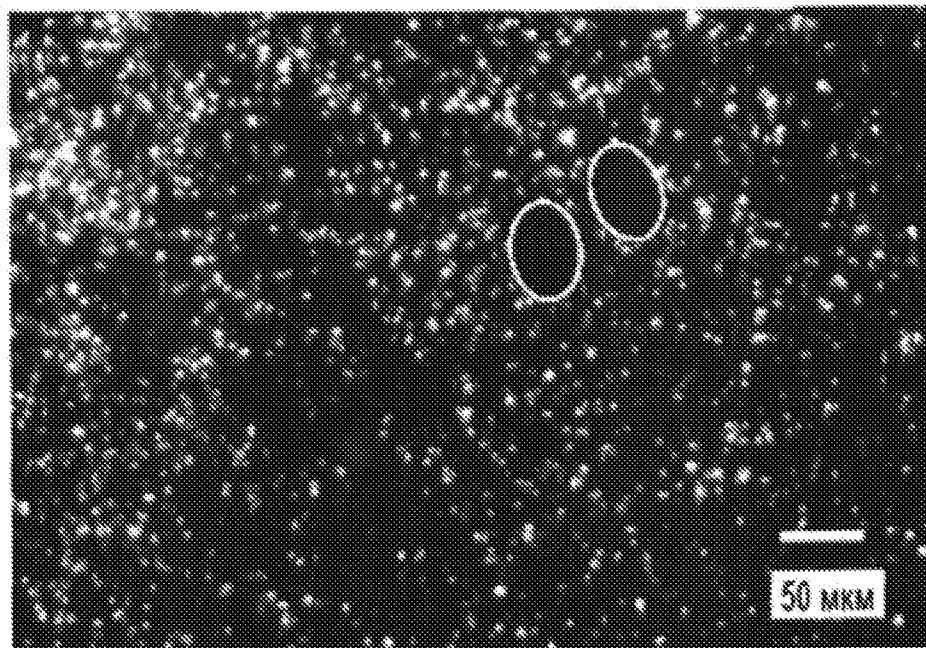


Фіг. 36В
Печінка



Фіг. 37А
Імунофарблення на GalC у тканинах мозку, 10х

Область кори, ІТ ін'єкція



Перивентрикулярна область, ІЦВ ін'єкція

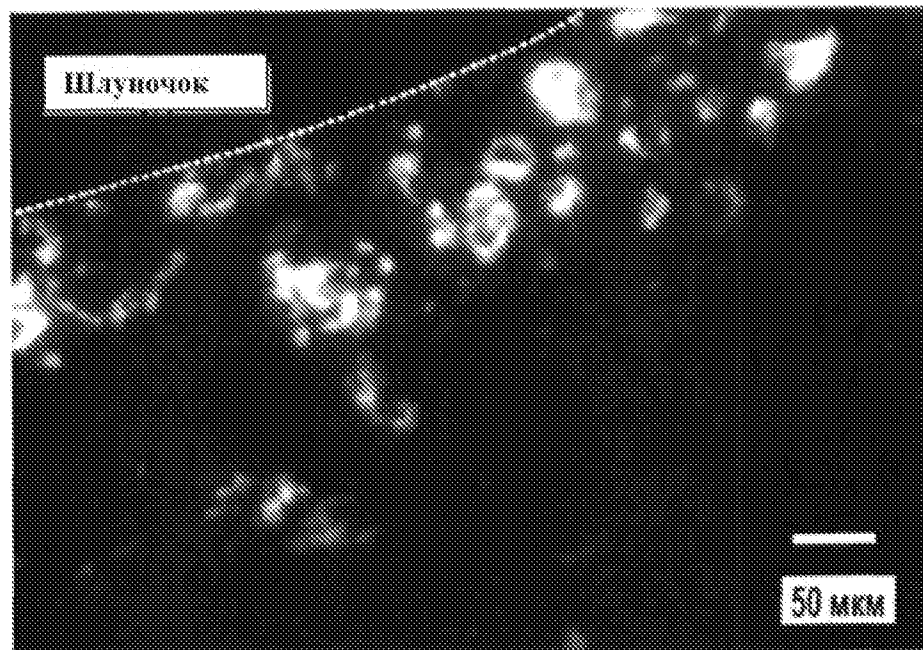
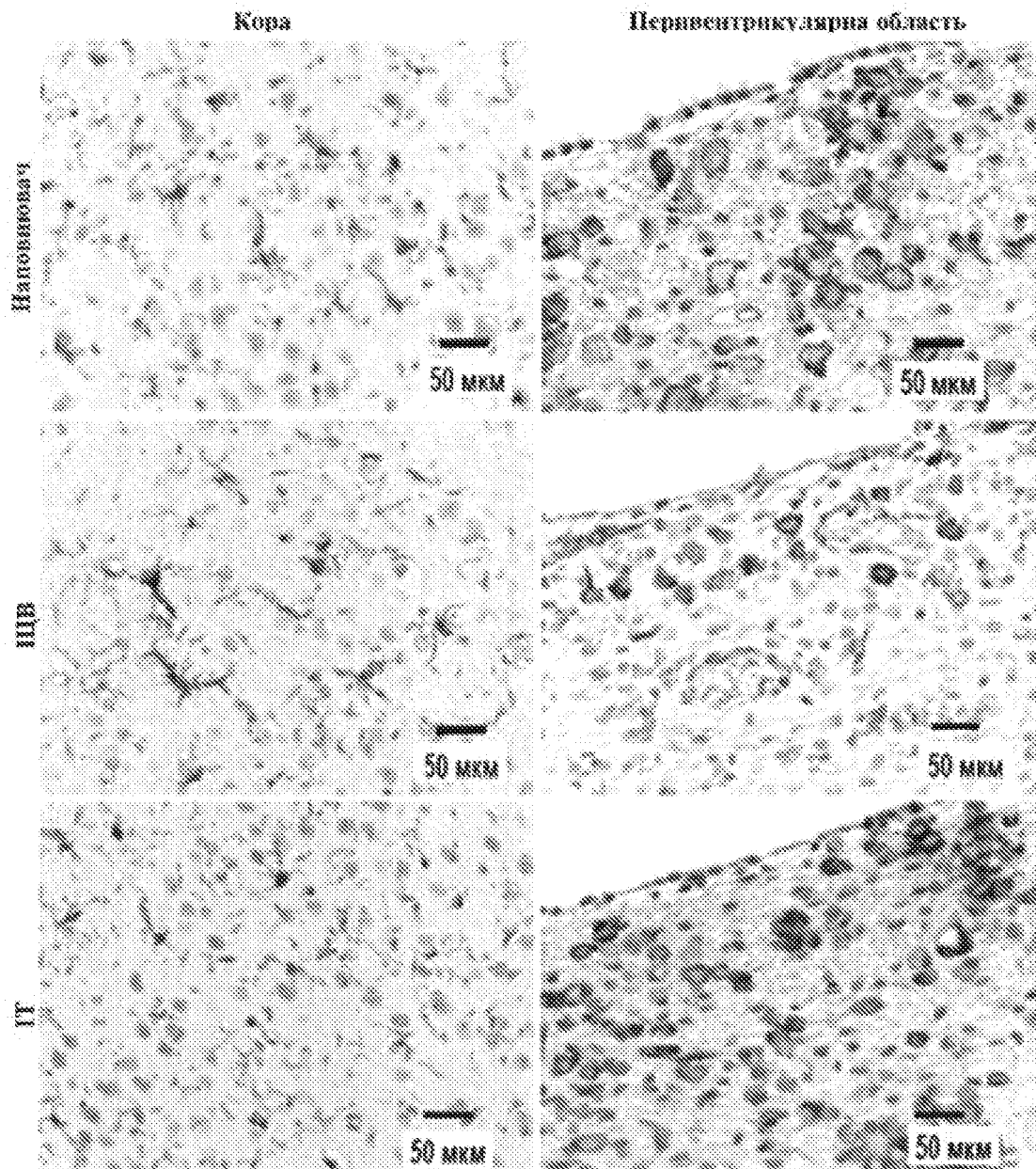
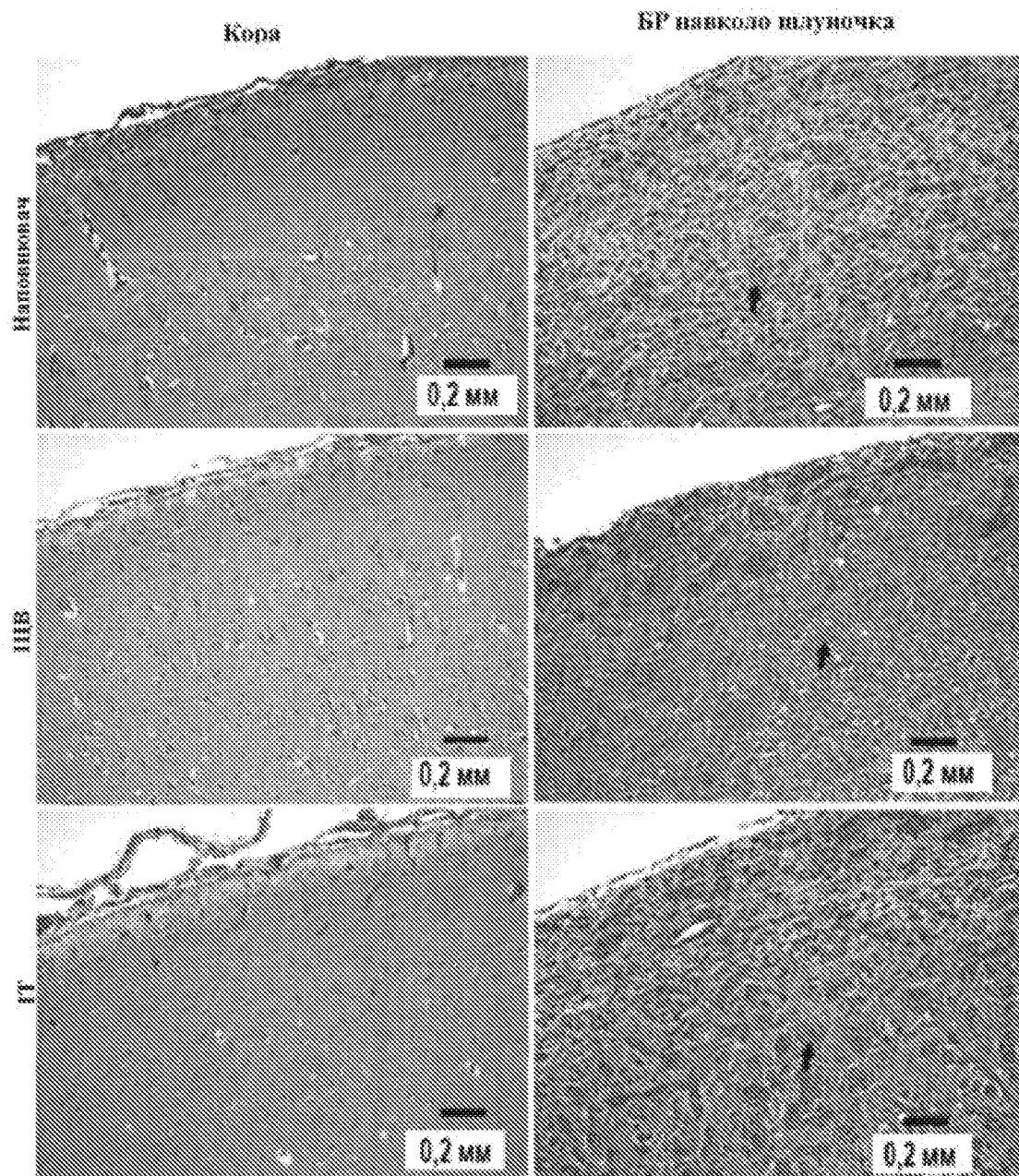


Fig. 37B

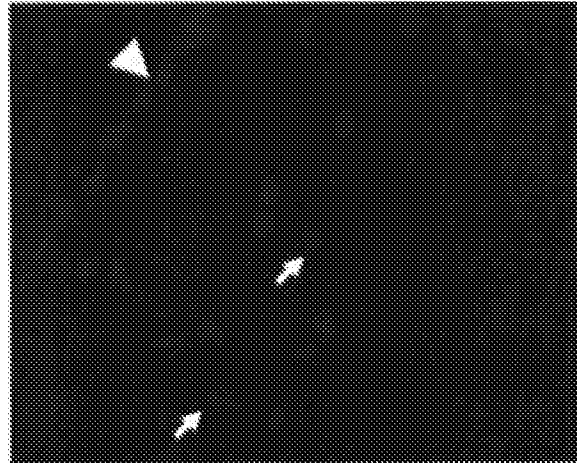


Фиг. 38

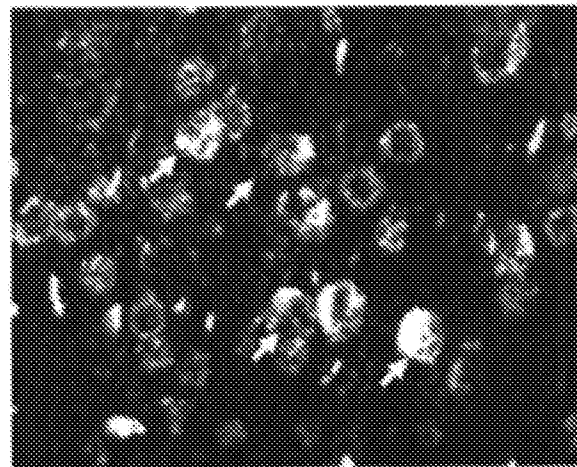


Фиг. 39

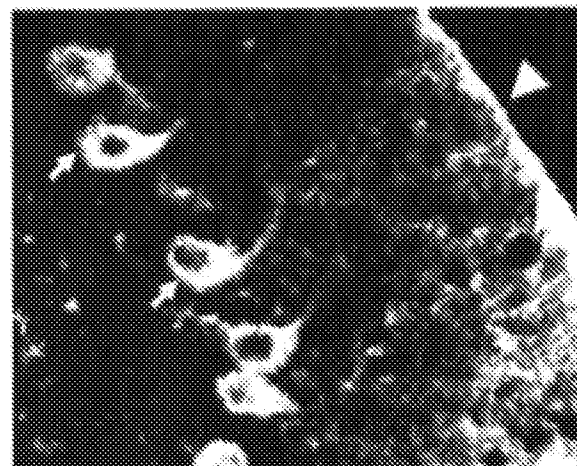
Няповиновяч,
кора головного
мозку



3 дози І28, кора
головного
мозку



3 дози І28, кора
головного
мозку



Фіг. 40

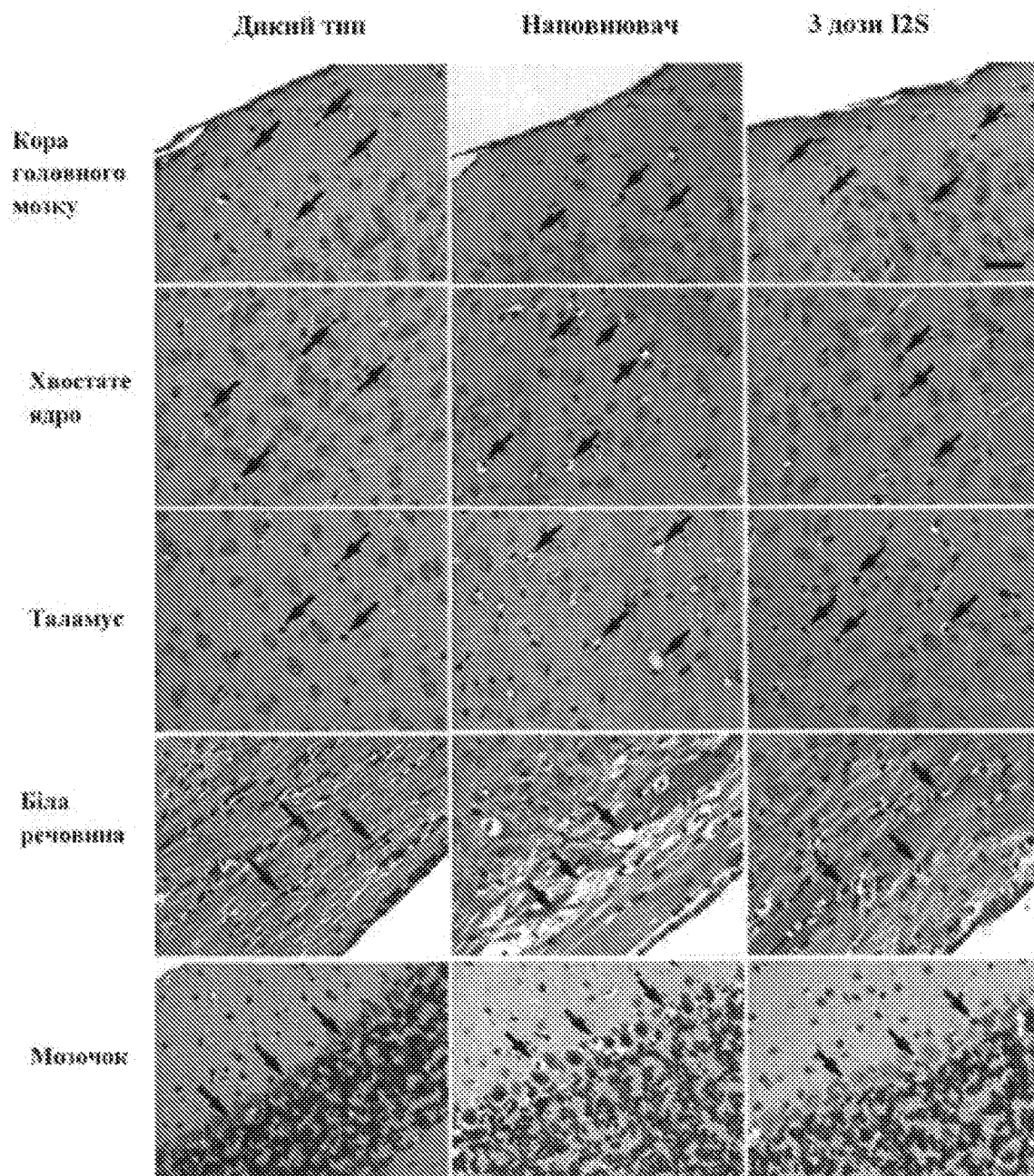


Fig. 41

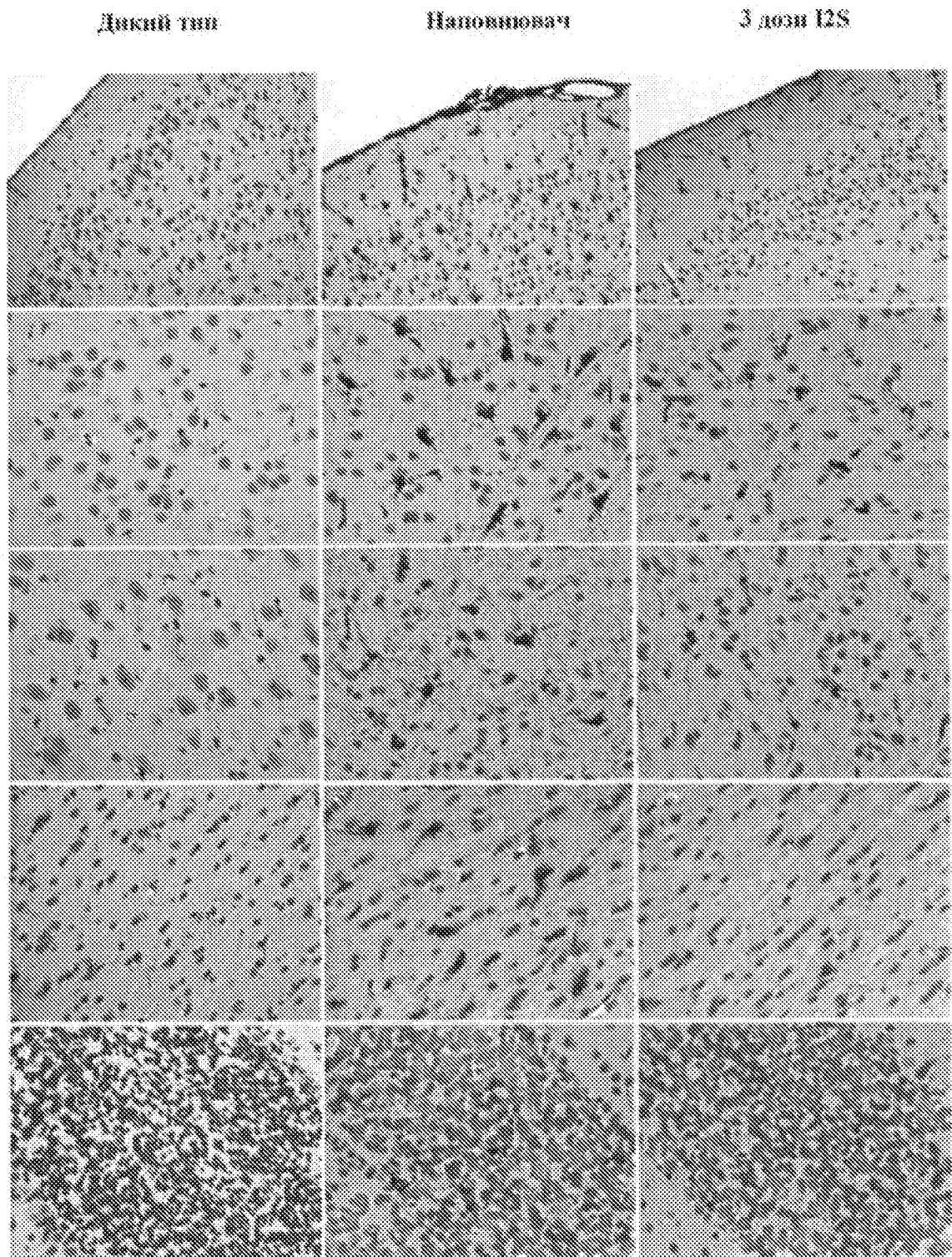
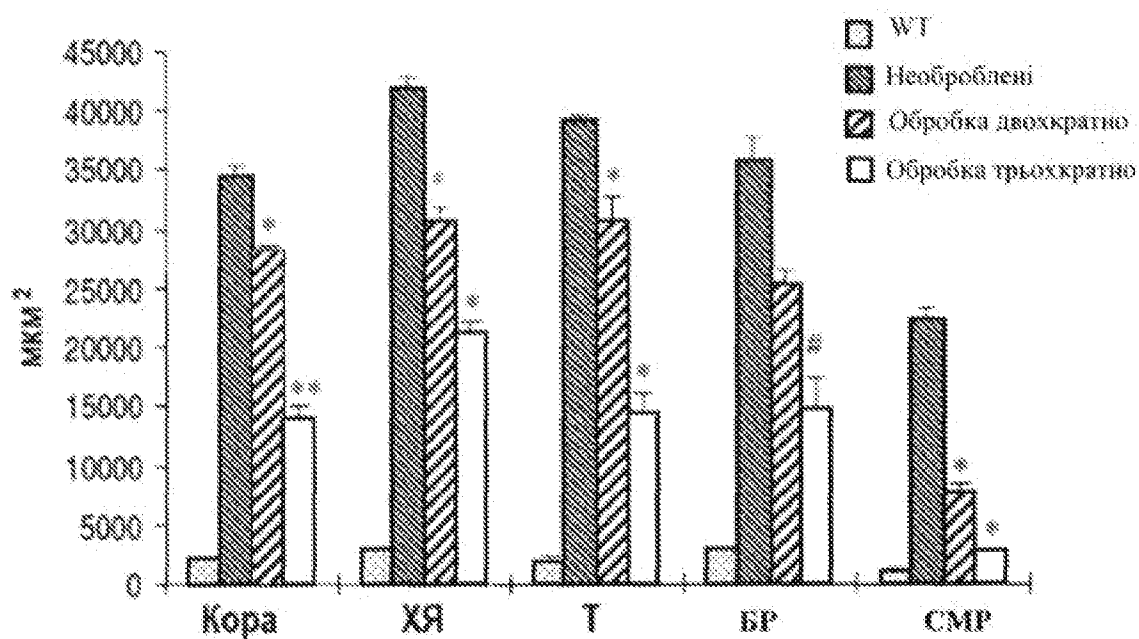
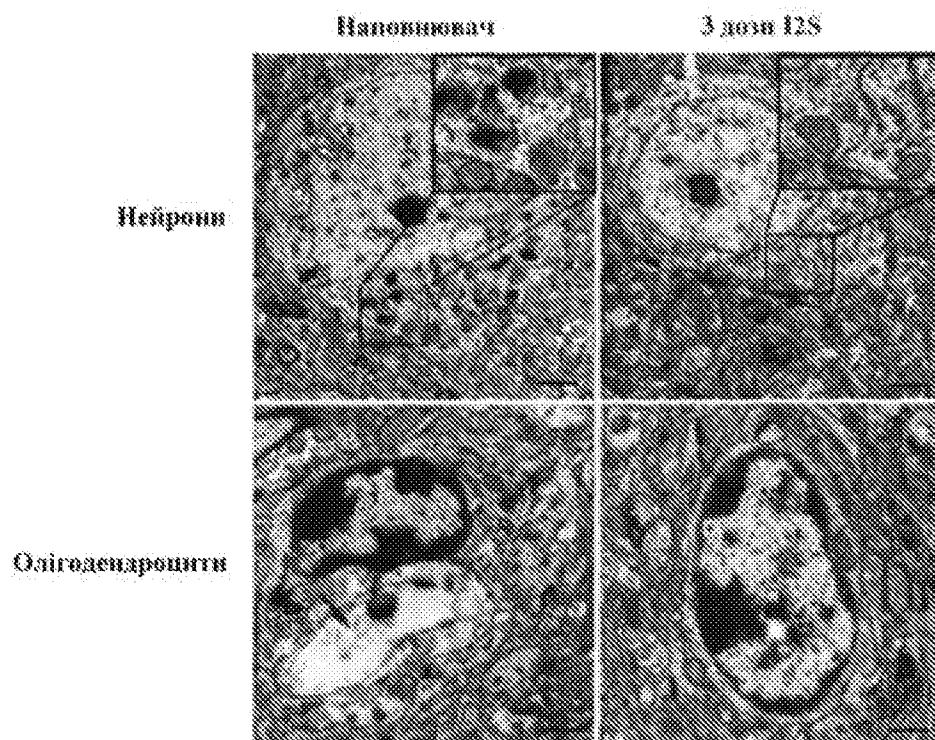


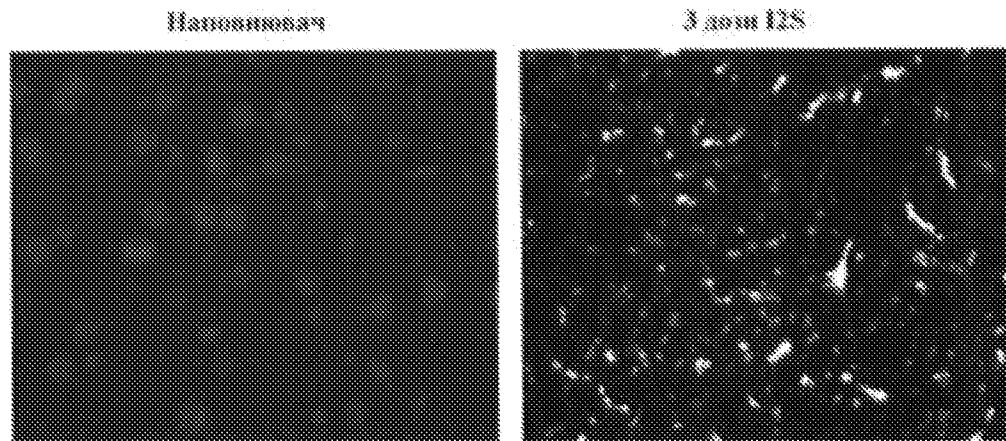
Fig. 42



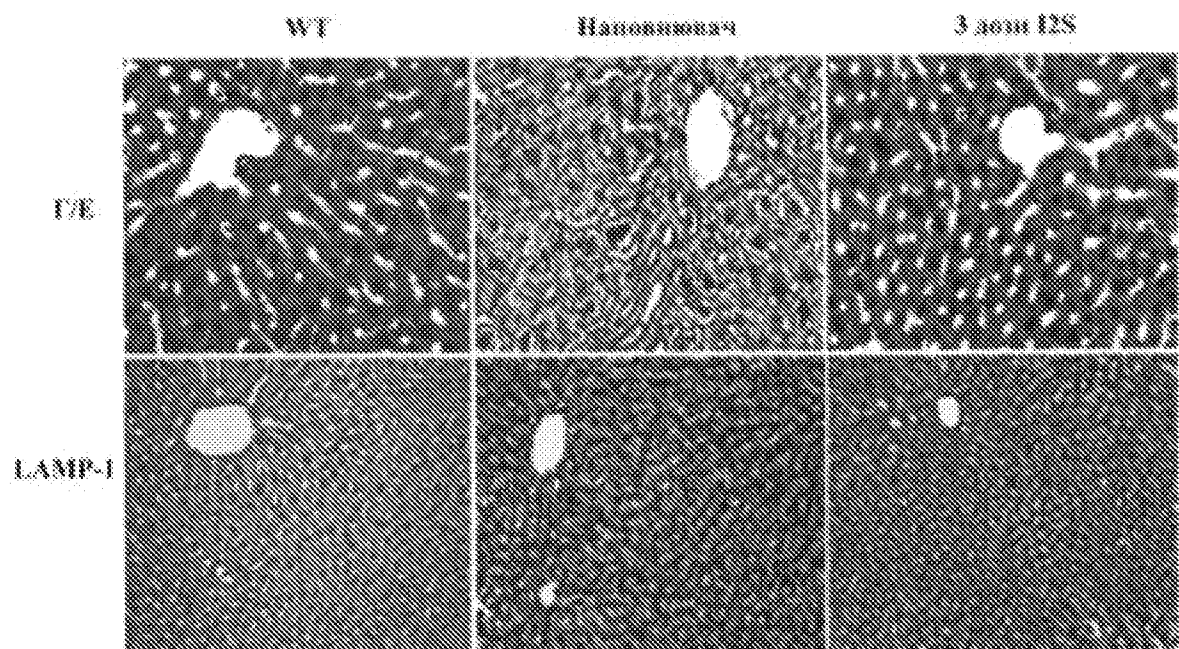
Фіг. 43
LAMP-позитивна область



Фіг. 44



Фиг. 45



Фиг. 46



Fig. 47



Fig. 48



Fig. 49



Φir. 50



Φir. 51

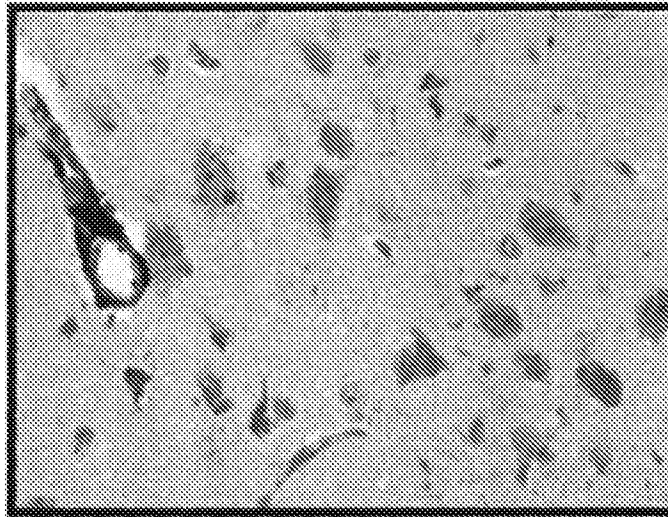


Fig. 52

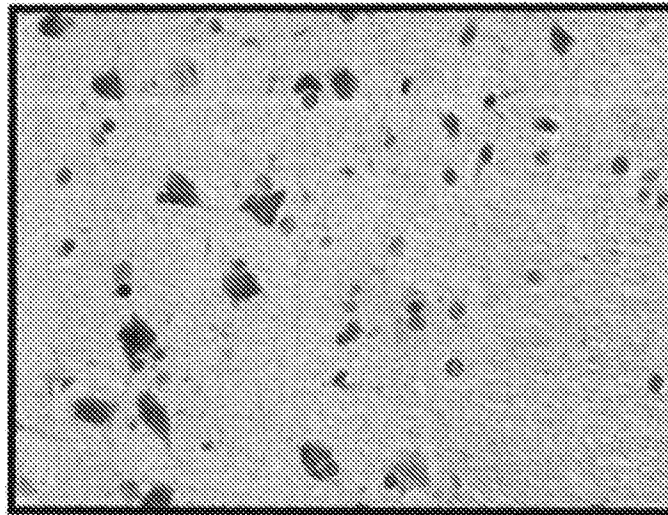


Fig. 53

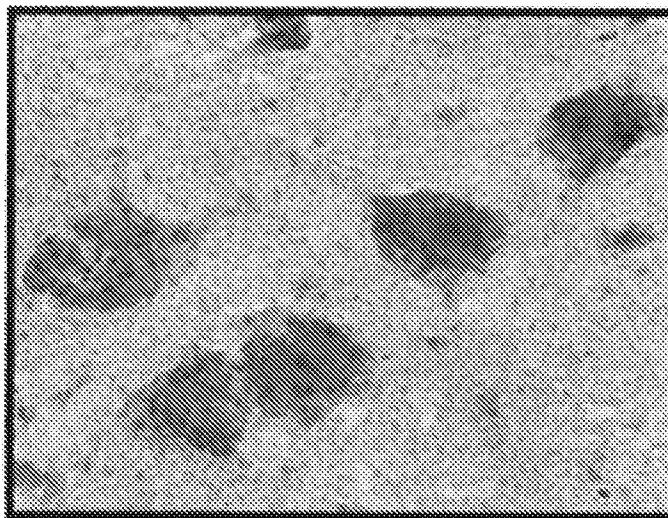


Fig. 54



Fig. 55

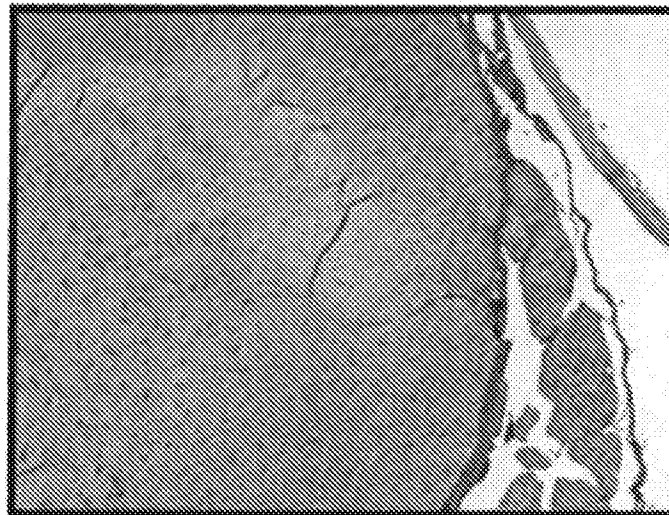
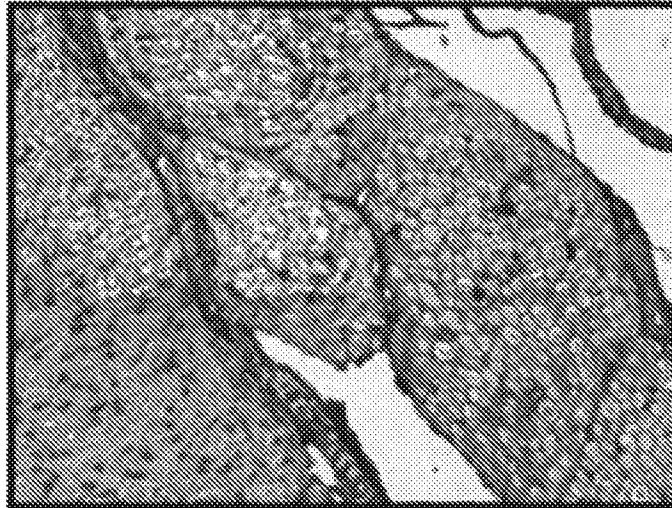
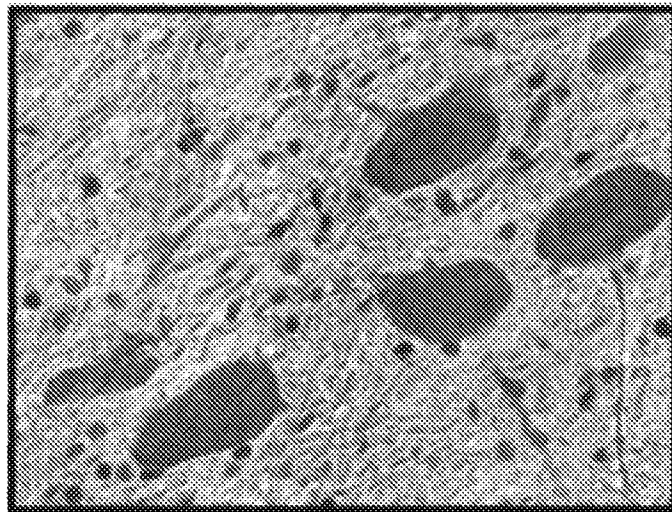


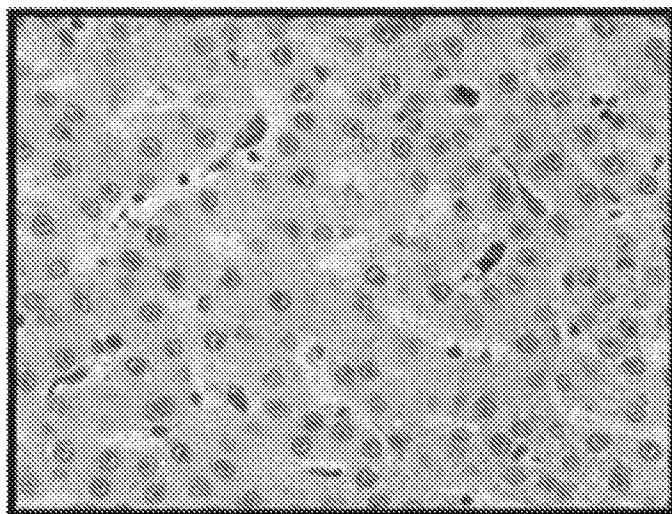
Fig. 56



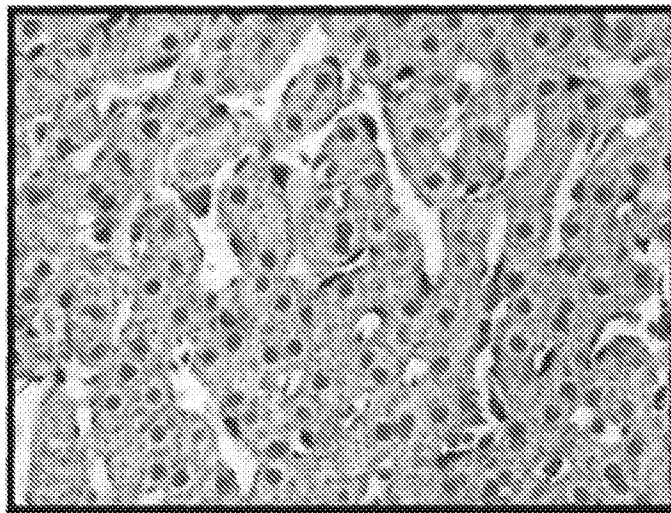
Φir. 57



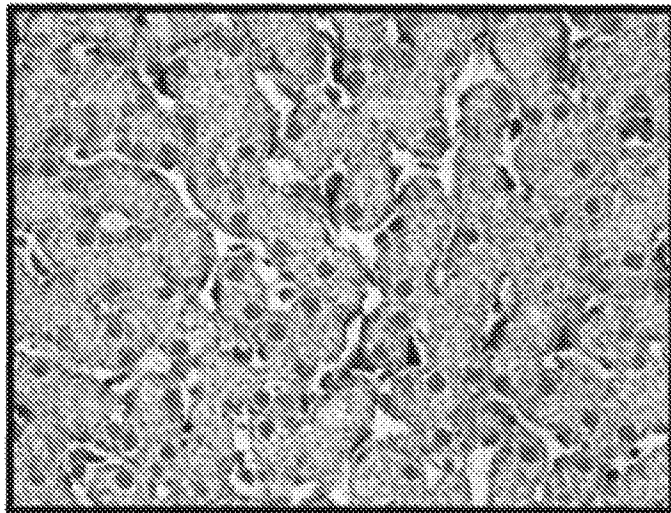
Φir. 58



Φir. 59



Φir. 60



Φir. 61

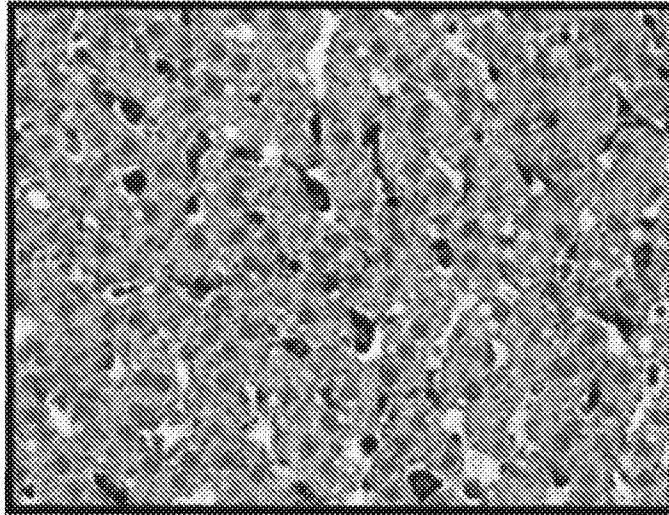


Fig. 62

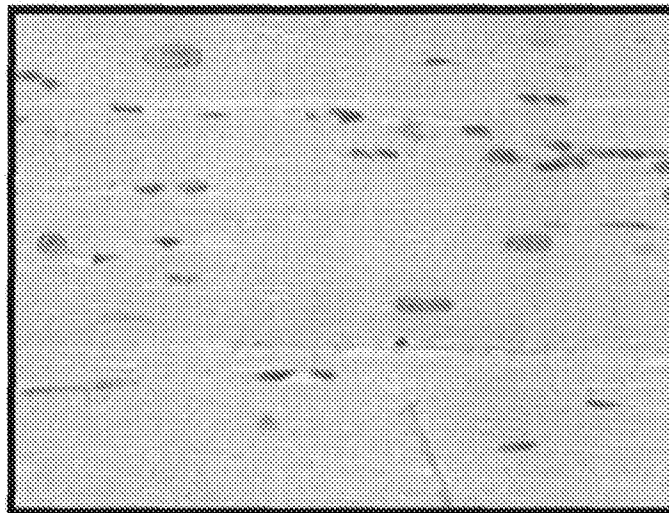


Fig. 63

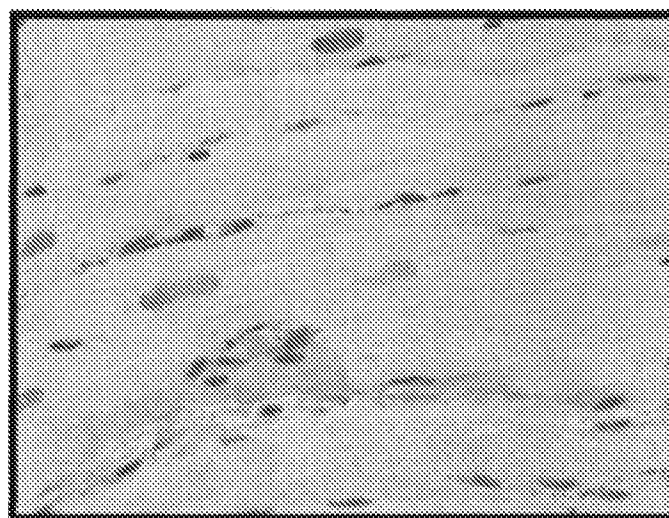
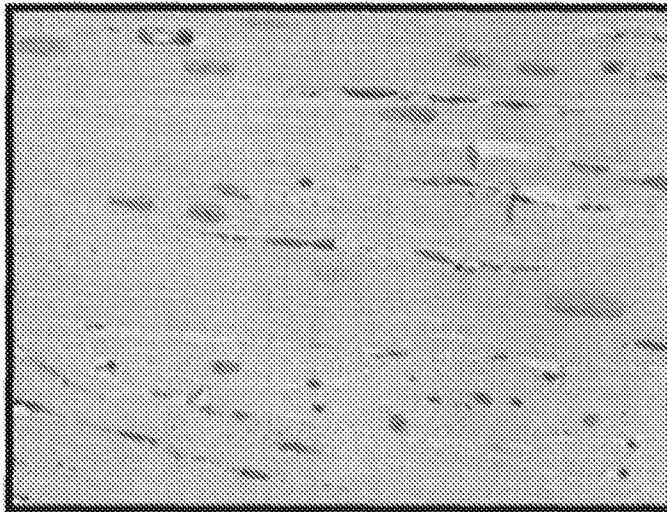
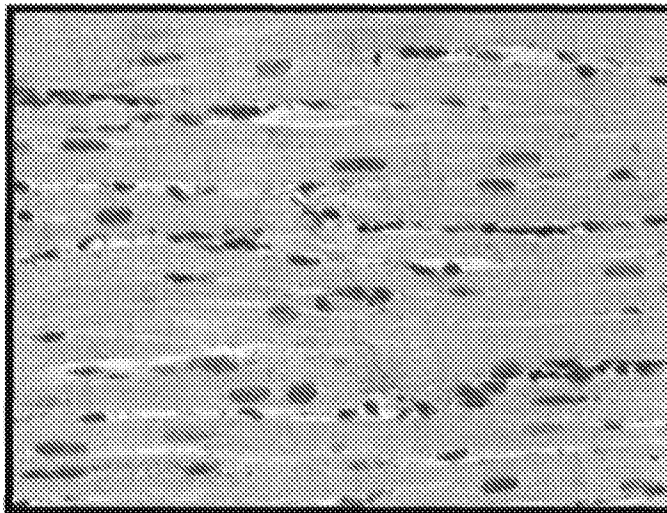


