(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6797876号
(P6797876)

(45)発行日　令和2年12月9日(2020.12.9)　(24)登録日　令和2年11月20日(2020.11.20)

| (51)Int.Cl. | | F I | | |
|---|---|---|---|---|
| A61K 38/43 | (2006.01) | A61K | 38/43 | ZMD |
| A61K 47/04 | (2006.01) | A61K | 47/04 | |
| A61P 25/00 | (2006.01) | A61P | 25/00 | |
| A61K 47/26 | (2006.01) | A61K | 47/26 | |
| A61K 47/10 | (2006.01) | A61K | 47/10 | |

請求項の数 14　外国語出願　(全 227 頁)

(21)出願番号　特願2018-192589 (P2018-192589)
(22)出願日　平成30年10月11日 (2018.10.11)
(62)分割の表示　特願2017-177784 (P2017-177784)の分割
原出願日　平成23年6月25日 (2011.6.25)
(65)公開番号　特開2019-6826 (P2019-6826A)
(43)公開日　平成31年1月17日 (2019.1.17)
審査請求日　平成30年10月11日 (2018.10.11)
(31)優先権主張番号　61/476,210
(32)優先日　平成23年4月15日 (2011.4.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/387,862
(32)優先日　平成22年9月29日 (2010.9.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国 (US)

(73)特許権者　504396117
シャイアー　ヒューマン　ジェネティック　セラピーズ　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　レキシントン　シャイアー　ウェイ　３００
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田　貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川　大輔
(74)代理人　230113332
弁護士　山本　健策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】治療薬のＣＮＳ送達

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
リソソーム酵素に関する補充酵素である酵素を含む薬学的組成物であって、該組成物は、該リソソーム酵素のレベルまたは活性の減少を伴うリソソーム蓄積症に罹患しているかまたは、これに罹患しやすい対象に髄腔内投与されることを特徴とし、該組成物は、少なくとも１０ｍｇ／ｍｌの濃度の該補充酵素と、２５ｍＭまでのリン酸塩とを含む、薬学的組成物であって、５．５～７．０のｐＨを有する、薬学的組成物。
【請求項２】
前記補充酵素が少なくとも３０ｍｇ／ｍｌの濃度で存在することをさらに特徴とする、請求項１に記載の薬学的組成物。
【請求項３】
前記補充酵素が少なくとも４０ｍｇ／ｍｌの濃度で存在することをさらに特徴とする、請求項１に記載の薬学的組成物。
【請求項４】
前記組成物がさらに界面活性剤を含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の薬学的組成物。
【請求項５】
前記界面活性剤がポリソルベートまたはポロキサマーを含むことをさらに特徴とする、請求項４に記載の薬学的組成物。
【請求項６】

前記ポリソルベートまたはポロキサマーが０．００５％～０．２％の濃度で存在することをさらに特徴とする、請求項５に記載の薬学的組成物。
【請求項７】
前記組成物がさらに等張化剤を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の薬学的組成物。
【請求項８】
前記等張化剤が塩である、請求項７に記載の薬学的組成物。
【請求項９】
前記等張化剤が塩化ナトリウムであり、任意に、該塩化ナトリウムが１３７～１５４ｍＭの濃度で存在する、請求項８に記載の薬学的組成物。
【請求項１０】
前記組成物が５ｍＭまでのリン酸塩を含む、請求項１～９のいずれか一項に記載の薬学的組成物。
【請求項１１】
（ｉ）前記組成物が、５ｍＬ未満もしくは３ｍＬ未満の単回用量体積で投与される；
（ｉｉ）前記組成物の髄腔内投与が、前記対象において実質的な有害な作用を生じない；および／または
（ｉｉｉ）前記組成物の髄腔内投与が、適応Ｔ細胞媒介性免疫応答を生じない、
請求項１～１０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２】
治療有効用量が、
（ｉ）０．００５ｍｇ／脳重量ｋｇ～１００ｍｇ／脳重量ｋｇの範囲である；
（ｉｉ）１ｍｇ／脳重量ｋｇより大きい；
（ｉｉｉ）１０ｍｇ／脳重量ｋｇより大きい；または
（ｉｖ）３０ｍｇ／脳重量ｋｇより大きい、
請求項１１に記載の組成物。
【請求項１３】
前記補充酵素が、
（ｉ）マンノース－６－ホスフェート（Ｍ６Ｐ）残基を含有する；
（ｉｉ）リソソームターゲッティング部分を含む融合タンパク質である；
（ｉｉｉ）ニューロン、グリア細胞、血管周囲細胞および／もしくは髄膜細胞に送達される；ならびに／または
（ｉｖ）脊髄中のニューロンにさらに送達される、
請求項１～１２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１４】
（ｉ）前記リソソーム蓄積症が、ハンター症候群、異染性ジストロフィー（ＭＬＤ）症、サンフィリッポ症候群　Ａ型、サンフィリッポ症候群　Ｂ型およびグロボイド細胞白質ジストロフィー（ＧＬＤ）症からなる群より選択され、任意に、前記補充酵素が、組換えイズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）、アリールスルファターゼ　Ａ（ＡＳＡ）、ヘパランＮ－スルファターゼ（ＨＮＳ）、アルファ－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼ（Ｎａｇｌｕ）およびβ－ガラクトシダーゼ（ＧＬＣ）からなる群より選択される；または
（ｉｉ）前記リソソーム蓄積症が、アスパルチルグルコサミン尿症、コレステロールエステル蓄積症、ウォルマン病、シスチン症、ダノン病、ファブリー病、ファーバー脂肪肉芽腫症、ファーバー病、フコシドーシス、ガラクトシアリドーシス　Ｉ／ＩＩ型、ゴーシェ病　Ｉ／ＩＩ／ＩＩＩ型、グロボイド細胞白質ジストロフィー症、クラッベ病、糖原病ＩＩ型、ポンペ病、ＧＭ１－ガングリオシドーシス　Ｉ／ＩＩ／ＩＩＩ型、ＧＭ２－ガングリオシドーシス　Ｉ型、テイ・サックス病、ＧＭ２－ガングリオシドーシス　ＩＩ型、サンドホッフ病、ＧＭ２－ガングリオシドーシス、α－マンノーシドーシス　Ｉ／ＩＩ型、β－マンノーシドーシス、異染性白質ジストロフィー症、ムコリピドーシス　Ｉ型、シアリドーシス　Ｉ／ＩＩ型、ムコリピドーシス　ＩＩ／ＩＩＩ型、Ｉ－細胞病、ムコリピ

ドーシス　ＩＩＩＣ型、偽性ハーラーポリジストロフィー、ムコ多糖症　Ｉ型、ムコ多糖症ＩＩ型、ハンター症候群、ムコ多糖症　ＩＩＩＡ型、サンフィリッポ症候群　Ａ、ＢまたはＣ型、ムコ多糖症　ＩＩＩＢ型、ムコ多糖症　ＩＩＩＣ型、ムコ多糖症　ＩＩＩＤ型、ムコ多糖症　ＩＶＡ型、モルキオ症候群、ムコ多糖症　ＩＶＢ型、ムコ多糖症　ＶＩ型、ムコ多糖症　ＶＩＩ型、スライ症候群、ムコ多糖症　ＩＸ型、多重スルファターゼ欠乏症、ニューロンセロイド脂褐素沈着症、ＣＬＮ１バッテン病、ＣＬＮ２バッテン病、ニーマン・ピック病　Ａ／Ｂ型、ニーマン・ピック病　Ｃ１型、ニーマン・ピック病　Ｃ２型、濃化異骨症、シンドラー病　Ｉ／ＩＩ型、ゴーシェ病およびシアル酸蓄積症からなる群より選択される；ならびに／または

（ｉｉｉ）前記リソソーム蓄積症が末梢症状を伴い、前記補充酵素が前記対象に髄腔内および静脈内の両方で投与され、任意に、該静脈内投与が、月１回投与以下の頻度であることを特徴とする；または

（ｉｖ）前記リソソーム蓄積症が末梢症状を伴い、かつ前記補充酵素が前記対象に髄腔内投与され、静脈内投与されないことを特徴とする、

請求項１～１３のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

（関連出願の相互参照）

本願は、米国特許仮出願第６１／３５８，８５７号（２０１０年６月２５日出願）；第６１／３６０，７８６号（２０１０年７月１日出願）；第６１／３８７，８６２号（２０１０年９月２９日出願）；第６１／４３５，７１０号（２０１１年１月２４日出願）；第６１／４４２，１１５号（２０１１年２月１１日出願）；６１／４７６，２１０号（２０１１年４月１５日出願）；および第６１／４９５，２６８号（２０１１年６月９日出願）に対する優先権を主張し、これらの記載内容は各々、参照により本明細書中に援用される。本願は、米国特許出願　表題「ヘパランＮ－スルファターゼのＣＮＳ送達のための方法および組成物」（同日出願）；「イズロン酸スルファターゼのＣＮＳ送達のための方法および組成物」（同日出願）；「β－ガラクトセレブロシダーゼのＣＮＳ送達のための方法および組成物」（同日出願）；「アリールスルファターゼＡのＣＮＳ送達のための方法および組成物」（同日出願）；ならびに「サンフィリッポ症候群Ｂ型の処置」（同日出願）に関連し、これらの記載内容は各々、参照により本明細書中に援用される。

【０００２】

酵素補充療法（ＥＲＴ）は、対象への天然または組換え的に得られるタンパク質および／または酵素の全身投与を伴う。認可療法は、典型的には、対象に静脈内投与され、一般的には、根元的酵素欠乏の身体症候を処置するのに有効である。中枢神経系（ＣＮＳ）の細胞および組織中への静脈内投与タンパク質および／または酵素の限定的分布の結果として、静脈内投与タンパク質および／または酵素は血液－脳関門（ＢＢＢ）を適切に横断しないため、ＣＮＳ病因を有する疾患の処置は特に挑戦的であった。

【０００３】

血液－脳関門（ＢＢＢ）は、ＢＢＢを横切って、根元的脳脊髄液（ＣＳＦ）およびＣＮＳ中に、血流中の有害物質、例えば細菌、高分子物質（例えばタンパク質）およびその他の親水性分子が分散するのを制限することにより、このような物質から中枢神経系（ＣＮＳ）を保護するよう機能する内皮細胞からなる構造系である。

【背景技術】

【０００４】

直接脳内注射、ＢＢＢの一過性透過処理ならびに組織分布を変更するための活性作用物質の改質を含めて、治療薬の脳送達を増強するためにＢＢＢを迂回するいくつかの方法がある。脳組織中への治療薬の直接注射は血管系を完全に迂回するが、しかし、頭蓋内注射により背負い込まれる合併症（感染、組織損傷、免疫応答性）、ならびに投与部位からの活性作用物質の不十分な拡散の危険を主に蒙る。今までのところ、脳物質中へのタンパク

質の直接投与は、拡散バリアおよび投与され得る治療薬の用量限定のため、有意の治療効果を達成していない。緩徐長期注入を用いた脳実質中に配置されるカテーテルによる対流拡散（Ｂｏｂｏ，ｅｔａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ９１，２０７６－２０８０（１９９４）；Ｎｇｕｙｅｎ，ｅｔａｌ．Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｕｒｇ．９８，５８４－５９０（２００３））が研究されてきたが、しかし長期療法のためにこのアプローチを一般に用いる認可療法はない。さらに、脳内カテーテルの配置は、非常に侵襲性であり、臨床的代替法として余り望ましくない。

【０００５】

髄腔内（ＩＴ）注射または脳脊髄液（ＣＳＦ）へのタンパク質の投与も試みられてきたが、しかし未だに治療的成功を見ていない。この処置における大きな挑戦は、脳室の上衣内張りを非常に堅く結合する活性作用物質の傾向であって、これがその後の拡散を妨げた。一般に、ＣＳＦへの直接的投与による脳遺伝子疾患の処置のための認可物質はない。実際、脳の表面での拡散に対するバリア、ならびに有効且つ便利な送達方法の欠如は、任意の疾患に関する脳における適切な治療効果を達成するには大きすぎる障害物である、と多くの人々が考えていた。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００６】

【非特許文献１】Ｂｏｂｏ，ｅｔａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ９１，２０７６－２０８０（１９９４）

【非特許文献２】Ｎｇｕｙｅｎ，ｅｔａｌ．Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｕｒｇ．９８，５８４－５９０（２００３）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

多数のリソソーム蓄積障害は神経系に影響を及ぼし、したがって伝統的療法でこれらの疾患を処置するに際して独特の挑戦を実証する。罹患個体のニューロンおよび髄膜において、グリコサミノグリカン（ＧＡＣ）の大きな蓄積がしばしば認められ、種々の型のＣＮＳ症候を生じさせる。今までのところ、リソソーム障害に起因するＣＮＳ症候は、利用可能な任意の手段により首尾よく処置されてきた。

【０００８】

したがって、脳に治療薬を有効に送達する必要性が依然として大いに存在する。さらに特定的には、リソソーム蓄積障害の処置のために中枢神経系に活性作用物質をより有効に送達することが大いに必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

本発明は、中枢神経系（ＣＮＳ）への治療薬の直接送達のための有効且つ低侵襲性のアプローチを提供する。本発明は、一部は、酵素が種々の表面を横断して有効に且つ広範に拡散して、深部脳領域を含めて脳を横断する種々の領域に浸透するよう、リソソーム蓄積症のための補充酵素が高濃度（例えば、約３ｍｇ／ｍｇ以上、４ｍｇ／ｍｌ、５ｍｇ／ｍｌ、１０ｍｇ／ｍｌ以上）での治療を必要とする対象の脳脊髄液（ＣＳＦ）中に直接的に導入され得る、という予期せぬ発見に基づいている。さらに意外なことに、単なる生理食塩水または緩衝液ベースの処方物を用いて、そして対象において実質的な有害作用、例えば重篤な免疫応答を誘導することなく、このような高タンパク質濃度送達が達成され得る、ということを本発明人等は実証した。したがって、本発明は、ＣＮＳ構成成分を有する種々の疾患および障害、特にリソソーム蓄積症の処置のための直接ＣＮＳ送達のための非常に効率的で臨床的に望ましく、且つ患者に優しいアプローチを提供する。本発明は、ＣＮＳターゲッティングおよび酵素補充療法の分野における有意の進歩を示す。

【００１０】

特に、本発明は、治療を必要とする対象への治療薬（例えば、補充酵素）の髄腔内（ＩＴ）投与の方法を提供する。いくつかの実施形態では、補充酵素は、組換え、遺伝子活性化または天然酵素であり得る。本明細書中で用いる場合、「髄腔内投与」、「髄腔内注射」、「髄腔内送達」という用語または文法的等価用語は、脊柱管（脊髄周囲のクモ膜内空隙）への注射を指す。いくつかの実施形態では、本発明による「髄腔内投与」または「髄腔内送達」は、腰椎区域または領域を介したＩＴ投与または送達、すなわち腰椎ＩＴ投与または送達を指す。本明細書中で用いる場合、「腰部領域」または「腰椎区域」という用語は、第三および第四腰椎（下方背部）間の区域、さらに包括的には、脊椎のＬ２～Ｓ１領域を指す。腰椎ＩＴ投与または送達は、われわれの発明による腰椎ＩＴ投与または送達は、遠位脊椎管へのより良好な且つより有効な送達を提供するが、一方、大槽送達は、特に、典型的には遠位脊椎管に良好に送達しない、という点で、大槽送達（すなわち、頭蓋骨と脊椎との間の開口部を経て小脳の周囲および下の空隙を介した注射）より優れた差異を表す、ということが意図される。

【００１１】

一態様において、本発明は、約５ｍｇ／ｍｌ超（例えば６ｍｇ／ｍｌ、７ｍｇ／ｍｌ、８ｍｇ／ｍｌ、９ｍｇ／ｍｌ、１０ｍｇ／ｍｌ、１５ｍｇ／ｍｌ、２０ｍｇ／ｍｌ、２５ｍｇ／ｍｌ、３０ｍｇ／ｍｌ、４０ｍｇ／ｍｌ、５０ｍｇ／ｍｌ、７５ｍｇ／ｍｌまたは１００ｍｇ／ｍｌ超）の濃度でリソソーム酵素に関する補充酵素を含む組成物を、リソソーム酵素のレベルまたは活性の減少を伴うリソソーム蓄積症に罹患しているかまたは、これに罹患しやすい対象に髄腔内投与するステップを含む方法を提供する。

【００１２】

いくつかの実施形態では、組成物はさらに、（ｉ）緩衝剤、（ｉｉ）界面活性剤、または（ｉｉｉ）等張化剤のうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、約３．０～８．０（例えば、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または５．５～６．５）のｐＨを有する。いくつかの実施形態では、組成物は、合成ＣＳＦでない処方物中に補充酵素を含む。

【００１３】

いくつかの実施形態では、組成物は、約１５ｍＬ未満（例えば、１０ｍｌ、９ｍｌ、８ｍｌ、７ｍｌ、６ｍｌ、５ｍｌ、４ｍｌ、３ｍｌ、２ｍｌ、１．５ｍｌ、１．０ｍｌまたは０．５ｍｌ未満）の単回用量体積で投与される。

【００１４】

いくつかの実施形態では、組成物の髄腔内投与は、対象において実質的な有害作用を生じない。ある実施形態では、組成物の髄腔内投与は、適応Ｔ細胞媒介性免疫応答を生じない。

【００１５】

さらに別の態様では、本発明は、リソソーム酵素に関する補充酵素を含む組成物を、リソソーム酵素のレベルまたは活性の減少を伴うリソソーム蓄積症に罹患しているかまたは、これに罹患しやすい対象に投与するステップを含む方法であって、投与が、同時的免疫抑制薬療法の非存在下での組成物の髄腔内投与を含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、当該方法は、治療されている対象における免疫寛容を伴わない。ある実施形態では、当該方法は、Ｔ細胞免疫抑制薬を用いた対象の前治療または前処置を伴わない。

【００１６】

さらなる一態様では、本発明は、脳、脊髄および末梢器官の１つ以上の組織中のリソソーム酵素の正常レベルまたは活性の少なくとも約１０％（例えば、少なくとも約１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％または９５％）が達成される治療有効量および投与間隔でリソソーム酵素に関する補充酵素を含む組成物を、リソソーム酵素のレベルまたは活性の減少を伴うリソソーム蓄積症に罹患しているかまたは、これに罹患しやすい対象に髄腔内投与するステップを含む方法を提供する。

【００１７】
いくつかの実施形態では、酵素が送達される脳の１つ以上の組織は髄膜組織を含む。いくつかの実施形態では、髄膜組織は、軟膜組織、硬膜組織およびクモ膜組織からなる群より選択される。
【００１８】
いくつかの実施形態では、酵素が送達される脳の１つ以上の組織は、大脳の組織を含む。ある実施形態では、大脳の組織は、大脳の表面組織または浅部組織である。ある実施形態では、大脳の表面組織または浅部組織は、軟膜組織、大脳皮質リボン組織、海馬、大脳表面の表面から４ｍｍ以内の組織、フィルヒョー・ロバン腔隙、ＶＲ腔隙内の血管、海馬、脳の下面の視床下部の部分、視神経および視索、嗅球および嗅突起ならびにその組合せからなる群より選択される。
【００１９】
いくつかの実施形態では、酵素が送達される大脳の組織は、大脳の深在組織である。ある実施形態では、大脳の深在組織は、大脳皮質リボンに内在する組織、大脳表面の表面から４ｍｍよりも下の組織、大脳表面の表面から６ｍｍよりも下の組織、大脳表面の表面から１０ｍｍよりも下の組織、間脳、視床下部、視床、腹側視床および視床腹部、後脳、大脳脚、赤核、第三脳神経核、深部灰白質、レンズ核、基底核、尾状核、被核、扁桃、淡蒼球、ならびにその組合せからなる群より選択される。
【００２０】
いくつかの実施形態では、酵素が送達される脳の１つ以上の組織は、小脳の組織を含む。ある実施形態では、小脳の組織は、分子層の組織、プルキンエ細胞層の組織、顆粒細胞層の組織、小脳脚およびその組合せからなる群より選択される。いくつかの実施形態では、小脳の組織は、小脳の深部組織である。ある実施形態では、小脳の深部組織は、プルキンエ細胞層の組織、顆粒細胞層の組織、深部小脳白質組織および深部小脳核組織からなる群より選択される。
【００２１】
いくつかの実施形態では、酵素が送達される脳の１つ以上の組織は、脳幹の組織を含む。ある実施形態では、脳幹の組織は、脳幹白質組織および／または脳幹核組織からなる群より選択される。
【００２２】
いくつかの実施形態では、酵素が送達される脊髄の１つ以上の組織は、脊髄の表面組織または浅部組織である。ある実施形態では、脊髄の表面組織または浅部組織は、軟膜、白質路、ならびに脊髄表面の表面から４ｍｍ以内の組織からなる群より選択される。いくつかの実施形態では、脊髄の１つ以上の組織は、脊髄の深部組織である。ある実施形態では、脊髄の深部組織は、脊髄灰白質および上衣細胞、ならびに脊髄表面の表面から４ｍｍよりも下の組織からなる群より選択される。
【００２３】
いくつかの実施形態では、酵素が送達される脳の１つ以上の組織は、表面組織または浅部組織を含む。ある実施形態では、表面組織または浅部組織は、髄膜の軟膜組織、硬膜組織およびクモ膜組織、軟膜組織、大脳皮質リボン組織、大脳表面の表面から４ｍｍ以内の組織、ならびにその組合せからなる群より選択される。
【００２４】
いくつかの実施形態では、酵素が送達される組織は、深部組織を含む。ある実施形態では、深部脳組織は、大脳の深部白質、脊髄の深部灰白質、脳梁、室周囲組織、視床、基底核、間脳、海馬采、大脳皮質リボンよりも下の組織、大脳表面の表面から４ｍｍよりも下の組織、大脳表面の表面から６ｍｍよりも下の組織、大脳表面の表面から１０ｍｍよりも下の組織、プルキンエ細胞層、顆粒細胞層の組織、深部小脳白質組織および深部小脳核組織、ならびにその組合せから選択される。
【００２５】
いくつかの実施形態では、治療有効量は、０．００５ｍｇ／脳重量ｋｇ～１００ｍｇ／

脳重量ｋｇの範囲である。ある実施形態では、治療有効量は、１ｍｇ／脳重量ｋｇより大きい（例えば、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５または５０ｍｇ／脳重量ｋｇより大きい）。ある実施形態では、治療有効量は、１０ｍｇ／脳重量ｋｇより大きい。ある実施形態では、治療有効量は、３０ｍｇ／脳重量ｋｇより大きい。

【００２６】

いくつかの実施形態では、投与間隔は、２週間に１回である。いくつかの実施形態では、投与間隔は１か月に１回である。いくつかの実施形態では、投与間隔は２ヶ月に１回である。いくつかの実施形態では、投与間隔は１か月に２回である。いくつかの実施形態では、投与間隔は毎週１回である。いくつかの実施形態では、投与間隔は毎週２回または数回である。いくつかの実施形態では、投与は連続的であり、例えば連続注入ポンプによる。

【００２７】

別の態様では、本発明は、リソソーム酵素に関する補充酵素を含む組成物を、リソソーム酵素のレベルまたは活性の減少を伴うリソソーム蓄積症に罹患しているかまたは、これに罹患しやすい対象に投与するステップを含む方法であって、補充酵素が外表面より少なくとも５ｍｍより下（例えば外表面より少なくとも６ｍｍ、７ｍｍ、８ｍｍ、９ｍｍ、１０ｍｍ、１１ｍｍ、１２ｍｍまたはそれより深く）の深部脳組織に送達されるように、投与が、組成物の髄腔内投与を含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、補充酵素は、外表面より少なくとも１０ｍｍより下の深部脳組織に送達される。ある実施形態では、補充酵素は、具体的には、深部脳組織の細胞リソソームに送達される。

【００２８】

いくつかの実施形態では、酵素が送達される深部脳組織は、大脳の深部白質、脊髄の深部灰白質、脳梁、室周囲組織、視床、海馬采、大脳皮質リボンよりも下の組織、大脳表面の表面から４ｍｍよりも下の組織、大脳表面の表面から６ｍｍよりも下の組織、大脳表面の表面から１０ｍｍよりも下の組織、プルキンエ細胞層、顆粒細胞層の組織、深部小脳白質組織、および深部小脳核組織、ならびにその組合せから選択される。

【００２９】

さらに別の態様では、本発明は、ヒト細胞から産生されるリソソーム酵素に関する補充酵素を含む組成物を、リソソーム酵素のレベルまたは活性の減少を伴うリソソーム蓄積症に罹患しているかまたは、これに罹患しやすい対象に髄腔内投与するステップを含む方法を提供する。

【００３０】

いくつかの実施形態では、リソソーム蓄積症は、アスパルチルグルコサミン尿症、コレステロールエステル蓄積症、ウォルマン病、シスチン症、ダノン病、ファブリー病、ファーバー脂肪肉芽腫症、ファーバー病、フコシドーシス、ガラクトシアリドーシスＩ／ＩＩ型、ゴーシェ病Ｉ型／ＩＩ型／ＩＩＩ型、グロボイド細胞白質ジストロフィー症、クラッベ病、糖原病ＩＩ型、ポンペ病、ＧＭ１－ガングリオシドーシスＩ型／ＩＩ型／ＩＩＩ型、ＧＭ２－ガングリオシドーシスＩ型、テイ・サックス病、ＧＭ２－ガングリオシドーシスＩＩ型、サンドホッフ病、ＧＭ２－ガングリオシドーシス、α－マンノーシドーシスＩ／ＩＩ型、β－マンノーシドーシス、異染性白質ジストロフィー症、ムコリピドーシスＩ型、シアリドーシスＩ型／ＩＩ型、ムコリピドーシスＩＩ型／ＩＩＩ型、ムコリピドーシスＩＶ型、Ｉ－細胞病、ムコリピドーシスＩＩＩＣ型、偽性ハーラーポリジストロフィー、ムコ多糖症Ｉ型、ムコ多糖症ＩＩ型、ハンター症候群、ムコ多糖症ＩＩＩＡ型、サンフィリッポ症候群Ａ型、Ｂ型またはＤ型（ムコ多糖症ＩＩＩＢ型、ムコ多糖症ＩＩＩＣ型、ムコ多糖症ＩＩＩＤ型）、ムコ多糖症ＩＶＡ型、モルキオ症候群、ムコ多糖症ＩＶＢ型、ムコ多糖症ＶＩ型、ムコ多糖症ＶＩＩ型、スライ症候群、ムコ多糖症ＩＸ型、多重スルファターゼ欠乏症、ニューロンセロイド脂褐素沈着症、ＣＬＮ１バッテン病、ＣＬＮ２バッテン病、ニーマン・ピック病Ａ型／Ｂ型、ニーマン・ピック病Ｃ１型、ニーマン・ピック病Ｃ２型、濃化異骨症、シンドラー病Ｉ型／ＩＩ型、ゴーシェ病およびシアル酸蓄積症からなる群より選択される。

【００３１】
いくつかの実施形態では、リソソーム蓄積症は、ハンター症候群、異染性ジストロフィー（ＭＬＤ）症、サンフィリッポ症候群Ａ型、サンフィリッポ症候群Ｂ型およびグロボイド細胞白質ジストロフィー（ＧＬＤ）症からなる群より選択される。ある実施形態では、補充酵素は、組換えイズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）、アリールスルファターゼＡ（ＡＳＡ）、ヘパランＮ－スルファターゼ（ＨＮＳ）、アルファ－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼ（Ｎａｇｌｕ）およびβ－ガラクトシダーゼ（ＧＬＣ）からなる群より選択される。いくつかの実施形態では、補充酵素は、マンノース－６－ホスフェート（Ｍ６Ｐ）残基を含有する。いくつかの実施形態では、補充酵素は、リソソームターゲッティング部分を含む融合タンパク質である。

【００３２】
いくつかの実施形態では、補充酵素は、ニューロン、グリア細胞、血管周囲細胞および／または髄膜細胞に送達される。ある実施形態では、補充酵素はさらに、脊髄中のニューロンに送達される。

【００３３】
いくつかの実施形態では、髄腔内投与はさらに、末梢標的組織における補充酵素の全身送達を生じる。ある実施形態では、末梢標的組織は、肝臓、腎臓および／または心臓、内皮、骨髄および骨髄由来細胞、脾臓、肺、リンパ節、骨および軟骨、卵巣および精巣から選択される。

【００３４】
いくつかの実施形態では、髄腔内投与は、脳標的組織、脊髄ニューロンおよび／または末梢標的組織における補充酵素のリソソーム局在化を生じる。いくつかの実施形態では、髄腔内投与は、脳標的組織、脊髄ニューロンおよび／または末梢標的組織におけるＧＡＧ貯蔵の低減を生じる。ある実施形態では、ＧＡＧ貯蔵は、対照と比較して、少なくとも２０％、４０％、５０％、６０％、８０％、９０％、１倍、１．５倍または２倍低減される。

【００３５】
いくつかの実施形態では、髄腔内投与は、ニューロンにおける液胞化低減を生じる。いくつかの実施形態では、ニューロンはプルキンエ細胞を含む。

【００３６】
いくつかの実施形態では、髄腔内投与は、脳標的組織、脊髄ニューロンおよび／または末梢標的組織における補充酵素の酵素活性増大を生じる。ある実施形態では、酵素活性は、対照と比較して、少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍または１０倍増大される。ある実施形態では、酵素活性増大は、少なくとも約１０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、２０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、４０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、５０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、６０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、７０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、８０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、９０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、１００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、１５０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、２００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、２５０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、３００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、３５０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、４００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、４５０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、５００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、５５０ｎｍｏｌ／時・ｍｇまたは６００ｎｍｏｌ／時・ｍｇである。

【００３７】
いくつかの実施形態では、酵素活性は、腰部領域で増大される。ある実施形態では、腰部領域における酵素活性増大は、少なくとも約５００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、６００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、７００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、８００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、９００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、１０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、１５００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、２０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、３０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、４０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、５０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、６０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、７０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、８０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、９０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇまたは１０，０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇである。

【００３８】

いくつかの実施形態では、リソソーム蓄積症は末梢症候を伴い、当該方法はさらに、対象に補充酵素を静脈内投与することを含む。ある実施形態では、静脈内投与は、週１回投与より高頻度でない（例えば、週２回、月１回、２ヶ月に１回、３ヶ月に１回、４ヶ月に１回、５ヶ月に１回または６ヶ月に１回より高頻度でない）。ある実施形態では、静脈内投与は、毎月投与より高頻度でなく、例えば週２回、週１回、隔週毎、または月２回である。いくつかの実施形態では、静脈内および髄腔内投与は、互いに一定時間内、例えば少なくとも２日以内、少なくとも３日以内、少なくとも４日以内、少なくとも５日以内、少なくとも６日以内、少なくとも７日以内または少なくとも１週間以内には実施されない。いくつかの実施形態では、静脈内および髄腔内投与は、交互スケジュールで、例えば週１回、隔週、月２回または月１回、交互投与で実施される。いくつかの実施形態では、髄腔内投与は、例えば週１回、隔週、月２回または月１回の静脈内投与のスケジュールで、そのスケジュールの第３または第４または第５投与毎に、静脈内投与の代わりに髄腔内投与に取り替えられ得る。いくつかの実施形態では、静脈内投与は、例えば週１回、隔週、月２回または月１回の髄腔内投与のスケジュールで、そのスケジュールの第３または第４または第５投与毎に、髄腔内投与の代わりに静脈内投与に取り替えられ得る。いくつかの実施形態では、静脈内および髄腔内投与は、逐次的に実施され、例えば先ず、静脈内投与を実施し（例えば週１回、隔週、月２回または月１回用量投与を、２週間、１ヶ月、２ヶ月、３ヶ月、４ヶ月、５ヶ月、６ヶ月または１年またはそれ以上の間）、その後、髄腔内投与（例えば週１回、隔週、月２回または月１回用量投与を、２週間より長い間、１ヶ月、２ヶ月、３ヶ月、４ヶ月、５ヶ月、６ヶ月または１年またはそれ以上の間）を実施する。いくつかの実施形態では、髄腔内投与を先ず実施し（例えば週１回、隔週、月２回、月１回、２ヶ月に１回、３ヶ月に１回の用量投与を、２週間、１ヶ月、２ヶ月、３ヶ月、４ヶ月、５ヶ月、６ヶ月または１年またはそれ以上の間）、その後、静脈内投与（例えば週１回、隔週、月２回または月１回用量投与を、２週間より長い間、１ヶ月、２ヶ月、３ヶ月、４ヶ月、５ヶ月、６ヶ月または１年またはそれ以上の間）を実施する。

【００３９】

いくつかの実施形態では、リソソーム蓄積症は末梢症候を伴い、当該方法は、補充酵素を髄腔内投与することを含むが、しかし対象への補充酵素の静脈内投与を伴わない。ある実施形態では、補充酵素の髄腔内投与は、対象の酵素補充欠損の末梢症候のうちの１つ以上を改善するかまたは低減する。

【００４０】

別の態様では、本発明は、ハンター症候群の治療方法であって、ハンター症候群の少なくとも１つの症候または特徴が、強度、重症度または頻度において低減されるか、あるいは発症の遅延を示すような治療有効量および投与間隔で、組換えイズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）酵素を、治療を必要とする対象に髄腔内投与するステップを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、ハンター症候群の少なくとも１つの症候または特徴は、認知障害；白質損傷；脳の実質組織、神経節、脳梁および／または脳幹における血管周囲空隙拡大；萎縮；および／または脳室拡大である。

【００４１】

さらに別の態様では、本発明は、異染性ジストロフィー（ＭＬＤ）症の治療方法であって、ＭＬＤの少なくとも１つの症候または特徴が、強度、重症度または頻度において低減されるか、あるいは発症の遅延を示すような治療有効量および投与間隔で、組換えアリールスルファターゼＡ（ＡＳＡ）酵素を、治療を必要とする対象に髄腔内投与するステップを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、ＭＬＤの少なくとも１つの症候または特徴は、頭蓋内圧増大、真空水頭症、中枢および末梢神経系におけるならびに内臓器官におけるミエリン鞘中の硫酸化糖脂質蓄積、進行性脱髄、ＣＮＳおよびＰＮＳ内の軸索損失、および／または運動および認知機能障害である。

【００４２】

さらに別の態様では、本発明は、サンフィリッポ症候群Ａ型（サンフィリッポＡ）の治療方法であって、サンフィリッポＡの少なくとも１つの症候または特徴が、強度、重症度

または頻度において低減されるか、あるいは発症の遅延を示すような治療有効量および投与間隔で、組換えヘパランＮ－スルファターゼ（ＨＮＳ）酵素を、治療を必要とする対象に髄腔内投与するステップを含む方法を提供する。

【００４３】

別の態様では、本発明は、サンフィリッポ症候群Ｂ型（サンフィリッポＢ）の治療方法であって、サンフィリッポＢの少なくとも１つの症候または特徴が、強度、重症度または頻度において低減されるか、あるいは発症の遅延を示すような治療有効量および投与間隔で、組換えアルファ－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼ（Ｎａｇｌｕ）酵素を、治療を必要とする対象に髄腔内投与するステップを含む方法を提供する。

【００４４】

いくつかの実施形態では、サンフィリッポＡまたはサンフィリッポＢの少なくとも１つの症候または特徴は、聴力損失、言語発達障害、運動能力欠如、多動性障害、進行性認知障害、攻撃性および／または睡眠障害である。

【００４５】

いくつかの実施形態では、組換えＮａｇｌｕ酵素は、Ｎａｇｌｕおよびリソソームターゲッティング部分を含む融合タンパク質である。ある実施形態では、リソソームターゲッティング部分はＩＧＦ－ＩＩである。

【００４６】

別の態様では、本発明は、グロボイド細胞白質ジストロフィー（ＧＬＤ）症の治療方法であって、ＧＬＤの少なくとも１つの症候または特徴が、強度、重症度または頻度において低減されるか、あるいは発症の遅延を示すような治療有効量および投与間隔で、組換えβ－ガラクトシダーゼ（ＧＬＣ）酵素を、治療を必要とする対象に髄腔内投与するステップを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、ＧＬＤの少なくとも１つの症候または特徴は、易刺激性、痙攣、知的退行、聴覚消失、失明、ミオクローヌス発作、筋緊張亢進、発達遅延、発達能力の退行、過敏症、振戦、運動失調、痙縮、偶発性重症嘔吐、白質ジストロフィー症、脳萎縮、グロボイド細胞の発達障害、および／または脱髄である。

【００４７】

さらに別の態様では、本発明は、髄腔内投与のための装置、例えば、流体接触ポート；流体接触ポートと流体連絡する第一流出口、および脊髄中への挿入のために設計された第二流出口；ならびに脊髄における中空体の挿入を固定するための固定機構を提供する。いくつかの実施形態では、固定機構は、中空体の表面に載せられる１つ以上のノブ、および１つ以上のノブを覆って調整可能な縫合リングを含む。いくつかの実施形態では、流体接触ポートはリザーバを含む。ある実施形態では、流体接触ポートは、埋込可能である。ある実施形態では、流体接触ポートは注射可能なポートである。いくつかの実施形態では、流体接触ポートは機械式ポンプである。

本発明の好ましい実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

（項目１）

リソソーム酵素のレベルまたは活性の減少を伴うリソソーム蓄積症に罹患しているか、またはこれに罹患しやすい対象に、リソソーム酵素の補充酵素を約５ｍｇ／ｍｌを上回る濃度で含む組成物を髄腔内投与するステップを含む、方法。

（項目２）

前記補充酵素が約１０ｍｇ／ｍｌを上回る濃度である、項目１に記載の方法。

（項目３）

前記組成物が、（ｉ）緩衝剤、（ｉｉ）界面活性剤または（ｉｉｉ）等張化剤のうちの１つ以上をさらに含む、項目１または２に記載の方法。

（項目４）

前記組成物のｐＨが約３．０～８．０である、項目１～３のいずれか１項に記載の方法。

（項目５）

前記組成物を５ｍＬ未満の単回用量体積で投与する、項目１～４のいずれか１項に記載

の方法。
（項目６）
前記組成物を３ｍＬ未満の単回用量体積で投与する、項目１～５のいずれか１項に記載の方法。
（項目７）
前記組成物の髄腔内投与が、対象において実質的な有害作用を生じない、項目１～６のいずれか１項に記載の方法。
（項目８）
前記組成物の髄腔内投与が、Ｔ細胞性の適応免疫応答を生じない、項目１～７のいずれか１項に記載の方法。
（項目９）
リソソーム酵素のレベルまたは活性の減少を伴うリソソーム蓄積症に罹患しているか、またはこれに罹患しやすい対象に、リソソーム酵素の補充酵素を合成ＣＳＦではない製剤中に含む組成物を髄腔内投与するステップを含む、方法。
（項目１０）
前記補充酵素が約５ｍｇ／ｍｌを上回る濃度である、項目９に記載の方法。
（項目１１）
リソソーム酵素のレベルまたは活性の減少を伴うリソソーム蓄積症に罹患しているか、またはこれに罹患しやすい対象に、リソソーム酵素の補充酵素を含む組成物を髄腔内投与するステップを含み、投与が、免疫抑制剤の同時治療を行わない、前記組成物の髄腔内投与を含む、方法。
（項目１２）
治療する対象における免疫耐性誘導を含まない、項目１１に記載の方法。
（項目１３）
Ｔ細胞免疫抑制を用いた対象の前治療または前処置を含まない、項目１２に記載の方法。
（項目１４）
リソソーム酵素のレベルまたは活性の減少を伴うリソソーム蓄積症に罹患しているか、またはこれに罹患しやすい対象に、リソソーム酵素の補充酵素を含む組成物を、脳、脊髄および末梢器官の１つ以上の組織においてリソソーム酵素の正常なレベルまたは活性の少なくとも１０％が達成される治療有効量および投与間隔で髄腔内投与するステップを含む、方法。
（項目１５）
前記脳の１つ以上の組織が髄膜組織を含む、項目１４に記載の方法。
（項目１６）
前記髄膜組織が、軟膜組織、硬膜組織およびクモ膜組織からなる群より選択される、項目１５に記載の方法。
（項目１７）
前記脳の１つ以上の組織が大脳の組織を含む、項目１６に記載の方法。
（項目１８）
前記大脳の組織が、大脳の表面組織または浅部組織である、項目１７に記載の方法。
（項目１９）
前記大脳の表面組織または浅部組織が、軟膜組織、大脳皮質リボン組織、大脳の表面から４ｍｍ以内の組織およびこれらの組み合わせからなる群より選択される、項目１８に記載の方法。
（項目２０）
前記大脳の組織が大脳の深部組織である、項目１７に記載の方法。
（項目２１）
前記大脳の深部組織が、大脳皮質リボンよりも下の組織、大脳の表面から４ｍｍよりも下の組織、大脳の表面から６ｍｍよりも下の組織、大脳の表面から１０ｍｍよりも下の組

織およびこれらの組合せ組織からなる群より選択される、項目２０に記載の方法。
（項目２２）
前記脳の１つ以上の組織が小脳の組織を含む、項目１４に記載の方法。
（項目２３）
前記小脳の組織が、分子層の組織、プルキンエ細胞層の組織、顆粒細胞層の組織およびこれらの組合せからなる群より選択される、項目２２に記載の方法。
（項目２４）
前記小脳の組織が小脳の深部組織である、項目２２に記載の方法。
（項目２５）
前記小脳の深部組織が、プルキンエ細胞層の組織、顆粒細胞層の組織、深部小脳白質組織および深部小脳核組織からなる群より選択される、項目２４に記載の方法。
（項目２６）
前記１つ以上の脳の組織が脳幹の組織を含む、項目１４に記載の方法。
（項目２７）
前記脳幹の組織が、脳幹白質組織および／または脳幹核組織からなる群より選択される、項目２６に記載の方法。
（項目２８）
前記脊髄の１つ以上の組織が、脊髄の表面組織または浅部組織である、項目１４に記載の方法。
（項目２９）
前記脊髄の表面組織または浅部組織が、軟膜、白質束および脊髄表面の表面から４ｍｍ以内の組織からなる群より選択される、項目２８に記載の方法。
（項目３０）
前記脊髄の１つ以上の組織が脊髄の深部組織である、項目１４に記載の方法。
（項目３１）
前記脊髄の深部組織が、脊髄灰白質および上衣細胞、ならびに脊髄表面の表面から４ｍｍよりも下の組織からなる群より選択される、項目３０に記載の方法。
（項目３２）
前記脳の１つ以上の組織が表面組織または浅部組織を含む、項目１４に記載の方法。
（項目３３）
前記表面組織または浅部組織が、髄膜の軟膜組織、硬膜組織およびクモ膜組織、軟膜組織、大脳皮質リボン組織、大脳の表面から４ｍｍ以内の組織およびこれらの組合せからなる群より選択される、項目３２に記載の方法。
（項目３４）
前記組織が深部組織を含む、項目１４に記載の方法。
（項目３５）
前記深部脳組織が、大脳の深部白質、脊髄の深部灰白質、脳梁、脳室周囲組織、視床、海馬采、大脳皮質リボンよりも下の組織、大脳の表面から４ｍｍよりも下の組織、大脳の表面から６ｍｍよりも下の組織、大脳の表面から１０ｍｍよりも下の組織、プルキンエ細胞層、顆粒細胞層の組織、深部小脳白質組織、および深部小脳核組織、ならびにこれらの組合せから選択される、項目３４に記載の方法。
（項目３６）
前記治療有効量が０．００５ｍｇ／脳重量ｋｇ～１００ｍｇ／脳重量ｋｇの範囲にある、項目１４～３５のいずれか１項に記載の方法。
（項目３７）
前記治療有効量が１ｍｇ／脳重量ｋｇよりも大きい、項目１４～３５のいずれか１項に記載の方法。
（項目３８）
前記治療有効量が１０ｍｇ／脳重量ｋｇよりも大きい、項目１４～３５のいずれか１項に記載の方法。

（項目３９）
前記治療有効量が３０ｍｇ／脳重量ｋｇよりも大きい、項目１４～３５のいずれか１項に記載の方法。
（項目４０）
前記投与間隔が２週間に１回である、項目１４～３９のいずれか１項に記載の方法。
（項目４１）
前記投与間隔が１か月に１回である、項目１４～３９のいずれか１項に記載の方法。
（項目４２）
前記投与間隔が２か月に１回である、項目１４～３９のいずれか１項に記載の方法。
（項目４３）
リソソーム酵素のレベルまたは活性の減少を伴うリソソーム蓄積症に罹患しているか、またはこれに罹患しやすい対象に、リソソーム酵素の補充酵素を含む組成物を髄腔内投与するステップを含み、投与が、前記補充酵素が外表面から少なくとも少なくとも５ｍｍ下の脳深部組織へ送達されるような前記組成物の髄腔内投与を含む、方法。
（項目４４）
前記補充酵素が、外表面の少なくとも１０ｍｍ下の深部脳組織へ送達される、項目４３に記載の方法。
（項目４５）
前記補充酵素が、深部脳組織のリソソームへ特異的に送達される、項目４３に記載の方法。
（項目４６）
前記深部脳組織が、大脳の深部白質、脊髄の深部灰白質、脳梁、脳室周囲組織、視床、海馬采、大脳皮質リボンよりも下の組織、大脳の表面から４ｍｍよりも下の組織、大脳の表面から６ｍｍよりも下の組織、大脳の表面から１０ｍｍよりも下の組織、プルキンエ細胞層、顆粒細胞層の組織、深部小脳白質組織、および小脳核組織、ならびにこれらの組合せから選択される、項目４３、４４および４５のいずれか１項に記載の方法。
（項目４７）
リソソーム酵素のレベルまたは活性の減少を伴うリソソーム蓄積症に罹患しているか、またはこれに罹患しやすい対象に、ヒト細胞から産生されたリソソーム酵素の補充酵素を含む組成物を髄腔内投与するステップを含む、方法。
（項目４８）
前記リソソーム蓄積症が、アスパルチルグルコサミン尿症、コレステロールエステル蓄積症、ウォルマン病、シスチン症、ダノン病、ファブリー病、ファーバー脂肪肉芽腫症、ファーバー病、フコース症、ガラクトシアリドーシスＩ型／ＩＩ型、ゴーシェ病Ｉ型Ｉ／ＩＩ型／ＩＩＩ型、グロボイド細胞白質ジストロフィー、クラッベ病、グリコーゲン蓄積症ＩＩ、ポンペ病、ＧＭ１－ガングリオシド症Ｉ型／ＩＩ型／ＩＩＩ型、ＧＭ２－ガングリオシド症Ｉ型、テイ・サックス病、ＧＭ２－ガングリオシド症ＩＩ型、サンドホフ病、ＧＭ２－ガングリオシド症、α－マンノース症Ｉ型／ＩＩ型、β－マンノース症、異染性白質ジストロフィー、ムコ脂質症Ｉ型、シアリドーシスＩ型／ＩＩ型、ムコ脂質症ＩＩ型／ＩＩＩ型、Ｉ細胞病、ムコ脂質症ＩＩＩＣ型偽性ハーラー・ポリジストロフィー、ムコ多糖症Ｉ型、ムコ多糖症ＩＩ型、ハンター症候群、ムコ多糖症ＩＩＩＡ型、サンフィリッポ症候群Ａ、ＢまたはＣ型、ムコ多糖症ＩＩＩＢ型、ムコ多糖症ＩＩＩＣ型、ムコ多糖症ＩＩＩＤ型、ムコ多糖症ＩＶＡ型、モルキオ症候群、ムコ多糖症ＩＶＢ型、ムコ多糖症ＶＩ型、ムコ多糖症ＶＩＩ型、スライ症候群、ムコ多糖症ＩＸ型、多種スルファターゼ欠損症、神経セロイドリポフスチン症、ＣＬＮ１バッテン病、ＣＬＮ２バッテン病、ニーマン・ピック病Ａ型／Ｂ型、ニーマン・ピック病Ｃ１型、ニーマン・ピック病Ｃ２型、濃化異骨症、シンドラー病Ｉ型／ＩＩ型、ゴーシェ病およびシアル酸蓄積症からなる群より選択される、項目１～４７のいずれか１項に記載の方法。
（項目４９）
前記リソソーム蓄積症が、ハンター症候群、異染性白質ジストロフィー（ＭＬＤ）症、

サンフィリッポ症候群Ａ型、サンフィリッポ症候群Ｂ型およびグロボイド細胞白質ジストロフィー（ＧＬＤ）症からなる群より選択される、項目１～４８のいずれか１項に記載の方法。

（項目５０）

前記補充酵素が、組換えイズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）、アリールスルファターゼＡ（ＡＳＡ）、ヘパランＮ－スルファターゼ（ＨＮＳ）、α－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼ（Ｎａｇｌｕ）およびβ－ガラクトシダーゼ（ＧＬＣ）からなる群より選択される、項目４９に記載の方法。

（項目５１）

前記補充酵素がマンノース－６－リン酸（Ｍ６Ｐ）残基を含む、項目１～５０のいずれか１項に記載の方法。

（項目５２）

前記補充酵素が、リソソーム標的化部分を含む融合タンパク質である、項目１～５１のいずれか１項に記載の方法。

（項目５３）

前記補充酵素が、ニューロン、グリア細胞、血管周囲細胞および／または髄膜細胞へ送達される、項目１～５２のいずれか１項に記載の方法。

（項目５４）

前記補充酵素が、さらに脊髄のニューロンへ送達される、項目１～５３のいずれか１項に記載の方法。

（項目５５）

前記髄腔内投与が、前記補充酵素の末梢標的組織内への全身送達を生じさせる、項目１～５４のいずれか１項に記載の方法。

（項目５６）

末梢標的組織が、肝臓、腎臓、脾臓および／または心臓から選択される、項目５５に記載の方法。

（項目５７）

前記髄腔内投与が、脳標的組織、脊髄ニューロンおよび／または末梢標的組織内での補充酵素のリソソーム局在化を生じさせる、項目１～５６のいずれか１項に記載の方法。

（項目５８）

前記髄腔内投与が、脳標的組織、脊髄ニューロンおよび／または末梢標的組織におけるＧＡＧ蓄積生じさせる、項目１～５７のいずれか１項に記載の方法。

（項目５９）

前記ＧＡＧ蓄積が、対照と比較して少なくとも２０％、４０％、５０％、６０％、８０％、９０％、１倍、１．５倍または２倍だけ減少する、項目５８に記載の方法。

（項目６０）

前記髄腔内投与が、ニューロンにおける空胞化生じさせる、項目１～５９のいずれか１項に記載の方法。

（項目６１）

前記ニューロンがプルキンエ細胞を含む、項目６０に記載の方法。

（項目６２）

前記髄腔内投与が、脳標的組織、脊髄ニューロンおよび／または末梢標的組織において補充酵素の酵素活性の増加を生じさせる、項目１～６１のいずれか１項に記載の方法。

（項目６３）

前記酵素活性が、対照と比較して少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍または１０倍だけ増加する、項目６２に記載の方法。

（項目６４）

前記増加した酵素活性が、少なくとも約１０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、２０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、４０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、５０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、６０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、７０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、８０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、９０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、１００ｎｍ

ｏｌ／時・ｍｇ、１５０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、２００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、２５０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、３００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、３５０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、４００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、４５０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、５００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、５５０ｎｍｏｌ／時・ｍｇまたは６００ｎｍｏｌ／時・ｍｇである、項目６２または６３に記載の方法。

（項目６５）

前記酵素活性が腰部領域において増加する、項目６４に記載の方法。

（項目６６）

前記腰部領域において増加した酵素活性が、少なくとも約５００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、６００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、７００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、８００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、９００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、１０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、１５００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、２０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、３０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、４０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、５０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、６０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、７０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、８０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、９０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇまたは１０，０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇである、項目６５に記載の方法。

（項目６７）

前記リソソーム蓄積症が末梢症状を伴い、かつ前記方法が対象への前記補充酵素の静脈内投与をさらに含む、項目１～６６のいずれか１項に記載の方法。

（項目６８）

前記静脈内投与が月１回投与以下の頻度である、項目６７に記載の方法。

（項目６９）

前記リソソーム蓄積症が末梢症状を伴い、かつ前記方法が対象への前記補充酵素の静脈内投与を含まない、項目１～６８のいずれか１項に記載の方法。

（項目７０）

ハンター症候群の治療方法であって、治療を必要とする対象に、組換えイズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）酵素を、ハンターハンター症候群の少なくとも１つの症状または特徴の強度、重症度もしくは頻度が減少するか、またはハンターハンター症候群の発症が遅延する治療有効量および投与間隔で髄腔内投与するステップを含む、方法。

（項目７１）

前記ハンター症候群の少なくとも１つの症状または特徴が、認知障害；白質病変；脳実質、神経節、脳梁および／または脳幹における血管周囲腔の拡大；萎縮；ならびに／あるいは脳室拡大である、項目７０に記載の方法。

（項目７２）

異染性白質ジストロフィー（ＭＬＤ）症の治療方法であって、治療を必要とする対象に、アリールスルファターゼＡ（ＡＳＡ）酵素を、ＭＬＤ症の少なくとも１つの症状または特徴の強度、重症度もしくは頻度が減少するか、またはＭＬＤ症の発症が遅延する治療有効量および投与間隔で髄腔内投与するステップを含む方法。

（項目７３）

前記ＭＬＤ症の少なくとも１つの症状または特徴が、頭蓋内圧上昇、代償性水頭症、中枢神経系および末梢神経系のミエリン鞘ならびに内臓器官への硫酸化糖脂質の蓄積、ＣＮＳおよびＰＮＳ内での進行性脱髄および軸索消失、ならびに／あるいは運動および認知障害である、項目７３に記載の方法。

（項目７４）

サンフィリッポ症候群Ａ型（サンフィリッポＡ）疾患の治療方法であって、治療を必要とする対象に、組換えヘパランＮ－スルファターゼ（ＨＮＳ）酵素を、サンフィリッポＡ疾患の少なくとも１つの症状または特徴の強度、重症度もしくは頻度が減少するか、またはサンフィリッポＡ疾患の発症が遅延する治療有効量および投与間隔で髄腔内投与するステップを含む方法。

（項目７５）

サンフィリッポ症候群Ｂ型（サンフィリッポＢ）疾患の治療方法であって、治療を必要とする対象に、組換えα－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼ（Ｎａｇｌｕ）酵素を、サン

フィリッポＢ疾患の少なくとも１つの症状または特徴の強度、重症度もしくは頻度が減少するか、またはサンフィリッポＢ疾患の発症が遅延する治療有効量および投与間隔で髄腔内投与するステップを含む方法。
（項目７６）
前記サンフィリッポＡまたはサンフィリッポＢ疾患の少なくとも１つの症状または特徴が、聴力損失、言語障害遅延、運動能力欠如、活動亢進、知的障害、攻撃性および／または睡眠障害である、項目７５または７６に記載の方法。
（項目７７）
前記組換えＮａｇｌｕ酵素が、Ｎａｇｌｕとリソソーム標的化部分とを含む融合タンパク質である、項目７７に記載の方法。
（項目７８）
前記リソソーム標的化部分がＩＧＦ－ＩＩである、項目７８に記載の方法。
（項目７９）
グロボイド細胞白質ジストロフィー（ＧＬＤ）症の治療方法であって、治療を必要とする対象に、組換えβ－ガラクトシダーゼ（ＧＬＣ）酵素を、ＧＬＤ症の少なくとも１つの症状または特徴の強度、重症度もしくは頻度が減少するか、またはＧＬＤ症の発症が遅延する治療有効量および投与間隔で髄腔内投与するステップを含む方法。
（項目８０）
前記ＧＬＤ症の少なくとも１つの症状または特徴が、易刺激性、痙攣、知的退行、聴覚消失、視覚消失、ミオクローヌス発作、筋緊張亢進、発達遅延、発達能力の退行、過敏性、振戦、運動失調、痙攣、突発性の激しい嘔吐、白質ジストロフィー、大脳萎縮症、グロボイド細胞の発達および／または脱髄である、項目８０に記載の方法。
（項目８１）
髄腔内投与のための装置であって、
体液接触ポートと、
前記体液接触ポートと流体連結された第一流出口と、脊髄への挿入用に設定された第二流出口とを有する中空体と、
前記脊髄へ前記中空体の挿入を固定するための固定機構と
を含む、装置。
（項目８２）
前記固定機構が、前記中空体の表面に備え付けられた１つ以上のノブと、前記１つ以上のノブ上で調節可能な縫合リングとを含む、項目８２に記載の装置。
（項目８３）
前記体液接触ポートがリザーバを含む、項目８２または８３に記載の装置。
（項目８４）
前記体液接触ポートが埋入可能である、項目８２～８４のいずれか１項に記載の装置。
（項目８５）
前記体液接触ポートが注射可能なポートである、項目８２～８５のいずれか１項に記載の装置。
（項目８６）
前記体液接触ポートが機械式ポンプである、項目８２～８５のいずれか１項に記載の装置。
【００４８】
本願で用いる場合、「約」および「およそ」という用語は、等価物として用いられる。本願で用いられる任意の数字は、約／およそを伴う場合も伴わない場合も、関連業界の当業者に理解される任意の通常変動を網羅するよう意図される。
【００４９】
本発明のその他の特徴、目的および利点は、以下の詳細な説明で明らかになる。しかしながら、詳細な説明は、本発明の実施形態を示して入るが、例証のために示されたものであって、本発明を限定するものではない、と理解されるべきである。本発明の範囲内の種

々の変更および修正は、詳細な説明を読めば当業者に明らかになる。
図面は例証に過ぎず、本発明を限定するものではない。
【図面の簡単な説明】
【００５０】
【図１】固定機構を有する髄腔内薬剤送達装置（ＩＤＤＤ）の略図の一例を示す。
【図２Ａ】図２Ａは、ＩＤＤＤが配置され得る患者の身体内の例示的位置を示す；図２Ｂは、髄腔内薬剤送達装置（ＩＤＤＤ）の種々の構成成分を示す；そして図２Ｃは、ＩＴ－腰椎注射のための患者の身体内の挿入位置の一例を示す。
【図２Ｂ】図２Ａは、ＩＤＤＤが配置され得る患者の身体内の例示的位置を示す；図２Ｂは、髄腔内薬剤送達装置（ＩＤＤＤ）の種々の構成成分を示す；そして図２Ｃは、ＩＴ－腰椎注射のための患者の身体内の挿入位置の一例を示す。
【図２Ｃ】図２Ａは、ＩＤＤＤが配置され得る患者の身体内の例示的位置を示す；図２Ｂは、髄腔内薬剤送達装置（ＩＤＤＤ）の種々の構成成分を示す；そして図２Ｃは、ＩＴ－腰椎注射のための患者の身体内の挿入位置の一例を示す。
【図３】成体サルにおいて試験されたビヒクルを要約する例示的結果を表す。
【図４】ｐＨの一関数としてのｈＧａｌＣの熱スクリーンにおけるｈＧａｌＣの安定性を示す例示的結果を表す。
【図５】ｐＨの一関数としてのｈＧａｌＣの特異的活性を示す例示的結果を表す。
【図６】塩濃度の一関数としてのｈＧａｌＣの熱スクリーンを示す例示的結果を表す。
【図７】５ｍＭ　Ｎａリン酸塩、ｐＨ６．０緩衝液中の異なるイオン強度と比較した場合の、ＧａｌＣの沈降速度実行を示す例示的結果を表す。図７Ａは、５０ｍＭ　ＮａＣｌおよびｈＧａｌＣを用いた例示的結果を表す。図７Ｂは、　ｄｅｐｉｃｔｓ　ｅｘｅｍｐｌａｒｙ　ｒｅｓｕｌｔｓ　ｉｌｌｕｓｔｒａｔｉｎｇ　１５０ｍＭ　ＮａＣｌおよびｈＧａｌＣを示す例示的結果を表す。図７Ｃは、５００ｍＭ　ＮａＣｌおよびｈＧａｌＣを示す例示的結果を表す。図７Ｄは、１５０ｍＭ　ＮａＣｌおよびマウスＧａｌＣを示す例示的結果を表す。
【図８】塩濃度の一関数としてのＧａｌＣ　ＡＵＣプロフィールを示す例示的結果を表す（１ｍｇ／ｍＬ　ＧａｌＣ、５ｍＭ　Ｎａリン酸塩、ｐＨ６．０）（Ｙ軸＝ｓ＊ｇ（ｓ＊）；Ｘ軸＝ｓ＊）。
【図９】汎用緩衝液、ｐＨ６．０中のｈＧａｌＣの希釈シリーズを示す例示的結果を表す（Ｙ軸＝＜ｇ（ｓ＊）／Ｃ$_0$＞（１／ｓｖｅｄｂｅｒｇ）；Ｘ軸＝ｓ＊（ｓｖｅｄｂｅｒｇｓ））。
【図１０】ｐＨの一関数としてのＧａｌＣ　ＡＵＣプロフィールを示す例示的結果を表す（１ｍｇ／ｍＬ、３ｍＭ区塩酸塩、リン酸塩およびホウ酸塩緩衝液（５０ｍＭ　ＮａＣｌを含む））。
【図１１】５ｍＭ　Ｎａリン酸塩および１５０ｍＭ　ＮａＣｌ中のｐＨ６．０で最高濃度でのＷＤＡ分析からの基線読取り値を示す例示的結果を表す。
【図１２】５ｍＭ　Ｎａリン酸塩および１５０ｍＭ　ＮａＣｌ中のｐＨ６．０で最高濃度でのＷＤＡ分析からの応力読取り値を示す例示的結果を表す。
【図１３】基線および応力ＧａｌＣ試料を比較し、重ね合わせたグラフである。
【図１４】１％ＮａＴＣの存在下でのｈＧａｌＣの希釈シリーズを示す例示的結果を表す。
【図１５】１％ＮａＴＣの存在下でのｈＧａｌＣの希釈シリーズを示す例示的結果を表す（１．０ｍｇ／ｍＬおよび０．３ｍｇ／ｍＬ）。
【図１６】異なる緩衝液およびｐＨ中のｈＧａｌＣ（１ｍｇ／ｍＬ）の内在性蛍光を示す例示的結果を表す。
【図１７】ｐＨの一関数としてのｈＧａｌＣの円二色性を示す例示的結果を表す。
【図１８】$^{125}$Ｉ－ｈＧａｌＣの単回髄腔内用量投与後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの血清、血液および赤血球中の放射能の群平均濃度を示す例示的結果を表す。
【図１９】$^{125}$Ｉ－ｈＧａｌＣの単回髄腔内用量投与後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌ

ｅｙラットの血清、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓中の放射能の群平均濃度を示す例示的結果を表す。
【図２０】$^{125}$Ｉ－ｈＧａｌＣの単回静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの血清、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓中の放射能の群平均濃度を示す例示的結果を表す。
【図２１】$^{125}$Ｉ－ｈＧａｌＣの単回髄腔内用量投与および静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの血清、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓中の放射能の群平均濃度を示す例示的結果を表す。
【図２２】$^{125}$Ｉ－ｈＧａｌＣの単回髄腔内用量投与後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの血清ならびに種々の組織（脂肪組織（腎臓脂肪）、副腎、骨（大腿骨）、筋肉（骨格筋）、坐骨神経）中の放射能の平均濃度を示す例示的結果を表す。
【図２３】$^{125}$Ｉ－ｈＧａｌＣの単回静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの血清ならびに種々の組織（脂肪組織（腎臓脂肪）、副腎、骨（大腿骨）、筋肉（骨格筋）、坐骨神経）中の放射能の平均濃度を示す例示的結果を表す。
【図２４】$^{125}$Ｉ－ｈＧａｌＣの単回髄腔内用量投与および静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの血清ならびに組織（脂肪組織（腎臓脂肪）、副腎、骨（大腿骨）、筋肉（骨格筋）、坐骨神経）中の放射能の平均濃度を示す例示的結果を表す。
【図２５】$^{125}$Ｉ－ｈＧａｌＣの単回髄腔内用量投与後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの血清、脳脊髄液および種々の他の組織中の放射能の平均濃度を示す例示的結果を表す。
【図２６】$^{125}$Ｉ－ｈＧａｌＣの単回静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの血清、脳脊髄液および種々の他の組織中の放射能の平均濃度を示す例示的結果を表す。
【図２７】$^{125}$Ｉ－ｈＧａｌＣの単回髄腔内用量投与および静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの血清、脳脊髄液および組織中の放射能の平均濃度を示す例示的結果を表す。
【図２８】$^{125}$Ｉ－ｈＧａｌＣの単回髄腔内用量投与後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの血清および組織中の放射能の平均濃度を示す例示的結果を表す。
【図２９】$^{125}$Ｉ－ｈＧａｌＣの単回静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの血清および組織中の放射能の平均濃度を示す例示的結果を表す。
【図３０】$^{125}$Ｉ－ｈＧａｌＣの単回髄腔内用量投与および静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの血清および組織中の放射能の平均濃度を示す例示的結果を表す。
【図３１】ｒｍＧａｌＣのＩＰ投与がｔｗｉｔｃｈｅｒマウスにおける脳サイコシンレベルを低減する、ということを示す例示的結果を表す。データは、ｎ＝４匹／処置群に関する平均±ＳＥＭを表す。
【図３２】ＩＣＶのみ、およびＩＣＶ／ＩＰ　ｒｍＧａｌＣ療法での生存率増大を示す例示的結果を表す。
【図３３】脳サイコシンがｔｗｉｔｃｈｅｒマウスにおいてｒｍＧａｌＣのＩＣＶおよびＩＣＶ／ＩＰ注射後に有意に低減されることを示す例示的結果を表す。
【図３４】４０ｕｇのｒｍＧａｌＣで処置されたｔｗｉｔｃｈｅｒマウスにおいて観察される組織学的マーカーにおける改善を示す例示的結果を表す。神経膠原繊維酸性タンパク質（ＧＦＡＰ）を、星状細胞マーカーとして用いた。Ｉｂａ　１を、ミクログリア／マクロファージマーカーとして用いた。リソソーム付随膜タンパク質－１（ＬＡＭＰ－１）を、リソソームマーカーとして用いた。
【図３５】ｒｍＧａｌＣまたはビヒクルの単回ＩＣＶ注射後のサイコシン再蓄積を示す例示的結果を表す。
【図３６】ＰＮＤ１９／２０でのｒｍＧａｌＣの単回ＩＣＶ注射で処置されたｔｗｉｔｃｈｅｒマウスにおける生存％を示す例示的結果を表す。データは、ｎ＝８派群を表す。

【図３７】ｒｍＧａｌＣおよびｒｈＧａｌＣでＩＣＶ／ＩＰ処置されたマウスにおける生存％を示す例示的結果を表す。
【図３８】ｒｍＧａｌＣおよびｒｈＧａｌＣの単回ＩＣＶ注射で処置されたマウスの歩行分析を示す例示的結果を表す。
【図３９】ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスにおけるｒｍＧａｌＣまたはｒｈＧａｌＣに対する抗原性応答を示す例示的結果を表す。
【図４０】ナイーブおよびｒｈＧａｌＣ処置ＧＬＤイヌのＣＳＦ中のサイコシンレベルを示す例示的結果を表す。
【図４１】群１ポリクローナル抗体を有する大脳におけるＩＴ注射ＧａｌＣのＩＨＣ染色を示す例示的結果を表す。
【図４２】群２抗体を有する大脳におけるＩＴ注射ＧａｌＣのＩＨＣ染色を示す例示的結果を表す。
【図４３】マウスモノクローナル抗体を有する大脳におけるＩＴ注射ＧａｌＣのＩＨＣ染色を示す例示的結果を表す。
【図４４】マウスモノクローナル抗体を有する大脳におけるＩＴ注射ＧａｌＣのＩＨＣ染色を示す例示的結果を表す。
【図４５】マウスモノクローナル抗体を有する肝臓におけるＩＴ注射ＧａｌＣのＩＨＣ染色を示す例示的結果を表す。
【図４６】群２ポリクローナル抗体を有する肝臓におけるＩＴ注射ＧａｌＣのＩＨＣ染色を示す例示的結果を表す。
【図４７】脳における平均ＧａｌＣ活性を示す例示的結果を表す。
【図４８】肝臓における平均ＧａｌＣ活性を示す例示的結果を表す。
【図４９】脳におけるＧａｌＣ免疫染色を示す例示的結果を表す（倍率１０倍）。
【図５０】脳におけるＧａｌＣ免疫染色を示す例示的結果を表す（倍率４０倍）。
【図５１】活性化ミクログリアのＩｂａ染色を示す例示的結果を表す（倍率４０倍）。
【図５２】脳におけるＬＦＢ／ＰＡＳ染色を示す例示的結果を表す（倍率１０倍）。
【図５３】３用量のＩ２Ｓの髄腔内注射後の脳の表面（矢頭）を覆う髄膜細胞の層を含めた大脳および小脳皮質におけるニューロン（矢印）で検出されたＩ２Ｓを実証した例示的Ｉ２Ｓを示す。２用量注射脳におけるＩ２Ｓ　ＩＨＣの染色は弱かった（写真に示されていない）。ビヒクル対照動物の脳における任意の細胞型に関する陽性Ｉ２Ｓ染色は観察されなかった（倍率４０倍）。
【図５４】髄腔内－腰椎Ｉ２Ｓ注射後のＩＫＯマウスの脳における病理学の例示的反転写真である。Ｈ＆Ｅ染色脳組織は、ビヒクル対照動物において多数の細胞貯蔵空胞（矢印）を示した。細胞空胞形成は、２用量（示されていない）および３用量注射マウスの両方において脳全体で低減された。顕著な低減は、３用量注射のもので見出された（倍率４０倍）。
【図５５】ＬＡＭＰ－１の例示的免疫組織化学的染色を表す。ビヒクル対照マウスと比較して、Ｉ２Ｓ処置の２用量（示されていない）および３用量投与後の脳において、リソソーム活性の顕著な低減は認められなかった。低減は、ＬＡＭＰ－陽性細胞の数の減少ならびに脳全体の領域におけるより薄い染色強度により特性化された。倍率４０倍。
【図５６】大脳皮質（Ｃｏｒｔｅｘ）、尾状核（ＣＰ）、視床（ＴＨ）、白質（ＷＭ）および小脳（ＣＢＬ）における野生型（ＷＴ）、ビヒクル非処置およびＩ２Ｓ（２および３用量）マウス間の平均ＬＡＭＰ－１陽性域の比較からの例示的外形計測結果は、評価した脳のすべての領域においてＬＡＭＰ－１陽性染色の有意の低減は認められない、ということを確証した。データは、平均±ｓ．ｄ．として表される。＃＝Ｐ＜０．０５；＊＝Ｐ＜０．０１；＊＊＝Ｐ＜０．００１。
【図５７】脳細胞が微細構造レベルで病理学的改善を示したという例示的電子顕微鏡写真を表す。ビヒクル処置マウスのニューロンは、層板状封入体、ゼブラ小体様構造、および顆粒貯蔵物質（差込図）を含有する空胞（これはＩ２Ｓ注射マウスでは低減された）を有した。ビヒクル処置マウスの乏突起グリア細胞は大きな電子透過性貯蔵空胞（矢印）を示

したが、一方、Ｉ２Ｓ注射マウスの乏突起グリア細胞は最小度の空胞形成を有した。スケールバー：ニューロンでは２μＭ；乏突起グリア細胞では５００ｎｍ。
【図５８】Ｉ２Ｓの３用量の髄腔内注射後の肝臓の洞様細胞で検出されたＩ２Ｓを実証する例示的免疫組織化学的結果を表す。２用量注射肝臓における２Ｓ　ＩＨＣ染色は、より弱かった（示されていない）。ビヒクル対照動物の肝臓に置いて、陽性Ｉ２Ｓ染色は観察されなかった。倍率４０倍。
【図５９】肝臓からの例示的組織を現す。重度の細胞空胞形成および異常に高いリソソーム活性は、Ｈ＆Ｅ染色によって明示される。ＷＴに比して強いＬＡＭＰ－１免疫染色が、ビヒクル対照動物において見出された。細胞空胞形成およびＬＡＭＰ－１免疫染色の顕著なテイ癌は、Ｉ２Ｓ処置の３用量および２用量（示されていない）での髄腔内処置後に見出された。Ｈ＆Ｅ染色は、細胞質内空胞形成がほぼ完全に消失され、ほぼ正常な肝臓細胞構造を有したことを明示した。Ｈ＆Ｅ、倍率４０倍；ＬＡＭＰ－１、倍率２０倍。
【図６０】３ｍｇ処置群動物の大脳を示す例示的組織を表す。陽性Ｉ２Ｓ染色は、髄膜細胞で観察された。倍率４倍。
【図６１】３０ｍｇ処置群動物の大脳を示す例示的組織を表す。陽性Ｉ２Ｓ染色は、ニューロンおよび髄膜細胞で観察された。倍率４倍。
【図６２】１００ｍｇ処置群動物の大脳を示す例示的組織を表す。ニューロンおよび髄膜細胞における陽性Ｉ２Ｓ染色は、３および３０ｍｇ処置動物の場合より強かった。倍率４倍。
【図６３】１５０ｍｇ処置群動物の大脳を示す例示的組織を表す。ニューロンの大型集団は、強陽性髄膜細胞とともにＩ２Ｓ陽性である場合に観察された。
【図６４】３０ｍｇ処置群動物における大脳の層Ｉ内で、髄膜細胞とともに、Ｉ２Ｓ陽性ニューロンおよびグリア細胞を示す例示的組織を表す。倍率４０倍。
【図６５】３０ｍｇ処置群動物における大脳の層ＩＩＩ内で、血管周囲細胞とともに、Ｉ２Ｓ陽性ニューロンおよびグリア細胞を示す例示的組織を表す。倍率４０倍。
【図６６】３０ｍｇ処置群動物における白質に隣接する大脳の層ＶＩ内のＩ２Ｓ陽性ニューロンおよびグリア細胞を示す例示的組織を表す。倍率４０倍。
【図６７】１５０ｍｇ処置群動物のニューロン（大脳）における強陽性Ｉ２Ｓ染色を示す例示的組織を表す。倍率１００倍。
【図６８】１５０ｍｇ処置群における頚髄のＩ２Ｓ免疫染色を示す例示的組織を表す。倍率４倍。
【図６９】１５０ｍｇ処置群動物の腰髄における強Ｉ２Ｓ免疫染色を示す例示的組織を表す。倍率４倍。
【図７０】１５０ｍｇ処置群動物の腰椎切片中の髄膜細胞、グリア細胞および神経上膜／神経周膜／神経内膜（結合細胞）の強陽性Ｉ２Ｓ免疫染色を示す例示的組織を表す。倍率４０倍。
【図７１】１５０ｍｇ処置群動物の腰髄におけるニューロンは強Ｉ２Ｓ陽性であったということを示す画像を表す。倍率４０倍。
【図７２】３ｍｇ処置群動物からの肝臓からの例示的結果を表わす。洞様細胞のみがＩ２Ｓ陽性であった。倍率４０倍。
【図７３】３０ｍｇ処置群動物からの肝臓からの例示的結果を表わす。洞様細胞および肝細胞がＩ２Ｓ陽性であった。倍率４０倍。
【図７４】１００ｍｇ処置群動物からの肝臓からの例示的結果を表わす。Ｉ２Ｓ免疫染色は、洞様細胞および肝細胞において強かった。倍率４０倍。
【図７５】１５０ｍｇ処置群動物からの肝臓からの例示的結果を表わす。強陽性Ｉ２Ｓ染色は、洞様細胞および肝細胞で同定された。倍率４０倍。
【図７６】３ｍｇ処置群動物からの心臓からの例示的結果を表わす。Ｉ２Ｓ免疫染色は陰性であった。倍率４０倍。
【図７７】３０ｍｇ処置群動物からの心臓からの例示的結果を表わす。間質細胞はＩ２Ｓ陽性であった。倍率４０倍。

【図７８】１００ｍｇ処置群動物からの心臓からの例示的結果を表わす。Ｉ２Ｓに関する陽性間質細胞染色が観察された。倍率４０倍。
【図７９】１５０ｍｇ処置群動物からの心臓からの例示的結果を表わす。Ｉ２Ｓに関する強陽性間質細胞染色が観察された。倍率４０倍。
【図８０】３ｍｇ処置群動物からの腎臓からの例示的結果を表わす。Ｉ２Ｓ免疫染色は陰性であった。倍率４０倍。
【図８１】３０ｍｇ処置群動物からの腎臓からの例示的結果を表わす。糸球体および間質細胞はＩ２Ｓ陽性であった。
【図８２】１００ｍｇ処置群動物からの腎臓からの例示的結果を表わす。Ｉ２Ｓに関する糸球体および間質細胞染色増大が観察された。倍率４０倍。
【図８３】１５０ｍｇ処置群動物からの腎臓からの例示的結果を表わす。近位尿細管、糸球体および間質細胞の陽性Ｉ２Ｓ染色が観察された。倍率４０倍。
【図８４】イズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）の週１回用量投与で投与されたカニクイザルのＣＮＳ組織を評価する免疫組織化学的（ＩＨＣ）試験の結果を示す。ＩＨＣにより確定されるように、ＣＮＳ全体を通してＩ２Ｓの細胞内沈着が認められた。灰白質において、Ｉ２Ｓは、用量依存的に、すべての群の大脳、小脳、脳幹および脊髄のニューロン中で検出された。高用量群の表面灰白質では、多数の脳ニューロンが、表面皮質においてＩ２Ｓ染色に関して陽性であった（図８４Ａ）。Ｉ２Ｓは、視床（図８４Ｂ）、海馬（図８４Ｃ）、尾状核（図８４Ｄ）および脊髄（図８４Ｅ）のニューロンにおいても検出された。髄膜細胞および血管周囲細胞も、Ｉ２Ｓ染色陽性であった（図８４Ｆ）。同定スケールバーは、２５ｎｍに対応する。
【図８５】投与後の時間に比して頭蓋および脊椎プールにおけるＩ２Ｓの量をプロットすることにより、このようなプールにおけるイズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）のクリアランスを比較したグラフである。
【図８６】６ヶ月に亘って非ヒト霊長類に髄腔内投与されたイズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）の用量依存的灰白質沈着を示す。示した染色強度は、視床におけるイズロン酸－２－スルファターゼの蓄積に対応する。本発明の図８６では、核は、ＤＡＰＩにより対比染色されて、青色として現れ、タンパク質（Ｉ２Ｓ）は緑色として現れる。
【図８７】６ヶ月に亘る単回注射および多数回注射後に、非ヒト霊長類に髄腔内投与されたイズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）の用量依存的蓄積を示す。示した染色強度は、大脳皮質におけるＩ２Ｓタンパク質の蓄積に対応する。
【図８８】霊長類の大脳全体を通してのイズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）の細胞内局在化を実証する。図８８Ａは、霊長類の大脳から抽出された脳組織の横断図を示し、一方、図８８Ｂは、図８８Ａで同定された切片の白質組織の３つの領域（Ｗ１、Ｗ２およびＷ３と呼ぶ）、脳室付近の白質（ＶＷ）および表面灰白質（ＳＧ）組織に対応する特定領域を示す。
【図８９Ａ】６ヶ月間にわたる月１回注射後の霊長類への髄腔内投与イズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）のニューロンおよび乏突起グリア細胞取込みおよび軸索会合を示す。特に、図８９Ａ、図８９Ｂ、図８９Ｃおよび図８９Ｄは、イズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）を髄腔内投与された霊長類の大脳組織のフィラメント染色を示し、それぞれ、図８７Ｂで同定された白質の３つの領域（Ｗ１、Ｗ２およびＷ３）ならびに表面灰白質（ＳＧ）領域に対応する。図８９Ａは、白質（Ｗ１）組織中の髄腔内投与Ｉ２Ｓの乏突起グリア細胞取込みを示す。図８９Ｂおよび図８９Ｃは、それぞれＷ２およびＷ３白質組織における髄腔内投与Ｉ２Ｓの乏突起神経膠取込みおよび軸索会合を示す。図８９Ｄは、表面灰白質（ＳＧ）組織中の髄腔内投与Ｉ２Ｓのニューロン取込みを示す。
【図８９Ｂ】６ヶ月間にわたる月１回注射後の霊長類への髄腔内投与イズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）のニューロンおよび乏突起グリア細胞取込みおよび軸索会合を示す。特に、図８９Ａ、図８９Ｂ、図８９Ｃおよび図８９Ｄは、イズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）を髄腔内投与された霊長類の大脳組織のフィラメント染色を示し、それぞれ、図８７Ｂで同定された白質の３つの領域（Ｗ１、Ｗ２およびＷ３）ならびに表面灰

白質（ＳＧ）領域に対応する。図８９Ａは、白質（Ｗ１）組織中の髄腔内投与Ｉ２Ｓの乏突起グリア細胞取込みを示す。図８９Ｂおよび図８９Ｃは、それぞれＷ２およびＷ３白質組織における髄腔内投与Ｉ２Ｓの乏突起神経膠取込みおよび軸索会合を示す。図８９Ｄは、表面灰白質（ＳＧ）組織中の髄腔内投与Ｉ２Ｓのニューロン取込みを示す。

【図８９Ｃ】６ヶ月間にわたる月１回注射後の霊長類への髄腔内投与イズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）のニューロンおよび乏突起グリア細胞取込みおよび軸索会合を示す。特に、図８９Ａ、図８９Ｂ、図８９Ｃおよび図８９Ｄは、イズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）を髄腔内投与された霊長類の大脳組織のフィラメント染色を示し、それぞれ、図８７Ｂで同定された白質の３つの領域（Ｗ１、Ｗ２およびＷ３）ならびに表面灰白質（ＳＧ）領域に対応する。図８９Ａは、白質（Ｗ１）組織中の髄腔内投与Ｉ２Ｓの乏突起グリア細胞取込みを示す。図８９Ｂおよび図８９Ｃは、それぞれＷ２およびＷ３白質組織における髄腔内投与Ｉ２Ｓの乏突起神経膠取込みおよび軸索会合を示す。図８９Ｄは、表面灰白質（ＳＧ）組織中の髄腔内投与Ｉ２Ｓのニューロン取込みを示す。

【図８９Ｄ】６ヶ月間にわたる月１回注射後の霊長類への髄腔内投与イズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）のニューロンおよび乏突起グリア細胞取込みおよび軸索会合を示す。特に、図８９Ａ、図８９Ｂ、図８９Ｃおよび図８９Ｄは、イズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）を髄腔内投与された霊長類の大脳組織のフィラメント染色を示し、それぞれ、図８７Ｂで同定された白質の３つの領域（Ｗ１、Ｗ２およびＷ３）ならびに表面灰白質（ＳＧ）領域に対応する。図８９Ａは、白質（Ｗ１）組織中の髄腔内投与Ｉ２Ｓの乏突起グリア細胞取込みを示す。図８９Ｂおよび図８９Ｃは、それぞれＷ２およびＷ３白質組織における髄腔内投与Ｉ２Ｓの乏突起神経膠取込みおよび軸索会合を示す。図８９Ｄは、表面灰白質（ＳＧ）組織中の髄腔内投与Ｉ２Ｓのニューロン取込みを示す。