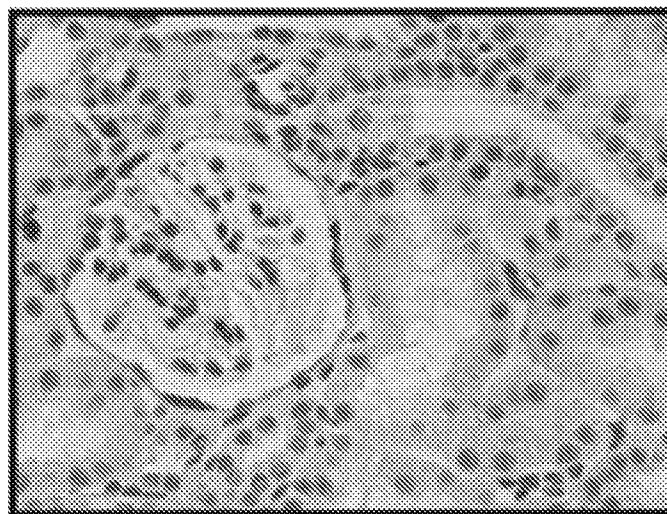
Fig. 64



Φir. 65



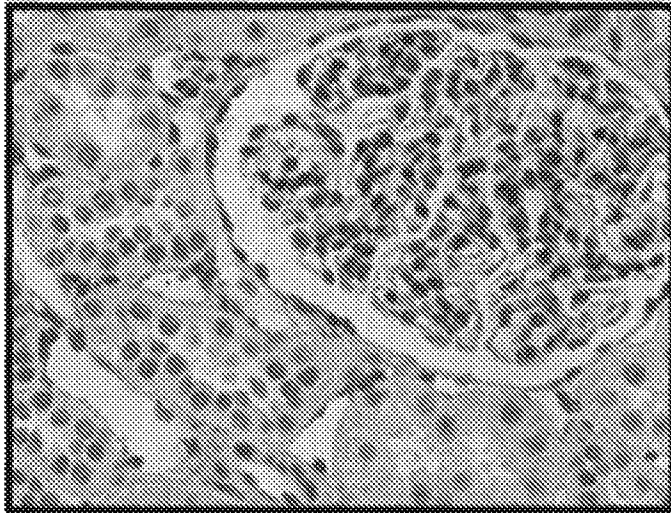
Φir. 66



Φir. 67



Φir. 68



Φir. 69

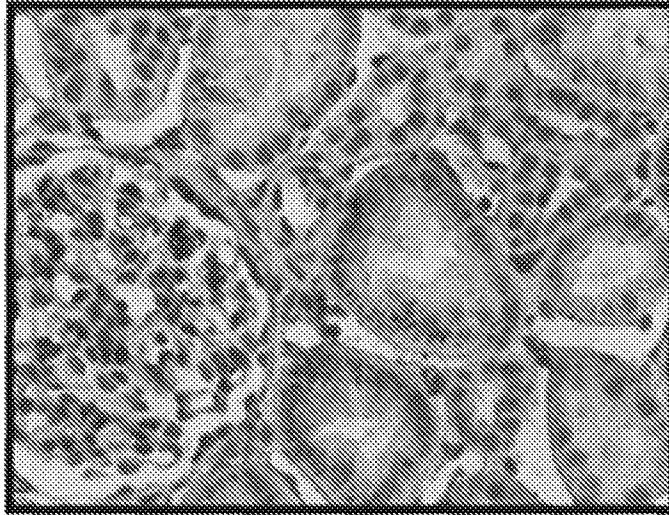


Fig. 70

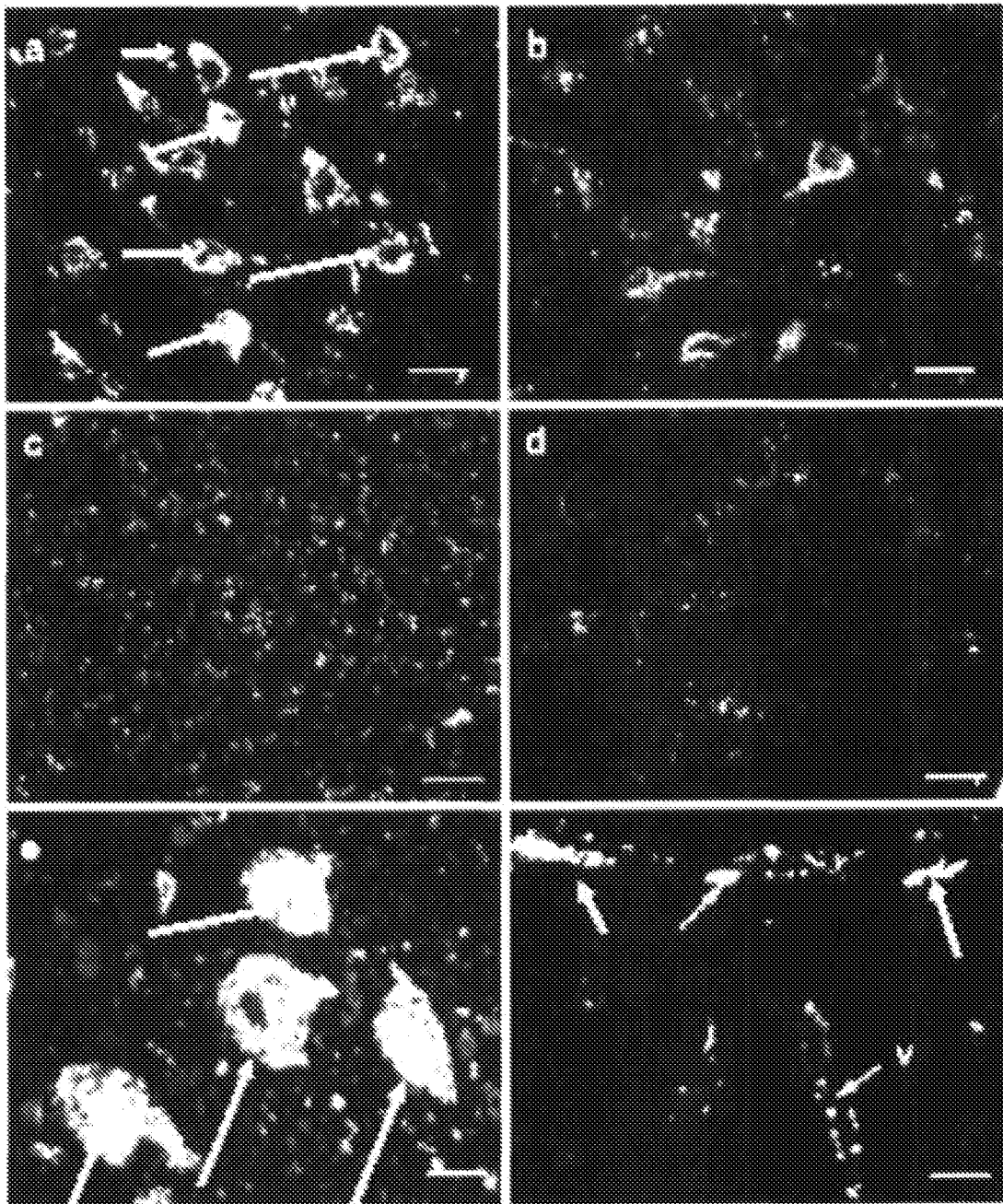
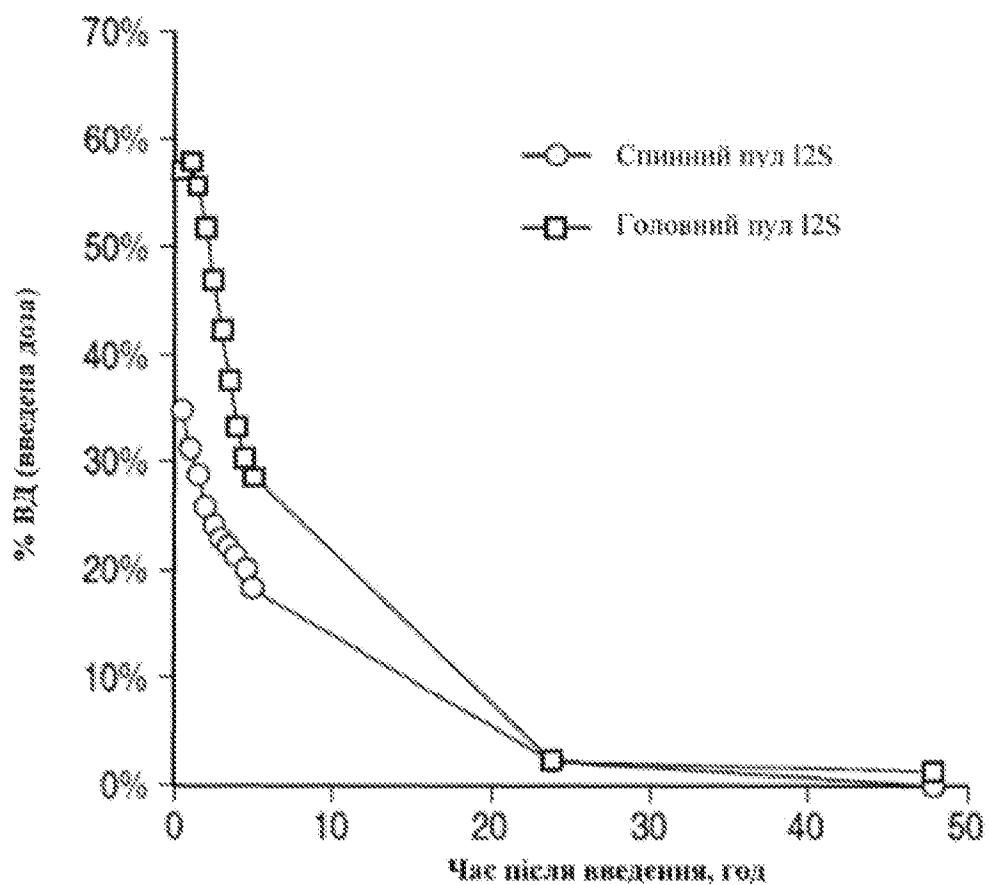
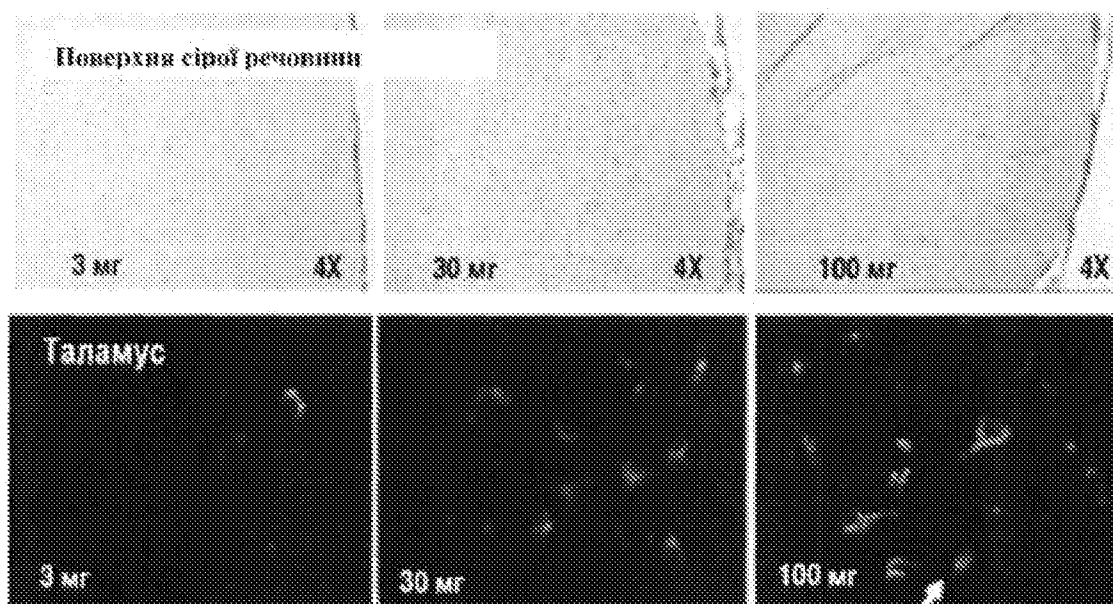


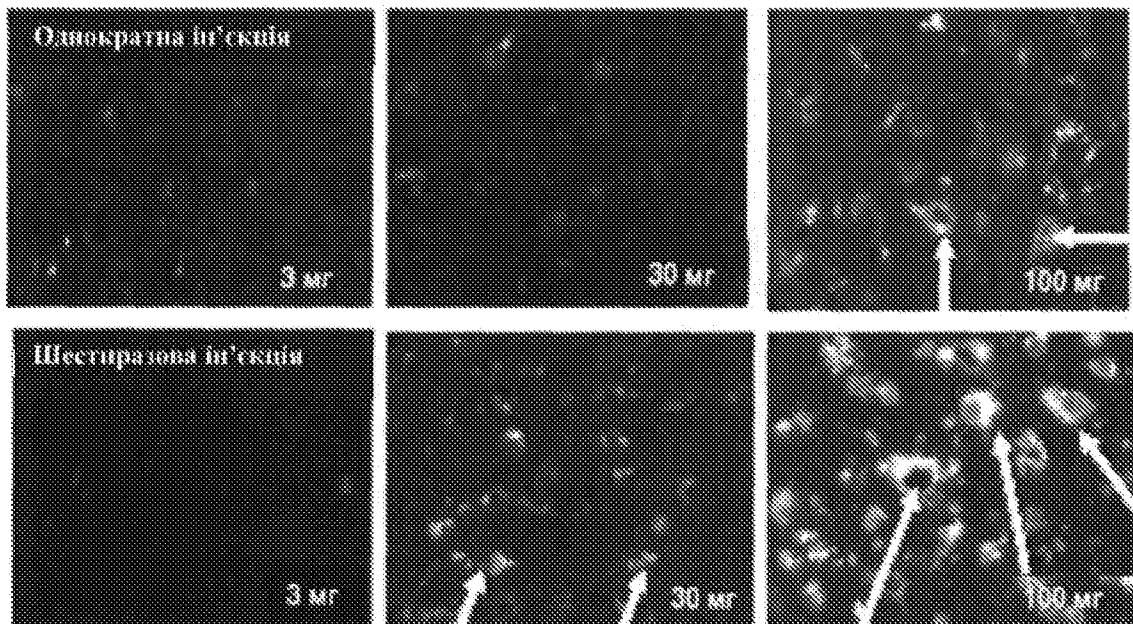
Fig. 71



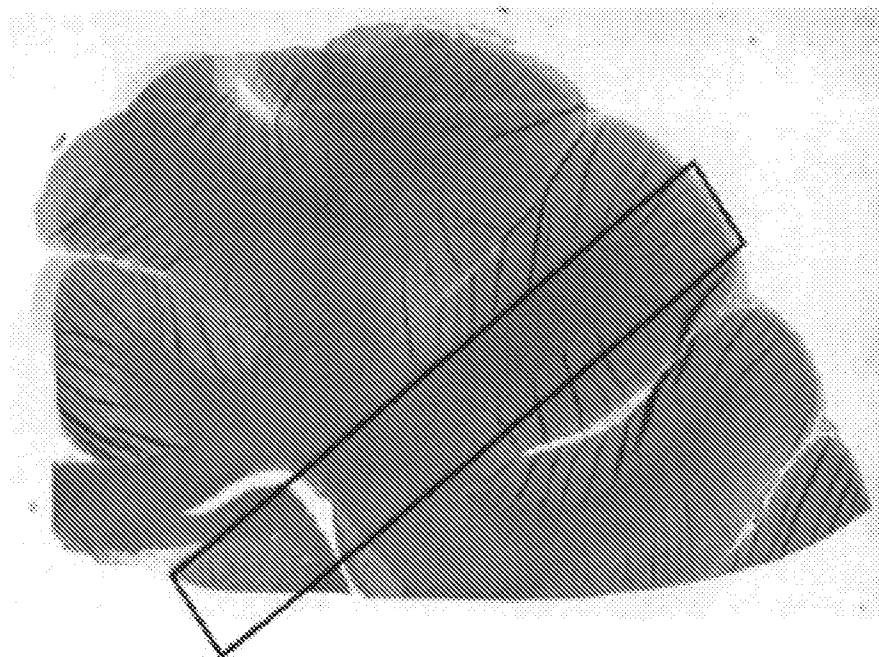
Фіг. 72



Фіг. 73



Фиг. 74



Фиг. 75А

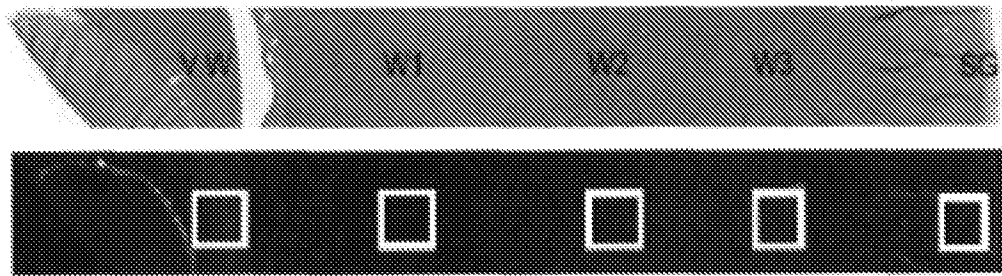


Fig. 75B

VW (ШР) - біла речовина поблизу шлуночка
W1, W2, W3 (БР1, БР2, БР3) - біла речовина
SG (СР) - сіра речовина

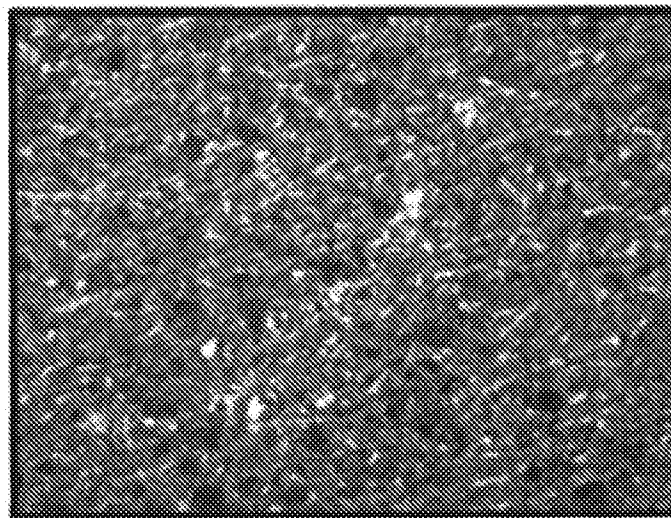


Fig. 76A

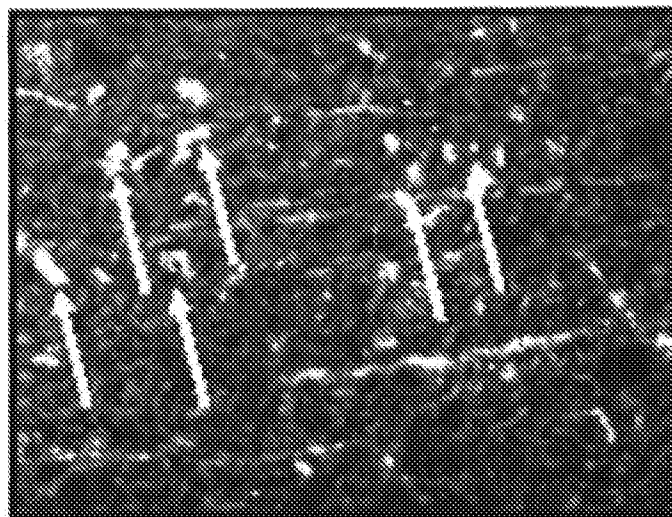
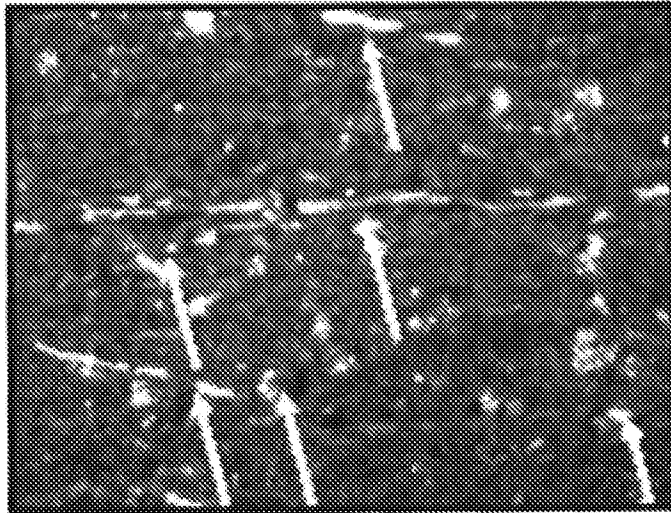
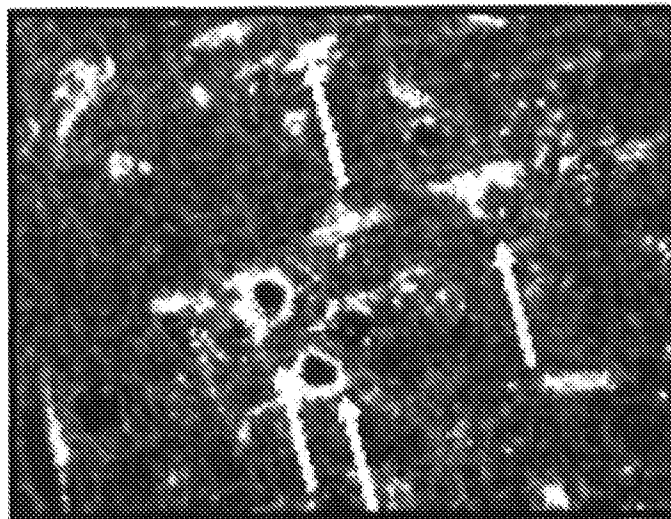


Fig. 76B



Φir. 76C



Φir. 76D

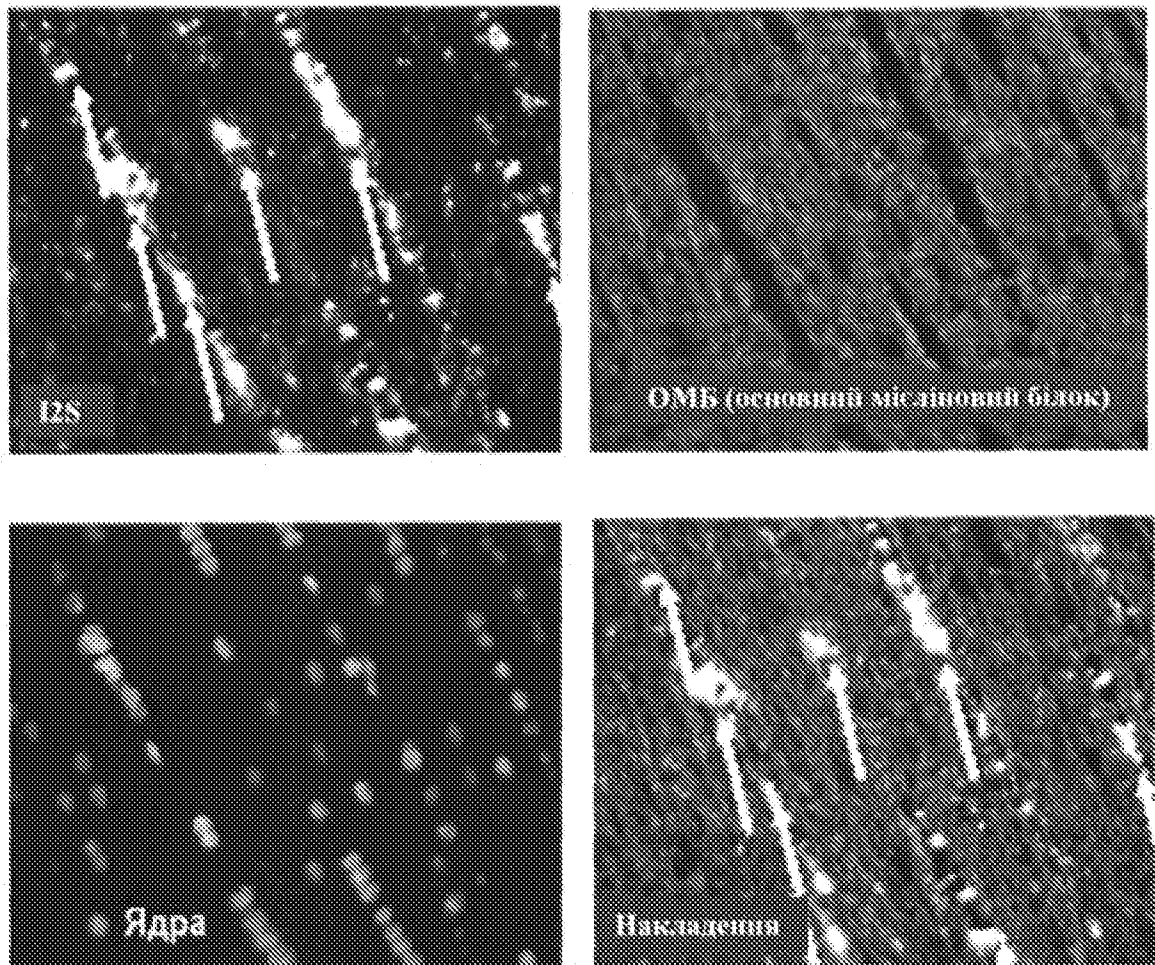


Fig. 77

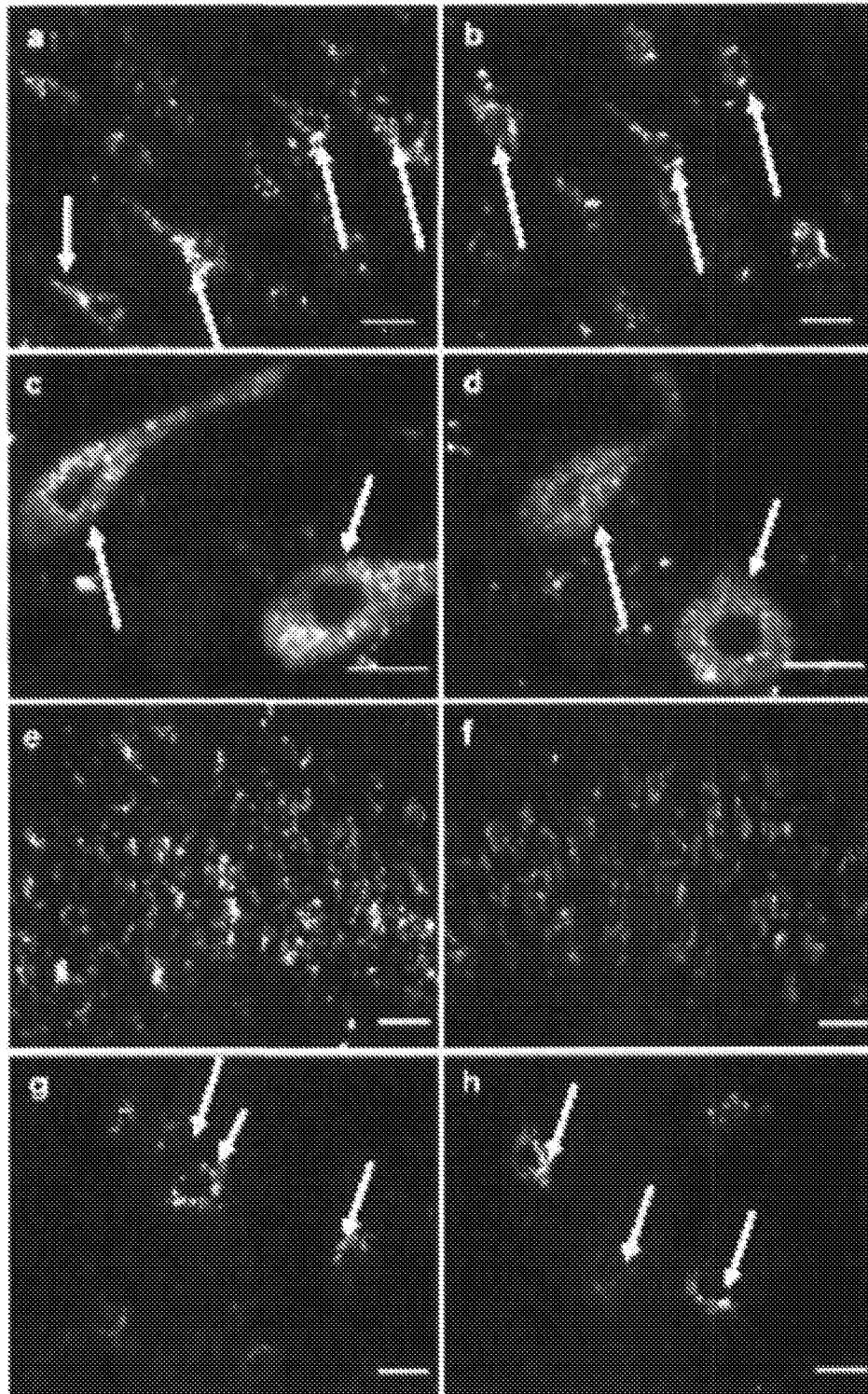


Fig. 78

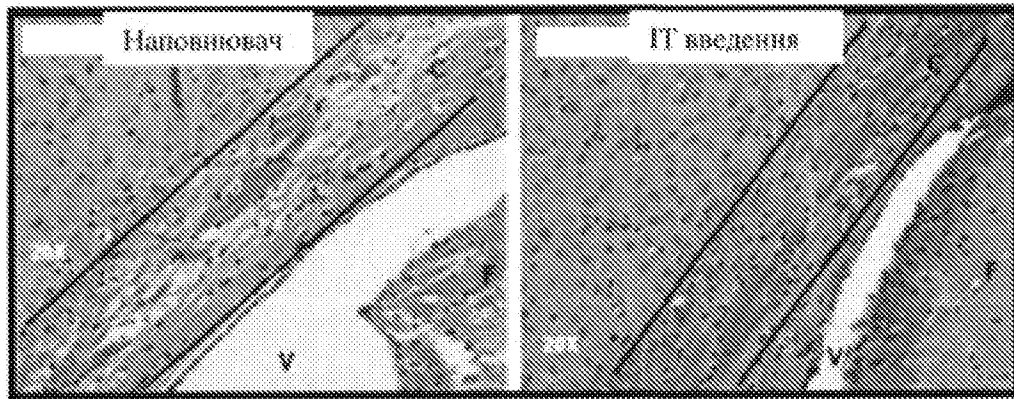


Fig. 79

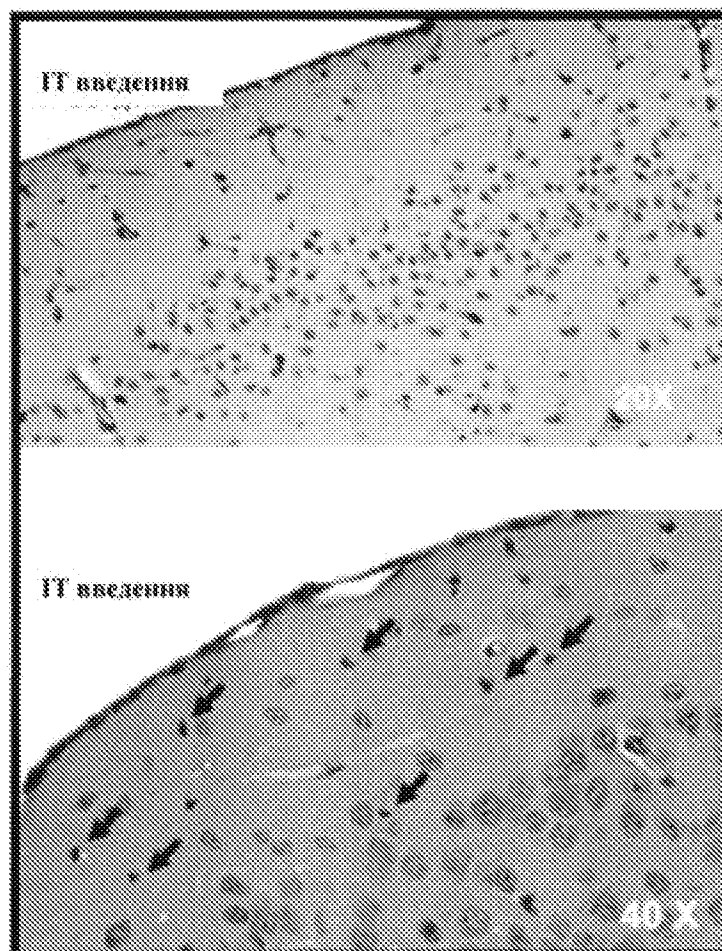
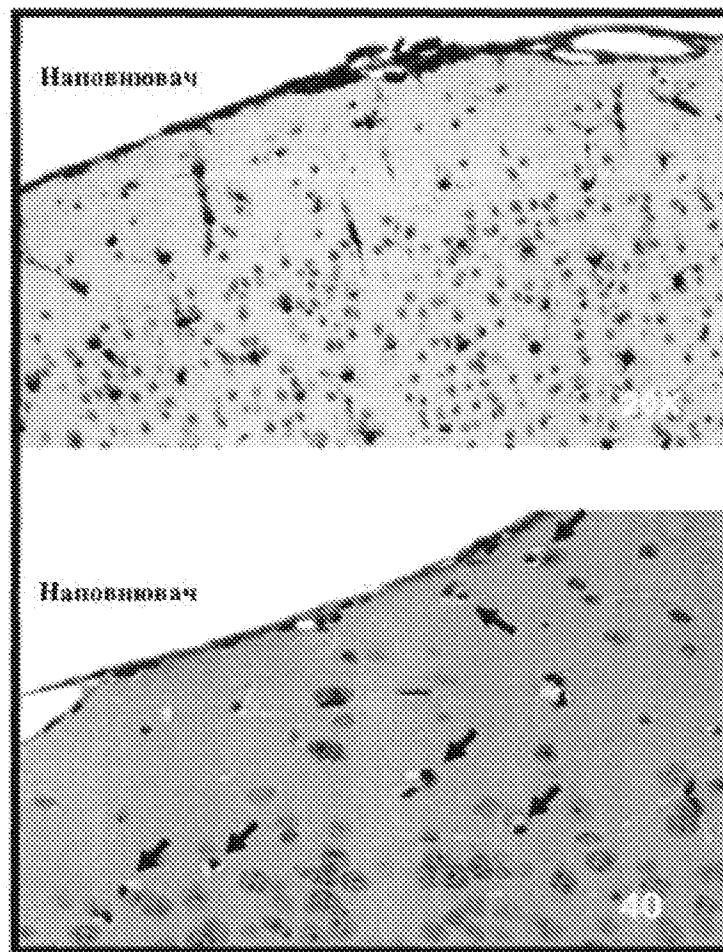
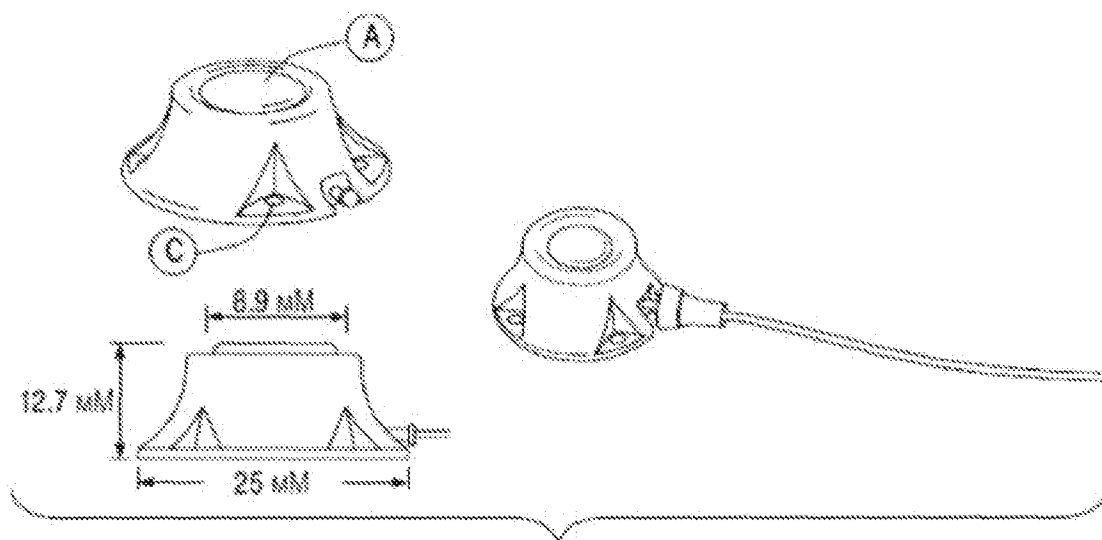


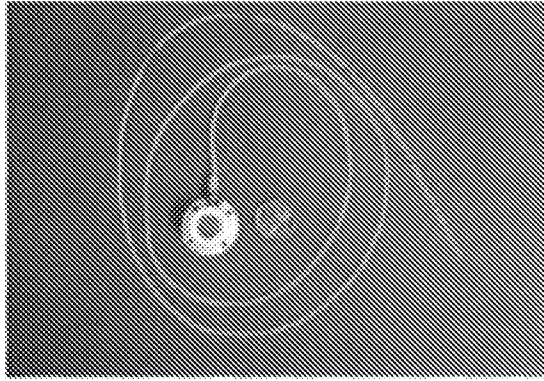
Fig. 80A



Фиг. 80В

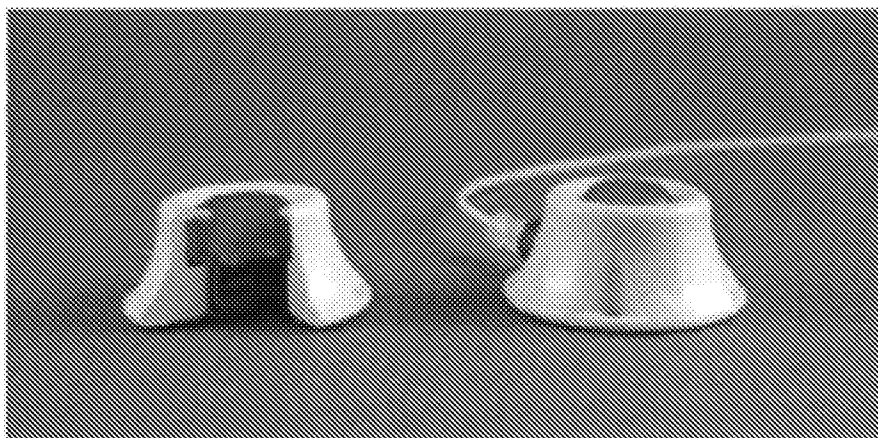


Фиг. 81

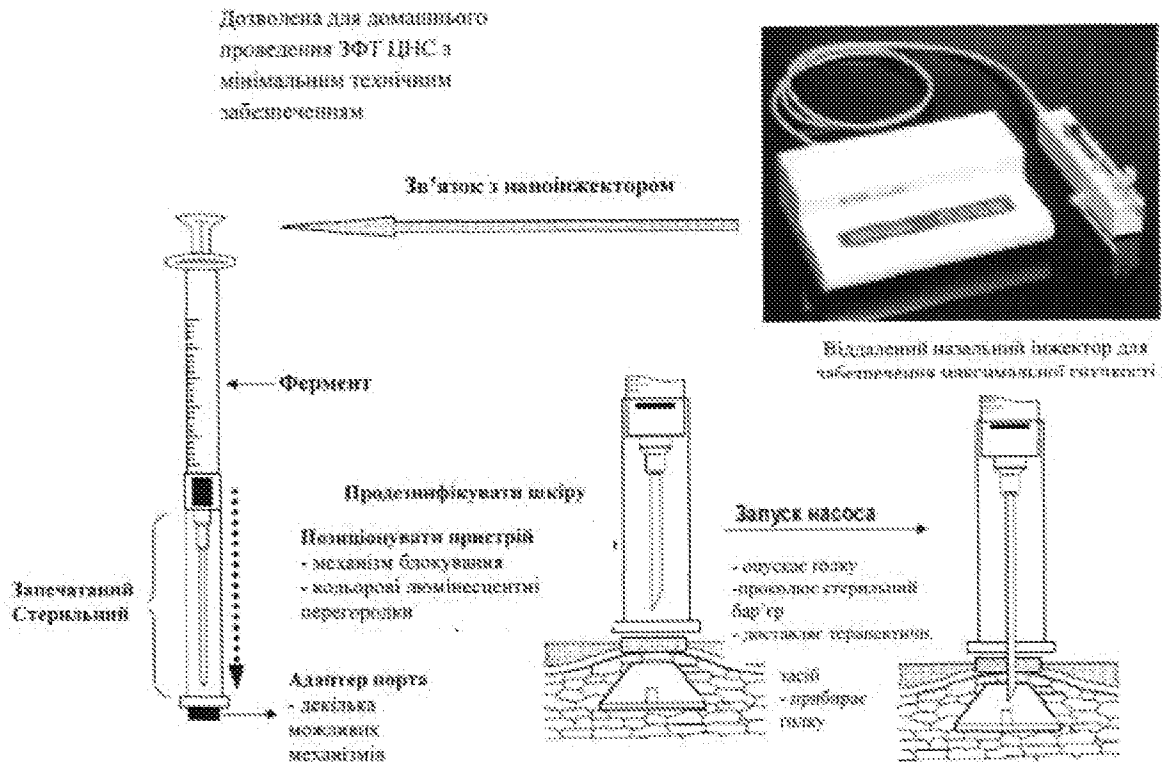


Фіг. 82

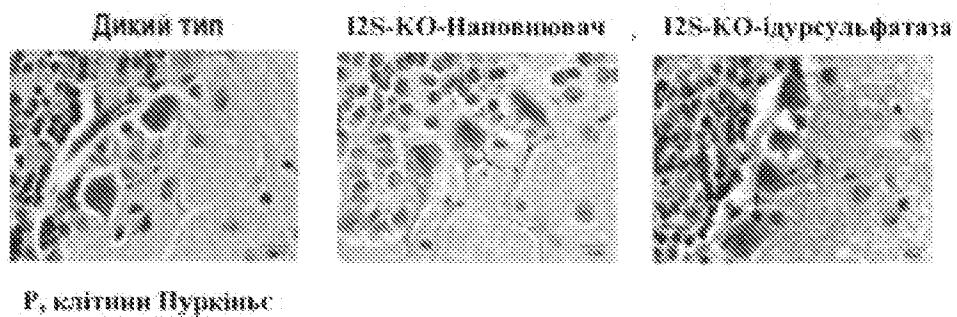
Низькопрофільна система доступу PORT-A-CATH®, яка інтратекально імплантується



Фіг. 83



Фіг. 84



Фіг. 85

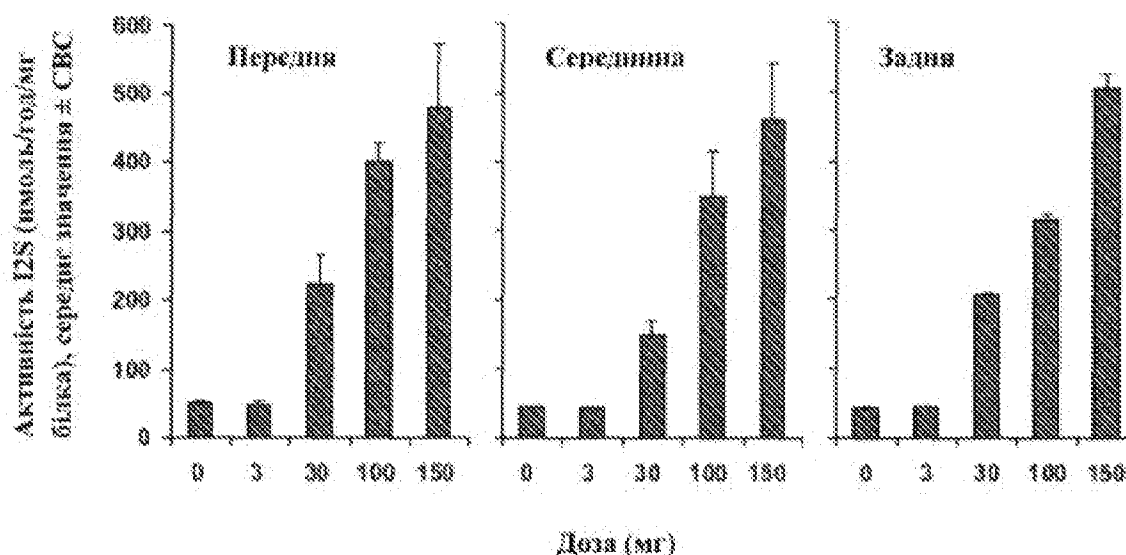


Fig. 86

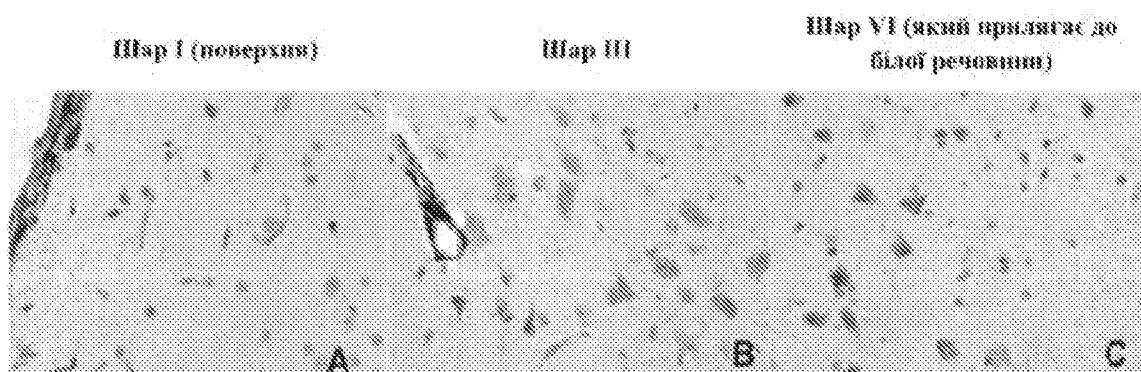


Fig. 87

I2S-позитивні нейрони, гліальні клітини і клітини оболонок виявлені в шарі I (Панель A), шарі III (Панель B) та шарі VI (Панель C) мозку. Дана тварина відноситься до групи, яка одержувала 30 мг (збільшення 40X)

Група, яка одержувала 30 мг. Початкове збільшення = 40X

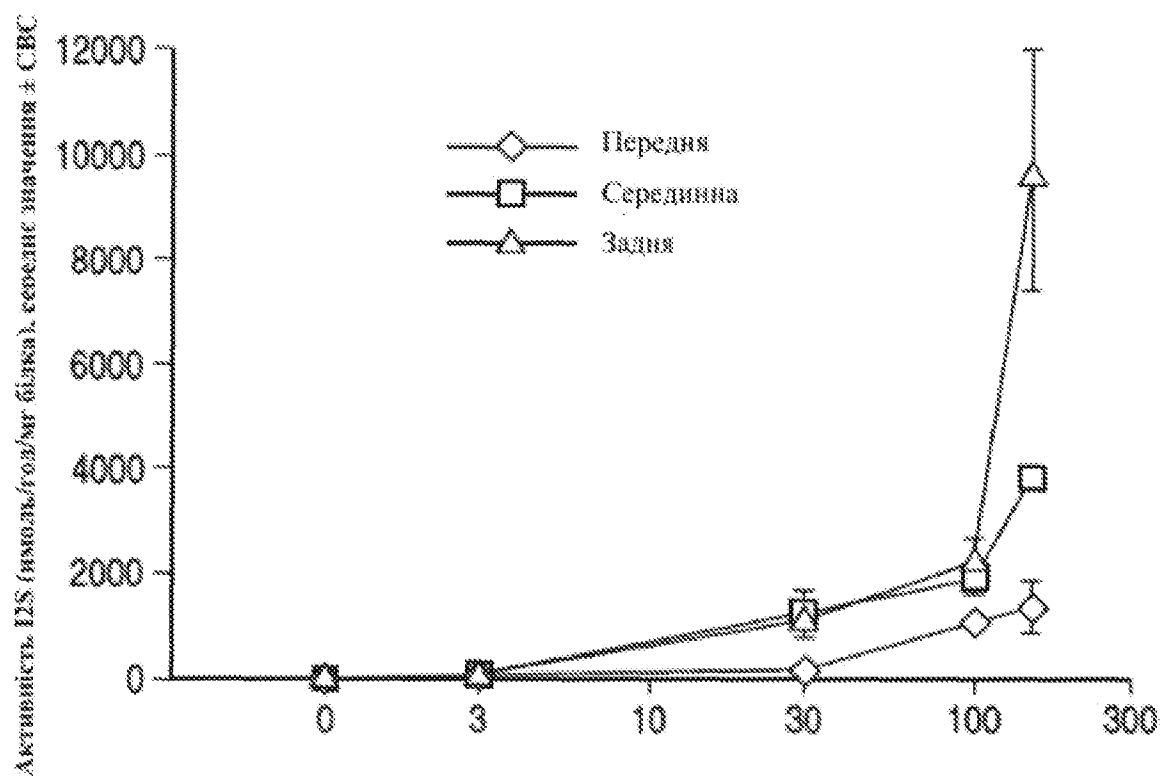


Fig. 88

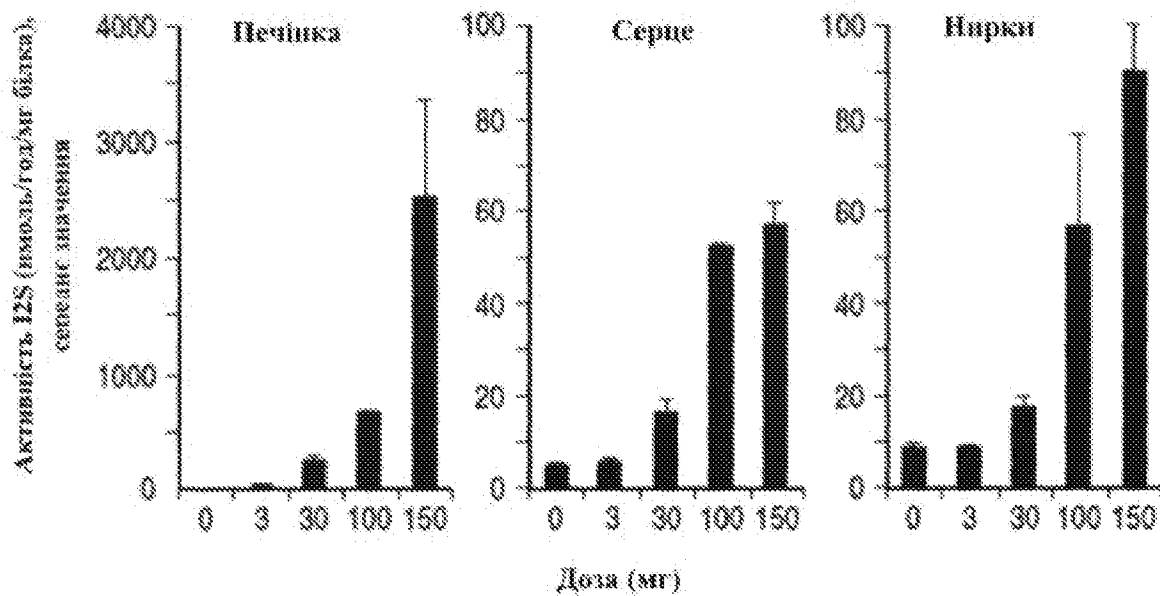
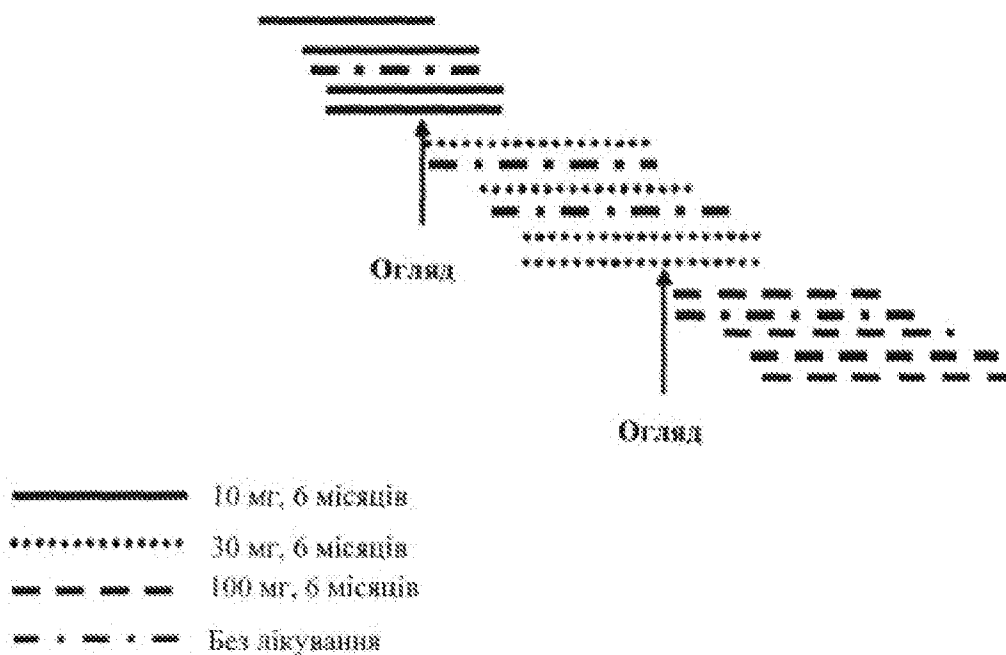
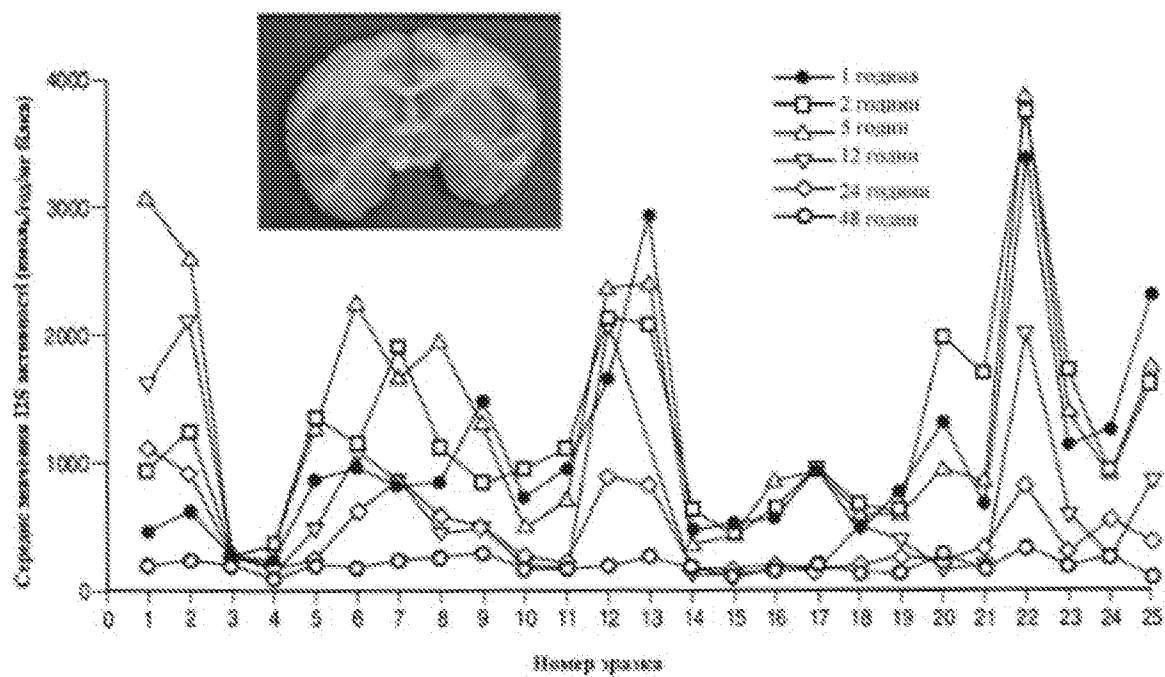


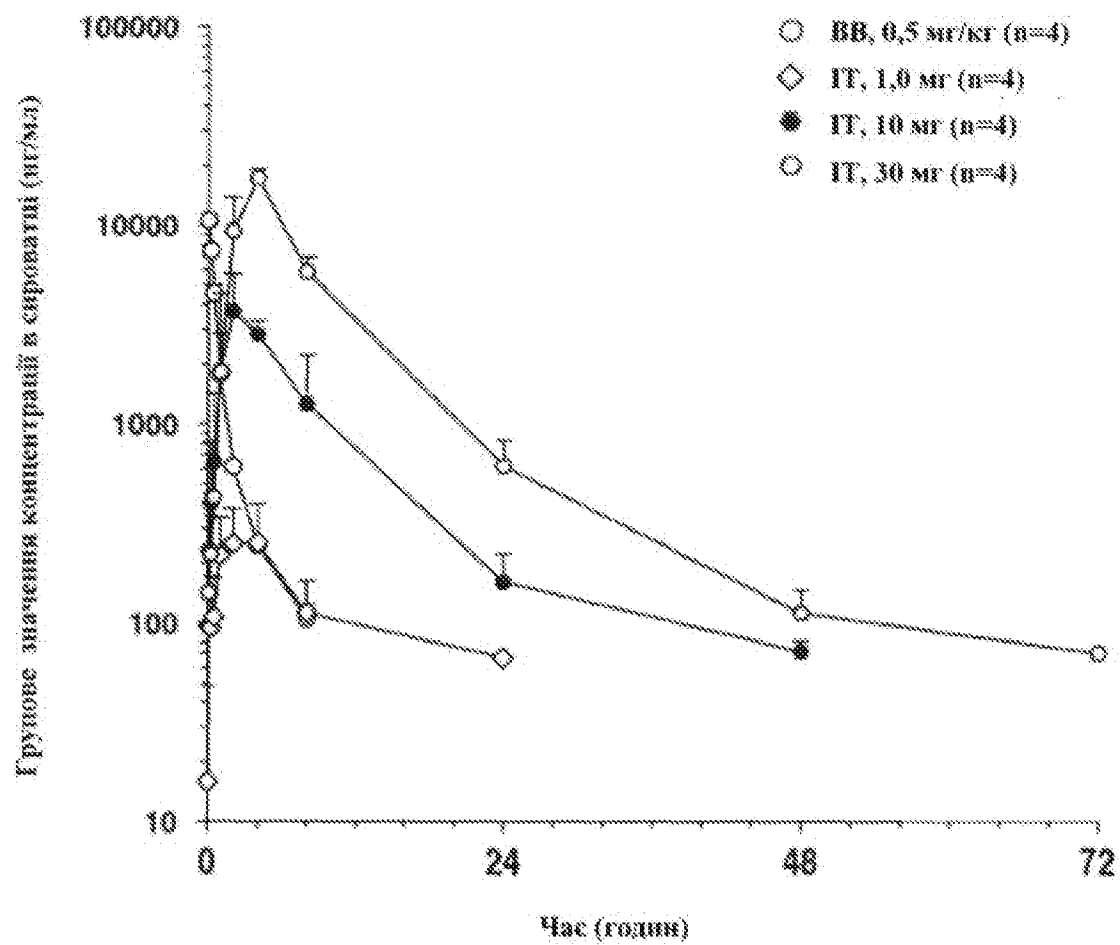
Fig. 89



Фіг. 90



Фіг. 91



Фіг. 92
Концентрація I2S в сироватці

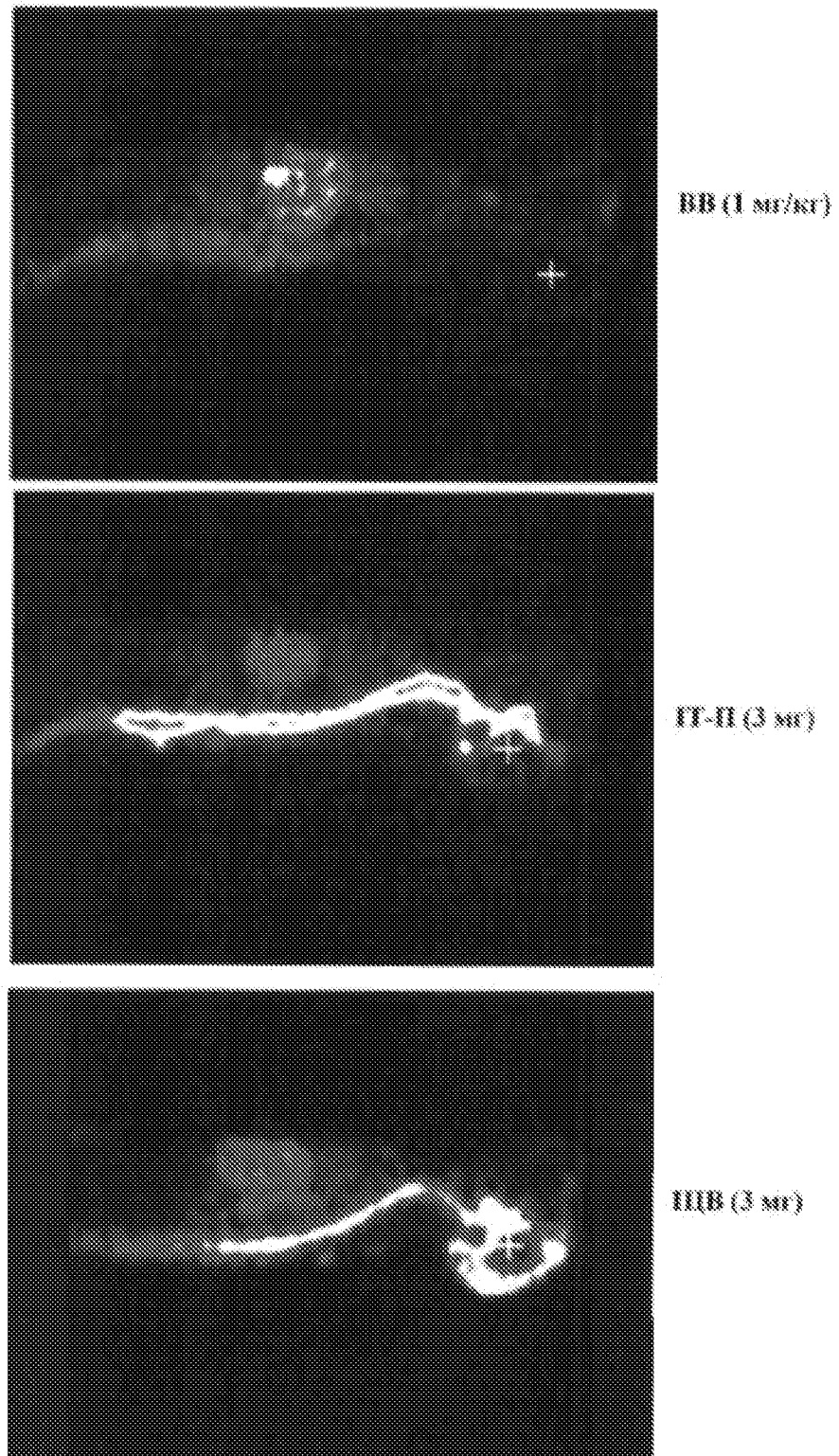


Fig. 93

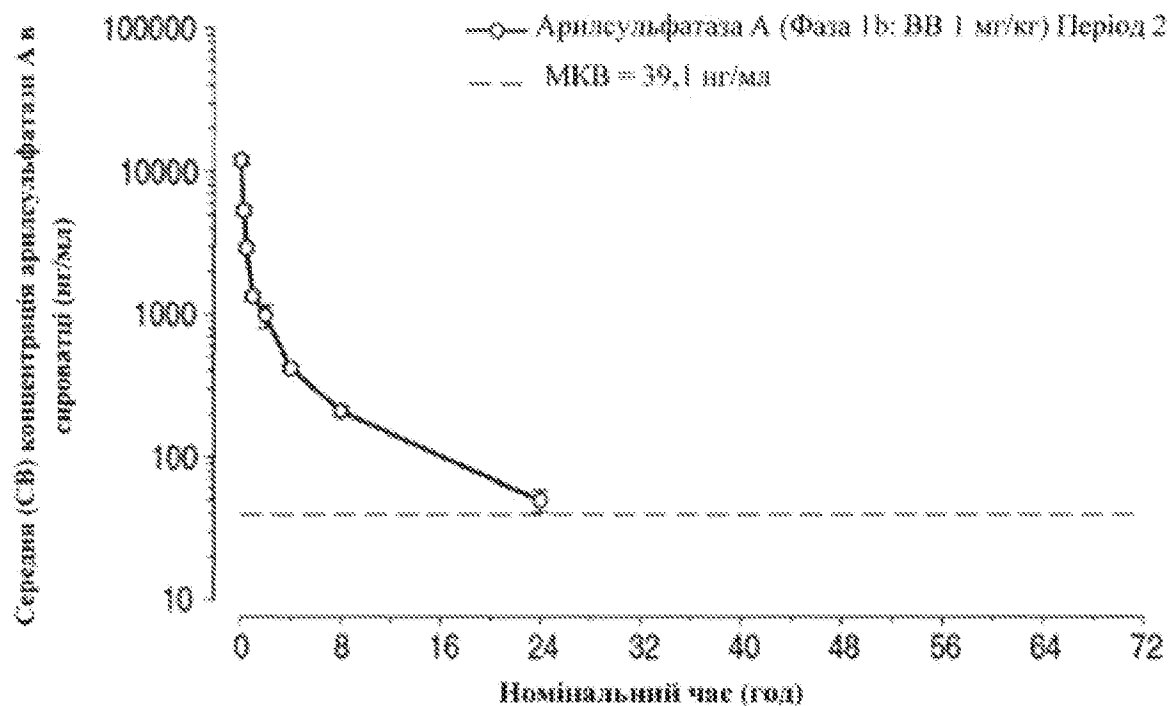


Fig. 94

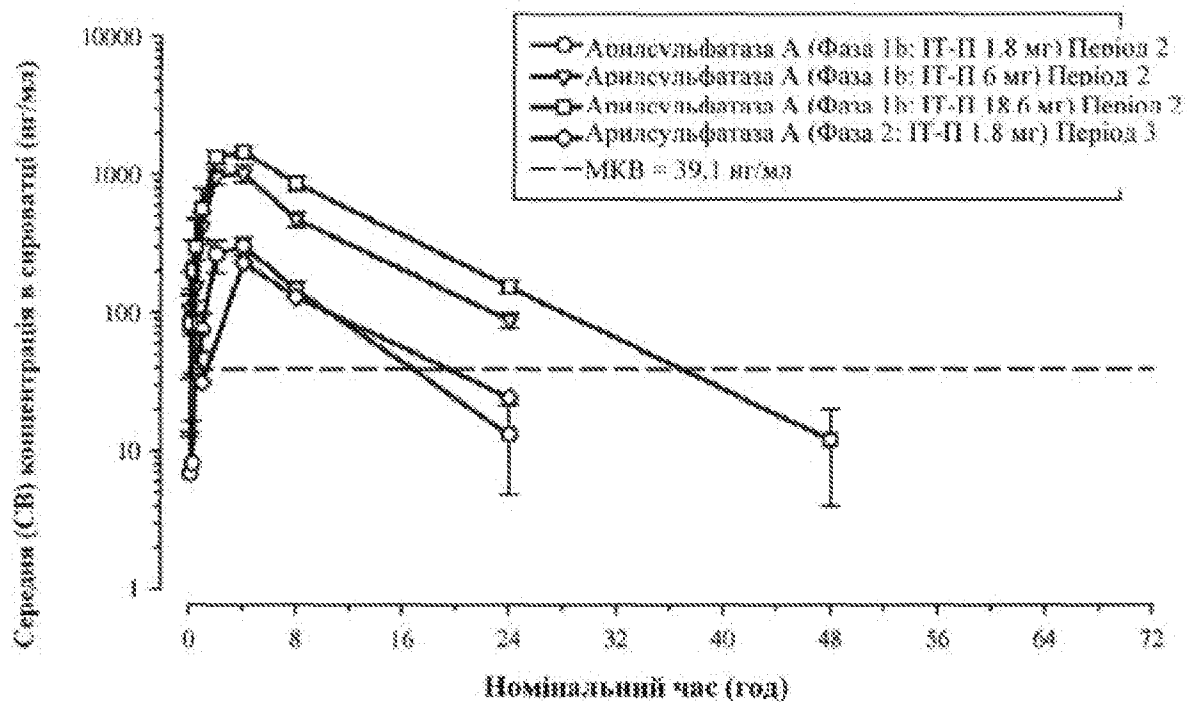


Fig. 95

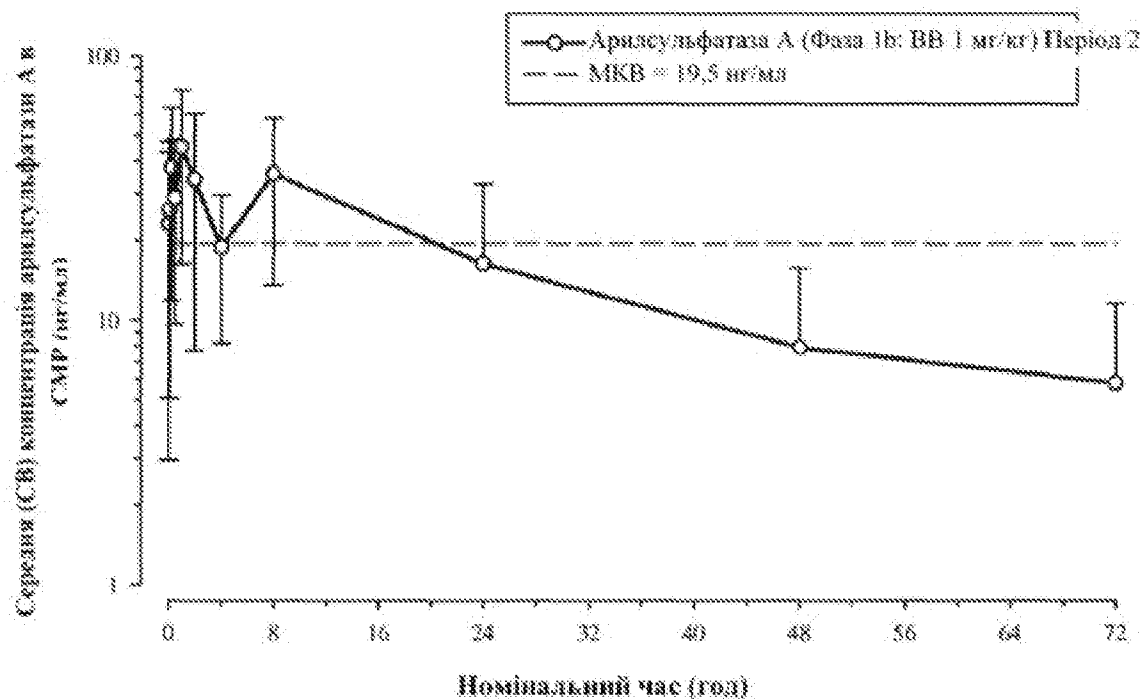


Fig. 96

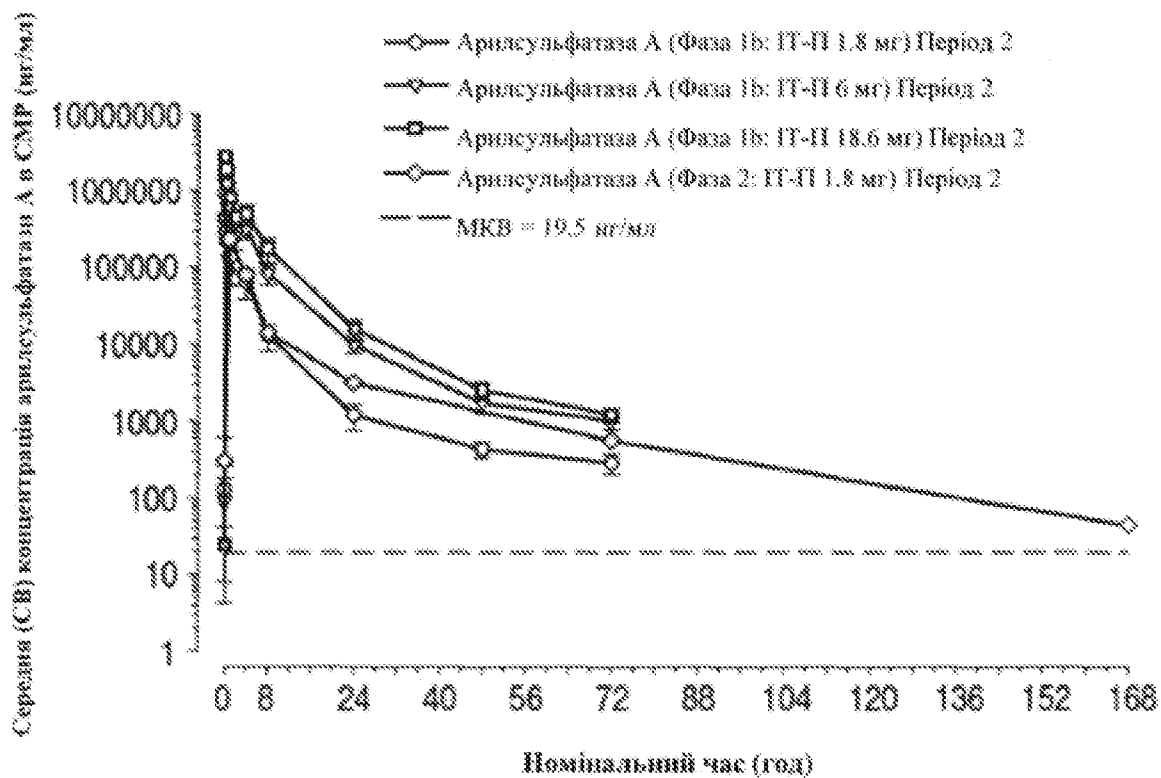


Fig. 97



Fig. 98

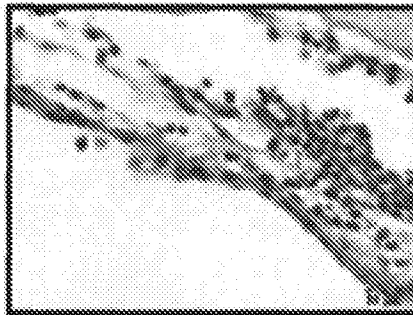


Fig. 99

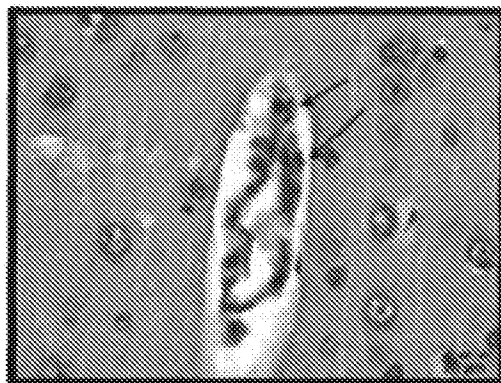
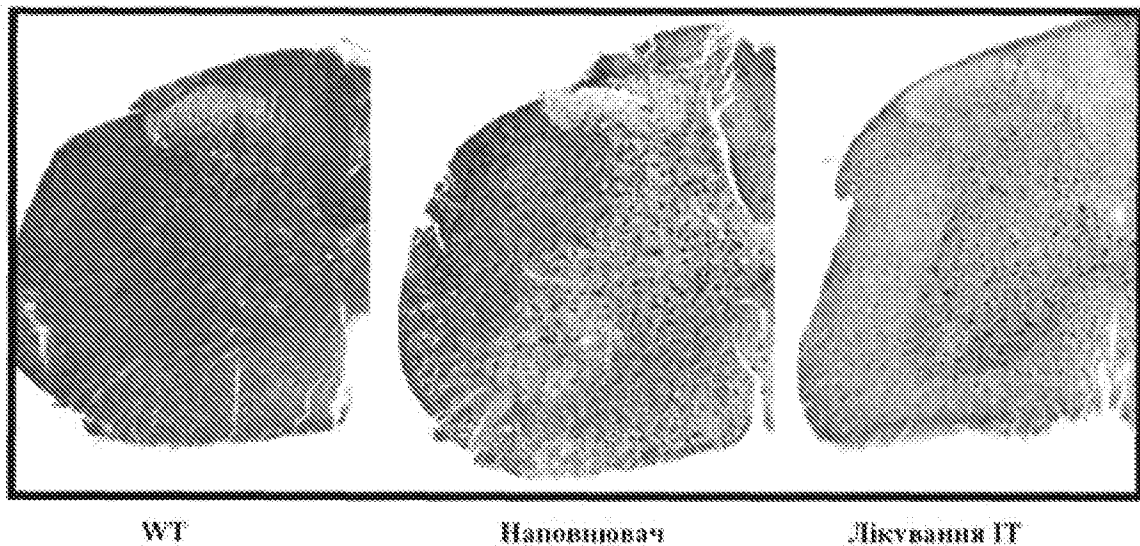
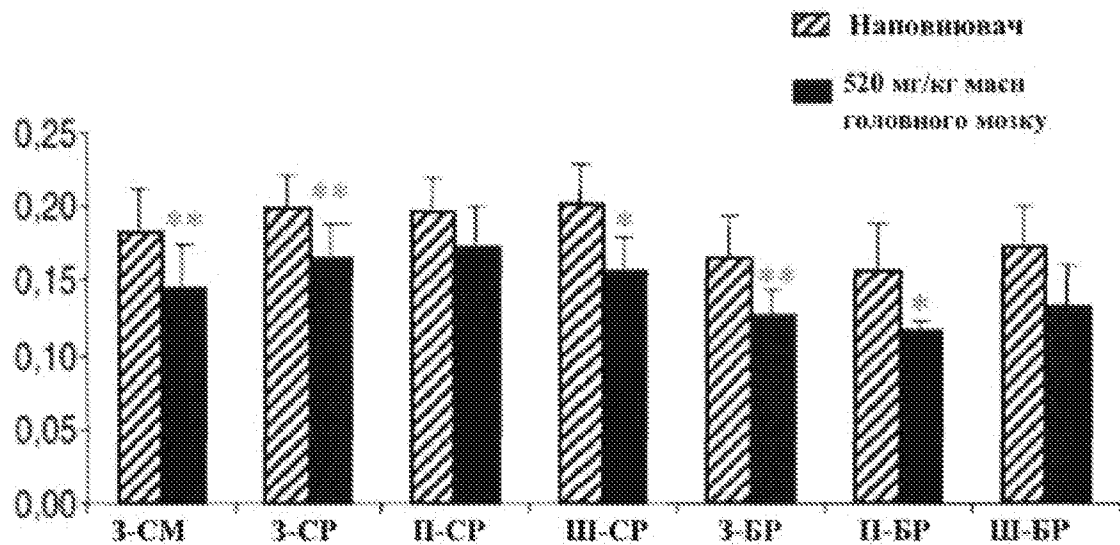


Fig. 100



Фіг. 101

WT = дикий тип; Миші, які одержували лікування IT у вигляді 4 доз ghASA 1 раз на тиждень по 520 мг/кг маси головного мозку (0,21 мг), 4x збільшення



Фіг. 102

**P < 0,001; *P < 0,05;

3-СМ = увесь спинний мозок;

3-СР = уся сіра речовина;

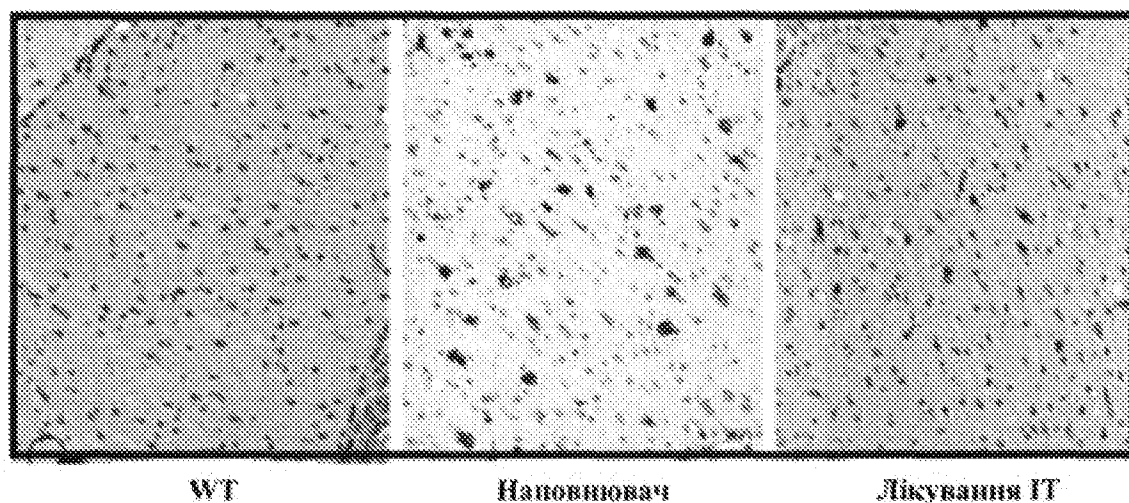
П-СР = поперекова сіра речовина;

Ш-СР = шийна сіра речовина;

3-БР = уся біла речовина;

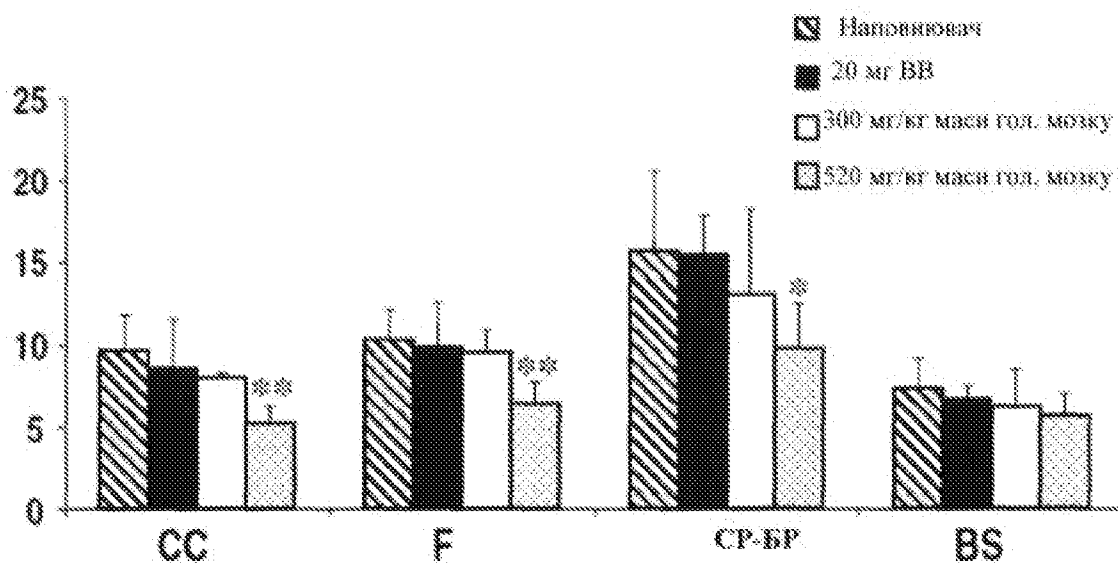
П-БР = поперекова біла речовина;

Ш-БР = шийна біла речовина

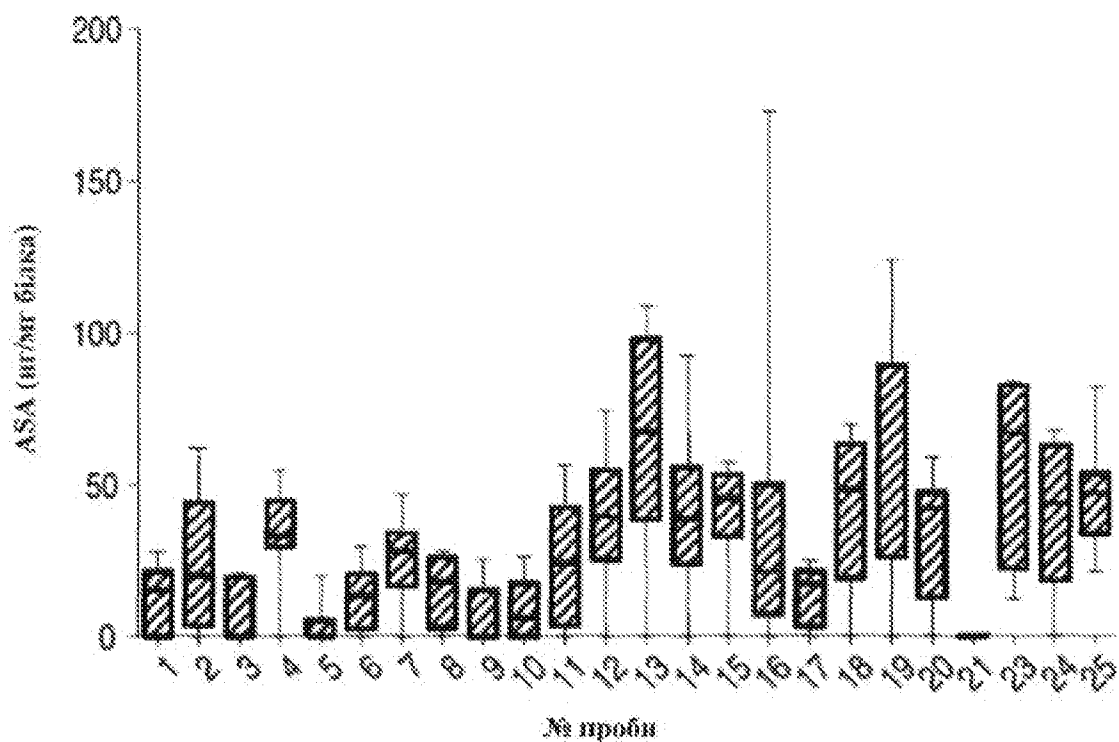


Фіг. 103

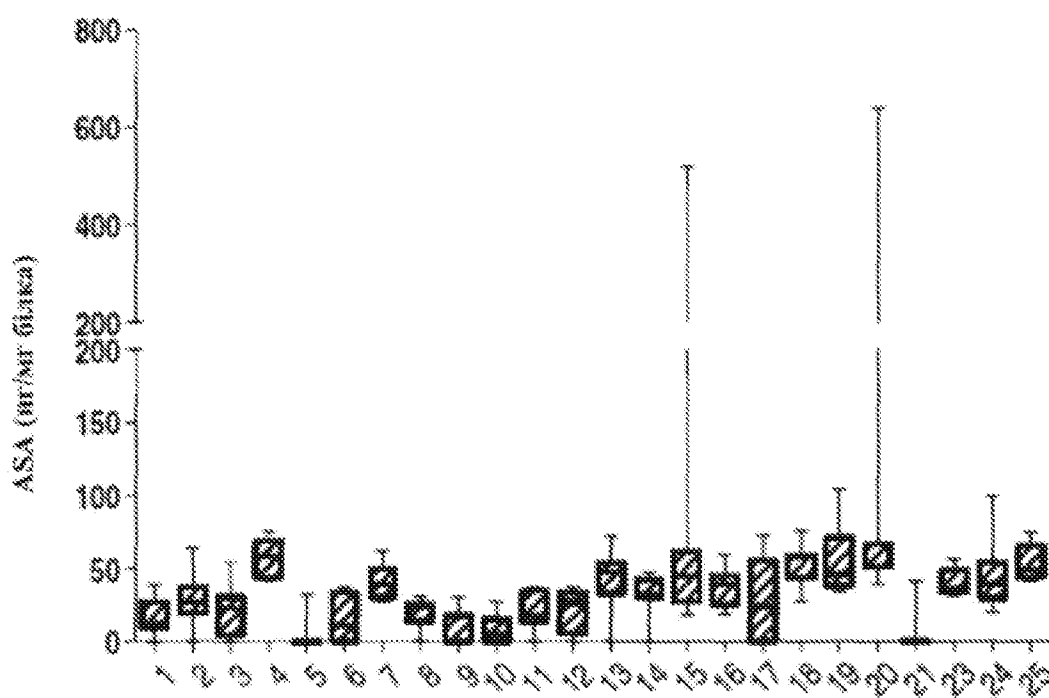
WT = дикий тип; Миші, які одержували лікування IT у вигляді 4 доз на тиждень по 520 мг/кг маси головного мозку rhASA (0,21 мг), 20х збільшення



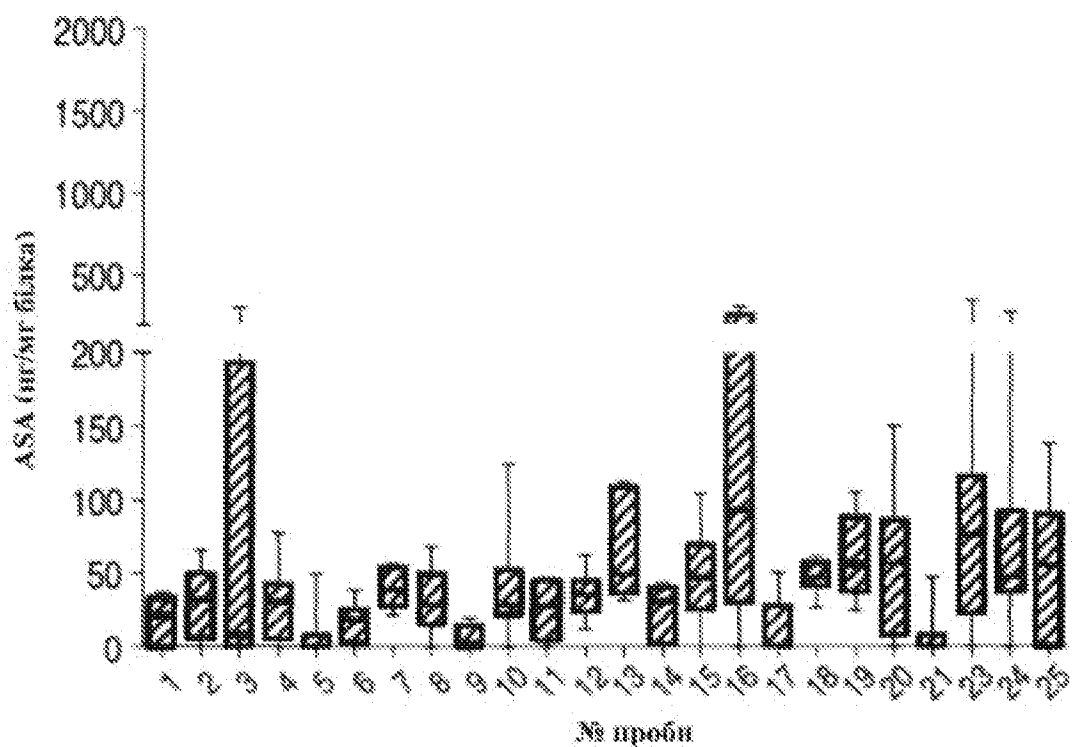
Фіг. 104



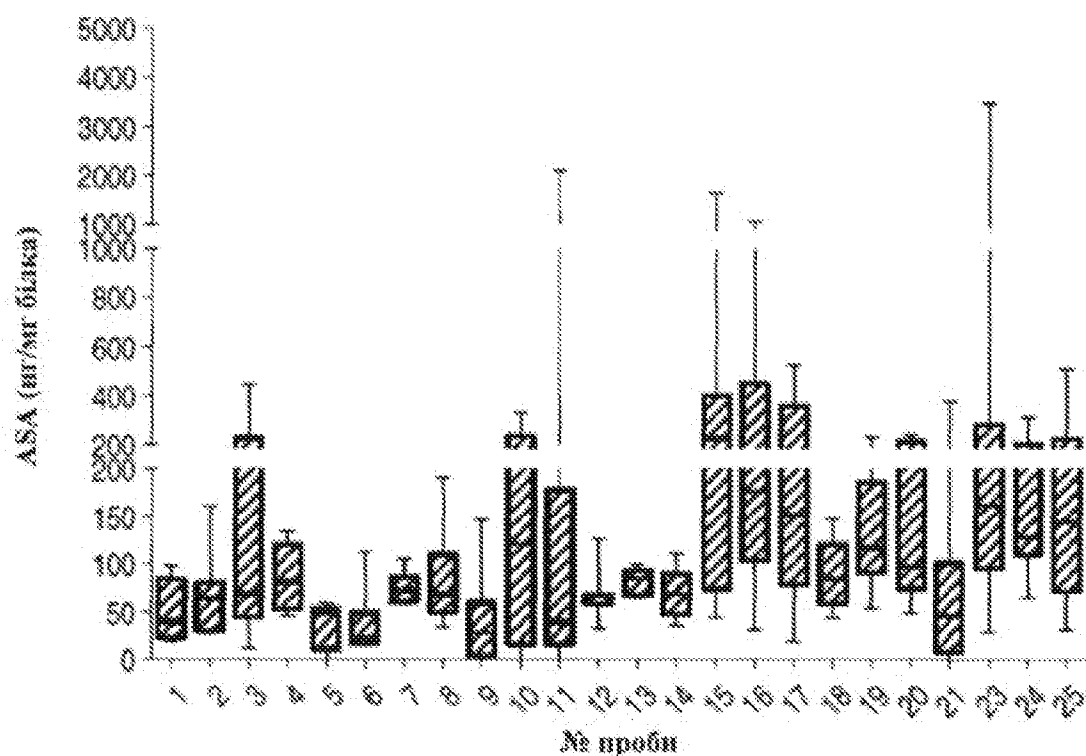
Фіг. 105
Наповнювач, загальна некропія



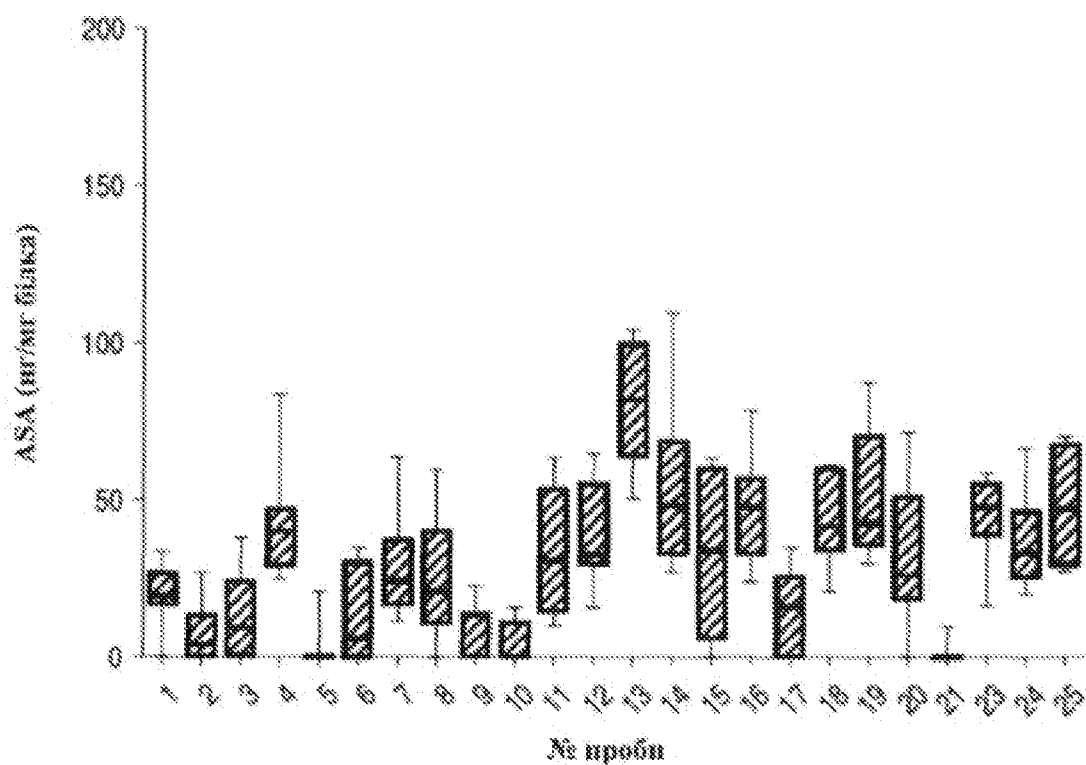
Фіг. 106
1,8 мг доза, загальна некропія



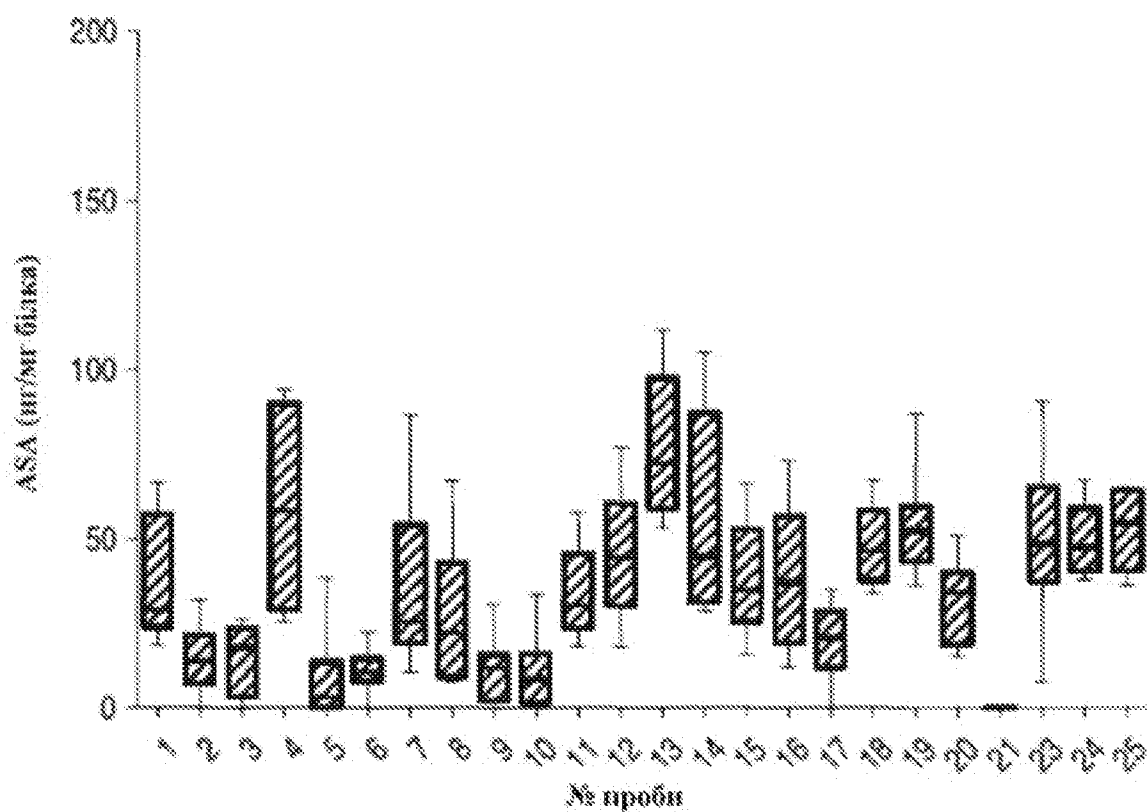
Фіг. 107
6,0 мг доза, загальна некропія



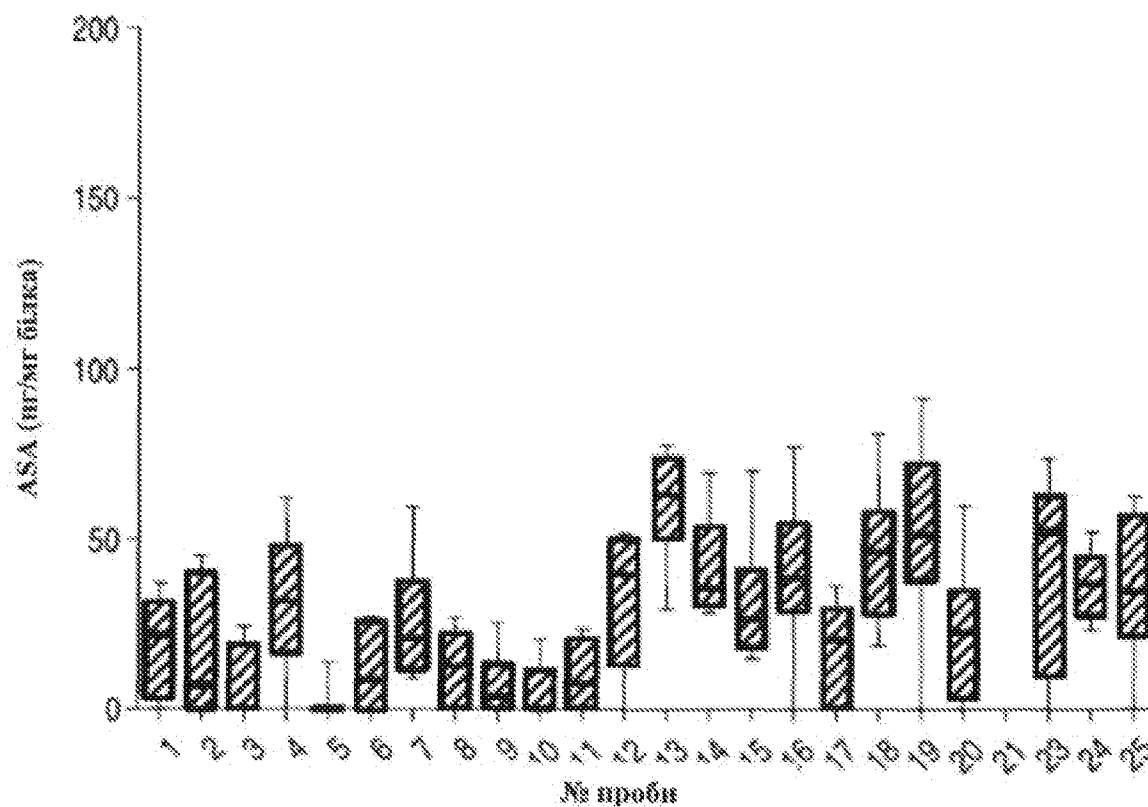
Фіг. 108
18,6 мг доза, загальна некропія



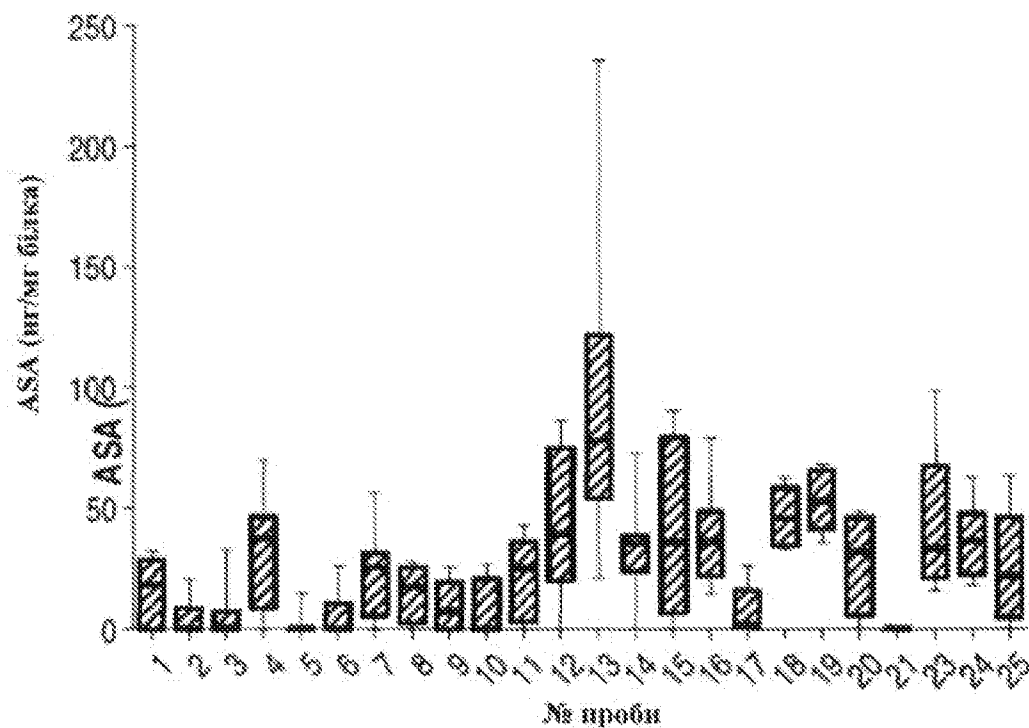
Фіг. 109
Контроль пристрою, некропія при відновленні