【図９０】非ヒト霊長類の脳室付近の白質（ＶＷ）中のイズロン酸－２－スルファターゼの細胞内同定を示す（上左の矢印）。補充画像に示すように（下右の矢印）、イズロン酸－２－スルファターゼはミエリンと会合されない（上右）。本発明の図９０では、核はＤＡＰＩにより対比染色される（下左）。タンパク質（Ｉ２Ｓ）は上左枠で現れている。

【図９１】イズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）の単回注射を脳室内（ＩＣＶ）または髄腔内（ＩＴ）投与された健常ビーグル犬の組織における染色を示す。画像ａ～ｈで示すように、Ｉ２Ｓは、免疫組織化学（ＩＨＣ）により確定されるように、ＩＴおよびＩＣＶ群の両方の灰白質全体に広範に分布された。画像ａおよびｂは、大脳皮質において、ＩＴおよびＩＣＶ群の両方の表面分子層から深部内部層まで、６つのニューロン層すべてで、ニューロンがＩ２Ｓに関して陽性であったことを示す。画像ｃおよびｄは、ＩＴおよびＩＣＶ群の小脳皮質において、Ｉ２Ｓが、プルキンエ細胞を含めてニューロン中で検出されたことを示す。同様に、画像ｅおよびｆは、ＩＴおよびＩＣＶ群の療法で、海馬中のニューロンの大型集団がＩ２Ｓに関して陽性であったことを示す。最後に、画像ｇおよびｈは、Ｉ２Ｓ陽性ニューロンが、ＩＴおよびＩＣＶ群の療法で、視床および尾状核においても見出されたことを実証する。本発明の図９１では、Ｉ２Ｓ染色は矢印で示されている。

【図９２】非処置のまたはＩ２Ｓを髄腔内投与されたイズロン酸－２－スルファターゼノックアウト（ＩＫＯ）マウスの脳梁組織を比較して示す。図示したように、処置ＩＫＯマウスは、Ｉ２Ｓ処置ＩＫＯマウスの脳梁および脳弓組織におけるある種のリソソーム貯蔵障害を特徴とする細胞空胞形成の低減を示した。

【図９３Ａ】図９３Ａは、非処置ＩＫＯ対照マウス（９３Ｂ）に比して、処置ＩＫＯマウス（図９３Ａ）の表面大脳皮質組織中の、リソソーム病病理バイオマーカーであるリソソーム付随膜タンパク質１（ＬＡＭＰ－１）の存在の顕著な低減を示す。倍率２０倍および４０倍。

【図９３Ｂ】図９３Ａは、非処置ＩＫＯ対照マウス（９３Ｂ）に比して、処置ＩＫＯマウス（図９３Ａ）の表面大脳皮質組織中の、リソソーム病病理バイオマーカーであるリソソーム付随膜タンパク質１（ＬＡＭＰ－１）の存在の顕著な低減を示す。倍率２０倍および４０倍。

【図９４】例示的髄腔内薬剤送達装置（ＩＤＤＤ）を示す。
【図９５】例示的ＰＯＲＴ－Ａ－ＣＡＴＨ（登録商標）低プロフィール髄腔内埋込可能接触系を示す。
【図９６】例示的髄腔内薬剤送達装置（ＩＤＤＤ）を示す。
【図９７】ＣＮＳ酵素補充療法（ＥＲＴ）のための在宅投与を可能にする、髄腔内薬剤送達装置（ＩＤＤＤ）を示す。
【図９８】ニューロン（プルキンエ細胞）中のイズルスルファーゼの単回大脳内注射後の空胞形成の作用を示す例示図である。
【図９９】用量および領域による脳中のＩ２Ｓ活性を示す例示図である。
【図１００】大脳皮質の異なる深度でのイズルスルファーゼの免疫組織化学的局在化のデータを示す例示図である。
【図１０１】イズルスルファーゼを髄腔内用量投与後のサルの脊髄中のＩ２Ｓ活性を示す例示図である。
【図１０２】イズルスルファーゼを髄腔内用量投与後のサルの肝臓、心臓および腎臓中のＩ２Ｓ活性を示す例示図である。
【図１０３】拡大ハンターＩＴ試験プログラムのための例示的模式図を表す。
【図１０４】３０ｍｇ用量投与後の脳組織の種々の切片におけるＩ２Ｓ濃度の測定値を示す例示図である。異なるプロットは、異なる測定時間に対応する。
【図１０５】種々の生成物濃度に関して種々の投与経路で長時間投与後のＩ２Ｓ濃度の測定値を示す例示図である。
【図１０６】ＩＶ、ＩＴ－ＬまたはＩＣＶ用量投与後ｔ＝５時間でのカニクイザルにおける$^{124}$Ｉ標識化イズルスルファーゼ－ＩＴのＰＥＴ画像を表す。
【図１０７】静脈内投与後の血清におけるＡＳＡ濃度データを示す例示図である。
【図１０８】ＩＴ－腰椎投与後の血清におけるＡＳＡ濃度データを示す例示図である。
【図１０９】ＩＶ投与後のＣＳＦにおけるＡＳＡ濃度を示す例示図である。
【図１１０】ＩＴ－腰椎投与後のＣＳＦにおけるＡＳＡ濃度を示す例示図である。
【図１１１】処置後の脳組織、髄膜、浸潤物（中および高用量群、雌雄）の例示的顕微鏡写真を表す。
【図１１２】処置後の脳組織、髄膜、浸潤物（中および高用量群、雌雄）の顕微鏡写真の別の例を表す。
【図１１３】処置後の脳組織、血管周囲、浸潤物（中および高用量群、雌雄）の例示的顕微鏡写真を表す。
【図１１４】ｒｈＡＳＡ１で処置された免疫寛容ＭＬＤマウスの脊髄の例示的アルシャンブルー染色、ならびに１、８、１５および２２日目に５２０ｍｇ／脳１ｋｇのｒｈＡＳＡの髄腔内注射を受けた動物またはビヒクル対照における頚髄のアルシャンブルー染色により確定されるようなスルファチド低減を示す結果を表す。実証されたように、髄腔内注射ｒｈＡＳＡによる処置は、脊髄の頚椎領域を含めた脊髄中のスルファチド蓄積の低減を生じた。
【図１１５】ｒｈＡＳＡ１で処置された免疫寛容ＭＬＤマウスからのアルシャンブルー染色脊髄切片の例示的外形計測分析、ならびに外形計測分析により確定されるような総脊髄（Ｔ－脊髄）、総灰白質（Ｔ－ＧＭ）、腰椎灰白質（Ｌ－ＧＭ）、頚椎灰白質（Ｃ－ＧＭ）、総白質（Ｔ－ＷＭ）、腰椎白質（Ｌ－ＷＭ）および頚椎白質（Ｃ－ＷＭ）におけるアルシャンブルーの光学密度を示す結果を示す。実証されたように、ビヒクル対照と比較した場合、アルシャンブルー染色における統計学的に有意の低減がｒｈＡＳＡで処置された動物において観察された。
【図１１６】ｒｈＡＳＡ１で処置された免疫寛容ＭＬＤマウスの白質（海馬采）におけるＬＡＭＰ染色の例示的低減を表わし、ならびに、免疫組織化学により確定されるような海馬采におけるＬＡＭＰ－１レベルを示す例示的結果を表す。倍率＝２０倍。実証されたように、髄腔内注射ｒｈＡＳＡによる処置は、大脳白質におけるＬＡＭＰ－１の低減を生じた。

【図１１７】ｒｈＡＳＡ１で処置された免疫寛容ＭＬＤマウスからの脳のＬＡＭＰ染色の例示的外形計測分析、ならびに２０ｍｇ／ｋｇ静脈内ｒｈＡＳＡ、３００ｍｇ／脳１ｋｇ髄腔内ｒｈＡＳＡ、５２０ｍｇ／脳１ｋｇ静脈内ｒｈＡＳＡで処置された動物またはビヒクル対照の、脳梁（ＣＣ）、海馬采（Ｆ）、小脳白質（ＣＢ－ＷＭ）および脳幹（ＢＳ）におけるＬＡＭＰ－１染色強度を示す結果を示す。
【図１１８】６ヶ月間、隔週（ＥＯＷ）ＩＴ用量投与後のビヒクル投与若年カニクイザルの脳パンチ中のＡＳＡの濃度を示す例示的図である（主剖検）。
【図１１９】６ヶ月間、１．８ｍｇ／用量投与でのｒｈＡＳＡ１のＥＯＷ　ＩＴ用量投与後の若年カニクイザルの脳パンチ中のＡＳＡの濃度を示す例示図である（主剖検）。
【図１２０】６ヶ月間、６．０ｍｇ／用量投与でのｒｈＡＳＡ１のＥＯＷ　ＩＴ用量投与後の若年カニクイザルの脳パンチ中のＡＳＡの濃度を示す例示図である（主剖検）。
【図１２１】６ヶ月間、１８．６ｍｇ／用量投与でのｒｈＡＳＡ１のＥＯＷ　ＩＴ用量投与後の若年カニクイザルの脳パンチ中のＡＳＡの濃度を示す例示図である（主剖検）。
【図１２２】６ヶ月間、ＥＯＷ　ＩＴ用量投与（ＰＢＳ対照）後の若年カニクイザルの脳パンチ中のＡＳＡの濃度を示す例示図である（主剖検）。
【図１２３】６ヶ月間、ビヒクルのＥＯＷ　ＩＴ用量投与後の若年カニクイザルの脳パンチ中のｒｈＡＳＡの濃度を示す例示的図である（主剖検）。
【図１２４】６ヶ月間、１．８ｍｇ／用量投与でのｒｈＡＳＡ１のＥＯＷ　ＩＴ用量投与後の若年カニクイザルの脳パンチ中のｒｈＡＳＡの濃度を示す例示的図である（主剖検）。
【図１２５】６ヶ月間、６．０ｍｇ／用量投与でのｒｈＡＳＡ１のＥＯＷ　ＩＴ用量投与後の若年カニクイザルの脳パンチ中のｒｈＡＳＡの濃度を示す例示図である（主剖検）。
【図１２６】６ヶ月間、１８．６ｍｇ／用量投与でのｒｈＡＳＡ１のＥＯＷ　ＩＴ用量投与後の若年カニクイザルの脳パンチ中のｒｈＡＳＡの濃度を示す例示図である（主剖検）。
【図１２７】デバイス対照、ビヒクル、１．８ｍｇ、６．０ｍｇおよび１８．６ｍｇ処置動物に関する脳の表面からの選択パンチ中のｒｈＡＳＡの濃度を示す例示図である（雌雄別。デバイス対照データは回復剖検から。他のデータはすべて、主剖検から）。
【図１２８】デバイス対照、ビヒクル、１．８ｍｇ、６．０ｍｇおよび１８．６ｍｇ処置動物に関する脳の深部白質域からの選択パンチ中のｒｈＡＳＡの濃度を示す例示図である（雌雄別。デバイス対照データは回復剖検から。他のデータはすべて、主剖検から）。
【図１２９】デバイス対照、ビヒクル、１．８ｍｇ、６．０ｍｇおよび１８．６ｍｇ処置動物に関する脳の深部灰白質域からの選択パンチ中のｒｈＡＳＡの濃度を示す例示図である（雌雄別。デバイス対照データは回復剖検から。他のデータはすべて、主剖検から）。
【図１３０】デバイス対照、ビヒクル、１．８ｍｇ、６．０ｍｇおよび１８．６ｍｇ処置動物における種々の領域からの選択パンチ中のｒｈＡＳＡの濃度を示す例示図である（雌雄別。デバイス対照データは回復剖検から。他のデータはすべて、主剖検から）。
【図１３１】６ヶ月間、ＥＯＷ　ＩＴ用量投与後の若年カニクイザルの脊髄切片中のｒｈＡＳＡの濃度を示す例示的図である（回復剖検）。
【図１３２】６ヶ月間、ＥＯＷ　ＩＴ用量投与後の若年カニクイザルの肝臓中のｒｈＡＳＡの濃度を示す例示的図である（０４７－０２１）（回復剖検）。
【図１３３】皮質下ＷＭ、血管周囲ＷＭ（および深部白質）および皮質下ＷＭ中の大脳パンチの解剖学的位置を示す例示図である。
【図１３４】脳梁および脳梁周囲皮質下ＷＭ、内包－ＧＰｉ、内包－尾状核、深部白質、皮質下ＷＭおよび皮質、被殻、ならびに側頭部皮質下ＷＭおよび皮質中の大脳パンチの解剖学的位置を示す例示図である。
【図１３５】深部灰白質、深部ＷＭ（前頭部脳室周囲および皮質した）、ならびに皮質下白質および皮質－表在矢状断面中の大脳パンチの解剖学的位置を示す例示図である。
【図１３６】脳梁および脳梁周囲皮質下ＷＭ、深部皮質下ＷＭ、深部皮質下ＷＭ、深部灰白質、脳室周囲ＷＭ、皮質下ＷＭおよび海馬中の大脳パンチの解剖学的位置を示す例示図

である。
【図１３７】脳梁および深部ＷＭ中の脳パンチの解剖学的位置を示す例示図である。
【図１３８】皮質下ＷＭ－後頭葉および小脳白質（歯状核（ＷＭ）を含む）中の脳パンチの解剖学的位置を示す例示図である。
【図１３９Ａ】Ａ～Ｇは、ビヒクル、１．８ｍｇ　ｒｈＡＳＡまたは１８．６ｍｇ　ｒｈＡＳＡのいずれかを投与された成年および若年カニクイザルの脳組織からの抽出組織パンチ中の組換えヒトアリールスルファターゼＡの濃度を示す。図１３９Ａ～Ｇの各々は、図１３４に示した脳組織の領域に対応する。
【図１３９Ｂ】Ａ～Ｇは、ビヒクル、１．８ｍｇ　ｒｈＡＳＡまたは１８．６ｍｇ　ｒｈＡＳＡのいずれかを投与された成年および若年カニクイザルの脳組織からの抽出組織パンチ中の組換えヒトアリールスルファターゼＡの濃度を示す。図１３９Ａ～Ｇの各々は、図１３４に示した脳組織の領域に対応する。
【図１３９Ｃ】Ａ～Ｇは、ビヒクル、１．８ｍｇ　ｒｈＡＳＡまたは１８．６ｍｇ　ｒｈＡＳＡのいずれかを投与された成年および若年カニクイザルの脳組織からの抽出組織パンチ中の組換えヒトアリールスルファターゼＡの濃度を示す。図１３９Ａ～Ｇの各々は、図１３４に示した脳組織の領域に対応する。
【図１３９Ｄ】Ａ～Ｇは、ビヒクル、１．８ｍｇ　ｒｈＡＳＡまたは１８．６ｍｇ　ｒｈＡＳＡのいずれかを投与された成年および若年カニクイザルの脳組織からの抽出組織パンチ中の組換えヒトアリールスルファターゼＡの濃度を示す。図１３９Ａ～Ｇの各々は、図１３４に示した脳組織の領域に対応する。
【図１３９Ｅ】Ａ～Ｇは、ビヒクル、１．８ｍｇ　ｒｈＡＳＡまたは１８．６ｍｇ　ｒｈＡＳＡのいずれかを投与された成年および若年カニクイザルの脳組織からの抽出組織パンチ中の組換えヒトアリールスルファターゼＡの濃度を示す。図１３９Ａ～Ｇの各々は、図１３４に示した脳組織の領域に対応する。
【図１３９Ｆ】Ａ～Ｇは、ビヒクル、１．８ｍｇ　ｒｈＡＳＡまたは１８．６ｍｇ　ｒｈＡＳＡのいずれかを投与された成年および若年カニクイザルの脳組織からの抽出組織パンチ中の組換えヒトアリールスルファターゼＡの濃度を示す。図１３９Ａ～Ｇの各々は、図１３４に示した脳組織の領域に対応する。
【図１３９Ｇ】Ａ～Ｇは、ビヒクル、１．８ｍｇ　ｒｈＡＳＡまたは１８．６ｍｇ　ｒｈＡＳＡのいずれかを投与された成年および若年カニクイザルの脳組織からの抽出組織パンチ中の組換えヒトアリールスルファターゼＡの濃度を示す。図１３９Ａ～Ｇの各々は、図１３４に示した脳組織の領域に対応する。
【図１４０】図１４０Ａおよび１４０Ｂは、ｒｈＡＳＡを髄腔内（ＩＴ）または脳室内（ＩＣＶ）投与された成年および若年カニクイザルの深部白質（図１４０Ａ）または深部灰白質（図１４０Ｂ）脳組織中で検出された組換えヒトアリールスルファターゼＡ（ＡＳＡ）の濃度の比較を示す例示図である。
【図１４１】図１４１Ａは、１８．６または１．８ｍｇ用量の組換えヒトアリールスルファターゼＡ（ｒｈＡＳＡ）をＩＴ投与された若年（＜１２月齢）カニクイザルから得られたいくつかの組織パンチ中で検出されたＡＳＡの濃度を示す例示図である。図１４０Ａ～Ｂの両方に示したように、組織に送達されるＡＳＡの濃度は、２．５ｎｇ／ｍｇ　ｒｈＡＳＡの目標治療濃度内であったか、またはそうでなければそれを超えた。図１４０Ａおよび図１４０Ｂに示したパンチ数の各々に対応する脳組織の解剖学的領域を、以下に示す：皮質下白質（１）；脳室周囲白質および深部白質（２）；皮質下白質（３）；皮質下白質（４）；内包（５）；内包尾状核（６）；深部白質（７）；皮質下白質および皮質（８）；被殻（９）；側頭部皮質下白質および皮質（１０）；深部灰白質（１１）；深部灰白質（１２）；前頭部脳室周囲＆皮質下（１３）；皮質下白質、皮質表在性大脳鎌周囲（１４）；脳梁および脳梁周囲皮質下白質（１５）；深部皮質下白質（１６）；深部灰白質（１７）；深部灰白質（１８）；脳室周囲白質（１９）；深部皮質下白質（２０）；海馬（２１）；脳梁（２２）；深部白質（２３）；皮質下白質、後頭葉（２４）；および小脳白質（２５）。

【図１４２Ａ】図１４２Ａは、１．８ｍｇのＡＳＡをＩＴ投与されたカニクイザルから抽出された深部白質組織の領域を示す。図１４２Ｂは、深部白質組織の免疫染色、ならびに関連細胞中のＡＳＡの分布を示す。図１４２Ｂでは、タンパク質（ＡＳＡ）は右下図に示されている。図１４２Ｃは、ＩＴ投与ＡＳＡが、カニクイザルの深部白色組織における、特にリソソーム中での細胞小器官共局在化を示した、ということを示す。図１４２Ｃでは、ＡＳＡ免疫染色は上左図に示されている。

【図１４２Ｂ】図１４２Ａは、１．８ｍｇのＡＳＡをＩＴ投与されたカニクイザルから抽出された深部白質組織の領域を示す。図１４２Ｂは、深部白質組織の免疫染色、ならびに関連細胞中のＡＳＡの分布を示す。図１４２Ｂでは、タンパク質（ＡＳＡ）は右下図に示されている。図１４２Ｃは、ＩＴ投与ＡＳＡが、カニクイザルの深部白色組織における、特にリソソーム中での細胞小器官共局在化を示した、ということを示す。図１４２Ｃでは、ＡＳＡ免疫染色は上左図に示されている。

【図１４２Ｃ】図１４２Ａは、１．８ｍｇのＡＳＡをＩＴ投与されたカニクイザルから抽出された深部白質組織の領域を示す。図１４２Ｂは、深部白質組織の免疫染色、ならびに関連細胞中のＡＳＡの分布を示す。図１４２Ｂでは、タンパク質（ＡＳＡ）は右下図に示されている。図１４２Ｃは、ＩＴ投与ＡＳＡが、カニクイザルの深部白色組織における、特にリソソーム中での細胞小器官共局在化を示した、ということを示す。図１４２Ｃでは、ＡＳＡ免疫染色は上左図に示されている。

【図１４３】カニクイザルに$^{124}$Ｉ標識化アリールスルファターゼＡ（ＡＳＡ）のＩＴ－またはＩＣＶ投与の２４時間後のＰＥＴスキャニングを用いたこのような標識化ＡＳＡの分布を比較する。

【図１４４】カニクイザルへのＩＣＶ投与直後の$^{124}$Ｉ標識化ＡＳＡの分布を示し、２～５時間後のＩＴ投与$^{124}$Ｉ標識化ＡＳＡの分布を比較する。実証されたように、ＩＴ投与は、ＩＣＶ投与に関して示されたものと同一の初期区画（脳槽および近位脊椎）に$^{124}$Ｉ標識化ＡＳＡを送達した。

【図１４５】マウスモデルにおける例示的ＩＣＶおよびＩＴ投与を表す。

【図１４６－１】図１４６Ａは、６ヶ月の用量投与後の１．５、４．５および８．３ｍｇ用量での時間の一関数としてのＨＮＳのＣＳＦ濃度を示す例示的結果を表す。図１４６Ｂは、サルにおける１．５、４．５および８．３ｍｇ用量のＩＴ投与の６ヵ月後のＣＳＦ中の抗ＨＮＳ抗体濃度を示す例示的結果を詳細に示す。データは、雌雄を併合して示されている。図１４６Ｃは、６ヶ月の用量投与後のサルにおける１．５、４．５および８．３ｍｇ用量のＩＴ投与の６ヵ月後のＣＳＦ中の抗ＨＮＳ抗体を示す例示的結果を詳細に示す。データは、雌雄合わせて示されている。８．３ｍｇのＨＮＳでの後ＩＴ用量投与６での２つの最高濃度（３２，２０５ｎｇ／ｍＬおよび１５，４６７ｎｇ／ｍＬ）は、ＣＳＦ試料が前用量投与６に採取されなかったため、プロットから除外された。

【図１４６－２】図１４６Ａは、６ヶ月の用量投与後の１．５、４．５および８．３ｍｇ用量での時間の一関数としてのＨＮＳのＣＳＦ濃度を示す例示的結果を表す。図１４６Ｂは、サルにおける１．５、４．５および８．３ｍｇ用量のＩＴ投与の６ヵ月後のＣＳＦ中の抗ＨＮＳ抗体濃度を示す例示的結果を詳細に示す。データは、雌雄を併合して示されている。図１４６Ｃは、６ヶ月の用量投与後のサルにおける１．５、４．５および８．３ｍｇ用量のＩＴ投与の６ヵ月後のＣＳＦ中の抗ＨＮＳ抗体を示す例示的結果を詳細に示す。データは、雌雄合わせて示されている。８．３ｍｇのＨＮＳでの後ＩＴ用量投与６での２つの最高濃度（３２，２０５ｎｇ／ｍＬおよび１５，４６７ｎｇ／ｍＬ）は、ＣＳＦ試料が前用量投与６に採取されなかったため、プロットから除外された。

【図１４７－１】ヘマトキシリンおよびエオシンで染色された脳の髄膜および実質からの組織切片の代表的画像を示す例示的結果を表す。図１４７Ａは、ＤＣサルにおけるＩＴカテーテルに限局的な好中球浸潤物の低出力図を示す例示的結果を表す。図１４７Ｂは、高用量（８．３ｍｇ／用量投与）サルの髄膜における好酸性浸潤物の高出力図を示す例示的結果を表す；浸潤物の全体的重症度は、中用量（４．５ｍｇ／用量投与）群と同様であった（示されていない）。図１４７Ｃは、血管周囲空隙（脳実質）中に好酸球を示す低用量

（１．５ｍｇ／用量投与）サルの高出力図を示す例示的結果を表す。図１４７Ｄは、血管周囲空隙および隣接実質組織中に好酸球を示す低用量サル（１．５ｍｇ／用量投与）を示す例示的結果を表す。図１４７Ｅは、低用量群動物の脊髄実質中の好酸球（矢印で示す）を示す例示的結果を表す；当該領域中のニューロンは正常である。図１４７Ｆは、低用量（１．５ｍｇ／用量投与）サルにおける好酸球および小グリア細胞症の領域（矢印は好酸球を示す；矩形は、小グリア細胞症の領域を示す）を示す例示的結果を表す。当該領域にいくつかの大型ニューロンが認められるが、これらはすべて正常である。スケールバー：２００ｕｍ。

【図１４７－２】ヘマトキシリンおよびエオシンで染色された脳の髄膜および実質からの組織切片の代表的画像を示す例示的結果を表す。図１４７Ａは、ＤＣサルにおけるＩＴカテーテルに限局的な好中球浸潤物の低出力図を示す例示的結果を表す。図１４７Ｂは、高用量（８．３ｍｇ／用量投与）サルの髄膜における好酸性浸潤物の高出力図を示す例示的結果を表す；浸潤物の全体的重症度は、中用量（４．５ｍｇ／用量投与）群と同様であった（示されていない）。図１４７Ｃは、血管周囲空隙（脳実質）中に好酸球を示す低用量（１．５ｍｇ／用量投与）サルの高出力図を示す例示的結果を表す。図１４７Ｄは、血管周囲空隙および隣接実質組織中に好酸球を示す低用量サル（１．５ｍｇ／用量投与）を示す例示的結果を表す。図１４７Ｅは、低用量群動物の脊髄実質中の好酸球（矢印で示す）を示す例示的結果を表す；当該領域中のニューロンは正常である。図１４７Ｆは、低用量（１．５ｍｇ／用量投与）サルにおける好酸球および小グリア細胞症の領域（矢印は好酸球を示す；矩形は、小グリア細胞症の領域を示す）を示す例示的結果を表す。当該領域にいくつかの大型ニューロンが認められるが、これらはすべて正常である。スケールバー：２００ｕｍ。

【図１４７－３】ヘマトキシリンおよびエオシンで染色された脳の髄膜および実質からの組織切片の代表的画像を示す例示的結果を表す。図１４７Ａは、ＤＣサルにおけるＩＴカテーテルに限局的な好中球浸潤物の低出力図を示す例示的結果を表す。図１４７Ｂは、高用量（８．３ｍｇ／用量投与）サルの髄膜における好酸性浸潤物の高出力図を示す例示的結果を表す；浸潤物の全体的重症度は、中用量（４．５ｍｇ／用量投与）群と同様であった（示されていない）。図１４７Ｃは、血管周囲空隙（脳実質）中に好酸球を示す低用量（１．５ｍｇ／用量投与）サルの高出力図を示す例示的結果を表す。図１４７Ｄは、血管周囲空隙および隣接実質組織中に好酸球を示す低用量サル（１．５ｍｇ／用量投与）を示す例示的結果を表す。図１４７Ｅは、低用量群動物の脊髄実質中の好酸球（矢印で示す）を示す例示的結果を表す；当該領域中のニューロンは正常である。図１４７Ｆは、低用量（１．５ｍｇ／用量投与）サルにおける好酸球および小グリア細胞症の領域（矢印は好酸球を示す；矩形は、小グリア細胞症の領域を示す）を示す例示的結果を表す。当該領域にいくつかの大型ニューロンが認められるが、これらはすべて正常である。スケールバー：２００ｕｍ。

【図１４８－１】サル脊髄および脳におけるＨＮＳ酵素活性を示す例示的結果を表す。図１４８Ａ／Ｂは、（Ａ）雄および（Ｂ）雌サルの脊髄における活性を示す例示的結果を表す。切片－３＝腰椎、切片３、６＝胸椎および切片９＝頚椎；０＝カテーテル先端。図１４８Ｃ／Ｄは、（Ｃ）雄および（Ｄ）雌サルの脳におけるＨＮＳ活性を示す例示的結果を表す。切片は、頭側から尾側に向けて番号付けされている（３～１５）。組織試料はすべて、最終用量投与の約２４時間後に、または回復動物に関する最終用量投与の４週間後に収集された。ＤＣ：デバイス対照。データは、ｎ＝４匹のサル／処置群に関する平均±ＳＥＭを表す。

【図１４８－２】サル脊髄および脳におけるＨＮＳ酵素活性を示す例示的結果を表す。図１４８Ａ／Ｂは、（Ａ）雄および（Ｂ）雌サルの脊髄における活性を示す例示的結果を表す。切片－３＝腰椎、切片３、６＝胸椎および切片９＝頚椎；０＝カテーテル先端。図１４８Ｃ／Ｄは、（Ｃ）雄および（Ｄ）雌サルの脳におけるＨＮＳ活性を示す例示的結果を表す。切片は、頭側から尾側に向けて番号付けされている（３～１５）。組織試料はすべて、最終用量投与の約２４時間後に、または回復動物に関する最終用量投与の４週間後に

収集された。ＤＣ：デバイス対照。データは、ｎ＝４匹のサル／処置群に関する平均±ＳＥＭを表す。

【図１４９Ａ】サル脳および肝臓における酵素活性を示す例示的結果を表す。図１４９Ａは、高用量（８．３ｍｇ／用量投与）群サルにおけるＨＮＳ活性分布を示す例示的結果を表す。内因性レベル（ＤＣ群）と比較した場合の脳の表面、深部および極深部（脳室周囲）域における倍率変化が示されている。組織試料はすべて、最終用量投与の約２４時間後に、または回復動物に関する最終用量投与の４週間後に収集された。データは、ｎ＝６匹のサル（雌雄）、脳切片６および９に関する平均±ＳＥＭを表す。２匹のサルに関するデータは含まれていない：剖検時に、カテーテルが特許品であることは判明しなかった。

【図１４９Ｂ】サル脳および肝臓における酵素活性を示す例示的結果を表す。図１４９Ａは、高用量（８．３ｍｇ／用量投与）群サルにおけるＨＮＳ活性分布を示す例示的結果を表す。内因性レベル（ＤＣ群）と比較した場合の脳の表面、深部および極深部（脳室周囲）域における倍率変化が示されている。組織試料はすべて、最終用量投与の約２４時間後に、または回復動物に関する最終用量投与の４週間後に収集された。データは、ｎ＝６匹のサル（雌雄）、脳切片６および９に関する平均±ＳＥＭを表す。２匹のサルに関するデータは含まれていない：剖検時に、カテーテルが特許品であることは判明しなかった。図１４９Ｂは、サル肝臓におけるＨＮＳ活性を示す。組織試料はすべて、最終用量投与の約２４時間後に、または回復動物に関する最終用量投与の４週間後に収集された。ＤＣ：デバイス対照。Ｒｅｃ：回復。データは、ｎ＝４匹のサル／処置群に関する平均±ＳＥＭを表すが、但し、低用量（４．５ｍｇ／用量投与）雌群（ｎ＝３）は除く。

【図１５０】若年カニクイザル小脳：３ヶ月暫定同齢集団におけるＨＮＳ局在化を示す例示的結果を表す。図１５０Ａは、ＨＮＳ免疫染色に関して陰性のビヒクル対照動物（０ｍｇ／用量投与）の小脳を示す例示的結果を表す；倍率２０倍。図１５０Ｂは、分子層に限定される最小陽性染色を示す低用量（１．５ｍｇ／用量投与）動物の小脳を示す例示的結果を表す。図１５０Ｃは、外側顆粒層における最小染色を示す中用量（４．５ｍｇ／用量投与）動物の小脳を示す例示的結果を表す；倍率２０倍。図１５０Ｄは、分子層、外側顆粒層およびプルキンエ細胞を含めた高用量（８．３ｍｇ／用量投与）動物の小脳における中等度の染色を示す例示的結果を表す；倍率２０倍。

【図１５１】１および１０ｍｇ／ｋｇでの$^{124}$Ｉ－ＨＮＳのＩＴ用量投与後の最初の２０分において経時的にプロットした頭部領域におけるＨＮＳの濃度の例示的試験を表す。

【図１５２】１および１０ｍｇ／ｋｇでの$^{124}$Ｉ－ＨＮＳのＩＴ用量投与後の経時的にプロットした脳におけるＨＮＳの濃度の例示的試験を表す。

【図１５３】１および１０ｍｇ／ｋｇでの$^{124}$Ｉ－ＨＮＳのＩＴ用量投与後の経時的にプロットした脳領域におけるＨＮＳの濃度の例示的試験を表す。

【図１５４】１および１０ｍｇ／ｋｇでの$^{124}$Ｉ－ＨＮＳのＩＴ用量投与後の経時的にプロットした頭部領域におけるＨＮＳの濃度の例示的試験を表す。

【図１５５】１および１０ｍｇ／ｋｇでの$^{124}$Ｉ－ＨＮＳのＩＴ用量投与後の経時的にプロットした近位脊椎におけるＨＮＳの濃度の例示的試験を表す。

【図１５６】１および１０ｍｇ／ｋｇでの$^{124}$Ｉ－ＨＮＳのＩＴ用量投与後の経時的にプロットした脊椎中央部におけるＨＮＳの濃度の例示的試験を表す。

【図１５７】１および１０ｍｇ／ｋｇでの$^{124}$Ｉ－ＨＮＳのＩＴ用量投与後の経時的にプロットした遠位脊椎におけるＨＮＳの濃度の例示的試験を表す。

【図１５８】１および１０ｍｇ／ｋｇでの$^{124}$Ｉ－ＨＮＳのＩＴ用量投与後の経時的にプロットした肝臓におけるＨＮＳの濃度の例示的試験を表す。

【図１５９】１および１０ｍｇ／ｋｇでの$^{124}$Ｉ－ＨＮＳのＩＴ用量投与後の経時的にプロットした脳におけるＨＮＳの濃度の例示的試験を表す。個別（上）および平均±ＳＤ

（下）。
【図１６０】１および１０ｍｇ／ｋｇでの$^{124}$Ｉ－ＨＮＳのＩＴ用量投与後の経時的にプロットしたＨＮＳの肝臓濃度の例示的試験を表す。個別（上）および平均±ＳＤ（下）。
【図１６１】１および１０ｍｇ／ｋｇでの$^{124}$Ｉ－ＨＮＳのＩＴ用量投与後の経時的にプロットしたＨＮＳの腎臓濃度の例示的試験を表す。個別（上）および平均±ＳＤ（下）。
【図１６２】１および１０ｍｇ／ｋｇでの$^{124}$Ｉ－ＨＮＳのＩＴ用量投与後の経時的にプロットしたＨＮＳの心臓濃度の例示的試験を表す。個別（上）および平均±ＳＤ（下）。
【図１６３】１および１０ｍｇ／ｋｇでの$^{124}$Ｉ－ＨＮＳのＩＴ用量投与後の経時的にプロットしたＨＮＳの皮膚濃度の例示的試験を表す。個別（上）および平均±ＳＤ（下）。
【図１６４】１および１０ｍｇ／ｋｇでの$^{124}$Ｉ－ＨＮＳのＩＴ用量投与後の経時的にプロットしたＨＮＳの脳濃度の例示的試験（上）、ならびに脳における非区画ＰＫパラメーターの比較（下）を表す。
【図１６５】１および１０ｍｇ／ｋｇでの$^{124}$Ｉ－ＨＮＳのＩＴ用量投与後の経時的にプロットしたＨＮＳの肝臓濃度の例示的試験（上）、ならびに肝臓における非区画ＰＫパラメーターの比較（下）を表す。
【図１６６】ｒｈＮａｇｌｕおよびＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの細胞内在化試験に関して用いられた正常ヒトからの例示的一次繊維芽細胞を示す。ｒｈＮａｇｌｕの細胞取込みは最小度であったが、一方、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの細胞取込みは大いに顕著であった。Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ内在化の飽和曲線は、受容体媒介性取込みを示した。この取込みは、ＩＧＦＩＩにより抑制されたが、しかし、マンノース－６－ホスフェートによっては抑制されなかった。
【図１６７】サンフィリッポＢ対象の繊維芽細胞（ＧＭ０１４２６）を用いた例示的共焦点顕微鏡試験の結果を表す。Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの広範囲の内在化、ならびにＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩとＬａｍｐ－１との共局在化が観察された。
【図１６８】野生型（ＷＴ）、Ｎａｇｌｕ－／－（ＫＯ）および異種接合体Ｎａｇｌｕ＋／－（Ｈｅｔ）マウスにおけるＮａｇｌｕ活性を示す例示図である。サンフィリッポＢマウスにおけるＮａｇｌｕの全体的欠損は、脳、肝臓および脾臓で観察された。
【図１６９】槽内注射（ＩＣ）の部位ならびに組織学的分析のための切断面を示すためのマウス脳の上面および側面図を表す。中央の顕微鏡写真はマウス脳の横断面で、倍率は１倍である。矩形域は、下部顕微鏡写真の倍率４倍の顕微鏡像の視野を示す。下部顕微鏡写真は、組織学的スライドの倍率４倍の画像である。矩形ＡおよびＢは、図１７０および図１７１の倍率４０倍の顕微鏡写真の視野を示す。
【図１７０】槽内注射（ＩＣ）の７日後のサンフィリッポＢマウスにおける大脳皮質の例示的免疫組織化学知見を表す。倍率４０倍。ｒｈＮａｇｌｕおよびＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩはともに、ニューロンにおける、ならびにグリア細胞における広範囲の細胞取込みを示し、その分布および細胞取込みパターンは２つのタンパク質間で非常によく似ていた（抗ヒトＮａｇｌｕモノクローナル抗体）。
【図１７１】倍率４０倍での大脳皮質の例示的ＬＡＭＰ－１免疫染色を表す。野生型マウスの脳と比較して、ＬＡＭＰ－１免疫染色陽性スポット増大により実証されるように、ビヒクル処置サンフィリッポＢマウスの脳では、リソソーム貯蔵増大が観察された。ｒｈＮａｇｌｕおよびＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ処置サンフィリッポＢマウスの両方の脳が、ｗｔマウスと非常によく似たリソソーム貯蔵の減少を示した。
【図１７２】図１７２Ａは、ビヒクルを投与された同一Ｎａｇｌｕ欠損マウスに比して、ＮａｇｌｕをＩＴ投与されたＮａｇｌｕ欠損マウスの白質組織中の細胞空胞形成の広範な減少を示す。図１７２Ｂは、ビヒクルを投与された同一Ｎａｇｌｕ欠損マウスに比して、Ｎａｇｌｕを髄腔内投与されたＮａｇｌｕ欠損マウスの白質組織中のリソソーム付随膜タ

ンパク質１（ＬＡＭＰ１）免疫染色における顕著な減少を示す。
【図１７３】野生型マウスならびにビヒクルを投与されたＮａｇｌｕ欠損マウスの療法と比較した場合の、Ｎａｇｌｕを投与されたＮａｇｌｕ欠損マウスの大脳皮質、尾状核および被殻（ＣＰ）、視床（ＴＨ）、小脳（ＣＢＬ）および白質（ＷＭ）で測定されたＬＡＭＰの濃度を定量的に示し、比較する。分析された脳組織の各領域のＬＡＭＰ陽性域は、２週間過程の間の２用量のＮａｇｌｕ（図１７３Ｂ）と比較して、７日過程に亘る３用量のＮａｇｌｕの髄腔内投与後、さらに低減された（図１７３Ａ）。
【図１７４】ｗｔカニューレ挿入ラットにおけるＩＴ注射の部位を実証するために、この図における参照として用いられるヒトＣＮＳの例示的正中矢状解剖図を示す。矢印は、脊髄中のＩＴ注射のおよその解剖学的位置、ならびに免疫組織化学的試験のために組織が採取された大脳皮質領域を示す。
【図１７５】ＩＴ注射後の脳における例示的Ｎａｇｌｕ活性を示す。Ｎａｇｌｕ活性は、Ｎａｇｌｕ－ＴＡＴおよびＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ注射ｗｔラットの脳において有意に高かった。
【図１７６】ＩＴ注射の２４時間後のｒｈＮａｇｌｕ、Ｎａｇｌｕ－ＴＡＴ、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ、Ｎａｇｌｕ－ｋｉｆおよびＰｅｒＴ－Ｎａｇｌｕ処置ｗｔカニューレ挿入ラットの大脳皮質の例示的Ｎａｇｌｕ免疫染色を表す。倍率２０倍。Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩは、脳の実質組織中への広範囲の分布を良好に示した唯一のタンパク質であった。ニューロンおよびグリア細胞中への細胞内取込みも、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ処置ラットで明らかであった。他方で、ｒｈＮａｇｌｕ、Ｎａｇｌｕ－ＴＡＴ、Ｎａｇｌｕ　ｋｉｆおよびＰｅｒＴ－Ｎａｇｌｕ処置群では、タンパク質は髄膜（Ｍ）中に残存した。
【図１７７】図１７６からの選択スライドの例示的高出力倍率を表す。上段パネル：ｒｈＮａｇｌｕ処置ｗｔカニューレ挿入ラットにおいて、ｒｈＮａｇｌｕは髄膜（Ｍ）に残存し、脳の実質組織中に陽性染色は認められなかった。下段パネル：Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ処置ｗｔカニューレ挿入ラットでは、脳の実質組織中への広範囲の分布が良好に観察され、細胞取込みはニューロンおよびグリア細胞において観察された。
【図１７８】最終ＩＴ注射の２４時間後の脳および肝臓における例示的Ｎａｇｌｕ活性を示す。３つの処置群の間で、脳のＮａｇｌｕ活性は有意差を示さなかったが、同じことは、肝臓における活性に関しても言えた。この結果は、脳および肝臓中で検出されたＮａｇｌｕ活性は主として、屠殺の２４時間前になされた最終注射のためである、ということを示した。
【図１７９】Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩのＩＴ注射後の脳および肝臓における例示的総ＧＡＧレベルを示す。ビヒクル処置サンフィリッポＢマウスの脳における総ＧＡＧは、漸進的増大を示したが、これはサンフィリッポＢマウスが加齢する場合の累積的作用を反映するものである。脳におけるＧＡＧの統計学的に有意の減少は、３×注射群において観察された（Ｐ＜０．０５）。肝臓におけるＧＡＧの統計学的に有意の減少も、２×および３×注射群で観察された（Ｐ＜０．０５）。脳におけるよりも肝臓におけるＧＡＧレベルのより迅速且つより激烈な変化は、ハンター症候群に関してＩ２ＳのＩＴ送達でも観察された現象である。
【図１８０】ＩＴ注射後のサンフィリッポＢマウスの脳におけるＮａｇｌｕの例示的生体分布を表す。Ｎａｇｌｕ免疫蛍光染色は、髄膜（Ｍ）および脳の実質組織におけるＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩタンパク質を明示した。細胞取込みは、２×および３×注射群で観察された。Ｇ：グリア細胞。
【図１８１】マウス脳の冠状切片を示す例示図である。矩形は、ＬＡＭＰ－１免疫染色のための写真が撮られた場所を示す。タンパク質分布および効力の程度を実証するために、大脳皮質および皮質下組織、例えば尾状核、視床および白質が、ＬＡＭＰ－１免疫染色のために選択された。
【図１８２】大脳皮質のＬＡＭＰ－１免疫染色を示す例示図である（倍率４０倍）。野生型マウスの脳と比較すると、ＬＡＭＰ－１免疫染色陽性スポット増大により分かるように、ビヒクル処置サンフィリッポＢマウスの脳においてリソソーム貯蔵増大が観察された。

Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ注射後のリソソーム貯蔵の減少は、２×注射処置サンフィリッポＢマウス脳の陽性スポットのサイズ減少、ならびに３×注射処置サンフィリッポＢマウス脳の陽性スポットのサイズおよび数の減少により明らかであった。

【図１８３】皮質下核である尾状核のＬＡＭＰ－１免疫染色を示す例示図である（倍率４０倍）。大脳皮質において観察されたものと同様に、ＬＡＭＰ－１免疫染色陽性スポット増大により分かるように、ビヒクル処置サンフィリッポＢマウスの脳において、リソソーム貯蔵増大が観察された。Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ　ＩＴ注射後のリソソーム貯蔵の減少は、２×注射処置サンフィリッポＢマウス脳の陽性スポットのサイズ減少により、そして３×注射処置サンフィリッポＢマウス脳の陽性スポットのサイズおよび数の減少により、明らかであった。

【図１８４】間脳核である視床のＬＡＭＰ－１免疫染色を示す例示図である（倍率４０倍）。Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ　ＩＴ注射後のリソソーム貯蔵の減少は、２×注射処置サンフィリッポＢマウス脳の陽性スポットのサイズ減少により、そして３×注射処置サンフィリッポＢマウス脳の陽性スポットのサイズおよび数の減少により、明らかであった。

【図１８５】白質のＬＡＭＰ－１免疫染色を示す例示図である（倍率４０倍）。ニューロン軸索繊維の軸筋は、図１８１～１８４に示したように白質を灰白質と区別する。それでも、野生型マウスと比較した場合、リソソーム貯蔵の同一増大パターンが、ビヒクル処置サンフィリッポＢマウスの脳で観察され得た。Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ　ＩＴ注射後のリソソーム貯蔵の減少は、２×および３×注射処置サンフィリッポＢマウス脳の陽性スポットのサイズ減少および数減少により明らかであった。

【図１８６】小脳皮質のＬＡＭＰ－１免疫染色を示す例示図である。小脳皮質の形態は、密に集合された粒状ニューロン、低細胞性分子層、ならびに粒状ニューロンおよび分子層間のプルキンエニューロンの単一層により明らかであった。プルキンエニューロンは、大型細胞質ならびに分子層中に時折突出する樹状突起により確認された。

【図１８７】脳、脊髄および肝臓におけるＮａｇｌｕ染色を示す例示図である。脳および脊髄において、注射されたＮａｇｌｕは、ＩＨＣにより髄膜（Ｍ）中に検出されただけで、任意の他の領域でＮａｇｌｕ陽性染色は検出されなかった。肝臓では、洞様細胞（Ｓ）はＮａｇｌｕ陽性であったが、肝細胞（Ｈ）中にＮａｇｌｕ取込みは見出されなかった。

【図１８８】肝臓および脊髄のＬＡＭＰ免疫染色およびＨ＆Ｅ染色を示す例示図である。ビヒクル動物と比較すると、ＬＡＭＰ染色は、Ｎａｇｌｕで処置された肝臓および脊髄の両方において全体に亘って低減された。Ｈ＆Ｅ染色は、肝細胞における細胞空胞形成は、ビヒクル処置動物と比較して、処置動物において低減される、ということを示した。

【図１８９Ａ】図１８９Ａおよび図１８９Ｂは、脳のＨ＆Ｅ染色、ならびに３ヶ月間、Ｎａｇｌｕの６回隔週（ＥＯＷ）ＩＴ注射後の脳の形態学的改善を示す例示図である。処置脳では、すべての実験領域における細胞空胞形成（矢印）は、ビヒクル群と比較して減少した。

【図１８９Ｂ】図１８９Ａおよび図１８９Ｂは、脳のＨ＆Ｅ染色、ならびに３ヶ月間、Ｎａｇｌｕの６回隔週（ＥＯＷ）ＩＴ注射後の脳の形態学的改善を示す例示図である。処置脳では、すべての実験領域における細胞空胞形成（矢印）は、ビヒクル群と比較して減少した。

【図１９０Ａ】図１９０Ａおよび図１９０Ｂは、３ヶ月間６回ＩＴ　Ｎａｇｌｕ注射後の種々の脳領域におけるＬＡＭＰ免疫染色を示す例示図である。ビヒクル処置群と比較して、サンフィリッポＢマウスへのＮａｇｌｕ　ＩＴ投与は、ＬＡＭＰ免疫染色により明示されたすべての実験領域においてリソソーム活性の低減を生じた。この低減は、ＬＡＭＰ陽性細胞の数の減少、より小さな細胞サイズおよびより薄い染色により特性化された。他の脳領域と比較して、脊髄に近い脳の尾状核部に位置する小脳および脳幹において、顕著な低減が見出された。明らかな低減は、白質、海馬および視床を含めた深部脳領域においても見出された。

【図１９０Ｂ】図１９０Ａおよび図１９０Ｂは、３ヶ月間６回ＩＴ　Ｎａｇｌｕ注射後の種々の脳領域におけるＬＡＭＰ免疫染色を示す例示図である。ビヒクル処置群と比較して

、サンフィリッポＢマウスへのＮａｇｌｕ　ＩＴ投与は、ＬＡＭＰ免疫染色により明示されたすべての実験領域においてリソソーム活性の低減を生じた。この低減は、ＬＡＭＰ陽性細胞の数の減少、より小さな細胞サイズおよびより薄い染色により特性化された。他の脳領域と比較して、脊髄に近い脳の尾状核部に位置する小脳および脳幹において、顕著な低減が見出された。明らかな低減は、白質、海馬および視床を含めた深部脳領域においても見出された。

【図１９１Ａ】図１９１Ａおよび図１９１Ｂは、３ヶ月間６回ＩＴ　Ｎａｇｌｕ注射後の種々の脳領域におけるＩｂａ　ＩＨＣを示す例示図であって、これは、ミクログリア細胞の活性化を明示した。ビヒクル処置群と比較して、Ｎａｇｌｕ処置群においては、養成細胞の数および染色強度の現象は観察されなかった。しかしながら、陽性ミクログリア細胞の細胞形態は、ビヒクル群の大型の且つ空胞形成したもの（挿入図）と比較して、すべての実験脳領域において、細胞サイズの低減に伴って変化した。

【図１９１Ｂ】図１９１Ａおよび図１９１Ｂは、３ヶ月間６回ＩＴ　Ｎａｇｌｕ注射後の種々の脳領域におけるＩｂａ　ＩＨＣを示す例示図であって、これは、ミクログリア細胞の活性化を明示した。ビヒクル処置群と比較して、Ｎａｇｌｕ処置群においては、養成細胞の数および染色強度の現象は観察されなかった。しかしながら、陽性ミクログリア細胞の細胞形態は、ビヒクル群の大型の且つ空胞形成したもの（挿入図）と比較して、すべての実験脳領域において、細胞サイズの低減に伴って変化した。

【図１９２Ａ】図１９２Ａおよび図１９２Ｂは、３ヶ月間６回ＩＴ　Ｎａｇｌｕ注射後の種々の脳領域におけるＧＦＡＰ　ＩＨＣを示す例示図であって、これは星状細胞活性化を明示した。ビヒクル処置群と比較して、ＧＦＡＰ陽性染色は、小脳および脳幹において減少され、他の実験領域においてわずかに減少された。

【図１９２Ｂ】図１９２Ａおよび図１９２Ｂは、３ヶ月間６回ＩＴ　Ｎａｇｌｕ注射後の種々の脳領域におけるＧＦＡＰ　ＩＨＣを示す例示図であって、これは星状細胞活性化を明示した。ビヒクル処置群と比較して、ＧＦＡＰ陽性染色は、小脳および脳幹において減少され、他の実験領域においてわずかに減少された。

【発明を実施するための形態】

【００５１】

定義

本発明をより容易に理解するために、一定の用語を先ず以下で定義する。以下の用語および他の用語に関する付加的な定義は、本明細書全体を通して記述されている。

【００５２】

「およそまたは約」は、本明細書中で用いる場合、「およそ」または「約」という用語は、１つ以上の当該値に適用される場合、記述参照値と類似する値を指す。ある実施形態では、「およそ」または「約」という用語は、別記しない限り、あるいはそうでない場合は本文から明らかな記述参照値のいずれかの方向で（より大きいかまたはより小さい）２５％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％またはそれ以下内にある一連の値を指す（このような数が考え得る値の１００％を超える場合を除く）。

【００５３】

「改善」：本明細書中で用いる場合、「改善」という用語は、ある状態の防止、低減または緩和、あるいは対象の状態の改善を意味する。改善は、疾患状態の完全回復または完全防止を包含するが、しかし必要とするわけではない。いくつかの実施形態では、改善は、関連疾患組織中に欠けている漸増レベルの関連タンパク質またはその活性を包含する。

【００５４】

「生物学的に活性な」：本明細書中で用いる場合、「生物学的に活性な」という語句は、生物学的系において、特に生物体において活性を有する任意の作用物質の特徴を指す。例えば、生物体に投与された場合、その生物体に及ぼす生物学的作用を有する作用物質は、生物学的に活性であるとみなされる。タンパク質またはポリペプチドが生物学的に活性である特定の実施形態では、当該タンパク質またはポリペプチドの少なくとも１つの生物

学的活性を共有するそのタンパク質またはポリペプチドの一部分は、典型的には、「生物学的活性」部分として言及される。

【００５５】

「バルク剤」：本明細書中で用いる場合、「バルク剤」という用語は、凍結乾燥混合物に質量を付加し、凍結乾燥ケークの物理的構造に寄与する（例えば、開口構造を保持する本質的に均一な凍結乾燥ケークの生産を促す）化合物を指す。バルク剤の例としては、マンニトール、グリシン、塩化ナトリウム、ヒドロキシエチルデンプン、ラクトース、スクロース、トレハロース、ポリエチレングリコールおよびデキストランが挙げられる。

【００５６】

「陽イオン非依存性マンノース－６－ホスフェート受容体（ＣＩ－ＭＰＲ）」：本明細書中で用いる場合、「陽イオン非依存性マンノース－６－ホスフェート受容体（ＣＩ－ＭＰＲ）」という用語は、リソソームへの輸送を定められているゴルジ装置における酸加水分解酵素上のマンノース－６－ホスフェート（Ｍ６Ｐ）タグを結合する細胞受容体を指す。マンノース－６－ホスフェートのほかに、ＣＩ－ＭＰＲは、他のタンパク質、例えばＩＧＦ－ＩＩも結合する。ＣＩ－ＭＰＲは、「Ｍ６Ｐ／ＩＧＦ－ＩＩ受容体」、「ＣＩ－ＭＰＲ／ＩＧＦ－ＩＩ受容体」、「ＩＧＦ－ＩＩ受容体」または「ＩＧＦ２受容体」としても既知である。これらの用語およびその略語は、本明細書中で互換的に用いられる。

【００５７】

「同時免疫抑制薬療法」：本明細書中で用いる場合、「同時免疫抑制薬療法」という用語は、前処置、前状態調節として、またはある処置方法と並行して用いられる任意の免疫抑制薬両方を包含する。

【００５８】

「希釈剤」：本明細書中で用いる場合、「希釈剤」という用語は、再構成処方物の調整のために有用な製薬上許容可能な（例えば、ヒトへの投与のために安全且つ非毒性の）希釈物質を指す。希釈剤の例としては、滅菌水、注射用静菌性水（ＢＷＦＩ）、ｐＨ緩衝溶液（後、リン酸塩緩衝生理食塩水）、滅菌生理食塩溶液、リンガー溶液またはデキストロース溶液が挙げられる。

【００５９】

「剤形」：本明細書中で用いる場合、「剤形」および「単位剤形」という用語は、処置されるべき患者のための治療用タンパク質の物理的に別個の単位を指す。各単位は、所望の治療効果を生じるよう算定された予定量の活性物質を含有する。しかしながら、組成物の総投与量は、信頼できる医学的判断の範囲内で、担当医により決定される、と理解される。

【００６０】

「酵素補充療法（ＥＲＴ）」：本明細書中で用いる場合、「酵素補充療法（ＥＲＴ）」という用語は、失われている酵素を提供することにより酵素欠乏症を矯正する任意の治療戦略を指す。いくつかの実施形態では、失われている酵素は、髄腔内投与により提供される。いくつかの実施形態では、失われている酵素は、血流中への注入により提供される。一旦投与されると、酵素は細胞に取り込まれ、リソソームに運ばれて、そこで酵素は、酵素欠乏のためにリソソーム中に蓄積された物質を除去するよう作用する。典型的には、有効であるべきリソソーム酵素補充療法に関して、治療用酵素は、貯蔵欠陥が顕在性である標的組織中の適切な細胞中のリソソームに送達される。

【００６１】

「改善する、増大するまたは低減する」：本明細書中で用いる場合、「改善する」、「増大する」または「低減する」という用語、あるいは文法的等価物は、基線測定値、例えば本明細書中に記載される処置の開始前の同一個体における測定値、あるいは本明細書中に記載される処置の非存在下での一対照個体（または多数の対照個体）における測定値と比較した場合の値を示す。「対照個体」は、処置されている個体と同一型のリソソーム貯蔵疾患に罹患している個体であって、処置されている個体とほぼ同年齢である（処置個体と対照個体（単数または複数）における疾患の段階が比較可能であることを保証するため

）。

【００６２】

「個体、対象、患者」：本明細書中で用いる場合、「対象」、「個体」または「患者」という用語は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物対象を指す。処置されている個体（「患者」または「対象」としても言及される）は、疾患に罹患している個体（胎児、幼児、小児、若者または成人）である。

【００６３】

「髄腔内投与」：本明細書中で用いる場合、「髄腔内投与」または「髄腔内注射」という用語は、脊柱管（脊髄周囲の髄腔内空隙）への注射を指す。種々の技法、例えば穿頭孔あるいは槽または腰椎穿刺等を通した外側脳室注射が用いられ得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本発明による「髄腔内投与」または「髄腔内送達」は、腰椎域または領域を介したＩＴ投与または送達、すなわち、腰椎ＩＴ投与または送達を指す。本明細書中で用いる場合、「腰部領域」または「腰椎域」という用語は、第三および第四腰椎（背中下部）間の区域、さらに包括的には、脊椎のＬ２～Ｓ１領域を指す。

【００６４】

「リンカー」：本明細書中で用いる場合、「リンカー」という用語は、融合タンパク質において、天然タンパク質中の特定位置に出現するもの以外のアミノ酸配列を指し、一般的に、柔軟性であるよう、または２つのタンパク質部分の間の構造物、例えばらせんを間に置くよう意図される。リンカーは、スペーサーとしても言及される。

【００６５】

「リオプロテクタント」：本明細書中で用いる場合、「リオプロテクタント」という用語は、凍結乾燥およびその後の貯蔵時に、タンパク質または他の物質の化学的および／または物理的不安定性を防止するかまたは低減する分子を指す。リオプロテクタントの例としては、糖、例えばスクロースまたはトレハロース；アミノ酸、例えばグルタミン酸またはヒスチジン一ナトリウム；メチルアミン、例えばベタイン；リオトロピック塩、例えば硫酸マグネシウム；ポリオール、例えば三価またはそれ以上の糖アルコール、例えばグリセリン、エリトリトール、グリセロール、アラビトール、キシリトール、ソルビトールおよびマンニトール；プロピレングリコール；ポリエチレングリコール；プルロニック；ならびにその組合せが挙げられる。いくつかの実施形態では、リオプロテクタントは、非還元糖、例えばトレハロースまたはスクロースである。

【００６６】

「リソソーム酵素」：本明細書中で用いる場合、「リソソーム酵素」という用語は、哺乳動物リソソーム中の蓄積物質を還元し得るか、あるいは１つ以上のリソソーム貯蔵疾患症候を救出するかまたは改善し得る任意の酵素を指す。本発明に適しているリソソーム酵素は、野生型または修飾リソソーム酵素の両方を包含し、組換えおよび合成方法を用いて生成され得るし、あるいは天然供給源から精製され得る。リソソーム酵素の例は、表１に列挙されている。

【００６７】

「リソソーム酵素欠乏症」：本明細書中で用いる場合、「リソソーム酵素欠乏症」は、高分子物質（例えば酵素基質）をリソソーム中でペプチド、アミノ酸、単糖、拡散および脂肪酸に分解するために必要とされる酵素のうちの少なくとも１つにおける欠乏に起因する遺伝子障害の一群を指す。その結果、リソソーム酵素欠乏症に罹患している個体は、種々の組織（例えば、ＣＮＳ、肝臓、脾臓、腸、血管壁およびその他の器官）中に物質を蓄積している。

【００６８】

「リソソーム蓄積症」：本明細書中で用いる場合、「リソソーム蓄積症」という用語は、天然高分子物質を退社するために必要な１つ以上のリソソーム酵素の欠乏に起因する任意の疾患を指す。これらの疾患は、典型的には、リソソーム中に非分解分子の蓄積を生じて、貯蔵顆粒（貯蔵小胞とも呼ばれる）の数を増大する。これらの疾患および種々の例は、以下で詳細に記載される。

【００６９】
「ポリペプチド」：本明細書中で用いる場合、「ポリペプチド」は、概して、ペプチド結合により互いに結合された少なくとも２つのアミノ酸の紐である。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、その各々が少なくとも１つのペプチド結合により他のものと結合される少なくとも３～５つのアミノ酸を含み得る。ポリペプチドは、時として、「非天然」アミノ酸、あるいはそれでも任意にポリペプチド鎖に一体化し得る他の実体を包含する、と当業者は理解する。
【００７０】
「補充酵素」：本明細書中で用いる場合、「補充酵素」という用語は、処置されるべき疾患において欠乏しているかまたは失われている酵素に少なくとも一部は取って替わるよう作用し得る任意の酵素を指す。いくつかの実施形態では、「補充酵素」という用語は、処置されるべきリソソーム蓄積症において欠乏しているかまたは失われているリソソーム酵素に少なくとも一部は取って替わるよう作用し得る任意の酵素を指す。いくつかの実施形態では、補充酵素は、哺乳動物リソソーム中の蓄積物質を低減し得るし、あるいは１つ以上のリソソーム蓄積症症候を救出するかまたは改善し得る。本発明に適している補充酵素は、野生型または修飾リソソーム酵素の両方を包含し、組換えおよび合成方法を用いて生成し得るし、あるいは天然供給源から精製され得る。補充酵素は、組換え、合成、遺伝子活性化または天然酵素であり得る。
【００７１】
「可溶性の」：本明細書中で用いる場合、「可溶性の」という用語は、均質溶液を生成する治療薬の能力を指す。いくつかの実施形態では、それが投与されそれが標的作用部位（例えば、脳の細胞および組織）に輸送される溶液中の治療薬の溶解度は、標的作用部位への治療的有効量の治療薬の送達を可能にするのに十分である。いくつかの因子が、治療薬の溶解度に影響を及ぼし得る。例えば、タンパク質溶解度に影響し得る関連因子としては、イオン強度、アミノ酸配列および他の同時可溶化剤または塩（例えば、カルシウム塩）の存在が挙げられる。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、カルシウム塩がこのような組成物から除去されるよう処方される。いくつかの実施形態では、本発明による治療薬は、その対応する薬学的組成物中で可溶性である。非経口投与薬のためには等張溶液が一般的に好ましいが、等張溶液の使用は、いくつかの治療薬、特にいくつかのタンパク質および／または酵素に関する適切な溶解度を制限し得る、と理解される。わずかに高張性の溶液（例えば、５ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ７．０）中に１７５ｍＭまでの塩化ナトリウム）および糖含有溶液（例えば、５ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ７．０）中に２％までのスクロース）は、サルにおいて良好に耐容されることが実証されている。例えば、最も一般に認可されたＣＮＳボーラス処方物組成物は、生理食塩水（水中１５０ｍＭのＮａＣｌ）である。
【００７２】
「安定性」：本明細書中で用いる場合、「安定な」という用語は、長期間に亘ってその治療効力（例えば、その意図された生物学的活性および／または物理化学的完全性のすべてまたは大部分）を保持する治療薬（例えば、組換え酵素）の能力を指す。治療薬の安定性、ならびにこのような治療薬の安定性を保持する薬学的組成物の能力は、長期間に亘って評価され得る（例えば、少なくとも１、３、６、１２、１８、２４、３０、３６ヶ月またはそれ以上）。概して、本明細書中に記載される薬学的組成物は、それらが、一緒に処方される１つ以上の治療薬（例えば、組換えタンパク質）を安定化し、あるいはそれらの分解を遅くするかまたは防止し得るよう、処方されている。一処方物の状況では、安定処方物は、貯蔵時、および加工処理（例えば、凍結／解凍、機械的混合および凍結乾燥）中に、その中の治療薬が本質的にその物理的および／または化学的完全性および生物学的活性を保持するものである。タンパク質安定性に関しては、それは、高分子量（ＨＭＷ）集合体の形成、酵素活性の損失、ペプチド断片の生成および電荷プロフィールの移動により測定され得る。
【００７３】

「対象」：本明細書中で用いる場合、「対象」という用語は、ヒトを含めた任意の哺乳動物を意味する。本発明のある実施形態では、対象は、成人、若者または幼児である。薬学的組成物の投与、および／または子宮内処置方法の実施も、本発明により意図される。

【００７４】

「実質的相同性」：「実質的相同」という語句は、アミノ酸または核酸配列間の比較に言及するために本明細書中で用いられる。当業者に理解されるように、２つの配列は、それらが、対応する位置に相同な残基を含有する場合、一般的に「実質的に相同」であるとみなされる。相同残基は、同一残基であり得る。代替的には、相同残基は、ほぼ同様の構造的および／または機能的特徴を有する非同一残基であり得る。例えば、当業者に周知であるように、あるアミノ酸は、典型的には、「疎水性」または「親水性」アミノ酸として分類され、および／または「極性」または「非極性」側鎖を有するとして分類される。一アミノ酸の、別の同一型のアミノ酸への置換は、しばしば、「相同」置換とみなされ得る。

【００７５】

当該技術分野で周知であるように、アミノ酸または核酸配列は、種々のアルゴリズム、例えば市販のコンピュータープログラム、例えばヌクレオチド配列に関するＢＬＡＳＴＮ、ならびにアミノ酸配列に関するＢＬＡＳＴＰ、ギャップ化ＢＬＡＳＴおよびＰＳＩ－ＢＬＡＳＴを用いて比較され得る。このようなプログラムの例は、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；およびＭｉｓｅｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，（ｅｄｓ．），Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１３２），Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，１９９９に記載されている。相同配列を同定することのほかに、上記のプログラムは、典型的には、相同性の程度の指示を提供する。いくつかの実施形態では、２つの配列は、それらの対応する残基のうちの少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上が関連残基鎖上で相同である場合、実質的に相同であるとみなされる。いくつかの実施形態では、関連鎖は完全配列である。いくつかの実施形態では、関連鎖は、少なくとも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残基またはそれ以上の残基である。

【００７６】

「実質的同一性」：「実質的同一性」という語句は、アミノ酸または核酸配列間の比較に言及するために本明細書中で用いられる。当業者に理解されるように、２つの配列は、それらが、対応する位置に同一の残基を含有する場合、一般的に「実質的に同一」であるとみなされる。当該技術分野で周知であるように、アミノ酸または核酸配列は、種々のアルゴリズム、例えば市販のコンピュータープログラム、例えばヌクレオチド配列に関するＢＬＡＳＴＮ、ならびにアミノ酸配列に関するＢＬＡＳＴＰ、ギャップ化ＢＬＡＳＴおよびＰＳＩ－ＢＬＡＳＴを用いて比較され得る。このようなプログラムの例は、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；およびＭｉｓｅｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，（ｅｄｓ．），Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１３２），Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，１９９９に記載されている。同一配列を同定することのほかに、上記のプログラムは、典型的には、同一性の程度の指示を提供する。いくつかの実施形態では、２つの配列は、それらの対応する残基のうちの少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上が関連残基鎖上で同一である場合、実質的に同一であるとみなされる。いくつかの実施形態では、関連鎖は完全配列である。いくつかの実施形態では、関連鎖は、少なくとも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残基またはそれ以上の残基である。

【００７７】

「合成ＣＳＦ」：本明細書中で用いる場合、「合成ＣＳＦ」という用語は、脳脊髄液と一致するｐＨ、電解質組成、グルコース含量および浸透圧を有する溶液を指す。合成ＣＳＦは、人工ＣＳＦとも呼ばれる。いくつかの実施形態では、合成ＣＳＦはエリオットＢ溶液である。

【００７８】

「ＣＮＳ送達に適している」：本明細書中で用いる場合、「ＣＮＳ送達に適している」または「髄腔内送達に適している」という語句は、それが本発明の薬学的組成物に関する場合、一般的に、このような組成物の安定性、耐容性および溶解度特性、ならびに標的送達部位（例えば、ＣＳＦまたは脳）にその中に含有される有効量の治療薬を送達するこのような組成物の能力を指す。

【００７９】

「標的組織」：本明細書中で用いる場合、「標的組織」は、処置されるべきリソソーム蓄積症により影響を及ぼされる任意の組織、あるいは欠乏リソソーム酵素が正常に発現される任意の組織を指す。いくつかの実施形態では、標的組織は、リソソーム蓄積症に罹患しているかまたは罹患し易い患者において、検出可能な、または以上に高量の酵素基質が存在する、例えば当該組織の細胞リソソーム中に貯蔵される組織を包含する。いくつかの実施形態では、標的組織は、疾患関連病態、症候または特徴を示す組織を包含する。いくつかの実施形態では、標的組織は、欠乏リソソーム酵素が高レベルで正常に発現される組織を包含する。本明細書中で用いる場合、標的組織は、脳標的組織、脊髄標的組織および／または末梢標的組織であり得る。標的組織の例は、以下で詳細に記載される。

【００８０】

「治療的部分」：本明細書中で用いる場合、「治療的部分」という用語は、分子の治療作用を果たす分子の一部分を指す。いくつかの実施形態では、治療的部分は、治療活性を有するポリペプチドである。

【００８１】

「治療的有効量」：本明細書中で用いる場合、「治療的有効量」という用語は、任意の医学的処置に適用可能な合理的利益／危険比で、処置対象に治療効果を付与する治療用タンパク質（例えば、補充酵素）の量を指す。治療作用は、客観的（すなわち、何らかの試験またはマーカーにより測定可能）または主観的（すなわち、対象は、作用の指示を与えるかまたは作用を感じる）であり得る。特に、「治療的有効量」は、例えば疾患に伴う症候を改善し、疾患の開始を防止するかまたは遅延し、および／または疾患の症候の重症度

または頻度を下げることにより、所望の疾患または症状を処置し、改善し、または防止するために、あるいは検出可能な治療的または予防的作用を示すために有効な治療用タンパク質または組成物の量を指す。治療的有効量は、一般に、多重単位用量を含み得る用量投与レジメンで投与される。任意の特定治療用タンパク質に関して、治療的有効量（および／または有効用量投与レジメン内の適切な単位用量）は、例えば、投与経路、他の薬学的作用物質との組合せによって変わり得る。さらにまた、任意の特定患者に関する具体的治療的有効量（および／または単位用量）は、種々の因子、例えば処置されている障害、および障害の重症度；用いられる具体的な薬学的作用物質の活性；用いられる具体的組成物；患者の年齢、体重、全身健康状態、性別および食事；投与時間、投与経路および／または用いられる具体的融合タンパク質の排出または代謝の速度；処置の持続期間；ならびに医療業界で周知であるような同様の因子によって決まる。

【００８２】

「耐容可能な」：本明細書中で用いる場合、「耐容可能な」および「耐容性」という用語は、このような組成物が投与される対象において悪反応を引き出さないか、代替的には、このような組成物が投与される対象において重篤な悪反応を引き出さない本発明の薬学的組成物の能力を指す。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物は、このような組成物が投与される対象により良好に耐容される。

【００８３】

「処置」：本明細書中で用いる場合、「処置」（さらにまた「処置する」または「処置すること」）という用語は、特定の疾患、障害および／または症状（例えば、ハンター症候群、サンフィリッポ症候群Ｂ型）の１つ以上の症候または特徴を、部分的にまたは完全に、緩和し、改善し、軽減し、抑制し、その開始を遅延し、その重症度を低減し、および／またはその発生率を低減する治療用タンパク質（例えば、リソソーム酵素）の任意の投与を指す。このような処置は、関連疾患、障害および／または症状の徴候を示さない対象の、および／または疾患、障害および／または症状の早期徴候のみを示す対象のものであり得る。代替的にまたは付加的に、このような処置は、関連疾患、障害および／または症状の１つ以上の確立された徴候を示す対象のものであり得る。

詳細な説明

【００８４】

本発明は、特に、中枢神経系（ＣＮＳ）への治療薬の有効な直接送達のための改良された方法を提供する。上記のように、本発明は、リソソーム蓄積症に関する補充酵素が、被験者における実質的な有害作用を誘導することなく、高濃度で処置を必要とする対象の脳脊髄液（ＣＳＦ）中に直接導入され得る、という予期せぬ発見に基づいている。さらに意外なことに、合成ＣＳＦを用いることなく、補充酵素が単なる生理食塩水または緩衝液ベースの処方物中で送達され得る、ということを本発明人等は見出した。さらに予期せぬことに、本発明による髄腔内送達は、対象における実質的な有害作用、例えば重症免疫応答を生じない。したがって、いくつかの実施形態では、本発明による髄腔内送達は、同時免疫抑制薬療法の非存在下で（例えば、前処置または前状態調節による免疫寛容の誘導なしで）、用いられ得る。

【００８５】

いくつかの実施形態では、本発明による髄腔内送達は、種々の脳組織を通した効率的拡散を可能にして、表面、浅在および／または深部脳領域における種々の標的脳組織における補充酵素の効果的送達を生じる。いくつかの実施形態では、本発明による髄腔内送達は、末梢循環に進入するのに十分な量の補充酵素を生じた。その結果、いくつかの場合には、本発明による髄腔内送達は、肝臓、心臓および腎臓のような末梢組織における補充酵素の送達を生じた。この発見は予期せぬものであり、典型的には定期的髄腔内投与および静脈内投与を必要とするＣＮＳおよび末梢構成成分の両方を有するリソソーム蓄積症の処置のために特に有用であり得る。本発明による髄腔内送達は、末梢症候を処置するに際して治療効果を危うくすることなく、静脈内注射の用量投与および／または頻度低減を可能にし得る、ということが意図される。

【００８６】
本発明は、種々の脳標的組織への補充酵素の効率的且つ便利な送達を可能にして、ＣＮＳ指標を有するリソソーム蓄積症の有効な処置を生じる種々の予期せぬ且つ有益な特徴を提供する。
【００８７】
本発明の種々の態様は、以下の節で詳細に記載される。節の記載内容は、本発明を限定するものではない。各説は、本発明の任意の態様に適用し得る。この出願において、「または」は、別記しない限り「および／または」を意味する。
リソソーム蓄積症および補充酵素
【００８８】
本発明の方法は、任意のリソソーム蓄積症、特にＣＮＳ病因および／または症候を有するリソソーム蓄積症、例えば、アスパルチルグルコサミン尿症、コレステロールエステル蓄積症、ウォルマン病、シスチン症、ダノン病、ファブリー病、ファーバー脂肪肉芽腫症、ファーバー病、フコシドーシス、ガラクトシアリドーシス　Ｉ／ＩＩ型、ゴーシェ病　Ｉ／ＩＩ／ＩＩＩ型、グロボイド細胞白質ジストロフィー症、クラッベ病、糖原病　ＩＩ型、ポンペ病、ＧＭ１－ガングリオシドーシス　Ｉ／ＩＩ／ＩＩＩ型、ＧＭ２－ガングリオシドーシス　Ｉ型、テイ・サックス病、ＧＭ２－ガングリオシドーシス　ＩＩ型、サンドホッフ病、ＧＭ２－ガングリオシドーシス、α－マンノーシドーシス　Ｉ／ＩＩ型、β－マンノーシドーシス、異染性白質ジストロフィー症、ムコリピドーシス　Ｉ型、シアリドーシス　Ｉ／ＩＩ型、ムコリピドーシス　ＩＩ／ＩＩＩ型、ムコリピドーシス　ＩＶ型、Ｉ－細胞病、ムコリピドーシス　ＩＩＩＣ型、偽性ハーラーポリジストロフィー、ムコ多糖症　Ｉ型、ムコ多糖症ＩＩ型、ハンター症候群、ムコ多糖症　ＩＩＩＡ型、サンフィリッポ症候群　Ａ、ＢまたはＤ型、ムコ多糖症　ＩＩＩＢ型、ムコ多糖症　ＩＩＩＣ型、ムコ多糖症　ＩＩＩＤ型、ムコ多糖症　ＩＶＡ型、モルキオ症候群、ムコ多糖症　ＩＶＢ型、ムコ多糖症　ＶＩ型、ムコ多糖症　ＶＩＩ型、スライ症候群、ムコ多糖症　ＩＸ型、多重スルファターゼ欠乏症、ニューロンセロイド脂褐素沈着症、ＣＬＮ１バッテン病、ＣＬＮ２バッテン病、ニーマン・ピック病　Ａ／Ｂ型、ニーマン・ピック病　Ｃ１型、ニーマン・ピック病　Ｃ２型、濃化異骨症、シンドラー病　Ｉ／ＩＩ型、ゴーシェ病およびシアル酸蓄積症（これらに限定されない）を処置するために用いられ得る。
【００８９】
いくつかの実施形態では、本発明の方法を用いて処置されるべきリソソーム蓄積症としては、ハンター症候群、異染性ジストロフィー（ＭＬＤ）症、サンフィリッポ症候群　Ａ型、サンフィリッポ症候群　Ｂ型およびグロボイド細胞白質ジストロフィー（ＧＬＤ）症が挙げられる。
【００９０】
リソソーム蓄積症の遺伝的病因、臨床症候発現および分子生物学知見は、Ｓｃｒｉｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，　ｅｄｓ．，　Ｔｈｅ　Ｍｅｔａｂｏｌｉｃ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂａｓｉｓ　ｏｆ　Ｉｎｈｅｒｉｔｅｄ　Ｄｉｓｅａｓｅ，　７．ｓｕｐ．ｔｈ　Ｅｄ．，　Ｖｏｌ．　ＩＩ，　ＭｃＧｒａｗ　Ｈｉｌｌ，　（１９９５）に詳述されている。したがって、上記疾患における酵素欠乏は当業者に既知であり、これらのいくつかは、以下の表に例示されている：

【表１－１】

表１

| 病名 | 酵素欠乏 | 貯蔵物質 |
|---|---|---|
| ポンペ病 | 酸－α１，4-グルコシダーゼ | グリコーゲン α1-4 連結 オリゴ糖 |
| GM1 ガングリオシドーシス | β-ガラクトシダーゼ | $GM_1$ ガングリオシド |
| テイ・サックス病 | β-ヘキソサミニダーゼ A | $GM_2$ ガングリオシド |
| GM2 ガングリオシドーシス: AB 変異体 | $GM_2$ アクチベーター タンパク質 | $GM_2$ ガングリオシド |
| サンドホッフ病 | β-ヘキソサミニダーゼ A&B | $GM_2$ ガングリオシド |
| ファブリー病 | α-ガラクトシダーゼ A | グロボシド |
| ゴーシェ病 | グルコセレブロシダーゼ | グルコシルセラミド |
| 異染性白質ジストロフィー症 | アリールスルファターゼ A | スルファチド |
| クラッベ病 | ガラクトシルセラミダーゼ | ガラクトセレブロシド |
| ニーマン・ピック病 Ａ＆Ｂ型 | 酸スフィンゴミエリナーゼ | スフィンゴミエリン |
| ニーマン・ピック病 Ｃ型 | コレステロール エステル化欠損 | スフィンゴミエリン |
| ニーマン・ピック病 Ｄ型 | 不明 | スフィンゴミエリン |
| ファーバー病 | 酸セラミダーゼ | セラミド |
| ウォルマン病 | 酸 リパーゼ | コレステリル エステル |
| ハーラー症候群 (MPS IH) | α-L-イズロニダーゼ | ヘパラン & デルマタン スルフェート |
| シャイエ症候群 (MPS IS) | A-L-イズロニダーゼ | ヘパラン & デルマタン, スルフェート |
| ハーラー・シャイエ (MPS IH/S) | α-L-イズロニダーゼ | ヘパラン & デルマタン スルフェート |
| ハンター症候群 (MPS II) | イズロネート スルファターゼ | ヘパラン & デルマタン スルフェート |

【表１－２】

| | | |
|---|---|---|
| サンフィリッポ 症候群 Ａ型<br>(MPS IIIA) | ヘパラン N-スルファターゼ | ヘパラン<br>スルフェート |
| サンフィリッポ 症候群 Ｂ型<br>(MPS IIIB) | α-N-アセチルグルコサミニダーゼ | ヘパラン<br>スルフェート |
| サンフィリッポ 症候群 Ｃ型<br>(MPS IIIC) | アセチル-CoA-グルコサミニド アセチルトランスフェラーゼ | ヘパラン<br>スルフェート |
| サンフィリッポ 症候群 Ｄ型<br>(MPS IIID) | N-アセチルグルコサミン -6-スルファターゼ | ヘパラン<br>スルフェート |
| モルキオＢ<br>(MPS IVB) | β-ガラクトシダーゼ | カラタン<br>スルフェート |
| マロトー・ラミー<br>(MPS VI) | アリールスルファターゼ B | デルマタン<br>スルフェート |
| スライ症候群<br>(MPS VII) | β-グルクロニダーゼ | |
| α -マンノーシドーシス | α -マンノーシダーゼ | マンノース/<br>オリゴ糖 |
| β -マンノーシドーシス | β-マンノーシダーゼ | マンノース/<br>オリゴ糖 |
| フコシドーシス | α -L-フコシダーゼ | フコシル オリゴ糖 |
| アスパルチルグルコサミン尿症 | N-アスパルチル- β-グルコサミニダーゼ | アスパルチルグルコサミン<br>アスパラギン |
| シアリドーシス （ムコリピドーシス Ⅰ） | Ａ -ノイラミニダーゼ | シアリルオリゴ糖 |
| ガラクトシアリドーシス<br>（ゴールドバーグ症候群） | リソソーム 保護タンパク質 欠損 | シアリルオリゴ糖 |
| シンドラー病 | α -N-アセチル- ガラクトサミニダーゼ | |
| ムコリピドーシス II<br>(I-細胞病) | N-アセチルグルコサミン-1- ホスホトランスフェラーゼ | ヘパランスルフェート |
| ムコリピドーシス III （偽性ハーラーポリジストロフィー） | ML II と同じ | |
| シスチン症 | シスチン輸送タンパク質 | 遊離シスチン |

【表１－３】

| | | |
|---|---|---|
| サラ病 | シアル酸輸送タンパク質 | 遊離シアル酸およびグルクロン酸 |
| 小児性シアル酸蓄積症 | シアル酸輸送 タンパク質 | 遊離シアル酸およびグルクロン酸 |
| 小児性ニューロンセロイド脂褐素沈着症 | パルミトイル-タンパク質チオエステラーゼ | 褐色色素 |
| ムコリピドーシス IV | 不明 | ガラクトシダーゼ&ヒアルロン酸 |
| プロサポシン | サポシン A、B、C または D | |

補充酵素

【００９１】

本発明の方法は、任意の補充酵素を送達するために用いられ得る。本明細書中で用いる場合、本発明に適した補充酵素は、処置されるべきリソソーム蓄積症において欠乏しているかまたは失われているリソソーム酵素の少なくとも一部の活性に取って替わるよう作用し得る任意の酵素を包含し得る。いくつかの実施形態では、補充酵素は、リソソーム中の蓄積物質を低減し得るし、あるいは１つ以上のリソソーム蓄積症症候を救出するかまたは改善し得る。