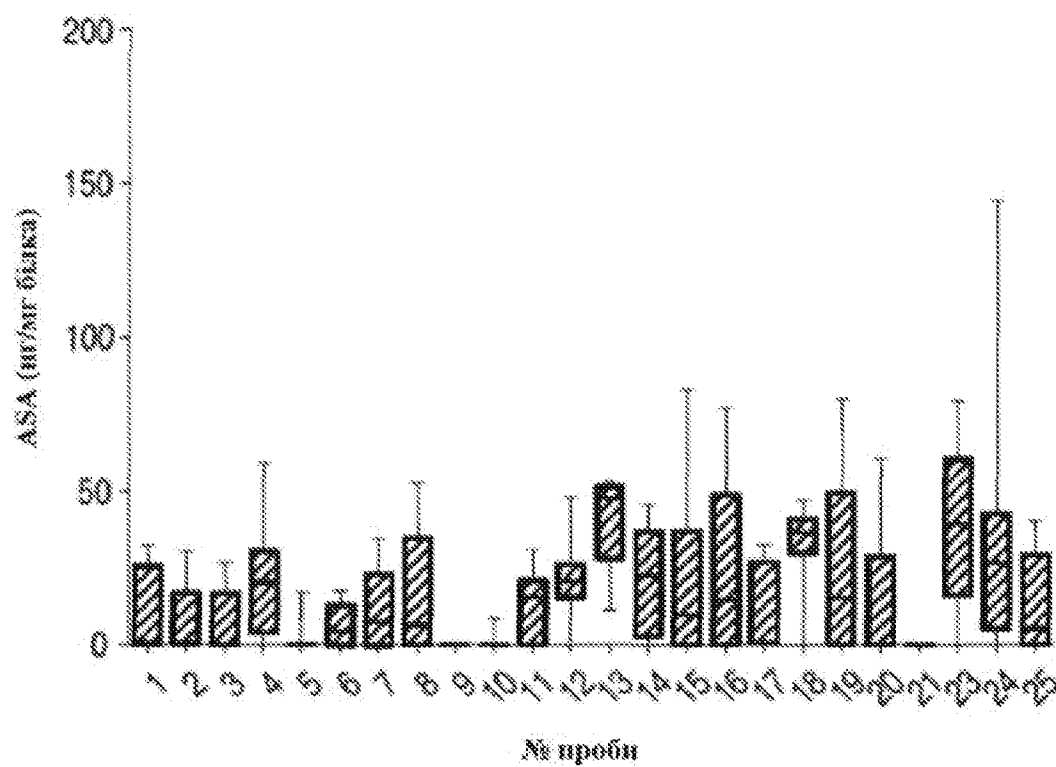
Фіг. 110
Наповнювач, некропія при відновленні



Фіг. 111
Доза 1,8 мг, некропія при відновленні



Фіг. 112
Доза 6,0 мг, некропія при відновленні



Фіг. 113

Доза 18,6 мг, некропія при відновленні

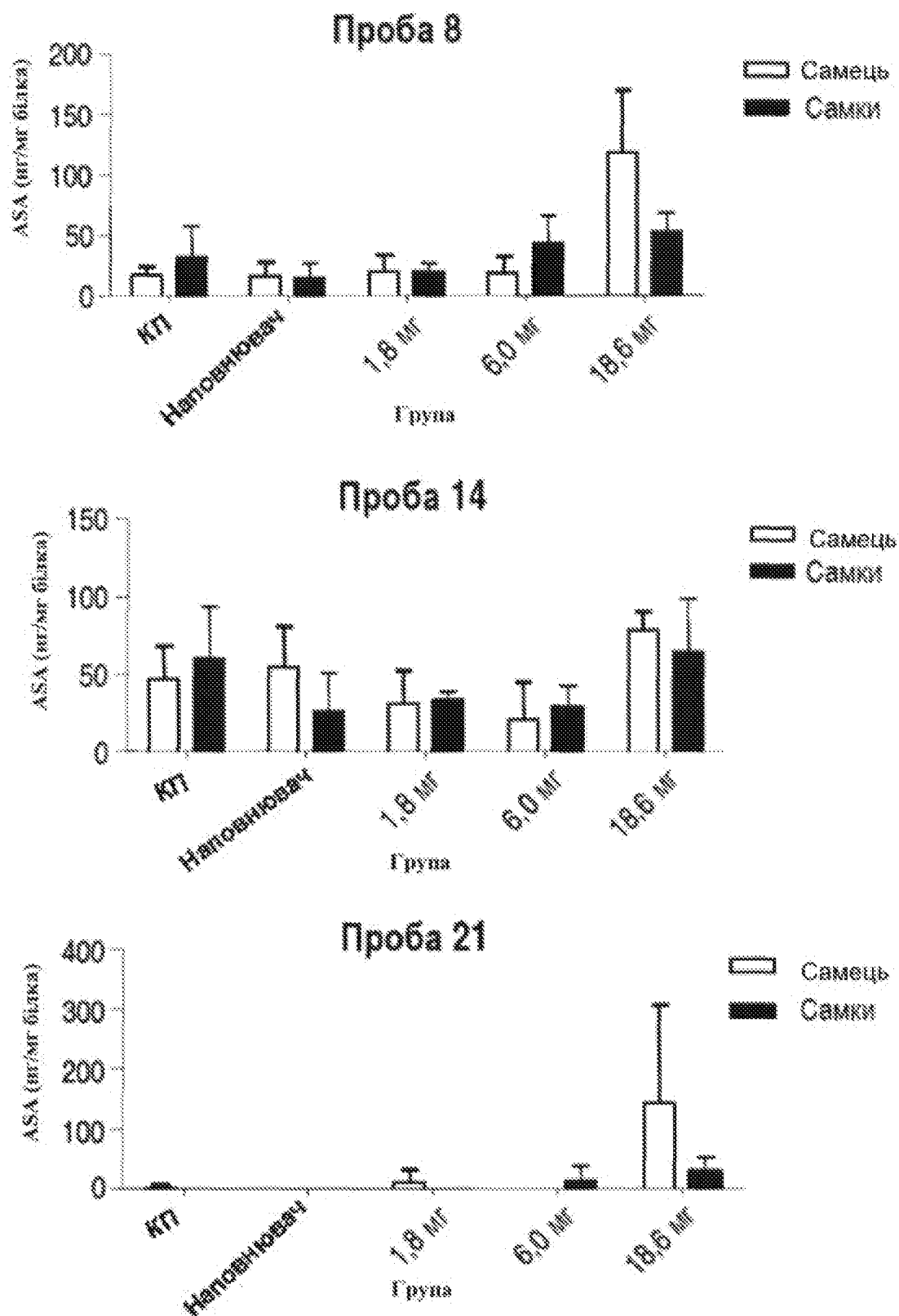


Fig. 114

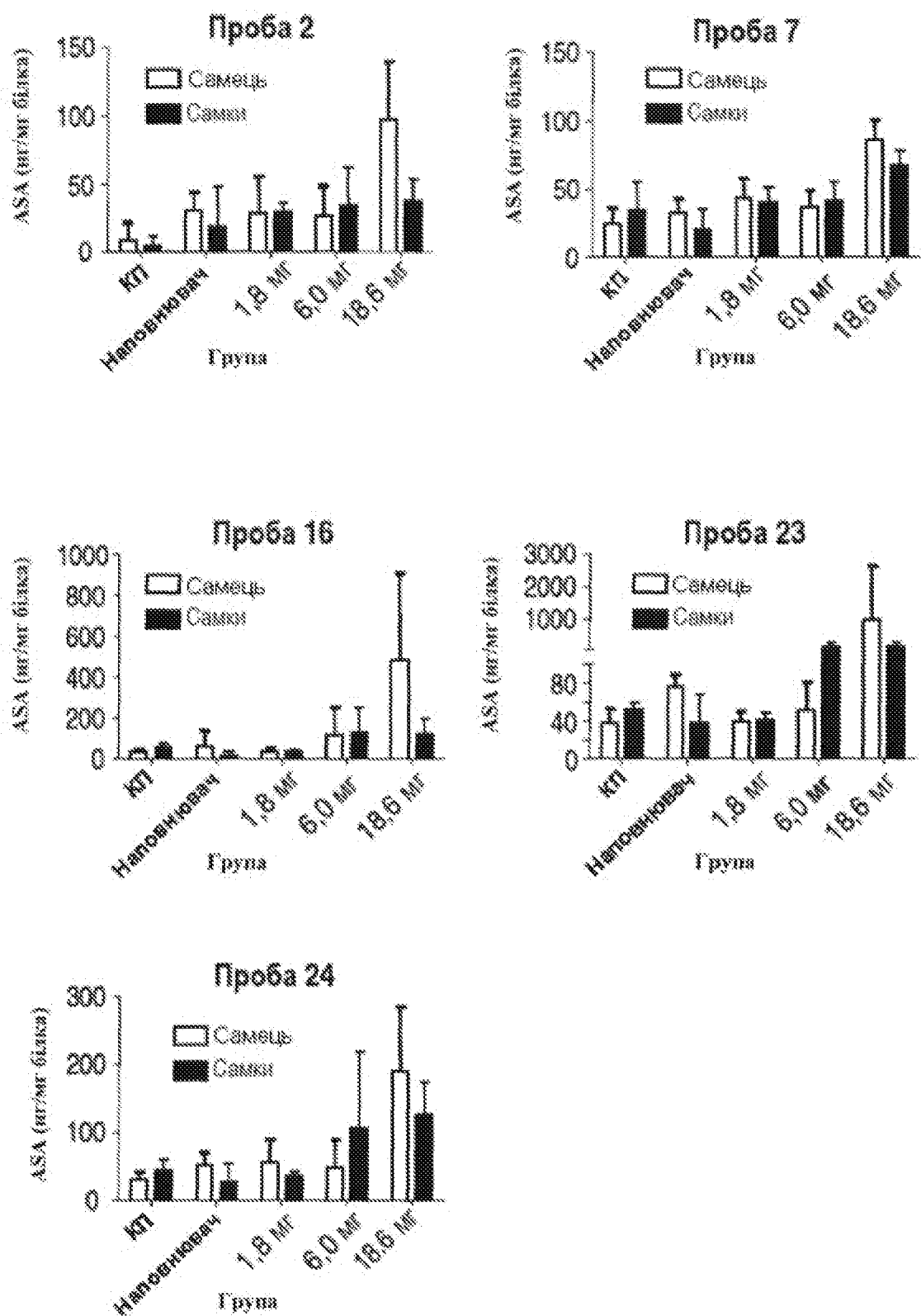
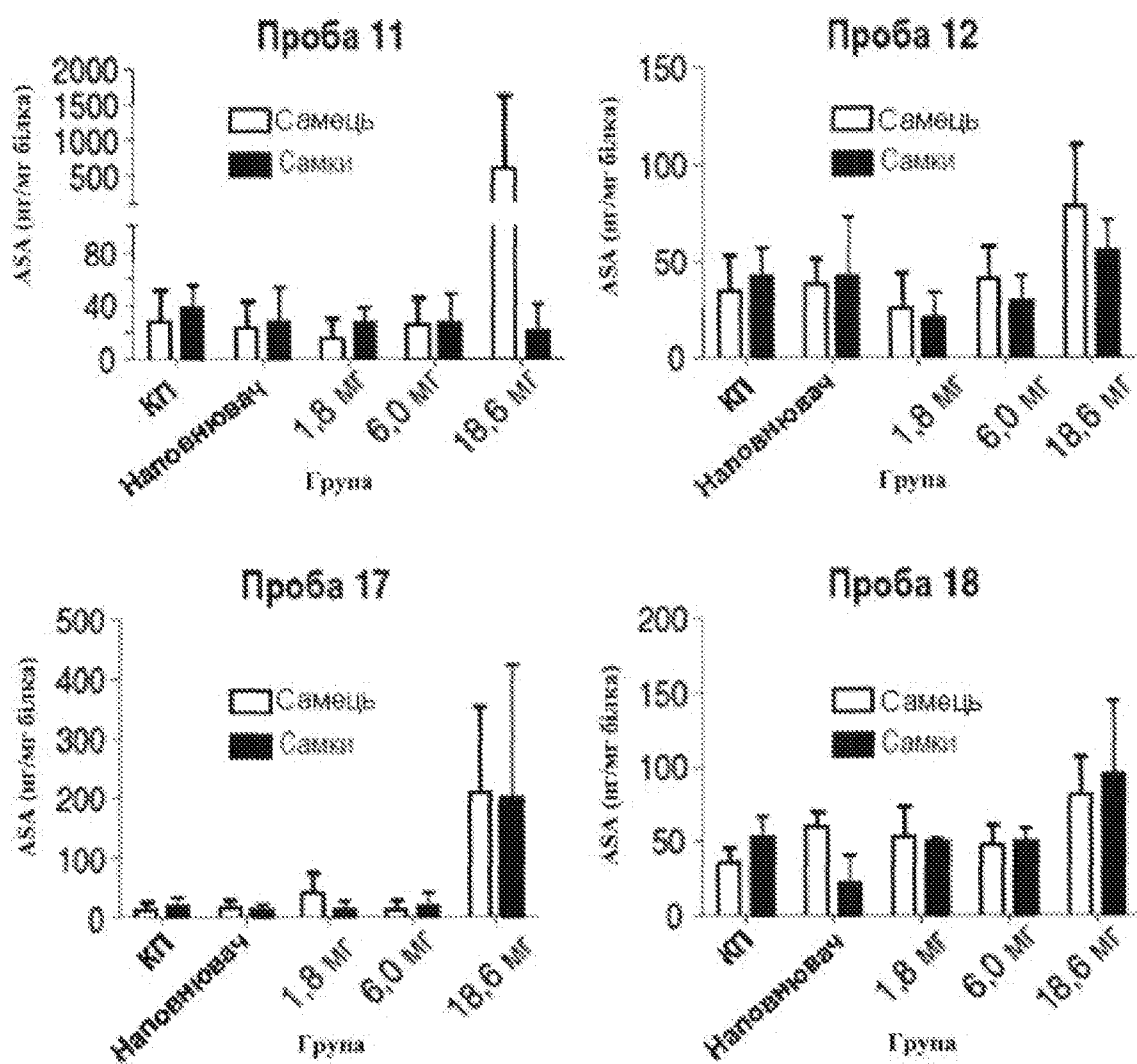
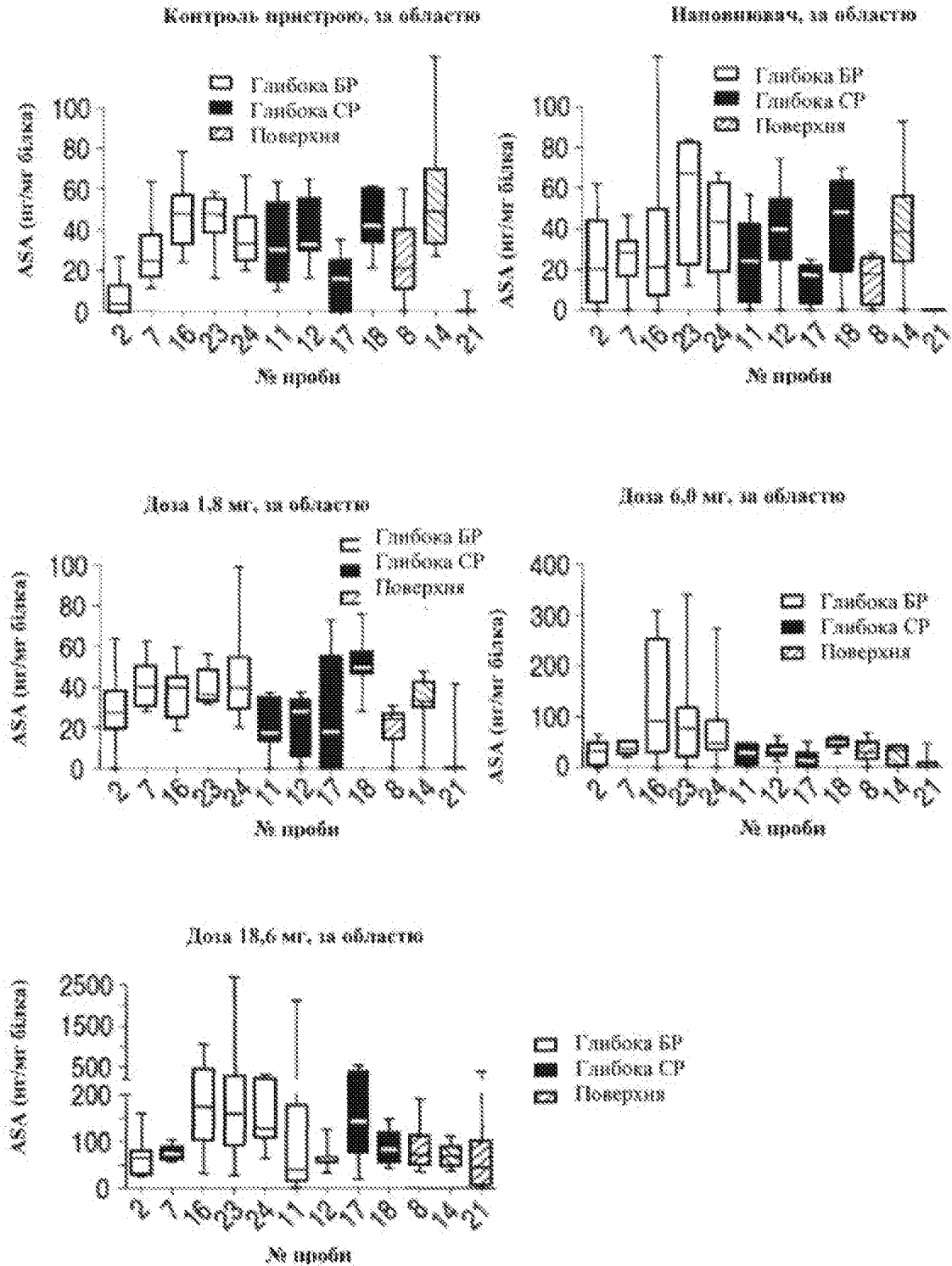


Fig. 115



Фіг. 116



Фіг. 117

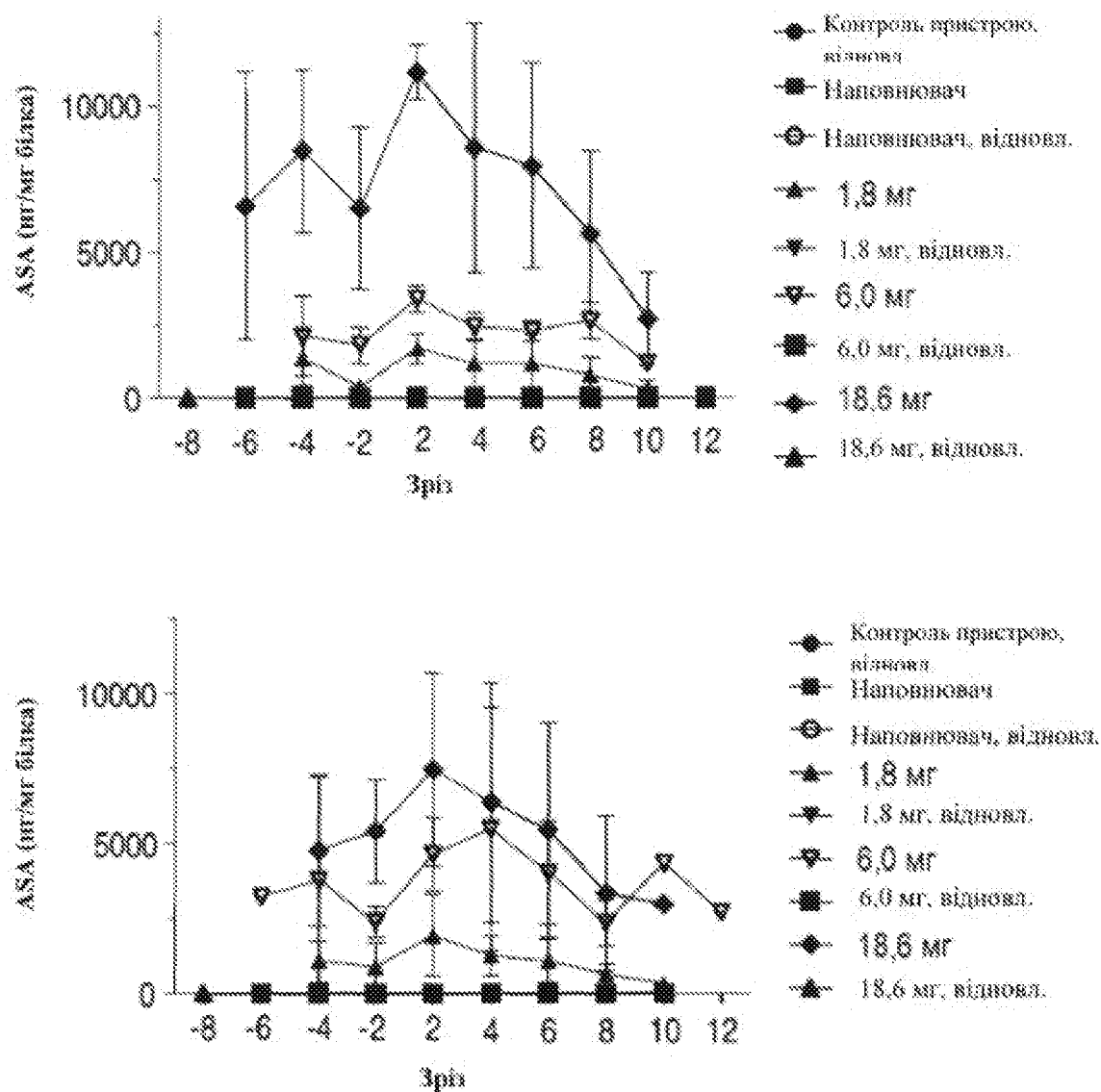


Fig. 118

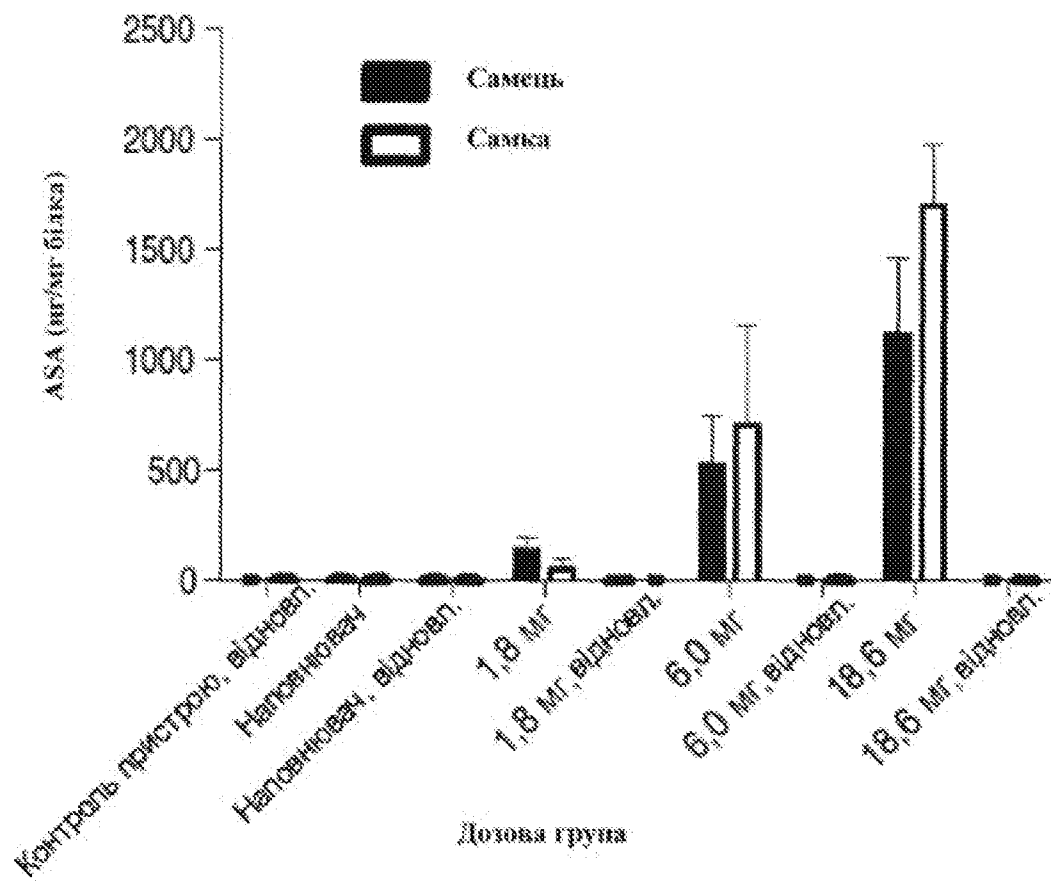
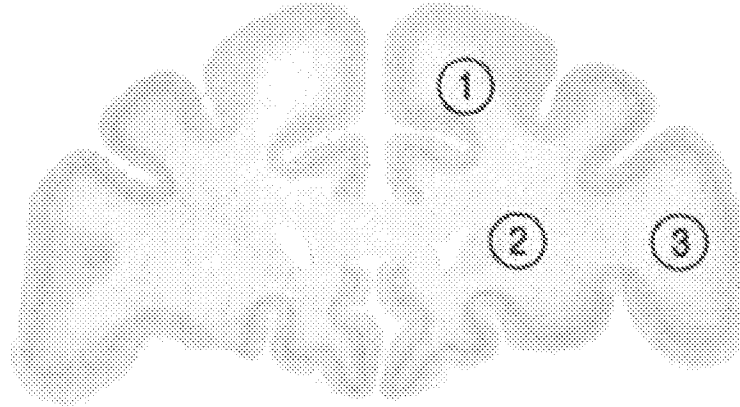


Fig. 119

62-133

#458

Зріз 4



Анатом. індекс

1. Підкіркова БР

2. Перивентрикулярна БР та глибока біла речовина

3. Підкіркова БР

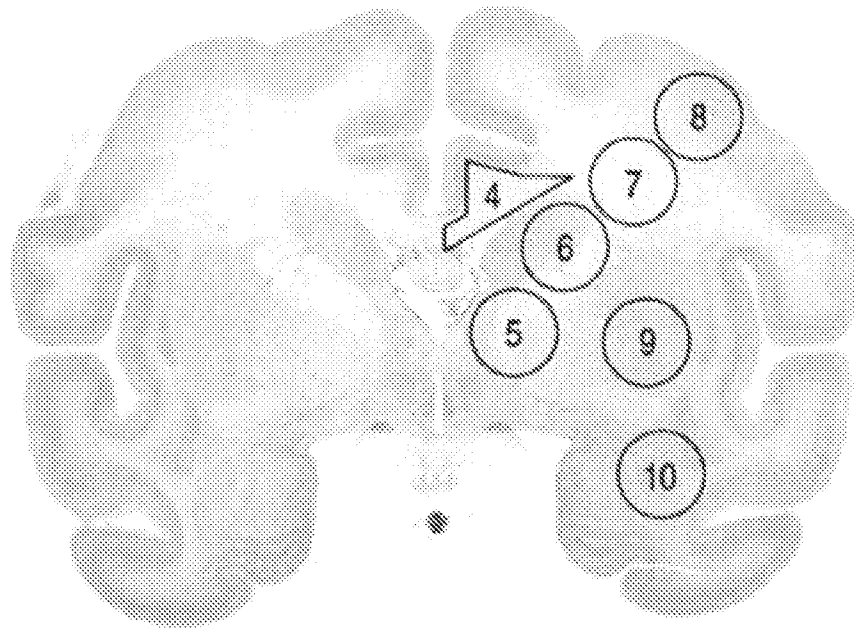
1 cm

Fig. 120

62-133

Зріз 6

#780



1 см

Фіг. 121

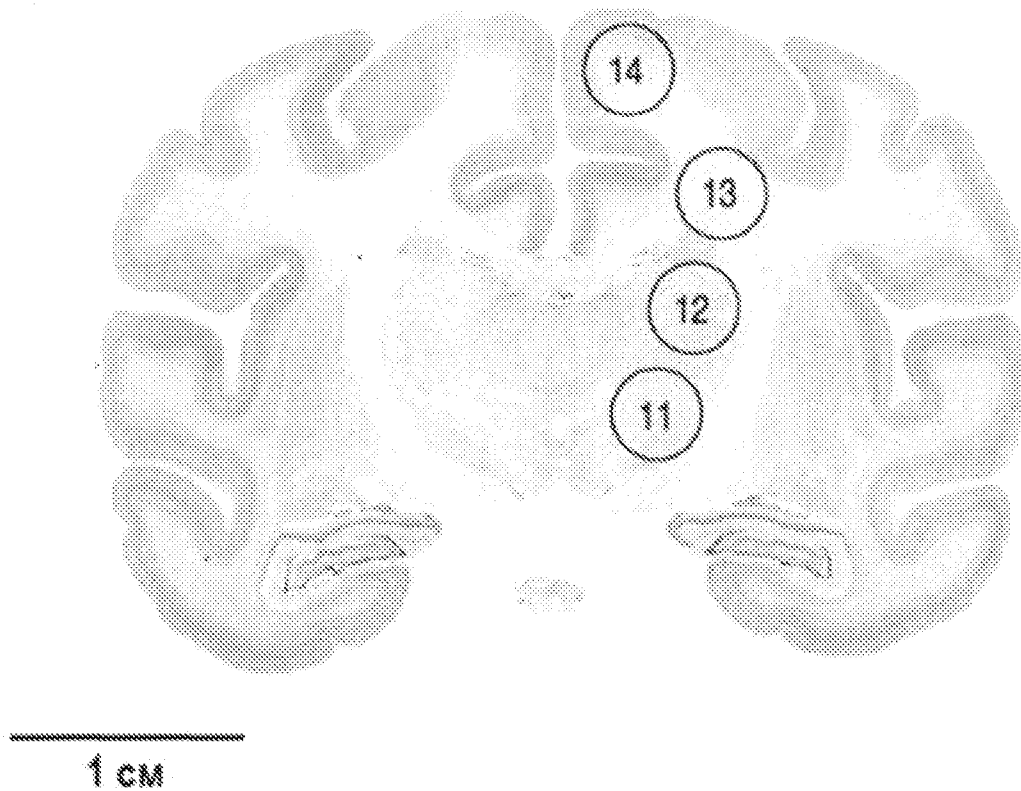
Анатом, індекси

4. Мозолисте тіло і навіколомозолиста підкіркова БР
5. Внутрішня капсула, блідий шар
6. Внутрішня капсула, хвостате ядро
7. Глибока біла речовина
8. Підкіркова БР і кора
9. Путамен
10. Сконева підкіркова БР і кора

62-133

Зрпз 8

#962



Фіг. 122

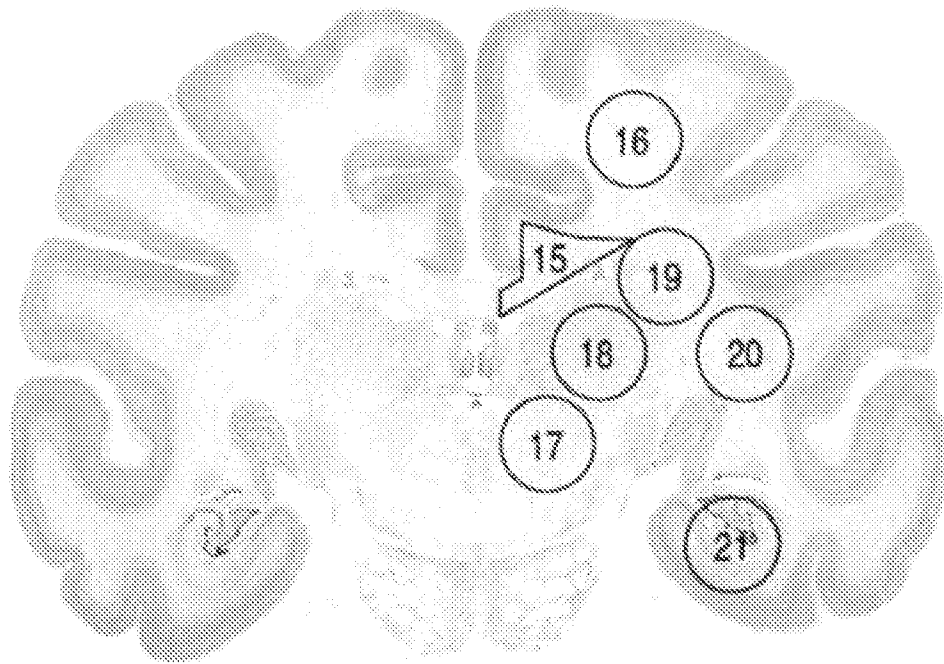
Анатом, індекси

- 11. Глибока сіра речовина
- 12. Глибока сіра речовина
- 13. Глибока БР, лобна перивентрикулярна і підкіркова
- 14. Підкіркова біла речовина і кора, поверхнево-сагітальна

62-133

Зріз 10

#1102



1 cm

Fig. 123

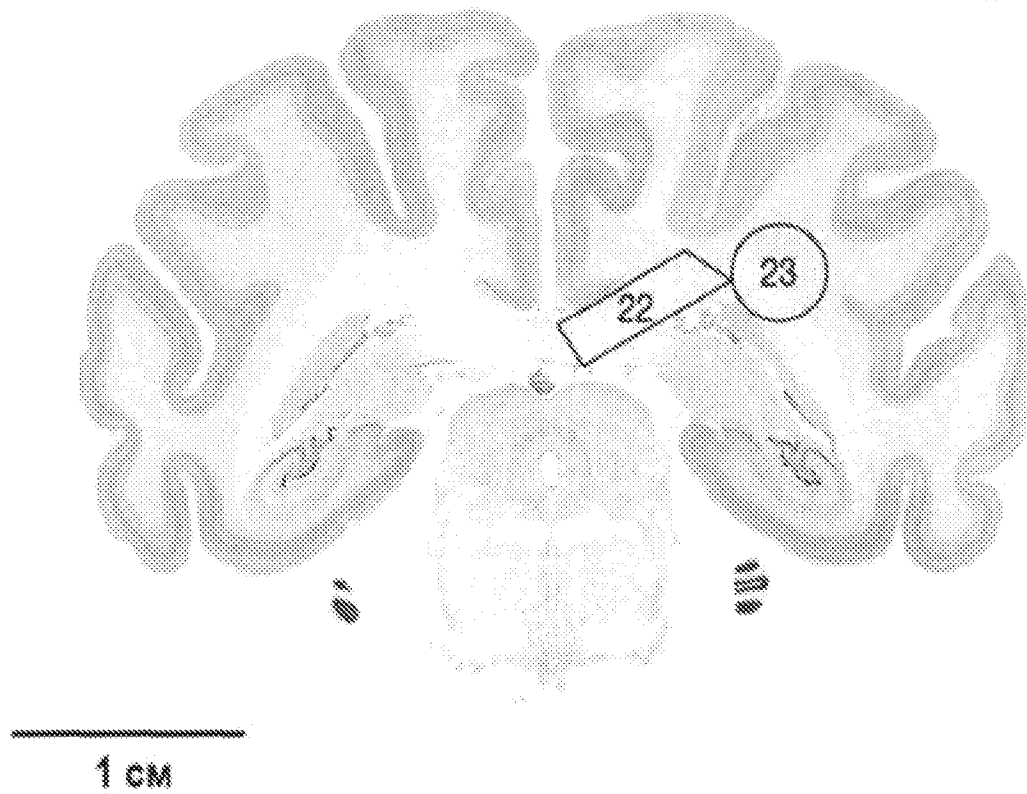
Анатом, індекси

- 15. Мозолисте тіло і навіколомозолиста підкіркова БР
- 16. Глибока підкіркова БР
- 17. Глибока сіра речовина
- 18. Глибока сіра речовина
- 19. Перивентрикулярна БР
- 20. Підкіркова БР
- 21. Гіпокамп

62-133

Зрiз 12

#1240



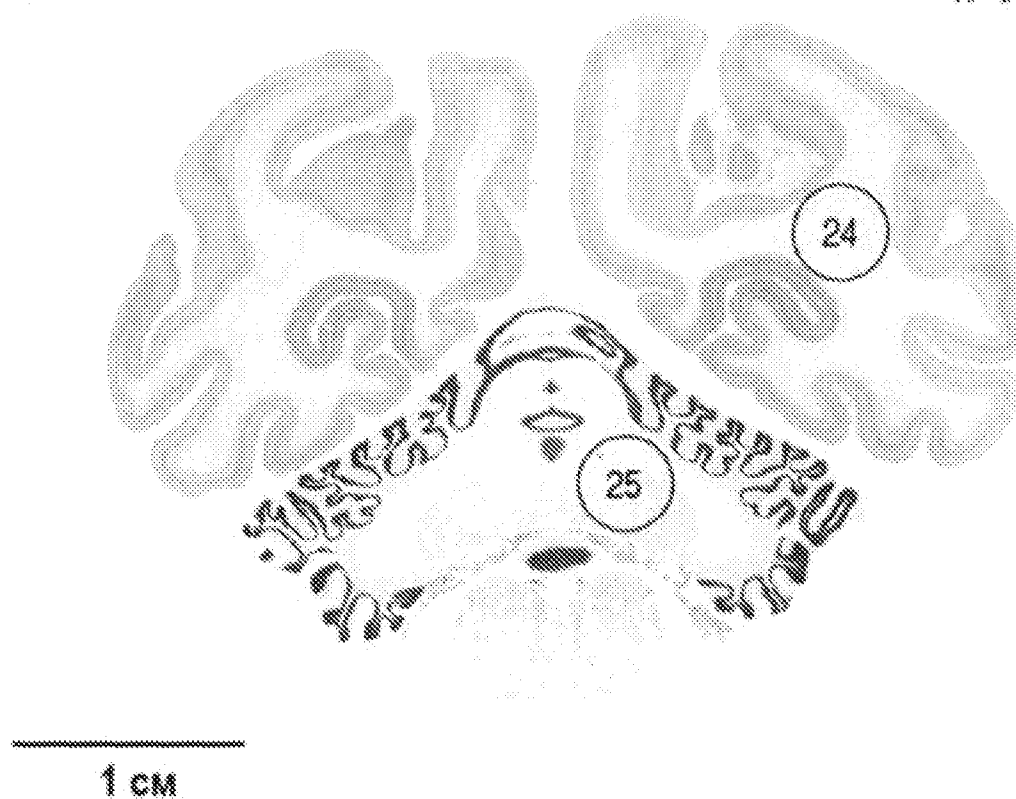
Фіг. 124

Анатом, індекси
22. Мозолисте тіло
23. Глибока БР

62-133

Зрп 14

#1486

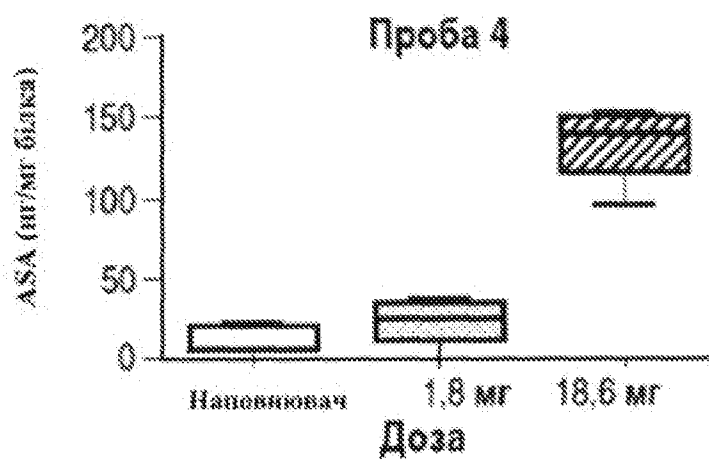


Фіг. 125

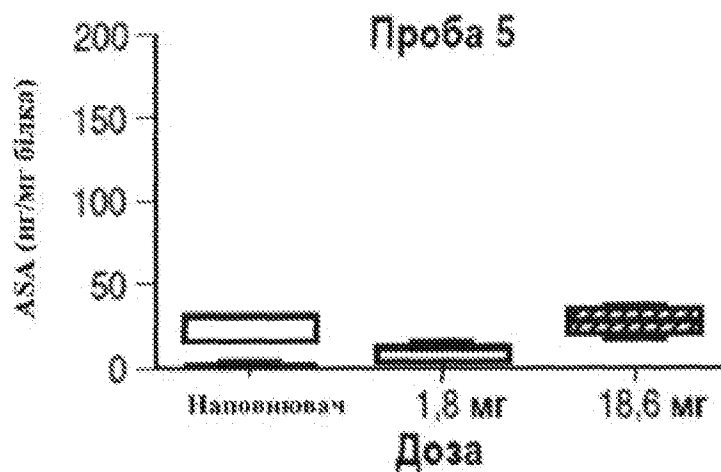
Анатом, індекси

24. Підкіркова БР, потилична доля

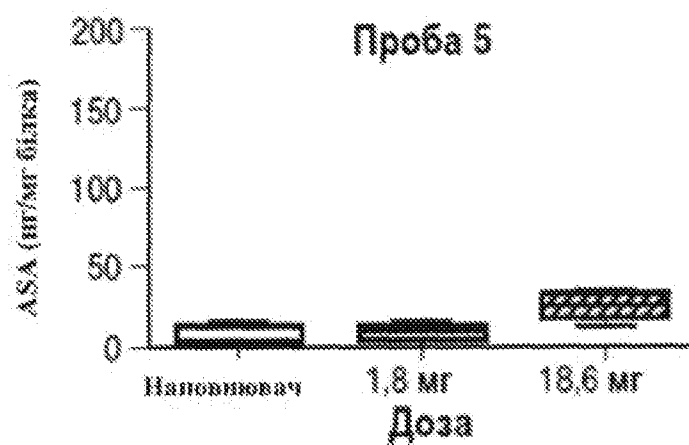
25. Мозочкова біла реч-на, включаючи зубчасте ядро (БР)



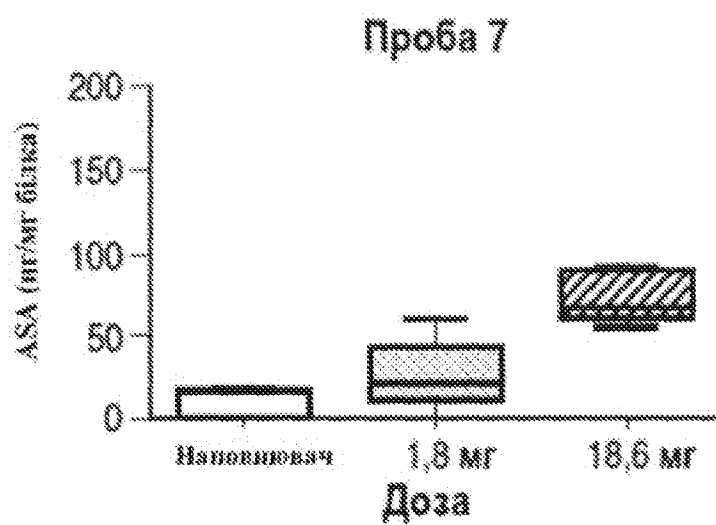
Фіг. 126A



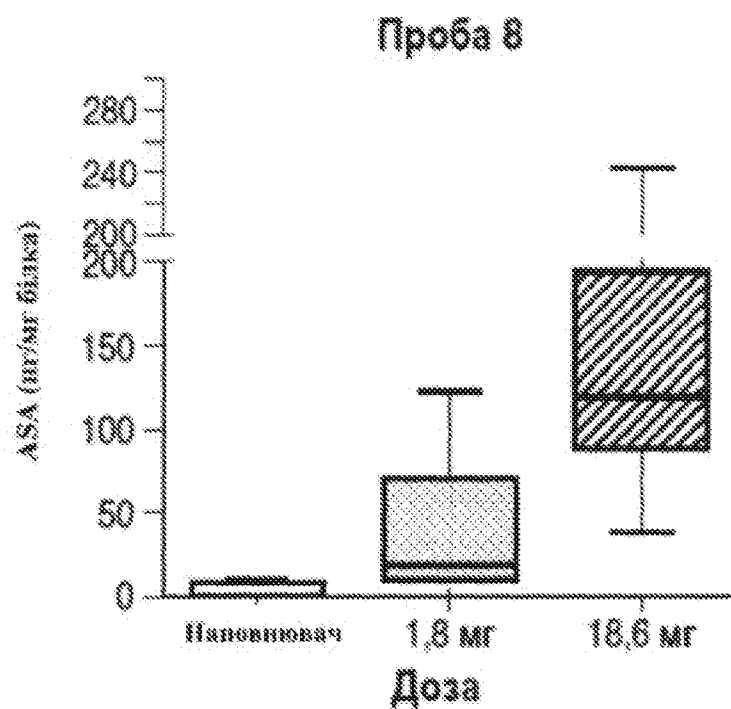
Фиг. 126B



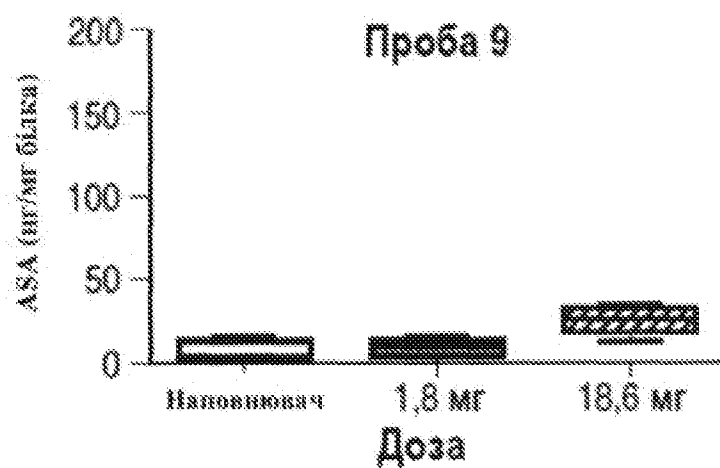
Фиг. 126C



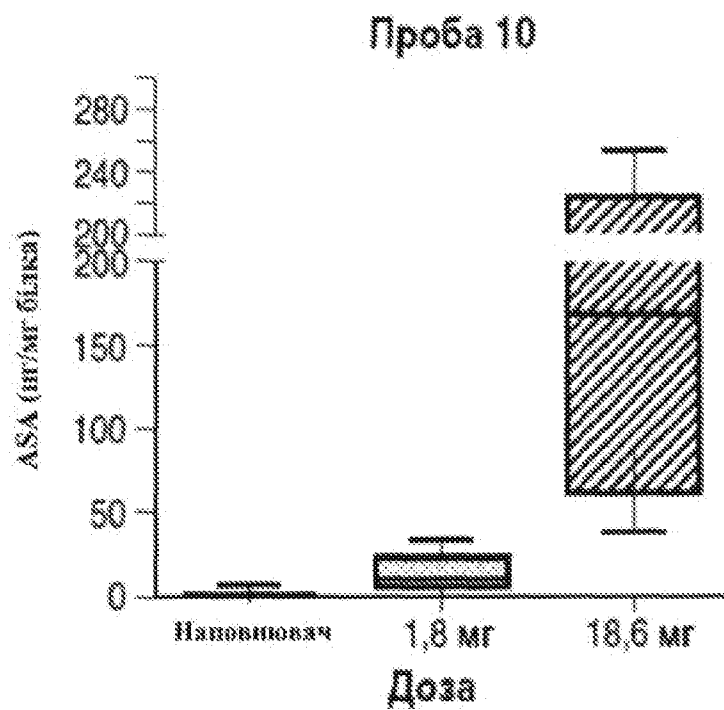
Фиг. 126D



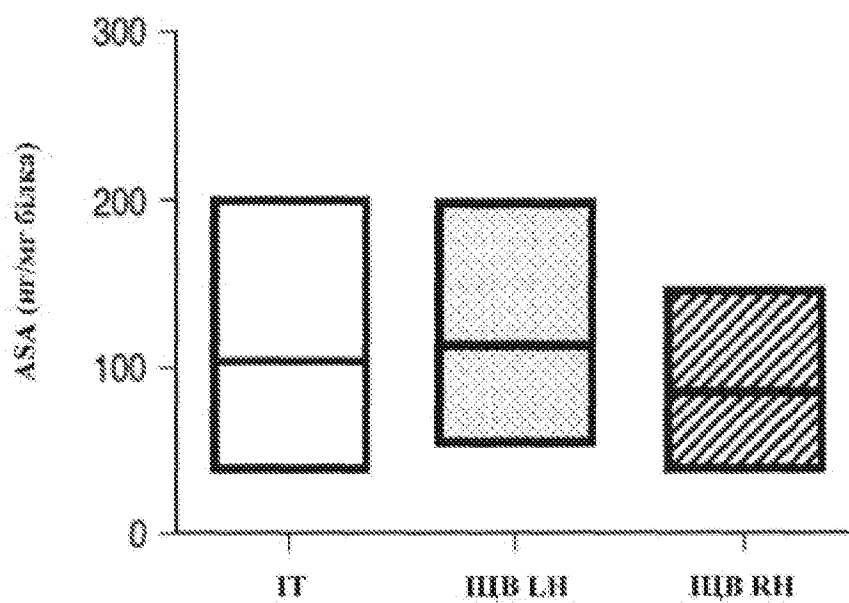
Фіг. 126E



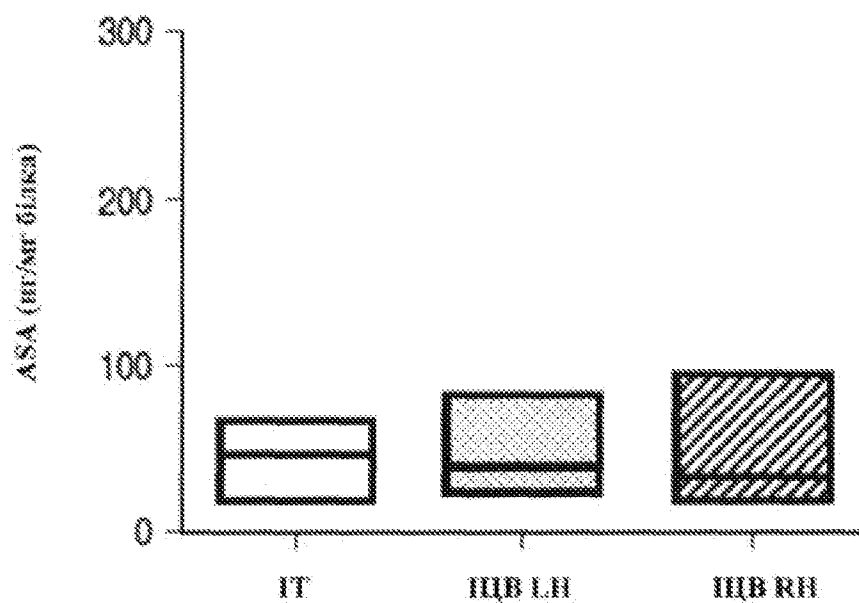
Фіг. 126F



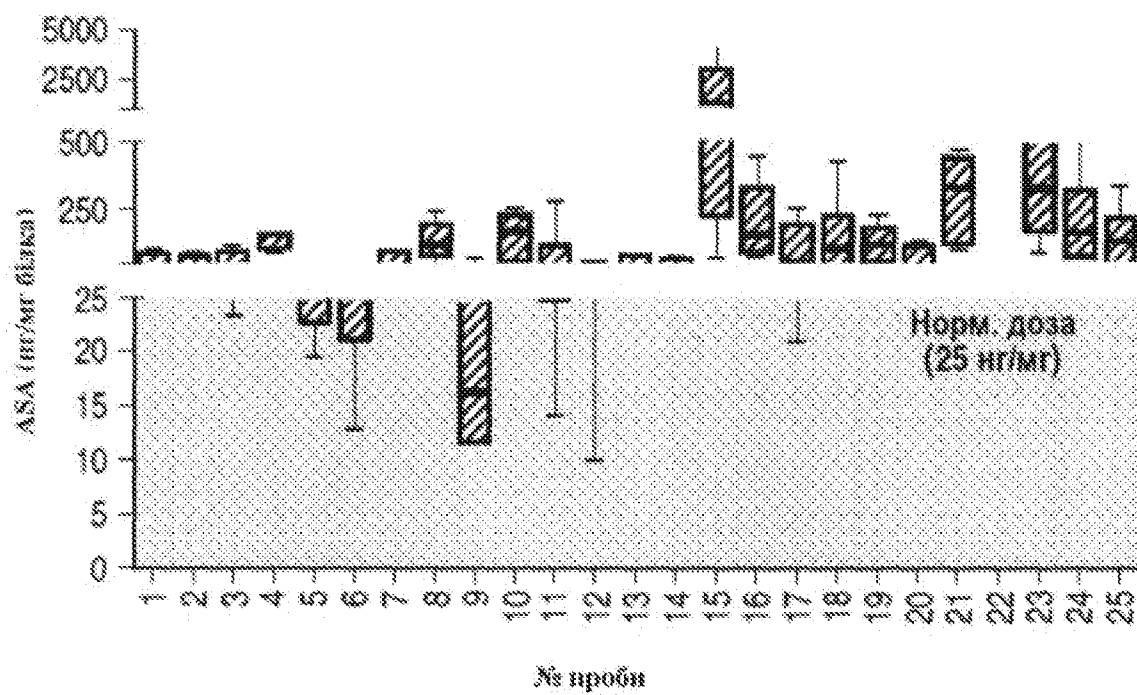
Фіг. 126G



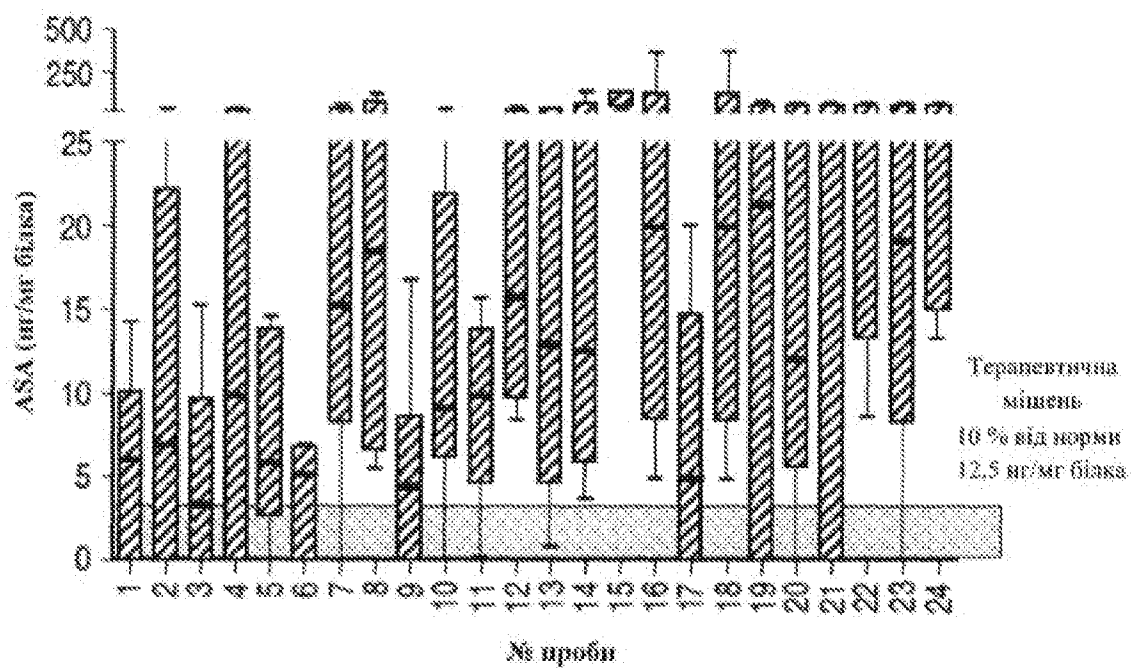
Фіг. 127A
Глибока біла речовина



Фиг. 127В
Глибока сіра речовина



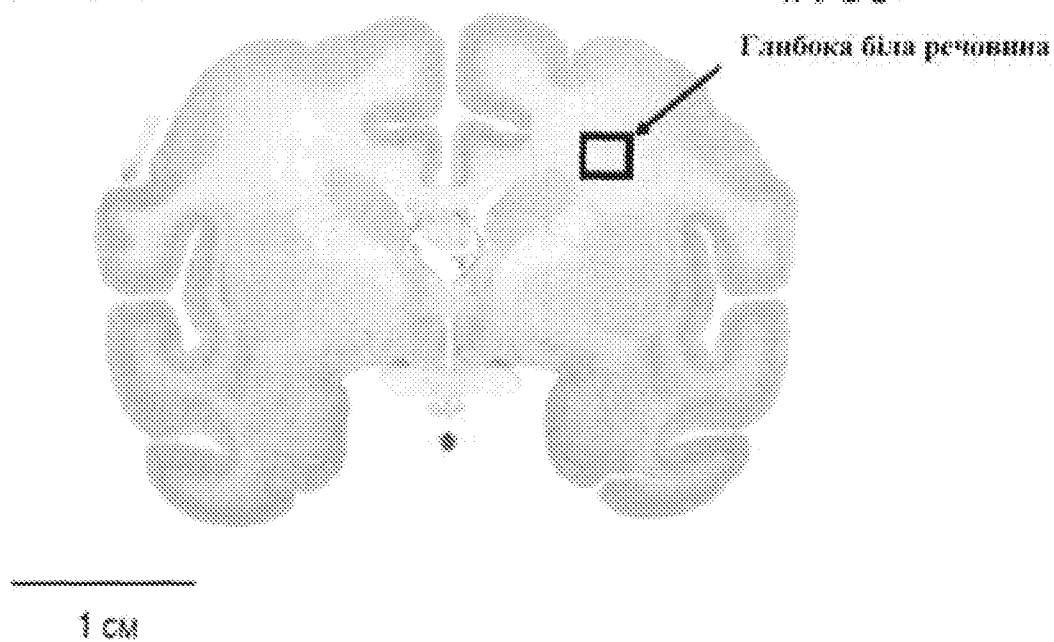
Фиг. 128А
Доза 18,6 мг



Фіг. 128В

62-133

#780



Фіг. 129А

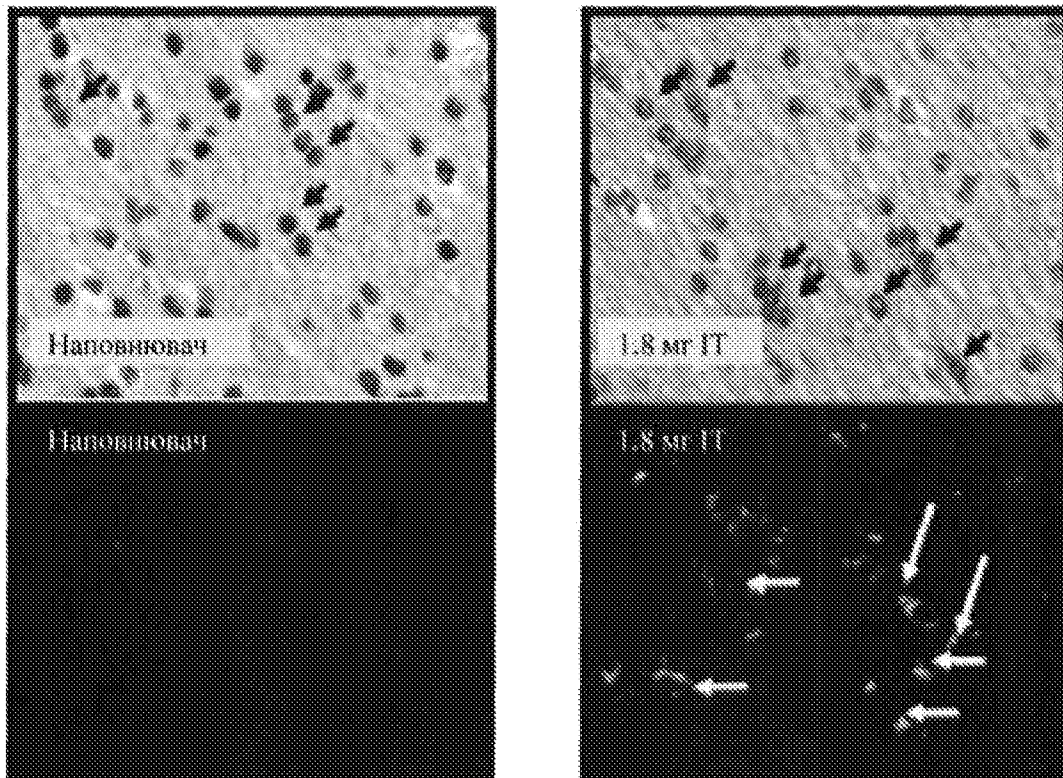
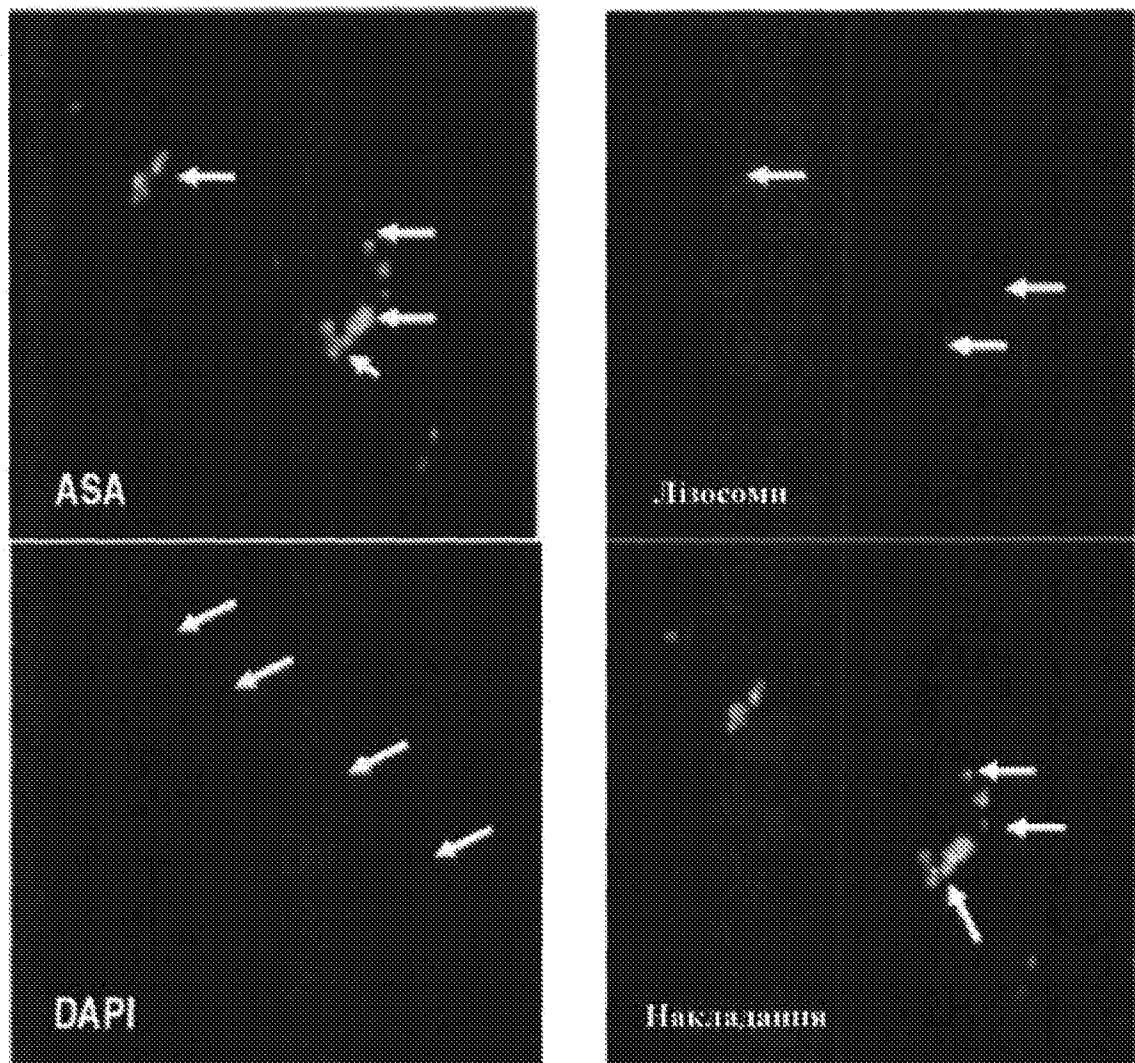
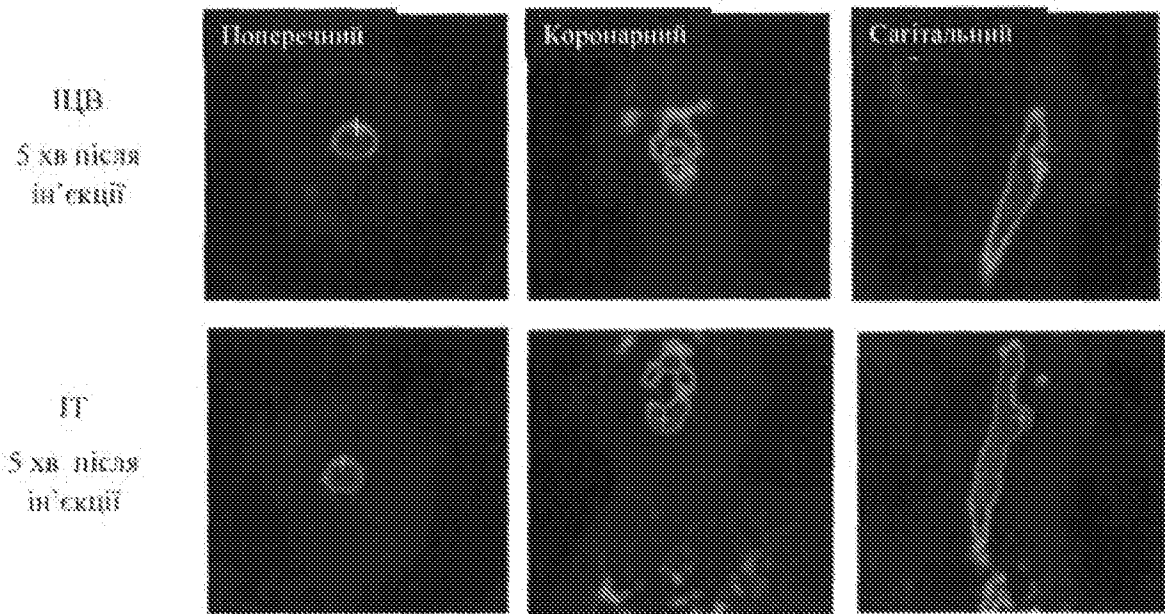


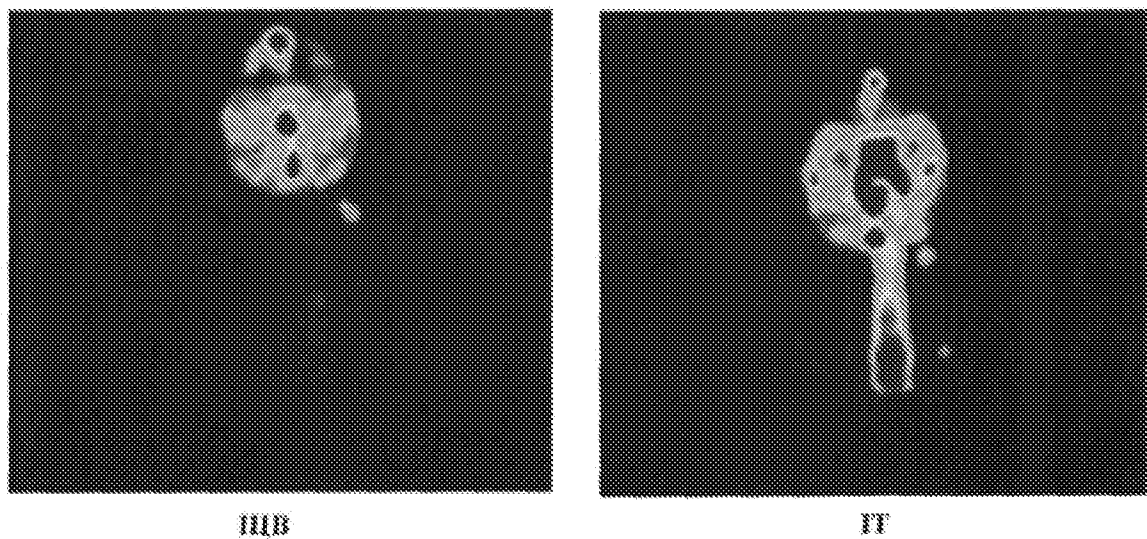
Fig. 129B



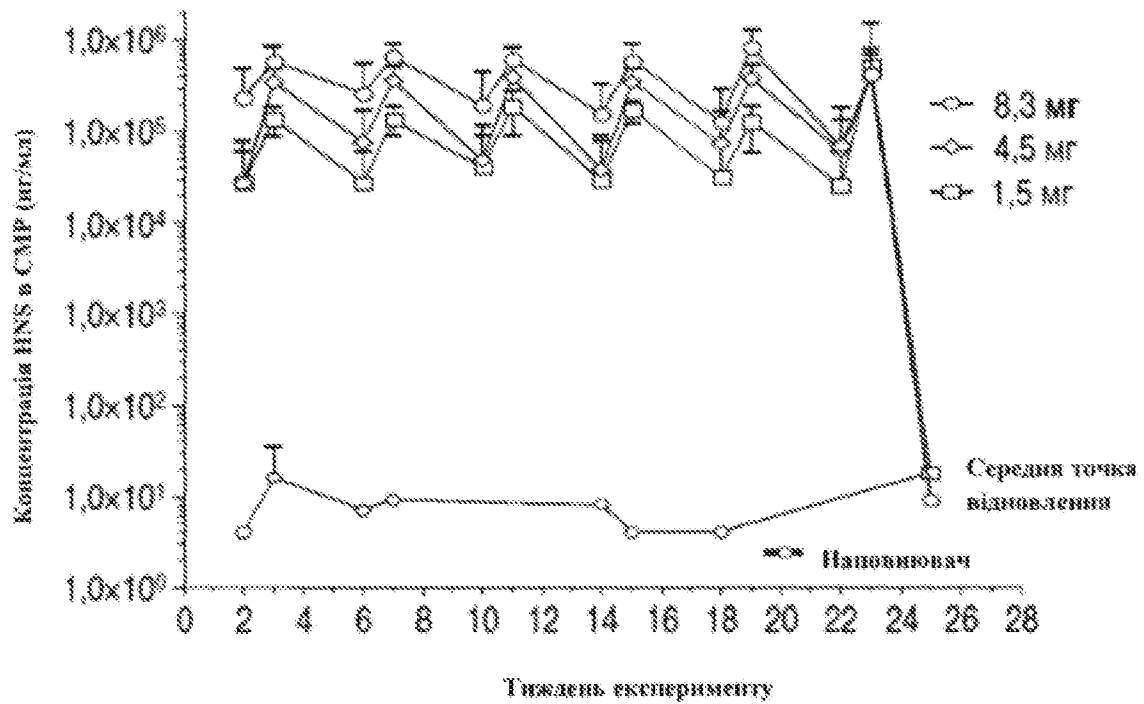
Фиг. 129С



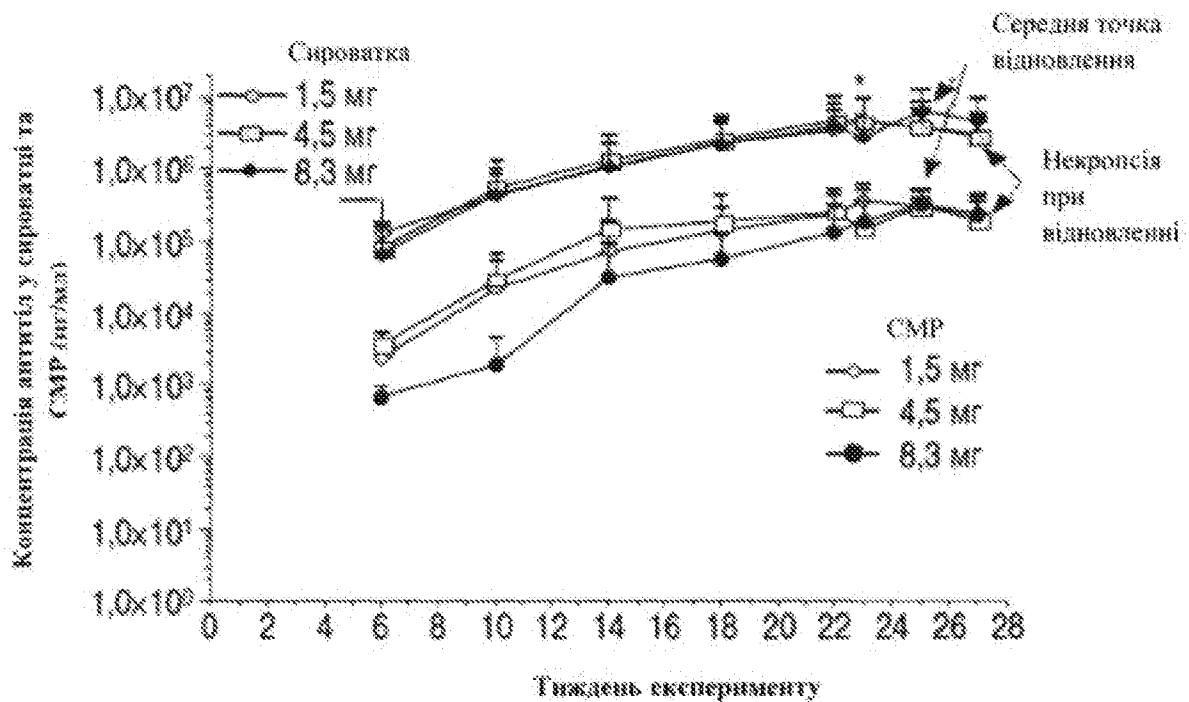
Фіг. 130



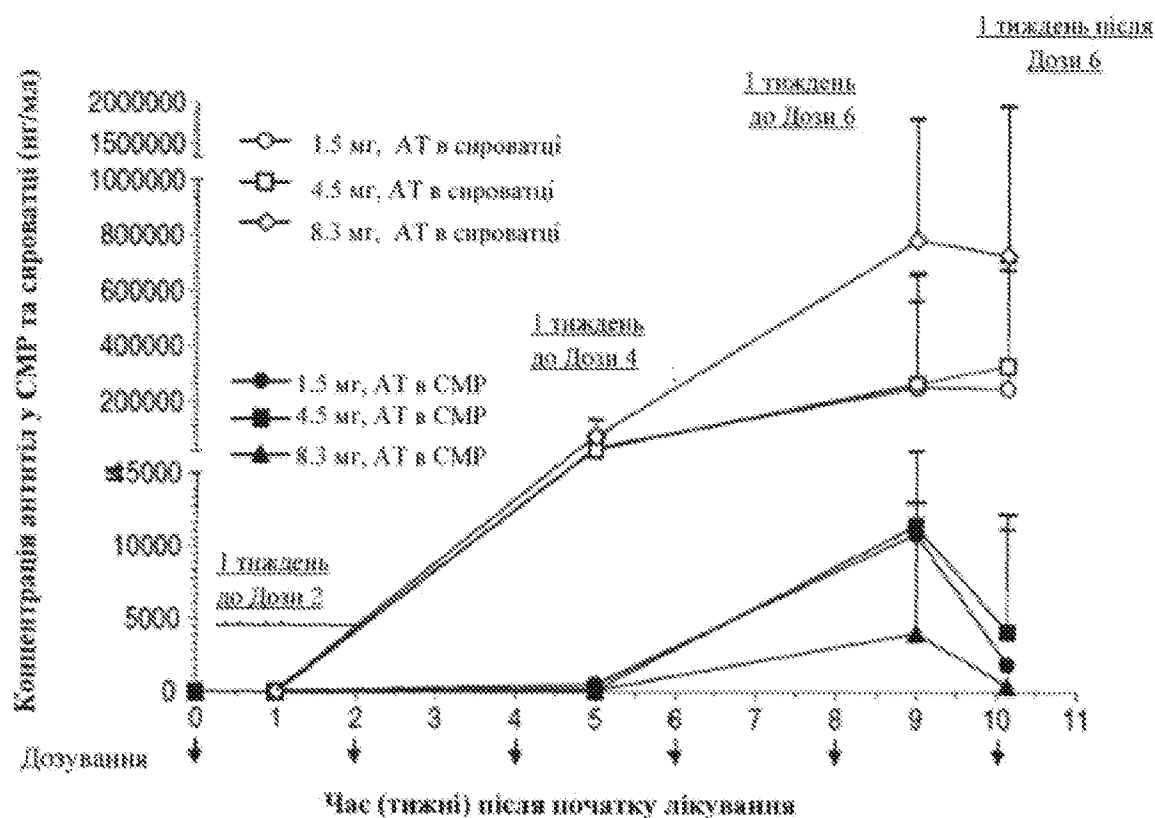
Фіг. 131



Фіг. 146А
Графік концентрації HNS у СМР як функція від часу

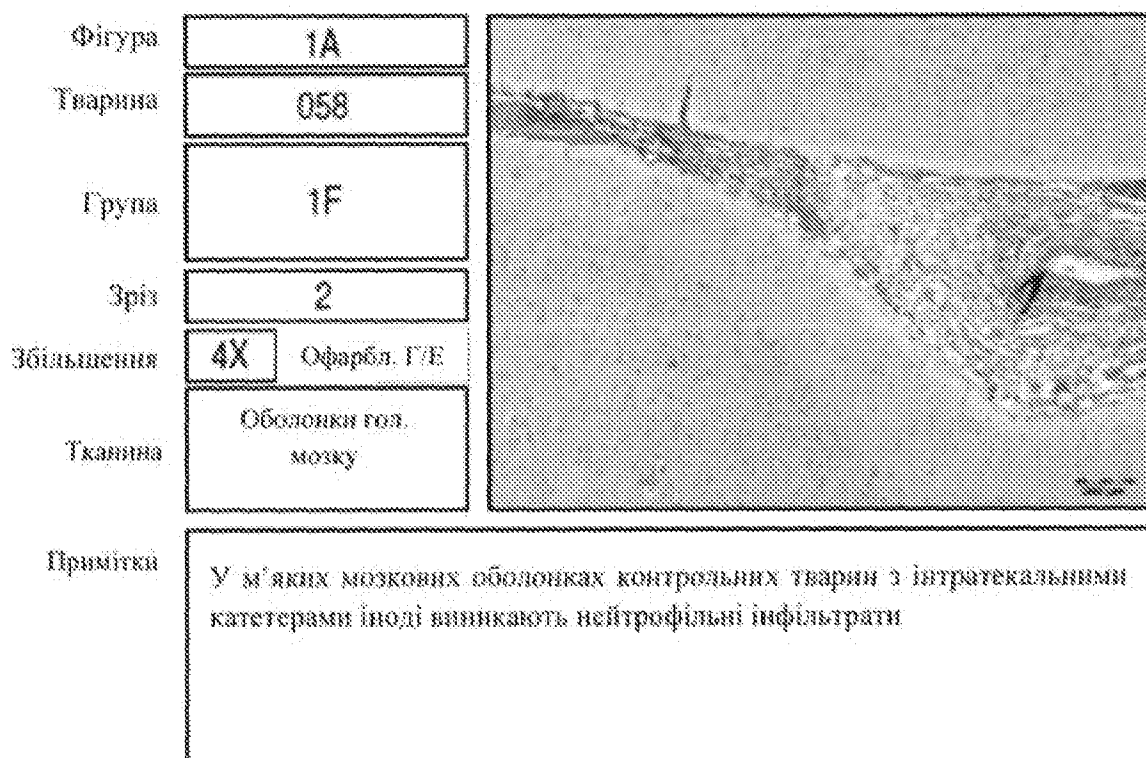


Фіг. 146В
Графік концентрації антитіл в сироватці в порівнянні з СМР як функція від часу

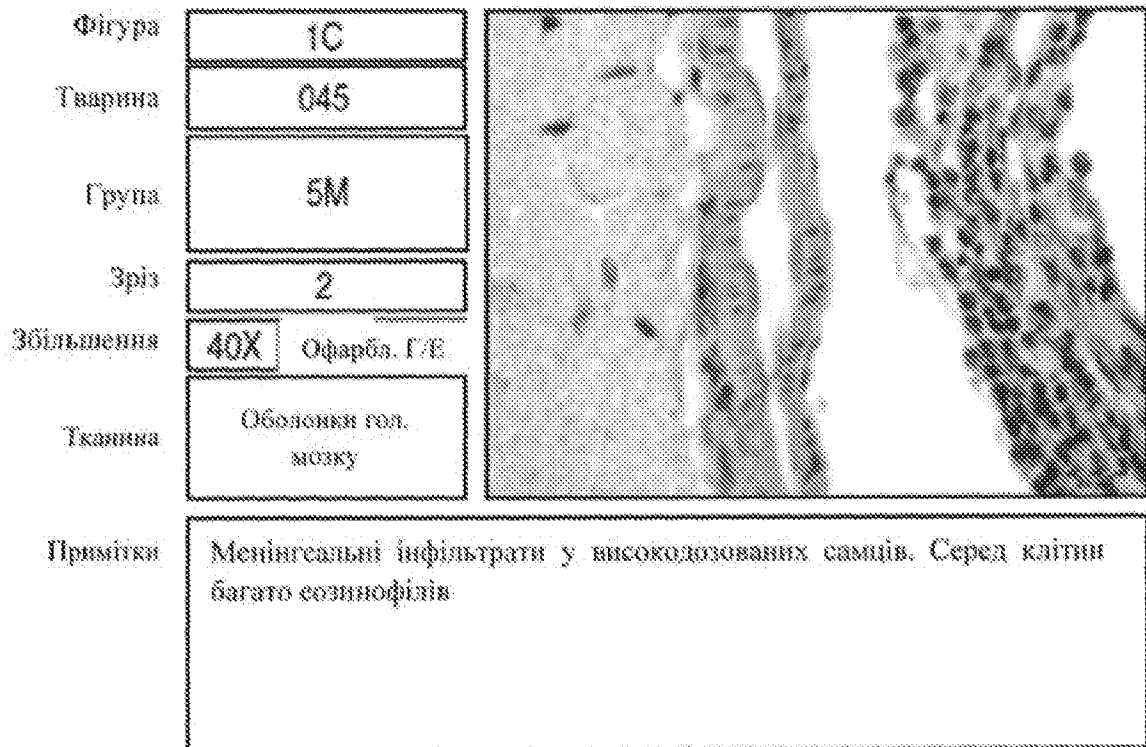


Фіг. 146С

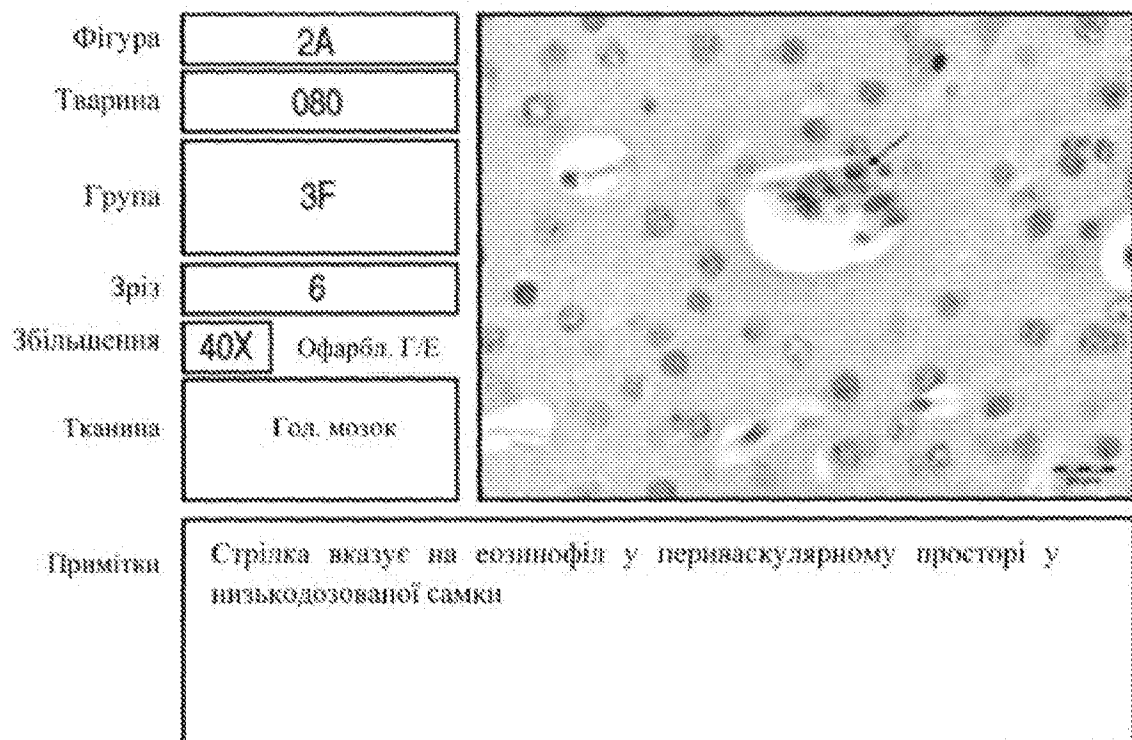
Концентрації антитіл (АТ) у сироватці та СМР після повторного ІТ дозування на всіх 3-ох рівнях



Фіг. 147А



Фіг. 147В



Фіг. 147С

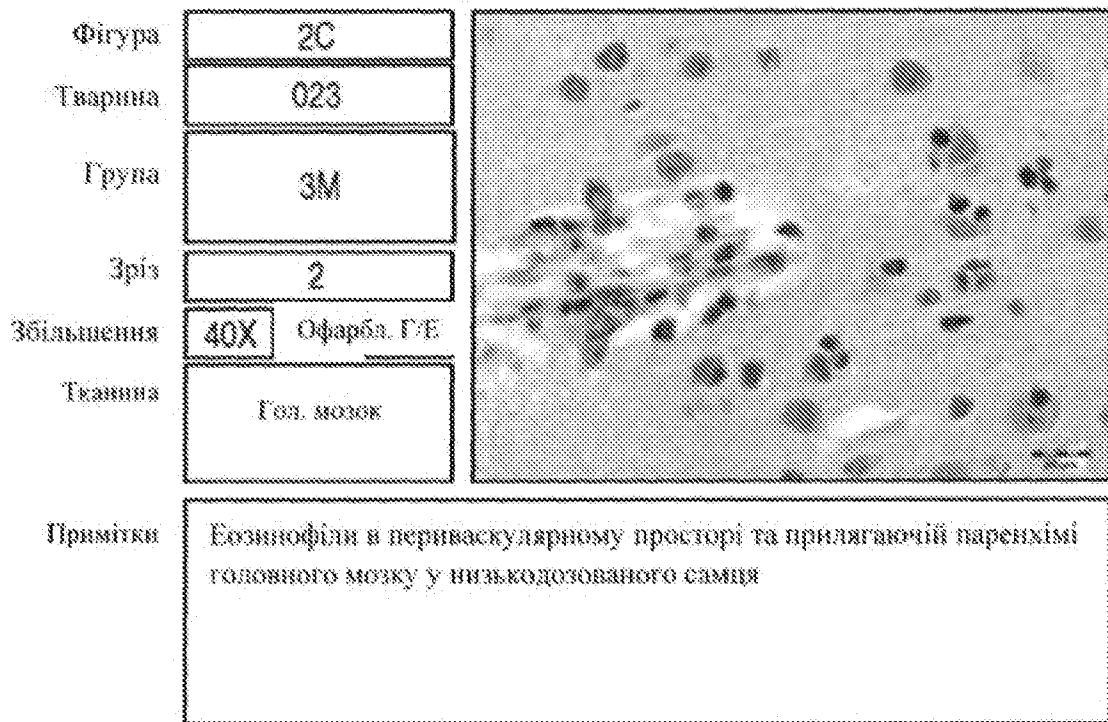


Fig. 147D

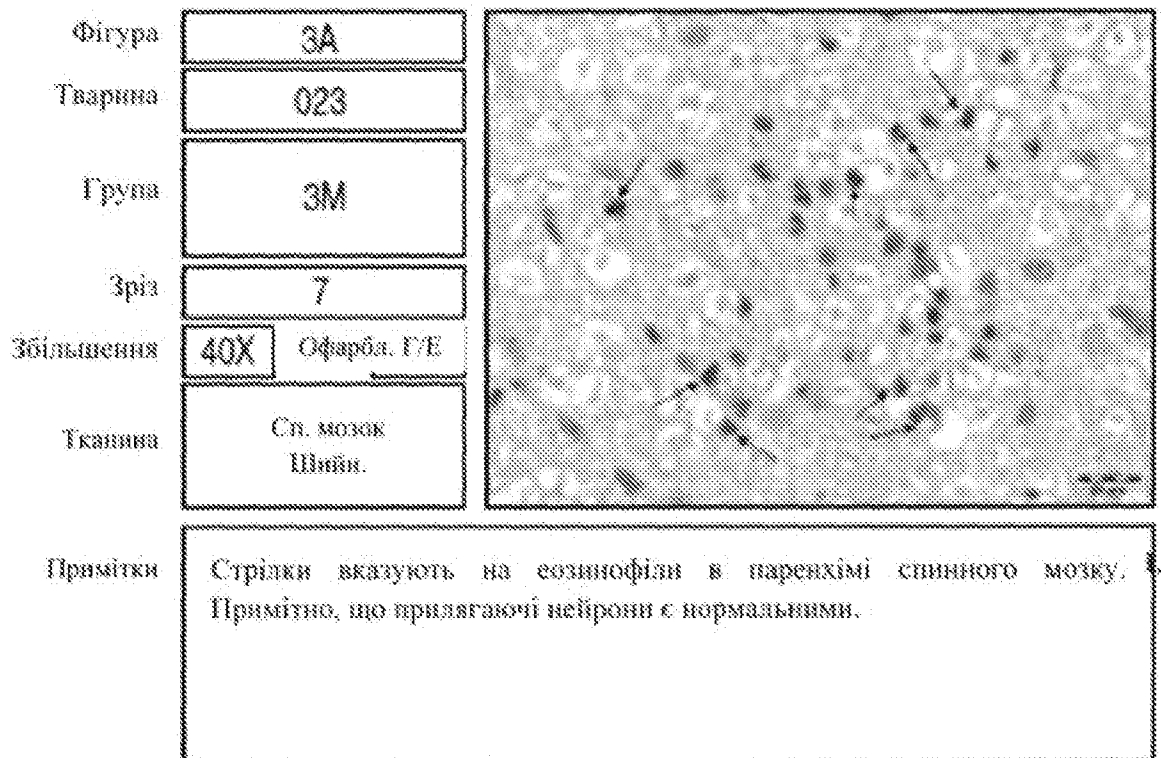


Fig. 147E

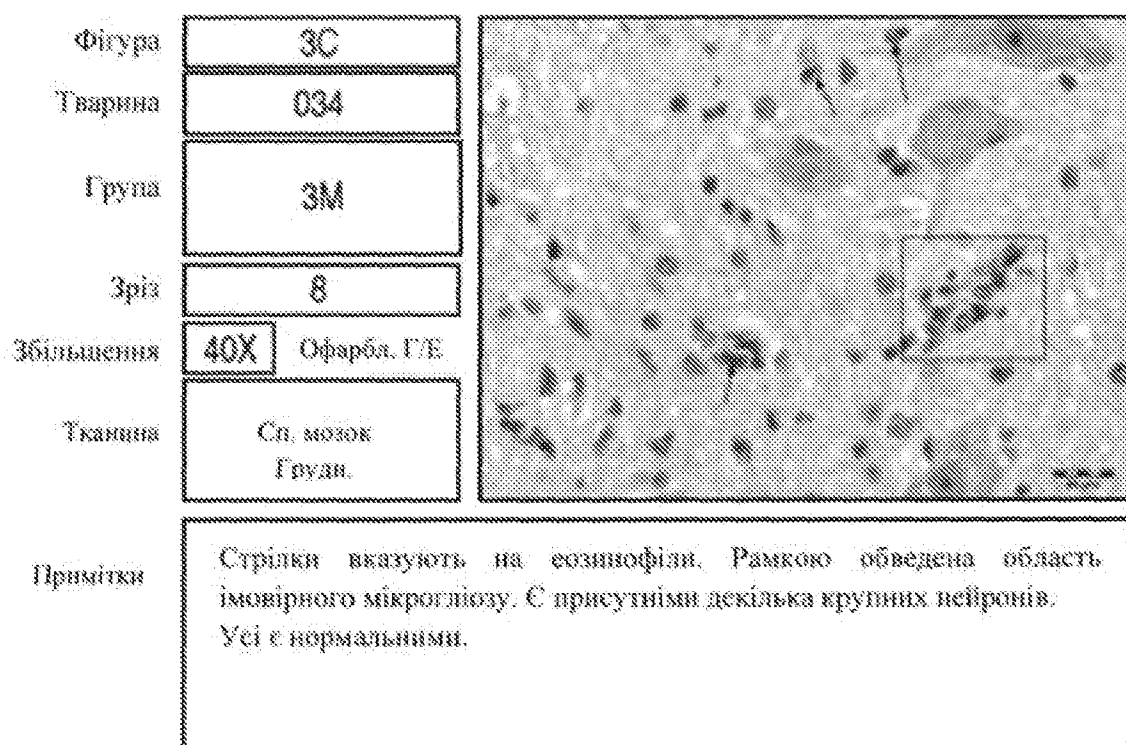


Fig. 147F

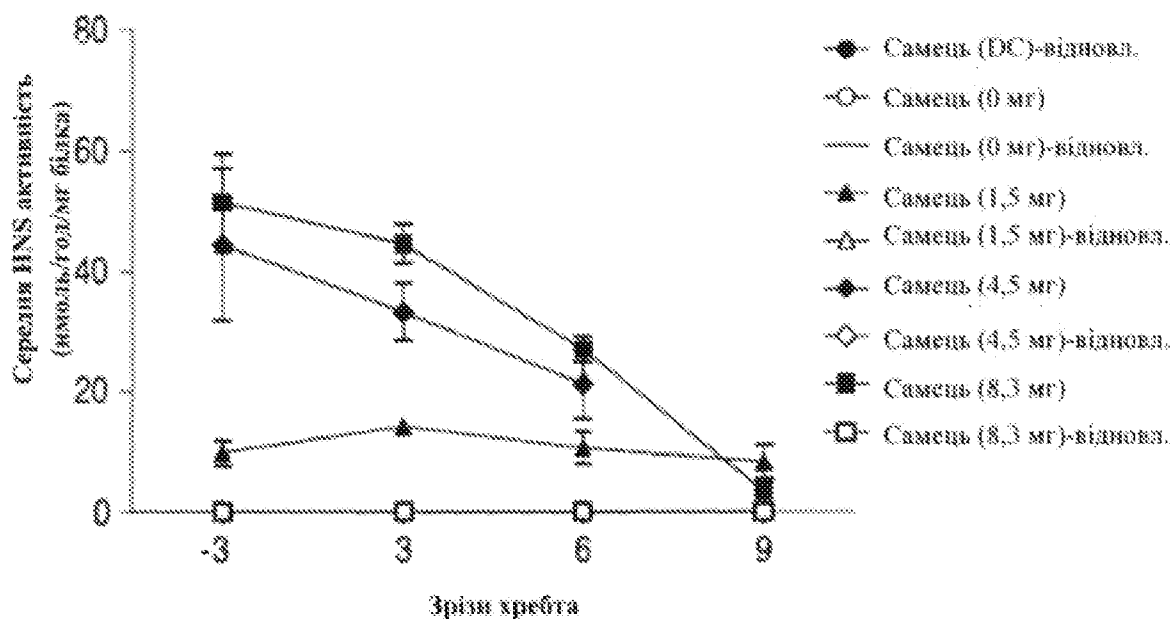
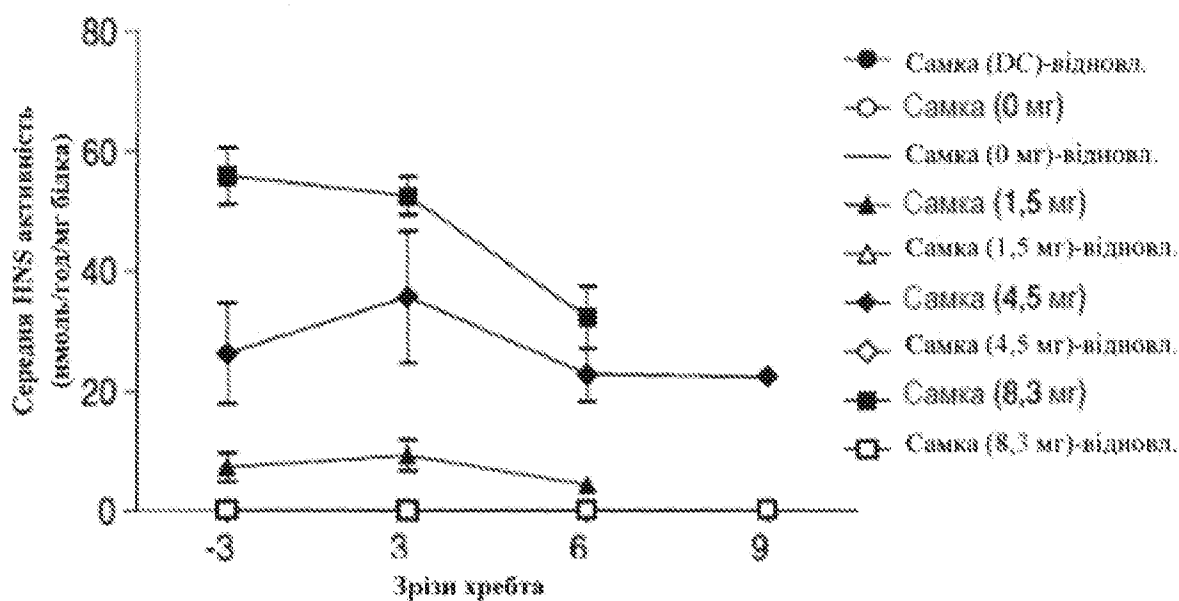


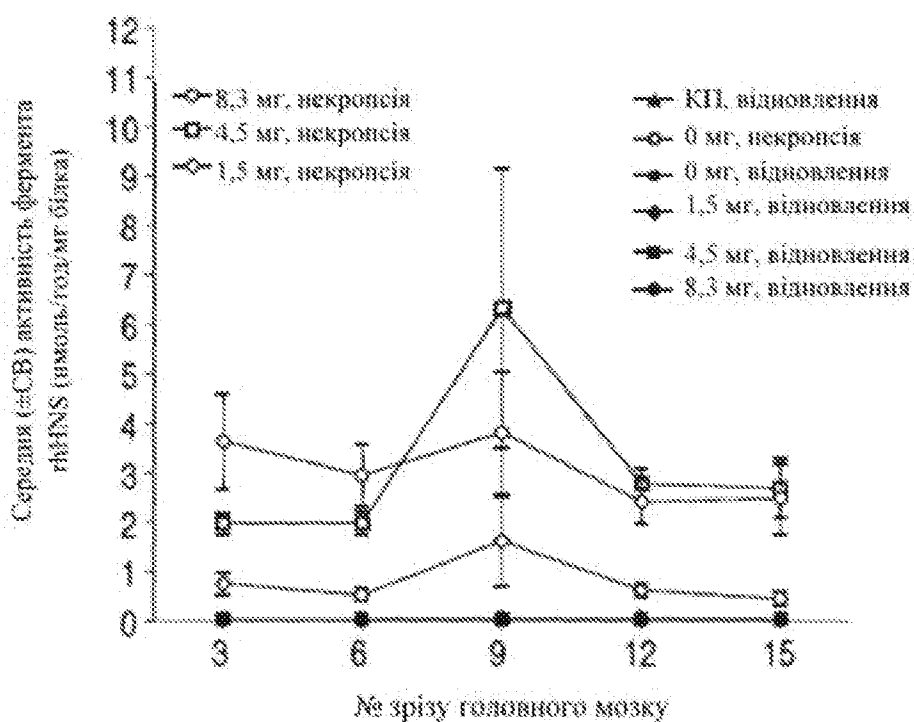
Fig. 148A

Активність фермента HNS в спинному мозку (нмоль/год/мг білка) у самців довгохвостих макак після 6 місяців дозування