【００９２】

いくつかの実施形態では、適切な補充酵素は、処置されるべきリソソーム蓄積症に関連づけられることが既知の任意のリソソーム酵素であり得る。いくつかの実施形態では、適切な補充酵素は、上記の表１に列挙された酵素から選択される酵素である。いくつかの実施形態では、本発明に適している補充酵素は、イズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）、アリールスルファターゼ　Ａ（ＡＳＡ）、ヘパランＮ－スルファターゼ（ＨＮＳ）、アルファ－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼ（Ｎａｇｌｕ）またはβ－ガラクトシダーゼ（ＧＬＣ）である。

【００９３】

いくつかの実施形態では、本発明に適している補充酵素は、野生型または天然配列を有し得る。いくつかの実施形態では、本発明に適している補充酵素は、野生型または天然配列と実質的相同性または同一性を有する（例えば、野生型または天然配列との少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％の配列同一性を有する）修飾配列を有し得る。

【００９４】

本発明に適している補充酵素は、任意の利用可能な手段により産生され得る。例えば、補充酵素は、補充酵素コード核酸を発現するよう工学処理された宿主細胞系を利用することにより、組換え的に産生され得る。代替的または付加的には、補充酵素は、内因性遺伝子を活性化することにより産生され得る。代替的または付加的には、補充酵素は、化学合成により、部分的にまたは完全に、調製され得る。代替的または付加的には、補充酵素は、天然供給源からも精製され得る。

【００９５】

酵素が組換え的に産生される場合、任意の発現系が用いられ得る。２～３ではあるが例を挙げると、既知の発現系としては、例えば卵細胞、バキュロウイルス、植物細胞、酵母または哺乳動物細胞が挙げられる。

【００９６】

いくつかの実施形態では、本発明に適している酵素は、哺乳動物中で産生される。本発

明にしたがって用いられ得る哺乳動物細胞の非限定例としては、以下のものが挙げられる：
ＢＡＬＢ／ｃマウス骨髄腫株（ＮＳＯ／１、ＥＣＡＣＣ番号：８５１１０５０３）；ヒト網膜芽細胞（ＰＥＲ．Ｃ６、ＣｒｕＣｅｌｌ，　Ｌｅｉｄｅｎ，　Ｔｈｅ　Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）；ＳＶ４０により形質転換されたサル腎臓ＣＶ１株（ＣＯＳ－７、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１６５１）；ヒト胚性腎臓株（２９３または２９３細胞（懸濁液培養中での増殖のためにサブクローン化）、Ｇｒａｈａｍ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．　Ｇｅｎ　Ｖｉｒｏｌ．，　３６：５９，１９７７）；ヒト繊維肉腫細胞株（例えば、ＨＴ１０８０）；ハムスター幼仔腎細胞（ＢＨＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　１０）；チャイニーズハムスター卵巣細胞＋／－ＤＨＦＲ（ＣＨＯ、Ｕｒｌａｕｂ　ａｎｄ　Ｃｈａｓｉｎ，　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ，　７７：４２１６，　１９８０）；マウスセルトリ細胞（ＴＭ４、Ｍａｔｈｅｒ，　Ｂｉｏｌ．　Ｒｅｐｒｏｄ．，　２３：２４３－２５１，　１９８０）；サル腎細胞（ＣＶ１　ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　７０）；アフリカミドリザル腎細胞（ＶＥＲＯ－７６、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１　５８７）；ヒト子宮頚部癌細胞（ＨｅＬａ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　２）；イヌ腎細胞（ＭＤＣＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　３４）；バッファローラット肝細胞（ＢＲＬ　３Ａ、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１４４２）；ヒト肺細胞（Ｗ１３８、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　７５）；ヒト肝細胞（Ｈｅｐ　Ｇ２、ＨＢ　８０６５）；マウス乳癌（ＭＭＴ　０６０５６２、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ５１）；ＴＲＩ細胞（Ｍａｔｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，　Ａｎｎａｌｓ　Ｎ．Ｙ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．，　３８３：４４－６８，　１９８２）；ＭＲＣ　５細胞；ＦＳ４細胞；およびヒト肝細胞癌株（Ｈｅｐ　Ｇ２）。

【００９７】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、ヒト細胞から産生される補充酵素を送達するために用いられる。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、ＣＨＯ細胞から産生される補充酵素を送達するために用いられる。

【００９８】

いくつかの実施形態では、本発明の方法を用いて送達される補充酵素は、細胞取込みおよび／またはリソソームターゲッティングを助長するために脳細胞の表面の受容体と結合する部分を含有する。例えば、このような受容体は、マンノース－６－ホスフェート（Ｍ６Ｐ）残基を結合する陽イオン非依存性マンノース－６－ホスフェート受容体（ＣＩ－ＭＰＲ）であり得る。さらに、ＣＩ－ＭＰＲは、他のタンパク質、例えばＩＧＦ－ＩＩとも結合する。いくつかの実施形態では、本発明に適している補充酵素は、タンパク質の表面にＭ６Ｐ残基を含有する。いくつかの実施形態では、本発明に適している補充酵素は、ＣＩ－ＭＰＲに対するより高い結合親和性を有するビス－ホスホリル化オリゴ糖を含有し得る。いくつかの実施形態では、適切な酵素は、酵素当たりおよそ少なくとも２０％のビス－ホスホリル化オリゴ糖のほぼ平均まで含有する。他の実施形態では、適切な酵素は、酵素当たり約１０％、１５％、１８％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％のビス－ホスホリル化オリゴ糖を含有し得る。このようなビス－ホスホリル化オリゴ糖は酵素上に天然に存在し得るが、酵素はこのようなオリゴ糖を保有するよう修飾され得る、ということに留意すべきである。例えば、適切な補充酵素は、ＵＤＰ－ＧｌｃＮＡｃからリソソーム酵素上のα－１，２－連結マンノースの６’位置へのＮ－アセチルグルコサミン－Ｌ－ホスフェートの移動を触媒し得るある種の酵素により修飾され得る。このような酵素を産生し、使用するための方法および組成物は、例えば、Ｃａｎｆｉｅｌｄ等により米国特許第６，５３７，７８５号および米国特許第６，５３４，３００号（これらの記載内容は各々、参照により本明細書中に援用される）に記載されている。

【００９９】

いくつかの実施形態では、本発明に用いるための補充酵素は、脳細胞の表面の受容体と結合し得るリソソームターゲッティング部分と共役されるかまたは融合され得る。適切なリソソームターゲッティング部分は、ＩＧＦ－Ｉ、ＩＧＦ－ＩＩ、ＲＡＰ、ｐ９７、なら

びにその変異体、相同体または断片（例えば、野生型成熟ヒトＩＧＦ－Ｉ、ＩＧＦ－ＩＩ、ＲＡＰ、ｐ９７ペプチド配列と少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％または９５％同一な配列を有するペプチド）であり得る。

【０１００】

いくつかの実施形態では、本発明に適している補充酵素は、ＢＢＢを横断し、ＣＮＳ中にこのような作用物質を送達するかまたは輸送するのを増強するよう修飾されていない。

髄腔内送達

【０１０１】

本発明によれば、補充酵素はＣＮＳに送達される。いくつかの実施形態では、処置を必要とする対象の脳脊髄液（ＣＳＦ）中に投与することにより、補充酵素はＣＮＳに送達される。いくつかの実施形態では、髄腔内投与は、ＣＳＦ中への所望の補充酵素を送達するために用いられる。本明細書中で用いる場合、髄腔内投与（髄腔内注射とも呼ばれる）は、脊柱管（脊髄周囲の髄腔内空隙）への注射を指す。種々の技法、例えば穿頭孔あるいは槽または腰椎穿刺等を通した外側脳室注射が用いられ得るが、これらに限定されない。例示的方法は、Ｌａｚｏｒｔｈｅｓ ｅｔ ａｌ．Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｉｎ Ｎｅｕｒｏｓｕｒｇｅｒｙ，１４３－１９２およびＯｍａｙａ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，１：１６９－１７９（これらの記載内容は参照により本明細書中に援用される）に記載されている。

【０１０２】

本発明によれば、酵素は、脊柱管周囲の任意の領域で注射され得る。いくつかの実施形態では、酵素は、腰椎域または大槽中に注射されるか、あるいは脳室空隙中に脳室内注射される。本明細書中で用いる場合、「腰部領域」または「腰椎区域」という用語は、第三および第四腰椎（下方背部）間の区域、さらに包括的には、脊椎のＬ２～Ｓ１領域を指す。典型的には、腰部領域または腰椎区域を介した髄腔内注射は、「腰椎ＩＴ送達」または「腰椎ＩＴ投与」としても言及される。「大槽」という用語は、頭蓋骨と脊椎の上部との間の開口部を介した小脳の周囲および下の空隙を指す。典型的には、大槽を介した髄腔内注射は、「大槽送達」とも呼ばれる。「脳室」という用語は、脊髄の中央管と連続している脳中の空洞を指す。典型的には、脳室腔を介した注射は、脳室内大脳（ＩＣＶ）送達と呼ばれる。

【０１０３】

いくつかの実施形態では、本発明による「髄腔内投与」または「髄腔内送達」は、例えば、第三および第四腰椎（下方背部）間の区域、さらに包括的には、脊椎のＬ２～Ｓ１領域の間に送達される腰椎ＩＴ投与または送達を指す。腰椎ＩＴ投与または送達は、本発明による腰椎ＩＴ投与または送達が遠位脊柱管へのより良好な且つより有効な送達を提供するという点で大槽送達を上回って区別されるが、一方、大槽送達は、特に、典型的には遠位脊柱管に良好に送達しない、ということが意図される。

ＩＴ送達のための安定処方物

【０１０４】

いくつかの実施形態では、所望の酵素は、髄腔内送達のために安定処方物中で送達される。本発明のある実施形態は、少なくとも一部は、本明細書中に開示される種々の処方物が、ＣＮＳの標的化組織、細胞および／または細胞小器官への１つ以上の治療薬（例えば、酵素）の有効な送達および分布を促す、という発見に基づいている。特に、本明細書中に記載される処方物は、高濃度の治療薬（例えば、タンパク質または酵素）を可溶化し得るし、ＣＮＳ構成成分および／または病因を有する疾患の処置のために対象のＣＮＳにこのような治療薬を送達するのに適している。本明細書中に記載される組成物は、それを必要とする対象のＣＮＳに（例えば髄腔内に）投与される場合、安定性改善および耐容性改善によりさらに特性化される。

【０１０５】

本発明の前に、伝統的非緩衝化等張生理食塩水およびエリオットのＢ溶液（人工ＣＳＦ

）が、典型的には髄腔内送達のために用いられた。エリオットのＢ溶液に対するＣＳＦの組成を表す比較は、以下の表２に含まれている。表２に示されているように、エリオットＢ溶液の濃度は、ＣＳＦの濃度と密接に類似している。しかしながら、エリオットのＢ溶液は、極度に低い緩衝剤濃度を含有し、したがって、特に長期間に亘って（例えば、貯蔵状態の間）、治療薬（例えばタンパク質）を安定化するために必要とされる適切な緩衝能力を提供し得ない。さらに、エリオットのＢ溶液は、いくつかの治療薬、特にタンパク質または酵素を送達するよう意図された処方物と非相溶性であり得るある種の塩を含有する。例えば、エリオットのＢ溶液中に存在するカルシウム塩は、タンパク質沈降を媒介し、それにより処方物の安定性を低減し得る。

【表２】

表２

| 溶液 | $Na^+$ mEq/L | $K^+$ mEq/L | $Ca^{++}$ mEq/L | $Mg^{++}$ mEq/L | $HCO3^-$ mEq/L | $Cl^-$ mEq/L | pH | リン mg/L | グルコース mg/L |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CSF | 117-137 | 2.3 | 2.2 | 2.2 | 22.9 | 113-127 | 7.31 | 1.2-2.1 | 45-80 |
| エリオットのＢ溶液 | 149 | 2.6 | 2.7 | 2.4 | 22.6 | 132 | 6.0-7.5 | 2.3 | 80 |

したがって、いくつかの実施形態では、本発明による髄腔内送達に適した処方物は、合成または人工ＣＳＦではない。

【０１０６】

いくつかの実施形態では、髄腔内送達のための処方物は、それらが、それとともに処方される１つ以上の治療薬（例えば、組換えタンパク質）を安定化し、あるいはその分解を遅くするかまたは防止し得るよう、処方されている。本明細書中で用いる場合、「安定な」という用語は、長期間に亘ってその治療効力（例えば、その意図された生物学的活性および／または物理化学的完全性のうちのすべてまたは大多数）を保持する治療薬（例えば、組換え酵素）の能力を指す。治療薬の安定性、ならびにこのような治療薬の安定性を保持する薬学的組成物の能力は、長期間（例えば、好ましくは少なくとも１、３、６、１２、１８、２４、３０、３６ヶ月またはそれ以上）に亘って評価され得る。処方物の状況では、安定処方物は、貯蔵時および加工処理（例えば、凍結／解凍、機械的混合および凍結乾燥）の間、その中の治療薬が本質的にはその物理的および／または化学的完全性ならびに生物学的活性を保持するものである。タンパク質安定性に関しては、それは、高分子量（ＨＭＷ）集合体の形成、酵素活性の損失、ペプチド断片の生成、および電荷プロフィールの移動により測定され得る。

【０１０７】

治療薬の安定性は、特別な重要性を有する。治療薬の安定性は、長期間に亘る治療薬の生物学的活性または物理化学的完全性に関してさらに評価され得る。例えば、所定の時点での安定性は、早い時点（例えば、処方０日目）での安定性に対して、あるいは非処方治療薬に対して比較され得る。この比較の結果は、パーセンテージとして表される。好ましくは、本発明の薬学的組成物は、長期間に亘って（例えば、室温で、または加速貯蔵条件下で、少なくとも６～１２ヶ月間に亘って測定）、治療薬の生物学的活性または物理化学的完全性の少なくとも１００％、少なくとも９９％、少なくとも９８％、少なくとも９７％、少なくとも９５％、少なくとも９０％、少なくとも８５％、少なくとも８０％、少なくとも７５％、少なくとも７０％、少なくとも６５％、少なくとも６０％、少なくとも５５％または少なくとも５０％を保持する。

【０１０８】

いくつかの実施形態では、治療薬（例えば、所望の酵素）は、本発明の処方物中で可溶性である。「可溶性の」という用語は、均質溶液を生成するこのような治療薬の能力を指す。好ましくは、それが投与されそれが標的作用部位（例えば、脳の細胞および組織）に

輸送される溶液中の治療薬の溶解度は、標的作用部位への治療的有効量の治療薬の送達を可能にするのに十分である。いくつかの因子が、治療薬の溶解度に影響を及ぼし得る。例えば、タンパク質溶解度に影響し得る関連因子としては、イオン強度、アミノ酸配列および他の同時可溶化剤または塩（例えば、カルシウム塩）の存在が挙げられる。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、カルシウム塩がこのような組成物から除去されるよう処方される。

【０１０９】

したがって、髄腔内投与に適した処方物は、種々の濃度で当該治療薬（例えば、酵素）を含有し得る。いくつかの実施形態では、適切な処方物は、約３００ｍｇ／ｍｌまで（例えば、約２５０ｍｇ／ｍｌまで、２００ｍｇ／ｍｌまで、１５０ｍｇ／ｍｌまで、１００ｍｇ／ｍｌまで、９０ｍｇ／ｍｌまで、８０ｍｇ／ｍｌまで、７０ｍｇ／ｍｌまで、６０ｍｇ／ｍｌまで、５０ｍｇ／ｍｌまで、４０ｍｇ／ｍｌまで、３０ｍｇ／ｍｌまで、２５ｍｇ／ｍｌまで、２０ｍｇ／ｍｌまで、１０ｍｇ／ｍｌまで）の濃度で当該タンパク質または酵素を含有し得る。いくつかの実施形態では、適切な処方物は、約０～３００ｍｇ／ｍｌ（例えば、約１～２５０ｍｇ／ｍｌ、約１～２００ｍｇ／ｍｌ、約１～１５０ｍｇ／ｍｌ、約１～１００ｍｇ／ｍｌ、約１０～１００ｍｇ／ｍｌ、約１０～８０ｍｇ／ｍｌ、約１０～７０ｍｇ／ｍｌ、約１～６０ｍｇ／ｍｌ、約１～５０ｍｇ／ｍｌ、約１０～１５０ｍｇ／ｍｌ、約１～３０ｍｇ／ｍｌ）の間の範囲の濃度で当該タンパク質または酵素を含有し得る。いくつかの実施形態では、髄腔内送達に適した処方物は、およそ１ｍｇ／ｍｌ、３ｍｇ／ｍｌ、５ｍｇ／ｍｌ、１０ｍｇ／ｍｌ、１５ｍｇ／ｍｌ、２０ｍｇ／ｍｌ、２５ｍｇ／ｍｌ、５０ｍｇ／ｍｌ、７５ｍｇ／ｍｌ、１００ｍｇ／ｍｌ、１５０ｍｇ／ｍｌ、２００ｍｇ／ｍｌ、２５０ｍｇ／ｍｌまたは３００ｍｇ／ｍｌの濃度で、当該タンパク質を含有し得る。

【０１１０】

いくつかの実施形態では、等張溶液が用いられる。いくつかの実施形態では、わずかに高張性の溶液（例えば、５ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ７．０）中に、３００ｍＭまで（例えば、２５０ｍＭまで、２００ｍＭ、１７５ｍＭ、１５０ｍＭ、１２５ｍＭまで）の塩化ナトリウム）および糖含有溶液（例えば、５ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ７．０）中に３％まで（例えば、２．４％、２．０％、１．５％、１．０％まで）のスクロース）は、サルにおいて良好に耐容されることが実証されている。いくつかの実施形態では、適切なＣＮＳボーラス処方物組成物は、生理食塩水（水中１５０ｍＭのＮａＣｌ）である。

【０１１１】

多数の治療薬、特に本発明のタンパク質および酵素は、本発明の薬学的組成物中でそれらの溶解性および安定性を保持するために、制御されたｐＨおよび特定の賦形剤を要する。以下の表３は、本発明のタンパク質治療薬の溶解性および安定性を保持するために重要であるとみなされるタンパク質処方物のある例示的態様を確認するのに役立つ。

【表３】

表３

| パラメーター | 典型的範囲／型 | 論理的根拠 |
|---|---|---|
| pH | 5 to 7.5 | 安定性のため<br>時々、溶解性のためでもある |
| 緩衝剤の種類 | 酢酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、ヒスチジン、リン酸塩またはトリス | 最適ｐＨを保持するため<br>安定性に影響を及ぼすこともある |
| 緩衝剤濃度 | 5-50 mM | ｐＨを保持するため<br>イオン強度を安定化するかまたは付加することもある |
| 等張化剤 | NaCl、糖、マンニトール | 等張または等張溶液にさせるため |
| 界面活性剤 | ポリソルベート 20、ポリソルベート 80 | 界面および剪断に対して安定化するため |
| その他 | アミノ酸(例えば、アルギニン)、数十～数百ｍＭ | 溶解性または安定性を増強するため |

【０１１２】

薬学的組成物のｐＨは、水性薬学的組成物中の治療薬（例えば、酵素またはタンパク質）の溶解度を変更し得る付加的因子である。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物は、１つ以上の緩衝剤を含有する。いくつかの実施形態では、本発明による組成物は、約４．０～８．０、約５．０～７．５、約５．５～７．０、約６．０～７．０および約６．０～７．５の間の上記組成物の最適ｐＨを保持するのに十分な量の緩衝剤を含有する。他の実施形態では、緩衝液は、約５０ｍＭまで（例えば、約４５ｍＭ、４０ｍＭ、３５ｍＭ、３０ｍＭ、２５ｍＭ、２０ｍＭ、１５ｍＭ、１０ｍＭ、５ｍＭまで）のリン酸ナトリウムを含む。適切な緩衝剤としては、例えば酢酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、リン酸塩、他の有機酸およびトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（“トリス”）が挙げられる。適切な緩衝剤の濃度は、例えば、緩衝剤および処方物の所望の等張性によって、約１ｍＭから約１００ｍＭまで、または約３ｍＭから約２０ｍＭまでであり得る。いくつかの実施形態では、適切な緩衝剤は、約１ｍＭ、５ｍＭ、１０ｍＭ、１５ｍＭ、２０ｍＭ、２５ｍＭ、３０ｍＭ、３５ｍＭ、４０ｍＭ、４５ｍＭ、５０ｍＭ、５５ｍＭ、６０ｍＭ、６５ｍＭ、７０ｍＭ、７５ｍＭ、８０ｍＭ、８５ｍＭ、９０ｍＭ、９５ｍＭまたは１００ｍＭの濃度で存在する。

【０１１３】

いくつかの実施形態では、処方物は、処方物を等張に保つために等張剤を含有する。ＩＴ送達と結びつけて用いられる場合、「等張の」とは、当該処方物が本質的にはヒトＣＳＦと同じ等張性を有することを意味する。等張処方物は、一般的に、約２４０ｍＯｓｍ／ｋｇ～約３５０ｍＯｓｍ／ｋｇの浸透圧を有する。等張度は、例えば、蒸気圧または凝固点型浸透圧計を用いて測定され得る。例示的等張剤としては、グリシン、ソルビトール、マンニトール、塩化ナトリウムおよびアルギニンが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、適切な等張剤は、約０．０１～５重量％（例えば、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または５．０重量％）の濃度で、処方物中に存在し得る。

【０１１４】

いくつかの実施形態では、処方物は、タンパク質を保護するために安定化剤を含有し得る。典型的には、適切な安定化剤は、非還元糖、例えばスクロース、ラフィノース、トレハロース、またはアミノ酸、例えばグリシン、アルギニンおよびメチオニンである。処方物中の安定化財の量は、一般的に、処方物が等張であるような量である。しかしながら、高張処方物も適切であり得る。さらに、安定化剤の量は、治療薬の許容不可能な量の分解

／凝集が起きるほど低すぎてはならない。処方物中の安定化剤の濃度の例は、約１ｍＭ～約４００ｍＭ（例えば、約３０ｍＭ～約３００ｍＭ、および約５０ｍＭ～約１００ｍＭ）、あるいは０．１～１５重量％（例えば、１～１０重量％、５～１５重量％、５～１０重量％）の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、安定化剤と治療薬の質量比は、約１：１である。他の実施形態では、安定化剤と治療薬の質量比は、約０．１：１、０．２：１、０．２５：１、０．４：１、０．５：１、１：１、２：１、２．６：１、３：１、４：１、５：１、１０；１、ｏｒ　２０：１であり得る。凍結乾燥に適切であるいくつかの実施形態では、安定化剤はリオプロテクタントでもある。

【０１１５】

本発明の薬学的組成物、処方物および関連方法は、対象のＣＮＳに種々の治療薬を（例えば、髄腔内、脳室内または槽内に）送達するために、ならびに関連疾患の処置のために有用である。本発明の薬学的組成物は、リソソーム蓄積症に罹患している対象にタンパク質および酵素を送達するために特に有用である。

【０１１６】

いくつかの実施形態では、処方物に界面活性剤を付加することが望ましい。界面活性剤の例としては、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート２０または８０）；ポロキサマー（例えば、ポロキサマー１８８）；トリトン；ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）；ラウリル硫酸ナトリウム；ナトリウムオクチルグリコシド；ラウリル－、ミリスチル－、リノレイル－またはステアリル－スルホベタイン；ラウリル－、ミリスチル－、リノレイル－またはステアリル－サルコシン；リノレイル－、ミリスチル－またはセチル－ベタイン；ラウロアミドプロピル－、コカミドプロピル－、リノレアミドプロピル－、ミリスタミドプロピル－、パルミドプロピル－またはイソステアラミドプロピル－ベタイン（例えば、ラウロアミドプロピル）；ミリスタルニドプロピル－、パルミドプロピル－またはイソステアラミドプロピル－ジメチルアミン；ナトリウムメチルココイル－または二ナトリウムメチルオフェイル－タウレート；およびＭＯＮＡＱＵＡＴ（商標）シリーズ（Ｍｏｎａ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ，　Ｉｎｃ．，　Ｐａｔｅｒｓｏｎ，　Ｎ．Ｊ．）、ポリエチルグリコール、ポリプロピルグリコール、ならびにエチレンおよびプロピレングリコールのコポリマー（例えば、プルロニック、ＰＦ６８等）が挙げられる。典型的には、付加される界面活性剤の量は、それがタンパク質の凝集を低減し、粒子の形成または泡立ちを最小限にするような量である。例えば、界面活性剤は、約０．００１～０．５％（例えば、約０．００５～０．０５％または０．００５～０．０１％）の濃度で処方物中に存在し得る。特に、界面活性剤は、約０．００５％、０．０１％、０．０２％、０．１％、０．２％、０．３％、０．４％または０．５％等の濃度で処方物中に存在し得る。

【０１１７】

いくつかの実施形態では、適切な処方物は、特に凍結乾燥処方物のために、１つ以上のバルク剤をさらに含み得る。「バルク剤」は、凍結乾燥混合物に質量を付加し、凍結乾燥ケークの物理的構造に寄与する。例えばバルク剤は、凍結乾燥ケークの外観を改良し得る（例えば、本質的に均一な凍結乾燥ケーク）。適切なバルク剤の例としては、塩化ナトリウム、ラクトース、マンニトール、グリシン、スクロース、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプンが挙げられるが、これらに限定されない。バルク剤の濃度の例は、約１％～約１０％（例えば、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％および１０．０％）である。

【０１１８】

本発明による処方物は、品質分析、再構成時間（凍結乾燥された場合）、再構成の質（凍結乾燥された場合）、高分子量、水分およびガラス転移温度に基づいて評価され得る。典型的には、タンパク質の質および生成物分析は、例えば、サイズ排除ＨＰＬＣ（ＳＥ－ＨＰＬＣ）、陽イオン交換－ＨＰＬＣ（ＣＥＸ－ＨＰＬＣ）、Ｘ線回析（ＸＲＤ）、変調型示差走査熱量測定（ｍＤＳＣ）、逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）、多角度光散乱（ＭＡＬＳ）、蛍光、紫外線吸収、ネフェロメトリー、毛細管電気泳動（ＣＥ）、ＳＤＳ－Ｐ

ＡＧＥおよびその組合せ（これらに限定されない）を含めた方法を用いる生成物分解率分析を包含する。いくつかの実施形態では、本発明による生成物の評価は、外観（液体またはケーク外観）を評価するステップを含む。

【０１１９】

一般的に、処方物（凍結乾燥化または水性）は、室温で長期間保存され得る。貯蔵温度は、典型的には、０℃～４５℃（例えば、４℃、２０℃、２５℃、４５℃等）の範囲であり得る。処方物は、吸うかげる～数年の間貯蔵され得る。貯蔵時間は、一般的に、２４ヶ月、１２ヶ月、６ヶ月、４．５ヶ月、３ヶ月、２ヶ月または１ヶ月である。処方物は、投与のために用いられる容器中に直接貯蔵されて、移送ステップを排除し得る。

【０１２０】

処方物は、凍結乾燥容器（凍結乾燥される場合）中に直接貯蔵され得るが、これは、再構成容器としても機能して、移送ステップを排除し得る。代替的には、凍結乾燥物質処方物は、貯蔵のためにより小さい増分で測定され得る。貯蔵は、一般的に、タンパク質の分解を生じさせる環境、例えば日光、紫外線他の形態の電磁放射線、過剰な熱または寒冷、休息名熱ショック、ならびに機械的衝撃への曝露（これらに限定されない）を避けるべきである。

【０１２１】

いくつかの実施形態では、本発明による処方物は、液体または水性形態である。いくつかの実施形態では、本発明の処方物は凍結乾燥される。このような凍結乾燥処方物は、対象への投与の前に、それに１つ以上の希釈剤を付加することにより、再構成され得る。適切な希釈剤としては、滅菌水、注射用静菌性水および滅菌生理食塩溶液が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、再構成時、そこに含有される治療薬は安定で、可溶性であり、そして対象への投与時に耐容性を実証する。

【０１２２】

本発明の薬学的組成物は、それらの耐容性により特性化される。本明細書中で用いる場合、「耐容可能な」および「耐容性」という用語は、このような組成物が投与される対象において悪反応を引き出さないか、代替的には、このような組成物が投与される対象において重篤な悪反応を引き出さない本発明の薬学的組成物の能力を指す。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物は、このような組成物が投与される対象により良好に耐容される。

髄腔内送達のための装置

【０１２３】

本発明による髄腔内送達のために、種々の装置が用いられ得る。いくつかの実施形態では、髄腔内投与のための装置は、流体接触ポート（例えば注射用口）；流体接触ポートと流体連絡する第一流出口、および脊髄中への挿入のために設計された第二流出口；ならびに脊髄における中空体の挿入を固定するための固定機構を含有する。図１に示した非限定例として、適切な固定機構は、中空体の表面に載せられる１つ以上のノブ、および１つ以上のノブを覆って、中空体が脊髄から滑り落ちないようにする調整可能な縫合リングを含有する。種々の実施形態では、流体接触ポートはリザーバを含む。いくつかの実施形態では、流体接触ポートは、機械式ポンプ（例えば、注入ポンプ）を含む。いくつかの実施形態では、埋込みカテーテルは、リザーバ（例えば、ボーラス送達のため）または注入ポンプと連結される。流体接触ポートは、埋め込まれるかまたは外側に存在し得る。

【０１２４】

いくつかの実施形態では、髄腔内投与は、腰椎穿刺（すなわち、緩徐ボーラス投与）により、またはポート・カテーテル送達系（すなわち注入またはボーラス投与）を介して実施され得る。いくつかの実施形態では、カテーテルは腰椎の薄板間に挿入され、尖端は、包膜空隙に所望のレベル（一般的にＬ３～Ｌ４）に装填される（図２）。

【０１２５】

静脈内投与に比して、髄腔内投与に適した単回用量投与容積は典型的に小さい。典型的には、本発明による髄腔内送達は、ＣＳＦの組成の平衡、ならびに対象の頭蓋内圧を保持

する。いくつかの実施形態では、髄腔内送達は、対象からのＣＳＦの対応する除去がない時に実施される。いくつかの実施形態では、適切な単回用量投与容積は、例えば約１０ｍｌ、８ｍｌ、６ｍｌ、５ｍｌ、４ｍｌ、３ｍｌ、２ｍｌ、１．５ｍｌ、１ｍｌまたは０．５ｍｌ未満であり得る。いくつかの実施形態では、適切な単回用量投与容積は、約０．５～５ｍｌ、０．５～４ｍｌ、０．５～３ｍｌ、０．５～２ｍｌ、０．５～１ｍｌ、１～３ｍｌ、１～５ｍｌ、１．５～３ｍｌ、１～４ｍｌまたは０．５～１．５ｍｌであり得る。いくつかの実施形態では、本発明による髄腔内送達は、所望量のＣＳＦを除去するステップを最初に包含する。いくつかの実施形態では、約１０ｍｌ未満（例えば、約９ｍｌ、８ｍｌ、７ｍｌ、６ｍｌ、５ｍｌ、４ｍｌ、３ｍｌ、２ｍｌ、１ｍｌ未満）のＣＳＦが先ず除去された後、ＩＴ投与がなされる。それらの場合、適切な単回用量投与容積は、例えば約３ｍｌ、４ｍｌ、５ｍｌ、６ｍｌ、７ｍｌ、８ｍｌ、９ｍｌ、１０ｍｌ、１５ｍｌまたは２０ｍｌより大きい。

【０１２６】

治療用組成物の髄腔内投与を実行するために、種々の他の装置が用いられ得る。例えば、所望の酵素を含有する処方物は、髄膜癌腫症のための薬剤を髄腔内投与するために一般に用いられるオンマヤ（Ｏｍｍａｙａ）リザーバを用いて投与され得る（Ｌａｎｃｅｔ２：　９８３－８４，　１９６３）。さらに具体的には、この方法では、脳室チューブは前角中に形成される穴を通して挿入され、頭皮下に設置されるオンマヤリザーバに連結され、リザーバは皮下穿刺されて、リザーバ中に注入される補充されるべき特定酵素を髄腔内送達する。個体への治療用組成物または処方物の髄腔内投与のための他の装置は、米国特許第６，２１７，５５２号明細書（この記載内容は参照により本明細書中に援用される）に記載されている。代替的には、薬剤は、例えば単回注射または連続注入により、髄腔内投与され得る。投薬処置は、単回用量投与または多数回用量投与の一形態であり得る、と理解されるべきである。

【０１２７】

注射のためには、本発明の処方物は、液体溶液中に処方され得る。さらに、酵素は固体形態で処方され、使用直前に再溶解または懸濁され得る。凍結乾燥形態も包含される。注射は、例えば、酵素のボーラス注射または連続注入（例えば、注入ポンプを用いる）の形態であり得る。

【０１２８】

本発明の一実施形態では、酵素は、対象の脳への外側脳室注射により投与される。注射は、例えば、対象の頭蓋骨に作られる穿頭孔を通してなされ得る。別の実施形態では、酵素および／または他の薬学的処方物は、対象の脳室中に外科的に挿入されるシャントを通して投与される。例えば、注射は、より大きい外側脳室中になされ得る。いくつかの実施形態では、より小さい第三および第四脳室への注射もなされ得る。

【０１２９】

さらに別の実施形態では、本発明に用いられる薬学的組成物は、対象の大槽または腰椎区域への注射により投与される。

【０１３０】

本発明の方法の別の実施形態では製薬上許容可能な処方物は、製薬上許容可能な処方物が対象に投与された後、少なくとも１、２、３、４週間またはそれ以上の間、対象に、本発明で用いられる酵素または他の薬学的組成物の持続性送達、例えば「緩徐放出」を提供する。

【０１３１】

本明細書中で用いる場合、「持続性送達」という用語は、投与後、長期間に亘って、好ましくは少なくとも数日間、１週間または数週間、ｉｎ　ｖｉｖｏで本発明の薬学的処方物を連続送達することを指す。組成物の持続性送達は、例えば、長時間に亘る酵素の連続治療効果により実証され得る（例えば、酵素の持続性送達は、対象における貯蔵顆粒の量の連続的低減により実証され得る）。代替的には、酵素の持続性送達は、長時間に亘るｉｎ　ｖｉｖｏでの酵素の存在を検出することにより実証され得る。

標的組織への送達

【０１３２】

上記のように、本発明の意外な且つ重要な特徴の１つは、本発明の方法を用いて投与される治療薬、特に補充酵素、ならびに本発明の組成物は、脳表面全体に効果的に且つ広範囲に拡散し、脳の種々の層または領域、例えば深部脳領域に浸透し得る、という点である。さらに、本発明の方法および本発明の組成物は、現存するＣＮＳ送達方法、例えばＩＣＶ注射では標的化するのが困難である脊髄の出の組織、ニューロンまたは細胞、例えば腰部領域に治療薬（例えば、補充酵素）を効果的に送達する。さらに、本発明の方法および組成物は、血流ならびに種々の末梢器官および組織への十分量の治療薬（例えば、補充酵素）を送達する。

【０１３３】

したがって、いくつかの実施形態では、治療用タンパク質（例えば、補充酵素）は、対象の中枢神経系に送達される。いくつかの実施形態では、治療用タンパク質（例えば、補充酵素）は、脳、脊髄および／または末梢期間の標的組織のうちの１つ以上に送達される。本明細書中で用いる場合、「標的組織」という用語は、処置されるべきリソソーム蓄積症により影響を及ぼされる任意の組織、あるいは欠損リソソーム酵素が正常では発現される任意の組織を指す。いくつかの実施形態では、標的組織としては、リソソーム蓄積症に罹患しているかまたは罹患しやすい患者において、例えば組織の細胞リソソーム中に貯蔵される酵素基質が検出可能量でまたは異常に高い量で存在する組織が挙げられる。いくつかの実施形態では、標的組織としては、疾患関連病態、症候または特徴を示す組織が挙げられる。いくつかの実施形態では、標的組織としては、欠損リソソーム酵素が抗レベルで正常では発現される組織が挙げられる。本明細書中で用いる場合、標的組織は、脳標的組織、脊髄標的組織および／または末梢標的組織であり得る。標的組織の例は、以下で詳細に記載される。

脳標的組織

【０１３４】

概して、脳は、異なる領域、層および組織に分けられ得る。例えば、髄膜組織は、脳を含めた中枢神経系を包む膜系である。髄膜は、３つの層、例えば硬膜、クモ膜および軟膜を含有する。概して、髄膜の、ならびに脳脊髄液の主な機能は、脳神経系を保護することである。いくつかの実施形態では、本発明による治療用タンパク質は、髄膜の１つ以上の層に送達される。

【０１３５】

脳は、大脳、小脳および脳幹を含めた３つの主な細区画を有する。大脳半球は、ほとんどの他の脳構造の上に位置し、皮質層で覆われている。大脳の下層には脳幹が横たわり、これは茎に似ており、その上に大脳が取り付けられている。脳の後部、大脳の下および脳幹の背後には、小脳が存在する。

【０１３６】

脳の正中線近くおよび中脳の上に位置する間脳は、視床、視床後部、視床下部、視床上部、腹側視床および視蓋腹部を含有する。中脳（ｍｅｓｅｎｃｅｐｈａｌｏｎ）は、ｍｉｄｂｒａｉｎとも呼ばれ、視蓋、外被、ｖｅｎｔｒｉｃｕｌａｒ　ｍｅｓｏｃｏｅｌｉａ、ならびに大脳脚、赤核および第三脳神経核を含有する。中脳は、視覚、聴覚、運動制御、睡眠／覚醒、警戒および温度調節に関連する。

【０１３７】

脳を含めた中枢神経系の組織の領域は、組織の深さに基づいて特性化され得る。ＣＮＳ（例えば脳）組織は、表面組織または浅部組織、中深部組織および／または深部組織として特性化され得る。

【０１３８】

本発明によれば、治療用タンパク質（例えば、補充酵素）は、対象において処置されるべき特定疾患に関連した任意の適切な脳標的組織（単数または複数）に送達され得る。いくつかの実施形態では、本発明による治療用タンパク質（例えば、補充酵素）は、表面お

よび浅在脳標的組織に送達される。いくつかの実施形態では、本発明による治療用タンパク質は、中深部脳標的組織に送達される。いくつかの実施形態では、本発明による治療用タンパク質は、深部脳標的組織に送達される。いくつかの実施形態では、本発明による治療用タンパク質は、表面または浅在脳標的組織、中深部脳標的組織および／または深部脳標的組織の組合せに送達される。いくつかの実施形態では、本発明による治療用タンパク質は、脳の外表面の少なくとも４ｍｍ、５ｍｍ、６ｍｍ、７ｍｍ、８ｍｍ、９ｍｍ、１０ｍｍまたはそれより下（または内側）の深部脳組織に送達される。

【０１３９】

いくつかの実施形態では、治療薬（例えば酵素）は、大脳の１つ以上の表面組織または浅部組織に送達される。いくつかの実施形態では、大脳の標的化表面組織または浅部組織は、大脳の表面から４ｍｍ内に位置する。いくつかの実施形態では、大脳の標的化表面組織または浅部組織は、軟膜組織、大脳皮質リボン組織、海馬、フィルヒョー・ロバン腔隙、ＶＲ腔隙内の血管、海馬、脳の下面の視床下部の部分、視神経および視索、嗅球および嗅突起ならびにその組合せから選択される。

【０１４０】

いくつかの実施形態では、治療薬（例えば酵素）は、大脳の１つ以上の深部組織に送達される。いくつかの実施形態では、大脳の標的化表面組織または浅部組織は、大脳の表面から４ｍｍより下（例えば、５ｍｍ、６ｍｍ、７ｍｍ、８ｍｍ、９ｍｍまたは１０ｍｍ）に位置する。いくつかの実施形態では、大脳の標的化深部組織は、大脳皮質リボンを包含する。いくつかの実施形態では、大脳の標的化深部組織は、間脳（例えば、視床下部、視床、腹側視床および視床腹部等）、後脳、レンズ核、基底核、尾状核、被核、扁桃、淡蒼球およびその組合せのうちの１つ以上を包含する。

【０１４１】

いくつかの実施形態では、治療薬（例えば酵素）は、小脳の１つ以上の組織に送達される。ある実施形態では、小脳の１つ以上の標的化組織は、分子層の組織、プルキンエ細胞層の組織、顆粒細胞層の組織、小脳脚およびその組合せからなる群より選択される。いくつかの実施形態では、治療薬（例えば酵素）は、小脳の１つ以上の深部組織、例えばプルキンエ細胞層の組織、顆粒細胞層の組織、深部小脳白質組織（例えば、顆粒細胞層に比して深部）および深部小脳核組織（これらに限定されない）に送達される。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、治療薬（例えば酵素）は、脳幹の１つ以上の組織に送達される。いくつかの実施形態では、脳幹の１つ以上の標的化組織は、脳幹白質組織および／または脳幹核組織を包含する。

【０１４３】

いくつかの実施形態では、治療薬（例えば酵素）は、種々の脳組織、例えば灰白質、白質、脳室周囲域、軟膜－クモ膜、髄膜、新皮質、小脳、大脳皮質の深部組織、分子層、尾状核／被殻領域、中脳、脳橋または延髄の深部領域、およびその組合せ（これらに限定されない）に送達される。

【０１４４】

いくつかの実施形態では、治療薬（例えば酵素）は、脳中の種々の細胞、例えばニューロン、グリア細胞、血管周囲細胞および／または髄膜細胞（これらに限定されない）に送達される。いくつかの実施形態では、治療用タンパク質は、深部白質の乏突起グリア細胞に送達される。

脊髄

【０１４５】

概して、脊髄の領域または組織は、組織の深度に基づいて特性化され得る。例えば、脊髄組織は、表面組織または浅部組織、中深部組織、および／または深部組織として特性化され得る。

【０１４６】

いくつかの実施形態では、治療薬（例えば酵素）は、脊髄の１つ以上の表面組織または

浅部組織に送達される。いくつかの実施形態では、脊髄の標的化表面組織または浅部組織は、脊髄の表面から４ｍｍ内に位置する。いくつかの実施形態では、脊髄の標的化表面組織または浅部組織は、軟膜および／または白質路を含有する。

【０１４７】

いくつかの実施形態では、治療薬（例えば酵素）は、脊髄の１つ以上の深部組織に送達される。いくつかの実施形態では、脊髄の標的化深部組織は、脊髄の表面から４ｍｍ内部に位置する。いくつかの実施形態では、脊髄の標的化深部組織は、脊髄灰白質および／または上衣細胞を含有する。

【０１４８】

いくつかの実施形態では、治療薬（例えば酵素）は、脊髄のニューロンに送達される。

末梢標的組織

【０１４９】

本明細書中で用いる場合、末梢器官または組織は、中枢神経系（ＣＮＳ）の一部ではない任意の器官または組織を指す。末梢標的組織としては、血管系、肝臓、腎臓、心臓、内皮、骨髄および骨髄由来細胞、脾臓、肺、リンパ節、骨、軟骨、卵巣および精巣が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本発明による治療用タンパク質（例えば補充酵素）は、末梢標的組織のうちの１つ以上に送達される。

生体分布および生物学的利用能

【０１５０】

種々の態様において、標的組織に一旦送達されると、治療薬（例えば補充酵素）は、細胞内に局在化される。例えば、治療薬（例えば酵素）は、標的細胞（例えば、プルキンエ細胞のようなニューロン）のエキソン、軸索、リソソーム、ミトコンドリアまたは空胞に局在化され得る。例えば、いくつかの実施形態では、髄腔内投与酵素は、酵素が血管周囲腔隙内に移動するよう（例えば、拍動補助対流機構により）、移動力学を実証する。さらに、投与タンパク質または酵素と神経細繊維との会合に関する活性軸索輸送機構も、中枢神経系の深部組織中への、髄腔内投与タンパク質または酵素の分布に寄与し得るし、そうでなければそれを助長し得る。

【０１５１】

いくつかの実施形態では、本発明に従って送達される治療薬（例えば補充酵素）は、本明細書中に記載される種々の標的組織において、治療的または臨床的有効レベルまたは活性を達成し得る。本明細書中で用いる場合、治療的または臨床的有効レベルまたは活性は、標的組織において治療作用を付与するのに十分なレベルまたは活性である。治療作用は、客観的（すなわち、何らかの試験またはマーカーにより測定）または主観的（すなわち、対象が作用の指標または感覚を提示する）であり得る。例えば、治療的または臨床的有効レベルまたは活性は、標的組織における疾患に伴う症候（例えば、ＧＡＧ貯蔵）を改善するのに十分である酵素レベルまたは活性であり得る。

【０１５２】

いくつかの実施形態では、本発明に従って送達される治療薬（例えば補充酵素）は、標的組織における対応するリソソーム酵素の正常レベルまたは活性の少なくとも５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％である酵素レベルまたは活性を達成し得る。いくつかの実施形態では、本発明に従って送達される治療薬（例えば補充酵素）は、対照（例えば、処置を伴わない内因性レベルまたは活性）と比較して、少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍または１０倍増大される酵素レベルまたは活性を達成し得る。いくつかの実施形態では、本発明に従って送達される治療薬（例えば補充酵素）は、標的組織中で、少なくとも約１０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、２０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、４０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、５０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、６０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、７０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、８０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、９０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、１００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、１５０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、２００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、２５０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、３００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、３５０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、４００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、４５０ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、５００

ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、５５０ｎｍｏｌ／時・ｍｇまたは６００ｎｍｏｌ／時・ｍｇの酵素レベルまたは活性増大を達成し得る。

【０１５３】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、腰部領域を標的化するために特に有用である。いくつかの実施形態では、本発明に従って送達される治療薬（例えば補充酵素）は、少なくとも約５００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、６００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、７００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、８００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、９００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、１０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、１５００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、２０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、３０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、４０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、５０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、６０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、７０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、８０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇ、９０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇまたは１０，０００ｎｍｏｌ／時・ｍｇの腰部領域における酵素レベルまたは活性増大を達成し得る。

【０１５４】

概して、本発明に従って送達される治療薬（例えば補充酵素）は、ＣＳＦならびに脳、脊髄および末梢器官の標的組織中で十分に長い半減期を有する。いくつかの実施形態では、本発明に従って送達される治療薬（例えば補充酵素）は、少なくとも約３０分、４５分、６０分、９０分、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１２時間、１６時間、１８時間、２０時間、２５時間、３０時間、３５時間、４０時間、３日まで、７日まで、１４日まで、２１日まで、または１ヶ月までの半減期を有し得る。いくつかの実施形態では、本発明に従って送達される治療薬（例えば補充酵素）は、投与の１２時間、２４時間、３０時間、３６時間、４２時間、４８時間、５４時間、６０時間、６６時間、７２時間、７８時間、８４時間、９０時間、９６時間、１０２時間または１週間後に、ＣＳＦまたは血流中に検出可能なレベルまたは活性を保持し得る。検出可能なレベルまたは活性は、当該技術分野で既知の種々の方法を用いて決定され得る。

【０１５５】

ある実施形態では、本発明に従って送達される治療薬（例えば補充酵素）は、投与後（例えば、対象への薬学的組成物の髄腔内投与の、１週間、３日、４８時間、３６時間、２４時間、１８時間、１２時間、８時間、６時間、４時間、３時間、２時間、１時間、３０分後、またはそれ未満の後）、対象のＣＮＳ組織および細胞中で、少なくとも３０μｇ／ｍｌの濃度を達成する。ある実施形態では、本発明に従って送達される治療薬（例えば補充酵素）は、対象の標的化組織または細胞（例えば、脳組織またはニューロン）中で、このような対象への投与後（例えば、対象へのこのような薬学的組成物の髄腔内投与の、１週間、３日、４８時間、３６時間、２４時間、１８時間、１２時間、８時間、６時間、４時間、３時間、２時間、１時間、３０分後、またはそれ未満の後）、少なくとも２０μｇ／ｍｌ、少なくとも１５μｇ／ｍｌ、少なくとも１０μｇ／ｍｌ、少なくとも７．５μｇ／ｍｌ、少なくとも５μｇ／ｍｌ、少なくとも２．５μｇ／ｍｌ、少なくとも１．０μｇ／ｍｌまたは少なくとも０．５μｇ／ｍｌの濃度を達成する。

髄腔内投与によるリソソーム蓄積症の処置

【０１５６】

リソソーム蓄積症は、リソソーム機能の欠陥に起因するかなり稀な遺伝性代謝障害の一群を表す。リソソーム症は、リソソーム内の酵素基質を含めた未消化高分子物質の蓄積（表１参照）により特性化され、これが、このようなリソソームのサイズおよび数の増大を、そして最終的には細胞機能不全および臨床的異常を生じる。

【０１５７】

本明細書中に記載される本発明の方法は、標的化細胞小器官への１つ以上の治療薬（例えば、１つ以上の補充酵素）の送達を有益に助長し得る。例えば、ハンター症候群のようなリソソーム蓄積症は罹患細胞のリソソーム中のグリコサミノグリカン（ＧＡＧ）の蓄積により特性化されるため、リソソームは、リソソーム蓄積障害の処置のための所望の標的細胞小器官を表す。

【０１５８】
本発明の方法および組成物は、ＣＮＳ病因または構成成分を有する疾患を処置するために特に有用である。ＣＮＳ病因または構成成分を有するリソソーム蓄積症としては、例えばサンフィリッポ症候群Ａ型、サンフィリッポ症候群Ｂ型、ハンター症候群、異染性白質ジストロフィー症およびグロボイド細胞白質ジストロフィー症が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の前に、伝統的療法は、対象に静脈内投与されることに限定されており、一般的には、根元的酵素欠乏症の体細胞性症候を処置するに際して有効であるに過ぎない。本発明の組成物および方法は、このようなＣＮＳ病因を有する疾患に罹患している対象のＣＮＳ中に直接、有益に投与され、それによりＣＮＳ（例えば脳）の罹患細胞および組織内の治療的濃度を達成し、したがって、このような治療薬の伝統的全身投与に伴う制限を克服し得る。

【０１５９】
いくつかの実施形態では、本発明の方法および組成物は、リソソーム蓄積障害の神経学的および体細胞性後遺症または症候群の両方を処置するために有用である。例えば、本発明のいくつかの実施形態は、ＣＮＳまたは神経学的後遺症ならびにリソソーム蓄積症の書状発現の処置のために、対象のＣＮＳに１つ以上の治療薬を送達する（例えば、髄腔内、静脈内または槽内に）組成物および方法に関するが、一方、そのリソソーム蓄積症の全身性または体細胞性症状発現も処置するためでもある。例えば、本発明のいくつかの組成物は、対象に髄腔内投与され、それにより、対象のＣＮＳに１つ以上の治療薬を送達して、神経学的後遺症を処置し、それと対になって、全身循環の細胞および組織（例えば、心臓、肺、肝臓、腎臓またはリンパ節の細胞および組織）の両方にこのような治療薬を送達するために１つ以上の治療薬を静脈内投与し、それにより体細胞性後遺症を処置する。例えば、リソソーム蓄積症（例えばハンター症候群）を有するか、そうでなければ影響を及ぼされる対象は、１つ以上の治療薬（例えば、イズロン酸－２－スルファターゼ）を含む薬学的組成物を、神経学的後遺症を処置するために、少なくとも週１回、２週間に１回、月１回、２ヶ月に１回またはそれ以上、髄腔内投与され得るが、一方、異なる治療薬は、当該疾患の全身性または体細胞性症状発現を処置するために、より高頻度ベースで（例えば、１日１回、隔日に１回、週３回または週１回）、対象に静脈内投与され得る。

【０１６０】
例えば、ハンター症候群に罹患している患者は、脳における組織学的変化を示し、これらの例としては、萎縮、皮質ニューロン膨潤、大脳白質低減、血管周囲腔隙拡張、ならびにプルキンエ細胞樹状突起膨潤が挙げられ得る。白質に関連した重症び漫性性病変、脳萎縮および水頭症が、認知障害を有する患者においては、その障害を有さない患者と比較して、より一般的であった、ということを磁気共鳴画像処理／分光法試験は示している（Ｖｅｄｏｌｉｎ，Ｌ．，ｅｔ ａｌ．，ＡＪＮＲ Ａｍ Ｊ Ｎｅｕｒｏｒａｄｉｏｌ（２００７）２８，１０２９－１０３３）。精神遅滞または発達遅延といったような極度の神経学的後遺症を有さない患者でさえ、萎縮、脳室拡大、ならびに血管周囲腔隙拡張を含む脳異常を有することが示された（Ｍａｔｈｅｕｓ，ＭＧ，ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｕｒｏｒａｄｉｏｌｏｇｙ（２００４）４６，６６６－６７２）。

【０１６１】
非限定例として、ムコ多糖症ＩＩＩＡ型（ＭＰＳ ＩＩＩＡ；サンフィリッポ症候群Ａ型）は、最も重篤な型のサンフィリッポ症候群Ａ型であって、世界中で約１００，０００人に一人が罹患している。サンフィリッポ症候群Ａ型（サンフィリッポＡ）は、グルコサミノグリカン（ＧＡＧ）ヘパランスルフェートのリソソーム異化に関与するエキソスルファターゼである酵素ヘパランＮ－スルファターゼ（ＨＮＳ）の欠乏により特性化される（Ｎｅｕｆｅｌｄ ＥＦ，ｅｔ ａｌ．Ｔｈｅ Ｍｅｔａｂｏｌｉｃ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂａｓｅｓ ｏｆ Ｉｎｈｅｒｉｔｅｄ Ｄｉｓｅａｓｅ（２００１）ｐｐ．３４２１－３４５２）。この酵素の非存在下では、ＧＡＧヘパランスルフェートはニューロンおよびグリア細胞のリソソーム中に蓄積するが、脳の外側には余り蓄積しない。

【０１６２】
非限定例として、ムコ多糖症ＩＩＩＢ型（ＭＰＳ　ＩＩＩＢ；サンフィリッポ症候群Ｂ型病）は、酵素アルファ－Ｎ－アセチル－グルコサミニダーゼ（Ｎａｇｌｕ）の欠乏により特性化される常染色体劣性障害である。この酵素の非存在下では、ＧＡＧヘパランスルフェートはニューロンおよびグリア細胞のリソソーム中に蓄積するが、脳の外側には余り蓄積しない。
【０１６３】
非限定例として、グロボイド細胞白質ジストロフィー（ＧＬＤ）症は、ガラクトセレブロシダーゼ（ＧＡＬＣ）の機能不全により引き起こされる稀な常染色体劣性リソソーム貯蔵障害である。ＧＡＬＣは、ミエリンの正常構成成分であるガラクトシルセラミドをガラクトースとセラミドに、そしてガラクトシドセラミド合成の有害副産物であるサイコシン（ガラクトシルスフィンゴシン）をガラクトースとスフィンゴシンに分解する可溶性リソソーム酸ヒドロラーゼ酵素である。ＧＡＬＣ欠乏は、２つの関連するが別個の経路である中枢および末梢神経系（それぞれ、ＣＮＳおよびＰＮＳ）の神経学的損傷を生じさせる。第一の経路は、過剰サイコシン蓄積を生じて、その結果、有髄細胞のアポトーシスを引き起こす。第二の経路では、ガラクトシルセラミドが蓄積し、活性化ミクログリア中に貪食されて、その病気がそう呼ばれる特徴的グロボイド細胞を生成する。非分解基質を蓄積する他のリソソーム貯蔵疾患に対比して、一般的に、ニューロン組織における総ガラクトシルセラミドの増大は認められない。
【０１６４】
この障害の限定性臨床的特徴は中枢神経系（ＣＮＳ）変性であって、これにより、主要な発達里程標石を失い、あるいはそれを達成できなくなる。進行性認知低下は、痴呆および若年死亡率を最高度に高める。当該疾患は、それ自体、幼児において（早発性ＧＬＤ）、またはあらゆる年齢の個体において（後発性ＧＬＤ）、症状発現し得る。早発性ＧＬＤに罹患した個体の寿命は、典型的には、２歳を超えることはない。後発性ＧＬＤは、あらゆる年齢の個体に現れ、疾患の進行は大きく異なり得る。
【０１６５】
異染性ジストロフィー（ＭＬＤ）症は、酵素アリールスルファターゼＡ（ＡＳＡ）の欠乏に起因する常染色体劣性障害である。ヒトにおけるＡＲＳＡ遺伝子によりコードされるＡＳＡは、セレブロシド３－スルフェートまたはスフィンゴリピド３－Ｏ－スルホガラクトシルセラミド（スルファチド）をセレブロシドおよびスルフェートに分解する酵素である。当該酵素の非存在下では、スルファチドは神経系（例えばミエリン鞘、ニューロンおよびグリア細胞）に蓄積するが、内臓中に蓄積する程度は低い。これらの分子および細胞性事象は、ＣＮＳおよびＰＮＳ内の進行性脱髄および軸索損失であって、これは、臨床的に、重度の運動および認知機能障害を伴う。
【０１６６】
この障害の限定性臨床的特徴は中枢神経系（ＣＮＳ）変性であって、これにより、認知障害（例えば、精神遅滞、神経障害および失明等）が生じる。
【０１６７】
非減定例として、ＭＬＤは、それ自体、幼児において症状発現し得る（後期乳児型）が、この場合、罹患小児は、典型的には、出生初年後（例えば、約１５～２４ヶ月）直ぐに症候を示し始め、一般的に、５歳を過ぎると生存しない。ＭＬＤは、それ自体、小児において症状発現し得る（若年型）が、この場合、罹患小児は、典型的には、約３～１０歳までに認知障害を示し、寿命は種々であり得る（例えば、症候開始後１０～１５年の範囲）。ＭＬＤは、それ自体、成年において症状発現し（成年開始型）、あらゆる年齢（例えば、典型的には１６歳以降）の個体に現れ、疾患の進行は大きく異なり得る。
【０１６８】
したがって、いくつかの実施形態では、本発明の方法および組成物は、１つ以上の治療薬（例えば、１つ以上の補充酵素）を、脳、脊髄および／または末梢器官の標的組織および細胞の１つ以上の細胞小器官（例えばリソソーム）に送達して、種々のリソソーム蓄積

症の処置を実行する。本明細書中で用いる場合、「処置する」または「処置」という用語は、当該疾患に伴う１つ以上の症候の改善、当該疾患の１つ以上の症候の開始の防止または遅延、および／または当該疾患の１つ以上の症候の重症度または頻度の低下を指す。

【０１６９】

いくつかの実施形態では、処置は、リソソーム症に罹患しているかまたは罹患しやすい患者における神経学的障害の重症度および／または発生率を部分的にまたは完全に緩和し、改善し、軽減し、抑制し、開始を遅延し、重症度および／または発生率を低減することを指す。本明細書中で用いる場合、「神経学的障害」という用語は、中枢神経系（例えば、脳および脊髄）の機能障害に伴う種々の症候を包含する。神経学的障害の症候としては、例えば、発達遅延、進行性認知障害、聴力損失、言語発達障害、運動能力欠如、多動性障害、攻撃性および／または睡眠障害等が挙げられ得る。

【０１７０】

いくつかの実施形態では、処置は、種々の組織におけるリソソーム貯蔵（例えば、ＧＡＧのような貯蔵された高分子物質）低減を指す。いくつかの実施形態では、処置は、脳標的組織、脊髄ニューロン、および／または末梢標的組織におけるリソソーム貯蔵低減を指す。ある実施形態では、リソソーム貯蔵は、対照と比較して、約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、１００％またはそれ以上低減される。いくつかの実施形態では、リソソーム貯蔵は、対照と比較して、少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍または１０倍低減される。いくつかの実施形態では、リソソーム貯蔵は、リソソーム貯蔵顆粒の存在により測定される（例えば、ゼブラストライプ形態）。

【０１７１】

いくつかの実施形態では、処置は、ニューロン（例えば、プルキンエ細胞を含有するニューロン）における空胞形成低減を指す。ある実施形態では、ニューロンにおける空胞形成は、対照と比較して、約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、１００％またはそれ以上低減される。いくつかの実施形態では、空胞形成は、対照と比較して、少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍または１０倍低減される。

【０１７２】

ある実施形態では、本発明による処置は、リソソーム蓄積症に関連した１つ以上の病理学的または生物学的マーカーの存在、または代替的にはその蓄積の低減（例えば、約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、４０％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、９０％、９５％、９７．５％、９９％またはそれ以上の低減）、または完全排除を生じる。このような低減または排除は、ＣＮＳの細胞および組織（例えば、ニューロンおよび乏突起グリア細胞）において特に明らかであり得る。例えば、いくつかの実施形態では、対象への投与時に、本発明の薬学的組成物は、対象のＣＮＳ細胞および組織において（例えば、大脳皮質、小脳、尾状核および被殻、白質および／または視床において）、バイオマーカーリソソーム付随膜タンパク質１（ＬＡＭＰ１）の蓄積の低減を実証するかまたは達成する。ＬＡＭＰ１は、リソソーム膜において高度に発現される糖タンパク質であり、その存在は、リソソーム蓄積症を有する患者で増大される（Ｍｅｉｋｌｅ，ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ Ｃｈｅｍ．（１９９７）４３：１３２５－１３３５）。したがって、リソソーム蓄積症を有する患者におけるＬＡＭＰ１の存在または非存在（例えば、ＬＡＭＰ染色により確定される）は、リソソーム活性の有用な指標、ならびにリソソーム蓄積症の診断およびモニタリングの両方のためのマーカーを提供し得る。

【０１７３】

したがって、本発明のいくつかの実施形態は、疾患（例えば、リソソーム蓄積症）に関連する１つ以上の病理学的または生物学的マーカーの存在または蓄積を低減するか、そう

でなければ排除する方法に関する。同様に、本発明のいくつかの実施形態は、リソソーム蓄積症に関連した１つ以上の病理学的または生物学的マーカー（例えばＬＡＭＰ）の分解（または分解速度）を増大する方法に関する。

【０１７４】

いくつかの実施形態では、処置は、認知能力の喪失の進行低減を指す。ある実施形態では、認知能力の喪失の進行は、対照と比較して、約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、１００％またはそれ以上低減される。いくつかの実施形態では、処置は、発達遅延低減を指す。ある実施形態では、発達遅延は、対照と比較して、約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、１００％またはそれ以上低減される。

【０１７５】

いくつかの実施形態では、処置は、生存（例えば、生存時間）増大を指す。例えば、処置は、患者の平均余命増大を生じ得る。いくつかの実施形態では、本発明による処置は、処置を伴わない同様の疾患を有する１人以上の対照個体の平均余命と比較して、約５％より多く、約１０％、約１５％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、約１００％、約１０５％、約１１０％、約１１５％、約１２０％、約１２５％、約１３０％、約１３５％、約１４０％、約１４５％、約１５０％、約１５５％、約１６０％、約１６５％、約１７０％、約１７５％、約１８０％、約１８５％、約１９０％、約１９５％、約２００％またはそれ以上、患者の平均余命を増大する。いくつかの実施形態では、本発明による処置は、処置を伴わない同様の疾患を有する１人以上の対照個体の平均余命と比較して、約６ヵ月より長く、約７ヵ月、約８ヵ月、約９ヵ月、約１０ヵ月、約１１ヵ月、約１２ヵ月、約２年、約３年、約４年、約５年、約６年、約７年、約８年、約９年、約１０年またはそれ以上、患者の平均余命を増大する。いくつかの実施形態では、本発明による処置は、患者の長期間生存を生じる。本明細書中で用いる場合、「長期間生存」という用語は、約４０年、４５年、５０年、５５年、６０年またはそれ以上の生存時間または平均余命を指す。

【０１７６】

「改善する」、「増大する」または「低減する」という用語は、本明細書中で用いる場合、対照と対比する値を示す。いくつかの実施形態では、適切な対照は、基線測定値、例えば、本明細書中に記載される処置の開始前の同一個体における測定値、あるいは本明細書中に記載される処置の非存在下での一対照個体（または多数の対照個体）における測定値である。「対照個体」は、処置されている個体とほぼ同一年齢および／または性別である、同一疾患に苦しむ個体である（処置個体および対照個体（単数または複数）における疾患の段階が比較可能であることを保証するため）。

【０１７７】

処置されている個体（「患者」または「対象」とも呼ばれる）は、当該疾患を有するかまたは当該疾患を発症する可能性を有する個体（胎児、幼児、小児、若者または成人）である。個体は、残留内因性リソソーム酵素発現および／または活性を有し得るし、あるいは測定可能な活性を有さない。例えば、サンフィリッポ症候群Ａ型を有する個体は、正常ＨＮＳ発現レベルの約３０～５０％未満、約２５～３０％未満、約２０～２５％未満、約１５～２０％未満、約１０～１５％未満、約５～１０％未満、約０．１～５％未満であるＨＮＳ発現レベルを有し得る。

免疫寛容

【０１７８】

一般的に、本発明による治療薬（例えば補充酵素）の髄腔内投与は、対象において重篤な副作用を生じない。本明細書中で用いる場合、重症副作用は、実質的免疫応答、毒性または死（これらに限定されない）を誘導する。本明細書中で用いる場合、「実質的免疫応

答」という用語は、重症または重篤免疫応答、例えば適応Ｔ細胞免疫応答を指す。

【０１７９】

したがって、多くの実施形態において、本発明の方法は、同時免疫抑制剤療法（すなわち、前処置／前状態調節として、あるいは当該方法と並行して用いられる任意の免疫抑制剤療法）を包含しない。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、処置されている対象における免疫寛容誘導を包含しない。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、Ｔ細胞免疫抑制剤を用いる対象の前処置または前状態調節を包含しない。

【０１８０】

いくつかの実施形態では、治療薬の髄腔内投与は、これらの作用物質に対する免疫応答を高め得る。したがって、いくつかの実施形態では、酵素補助療法に対して寛容な補助酵素を患者に接種させることが有用であり得る。免疫寛容は、当該技術分野で既知の種々の方法を用いて誘導され得る。例えば、Ｔ細胞免疫抑制剤、例えばシクロスポリンＡ（ＣｓＡ）および抗増殖剤、例えばアザチオプリン（Ａｚａ）を、低用量の所望の補充酵素の毎週髄腔内注入と組合せた初期３０～６０日レジメンが、用いられ得る。

【０１８１】

当業者に既知の任意の免疫抑制剤は、本発明の組合せ療法と一緒に用いられ得る。このような免疫抑制剤としては、シクロスポリン、ＦＫ５０６、ラパマイシン、ＣＴＬＡ４－Ｉｇおよび抗ＴＮＦ剤、例えばエタネルセプト（例えば、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 ａｌ．，１９９９，Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８７５，１５９－１７４；Ｓｌａｖｉｋ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｓ．１９，１－２４；Ｇａｚｉｅｖ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｂｏｎｅ Ｍａｒｒｏｗ Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ．２５，６８９－６９６；Ｈｅｎｒｙ，１９９９，Ｃｌｉｎ．Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ．１３，２０９－２２０；Ｇｕｍｍｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｊ．Ａｍ．Ｓｏｃ．Ｎｅｐｈｒｏｌ．１０，１３６６－１３８０；Ｑｉ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ ６９，１２７５－１２８３参照）が挙げられるが、これらに限定されない。抗ＩＬ２受容体（アルファーサブユニット）抗体ダクリズマブ（例えば、ゼナパックス ＴＭ）（これは、移植患者において有効であることが実証されている）も、免疫抑制剤として用いられ得る （例えば、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．１３，１５１－１５９参照）。付加的免疫抑制剤としては、抗ＣＤ２（Ｂｒａｎｃｏ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ ６８，１５８８－１５９６；Ｐｒｚｅｐｉｏｒｋａ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｂｌｏｏｄ ９２，４０６６－４０７１）、抗ＣＤ４（Ｍａｒｉｎｏｖａ－Ｍｕｔａｆｃｈｉｅｖａ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ Ｒｈｅｕｍ．４３，６３８－６４４；Ｆｉｓｈｗｉｌｄ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９２，１３８－１５２）および抗ＣＤ４０リガンド（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）が挙げられるが、これらに限定されない。

投与

【０１８２】

本発明の方法は、治療的有効量の本明細書中に記載される治療薬（例えば補充酵素）の単回ならびに多数回投与を意図する。治療薬（例えば補充酵素）は、対象の症状（例えば、リソソーム蓄積症）の性質、重症度および程度によって、一定間隔で投与され得る。いくつかの実施形態では、本発明の治療的有効量の治療薬（例えば補充酵素）は、一定間隔で（例えば、年１回、６ヶ月に１回、５ヶ月に１回、３ヶ月に１回、隔月（２ヶ月に１回）、毎月（１ヶ月に１回）、隔週（２週間に１回）、毎週）、定期的に髄腔内投与され得る。

【０１８３】

いくつかの実施形態では、髄腔内投与は、他の投与経路（例えば、静脈内、皮下、筋肉内、腸管外、経皮的、または経筋肉的に（例えば、経口的または鼻に））と共同で用いられ得る。いくつかの実施形態では、他の投与経路（例えば、静脈内投与）は、隔週、毎月、２ヶ月に１回、３ヶ月に１回、４ヶ月に１回、５ヶ月に１回、６ヶ月に１回、毎年投与以下の頻度で実施され得る。

【０１８４】

本明細書中で用いる場合、「治療的有効量」という用語は、主として、本発明の薬学的組成物中に含有される治療薬の総量に基づいて確定される。一般的に、治療的有効量は、対象に対して意義のある利益（例えば、根元的疾患または症状を処置し、調整し、治癒し、防止し、および／または改善すること）を達成するのに十分である。例えば、治療的有効量は、所望の治療的および／または予防的作用を達成するのに十分な量、例えばリソソーム酵素受容体またはそれらの活性を調整し、それによりこのようなリソソーム蓄積症またはその症候を処置する（例えば、対象への本発明の組成物の投与後の、「ゼブラ体」の存在または出現の、あるいは細胞空胞形成の低減または排除）ために十分な量であり得る。一般的に、それを必要とする対象に投与される治療薬（例えば、組換えリソソーム酵素）の量は、対象の特質によって決まる。このような特質としては、対象の症状、疾患重症度、全身健康状態、年齢、性別および体重が挙げられる。これらのおよびその他の関連因子によって、適切な投与量を、当業者は容易に決定し得る。さらに、最適投与量範囲を同定するために、客観的および主観的検定がともに任意に用いられ得る。

【０１８５】

治療的有効量は、多重単位用量を含み得る用量投与レジメンで一般に投与される。任意の特定の治療用タンパク質に関しては、治療的有効量（および／または有効用量投与レジメン内の適切な単位用量）は、例えば投与経路、他の薬学的作用物質との組合せによって変わり得る。さらにまた、任意の特定患者のための具体的治療的有効量（および／または単位用量）は、種々の因子、例えば処置されている障害および障害の重症度；用いられる具体的薬学的作用物質の活性；用いられる具体的組成物；患者の年齢、体重、全身健康状態、性別および食餌；投与時間；投与経路、および／または用いられる具体的融合タンパク質の排出または代謝速度；処置の持続期間；ならびに医療業界で周知であるような因子によって決まり得る。

【０１８６】

いくつかの実施形態では、治療有効量は、約０．００５ｍｇ／脳１ｋｇ～５００ｍｇ／脳１ｋｇ、例えば、約０．００５ｍｇ／脳１ｋｇ～４００ｍｇ／脳１ｋｇ、約０．００５ｍｇ／脳１ｋｇ～３００ｍｇ／脳１ｋｇ、約０．００５ｍｇ／脳１ｋｇ～２００ｍｇ／脳１ｋｇ、約０．００５ｍｇ／脳１ｋｇ～１００ｍｇ／脳１ｋｇ、約０．００５ｍｇ／脳１ｋｇ～９０ｍｇ／脳１ｋｇ、約０．００５ｍｇ／脳１ｋｇ～８０ｍｇ／脳１ｋｇ、約０．００５ｍｇ／脳１ｋｇ～７０ｍｇ／脳１ｋｇ、約０．００５ｍｇ／脳１ｋｇ～６０ｍｇ／脳１ｋｇ、約０．００５ｍｇ／脳１ｋｇ～５０ｍｇ／脳１ｋｇ、約０．００５ｍｇ／脳１ｋｇ～４０ｍｇ／脳１ｋｇ、約０．００５ｍｇ／脳１ｋｇ～３０ｍｇ／脳１ｋｇ、約０．００５ｍｇ／脳１ｋｇ～２５ｍｇ／脳１ｋｇ、約０．００５ｍｇ／脳１ｋｇ～２０ｍｇ／

脳１ｋｇ、約０．００５ｍｇ／脳１ｋｇ～１５ｍｇ／脳１ｋｇ、約０．００５ｍｇ／脳１ｋｇ～１０ｍｇ／脳１ｋｇの範囲である。

【０１８７】

いくつかの実施形態では、治療有効量は、約０．１ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約０．５ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約１．０ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約３ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約５ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約１０ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約１５ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約２０ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約３０ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約４０ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約５０ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約６０ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約７０ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約８０ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約９０ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約１００ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約１５０ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約２００ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約２５０ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約３００ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約３５０ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約４００ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約４５０ｍｇ／脳１ｋｇより多く、約５００ｍｇ／脳１ｋｇより多い。

【０１８８】

いくつかの実施形態では、治療有効量は、ｍｇ／体重１ｋｇによっても定義され得る。当業者が理解するように、脳重量および体重は相関し得る（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）。したがって、いくつかの実施形態では、投与量は、表４に示されるように換算され得る。

【表４】

**表４．　投与量換算**

**男性の脳重量、体重および年齢の間の相関**

| 年齢（歳） | 脳重量（kg） | 体重（kg） |
|---|---|---|
| 3（31-43ヶ月） | 1.27 | 15.55 |
| 4-5 | 1.30 | 19.46 |

【０１８９】

いくつかの実施形態では、治療有効量は、ｍｇ／ＣＳＦ　１５ｃｃによっても定義され得る。当業者が理解するように、脳重量および体重に基づいた治療有効量は、ｍｇ／ＣＳＦ　１５ｃｃに換算され得る。例えば、成人におけるＣＳＦの容積は約１５０ｍＬである（Ｊｏｈａｎｓｏｎ　ＣＥ，　ｅｔ　ａｌ．“Ｍｕｌｔｉｐｌｉｃｉｔｙ　ｏｆ　ｃｅｒｅｂｒｏｓｐｉｎａｌ　ｆｌｕｉｄ　ｆｕｎｃｔｉｏｎｓ：　Ｎｅｗ　ｃｈａｌｌｅｎｇｅｓ　ｉｎ　ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　ｄｉｓｅａｓｅ，”　Ｃｅｒｅｂｒｏｓｐｉｎａｌ　Ｆｌｕｉｄ　Ｒｅｓ．　２００８　Ｍａｙ　１４；５：１０）。したがって、成人への０．１ｍｇ～５０ｍｇの単一用量注射は、成人では約０．０１ｍｇ／ＣＳＦ　１５ｃｃ（０．１ｍｇ）～５．０ｍｇ／ＣＳＦ　１５ｃｃ（５０ｍｇ）用量である。

【０１９０】

任意の特定の対象に関して、具体的投与量レジメンは、個体の必要性、ならびに酵素補充療法の投与を施すかまたは指図する専門家の判断によって経時的に調整されるべきであり、そして本明細書中に記述される投与量範囲は単なる例であって、本発明の範囲または実行を限定するものではない、とさらに理解されるべきである。

キット

【０１９１】

本発明はさらに、本発明の処方物を含有するキットまたは他の製品を提供し、そしてその再構成（凍結乾燥された場合）および／または使用のための機器を提供する。キットまたはその他の製品としては、容器、ＩＤＤＤ、カテーテル、ならびに髄腔内投与および関

連外科手術に有用な任意のその他の物質、装置または設備が挙げられ得る。適切な容器としては、例えばボトル、バイアル、注射器（薬剤充填済み注射器）、アンプル、カートリッジ、リザーバまたはｌｙｏ－ｊｅｃｔｓが挙げられる。容器は、種々の材料、例えばガラスまたはプラスチックから作られ得る。いくつかの実施形態では、容器は薬剤充填済み注射器である。適切な薬剤充填済み注射器としては、ベイクドシリコン被覆膜を有するホウケイ酸ガラス注射器、噴霧シリコンを有するホウケイ酸ガラス注射器またはシリコンを含有しないプラスチック樹脂注射器が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１９２】

典型的には、容器は、処方物、ならびに再構成および／または使用に関する指示を示し得る容器上の、または容器に付随したラベルを保持し得る。例えば、ラベルは、処方物が上記のようなタンパク質濃度に再構成される、ということを示し得る。ラベルはさらに、処方物が、例えばＩＴ投与のために有用であるかまたは意図される、ということを示し得る。いくつかの実施形態では、容器は、治療薬（例えば補充酵素）を含有する単一用量の安定処方物を含有し得る。種々の実施形態において、単一用量の安定処方物は、約１５ｍｌ未満、１０ｍｌ、５．０ｍｌ、４．０ｍｌ、３．５ｍｌ、３．０ｍｌ、２．５ｍｌ、２．０ｍｌ、１．５ｍｌ、１．０ｍｌまたは０．５ｍｌの容量で存在する。代替的には、処方物を保持するよう基は、多数回使用バイアルであって、これは、処方物の反復投与（例えば、２～６回投与）を可能にし得る。キットまたは他の製品はさらに、適切な希釈剤（例えば、ＢＷＦＩ、生理食塩水、緩衝化生理食塩水）を含む第二容器を包含し得る。希釈剤および処方物の混合時に、再構成化処方物中の最終タンパク質濃度は、一般的に、少なくとも１ｍｇ／ｍｌ（例えば、少なくとも５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも１０ｍｇ／ｍｌ、少なくとも２５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも５０ｍｇ／ｍｌ、少なくとも７５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも１００ｍｇ／ｍｌ）である。キットまたは他の製品はさらに、商業的および使用者の見地から望ましい他の物質、例えば他の緩衝剤、希釈剤、充填剤、針、ＩＤＤＤ、カテーテル、注射器および使用説明書を伴う添付文書を包含し得る。

【０１９３】

本発明は、以下の実施例を参照することにより、さらに十分に理解されるであろう。しかしながら、それらは本発明の範囲を限定するよう意図されるべきでない。引用文献はすべて、参照により本明細書中に援用される。

【実施例】

【０１９４】

ＧａｌＣタンパク質のＩＴ送達の実施例

実施例１：髄腔内送達のためのＧＡＬＣ処方物の物理化学的特性化

【０１９５】

本実施例は、タンパク質の髄腔内（ＩＴ）送達中の異なる溶液条件下でのその行動および安定性を理解するために、ＧａｌＣの物理化学的特性化を記載する。

【０１９６】

特に、本実施例は、ＧａｌＣの上首尾のＩＴ送達のために重要であるＧａｌＣ処方物を記載する。いくつかの実施形態では、この処方物は、５ｍＭ　Ｎａリン酸塩＋１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．０＋０．００５％ポリソルベート　２０を含む。いくつかの実施形態では、この処方物は、＜５ｍＭ、＜１０ｍＭ、＜１５ｍＭおよび＜２０ｍＭのＮａリン酸塩を含む。いくつかの実施形態では、この処方物は、１５０ｍＭ　ＮａＣｌで、ｐＨ≧５．５および≦ｐＨ７．０を包含する。

【０１９７】

種々のリン酸塩モル濃度およびｐＨのＰＢＳ送達ビヒクルを、成体カニクイザルで試験した（図３）。５．５～７．０のｐＨ範囲での５ｍＭリン酸塩は副作用を示さなかったが、一方、ｐＨ７．０～７．５の２０ｍＭリン酸塩およびｐＨ７．５～８．０の１０～２０ｍＭリン酸塩は、サルにおいて副作用を示した（図３）。３ｍＭ　クエン酸塩、リン酸塩およびホウ酸塩緩衝液（５０ｍＭ　ＮａＣｌ含有）中のｈＧａｌＣ（１ｍｇ／ｍｌ）の熱安定性を、ｐＨ５．０～８．０の範囲内のｐＨの一関数として調べた（図４）。ｈＧａｌ

Ｃ特異的活性を、基線（２０～２５°Ｃ）で、ならびに４０℃で２週間測定したが、最高特異的活性は、ｐＨ６．０～６．５で保持された（図４）。ｈＧａｌＣ特異的活性を、さらに、５℃で３ヶ月で測定した。最高特異的活性は、ｐＨ６．０～６．５で保持された（図５）。ｈＧａｌｃの融解温度を、ｐＨの一関数として測定し（表５）、異なる処方物においても独立して測定した（表６）。

【表５】

**表５：ｐＨの一関数としてのhGalC (1mg/mL)の融解温度**

| 汎用緩衝液のpH | Tm (°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 |

沈降のため[GalC]<1 mg/mL

【表６】

**表６：異なる処方物中のhGalC (1mg/mL)の融解温度**

| 処方物(pH 6.0) | Tm (°C) |
|---|---|
| 5 mMリン酸塩、50 mM NaCl | 61.6 |
| 5 mMリン酸塩、150 mM NaCl | 60.2 |
| 5 mMリン酸塩、500 mM NaCl | 59.5 |
| 5 mMリン酸塩、5%デキストロース | 63.8 |
| 5 mMリン酸塩、150 mM NaCl、1%NaTC | 56.8 |

【０１９８】

５℃で～３週間、ならびに４０℃で２週間でのｈＧａｌＣ特異的活性の保持により確定した場合の、ｈＧａｌＣの熱安定性を、塩濃度の一関数としても評価した（図６）。結果は、ｐＨ６．５で、５ｍＭリン酸塩＋５０ｍＭ　ＮａＣｌ（本明細書中では５＋５０と略記）から５０ｍＭリン酸塩＋１５０ｍＭ　ＮａＣｌ（本明細書中では５０＋１５０と略記）までの範囲の種々の塩濃度において、５℃で３週間後、ｈＧａｌＣは最高特異的活性を保持する、ということを示した（図６）。

沈降分析

【０１９９】

沈降速度は、遠心分離で発生される遠心力に応答して分子が動く速度を測定する分析的超遠心分離（ＡＵＣ）法であり、溶液中のタンパク質会合状態を決定するための有用な技法である。一次沈降速度実験は、自己会合および／または非理想特性に関して試料を評価するための、５Ｍ　Ｎａリン酸塩、ｐＨ６．０（１５０ｍＭ　ＮａＣｌ含有）中のヒトＧａｌＣの希釈シリーズ（図７）であった。希釈シリーズを、各濃度での正規化ｇ（ｓ＊）

曲線（ｇ（ｓ＊））対ｓ＊）としてプロットした。希釈時のより低いｓ値への曲線における全般的シフトは、解離を示し、これは、迅速可逆的自己会合系である。異なるイオン強度を比較した場合（図７Ａ、Ｂ＆Ｃ）、曲線組は、イオン強度を上げるとより低いｓ値にシフトすることは明らかであり、イオン相互作用も会合過程に関与し、自己会合は高塩濃度では低減されることを示している。

【０２００】

マウスＧａｌＣも、同一時間で１５０ｍＭ　ＮａＣｌで実験して、ｈＧａｌＣと比較した。対応するイオン強度（１５０ｍＭ　ＮａＣｌ）を比較した場合、ｍＧａｌＣの自己会合の自由エネルギーがｈＧａｌＣのものより低いことは明らかである。図７における曲線は、約２０Ｓでのカットオフであって、解離をより明白に示した；しかしながら、広範囲分布解析（ＷＤＡ）を用いてこれらの実験を分析し、結果を対数スケールでプロットした場合、より高い凝集物（ｓ＊＞２０Ｓ）が明らかに観察され得る。高オリゴマーへの凝集（図８）は、５０ｍＭ　ＮａＣｌで特に目立っており、１０ｍＭ　ＮａＣｌで多少低減され、そして５００ｍＭ　ＮａＣｌでｐＨ６．０では有意に減少したが、しかし存在する。イオン強度の各々からの最高濃度からのＷＤＡ曲線を、図８にプロットする。

ｐＨ６．０での汎用緩衝液中での自己会合

【０２０１】

汎用緩衝液中でのこれらの条件下で、自己会合は、図９で分かるように、リン酸塩緩衝液中とほぼ同一規模であると思われる。汎用緩衝液中でのｈＧａｌＣ自己会合のエネルギー論に及ぼすｐＨの作用も調べた。希釈シリーズを、ｐＨ４．５、５．０、６．０、６．５、７．０および７．５で実施した。ｐＨ４．５および５．０での試料は不溶性で、本質的に１００％のｈＧａｌＣが沈澱しており、上清中では何も測定されないままであった。

【０２０２】

ｐＨの作用は図１０で明らかであり、この場合、最小量の自己会合がｐＨ７．５で観察され、かなりの量の自己会合がｐＨ６．０で観察される。その傾向は、より高いｐＨでの種々のイオン強度で観察されたものと同様である。イオン強度およびｐＨをともに上げると、最高濃度（すべて約１．０ｍｇ／ｍＬ）でより小さいオリゴマーを選択するよう平衡をシフトする。１／３連続希釈まで濃度を下げると（図７参照）、平衡は、約５．２Ｓの沈降係数を有することが明らかである最小種の方へシフトする。約１０～１３Ｓで生じるピークは、５Ｓ種の四量体を表すと思われる。自己会合モデルにこれらのデータを合わせる努力は今までのところ不首尾に終わっており、不定度のグリコシル化から生じる固有の微小不均一性のためであると思われる。

ｐＨ６．０での汎用緩衝液中の自己会合

【０２０３】

５ｍＭ　Ｎａリン酸塩、ｐＨ６．０（１５０ｍＭ　ＮａＣｌ含有）中のＧａｌＣのストレスおよび基線試料を、希釈シリーズ実験で比較した（赤→青→緑→黒）。最低濃度（黒）～０．０３ｍｇ／ｍＬに関する結果は平坦であったが、これが、曲線がほとんどノイズを有さないと思われる理由である。ストレス試料では、基線試料よりはるかに高い濃度で存在するｌｎ（ｓ＊）＝３．０（～２０Ｓ）周囲に凝集物が存在する。それは、正規化プロットにおいて希釈時のその持続性により立証されるように、試料のほぼ一定の割合を表す（図１１、図１２、図１３）。したがって、それは、少なくとも５００ｋｇ／ｍｏｌのモル質量を有する不可逆的凝集物である。

溶液中にタウロコール酸ナトリウムを有するｈＧａｌＣ

【０２０４】

タウロコール酸ナトリウム（ＮａＴＣ）（１％）中では、自己会合は有意に低減される。主境界線は低ｓ値にシフトされ、高オリゴマー化が抑制される（図１４）。

５％デキストロースを有するｈＧａｌＣ

【０２０５】

５ｍＭ　Ｎａリン酸塩、ｐＨ６．０中のＧａｌＣへの５％デキストロースの付加は、大型凝集物を形成した（図１５）。１８Ｓでのピークは、約４４０ｋＤａの最小モル質量に

対応し、そして５６Ｓでのピークは、１０．０ＭＤａより大きいモル質量に対応する１５０Ｓを越えて伸びる尾を有する１２．４ＭＤａの最小モル質量に対応する。１．０から０．３ｍｇ／ｍＬへの希釈時に、このパターンに非常に小さい変化が認められるが、これは、５～６時間の沈降実験の時間スケールで、これらのオリゴマーがほとんど不可逆的であることを示している。

ｈＧａｌＣ固有蛍光

【０２０６】

ｈＧａｌＣの固有蛍光試験（２３Ｔｒｐを使用）を実施して、分子相互作用に及ぼすｐＨおよび塩濃度の役割を評価した（図１６および図１７）。分子相互作用は、５００ｍＭＮａＣｌまたは１％　ＮａＴＣ中で最小であった（３３０ｎｍ～３５０ｎｍ間で最高相対蛍光）（図１６）。二次構造の小変化が、ｐＨの一関数として観察された。沈澱は、ｐＨ４．５および５．０で観察された（図１７）。

要約

【０２０７】

ｈＧａｌＣおよびｍＧａｌＣの相対的溶解度を評価するために、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）誘導性固相アプローチを用いた（Ｍｉｄｄａｕｇｈ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．　１９７９，　２５４，　３６７－３７０）。このアプローチは、タンパク質の相対溶解度を定量的に測定可能にした。各ＧａｌＣの緩衝化溶液（５ｍＭ　リン酸ナトリウム（１５０ｍＭ　ＮａＣｌ含有）、ｐＨ６．０）を、異なる濃度のＰＥＧ（１０ｋＤａ）に導入することにより、溶解度測定を実施した。対数タンパク質溶解度対ＰＥＧ濃度のプロットは、線状傾向を生じた。見掛けの溶解度をゼロＰＥＧ濃度に外挿することにより、各タンパク質の相対溶解度を得た。ｍＧａｌＣ対ｈＧａｌＣの相対溶解度は、如何なる差異も示さなかった。ｈＧａｌＣの溶解度実験では、２～８°Ｃで（５ｍＭ　リン酸ナトリウム（異なる塩濃度を有する）、ｐＨ６．０～６．５中で）、３週間後に、沈澱または活性損失は観察されなかった。～３０ｍｇ／ｍＬでの溶解度は、処方物５ｍＭ　Ｎａリン酸塩＋１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．０で達成され、２～８℃で５０日後、沈澱は観察されなかった。

【０２０８】

ＡＵＣデータは、「ネイティブ」状態のＧａｌＣが、より高次のオリゴマーとの濃度依存的可逆的会合である、ということを示唆している。生物物理学的データは、より高次のオリゴマーに対する機能的および構造的重要性が認められ得る、ということを示唆している。高ｐＨ値では、ＡＵＣにより測定した場合、低活性保持、低Ｔｍ値およびより均質な系が認められる。５ｍＭリン酸ナトリウム（１５０ｍＭ　ＮａＣｌ含有、ｐＨ６．０）中では、単量体、四量体および他の高次種間に平衡が存在すると思われる。さらに、ｐＨは、６．５～７．５のｐＨ範囲でＡＵＣプロフィールに劇的に作用するわけではない。全体的に、ＧａｌＣ系は、試験緩衝液中で迅速可逆的高自己会合系である。

実施例２：$^{125}$Ｉ－ｈＧａｌＣの単回髄腔内用量投与または単回静脈内ボーラス注射後のＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットにおける放射能の薬物動態および組織分布

【０２０９】

本実施例は、単回髄腔内用量投与または単回静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットにおける Ｉ－ｈＧＡＬＣの薬物動態および組織分布を例証する例示的結果を示す。全血、血清、赤血球、脳脊髄液（ＣＳＦ）および組織中の放射能の濃度および含量を測定し、その結果生じたデータに関して、非コンパートメント解析を実施した。ヒトにおける意図された投与経路であるので、髄腔内および静脈内経路を選択した。潜在的ヒト曝露、現存毒性および薬物動態データならびに被験物質により課せられる任意の制限に基づいて、用量レベルを選択した。薬物動態および組織分布試験に用いるために容認された種であるため、ラットを試験のために選択した。この試験に用いられる動物数は、各時点での予測可変性を適切に評価し、実験目的を達成するのに必要とされる最小数であった。

材料および方法

試験系

【０２１０】

８２匹のＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（Ｒａｔｔｕｓ　ｎｏｒｖｅｇｉｃｕｓ）を、２００９年4月１５日にＣｈａｒｌｅｓＲｉｖｅｒ　Ｃａｎａｄａ　Ｉｎｃ．（Ｓｔ．　Ｃｏｎｓｔａｎｔ，　Ｑｕｅｂｅｃ，　Ｃａｎａｄａ）から受け取った。処置開始時に、動物はほぼ１０～１１週齢であった。さらに9匹の雄ラットを、２００９年4月２８日にＣｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｃａｎａｄａから受け取った；これらの動物は、到着時はほぼ9週齢で、試験の完全用量投与のために十分なカニューレ挿入動物が利用可能であることを保証する必要があった。

【０２１１】

雄ラットの体重は、処置開始時に３４２～４５３ｇの範囲であった。用量投与時は1匹の雄ラットを除いてすべての体重がプロトコールに記述された範囲（２５０～３５０ｇ）より高かったが、しかしながら、動物は健常で、用量投与のためには実際の体重を用いたため、この小偏差が試験または得られたデータに影響を及ぼすとは考えられなかった。

動物管理

【０２１２】

ＰＣＳ－ＭＴＬに到着後、獣医学スタッフの有資格員が全動物を全身身体検査した。受け取った動物には、有意の異常は検出されなかった。金網床で自動給水弁を備えたステンレス製ケージに、動物を個別に収容した。環境強化プログラムは、適切なＳＯＰに従った。各ケージには、試験、群、動物番号および性別を示す色コード化ケージカードではっきりと標識を付けた。ＡＩＭＳ（登録商標）刺青系を用いて、各動物を独自に同定した。試験実行中の環境条件は、それぞれ１９～２５℃および３０～７０％の標的温度および相対湿度で、制御した。光周期は明１２時間及び暗１２時間であった（但し、予定された活動のために遮断される場合を除く）。

食餌

【０２１３】

指定手順中を除いて、全動物には、市販の標準認証実験室用ペレット餌（ＰＭＩ認証齧歯類餌　５００２：　ＰＭＩ　Ｎｕｔｒｉｔｉｏｎ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｃ．）を自由に摂らせた。餌中の夾雑物（例えば、重金属、アフラトキシン、有機リン、塩素化炭化水素、ＰＣＢ）の最大許容可能濃度は、メーカーにより制御され、慣例的に分析される。ヒト消費に適した自治体水道水（０．５μｍ静菌性ポリカーボネートフィルターを通して濾過）を、動物は、指定手順中以外は自由に利用できた。試験の目的を妨げ得る食餌材料中の既知の夾雑物は存在しないと考えられた。

馴化および無作為化

【０２１４】

少なくとも6日（２００９年４月１５日に受け取った動物に関して）または3日（２００９年４月２８日に受け取った付加的動物に関して）で、動物の受け入れと髄腔内カニューレを設置するための手術との間に、物理的および環境的条件に動物を馴れさせた。馴化期間中、コンピューターベースの無作為化手順を用いて、全動物を計量し、無作為化した。パラメーターとして体重を用いて、層化後に無作為化を実施した。体重範囲の両極端は、群に割り当てなかった。

【０２１５】

動物を、以下のように試験群に割り当てた：

【表７】
表７

| 群番号 | 投与経路および用量 | | 予想用量体積 | | 動物番号 |
|---|---|---|---|---|---|
| | 静脈内 | 髄腔内 | 静脈内 (mL/kg) | 髄腔内 (mL) | 雄 |
| 1 | - | 60 μg | - | 0.02 | 1001-1024 |
| 2 | 1 mg/kg | - | 3.33 | - | 2001-2024 |
| 3[a] | 1 mg/kg | 60 μg | 3.33 | 0.02 | 3001-3024 |

A: 髄腔内用量投与後５分以内に、ＩＶ用量を投与した。

群１および群２の各ラットは、約３μＣｉ／動物の公称放射化学用量を摂取した。群３の各ラットは、約６μＣｉ／動物の公称放射化学用量を摂取した。

髄腔内用量投与処方物

【０２１６】

初回髄腔内用量投与日に、髄腔内用量投与処方物を調製した。十分量の$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＧ溶液を測定し、十分量の測定非標識化ｈＧＡＬＣ溶液に付加した。測定容積のビヒクルを付加し、全体を静かに混合した。約１５０μＣｉ／ｍＬの標的放射能レベルで濃度３ｍｇ／ｍＬの溶液を調製した。その結果生じた処方物を、低タンパク質結合フィルター（０．２２μｍ　ＧＶ　ＰＶＤＦフィルターユニット）を通して滅菌容器中に濾過し、冷蔵保存（２～８℃）して、用量投与のための使用を待つ間、光から保護した。

静脈内用量投与処方物

【０２１７】

初回静脈内用量投与日に、静脈内用量投与処方物を調製した。十分量の$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＧ溶液を測定し、十分量の測定非標識化ｈＧＡＬＣ溶液に付加した。測定容積のビヒクルを付加し、全体を静かに混合した。約３μＣｉ／ｍＬの標的放射能レベルで濃度０．３ｍｇ／ｍＬの溶液を調製した。その結果生じた処方物を、低タンパク質結合フィルター（０．２２μｍ　ＧＶ　ＰＶＤＦフィルターユニット）を通して滅菌容器中に濾過し、冷蔵保存（２～８℃）して、用量投与のための使用を待つ間、光から保護した。

用量投与処方物の分析

【０２１８】

処置の前後に、液体シンチレーション分光法により用量投与の各々の日にＰＣＳ－ＭＴＬで各放射能標識用量投与処方物を分析して、放射能濃度を確定した。ビヒクル中に用量投与処方物の適切な希釈液を調製することにより放射能濃度を確定し、各希釈液の二重反復実験用アリコートを分析した。分析（反復分析を含む）完了後に、残りの用量投与処方物を捨てた。

被験物質の比放射能の算定

【０２１９】

用量投与処方物中の被験物質の比放射能を、用量投与処方物中の放射能の平均（用量投与の前および後）測定レベルおよび被験物質の総質量（提供された濃度に基づいて）から算定した。

臨床的観察

【０２２０】
到着当日と試験終了日（これらの日には、動物を１回だけ検査した）を除いて、馴化および試験期間を通して、死亡率および健康障害の徴候および処置に対する反応に関して、全動物を１日２回検査した。詳細な検査は、毎週実施した。
体重
【０２２１】
馴化中、外科手術前および用量投与前日に１回、個体体重を測定した。用量投与前日に記録された体重のみを報告した。
外科手術
【０２２２】
動物受け入れと外科手術との間に最低６日（または９匹の付加的動物に関しては３日）置いて、動物が実験室環境条件に慣れるようにさせた。手術当日に、そして術後２日目に再び、スペアを含めて全動物が、ベンザチンペニシリンＧ＋プロカインペニシリンＧ抗生物質の単回筋肉内注射を受けた。概して、手術の前および初回投与の約８時間後に、そしてその後、必要と思われた時に、ブプレノルフィン　０．０５ｍｇ／ｋｇを皮下投与した。数匹の動物に関しては、８～１２時間の代わりに、初回投与の約６時間後に、ブプレノルフィンを投与した。ラットにおけるブプレノルフィンの半減期を考えると、プロトコールからのこの逸脱は、これらの動物の健康に影響せず、したがって、試験で得られた妥当性またはデータに影響を及ぼさなかった。
【０２２３】
頭蓋から頸部の背側－胸部領域まで剃毛することにより、動物を準備した。術前にイソフルラン／酸素ガスで動物を麻酔して、手術手順を通してイソフルランガス麻酔下に保持した。術前、ならびに手術手順の終了時に、麻酔下にある間、低刺激性潤滑性眼用薬を各眼に投与した。術前に、そして初回投与後約２４時間間隔で２回の他の場合に、各動物に抗炎症薬（カルプロフェン、５ｍｇ／ｋｇで）を皮下注射した。
【０２２４】
動物を、定位台に載せた。頭蓋の尾側縁から頸部にかけて、約２ｃｍの皮膚切開を施した。環椎－後頭膜を曝露するために、背側頸部筋肉を分離した。開創器を用いて、膜への接触を助長した。環椎－後頭膜を切開し、カテーテルが腰部領域に配置されるまで、髄腔内カテーテルを徐々に尾側に挿入した。コットンスワブを用いて過剰量の流体を除去し、環椎－後頭膜を乾かした。その直後に、接着剤を用いて、カテーテル球部を膜に固着した。一旦接着剤が乾いたら、カテーテルをしっかりと固定して、開創器を除去した。頭蓋上にカテーテルで小ループを作り、非吸収性物質の縫合糸を用いて球部を取り付けた。カテーテルが一旦固定されたら、それを、接触ポートを配置するために切開を施された背側胸部領域に通した。これを、非吸収性物質を用いてその場に縫合した。
【０２２５】
頸部筋肉を閉じる前に、温い生理食塩水（すなわち、約３７．５℃）の２ｍＬフラッシュを創傷に施した。吸収性物質の簡単な断続縫合を用いて、筋肉を閉じた。接触ポート部位を２ｍＬの温生理食塩水でフラッシュして、吸収性縫合物質の連続皮内縫合を用いて皮膚を閉じた。術後、ならびに必要なしと考えられるまでその後毎日１回、局所抗生物質軟膏を手術部位に投与した。
【０２２６】
カテーテルおよび接触ポートの死容積を、手術時点で確定した。手術日と処置日との間の前処置機関中に１回、開存性検査を実施した。
処置
【０２２７】
カテーテル／接触ポートの外科的埋込みと処置開始との間に少なくとも７日の期間を置いて、適切な回復を可能にした。髄腔内用量投与前に、必要な場合は、接触ポートを剃毛した。グルコン酸クロルヘキシジンおよび水を用いて、穿刺部位を清浄にし、その部位を滅菌水の浸漬ガーゼで拭いて、その後、ポビドンヨード１０％を３回通した。接触ポート

を、用量投与注射器に連結された針で穿刺し、被験物質を徐々に投与した。用量投与後、汚染を制限するために、その部位をヨードで拭いた。

【０２２８】

試験１日目に、群１動物に処方$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＧを皮下腰椎接触ポート中への緩徐ボーラス髄腔内注射により投与し、その後、０．０４ｍＬの生理食塩水フラッシュを施して、６０μｇ／動物の標的用量レベルおよび約３μＣｉ／動物の放射能線量を送達した。

【０２２９】

試験２日目に、群３動物に処方$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＧを皮下腰椎接触ポート中への緩徐ボーラス髄腔内注射により投与し、その後、０．０４ｍＬの生理食塩水フラッシュを施して、６０μｇ／動物の標的用量レベルおよび約３μＣｉ／動物の放射能線量を送達した。緩徐ボーラス髄腔内注射の５分以内に、群３動物に、尾静脈中への静脈内カテーテルを介して静脈内注射（３．３３ｍＬ／ｋｇ）も施し、その後、０．６ｍＬの生理食塩水フラッシュを施して、１ｍｇ／ｋｇの標的用量レベルを、３μＣｉ／動物のおよその放射能レベルとともに送達した。

【０２３０】

試験３日目に、群２動物に処方$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＧを尾静脈中への静脈内カテーテルを介して静脈内注射（３．３３ｍＬ／ｋｇ）も施し、その後、０．６ｍＬの生理食塩水フラッシュを施して、１ｍｇ／ｋｇの標的用量レベル、ならびに３μＣｉ／動物のおよその放射能レベルを送達した。

【０２３１】

投与容積は、各動物の最新実際体重を基礎にした。動物への送達後の処方$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＧを充填したまたは空の注射器の重量を記録した。各動物に送達された用量を、注射器から放出された投与処方物の正味重量ならびに処方用量中の測定放射能濃度に基づいて算定した。

【０２３２】

用量投与中、用量投与処方物の任意の少量の逆流を吸収するためにガーゼが利用可能であり、被験物質喪失を、プロジェクト特異的手順に従って液体シンチレーション計数により説明した。処方被験物質の投与のために用いられた注射器および静脈内カテーテルを、保持した。静脈内カテーテルおよび選定髄腔内接触ポート／カテーテルを、プロジェクト特異的手順により放射能のレベルに関して分析した。

試料収集

血液／血清および組織

【０２３３】

群１～３に関して、一時点当たり３匹の動物から、用量投与の１０分、３０分、ならびに１、３、６、２４、４８および９６時間後に、末端血液試料（最大可能容積）を収集した。髄腔内投与は群３では静脈内投与に先行し、末端血液試料に関する時機は、静脈内投与の時間を基礎にした。腹大動脈からの放血により、イソフルラン麻酔下で安楽死させたラット（群１、２および３、ならびに３匹のスペア動物）の腹大動脈から、末端血液試料を収集した。約３ｍＬの血液（群１、２および３）を、$K_3$－ＥＤＴＡを含有する適切な試験管に移して、全血試料を供給し、加工処理を待つ間、湿潤氷上に保持した。群２および３、ならびにスペア動物に関しては、さらなる１．５ｍＬの血液を、プロトロンビン時間（ＰＴＴ）、活性化部分トロンビン時間（ＡＰＴＴ）およびフィブリノーゲンの分析のためにクエン酸ナトリウムを含有する試験管中に移した。４℃で１５分間、２７００ＲＰＭで、遠心分離を待つ間、血液試料を湿潤氷上に保存した。血漿試料を約－８０℃で凍結保存した後、発送し、出願人により意図された実験室で分析した。スペア動物からの血漿は、ＰＴＴ、ＡＰＴＴおよびフィブリノーゲンの分析のための空試料として役立てるためのものであった。すべての分析を実施するには不十分な血液容積が得られた場合（群１、２及び３）には、放射能分析のための血液が優先権を有した。

【０２３４】

残りの血液（群１、２および３、ならびに３匹のスペア動物）を、血清生成のために凝

固活性剤を含有する試験管中に移し、約３０分の期間に亘って、室温で凝固させた後、遠心分離した。スペア動物から収集した試料を用いて、非処置動物からの血液試料の凝固を評価した。

【０２３５】

放血後、以下の試料を、指示通りに群１～３から、一時点当たり３匹の動物から収集した：脂肪組織（腎臓脂肪）、副腎、骨（大腿骨）、脳、眼、心臓、腎臓、大腸、大腸内容物、肝臓、肺、筋肉（骨格筋）、坐骨神経、小腸、小腸内容物、脊髄（腰椎、胸椎、頚椎）、脾臓、胃、胃内容物、甲状腺／上皮小体、膀胱内容物。

【０２３６】

収集時、組織を計量し、次いで加工処理して、総放射能に関して分析した。上記の全組織、ならびに末端血液および血清をスペア動物からも収集して、放射能のバックグラウンドレベルを決定するために用いた。残りの死骸を指示冷凍庫中で凍結保持（－１０℃～－２０℃）して、放射能崩壊させた後、生物学的廃棄物として処分した。群１および３からの各時点での最初の動物の死骸を冷凍庫から回収して、解凍し、接触ポートおよびカテーテルを取外し、水で洗い流して、残留放射能に関して実証した。

脳脊髄液

【０２３７】

脳脊髄液（ＣＳＦ）試料を、安楽死の直前の剖検で全動物から収集した。群１～３からの３匹の動物／時点を、用量投与の１０分、３０分、ならびに１、３、６、２４、４８および９６時間後に、安楽死させた。一直線に頭を保持するために必要な定位台を用いて、大槽を介してＣＳＦの試料（最大可能容積）を取り出した。ＣＳＦを平滑管に移して、湿潤氷上に置いた。一部分（約２０μＬ）を加工処理して、総放射能含量に関して分析した。ＣＳＦをスペア動物からも採取して、放射能のバックグラウンドレベルを決定するために用いた。

バックグラウンド放射能レベルの決定

【０２３８】

スペア動物から採取した血液、血清および組織を、群１、２および３における動物の血液、血清および組織に関するバックグラウンド放射能レベルの決定のために用いた。スペア動物から採取したＣＳＦを、ＣＳＦに関するバックグラウンド放射能レベルの決定のために用いた。

放射能測定のための試料加工処理

【０２３９】

血液、血漿、血清およびＣＳＦに関するものを除いて、全試料を採取後に計量した。全群に関して、$K_3$－ＥＤＴＡ上に採取した全血の二重反復実験用１００μＬ計量アリコートを、放射能の分析のために得た。全血のトリクロロ酢酸（ＴＣＡ）を用いたタンパク質沈降を、以下のように実施した：ＴＣＡの１５％水溶液の等価容積を、全血の二重反復実験用１００μＬ計量アリコートに付加した。試料（１００μＬ全血＋１００μＬ　ＴＣＡ）を掻き混ぜることにより混合し、次いで、１００００ｒｐｍで約１５分間、４℃で遠心分離して、上清を別の試験管にデカントした。上清およびペレットの両方を、放射能含量に関して分析した。

【０２４０】

血清収集のための血液を、室温で約３０分間保持して、凝固させた後、２７００ｒｐｍ（１２５０ｒｃｆ）で約１０分間、４℃で遠心分離して、血清を分離した。次に血清試料を、放射能分析のためにアリコート処理（２×１００μＬ計量アリコート）するのを待つ間、湿潤氷上に保持した。（血清分離後に得た）濃縮赤血球を、放射能分析のための加工処理を待つ間、湿潤氷上に保持した。残りの血清を凍結保存した（－１０℃～－２０℃）。全血および赤血球（血清分離後に得て、等容積の脱イオン水と混合し（ｗ／ｖ）、ポリトロン乳化剤で均質化した）の二重反復実験用１００μＬ計量アリコートを、Ｓｏｌｕｅｎｅ－３５０中で可溶化し、過酸化水素（３０％ｗ／ｖ）で脱色して、放射能の分析のために液体シンチレーション流体と混合した。

【０２４１】
ＴＣＡ血液沈澱ペレットを、３５％水酸化テトラエチルアンモニウム（ＴＥＡＨ）中で可溶化し、過酸化水素（３０％ｗ／ｖ）で脱色して、放射能の分析のために液体シンチレーション流体と混合した。膀胱内容物、ＴＣＡ血液上清、用量投与処方物の二重反復実験用計量アリコート（希釈）および血清を、放射能測定のために液体シンチレーション流体と直接混合した。ＣＳＦの二重反復実験用計量アリコート（約１０μＬ／アリコート）を、３５％ＴＥＡＨ中で可溶化した後、放射能測定のために液体シンチレーション流体と混合した。
【０２４２】
組織試料を、全部、３５％ＴＥＡＨ中で可溶化した。次に、二重反復実験用アリコートを、放射能測定の前に液体シンチレーション流体と混合した。大腸内容物を、既知容積の水中で均質化した。大腸内容物（ＬＩＮＣ）ホモジネート、胃内容物（ＳＴＣ）および小腸内容物（ＳＩＮＣ）の二重反復実験用計量アリコートを、３５％ＴＥＡＨ中で可溶化し、放射能測定のために液体シンチレーション流体と混合した。
放射能測定
【０２４３】
標準操作手順（ＳＯＰ）に従って、液体シンチレーション分光法により、放射能測定を実行した。各試料を、５分間または０．１％の誤差２シグマに計数した（どちらを最初にしてもよい）。外部標準に関する範囲のシフトに基づいた自動クエンチ補正により、全計数を絶対放射能（ＤＰＭ）に換算した。適切なバックグラウンドＤＰＭ値を、全試料ＤＰＭ値から差し引いた。バックグラウンドを差し引いた後、バックグラウンド値以下の放射能を示した試料を、その後の全操作に関してゼロとみなした。
データ解析
放射能濃度
【０２４４】
全放射能測定値を、試料中の放射能濃度（ｄｍｐ／ｇおよび質量ｅｑ／ｇ）およびパーセンテージ投与放射能の算定のために、標準コンピューターデータベースプログラム（Ｄｅｂｒａ　バージョン５．２）に入れた。ｄｍｐ／ｇおよび質量ｅｑ／ｇでの放射能の血液、血清、組織およびＣＳＦ濃度を、用量溶液中の放射能標識被験物質の測定比放射能（ｄｐｍ／ｍｇまたは適切な質量単位）に基づいて算定した。血液試料中の放射能濃度を、ラット血液の密度に基づいて質量ｅｑ／ｍＬに変換した。総器官重量に関して、総組織含量を算定した。
薬物動態
【０２４５】
血液、血清、ＣＳＦおよび組織中の総放射能の薬物動態（ＰＫ）プロフィールを、認証コンピュータープログラムを用いて濃度対時間データの非コンパートメント解析により特性化した（ＷｉｎＮｏｎｌｉｎ，　ｖｅｒｓｉｏｎ　３．２，　Ｐｈａｒｓｉｇｈｔ　Ｃｏｒｐ．，　Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ，　Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ，　ＵＳＡ）。静脈内および血管外投与経路に基づいて、モデルを選択した。検出可能または定量可能でないと報告された濃度値は、概算しなかった；それらを、不参加試料として処理した。濃度データを、各時点で異なる動物から得て、平均値を用いて複合薬物動態プロフィールを生成した。群１（Ａｎｉｍａｌ　Ｎｏｓ．　１００１，　１００２，　１００３）および群２（Ａｎｉｍａｌ　Ｎｏｓ．　２００１，　２００２，　２００３）に関する１０分試料採取、ならびに群１に関する４８時間試料採取（Ａｎｉｍａｌ　Ｎｏｓ．　１０１９，　１０２０）は、正常時点の１０％または６分以上逸れた。薬物動態分析では、平均時間を算定し、用いたため、プロトコールからのこの偏差は、試験の妥当性または得られたデータに影響しなかった。
【０２４６】
放射能濃度対時間曲線下の面積（ＡＵＣ）を、線形台形法（線形補間法）を用いて算定した。実際の場合、ＰＫプロフィールの末端消失相を、少なくとも最後の３つの観察濃度

値を用いて最適合の線（$R^2$）に基づいて同定した。非計量濃度データを用いて、対数線形回帰を用いて、末端消失相の勾配を算定した。決定計数（$R^2$）が０．８未満である場合、または無限大へのＡＵＣの外挿が総面積の２０％より大きい場合、$k_{e1}$の決定に頼るパラメーターは報告されなかった。

結果

用量投与処方物の分析（表８）

【０２４７】

各用量投与日に、全群への用量投与の前後に、液体シンチレーション分光法により各処方物のアリコートを分析し、これらの分析から被験物質の比放射能を算定した。髄腔内投与のための処方物中の全体的平均放射能濃度（±Ｓ．Ｄ．）は、群１に関しては、３４５．４×１０$^6$±４．９２×１０$^6$ｄｐｍ／ｇ（１５５．６０μＣｉ／ｇ）、および群３に関しては、３３４．４×１０$^6$±５．８７×１０$^6$ｄｐｍ／ｇ（１５０．６２μＣｉ／ｇ）であった。静脈内投与のための処方物中の全体的平均放射能濃度は、群２に関しては、４．４×１０$^6$±４．２２×１０$^5$ｄｐｍ／ｇ（１．９７μＣｉ／ｇ）、そして群３に関しては、４．７×１０$^6$±２．３１×１０$^5$ｄｐｍ／ｇ（２．１１μＣｉ／ｇ）であった。髄腔内処方物における被験物質の比放射能は、群１用量に関しては、５１．１６μＣｉ／ｍｇおよび群３用量に関しては、４９．５３μＣｉ／ｍｇと算定された。静脈内処方物中の被験物質の比放射能は、群２用量に関しては、６．５３μＣｉ／ｍｇ、群３用量に関しては、６．９９μＣｉ／ｍｇと算定された。

【表８】

**表８：液体シンチレーション分光法による用量投与処方物中の放射能の濃度の結果要約**

| 群番号 | 投与経路 | 場合 | 放射能の平均濃度 | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | (dpm/g) | | (μCi/g) |
| | | | 平均±ＳＤ | CV | Mean |
| 1 | くも膜下<br>腔内髄腔内 | 前用量投与 | 348445137 ± 3391878 | 0.97% | 156.96 |
| | | 後用量投与 | 342426851 ± 4484476 | 1.31% | 154.25 |
| | | 全体的 | 345435994 ± 4924300 | 1.43% | 155.60 |
| 2 | 静脈内<br>ボーラス注射 | 前用量投与 | 4091887 ± 61669 | 1.51% | 1.84 |
| | | 後用量投与 | 4672629 ± 430335 | 9.21% | 2.10 |
| | | 全体的 | 4382258 ± 421765 | 9.62% | 1.97 |
| 3 | くも膜下<br>腔内髄腔内 | 前用量投与 | 332418463 ± 3013337 | 0.91% | 149.74 |
| | | 後用量投与 | 336332353 ± 7582128 | 2.25% | 151.50 |
| | | 全体的 | 334375408 ± 5868250 | 1.75% | 150.62 |
| 3 | 静脈内<br>ボーラス注射 | 前用量投与 | 4827255 ± 92785 | 1.92% | 2.17 |
| | | 後用量投与 | 4545578 ± 247903 | 5.45% | 2.05 |
| | | 全体的 | 4686417 ± 231271 | 4.93% | 2.11 |

動物の体重および投与用量（表９）

【０２４８】

用量投与前日の群１、２および３における動物の平均体重は、それぞれ４０５ｇ（３７３ｇ～４５２ｇの範囲）、４１０ｇ（３６７ｇ～４５３ｇの範囲）および３９５ｇ（３４２ｇ～４４４ｇの範囲）であった。群１動物に髄腔内投与された$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの算定平均用量は、４１±０．０１４μｇ／動物であって、これは、２．１２±０．７２μＣｉ／動物の放射化学的用量と等価であった。　Ｔｈｅ　ｍｅａｎ　ｄｏｓｅ　ｏｆ群２動物に静脈内経路により投与された$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣは、１．００±０．０２ｍｇ／ｋｇ（２．６９±０．１４μＣｉ／動物）であった。群３に関しては、髄腔内および静脈内投与された$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの算定平均用量は、１．０８±０．０４ｍｇ／ｋｇ（５．７２±０．３１μＣｉ／動物）であった。

【表９】

**表９：群平均体重および雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットに投与された$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣ用量の細目**

| 群 | 体重 (kg) | 投与経路 | 放射能 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ＤＰＭ／動物 | μＣｉ／動物 | μCi/kg | ｍｇ／動物 | mg/kg | μｇ／動物 |
| 1 | 0.405 ± 0.022 | IT | 4,715,057 ± 1,600,366 | 2.12 ± 0.72 | 5.26 ± 1.86 | 0.041 ± 0.014 | 0.102 ± 0.037 | 41 |
| 2 | 0.410 ± 0.021 | IV | 5,961,365 ± 306,654 | 2.69 ± 0.14 | 6.55 ± 0.15 | 0.411 ± 0.022 | 1.00 ± 0.023 | - |
| 3[b] | 0.395 ± 0.027 | IT and IV | 12,698,351 ± 686,160 | 5.72 ± 0.31 | 14.5 ± 0.62 | 0.425 ± 0.034 | 1.08 ± 0.042 | - |

【０２４９】

群１における動物に投与された平均化学用量および放射化学用量は、標的用量レベルより低く（それぞれ、約３２％および２９％）、これはプロトコールからの逸脱を生じた。しかしながら、動物に投与された実用量が算定全体を通して用いられたため、これらの低い値は試験の妥当性または得られたデータに影響しないとみなされた。

臨床的観察

【０２５０】

処置関連臨床徴候は、ｉｎｔｒａｔｈｅｃａｌｌｙ　ａｔ　６０μｇ／動物で髄腔内に、１ｍｇ／ｋｇで静脈内に$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣを投与後のラットの何れにおいても観察されなかった。

凝固評価

【０２５１】

早い時点で（用量投与後１０分～６時間）、処置動物から採取された血液は３０分以内に完全に凝固しない、ということが注目された。しかしながら、３匹の非処置スペアラットから採取された血液は容易に凝固したが、これは、被験物質が凝固過程を何らかの形で妨げていることを示唆する。３０分未満またはそれより長い凝固時間は、プロトコールからの逸脱を引き起こした。しかしながら、分析用の多少の血清を提供するためには、いくつかの試料に関してはより長い凝固時間を要した。得られた結果の再検討は、血清において得られた濃度値と血液が凝固に要した時間の長さとの間に相関を明示しなかった。したがって、この延長または短縮凝固時間は、試験の妥当性または得られたデータに影響しなかった。

血液、血清、赤血球、ＣＳＦおよび組織中の総放射能の薬物動態

血液、血清および赤血球中の総放射能濃度（表１０、表１１、表１２、表１８～２１）

【０２５２】

$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの髄腔内および／または静脈内用量投与後の雄ラットの血清中の放射能標識物質の平均濃度を、表１０に示す。全血および赤血球中の放射能標識物質の平

均濃度を、表１１に示す。平均データを、図１８にグラフで示す。ＴＣＡ沈降後の血液の上清およびペレット中で回収される放射能の平均パーセンテージを、表１２に示す。

群１（４１μｇ／動物の髄腔内平均用量投与）

【０２５３】

髄腔内用量投与後、血清および血液中の放射能標識物質の最高平均濃度（$C_{max}$）は、用量投与後３時間で観察された（それぞれ、０．１０８±０．０２６μｇ　ｅｑ／ｇおよび０．０９３±０．０２３μｇ　ｅｑ／ｇ）。血液中の放射能レベルは、用量投与後３～６時間では相対的に一定のままであったが、一方、血清中の放射能レベルは、わずかに減少した。その後、血清および血液中の放射能濃度は減少し、用量投与後４８時間までには定量限界（ＬＯＱ）より低くなった。赤血球に関しては、$C_{max}$は用量投与後６時間で観察され、０．０８±０．０２４　μｇ　ｅｑ／ｇであった。その後、赤血球放射能濃度は減少し、用量投与後４８時間までにはＬＯＱより低くなった。髄腔内用量投与後の平均血液対血清比は、試験期間全体を通して１未満であった（０．７～０．９の範囲）が、これは、放射能標識物質が血球と特定的に会合しなかったことを示す。赤血球対血清比のその値（０．８～０．９の範囲）は、放射能が血球と実質的に会合されなかった、ということも支持した。血液で見出された用量のパーセンテージを、標準血液容積／体重（すなわち、６４．０ｍＬ／ｋｇ）を用いて概算した。$t_{max}$（最高放射能濃度が生じる時間）では、投与用量の約６％が血液と会合された。

群２（１．００μｇ／ｋｇの静脈内平均用量投与）

【０２５４】

静脈内用量投与後、血清（１４．８６４±０．８５３μｇ　ｅｑ／ｇ）および血液（１０．２２８±０．４４７μｇ　ｅｑ／ｇ）中の放射能標識物質の最高平均濃度（$C_{max}$）は、用量投与後１０分で観察された（すなわち、分析初回時点）。その後、血清および血液中の放射能濃度は徐々に減少したが、用量投与後９６時間で依然として検出可能で（血清：０．０８８±０．００６μｇ　ｅｑ／ｇ、$C_{max}$の０．５９％；血液：０．０５１±０．００２μｇ　ｅｑ／ｇ、$C_{max}$の０．５０％）、血液中の用量の概算％は６８．４％から０．３％に低減した。赤血球に関しては、５．１３６±１．５２９μｇ　ｅｑ／ｇという$C_{max}$が用量投与後１０分で観察された。その後、赤血球放射能濃度は減少し、用量投与後９６時間までにはＬＯＱより低くなった。静脈内用量投与後の平均血液対血清比は、試験期間全体を通して１未満であった（０．６～０．８の範囲）が、これは、放射能標識物質が血球と特定的に会合しなかったことを示す。赤血球対血清比のその値（０．４～０．６の範囲）は、放射能が血球と実質的に会合されなかった、ということも支持した。

群３（髄腔内用量投与とその後の静脈内用量投与：１．０８ｍｇ／ｋｇ（併合用量））

【０２５５】

髄腔内用量投与（目標６０μｇ／動物）および静脈内用量投与（１ｍｇ／ｋｇ）後、血清（１４．６７５±０．８１０μｇ　ｅｑ／ｇ）および血液（９．９７４±０．５５８μｇ　ｅｑ／ｇ）中の放射能標識物質の最高平均濃度（$C_{max}$）は、用量投与後１０分で観察された（すなわち、分析初回時点）。その後、血清および血液中の放射能濃度は徐々に減少したが、用量投与後９６時間で依然として検出可能で（血清：０．０７７±０．００１０μｇ　ｅｑ／ｇ、$C_{max}$の０．５２％；血液：０．０３７±０．００３３μｇ　ｅｑ／ｇ、$C_{max}$の０．３７％）、血液中の用量の外挿％は３２．６％から０．１％に低減した。赤血球に関しては、６．１１３±１．７４８μｇ　ｅｑ／ｇという$C_{max}$が用量投与後１０分で観察された。その後、赤血球放射能濃度は減少し、用量投与後９６時間までには定量限界より低くなった。平均血液対血清比および赤血球対血清比が１未満であった（それぞれ、０．７～０．８および０．４～０．７の範囲）ことにより示されるように、放射能標識物質は血球と特定的に会合しなかった。

【表１０ａ－１】

表１０ａ　－　$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内用量投与後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットにおける放射能の群平均濃度

群１：４１μｇ／動物の平均用量において

| 時点 | 放射能濃度 | |
|---|---|---|
| | DPM/g | μg eq/g |
| 10分 | 504 ± 462 | 0.004 ± 0.004 |
| 30分 | 4125 ± 2327 | 0.036 ± 0.020 |
| 1時間 | 5705 ± 1535 | 0.050 ± 0.014 |
| 3時間 | 12311 ± 2960 | 0.108 ± 0.026 |
| 6時間 | 11473 ± 2596 | 0.101 ± 0.023 |
| 24時間 | 884 ± 122 | 0.008 ± 0.001 |
| 48時間 | 0 ± 0 | 0.000 ± 0.000 |
| 96時間 | 0 ± 0 | 0.000 ± 0.000 |

【表１０ａ－２】

表１０ａ　－　$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内用量投与後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの血清中の放射能の群平均濃度

群１：４１μｇ／動物の平均用量において

| 時点 | 放射能濃度 | |
|---|---|---|
| | DPM/g | μg eq/g |
| 10分 | 504 ± 462 | 0.004 ± 0.004 |
| 30分 | 4125 ± 2327 | 0.036 ± 0.020 |
| 1時間 | 5705 ± 1535 | 0.050 ± 0.014 |
| 3時間 | 12311 ± 2960 | 0.108 ± 0.026 |
| 6時間 | 11473 ± 2596 | 0.101 ± 0.023 |
| 24時間 | 884 ± 122 | 0.008 ± 0.001 |
| 48時間 | 0 ± 0 | 0.000 ± 0.000 |
| 96時間 | 0 ± 0 | 0.000 ± 0.000 |

【表１０ｂ】

表１０ｂ　－　$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの血清中の放射能の群平均濃度

群２：１．００ｍｇ／ｋｇの平均用量において

| 時点 | 放射能濃度 | |
|---|---|---|
| | DPM/g | μg eq/g |
| 10分 | 215632 ± 12377 | 14.864 ± 0.853 |
| 30分 | 157259 ± 14339 | 10.840 ± 0.988 |
| 1時間 | 106804 ± 6790 | 7.362 ± 0.468 |
| 3時間 | 47009 ± 3754 | 3.240 ± 0.259 |
| 6時間 | 31898 ± 2417 | 2.199 ± 0.167 |
| 24時間 | 6584 ± 194 | 0.454 ± 0.013 |
| 48時間 | 3523 ± 503 | 0.243 ± 0.035 |
| 96時間 | 1278 ± 86 | 0.088 ± 0.006 |

【表１０ｃ】

表１０ｃ　－　$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内投与および単回静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの血清中の放射能の群平均濃度

群３：１．０８ｍｇ／ｋｇの平均用量において

| 時点 | 放射能濃度 | |
|---|---|---|
| | DPM/g | μg eq/g |
| 10分 | 227675 ± 12574 | 14.675 ± 0.810 |
| 30分 | 171721 ± 10165 | 11.069 ± 0.655 |
| 1時間 | 127621 ± 7785 | 8.226 ± 0.502 |
| 3時間 | 66561 ± 1164 | 4.290 ± 0.075 |
| 6時間 | 54374 ± 4044 | 3.505 ± 0.261 |
| 24時間 | 8894 ± 686 | 0.573 ± 0.044 |
| 48時間 | 3622 ± 458 | 0.233 ± 0.030 |
| 96時間 | 1199 ± 157 | 0.077 ± 0.010 |

【表１１ａ】

表１１ａ　－　$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内用量投与後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの血液中の放射能の群平均濃度および含量ならびに血液対血清比

群１：４１μｇ／動物の平均用量において

| 時点 | 放射能濃度 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | DPM/g | μg eq/g | μg eq/mL | 血液対血清比[b] | 用量のパーセント |
| 10分 | 210 ± 364 | 0.002 ± 0.003 | 0.002 ± 0.003 | 0.696[b] | 0.074 ± 0.128 |
| 30分 | 3579 ± 1918 | 0.032 ± 0.017 | 0.033 ± 0.018 | 0.878 ± 0.029 | 1.822 ± 0.351 |
| 1時間 | 4933 ± 1446 | 0.043 ± 0.013 | 0.046 ± 0.013 | 0.860 ± 0.027 | 3.890 ± 0.253 |
| 3時間 | 10617 ± 2586 | 0.093 ± 0.023 | 0.098 ± 0.024 | 0.862 ± 0.006 | 5.582 ± 0.554 |
| 6時間 | 10530 ± 2507 | 0.093 ± 0.022 | 0.097 ± 0.023 | 0.917 ± 0.035 | 4.664 ± 0.576 |
| 24時間 | 677 ± 118 | 0.006 ± 0.001 | 0.006 ± 0.001 | 0.764 ± 0.032 | 0.600 ± 0.114 |
| 48時間 | 0 ± 0 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | n/a | 0.000 ± 0.000 |
| 96時間 | 0 ± 0 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | n/a | 0.000 ± 0.000 |

【表１１ｂ】

表１１ｂ　－　$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの血液中の放射能の群平均濃度および含量ならびに血液対血清比

群２：１．００ｍｇ／ｋｇの平均用量において

| 時点 | 放射能濃度 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | DPM/g | μg eq/g | μg eq/mL | 血液対血清比[b] | 用量のパーセント |
| 10分 | 148373 ± 6480 | 10.228 ± 0.447 | 10.739 ± 0.469 | 0.688 ± 0.012 | 68.393 ± 3.453 |
| 30分 | 107195 ± 5739 | 7.389 ± 0.396 | 7.759 ± 0.415 | 0.683 ± 0.036 | 49.317 ± 1.788 |
| 1時間 | 77163 ± 694 | 5.319 ± 0.048 | 5.585 ± 0.051 | 0.724 ± 0.040 | 36.460 ± 0.174 |
| 3時間 | 35469 ± 3124 | 2.445 ± 0.215 | 2.567 ± 0.226 | 0.754 ± 0.007 | 16.355 ± 1.166 |
| 6時間 | 24364 ± 1639 | 1.679 ± 0.113 | 1.763 ± 0.119 | 0.764 ± 0.007 | 11.184 ± 0.612 |
| 24時間 | 4794 ± 160 | 0.330 ± 0.011 | 0.347 ± 0.011 | 0.729 ± 0.030 | 2.218 ± 0.076 |
| 48時間 | 2259 ± 233 | 0.156 ± 0.016 | 0.163 ± 0.017 | 0.644 ± 0.028 | 1.042 ± 0.141 |
| 96時間 | 738 ± 29 | 0.051 ± 0.002 | 0.053 ± 0.003 | 0.579 ± 0.052 | 0.341 ± 0.011 |

【表１１ｃ】

表１１ｃ　－　$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内用量投与および静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの血液中の放射能の群平均濃度および含量ならびに血液対血清比

群３：１．０８ｍｇ／ｋｇの平均用量において

| 時点 | 放射能濃度 | | | 血液対血清比 | 用量のパーセント |
|---|---|---|---|---|---|
| | DPM/g | μg eq/g | μg eq/mL | | |
| 10分 | 154742 ± 8651 | 9.974 ± 0.558 | 10.473 ± 0.586 | 0.680 ± 0.009 | 32.599 ± 1.331 |
| 30分 | 117563 ± 4922 | 7.578 ± 0.317 | 7.957 ± 0.333 | 0.685 ± 0.018 | 24.596 ± 1.523 |
| 1時間 | 92086 ± 2812 | 5.936 ± 0.181 | 6.233 ± 0.191 | 0.723 ± 0.022 | 19.132 ± 1.432 |
| 3時間 | 52419 ± 244 | 3.379 ± 0.016 | 3.548 ± 0.016 | 0.788 ± 0.017 | 11.283 ± 0.344 |
| 6時間 | 43097 ± 4071 | 2.778 ± 0.262 | 2.917 ± 0.276 | 0.792 ± 0.019 | 9.263 ± 0.836 |
| 24時間 | 6561 ± 78 | 0.423 ± 0.005 | 0.444 ± 0.006 | 0.740 ± 0.054 | 1.345 ± 0.080 |
| 48時間 | 2362 ± 398 | 0.152 ± 0.026 | 0.160 ± 0.027 | 0.650 ± 0.029 | 0.465 ± 0.083 |
| 96時間 | 581 ± 513 | 0.037 ± 0.033 | 0.039 ± 0.035 | 0.684 ± c | 0.124 ± 0.109 |

【表１１ｄ】

表１１ｄ　－　$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内用量投与後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの赤血球中の放射能の群平均濃度および含量ならびに赤血球対血清比

群１：４１μｇ／動物の平均用量において

| 時点 | 放射能濃度 | | 赤血球対血清比 | 用量のパーセント |
|---|---|---|---|---|
| | DPM/g | μg eq/g | | |
| 10分 | 0 ± 0 | 0.000 ± 0.000 | n/a | 0.000 ± 0.000 |
| 30分 | 3044 ± 1261 | 0.027 ± 0.011 | 0.793 ± 0.148 | 0.213 ± 0.067 |
| 1時間 | 4454 ± 1396 | 0.039 ± 0.012 | 0.773 ± 0.059 | 0.357 ± 0.336 |
| 3時間 | 9768 ± 2664 | 0.086 ± 0.023 | 0.789 ± 0.031 | 0.734 ± 0.300 |
| 6時間 | 10086 ± 2682 | 0.089 ± 0.024 | 0.876 ± 0.083 | 0.616 ± 0.200 |
| 24時間 | 287 ± 497 | 0.003 ± 0.004 | 0.841 [b] | 0.044 ± 0.075 |
| 48時間 | 0 ± 0 | 0.000 ± 0.000 | n/a | 0.000 ± 0.000 |
| 96時間 | 0 ± 0 | 0.000 ± 0.000 | n/a | 0.000 ± 0.000 |

【表１１ｅ】

表１１ｅ　－　$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの赤血球中の放射能の群平均濃度および含量ならびに赤血球対血清比

群２：１．００ｇ／ｋｇの平均用量において

| 時点 | 放射能濃度 | | 赤血球対血清比 | 用量のパーセント |
|---|---|---|---|---|
| | DPM/g | μg eq/g | | |
| 10分 | 74506 ± 22185 | 5.136 ± 1.529 | 0.350 ± 0.119 | 4.110 ± 2.794 |
| 30分 | 59201 ± 14694 | 4.081 ± 1.013 | 0.377 ± 0.086 | 2.600 ± 1.087 |
| 1時間 | 52799 ± 23155 | 3.639 ± 1.596 | 0.487 ± 0.196 | 3.229 ± 2.403 |
| 3時間 | 28039 ± 3432 | 1.933 ± 0.237 | 0.599 ± 0.083 | 1.709 ± 0.734 |
| 6時間 | 19662 ± 2540 | 1.355 ± 0.175 | 0.616 ± 0.057 | 1.143 ± 0.315 |
| 24時間 | 3714 ± 292 | 0.256 ± 0.020 | 0.564 ± 0.040 | 0.164 ± 0.111 |
| 48時間 | 1619 ± 482 | 0.112 ± 0.033 | 0.453 ± 0.082 | 0.076 ± 0.064 |
| 96時間 | 0 ± 0 | 0.000 ± 0.000 | n/a | 0.000 ± 0.000 |

【表１１ｆ】

表１１ｆ　－　$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内用量投与および静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの赤血球中の放射能の群平均濃度および含量ならびに赤血球対血清比

群３：１．０８ｇ／ｋｇの平均用量において

| 時点 | 放射能濃度 | | 赤血球対血清比 | 用量のパーセント |
|---|---|---|---|---|
| | DPM/g | μg eq/g | | |
| 10分 | 94843 ± 27122 | 6.113 ± 1.748 | 0.414 ± 0.104 | 3.640 ± 1.162 |
| 30分 | 65477 ± 23687 | 4.220 ± 1.527 | 0.378 ± 0.117 | 2.266 ± 1.583 |
| 1時間 | 61906 ± 14623 | 3.990 ± 0.943 | 0.489 ± 0.130 | 2.253 ± 1.300 |
| 3時間 | 38985 ± 8524 | 2.513 ± 0.549 | 0.586 ± 0.128 | 0.992 ± 0.458 |
| 6時間 | 37327 ± 4497 | 2.406 ± 0.290 | 0.685 ± 0.038 | 1.479 ± 0.417 |
| 24時間 | 5250 ± 334 | 0.338 ± 0.022 | 0.591 ± 0.032 | 0.139 ± 0.070 |
| 48時間 | 2109 ± 319 | 0.136 ± 0.021 | 0.581 ± 0.022 | 0.060 ± 0.017 |
| 96時間 | 0 ± 0 | 0.000 ± 0.000 | n/a | 0.000 ± 0.000 |

【表１２ａ】

表１２ａ　－　$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内用量投与後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットからの血液の上清およびペレット中で回収された平均放射能％

群２：１．００ｇ／ｋｇの平均用量において

| 時点 | 放射能の回収％ | |
|---|---|---|
| | ペレット | 上清 |
| 10分 | 100 ± 0 | 0 ± 0 |
| 30分 | 75.1 ± 10.7 | 24.9 ± 10.7 |
| 1時間 | 71.8 ± 11.7 | 28.2 ± 11.7 |
| 3時間 | 81.2 ± 2.38 | 18.8 ± 2.38 |
| 6時間 | 67.3 ± 13.5 | 32.7 ± 13.5 |
| 24時間 | 100 ± 0 | 0 ± 0 |
| 48時間 | 100 ± 0 | 0 ± 0 |
| 96時間 | 100 ± 0 | 0 ± 0 |

【表１２ｂ】

表１２ｂ　－　$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットからの血液の上清およびペレット中で回収された平均放射能％

群２：１．００ｍｇ／ｋｇの平均用量において

| 時点 | 放射能の回収％ | |
|---|---|---|
| | ペレット | 上清 |
| 10分 | 99.2 ± 0.03 | 0.85 ± 0.03 |
| 30分 | 97.5 ± 0.32 | 2.48 ± 0.32 |
| 1時間 | 95.8 ± 0.56 | 4.23 ± 0.56 |
| 3時間 | 92.5 ± 0.17 | 7.49 ± 0.17 |
| 6時間 | 90.7 ± 0.45 | 9.26 ± 0.45 |
| 24時間 | 100 ± 0 | 0 ± 0 |
| 48時間 | 100 ± 0 | 0 ± 0 |
| 96時間 | 100 ± 0 | 0 ± 0 |

【表１２ｃ】

**表１２ｃ　－　$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内用量投与および静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットからの血液の上清およびペレット中で回収された平均放射能％**

群３：１．０８ｍｇ／ｋｇの平均用量において

| 時点 | 放射能の回収％ | |
|---|---|---|
| | ペレット | 上清 |
| 10分 | 99.0 ± 0.11 | 1.02 ± 0.11 |
| 30分 | 95.9 ± 0.49 | 4.07 ± 0.49 |
| 1時間 | 94.5 ± 0.56 | 5.55 ± 0.56 |
| 3時間 | 88.1 ± 5.34 | 11.9 ± 5.34 |
| 6時間 | 88.9 ± 1.03 | 11.1 ± 1.03 |
| 24時間 | 90.7 ± 3.48 | 9.33 ± 3.48 |
| 48時間 | 100 ± 0 | 0 ± 0 |
| 96時間 | 100 ± 0 | 0 ± 0 |

全血中の$^{125}$Ｉ－沈澱性物質（表１２）

【０２５６】

群１、２および３に関するトリクロロ酢酸（ＴＣＡ）による全血における沈澱後のペレットおよび上清中の放射能の回収に関する平均値を、表１２に要約する。全血中のタンパク質を沈澱させるためにＴＣＡの１５％水溶液を用いる場合、放射能は主に血液のペレット中で回収された（群１：１００％～６７％；群２：１００％～９１％；群３：１００％～８８％）が、これは、循環放射能の大部分がタンパク質と会合され、したがって遊離$^{125}$ヨウ素を反映していない、ということを示唆している。　　組織および脳脊髄液（ＣＳＦ）中の放射能濃度（表１３、表１４、表１５、図１９～３０）

【０２５７】

$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内および静脈内用量投与後の組織およびＣＳＦ中の放射能の平均濃度を、表１３に示す。平均データは、図１９～３０にグラフで示す。平均組織対血清比は表１４に示し、そして組織、ＣＳＦ、ならびに消化器および膀胱内容物中の投与用量の回収は表１５に示す。

【表１３ａ】

表１３ａ　－　$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内用量投与後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの組織、脳脊髄液中の放射能の群平均濃度

群１：４１μｇ／動物の平均用量において

| 試料 | 放射能の濃度, μg eq/g [a] | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 10分 | 30分 | 1時間 | 3時間 |
| 脂肪組織（腎臓脂肪） | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.005 ± 0.004 |
| 副腎 | 0.000 ± 0.000 | 0.014 ± 0.006 | 0.017 ± 0.006 | 0.021 ± 0.005 |
| 大腿骨 | 0.000 ± 0.000 | 0.011 ± 0.006 | 0.016 ± 0.005 | 0.040 ± 0.012 |
| 脳 | 0.000 ± 0.000 | 0.003 ± 0.003 | 0.004 ± 0.004 | 0.005 ± 0.001 |
| 脳脊髄液（ＣＳＦ） | 0.000 [b] | 0.000 [b] | 0.000 [b] | 0.000 ± 0.000 |
| 眼 | 0.000 ± 0.000 | 0.006 ± 0.004 | 0.011 ± 0.003 | 0.027 ± 0.006 |
| 心臓 | 0.001 ± 0.002 | 0.014 ± 0.006 | 0.017 ± 0.005 | 0.028 ± 0.006 |
| 腎臓 | 0.004 ± 0.004 | 0.042 ± 0.023 | 0.052 ± 0.014 | 0.096 ± 0.018 |
| 大腸 | 0.000 ± 0.000 | 0.009 ± 0.004 | 0.011 ± 0.003 | 0.024 ± 0.010 |
| 肝臓 | 0.000 ± 0.000 | 0.012 ± 0.007 | 0.015 ± 0.006 | 0.029 ± 0.008 |
| 肺 | 0.002 ± 0.003 | 0.020 ± 0.010 | 0.027 ± 0.008 | 0.058 ± 0.014 |
| 筋肉（骨格筋） | 0.000 ± 0.000 | 0.007 ± 0.003 | 0.010 ± 0.002 | 0.014 ± 0.003 |
| 坐骨神経 | 0.000 ± 0.000 | 0.008 ± 0.008 | 0.012 ± 0.011 | 0.043 ± 0.017 |
| 小腸 | 0.000 ± 0.000 | 0.011 ± 0.005 | 0.016 ± 0.005 | 0.046 ± 0.013 |
| 脊髄（腰椎、胸椎、頚椎） | 0.000 ± 0.000 | 0.004 ± 0.004 | 0.006 ± 0.002 | 0.009 ± 0.001 |
| 脾臓 | 0.000 ± 0.000 | 0.014 ± 0.008 | 0.019 ± 0.006 | 0.040 ± 0.010 |
| 胃 | 0.003 ± 0.002 | 0.022 ± 0.010 | 0.037 ± 0.017 | 0.203 ± 0.101 |
| 甲状腺／上皮小体 | 0.020 ± 0.019 | 0.149 ± 0.083 | 0.278 ± 0.147 | 2.031 ± 1.228 |

| 試料 | 放射能の濃度, μg eq/g [a] | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 6時間 | 24時間 | 48時間 | 96時間 |
| 脂肪組織（腎臓脂肪） | 0.006 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 副腎 | 0.020 ± 0.002 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 大腿骨 | 0.041 ± 0.007 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 脳 | 0.004 ± 0.001 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 脳脊髄液（ＣＳＦ） | 0.000 [b] | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 眼 | 0.024 ± 0.003 | 0.001 ± 0.001 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 心臓 | 0.026 ± 0.004 | 0.001 ± 0.002 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 腎臓 | 0.082 ± 0.012 | 0.012 ± 0.001 | 0.008 ± 0.002 | 0.005 ± 0.001 |
| 大腸 | 0.024 ± 0.003 | 0.002 ± 0.002 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 肝臓 | 0.030 ± 0.008 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 肺 | 0.055 ± 0.012 | 0.004 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 筋肉（骨格筋） | 0.012 ± 0.002 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 坐骨神経 | 0.050 ± 0.013 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 小腸 | 0.041 ± 0.015 | 0.004 ± 0.001 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 脊髄（腰椎、胸椎、頚椎） | 0.008 ± 0.003 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 脾臓 | 0.036 ± 0.007 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 胃 | 0.163 ± 0.060 | 0.008 ± 0.001 | 0.003 ± 0.000 | 0.002 ± 0.001 |
| 甲状腺／上皮小体 | 2.453 ± 0.554 | 4.126 ± 1.073 | 4.127 ± 1.635 | 1.927 ± 1.585 |

【表１３ｂ】

表１３ｂ　－　$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの組織、脳脊髄液中の放射能の群平均濃度

群２：１．００ｍｇ／ｋｇの平均用量において

| 試料 | 放射能の濃度, μg eq/g [a] | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 10分 | 30分 | 1時間 | 3時間 |
| 脂肪組織（腎臓脂肪） | 0.138 ± 0.054 | 0.158 ± 0.019 | 0.128 ± 0.007 | 0.092 ± 0.008 |
| 副腎 | 8.827 ± 2.435 | 7.090 ± 0.547 | 4.360 ± 0.574 | 1.873 ± 0.070 |
| 大腿骨 | 1.568 ± 0.013 | 1.584 ± 0.223 | 1.286 ± 0.166 | 0.887 ± 0.090 |
| 脳 | 0.252 ± 0.041 | 0.236 ± 0.017 | 0.195 ± 0.018 | 0.083 ± 0.002 |
| 脳脊髄液（ＣＳＦ） | 0.137 ± 0.238 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 [b] | 0.210 ± 0.363 |
| 眼 | 0.110 ± 0.010 | 0.307 ± 0.016 | 0.406 ± 0.027 | 0.344 ± 0.049 |
| 心臓 | 1.215 ± 0.122 | 1.108 ± 0.039 | 0.999 ± 0.052 | 0.558 ± 0.093 |
| 腎臓 | 3.027 ± 0.330 | 2.872 ± 0.139 | 2.288 ± 0.149 | 1.657 ± 0.190 |
| 大腸 | 0.328 ± 0.072 | 0.467 ± 0.110 | 0.492 ± 0.103 | 0.397 ± 0.031 |
| 肝臓 | 11.335 ± 1.436 | 8.688 ± 0.788 | 5.904 ± 0.367 | 3.590 ± 0.192 |
| 肺 | 11.584 ± 0.906 | 20.629 ± 2.125 | 18.436 ± 3.906 | 8.526 ± 0.815 |
| 筋肉（骨格筋） | 0.128 ± 0.011 | 0.261 ± 0.039 | 0.275 ± 0.025 | 0.189 ± 0.007 |
| 坐骨神経 | 0.173 ± 0.023 | 0.336 ± 0.108 | 0.584 ± 0.059 | 0.689 ± 0.056 |
| 小腸 | 0.424 ± 0.004 | 0.691 ± 0.031 | 0.786 ± 0.125 | 0.832 ± 0.166 |
| 脊髄（腰椎、胸椎、頚椎） | 0.293 ± 0.028 | 0.272 ± 0.000 | 0.277 ± 0.008 | 0.142 ± 0.010 |
| 脾臓 | 6.595 ± 0.625 | 5.952 ± 1.316 | 4.187 ± 0.311 | 2.010 ± 0.333 |
| 胃 | 0.433 ± 0.088 | 0.939 ± 0.204 | 1.430 ± 0.076 | 2.404 ± 0.139 |
| 甲状腺／上皮小体 | 4.485 ± 1.194 | 22.335 ± 2.598 | 37.990 ± 11.900 | 147.644 ± 56.596 |

| 試料 | 放射能の濃度, μg eq/g [a] | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 6時間 | 24時間 | 48時間 | 96時間 |
| 脂肪組織（腎臓脂肪） | 0.077 ± 0.007 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 副腎 | 1.213 ± 0.031 | 0.339 ± 0.033 | 0.142 ± 0.013 | 0.074 ± 0.010 |
| 大腿骨 | 0.726 ± 0.053 | 0.106 ± 0.016 | 0.034 ± 0.030 | 0.000 ± 0.000 |
| 脳 | 0.066 ± 0.009 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 脳脊髄液（ＣＳＦ） | 0.185 ± 0.321 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 眼 | 0.336 ± 0.080 | 0.033 ± 0.006 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 心臓 | 0.440 ± 0.032 | 0.075 ± 0.011 | 0.040 ± 0.002 | 0.000 ± 0.000 |
| 腎臓 | 1.418 ± 0.108 | 0.337 ± 0.021 | 0.199 ± 0.009 | 0.099 ± 0.010 |
| 大腸 | 0.376 ± 0.077 | 0.054 ± 0.009 | 0.026 ± 0.003 | 0.000 ± 0.000 |
| 肝臓 | 3.179 ± 0.188 | 1.020 ± 0.091 | 0.506 ± 0.046 | 0.126 ± 0.014 |
| 肺 | 3.187 ± 0.079 | 2.958 ± 1.012 | 0.325 ± 0.114 | 0.069 ± 0.003 |
| 筋肉（骨格筋） | 0.153 ± 0.018 | 0.008 ± 0.014 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 坐骨神経 | 0.643 ± 0.063 | 0.025 ± 0.043 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 小腸 | 0.691 ± 0.121 | 0.094 ± 0.025 | 0.041 ± 0.012 | 0.000 ± 0.000 |
| 脊髄（腰椎、胸椎、頚椎） | 0.128 ± 0.017 | 0.014 ± 0.013 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 脾臓 | 1.667 ± 0.091 | 0.565 ± 0.046 | 0.250 ± 0.038 | 0.111 ± 0.009 |
| 胃 | 1.688 ± 0.310 | 0.180 ± 0.057 | 0.047 ± 0.005 | 0.015 ± 0.013 |
| 甲状腺／上皮小体 | 267.423 ± 177.568 | 280.829 ± 84.988 | 294.521 ± 52.953 | 218.917 ± 45.098 |

【表１３ｃ】

表１３ｃ　－　$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内用量投与および静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの組織、脳脊髄液中の放射能の群平均濃度

群３：１．０８ｍｇ／ｋｇの平均用量において

| 試料 | 放射能の濃度, μg eq/g[a] | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 10分 | 30分 | 1時間 | 3時間 |
| 脂肪組織（腎臓脂肪） | 0.140 ± 0.029 | 0.176 ± 0.051 | 0.188 ± 0.020 | 0.161 ± 0.008 |
| 副腎 | 9.567 ± 1.678 | 5.487 ± 1.129 | 4.868 ± 0.930 | 2.010 ± 0.331 |
| 大腿骨 | 1.227 ± 0.137 | 1.707 ± 0.160 | 1.571 ± 0.071 | 1.261 ± 0.030 |
| 脳 | 0.283 ± 0.062 | 0.276 ± 0.010 | 0.230 ± 0.008 | 0.153 ± 0.023 |
| 脳脊髄液（ＣＳＦ） | 2.087 ± 2.912 | 0.380 ± 0.371 | 0.598 ± 1.035 | 0.105 ± 0.182 |
| 眼 | 0.110 ± 0.018 | 0.372 ± 0.042 | 0.539 ± 0.019 | 0.611 ± 0.079 |
| 心臓 | 1.034 ± 0.049 | 1.315 ± 0.156 | 1.188 ± 0.028 | 0.845 ± 0.039 |
| 腎臓 | 2.864 ± 0.353 | 3.324 ± 0.265 | 3.390 ± 0.183 | 2.822 ± 0.020 |
| 大腸 | 0.261 ± 0.026 | 0.567 ± 0.051 | 0.716 ± 0.098 | 0.681 ± 0.102 |
| 肝臓 | 10.181 ± 0.600 | 8.475 ± 0.204 | 6.237 ± 0.341 | 3.740 ± 0.055 |
| 肺 | 3.133 ± 0.350 | 5.162 ± 0.564 | 5.305 ± 0.194 | 2.727 ± 0.198 |
| 筋肉（骨格筋） | 0.119 ± 0.006 | 0.297 ± 0.011 | 0.411 ± 0.009 | 0.298 ± 0.015 |
| 坐骨神経 | 0.244 ± 0.037 | 0.558 ± 0.023 | 0.994 ± 0.096 | 1.043 ± 0.057 |
| 小腸 | 0.304 ± 0.093 | 0.778 ± 0.037 | 1.149 ± 0.110 | 1.401 ± 0.152 |
| 脊髄（腰椎、胸椎、頚椎） | 0.327 ± 0.062 | 0.319 ± 0.025 | 0.285 ± 0.044 | 0.227 ± 0.019 |
| 脾臓 | 5.042 ± 0.902 | 4.721 ± 0.302 | 3.740 ± 0.406 | 2.186 ± 0.218 |
| 胃 | 0.465 ± 0.068 | 1.028 ± 0.175 | 2.450 ± 0.569 | 4.454 ± 1.455 |
| 甲状腺／上皮小体 | 3.191 ± 1.542 | 21.727 ± 8.873 | 30.411 ± 18.766 | 139.771 ± 37.999 |

| 試料 | 放射能の濃度, μg eq/g[a] | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 6時間 | 24時間 | 48時間 | 96時間 |
| 脂肪組織（腎臓脂肪） | 0.131 ± 0.005 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 副腎 | 1.412 ± 0.137 | 0.301 ± 0.014 | 0.118 ± 0.013 | 0.069 ± 0.016 |
| 大腿骨 | 1.165 ± 0.066 | 0.148 ± 0.012 | 0.029 ± 0.026 | 0.000 ± 0.000 |
| 脳 | 0.098 ± 0.012 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 脳脊髄液（ＣＳＦ） | 0.000[b] | 0.000[b] | 0.000[b] | 0.000 ± 0.000 |
| 眼 | 0.574 ± 0.085 | 0.064 ± 0.006 | 0.010 ± 0.009 | 0.000 ± 0.000 |
| 心臓 | 0.723 ± 0.057 | 0.101 ± 0.008 | 0.038 ± 0.007 | 0.006 ± 0.011 |
| 腎臓 | 2.046 ± 0.229 | 0.515 ± 0.019 | 0.249 ± 0.029 | 0.124 ± 0.005 |
| 大腸 | 0.726 ± 0.173 | 0.074 ± 0.014 | 0.027 ± 0.004 | 0.000 ± 0.000 |
| 肝臓 | 3.156 ± 0.143 | 0.996 ± 0.035 | 0.418 ± 0.036 | 0.137 ± 0.018 |
| 肺 | 1.830 ± 0.133 | 0.223 ± 0.007 | 0.076 ± 0.020 | 0.033 ± 0.008 |
| 筋肉（骨格筋） | 0.253 ± 0.029 | 0.032 ± 0.002 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 坐骨神経 | 1.039 ± 0.133 | 0.056 ± 0.098 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 小腸 | 1.102 ± 0.101 | 0.136 ± 0.027 | 0.033 ± 0.008 | 0.000 ± 0.000 |
| 脊髄（腰椎、胸椎、頚椎） | 0.202 ± 0.032 | 0.026 ± 0.003 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 脾臓 | 1.648 ± 0.109 | 0.395 ± 0.017 | 0.152 ± 0.009 | 0.083 ± 0.009 |
| 胃 | 4.242 ± 1.361 | 0.463 ± 0.357 | 0.064 ± 0.014 | 0.031 ± 0.005 |
| 甲状腺／上皮小体 | 182.099 ± 38.422 | 296.957 ± 57.793 | 199.316 ± 26.285 | 43.962 ± 23.164 |

【表１４ａ】

表１４ａ － $^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内用量投与後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの群平均組織、脳脊髄液対血清放射能比

群１：４１μｇ／動物の平均用量において

| | 組織、ＣＳＦ対血清比 | | | |
|---|---|---|---|---|
| 試料 | 10分 | 30分 | 1時間 | 3時間 |
| 脂肪組織（腎臓脂肪） | n/a | n/a | n/a | 0.071 [b] |
| 副腎 | n/a | 0.421 ± 0.116 | 0.324 ± 0.033 | 0.196 ± 0.012 |
| 大腿骨 | n/a | 0.308 ± 0.010 | 0.319 ± 0.038 | 0.369 ± 0.028 |
| 脳 | n/a | 0.097 [b] | 0.110 ± 0.018 | 0.045 ± 0.006 |
| 脳脊髄液（ＣＳＦ） | n/a | n/a | n/a | n/a |
| 眼 | n/a | 0.177 ± 0.032 | 0.216 ± 0.020 | 0.253 ± 0.007 |
| 心臓 | 0.333 | 0.412 ± 0.076 | 0.329 ± 0.008 | 0.265 ± 0.012 |
| 腎臓 | 0.976 | 1.157 ± 0.040 | 1.036 ± 0.062 | 0.895 ± 0.058 |
| 大腸 | n/a | 0.249 ± 0.027 | 0.220 ± 0.023 | 0.220 ± 0.048 |
| 肝臓 | n/a | 0.351 ± 0.028 | 0.302 ± 0.036 | 0.265 ± 0.015 |
| 肺 | 0.576 | 0.565 ± 0.050 | 0.533 ± 0.034 | 0.532 ± 0.003 |
| 筋肉（骨格筋） | n/a | 0.197 ± 0.032 | 0.192 ± 0.011 | 0.134 ± 0.021 |
| 坐骨神経 | n/a | 0.249 [b] | 0.317 [b] | 0.382 ± 0.074 |
| 小腸 | n/a | 0.318 ± 0.035 | 0.312 ± 0.035 | 0.426 ± 0.018 |
| 脊髄（腰椎、胸椎、頚椎） | n/a | 0.144 [b] | 0.117 ± 0.017 | 0.082 ± 0.010 |
| 脾臓 | n/a | 0.395 ± 0.036 | 0.382 ± 0.013 | 0.368 ± 0.007 |
| 胃 | 0.577 | 0.627 ± 0.072 | 0.723 ± 0.252 | 1.801 ± 0.619 |
| 甲状腺／上皮小体 | 4.443 | 4.035 ± 0.750 | 5.680 ± 2.612 | 17.423 ± 8.215 |

| | 組織、ＣＳＦ対血清比 | | | |
|---|---|---|---|---|
| 試料 | 6時間 | 24時間 | 48時間 | 96時間 |
| 脂肪組織（腎臓脂肪） | 0.057 ± 0.012 | n/a | n/a | n/a |
| 副腎 | 0.197 ± 0.026 | n/a | n/a | n/a |
| 大腿骨 | 0.407 ± 0.022 | n/a | n/a | n/a |
| 脳 | 0.040 ± 0.005 | n/a | n/a | n/a |
| 脳脊髄液（ＣＳＦ） | n/a | n/a | n/a | n/a |
| 眼 | 0.245 ± 0.023 | 0.284 [b] | n/a | n/a |
| 心臓 | 0.258 ± 0.022 | 0.343 [b] | n/a | n/a |
| 腎臓 | 0.821 ± 0.066 | 1.491 ± 0.128 | n/a | n/a |
| 大腸 | 0.250 ± 0.074 | 0.395 [b] | n/a | n/a |
| 肝臓 | 0.293 ± 0.029 | n/a | n/a | n/a |
| 肺 | 0.547 ± 0.009 | 0.489 ± 0.105 | n/a | n/a |
| 筋肉（骨格筋） | 0.115 ± 0.013 | n/a | n/a | n/a |
| 坐骨神経 | 0.496 ± 0.030 | n/a | n/a | n/a |
| 小腸 | 0.400 ± 0.059 | 0.550 ± 0.021 | n/a | n/a |
| 脊髄（腰椎、胸椎、頚椎） | 0.079 ± 0.009 | n/a | n/a | n/a |
| 脾臓 | 0.357 ± 0.009 | n/a | n/a | n/a |
| 胃 | 1.604 ± 0.478 | 1.085 ± 0.155 | n/a | n/a |
| 甲状腺／上皮小体 | 24.297 ± 0.831 | 527.002 ± 100.186 | n/a | n/a |

【表１４ｂ】

表１４ｂ　－　$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの群平均組織、脳脊髄液対血清放射能比

群２：１．００ｍｇ／ｋｇの平均用量において

| 試料 | 組織、ＣＳＦ対血清比 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 10分 | 30分 | 1時間 | 3時間 |
| 脂肪組織（腎臓脂肪） | 0.009 ± 0.003 | 0.015 ± 0.003 | 0.017 ± 0.001 | 0.028 ± 0.003 |
| 副腎 | 0.589 ± 0.133 | 0.654 ± 0.010 | 0.594 ± 0.089 | 0.580 ± 0.039 |
| 大腿骨 | 0.106 ± 0.006 | 0.146 ± 0.019 | 0.174 ± 0.012 | 0.273 ± 0.008 |
| 脳 | 0.017 ± 0.002 | 0.022 ± 0.003 | 0.027 ± 0.002 | 0.026 ± 0.002 |
| 脳脊髄液（ＣＳＦ） | 0.028 [b] | n/a | n/a | 0.188 [b] |
| 眼 | 0.007 ± 0.001 | 0.028 ± 0.002 | 0.055 ± 0.008 | 0.106 ± 0.009 |
| 心臓 | 0.082 ± 0.004 | 0.103 ± 0.006 | 0.136 ± 0.007 | 0.171 ± 0.016 |
| 腎臓 | 0.203 ± 0.011 | 0.266 ± 0.019 | 0.311 ± 0.015 | 0.512 ± 0.043 |
| 大腸 | 0.022 ± 0.004 | 0.043 ± 0.009 | 0.067 ± 0.012 | 0.123 ± 0.019 |
| 肝臓 | 0.766 ± 0.119 | 0.802 ± 0.026 | 0.805 ± 0.085 | 1.110 ± 0.055 |
| 肺 | 0.781 ± 0.070 | 1.903 ± 0.100 | 2.496 ± 0.452 | 2.642 ± 0.316 |
| 筋肉（骨格筋） | 0.008 ± 0.001 | 0.024 ± 0.004 | 0.037 ± 0.002 | 0.059 ± 0.004 |
| 坐骨神経 | 0.012 ± 0.002 | 0.032 ± 0.012 | 0.080 ± 0.009 | 0.213 ± 0.007 |
| 小腸 | 0.029 ± 0.002 | 0.064 ± 0.007 | 0.107 ± 0.019 | 0.255 ± 0.032 |
| 脊髄（腰椎、胸椎、頚椎） | 0.019 ± 0.002 | 0.025 ± 0.002 | 0.038 ± 0.001 | 0.044 ± 0.007 |
| 脾臓 | 0.443 ± 0.016 | 0.547 ± 0.090 | 0.571 ± 0.075 | 0.618 ± 0.065 |
| 胃 | 0.029 ± 0.004 | 0.086 ± 0.013 | 0.194 ± 0.012 | 0.743 ± 0.028 |
| 甲状腺／上皮小体 | 0.305 ± 0.092 | 2.074 ± 0.319 | 5.106 ± 1.355 | 46.707 ± 21.839 |

| 試料 | 組織、ＣＳＦ対血清比 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 6時間 | 24時間 | 48時間 | 96時間 |
| 脂肪組織（腎臓脂肪） | 0.035 ± 0.003 | n/a | n/a | n/a |
| 副腎 | 0.554 ± 0.045 | 0.747 ± 0.061 | 0.593 ± 0.104 | 0.845 ± 0.120 |
| 大腿骨 | 0.330 ± 0.004 | 0.234 ± 0.030 | 0.225 [b] | n/a |
| 脳 | 0.030 ± 0.002 | n/a | n/a | n/a |
| 脳脊髄液（ＣＳＦ） | 0.232 [b] | n/a | n/a | n/a |
| 眼 | 0.152 ± 0.024 | 0.073 ± 0.012 | n/a | n/a |
| 心臓 | 0.200 ± 0.010 | 0.165 ± 0.024 | 0.167 ± 0.025 | n/a |
| 腎臓 | 0.649 ± 0.086 | 0.741 ± 0.025 | 0.833 ± 0.169 | 1.118 ± 0.086 |
| 大腸 | 0.171 ± 0.035 | 0.119 ± 0.020 | 0.109 ± 0.008 | n/a |
| 肝臓 | 1.449 ± 0.096 | 2.245 ± 0.142 | 2.109 ± 0.302 | 1.440 ± 0.229 |
| 肺 | 1.453 ± 0.071 | 6.505 ± 2.210 | 1.345 ± 0.431 | 0.780 ± 0.033 |
| 筋肉（骨格筋） | 0.069 ± 0.005 | 0.052 [b] | n/a | n/a |
| 坐骨神経 | 0.292 ± 0.011 | 0.169 [b] | n/a | n/a |
| 小腸 | 0.316 ± 0.065 | 0.207 ± 0.057 | 0.175 ± 0.070 | n/a |
| 脊髄（腰椎、胸椎、頚椎） | 0.058 ± 0.003 | 0.047 [b] | n/a | n/a |
| 脾臓 | 0.762 ± 0.084 | 1.247 ± 0.134 | 1.030 ± 0.098 | 1.263 ± 0.069 |
| 胃 | 0.774 ± 0.176 | 0.397 ± 0.129 | 0.197 ± 0.047 | 0.263 [b] |
| 甲状腺／上皮小体 | 124.616 ± 86.507 | 615.613 ± 169.527 | 1231.684 ± 285.895 | 2484.660 ± 471.907 |

【表１４ｃ】

表１４ｃ　－　$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内用量投与および静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの群平均組織、脳脊髄液対血清放射能比