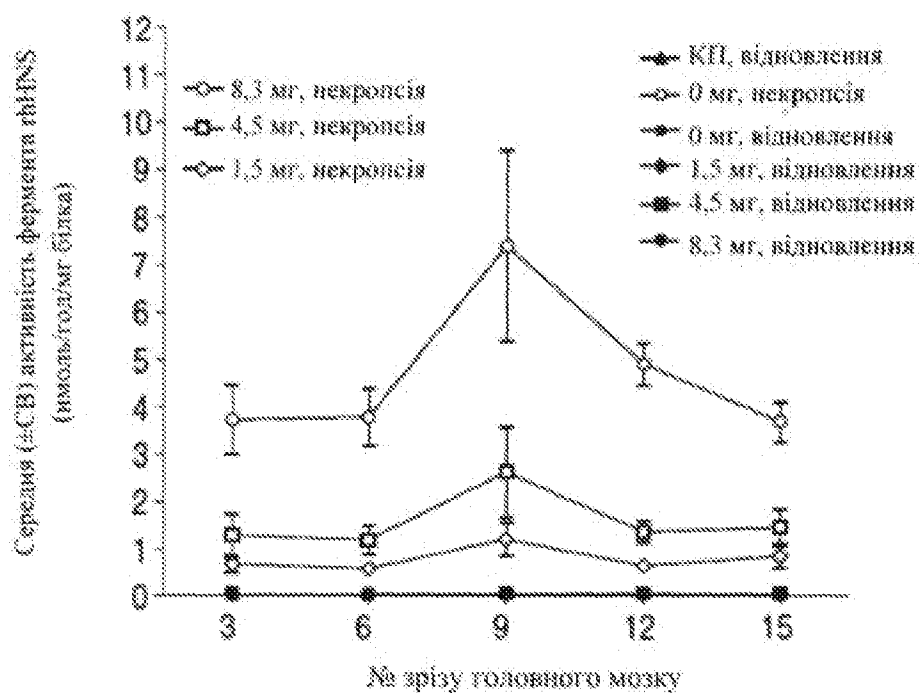
Фіг. 148B

Активність фермента HNS в спинному мозку (нмоль/год/мг білка) у самок яванського макака після 6 місяців дозування



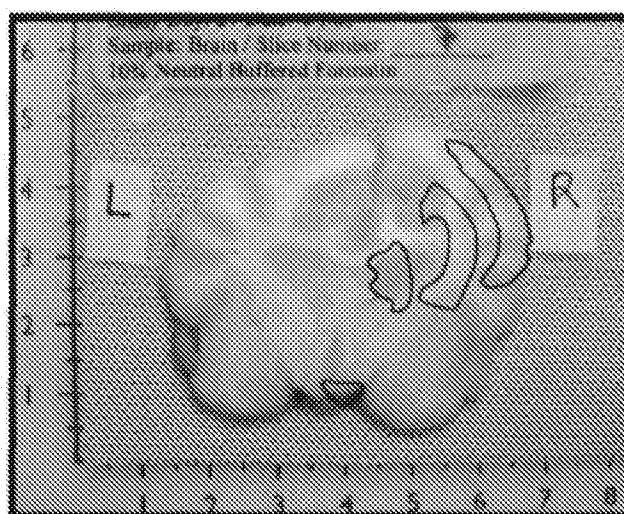
Фіг. 148C

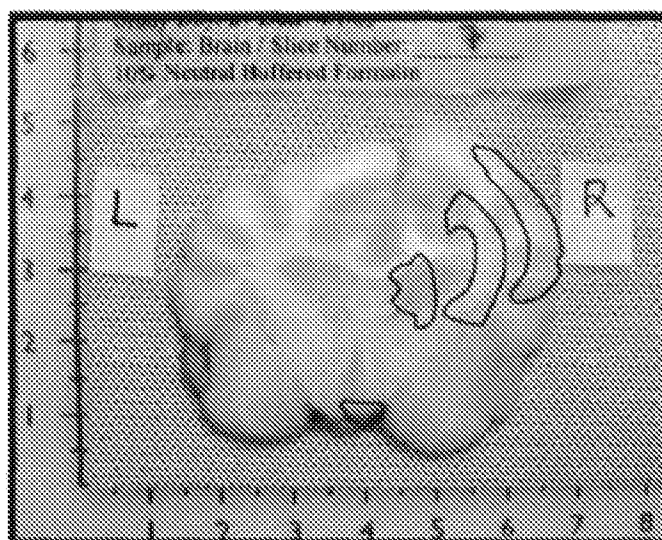
Концентрації rhHNS в головному мозку, виражені через активність ферменту, у самця яванського макака після 6 місяців дозування



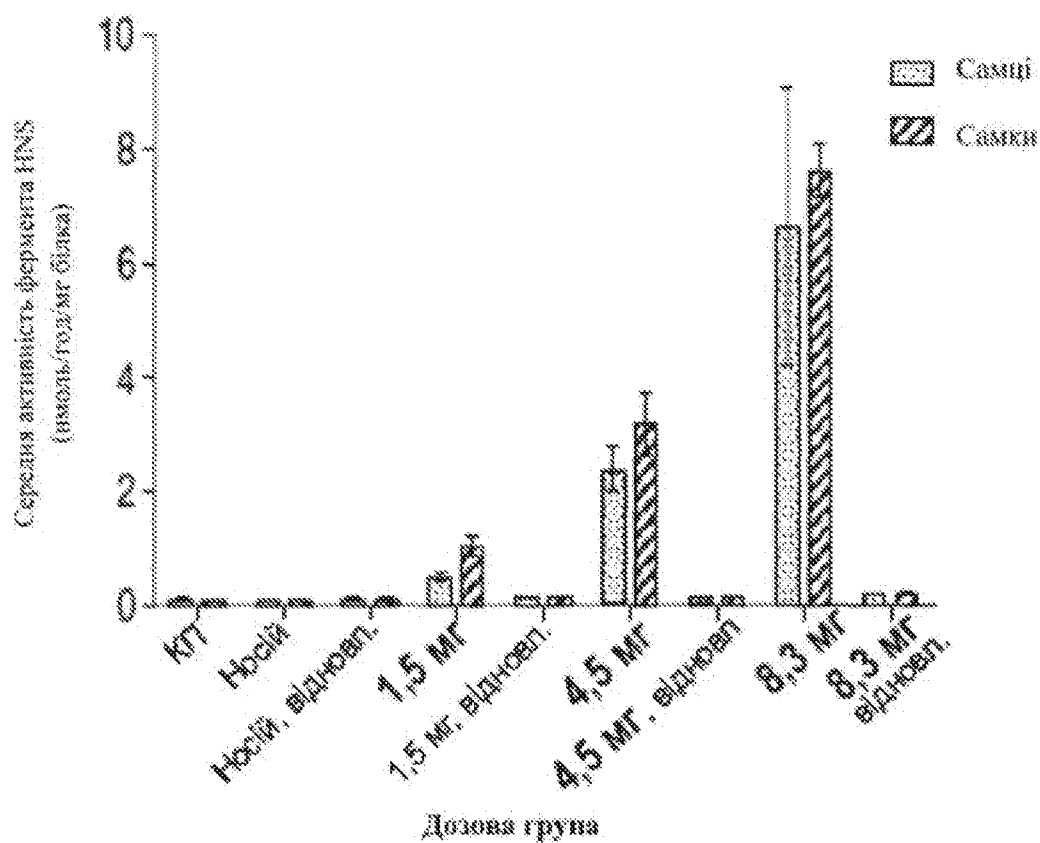
Фіг. 148D

Концентрації ghHNS в головному мозку, виражені через активність ферменту, у самки яванського макака після 6 місяців дозування



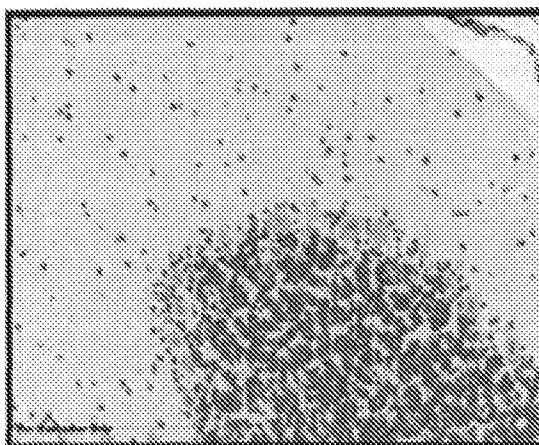


Фіг. 149А



Фіг. 149В

Середня активність HNS (нмоль/год/мг білка) в печінці яванського макака після 6 місяців і після 1 місяця відновлювального періоду



Фіг. 150А

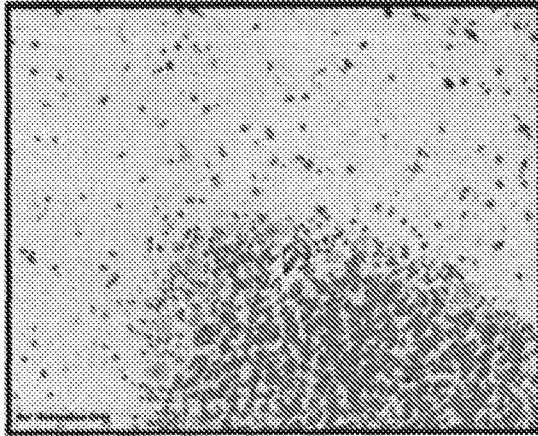


Fig. 150B

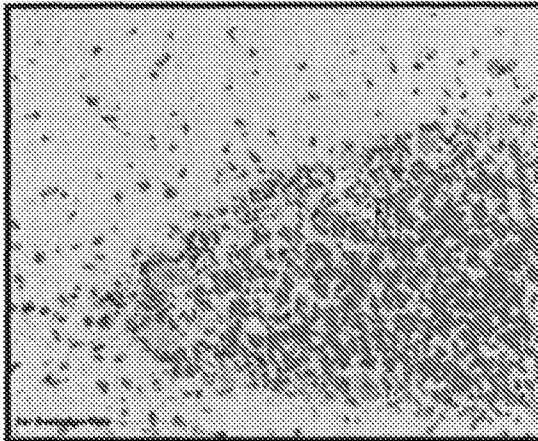


Fig. 150C

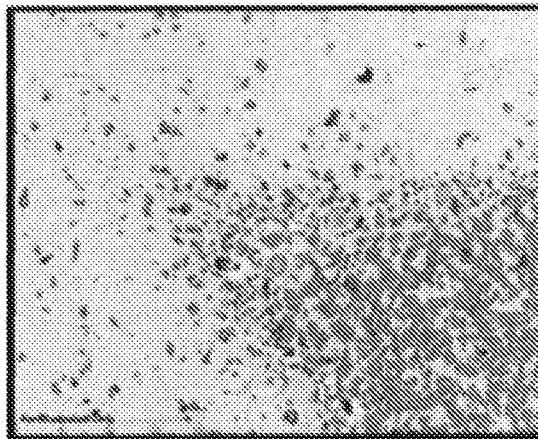


Fig. 150D

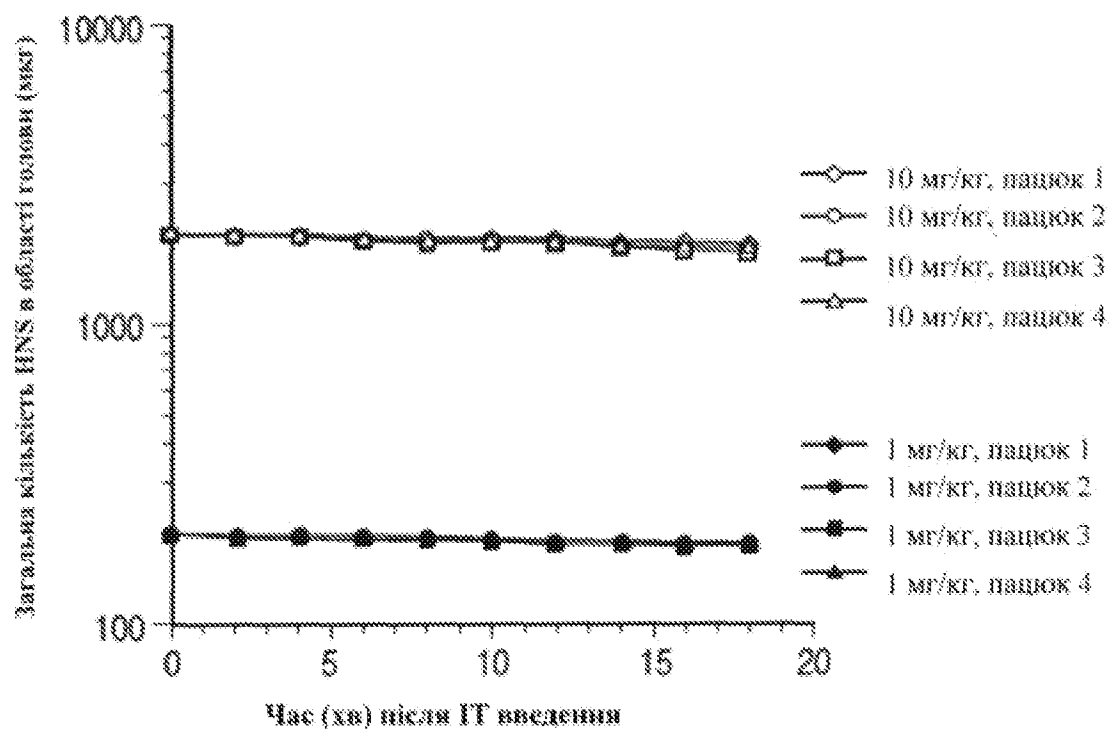


Fig. 151

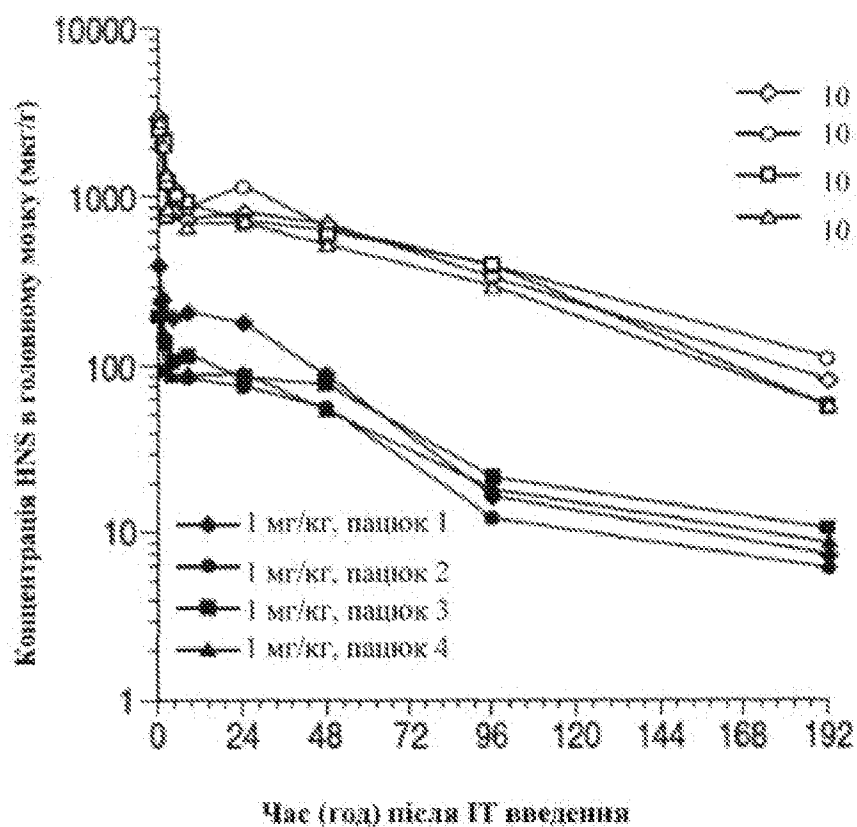
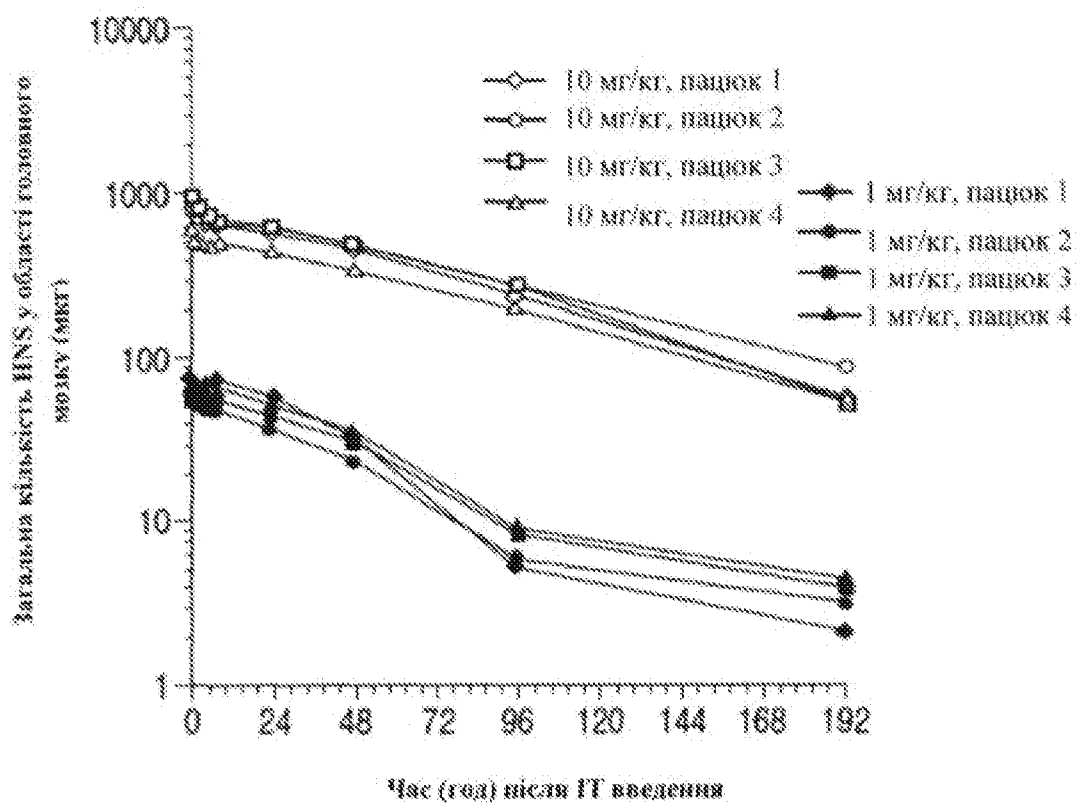
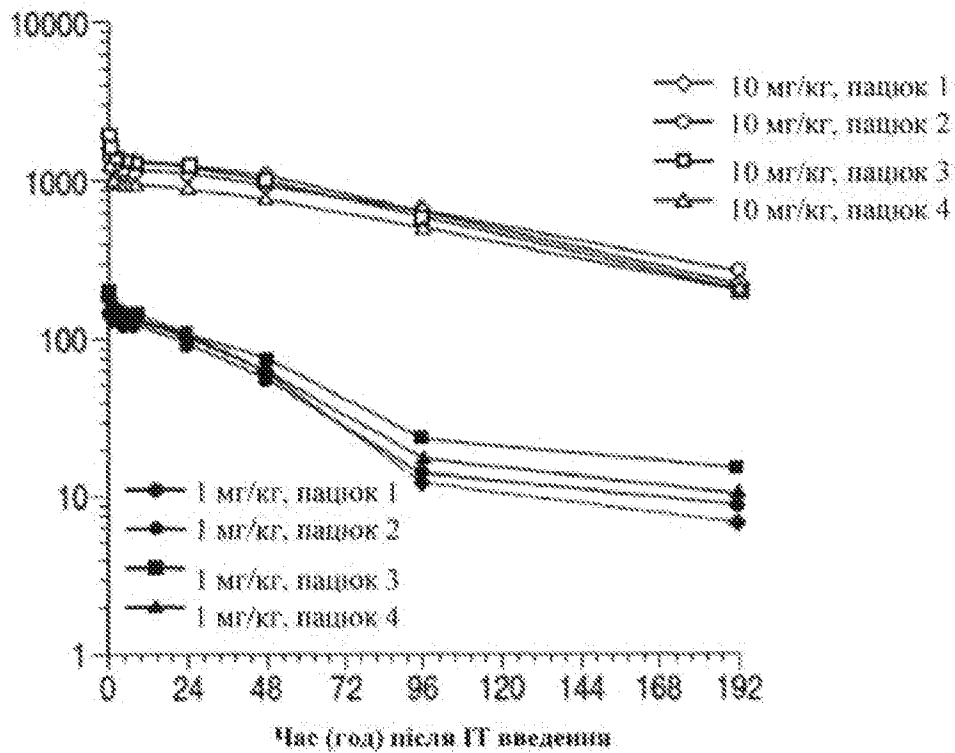


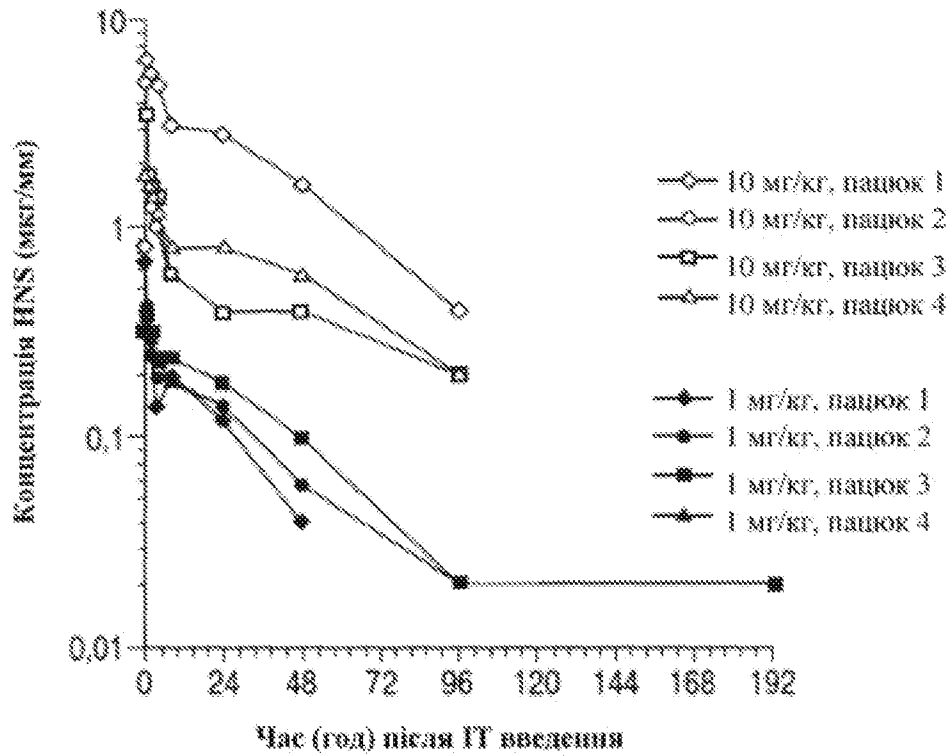
Fig. 152



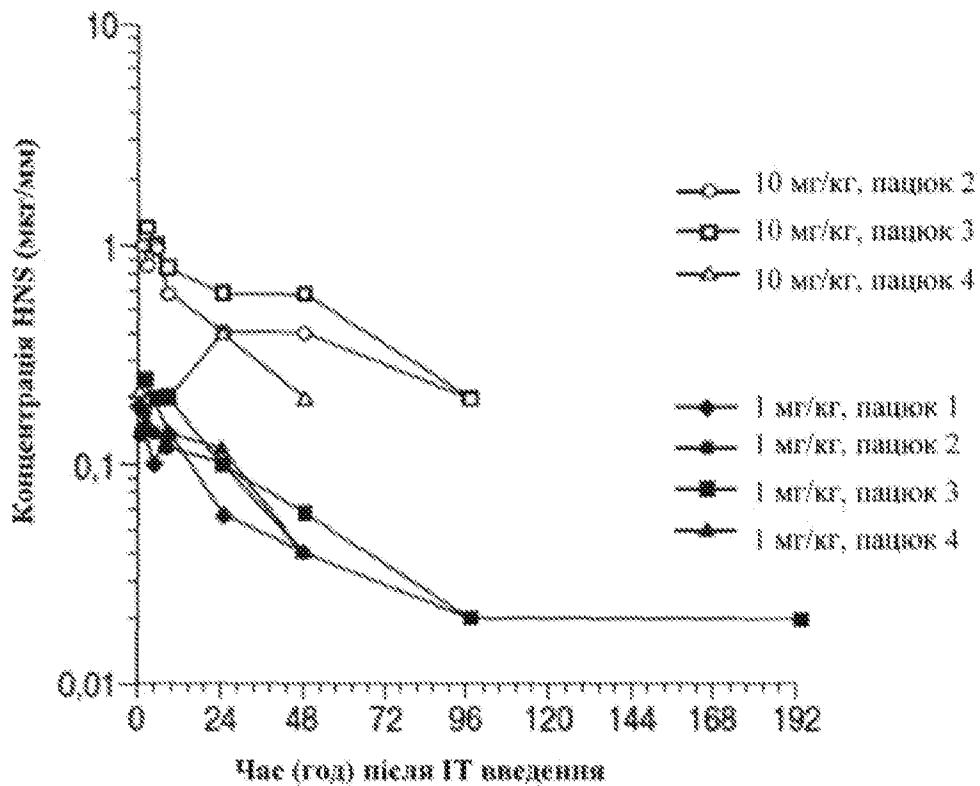
Фіг. 153



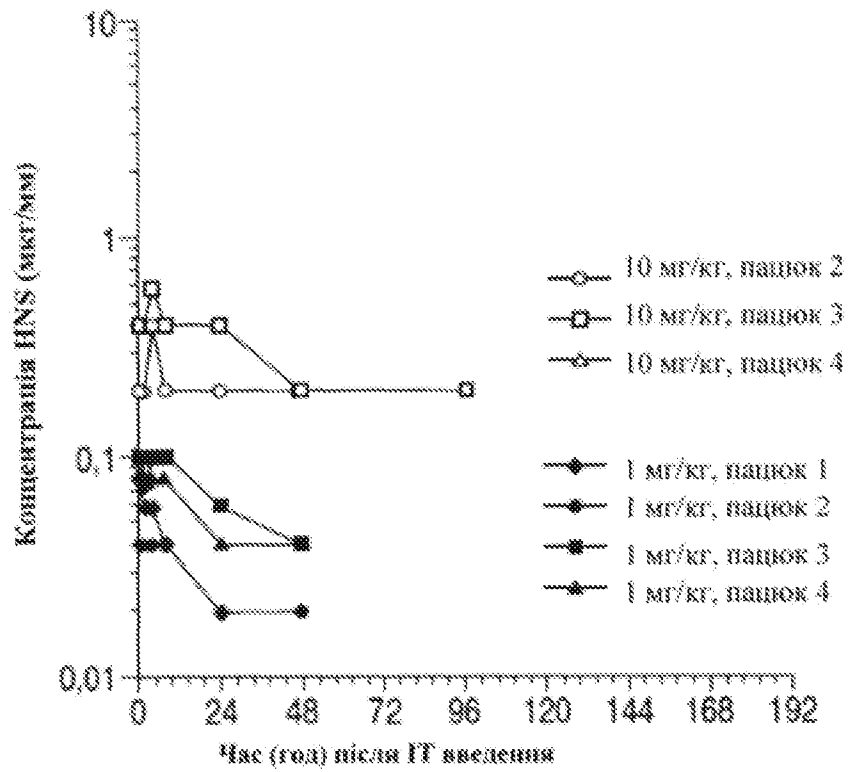
Фіг. 154



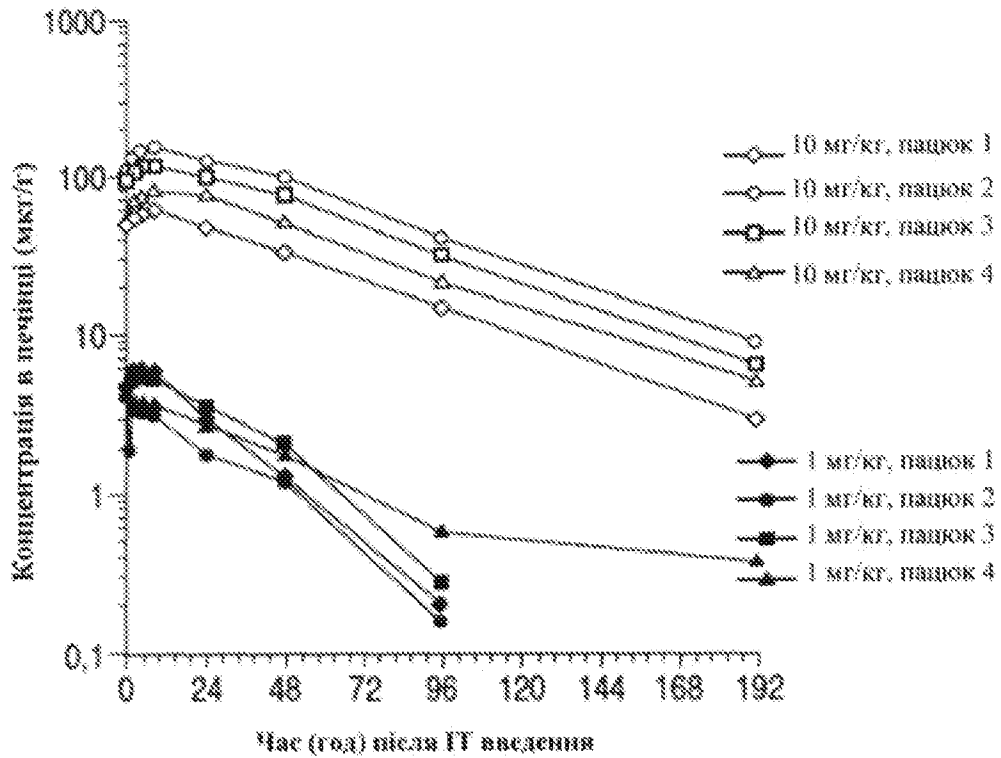
Фіг. 155
Проксимальний відділ хребта



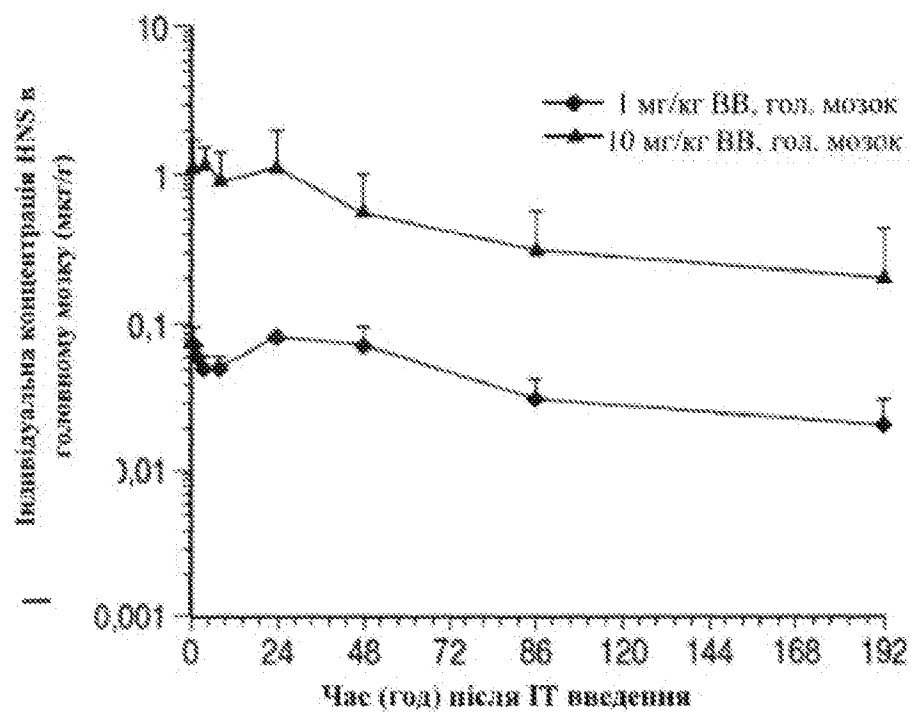
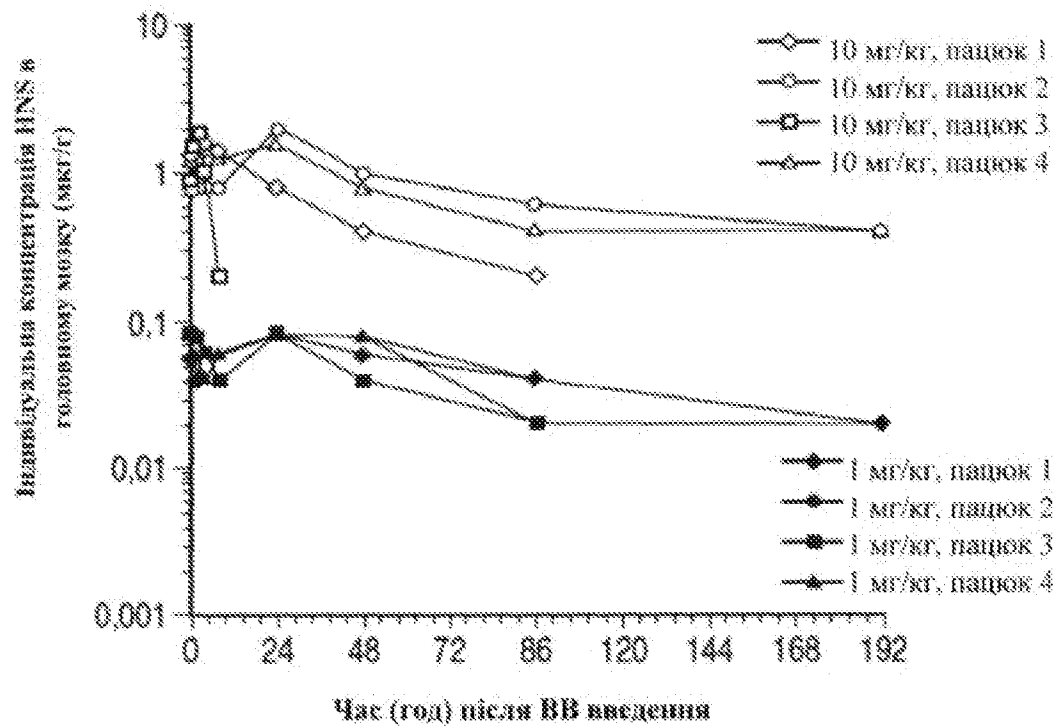
Фіг. 156
Середній відділ хребта



Фіг. 157
Дистальний відділ хребта



Фіг. 158
Концентрація HNS в печінці



Фіг. 159

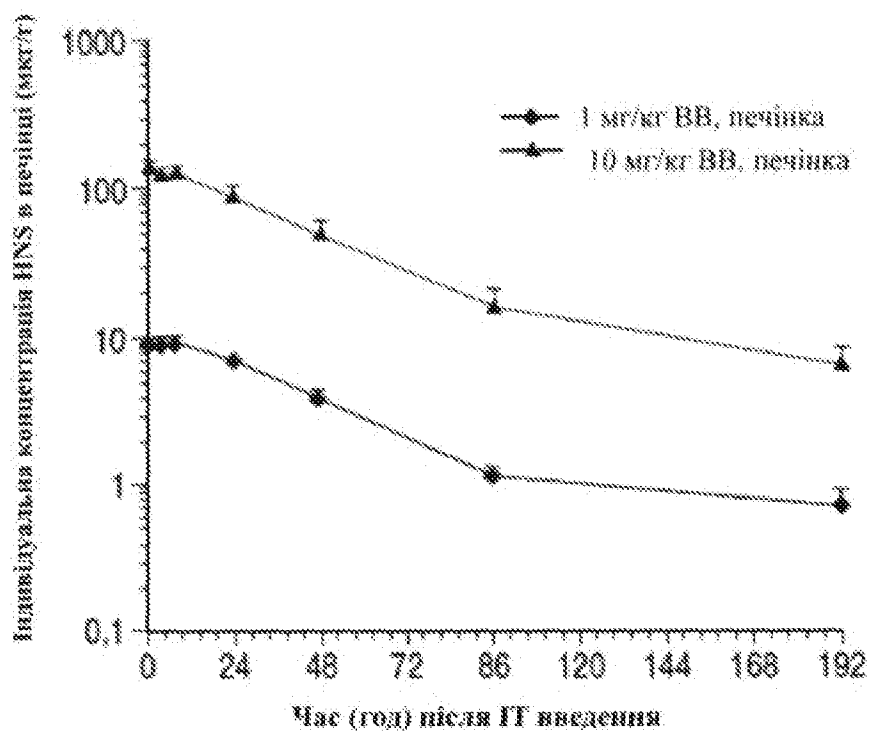
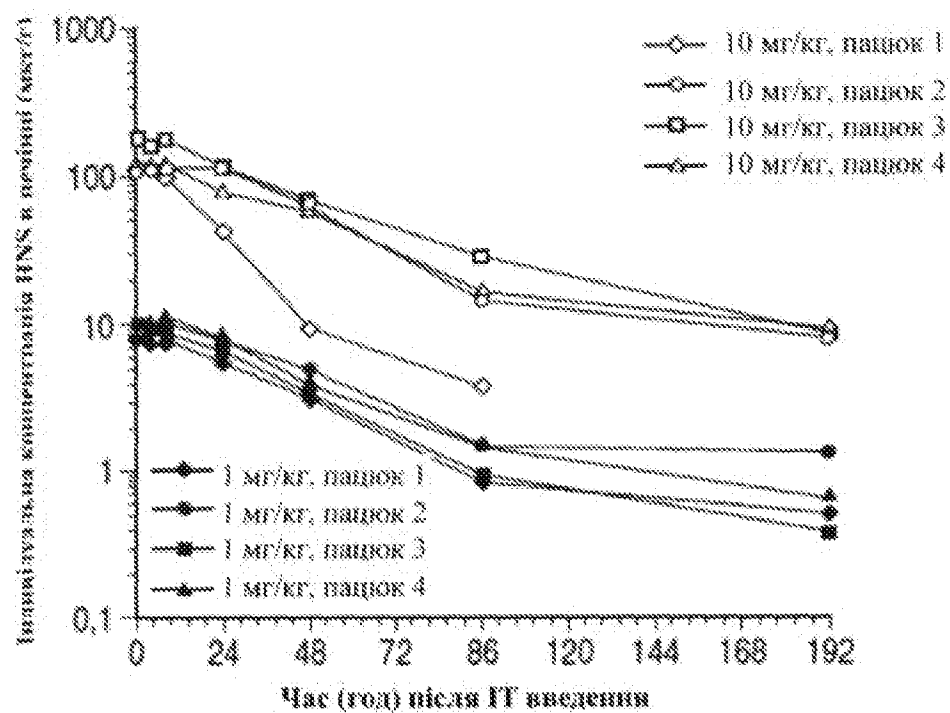


Fig. 160

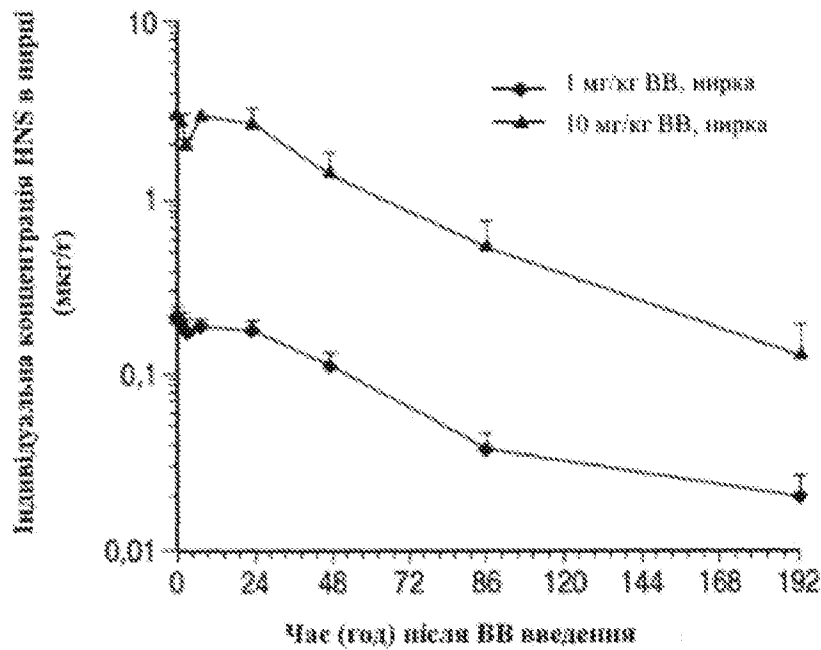
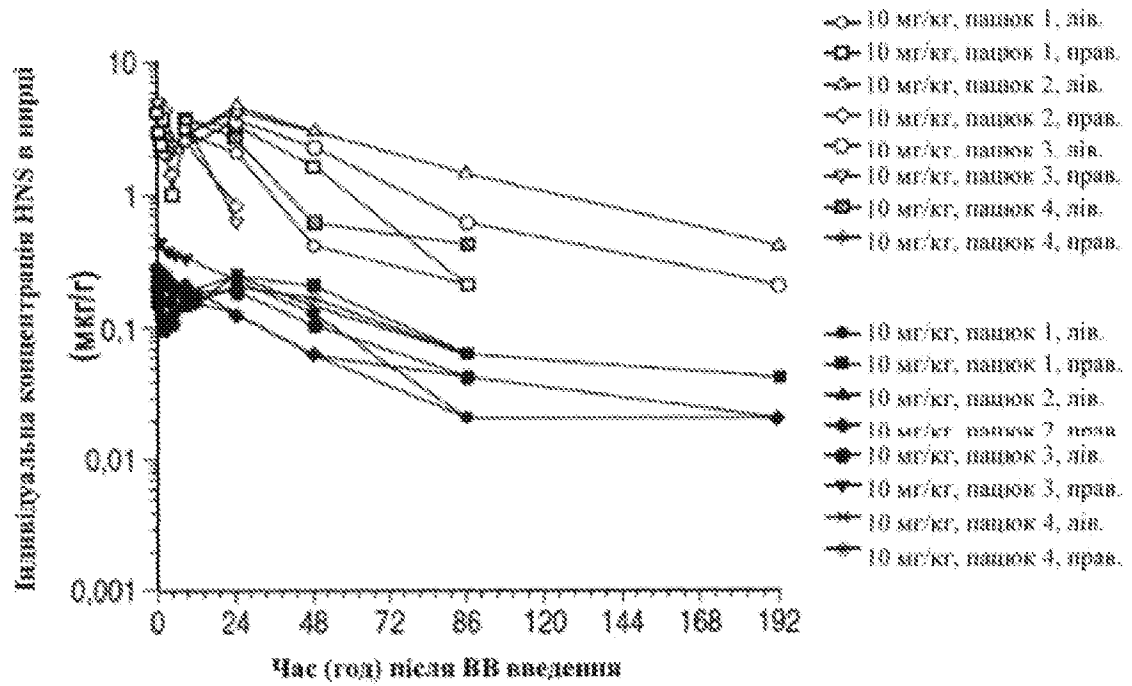
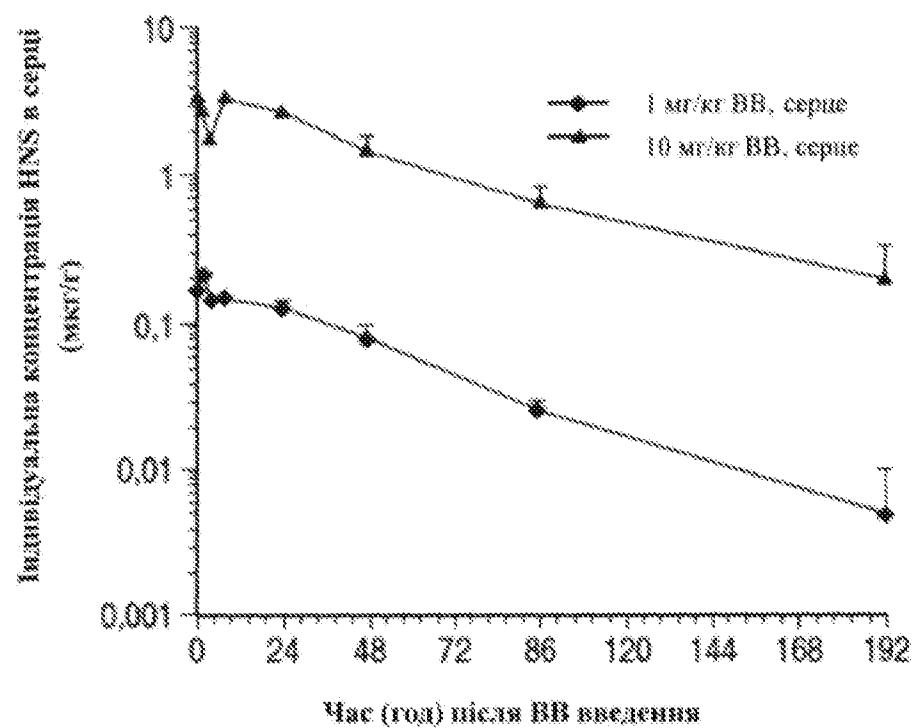
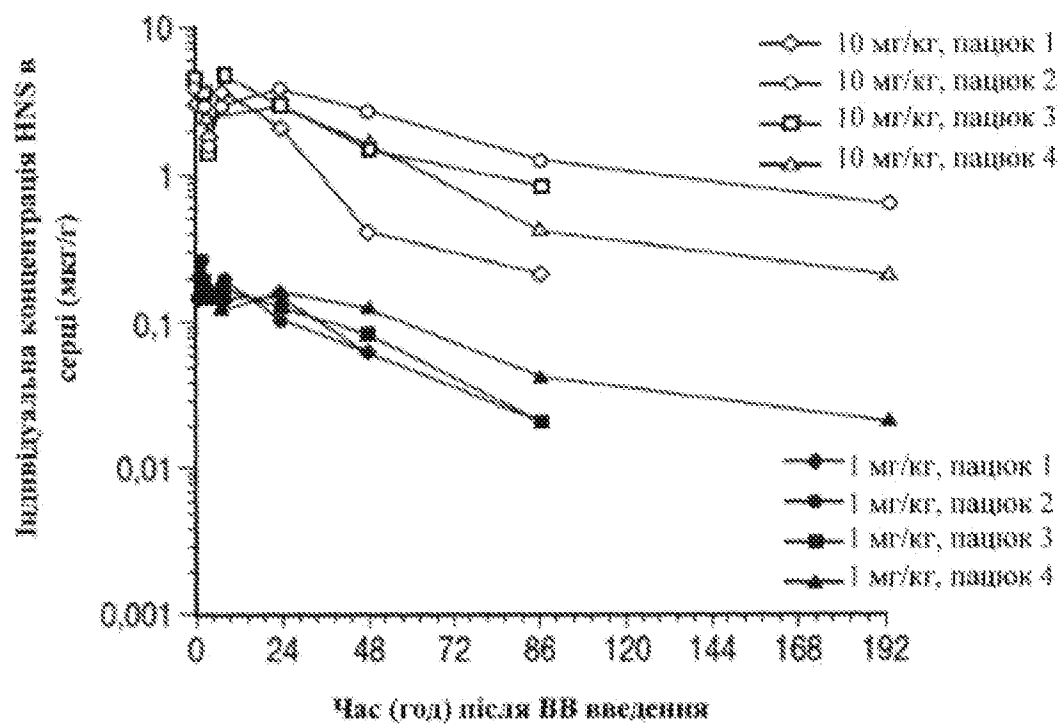