群３：１．０８ｍｇ／ｋｇの平均用量において

| | 組織、ＣＳＦ対血清比 | | | |
|---|---|---|---|---|
| 試料 | 10分 | 30分 | 1時間 | 3時間 |
| 脂肪組織（腎臓脂肪） | 0.010 ± 0.002 | 0.016 ± 0.005 | 0.023 ± 0.003 | 0.037 ± 0.002 |
| 副腎 | 0.649 ± 0.076 | 0.493 ± 0.072 | 0.589 ± 0.077 | 0.468 ± 0.069 |
| 大腿骨 | 0.083 ± 0.006 | 0.155 ± 0.012 | 0.191 ± 0.013 | 0.294 ± 0.005 |
| 脳 | 0.019 ± 0.003 | 0.025 ± 0.001 | 0.028 ± 0.003 | 0.035 ± 0.005 |
| 脳脊髄液（ＣＳＦ） | 0.204 [b] | 0.053 [b] | 0.221 [b] | 0.072 [b] |
| 眼 | 0.007 ± 0.001 | 0.034 ± 0.005 | 0.066 ± 0.007 | 0.143 ± 0.021 |
| 心臓 | 0.071 ± 0.001 | 0.119 ± 0.015 | 0.145 ± 0.011 | 0.197 ± 0.012 |
| 腎臓 | 0.195 ± 0.013 | 0.302 ± 0.041 | 0.413 ± 0.022 | 0.658 ± 0.016 |
| 大腸 | 0.018 ± 0.002 | 0.051 ± 0.005 | 0.087 ± 0.011 | 0.159 ± 0.023 |
| 肝臓 | 0.694 ± 0.007 | 0.768 ± 0.061 | 0.759 ± 0.023 | 0.872 ± 0.024 |
| 肺 | 0.214 ± 0.030 | 0.465 ± 0.025 | 0.646 ± 0.045 | 0.635 ± 0.036 |
| 筋肉（骨格筋） | 0.008 ± 0.001 | 0.027 ± 0.002 | 0.050 ± 0.003 | 0.070 ± 0.005 |
| 坐骨神経 | 0.017 ± 0.003 | 0.050 ± 0.004 | 0.122 ± 0.018 | 0.243 ± 0.012 |
| 小腸 | 0.021 ± 0.007 | 0.071 ± 0.007 | 0.140 ± 0.016 | 0.326 ± 0.029 |
| 脊髄（腰椎、胸椎、頸椎） | 0.022 ± 0.005 | 0.029 ± 0.001 | 0.035 ± 0.007 | 0.053 ± 0.004 |
| 脾臓 | 0.342 ± 0.044 | 0.427 ± 0.036 | 0.455 ± 0.044 | 0.510 ± 0.049 |
| 胃 | 0.032 ± 0.005 | 0.094 ± 0.020 | 0.300 ± 0.078 | 1.039 ± 0.348 |
| 甲状腺／上皮小体 | 0.217 ± 0.108 | 1.960 ± 0.776 | 3.781 ± 2.521 | 32.561 ± 8.787 |

| | 組織、ＣＳＦ対血清比 | | | |
|---|---|---|---|---|
| 試料 | 6時間 | 24時間 | 48時間 | 96時間 |
| 脂肪組織（腎臓脂肪） | 0.038 ± 0.003 | n/a | n/a | n/a |
| 副腎 | 0.405 ± 0.059 | 0.527 ± 0.029 | 0.514 ± 0.108 | 0.918 ± 0.317 |
| 大腿骨 | 0.333 ± 0.006 | 0.258 ± 0.026 | 0.183 [b] | n/a |
| 脳 | 0.028 ± 0.001 | n/a | n/a | n/a |
| 脳脊髄液（ＣＳＦ） | n/a | n/a | n/a | n/a |
| 眼 | 0.163 ± 0.012 | 0.113 ± 0.019 | 0.068 [b] | n/a |
| 心臓 | 0.206 ± 0.001 | 0.177 ± 0.018 | 0.164 ± 0.008 | 0.246 [b] |
| 腎臓 | 0.583 ± 0.022 | 0.900 ± 0.037 | 1.071 ± 0.104 | 1.623 ± 0.270 |
| 大腸 | 0.207 ± 0.044 | 0.131 ± 0.031 | 0.116 ± 0.018 | n/a |
| 肝臓 | 0.902 ± 0.028 | 1.744 ± 0.121 | 1.815 ± 0.316 | 1.770 ± 0.023 |
| 肺 | 0.522 ± 0.009 | 0.391 ± 0.040 | 0.321 ± 0.044 | 0.428 ± 0.084 |
| 筋肉（骨格筋） | 0.072 ± 0.011 | 0.056 ± 0.008 | n/a | n/a |
| 坐骨神経 | 0.296 ± 0.016 | 0.293 [b] | n/a | n/a |
| 小腸 | 0.314 ± 0.008 | 0.239 ± 0.063 | 0.140 ± 0.019 | n/a |
| 脊髄（腰椎、胸椎、頸椎） | 0.057 ± 0.007 | 0.046 ± 0.009 | n/a | n/a |
| 脾臓 | 0.471 ± 0.033 | 0.692 ± 0.067 | 0.661 ± 0.104 | 1.087 ± 0.230 |
| 胃 | 1.206 ± 0.373 | 0.807 ± 0.616 | 0.274 ± 0.032 | 0.405 ± 0.112 |
| 甲状腺／上皮小体 | 52.475 ± 13.382 | 525.335 ± 143.883 | 854.144 ± 52.674 | 571.341 ± 305.367 |

【表１５ａ】

表１５ａ － $^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内用量投与後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの組織、脳脊髄液、消化管および膀胱内容物中の群平均放射能含量

群１：４１μｇ／動物の平均用量において

| 試料 | 用量の％ | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 10分 | 30分 | 1時間 | 3時間 |
| 副腎 | 0.000 ± 0.000 | 0.002 ± 0.000 | 0.004 ± 0.000 | 0.003 ± 0.001 |
| 脳 | 0.000 ± 0.000 | 0.010 ± 0.009 | 0.027 ± 0.024 | 0.023 ± 0.003 |
| 脳脊髄液（ＣＳＦ） | 0.000[b] | 0.000[b] | 0.000[b] | 0.000 ± 0.000 |
| 眼 | 0.000 ± 0.000 | 0.003 ± 0.001 | 0.011 ± 0.002 | 0.017 ± 0.001 |
| 心臓 | 0.002 ± 0.003 | 0.037 ± 0.003 | 0.066 ± 0.009 | 0.077 ± 0.004 |
| 腎臓 | 0.027 ± 0.025 | 0.252 ± 0.086 | 0.553 ± 0.057 | 0.632 ± 0.104 |
| 肝臓 | 0.000 ± 0.000 | 0.417 ± 0.057 | 0.748 ± 0.108 | 0.907 ± 0.181 |
| 肺 | 0.003 ± 0.005 | 0.055 ± 0.009 | 0.122 ± 0.021 | 0.166 ± 0.013 |
| 坐骨神経 | 0.000 ± 0.000 | 0.001 ± 0.001 | 0.002 ± 0.002 | 0.003 ± 0.001 |
| 脊髄（腰椎、胸椎、頚椎） | 0.000 ± 0.000 | 0.004 ± 0.004 | 0.013 ± 0.001 | 0.012 ± 0.000 |
| 脾臓 | 0.000 ± 0.000 | 0.024 ± 0.009 | 0.054 ± 0.010 | 0.066 ± 0.011 |
| 甲状腺／上皮小体 | 0.001 ± 0.001 | 0.007 ± 0.002 | 0.024 ± 0.012 | 0.108 ± 0.021 |
| 消化管 | | | | |
| 小腸 | 0.000 ± 0.000 | 0.193 ± 0.054 | 0.364 ± 0.069 | 0.763 ± 0.107 |
| 小腸内容物 | 0.000 ± 0.000 | 0.399 ± 0.062 | 0.778 ± 0.084 | 2.611 ± 0.291 |
| 大腸 | 0.000 ± 0.000 | 0.090 ± 0.018 | 0.165 ± 0.037 | 0.238 ± 0.070 |
| 大腸内容物 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.598 ± 0.114 |
| 胃 | 0.008 ± 0.007 | 0.086 ± 0.009 | 0.216 ± 0.094 | 0.836 ± 0.336 |
| 胃内容物 | 0.000 ± 0.000 | 0.489 ± 0.052 | 1.774 ± 0.326 | 5.004 ± 0.346 |
| 膀胱内容物 | 0.003 ± 0.003 | 0.110 ± 0.030 | 0.156 ± 0.077 | 1.207 ± 1.029 |

| 試料 | 用量の％ | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 6時間 | 24時間 | 48時間 | 96時間 |
| 副腎 | 0.002 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 脳 | 0.015 ± 0.001 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 脳脊髄液（ＣＳＦ） | 0.000[b] | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 眼 | 0.013 ± 0.003 | 0.001 ± 0.001 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 心臓 | 0.056 ± 0.006 | 0.005 ± 0.008 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 腎臓 | 0.452 ± 0.115 | 0.130 ± 0.034 | 0.059 ± 0.007 | 0.029 ± 0.006 |
| 肝臓 | 0.775 ± 0.078 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 肺 | 0.132 ± 0.019 | 0.019 ± 0.005 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 坐骨神経 | 0.003 ± 0.001 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 脊髄（腰椎、胸椎、頚椎） | 0.009 ± 0.001 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 脾臓 | 0.048 ± 0.007 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 甲状腺／上皮小体 | 0.125 ± 0.037 | 0.348 ± 0.013 | 0.195 ± 0.075 | 0.086 ± 0.023 |
| 消化管 | | | | |
| 小腸 | 0.571 ± 0.165 | 0.117 ± 0.027 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 小腸内容物 | 1.740 ± 0.925 | 0.385 ± 0.045 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 大腸 | 0.199 ± 0.022 | 0.029 ± 0.025 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 大腸内容物 | 0.864 ± 0.100 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 胃 | 0.557 ± 0.117 | 0.059 ± 0.023 | 0.015 ± 0.002 | 0.009 ± 0.007 |
| 胃内容物 | 3.996 ± 1.013 | 0.758 ± 0.167 | 0.122 ± 0.107 | 0.000 ± 0.000 |
| 膀胱内容物 | 0.525 ± 0.264 | 0.178 ± 0.130 | 0.014[b] | 0.021 ± 0.028 |

【表１５ｂ】

表１５ｂ　－　$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの組織、脳脊髄液、消化管および膀胱内容物中の群平均放射能含量

群２：１．００ｍｇ／ｋｇの平均用量において

| 試料 | 用量の％ | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 10分 | 30分 | 1時間 | 3時間 |
| 副腎 | 0.113 ± 0.023 | 0.117 ± 0.022 | 0.059 ± 0.009 | 0.026 ± 0.002 |
| 脳 | 0.129 ± 0.022 | 0.120 ± 0.011 | 0.098 ± 0.005 | 0.044 ± 0.001 |
| 脳脊髄液（ＣＳＦ） | 0.001 ± 0.002 | 0.000 ± 0.000 | 0.000[b] | 0.001 ± 0.001 |
| 眼 | 0.007 ± 0.001 | 0.021 ± 0.001 | 0.028 ± 0.007 | 0.024 ± 0.005 |
| 心臓 | 0.382 ± 0.055 | 0.319 ± 0.018 | 0.292 ± 0.025 | 0.161 ± 0.024 |
| 腎臓 | 2.168 ± 0.172 | 1.966 ± 0.081 | 1.658 ± 0.014 | 1.168 ± 0.068 |
| 肝臓 | 41.711 ± 3.901 | 31.161 ± 1.934 | 20.702 ± 1.140 | 13.029 ± 0.875 |
| 肺 | 4.024 ± 0.305 | 7.047 ± 0.512 | 6.456 ± 1.094 | 2.842 ± 0.248 |
| 坐骨神経 | 0.001 ± 0.001 | 0.003 ± 0.003 | 0.004 ± 0.001 | 0.006 ± 0.003 |
| 脊髄（腰椎、胸椎、頚椎） | 0.045 ± 0.005 | 0.042 ± 0.008 | 0.039 ± 0.003 | 0.023 ± 0.002 |
| 脾臓 | 1.234 ± 0.045 | 1.014 ± 0.093 | 0.784 ± 0.123 | 0.393 ± 0.013 |
| 甲状腺／上皮小体 | 0.024 ± 0.001 | 0.100 ± 0.009 | 0.186 ± 0.050 | 0.947 ± 0.340 |
| 消化管 | | | | |
| 小腸 | 0.749 ± 0.121 | 1.477 ± 0.237 | 1.548 ± 0.186 | 1.535 ± 0.191 |
| 小腸内容物 | 0.530 ± 0.056 | 1.921 ± 0.346 | 3.737 ± 1.427 | 5.446 ± 2.102 |
| 大腸 | 0.327 ± 0.072 | 0.478 ± 0.076 | 0.529 ± 0.065 | 0.412 ± 0.008 |
| 大腸内容物 | 0.000 ± 0.000 | 0.345 ± 0.029 | 0.517 ± 0.135 | 0.782 ± 0.083 |
| 胃 | 0.176 ± 0.032 | 0.437 ± 0.050 | 0.632 ± 0.047 | 0.992 ± 0.059 |
| 胃内容物 | 0.343 ± 0.127 | 1.537 ± 0.287 | 5.330 ± 0.937 | 10.263 ± 1.971 |
| 膀胱内容物 | 0.100 ± 0.041 | 0.409 ± 0.179 | 0.675 ± 0.660 | 0.945 ± 0.571 |

| 試料 | 用量の％ | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 6時間 | 24時間 | 48時間 | 96時間 |
| 副腎 | 0.019 ± 0.002 | 0.005 ± 0.001 | 0.002 ± 0.000 | 0.001 ± 0.000 |
| 脳 | 0.034 ± 0.004 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 脳脊髄液（ＣＳＦ） | 0.003 ± 0.005 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 眼 | 0.023 ± 0.007 | 0.002 ± 0.001 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 心臓 | 0.121 ± 0.007 | 0.022 ± 0.003 | 0.012 ± 0.001 | 0.000 ± 0.000 |
| 腎臓 | 0.909 ± 0.076 | 0.251 ± 0.006 | 0.140 ± 0.003 | 0.072 ± 0.002 |
| 肝臓 | 10.311 ± 0.361 | 3.891 ± 0.283 | 1.980 ± 0.065 | 0.498 ± 0.016 |
| 肺 | 1.027 ± 0.037 | 0.991 ± 0.289 | 0.112 ± 0.037 | 0.023 ± 0.001 |
| 坐骨神経 | 0.004 ± 0.000 | 0.000 ± 0.001 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 脊髄（腰椎、胸椎、頚椎） | 0.017 ± 0.002 | 0.002 ± 0.002 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 脾臓 | 0.362 ± 0.028 | 0.100 ± 0.003 | 0.046 ± 0.010 | 0.022 ± 0.001 |
| 甲状腺／上皮小体 | 1.405 ± 0.830 | 1.333 ± 0.115 | 1.440 ± 0.604 | 0.997 ± 0.329 |
| 消化管 | | | | |
| 小腸 | 1.537 ± 0.436 | 0.175 ± 0.033 | 0.074 ± 0.031 | 0.000 ± 0.000 |
| 小腸内容物 | 3.051 ± 0.706 | 0.500 ± 0.184 | 0.254 ± 0.101 | 0.000 ± 0.000 |
| 大腸 | 0.380 ± 0.063 | 0.054 ± 0.007 | 0.030 ± 0.003 | 0.000 ± 0.000 |
| 大腸内容物 | 1.055 ± 0.116 | 0.396 ± 0.058 | 0.155 ± 0.134 | 0.000 ± 0.000 |
| 胃 | 0.744 ± 0.196 | 0.078 ± 0.023 | 0.021 ± 0.003 | 0.006 ± 0.005 |
| 胃内容物 | 8.294 ± 0.670 | 1.055 ± 0.057 | 0.296 ± 0.159 | 0.000 ± 0.000 |
| 膀胱内容物 | 1.531 ± 1.303 | 0.079[b] | 0.019 ± 0.021 | 0.007 ± 0.002 |

【表１５ｃ】

**表１５ｃ　－　$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内用量投与および静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの組織、脳脊髄液、消化管および膀胱内容物中の群平均放射能含量**

群３：１．０８ｍｇ／ｋｇの平均用量において

| 試料 | 用量の%[a] | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 10分 | 30分 | 1時間 | 3時間 |
| 副腎 | 0.066 ± 0.013 | 0.037 ± 0.010 | 0.032 ± 0.009 | 0.015 ± 0.002 |
| 脳 | 0.071 ± 0.009 | 0.071 ± 0.007 | 0.058 ± 0.002 | 0.039 ± 0.008 |
| 脳脊髄液（ＣＳＦ） | 0.046 ± 0.071 | 0.002 ± 0.002 | 0.010 ± 0.017 | 0.002 ± 0.003 |
| 眼 | 0.004 ± 0.001 | 0.012 ± 0.002 | 0.018 ± 0.001 | 0.021 ± 0.003 |
| 心臓 | 0.147 ± 0.008 | 0.188 ± 0.020 | 0.165 ± 0.008 | 0.136 ± 0.014 |
| 腎臓 | 1.005 ± 0.107 | 1.157 ± 0.073 | 1.179 ± 0.061 | 0.985 ± 0.006 |
| 肝臓 | 18.955 ± 0.723 | 14.647 ± 0.420 | 10.032 ± 1.037 | 6.754 ± 0.213 |
| 肺 | 0.506 ± 0.053 | 0.811 ± 0.104 | 0.871 ± 0.037 | 0.457 ± 0.031 |
| 坐骨神経 | 0.001 ± 0.000 | 0.002 ± 0.000 | 0.003 ± 0.001 | 0.003 ± 0.002 |
| 脊髄（腰椎、胸椎、頚椎） | 0.028 ± 0.007 | 0.025 ± 0.005 | 0.023 ± 0.005 | 0.018 ± 0.004 |
| 脾臓 | 0.468 ± 0.027 | 0.435 ± 0.037 | 0.329 ± 0.032 | 0.217 ± 0.007 |
| 甲状腺／上皮小体 | 0.008 ± 0.004 | 0.055 ± 0.019 | 0.073 ± 0.041 | 0.392 ± 0.071 |
| 消化管 | | | | |
| 小腸 | 0.286 ± 0.046 | 0.641 ± 0.033 | 1.118 ± 0.264 | 1.176 ± 0.044 |
| 小腸内容物 | 0.288 ± 0.037 | 1.150 ± 0.013 | 2.414 ± 0.038 | 4.314 ± 1.755 |
| 大腸 | 0.131 ± 0.013 | 0.272 ± 0.015 | 0.360 ± 0.032 | 0.335 ± 0.051 |
| 大腸内容物 | 0.000 ± 0.000 | 0.212 ± 0.070 | 0.351 ± 0.089 | 0.696 ± 0.181 |
| 胃 | 0.100 ± 0.017 | 0.206 ± 0.034 | 0.493 ± 0.124 | 0.931 ± 0.293 |
| 胃内容物 | 0.161 ± 0.029 | 0.806 ± 0.191 | 2.870 ± 1.090 | 8.789 ± 1.443 |
| 膀胱内容物 | 0.029 ± 0.021 | 0.182 ± 0.251 | 0.834 ± 0.663 | 0.273 ± 0.087 |

| 試料 | 用量の% | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 6時間 | 24時間 | 48時間 | 96時間 |
| 副腎 | 0.010 ± 0.002 | 0.002 ± 0.000 | 0.001 ± 0.000 | 0.001 ± 0.000 |
| 脳 | 0.024 ± 0.003 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 脳脊髄液（ＣＳＦ） | 0.000[b] | 0.000[b] | 0.000[b] | 0.000 ± 0.000 |
| 眼 | 0.019 ± 0.004 | 0.002 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 心臓 | 0.106 ± 0.008 | 0.015 ± 0.001 | 0.005 ± 0.001 | 0.001 ± 0.002 |
| 腎臓 | 0.689 ± 0.063 | 0.183 ± 0.013 | 0.081 ± 0.007 | 0.048 ± 0.002 |
| 肝臓 | 5.085 ± 0.292 | 1.653 ± 0.097 | 0.757 ± 0.043 | 0.281 ± 0.022 |
| 肺 | 0.297 ± 0.011 | 0.038 ± 0.001 | 0.012 ± 0.003 | 0.006 ± 0.002 |
| 坐骨神経 | 0.004 ± 0.001 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 脊髄（腰椎、胸椎、頚椎） | 0.016 ± 0.003 | 0.002 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 脾臓 | 0.146 ± 0.020 | 0.039 ± 0.003 | 0.015 ± 0.003 | 0.009 ± 0.000 |
| 甲状腺／上皮小体 | 0.496 ± 0.064 | 0.973 ± 0.162 | 0.567 ± 0.088 | 0.124 ± 0.088 |
| 消化管 | | | | |
| 小腸 | 0.954 ± 0.153 | 0.125 ± 0.046 | 0.032 ± 0.007 | 0.000 ± 0.000 |
| 小腸内容物 | 2.054 ± 0.707 | 0.298 ± 0.019 | 0.113 ± 0.039 | 0.000 ± 0.000 |
| 大腸 | 0.359 ± 0.097 | 0.036 ± 0.009 | 0.013 ± 0.002 | 0.000 ± 0.000 |
| 大腸内容物 | 0.971 ± 0.095 | 0.290 ± 0.115 | 0.041 ± 0.071 | 0.000 ± 0.000 |
| 胃 | 0.943 ± 0.323 | 0.102 ± 0.084 | 0.014 ± 0.004 | 0.008 ± 0.002 |
| 胃内容物 | 3.501 ± 3.698 | 0.610 ± 0.365 | 0.175 ± 0.053 | 0.000 ± 0.000 |
| 膀胱内容物 | 0.114 ± 0.034 | 0.199 ± 0.266 | 0.003 ± 0.002 | 0.005 ± 0.008 |

群１（４１μｇ／動物の髄腔内平均用量投与）

【０２５８】

髄腔内用量投与後、検査した組織のすべてにおける$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣ物質の全身分布が認められたが、しかしながら、ＣＳＦ中の放射能レベルはＬＯＱを下回った。雄ラットの組織中の$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣ物質の最高平均濃度は、甲状腺／上皮小体（４．１２７±１．６３５μｇ　ｅｑ／ｇ）で用量投与後４８時間で、そして胃（０．２０３±０．１０１μｇ　ｅｑ／ｇ）、腎臓（０．０９６±０．０１４μｇ　ｅｑ／ｇ）および肺（０．０５８±０．０１４μｇ　ｅｑ／ｇ）では用量投与後３時間で観察された。他の組織ではレベルは低く、$t_{max}$値は一般的に用量投与後３～６時間で観察された。最低$C_{max}$値は、脳（０．００５±０．００１μｇ　ｅｑ／ｇ）および腎臓脂肪（０．００６±０．０００μｇ　ｅｑ／ｇ）で観察された。用量投与後４８および９６時間までに、大部分の組織中の放射能レベルは検出限界を下回ったが、但し、甲状腺／上皮小体、腎臓および胃は異なった。用量投与後９６時間で、最高平均濃度は、甲状腺／上皮小体（１．９２７±１．５８５μｇ　ｅｑ／ｇ、$C_{max}$の４６．７％）、それに続いて、腎臓（０．００

５±０．００１μｇ　ｅｑ／ｇ、$C_{max}$の５．２％）および胃（０．００２±０．００１μｇ　ｅｑ／ｇ、$C_{max}$の１％）であった。

【０２５９】

組織対血清比は、一般的に、髄腔内用量投与後２４時間までの組織に関しては１未満であった。例外は、甲状腺／上皮小体、腎臓および胃であった。最高比は、断然、甲状腺／上皮小体に関して観察された。血清濃度がＬＯＱより低かったため、用量投与後４８および９６時間までに、組織対血清比は算定され得なかった。

【０２６０】

全組織において回収された放射能のレベルは投与用量の１％未満で、最高比率は用量投与後３時間で肝臓（０．９１％）において観察された。用量投与後１時間で、投与用量の１％より大きい比率は、胃含有物（１．８％）でのみ見出された。用量投与後３時間までに、投与用量の１％より大きい比率は、小腸内容物（２．６％）、胃内容物（５．０％）および膀胱内容物（１．２％）で検出された。用量投与後６時間で、投与用量の１％より大きい比率は、小腸内容物（１．７％）および胃内容物（４．０％）で見出された。用量投与後９６時間までに、少量の$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣ－由来放射能（０．１％未満）が腎臓、甲状腺／上皮小体、胃および膀胱内容物中で依然として回収され、最高回収率は甲状腺／上皮小体（０．０９％）で得られた。

群２（１．００μｇ／ｋｇの静脈内平均用量投与）

【０２６１】

静脈内投与後、群２ラットの組織中の放射能標識物質の最高平均濃度（$C_{max}$）は、甲状腺／上皮小体（２９４．５２１±５２．９５３μｇ　ｅｑ／ｇ；用量投与後４８時間で）、続いて、肺（２０．６２９±２．１２５μｇ　ｅｑ／ｇ；用量投与後３０分）、肝臓（１１．３３５±１．４３６μｇ　ｅｑ／ｇ；用量投与後１０分）、副腎（８．８２７±２．４３５μｇ　ｅｑ／ｇ；用量投与後１０分）、脾臓（６．５９５±０．６２５μｇ　ｅｑ／ｇ；用量投与後１０分）および腎臓（３．０２７±０．３３０μｇ　ｅｑ／ｇ；１０分）で観察された。組織に関する$t_{max}$値は用量投与後１０分～３時間の間に生じたが、但し、甲状腺／上皮小体は用量投与後４８時間であった。最低平均放射能$C_{max}$値は、腎臓脂肪（０．１５８±０．０１９μｇ　ｅｑ／ｇ）、ＣＳＦ（０．２１０±０．３６３μｇ　ｅｑ／ｇ）、脳（０．２５２±０．０４１μｇ　ｅｑ／ｇ）、骨格筋（０．２７５±０．０２５μｇ　ｅｑ／ｇ）および脊髄（０．２９３±０．０２８μｇ　ｅｑ／ｇ）において観察された。用量投与後９６時間までに、放射能は、分析した１８の組織のうち７つで依然として検出され、最高平均濃度は、甲状腺／上皮小体（２１８．９１７±４５．０９８μｇ　ｅｑ／ｇ、$C_{max}$の７４．３％）、次いで、肝臓（０．１２６±０．０１４μｇ　ｅｑ／ｇ、$C_{max}$の１．１％）、脾臓（０．１１１±０．００９μｇ　ｅｑ／ｇ、$C_{max}$の１．７％）および腎臓（０．０９９±０．０１０μｇ　ｅｑ／ｇ、$C_{max}$の３．３％）で検出された。

【０２６２】

用量投与後１０分で、平均組織対血清比は分析した全組織に関して１未満であった。用量投与後３０分および１時間までに、平均組織対血清比は、肺および甲状腺／上皮小体に関して１より大きかった。用量投与後３および６時間では、平均組織対血清比は、肝臓、肺および甲状腺／上皮小体に関して１より大きかった。用量投与後２４および４８時間で、用量投与肝臓、肺、脾臓および甲状腺／上皮小体は、１を上回る平均組織対血清比を有した。用量投与後９６時間で、平均組織対血清比は、腎臓、肝臓、脾臓および甲状腺／上皮小体に関して１より大きかった。最高組織対血清比は、甲状腺／上皮小体（９６時間で２４８５）、肺（２４時間で６．５）および肝臓（２４時間で２．２）で観察された。

【０２６３】

投与された放射能の比率に関して、組織中の最高平均値は、肝臓（用量投与後１０分で４１．７％）、肺（３０分で７．０％）、腎臓（１０分で２．２％）、小腸（１時間で１．５％）および甲状腺／上皮小体（４８時間で１．４％）で観察された。消化管内容物では、最高平均値は、胃内容物の１０．３％（用量投与後３時間で）、小腸内容物における

５．４％（用量投与後３時間で）および大腸内容物における１．１％（６時間）であった。用量投与後９６時間までに、投与用量の最高比率は、甲状腺／上皮小体（１．０％）、肝臓（０．５％）および腎臓（０．１％）で観察された。用量投与後のこの時点で、投与用量の０．０１％未満が、胃および膀胱内容物中に残存した。

群３（髄腔内用量投与とその後の静脈内用量投与：１．０８ｍｇ／ｋｇ（併合用量））

【０２６４】

髄腔内および静脈内用量投与後、群３ラットの組織中の放射能標識物質の最高平均濃度（$C_{max}$）は、甲状腺／上皮小体（２９６．９５７±５７．７９３μｇ　ｅｑ／ｇ；用量投与後２４時間で）、続いて、肝臓（１０．１８１±０．６００μｇ　ｅｑ／ｇ；用量投与後１０分）、副腎（９．５６７±１．６７８μｇ　ｅｑ／ｇ；用量投与後１０分）、肺（５．３０５±０．１９４μｇ　ｅｑ／ｇ；用量投与後１時間）、脾臓（５．０４２±０．９０２μｇ　ｅｑ／ｇ；用量投与後１０分）、胃（４．４５４±１．４５５μｇ　ｅｑ／ｇ；用量投与後３時間）、腎臓（３．３９０±０．１８３μｇ　ｅｑ／ｇ；１時間）およびＣＳＦ（２．０８７±２．９１２μｇ　ｅｑ／ｇ；１０分）で観察された。組織に関する$t_{max}$値は用量投与後１０分～３時間の間に生じたが、但し、大腸は用量投与後６時間、および甲状腺／上皮小体は用量投与後２４時間であった。最低平均放射能$C_{max}$値は、腎臓脂肪（０．１８８±０．０２０μｇ　ｅｑ／ｇ）、脳（０．２８３±０．０６２μｇ　ｅｑ／ｇ）、脊髄（０．３２７±０．０６２μｇ　ｅｑ／ｇ）および骨格筋（０．４１１±０．００９μｇ　ｅｑ／ｇ）において観察された。用量投与後９６時間までに、放射能は、分析した１８の組織のうち８つで依然として検出され、最高平均濃度は、甲状腺／上皮小体（４３．９６２±２３．１６４μｇ　ｅｑ／ｇ、$C_{max}$の１４．８％）、次いで、肝臓（０．１３７±０．０１８μｇ　ｅｑ／ｇ、$C_{max}$の１．３％）、腎臓（０．１２４±０．００５μｇ　ｅｑ／ｇ、$C_{max}$の３．７％）、脾臓（０．０８３±０．００９μｇ　ｅｑ／ｇ、$C_{max}$の１．６％）および副腎（０．０６９±０．０１６μｇ　ｅｑ／ｇ、$C_{max}$の０．７％）で検出された。

【０２６５】

用量投与後１０分で、平均組織対血清比は分析した全組織に関して１未満であった。用量投与後３０分および１時間までに、平均組織対血清比は、甲状腺／上皮小体に関して１より大きかった。用量投与後３および６時間では、平均組織対血清比は、胃および甲状腺／上皮小体に関して１より大きかった。用量投与後２４で、肝臓および甲状腺／上皮小体は１を上回る平均組織対血清比を有した。用量投与後４８および９６時間で、平均組織対血清比は、腎臓、肝臓、および甲状腺／上皮小体に関して、ならびに脾臓（９６時間）に関して、１より大きかった。最高組織対血清比は、甲状腺／上皮小体（４８時間で８５４）、肝臓（４８時間で１．８）および腎臓（９６時間で１．６）で観察された。

【０２６６】

投与された放射能の比率に関して、組織中の最高平均値は、肝臓（用量投与後１０分で１９．０％）、腎臓（１時間で１．２％）および小腸（３時間で１．２％）で観察された。消化管内容物では、最高平均値は、胃内容物の８．８％（用量投与後３時間で）、小腸内容物における４．３％（用量投与後３時間で）および大腸内容物における１．０％（６時間）であった。用量投与後９６時間までに、投与用量の最高比率は、肝臓（０．３％）で、甲状腺／上皮小体（０．１％）および腎臓（０．０５％）で観察された。用量投与後のこの時点で、投与用量の０．０１％未満が、副腎、心臓、肺、脾臓、胃および膀胱内容物中に残存した。

血液、血清、赤血球、ＣＳＦおよび組織中の放射能の薬物動態（表１６および表１７）

【０２６７】

$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内および／または静脈内用量投与後のラットの血液、血清、赤血球、ＣＳＦおよび組織中の放射能の平均薬物動態パラメーターを、表１６および表１７に示す。

【表１６】

表１６：$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内用量投与後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの隔膜、血液および赤血球中の総放射能の体内動態

血清

群１：４１μｇ／動物の平均用量において

| $t_{max}$ (h) | $C_{max}$ (μg eq/g) | $t_{last}$ (h) | $AUC_{0\text{-}tlast}$ (μg eq*h/g) | k ($h^{-1}$) | $R^2$ | $t_{½}$ (h) | $AUC_{0\text{-}inf}$ (μg eq*h/g) | % 外挿 $AUC_{0\text{-}inf}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3 | 0.108 | 24 | 1.48 | 0.130 | 0.988 | 5.34 | 1.54 | 4.00 |

血液

| $t_{max}$ (h) | $C_{max}$ (μg eq/g) | $t_{last}$ (h) | $AUC_{0\text{-}tlast}$ (μg eq*h/g) | k ($h^{-1}$) | $R^2$ | $t_{½}$ (h) | $AUC_{0\text{-}inf}$ (μg eq*h/g) | % 外挿 $AUC_{0\text{-}inf}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3 | 0.0930 | 24 | 1.33 | 0.138 | 0.983 | 5.02 | 1.37 | 3.16 |

赤血球

| $t_{max}$ (h) | $C_{max}$ (μg eq/g) | $t_{last}$ (h) | $AUC_{0\text{-}tlast}$ (μg eq*h/g) | k ($h^{-1}$) | $R^2$ | $t_{½}$ (h) | $AUC_{0\text{-}inf}$ (μg eq*h/g) | % 外挿 $AUC_{0\text{-}inf}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 6 | 0.0890 | 24 | 1.24 | 0.170 | 0.980 | 4.08 | 1.25 | 1.41 |

【表１６ｂ】

表１６ｂ：$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの隔膜、血液および赤血球中の総放射能の体内動態

血清

群２：１．００ｍｇ／ｋｇの平均用量において

| $t_{max}$ (h) | $C_{max}$ (μg eq/g) | $t_{last}$ (h) | $AUC_{0\text{-}tlast}$ (μg eq*h/g) | k ($h^{-1}$) | $R^2$ | $t_{½}$ (h) | $AUC_{0\text{-}inf}$ (μg eq*h/g) | % 外挿 $AUC_{0\text{-}inf}$ | $V_z$ (mL/kg) | CL (mL/h/kg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 20.1 | 96 | 71.1 | 0.0226 | 0.997 | 30.7 | 75.0 | 5.21 | 591 | 13.3 |

血液

| $t_{max}$ (h) | $C_{max}$ (μg eq/g) | $t_{last}$ (h) | $AUC_{0\text{-}tlast}$ (μg eq*h/g) | k ($h^{-1}$) | $R^2$ | $t_{½}$ (h) | $AUC_{0\text{-}inf}$ (μg eq*h/g) | % 外挿 $AUC_{0\text{-}inf}$ | $V_z$ (mL/kg) | Cl (mL/h/kg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 14.0 | 96 | 51.2 | 0.0256 | 0.994 | 27.1 | 53.2 | 3.75 | 735 | 18.8 |

赤血球

| $t_{max}$ (h) | $C_{max}$ (μg eq/g) | $t_{last}$ (h) | $AUC_{0\text{-}tlast}$ (μg eq*h/g) | k ($h^{-1}$) | $R^2$ | $t_{½}$ (h) | $AUC_{0\text{-}inf}$ (μg eq*h/g) | % 外挿 $AUC_{0\text{-}inf}$ | $V_z$ (mL/kg) | Cl (mL/h/kg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 6.40 | 48 | 33.9 | 0.0635 | 0.941 | 10.9 | 35.7 | 4.94 | 441 | 28.0 |

【表１６ｃ】

表１６ｃ：$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内用量投与および静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの隔膜、血液および赤血球中の総放射能の体内動態

血清

群３：１．０８ｍｇ／ｋｇの平均用量において

| $t_{max}$ (h) | $C_{max}$ (μg eq/g) | $t_{last}$ (h) | $AUC_{0-tlast}$ (μg eq·h/g) | k ($h^{-1}$) | $R^2$ | $t_{½}$ (h) | $AUC_{0-inf}$ (μg eq·h/g) | % 外挿 $AUC_{0-inf}$ | $V_z$ (mL/kg) | CL (mL/h/kg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 16.9 | 96 | 89.8 | 0.0272 | 0.983 | 25.5 | 92.6 | 3.06 | 429 | 11.7 |

血液

| $t_{max}$ (h) | $C_{max}$ (μg eq/g) | $t_{last}$ (h) | $AUC_{0-tlast}$ (μg eq·h/g) | k ($h^{-1}$) | $R^2$ | $t_{½}$ (h) | $AUC_{0-inf}$ (μg eq·h/g) | % 外挿 $AUC_{0-inf}$ | $V_z$ (mL/kg) | Cl (mL/h/kg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 11.4 | 96 | 66.9 | 0.0332 | 0.990 | 20.9 | 68.0 | 1.64 | 478 | 15.9 |

赤血球

| $t_{max}$ (h) | $C_{max}$ (μg eq/g) | $t_{last}$ (h) | $AUC_{0-tlast}$ (μg eq·h/g) | k ($h^{-1}$) | $R^2$ | $t_{½}$ (h) | $AUC_{0-inf}$ (μg eq·h/g) | % 外挿 $AUC_{0-inf}$ | $V_z$ (mL/kg) | Cl (mL/h/kg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 7.36 | 48 | 49.2 | 0.0721 | 0.947 | 9.61 | 51.0 | 3.69 | 293 | 21.2 |

【表１７ａ】

表１７ａ：$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内用量投与後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｌｗｅｙラットの組織および脳脊髄液中の総放射能の体内動態

群１：４１μｇ／動物の平均用量において

| 試料 | $t_{max}$ (h) | $C_{max}$ (μg eq/g) | $t_{last}$ (h) | $AUC_{0-tlast}$ (μg eq·h/g) | k ($h^{-1}$) | $R^2$ | $t_{½}$ (h) | $AUC_{0-inf}$ (μg eq·h/g) | % 外挿 ($AUC_{0-inf}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 脂肪組織（腎臓脂肪） | 6 | 0.0060 | 6 | 0.0215 | a | a | a | a | a |
| 副腎 | 3 | 0.0210 | 6 | 0.109 | a | a | a | a | a |
| 骨（大腿骨） | 6 | 0.0410 | 6 | 0.186 | a | a | a | a | a |
| 脳 | 3 | 0.0050 | 6 | 0.0247 | a | a | a | a | a |
| 脳脊髄液（ＣＳＦ） | b | 0.000 | b | 0.000 | b | b | b | b | b |
| 眼 | 3 | 0.0270 | 24 | 0.345 | 0.164 | 0.990 | 4.23 | 0.351 | 1.74 |
| 心臓 | 3 | 0.0280 | 24 | 0.379 | 0.167 | 0.987 | 4.16 | 0.385 | 1.56 |
| 腎臓 | 3 | 0.0960 | 96 | 1.84 | 0.0118 | 0.979 | 58.6 | 2.27 | 18.6 |
| 大腸 | 3 | 0.0240 | 24 | 0.347 | 0.125 | 0.983 | 5.54 | 0.363 | 4.40 |
| 肝臓 | 6 | 0.0300 | 6 | 0.141 | a | a | a | a | a |
| 肺 | 3 | 0.0580 | 24 | 0.801 | 0.134 | 0.987 | 5.18 | 0.831 | 3.60 |
| 筋肉（骨格筋） | 3 | 0.0140 | 6 | 0.0683 | a | a | a | a | a |
| 坐骨神経 | 6 | 0.0500 | 6 | 0.201 | a | a | a | a | a |
| 小腸 | 3 | 0.0460 | 24 | 0.606 | 0.121 | 0.992 | 5.74 | 0.639 | 5.18 |
| 脊髄（腰椎、胸椎、頚椎） | 3 | 0.0090 | 6 | 0.0436 | a | a | a | a | a |
| 脾臓 | 3 | 0.0400 | 6 | 0.183 | a | a | a | a | a |
| 胃 | 3 | 0.203 | 96 | 2.60 | 0.0177 | 0.831 | 39.1 | 2.71 | 4.16 |
| 甲状腺／上皮小体 | 48.1 | 4.13 | 96 | 313 | c | 0.892 | c | c | 35.2 |

a　終末過程として報告可能な結果は確認され得なかった。
b　ＰＫパラメーターは、試料が＜ＬＬＯＱであるため、概算しなかった。
c　$AUC_{0-last}$が２０％より多く外挿されるかまたは$R^2$が＜０．８であるため、値は報告されない。

【表１７ｂ】

表１７ｂ：$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの組織および脳脊髄液中の総放射能の体内動態

群２：１．００ｍｇ／ｋｇの平均用量において

| 試料 | $t_{max}$ (h) | $C_{max}$ (μg eq/g) | $t_{last}$ (h) | $AUC_{0\text{-}tlast}$ (μg eq•h/g) | k ($h^{-1}$) | $R^2$ | $t_{½}$ (h) | $AUC_{0\text{-}inf}$ (μg eq•h/g) | % 外挿 ($AUC_{0\text{-}inf}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 脂肪組織（腎臓脂肪） | 0.5 | 0.158 | 6 | 0.617 | a | 0.920 | a | a | 56.0 |
| 副腎 | 0 | 10.9 | 96 | 43.1 | 0.0201 | 0.927 | 34.6 | 46.8 | 7.89 |
| 骨（大腿骨） | 0.5 | 1.58 | 48 | 15.3 | 0.0777 | 0.965 | 8.92 | 15.7 | 2.79 |
| 脳 | 0 | 0.268 | 6 | 0.735 | a | 0.897 | a | a | 26.8 |
| 脳脊髄液（ＣＳＦ） | 3 | 0.210 | 6 | 0.854 | b | b | b | b | b |
| 眼 | 1 | 0.406 | 24 | 5.35 | 0.113 | 0.981 | 6.15 | 5.64 | 5.19 |
| 心臓 | 0 | 1.33 | 48 | 10.2 | 0.0726 | 0.909 | 9.54 | 10.8 | 5.12 |
| 腎臓 | 0 | 3.18 | 96 | 40.7 | 0.0167 | 0.988 | 41.6 | 46.7 | 12.7 |
| 大腸 | 1 | 0.492 | 48 | 7.30 | 0.0658 | 0.938 | 10.5 | 7.70 | 5.14 |
| 肝臓 | 0 | 14.6 | 96 | 100 | 0.0290 | 1.00 | 23.9 | 105 | 4.15 |
| 肺 | 0.5 | 20.6 | 96 | 165 | 0.0497 | 0.939 | 13.9 | 167 | 0.832 |
| 筋肉（骨格筋） | 1 | 0.275 | 24 | 2.64 | 0.154 | 0.996 | 4.50 | 2.69 | 1.93 |
| 坐骨神経 | 3 | 0.689 | 24 | 9.62 | 0.166 | 0.987 | 4.18 | 9.77 | 1.54 |
| 小腸 | 3 | 0.832 | 48 | 13.2 | 0.0693 | 0.932 | 10.0 | 13.8 | 4.29 |
| 脊髄（腰椎、胸椎、頸椎） | 0 | 0.315 | 24 | 2.39 | 0.115 | 0.991 | 6.04 | 2.51 | 4.87 |
| 脾臓 | 0 | 7.27 | 96 | 56.1 | 0.0218 | 0.964 | 31.8 | 61.2 | 8.33 |
| 胃 | 3 | 2.40 | 96 | 31.9 | 0.0330 | 0.945 | 21.0 | 32.3 | 1.41 |
| 甲状腺／上皮小体 | 48 | 295 | 96 | 24989 | b | b | b | b | b |

a　$AUC_{0\text{-}inf}$が２０％より多く外挿されるかまたは$R^2$が＜０．８であるため、値は報告されない。
b　終末過程として報告可能な結果は確認され得なかった。

【表１７ｃ】

表１７ｃ：$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内用量投与および静脈内ボーラス注射後の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの組織および脳脊髄液中の総放射能の体内動態

群３：１．０８ｍｇ／ｋｇの平均用量において

| 試料 | $t_{max}$ (h) | $C_{max}$ (μg eq/g) | $t_{last}$ (h) | $AUC_{0\text{-}tlast}$ (μg eq•h/g) | k ($h^{-1}$) | $R^2$ | $t_{½}$ (h) | $AUC_{0\text{-}inf}$ (μg eq•h/g) | % 外挿 ($AUC_{0\text{-}inf}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 脂肪組織（腎臓脂肪） | 1 | 0.188 | 6 | 0.954 | a | 0.999 | a | a | 65.6 |
| 副腎 | 0 | 12.6 | 96 | 43.9 | 0.0354 | 0.835 | 19.6 | 45.8 | 4.25 |
| 骨（大腿骨） | 0.5 | 1.71 | 48 | 21.9 | 0.0869 | 0.985 | 7.98 | 22.3 | 1.50 |
| 脳 | 0 | 0.287 | 6 | 1.03 | a | 0.992 | a | a | 36.1 |
| 脳脊髄液（ＣＳＦ） | 0 | 4.89 | 3 | 1.94 | a | 0.775 | a | a | 5.95 |
| 眼 | 3 | 0.611 | 48 | 9.88 | 0.0947 | 0.988 | 7.32 | 9.99 | 1.06 |
| 心臓 | 0.5 | 1.32 | 96 | 15.7 | 0.0391 | 1.00 | 17.7 | 15.9 | 0.967 |
| 腎臓 | 1 | 3.39 | 96 | 57.9 | 0.0190 | 0.960 | 36.4 | 64.4 | 10.1 |
| 大腸 | 6 | 0.726 | 48 | 12.4 | 0.0764 | 0.911 | 9.07 | 12.8 | 2.77 |
| 肝臓 | 0 | 11.2 | 96 | 96.5 | 0.0269 | 0.986 | 25.7 | 102 | 5.00 |
| 肺 | 1 | 5.31 | 96 | 44.1 | 0.0252 | 0.932 | 27.5 | 45.4 | 2.88 |
| 筋肉（骨格筋） | 1 | 0.411 | 24 | 4.37 | 0.110 | 0.997 | 6.31 | 4.66 | 6.25 |
| 坐骨神経 | 3 | 1.04 | 24 | 15.6 | 0.147 | 0.983 | 4.71 | 16.0 | 2.38 |
| 小腸 | 3 | 1.40 | 48 | 20.2 | 0.0851 | 0.974 | 8.14 | 20.6 | 1.88 |
| 脊髄（腰椎、胸椎、頸椎） | 0 | 0.331 | 24 | 3.52 | 0.105 | 0.994 | 6.58 | 3.77 | 6.55 |
| 脾臓 | 0 | 5.21 | 96 | 46.9 | 0.0347 | 0.860 | 20.0 | 49.3 | 4.85 |
| 胃 | 3 | 4.45 | 96 | 72.1 | 0.0557 | 0.858 | 12.4 | 72.6 | 0.766 |
| 甲状腺／上皮小体 | 24 | 297 | 96 | 16776 | 0.0272 | 0.982 | 25.4 | 18390 | 8.78 |

a　$AUC_{0\text{-}inf}$が２０％より多く外挿されるかまたは$R^2$が＜０．８であるため、値は報告されない。

血液、血清および赤血球

【０２６８】

髄腔内用量投与（群１：４１μｇ／動物）後、血清、全血および赤血球に関する時間ゼロから最終測定可能時点までの放射能濃度対時間曲線下平均算定面積（$AUC_{0-tlast}$）は、それぞれ１．４８μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ、１．３３μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇおよび１．２４μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇであった。血清、全血および赤血球中の放射能に関して報告さ

れた見掛けの終末$t_{1/2}$値は、それぞれ５．３４、５．０２および４．０８時間であった。消失速度定数、ｋを、血清、全血および赤血球において、それぞれ０．１３０$h^{-1}$、０．１３８$h^{-1}$および０．１７０$h^{-1}$と算定した。$AUC_{0-inf}$を、血清、全血および赤血球において、それぞれ１．５４μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ、１．３７μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇおよび１．２５μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇと算定した。血清、全血および赤血球からの放射能に関する排出相は、$AUC_{0-inf}$の算定のために必要とされる極度に低い外挿値パーセンテージ（それぞれ４．０、３．２および１．４％）により立証されるように、良好に限定された。

【０２６９】

静脈内用量投与（群２：１．００ｍｇ／ｋｇ）後、血清、全血および赤血球に関する平均$AUC_{0-tlast}$値は、それぞれ７１．１μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ、５１．２μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇおよび３３．９μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇであり、見掛けの終末$t_{1/2}$値は、それぞれ３０．７、２７．１および１０．９時間であった。ｋ値は、血清、全血および赤血球において、それぞれ０．０２２６$h^{-1}$、０．０２５６$h^{-1}$および０．０６３５$h^{-1}$として算定された。血清、全血および赤血球からの放射能に関する排出相は良好に限定され、$AUC_{0-inf}$は、血清、全血および赤血球において、それぞれ７５．０μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ（外挿　５．２１％）、５３．２μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ（外挿　３．７５％）および３５．７μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ（外挿　４．９４％）として算定された。見掛けの分布容積（$V_z$）は、全血（７３５ｍＬ／ｋｇ）、次いで、血清（５９１ｍＬ／ｋｇ）および赤血球（４４１ｍＬ／ｋｇ）において最大であった。被験物質のクリアランスは、血清から１３．３ｍＬ／ｈ／ｋｇで、全血に関して１８．８ｍＬ／ｈ／ｋｇで排出された。

【０２７０】

群３動物への髄腔内用量投与および静脈内用量投与（併合　１．０８ｍｇ／ｋｇ）後、血清、全血および赤血球に関する平均$AUC_{0-tlast}$値は、それぞれ８９．８μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ、６６．９μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇおよび４９．２μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇであった。血清、全血および赤血球中の放射能に関して報告された見掛けの終末$t_{1/2}$値は、それぞれ２５．５、２０．９および９．６１時間であり、ｋは、０．０２７２$h^{-1}$、０．０３３２$h^{-1}$おおび０．０７２１$h^{-1}$であった。さらにまた、３つのマトリックスすべてに関する排出相は良好に限定され、$AUC_{0-inf}$は、血清、全血および赤血球において、それぞれ９２．６μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ、６８．０μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇおよび５１．０μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ（外挿：３．０６％、１．６４％および３．６９％）として算定された。$V_z$は、全血（４７８ｍＬ／ｋｇ）、次いで、血清（４２９ｍＬ／ｋｇ）および赤血球（２９３ｍＬ／ｋｇ）においてより大きかった。クリアランス値は、全血に関して１５．９ｍＬ／ｈ／ｋｇおよび血清に関して１１．７ｍＬ／ｈ／ｋｇであった。

組織

【０２７１】

$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの髄腔内用量投与（群１：４１μｇ／動物）後のラットからの組織中の最高$AUC_{0-tlast}$値は、甲状腺／上皮小体（３１３μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ）で、次いで、胃（２．６０μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ）および腎臓（１．８４μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ）で観察された。いくつかの組織に関しては、無限大までのＡＵＣの外挿％が２０％より大きいため、あるいは終末相におけるデータを欠くため、ｋまたはＫから得られる任意のパラメーター（すなわち、$t_{1/2}$および$AUC_{0-inf}$）は概算できなかった。概算できなかった組織（眼、心臓、腎臓、大腸、肺、小腸および胃）に関しては、ｋは０．０１ないし０．１７　$h^{-1}$の範囲であり、そして$t_{1/2}$は一般的に４～６時間の範囲であったが、但し、腎臓に関しては５８．６時間、そして胃に関しては３９．１時間であった。

【０２７２】

静脈内用量投与（群２；１．００ｍｇ／ｋｇ）後、$AUC_{0-tlast}$に関する最高値は、甲状腺／上皮小体（２４９８９μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ）で、次いで、肺（１６５μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ）、肝臓（１００μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ）、脾臓（５６．１μｇ　ｅｑ・ｈ

／ｇ）、副腎（４３．１μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ）および腎臓（４０．７μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ）において観察された。最低$AUC_{0-tlast}$値は、腎臓脂肪（０．６１７μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ）および脳（０．７３５μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ）に関して観察された。ｋから得られるパラメーターは、排出相が不十分に限定された組織（甲状腺／上皮小体およびＣＳＦ）、あるいは$AUC_{0-inf}$への外挿が２０％より大きい組織（腎臓脂肪および脳）に関しては報告されなかった。肝臓および肺に関する$AUC_{0-inf}$値のみが、血清の値（７５μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ）より大きかった。最高報告$AUC_{0-inf}$値は、肺（１６７μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ；外挿　０．８３２％）、次いで肝臓（１０５μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ；外挿　４．１５％）、脾臓（６１．２μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ；外挿　８．３３％）、副腎（４６．８μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ；外挿　７．８９％）および腎臓（４６．７μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ；外挿　１２．７％）に関するものであった。

【０２７３】

$AUC_{0-inf}$値に関する最低報告値を、脊髄（２．５１μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ；外挿　４．８７％）、次いで、筋肉（２．６９μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ；外挿　１．９３％）および眼（５．６４μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ；外挿　５．１９％）に関して算定した。組織における最長算定可能$t_{1/2}$は、腎臓に関する４１．６時間、次いで、副腎に関する３４．６時間、および脾臓に関する３１．８時間であった。最短報告$t_{1/2}$は、坐骨神経に関する４．１８時間であった。

【０２７４】

群３に関しては、髄腔内および静脈内用量投与（１．０８ｍｇ／ｋｇ、併合用量）後、$AUC_{0-tlast}$に関する最高値は、甲状腺／上皮小体（１６７７６μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ）で、次いで、肝臓（９６．５μｇｅｑ・ｈ／ｇ）、胃（７２．１μｇｅｑ・ｈ／ｇ）、腎臓（５７．９μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ）、脾臓（４６．９μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ）、肺（４４．１μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ）および副腎（４３．９μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ）において観察された。最低$AUC_{0-tlast}$値は、腎臓脂肪（０．９５４μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ）および脳（１．０３μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ）に関して観察された。ｋから得られるパラメーターは、$AUC_{0-inf}$に対する外挿が２０％より大きい（腎臓脂肪および脳）か、または$R^2$が０．８より低い（ＣＳＦ）組織に関しては、報告しなかった。甲状腺／上皮小体および肝臓に関する$AUC_{0-inf}$値だけが、血清（９２．６μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ）の値より大きかった。最高報告$AUC_{0-inf}$値は、甲状腺／上皮小体（１８３９０μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ；外挿　８．７８％）、次いで、肝臓（１０２μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ；外挿　５．０％）、胃（７２．６μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ；外挿　０．７６６％）、腎臓（６４．４μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ；外挿　１０．１％）、脾臓（４９．３μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ；外挿　４．８５％）、副腎（４５．８μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ；外挿　４．２５％）および肺（４５．４μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ；外挿　２．８８％）に関してであった。$AUC_{0-inf}$値に関する最低報告値は、脊髄（３．７７μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ；外挿　６．５５％）、次いで、筋肉（４．６６μｇ　ｅｑ・ｈ／ｇ；外挿　６．２５％）に関して算定された。組織における最長算定可能$t_{1/2}$は、腎臓に関する３６．４時間、次いで、肺に関する２７．５時間、肝臓に関する２５．７時間および甲状腺／上皮小体に関する２５．４時間であった。最短報告$t_{1/2}$は、坐骨神経に関する４．７１時間であった。

考察

【０２７５】

髄腔内投与後、血清および全血中の放射能の最高平均濃度は用量投与後３時間で観察されたが、これは、全身循環への用量投与関連物質の相対的に迅速な分布を示唆している。静脈内投与後、血清および全血中の放射能の最高平均濃度は、測定された初回時点で観察された。１未満という血液対血清比により反映されるように、血清中の濃度は、常に、全血中の濃度より高かった。これは、用量投与関連物質が用量投与後任意の時間に任意の群の血球と特定的に会合されない、ということを示した。血液タンパク質のＴＣＡ沈降後、放射能は主にペレット中で回収されたが、これは、循環放射能の大部分が会合されたタンパク質であったということを示唆しており、観察された放射能分布が遊離$^{125}$Ｉヨウ素

の傾向を主に反映しているわけではなかったことを示している。

【０２７６】

群２（静脈内用量投与　１．００ｍｇ／ｋｇ）を群３（髄腔内および静脈内併合用量投与　１．０８ｍｇ／ｋｇ）と比較した場合、群３　血清および全血における濃度は、一般的に、群２のものと類似していると思われた。両群に関する両マトリックス中の放射能の減少も、血液対血清比により評価されるように、非常によく似ていた。群２および群３血清および血液に関するＡＵＣ$_{0-tlast}$およびＡＵＣ$_{0-inf}$の比較は、用量投与関連物質への曝露が群３動物においてわずかに高いことを示した。

【０２７７】

群１において、ＣＳＦ中の放射能のレベルは非常に低く、髄腔内腔隙への直接的な被験物質の投与によると思われない知見であったが、非常に低いレベルは脳において観察された。しかしながら、放射能は、全身循環中に、ならびに全身組織中に、用量投与の直ぐ後に観察され、これは、用量投与関連物質が投与後髄腔内腔隙からかなり迅速に分布された、ということを示唆している。胃および腸内容物における高レベルは、用量投与関連物質が糞便を介して排出されるということを示唆したが、しかし排出物における直接測定はこの試験では実施しなかった。さらに、膀胱内容物における高レベルも尿を介した排出を示唆している。被験物質それ自体の分布／持続というよりむしろこの組織におけるヨウ素標識の損失ならびに標識の持続と考えられる甲状腺／上皮小体における高レベル以外に、抗レベルの放射能は、肝臓、肺、副腎、脾臓および腎臓で観察されたが、これらは被験物質の代謝および／または排出に関与すると思われる組織であった。

【０２７８】

放射能の分布は、群２および３において、用量投与後の初回時点までに全身性および広範であった。最高濃度は、一般的に、肝臓、肺、腎臓、脾臓、副腎、そして特に甲状腺／上皮小体に関連した。したがって、３つの群すべての組織中の放射能の分布パターンは、非常によく似ていた。さらにまた、すべての動物の甲状腺／上皮小体で観察された高レベルの放射能（特に、用量投与後の漸増回数に伴う顕著な濃度増大と考えられる）は、おそらくは、被験物質それ自体の分布／持続というよりむしろ、この組織におけるヨウ素標識の損失および標識の持続を示した。ＣＳＦレベルは、用量投与後早い時点で、群１と比較してこれらの群においてより高かったが、これは、放射能標識物質が血液脳関門を横断し得た、ということを示唆している。群２と比較して、これもまた用量投与後早い時点で、わずかに高いレベルが群３のこのマトリックス中で観察されたが、これは、この濃度が、静脈内用量投与から分布する被験物質関連物質、ならびに髄腔内腔隙中に直接注射された物質により説明された、ということを示唆している。したがって、群１に関して観察されたＬＯＱより低い値は、この分析法により考えられる量より低い、極度に少量の試料容積中の極度に低い濃度の結果であり得る。

【０２７９】

組織対血清比は、一般的に、用量投与後９６時間までに全群の組織の大多数において１未満であったが、これは、用量投与関連物質が組織中に分布され、一般的に、血清からより組織からより迅速に掃去された、ということを示している。全群に関して、用量投与関連物質への組織の大多数の曝露（ＡＵＣ$_{0-tlast}$により評価）は、血清の場合より低かった。

結論

【０２８０】

雄ラットへの$^{125}$Ｉ－ｈＧＡＬＣの単回髄腔内（公称６０ｕｇ／動物）および／または静脈内ボーラス用量投与（公称濃度　１ｍｇ／ｋｇ）後、血液、血清、赤血球、ＣＳＦおよび組織中の放射能の濃度を測定した。

【０２８１】

血清および全血中の放射能の最高観察濃度は、髄腔内投与後の用量投与後３時間で（全身循環への相対的に迅速な分布を示す）、あるいは静脈内用量投与後初回時点（１０分）で生じた。血清中の濃度は血液中より高かったが、これは、被験物質関連物質が血球と特

定的に会合されなかったことを示している。組織中への放射能の分布は、用量投与後の早い時点までに全身性および広範であり、概して、組織への分布パターンは３つの群すべての間で類似していた。全群に関して、用量投与関連物質への組織の対部分の曝露（ＡＵＣ$_{0-tlast}$により評価）は、血清の場合より低かった。３群すべてに関する甲状腺／上皮小体における高濃度は、この組織における用量投与関連物質の分布および存続というよりむしろ、ヨウ素標識の損失を示すと考えられた。静脈内用量投与後９６時間までに、放射能は検査した組織の少数において依然として検出された。

実施例３：ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスにおけるＩＣＶおよびＩＣＶ／ＩＰ　ＲＭＧＡＬＣ注射および生存延長の前臨床試験

【０２８２】

本実施例は、ｒｍＧＡＬＣの毎週ＩＰ注射を施されたｔｗｉｔｃｈｅｒマウスにおける生存延長を示す前臨床試験の一実施形態を実証する。本実施形態では、サイコシンレベル低減および全体的運動機能（走り方）改善とともに、髄鞘形成改善が坐骨神経において観察された。いくつかの実施形態では、単回ＩＣＶまたはＩＣＶ／ＩＰ　ｒｍＧＡＬＣ注射で処置したｔｗｉｔｃｈｅｒマウスは、生存増大、ならびに脳サイコシンレベルの６３％までの低減を示した。ｒｍＧＡＬＣの単回ＩＣＶ投与後の重要な終点（すなわち、生存、脳サイコシンレベル）における、全身投与の付加（ＩＣＶ／ＩＰ）後のこれらの終点における非常に小さな改善を伴う陽性結果は、ＣＮＳ単独レジメンがＧＬＤの処置のための実行可能な臨床的選択肢である、ということを示唆している。

序論

【０２８３】

グロボイド細胞白質ジストロフィー（ＧＬＤ）症は、約１：１００，０００の出現率（スカンジナビア諸国では１．９：１００，０００）で出生児に生じる常染色体劣性リソソーム貯蔵障害である。進行性末梢（ＰＮＳ）および中枢（ＣＮＳ）神経系障害であるＧＬＤは、ガラクトセレブロシダーゼ（ＧＡＬＣ）の酵素活性の欠陥を引き起こして、基質脂質を分解する（すなわち、ガラクトシルセラミドをガラクトースとセラミドに；ガラクトシルスフィンゴシン（サイコシン）をガラクトースとスフィンゴシンに分解する）遺伝子突然変異の結果である。この障害は、乏突起グリア細胞およびミエリンの完全損失、ならびにガラクトシルセラミド貪食制マクロファージ（「グロボイド細胞」）の存在により特性化される。

【０２８４】

この疾患の臨床的特徴は、２つの型で現われる：すなわち乳児期および後期開始型である。乳児型のＧＬＤ（クラッベ病としても知られている）は、ＧＡＬＣ欠乏症と診断された全患者の９０％で起こり、症候は、通常は出生後３～６ヶ月以内に観察される；２～３週齢という早期に症状発現する症候の報告がある（Ｗｅｎｇｅｒ，Ｄ．Ａ．ｅｔａｌ．，２００１，Ｇａｌａｃｔｏｓｙｌｃｅｒａｍｉｄｅ Ｌｉｐｉｄｏｓｉｓ：Ｇｌｏｂｏｉｄ Ｃｅｌｌ Ｌｅｕｋｏｄｙｓｔｒｏｐｈｙ（Ｋｒａｂｂｅ Ｄｉｓｅａｓｅ），ｉｎ Ｔｈｅ Ｍｅｔａｂｏｌｉｃ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂａｓｅｓ ｏｆ Ｉｎｈｅｒｉｔｅｄ Ｄｉｓｅａｓｅ，Ｃ．Ｒ．Ｓｃｒｉｖｅｒ，Ｂｅａｕｄｅｔ，Ａ．Ｌ．，Ｓｌｙ，Ｗ．Ｓ．，ａｎｄ Ｖａｌｌｅ，Ｄ，Ｅｄｉｔｏｒ．２００１，ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ．ｐ．３６６９－３６８７）（この記載内容は、参照により本明細書中に援用される）。この疾患の後期発症型変種は、１０歳までに臨床的に現われるが、しかしながら、４０歳で診断された患者が報告されている（Ｗｅｎｇｅｒ，Ｄ．Ａ．ｅｔ ａｌ．，２００１，Ｇａｌａｃｔｏｓｙｌｃｅｒａｍｉｄｅ Ｌｉｐｉｄｏｓｉｓ：Ｇｌｏｂｏｉｄ Ｃｅｌｌ Ｌｅｕｋｏｄｙｓｔｒｏｐｈｙ（Ｋｒａｂｂｅ Ｄｉｓｅａｓｅ），ｉｎ Ｔｈｅ Ｍｅｔａｂｏｌｉｃ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂａｓｅｓ ｏｆ Ｉｎｈｅｒｉｔｅｄ Ｄｉｓｅａｓｅ，Ｃ．Ｒ．Ｓｃｒｉｖｅｒ，Ｂｅａｕｄｅｔ，Ａ．Ｌ．，Ｓｌｙ，Ｗ．Ｓ．，ａｎｄ Ｖａｌｌｅ，Ｄ，Ｅｄｉｔｏｒ．２００１，ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ．ｐ．３６６９－３６８７）（この記載内容は、参照により本

明細書中に援用される）。後期発症型患者における機能の低減は、数年の期間に亘って次第に進行する。

【０２８５】

全身性酵素補充療法（ＥＲＴ）は、リソソーム貯蔵障害（ＬＳＤ）、例えばゴーシェ病、ファブリー病およびハンター症候群に罹患している患者に関する利益を提供してきた（Ｗｅｎｇｅｒ，Ｄ.Ａ.ｅｔａｌ.，２００１，ＧａｌａｃｔｏｓｙｌｃｅｒａｍｉｄｅＬｉｐｉｄｏｓｉｓ：ＧｌｏｂｏｉｄＣｅｌｌＬｅｕｋｏｄｙｓｔｒｏｐｈｙ（ＫｒａｂｂｅＤｉｓｅａｓｅ），ｉｎＴｈｅＭｅｔａｂｏｌｉｃａｎｄＭｏｌｅｃｕｌａｒＢａｓｅｓｏｆＩｎｈｅｒｉｔｅｄＤｉｓｅａｓｅ，Ｃ.Ｒ.Ｓｃｒｉｖｅｒ，Ｂｅａｕｄｅｔ，Ａ.Ｌ.，Ｓｌｙ，Ｗ.Ｓ.，ａｎｄＶａｌｌｅ，Ｄ，Ｅｄｉｔｏｒ.２００１，ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ.ｐ.３６６９－３６８７；Ｎｅｕｆｅｌｄ，Ｅ.Ｆ.，２００４，ＥｎｚｙｍｅＲｅｐｌａｃｅｍｅｎｔｔｈｅｒａｐｙ.ＬｙｓｏｓｏｍａｌｄｉｓｏｒｄｅｒｓｏｆｔｈｅＢｒａｉｎ，ｅｄ.Ｆ.Ｍ.ａ.Ｗ.Ｐｌａｔｔ，Ｓ.Ｖ.２００４：ＯｘｆｏｒｄＵｎｉｖｅｒｓｉｔｙＰｒｅｓｓ.３２７－３３８；Ｄｅｓｎｉｃｋ，Ｒ.Ｊ.，２００４.Ｊ.Ｉｎｈｅｒｉｔ.Ｍｅｔａｂ.Ｄｉｓ.，２７（３）：ｐ.３８５－４１０）（これらの記載内容はすべて、参照により本明細書中に援用される）。ＧＬＤに関するＥＲＴは、おそらくはこの疾患がＰＮＳおよびＣＮＳの両方に影響を及ぼすため、厳正に遂行されてこなかった。ＧＬＤ患者に関する最新処置としては、造血細胞移植（ＨＣＴ）が挙げられるが、しかしながら、この手法は有意の副作用（すなわち３０％の処置関連死、生涯に亘る免疫抑制療法）のため、ならびに前駆症状製患者においてのみ有効であるため、限界がある。

【０２８６】

ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスは、ＧＬＤを研究するために用いられる最も一般的な実験動物であり、この疾患に関する膨大な実験作業を実行させている（Ｗｅｎｇｅｒ，Ｄ.Ａ.，２０００，Ｍｏｌ.Ｍｅｄ.Ｔｏｄａｙ，６（１１）：ｐ.４４９－４５１；この記載内容は、参照により本明細書中に援用される）が、しかし種々の程度の特性化を有するＧＬＤの他の天然動物モデルが存在する。自然突然変異が、ＷｅｓｔＨｉｇｈｌａｎｄＷｈｉｔｅ／Ｃａｉｒｎテリア（Ｋｏｂａｙａｓｈｉ Ｔ.，ｅｔａｌ.，１９８０，Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ.，２０２：４７９－８３；これらの記載内容は、参照により本明細書中に援用される）、無角ドーセットヒツジ（ＰｒｉｔｃｈａｒｄＤ.，ｅｔａｌ.，１９８０，Ｖｅｔ.Ｐａｔｈｏｌ.，１７：３９９－４０５）、飼いネコ（Ｊｏｈｎｓｏｎ Ｋ.，１９７０，Ｊ.Ａｍ.Ｖｅｔ.Ｍｅｄ.Ａｓｓｏｃ.，１５７：２０５７－６４；この記載内容は、参照により本明細書中に援用される）および非ヒト霊長類であるアカゲザル（Ｂａｓｋｉｎ Ｇ.，ｅｔａｌ.，１９９８，Ｌａｂ Ａｎｉｍ.Ｓｃｉ.，４８：４７６－８２；この記載内容は、参照により本明細書中に援用される）において存在する。

【０２８７】

初期の神経同種異系移植試験は、ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスのシュワン細胞の末梢神経機能を改善する能力が、ｉｎ ｓｉｔｕでの同種異系移植片ｔｗｉｔｃｈｅｒ細胞への酵素補充により媒介されるということ、ならびに損傷ｔｗｉｔｃｈｅｒ末梢有髄細胞の長期回復が可能であることを実証した。しかしながら、この技法は、ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスの全体的療法として一般化され得なかった（Ｂａｓｋｉｎ Ｇ.，ｅｔａｌ.，１９９８，Ｌａｂ Ａｎｉｍ.Ｓｃｉ.，４８：４７６－８２；この記載内容は、参照により本明細書中に援用される）。罹患マウスにおいて、ＨＣＴは、罹患動物の寿命の有意の改善および体重増を実証したが、しかしながら（骨髄低減状態調節を受けているマウスにおいて）４４日から１００日以上の間に実証された生存可能性とともに、種々の効力が観察されている（Ｌｉｎ，Ｄ.，ｅｔａｌ.，２００７，Ｍｏｌ.Ｔｈｅｒ.，１５（１）：ｐ.４４－５２；Ｈｏｏｇｅｒｂｒｕｇｇｅ，Ｐ.Ｍ.，ｅｔａｌ.，１９９８，Ｊ.Ｃｌｉｎ.Ｉｎｖｅｓｔ.，８１（６）：

ｐ．　１７９０－４；ともにこれらの記載内容は、参照により本明細書中に援用される）。これらの研究における非処置マウスの典型的寿命は、約４０日であった。

【０２８８】

これらのおよび他の試験において、再髄鞘形成速度も現存する脳病害も非処置対照に対比して処置マウスにおいて改善されることはなかった（Ｙｅａｇｅｒ　Ａ．，　ｅｔ　ａｌ．，　１９８４，　Ｓｃｉｅｎｃｅ，　２２５：１０５２－４；　Ｔｏｙｏｓｈｉｍａ，　Ｅ．，　ｅｔ　ａｌ．，　１９８６，　Ｊ．　Ｎｅｕｒｏｌ．　Ｓｃｉ．，　７４（２－３），　ｐ．　３０７－１８；ともにこれらの記載内容は、参照により本明細書中に援用される）。Ｌ－シクロセリンを、単独でまたはＨＣＴと組合せて用いたスフィンゴシン合成を標的にする基質抑制は、ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスの寿命を増大する（ＬｅＶｉｎｅ　Ｓ．，　ｅｔ　ａｌ．，　２０００，　Ｊ．　Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．　Ｒｅｓ．，　６０：２３１－６；　Ｂｉｓｗａｓ　Ｓ．，　ｅｔ　ａｌ．，　２００３，　Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．　Ｌｅｔｔ．，　ｐ３４７：３３－６；ともにこれらの記載内容は、参照により本明細書中に援用される）。Ｌ－シクロセリンは、不安の処置のために指示されるそのエナンチオマーであるＤ－シクロセリンとは異なって、ヒトが用いるには有毒過ぎる。遺伝子療法実験は、単独療法またはＨＣＴとの組合せにおいて、トランスフェクト化細胞において酵素を生じる能力、ならびにｔｗｉｔｃｈｅｒマウスにおける寿命を改善する能力を示している（Ｌｉｎ，　Ｄ．，　ｅｔ　ａｌ．，　２００７，　Ｍｏｌ．　Ｔｈｅｒ．，　１５（１）：　ｐ．　４４－５２；この記載内容は、参照により本明細書中に援用される）。基質低減、ＨＣＴおよび遺伝子療法はすべて、前駆症状製動物に用いた場合、最も有意の効力を提供し、症候性動物における疾患に全く影響を及ぼさないが、及ぼしても限定的である。したがって、ＥＲＴは、特に前駆症候性患者に施す場合、ＧＬＤの処置における実行可能な選択肢を提供し得る。

結果

【０２８９】

ＨＥＫ２９３由来ネズミＧＡＬＣ（ｒｍＧＡＬＣ；５ｍｇ／ｋｇ）を用いた全身投与酵素補充療法は、多数回腹腔内（ＩＰ）注射として末梢投与した場合、ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスの寿命を改善し、ビヒクル処置動物と比較して、サイコシン蓄積を１５％低減した（表１８、図３１）。

【表１８】

**表１８：ｒｍＧＡＬＣのＩＰ投与はtwitcherマウスにおける生存を改善する**

| 用量投与群 | 生存（日） | | | Mann-Whitney 解析 |
|---|---|---|---|---|
| | 平均 | 範囲 | | （対ビヒクル） |
| | | 最小 | 最大 | |
| 非処置 | 42.6 | 39 | 45 | 0.49 |
| ビヒクル | 43.2 | 37 | 48 | n/a |
| 1 mg/kg | 43.0 | 40 | 46 | 0.61 |
| 5 mg/kg | 48.9 | 46 | 54 | 0.0003 |
| 10 mg/kg | 49.2 | 47 | 54 | 0.0003 |

【０２９０】

ｒｍＧＡＬＣでＩＰ処置したマウスは、非処置またはビヒクル処置動物と比較して、走り方試験においてより良好に遂行し、坐骨神経組織病理学知見が改善された。末梢（ＩＰ）投与ｒｍＧＡＬＣは、脳に最小度に送達されて、脳サイコシンのわずかな低減を生じた。しかしながら、脳組織病理学知見においては如何なる変化も認められなかった。したがって、ｒｍＧＡＬＣ（５ｍｇ／ｋｇ）の反復毎週全身投与（ＩＰ）で処置したｔｗｉｔｃｈｅｒマウスにおいて観察された結果は、生存に有益で、脳サイコシンレベルをわずかに低減し、そして全体的運動機能を改善した。

ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスにおける単回ＩＣＶおよび併用ＩＣＶ／ＩＰ　ｒｍＧＡＬＣ

【０２９１】

結果は、高用量ＩＣＶ／ＩＰ処置群が平均５０日生存し（１２０μｇ／５ｍｐｋ）、ビヒクル処置動物は３６日生存したに過ぎない、ということを示している（図３２）。ＩＣＶ　ｒｍＧＡＬＣで処置したマウスは、４２日（４０μｇ）および４８日（１２０μｇ）の用量応答性平均生存時間を示しただけであった。単回１２０μｇＩＣＶ注射は、サイコシンの脳レベルを低減した（６３％）が、一方、４０μｇ　ｒｍＧＡＬＣの単回ＩＣＶ注射は、サイコシンの３９％減少を生じた（図３３）。ＩＣＶ／ＩＰ投与は、ＩＣＶ単独と比較して、サイコシン低減の如何なる付加的利益も提供しなかったが、しかし併用レジメンで観察されたサイコシンレベルの４８％低減は、毎週ＩＰ処置単独で観察されたもの（１５％）より有意に低かった。さらに、注射部位の遠位の部位での脳組織学知見の改善が、４０μｇレベルでのＩＣＶ処置で観察された（図３４）。これらの結果は、直接ＩＣＶ注射後のｒｍＧＡＬＣの脳における活性および生体分布を確証した。しかしながら、ＩＣＶ　ｒｍＧＡＬＣのみで処置したマウスは、坐骨神経繊維形態の回復または髄鞘形成を実証できず、全体的運動機能のわずかな改善のみであった（例えば、走り方分析）。ｒｍＧＡＬＣの単回ＩＣＶ投与後の重要な終点（すなわち、生存、脳サイコシンレベル）における有意の改善は、全身循環における十分な酵素濃度が欠けていることを示唆する。

臨床的用量投与パラメーター：ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスにおけるサイコシン再蓄積率

【０２９２】

適切な臨床的用量範囲を限定しようと努力して、ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスモデルにおいて以下の試験を実施した：

－　ＰＮＤ１０での単回ＩＣＶ注射後のｔｗｉｔｃｈｅｒマウスにおける脳サイコシン再蓄積率

－　ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスにおけるｒｍＧＡＬＣ併用腹腔内（ＩＰ）＋脳室内（ＩＣＶ）注射を用いた用量確認試験。

【０２９３】

中枢神経系におけるサイコシン再蓄積率を評価するために、ＰＮＤ１９での１２μｇまたは４０μｇのｒｍＧＡＬＣの単回ＩＣＶ注射で、ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスを処置した。マウスの群（ｎ＝３）を、注射（ＰＮＤ２０）の２４時間後に、その後、３日毎に屠殺した。脳組織を取り出し、サイコシン分析、組織病理学および酵素活性分析に付した。動物組を生存に関してモニタリングし（ｎ＝８）、運動機能（走り方分析）をＰＮＤ４０で分析した。

【０２９４】

単回ＩＣＶ注射後の脳ホモジネート中のサイコシンレベルを、質量分光分析（ＬＣＭＳ　Ｌｔｄ．，　Ｎｏｒｔｈ　Ｃａｒｏｌｉｎａ）により分析した。結果は、ｒｍＧＡＬＣ投与の２４時間以内にサイコシンが急速に減少することを示唆している（図３５）。サイコシンの低減傾向は、酵素投与後２４日間保持された。さらに、サイコシン濃度の減少は、ビヒクル処置動物と比較して、この期間の間は用量依存性であると思われた：ビヒクル処置（平均：４．５ｎｇ／ｍｌのサイコシン）対１２μｇ　ｒｍＧＡＬＣ（平均：２．５ｍｇ／ｍｌ　サイコシン）対４０μｇ／ｍｌ　ｒｍＧＡＬＣ（平均：１．６ｎｇ／ｍｌ　サイコシン）。興味深いことに、試験終了時（処置後２８～３２日目）に両用量投与群で観察された漸増サイコシンレベルは、月１回ベースで投与された場合、ＥＲＴが首尾よくいかないことがある、ということを示唆している。より高頻度の用量投与計画が必要であ

り得る。各試料採取時点で動物が少数であるため、結果の変動性が明白であった。しかしながら、これらの結果に基づいて、サイコシン再蓄積がほぼ４週間（２８日）スケジュールで起こることは明白である。

【０２９５】

生存時間を分析した場合、結果は、１２μｇ／ｍＬおよび４０μｇ／ｍＬ　ｒｍＧＡＬＣ処置群がともに、４８日（１２μｇ／ｍＬ）および５０．５日（４０μｇ／ｍＬ）という生存中央値を有し、ビヒクル処置動物は４０日生存した（図３６）。予期せぬことに、４０μｇヒトＧＡＬＣ（ｒｈＧＡＬＣ）で処置したマウスは、４０日生存するビヒクル処置動物と比較して、単に４２日までの生存利益を示した。ｒｈＧＡＬＣによるこの効力ｔ芸源の理由（単数または複数）は不明であるが、しかし後述の節で考察する。しかしながら、この試験の結果から、低用量のｒｍＧＡＬＣでも、ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスモデルにおける生存利益を示すのに有効である、ということは明らかである。

臨床的用量投与パラメーター：ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスにおけるｒｍＧＡＬＣおよびｒｈＧＡＬＣ用量分類試験

【０２９６】

従来の結果は、ＩＣＶ／ＩＰ　ｒｍＧＡＬＣ（１２０μｇおよび５ｍｐｋ）で処置したｔｗｉｔｃｈｅｒマウスが、ビヒクル処置動物より１４日長く生存した、ということを示した。しかしながら、直接ＣＮＳ注射のみで処置したｔｗｉｔｃｈｅｒマウスは、１２日（１２０μｇ　ＩＣＶ）および6日（４０μｇ　ＩＣＶ）の平均生存の用量応答性改善を示した。ネズミ脳における１２０μｇの用量は、患者における３００ｍｇ／脳１ｋｇの用量と解釈できる；したがって、低用量のｒｍＧＡＬＣの効力を調べることが重要であった。さらに、ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスにおける効力に関して、ｒｈＧＡＬＣの早期ロットを検査した。マウスの群を、ＰＮＤ１０で開始するｒｍＧＡＬＣの毎週ＩＰ注射（５ｍｇ／ｋｇ）＋ＰＮＤ１９での１２　μｇ（３０ｍｇ／脳１ｋｇ）または２６μｇ（６０ｍｇ／脳１ｋｇ）のｒｍＧＡＬＣまたはｒｈＧＡＬＣの単回ＩＣＶ注射で処置した。ＰＮＤ３９で、マウス組（ｎ＝３／群）を、組織採取（脳、坐骨神経、肝臓、血清）のために屠殺した。脳組織を、サイコシン分析、組織病理学および酵素活性定量に付した。残りの動物生存（ｎ＝８）を、生存および走り方分析に関してモニタリングした。

考察

【０２９７】

この用量確認試験の結果は、ｒｍＧＡＬＣ投与に関する生存利益を示し、用量依存性傾向を伴った（図３７）。１２μｇ／５ｍｐｋおよび２６μｇ／５ｍｐｋ組合せ用量のｒｍＧＡＬＣは、ビヒクル処置動物に関する４０．５日と比較して、ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスの平均寿命をそれぞれ４４．５および４５．５日に延長した。１２μｇ／５ｍｐｋ（３８日）および２６μｇ／５ｍｐｋ（３９．５日）用量のｒｈＧＡＬＣに関する生存利益は認められなかった。２６μｇ／５ｍｐｋ　ｒｈＧＡＬＣは、罹患ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスの寿命を１．５日延長したが、しかしながら、何れの用量のｒｈＧＡＬＣも、ビヒクル処置動物に関する生存日数に達しなかった（図３７）。ｒｍＧＡＬＣで全身処置（ＩＰ）された動物で以前観察されたように、ｒｍＧＡＬＣの併用ＩＣＶ／ＩＰ投与を受けている全動物に関して走り方分析における改善が観察されたが、一方、単回ＩＣＶ注射で処置された動物は、運動機能における利益をほとんど示さなかった（図３８）。寿命における利益に関して観察されたように、ｒｈがるで処置したマウスにおいては、走り方分析における利益は観察されなかった。しかしながら、ｒｈＧＡＬＣの特異的活性は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性におけるｒｍＧＡＬＣの約３３％であることが判明した（表１９）。したがって、これらの最新結果は、低用量のｒｍＧＡＬＣでも、生存および運動機能の両方に有益であり、ＧＬＤの処置のためのＥＲＴの適時を増大する、ということを示唆する。サイコシン再蓄積が４週間（２８日）スケジュールでほぼ起きることは、明白である。

【表１９－１】

表１９：ｒｍＧＡＬＣおよびｒｈＧＡＬＣ活性

| ロット | 平均活性（μmol/hr/mg） | % rmGALC |
|---|---|---|
| rmGALC R5 (3.44 mg/mL) | 154.48 ± 87.5 | n/a |
| rhGALC Lot 73 (8.74 mg/mL) | 51.35 ± 16.2 | 33 |

ｒｍＧＡＬＣおよびｒｈＧＡＬＣの抗原性は、ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスがヌルモデル（すなわち、それらは交差反応性免疫学的物質（ＣＲＩＭ）陰性）であると予測されるべきものである。全体的に、ｒｈＧＡＬＣ処置マウス（ＩＣＶ／ＩＰレジメン）における最大血清抗体力価は、匹敵するＩＣＶ／ＩＰ　ｒｍＧＡＬＣレジメンで処置されたマウスより有意に高かった（図３９）。抗体は、直接ＣＮＳ注射で処置されたマウスにおいても存在したが、しかし最大力価は、ＩＣＶ／ＩＰ処置を受けている動物より数倍低かった。中和抗体が生成され得たという可能性が存在する。

【０２９８】

ＧＡＬＣ欠乏イヌを用いた試験を開始して、ｒｈＧＡＬＣの抗原性を特性化した。この試験では、罹患動物（生後６週）を、ヒトＧＡＬＣの２ｍｇ／ｋｇを毎週１回ＩＶ投与および／または２．２５ｍｇ（３０ｍｇ／脳１ｋｇ）ＩＴ投与またはビヒクル単独の投与で処置した。残りの試験に関しては、付加的処置を、８週目および毎月（生後～１６週まで）施した。ＣＳＦを取り出した後、安楽死させて、抗体形成およびサイコシンレベルに関して分析した（図４０）。

【０２９９】

ＭＰＳＩＩＩＡのＨｕｎｔａｗａｙイヌモデルにおける組換えヒトヘパリンＮ－スルファターゼを用いた以前の試験は、試験における動物の寛容化を必要とする外因性酵素に対する顕著な抗体応答を実証した。しかしながら、ナイーブおよびｒｈＧＡＬＣ処置イヌからのＣＳＦを検査する予備的結果は、非処置対照と比較して、サイコシンレベルの明らかな低減を示した（図４０）。

実施例４：マウスにおけるＩＴ注射ＧＡＬＣの脳および肝臓の組織学的知見／標識化

【０３００】

本実施例は、マウスにおけるＩＴ注射ｈＧａｌＣおよびｍＧａｌＣの一実施形態、ならびに種々の組織におけるＧａｌＣ抗体の対応する検出および局在化を記載する。

実験計画

【表１９－２】

実験計画：

| 群 | N | 処置 | 用量 (μg) | 注射容積 (μL) | 投与経路 | 頻度 | 屠殺 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 6 | ビヒクル対照 | 0 | 10 μl | IT | ３回毎週注射 | 最終注射の２４時間後 |
| B | 6 | hGalC（調査） | 100 | | | | |
| C | 6 | hGalC (PD) | | | | | |
| D | 6 | mGalC | | | | | |

組織採取および組織学的染色

【０３０１】

それぞれ群ＢおよびＣから組織学的分析のために利用可能な動物は３匹だけであった。脳および肝臓からの試料を、その後にパラフィン包埋するために、１０％中性緩衝化ホルマリン中に固定した。５μｍパラフィン切片を、免疫組織化学（ＩＨＣ）検査のために調製して、注射タンパク質を検出した。ＧａｌＣＡのＩＨＣ染色のために、３つの抗ＧａｌＣ抗体を用いた。

１．　マウスモノクローナル抗体（エックマン博士の研究室で生成）
２．　ウサギポリクローナル抗体（群１により産生）
３．　ウサギポリクローナル抗体（群２により産生）

高感受性ＡＢＣ＋チラミド蛍光増幅法を用いて、標的化タンパク質を標識した。染色結果は、ＧａｌＣ陽性細胞を緑色に示し、核をＤＡＰＩブルーとして対比染色し、バックグラウンド域を黒色として示した。

結果

【０３０２】

群１ポリクローナル抗体は、マウス脳において、内因性タンパク質との強力な交差反応を有した。ビヒクル対照脳でも、すべてのＣＮＳ細胞が強陽性に染色された。注射タンパク質は、このような強バックグラウンドで確認されなかった（図４１）。群２ポリクローナル抗体は、マウス脳において内因性タンパク質との弱い交差反応を有したが、しかしビヒクル対照脳におけるＣＮＳ細胞は依然として陽性であった。注射タンパク質は、バックグラウンドを上回って検出されなかった（図４２）。マウスモノクローナル抗体は、許容可能な特異性を有し、ビヒクル対照脳においては、シグナルは非常に低かった（データは示されていない）。ＩＴ注射後、タンパク質はすべて、脳表面の髄膜中で検出された。群１および群２のｈＧａｌＣはともに、髄膜下の領域のＣＮＳ細胞（ニューロンおよびグリア細胞）中で検出され、群１処置動物のｈＧａｌＣにおいて相対的に強いシグナルが認められた。陽性ニューロンおよびグリア細胞は、ｍＧａｌＣ処置脳においては検出されなかった（図４３）。小脳では、ｈＧａｌＣは髄膜中および顆粒帯表面における染色を生じたが、一方、ｍＧａｌＣは生じなかった（図４４）。マウスモノクローナル抗体はマウス脳中で働いたが、しかし肝臓中の洞様細胞との強い交差反応性を示し、肝臓におけるＩＴ注射タンパク質の細胞取込みを評価するために用いることはできなかった（図４５）。群２

ポリクローナル抗体は、肝臓組織において特異性を示し、ビヒクル対照脳においてはシグナルは非常に低かった。ＩＴ注射タンパク質はすべて、処置後、肝臓の洞様細胞および肝細胞の両方で検出され、群１処置動物のｈＧａｌＣにおいては、陽性細胞は少なく、シグナルは弱かった（図４６）。如何なる処置群においても高ＧａｌＣ活性は見出されなかったが、しかし陽性染色は、髄膜において、ならびに周囲領域のＣＮＳ細胞で見出され、これは、ＩＨＣが、細胞レベルで取り込まれた注射タンパク質の検出において感受性であることを示している（図４７）。肝臓では、ｍＧａｌＣはより高い活性を示したが、しかしながら、群２　ＡｂによるＩＨＣは、ｍＧａｌＣおよびｈＧａｌＣ間の非常に小さな差を検出した（図４８）。ｈＧａｌＣにおける群１Ａｂによる低検出可能活性は、低観察ＩＨＣレベルと一致した。

要約

【０３０３】

ＩＴ注射後、注射タンパク質はすべて、ＩＨＣにより大脳の髄膜中で検出された。群１および群２の両方の注射ｈＧａｌＣの細胞更新は、ＣＮＳ細胞（ニューロンおよびグリア細胞）中で検出され、群１処置脳のｈＧａｌＣにおけるシグナルは相対的に強かった。要請ニューロンおよびグリア細胞は、ｍＧａｌＣ処置脳では検出されなかった。小脳では、髄膜における陽性シグナルのほかに、群１および群２の両方の注射ｈＧａｌＣは、顆粒帯の表面の細胞の層中に見出された。全処置群の肝臓において、注射タンパク質は洞様細胞および肝細胞中に検出され、これは、循環系における髄腔内Ｉ２Ｓの終局的取込みを示唆する。群２のｍＧａｌＣおよびｈＧａｌＣは、群１のｈＧａｌＣに対比して、同様の強い染色シグナルを有した。

実施例５：イヌにおけるＩＴ注射ＧＡＬＣの脳組織学的知見／標識化

【０３０４】

本実施例は、イヌにおけるＩＴ注射ＧａｌＣの一実施形態、ならびに脳におけるＧａｌＣ抗体の対応する検出および局在化を記載する。この実施形態では、ＩＴ注射タンパク質は、髄膜で、ならびに髄膜下の表面皮質の領域で検出された。ＩＣＶ注射タンパク質は、脳室周囲領域に見出された（図４９）。ＧａｌＣ　ＩＨＣは、ＩＴ注射後に皮質における拡散性細胞外染色パターンを示し、ニューロン（円形）では陰性シグナルを有した（図５０）。陽性Ｉｂａ染色を有する活性化ミクログリア細胞の限定性低減が、ＩＣＶ注射脳室周囲領域およびＩＴ注射皮質において観察された（図５１）。形態学的変化（グロボイド細胞）はビヒクル群においてはＬＦＢ／ＰＡＳで皮質中には見出されず、群を通して差異は観察されなかった。Ｉｂａ染色で印を付けられたグロボイド細胞（矢印）は、脳室周囲領域の４つの限定区域において、ＩＣＶ処置後に低減された（図５２）。

Ｉ２ＳタンパクのＩＴ送達の例

実施例６：ＩＴ送達Ｉ２Ｓの生体分布

【０３０５】

この試験の主な目的は、組換えヒトＩ２Ｓが、髄腔内－腰椎経路により生体ＭＰＳＩＩマウスの脳に送達され得るか否かを確定することであった。

【表２０】

表２０：８～１２週齢雄マウスの６つの群を以下のように処置した：

| 群 | N | 系統 | 処置 | 容積 | 用量 | 用量/脳重量 | 経路 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 3 | IKO | I2S | 10 μL | 260 μg | 520 mg/kg | IT-腰椎 |
| B | 3 | IKO | I2S | 10 μL | 260 μg | 520 mg/kg | IT-腰椎 |
| C | 3 | IKO | 非処置 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| D | 1 | IKO | I2S | 10 μL | 260 μg | 520 mg/kg | IT-腰椎 |
| E | 3 | IKO | 非処置 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| F | 3 | C57Bl/6 | 非処置 | N/A | N/A | N/A | N/A |

注射スケジュール:髄腔内－腰椎経路によるイズルスルファーゼ(10 μL)の３回までの注射を動物に施した：

- 群A & D：3用量のI2Sを、1、8および15日目に投与した
- 群B：2用量のI2Sを1および8日目に投与した
- 群C & E：非処置対照(IKO)マウス
- 群F：非処置野生型対照マウス

材料および方法

動物：

【０３０６】

マウスを、１２時間明暗周期下で、コロニー室中にケージ当たり４匹までの群で収容した。齧歯類餌（ＬａｂＤｉｅｔ－５００１、Ｓｔ Ｌｏｕｉｓ, ＭＯ）および水（Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ, ＭＡ 自治体水道水；逆浸透により精製）を、実験期間中、自由に摂取させた。動物の管理は、実験室動物の管理および使用に関するガイド Ｇｕｉｄｅ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ ｏｆ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌｓ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ Ｐｒｅｓｓ, Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ Ｄ．Ｃ．, １９９６）に記載された指針に従って実行した。 Ｔｈｅ ｃｕｒｒｅｎｔ ＩＫＯ ｂｒｅｅｄｉｎｇ ｃｏｌｏｎｙ ｗａｓ ｅｓｔａｂｌｉｓｈｅｄ ｆｒｏｍ ｆｏｕｒ ｃａｒｒｉｅｒ ｆｅｍａｌｅ ｍｉｃｅ ｈｅｔｅｒｏｚｙｇｏｕｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ＩＫＯ ｍｕｔａｔｉｏｎ ｔｈａｔ ｗｅｒｅ ｏｂｔａｉｎｅｄ ｆｒｏｍ Ｄｒ．Ｊｏｓｅｐｈ Ｍｕｅｎｚｅｒ（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｎｏｒｔｈ Ｃａｒｏｌｉｎａ）から入手したＩＫＯ突然変異のための４匹のキャリアー雌を、Ｃ５７ＢＬ／６バックグラウンド株の雄マウス（Ｃ５７ＢＬ／６ＮＴａｃ、Ｔａｃｏｎｉｃ, Ｈｕｄｓｏｎ, ＮＹ）と交配させて、異種接合性雌および半接合性雄ノックアウトマウス、ならびに野生型雄および雌同腹仔を産生した。子孫はすべて、組織でなのＰＣＲ解析による遺伝子型であった。この実験に用いたマウスはすべて、８～１２週齢の半接合性ＩＫＯ（－／０）または野生型（ＷＴ）同腹仔（＋／０）マウスとして同定された雄であった。

イズルスルファーゼ：

【０３０７】

２４ｍＬのＩ２Ｓ（組換えヒトイズルスルファーゼ）を、２Ｌのリン酸塩緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）を４回取り替えながら透析した。Ｉ２Ｓを次に、Ｖｉｖａｓｐｉｎカラムにより濃縮して、最終容積１ｍＬのＰＢＳ中に再懸濁した後、０．２μｍフィルターを用いてフィルター滅菌した。採集濃度は５１ｍｇ／ｍＬであった。

髄腔内－腰椎注射：

【０３０８】

腹腔内注射により、２００～３００μＬ／体重１０ｇ（２５０～３５０ｍｇ／ｋｇ）で

１．２５％２，２，２－トリブロモエタノール（アベルチン）を用いて、成体マウスを麻酔した。尾の基部と肩甲骨との間で背側毛を除去し、剃毛区域をポビドン／ベタジンスクラブで、その後、イソプロピルアルコールで拭き取った。小さい正中線皮膚切開（１～２ｃｍ）を腰椎仙椎上に作って、背側正中線と腸骨の翼（片方の腸骨）の頭蓋側の交差を確認した。腸骨窩中の筋肉（中臀筋肉）はハート型筋肉で、「ハート」の上部の２つの側面は、腸骨の翼の位置に近い。気密性１０～２０μＬガラス製はミルトン注射器に取り付けた３２ゲージ針を、下にある骨からの抵抗が感じられるまで挿入した。２μＬ／２０秒（１０μＬ／２分）のおよその速度で被験物質１０μＬの注射を実施した。適宜、創傷クリップを用いて皮膚切開を閉じて、回復室で動物を回復させた後、適切なケージに戻した。

組織学手順：

【０３０９】

最終注射の１時間後に、動物を屠殺した。

【０３１０】

脳および肝臓組織を採取し、１０％中性緩衝化ホルマリン中で固定し、次に、加工処理して、パラフィン中に包埋した。ヘマトキシリン／エオシン（Ｈ＆Ｅ）染色および免疫組織化学（ＩＨＣ）染色のために、５μｍ切片を調製した。

ヘマトキシリンおよびエオシン染色：

【０３１１】

脳および肝臓切片を、Ｈ＆Ｅで染色した。染色結果は、核を紫色に、そして細胞室を桃色～赤色として示した。Ｈ＆Ｅ染色スライドを、組織病理学的形態評価のために用いた。

免疫組織化学：

【０３１２】

Ｉ２Ｓ生体分布評価のために、脱パラフィン化および再水和化脳および肝臓切片を、組換えヒトＩ２Ｓに対するマウスモノクローナル抗体２Ｃ４－２Ｂ２（Ｍａｉｎｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，Ｐｏｒｔｌａｎｄ，ＭＥ）とともに一晩インキュベートして、注射Ｉ２Ｓ（または、陰性対照抗体としての無関係マウスＩｇＧ；Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ，ＣＡ）を検出した。２～８℃で一晩インキュベーション後、ホースラディッシュペルオキシダーゼと共役された二次ヤギ抗マウスＩｇＧを付加した。さらに、３７℃で３０分間インキュベーション後、Ｔｙｒａｍｉｄｅ－Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８標識溶液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ．，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を、さらに１０分間付加した。１．５μｇ／ｍｌの４’－６－ジアミジノ－２－フェニルインドール（ＤＡＰＩ）を核対比染色として含有する褪色防止封入液（ＶｅｃｔａＳｈｉｅｌｄ；Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を用いて、切片を封入して、多チャンネルニコン蛍光顕微鏡で観察した。染色結果は、Ｉ２Ｓ細胞を緑色で、核を青色で、そしてバックグラウンド区域を黒色として示した。

【０３１３】

効力分析のために、脳および肝臓切片を、一次抗体としてのラット抗ＬＡＭＰ１（リソソームマーカーとしてのリソソーム付随膜タンパク質）ＩｇＧ（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）で染色した。無関係抗体としてのラットＩｇＧを、陰性対照として用いた。ＡＢＣ（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｓ，Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａからのアビジンビオチン複合体キット）法を用いて、標的化マーカーを増幅した。

【０３１４】

要するに、脱パラフィン化切片を再水和し、一次抗体とともにインキュベートした。２～８℃で一晩インキュベーション後、二次ビオチニル化ウサギ抗ラットＩｇＧ（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｓ，Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）を付加し、３７℃で３０分間インキュベートして、次に、試料を洗浄し、アビジン－ビオチン－ペルオキシダーゼ複合体（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）で３０分間処理した。発色のために、３，３’－ジアミノベンジジン四塩酸塩（ＤＡＢ）を色原体として用いた。次い

で、切片をヘマトキシリンで対比染色して、カバーガラスで覆った。染色結果は、ＬＡＭＰ－１陽性細胞を褐色で、核を青色として示した。

【０３１５】

代表的写真を撮影して、ＬＡＭＰ－１陽性細胞の区域をＩｍａｇｅ－Ｐｒｏ　Ｐｌｕｓソフトウェア（Ｍｅｄｉａ　Ｃｙｂｅｒｎｅｔｉｃｓ，　Ｉｎｃ．，　Ｂｅｔｈｅｓｄａ，　ＭＤ）で解析し、スチューデントｔ検定を用いて比較統計学分析を実施した。

電子顕微鏡法：

【０３１６】

３用量のＩ２Ｓ処置動物からの脳組織を、４℃で一晩、０．１Ｍカコジル酸ナトリウム緩衝液、ｐＨ７．４中の２．５％ＰＦＡ／２．５％グルタルアルデヒドで固定した。次に、試料をカコジル酸塩緩衝液（０．１Ｍ、ｐＨ７．４）中で洗浄し、四酸化オスミウム中で後固定して、アルコールおよびプロピレンオキシド中で脱水し、エポン樹脂中に包埋した。超薄切片を１００ｎｍで切断し、クエン酸鉛で染色して、Ｔｅｃｎａｉ（商標）　Ｇ$^2$　Ｓｐｉｒｉｔ　ＢｉｏＴＷＩＮ透過型電子顕微鏡で検査した。

結果

【０３１７】

免疫組織化学（ＩＨＣ）により測定した場合の脳では、Ｉ２Ｓはビヒクル対照動物において見出されなかった。これに対比して、髄膜細胞、大脳および小脳のニューロンは、Ｉ２Ｓ注射動物においてＩ２Ｓに対して陽性に染色された。染色シグナルは、３用量を投与された動物においてより強かった（図５３）。

【０３１８】

ビヒクル処置ＩＫＯマウスの脳組織では、細胞空胞形成（リソソーム蓄積症の組織病理学的特徴）が、野生型動物と比較して、脳全体に見出された。Ｉ２Ｓ処置ＩＫＯマウスでは、非処置マウスと比較して、表面大脳皮質、尾状核、視床、小脳から白質までの細胞空胞形成の広範な低減が認められた（図５４）。異常に高いリソソーム活性は、野生型動物と比較した場合、ビヒクル処置ＩＫＯマウスのミクログリア、髄膜および血管周囲細胞において、リソソーム付随膜タンパク質－１（ＬＡＭＰ－１）染色（リソソーム活性および疾患状態の指標）により見出された（図５５）。Ｉ２Ｓ髄腔内処置マウスは、ＬＡＭＰ－１免疫染色における顕著な低減を有した。この低減は、ＬＡＭＰ－１陽性細胞の数の減少および薄い染色により特性化された。低減は、２および３用量のＩ２Ｓ処置動物の両方において、表面大脳皮質、尾状核、視床、小脳から白質までの全脳全体に見出された（図５６）。種々の脳領域のＬＡＭＰ－１免疫染色の外形計測分析は、評価した脳の全区域においてＬＡＭＰ－１陽性染色の有意の低減が認められる、ということを確証した（図５６）。

【０３１９】

ビヒクル処置ＩＫＯマウスにおける脳細胞の電子顕微鏡検査は、非晶質顆粒貯蔵物質を含有する拡張空胞ならびに層板およびゼブラ体様構造を有する封入体を明示した。微細構造レベルでのリソソーム貯蔵のこれらの典型的病理学的特徴は、Ｉ２Ｓ髄腔内－腰椎注射マウスにおいて低減された（図５７）。

【０３２０】

肝臓では、ビヒクル処置マウスにおけるＩ２Ｓの陽性染色は認められなかった。Ｉ２Ｓ髄腔内注射マウスでは、多量の注射Ｉ２Ｓが洞様細胞中に明白に見出され（図５８）、これは、髄腔内腔隙内の注射Ｉ２ＳがＣＳＦと一緒に循環し、次に、循環系中にクモ膜顆粒を通して吸収されたことを示した。

【０３２１】

ビヒクル処置ＩＫＯマウスの肝臓組織では、Ｈ＆Ｅ染色および強ＬＡＭＰ－１免疫染色により実証される重症細胞空胞形成および異常に高いリソソーム活性が、ＷＴマウスと比較して、見出された。肝臓における細胞空胞形成およびＬＡＭＰ－１免疫染色の顕著な低減は、Ｉ２Ｓによる髄腔内処置後に見出された。Ｈ＆Ｅ染色は、ほぼ完全に消失した細胞質内空胞形成を明示し、ほぼ正常な肝臓細胞構造が認められた（図５９）。

【０３２２】
ＩＫＯマウスにおいて、組換えヒトＩ２Ｓは、髄腔内－腰椎経路により脳に送達され、注射Ｉ２Ｓは、脳の種々の領域において広範な組織病理学的改善を生じる。
・　注射Ｉ２Ｓは、脳において髄膜細胞およびニューロンで検出された。
・　光学および電子顕微鏡レベルの両方での脳全体の細胞空胞形成低減。
・　脳全体のＬＡＭＰ－１リソソームマーカー低減。
・　髄腔内注射Ｉ２Ｓは末梢循環に進入し、肝臓形態および組織学的マーカーを改善した。
実施例７：Ｉ２ＳのＩＴ送達の毒物学
【０３２３】
この実施例は、カニクイザルにおける毎月ボーラス髄腔内腰椎用量投与によるイズルスルファーゼに関連した臨床徴候を例証する。これを達成するために、以下の表２１に示すように、１４匹の雄カニクイザルを５つの処置群に無作為に割り当てた。
【表２１】

**表２１：実験計画**

| 動物の群番号 | | 公称用量(mg) | 用量投与容積（ml） |
|---|---|---|---|
| 1 | 3 | 0 | 1 |
| 2 | 3 | 3 | 1 |
| 3 | 3 | 30 | 1 |
| 4 | 3 | 150 | 1 |
| 5 | 2 | 100 | 1 |

【０３２４】
全群の動物に、腰椎のレベルでのＩＴで、毎月３回の間隔で用量投与した。１ｍｌの用量投与容積を、０．３ｍｌのＰＢＳでカテーテル系からフラッシュした。各用量投与の１～２日前に、約２ｍｌのＣＳＦを、大槽のレベルでＩＴ脊髄タップから採取した。血液試料（２ｍｌ）も、この時点で採取した。血液（２ｍｌ）およびＣＳＦ（０．１ｍｌ）を、群５動物から、用量投与前、初回用量投与後０．５、１、２、４、８、２４および４８時間後に採取した。毎日少なくとも２回、臨床徴候を記録した。３回目の用量投与の約２４時間後に剖検を実施して、選択組織を収穫し、保存した。
【０３２５】
１日目に、３匹の群４（１５０ｍｇ）動物すべてが、用量投与後３～１２分以内に最小度に後半身を気にするしぐさを示し、５～１５分間持続した；この徴候は、被験物質に関連すると思われる。体重、摂食量、ならびに神経学的／身体的検査パラメーターに、被検物に関連するとみなされる変化は認められなかった。
【０３２６】
血清およびＣＳＦ試料の分析、ならびに用量投与溶液分析物を提示する。内因性イズルスルファーゼ活性における変動は、カニクイザルからの種々の組織において観察された；脳および脊髄は、検査した他の末梢器官、例えば肝臓、心臓および腎臓より大きい内因性活性を有した。イズルスルファーゼ投与は、種々の脳領域において、ならびに脳幹および脊髄において、イズルスルファーゼ活性の用量依存的増大に関連した。ＩＴ送達は、左右の大脳半球の間の分布の観察可能な差を生じなかった。以下の器官において、イズルスルファーゼ活性の明白な用量依存的増大が認められた：脳、肝臓、心臓および腎臓。脳におけるイズルスルファーゼに関する免疫染色は、染色強度の用量依存的増大を実証した。３ｍｇ群では、髄膜下の髄膜細胞および限定グリア細胞染色が観察された：ニューロン染色は、３ｍｇ処置群からの動物においては明らかでなかった。イズルスルファーゼ染色は、脊髄において陽性で且つ用量依存的であって、最高染色強度は腰部領域で認められたが、ここは、イズルスルファーゼのＩＴ投与が行なわれた場所である。肝臓、腎臓および心臓におけるイズルスルファーゼ染色強度は、用量依存的で、これらの器官におけるイズルス

ルファーゼ活性増大と一致した。

【０３２７】

要するに、月１回の間隔で送達される１５０ｍｇまでの用量でのイズルスルファーゼのＩＴ投与は、副作用を生じなかった。したがって、非観察副作用レベル（ＮＯＡＥＬ）は、この試験で用いた最高用量である１５０ｍｇであると解釈された。イズルスルファーゼ投与は、ＣＮＳにおけるイズルスルファーゼ活性の用量依存的増大と関連し、肝臓、腎臓および心臓における全身レベルを生じた。

【０３２８】

被験物質であるイズルスルファーゼは、１５４ｍＭ　ＮａＣｌ、０．００５％ポリソルベート２０、ｐＨ５．３～６．１中の用量投与溶液として供給された。供給用両党よ溶液の公称濃度は、０、３、３０または１５０　ｍｇ／ｍｌであった。被験物質は、－８２°～－７９°Ｃで冷凍庫に保存した。リン酸塩緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）、ｐＨ７．２を、用量投与後の、そして連続ＣＳＦ採取後のフラッシュ剤として用いた。ＰＢＳは、Ｇｉｂｃｏ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎから入手した。

被験物質用量投与調製物

【０３２９】

各時間間隔の用量投与の初日に、各濃度について１つのバイアルを－８０℃箱型冷凍庫から取り出して、台上で室温に解凍させた。一旦解凍したら、群１、２および３に関するバイアルにラベルを貼って、計量し、用量投与を予定された各動物に関して０．２２μｍフィルターを通して引き出した。用量のすべてを投与した後、バイアルを再計量し、冷蔵庫に入れた。

【０３３０】

翌日（動物００３、群４および群５に関する用量投与当日）、群１および４のための用量投与溶液を冷蔵庫から取り出して、台上に載せて、室温にした。一旦室温になったら、群１および４に関するバイアルを計量し、群４バイアルにラベルを貼って、群１および４において用量投与が予定されている各動物に関してフィルターを通して１ｍｌを引き出した。次に、適量の群４用量投与溶液および群１（ビヒクル）を滅菌ポリプロピレンバイアル中に注入することにより、群５に関する用量投与溶液を調製した。群１および４から付加された量を、記録した。バイアルを静かに逆さにすることにより溶液を混合し、群５の動物のために２～１ｍｌ用量をフィルターを通して引き出した。用量投与完了時に群１および４に関するバイアルを再計量し、バイアルすべて（群１～５）を冷凍庫に入れた。

【０３３１】

１４匹の動物を、表２１に記載したように、処置群に無作為に割り当てた。

【０３３２】

ヒト投与のために意図された経路であるため、ＩＴ投与経路を選択した。この試験のために選定されたイズルスルファーゼの用量（３、３０、１００および１５０ｍｇ／ｍｌ）を選択して、３連続毎月ボーラスＩＴ腰椎注射後に非ヒト霊長類中枢神経系（ＣＮＳ）内の酵素の種々の用量レベルの生体分布を評価した。

臨床観察

【０３３３】

臨床徴候の全体的出現率は、最小度であった。群１（対照）、群２（３ｍｇ）、群３（３０ｍｇ）または群５（１００ｍｇ）は、試験中の任意の時間で被験物質に関連があるとみなされる臨床徴候を有した。

【０３３４】

１日目に、３匹の群４（１５０ｍｇ）動物（０１２～０１４）すべてが、用量投与後３～１２分以内に最小度に後半身を気にするしぐさを示し、５～１５分間持続した。この徴候は被験物質に関連すると思われたが、低用量群のいずれにおいても観察されなかった。初回用量投与直後、または被験物質投与直後の当日に、他の臨床徴候は認められなかった。群４動物に関して観察された唯一の他の徴候は、３５日目の動物０１３に関する嘔吐の単一エピソードであった。

【０３３５】
１か月に１回の髄腔内ボーラス投与としての被験物質の投与は、移植薬剤送達装置に固有の変化を考慮に入れた場合、任意の肉眼的または顕微鏡的悪変化と関連しなかった。対照群を含めた全群が、薬剤送達系に対する炎症反応を示す髄膜中の顕微鏡的変化を有した。３０ｍｇ以上の被験物質用量を摂取した動物では、より顕著な好酸性構成成分を有する髄膜における炎症反応傾向を示したが、しかしこの差は、生物学的に有意であるとみなされなかった。
【０３３６】
対照と被験物質処置動物との間の差は非常にわずかであったため、非観察副作用レベル（ＮＯＡＥＬ）は、この試験で用いた最高用量である１５０ｍｇであると解釈された。
【０３３７】
全群（対照を含む）における髄膜の全体的炎症反応は、サルにおいてこの期間中の髄腔内投与試験で一般的に遭遇するものよりわずかに顕著であった。しかしながら、これは、おそらくは、ビヒクルの何らかの特性と、または剖検の２４時間前の用量投与の実行と関連があるとみなされた。
【０３３８】
脳イズルスルファーゼ染色は、３ｍｇ群の１匹を除いて、全処置群で陽性であり、最高染色強度は１５０ｍｇ群で見出された（図６０、６１、６２および６３）。３ｍｇ群では、髄膜下の髄膜細胞と少数のグリア細胞のみが陽性であった；注射イズルスルファーゼはニューロン中には検出されなかった。高用量群（３０、１００および１５０ｍｇ）では、大脳ニューロンの大集団が、髄膜細胞、グリア細胞および血管周囲細胞とともに、イズルスルファーゼ染色に関して強陽性であった。イズルスルファーゼ免疫染色は、髄膜近くの表面の層Ｉ内のニューロンから、白質に隣接するより深部の層ＶＩ内のニューロンまで、大脳ニューロン中の注射イズルスルファーゼの広範な分布を明示した（図６４、６５および６６）。ニューロンの顕著な染色は、１５０ｍｇ用量群に関しても観察された（図６７）。全動物（３０～１５０ｍｇの用量群）において、脳の前部、中央および後部区分間に、ニューロンイズルスルファーゼ染色の顕著な差は見出されなかった。
【０３３９】
イズルスルファーゼ染色は全動物の脊髄において陽性で、最高染色強度は腰部領域であった（図６８および６９）。イズルスルファーゼ免疫染色も、用量依存的であった。ニューロン、髄膜細胞、グリア細胞、血管周囲細胞、ならびに神経繊維を取り囲む神経上膜／神経周囲膜／神経内膜（結合細胞）は、１５０ｍｇ群においてイズルスルファーゼ染色に関して強陽性であった（図７０および７１）。
【０３４０】
肝臓では、イズルスルファーゼに関する陽性染色は、動物の洞様細胞（クッパー細胞および内皮細胞）において見出された。しかしながら、イズルスルファーゼは、３ｍｇ処置群に関する肝細胞中では検出されなかった（図７２）が、一方、肝細胞における陽性イズルスルファーゼ染色は、高用量群で見出され、１５０ｍｇ処置群ではより高い染色強度を示した（図７３、７４および７５）。
【０３４１】
３ｍｇ処置群からの動物において、イズルスルファーゼに関する陽性染色は認められなかった（図７６）。これに対比して、３０、１００および１５０ｍｇ群においては、間質細胞はイズルスルファーゼに関して陽性に染色され、顕著な染色は１５０ｍｇ群で観察された（陽性細胞数および染色強度）（図７７、７８および７９）。
腎臓
【０３４２】
３ｍｇ用量群からの動物においては、注射イズルスルファーゼはほとんどまたは全く検出されなかった（図８０）。しかしながら、陽性イズルスルファーゼ染色は、３０および１００ｍｇ群の糸球体細胞および間質細胞で見出された（図８１および８２）。１５０ｍｇ群では、イズルスルファーゼ免疫染色はさらに、近位尿細管細胞のイズルスルファーゼ

染色を、糸球体および間質細胞の顕著な染色とともに明示した（図８３）。

考察

【０３４３】

体重、摂食量、身体検査知見および神経学的検査知見に及ぼす被験物質関連の臨床徴候または作用は認められなかった。１日目に、群４（１５０ｍｇ）動物は、用量投与後３～１２分以内に最小度に後半身を気にするしぐさを示し、５～１５分間持続した；この徴候は、被験物質に関連すると判断された。

【０３４４】

イズルスルファーゼ投与は、種々の脳領域、ならびに脳幹および脊髄におけるイズルスルファーゼ活性の用量依存的増大と関連した。脊髄における最高レベルの染色強度は、腰部領域であったが、ここは、イズルスルファーゼのＩＴ投与が行なわれた場所である。イズルスルファーゼのＩＴ投与は全身曝露も生じ、肝臓、腎臓および心臓において用量依存的染色強度が認められた。３０ｍｇ以上の用量で被験物質を摂取した動物は、髄膜における炎症傾向を示し、より顕著な好酸性構成成分を有した。

【０３４５】

月１回の間隔で送達される１５０ｍｇまでの用量でのイズルスルファーゼのＩＴ投与は、副作用を生じなかった。したがって、非観察副作用レベル（ＮＯＡＥＬ）は、この実施例で用いた最高用量である１５０ｍｇであると解釈された。イズルスルファーゼ投与は、ＣＮＳにおけるイズルスルファーゼ活性の用量依存的増大と関連し、肝臓、腎臓および心臓における全身レベルを生じた。

【０３４６】

実施例８：ＩＴ送達したＩ２ＳのＰＫ（血清およびＣＳＦ）

本実施例は、カニクイザルにおける月１回のボーラス髄腔内腰椎注射および週１回のボーラス静脈内注射により投与したイデュルスルファーゼの６か月間の毒性試験に関連した、被検試料（ＴＡ）濃度に関する血清および脳脊髄液（ＣＳＦ）解析を提供する。

【０３４７】

実験計画

ｔの目的は、６か月の期間にわたり、イデュルスルファーゼ（Ｉ２ｓ）の髄腔内（ＩＴ）反復投与を毒性学および安全性薬理学の観点から評価することであった。試験計画を表２２に示す。

【０３４８】

【表２２】

**表２２：試験計画**

| 群番号 | 個体数 | ＩＶ用量（ｍｇ／ｋｇ） | ＩＶ投与回数 | ＩＴ用量（ｍｇ） | ＩＴ投与回数 |
|---|---|---|---|---|---|
| １ | ６ | ＤＣ（生理食塩水） | ２３ | ＤＣ（ＰＢＳ） | ６ |
| ２ | １２ | ０（ＩＶ溶媒） | ２３ | ０（ＩＴ溶媒） | ６ |
| ３ | １２ | ０．５ | ２３ | ３ | ６ |
| ４ | ６ | ０．５ | ２３ | ３０ | ６ |
| ５ | １２ | ０．５ | ２３ | １００ | ６ |

**ＤＣ＝装置対照：群１の個体には溶媒も被検試料も投与しなかった。**

被検試料

アイデンティティ：イデュルスルファーゼＩＶ投与－ロット番号ＦＤＣ０６－００１（２．０ｍｇ／ｍＬ）

ＩＴ投与－イデュルスルファーゼ（０ｍｇ／ｍＬ）

イデュルスルファーゼ（３ｍｇ／ｍＬ）

イデュルスルファーゼ（３０ｍｇ／ｍｌ）
イデュルスルファーゼ（１００ｍｇ／ｍｌ）
【０３４９】
アッセイ方法：
イデュルスルファーゼ濃度を決定するために、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着測定）を用いて解析を行った。希釈係数を乗じる前の検出限界（ＬＯＤ）は１．２５ｎｇ／ｍＬであった。試料を１：５０の希釈でスクリーニングしたため、アッセイ感度は６２．５ｎｇ／ｍＬである。検量曲線の上限を超えた試料をさらに希釈し、曲線の範囲内の値が得られるような適当な希釈で再試験した。選択された試料を、酵素活性アッセイを用いてさらに解析した。このアッセイのＬＯＤは、最小の試料希釈１：１５０で０．１８ｍＵ／ｍＬである。
【０３５０】
それぞれ生理食塩水または溶媒を投与した群１および２のすべての個体において、ＩＶ投与およびＩＴ投与の期間を通して、血清イデュルスルファーゼレベルは１３８ｎｇ／ｍＬから６２．５ｎｇ／ｍＬ未満（すなわちＬＯＤ未満）の範囲であった。群１および２の個体の２００個の被検ＣＳＦ試料のうち、６２個がアッセイＬＯＤを上回るＩ２Ｓレベルを示した。そのうち７個の値が高かった（＞１，０００ｎｇ／ｍＬ）。ＩＴ投与３の前に採取した１つの他のＣＳＦ試料は、Ｉ２Ｓが１，０００ｎｇ／ｍＬを上回るという試験結果であった。次いで、試料のイデュルスルファーゼ活性を試験した。各場合において、活性の結果はＩ２Ｓの存在を示し、活性レベルに基づきＩ２Ｓのおよその濃度を計算したところ、その結果は、抗原ＥＬＩＳＡにより得られた結果から２０％以内にあった（表２３を参照）。非特異的活性を除外するために、抗原ＥＬＩＳＡの結果がＬＯＤ未満の無作為に選択した追加のＣＳＦ試料も酵素活性アッセイを用いて試験した。
【０３５１】
【表２３】

**表２３：ＣＳＦ試料の調査結果**

| 個体番号 | 群 | 投与 | 投与回数 | 投与方法 | 時点 | ELISAの結果 (mg/mL) | 活性の結果 (mU/mL) | 活性に基づき計算したng/mL | 測定値の%として表した計算値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 003 | 1 | 生理食塩水 | 5 | IT | 投与前 | 1392 | 4.7 | 1173 | 119% |
| 003 | 1 | 生理食塩水 | 6 | IT | 投与前 | 7322 | 29.9 | 7469 | 96% |
| 004 | 1 | 生理食塩水 | 2 | IT | 2時間後 | 17045 | 62.1 | 15527 | 110% |
| 006 | 1 | 生理食塩水 | 6 | IT | 4時間後 | 16435 | 70.7 | 17682 | 93% |
| 006 | 1 | 生理食塩水 | 1 | IT | 投与前 | 1320 | 5.3 | 1319 | 100% |
| 0016 | 2 | 溶媒 | 1 | IT | 2時間後 | 3070 | 11 | 2743 | 112% |
| 017A | 2 | 溶媒 | mo.3 | IV | 4時間後 | 2236 | 8.8 | 2194 | 102% |
| 046 | 5 | 100mg/kg | 3 | IT | 投与前 | 2086 | 7 | 1750 | 119% |

【０３５２】
この試験では、血清およびＣＳＦ試料のイデュルスルファーゼ濃度を解析した。血清試料を以下のような計画に従って採取した：

ＩＶ投与：投与１～１０の投与前および投与の２時間後、投与１１～２３の投与前および投与の４時間後、ならびに剖検時。
ＩＴ投与：投与１および２の投与前および投与の２時間後、投与３～６の投与前および投与の４時間後、ならびに剖検時。
ＣＳＦ試料を以下のような計画に従って採取した：
ＩＶ投与：投与１の投与前および投与の２時間後、ならびに投与３および６の４時間後。
ＩＴ投与：投与１および２の投与前および投与の２時間後、投与３～６の投与前および投与の４時間後、ならびに剖検時。

【０３５３】

一般的に、血清イデュルスルファーゼの方がＣＳＦイデュルスルファーゼよりも早く除去されるようであった。それぞれ生理食塩水または溶媒を投与した群１および２の個体の血清イデュルスルファーゼレベルは、試験した全時点で１３８ｎｇ／ｍＬ以下であった。アッセイの検出限界（ＬＯＤ）を下回るレベルの個体もいた。

【０３５４】

高レベル（＞１，０００ｎｇ／ｍＬ）の結果が得られた７つの明らかな例外を除けば、アッセイのＬＯＤを上回る群１および２のＣＳＦ試料は比較的少なかった。ＩＴ投与３の前に１個体から採取した１つのＣＳＦ試料でも、イデュルスルファーゼが１，０００ｎｇ／ｍＬを上回る試験結果が得られた。

【０３５５】

上記の傾向から外れた結果が得られた試料を再試験し、確認した。さらに、これらの試料のイデュルスルファーゼ酵素活性を試験した。これらの活性の結果でも、イデュルスルファーゼの質量アッセイにより得られた結果から２０％以内にある高いイデュルスルファーゼレベルが確認された（表２３）。

【０３５６】

イデュルスルファーゼの質量単位がＬＯＤに満たないＣＳＦ試料を無作為に試験することにより、この試料コホートにおける活性アッセイの特異性の妥当性を調べ、これらの試料中のイデュルスルファーゼレベルが確かにＬＯＤ未満であることが確認された（データ不掲載）。

【０３５７】

実施例９．ＩＴ送達したＩ２Ｓの生体内分布

髄腔内投与がＩ２ＳをＣＮＳの組織に送達する有効な方法であることが良好に示されたため、脳の深部組織内に分布することが可能であるか否か、またＩＴ投与したＩ２Ｓの細胞局在が見られるか否かを判定するために、さらなる試験を行った。組換えヒトイズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）製剤を、ｐＨ６．０の１５４ｍＭ　ＮａＣｌ、０．００５％ポリソルベート２０の溶媒で調製し製剤化した。

【０３５８】

３ｍｇ、３０ｍｇまたは１００ｍｇのＩ２Ｓを月１回、埋入した髄腔内ポートから６か月間連続で非ヒト霊長類に投与した。この試験の計画を下の表２４にまとめる。

【０３５９】

【表２４】

表２４

| 群 | n | ＩＶ投与 (mg/kg)[a] | ＩＴ投与 (mg)[a] | 試験最終日（個体数） ６か月 | 回復 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 6 | DC（NS） | DC（PBS） | 6 | - |
| 2 | 12 | 0（溶媒） | 0（ＩＴ溶媒） | 6 | 6 |
| 3 | 12 | 0.5 | 3 | 6 | 6 |
| 4 | 6 | 0.5 | 30 | 6 | - |
| 5 | 12 | 0.5 | 100 | 6 | 6 |

[a]別途明記されない限り、イデュルスルファーゼ。ＤＣ（装置対照）；ＩＴ（髄腔内）；ＩＶ（静脈内）；ＮＳ（通常の生理食塩水）；ＰＢＳ（リン酸緩衝生理食塩水、ｐＨ７．２）。

【０３６０】
ＩＲＳの月１回、６か月間の非ヒト霊長類への反復投与は、試験した最高用量において高い忍容性が認められ、また重大な毒性学上の有害事象を全く伴わなかった。最後の６回目のＩＲＳ投与の２４時間後に、非ヒト霊長類対象を屠殺し、この非ヒト霊長類のＣＮＳ組織を調べた。

【０３６１】
免疫組織化学（ＩＨＣ）により、ＣＮＳの細胞および組織全体にわたって、ＩＲＳの広範囲な細胞内沈着があると判定された。脳の全組織でＩＲＳタンパク質がＩＨＣにより検出され、大脳皮質から脳室白質にかけて沈着の勾配が見られた。灰白質においては、全群の大脳、小脳、脳幹および脊髄のニューロンでＩＲＳが用量依存的に検出された。高用量群の表面灰白質では、表面皮質において多数の大脳ニューロンがＩＲＳ染色で陽性であった（図８４Ａ）。またＩＲＳは、視床（図８４Ｂ）、海馬（図８４Ｃ）、尾状核（図８４Ｄ）および脊髄（図８４Ｅ）のニューロンでも検出された。髄膜細胞および血管周囲細胞もＩＲＳ染色で陽性であった（図８４Ｆ）。

【０３６２】
図８５および図８６で図示されるように、非ヒト霊長類対象において、ＩＴ投与したＩＲＳのＣＮＳ組織内への分布、特に灰白質、視床および大脳皮質における沈着が明らかである。さらに、図８６および図８７は、ＩＴ投与したＩＲＳが、非ヒト霊長類対象の図示したＣＮＳ組織内に用量依存的に蓄積することを示している。また共局在染色により、ＩＲＳのＩＴ投与がニューロンおよびオリゴデンドロサイトの両方に関連することも明らかとなった。また図８８により示されるように、ＩＴ投与したＩＲＳは、非ヒト霊長類対象の大脳全体にわたり分布し局在する。特に図８９Ａ～８９Ｄは、線維染色により示されるように、非ヒト霊長類へのＩＴ投与後のＩＲＳのニューロンによる取込みおよび軸索との関連を示している。また特に興味深いことに、本試験は、ＩＲＳが神経細胞に対して選択的であり、このような神経細胞が髄腔内投与したＩＲＳの脳深部組織内への分布を促進し、またＩＲＳが軸索の構造に関連するらしいことを示しており、このことはＩＲＳの順行性の軸索輸送を示唆している。

【０３６３】
独立した動物試験での各種投与経路および用量の薬物動態データを下の表２５に示す。
【０３６４】
【表２５】
**表２５**

| 用量 | AUClast | 体重 | 脳重量 | 用量 | |
|---|---|---|---|---|---|
| 単位 | 時間･ng/mL | kg | kg | mg/kg BW | mg/kg Br wt |
| 0.5mg/kg | 8331 | 2.7 | 0.1 | 0.5 | 5 |
| 1mg、IT | 1933 | 3.1 | 0.1 | 0.32 | 10 |
| 10mg、IT | 31316 | 2.7 | 0.1 | 3.66 | 100 |
| 30mg、IT | 140345 | 2.9 | 0.1 | 10.34 | 300 |

【０３６５】
下の表２６に示すように、$^{124}$Ｉ標識したＩ２Ｓを試験動物に投与した。またＰＥＴスキャンの結果を図１０６に示す。
【０３６６】
【表２６】
**表２６**

| 群 | 個体数／群 | 経路 | 被検試料 | 用量 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | ICV | [$^{124}$Ｉ]－イデュルスルファーゼ | 3mg |
| 2 | 4 | IT-L | [$^{124}$Ｉ]－イデュルスルファーゼ | 3mg |
| 3 | 4 | IV | [$^{124}$Ｉ]－イデュルスルファーゼ | 0.1mg/kg |
| 4 | 4 | IV | [$^{124}$Ｉ]－イデュルスルファーゼ | 1mg/kg |

【０３６７】
また本試験により、ＩＴ投与後の非ヒト霊長類対象の脳室付近の白質脳組織におけるＩＴ投与Ｉ２Ｓの細胞内同定も示された。白質のＩ２Ｓ染色密度は全般的に灰白質よりも低く、Ｉ２Ｓはオリゴデンドロサイト内で検出された（図９０）。具体的には、図９０は、白質脳組織におけるＩ２Ｓの細胞内同定を示し、さらに、Ｉ２Ｓがミエリンと関連しないらしいことを示している。
【０３６８】
ＩＴ投与したＩ２Ｓが脳組織の深部に分布していることが示されたことに加え、本試験では、Ｉ２Ｓの標的細胞小器官内への局在、および重要なことに、ハンター症候群のようなリソソーム蓄積症において冒される細胞小器官であるリソソーム内へのＩ２Ｓの局在も確認された。具体的には、Ｉ２Ｓはリソソーム内に見られ、また軸索内でも検出された。図９０は、ＩＴ投与したＩ２Ｓが、非ヒト霊長類対象のオリゴデンドロサイトのリソソーム内に局在することを示しており、これにより、ＩＴ投与したＩ２Ｓが脳の深部組織内に分布することが可能であり、かつ細胞内に局在化することが可能であることが確認される。
【０３６９】
送達されたＩ２Ｓが生物活性を保持しているか否かを判別するために、比活性アッセイを用いて脳内のＩ２Ｓレベルを測定した。最終投与の２４時間後の３ｍｇＩＴ群の脳内での活性は、装置対照および溶媒対照の個体の基底レベルと外観的には異ならなかった。３０ｍｇＩＴ投与および１００ｍｇＩＴ投与個体の脳内での酵素活性は、剖検時（投与の２４時間後）にベースラインを上回っていた。
脳へのＩ２Ｓ送達の位置を判別するためのさらなる動物試験を図１０４および下の表２７に示す。

【０３７０】
【表２７】

**表２７：試料の位置**

| 試料番号 | 構造 | スライス番号 | 試料番号 | 構造 | スライス番号 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 大脳皮質-表面(L) | 4 | 14 | 視床(L) | 8 |
| 2 | 大脳皮質-表面(R) | 4 | 15 | 視床(R) | 8 |
| 3 | 尾状核(R) | 6 | 16 | 視床下部(L) | 8 |
| 4 | 尾状核(L) | 6 | 17 | 視床下部(R) | 8 |
| 5 | 脳梁 | 6 | 18 | 海馬(L) | 8 |
| 6 | 大脳皮質(前頭)-表面(L) | 8 | 19 | 海馬(R) | 8 |
| 7 | 大脳皮質(前頭)-表面(R) | 8 | 20 | 白質-深部(L) | 10 |
| 8 | 白質-表面(L) | 8 | 21 | 白質-表面(R) | 10 |
| 9 | 白質-表面(R) | 8 | 22 | 脳梁 | 10 |
| 10 | 白質-深部(L) | 8 | 23 | 白質-深部(L) | 12 |
| 11 | 白質-深部(R) | 8 | 24 | 白質-深部(R) | 12 |
| 12 | 大脳皮質（側頭)-表面(L) | 8 | 25 | 小脳(R) | 14 |
| 13 | 大脳皮質（側頭)-表面(R) | 8 | | | |

【０３７１】
実施例１０．ビーグル犬におけるＩＴ送達の生体内分布
上記の例で観察されたＩ２Ｓの分布パターンが、単回のＩＴまたはＩＣＶ投与を行った健常なビーグル犬でも再現された。コンピュータで出した数字を用いて、雄ビーグル犬を２群に無作為化した（群１（ＩＣＶ）、Ｎ＝３；群２（ＩＴ）；Ｎ＝４）。全個体の腰椎クモ膜下腔または左側脳室（投与用）、および大槽（試料採取用）にカテーテルを埋入した。カテーテルはすべて、皮下チタン製接触ポートを終端とした。未投与の手術対照として追加のイヌを用いた。
【０３７２】
単回ボーラスで１ｍｌのＩ２Ｓ注射（２０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ６．０；１３７ｍＭ塩化ナトリウム；０．０２％ポリソルベート－２０中、３０ｍｇ／ｍｌ）をＩＴまたはＩＣＶで行い、次いで、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ；ｐＨ７．２）による０．３ｍｌの洗い流しを行った。臨床兆候をモニターし、投与の２４時間後に屠殺した。脳および脊髄の組織試料を採取し、ＥＬＩＳＡ、Ｉ２Ｓ酵素活性およびＩＨＣにより測定されるＩ２Ｓ定量分析を行い、試験群間で比較した。
【０３７３】
ＩＨＣによる測定では、Ｉ２ＳがＩＴおよびＩＣＶの両群の灰白質全体にわたり広範囲に分布していた。大脳皮質では、図９１（画像ａおよびｃ）に示されるように、ＩＴおよびＩＣＶの両群において、表面の分子層から深部の内層までの６つの全ニューロン層でニューロンがＩ２Ｓ陽性であった。ＩＴ群およびＩＣＶ群の小脳皮質では、図９１（画像ｃおよびｄ）に示されるように、プルキンエ細胞を含むニューロンでＩ２Ｓが検出された。ＩＴおよびＩＣＶの両群において、図９１（画像ｅおよびｆ）に示されるように、海馬の多数のニューロンがＩ２Ｓ陽性であった。また図９１（画像ｇおよびｈ）に示されるように、両群の視床および尾状核でもＩ２Ｓ陽性ニューロンが見られた。
【０３７４】
したがって、本試験は、ＩＴ投与した酵素が脳深部の細胞および組織内に分布する能力を確認するものであり、また、ＩＴ投与したＩ２Ｓのような酵素が、ハンター症候群のようなリソソーム蓄積症に関連したＣＮＳ発症の治療に有用であることを支持するものである。
【０３７５】

実施例１１．ＩＴ送達したＩ２Ｓのｉｎ　ｖｉｖｏでの有効性イズロン酸－２－スルファターゼ欠損マウスモデル

ＩＴ投与したＩ２Ｓが脳の深部組織内に分布しＩ２Ｓの細胞内に局在する能力が示されたため、ＩＴ投与したＩ２Ｓの治療効果を判定するためにさらなる試験を行った。ＩＴ投与したＩ２Ｓが疾患進行を変化させる能力を試験するために、遺伝子操作されたイズロン酸－２－スルファターゼノックアウト（ＩＫＯ）マウスのハンター症候群モデルを開発した。Ｉ２Ｓ遺伝子座の標的破壊を用いて組織および器官でのグリコサミノグリカン（ＧＡＧ）蓄積を生じさせることにより、Ｉ２Ｓノックアウトマウスモデルを開発した。ＩＫＯマウスモデルは、特徴的な顔面粗造化および骨格異常を含めた、ヒトで見られるハンター症候群の身体的特性を多数示す。さらにＩＫＯマウスモデルは、尿中および体全体の組織におけるグリコサミノグリカン（ＧＡＧ）レベルの上昇、ならびに組織病理学的に観察された広範な細胞空胞化を示す。

【０３７６】

本試験では、市販のＩ２Ｓ（Ｅｌａｐｒａｓｅ（登録商標））を濃縮し、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で再懸濁させた。６群の８～１２週齢の雄ＩＫＯマウスをＩ２Ｓ（１０μＬ；２６ｍｇ／ｍｌ）で処置した。群Ａおよび群Ｂ（Ｎ＝３）にはそれぞれ、Ｉ２Ｓを２６０μｇの用量で３回（１日目、８日目および１５日目）および２６０μｇの用量で２回（１日目および８日目）髄腔内に投与した。群Ｄにも、１日目、８日目および１５日目の３回、２６０μｇの用量で髄腔内投与による処置を行った。群ＣおよびＥ（Ｎ＝３）は未処置の対照群、群Ｆ（Ｎ＝３）は未処置の野生型対照であった。対照マウスにはＩ２Ｓを含まない溶媒を投与した。最後の注射の１時間後にマウスを屠殺し、次いで、免疫組織化学（ＩＨＣ）および組織病理学的解析用に組織標本を作成した。

【０３７７】

３回目の注射後、Ｉ２Ｓ処置マウスの表面大脳皮質、尾状核、視床および小脳において、溶媒処置マウスに比べて広範な細胞空胞化の減少が見られた。また細胞空胞化の減少は、ＩＴ処置後の白質でも見られた。ＩＴ投与後のＩＫＯマウスの脳組織へのＩ２Ｓの分布は明らかであった。

【０３７８】

ＩＫＯマウスにおけるＩ２Ｓの３回の週１回ＩＴ投与でも、ＣＮＳ細胞空胞化の顕著な減少が光学顕微鏡レベルおよび電子顕微鏡レベルの両方で示された。Ｉ２ＳのＩＴ投与後、細胞空胞化の減少は未処置ＩＫＯマウスに比べて明らかであったが、このことは、ＩＴ投与したＩ２Ｓが疾患進行を変化させることが可能であることを示している。図９２に示されるように、細胞空胞化の減少は、Ｉ２ＳのＩＴ投与後のＩＫＯマウスの脳梁および脳弓において明らかであった。

【０３７９】

さらに、電子顕微鏡法により、灰白質ニューロン中の蓄積封入体および白質オリゴデンドロサイトの空胞化の存在の減少が示された。具体的には、ＩＫＯマウスにおけるＩ２ＳのＩＴ投与では、特定のリソソーム蓄積症に特徴的な柵状のラメラ体（「ゼブラ小体」）の減少も示された。具体的には、図５７は、電子顕微鏡検査を表し、Ｉ２Ｓを投与したＩＫＯマウスのニューロンにおいて、特徴的なゼブラ小体が未処置ＩＫＯマウスに比べて減少したことを示している。同様に図５７は、脳梁オリゴデンドロサイトの電子顕微鏡検査を示している。

【０３８０】

さらにＩＫＯマウスへのＩ２ＳのＩＴ投与では、表面大脳皮質、尾状核、視床、小脳および白質において、リソソームの活性および病的状態の指標である、リソソーム病の病理学的バイオマーカーのリソソーム膜タンパク質１（ＬＡＭＰ１）による免疫染色の顕著な減少も示された。図９３Ａに示されるように、処置ＩＫＯマウスの表面大脳皮質組織におけるＬＡＭＰ１免疫染色の顕著な減少は、図９３Ｂに示される未処置ＩＫＯ対照マウスに比べて明らかであり、このことは疾患病態の改善を示している。

【０３８１】

図５６は、脳組織の面積μｍ$^2$で測定されたＬＡＭＰ１の濃度を定量的に図示し、比較したものである。様々な脳領域におけるＬＡＭＰ－１免疫染色の形態計測学的解析では、評価した脳の全領域でＬＡＭＰ－１陽性染色の有意な減少が見られることが確認された。図５６に示されるように、評価した脳組織の各領域（皮質、尾状核および被殻（ＣＰ）、視床（ＴＨ）、小脳（ＣＢＬ）、ならびに白質（ＷＭ））において、処置ＩＫＯマウスのＬＡＭＰ陽性領域が未処置ＩＫＯ対照マウスに比べて減少しており、野性型マウスのＬＡＭＰ陽性領域に近かった。特に、解析した脳組織の各領域のＬＡＭＰ陽性領域が、治療期間の継続によりさらに減少したのは注目すべきことである。

【０３８２】

異常に高いリソソーム活性の減少は、脳の全領域の劇的な形態学的改善と相関していた。これらの結果により、ＩＴ投与したＩ２Ｓが、遺伝子操作されたＩＫＯマウスモデルにおいてリソソーム蓄積症の進行を変化させることが可能であるということが確認され、さらに、ＩＴ投与したＩ２Ｓのような酵素がハンター症候群のようなリソソーム蓄積症に関連したＣＮＳ発症を治療する能力が確認される。

【０３８３】

実施例１２．ハンター病患者の治療

例えばＩＴ送達による、ＣＮＳへの直接投与を用いて、ハンター病患者を効果的に治療することができる。本実施例は、遅発乳児型ハンター病の患者に対して、隔週（ＥＯＷ）、全４０週で、髄腔内薬物送達装置（ＩＤＤＤ）により投与する、３用量レベルまでのＩ２Ｓの安全性を評価するために計画された多施設用量漸増試験を示すものである。ヒト治療に適した髄腔内薬物送達装置の様々な例を図８９～図９２に図示する。

【０３８４】

最大２０患者まで登録：

コホート１：５患者（最低用量）

コホート２：５患者（中間用量）

コホート３：５患者（最高用量）

無作為に５患者を無治療とする。

【０３８５】

以下の基準を含むか否かに基づき、試験する患者を選択する：（１）生後３０か月までに最初の症状が現れた；（２）スクリーニング時に歩行可能である（自力で立ち上がり、片手を持たれた状態で１０歩前へ歩く能力と定義される）；（３）スクリーニング時に神経学的兆候が見られる。通常、造血幹細胞移植の経歴がある患者は除外される。

【０３８６】

遅発乳児型ハンター病の小児において、４０週間、用量を漸増してＩＴ注射により投与するＩ２Ｓの安全性を判定する。さらに、粗大運動機能に対するＩ２Ｓの臨床活性、ならびに単回および反復投与の血清中薬物動態および脳脊髄液（ＣＳＦ）中濃度を評価する。

【０３８７】

ｒｈＡＳＡタンパク質のＩＴ送達

実施例１３：ＩＴ送達した組換えＡＳＡの毒性試験

他の髄腔内投与した組換え酵素がＣＮＳの細胞および組織内に分布する能力を評価するために、幼若の（１２か月齢未満）カニクイザルにおいて１か月の期間にわたりＧＬＰ試験を行って、組換えにより調製したヒトアリールスルファターゼＡ（ｒｈＡＳＡ）の反復髄腔内（ＩＴ）投与を毒性学および安全性薬理学の観点から評価した。ｐＨ６．０の１５４ｍＭ　ＮａＣｌ、０．００５％ポリソルベート２０の溶媒で、ｒｈＡＳＡの製剤を調製し製剤化した。

【０３８８】

これを行うために、９匹の雄および９匹の雌の幼若体カニクイザルを、下の表２８に示すように、体重により３つの処置群の１つに無作為に割り当てた。個体（投与１の１雄個体を除く）に０、３または３１ｍｇ／ｍｌのｒｈＡＳＡを隔週、０．６ｍＬ（０、１．８または１８．６ｍｇの総用量）の短時間のＩＴ注入で、１個体当たり計３用量になるよう

に投与した。体重、臨床観察、神経学的および生理学的検査、臨床病理、眼科検査、ならびに毒物動態試料採取をモニターした。２９、３０または３１日目（最後のＩＴ投与の約２４時間後）に全個体の剖検を行った。選択した組織を採取し、顕微鏡により検査した。

【０３８９】

【表２８】

**表２８**

| 群 | 個体数 | 名目上の投与濃度 (mg/mL) | 投与体積 | 投与量(mg) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 3M、3F | 0 | 0.6 | 0 |
| 2 | 3M、3F | 3 | 0.6 | 1.8 |
| 3 | 3M、3F | 31 | 0.6 | 18.6 |

【０３９０】

カニクイザルのＣＮＳ組織で検出されたｒｈＡＳＡの濃度をＥＬＩＳＡにより解析し、約２．５ｎｇ／組織ｍｇに相当する正常ヒトｒｈＡＳＡ濃度の１０％の治療標的と比較した。カニクイザルの脳の異なる領域から組織試料またはパンチ試料を摘出し、ｒｈＡＳＡの存在に関してさらに解析した。図１３３～図１３８は、パンチ試料を摘出した組織を示している。パンチした組織試料は、図１３９Ａ～１３９Ｇに示されるように、大脳皮質から深部白質および深部灰白質にかけての沈着の勾配を伴うｒｈＡＳＡ濃度の増加を示した。

【０３９１】

１８．６ｍｇ用量のｒｈＡＳＡを投与した６匹のサルのＩＴおよびＩＣＶの両投与経路の同じパンチ試料を用いて検出されたｒｈＡＳＡの濃度を、図１４０Ａ～１４０Ｂに示す。ｒｈＡＳＡを髄腔内（ＩＴ）または脳室内（ＩＣＶ）に投与した成体および幼若体カニクイザルの深部白質（図１４０Ａ）および深部灰白質（図１４０Ｂ）脳組織で検出されたｒｈＡＳＡの濃度は同等であった。

【０３９２】

次いで、成体および幼若体カニクイザルの脳から摘出したパンチ組織試料を解析して、摘出組織試料中に蓄積したｒｈＡＳＡの濃度を決定し、この濃度を、タンパク質１ｍｇ当たり２．５ｎｇのｒｈＡＳＡの治療標的濃度（健常対象における正常ｒｈＡＳＡ濃度の１０％に相当する）と比較した。図１４１Ａに示されるように、解析した各組織試料パンチにおいて、１８．６ｍｇ用量のｒｈＡＳＡをＩＴ投与することにより、２．５ｎｇ／タンパク質ｍｇの標的治療濃度を上回るｒｈＡＳＡ濃度を生じた。同様に、１．８ｍｇ用量のｒｈＡＳＡを幼若カニクイザルにＩＴ投与した場合、解析した各組織試料パンチは、２．５ｎｇ／タンパク質ｍｇの治療濃度内または治療濃度を上回るｒｈＡＳＡの濃度を示し、ｒｈＡＳＡ濃度の中央値は、試験した全組織パンチ試料で治療標的を上回っていた（図１４１Ｂ）。

【０３９３】

ＩＴ投与したｒｈＡＳＡが適切な細胞に分布するか否かを判定するために、１．８ｍｇのｒｈＡＳＡをＩＴ投与したカニクイザルの図１４２Ａに示される領域の深部白質の組織を解析した。図１４２Ｂに示されるように、深部白質組織の免疫染色により、カニクイザルのオリゴデンドロサイト細胞内のｒｈＡＳＡ分布が明らかとなった。同様に、図１４２Ｃは、ＩＴ投与したｒｈＡＳＡがカニクイザルの深部白質組織での共局在を示したことを表している。具体的には、染色下で、リソソームのような標的細胞小器官における共局在が明らかであり（図１４２Ｃ）、このことは、ＩＴ投与したｒｈＡＳＡが、オリゴデンドロサイトのリソソームを含めた、ＣＮＳの適切な細胞、組織および細胞小器官に分布することが可能であるという結論を支持する。

【０３９４】

実施例１４．ＩＣＶ投与とＩＴ投与

陽電子放射体$^{124}$Ｉで標識されたｒｈＡＳＡを、ｐＨ６．０の１５４ｍＭ　ＮａＣｌ、０．００５％ポリソルベート２０の溶媒で調製および製剤化した。３ｍｇのｒｈＡＳＡに相当する量の製剤（約３８ｍｇ／脳ｋｇに相当する）を、脳室内（ＩＣＶ）および髄腔内（ＩＴ）の投与経路で成体カニクイザルに投与した。カニクイザルの高解像度ＰＥＴスキャン画像解析（ｍｉｃｒｏＰＥＴ　Ｐ４）を行って、投与した$^{124}$Ｉ標識ｒｈＡＳＡの分布を判定した。

【０３９５】

ＰＥＴ画像データ（図１４３）は、ＩＣＶ投与した$^{124}$Ｉ標識ｒｈＡＳＡおよびＩＴ投与した$^{124}$Ｉ標識ｒｈＡＳＡはともにＣＮＳの組織に効率的に分布し、特にＩＴ腰椎カテーテルにより投与した$^{124}$Ｉ標識ｒｈＡＳＡは、脊髄の全長にわたる脳脊髄液（ＣＳＦ）中に迅速かつ均一に広がったことを示している。具体的には、図１４３に示されるように、ＩＣＶ投与およびＩＴ投与後に、治療濃度の$^{124}$Ｉ標識ｒｈＡＳＡが対象カニクイザルの脳、脊髄およびＣＳＦを含めたＣＮＳ組織内で検出された。ＣＮＳ組織内、特に脳組織内で検出されたｒｈＡＳＡの濃度は、２．５ｎｇ／タンパク質ｍｇの治療標的濃度を上回った。

【０３９６】

ｒｈＡＳＡタンパク質の分布はＩＴおよびＩＣＶの投与経路において同程度であったが、図１４３から明らかなように、ＩＣＶの方が脊柱内での沈着が著しく少なかった。

【０３９７】

製剤投与の２４時間後、ＩＣＶ投与した$^{124}$Ｉ標識ｒｈＡＳＡおよびＩＴ投与した$^{124}$Ｉ標識ｒｈＡＳＡはともにＣＮＳの組織に効率的に分布した。具体的には、ＩＴ投与の２４時間後に、ＩＣＶ投与の１６．７％に対し投与量の１２．４％が頭部領域内にあった。したがって、ｒｈＡＳＡをＩＴで投与した場合、このようなＣＮＳ組織内、特に脳組織内で検出されたｒｈＡＳＡの濃度は、同じ用量のＩＣＶ投与後に検出された濃度に近かった。

【０３９８】

図１４４に示されるように、$^{124}$Ｉ標識ｒｈＡＳＡのＩＣＶ注射では、注射した量が大槽、橋槽、脚間槽および近位脊柱へ迅速に移動する。また図１４４で示されるように、ＩＴ投与でも、ＩＣＶ投与で示されたのと同じ最初の区画（槽および近位脊柱）へ$^{124}$Ｉ標識ｒｈＡＳＡが２～５時間以内に送達された。図１４５に示されるように、ＩＣＶおよびＩＴの両投与の２４時間後に、$^{124}$Ｉ標識ｒｈＡＳＡの分布は、槽および近位脊柱領域において同程度であった。

【０３９９】

これらの結果により、ｒｈＡＳＡを侵襲性の少ないＩＴ投与経路で対象に送達して、標的細胞および組織内での治療濃度を達成し得るということが確認される。

【０４００】

リソソーム蓄積症は、酵素の欠損または不全を原因とする異常な基質蓄積を生じる遺伝性疾患ファミリーの代表的なものである。これらの疾患のいくつかと関連する末梢症状は、組換え酵素の静脈内投与により効果的に軽減されるが、このような組換え酵素の静脈内投与は、大部分のリソソーム蓄積症に関連したＣＮＳ発症に大きな影響を与えることは期待されない。例えば、ハンター症候群の身体症状の治療用に組換えヒトイズロン酸－２－スルファターゼ（イデュルスルファーゼ、Ｅｌａｐｒａｓｅ（登録商標）；Ｓｈｉｒｅ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｔｈｅｒａｐｉｅｓ，Ｉｎｃ．Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ、ＭＡ）が認可されているが、発達遅延および進行性の精神障害を含み得るハンター症候群の神経発症の治療のための薬物療法はない。その原因の一つは、Ｉ２Ｓが分子量約７６ｋＤの大型で高度にグリコシル化された酵素であり、静脈内投与後に血液脳関門を横断しないという性質にある。

【０４０１】

したがって、本発明者らは、組換えヒト酵素、例えばイズロン酸－２－スルファターゼ（Ｉ２Ｓ）、アリールスルファターゼＡ（ｒｈＡＳＡ）およびα－Ｎ－アセチルグルコサ

ミニダーゼ（Ｎａｇｌｕ）などの髄腔内製剤の髄腔内（ＩＴ）送達を調べる計画に取り組んだ。本明細書に提供される結果は、組換えリソソームタンパク質のＩＴ腰椎投与により、投与したタンパク質のかなりの割合が脳に送達される、具体的には、このようなタンパク質がカニクイザルおよびイヌ両者の脳および脊髄のニューロン内に広範に蓄積されることを初めて示すものである。ＣＮＳ組織の免疫組織化学的解析では、リソソーム蓄積症における病的なグリコサミノグリカン蓄積の部位であるリソソームに対してタンパク質が標的化されることが示された。さらに、ハンター症候群のＩＫＯマウスモデル、サンフィリッポ症候群Ｂ型のＮａｇｌｕ－欠損マウスモデルおよび異染性白質ジストロフィー（ＭＬＤ）のＡＳＡノックアウトマウスモデルで示された形態学的改善は、ＩＴ投与した酵素が適切な組織に分布し、適切な細胞区画および細胞小器官へ輸送されるという観察を補強するものである。

【０４０２】

Ｉ２ＳのＩＴ腰椎投与後およびＩＣＶ投与後に検出された脳内分布パターンの類似性は、ＣＳＦの総体流および活発な再混合を示唆するものである。したがって、臨床状況においてＩＴ投与およびＩＣＶ投与の両経路が潜在的に実行可能であるが、ＩＴ投与後に脊髄内でＩ２Ｓ蓄積が観察されたことは、ハンター症候群のようなリソソーム蓄積症の脊椎での続発症および構成要素に対処する上での明らかな利点を提供する。さらに、脊髄注射ポートは侵襲性が少なく、特に小児対象で長期にわたって使用するのにより適することが予想される。

【０４０３】

血管周囲細胞染色、および上記のＰＥＴ画像解析で観察されたタンパク質移行動態による証拠は、酵素が、おそらく拍動による対流機序により血管周囲腔内に移動することを示している。活発な軸索輸送を示すＩ２Ｓと神経フィラメントとの関連が観察されたことにより、さらなる輸送機序が示唆される。後者はおそらく、脊髄および脳の細胞で広く発現され、脳実質への直接投与時にＩ２Ｓ酵素が標的細胞に取り込まれやすくするニューロンマンノース－６－リン酸（Ｍ６Ｐ）受容体と、タンパク質との相互作用から始まるのであろう（Ｂｅｇｌｅｙら，Ｃｕｒｒ　Ｐｈａｒｍ　Ｄｅｓ（２００８）１４：１５６６－１５８０）。

【０４０４】

リソソーム酵素の軸索輸送が、ｉｎ　ｖｉｖｏでの間接的な方法およびｉｎ　ｖｉｖｏでのイメージングにより既に示唆されているが、本試験は、ＣＳＦを介して輸送される、ウイルスによらないまたは発現された酵素の軸索輸送の最初の直接的な証拠を提供するものである。したがって、ＣＳＦから脳表面および深部脳組織へのタンパク質送達は、活発な移動プロセスに依存すると思わるが、このようなプロセスはいずれもまだ記載されていない、すなわち、脳の細胞、組織および細胞小器官へのタンパク質または酵素の送達を明らかにするものである。

【０４０５】

実質間質およびＣＳＦの流動力学がＩＴ腰椎投与したタンパク質の脳白質への分布を妨げるという一般的な見解に反して、本試験は、リソソーム酵素のＩＴ送達が、全脳組織内でのタンパク質の分布および蓄積、ならびに病的なグリコサミノグリカン蓄積の部位である標的細胞のリソソーム区画内での沈着を生じさせることを明らかに示している。（例えば、Ｆｅｎｓｔｅｒｍａｃｈｅｒら，Ａｎｎ　Ｎ　Ｙ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ（１９８８）５３１：２９－３９およびＤｉＣｈｉｒｏら，Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ（１９７６）２６：１－８を参照されたい）。ＩＴ腰椎送達が侵襲性の少ない性質であることに加え、この経路は、特に小児において、生物学的治療剤を脳に送達するための臨床上適切な手段を提供する。

【０４０６】

実施例１５．毒性学

本実施例は、６か月の期間にわたるｒｈＡＳＡの髄腔内（ＩＴ）投与の反復投与を、毒性学的および安全性薬理学的観点から示すものである。本試験のＩＴ被検試料はｒｈＡＳ

Ａであった。３６匹の雄および３６匹の雌カニクイザルを無作為に５つの処置群に割り当てた。群１の個体は未処置の埋植物装置対照（ポートおよびカテーテル）であり、これらの個体には溶媒も被検試料も投与しなかったが、被検試料の投与計画に合わせた計画で０．６ｍＬのＰＢＳを投与した。群２～５の個体には、０、３、１０または３１ｍｇ／ｍｌのｒｈＡＳＡを隔週、０．６ｍＬ（０、１．８、６．０または１８．６ｍｇの総用量）のＩＴ注入で投与した（すなわち、合計１２回の投与）。６か月後（最後のＩＴ投与の２４時間後）に個体の剖検を行い、４週間の回復期間の終わりに残りの４個体／性別／群の剖検を行った。選択した組織を採取して保存し、顕微鏡で調べた。

【０４０７】

全般的に、被検試料に関連する変化は、２つの大きな種類に分類することが可能であり、全用量レベル（１．８、６．０および１８．６ｍｇ／投与）で見られた。髄膜、脳実質、脊髄実質、三叉神経節、および場合により脊髄神経根／節（またはこれらの構造を取り囲む神経上膜）における浸潤（通常は好酸性成分が顕著な白血球）の増加。この増加は、被検試料（タンパク質）が髄腔内腔および神経系組織内に存在することによると解釈した。一部の個体の脊髄および脳でミクログリア細胞のわずかな局所的増加（小膠細胞症は高用量のいずれの個体でも観察されなかった）。形態学的変化は２種類とも、被検試料の存在に対する反応であると解釈した。いずれの個体においても、ニューロン壊死の証拠は見られなかった。被検試料に関連する変化はいずれも、脳、脊髄、脊髄神経根または脊髄神経節におけるいかなる生物学的に有害な反応とも関連しなかった。具体的には、ニューロン壊死または生物学的に重要なグリア反応の証拠が見られなかった。被検試料に関連する非神経系組織の病変は見られなかった。

【０４０８】

１か月の回復期間（無投与期間）の後、被検試料に関連する変化は、完全に消散するか、または被検試料の存在に伴って以前に増加した炎症性応答の残存物に限定されていた。回復個体において有害な形態学的影響は見られなかった。半定量的染色スコアを付ける盲目下での顕微鏡検査に基づけば、最終屠殺時に、アリールスルファターゼＡ（ｒｈＡＳＡ；被検試料）に対する免疫組織化学染色が、全被検試料処置群でニューロンを除く脳および脊髄の各種細胞型において増加していた。またこの増加は、肝臓のＫｕｐｆｆｅｒ細胞においても明らかであった。１か月の回復期間の後、被検試料処置個体（全用量群）におけるｒｈＡＳＡ染色が対照（装置および／または溶媒対照）レベルに戻っていた。低用量群の回復雄の１個体では、大脳皮質において、複数の領域での以前の虚血を示すアストロサイト増加およびニューロン損失の複数の病巣が見られた。この個体でのこれらの病変の正確な病因は明らかでなかったが、１０倍の用量を投与した高用量個体を含めた他の被検試料処置個体で同様の病変が見られなかったことは、これらの病変が被検試料に関係するものではなかったことを示している。

【０４０９】

本試験のＩＴ被検試料はｒｈＡＳＡであった。３６匹の雄および３６匹の雌カニクイザルを無作為に５つの処置群に割り当てた。群１の個体は未処置の埋植物装置対照（ポートおよびカテーテル）であり、これらの個体には溶媒も被検試料も投与しなかったが、被検試料の投与計画に合わせた計画で０．６ｍＬのＰＢＳを投与した。群２～５の個体には、０、３、１０または３１ｍｇ／ｍｌのｒｈＡＳＡを隔週、０．６ｍＬ（０、１．８、６．０または１８．６ｍｇの総用量）のＩＴ注入で投与した（すなわち、合計１２回の投与）。６か月後（最後のＩＴ投与の２４時間後）に個体の剖検を行い、４週間の回復期間の終わりに残りの４つ個体／性別／群の剖検を行った。選択した組織を採取して保存し、顕微鏡で調べた。下の表は、本試験の病理学的側面に関連する試験計画を示すものである。

【０４１０】

屠殺時に、脳を脳マトリックスで約３ｍｍの冠状スライス厚に切った。最初のスライスと、そこから１枚おきのスライスを、組織病理学的評価および免疫組織化学的解析用にホルマリン中で固定した。脳を完全な冠状切片として処理した。これらの切片には、少なくとも以下の脳領域が含まれていた。

・新皮質（前頭皮質、頭頂皮質、側頭皮質および後頭皮質を含む：脳切片１～８（および存在すればスライス９）
・古皮質（嗅球および／または梨状葉）：脳切片１～３
・大脳基底核（尾状核および被殻を含む）：脳切片３および４
・辺縁系（海馬および帯状回を含む）：脳切片４および５
・視床／視床下部、および黒質を含めた中脳領域：脳切片４および５
・小脳、脳橋および延髄：脳切片６～８（および存在すればスライス９）。

【０４１１】

脳切片を切片１～８／９（一部の個体に関して切片９は試験施設により提供された）としてデータ表に挙げられている。切片作成は個体間で若干異なっていた。上に挙げた脳切片（１～８／９）は、様々な解剖学的領域のおよその位置であった。脳切片は、後に可能性のあるさらなるスライド再検査（それがある場合）を容易にするために、その切片と関係のある診断とともに個々の切片としてデータ表に挙げられている。データ解釈の際には、被検試料による固有の影響（すなわち、特定の脳領域に固有）を同定するために、脳の個々の解剖学的部位（上記）を比較した。ＴＰＳでは、全個体の脳切片をすべてパラフィンに包埋して、５ミクロンに薄切し、ヘマトキシリンおよびエオシン（Ｈ＆Ｅ）で染色して、顕微鏡により調べた。さらに、対照および高用量の個体の脳をフルオロ－Ｊａｄｅ Ｂ（神経変性に関する脳の評価の感度を増強する染色）およびＢｉｅｌｓｃｈｏｗｓｋｙの銀染色（軸索、樹状突起および神経フィラメントを直接可視化することができる処理）で染色して調べた。

【０４１２】

脊髄（頸部、胸部および腰部）を１センチメートルの切片に切った。次いで、最初のスライスと、そこから１枚おきのスライスを、組織病理学的評価および免疫組織化学的解析用にホルマリン中で固定した。全個体の脊髄切片（頸部、胸部（カテーテル先端を含む）および腰部）を約５ミクロンに薄切して、Ｈ＆Ｅで染色し、各レベルで得られた横断切片および斜位切片を調べた。対照群および高用量群の脊髄の連続切片をＢｉｅｌｓｃｈｏｗｓｋｙ銀染色および抗ＧＦＡＰ（アストロサイトとその突起を直接可視化することができる免疫組織化学的染色）でさらに染色した。

【０４１３】

脊髄神経後根および神経節（中頸部、中胸部および中腰部で得られた）をパラフィンに包埋し、連続切片をＨ＆Ｅで染色した。さらに、対照群および高用量群の連続切片をＢｉｅｌｓｃｈｏｗｓｋｙ銀染色で染色した。

【０４１４】

全個体の坐骨神経、脛骨神経および腓腹神経の切片に関しては、各神経の縦断切片をパラフィンに包埋して、約５ミクロンに薄切し、Ｈ＆Ｅで染色した。各神経の横断切片をオスミウムで後固定し、Ｓｐｕｒｒ樹脂に包埋して、約１～２ミクロンに薄切し、トルイジンブルーで染色した。オスミウム後固定および樹脂包埋は末梢神経のミエリン保存性に優れているため、神経をより詳細に調べることができる。