Fig. 161



Фіг. 162

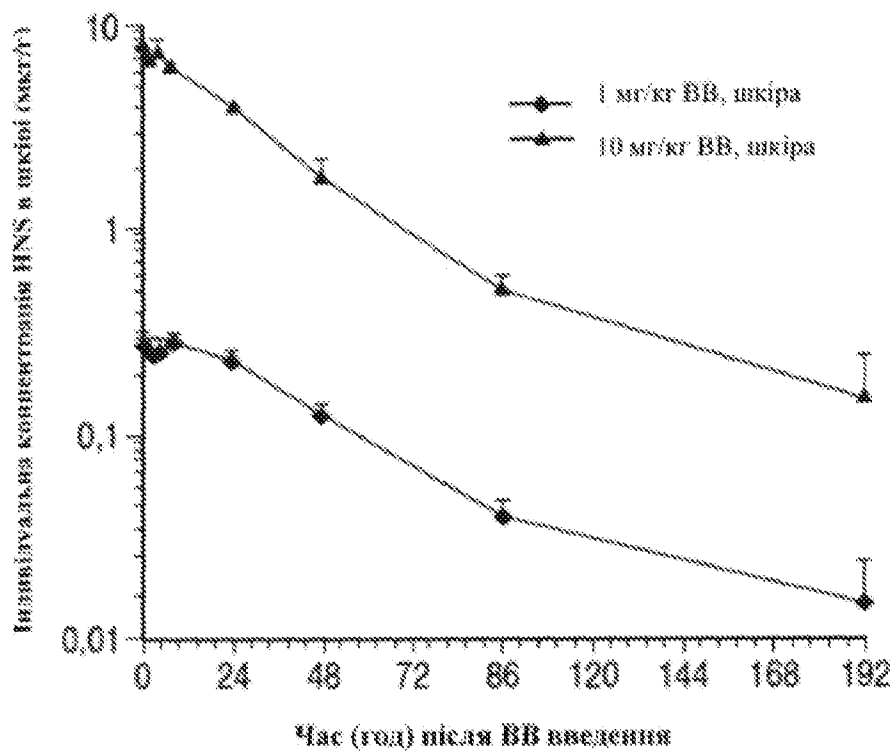
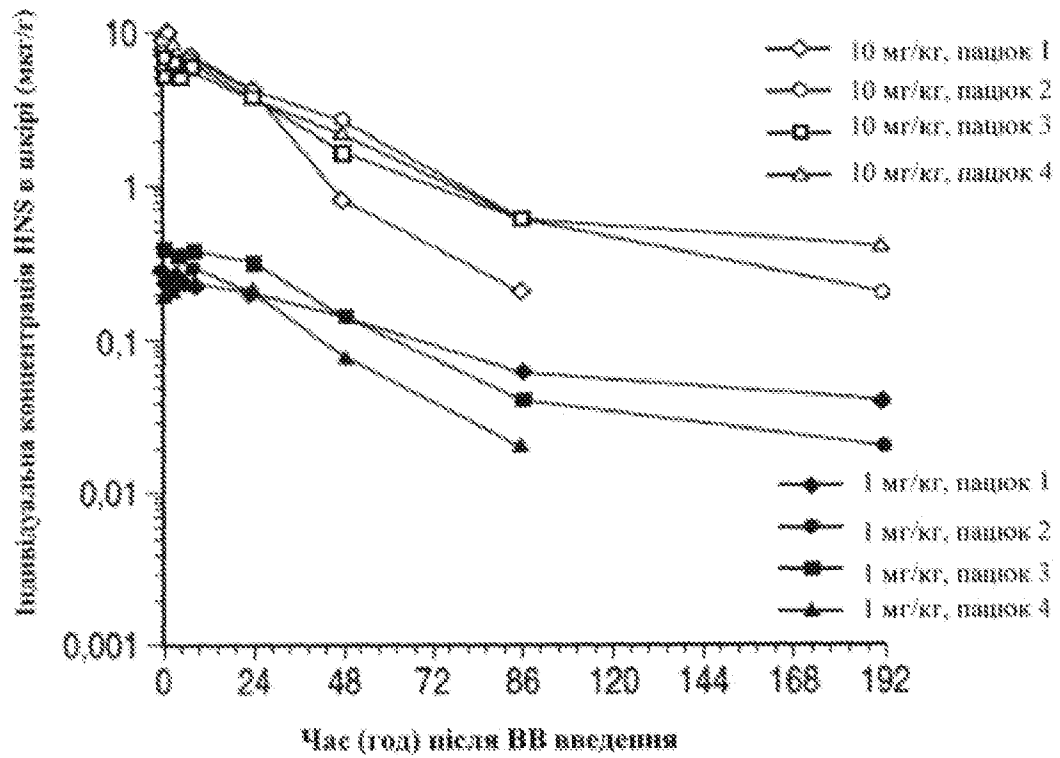
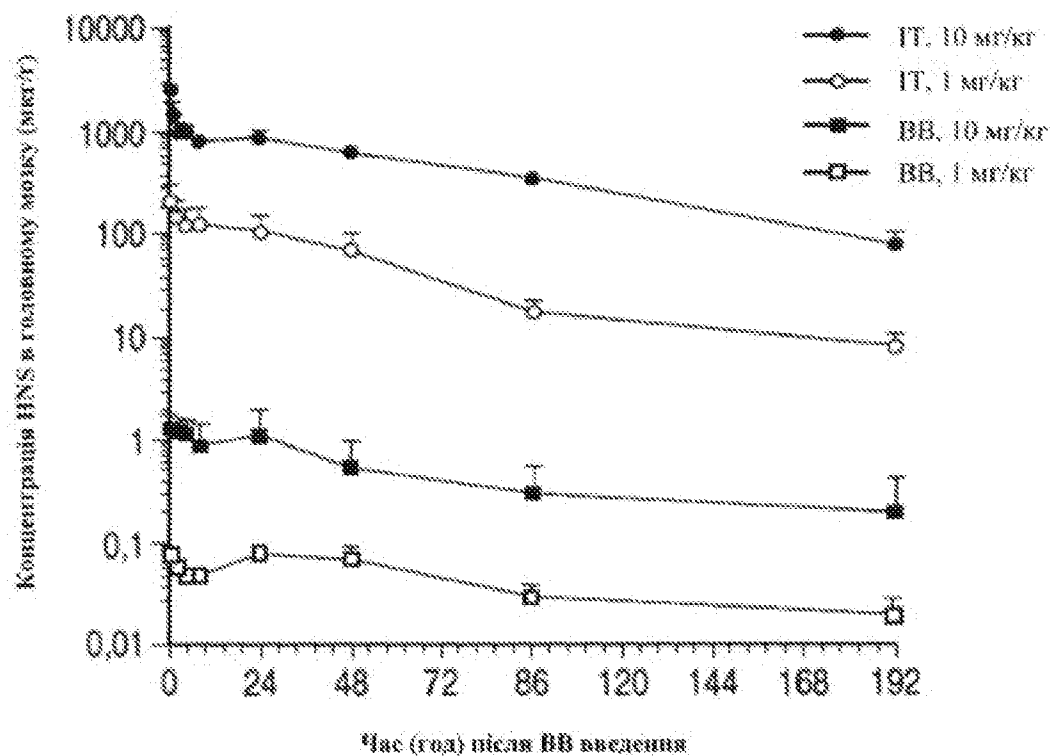


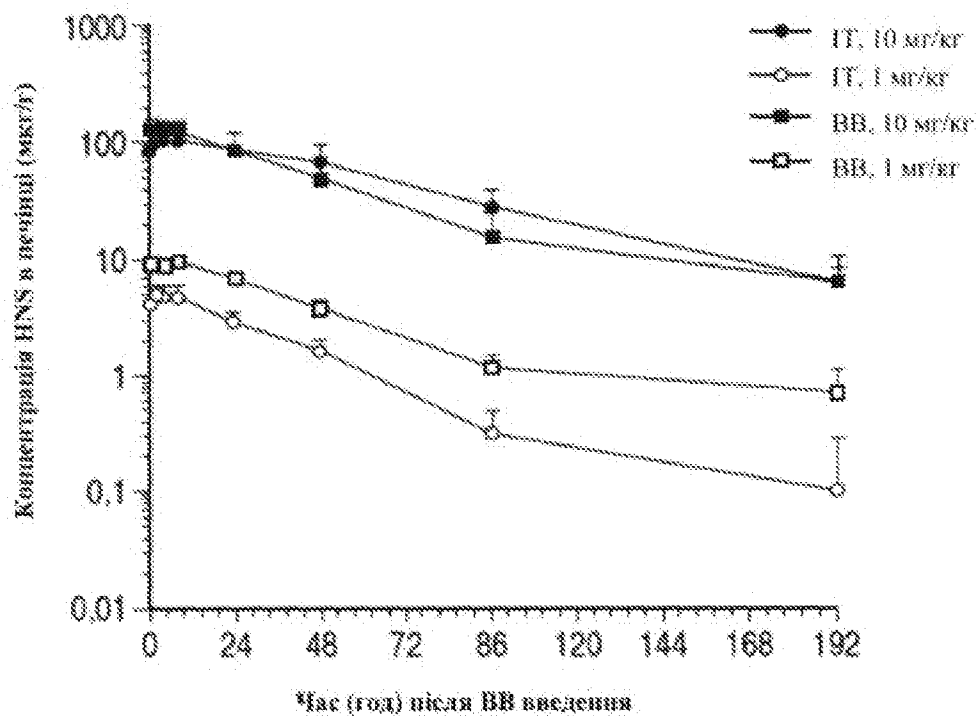
Fig. 163



Порівняння без урахування компартментів ФК параметрів у головному мозку

	Параметр	Од.	IT		IB		Відношення
			Середнє	С.В.	Середнє	С.В.	
1 мг/кг	λ_z	1/год	0,016	0,003	0,011	0,005	
	$t_{1/2}$	год	45	7	71	23	
	C_{max}	мг/г	257	90	0,1	0,0	3212
	$AUC_{0-192\text{ год}}$	год·мг/г	8393	2457	7	2	1136
10 мг/кг	λ_z	1/год	0,014	0,001	0,102	0,180	
	$t_{1/2}$	год	49	4	60	53	
	C_{max}	мг/г	2628	265	1,8	0,2	1501
	$AUC_{0-192\text{ год}}$	год·мг/г	83962	10083	86	66	978

Фіг. 164



Порівняння без урахування компартментів параметрів ФК у плазмі

	Параметр	Од.	ІТ		ІМ		Відношення
			Середнє	С. В.	Середнє	С. В.	
1 мг/кг	λ_z	1/год	0,030	0,011	0,015	0,003	
	$t_{1/2}$	год	28	16	47	10	
	C_{max}	мкг/л	4,9	1,3	9,6	0,5	0,5
	$AUC_{0-192\text{ год}}$	год·мкг/л	204	50	525	104	0,4
10 мг/кг	λ_z	1/год	0,017	0,000	0,021	0,012	
	$t_{1/2}$	год	42	1	38	13	
	C_{max}	мкг/л	105	41	131,6	27	0,8
	$AUC_{0-192\text{ год}}$	год·мкг/л	7987	3276	6747	2837	1,2

Fig. 165

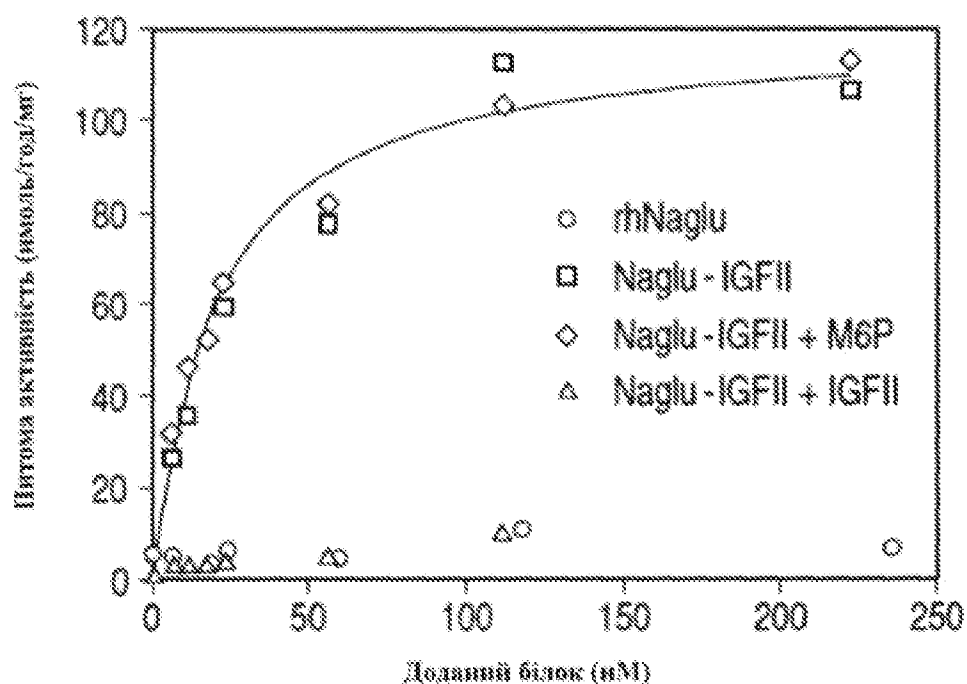


Fig. 166
KU захоплення Naglu-IGFII = 25,1 нМ

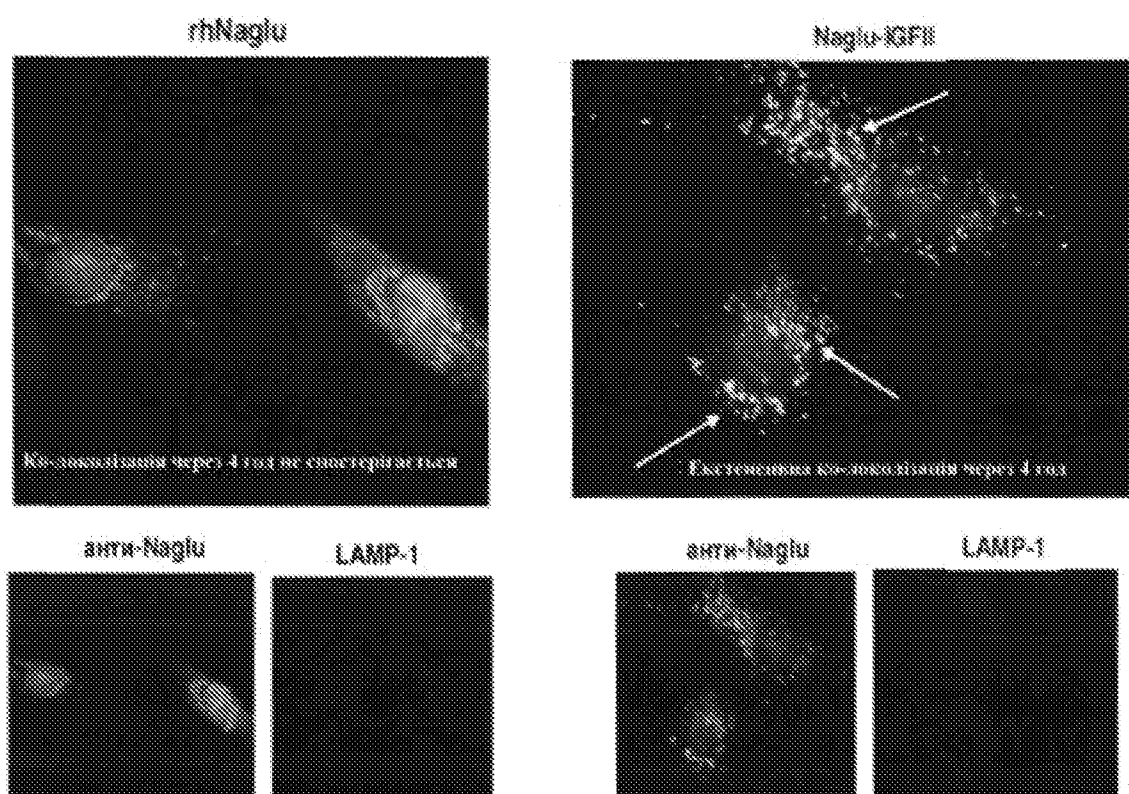
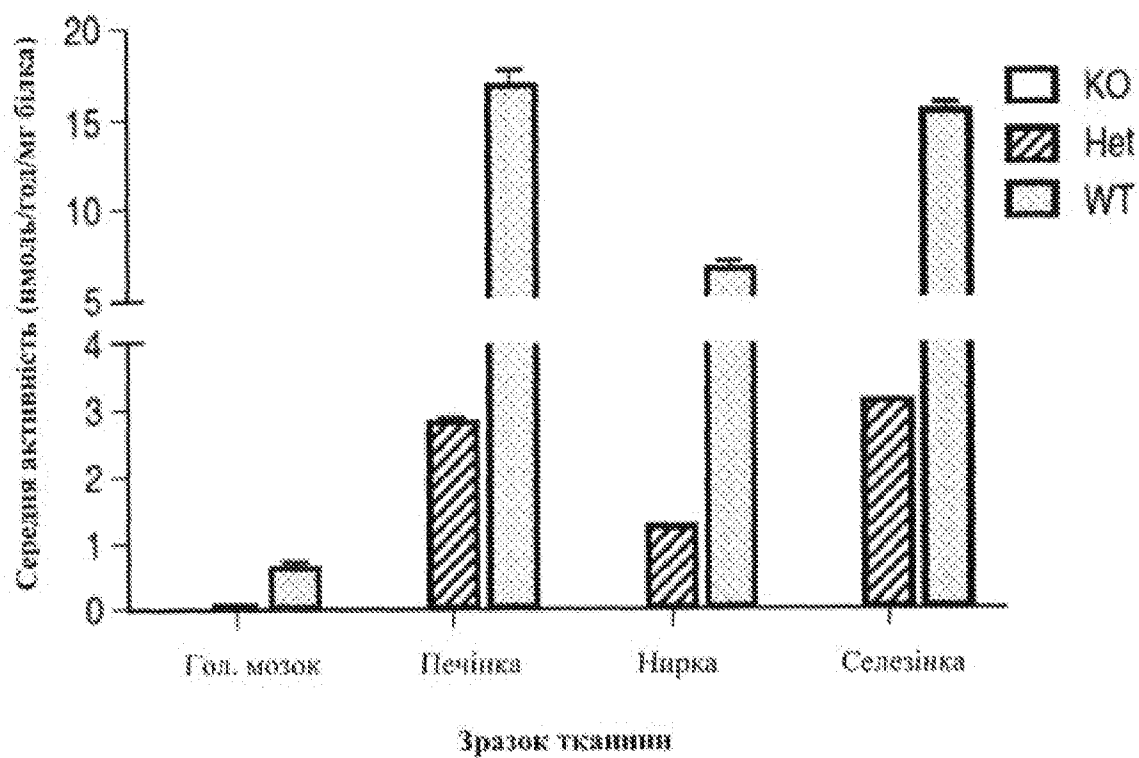
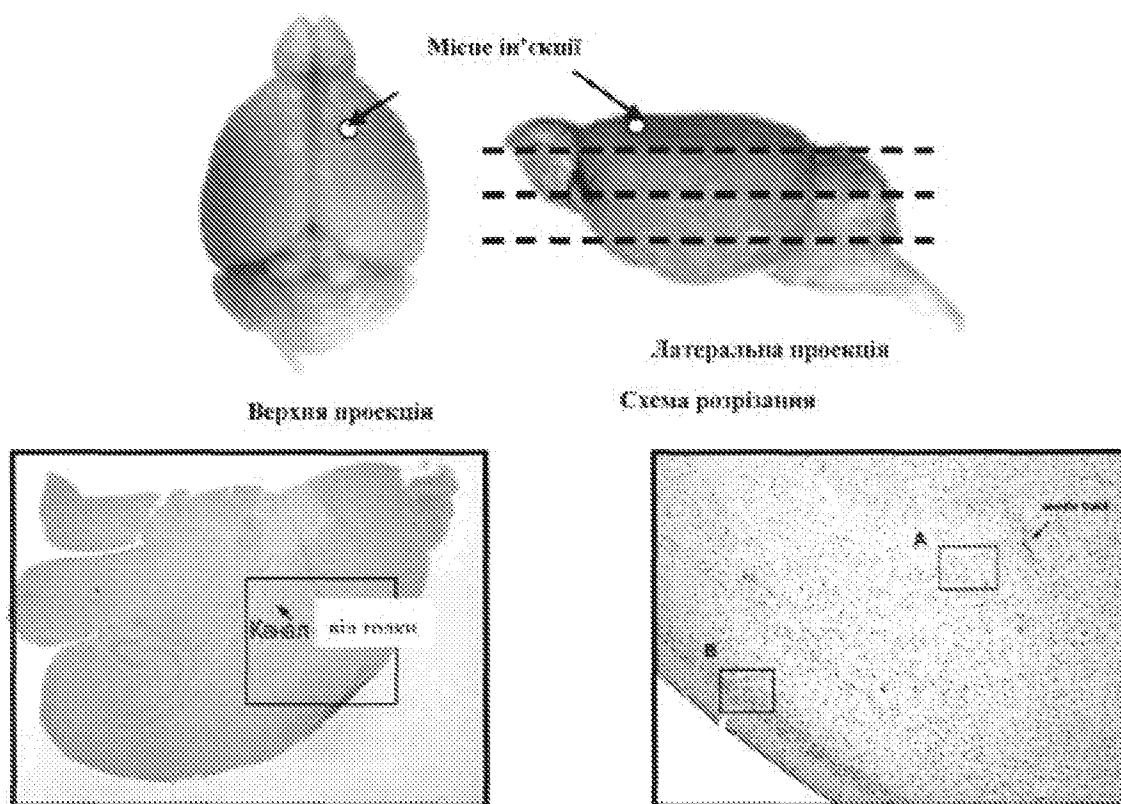


Fig. 167



Фіг. 168
Середня активність Naglu у KO, WT і Het Naglu мишей, що не одержували лікування



Фіг. 169

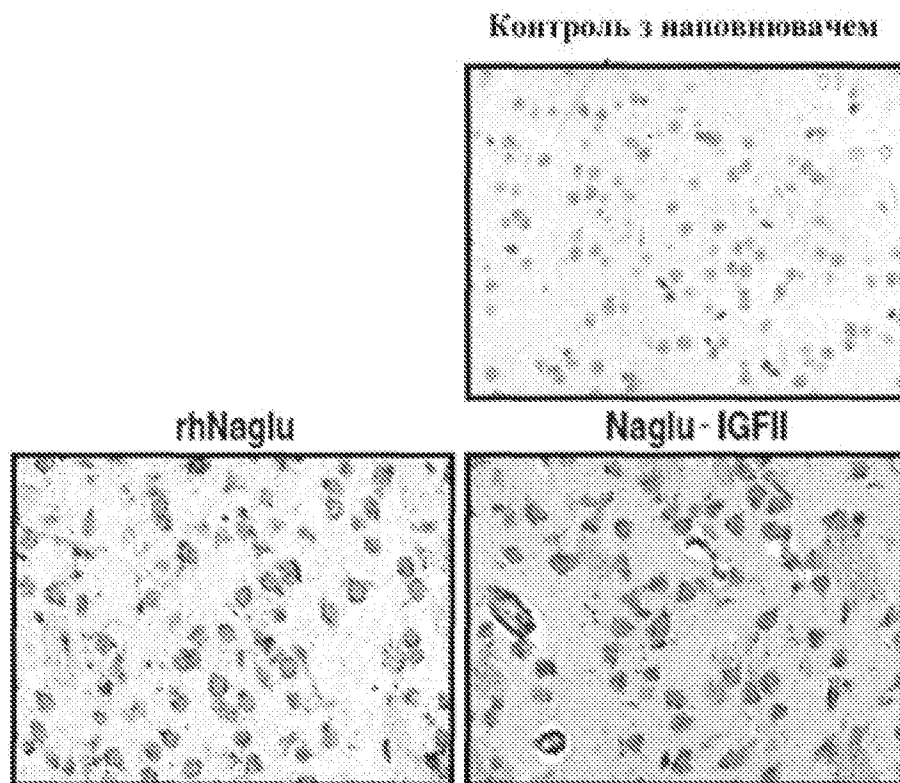


Fig. 170

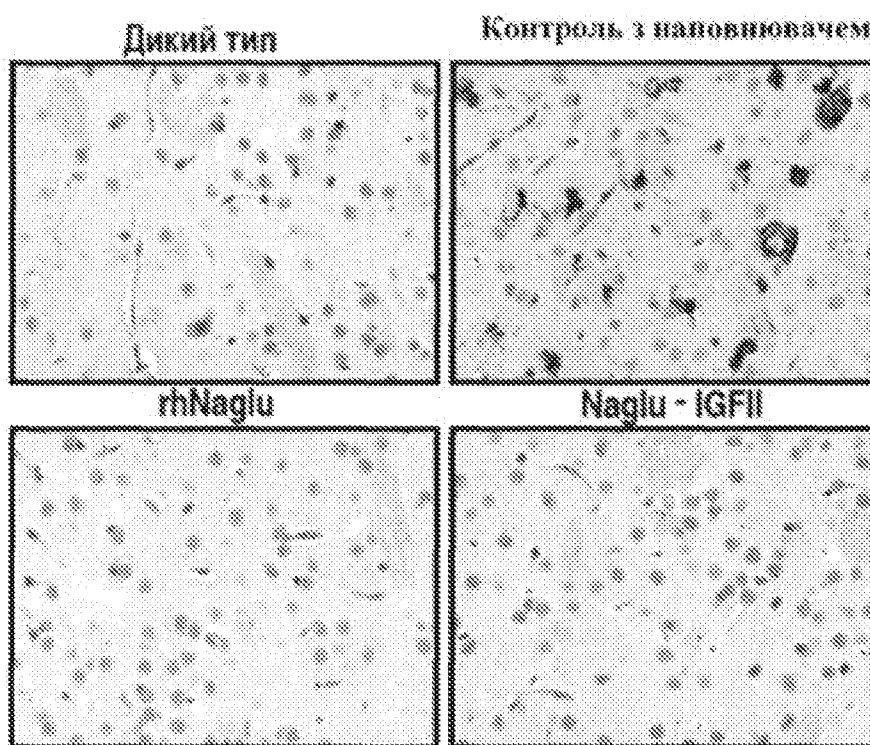
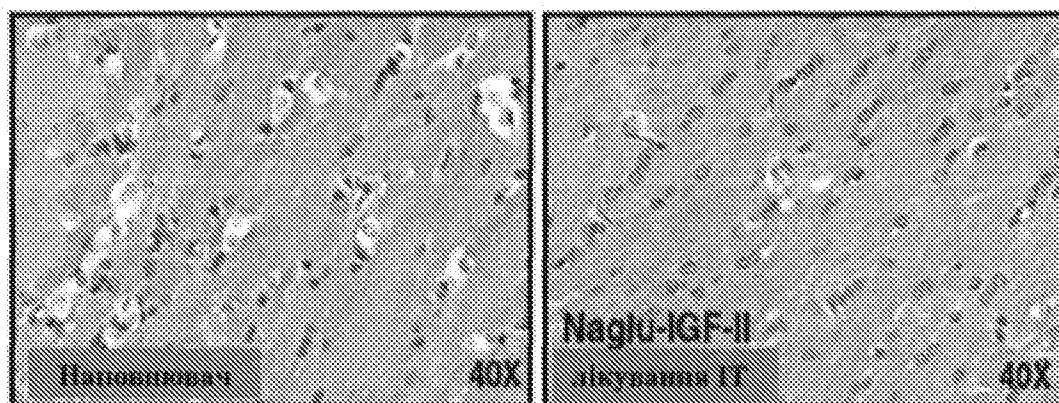
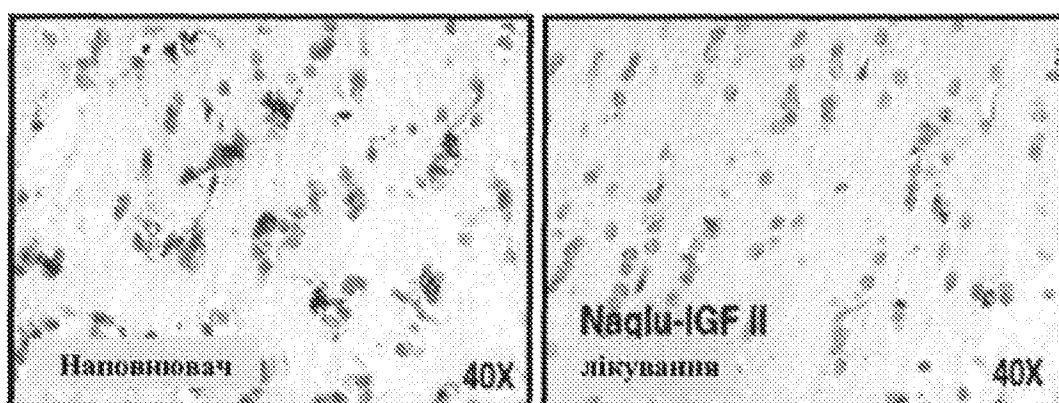


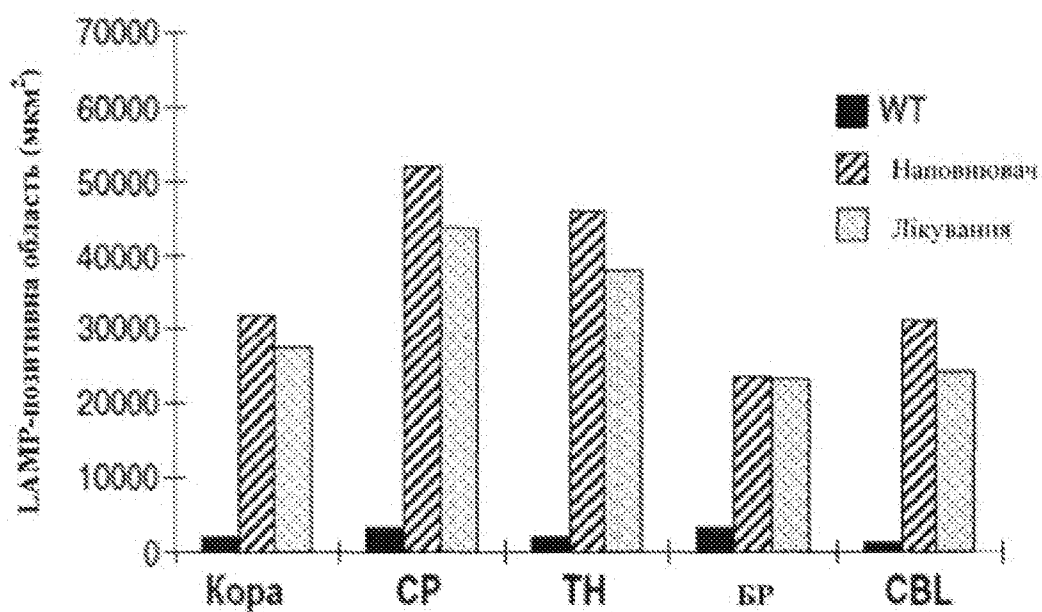
Fig. 171



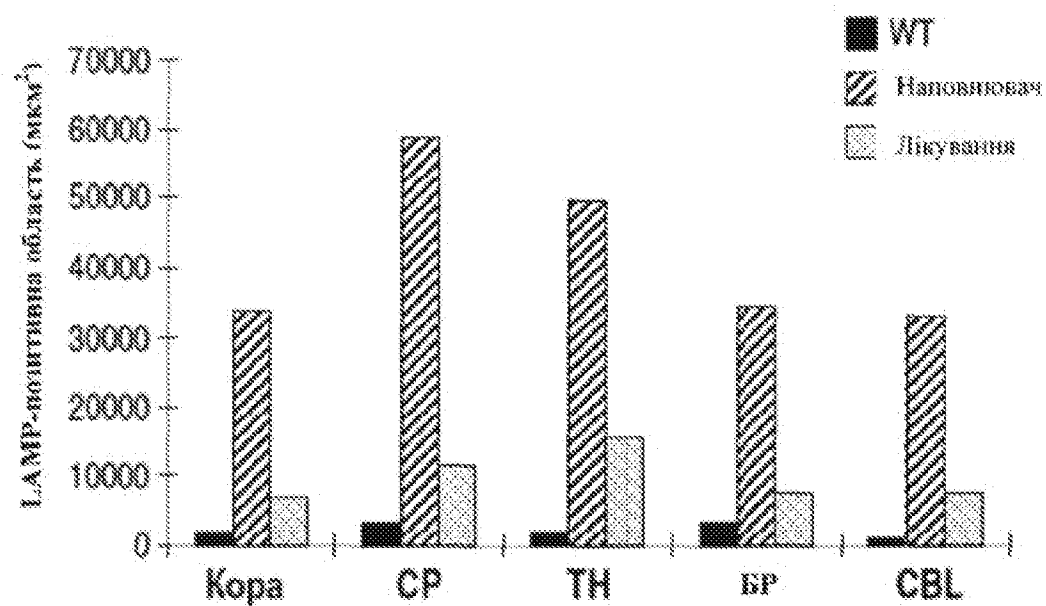
Фіг. 172A



Фіг. 172B



Фіг. 173 A
1 W Naglu-IGF-II IT лікування



Фіг. 173В
2 W Naglu-IGF II IT лікування

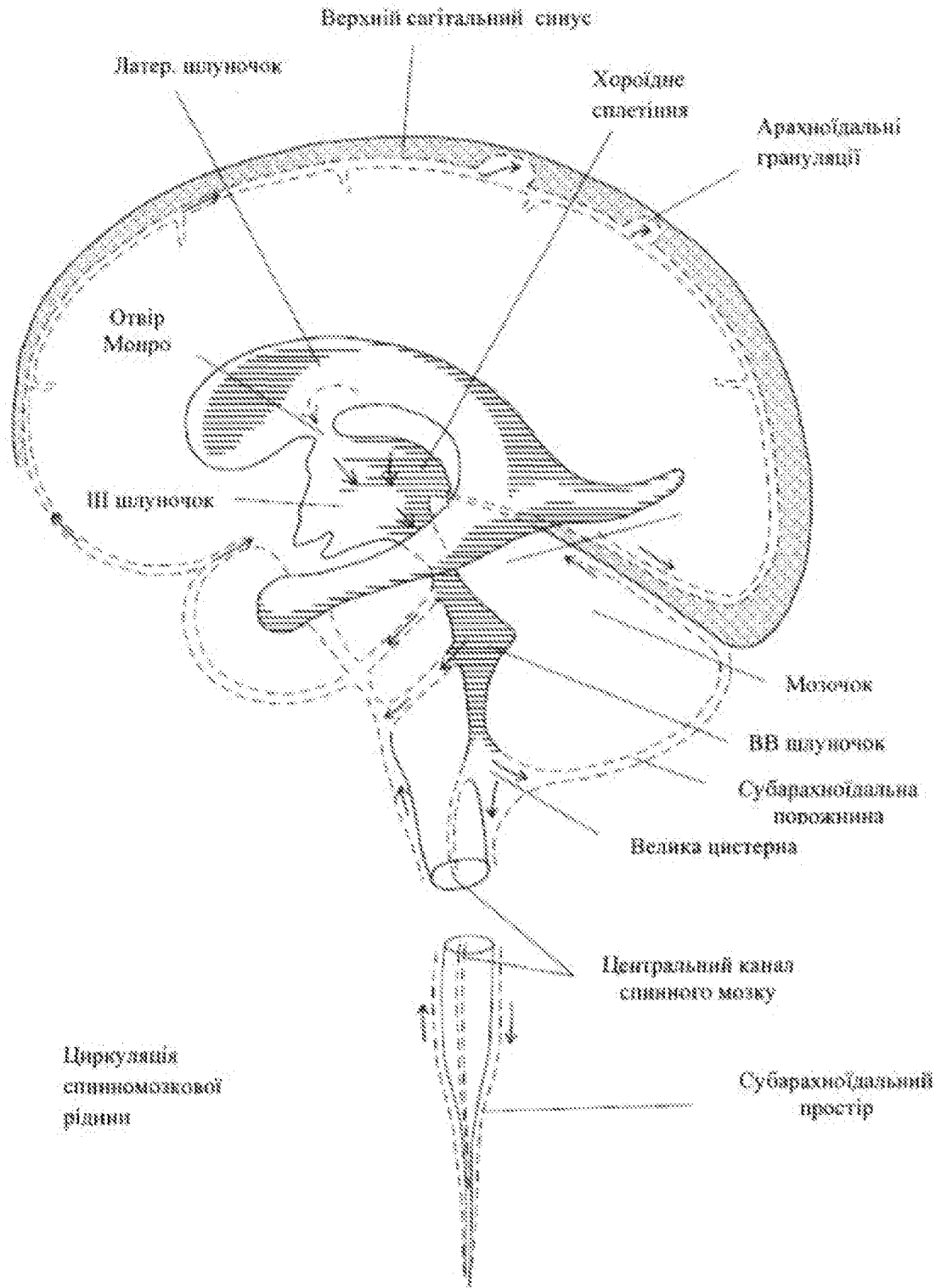
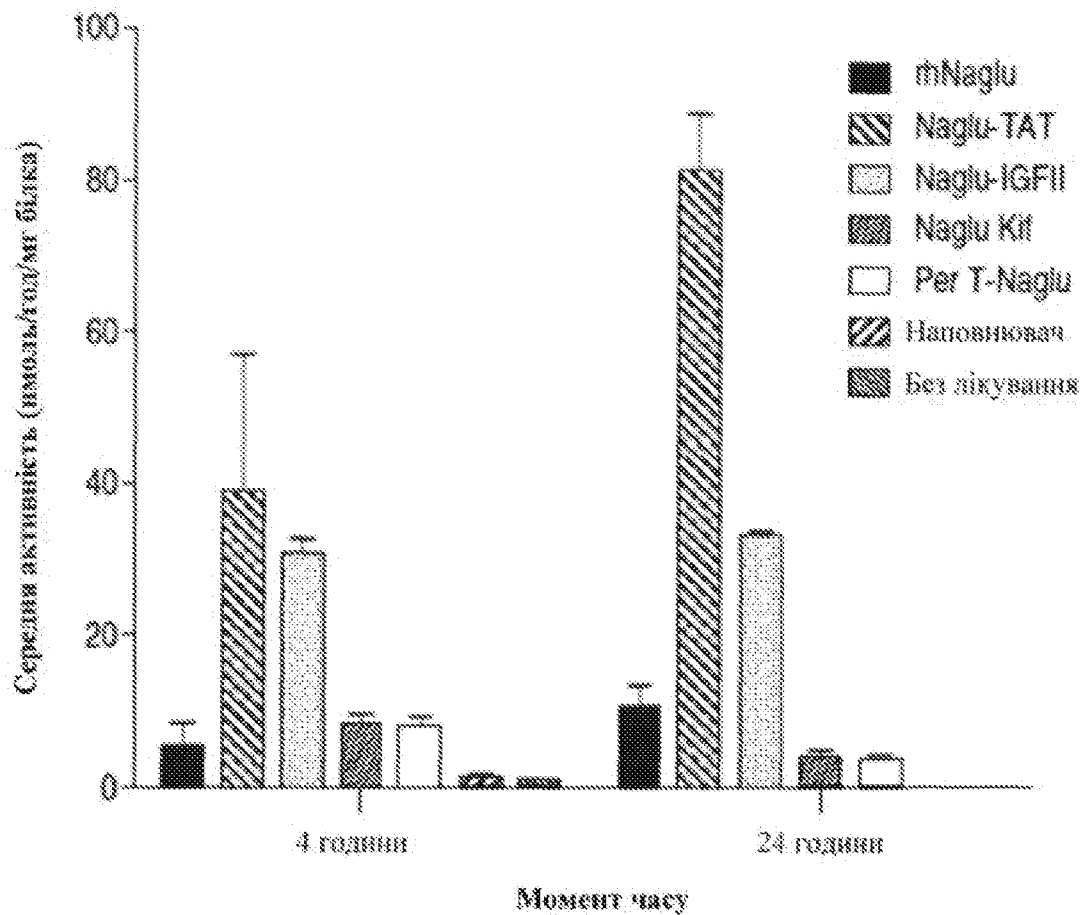
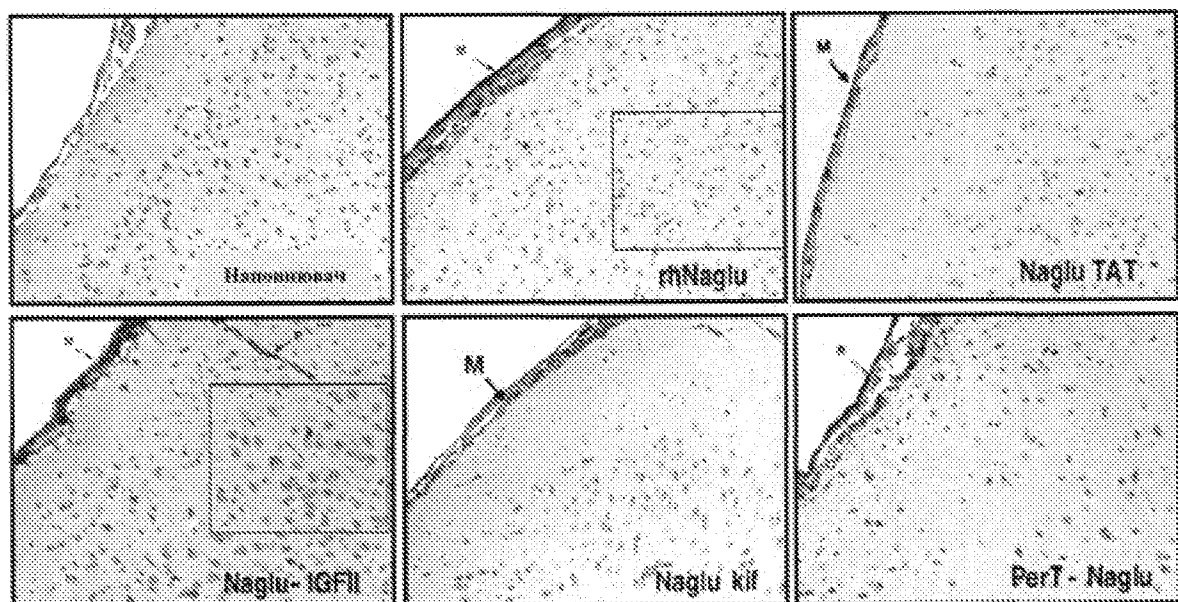


Fig. 174

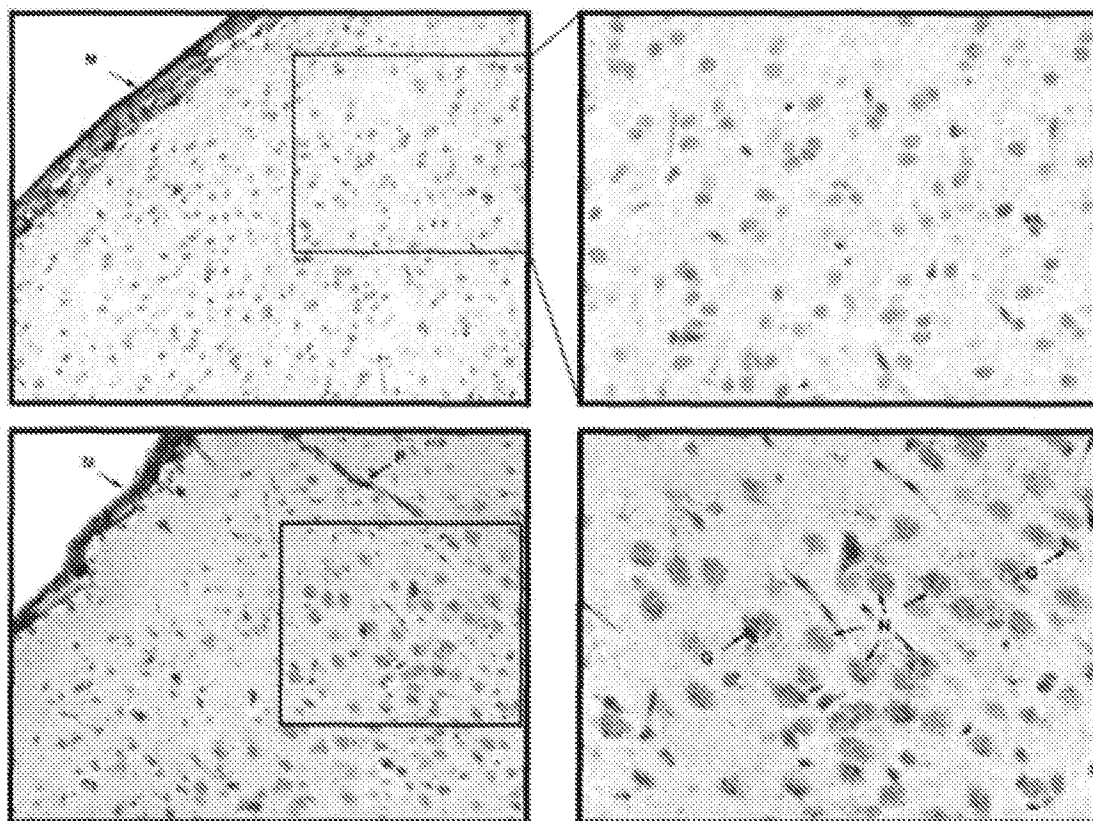


Фіг. 175

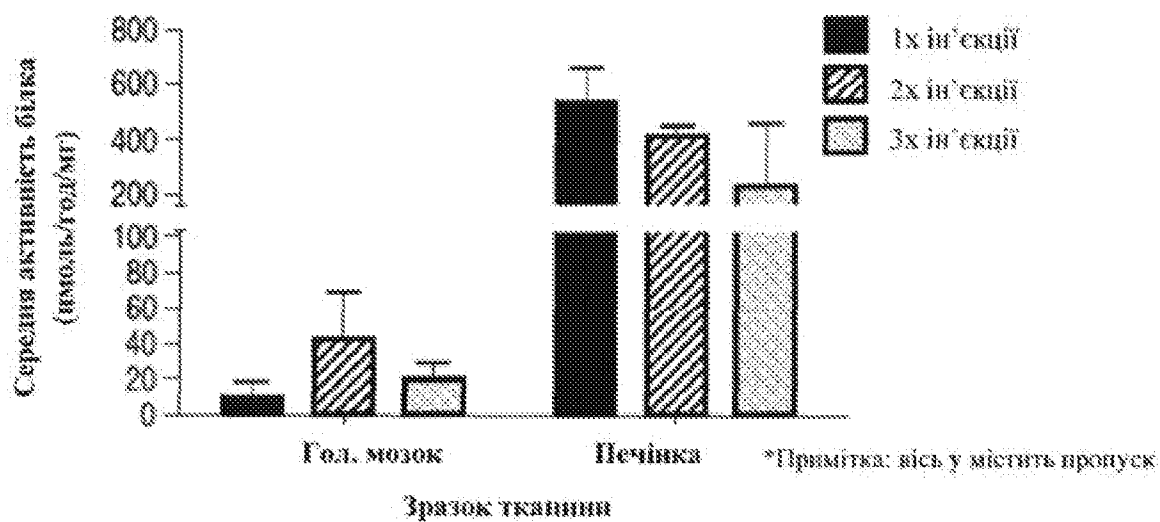
Середня активність Naglu в головному мозку пацієнтів після інтратекального ін'єктування SFB.05.09



Фіг. 176

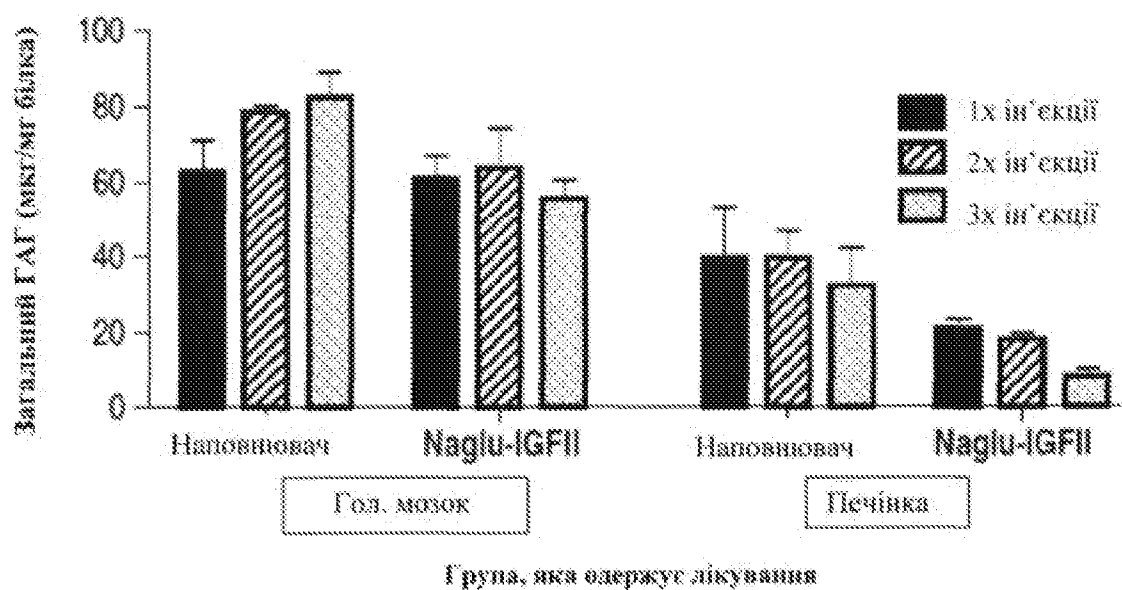


Фіг. 177



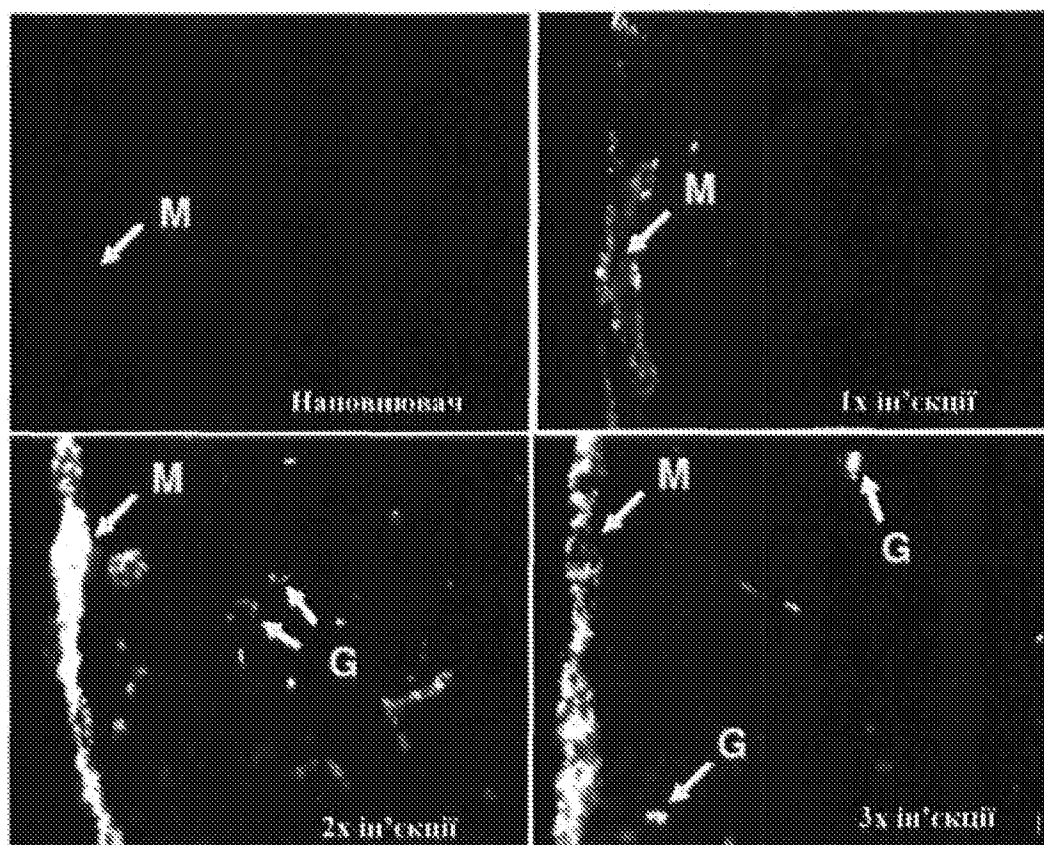
Фіг. 178

Середня активність у Naglu KO мишей після IT-ін'єкцій Naglu-IGFII SFB.02.10

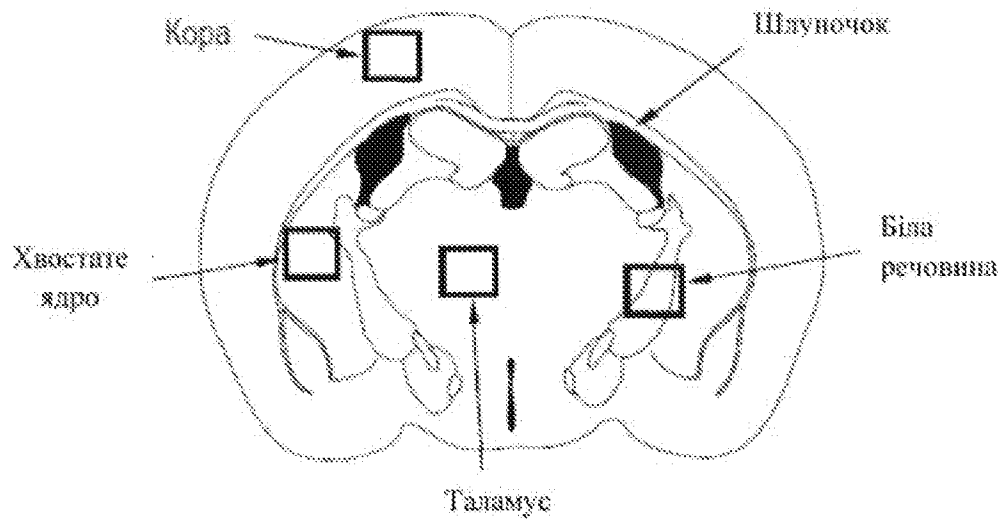


Фіг. 179

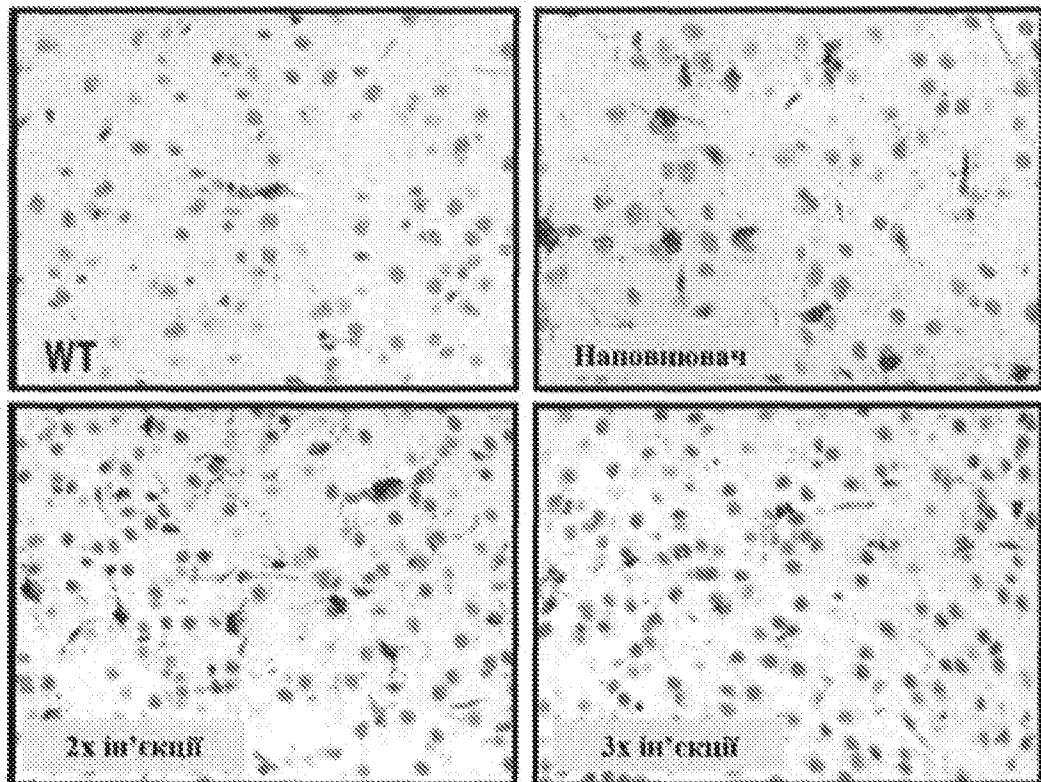
Загальна концентрація ГАГ у Naglu KO мишей після IT-ін'єкцій Naglu-IGFII SFB.02.10