【０４１５】

剖検時に全個体から採取した全組織および肉眼的病変もパラフィンに包埋して、Ｈ＆Ｅで染色し、顕微鏡で調べた。組織病理学的な処理および評価、ならびに免疫組織化学的解析をＴＰＳにより行った。

【０４１６】

方法：アリールスルファターゼＡ（ｒｈＡＳＡ）染色

陽性対照スライドは試験依頼者から提供された。スライドはｒｈＡＳＡを注射したマウスの肝臓切片であった。陽性対照スライドはすべて、肝臓Ｋｕｐｆｆｅｒ細胞（類洞マクロファージ）内にｒｈＡＳＡの十分な証拠を示していた。陽性対照スライドを本試験の他のスライドとともに保管する。最初に、ｒｈＡＳＡ染色した切片のすべての評価を個体の処置群に対して盲目下で行った。これは、最初に病理学者が、ラベルの個体番号を隠した（評価される実際の個体を知っている助手による）状態でｒｈＡＳＡ染色スライドを読み

取り、評価する際にスコア（重症度）を口述し、同じ助手が直ちに染色スコア（重症度）をデータ表に記入することにより行われた。次いで、正確なデータ記入を保証するために、試験神経病理学者と助手の両者が個体ＩＤを照合した。このような手順を踏んだのは、細胞内ｒｈＡＳＡ検出のための免疫組織化学的染色による染色の全体の強度の判断に偏りが生じないようにするためである。ニューロン、髄膜マクロファージ、血管周囲マクロファージおよびグリア細胞（アストロサイトとミクログリア細胞であるが、おそらくは大部分がミクログリア細胞である）の相対的な染色の程度を、脳および脊髄のすべての切片で等級付けした。各群の各脳および脊髄レベルでの平均重症度スコアを合計し（群ごと）、脳一般ｒｈＡＳＡ染色、および脊髄一般ｒｈＡＳＡ染色という組織項目下での合計として記録した。

【０４１７】

一般に、脳のニューロンのｒｈＡＳＡ染色は、脳の大脳皮質および他の核野におけるニューロンの尺度であった。髄膜マクロファージのｒｈＡＳＡ染色は、髄膜マクロファージによる被検試料の取込みおよび／または髄膜マクロファージに内在するｒｈＡＳＡの証拠であった。血管周囲マクロファージのｒｈＡＳＡ染色は、脳／脊髄のマクロファージによるｒｈＡＳＡの取込み（または内在するｒｈＡＳＡ）の尺度であったが、脳および脊髄の血管周囲腔（Ｖｉｒｃｈｏｗ－Ｒｏｂｉｎ腔）は髄膜と繋がっていることに留意するべきである。一般に、グリア細胞におけるｒｈＡＳＡ染色の等級付けは主として、特に大脳皮質の灰白質および／または白質（放線冠は大脳皮質下の白質である）内への被検試料の取込み／被検試料の透過の尺度であった。白質でのｒｈＡＳＡ染色は、アストロサイトおよびミクログリア細胞に見られるようであった。

【０４１８】

以下に挙げる等級付けスキームを用いて、各種細胞型（ニューロン、グリア細胞、マクロファージ）のｒｈＡＳＡ染色の程度を採点した。

等級の説明（染色された可能性のある細胞の％）

１　１０％未満
２　１０～２５％
３　２５～５０％
４　５０～７５％
５　７５％以上

【０４１９】

このスキームは厳密に定量的なものではないことに留意されたい。このスキームは、ｒｈＡＳＡによる脳および脊髄の染色の程度を評価するための効率的で半定量的な方法として用いたものである。試験神経病理学者は、すべてのニューロン領域がｒｈＡＳＡ染色で等しく染色されるわけではないことに留意した。また、一部の対照個体では内因性のニューロン染色が見られること、および脈絡叢の細胞および後根神経節のニューロンは対照個体においてもｒｈＡＳＡで強く染色されやすいことにも留意した。脈絡叢および後根神経節の染色の等級付けは行わなかったが、試験神経病理学者は対照動物においても染色が顕著であることに留意した。

【０４２０】

注：全用量群：低用量＝１．８ｍｇ／投与；中用量＝６．０ｍｇ／投与；高用量＝１８．６ｍｇ／投与。全用量群（雌雄；下を参照）の肝臓におけるｒｈＡＳＡ染色の増加を除いては、被検試料に関連した非神経系組織の病変は見られなかった。

【０４２１】

終了時に屠殺した個体（６か月間の隔週投与）：ｒｈＡＳＡ染色切片

以下に挙げる組織／細胞型においてｒｈＡＳＡ染色の増加が見られた。特定の用量群の特定の細胞におけるｒｈＡＳＡ染色の程度に対する被検試料の影響を考察する際には、比較のために同時溶媒対照および装置対照（回復後に屠殺した個体とともに屠殺）の染色レベルを考慮した。

【０４２２】

・脳、髄膜、マクロファージ（全用量群、雌雄）
・脳、血管周囲、マクロファージ（全用量群、雌雄）
・脳、グリア細胞（全用量群、雌雄）
・脊髄、髄膜、マクロファージ（全用量群、雌雄）
・脊髄、血管周囲、マクロファージ（全用量群、雌雄）
・脊髄、グリア細胞（中用量および高用量の雌雄）
・肝臓、Ｋｕｐｆｆｅｒ細胞（全用量群、雌雄）

【０４２３】

内因性の染色があるため、脳および脊髄のニューロンにおけるＡＲＳＡ染色レベルを明確に定めることが最も困難であった。ｒｈＡＳＡ染色では、髄膜および脳／脊髄の血管周囲マクロファージにおいて、およびグリア細胞内においても一貫してｒｈＡＳＡレベルの増加が示された。対照個体と被検試料処置個体との間で、ニューロンにおけるｒｈＡＳＡ染色の検出可能な差は見られなかった。

【０４２４】

回復後に屠殺した個体（６か月間の隔週投与後に、１か月間の無投与期間）

全般的に、剖検前に１か月の無投与期間を設けた個体では、被検試料関連の変化が完全に消散するか、または著しく減少した。以下のような顕微鏡的変化が、被検試料との関連性を示す発生率および／または重症度で見られた。

【０４２５】

被検試料に関連する顕微鏡的変化（回復個体）
・脳、髄膜、浸潤（中用量および高用量群、雌雄）（図１１１および図１１２）
・脳、髄膜、浸潤、好酸球の％（中用量の雄；高用量の雌）
・脳、血管周囲、浸潤（中用量の雄；高用量の雌）（図１１３）
・脳、血管周囲、浸潤、好酸球の％（中用量の雄；高用量の雌）
・脳、灰白質、浸潤（全用量群、雌雄）
・脳、灰白質、浸潤、好酸球の％（低用量の雄）
・脳、灰白質、好酸球、壊死（低用量の雄）
・脊髄、髄膜、浸潤（中用量および高用量の雄；低用量および高用量の雌）
・脊髄、髄膜、浸潤、好酸球の％（中用量の雄；低用量の雌）
・脊髄、灰白質、浸潤（低用量の雌）
・脊髄、灰白質、浸潤、好酸球の％（低用量の雌）
・後根神経節および神経根、神経上膜、浸潤（中用量の雌）
・脊髄神経根および神経節、浸潤、好酸球（中用量および高用量の雄；全用量の雌）
・三叉神経節、浸潤、好酸球（中用量の雌雄）

【０４２６】

これらの変化はすべて、終了時に屠殺した個体で認められた炎症性変化の増加の残存物であると解釈した。終了時に屠殺した個体の場合と同様に、一部の回復個体に依然として存在する炎症性の細胞浸潤の増加が、有害な作用を引き起こす形態学的変化を示すという証拠は見られなかった。被検試料に関連する非神経系組織の病変は見られなかった。

【０４２７】

回復後に屠殺した個体（６か月間の隔週投与後に、１か月間の無投与期間）：ＡＲＳＡ染色

【０４２８】

回復雄または雌において、装置および／または溶媒対照と比べてｒｈＡＳＡ染色の増加は示されなかった。実際には、低用量、中用量および高用量の回復雄の脳では、一部の細胞型（治療群間で異なる）において、装置および／または溶媒対照と比較してｒｈＡＳＡ染色の減少が示された。これが実際の影響であるか否かを含め、その理由はわからなかった。可能性のある１つの説明は、外来性のｒｈＡＳＡの投与が内因性のｒｈＡＳＡ産生をいくらか減少させた可能性があるということであろう。同様の所見は雄の脊髄では見られなかった。回復雄および雌では、肝臓における染色が、対照で認められたものと類似して

いた。

【０４２９】

全般的に、被検試料に関連する変化は、２つの大きな種類に分類可能であり、全用量レベル（１．８、６．０および１８．６ｍｇ／投与）で見られた。

【０４３０】

髄膜、脳実質、脊髄実質、三叉神経節、および場合により脊髄神経根／節（またはこれらの構造を取り囲む神経上膜）における浸潤（通常は好酸性成分が顕著な白血球）の増加。この増加は、被検試料（タンパク質）が髄腔内腔および神経系組織内に存在することによると解釈した。

【０４３１】

一部の個体の脊髄および脳でミクログリア細胞のわずかな局所的増加（小膠細胞症は高用量のいずれの個体でも観察されなかった）。形態学的変化は２種類とも、被検試料の存在に対する反応であると解釈した。いずれの個体においても、ニューロン壊死の証拠は見られなかった。ｒｈＡＳＡ染色切片の評価は、この中間報告の執筆の時点では未決定である。被検試料に関連する変化はいずれも、脳、脊髄、脊髄神経根または神経節におけるいかなる生物学的に有害な反応とも関連しなかった。具体的には、ニューロン壊死または生物学的に重要なグリア反応の証拠が見られなかった。被検試料に関連する非神経系組織の病変は見られなかった。１か月の回復期間（無投与期間）の後、被検試料に関連する変化は、完全に消散するか、または被検試料の存在に伴って以前に増加した炎症性応答の残存物に限定されていた。回復個体において有害な影響は見られなかった。

【０４３２】

半定量的染色スコアを与える盲目下での顕微鏡検査に基づけば、アリールスルファターゼＡ（ｒｈＡＳＡ；被検試料）に対する免疫組織化学染色が、全被検試料処置群でニューロンを除く脳および脊髄の各種細胞型において増加していた。またこの増加は、肝臓のＫｕｐｆｆｅｒ細胞においても明らかであった。１か月の回復期間の後、被検試料処置個体（全用量群）におけるｒｈＡＳＡ染色が対照（装置および／または溶媒対照）レベルに戻っていた。低用量群の回復雄の１個体では、大脳皮質において、複数の領域での以前の虚血を示すアストロサイト増加およびニューロン損失の複数の病巣が見られた。この個体でのこれらの病変の正確な病因は明らかではなかったが、１０倍の用量を投与した高用量個体を含めた他の被検試料処置個体で同様の病変が見られなかったことは、これらの病変が被検試料に関係するものではなかったことを示している。この予備報告の発行の時点で、本試験における肉眼所見および顕微鏡所見（パラフィン包埋、ヘマトキシリン／エオシン染色切片による）に厳密に基づけば、無毒性量（ＮＯＡＥＬ）は１８．６ｍｇであった。

【０４３３】

実施例１６．薬物動態データ

６か月の個体のデータ

本実施例では、ｒｈＡＳＡおよびＮｏｒｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ社の抗ｒｈＡＳＡ血清抗体の血清中およびＣＳＦ中濃度の解釈的分析を提供する。

【０４３４】

本実施例の目的は、幼若（１２か月齢未満）カニクイザルにおいて、反復投与によるｒｈＡＳＡの髄腔内（ＩＴ）投与を、毒性学および安全性薬理学の観点から評価することであった。６か月間で全１２回の投与を行った。最後の投与の２４時間後または１か月後に個体の剖検を行った。試験計画を表２９に示す。

【０４３５】

【表２９】

表２９：０４７－０２１の試験計画（ｒｈＡＳＡ　１－０９－０１５）

| 群 | 個体数 | 試験計画 名目上の投与濃度（ｍｇ／ｍＬ） | 投与量（ｍｇ） | ６か月後に屠殺した個体数 | １か月の回復後に屠殺した個体数 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 4M, 4F | DC | 0 | - | 4M, 4F |
| 2 | 8M, 8F | 0 | 0 | 4 M, 3 F[a] | 4M, 4F |
| 3 | 8M, 8F | 3 | 1.8 | 4 M, 4 F | 4M, 4F |
| 4 | 8M, 8F | 10 | 6.0 | 4 M, 4 F | 4M, 4F |
| 5 | 8M, 8F | 31 | 18.6 | 4 M, 4 F | 4M, 4F |

ＤＣ＝装置対照；群１の個体には溶媒も被検試料も投与しなかった。

[a]溶媒対照の個体番号０４４はカテーテル漏れのため、早期に５０日目で屠殺した。

【０４３６】

アッセイ方法－抗体解析

有効な方法を用いて、カニクイザル血清中およびＣＳＦ中の抗ｒｈＡＳＡ抗体の定量化を行った。簡潔に述べれば、ＭＳＤストレプトアビジンでコートしたプレートのブロッキングからアッセイを始め、次いでビオチン標識ｒｈＡＳＡとのインキュベーションを行う。洗浄段階の後、希釈試料、較正物質およびＱＣをプレートに加え、インキュベートする。さらなる洗浄段階の後、ＳＵＬＦＯ　ＴＡＧ標識剤を加え、インキュベートする。最後の洗浄段階を行い、ＭＳＤリード緩衝液を加える。直ちにプレートを読み取る。ＳＯＦＴＭａｘ　Ｐｒｏテンプレートを用いて、相対発光量（ＲＬＵ）のシグナルデータを解析する。

【０４３７】

血清中およびＣＳＦ中濃度

有効な方法を用いて、カニクイザル血清中およびＣＳＦ中のｒｈＡＳＡの定量化を行った。この方法は酵素結合免疫吸着測定（ＥＬＩＳＡ）技術に基づくものである。簡潔に述べればマイクロタイタープレートを組換えヒトアリールスルファターゼＡ（ｒｈＡＳＡ）に対するウサギポリクローナル抗体（ＳＨ０４０）でコートする。ｒｈＡＳＡ標準品および試験試料とのインキュベーション後、結合したｒｈＡＳＡタンパク質を西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）コンジュゲート抗ＡＳＡモノクローナル抗体（クローン１９－１６－３）により検出する。次いで、プレートをＨＲＰの基質であるＴＭＢペルオキシダーゼとともにインキュベートする。この酵素－基質反応を２Ｎ硫酸（$H_2SO_4$）の添加により停止させ、吸光波長４５０ｎｍでの各ウェルの吸光度を参照波長を６５５ｎｍとして測定する。同じプレートでのｒｈＡＳＡ検量曲線を用いて、試料中のｒｈＡＳＡの濃度を計算する。

【０４３８】

ｒｈＡＳＡの血清中濃度のまとめを表３０に示す。

【０４３９】

ｒｈＡＳＡのＣＳＦ中濃度のまとめを表３１に示す。

【０４４０】

抗ｒｈＡＳＡの血清中抗体濃度のまとめを表３２に示す。

【０４４１】

抗ｒｈＡＳＡのＣＳＦ中抗体濃度のまとめを表３３に示す。

【０４４２】

群および性別による抗体の出現率を表３６に示す。

【０４４３】

【表３０－１】

表３０：カニクイザルにおけるｒｈＡＳＡの血清中濃度のまとめ

| 群１：溶媒対照 | 雄 | | | 雌 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与２の後 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与４の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与４の後 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与６の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与６の後 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与８の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与８の後 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与１０の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与１０の後 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与１２の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与１２の後 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 回復期中間 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 回復後剖検 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| | | | | | | |
| 群２：０ｍｇ | 雄 | | | 雌 | | |
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 7 |
| 投与２の後 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 7 |
| 投与４の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 7 |
| 投与４の後 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 7 |
| 投与６の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与６の後 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与８の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与８の後 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与１０の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 7 |
| 投与１０の後 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 7 |
| 投与１２の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 7 |
| 投与１２の後（６か月後の剖検前） | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 回復期中間 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 回復後剖検 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| | | | | | | |
| 群３：１．８ｍｇ | 雄 | | | 雌 | | |
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |

【表３０－２】

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 投与２の後 | 49.2 | 46.8 | 8 | 40.3 | 27.3 | 8 |
| 投与４の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与４の後 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与６の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与６の後 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与８の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与８の後 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与１０の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与１０の後 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与１２の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与１２の後（６か月後の剖検前） | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 回復期中間 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 回復後剖検 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| | | | | | | |
| 群４：６．０ｍｇ | 雄 | | | 雌 | | |
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与２の後 | 173.6 | 69.5 | 8 | 143.2 | 89.0 | 8 |
| 投与４の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与４の後 | 17 | 49 | 8 | 63.8 | 119.9 | 8 |
| 投与６の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与６の後 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与８の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与８の後 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与１０の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与１０の後 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与１２の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与１２の後（６か月後の剖検前） | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 回復期中間 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 回復後剖検 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| | | | | | | |
| 群５：１８．６ｍｇ | 雄 | | | 雌 | | |
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与２の後 | 348.0 | 272.9 | 8 | 562.3 | 204.3 | 8 |
| 投与４の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与４の後 | 105.7 | 274.6 | 8 | 172.0 | 141.3 | 8 |
| 投与６の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |

【表３０－３】

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 投与６の後 | 20.4 | 38.4 | 8 | 88.6 | 121.4 | 8 |
| 投与８の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与８の後 | 0 | 0 | 8 | 54.0 | 89.4 | 8 |
| 投与１０の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与１０の後 | 0 | 0 | 8 | 6 | 18 | 8 |
| 投与１２の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与１２の後（６か月後の剖検前） | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 回復期中間 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 回復後剖検 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |

【０４４４】

【表３１－１】
表３１：カニクイザルにおけるＣＳＦ中濃度のまとめ

| 群１：溶媒対照 | 雄 | | | 雌 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与２の後 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与４の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与４の後 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与６の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与６の後 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与８の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与８の後 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与１０の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与１０の後 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 4 |
| 投与１２の前 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 4 |
| 投与１２の後 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 4 |
| 回復期中間 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 4 |
| 回復後剖検 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| | | | | | | |
| 群２：０ｍｇ | 雄 | | | 雌 | | |
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 7 |
| 投与２の後 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 7 |
| 投与４の前 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 6 |
| 投与４の後 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| 投与６の前 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| 投与６の後 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| 投与８の前 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| 投与８の後 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| 投与１０の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 5 |
| 投与１０の後 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 5 |

【表３１－２】

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 投与１２の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 5 |
| 投与１２の後（６か月後の剖検前） | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| 回復期中間 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 |
| 回復後剖検 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| | | | | | | |
| 群３：１．８ｍｇ | 雄 | | | 雌 | | |
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 投与２の前 | 42491 | 59255 | 7 | 42217 | 47300 | 6 |
| 投与２の後 | 95886 | 22626 | 7 | 125717 | 61723 | 6 |
| 投与４の前 | 17664 | 24372 | 6 | 50829 | 41891 | 6 |
| 投与４の後 | 106783 | 42823 | 6 | 138400 | 49908 | 6 |
| 投与６の前 | 39400 | 50105 | 4 | 45817 | 38404 | 6 |
| 投与６の後 | 95275 | 12836 | 4 | 104080 | 37423 | 5 |
| 投与８の前 | 25799 | 31589 | 4 | 58086 | 43821 | 5 |
| 投与８の後 | 148750 | 34664 | 4 | 119200 | 66556 | 5 |
| 投与１０の前 | 25927 | 31380 | 4 | 30380 | 30328 | 5 |
| 投与１０の後 | 89975 | 29494 | 4 | 105200 | 44603 | 5 |
| 投与１２の前 | 29746 | 34267 | 4 | 82780 | 65906 | 5 |
| 投与１２の後（６か月後の剖検前） | 32030 | 39155 | 7 | 47331 | 49015 | 6 |
| 回復期中間 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 2 |
| 回復後剖検 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| | | | | | | |
| 群４：６．０ｍｇ | 雄 | | | 雌 | | |
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 投与２の前 | 75203 | 67002 | 8 | 146979 | 233673 | 6 |
| 投与２の後 | 360000 | 179276 | 8 | 267667 | 103369 | 6 |
| 投与４の前 | 58064 | 77210 | 8 | 53285 | 73340 | 5 |
| 投与４の後 | 369250 | 241251 | 8 | 305517 | 152232 | 6 |
| 投与６の前 | 77253 | 91407 | 8 | 97987 | 146762 | 6 |
| 投与６の後 | 418600 | 200098 | 5 | 369000 | 232238 | 5 |
| 投与８の前 | 66342 | 80374 | 5 | 11592 | 23072 | 4 |
| 投与８の後 | 329400 | 209841 | 5 | 340500 | 135128 | 4 |
| 投与１０の前 | 119420 | 148408 | 5 | 74031 | 104609 | 2 |
| 投与１０の後 | 412000 | 149278 | 5 | 245500 | 161927 | 2 |
| 投与１２の前 | 68651 | 92902 | 5 | 74577 | 105251 | 2 |
| 投与１２の後（６か月後の剖検前） | 141833 | 173933 | 7 | 58986 | 99016 | 4 |

【表３１－３】

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 回復期中間 | 0 | 0 | 3 | 0 | NA | 1 |
| 回復後剖検 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| | | | | | | |
| 群５：１８．６ｍｇ | 雄 | | | 雌 | | |
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 投与２の前 | 289917 | 291188 | 7 | 201339 | 250774 | 8 |
| 投与２の後 | 734429 | 298352 | 7 | 920143 | 448409 | 7 |
| 投与４の前 | 150238 | 210302 | 7 | 169895 | 185675 | 6 |
| 投与４の後 | 984857 | 570039 | 7 | 965167 | 425924 | 6 |
| 投与６の前 | 265479 | 252067 | 7 | 288879 | 226889 | 6 |
| 投与６の後 | 758143 | 102009 | 7 | 1270000 | 558533 | 6 |
| 投与８の前 | 190529 | 240081 | 7 | 196021 | 199396 | 6 |
| 投与８の後 | 1003429 | 538271 | 7 | 989800 | 585072 | 5 |
| 投与１０の前 | 176297 | 272500 | 7 | 168864 | 191087 | 6 |
| 投与１０の後 | 1013000 | 390673 | 7 | 773400 | 103717 | 5 |
| 投与１２の前 | 142334 | 196793 | 5 | 430542 | 436534 | 6 |
| 投与１２の後（６か月後の剖検前） | 291525 | 350251 | 7 | 252142 | 381200 | 6 |
| 回復期中間 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 2 |
| 回復後剖検 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |

【０４４５】

【表３２－１】

表３２：血清中の抗ｒｈＡＳＡ抗体濃度のまとめ

| 群１：溶媒対照 | 雄 | | | 雌 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/Ml | | ng/mL | ng/mL | |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与４の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与６の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与８の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与１０の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与１２の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 回復期中間 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 回復後剖検 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| | | | | | | |
| 群２：０ｍｇ | 雄 | | | 雌 | | |
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与４の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与６の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 7 |
| 投与８の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 7 |
| 投与１０の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 7 |
| 投与１２の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 7 |
| 剖検（最後の投与の２４時間後） | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 回復期中間 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 回復後剖検 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| | | | | | | |
| 群３：１．８ｍｇ | 雄 | | | 雌 | | |
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | N |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与４の前 | 18409 | 21371 | 8 | 27648 | 37504 | 8 |
| 投与６の前 | 75913 | 64863 | 8 | 85625 | 79871 | 8 |
| 投与８の前 | 132163 | 95576 | 8 | 151900 | 97818 | 8 |
| 投与１０の前 | 392338 | 606626 | 8 | 290675 | 186213 | 8 |
| 投与１２の前 | 499438 | 735028 | 8 | 524438 | 569523 | 8 |
| 剖検（最後の投与の２４時間後） | 261625 | 157865 | 4 | 733550 | 928411 | 4 |
| 回復期中間 | 339250 | 265888 | 4 | 377175 | 218955 | 4 |
| 回復後剖検 | 712500 | 1107129 | 4 | 295525 | 174718 | 4 |
| | | | | | | |

【表３２－２】

| 群４：６．０ｍｇ | 雄 | | | 雌 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | N |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与４の前 | 30419 | 30561 | 8 | 64000 | 89510 | 8 |
| 投与６の前 | 143693 | 128094 | 8 | 191750 | 150511 | 8 |
| 投与８の前 | 325750 | 190651 | 8 | 305850 | 224707 | 8 |
| 投与１０の前 | 669125 | 515458 | 8 | 832188 | 846241 | 8 |
| 投与１２の前 | 946125 | 651530 | 8 | 1060775 | 1088889 | 8 |
| 剖検（最後の投与の２４時間後） | 713500 | 598812 | 4 | 1047568 | 1132048 | 4 |
| 回復期中間 | 1566000 | 708132 | 4 | 975500 | 1149734 | 4 |
| 回復後剖検 | 1113250 | 554510 | 4 | 793000 | 991450 | 4 |
| | | | | | | |
| 群５：１８．６ｍｇ | 雄 | | | 雌 | | |
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | N |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与４の前 | 56873 | 39107 | 8 | 39994 | 53411 | 8 |
| 投与６の前 | 311638 | 237796 | 8 | 193263 | 208952 | 8 |
| 投与８の前 | 482875 | 270130 | 8 | 399363 | 360425 | 8 |
| 投与１０の前 | 1006750 | 857916 | 8 | 866875 | 894776 | 8 |
| 投与１２の前 | 1419000 | 1382276 | 8 | 1341500 | 1373771 | 8 |
| 剖検（最後の投与の２４時間後） | 165000 | 147463 | 4 | 407300 | 268570 | 4 |
| 回復期中間 | 2884250 | 1363128 | 4 | 2101500 | 2090420 | 4 |
| 回復後剖検 | 2504250 | 1118042 | 4 | 1506000 | 1524682 | 4 |

【０４４６】

【表３３－１】

表３３：ＣＳＦ中の抗ｒｈＡＳＡ抗体濃度のまとめ

| 群１：溶媒対照 | 雄 | | | 雌 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 手術 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与４の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与６の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与８の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与１０の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 投与１２の前 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 4 |
| 回復期中間 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 4 |
| 回復後剖検 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| | | | | | | |
| 群２：０ｍｇ | 雄 | | | 雌 | | |
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 手術 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 6 |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 7 |
| 投与４の前 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 6 |
| 投与６の前 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| 投与８の前 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| 投与１０の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 5 |
| 投与１２の前 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 5 |
| 剖検（最後の投与の２４時間後） | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 2 |
| 回復期中間 | 0 | NA | 1 | 0 | 0 | 3 |
| 回復後剖検 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| | | | | | | |
| 群３：１．８ｍｇ | 雄 | | | 雌 | | |
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 手術 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 8 |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 6 |
| 投与４の前 | 0 | 0 | 6 | 41 | 101 | 6 |
| 投与６の前 | 685 | 1317 | 4 | 632 | 1413 | 5 |
| 投与８の前 | 2238 | 2596 | 4 | 2180 | 4875 | 5 |
| 投与１０の前 | 3393 | 5038 | 4 | 5560 | 12433 | 5 |
| 投与１２の前 | 6436 | 8266 | 4 | 12700 | 28398 | 5 |
| 剖検（最後の投与の２４時間後） | 14848 | 12401 | 4 | 21442 | 32382 | 4 |

【表３３－２】

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 回復期中間 | 29307 | 40617 | 3 | 18700 | 283 | 2 |
| 回復後剖検 | 21060 | 30010 | 3 | 13078 | 7181 | 4 |
| | | | | | | |
| 群４：６．０ｍｇ | 雄 | | | 雌 | | |
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 手術 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 8 |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 6 |
| 投与４の前 | 99 | 172 | 7 | 84 | 187 | 5 |
| 投与６の前 | 1117 | 1862 | 8 | 1473 | 2775 | 6 |
| 投与８の前 | 3987 | 5580 | 5 | 20824 | 27320 | 4 |
| 投与１０の前 | 6600 | 9679 | 5 | 2715 | 1237 | 2 |
| 投与１２の前 | 5285 | 7279 | 5 | 955 | 1237 | 2 |
| 剖検（最後の投与の２４時間後） | 16870 | 16350 | 4 | 63000 | 63000 | 3 |
| 回復期中間 | 66233 | 42238 | 3 | 16800 | NA | 1 |
| 回復後剖検 | 53600 | 14388 | 3 | 28880 | 29890 | 4 |
| | | | | | | |
| 群５：１８．６ｍｇ | 雄 | | | 雌 | | |
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 手術 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 6 |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 8 |
| 投与４の前 | 102 | 192 | 7 | 0 | 0 | 6 |
| 投与６の前 | 233 | 351 | 7 | 1506 | 3234 | 6 |
| 投与８の前 | 3378 | 5931 | 7 | 6367 | 9865 | 6 |
| 投与１０の前 | 16327 | 24035 | 7 | 19567 | 27542 | 6 |
| 投与１２の前 | 11596 | 16406 | 5 | 15143 | 24351 | 6 |
| 剖検（最後の投与の２４時間後） | 5168 | 7427 | 4 | 12135 | 10341 | 4 |
| 回復期中間 | 54700 | 26439 | 3 | 46315 | 62770 | 2 |
| 回復後剖検 | 50725 | 29217 | 4 | 37790 | 35967 | 4 |

【０４４７】

【表３４－１】

表３４：ｒｈＡＳＡの血清中およびＣＳＦ中濃度、雌雄の合計（ｎｇ／ｍＬ）

| 群１：溶媒対照 | 血清中rhASA (ng/mL) | | | CSF中rhASA (ng/mL) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 群全体 | | | 群全体 | | |
| 時点 | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与２の後 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与４の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与４の後 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与６の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与６の後 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与８の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与８の後 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与１０の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与１０の後 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 7 |
| 投与１２の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 7 |
| 投与１２の後 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 7 |
| 回復期中間 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 7 |
| 回復後剖検 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |

| 群２：０ｍｇ | 血清中rhASA (ng/mL) | | | CSF中rhASA (ng/mL) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 群全体 | | | 群全体 | | |
| 時点 | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 16 | 0 | 0 | 13 |
| 投与２の後 | 0 | 0 | 16 | 0 | 0 | 12 |
| 投与４の前 | 0 | 0 | 16 | 0 | 0 | 11 |
| 投与４の後 | 0 | 0 | 16 | 0 | 0 | 10 |
| 投与６の前 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 10 |
| 投与６の後 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 10 |
| 投与８の前 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 10 |
| 投与８の後 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 10 |
| 投与１０の前 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 9 |
| 投与１０の後 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 9 |
| 投与１２の前 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 9 |
| 投与１２の後（６か月後の剖検前） | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 10 |
| 回復期中間 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 5 |
| 回復後剖検 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |

【表３４－２】

| 群３：１．８ｍｇ | 血清中rhASA (ng/mL) | | | CSF中rhASA (ng/mL) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 群全体 | | | 群全体 | | |
| 時点 | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 16 | 42365 | 51844 | 13 |
| 投与２の後 | 44.7 | 37.3 | 16 | 109654 | 45639 | 13 |
| 投与４の前 | 0 | 0 | 16 | 34247 | 36982 | 12 |
| 投与４の後 | 0 | 0 | 16 | 122592 | 47311 | 12 |
| 投与６の前 | 0 | 0 | 16 | 43250 | 40831 | 10 |
| 投与６の後 | 0 | 0 | 16 | 100167 | 27992 | 9 |
| 投与８の前 | 0 | 0 | 16 | 43736 | 40298 | 9 |
| 投与８の後 | 0 | 0 | 16 | 132333 | 53926 | 9 |
| 投与１０の前 | 0 | 0 | 16 | 28401 | 28890 | 9 |
| 投与１０の後 | 0 | 0 | 16 | 98433 | 37220 | 9 |
| 投与１２の前 | 0 | 0 | 16 | 59209 | 58253 | 9 |
| 投与１２の後（６か月後の剖検前） | 0 | 0 | 16 | 39092 | 42786 | 13 |
| 回復期中間 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 5 |
| 回復後剖検 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |

| 群４：６．０ｍｇ | 血清中rhASA (ng/mL) | | | CSF中rhASA (ng/mL) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 群全体 | | | 群全体 | | |
| 時点 | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 16 | 105964 | 157408 | 14 |
| 投与２の後 | 158.4 | 78.7 | 16 | 320429 | 153832 | 14 |
| 投与４の前 | 0 | 0 | 16 | 56226 | 72638 | 13 |
| 投与４の後 | 40.6 | 91.7 | 16 | 341936 | 203284 | 14 |
| 投与６の前 | 0 | 0 | 16 | 86139 | 113563 | 14 |
| 投与６の後 | 0 | 0 | 16 | 393800 | 206033 | 10 |
| 投与８の前 | 0 | 0 | 16 | 42009 | 65286 | 9 |
| 投与８の後 | 0 | 0 | 16 | 334333 | 169995 | 9 |
| 投与１０の前 | 0 | 0 | 16 | 106452 | 130375 | 7 |
| 投与１０の後 | 0 | 0 | 16 | 364429 | 160707 | 7 |
| 投与１２の前 | 0 | 0 | 16 | 70344 | 87227 | 7 |
| 投与１２の後（６か月後の剖検前） | 0 | 0 | 16 | 111707 | 151129 | 11 |
| 回復期中間 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 4 |
| 回復後剖検 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |

【表３４－３】

| 群５：１８．６ｍｇ | 血清中rhASA (ng/mL) | | | CSF中rhASA (ng/mL) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 群全体 | | | 群全体 | | |
| 時点 | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 16 | 242676 | 264338 | 15 |
| 投与２の後 | 455.1 | 257.8 | 16 | 827286 | 378379 | 14 |
| 投与４の前 | 0 | 0 | 16 | 159311 | 191264 | 13 |
| 投与４の後 | 138.8 | 213.7 | 16 | 975769 | 488021 | 13 |
| 投与６の前 | 0 | 0 | 16 | 276279 | 231010 | 13 |
| 投与６の後 | 54.5 | 93.8 | 16 | 994385 | 453568 | 13 |
| 投与８の前 | 0 | 0 | 16 | 193064 | 213058 | 13 |
| 投与８の後 | 27.0 | 67.1 | 16 | 997750 | 531567 | 12 |
| 投与１０の前 | 0 | 0 | 16 | 172866 | 228817 | 13 |
| 投与１０の後 | 3.2 | 13 | 16 | 913167 | 319975 | 12 |
| 投与１２の前 | 0 | 0 | 16 | 299538 | 365275 | 11 |
| 投与１２の後（６か月後の剖検前） | 0 | 0 | 16 | 273348 | 349718 | 13 |
| 回復期中間 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 5 |
| 回復後剖検 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |

【０４４８】

【表３５－１】

表３５：血清中およびＣＳＦ中の抗ｒｈＡＳＡ抗体、雌雄の合計（ｎｇ／ｍＬ）

| 群１：溶媒対照 | 血清中の抗rhASA抗体 (ng/mL) | | | CSF中の抗rhASA抗体 (ng/mL) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 群全体 | | | 群全体 | | |
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 手術 | | | | 0 | 0 | 8 |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与４の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与６の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与８の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与１０の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 投与１２の前 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 7 |
| 回復期中間 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 7 |
| 回復後剖検 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |

| 群２：０ｍｇ | 血清中の抗rhASA抗体 (ng/mL) | | | CSF中の抗rhASA抗体 (ng/mL) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 群全体 | | | 群全体 | | |
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 手術 | | | | 0 | 0 | 13 |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 16 | 0 | 0 | 13 |
| 投与４の前 | 0 | 0 | 16 | 0 | 0 | 11 |
| 投与６の前 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 10 |
| 投与８の前 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 10 |
| 投与１０の前 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 9 |
| 投与１２の前 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 9 |
| 剖検（最後の投与の２４時間後） | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 5 |
| 回復期中間 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 4 |
| 回復後剖検 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |

| 群３：１．８ｍｇ | 血清中の抗rhASA抗体 (ng/mL) | | | CSF中の抗rhASA抗体 (ng/mL) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 群全体 | | | 群全体 | | |
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 手術 | | | | 0 | 0 | 15 |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 16 | 0 | 0 | 13 |
| 投与４の前 | 23028 | 29871 | 16 | 21 | 72 | 12 |
| 投与６の前 | 80769 | 70467 | 16 | 656 | 1284 | 9 |

【表３５－２】

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 投与８の前 | 142031 | 93979 | 16 | 2206 | 3796 | 9 |
| 投与１０の前 | 341506 | 436656 | 16 | 4597 | 9386 | 9 |
| 投与１２の前 | 511938 | 635340 | 16 | 9916 | 20970 | 9 |
| 剖検（最後の投与の２４時間後） | 497588 | 666122 | 8 | 18145 | 22972 | 8 |
| 回復期中間 | 358213 | 226397 | 8 | 25064 | 29302 | 5 |
| 回復後剖検 | 504013 | 766860 | 8 | 16499 | 18552 | 7 |
| | | | | | | |
| 群４：６．０ｍｇ | 血清中の抗rhASA抗体 (ng/mL) | | | CSF中の抗rhASA抗体 (ng/mL) | | |
| | 群全体 | | | 群全体 | | |
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 手術 | | | | 0 | 0 | 15 |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 16 | 0 | 0 | 13 |
| 投与４の前 | 47209 | 66899 | 16 | 93 | 170 | 12 |
| 投与６の前 | 167721 | 137276 | 16 | 1269 | 2205 | 14 |
| 投与８の前 | 315800 | 201572 | 16 | 11470 | 19344 | 9 |
| 投与１０の前 | 750656 | 682110 | 16 | 5490 | 8143 | 7 |
| 投与１２の前 | 1003450 | 868860 | 16 | 4048 | 6328 | 7 |
| 剖検（最後の投与の２４時間後） | 880534 | 857199 | 8 | 36640 | 45439 | 7 |
| 回復期中間 | 1270750 | 938646 | 8 | 53875 | 42430 | 4 |
| 回復後剖検 | 953125 | 763122 | 8 | 39474 | 26274 | 7 |
| | | | | | | |
| 群５：１８．６ｍｇ | 血清中の抗rhASA抗体 (ng/mL) | | | CSF中の抗rhASA抗体 (ng/mL) | | |
| | 群全体 | | | 群全体 | | |
| | 平均 | SD | n | 平均 | SD | n |
| 時点 | ng/mL | ng/mL | | ng/mL | ng/mL | |
| 手術 | | | | 0 | 0 | 13 |
| 投与２の前 | 0 | 0 | 16 | 0 | 0 | 15 |
| 投与４の前 | 48433 | 46054 | 16 | 55 | 146 | 13 |
| 投与６の前 | 252450 | 224723 | 16 | 821 | 2204 | 13 |
| 投与８の前 | 441119 | 310702 | 16 | 4757 | 7781 | 13 |
| 投与１０の前 | 936813 | 849893 | 16 | 17822 | 24652 | 13 |
| 投与１２の前 | 1380250 | 1331905 | 16 | 13531 | 20189 | 11 |
| 剖検（最後の投与の２４時間後） | 286150 | 238760 | 8 | 8652 | 9129 | 8 |
| 回復期中間 | 2492875 | 1686472 | 8 | 51346 | 36819 | 5 |
| 回復後剖検 | 2005125 | 1347857 | 8 | 44258 | 31114 | 8 |

【０４４９】

【表３６】

表３６：剖検時の抗ｒｈＡＳＡ抗体の出現率

| 群 | 血清中抗体が陽性の個体（陽性/試験総数） | | | | CSF中抗体が陽性の個体（陽性/試験総数） | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M | | F | | M | | F | |
| | 6か月後の剖検 | 回復後剖検 | 6か月後の剖検 | 回復後剖検 | 6か月後の剖検 | 回復後剖検 | 6か月後の剖検 | 回復後剖検 |
| 1(DC) | NA | 0/4 | NA | 0/4 | NA | 0/4 | NA | 0/4 |
| 2(溶媒) | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/3 | 0/4 | 0/2 | 0/4 |
| 3(1.8mg IT) | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 3/3 | 3/4 | 4/4 |
| 4(6.0mg IT) | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 3/3 | 2/3 | 4/4 |
| 5(18.6mg IT) | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 3/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 |

【０４５０】

カニクイザル血清中のｒｈＡＳＡの定量下限は３９．１ｎｇ／ｍＬであり、群１および２の血清試料はすべて定量下限未満（ＢＱＬ）であった（表３０を参照）。投与２、４、６、８、１０および１２の前およびの２４時間後（６か月後の剖検）、回復期間の途中、ならびに回復後剖検前にｒｈＡＳＡの血清中レベルを試験した。群３（１．８ｍｇ／投与）、群４（６．０ｍｇ／投与）および群５（１８．６ｍｇ／投与）では、投与２、４、６、８、１０および１２の前、投与１２の後、回復期間の途中、ならびに回復後剖検前のｒｈＡＳＡレベルは検出不可能であった。投与２の後では、血清中ｒｈＡＳＡのレベルは用量依存的であった。投与４（群３）、投与６（群３および４）および投与８および１０（群３および４、ならびに群５の雄）の後では、ｒｈＡＳＡレベルは検出不可能であった。ｒｈＡＳＡの血清中レベルは、群４（６．０ｍｇ／投与）では投与４の後に、群５（１８．６ｍｇ／投与）では、雄で投与４および６の後、雌で投与４、６、８および１０の後に減少した。この血清中ｒｈＡＳＡレベルの明らかな減少は、抗ｒｈＡＳＡ抗体濃度の増加に関連している可能性がある。本試験における試料のばらつきおよび少ない群数を考えれば、ｒｈＡＳＡの血清中レベルでの雌雄間の明らかな差はなかった。

【０４５１】

カニクイザルＣＳＦ中のｒｈＡＳＡの定量下限は１９．５ｎｇ／ｍＬであり、群１および２のＣＳＦ試料はすべてＢＱＬであった（表３１参照）。全投与群において、投与２、４、６、８、１０および１２（６か月後の剖検）の前および後に、ＣＳＦ中のｒｈＡＳＡが検出可能であった。そのレベルは投与後（投与の約２４時間後）の方が高く、用量依存的であった。ＣＳＦ中のレベルは血清中のレベルよりも大幅に高かった。本試験における試料のばらつきおよび少ない群数を考えれば、ｒｈＡＳＡのＣＳＦ中レベルでの雌雄間の明らかな差はなかった。全投与群において、回復期間の途中および回復後剖検前にｒｈＡＳＡは検出されなかった。ｒｈＡＳＡ処置群の投与１２（剖検）で採取されたＣＳＦ中のレベルは、投与８および１１の後のレベルよりも低かった。剖検時の方がｒｈＡＳＡレベルが低い理由としては、剖検時に採取した量（細胞計数、化学、ｒｈＡＳＡおよび抗ＲＨＡＳＡ抗体用に合計約２．２５ｍＬ）の方が、生存中の投与間に採取した量（ｒｈＡＳＡ濃度用に投与前または投与後に０．５ｍＬ以下）よりも多かったということが考えられる。さらに、一部の個体は剖検時にカテーテルが塞がっていたため、カテーテルではなくＣＭ穿刺により採取した。この経路は、カテーテルを介した試料採取に比べて、ｒｈＡＳＡ濃度が常に低い。これはＣＳＦの体軸方向の総体流が制限されていることによるものと思われ、このような現象は、サルおよびヒトのような体が垂直方向に伸びている動物で生じ

ることが認められている（例えば、ＣＳＦの成分が個体の生涯を通して顕著な体軸方向の勾配を示すことがよく知られている）。

【０４５２】

いくつかの時点では、ＲＨＡＳＡで処置した全個体において血清中に抗ｒｈＡＳＡ抗体が検出された（表３２を参照）。抗ｒｈＡＳＡ抗体のレベルが定量下限（７８．１ｎｇ／ｍＬ）を上回っていれば、その個体を抗ｒｈＡＳＡ抗体に関して陽性であると定めた。一度血清転換した個体は、抗ｒｈＡＳＡ抗体に関して陽性のままであった。投与２の前の時点では、抗ｒｈＡＳＡ抗体に関して陽性の個体は見られなかった。投与４の前の時点では、番号０２６の雄（群４；６．０ｍｇ／投与）を除く全ｒｈＡＳＡ個体が血清中抗ｒｈＡＳＡ抗体に関して陽性であった。番号０２６の雄は、投与６の前の時点で血清中抗体に関して陽性であった。群５（１８．６ｍｇ／ｋｇ）では、剖検抗体試料の抗体レベルが低くなっていた。この明らかな減少は、アッセイに干渉するｒｈＡＳＡの存在によるものであろう。力価は全般的に、低用量個体（１．８ｍｇ／投与）よりも中用量および高用量群（６．０および１８．６ｍｇ／投与）の方が高かった。抗ｒｈＡＳＡ抗体の存在は、組換えヒトタンパク質でカニクイザルを処置することから得られる予測された結果である。結果のばらつきを考えれば、雌雄間の明らかな差はなかった。

【０４５３】

ＣＳＦ中の抗ｒｈＡＳＡ抗体が検出可能な個体では、番号０４９（群３；１．８ｍｇ／投与）および番号０５７（群４；６．０ｍｇ／投与）の雌を除き、すべてが血清中のｒｈＡＳＡ抗体も検出可能であった。抗体の濃度および出現率にばらつきがあるため、用量反応を決定することができない。抗ｒｈＡＳＡ抗体のレベルが定量下限（７８．１ｎｇ／ｍＬ）を上回った個体を、抗ＲＨＡＳＡ抗体に関して陽性であると定める。

【０４５４】

血清中およびＣＳＦ中ＲＨＡＳＡレベルならびに抗ＲＨＡＳＡ抗体に関する雌雄の合計数値を表３４および表３５に示す。上述のように、雌雄を合わせた結果は雌雄別々の結果と同様であった。

【０４５５】

実施例１７．有効性

本実施例では、１１匹の野生型対照（ｍＡＳＡ＋／＋ｈＡＳＡ－／－）マウスを群Ａに割り付け、これらには処置を行わなかった。３４匹のｈＡＳＡＣ６９Ｓ／ＡＳＡ－／－マウスを５つの各用量群に割り付け、これらには１、９、１５／１６および２２日目に溶媒（群Ｂ）または２０ｍｇ／ｋｇ（静脈内［ＩＶ］；群Ｃ）もしくは０．０４、０．１２および０．２１ｍｇ（それぞれ群Ｄ、ＥおよびＦ）の用量のｒｈＡＳＡを投与した。ＩＶ投与はすべて尾静脈から行った。髄腔内（ＩＴ）投与はすべて、約２μＬ／２０秒の範囲で１２μＬの量の注入として行った（表３７）。

【０４５６】

【表３７】

**表３７：試験計画**

| 群 | 個体数 | マウスの種類 | 処置 | 用量 | 経路 | 注射の総回数 | 屠殺 | mg/脳重量kgでの用量[a] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 11 | 野生型対照(mASA+/+hASA-/-) | なし | NA | NA | NA | NA | NA |
| B | 9 | hASAC69S/ASA-/- | 溶媒対照 | 溶媒 | IT腰椎 | 4(1、9、15/16[b]および22日目) | 4回目の投与の24時間後 | 0 |
| C | 5 | | rhASA | 20mg/kg | IV(尾静脈) | | | NA |
| D | 5 | | rhASA | 0.04mg | IT腰椎 | | | 100 |
| E | 5 | | rhASA | 0.12mg | IT腰椎 | | | 300 |
| F | 10 | | rhASA | 0.21mg | IT腰椎 | | | 520 |

ＮＡ＝該当なし；ＩＴ＝髄腔内；ＩＶ＝静脈内。

[a]マウスの脳重量は約０．０００４ｋｇである。

[b]群Ｃ、ＤおよびＥでは１５日目に投与し、群ＢおよびＥでは１６日目に投与した。

【０４５７】

ＡＳＡノックアウトマウスｈＡＳＡＣ６９Ｓ／ＡＳＡ（－／－）はＭＬＤのモデルとして認められており、この疾患に対して可能性のある治療法を試験するために用いられてきた。髄腔内経路はヒトでの投与経路を意図したものである。静脈内投与経路は、この化合物および同様の化合物に関して、ＭＬＤマウスで試験されている。末梢器官で予想される組織学的変化の陽性対照として、静脈内対照群を加えた。１００、３００または５２０ｍｇ／脳重量ｋｇ（それぞれ０．０４、０．１２、０．２１ｍｇ）のｒｈＡＳＡをマウスに投与した。本試験のために選択した、脳重量に対して正規化した用量レベルは、ヒトでの使用が計画されている用量、または毒性学試験もしくは以前のリソソーム蓄積症の有効性モデルで使用された用量に相当する。これらの用量は全く毒性を有さないと予想された。

【０４５８】

受取り

種　　マウス（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ）

系統　ｈＡＳＡＣ６９Ｓ／ＡＳＡ（－／－）マウスおよび野生型対照

齢数　到着時で約１４～１７か月齢

群数　６

個体数　ＡＳＡノックアウトマウス３４匹＋野生型対照１１匹

到着後、健康状態を評価するために各個体を検査した。

飼育

マウスを、ＣａｒｅＦｒｅｓｈ紙床敷と給水ボトルとを備えた高温ポリカーボネート製のフィルタートップケージで集団飼育した。各ゲージを、計画、群番号および個体番号、ならびに雌雄を明記したケージカードでわかりやすく標識した。耳パンチ方式を用いて、各個体を１個体ずつ区別した。

個体の室内環境および光周期の目標条件は以下の通りであった：

温度　２２℃±３℃

湿度　５０％±２０％

光周期　１２時間の明期と１２時間の暗期

【０４５９】
使用可能な野生型個体（１１匹）をすべて群Ａに割り付け、３５～４５の番号を付した。順化期間中に、ケージから取り出して、体重を量り、耳パンチを行う際に、ＡＳＡ（－／－）ｈＡＳＡ（＋／－）個体に連続する番号（１～３４）を割り付けた。次いで、２０１１年1月3日にＲｅｓｅａｒｃｈ　Ｒａｎｄｏｍｉｚｅｒ（ｗｗｗ．ｒａｎｄｏｍｉｚｅｒ．ｏｒｇ）を用いて、マウスを治療群に割り付けた。最初の９つの番号を群Ｂに、次の５つの番号を群Ｃに、その次の５つの番号を群Ｄに、その次の５つの番号を群Ｅに、最後の１０個の番号を群Ｆに割り付けた。個体は以下のように割り付けられた：
【表３８】
**表３８：個体の割付け**

| 群 | N | 個体番号 |
|---|---|---|
| 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]個体番号１９は投与時に見つからなかった。
[b]個体番号３は投与開始前に死亡した。

被検試料および溶媒
被検試料
アイデンティティ　ｒｈＡＳＡ
種類　ヒト組換えアリールスルファターゼＡ（ＡＲＳＡ）
保管条件　約４℃

溶媒
アイデンティティ　ｒｈＡＳＡ溶媒（１５４ｍＭ　ＮａＣｌ、０．００５％ポリソルベート２０、ｐＨ約６．０）
保管条件　約４℃
【０４６０】
溶媒の調製
溶媒を記載の通りに使用した。溶媒を卓上で温めた（周囲温度）。溶媒が温まってから、緩やかに回転および反転させて物質を混合した。ボトルをボルテックスしたり振盪させたりしなかった。物質を利用する前にボトルを乾燥させた。残った溶媒は冷蔵庫に戻した（１℃～８℃）。
【０４６１】
投与製剤の調製
ｒｈＡＳＡを溶媒で希釈して必要な濃度にした。被検試料を卓上で温めた（周囲温度）。被検試料が温まってから、緩やかに回転および反転させて物質を混合した。ボトルをボルテックスしたり振盪させたりしなかった。
【０４６２】
注射剤を追跡するための色素：
赤外色素（例えばＩＲＤｙｅ（登録商標）、ＬＩ－ＣＯＲ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｌｉｎｃｏｌｎ、ＮＥなど）を注射剤の追跡に用いた。このような色素は、髄腔内投与後の残存分析法として髄腔内注射剤で用いられてきた。投与前に色素を被検試料混合した。すなわち、１μＬの１ｎｍｏｌ色素を被検試料に加えた。赤外色素のほかに、１μＬのＦＤ＆Ｃ　ｂｌｕｅＮｏ．１（０．２５％）を注射剤の追跡に用いた。この青色の色素は一

般的な食品添加物であり、一般に安全で無毒であると考えられている。

【０４６３】

ｒｈＡＳＡまたは溶媒の腰仙部ＩＴ注射

１、９、１５または１６日目と２２日目に、群Ｂ、Ｄ、ＥおよびＦの個体に髄腔内注射を行った。

【０４６４】

１．２５％の２，２，２－トリブロモエタノール（Ａｖｅｒｔｉｎ）を体重１０ｇ当たり２００～３００μＬ（２５０～３５０ｍｇ／ｋｇ）で腹腔内注射により使用して、成体マウスを麻酔した。クリッパーを用いて尾の基部から肩甲骨までの背中の体毛を除去した。剃毛した部分を、ｐｏｖｉｄｉｎｅ／ｂｅｔａｄｉｎｅ洗浄、次いでイソプロピルアルコールにより消毒した。腰仙部脊椎の上で小さな正中皮膚切開（１～２ｃｍ）を行い、背側正中線と回腸の頭側の翼との交点を確認した。腸骨窩の筋肉（中殿筋）はハート型の筋肉である。この「ハート」の上部両側がほぼ回腸の翼の位置にある。気密性の１０～２０μＬガラス製Ｈａｍｉｌｔｏｎシリンジに装着した３２ゲージの針を、下にある骨の抵抗を感じるまで挿入した。被検試料１０μＬ、赤外色素１μＬおよび１μＬのＦＤ＆Ｃ　ｂｌｕｅ　Ｎｏ．１（合計注射量１２μＬ）を、約２μＬ／２０秒（１２μＬ／２分）の速度で注射した。創傷クリップを用いて皮膚切開を閉じた。注射が成功したか否かの判断を、赤外色素および可視性の青色色素がＣＮＳ全体に分布したか否かを画像で判定することにより行った。画像化の後、回復用チャンバーでマウスを回復させた。

【０４６５】

ｒｈＡＳＡの静脈内注射

１、９、１５および２２日目に、群Ｃの個体に静脈内注射を行った。

【０４６６】

ＩＶ注射のために、マウスを必要に応じてイソフルランを用いて麻酔し、保定器に入れた。尾を指で軽くはじいて温めることにより、尾静脈を拡大させた。次いで、注射部位を７０％エタノールでぬぐった。あるいは、マウスを暖かいチャンバー（４０℃）に１～１．５分間置いた。２８～３０ゲージの針を用いて被検物質を注射した。注射量は５～１０ｍＬ／ｋｇであった。

【０４６７】

４回目の投与の約２４時間後に群Ｂ～Ｆの個体を安楽死させた。これらの個体を以下に詳述するような様々な組織採取法に供した。群Ａには処置を施さなかったが、２０１１年１月の２７日または２８日に安楽死させ、以下に詳述するような組織採取法に供した。

【０４６８】

血清（全個体）

イソフルラン麻酔下、全個体（Ａ～）から後眼窩穿孔により終了時の血液試料（約０．５ｍＬ）を採取した。ガラス製チューブを眼窩に当て、眼球の下部に静かに差し込んで、眼球後部にある静脈排出路を破壊した。血液を毛管作用および／または自然流下により採取した。血液採取後に、眼窩を圧迫して止血した。

【０４６９】

全血試料を血清になるまで処理し、－８０℃未満で凍結させた。血清を－８０℃で保管し、抗体に関して解析した。

【０４７０】

光学顕微鏡検査用の組織（群Ａ～Ｆ；１群当たりマウス５匹）

血液採取後に、$CO_2$窒息によりマウスを安楽死させた。灌流前に尾部小片を採取し、可能性のある遺伝子型同定のために保管した。心膜腔を露出させた。１群当たり３匹のマウスを、ヘパリン処理した氷冷生理食塩水溶液（０．９％ＮａＣｌ中１Ｕ／ｍＬのナトリウムヘパリン、滅菌ろ過済み）、次いで約４℃の４％パラホルムアルデヒドで経心的に灌流した。脳を取り出し、腹部を切開して内臓をさらに露出させた。凍結させた尾部小片を除く、脳および死体をパラホルムアルデヒドに漬けた。

【０４７１】

脂質分析用の組織（群Ａ、ＢおよびＦ；それぞれ６、４および５個体）
血液採取後に、$CO_2$窒息により個体を安楽死させた。灌流前に尾部小片を採取し、可能性のある遺伝子型同定のために保管した。心膜腔を露出させた。脂質分析用に、１群当たり４～６匹のマウスを、ヘパリン処理した氷冷生理食塩水溶液（０．９％ＮａＣｌ中１Ｕ／ｍＬのナトリウムヘパリン、滅菌ろ過済み）で経心的に灌流した。
【０４７２】
【表３９】

表３９：脂質分析用に採取した組織

| 脂質分析用に採取した組織 | |
|---|---|
| 脳（左半球と右半球に分割し、重量を量った） | 腎臓（２） |
| 脊髄（脊柱から摘出） | |
| 坐骨神経（２）（筋肉から剥離） | 尾部小片（灌流前） |

採取時に、重量を量ってから組織をドライアイス上で、または－８０℃の冷凍庫に入れて凍結させた。脳を左半球と右半球に分割した。右半球をＭＳによる脂質分析に用いる。左半球を可能性のあるＮ－アセチル－Ｌ－アスパラギン酸分析用に分析する。分析まで組織を－８０℃で保管した。
【０４７３】
【表４０】

表４０：試料保管条件

| 試料の種類 | 保管温度 |
|---|---|
| 血清 | 約－８０℃で凍結 |
| 脂質分析用の組織 | 約－８０℃で凍結 |
| 尾部小片 | 約－８０℃で凍結 |
| 光学顕微鏡用の組織 | 約４℃ |

【０４７４】
ｒｈＡＳＡにより、ＭＬＤマウスの脊髄、特に白質におけるスルファチドの蓄積が減少した（図１１４）。ｒｈＡＳＡ投与後にアルシアンブルー染色剤の光学濃度が統計的に有意に減少することが、脊髄の形態計測解析により示された（図１１５）。ｒｈＡＳＡ処置したＭＬＤマウスも脳におけるリソソーム活性の減少を示した（図１１６）。この減少は、溶媒処置個体と比べて、高用量群（０．２１ｍｇ～５２０ｍｇ／脳重量ｋｇ）において統計的に有意であった（図１１７）
【０４７５】
１歳を超えた免疫耐性のＭＬＤマウス（ｈＡＳＡＣ６９Ｓ／ＡＳＡ（－／－））に毎週１回で４週間、ｒｈＡＳＡの髄腔内腰椎投与を行った（合計４回の投与）。用量は、溶媒（１５４ｍＭ　ＮａＣｌ、０．００５％ポリソルベート２０、ｐＨ約６．０）、０．０４、０．１２、０．２１ｍｇ／投与（正規化された用量はそれぞれ１００、３００および５２０ｍｇ／脳重量ｋｇ）であった。終了時点で、脳および脊髄内でのスルファチドクリアランスおよびリソソーム活性の免疫組織化学的評価により有効性を評価した。組織中のスルファチドを標的としたアルシアンブルー染色を用いて、脊髄および脳切片を染色した。また脳切片を、リソソームプロセスの指標であるリソソーム膜タンパク質（ＬＡＭＰ）の有無に関しても染色した。さらに、アルシアンブルーおよびＬＡＭＰで染色した脊髄（頸部、胸部および腰部）および脳切片の形態計測解析を行った。
【０４７６】
これらの予備結果は、ｒｈＡＳＡの髄腔内腰椎投与の有効性を示している。溶媒対照マ

ウスに比べて、ｒｈＡＳＡ処置ＭＬＤマウスは、脳内のスルファチド蓄積（アルシアンブルー染色により認められる）およびリソソーム活性の減少ような、疾患の組織学的マーカーにおける向上の証拠を示している。これらの組織病理学的変化は、末梢脊髄の投与部位付近（脊髄の腰部領域）だけでなく、脳の末梢部でも観察された。

【０４７７】

実施例１８．生体内分布２

概略

本試験では、３６匹の雄および３６匹の雌の幼若体カニクイザル（開始時に１２か月齢未満）を５つの各用量群に割り付け、０（装置対照；０．６ｍＬのＰＢＳを投与）、０（溶媒対照）、１．８、６．０または１８．６ｍｇ（それぞれ群１、２、３、４および５）の用量のｒｈＡＳＡを、隔週で６か月間、合計１２回投与した。全投与を０．６ｍＬの量の注入で行い、次いで、約１０分間の０．５ｍＬ　ＰＢＳによる洗い流しを行った（表４１）。

【０４７８】

【表４１】

表４１：試験計画

| 試験計画 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 群 | 個体数 | 名目上の投与濃度(mg/mL) | 投与量(mg) | ６か月後に屠殺した個体数 | １か月間の回復後に屠殺した個体数 |
| 1 | 4M, 4F | DC | 0 | - | 4M, 4F |
| 2 | 8M, 8F | 0 | 0 | 4 M, 3 F[a] | 4M, 4F |
| 3 | 8M, 8F | 3 | 1.8 | 4 M, 4 F | 4M, 4F |
| 4 | 8M, 8F | 10 | 6.0 | 4 M, 4 F | 4M, 4F |
| 5 | 8M, 8F | 31 | 18.6 | 4 M, 4 F | 4M, 4F |

ＤＣ＝装置対照；群１の個体には溶媒も被検試料も投与しなかった。

[a]溶媒対照の個体番号０４４はカテーテル漏れのため、早期に５０日目で屠殺した。

【０４７９】

材料および方法

組織採取

脳を脳マトリックスで約３ｍｍの冠状スライス厚に切った。各脳を以下のものを含む完全な冠状スライスに薄切した：新皮質（前頭皮質、頭頂皮質、側頭皮質および後頭皮質を含む）、古皮質（嗅球および／または梨状葉）、大脳基底核（尾状核および被殻を含む）、辺縁系（海馬および帯状回を含む）、視床／視床下部、中脳領域（黒質を含む）、小脳、脳橋および延髄。各組織試料が（４ｍｍの生検パンチにより）得られた位置を図１３３～１３８に示す。図１３３～１３８の画像は、ウィスコンシン大学およびミシガン州Ｃｏｍｐａｒａｔｉｖｅ　Ｍａｍｍａｌｉａｎ　Ｂｒａｉｎ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎｓ（および国立健康医学博物館）のものである。パンチ番号２２は、この構造が剖検時に存在しなかったため採取されなかった。すべての脳試料を、酵素結合免疫吸着測定を用いたｒｈＡＳＡの解析まで－６０℃以下で凍結させ保管した。

【０４８０】

最初のスライスと、そこから１枚おきのスライスを、組織病理学的評価および免疫組織化学的解析用にホルマリン中で固定した。２枚目の脳スライスと、そこから１枚おきのスライスを、被検試料濃度の分析用に凍結させた。凍結前に、生体内分布解析用に、偶数番号を付した被検試料解析用の脳スライスの右側部分から脳試料を採取した。脳試料の位置を剖検時に写真撮影し、脳スライス番号を記録した。採取される白質の量が最適になるように、４ｍｍの円形パンチを用いて、または解剖用メスで切り取って試料を採取した。すべてのパンチを被検試料解析用に－６０℃以下で凍結させ保管した。残りの脳スライスを、可能性のある被検試料解析用に－６０℃以下で凍結させ保管した。

【０４８１】
脊髄（頸部、胸部および腰部）を１センチメートルの切片に切った。次いで、最初のスライスと、そこから１枚おきのスライスを、組織病理学的評価および免疫組織化学的解析用にホルマリン中で固定した。次いで、２枚目の脊髄スライスと、そこから１枚おきのスライスを、被検試料濃度の分析用に－６０℃以下で凍結させ保管した。髄腔内カテーテルの先端部を含むスライス（スライス０）がホルマリンで固定され、組織病理に関して解析されるように、スライスの配分を調節した。
【０４８２】
脳、肝臓および脊髄抽出物の調製ならびにｒｈＡＳＡ濃度の決定
米国食品医薬品局（ＦＤＡ）医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準（ＧＬＰ）の規則２１ＣＦＲ、Ｐａｒｔ５８および適用されるＭｉｄｗｅｓｔ　ＢｉｏＲｅｓｅａｒｃｈ社の標準操作手順書を遵守した有効な方法を用いて、脳パンチ、脊髄および肝臓の試料を解析した。組織試料を溶解緩衝液中でホモジナイズし、遠心分離により組織残骸を除去し、アッセイまで－８０℃で保管した。捕捉抗体としてポリクローナルウサギ抗体ＳＨ０４０および検出抗体としてＨＲＰ（西洋ワサビペルオキシダーゼ）コンジュゲート抗ＡＳＡモノクローナル抗体１９－１６－３を用いたＥＬＩＳＡにより、ホモジネートの可溶性画分中のｒｈＡＳＡ濃度を決定した。未結合物質を除去する洗浄段階の後、テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）基質溶液をＨＲＰコンジュゲート抗体の存在下で過酸化物と反応させて、最初の段階で抗ＡＳＡ抗体と結合したｒｈＡＳＡの量に比例する比色シグナルを発生させた。各組織ホモジネート中の得られたｒｈＡＳＡの量を、標準曲線から内挿した。
【０４８３】
また、試料をビシンコニン酸（ＢＣＡ）タンパク質決定アッセイでも解析し、試料中のタンパク質の濃度を得た。各試料のタンパク質濃度をアルブミン標準曲線の内挿により決定した。次いで、ｒｈＡＳＡ濃度の結果を、ビシンコニン酸アッセイにより決定された組織抽出物中の総タンパク質に対して正規化した。
【０４８４】
溶媒、１．８ｍｇ／投与、６．０ｍｇ／投与および１８．６ｍｇ／投与群の全パンチのｒｈＡＳＡレベルを、それぞれ図１１８、図１１９、図１２０および図１２１に示す。装置対照、溶媒、１．８ｍｇ／投与、６．０ｍｇ／投与および１８．６ｍｇ／投与群の回復個体の全パンチのｒｈＡＳＡレベルを、それぞれ図１２２、図１２３、図１２４、図１２５および図１２６に示す。
【０４８５】
脳の表面付近（髄膜）で採取した、選択したパンチのｒｈＡＳＡレベルを図１２７に示す。主に深部の脳白質を含むと考えられる、選択したパンチのｒｈＡＳＡレベルを図１２８に示す。白質は、有髄神経細胞突起（または軸索）の束で構成されている。主に深部の脳灰白質を含む、選択したパンチを図１２９に示す。白質とは対照的に、灰白質は神経細胞体を含む。表面、深部白質、深部灰白質の選択したパンチのｒｈＡＳＡの値を、各用量群について図１３０に示す。
【０４８６】
脊髄中濃度のデータを図１３１に示す。
【０４８７】
肝臓中濃度のデータを図１３２に示す。
【０４８８】
装置対照および溶媒投与対照群の肝臓、脊髄および脳中のｒｈＡＳＡ濃度のレベルは、場合によって測定可能であった。肝臓および脊髄中のレベルは、いずれのｒｈＡＳＡ処置群よりも低かった。装置対照および溶媒投与個体で測定されたｒｈＡＳＡレベルは、ＥＬＩＳＡで使用した抗ｒｈＡＳＡ抗体と天然のカニクイザルタンパク質との交差反応性を示している。抗体とカニクイザルＡＳＡとの間の交差反応性の程度が不明であるということ、およびアッセイ標準品でｒｈＡＳＡを使用しているということから、装置対照および溶

媒の組織で報告された値は組織中のカニクイザルｒｈＡＳＡの定量値を表すものではない。しかし、装置対照と溶媒投与の組織の間で検出されたｒｈＡＳＡレベルの相違は、異なる組織および解剖学的領域におけるカニクイザルｒｈＡＳＡの相対量のばらつきを示すものであると解釈され得る。

【０４８９】

脊髄スライス中のｒｈＡＳＡレベルは、１．８、６．０および１８．６ｍｇ／投与群においてそれぞれ、雄では１６０～２３５２、１０８１～６６０７および１８９３～９２５２ｎｇ／タンパク質ｍｇの範囲、雌では０～３１５１、６６９～６６３７および１４０４～１６４２４ｎｇ／タンパク質ｍｇの範囲であった（図１２７）。ｒｈＡＳＡレベルは、脊椎の頸部領域よりも腰部領域の方が高かった。肝臓で検出されたｒｈＡＳＡタンパク質レベルは、ｒｈＡＳＡ処置群では用量依存的であり、溶媒群では非常に低かった。平均ｒｈＡＳＡレベルは、１．８、６．０および１８．６ｍｇ／投与群においてそれぞれ、雄では８８、６７４および２４２４ｎｇ／タンパク質ｍｇ、雌では１４０、４６２および１９９６ｎｇ／タンパク質ｍｇであった（図１２８）。

【０４９０】

全体的に、ｒｈＡＳＡレベルは、ｒｈＡＳＡ投与群の脊髄スライスおよび肝臓から調製した試料では、用量依存的であるようであった。試験した多くの脳領域において、ｒｈＡＳＡレベルとｒｈＡＳＡ投与の間の明らかな用量相関が示されたが、他のものはこれほど明らかではなかった。一般に、脳のｒｈＡＳＡレベルはｒｈＡＳＡ用量とともに増加した。

【０４９１】

実施例１９：ＩＴ投与したｒｈＡＳＡとＩＶ投与したｒｈＡＳＡの薬物動態（ＰＫ）および生体内分布

本試験の目的は、カニクイザルへの髄腔内（ＩＴ）および静脈内（ＩＶ）投与後の各種の治療用補充酵素の薬物動態（ＰＫ）および生体内分布を評価することである。

【０４９２】

本試験では、第１ａ相（Ｉ２Ｓ投与）および第１ｂ相（ｒｈＡＳＡ投与）のために、髄腔内腰椎（ＩＴ－Ｌ）カテーテルを有する合計１２匹の雄および１２匹の雌カニクイザルを、体重により４つの処置群に無作為に割り付けた。

【０４９３】

両相では、投与後の特定の間隔で血液およびＣＳＦを（ＩＴ－ＣＭカテーテルから）採取した。第１ａ相の最後の試料を採取した後、第１ｂ相の開始前に７日間のウォッシュアウト期間を設けた。

【０４９４】

第１ｂ相の最後の試料を採取した後、第２相の開始までに７日間のウォッシュアウト期間を設ける。第１ｂ相の合計１２匹の雄および雌カニクイザルを、体重によりＩ２Ｓ（群１ａ～６ａ）およびｒｈＡＳＡ（群１ｂ～６ｂ）の１２の処置群に無作為に割り付けた。

【０４９５】

ＩＴ－Ｌ投与後の血清中でのｒｈＡＳＡの絶対バイオアベイラビリティは、約３０～４０％である。これに対し、ＩＶ投与の０．５％のみがＣＳＦ中で生物学的に利用可能であった。

【０４９６】

ＩＴ－Ｌ投与後、血清中でのｒｈＡＳＡへの曝露量は、比例するよりも多く増加する。

【０４９７】

ＩＴ－Ｌ投与後、ＣＳＦ中でのｒｈＡＳＡへの曝露量は、用量の増加に比例するよりも少ない増加であった。

【０４９８】

【表４２】

表４２．カニクイザル血清中のｒｈＡＳＡのＰＫパラメーターのまとめ

| 平均(CV%) | 血清中アリールスルファターゼＡ | | | |
|---|---|---|---|---|
| | アリールスルファターゼＡ (第1b相:IV 1mg/kg) | アリールスルファターゼＡ (第1b相:IT-L 1.8mg) | アリールスルファターゼＡ (第1b相:IT-L 6mg) | アリールスルファターゼＡ (第1b相:IT-L 18.6mg) |
| N | 8 | 6 | 8 | 8 |
| AUC0-t (ng･時/mL) | 10505 (16.9) | 2219 (41.9) | 10352 (31.9) | 17583 (28.2) |
| AUC0-∞(ng･時/mL) | 11069 (17.2) | NC (NC)b | 9634 (28.9)c | 20789 (27.8)d |
| Cmax (ng/mL) | 11911 (20.0) | 363 (40.4) | 1160 (29.9) | 1621 (25.1) |
| Tmaxa(時間) | 0.08 (0.08, 0.08) | 4.00 (2.00, 4.00) | 4.00 (1.00, 4.00) | 3.00 (1.00, 4.00) |
| t1/2(時間) | 6.55 (31.8) | NC (NC)b | 6.77 (21.4)c | 7.40 (32.8)d |
| CLまたはCL/F (mL/時) | 261 (17.0) | NC (NC)b | 654 (25.0)c | 944 (25.4)d |
| VzまたはVz/F (mL) | 2418 (32.4) | NC (NC)b | 6523 (41.3)c | 9686 (25.8)d |

【０４９９】

【表４３】

表４３．カニクイザルＣＳＦ中のｒｈＡＳＡのＰＫパラメーターのまとめ

| 平均(CV%) | CSF中アリールスルファターゼＡ | | | |
|---|---|---|---|---|
| | アリールスルファターゼＡ (第1b相:IV 1mg/kg) | アリールスルファターゼＡ (第1b相:IT-L 1.8mg) | アリールスルファターゼＡ (第1b相:IT-L 6mg) | アリールスルファターゼＡ (第1b相:IT-L 18.6mg) |
| N | 4 | 6 | 8 | 8 |
| AUC0-t(ng･時/mL) | 1629 (179.8) | 1267266 (86.6) | 5334329 (68.8) | 8028775 (71.2) |
| AUC0-∞(ng･時/mL) | 8221 (NC)b | 1595942 (79.1)c | 4291829 (84.2)d | 9406664 (64.5)e |
| Cmax (ng/mL) | 69.3 (94.2) | 345167 (48.7) | 1039079 (73.6) | 1841125 (62.8) |
| Tmaxa(時) | 6.00 (1.00, 8.00) | 0.08(0.08, 4.00) | 0.29 (0.08, 4.00) | 2.04 (0.08, 4.00) |
| t1/2(時) | 37.6 (NC)b | 23.6 (68.3)c | 17.1 (31.3)d | 13.4 (29.3)e |
| CLまたはCL/F(mL/時) | 392 (NC)b | 1.95 (74.1)c | 38.1 (214.8)d * | 3.04 (66.1)e |
| VzまたはVz/F (mL) | 21237 (NC)b | 80.6 (110.4)c | 1090 (215.1)d | 67.6 (81.2)e |

【０５００】

【表４４】

表４４．血清およびＣＳＦ中のｒｈＡＳＡのバイオアベイラビリティ

| | 絶対バイオアベイラビリティの比較 | | |
|---|---|---|---|
| | アリールスルファターゼＡ (第1b相:IT-L 1.8mg) | アリールスルファターゼＡ (第1b相:IT-L 6mg) | アリールスルファターゼＡ (第1b相:IT-L 18.6mg) |
| Fabs(%) | NC | 39.9 | 27.3 |

【０５０１】
ＩＴ－Ｌ投与後の血清中のｒｈＡＳＡのバイオアベイラビリティは、約３０～４０％である。これに対し、ＩＶ経路により投与した用量の０．５％のみがＣＳＦ中で生物学的に利用可能であった。
【０５０２】
【表４５】
表４５．ＣＳＦ：血清分配

| CSF: 血漿分配 | | | |
|---|---|---|---|
| アリールスルファターゼＡ（第 1b 相：IV 1mg/kg） | アリールスルファターゼＡ（第 1b 相：IT-L 1.8mg） | アリールスルファターゼＡ（第 1b 相：IT-L 6mg） | アリールスルファターゼＡ（第 1b 相：IT-L 18.6mg） |
| 0.74 | NC | 445 | 452 |

【０５０３】
実施例２０．ＭＬＤ患者の治療
例えばＩＴ送達による、ＣＮＳへの直接投与を用いて、ＭＬＤ患者を効果的に治療することができる。本実施例は、遅発乳児型ＭＬＤの患者に対して、隔週（ＥＯＷ）、全４０週で、髄腔内薬物送達装置（ＩＤＤＤ）により投与する、３用量レベルまでのＩ２Ｓの安全性を評価するために計画された、多施設用量漸増試験を示すものである。ヒト治療に適した髄腔内薬物送達装置の様々な例を、図９４、図９５、図９６および図９７に図示する。
【０５０４】
最大２０患者まで登録：
コホート１：５患者（最低用量）
コホート２：５患者（中間用量）
コホート３：５患者（最高用量）
無作為に５患者を無治療とする。
【０５０５】
以下の基準を含むか否かに基づき、試験する患者を選択する：（１）生後３０か月までに最初の症状が現れた；（２）スクリーニング時に歩行可能である（自力で立ち上がり、片手を持たれた状態で１０歩前へ歩く能力と定義される）；（３）スクリーニング時に神経学的兆候が見られる。通常、造血幹細胞移植の経歴がある患者は除外される。
【０５０６】
遅発乳児型ＭＬＤの小児において、４０週間、用量を漸増してＩＴ注射により投与するｒｈＡＳＡの安全性を判定する。さらに、粗大運動機能に対するｒｈＡＳＡの臨床活性、ならびに単回および反復投与の血清中薬物動態および脳脊髄液（ＣＳＦ）中濃度を評価する。
【０５０７】
ＨＮＳのＩＴ送達の例
実施例２１：ヘパランＮ－スルファターゼの慢性髄腔内投与
本実施例は、ムコ多糖症ＩＩＩＡ（ＭＰＳ　ＩＩＩＡ；サンフィリッポ症候群Ａ型）に特徴的な臨床像である神経症状を治療するために、髄腔内投与を用いて、組換えヒトヘパランＮ－スルファターゼ（ｒｈＨＮＳ）のようなリソソーム酵素を脳組織内に効率的に送達することができることを示すものである。本実施例に記載されている実験は、ｒｈＨＮ

Ｓの慢性ＩＴ投与において高い忍容性が認められ、脳、脊髄および肝臓で用量依存的な酵素活性が検出されたことを示している。

【０５０８】

簡潔に述べれば、ムコ多糖症ＩＩＩＡ（ＭＰＳ　ＩＩＩＡ；サンフィリッポ症候群Ａ型）に特徴的な臨床像である神経症状を治療するための、組換えヒトヘパランＮ－スルファターゼ（ＨＮＳ）の髄腔内（ＩＴ）製剤を開発した。ＭＰＳ　ＩＩＩＡ患者の平均年齢が４．５歳であることから、発達中の脳に対する影響を評価するためのＨＮＳに関するピボタルな毒性学試験を幼若カニクイザルにおいて行った。サルに髄腔内（ＩＴ）腰椎薬物送達装置を埋入し、隔週で短時間注入により投与し（１．５、４．５または８．３ｍｇ／投与のＨＮＳを６か月間；１２用量）、装置対照および溶媒対照には、ぞれぞれリン酸緩衝生理食塩水または溶媒を投与した。最後のＩＴ投与の３か月および６か月後に１群当たり８個体（雌雄それぞれ４個体）の剖検を行い（装置対照群は３か月後に剖検）、溶媒群および３つのＨＮＳ用量群の８個体を最後のＩＴ投与の１か月後に剖検した。ＨＮＳに関連する臨床兆候または肉眼的な中枢神経系の病変は観察されなかった。対照群に比べ、脳／脊髄を取り囲む髄膜／神経周膜において、脳脊髄液（ＣＳＦ）白血球、主として好酸球の一過性の増加と相関する極めて軽度のものから最小限の平均重症度の細胞浸潤が見られたが、最終投与の１か月後に大部分が消散した。これらの変化は、脳または脊髄の有害な形態学的変化を伴わなかった。脳、脊髄および肝臓において、平均ＣＳＦ中ＨＮＳレベルおよび組織中ＨＮＳ活性レベルが高くなるという用量依存的な傾向があるようであった。無毒性量は最高用量である隔週投与の８．３ｍｇ／投与であったが、このことは、ＨＮＳが８．３ｍｇ／投与よりも高い濃度を含めた各種濃度で髄腔内に安全に投与され得ることを示している。

【０５０９】

サンフィリッポ症候群Ａ型

ムコ多糖症ＩＩＩＡ型（ＭＰＳ　ＩＩＩＡ；サンフィリッポ症候群Ａ型）は、世界の約１００，０００に１人が罹患する稀なリソソーム蓄積症であり、ヘパラン硫酸グリコサミノグリカン（ＧＡＧ）のリソソーム異化作用に関与する外部スルファターゼであるヘパランＮ－スルファターゼ（ＨＮＳ）の機能の欠如または不全が原因で生じる（Ｎｅｕｆｅｌｄ　ＥＦら，Ｔｈｅ　Ｍｅｔａｂｏｌｉｃ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂａｓｅｓ　ｏｆ　Ｉｎｈｅｒｉｔｅｄ　Ｄｉｓｅａｓｅ（２００１）ｐｐ．３４２１－３４５２）。この酵素がなければ、ニューロンおよびグリア細胞のリソソーム内にヘパラン硫酸ＧＡＧが蓄積するが、脳以外での蓄積は少ない。この疾患に特徴的な臨床像は中枢神経系（ＣＮＳ）の変性であり、この変性により、主要な発達段階がなくなるか、またはこれに達することができなくなる。進行性の認知低下から認知症および早期死亡に至る。

【０５１０】

ｒｈＨＮＳのＩＴ送達

ＭＰＳ　ＩＩＩＡ患者の平均年齢が４．５歳であることから、発達中の脳に対する影響を評価するためのＨＮＳに関するピボタルな毒性学試験を幼若カニクイザル（種の選択はヒトとの遺伝的および解剖的類似性に基づいた）において行った。文献によると、ヒトに対応するサルの年齢は、３０～４０か月の小児に対して７．６か月～１２．１か月の範囲である（Ｈｏｏｄ　ＲＤ，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔａｌ　ａｎｄ　Ｒｅｐｒｏｄｕｃｔｉｖｅ　Ｔｏｘｉｃｏｌｏｇｙ：Ａ　ｐｒａｃｔｉｃａｌ　ａｐｐｒｏａｃｈ（２００６）ｐ．２７６）。この取組みの一部として、ＨＮＳのＩＴ腰椎投与を評価するために、幼若カニクイザルにおいて６か月間の毒性学試験を行った。以前の１か月齢幼若カニクイザルでの毒性試験から得られたデータを、６か月間反復投与による幼若サルでの試験の用量レベルの選択および計画の指針とした。本発明者らの知る限り、これが幼若非ヒト霊長類でのＥＲＴの慢性ＩＴ投与に関する最初の試験である。