Фіг. 180



Фіг. 181



Фіг. 182

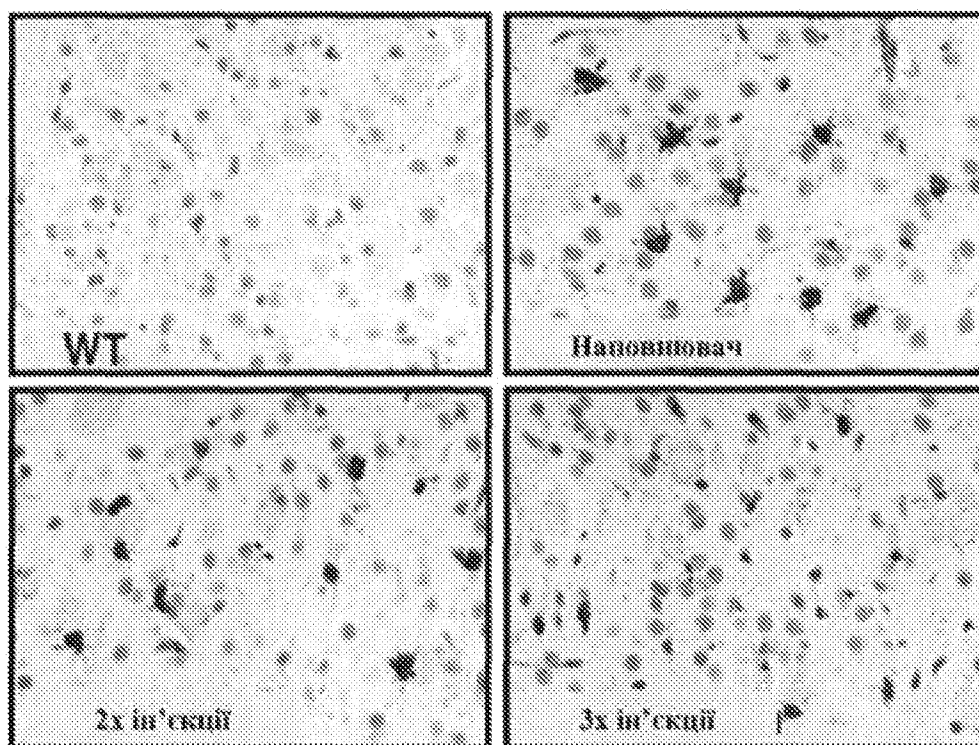


Fig. 183

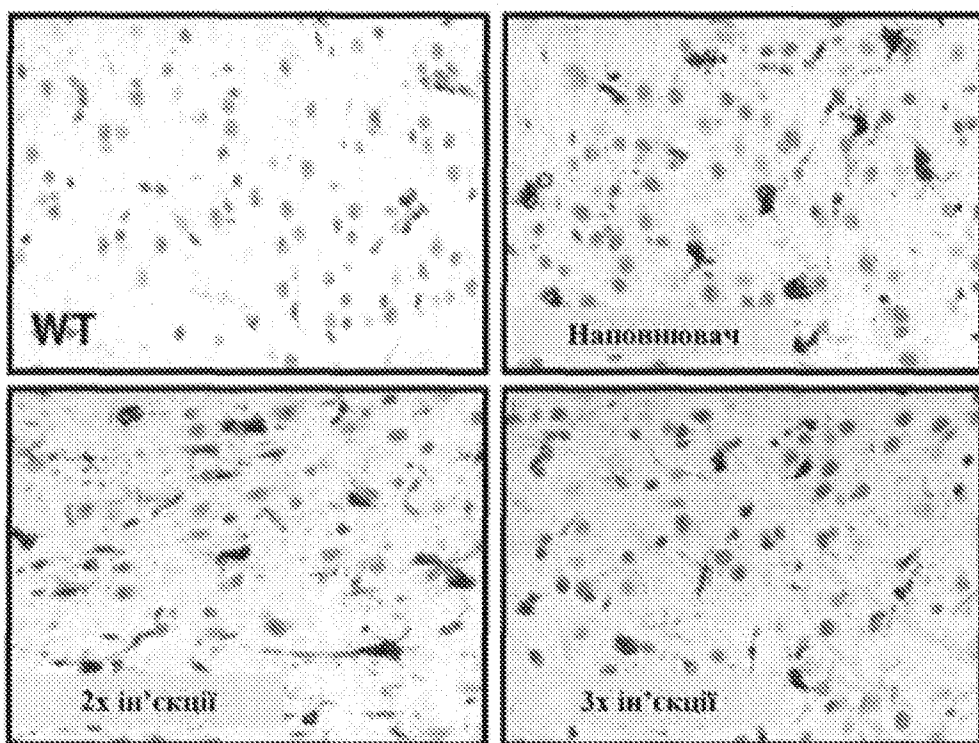
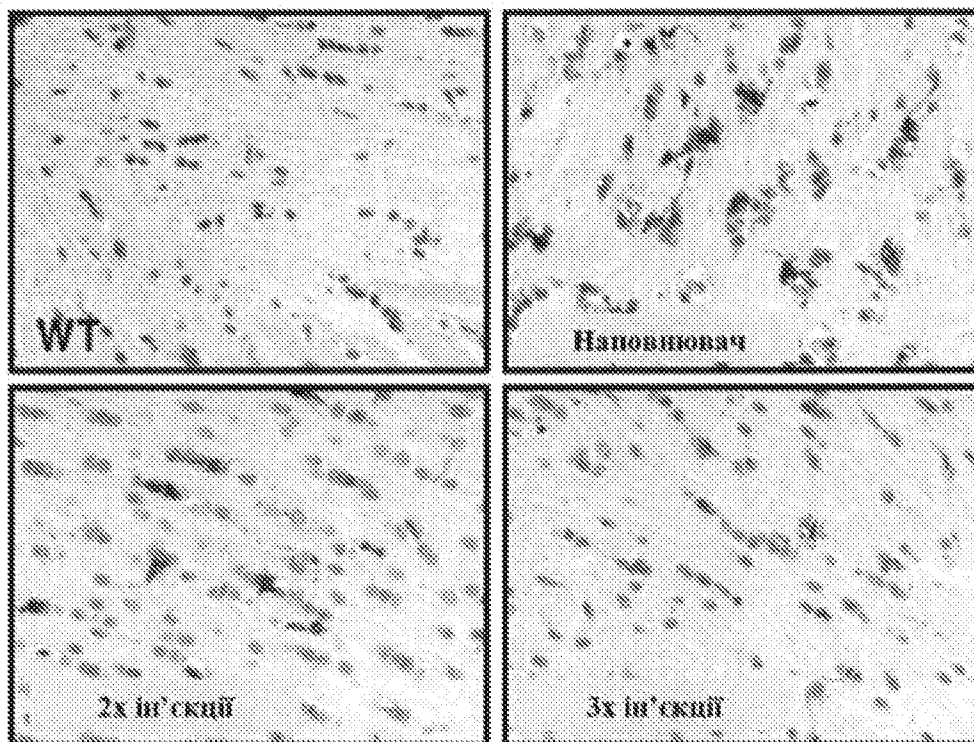
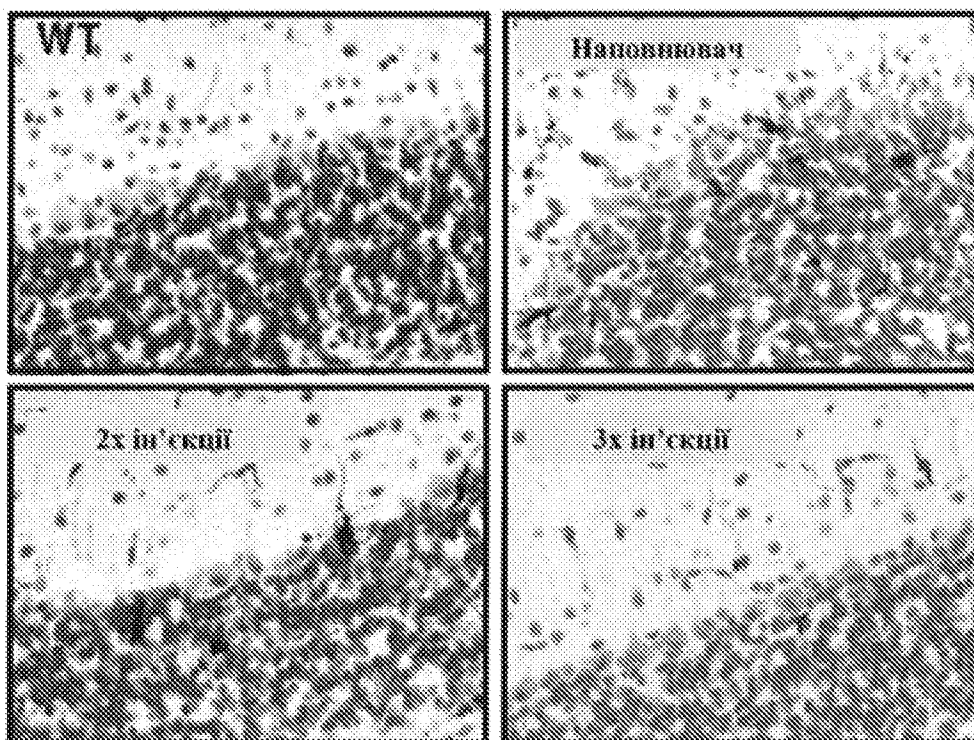


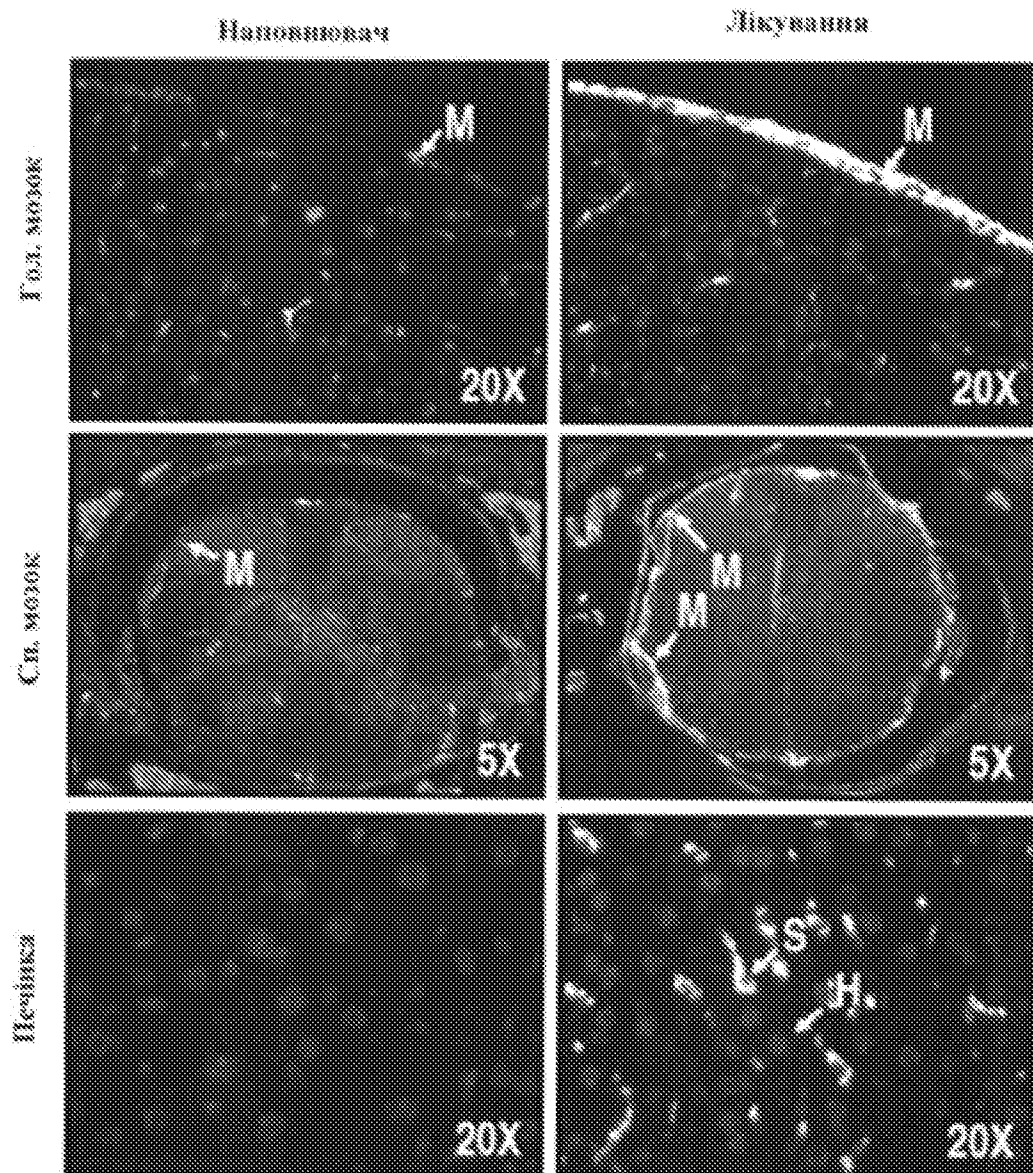
Fig. 184



Фиг. 185



Фиг. 186



Фиг. 187

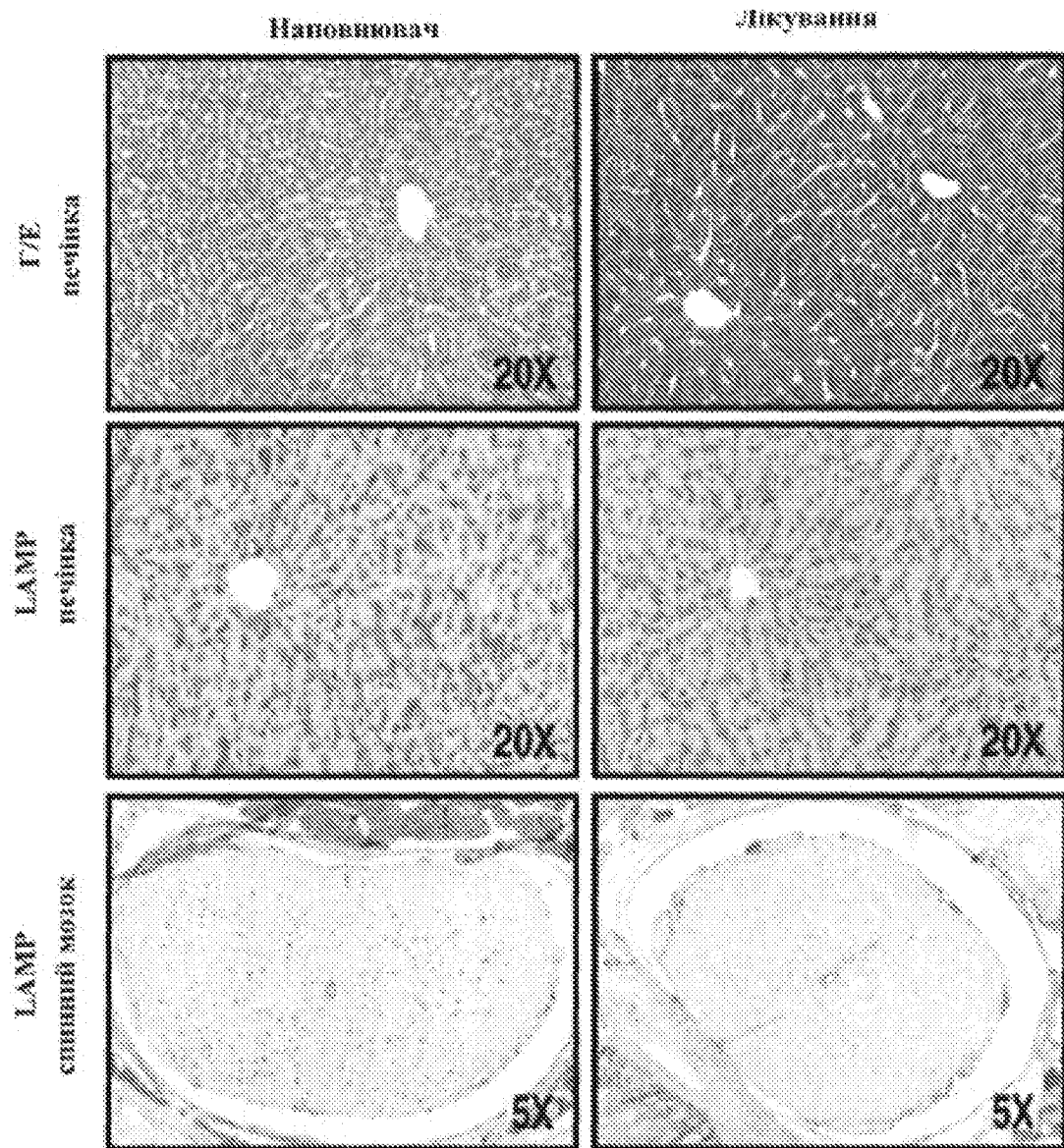
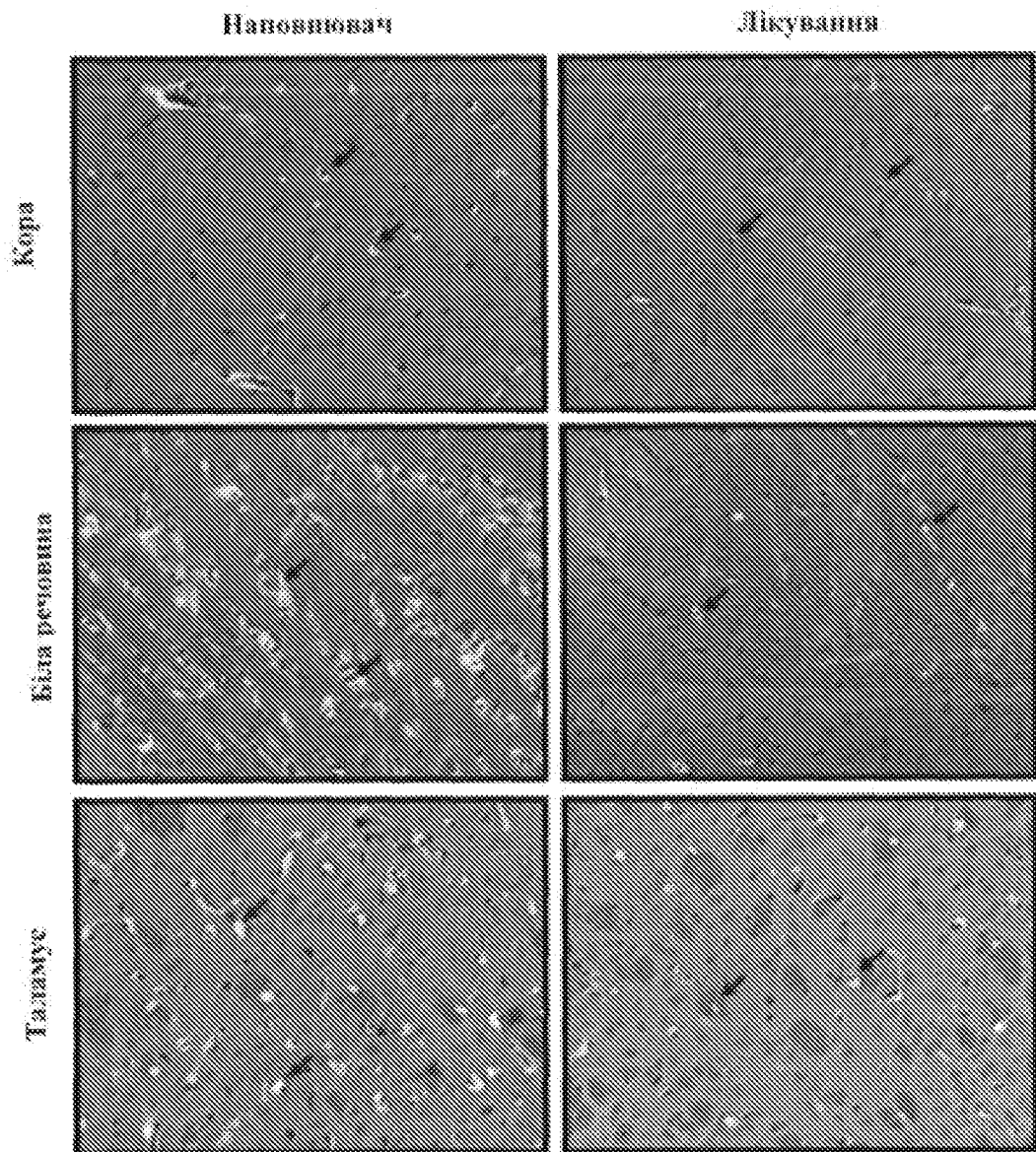


Fig. 188



Фіг. 189А

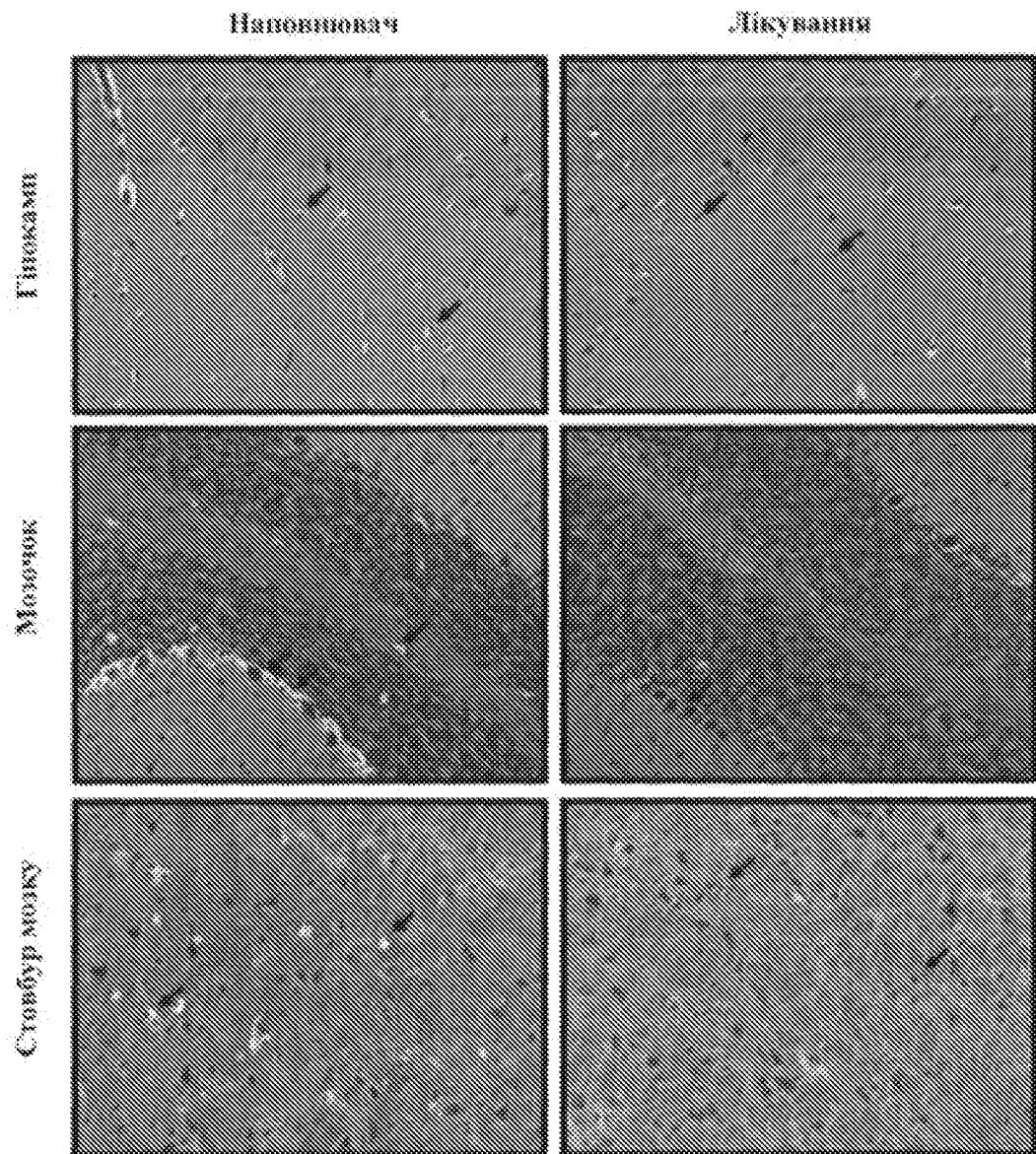


Fig. 189B

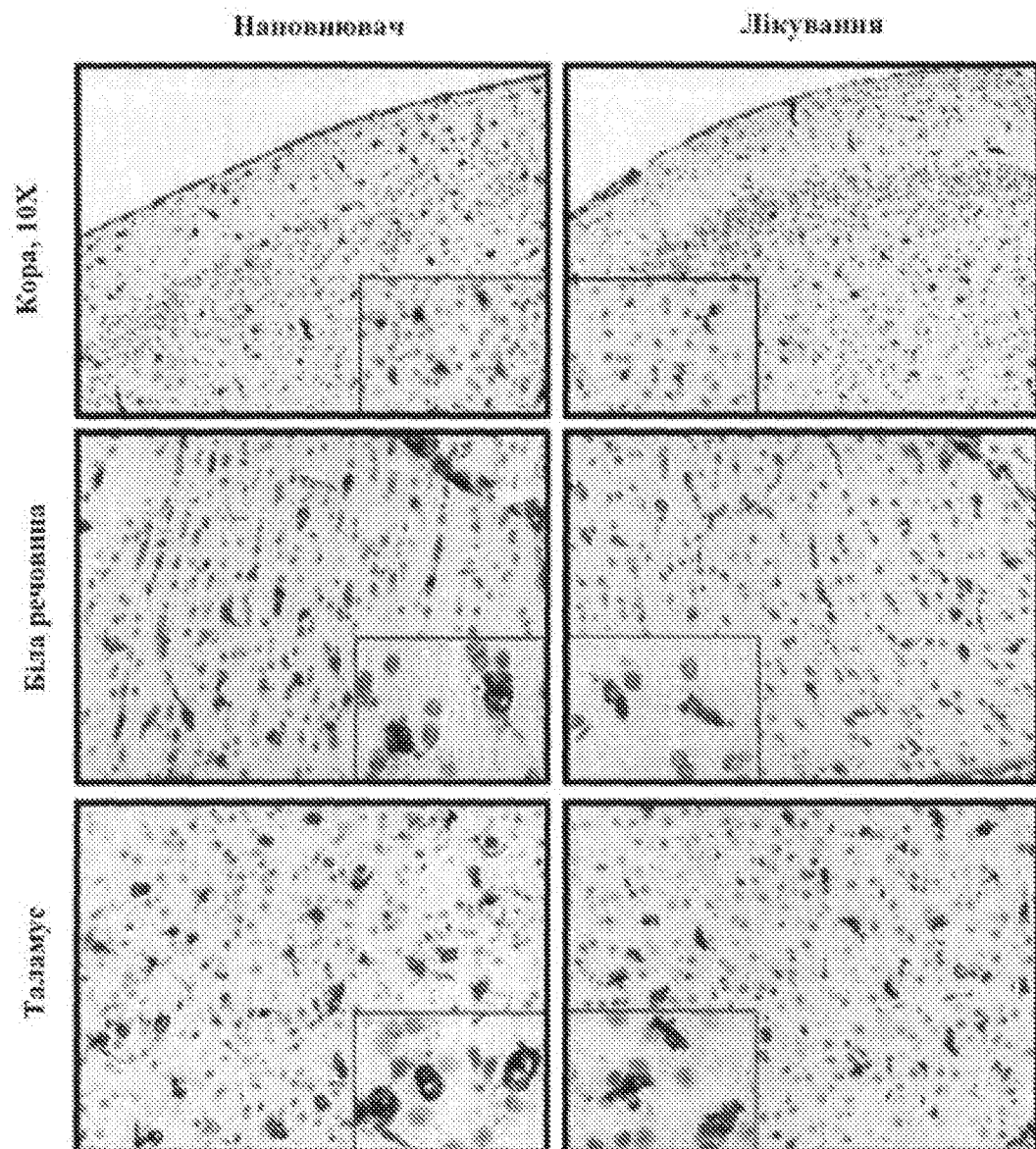
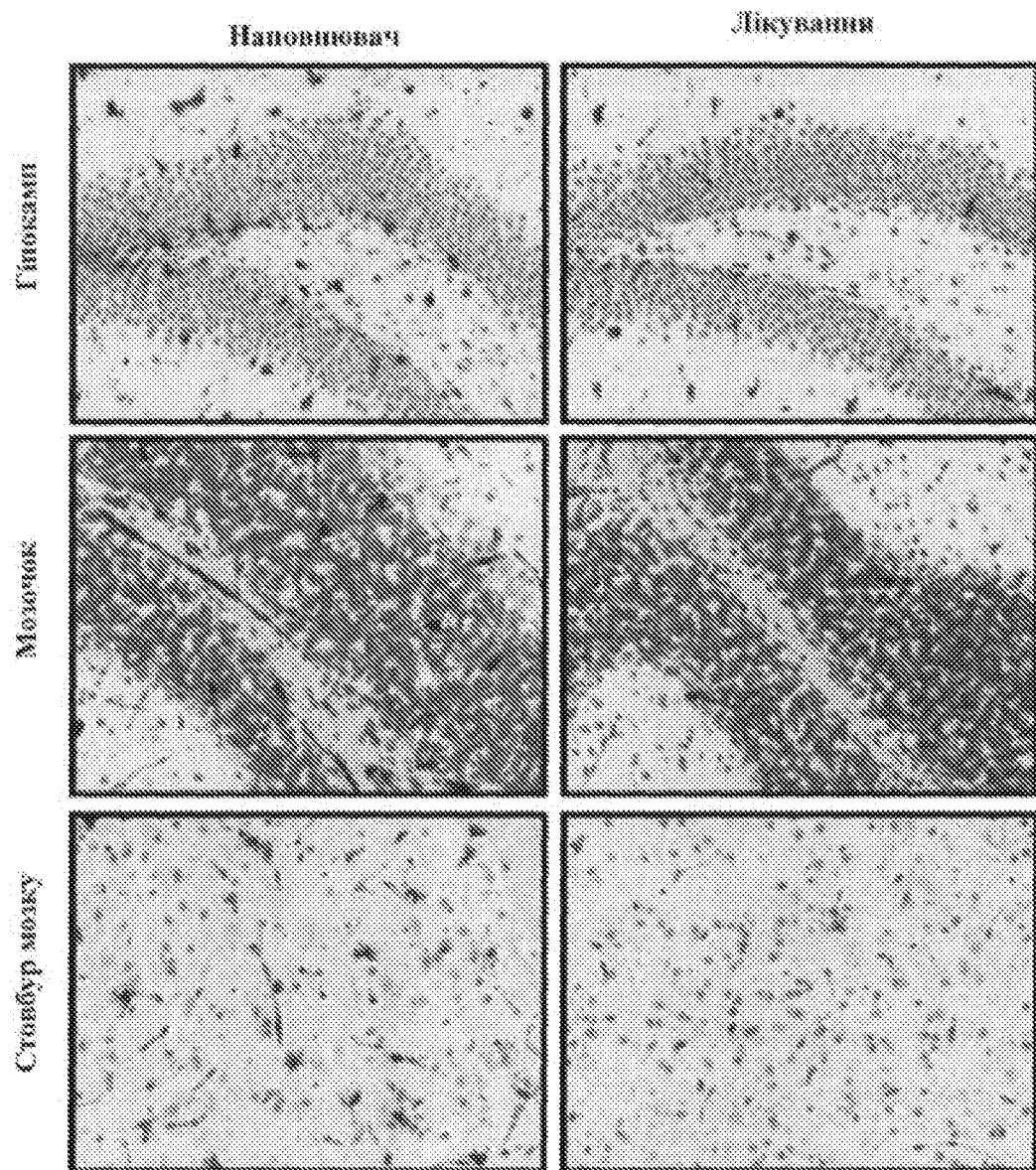
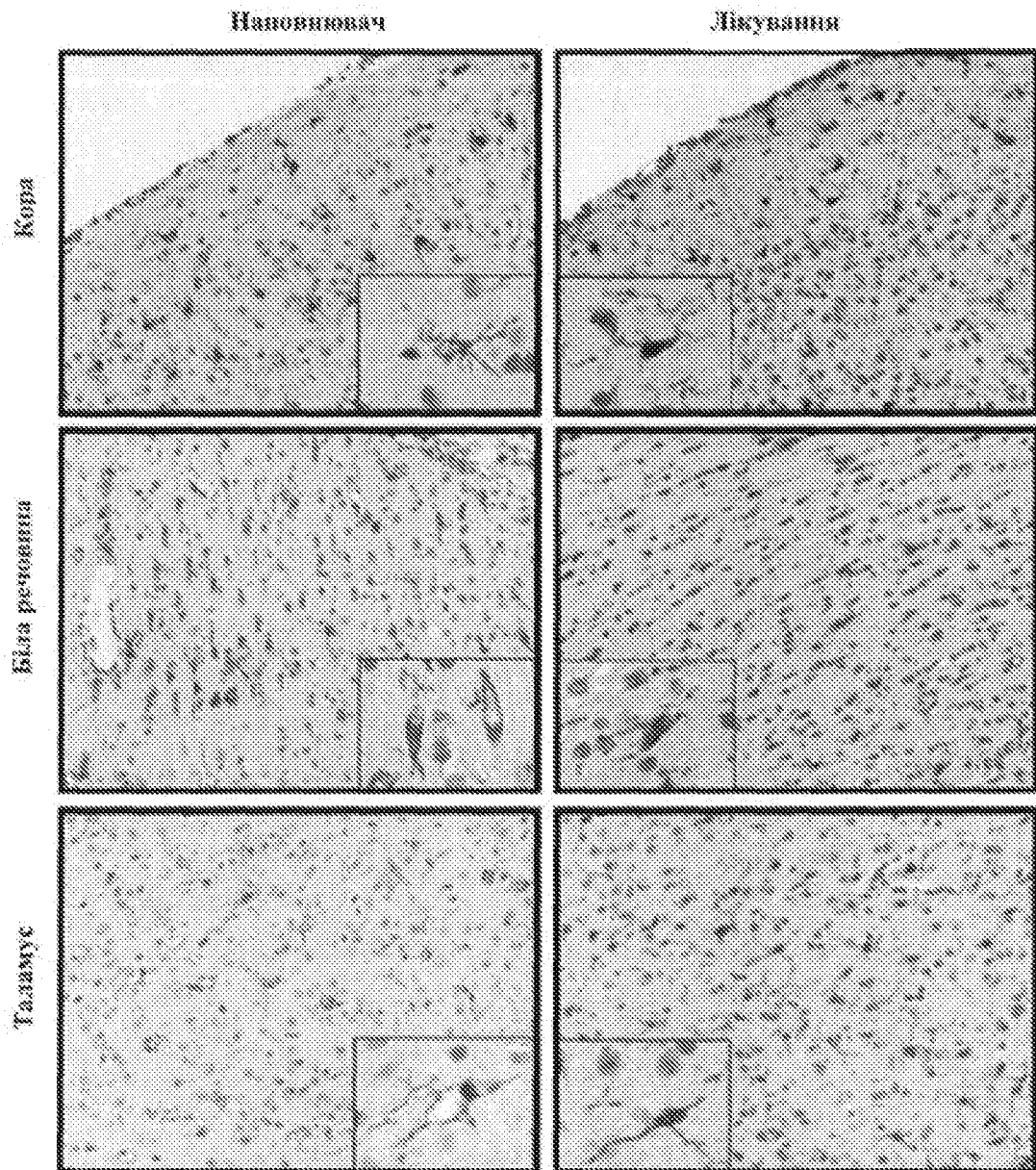


Fig. 190A



Фіг. 190В



Фіг. 191А

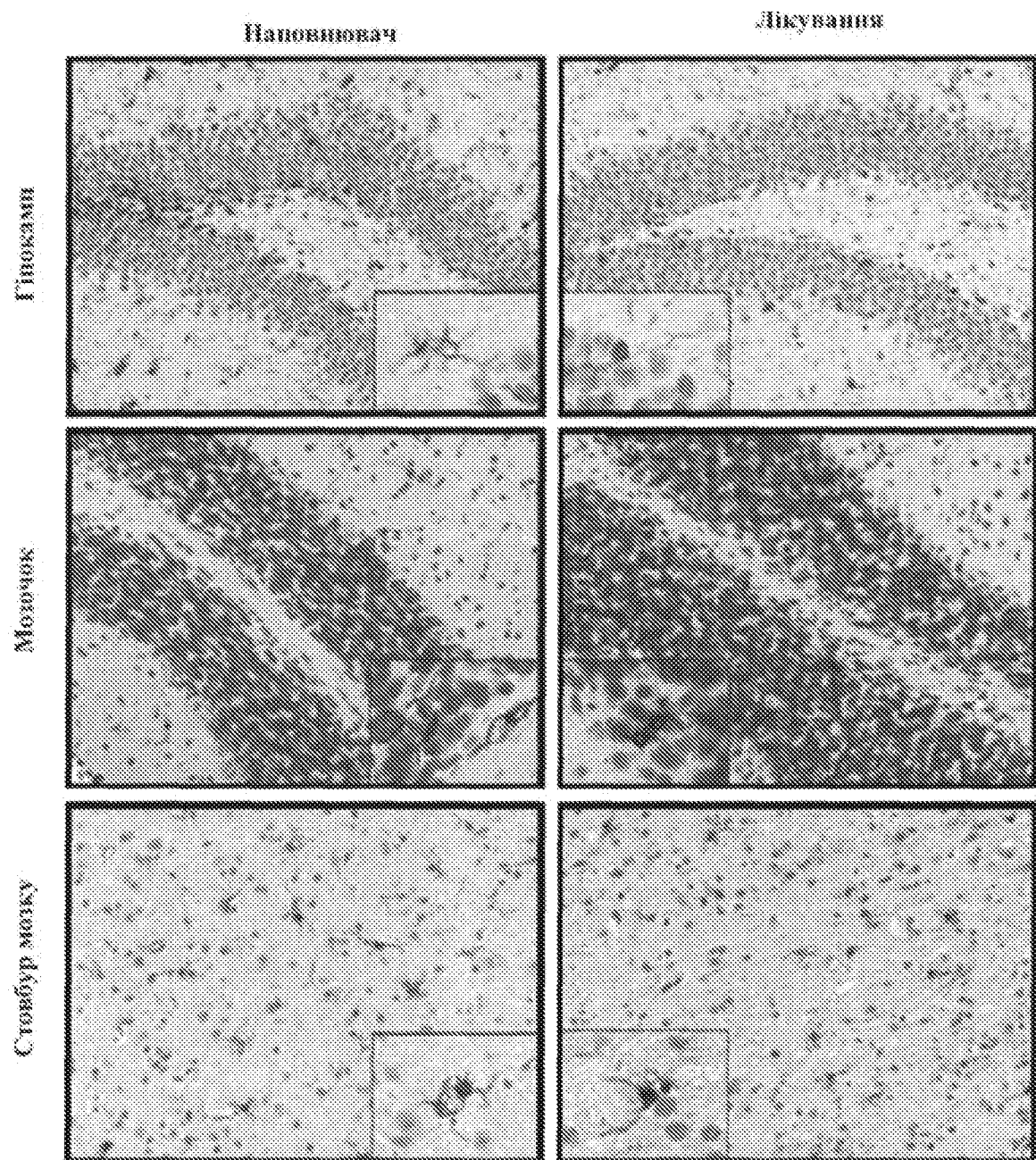
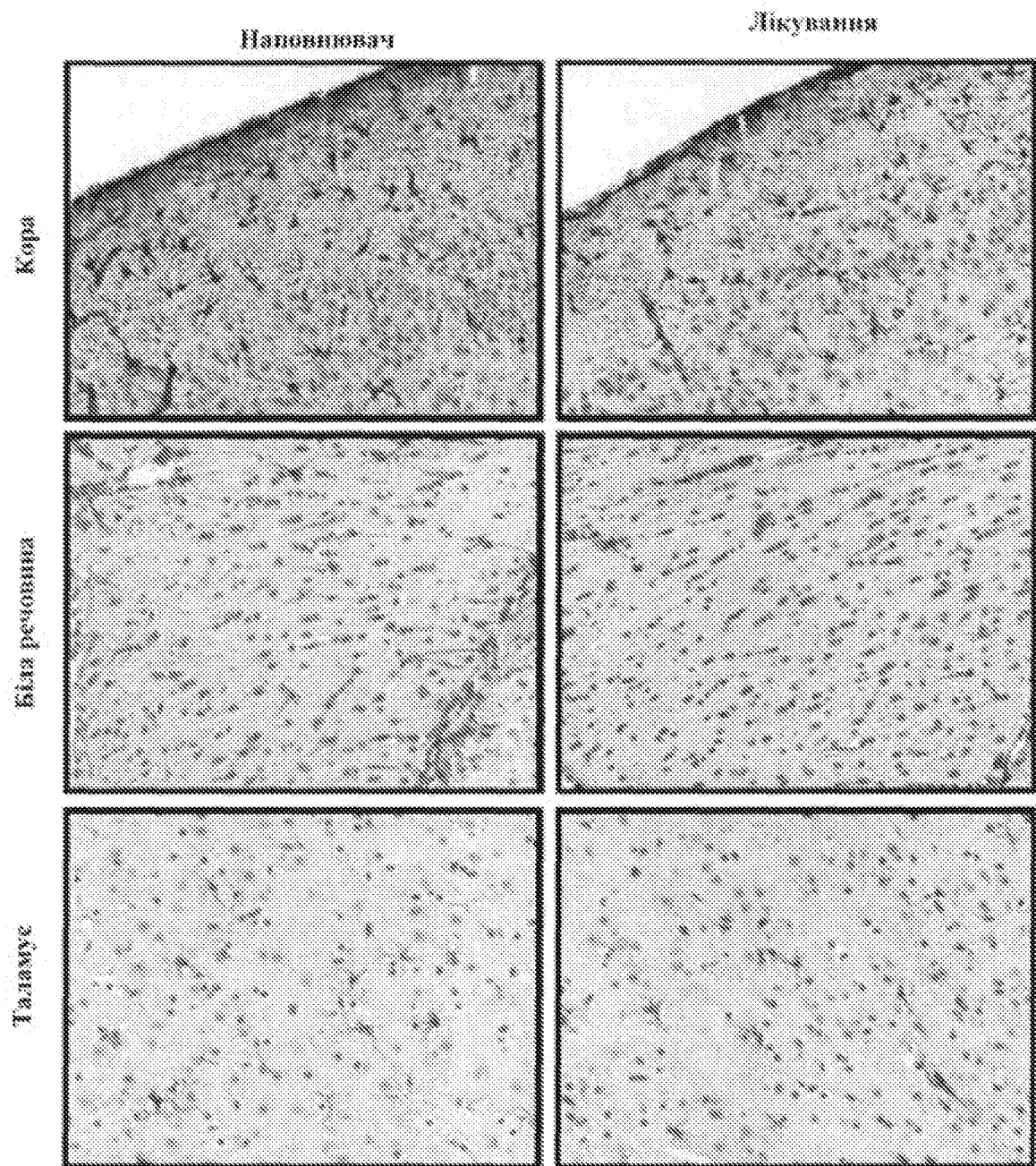
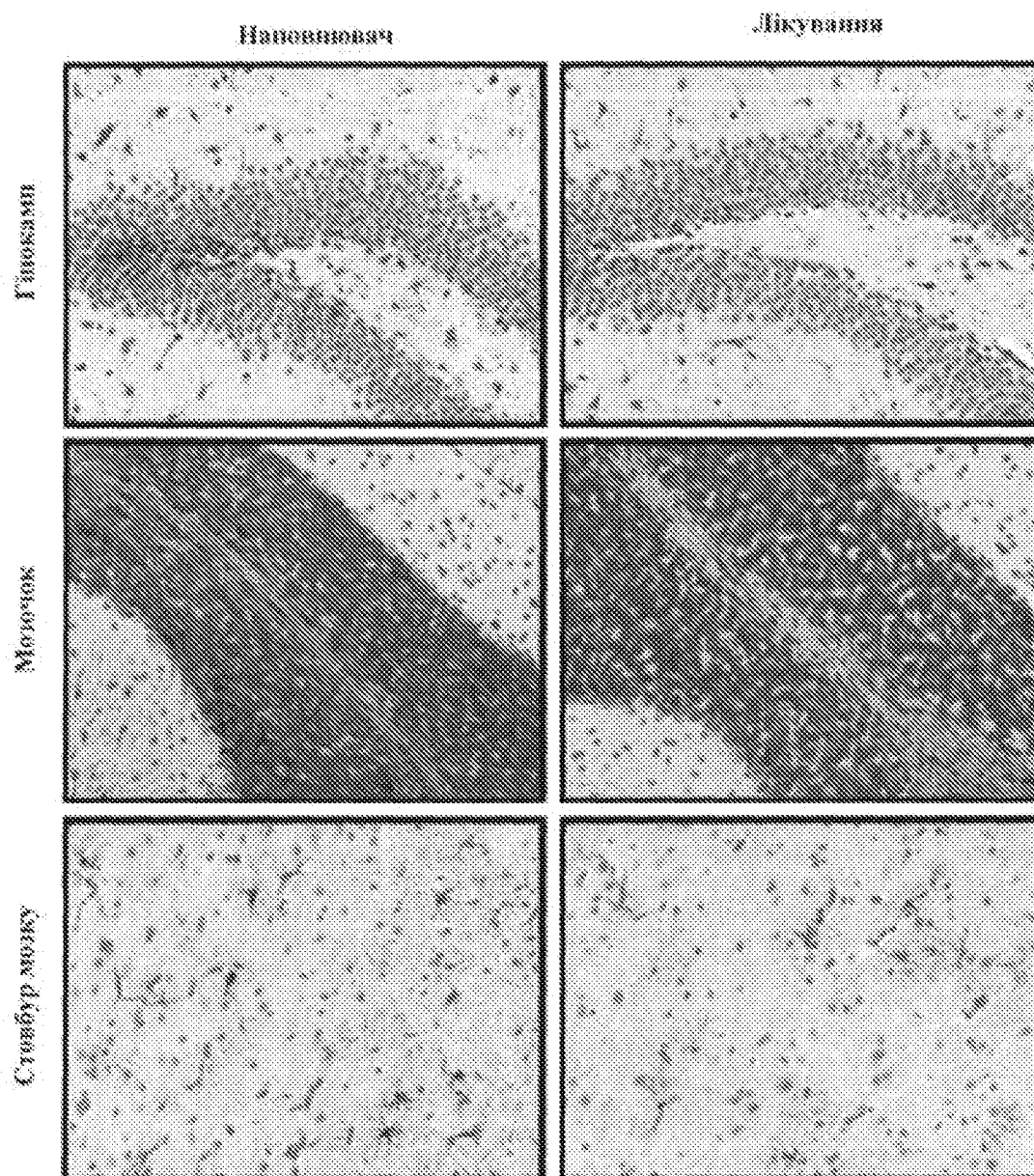


Fig. 191B



Фіг. 192А



Фіг. 192В