【０５１１】

本試験では、約６～９か月齢、体重０．８２～１．８１ｋｇの５６匹の雄および５６匹の雌幼若カニクイザル（Ｍａｃａｃａ　ｆａｓｃｉｃｕｌａｒｉｓ）を用いた。サルにＰ

ＭＩ－Ｃｅｒｔｉｆｉｅｄ　Ｐｒｉｍａｔｅ　Ｄｉｅｔ　５０４８（Ｒｉｃｈｍｏｎｄ、ＩＮ）のビスケットを毎日１５個与えた。水は、ろ過された自動給水システムによる自由摂取とし、採尿期間は水を与えなかった。到着時からサルをステンレス製ケージ内で２～４週間、グループ（１ケージ当たり２匹）で飼育したが、３か月齢の個体はステンレス製ケージ内で１匹ずつ飼育した。試験期間中は、全個体を、温度と湿度が管理された、明期１２時間と暗期１２時間のサイクルの部屋で、ステンレス製ケージ内で１匹ずつ飼育した。

【０５１２】

試験開始前に、全個体にＳＣポートおよびＩＴカテーテルを外科的に埋入した。手術前にコハク酸プレドニゾロンナトリウム（ＩＶ、３０ｍｇ／ｋｇ）およびフルニキシンメグルミン（筋肉内［ＩＭ］、２ｍｇ／ｋｇ）を投与した。個体をＳＣ硫酸アトロピン（０．０４ｍｇ／ｋｇ）で前処置し、ＩＭケタミンＨＣｌ；８ｍｇ／ｋｇで鎮静させて挿管し、約１Ｌ／分の酸素および２．０％イソフルランで維持した。腰椎（$Ｌ_4$、$Ｌ_5$または$Ｌ_6$）の背側突起の上で切開を行い、先細ポリウレタンカテーテル（長さ２５ｃｍ、外径０．９ｍｍ×内径０．５ｍｍ、６個の側孔の直径が０．３３ｍｍ）を挿入するために、$Ｌ_3$、$Ｌ_4$または$Ｌ_5$で半側椎弓切除術を行った。硬膜を小さく切開してカテーテルを挿入し、胸腰椎接合部の領域に向かって順方向に約１０ｃｍ進めた。チタン製ＳＣポートをＩＴカテーテルに装着し、ＳＣ組織に埋入した。Ｉｓｏｖｕｅ－３００（０．８ｍｌ；Ｂｒａｃｃｏ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ、Ｉｎｃ．、Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ、ＮＪ）を用いた脊髄造影像により、適切なカテーテル留置を確認した。手術から回復させた後、個体に酒石酸ブトルファノール（ＩＭ、０．０５ｍｇ／ｋｇ）およびセフチオフルナトリウム（ＩＭ、５．０ｍｇ／ｋｇ、１日２回を２日間）を投与した。

【０５１３】

本試験では、ＨＮＳを５ｍＭリン酸ナトリウム、１４５ｍＭ塩化ナトリウムおよび０．００５％ポリソルベート２０を含むＩＴ製剤溶媒（ｐＨ７．０）に溶かして調製した。ＨＮＳのＥＯＷ投与を、約１１分間にわたる短時間注入、すなわち、０．６ｍＬ（４分）、次いで０．５ｍＬリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）による洗い流し（７分）で行った。溶媒対照群の個体には、ＩＴ製剤のみを投与し、ＤＣ個体にはＰＢＳ（ｐＨ７．２）をＩＴで投与した。

【０５１４】

病的状態および死亡

ＨＮＳに関連する死亡または早期の屠殺はなかった。投与時または毎日の観察時に、ＨＮＳに関連する臨床兆候は見られなかった。投与時または投与後に観察された誤留置、掻痒、振戦および運動失調は、投与の数分後～約４時間後までに消散し、これらはＨＮＳまたは溶媒に対する反応ではなく、容積に関連する反応であると考えらた。投与時および投与直後に観察された臨床兆候は、対照群（ＤＣおよび／または溶媒投与群）において同等の発生率で見られたが、用量反応の証拠は見られなかった。一般に、投与時の臨床兆候の発生率は、後の投与ごとに減少していった。ＨＮＳに関連する、体重、摂餌量、身体所見および神経所見の変化、またはＥＣＧもしくは眼科検査における変化は見られなかった。

【０５１５】

臨床病理学

いずれのインターバル期間においても、ＨＮＳに関連すると考えられる血液学、血清化学、凝固または尿検査のパラメーターの変化は見られなかった。

【０５１６】

ＣＳＦの細胞計数および化学

投与の２４時間後に、ＤＣおよび０ｍｇ／投与群を含めた全群の平均ＣＳＦ白血球数に用量依存的な増加が見られた。投与した各用量で白血球数の全般的な増加が見られた。投与前に約半数の個体からＣＳＦを採取したところ、これらの影響は、前回の投与から２週間で軽減されることが示された。投与５の後に、４．５ｍｇ／投与および８．３ｍｇ／投与群のＨＮＳ投与雄において、白血球の増加に加え、投与前の平均に比べて群の平均ＣＳ

Ｆ中総タンパク質およびアルブミンの上昇（４～５倍以下）が観察された（ＤＣおよび０ｍｇ／投与群に対してＰ≦０．０５）が、雌のＨＮＳ投与群ではそれほど明らかな傾向が見られなかった。

【０５１７】

ＨＮＳ濃度および抗体解析

一般的に、血清中の平均ＨＮＳレベルは、全群の全時点において検出限界（ＬＯＤ）未満であった。ＤＣ対照および溶媒投与対照群の個体のＣＳＦ中ＨＮＳ濃度は、一般的に定量下限（ＬＯＱ）を下回っていた。統計解析は行わなかったが、ＣＳＦ中の平均ＨＮＳレベルが１．５、４．５および８．３ｍｇ／投与群において高くなるという用量依存的傾向があるようであった。投与前のＣＳＦの平均ＨＮＳレベルは、投与後のＣＳＦ中レベルよりも有意に低かった。試験終了時（主要剖検および回復後剖検）の６か月コホート（雌雄）における平均ＨＮＳ濃度を表４６にまとめる。所与の用量レベルにおいて、血清およびＣＳＦ中の抗ＨＮＳ抗体レベルが試験を通して上昇し続けたにもかかわらず、ＣＳＦ中のＨＮＳの平均濃度は同じ範囲に維持されるようであった（図１４６Ａ）。

【０５１８】

【表４６】

表４６：試験終了時（主要剖検および回復後剖検）のＣＳＦ中ＨＮＳ濃度

| | 主要剖検 | | | 回復後剖検 | |
|---|---|---|---|---|---|
| 群 | n | 平均±SD[a] (ng/mL) | | n | 平均±SD (ng/mL) |
| 溶媒 | 8 | - | | 8 | NA |
| 1.5 mg IT | 8 | 516,366 ± 1,024,084 | | 8 | NA |
| 4.5 mg IT | 7 | 377,460 ± 304,996 | | 7 | NA |
| 8.3 mg IT | 8 | 419,492 ± 345,975 | | 8 | NA |

ＣＳＦ、脳脊髄液；ＨＮＳ、ヒトヘパランＮ－スルファターゼ；ｎ＝ＬＯＱを上回った試料数；ＩＴ、髄腔内；ＳＤ、標準偏差。

[a]＝投与の約２４時間後に採取した試料。

ＮＡ＝解析に利用できる試料がなかった、または試料がＬＯＱを下回っていた。

【０５１９】

６か月／回復コホートでは、試験したいずれの時点でも、装置対照群（ＰＢＳのみ）または溶媒群で血清またはＣＳＦ中に抗ＨＮＳ抗体が生じた個体はいなかった。１．５、４．５および８．３ｍｇ／投与群の全個体が、試験前（ＣＳＦ）および投与２の前に採取した血清およびＣＳＦ試料中の抗ＨＮＳ抗体に関して陰性（ＬＯＤ未満）の試験結果であった。試験の終わりまでに、全個体が血清中の抗ＨＮＳ抗体に関して陽性の試験結果となった。

【０５２０】

１．５ｍｇ／投与および８．３ｍｇ／投与群の全個体、ならびに４．５ｍｇ／投与群の８個体中６個体が、１つ以上の時点でＣＳＦ中の抗ＨＮＳ抗体に関して陽性の試験結果であった。４．５ｍｇ群の２個体で、剖検を含めたいずれの時点でも試料が採取されなかったため、これらの結果は、ＨＮＳを投与した全個体が抗体反応を生じたことを示すと思われる。

【０５２１】

３つのすべての用量レベルにおいて、投与２の後に血清中の抗ＨＮＳ抗体濃度が検出され、投与４の後にレベルが顕著に増加した。統計解析は行わなかったが、血清中の抗体濃度が高くなるという用量依存的傾向があると思われ、試験終了までに、３つのＨＮＳ投与群間でレベルが同等になった（図１４６Ｂ）。本試験期間を通して、血清中の抗ＨＮＳ抗体レベルは常にＣＳＦ中のレベルよりも高く（９～２３６倍の血清中／ＣＳＦ中抗体濃度）、ＣＳＦ中濃度に対する血清中濃度で最も高い比（９８および２３６倍）は、投与の比較的初期（６および１０週目）に８．３ｍｇの用量レベルで見られた。

【０５２２】

血清中の抗ＨＮＳ抗体濃度は、投与の初期（６週目～１４週目）に、１．５ｍｇ、４．５ｍｇおよび８．３ｍｇ／投与レベルにおいて、それぞれ９倍、１６倍および１６倍に増加した。同じ期間でのＣＳＦ中抗体濃度は、１．５ｍｇ、４．５ｍｇおよび８．３ｍｇ／投与レベルにおいて、それぞれ３０倍、４１倍および５２倍に増加し（図１４６Ｂ）、１か月間の無投与回復相の後でもかなりのレベルが維持されていた（表４７）。

【０５２３】

【表４７】

表４７：試験終了時（主要剖検および回復後剖検）のＣＳＦ中の抗ＨＮＳ抗体濃度

| 群 | 主要剖検[a] | | 回復後剖検 | |
|---|---|---|---|---|
| | n | 平均±SD（ng/mL） | n | 平均±SD（ng/mL） |
| 溶媒 | 8 | - | 8 | - |
| 1.5 mg IT | 8 | 351,456 ± 244,171 | 8 | 299,512 ± 226,654 |
| 4.5 mg IT | 7 | 147,187 ± 213,095 | 7 | 193,045 ± 157,896 |
| 8.3 mg IT | 8 | 185,227 ± 315,858 | 8 | 238,727 ± 185,785 |

ＣＳＦ、脳脊髄液；ＨＮＳ、ヒトヘパランＮ－スルファターゼ；ＩＴ、髄腔内；ｎ、定量下限を上回った試料数；ＳＤ、標準偏差。

[a]投与の約１週間前に採取した試料。

【０５２４】

抗ＨＮＳ抗体が現れたのは、血清中よりもＣＳＦ中の方が遅かった（図１４６Ｃ）。血清中またはＣＳＦ中の抗体濃度の明らかな用量依存的な差は観察されず（試料数が少ないため統計解析は行わなかった）、雌雄間での抗体反応の差は見られなかった。

【０５２５】

ＣＳＦ中に抗ＨＮＳ抗体が存在しても、ＣＳＦ中のＨＮＳの平均濃度は維持されるようであったが、このことは、血清およびＣＳＦ中に抗ＨＮＳ抗体が存在しても、ＩＴ投与されたＨＮＳの濃度レベルが変化しなかったことを示している。６か月間のＨＮＳ反復投与の６か月／回復コホートの解析は、３か月中間および６か月コホートの屠殺個体の抗ＨＮＳ抗体濃度が同等であることを示していた（図１４６Ｃ）。

【０５２６】

肉眼的および病理組織学的所見

全用量レベルにおいて（全屠殺間隔で、性別特異的に、または用量依存的であるというわけでないが）、脳（主として灰白質）、脊髄（灰白質および白質）、脊髄神経後根／神経節および三叉神経節（中用量雄のみ）の実質に好酸球浸潤（図１４７Ａ）が見られた（図１４７Ｂ～１４７Ｄ）。浸潤は、髄膜／神経周膜の浸潤および／または組織実質内での

ＨＮＳの存在（透過）に続発するものであると解釈された。炎症型の変化が多数見られたが、カニクイザルはＨＮＳの投与に対して忍容性があると思われ、いずれの浸潤も神経系実質の有害な形態学的変化に関連する、またはこれを引き起こすとは考えられなかった。具体的には、ＨＮＳ投与に関連するニューロン壊死／変性の証拠およびグリア反応が見られなかった。

【０５２７】

脳および脊髄の灰白質における、主として好酸球による細胞浸潤に関連した小膠細胞症は、以前に行った１か月間の幼若サル毒性試験において比較的よく見られた。このような変化は、６か月間の試験の３か月目中間の屠殺ではあまり見られなかったが、このような反応の残存した証拠が６か月のコホートで見られた（図１４７Ｆ）。ミクログリア細胞の反応は、一部の（通常、タンパク質ベースの）中枢に投与された（または中枢で反応する）被検試料に対する反応の比較的初期の事象であることが多い。好酸球浸潤は、ＨＮＳ投与個体のＣＳＦにおける好酸球数の増加と確かに相関していたが、有害反応を誘発するのに十分な数の細胞は存在しなかった。

【０５２８】

全用量レベルにおいて、雌雄に関係なく、ほとんどのＨＮＳ投与群の脊髄神経後根／神経節で好酸球浸潤が観察された。各種神経系組織における浸潤は、髄膜／神経周膜の浸潤および／または組織実質内でのＨＮＳの存在（透過）により生じたものであると解釈された。回復後に屠殺した個体では、ＨＮＳに関連する影響は、一般に見られなかったか、または対照レベルまで減少していた。脊髄の小膠細胞症のような一部の変化は、回復期間の後に完全に消散していた。ＨＮＳに関連する変化は、脳または脊髄における有害な構造上の顕微鏡的変化を全く伴わないようであった。脳、脊髄または神経節のニューロン壊死は認められなかった。

【０５２９】

ＨＮＳ酵素活性

６か月／回復コホートでは、溶媒投与群の脊髄および脳におけるＨＮＳ酵素活性（０．０～０．１５４ｎｍｏｌ／時・タンパク質ｍｇ）は、３か月中間コホートの組織で見られたレベル（０．０～０．０１５４ｎｍｏｌ／時・タンパク質ｍｇ）と同程度であった。脊椎での酵素活性レベルは、脳または肝臓で測定されたレベルよりも高く（腰椎では１桁分高かった）、４．５ｍｇおよび８．３ｍｇ／投与群が同等のレベルであった。脊髄スライスのＨＮＳ酵素活性は、１．５、４．５および８．３ｍｇ／投与群において、雄（図１４８Ａ）でそれぞれ３．９～１８．６、１３．１～６７．１および３．６～６９．２ｎｍｏｌ／時・タンパク質ｍｇ、雌（図１４８Ｂ）でそれぞれ１．８～１６．２、４．５～６１．２および２１．１～６６．０ｎｍｏｌ／時・タンパク質ｍｇの範囲であった。１か月の回復期間後の脊髄組織では、酵素活性レベルが溶媒対照の数値と同じレベルまで戻っていた。

【０５３０】

脳スライスでのＨＮＳ酵素活性は、１．５、４．５および８．３ｍｇ／投与群において、雄（図１４８Ｃ）でそれぞれ０．０３～１６．０、０．３０～５５．７および０．１５～２１．２ｎｍｏｌ／時・タンパク質ｍｇ、雌（図１４８Ｄ）でそれぞれ０．０４～５．１、０．０～１４．４および０．９～３３．２ｎｍｏｌ／時・タンパク質ｍｇの範囲であった。回復後の脳組織では、酵素活性レベルが溶媒対照の数値と同じレベルまで戻っていた。

【０５３１】

内因性のレベル（ＤＣ群）と比較した、脳の異なる領域における活性の変化倍数を図１４９Ａに示す。表面の試料において分布が増加する傾向が認められたが、腰椎ＩＴ投与したＨＮＳが脳室周囲領域まで透過することが示された。

【０５３２】

６か月／回復コホートでは、１．５、４．５および８．３ｍｇ／投与群において、肝臓における平均活性レベルが、雄でそれぞれ０．５０、２．４１および６．６５ｎｍｏｌ／

時・タンパク質ｍｇ、雌でそれぞれ１．０４、４．１５および７．６２ｎｍｏｌ／時・タンパク質ｍｇであった（図１４９Ｂ）。溶媒対照個体のレベルは、雄で０．０８９ｎｍｏｌ／時・タンパク質ｍｇ、雌で０．０８３ｎｍｏｌ／時・タンパク質ｍｇであった。回復期間後、肝臓におけるＨＮＳ活性レベルは、全用量群でベースラインの対照レベルと同等であった。

【０５３３】

免疫組織化学

３か月中間コホートおよび６か月／回復コホートにおけるボーラスＩＴ注射によるＣＮＳへのＨＮＳ送達の結果、免疫反応性の被検試料が脊髄および脳の軟膜クモ膜組織まで送達された。ＨＮＳでＩＴを投与した個体では、免疫反応性物質が、髄膜マクロファージおよび血管周囲マクロファージ内（脳／脊髄）に一貫してに存在し、隣接するグリア細胞および神経細胞集団内にばらつきながら存在していた。溶媒投与対照の個体（図１５０Ａ）では染色が見られなかったことにより、ヒトＨＮＳに対する抗体の特異性が示された。一般的に、免疫反応性は用量依存的であった（すなわち、半定量的な段階付けスケールを用いて、免疫組織化学染色の一般的な用量依存的増加が認められた）。ボーラスＩＴによるＣＮＳへのＨＮＳ送達により、大脳皮質および小脳において陽性の免疫染色が生じた（図１５０Ｂ～１５０Ｄ）が、免疫反応性は、尾状核／被殻領域、中脳、または脳橋もしくは髄質の深部領域で一貫して明らかというわけではなかった。ＨＮＳを投与した全個体の肝臓において（肝細胞ではなく、Ｋｕｐｆｆｅｒ細胞を含めた類洞壁細胞において）、免疫反応性が明らかであった。修理不可能なカテーテル漏れのため早期に屠殺した１匹の雌（４．５ｍｇ／投与群）では、免疫反応性が明らかではなかった。

【０５３４】

１．５ｍｇ／投与群では、一部の残存した免疫反応性が明らかな肝臓および脳と脊髄の髄膜を除き、基本的に完全な回復が明らかであった。高用量（４．５および８．３ｍｇ／投与）では、免疫反応性強度および発生率が投与終了時よりも低かった。全用量レベルにおいて、１か月間の回復後に、脊髄、脳および肝臓のＨＮＳレベルが、溶媒投与対照で見られたレベルに近かった。

【０５３５】

本試験では、ＩＴで行った６か月間のＨＮＳのＥＯＷ送達では、一般に高い忍容性が認められた。体重、臨床状態、眼科検査／神経学検査／身体検査、ＥＣＧ、器官重量または器官の肉眼的外観の顕著な変化は観察されなかった。所見は、ごくわずかなものから軽度までの髄膜浸潤および硬膜外炎症を伴った、ＣＳＦの臨床病理における一過性の変化に限られていたが、これらは、回復期間後には、最高用量群を除く全群でほぼ完全に回復した。脳および脊髄全体にわたるＨＮＳの広範な分布が観察された。

【０５３６】

ＨＮＳのＥＯＷでのＩＴ投与により、残存性の白血球浸潤およびアルブミン浸出を特徴とする炎症性応答が誘発され、これが投与の２４時間後および剖検時に認められた。特定の理論に拘束されることを望むわけではないが、これはおそらく、カテーテル先端付近のタイトジャンクションの変化に関連した、局所的な一過性のＢＢＢの不完全な開口により、白血球および血漿タンパク質がＣＳＦ内に侵入したことによるものであろう（Ｓｉｍａｒｄ ＪＭら，Ｌａｎｃｅｔ Ｎｅｕｒｏｌ．（２００７）６，２５８－２６８；Ｓｔａｍａｔｏｖｉｃ ＳＭら，Ｃｕｒｒ．Ｎｅｕｒｏｐｈａｒｍａｃｏｌ．（２００８）６，１７９－１９２）。これは２つの要素、すなわち、１つは投与の方法または量に関連する要素、もう１つはタンパク質のＩＴ投与に関連する要素の結果であり得る。

【０５３７】

ＢＢＢ透過性の一過性の変化（投与の２４時間後の剖検時の各用量群および対照の間に有意な差はなかった）は、いかなる臨床兆候も伴わなかった。

【０５３８】

平均ＣＳＦ中ＨＮＳレベルが高くなるという用量依存的傾向があると思われたが、所与の用量レベルにおいて、血清中およびＣＳＦ中の抗ＨＮＳ抗体レベルの増加にもかかわら

ず、ＣＳＦ中のＨＮＳの平均濃度は同じ範囲で維持されるようであった。

【０５３９】

ＨＮＳを投与した幼若ザルの脳および脊髄において、ごくわずかなものから最小限までの平均重症度の髄膜の細胞浸潤が観察された。この顕微鏡的変化は溶媒投与対照でも認められ、一部の反応がＩＴカテーテル留置および外来タンパク質に対する非特異的炎症性応答に関連していたことを示している。特にＣＮＳに浸透する生物製剤／タンパク質をＩＴ内に導入すると、ほとんどの場合、ある程度の炎症性応答を誘発し（Ｈｏｖｌａｎｄ ＤＮら，Ｔｏｘｉｃｏｌ．Ｐａｔｈｏｌ．（２００７）３５，１０１３－１０２９；Ｂｕｔｔ ＭＴ，Ｔｏｘｉｃｏｌ．Ｐａｔｈｏｌ．（２０１１）３９，２１３－２１９）、隣接する組織に損傷を与えるだけの数が存在すれば、有害作用を示し得る。しかし、本試験では、これらの細胞（主として好酸球）は、組織の反応／組織への浸透のマーカーになると思われ、有害反応と見なすのに十分な量では見られなかった。ＨＮＳに関連する変化は、脳または脊髄における有害な構造上の顕微鏡的変化を伴わないようであった。脳、脊髄または神経節のニューロン壊死は認められなかった。

【０５４０】

抗被検試料抗体の評価は、被検試料のクリアランスまたは生体内分布に対する中和抗体または結合抗体による潜在的な影響を理由に、毒性試験の重要な側面である（Ｐｏｎｃｅ ＲＰら，Ｒｅｇｕｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．（２００９）５４，１６４－１８２）。本試験では、３か月中間コホートおよび６か月コホートの脳および脊髄において、用量依存的なおよび定量的に同様のレベルのＨＮＳ酵素活性が認められ、また血清およびＣＳＦ中の抗ＨＮＳ抗体レベルの増加にもかかわらずＣＳＦ中のＨＮＳ平均濃度が同じ範囲に維持されるようであったが、このことは、中和活性がなかったことを示している。

【０５４１】

脊髄、脳および肝臓において、ＨＮＳ酵素活性のレベルが高くなるという用量依存的傾向が見られるようであったが、そのレベルは、脊髄の腰部領域では注射部位付近が最も高く、脳では均一であり、また吻側から尾側にかけて、および右半球と左半球の間で有意差はなかった。６か月コホートの脳および脊髄組織では、３か月中間コホートに比べて、ＨＮＳ蓄積の証拠が認められなかった。表面試料では分布が増加する傾向が認められたが、腰椎ＩＴ投与したＨＮＳは深部の脳室周囲領域まで浸透した。肝臓でのＨＮＳ酵素活性は、ＨＮＳがＩＴ送達後に全身に再分布することを示していたが、肝臓では、ピボタルな毒性試験における臨床病理パラメーターおよび解剖病理パラメーターの評価により、ＨＮＳに関連する有害作用は観察されなかった。

【０５４２】

全般的に、免疫組織化学の結果は、脊髄および脳の軟膜クモ膜髄膜、ならびに髄膜に隣接する神経組織（ニューロン、グリア細胞）において用量依存的な免疫反応性が観察されたという点で、組織酵素活性を裏付けるものであった。ボーラスＩＴ注射または短時間ＩＴ注入後に、大脳および小脳の灰白質への良好な浸透が見られた。視床／視床下部の大脳基底核もしくは中心領域、中脳または脳橋／髄質のような深部構造では、免疫反応性は明らかではなかったが、酵素活性の結果は、腰椎ＩＴ投与したＨＮＳが深部の脳室周囲領域に浸透したことを示している。したがって、免疫組織化学は、被検試料の生体内分布の検出に関しては感度の低い手法であるのかもしれない。免疫反応性は、肝臓のＫｕｐｆｆｅｒ細胞および内皮細胞（食作用が可能な細胞）では明らかであったが、実質細胞（肝細胞）では明らかではなかった。

【０５４３】

幼若ザルにおける６か月間のＩＴ反復投与の毒性試験に関する６か月／回復コホートの解析は、脊髄、脳および肝臓における生存中パラメーター、臨床病理および解剖病理、ＣＳＦおよび血清中のＨＮＳおよび抗ＨＮＳ抗体の濃度ならびにＨＮＳの分布／細胞内局在を含めたＨＮＳに関連する変化が、３か月中間屠殺および６か月屠殺の個体において同等であることを示していた。回復後屠殺の個体では、ＨＮＳの影響が見られなかったか、ま

たは有意に減少していた。したがって、６か月幼若ザルにおける試験の無毒性量は、最高投与量の８．３ｍｇ／投与であった。

【０５４４】

ＣＳＦの細胞充実度およびタンパク質濃度の変化をモニターすることは、病理組織学的評価で認められる形態学的変化の信頼できる関連要素であると考えられ、ＨＮＳによりＩＴで治療した患者において有用であり得る。これらの変化は、ＩＴ投与したタンパク質に対する予想された反応であると考えられ、回復期間後に大部分が消散した。動物モデルによるこれらのデータは、リソソーム蓄積症の神経症状の治療ストラテジーとしてＩＴ療法を追求するための確信を与えるものである。この幼若非ヒト霊長類での毒性学試験は、ＩＴ腰椎薬物送達装置によりＨＮＳを小児患者に投与することの実現可能性および忍容性を示している。有害なＣＮＳ病理および有害な臨床兆候が見られなかったことは、最近の試験医薬品の書類承認を支持し、また、ＩＴ投与したＨＮＳがサンフィリッポＡ症候群のＣＮＳ症状を安全かつ効果的に治療し得ることを示すものであった。

【０５４５】

材料および方法

本実施例に記載されている各種実験で使用された材料および方法の例を以下に記載する。

【０５４６】

試験計画およびＨＮＳ投与

サルを無作為に５つの処置群に分けた。群１には処置を施さず（埋植物装置対照［ＤＣ］、ポートおよびカテーテル）、溶媒も被検試料も投与しなかった。群２～５には、０、２．５、７．５または１３．８ｍｇ／ｍｌのＨＮＳを０．６ｍＬ（すなわち、０、１．５、４．５または８．３ｍｇの総用量）を、ＥＯＷでＩＴにより投与した。３か月目に４個体／性別／群の剖検行い（中間剖検；６回目の投与の２４時間後）、投与６か月目に４個体／性別／群（３か月目に剖検するＤＣ群を除く）の剖検を行い（主要剖検：１２回目の投与の２４時間後）、１か月間の回復期間終了時に残りの４個体／性別／群の剖検を行った。剖検時に、選択した組織を採取し、処理して、顕微鏡で観察した。

【０５４７】

ＨＮＳを５ｍＭリン酸ナトリウム、１４５ｍＭ塩化ナトリウムおよび０．００５％ポリソルベート２０（ｐＨ７．０）からなるＩＴ製剤溶媒に溶かして準備した。ＨＮＳの隔週投与を、約１１分間にわたる短時間注入、すなわち、６ｍＬ（４分）、次いで０．５ｍＬリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）による洗い流し（７分）で行った。溶媒対照群の個体には、ＩＴ製剤のみを投与し、ＤＣ個体にはＰＢＳ（ｐＨ７．２）をＩＴで投与した。

【０５４８】

臨床評価

臨床兆候および病的状態および死亡の観察を、最初の投与から始めて少なくとも１日２回記録した。手術前、手術当日、試験期間中の週１回および剖検時に体重を測定した。摂餌量を、手術前から始めて毎日モニターした。試験開始前、試験期間中の毎月および剖検前に身体検査（心拍数、呼吸、体温、聴診、歩行運動、気性、腹部触診、リンパ節および全般的な外観）および神経学的検査（意識のレベル、追跡検査）を行った。運動機能、大脳反射（瞳孔反射、瞬目反射および角膜反射）および脊髄反射（足感覚反射、膝蓋腱反射、皮膚反射、固有感覚反射および尾部反射）も評価した。最初のＨＮＳ投与前および中間剖検（３か月）または主要剖検（６か月）の前の週に、心電図検査（ＥＣＧ；リードＩ、ＩＩおよびＩＩＩ）および眼科検査を行った。サルをケタミンＨＣｌ（ＩＭ、８ｍｇ／ｋｇ）で鎮静させ、眼を１％トロピカミドで散大させて、倒像検眼鏡による眼科検査を行った。

【０５４９】

臨床病理学

血液試料を、試験開始前、ＩＴ投与１、３、５、７、９および１１の後、回復期中間および剖検時に、血液学および血清化学用に絶食個体から採取した。尿試料を、投与前、投

与期間および回復期間の月１回、ならびに剖検前に受け皿から採取した。全細胞計数および化学分析用のＣＳＦ試料を、手術時、およびＩＴ投与１、３、５、７、９、１１の２４時間後、回復期中間、および剖検時に腰椎カテーテルから採取したが、カテーテルの部分的な閉塞により試料が採取されない場合もあった。予想を上回るＣＳＦ白血球数が認められたため、３か月投与の５つのＣＳＦ試料は、投与前に各群の半数の個体から、また投与の２４時間後に残りの個体から採取した。投与直前にＣＳＦの量をあまり変化させないように、投与前の試料採取を投与の少なくとも１日前に行った。６か月個体および回復個体では、全細胞計数および化学分析用に、ＣＳＦを投与前に各群の半数の個体から、また投与の２４時間後に残りの個体から採取した。閉塞によりカテーテルから試料が採取されない個体では、剖検時に脊椎穿刺（大槽）を行った。

【０５５０】

ＨＮＳ解析

ＨＮＳ解析用の血液試料を、ＩＴ投与２、４、６、８、１０、１２の前および２４時間後、回復期中間、および剖検時に末梢静脈から採取した。ＣＳＦ試料を、ＩＴ投与２、４、６、８、１０、１２の前および２４時間後、回復期中間、および剖検時に腰椎カテーテルから採取した。ＨＮＳ濃度を酵素結合免疫吸着測定により決定した。捕捉抗体はポリクローナルウサギ抗ＨＮＳ　ＩｇＧ、検出抗体は同じウサギ抗ＨＮＳ　ＩｇＧの西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートであった。ＬＯＤは０．２２ｎｇ／ｍＬであったため、ＬＯＱは０．６６ｎｇ／ｍＬと算出された。血清およびＣＳＦ試料を１：１００および１：５希釈で二重反復によりスクリーニングし、検量曲線の上限を超えた試料はさらに希釈して再試験した。

【０５５１】

抗ＨＮＳ抗体解析

抗体解析用の血液を、ＩＴ投与２、４、６、８、１０、１２の約１週間前、回復期中間、および剖検時に末梢静脈から採取した。抗体解析用のＣＳＦ試料を、手術時に、およびＩＴ投与２、４、６、８、１０、１２の約１週間前、回復期中間、および剖検時に腰椎カテーテルから採取した。Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ（ＭＳＤ（登録商標））技術の電気化学発光ブリッジ試験を抗ＨＮＳ抗体の検出に用いた。このアッセイは、任意の種の抗ＨＮＳ抗体およびすべての免疫グロブリンアイソタイプのための一般的な高感度のスクリーニング方法である。ＬＯＤは５ｎｇ／ｍＬであり、試料を１：２０希釈で二重反復によりスクリーニングし、有効な１００ｎｇ／ｍＬのアッセイ感度が得られた。検量曲線の上限を上回った試料はさらに希釈して再試験した。

【０５５２】

剖検および組織標本作成

最後のＩＴ投与の２４時間後（主要剖検）または１か月間の回復期間の終了時（回復後剖検）に完全剖検を行った。全個体をケタミンＨＣｌ（ＩＭ、８ｍｇ／ｋｇ）で鎮静させ、イソフルラン／酸素混合物下で維持し、ヘパリンナトリウム（２００ＩＵ／ｋｇ）のＩＶボーラス投与を行った。生理食塩水に溶かした室温の０．００１％亜硝酸ナトリウムにより、２００ｍｌ／分の速度で１２分間（約２４００ｍｌ）、左心室から還流を行った。採取後、組織試料を、病理組織学検査／免疫組織化学解析用には１０％中性緩衝ホルマリンで固定し、ＨＮＳ活性の解析用には、ドライアイス上で凍結させて－６０℃以下で保管した。

【０５５３】

脳マトリックス（ＭＢＭ－２０００Ｃ、ＡＳＩ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、Ｉｎｃ．、Ｗａｒｒｅｎ、ＭＩ）で脳を３ｍｍの冠状スライス厚に切った。最も吻側のスライスをスライス１として、スライスに番号を付した。スライス１、４、７、１０、１３および１６を組織病理用に処理し、スライス２、５、８、１１、１４および１７（入手できれば）を免疫組織化学用に処理した。スライス３、６、９、１２および１５をＨＮＳ活性の解析用に凍結させた。脊髄（頸部、胸部および腰部）を１ｃｍの切片に切った。最初のスライスと、そこから２枚おきのスライスを病理組織学的評価用に処理し、２番目のスライスと、

そこから２枚おきのスライスを免疫組織化学解析用に処理した。３番目のスライスと、そこから２枚おきのスライスをＨＮＳ解析用に凍結させた。髄腔内カテーテルの先端部を含むスライス（スライス０）がホルマリンで固定され、組織病理に関して解析されるように、スライスの配分を調節した。約５ｇの肝臓の重複試料を２つの別々の葉から採取してＨＮＳ解析用に凍結させ、約５ｇの追加の試料を免疫組織化学解析用に固定した。

【０５５４】

組織病理学

脳、脊髄、脊髄神経後根／神経節、坐骨神経、脛骨神経および腓腹神経、全組織リスト（この種でのこの期間の前臨床薬物安全性試験に典型的なもの）およびあらゆる肉眼的病変を、剖検時に全個体から採取した。全体的な顕微鏡評価用に、組織切片をパラフィンに包埋し、ヘマトキシリンおよびエオシン（以下に記す特殊なすべての染色／包埋法に加えて）で染色した。

【０５５５】

パラフィンブロックで作成した装置対照群、溶媒対照群および高用量群個体の脳切片を、フルオロ－Ｊａｄｅ　Ｂ（神経変性の評価の感度を増強する染色）およびＢｉｅｌｓｃｈｏｗｓｋｙ銀（軸索、樹状突起および神経フィラメントを直接可視化することができる処理）で染色した。フルオロ－Ｊａｄｅ　Ｂで染色したスライドを、フルオレセインイソチオシアネートフィルターキューブを用いて、蛍光下で調べた。

【０５５６】

脊髄を連続的に薄切し、カテーテル先端の位置の切片を含めた頸部、胸部および腰部で横断切片および斜位切片を切り（各レベルで１枚のスライスを調べた）、馬尾領域からさらに横断切片を切った。脊髄神経後根および神経節（中頸部、中胸部および中腰部）を処理して調べた。末梢神経（坐骨神経、脛骨神経および腓腹神経）を縦方向に薄切してパラフィンに包埋し、ヘマトキシリンおよびエオシン（Ｈ＆Ｅ）で染色した。横断切片をオスミウムで前固定してＳｐｕｒｒ樹脂に包埋し、薄切して（２μｍ）、トルイジンブルーで染色した。装置対照群、溶媒対照群および高用量群の脊髄の連続切片、ならびに脊髄神経後根および神経節をＢｉｅｌｓｃｈｏｗｓｋｙ銀で染色した。また、これらの群の脊髄切片を、アストロサイトとその突起を直接可視化することができる免疫組織化学染色である抗グリア線維性酸性タンパク質でも染色した。

【０５５７】

定量分析用の組織抽出物の調製

凍結させた脳スライス３、６、９、１２および１５を、左半球と右半球に分割して分けた。各半球の表面から４ｍｍを測って表面組織を採取し、残りの組織を深部組織とした。存在すれば（例えば、スライス６および９が）、さらに脳室周囲の試料を冠状スライスから切り取った。脳の半分（右側）だけを処理した（左側は凍結させたままであった）ため、薄切により得られたのは、スライス１枚当たり２つ～３つの試料、すなわち、右側表面、右側深部および存在すれば右側脳室周囲（すなわち、脳室深部；Ｖｄｅｅｐ）であった。小脳および脳幹組織が存在すれば、半球を分割する前に分離して別に処理した。これと同様に脊髄切片を処理し、重量を量り、ホモジナイズした。

【０５５８】

１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、５ｍＭエチレンジアミン四酢酸、０．１％　ＩｇｅｐａｌにＡｌｐｈａ　Ｃｏｍｐｌｅｔｅプロテアーゼ阻害剤微小錠剤（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ、Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ、ＩＮ）を加えて調製した溶解緩衝液（１ｍｌ／０．２５組織ｇ）中、ＴｅｅｎＡ　Ｌｙｓｉｎｇ　Ｍａｔｒｉｘ　Ａチューブまたはポリプロピレン製コニカルチューブを用いて組織試料をホモジナイズした。Ｆａｓｔｐｒｅｐ－２４自動ホモジナイザー（ＭＰ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ、Ｓｏｌｏｎ、ＯＨ）またはＰｏｗｅｒＧｅｎ　Ｍｏｄｅｌ　１２５動力付きホモジナイザー（Ｏｍｎｉ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、Ｋｅｎｎｅｓａｗ、ＧＡ）で試料を４０秒間処理した。ホモジナイズした後、試料をエタノール／乾燥氷浴および３７℃の水浴を用いた５回の凍結融解サイクルに供し、次いで、４℃での遠心分離により組織破片を沈殿させ、上清をアッセイまで－８０

℃で保管した。特異的基質（４－メチルウンベリフェリル－α－Ｄ－Ｎ－スルホグルコサミニド）を用いて、２段階の蛍光定量アッセイによりＨＮＳ活性を決定した。

【０５５９】

免疫組織化学のための組織の処理および染色

ホルマリン固定した厚さ３ｍｍの各個体の冠状脳スライス（スライス番号２、５、８、１１、１４および１７）６枚に、吻側から尾側に向かって１～６までの番号を付した。一般に、スライス１～４には基底核／視床／中脳および大脳が、尾側の２枚のスライスには小脳および脳幹（延髄）組織が含まれていた。脳、脊髄および肝臓の切片（Ｈ＆Ｅ染色および各種特殊な染色で用いたものと同じパラフィンブロックのもの）を、ＨＮＳに対して免疫組織化学的に染色した。特異的マウスモノクローナル抗体（クローン２Ｃ７；Ｍａｉｎｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｐｏｒｔｌａｎｄ、ＭＥ）を用いて、ＩＴ投与したＨＮＳの細胞内への取込みを検出し、この試薬により、内因性のカニクイザルＨＮＳとの交差反応性がないことが示された。陰性対照は無関係なマウスＩｇＧを用いて行った。脱パラフィンしたスライドを、一次マウス抗ＨＮＳ抗体とともに２～８℃で一晩インキュベートした。二次ヤギ抗マウスビオチン化免疫グロブリンＧを加え、３７℃で３０分間インキュベートした。アビジン／ビオチン化西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体を加えて、３０分間インキュベートした。スライドをペルオキシダーゼ基質のジアミノベンジジン溶液中、所望の染色強度になるまでインキュベートした。核をヘマトキシリンで対比染色した。

【０５６０】

統計解析

体重、体重変化、摂餌量、呼吸数、体温、心拍数、ＣＳＦ細胞計数、ＣＳＦ化学、臨床病理学データ、尿データ、ならびに絶対および相対器官重量を、一元配置分散分析、ならびにＤｕｎｎｅｔｔ検定による装置対照および溶媒対照群と各ＨＮＳ投与群との比較により解析した。さらに、２つの対照群を統計解析により相互に比較した。解析は、両側５％および１％の有意性レベルであった。全データを平均±標準偏差で表す。

【０５６１】

実施例２２：ヘパランＮ－スルファターゼの生体内分布および薬物動態試験

本実施例の実験は、ラットにおけるＨＮＳの静脈内または髄腔内単回投与（１ｍｇ／ｋｇまたは１０ｍｇ／ｋｇ）後のＨＮＳの組織分布を決定するために計画された。中でも例えば、これらの実験の目的は、陽電子放射断層撮影（ＰＥＴ）を用いてラットにおけるＨＮＳの生体内分布（ＢＤ）特性を特徴付けること；異なる経路（ＩＶまたはＩＴ）および異なる用量（１ｍｇ／ｋｇまたは１０ｍｇ／ｋｇ）で投与したときのＨＮＳの分布パターンを比較すること；ならびに上記投与レジメンでの各対象器官におけるＨＮＳの薬物動態特性を決定することであった。

【０５６２】

ラットにおける１ｍｇ／ｋｇまたは１０ｍｇ／ｋｇの$^{124}$Ｉ－ＨＮＳ静脈内（ＩＶ）または髄腔内（ＩＴ）単回投与後の$^{124}$Ｉ－スルファミダーゼ（ＨＮＳ）の薬物動態（ＰＫ）および生体内分布（ＢＤ）プロファイルを組織ＰＥＴ画像法により調べた。最初の２０分間の動態像ならびにＩＶまたはＩＴ投与の０．０５（ＩＴ投与のみ）、１、２、４、８、２４、４８、９６および１９２時間後の静態像から、対象領域における放射活性－時間のデータ得た。

【０５６３】

４つの各群（１ｍｇ／ｋｇ　ＩＶ、１ｍｇ／ｋｇ　ＩＴ、１０ｍｇ／ｋｇ　ＩＶおよび１０ｍｇ／ｋｇ　ＩＴ）の４匹のラットを本試験に用いた。ＩＴ投与後に頭部、脳（脳脊髄液、ＣＳＦを含む）、脊椎および肝臓領域における放射活性－時間のデータを、またＩＶ投与後に血液、脳（ＣＳＦを含む）、肝臓、腎臓、心臓（肺を含む）および皮膚における放射活性－時間のデータを測定した。データをヨウ素１２４の崩壊半減期（１００．２時間）により補正し、対象領域における注射量（％ＩＤ）または画像化した組織１グラム当たりの％ＩＤ（％ＩＤ／ｇ）の百分率として表した後、体重２００グラムに対して正規化した。対象領域における投与されたタンパク質総量（ｕｇ）または濃度（μｇ／ｇ）を

、対応する％ＩＤまたは％ＩＤ／ｇのデータから計算した。

【０５６４】

ＩＴ投与後の最初の２０分間は、１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇにおいて、頭部領域のＨＮＳの総量が０．００２／分～０．０１１／分（λｚ）の一定速度で減少した。本報告では、２つの用量間および２つの投与経路間での薬物動態の比較にクリアランス速度および分布容積を用いなかった（詳細な情報に関しては結果の節を参照されたい）。脳の一定の消失速度は、２つの試験用量で基本的に同じ（λｚ：１ｍｇ／ｋｇと１０ｍｇ／ｋｇでそれぞれ０．０１６／時と０．０１４／時）あり、ＩＴ投与の１９２時間後までの静態像による決定された半減期は、同じ約２日であった。ＣｍａｘおよびＡＵＣ（０－ｌａｓｔまたは０－ｉｎｆｉｎｉｔ）の値は、投与量に比例していた。これらのＩＴ単回投与レジメンで投与した１～１０ｍｇ／ｋｇの用量範囲において、直線的なＰＫ挙動が示された。脊椎の近位部分から遠位部分にかけて、濃度勾配が両用量レベルで観察された。

【０５６５】

ＩＴ投与後、肝臓のＨＮＳタンパク質は、１ｍｇ／ｋｇのＨＮＳでは９６時間後まで、１０ｍｇ／ｋｇのＨＮＳでは１９２時間後まで測定可能であった。肝臓中の濃度は、１ｍｇ／ｋｇでは２時間後に、１０ｍｇ／ｋｇでは７時間後にピークに達した。１ｍｇ／ｋｇにおける消失は０．０３０±０．０１１／時（平均λｚ）であり、１０ｍｇ／ｋｇにおける消失（λｚ：０．０１７±０／時）との間に有意差はなく（ｐ＝０．１０）、対応するｔ１／２（１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇの用量でそれぞれ２８時間と４２時間）を有していた。

【０５６６】

ＩＶ投与後の肝臓、腎臓、心臓および皮膚における消失半減期は、１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇでそれぞれ、肝臓が４７±１０時間および３８±１３時間、腎臓が５４±２５時間および２９±１６時間、心臓が３６±１５時間および４２±１９時間、皮膚が４０±２１時間および３１±１３時間であったのに対し、脳における半減期は７１±２３時間および６０±５３時間であった。肝臓、皮膚、腎臓、心臓および脳のＣｍａｘの平均値は、１ｍｇ／ｋｇでは９．６μｇ／ｇ、０．３０μｇ／ｇ、０．２５μｇ／ｇ、０．２２μｇ／ｇおよび０．０８μｇ／ｇ、１０ｍｇ／ｋｇでは１３２μｇ／ｇ、７．９μｇ／ｇ、３．９μｇ／ｇ、３．７μｇ／ｇおよび１．８μｇ／であった。各個体のＣｍａｘ値を用量に対して正規化すると、１０ｍｇ／ｋｇのＣｍａｘ／投与の値は、上記すべての器官で１ｍｇ／ｋｇの値よりも有意に高かった（ｐ値のほとんどが０．０５未満、肝臓ではｐ＝０．０６）。肝臓、皮膚、腎臓、心臓および脳のＡＵＣｌａｓｔの値は、１ｍｇ／ｋｇでは５２５時間・μｇ／ｇ、１６時間・μｇ／ｇ、１４時間・μｇ／ｇ、９時間・μｇ／ｇおよび７時間・μｇ／ｇであり、１０ｍｇ／ｋｇでは６７４７時間・μｇ／ｇ、２７６時間・μｇ／ｇ、１８３時間・μｇ／ｇ、２０１時間・μｇ／ｇおよび８６時間・μｇ／ｇであった。正規化後の１０ｍｇ／ｋｇにおけるＡＵＣｌａｓｔ／投与の値は、皮膚では１ｍｇ／ｋｇの値よりも有意に高く（ｐ＜０．０１）、心臓ではわずかな差が見られ（ｐ＝０．０６）、肝臓、脳および腎臓では有意な差がなかった（ｐ値はすべて０．３４を上回った）。

【０５６７】

同じ用量のＨＮＳを注射した場合、髄腔内投与では静脈内投与よりも３ｌｏｇだけ大きい脳曝露量が得られた。脳における消失半減期は、ＩＴでは２日、ＩＶ投与では３日であった。しかし、ＩＴ投与後の肝臓の曝露量は、同じ用量のＨＮＳでＩＶ投与後の曝露量と同程度であった。１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇのＩＴ／ＩＶによる肝臓での曝露量（ＣｍａｘおよびＡＵＣｌａｓｔ）は、０．４～１．２の範囲であった。

【０５６８】

実験計画

中枢神経系（ＣＮＳ）は大部分のリソソーム蓄積症に対して弱く、サンフィリッポ症候群Ａ型またはＢ型（ムコ多糖症ＩＩＩ）、異染性白質ジストロフィー（ＭＬＤ）およびハンター症候群のようないくつかのタイプの上記疾患では重度の損傷を受ける。本明細書に

記載されているように、末梢投与した場合は血液脳関門を透過しにくいため、酵素タンパク質をＣＮＳ内への直接投与することにより、中枢神経組織での酵素タンパク質の濃度が増加し、さらにその治療効果が増強され得るということが考慮される。本試験では、異なる用量レベルで髄腔内（ＩＴまたは大槽）投与を調べてＩＶ投与と比較した。

【０５６９】

ＰＥＴは非侵襲性の反復可能な定量技術であり、対象器官における薬物濃度の経時的な動的変化がわかる。標的器官（血液循環中以外の活性部位）における動的な濃度－時間のデータは有用であり、投与薬物の生物活性に直接関連するものである。さらに、動物でのＰＥＴ試験から得られた組織曝露量に関する情報を、ヒトでの初回投与量の選択の指針として利用することができる。

【０５７０】

材料および方法

被検試料

ＨＮＳ濃度が２０ｍｇ／ｍｌのヘパリンＮ－スルファターゼ（ＨＮＳ）を、１４５ｍＭ塩化ナトリウムを含むｐＨ７．０の５ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液中で調製した。この材料をＲＰ－ＨＰＬＣにより精製して、９９．９％が二量体であるヘパリンＮ－スルファターゼを９８．７％含有させた。ＨＮＳをヨウ素１２４で標識した。

【０５７１】

試料入手源

放射活性画像を、$^{124}$Ｉ－Ｈ－Ｎ－スルファターゼを１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇでＩＶおよびＩＴ投与した後のラットから得た。

【０５７２】

動物

１６匹の雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットを Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社から購入し（１９０±６０ｇ、ｎ＝１６）、４群（ｎ＝４）に分けた。上記の各ラット群（全４群）に対し、異なる用量（１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇ）で単回のＩＶまたはＩＴ注射を行った。用量および注射量を、各個体の体重に基づき個々に調節した。２つのＩＶ処置群では、３５ｍｇ／ｋｇの用量のペントバルビタールナトリウムのＩＶ注射により鎮静化を行った。静脈内投与を、尾静脈からボーラス注射で行った。２つのＩＴ処置群では、５０ｍｇ／ｋｇの用量でペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与してマウスを麻酔した。髄腔内投与を、大槽レベルで環椎後頭膜から１分間にわたって行った。実際に投与された放射活性をＰＥＴにより測定し、注射量として用いた。

【０５７３】

実験方法および／またはアッセイ方法

ＩＶ注射後に心臓（肺を含む）、肝臓および腎臓の領域において、ＩＴ投与後に頭部領域において、最初の２０分間の動態像（２分ごと）を２つ用量で得た。投与の０．０５（ＩＴ群のみで入手）、１、２、４、８、２４、４８、９６および１９２時間後に、ＩＶ処置群では脳（脳脊髄液ＣＳＦを含む）、肝臓、腎臓、心臓（肺を含む）、筋肉、皮膚および骨を含む領域において、ＩＴ処置個体では頭部、脳（ＣＳＦを含む）および肝臓の領域において静態像を得た。画像を再構築して、３つの身体断面を１つの画像に融合した。

【０５７４】

データ解析

ＰＥＴデータを１ｍＬ当たり（液体）または１ｇ当たり（組織）のナノキュリー（ｎＣｉ）数で表した。静態像での脳、肝臓、腎臓、骨格筋、胃、心臓（肺を含む）および皮膚領域の相対活性を得た。ＩＴ注射した個体の頭部または脳領域全体の絶対活性を得た。ＩＴ注射した個体の脊柱１ミリメートル当たりの放射活性を、３つの選択した断面；近位（頸部）、中位（肝臓上端の背部）および遠位（タンパク質を含む区画の遠位端から１ｃｍのところ）の脊椎において決定した。

【０５７５】

全データを$^{124}$Ｉの崩壊半減期（１００．２時間）により補正し、外部で測定された活性による$^{124}$Ｉ源の較正に基づく有効な位置合せ対して正規化した。次いで、データを全領域（頭部および脳）の注射量（％ＩＤ）または組織１グラム当たりの％ＩＤ（％ＩＤ／ｇ）の百分率として表した後、体重２００グラムに対して正規化した［データの正規化：（％ＩＤまたは％ＩＤ／ｇ）／個体体重×２００］。各群４個体しか使用しなかったため、正規化を導入してデータのばらつきを低減した。

【０５７６】

本試験では、各個体に注射したタンパク質投与量を用いて、ＨＮＳタンパク質の濃度または量を以下のように計算した：タンパク質濃度（μｇ／ｇ）＝（％ＩＤ／ｇ）×（注射量のｍｇ／ｋｇ×１０００×０．２）；対象領域における投与タンパク質の総投与量（μｇ）＝％ＩＤ×（注射量のｍｇ／ｋｇ×１０００×０．２）、ここで、注射量は１ｍｇ／ｋｇまたは１０ｍｇ／ｋｇであり、０．２は体重に対する正規化係数である。４つの各群の個々の非コンパートメントデータに基づき、群の各ＰＫパラメーターの平均および標準偏差を計算した。Ｓｔｕｄｅｎｔのｔ検定を行って、λｚ、ｔ１／２、ＣｍａｘおよびＡＵＣの値を２つの試験用量間および２つの投与経路間で比較した。統計的有意性は、ｐ値が０．０５未満（ｐ＜０．０５）であることと定めた。

【０５７７】

結果

下の表、図およびＰＫ解析中のＨＮＳの量（μｇ）または濃度（μｇ／ｇ）を、注射したタンパク質投与量（１ｍｇ／ｋｇまたは１０ｍｇ／ｋｇ）と、対応する％ＩＤまたは％ＩＤ／ｇの値とを乗じることにより計算した。

【０５７８】

１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇの用量での$^{124}$Ｉ－ＨＮＳによる髄腔内処置

動態像から得られた頭部領域での投与タンパク質の量（μｇ）を、時間の関数として図１５１にプロットした。静態像から得られた脳領域での濃度（μｇ／ｇ）を、時間の関数として図１５２にプロットした。静態像から得られた、脳および脳領域内の注射したタンパク質の総量（μｇ）を、時間とともにそれぞれ図１５３および図１５４にプロットした。近位、中位および遠位脊椎の濃度－時間曲線（μｇ／ｍｍ）を図１５５～図１５７に示す。図１５８は、肝臓中のＨＮＳ濃度（μｇ／ｇ）の変化を、１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇでの$^{124}$Ｉ－ＨＮＳのＩＴ投与後の時間とともに示したものである。

【０５７９】

総量－時間（μｇ）または濃度－時間（μｇ／ｇ）のデータを非コンパートメントモデル（ＷｉｎＮｏｎｌｉｎ　５．２、Ｐｈａｒｓｉｇｈｔ、Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ、ＣＡ）により解析した。一定の消失速度（λｚ）、ピーク濃度（Ｃｍａｘ）、終末相半減期（ｔ１／２）、血中濃度曲線下面積（ＡＵＣｌａｓｔおよびＡＵＣ０－ｉｎｆ）などのＰＫパラメーターを、各個体のデータから推定した。

【０５８０】

クリアランス速度および分布容積を推定したが、本報告では、以下のような２つの理由で、２つの用量間および２つの投与経路間でのＰＫ比較には使用しなかった：（１）本試験は、血中ＰＫではなく固体組織中のＨＮＳの生体内分布に焦点を当てたものであった；（２）脳領域の放射活性は脳組織（固体）とＣＳＦ（液体）の放射活性の合計であり、本試験では両者を互いに分離することができなかった。λｚは単位時間当たりに消失した注射量の百分率を示すものであったため、これを評価して比較に用いた。

【０５８１】

群の平均および標準偏差（ＳＤ）を計算し、２つの用量間で比較した。これらのＰＫパラメーターを下の表４８にまとめる。

【０５８２】

【表４８】

表４８

| 1 mg/kg IT | 脳 (ug/g)＊ | | 肝臓 | | 脳 (ug)# | | 頭部 (ug)# | | 近位 | | 中位 | | 遠位 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| パラメーター | 平均 | SD | 平均 | SD | 平均 | SD | 平均 | SD | 平均 | SD | 平均 | SD | 平均 | SD |
| λz | 0.016 | 0.003 | 0.030 | 0.011 | 0.017 | 0.002 | 0.016 | 0.002 | 0.025 | 0.012 | 0.020 | 0.008 | 0.028 | 0.016 |
| $t_{1/2}$ | 45 | 7 | 28 | 16 | 42 | 5 | 45 | 7 | 32 | 13 | 39 | 16 | 30 | 12 |
| $T_{max}$ | 0.1 | 0.0 | 2.3 | 1.3 | 2.0 | 4.0 | 0.1 | 0.0 | 0.3 | 0.5 | 1.8 | 1.5 | 1.0 | 0.0 |
| $C_{max}$ | 257.0 | 89.9 | 4.9 | 1.3 | 68.6 | 8.0 | 200.1 | 0.0 | 0.5 | 0.1 | 0.2 | 0.0 | 0.1 | 0.0 |
| $AUC_{last}$ | 8393 | 2457 | 204 | 50 | 3809 | 622 | 8216 | 782 | 9 | 3 | 7 | 3 | 2 | 1 |
| $AUC_{inf.}$ | 8942 | 2416 | 216 | 57 | 4030 | 643 | 8904 | 1069 | 11 | 3 | 8 | 3 | 3 | 2 |
| $MRT_{last}$ | 46 | 6 | 32 | 13 | 44 | 5 | 46 | 5 | 31 | 17 | 34 | 20 | 16 | 5 |
| 10 mg/kg IT | | | | | | | | | | | | | | |
| λz | 0.014 | 0.001 | 0.017 | 0.000 | 0.014 | 0.001 | 0.010 | 0.001 | 0.018 | 0.008 | 0.014 | - | 0.006 | - |
| $t_{1/2}$ | 49 | 4 | 42 | 1 | 51 | 5 | 70 | 9 | 45 | 18 | 50 | - | 123 | - |
| $T_{max}$ | 0.1 | 0.0 | 7.0 | 2.0 | 0.1 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.3 | 0.5 | 8.7 | 13.3 | 8.0 | - |
| $C_{max}$ | 2628 | 265 | 105 | 41 | 836 | 117 | 1844 | 314 | 6 | 4 | 1 | 0 | 1 | - |
| $AUC_{last}$ | 83962 | 10083 | 7987 | 3276 | 59115 | 8624 | 128751 | 15723 | 83 | 67 | 35 | 20 | 38 | - |
| $AUC_{inf.}$ | 89460 | 12098 | 8345 | 3424 | 63836 | 9466 | 151405 | 15123 | 98 | 66 | 60 | - | 73 | - |
| $MRT_{last}$ | 56 | 1 | 51 | 1 | 58 | 2 | 65 | 3 | 31 | 2 | 32 | 7 | 61 | - |

| 1 mg/kg IV | 脳 (ug/g)＊ | | 肝臓 | | 腎臓 | | 心臓 | | 皮膚 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| λz | 0.011 | 0.005 | 0.015 | 0.003 | 0.016 | 0.009 | 0.021 | 0.006 | 0.021 | 0.010 |
| $t_{1/2}$ | 71 | 23 | 47 | 10 | 54 | 25 | 36 | 15 | 40 | 21 |
| $T_{max}$ | 7 | 12 | 5 | 4 | 10 | 12 | 2 | 1 | 5 | 4 |
| $C_{max}$ | 0.1 | 0.0 | 9.6 | 1.5 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.0 | 0.3 | 0.1 |
| $AUC_{last}$ | 7 | 2 | 525 | 104 | 14 | 5 | 9 | 3 | 16 | 4 |
| $AUC_{inf.}$ | 9 | 3 | 576 | 138 | 16 | 6 | 10 | 3 | 18 | 5 |
| $MRT_{last}$ | 61 | 16 | 47 | 5 | 47 | 18 | 36 | 13 | 41 | 16 |
| 10 mg/kg IV | | | | | | | | | | |
| λz | 0.102 | 0.180 | 0.021 | 0.012 | 0.035 | 0.024 | 0.020 | 0.010 | 0.026 | 0.012 |
| $t_{1/2}$ | 60.5 | 53.1 | 37.8 | 13.4 | 28.4 | 16.4 | 41.6 | 18.6 | 31.0 | 12.7 |
| $T_{max}$ | 13 | 12 | 2 | 1 | 12 | 11 | 16 | 9 | 3 | 1 |
| $C_{max}$ | 1.8 | 0.2 | 131.6 | 26.8 | 3.9 | 0.7 | 3.7 | 0.7 | 7.9 | 2.3 |
| $AUC_{last}$ | 86 | 66 | 6747 | 2837 | 183 | 123 | 201 | 89 | 276 | 40 |
| $AUC_{inf.}$ | 118 | 98 | 7171 | 3029 | 198 | 131 | 230 | 110 | 292 | 43 |
| $MRT_{last}$ | 43 | 32 | 40 | 14 | 33 | 21 | 41 | 18 | 33 | 13 |

【０５８３】

投与後の最初の２０分間に、頭部領域のＨＮＳの総量（ｕｇ）が、１ｍｇ／ｋｇでは１分当たり０．００２～０．０１１（λｚ、０．００５±０．００４／分）、１０ｍｇ／ｋｇでは１分当たり０．００３～０．０１０（０．００７±０．００３／分）の一定速度で減少した。これら２つの用量レベルの一定の消失速度の間に有意な差は見られなかった（ｐ＝０．５７、図１５１）。

【０５８４】

脳の濃度－時間曲線（μｇ／ｇ、０．０５～１９２時間）は、二相性のプロファイルを示した（図１５２）。初期相は約２時間続く。一次速度過程の後に終末相が続く。脳の一定の消失速度は、２つの試験した用量において非常に類似し（１時間当たり０．００１６±０．００３および０．０１４±０．００１）、約２日という半減期も類似していた（１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇにおいてそれぞれ４５±７および４９±４時間）。ピーク濃度の値（２５７±９０および２６２８±２６５μｇ／ｇ）およびＡＵＣｌａｓｔ（１

ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇにおいてそれぞれ８３９３±２４５７および８３９６２±１００８３時）は、用量を１ｍｇ／ｋｇから１０ｍｇ／ｋｇに増加させると約１０倍増加する。上記の観察は、これらのＩＴ単回投与レジメンでの１～１０ｍｇ／ｋｇの範囲の用量における直線的なＰＫ挙動を示していた。脳ではピーク濃度がＩＴ投与の３分後（Ｔｍａｘ）に現れた。

【０５８５】

脳および頭部領域の総量－時間曲線（μｇ、０．０５～１９２時間）は、脳の濃度－時間曲線（μｇ／ｇ）で見られたものと同じ二相性のパターンに従っていた（図１５３および図１５４）。脳領域のＣｍａｘの値は、頭部領域の値よりも有意に低かった（それぞれ、１ｍｇ／ｋｇでは６９±８と２００±０、ｐ＜０．０１；１０ｍｇ／ｋｇでは８３６±１１７と１８４４±３１４ｕｇ、ｐ＜０．０１）。一定の消失速度は、１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇにおいてそれぞれ、脳では０．０１７±０．００２／時と０．０１４±０．００１／時、頭部領域では０．０１６±０．００２／時と０．０１０±０．００１／時であった。平均残留時間の値は、１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇにおいてそれぞれ、脳では４２±５時間と５１±５時間（ｐ＝０．０４８）、頭部では４５±７時間と７０±９時間（ｐ＜０．０１）であった。これらの観察は、投与タンパク質が、低用量において高用量よりも速く両領域から消失することを示していた。ＨＮＳの１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇでのＩＴ投与後のこれらの領域における平均半減期は、４２～７０時間の範囲であった。

【０５８６】

脊椎の近位部分から中位部分および遠位部分にかけての濃度勾配が両用量レベルで観察された（データ不掲載）。ＩＴ投与後に、ピーク濃度（μｇ／脊柱ｍｍ）が、近位部分では３０分前後（０～１時間）、中位部分では１～４時間（２４時間である１匹のラットを除く）、遠位部分では１～８時間で見られた。これらの部位における半減期には、ばらつきが見られた（平均ｔ１／２：１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇにおいてそれぞれ、脊椎の近位部分では３２±１３時間と４５±１８時間、中位部分では３９±１６時間と約５０時間、遠位部分では３０±１２時間と約１２３時間）。１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇの$^{124}$Ｉ－ＨＮＳでのピーク濃度の平均値は、これら３つの各部位においてほぼ用量に比例していた（脊椎の近位部分、中位部分および遠位部分において、それぞれ０．５μｇ／ｍｍと６．０μｇ／ｍｍ、０．２μｇ／ｍｍと０．９μｇ／ｍｍ、０．１μｇ／ｍｍと０．５μμｇ／ｍｍ）。ＡＵＣｌａｓｔの平均値は、ピーク濃度で見られたものと同じ比例パターンに従っていた（近位部位、中位部位および遠位部位において、それぞれ９．５時間・μｇ／ｍｍと８３時間・μｇ／ｍｍ、６．８時間・μｇ／ｍｍと３５時間・μｇ／ｍｍ、２時間・μｇ／ｍｍと３８時間・μｇ／ｍｍ）。

【０５８７】

ほとんどの末梢器官ではＨＮＳが検出不可能であったが、肝臓においては、ＩＴ投与後の早くて１時間後（投与後の最初の画像化時点）から、１ｍｇ／ｋｇでは９６時間後（４個体のうち３個体）まで、１０ｍｇ／ｋｇでは１９２時間後（全４個体）まで測定可能であった（図１５８）。肝臓での濃度は、１ｍｇ／ｋｇのＩＴ投与の２時間後、１０ｍｇ／ｋｇのＩＴ投与の７時間後にピークに達し、この後に一次速度過程を伴う消失相が続いた。一定の消失速度は１ｍｇ／ｋｇ（λｚ：０．０３０±０．０１１／時）の方が１０ｍｇ／ｋｇ（λｚ：０．０１７±０／時）よりも速く（ｐ＝０．１０）、これは１ｍｇ／ｋｇの方がｔ１／２が短い（１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇの用量で、それぞれ２８±１６時間と４２±１時間、ｐ＝０．７６）ことに対応していた。１ｍｇ／ｋｇのＡＵＣｌａｓｔ値は、１０ｍｇ／ｋｇの値と比べて約４０倍減少していた（それぞれ２０４±５０μｇ／ｇと７９８７±３２７６μｇ／ｇ）。

【０５８８】

１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇの用量での$^{124}$Ｉ－ＨＮＳによる静脈内処置

脳、肝臓、腎臓、心臓（肺組織を含む）および皮膚における濃度を、ぞれぞれ図１５９～図１６３に示されるように、１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇでのＨＮＳのＩＶ投与

後の時間の関数としてプロットした。本試験では、これらの器官の最初の静態像の時点が投与の１時間後であったため、これらの濃度－時間曲線の初期相を観察することはできない。肝臓、腎臓、心臓および皮膚の濃度－時間曲線は、ＩＶ投与後の１～８時間では平坦相を示した。脳では、この平坦相が投与後２４時間続いたが、このことは、脳が末梢器官よりも時間をかけてＩＶ投与タンパク質を吸収したことを示している。残りのデータは、ほぼ一次速度過程を伴う終末消失相を示していた。

【０５８９】

肝臓、腎臓、心臓および皮膚における消失半減期は、１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇにおいてそれぞれ、肝臓では４７±１０時間と３８±１３時間、腎臓では５４±２５時間と２９±１６時間、心臓では３６±１５時間と４２±１９時間、皮膚では４０±２１時間と３１±１３時間であったのに対し、脳での半減期は、１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇにおいて、それぞれ７１±２３時間と６０±５３時間であった（１０ｍｇ／ｋｇ群のラット３は、ｔ１／２を決定するためのデータが不十分なため除外した）。ｐ値＜０．０３の腎臓を除くこれらの器官では、１ｍｇ／ｋｇの半減期と１０ｍｇ／ｋｇの半減期との間に統計的な差は見られなかった。

【０５９０】

肝臓、皮膚、腎臓、心臓および脳のＣｍａｘの平均値は、１ｍｇ／ｋｇでは９．６μｇ／ｇ、０．３μｇ／ｇ、０．２５μｇ／ｇ、０．２２μｇ／ｇおよび０．０８μｇ／ｇ、１０ｍｇ／ｋｇでは１３２μｇ／ｇ、７．９μｇ／ｇ、３．９μｇ／ｇ、３．７μｇ／ｇおよび１．８μｇ／ｇであった。上記器官における１０ｍｇ／ｋｇでのＣｍａｘ値の１ｍｇ／ｋｇでの対応する値に対する比は、１４、２６、１６、１７および２３であった。各個体のＣｍａｘ値を用量に対して正規化すると、上記の全器官において、１０ｍｇ／ｋｇにおけるＣｍａｘ／投与の値は、１ｍｇ／ｋｇにおける値よりも有意に高かった（ｐ値のほとんどが０．０５未満、肝臓ではｐ＝０．０６）。肝臓、皮膚、腎臓、心臓および脳のＡＵＣｌａｓｔの値は、１ｍｇ／ｋｇでは５２５時間・μｇ／ｇ、１６時間・μｇ／ｇ、１４時間・μｇ／ｇ、９．３時間・μｇ／ｇおよび７時間・μｇ／ｇ；１０ｍｇ／ｋｇでは６７４７時間・μｇ／ｇ、２７６時間・μｇ／ｇ、１８３時間・μｇ／ｇ、２０１時間・μｇ／ｇおよび８６時間・μｇ／ｇであった。上記器官における１０ｍｇ／ｋｇでのＡＵＣｌａｓｔの１ｍｇ／ｋｇでの対応するＡＵＣｌａｓｔ値に対する比はそれぞれ、１３、１７、１３、２２および１２であった。正規化すると、皮膚では１０ｍｇ／ｋｇにおけるＡＵＣｌａｓｔ／投与が１ｍｇ／ｋｇにおける値よりも有意に高く（ｐ＜０．０１）、心臓ではわずかな差が見られ（ｐ＝０．０６）、肝臓、脳および腎臓では有意な差が見られなかった（ｐ値はすべて０．３４を上回った）。

【０５９１】

これらの観察により、以下のことが示された：（１）ほとんどの器官における半減期は、脳（約３日）を除き約２日であった；（２）肝臓における１グラム当たりの曝露量は皮膚、心臓および腎臓よりも高く、これら３つの曝露量は脳よりも高いかった；（３）用量が１０倍増加すると（１０／１ｍｇ／ｋｇ）、全試験器官の１０ｍｇ／ｋｇでのＣｍａｘ値が１ｍｇ／ｋｇでの値よりも１０倍増加した。

【０５９２】

脳では、ＩＶ投与の１～２４時間後（Ｔｍａｘ）にピーク濃度に達した。

【０５９３】

ＩＶ処置とＩＴ処置の比較

１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇでのＩＶおよびＩＴ投与後の脳および肝臓における濃度－時間曲線を、ぞれぞれ図１６４および図１６５で比較する。脳におけるＩＴ／ＩＶのＣｍａｘの比は、１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇにおいて、それぞれ３２１２および１５０１であった。ＡＵＣ０－１９２時間のこの比は１１３６および９７８であった。これらの観察は、同じ用量のＨＮＳを注射した場合、髄腔内投与により、脳での曝露量が静脈内投与よりも約３１ｏｇ高い曝露量となることを示していた。脳における消失半減期は、両用量レベルにおいて、ＩＴ投与では２日（１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇで４

５時間および４９時間）、ＩＶ投与では３日（１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇで７１時間および６０時間）であった。しかし、ＩＴ投与後の肝臓における曝露量は、同じ用量のＨＮＳでＩＶ投与後の曝露量と同等であった。肝臓における１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇでのＩＴ／ＩＶのＣｍａｘの比は、それぞれ０．５と０．８、ＡＵＣｌａｓｔの比は、それぞれ０．４と１．２であった。

【０５９４】

結論

$^{124}$Ｉ－スルファミダーゼ（ＨＮＳ）の薬物動態および生体内分布プロファイルを、１ｍｇ／ｋｇまたは１０ｍｇ／ｋｇの$^{124}$Ｉ－スルファミダーゼの静脈内または髄腔内単回投与後のラットにおける組織ＰＥＴ画像により調べた。対象領域における、投与の０．０５、１、２、４、８、２４、４８、９６および１９２時間後の動的（最初の２０分）および静的な濃度－時間データが得られた。ＩＴ投与後の動態像では、頭部領域のＨＮＳの総量が、最初の２０分間に０．００５／分～０．００７／分（平均λｚ）の類似した一定速度で減少していた。静態像では、脳からの消失速度は、試験した２つの用量で基本的に同じであり（λｚ：１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇでそれぞれ０．０１６／時と０．０１４／時）、半減期も約２日で同様であった。

【０５９５】

上記ＩＴ単回投与レジメンで投与された１～１０ｍｇ／ｋｇの用量範囲において、ＣｍａｘおよびＡＵＣｌａｓｔの値は投与量に比例し、直線的ＰＫ挙動が示された。

【０５９６】

両用量レベルにおいて、近位脊椎から遠位脊椎にかけて濃度勾配が観察された。

【０５９７】

ＩＴ投与後、近位部分では２０分前後で、中位部分では１～４時間で、遠位部分では１～８時間でピーク濃度が見られた。脊椎の異なる部分において、直線的ＰＫ挙動も示された。

【０５９８】

ＩＴ投与後、肝臓においては、ＨＮＳタンパク質が１ｍｇ／ｋｇでは非常に早期から９６時間後にかけて、１０ｍｇ／ｋｇでは非常に早期から１９２時間後にかけて測定可能であった。消失速度は１ｍｇ／ｋｇ（λｚ：０．０３０／時）の方が１０ｍｇ／ｋｇ（λｚ：０．０１７／時）よりも速く、これは低用量の方がｔ１／２が短いことに対応していた（１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇの用量でそれぞれ２８±１６時間および４２±１時間）。

【０５９９】

肝臓、腎臓、心臓および皮膚におけるＩＶ投与後の消失半減期は、１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇにおいてそれぞれ、肝臓では４７±１０時間と３８±１３時間、腎臓では５４±２５時間と２９±１６時間、心臓では３６±１５時間と４２±１９時間、皮膚では４０±２１時間と３１±１３時間であったのに対し、脳での半減期は、１ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇにおいて、それぞれ７１±２３時間と６０±５３時間であった。肝臓、皮膚、腎臓、心臓および脳のＣｍａｘの平均値は、１ｍｇ／ｋｇでは９．６μｇ／ｇ、０．３μｇ／ｇ、０．２５μｇ／ｇ、０．２２μｇ／ｇおよび０．０８μｇ／ｇ、１０ｍｇ／ｋｇでは１３２μｇ／ｇ、７．９μｇ／ｇ、３．９μｇ／ｇ、３．７μｇ／ｇおよび１．８μｇ／ｇであった。各個体のＣｍａｘ値を用量に対して正規化すると、上記の全器官において、１０ｍｇ／ｋｇにおける$C_{max}$／投与の値は、１ｍｇ／ｋｇにおける値よりも有意に高かった（ｐ値のほとんどが０．０５未満、肝臓ではｐ＝０．０６）。肝臓、皮膚、腎臓、心臓および脳のＡＵＣｌａｓｔの値は、１ｍｇ／ｋｇでは５２５時間・μｇ／ｇ、１６時間・μｇ／ｇ、１４時間・μｇ／ｇ、９．３時間・μｇ／ｇおよび７時間・μｇ／ｇ；１０ｍｇ／ｋｇでは６７４７時間・μｇ／ｇ、２７６時間・μｇ／ｇ、１８３時間・μｇ／ｇ、２０１時間・μｇ／ｇおよび８６時間・μｇ／ｇであった。正規化すると、皮膚では１０ｍｇ／ｋｇにおけるＡＵＣｌａｓｔ／投与が１ｍｇ／ｋｇでの値よりも有意に高く（ｐ＜０．０１）、心臓ではわずかな差が見られ（ｐ＝０．０６）、肝臓、脳お

よび腎臓では有意な差が見られなかった（ｐ値はすべて０．３４を上回った）。
【０６００】
実施例２３：ＨＮＳによるサンフィリッポ症候群Ａ型（サンフィリッポＡ）患者の治療
例えばＩＴ送達による、ＣＮＳへの直接投与を用いて、サンフィリッポＡ患者を効果的に治療することができる。本実施例は、サンフィリッポＡの患者に対して、隔週（ＥＯＷ）、全４０週で、髄腔内薬物送達装置（ＩＤＤＤ）により投与する、３用量レベルまでのｒｈＨＮＳの安全性を評価するために計画された、多施設用量漸増試験を示すものである。ヒト治療に適した髄腔内薬物送達装置の様々な例を、図９４～９７に図示する。
【０６０１】
最大２０患者まで登録：
コホート１：５患者（最低用量）
コホート２：５患者（中間用量）
コホート３：５患者（最高用量）
無作為に５患者を無治療とする。
【０６０２】
以下の基準を含むか否かに基づき、試験する患者を選択する：
【０６０３】
サンフィリッポＡの小児において、４０週間、用量を漸増してＩＴ注射により投与するＨＮＳの安全性を判定する。さらに、認知機能に対するＨＮＳの臨床活性、ならびに単回および反復投与の血清中薬物動態および脳脊髄液（ＣＳＦ）中濃度を評価する。
【０６０４】
ＮＡＧＬＵ－ＩＧＦＩＩのＩＴ送達の例
実施例２４：ｒｈＮａｇｌｕおよびＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩのｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験　サンフィリッポＢ患者線維芽細胞の２種類の株であるＧＭ０２３９１（Ｐ３５９Ｌ）およびＧＭ０１４２６（Ｅ１５３Ｋ）、ならびに正常ヒト線維芽細胞系を用いて、Ｎａｇｌｕの各変異体による細胞内取込みの機序が研究されてきた。線維芽細胞は、その細胞系でＭ６Ｐ受容体が発現されることを理由に、リソソーム酵素の細胞内取込み試験のために、研究者により伝統的に使用されている。
【０６０５】
線維芽細胞をｒｈＮａｇｌｕまたはＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩとともに３７℃で４時間、インキュベートすることにより、細胞内取込み試験を行った。インキュベーション後に細胞を洗浄して溶解させ、細胞溶解物中のＮａｇｌｕ酵素活性を測定した。ｒｈＮａｇｌｕと線維芽細胞とのインキュベーションでは、細胞内に検出可能な酵素はほとんど見られなかった。これに対し、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩと線維芽細胞とのインキュベーションでは、細胞内に顕著なレベルの酵素が見られた（図１６６）。内部に取り込まれたＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの量は、インキュベーションに用いる酵素の量を増加させるにつれて飽和に達した。用量依存的な取込みの飽和は、受容体介在型の細胞内取込みの典型的な結果である。さらに、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの内部取り込みは、外因性のＭ６Ｐによっては阻害されなかったが、外因性のＩＧＦＩＩによって完全に阻害された（図１６６）。この結果は、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの線維芽細胞への内部取り込みが、グリコシル化とは無関係にＭ６Ｐ／ＩＧＦＩＩ受容体に依存することを示していた。
【０６０６】
また、ｒｈＮａｇｌｕおよびＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩのリソソームへの輸送を試験する実験も行った。サンフィリッポＢ患者線維芽細胞（ＧＭ０１４２６）を本試験に使用した。最初にタンパク質と細胞とインキュベートした後に、細胞を抗ヒトＮａｇｌｕポリクローナル抗体で染色することにより、ｒｈＮａｇｌｕおよびＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの検出を調べた。ＬＡＭＰ－１（リソソーム膜タンパク質１）の免疫蛍光染色をリソソームの検出に用いた。ｒｈＮａｇｌｕおよびＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩのリソソームとの共局在を共焦点顕微鏡により可視化した（図１６７）。
【０６０７】

タンパク質と細胞のインキュベーションの４時間後に、広範なＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの内部取り込みが観察され、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩとリソソームの共局在が示された。これに対し、同じ時間内でｒｈＮａｇｌｕの内部取込みは示されず、リソソームとの共局在は観察されなかった。さらにこの結果は、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩが細胞内に取り込まれ、適切な細胞区画であるリソソームへ輸送されるという証拠を与えるものであった。内部の取り込まれたＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩのサンフィリッポＢ患者線維芽細胞内での半減期は１．５日であると決定された（データ不掲載）。

【０６０８】

実施例２５：マウスモデルでのｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験

野生型（ｗｔ）カニューレ処置ラット

ｉｎ　ｖｉｖｏでの分子スクリーニングには、サンフィリッポＢマウスモデルに加え、欠損動物モデルではないｗｔカニューレ処置ラットも用いた。カニューレ処置ラットでは、脊髄の上腰部および下位胸部にカニューレを外科手術によりに埋入し、カニューレからＣＳＦへ３５μｌの単回注射を行った。この動物モデルを用いた分子スクリーニングで評価した基準は、脳および脊髄のＮａｇｌｕ活性アッセイおよび免疫組織化学であった。

【０６０９】

サンフィリッポ症候群Ｂ型マウスモデル

サンフィリッポ症候群Ｂ型のマウスモデル（Ｎａｇｌｕ－／－マウス、サンフィリッポＢマウス）はＥ．Ｎｅｕｆｅｌｄらにより作製された（Ｌｉ　ＨＨら，ＰＮＡＳ　９６（２５）：１４５０５－１４５１０；１９９９）。マウスＮａｇｌｕ遺伝子のエクソン６を、選択マーカーのネオマイシン耐性遺伝子の挿入により破壊する。得られたホモ接合体Ｎａｇｌｕ－／－マウスは完全にＮａｇｌｕ欠損であり（図１６８）、全ＧＡＧが肝臓および腎臓に蓄積される。Ｎａｇｌｕが完全に欠損しているにもかかわらず、このマウスは全般的に健康であり、寿命が８～１２か月ある。約５か月齢で他のリソソーム酵素発現の変化が起こり、このような変化としては、肝臓および脳におけるｓ－ガラクトシダーゼ、α－グルコシダーゼ、β－グルクロニダーゼおよびβ－ヘキソサミニダーゼの代償性増加、肝臓におけるα－Ｌ－イズロニダーゼの上昇（脳では見られない）、ならびに肝臓および脳におけるノイラミニダーゼの減少が挙げられる。通常、尿閉および尿路感染症の結果、死亡する。サンフィリッポＢの病理変化を叙述するために、サンフィリッポＢマウスモデルが文献中で広く研究されてきた。Ｎａｇｌｕ－／－マウスのＣＮＳ病理に関連する表現型に関しては、４．５か月齢での活動性低下が報告されているが、他の年齢での活動亢進も観察されている。

【０６１０】

Ｎａｇｌｕ－／－マウス神経病理変化に関しては、ＥＭ（電子顕微鏡）によるニューロン、マクロファージおよび上皮細胞の空胞および封入体が記載されている。これらの病理変化は通常、３３日齢から始まり、マウスの年齢が上がるとともに徐々に悪化する。アストロサイトおよびミクログリア細胞の活性化も組織病理学的解析により示されている。２種類のガングリオシドＧＭ２およびＧＭ３の生化学的分析では、脳における５倍および９倍の増加が示されている（ＧＭ２およびＧＭ３はＮａｇｌｕの直接の基質ではなく、短時間のＥＲＴ後に有意な減少を示すことが困難であり得るため、ＰＯＣのエンドバイオマーカーとして使用されなかった）。

【０６１１】

Ｎａｇｌｕ酵素活性およびＧＡＧレベルの測定による生化学的分析を行い、また抗ヒトＮａｇｌｕ抗体、抗ＬＡＭＰ－１抗体、抗Ｉｂａ－１抗体および抗ＧＦＡＰ抗体の免疫組織化学による組織学的解析を行った。本試験で使用した抗ヒトＮａｇｌｕ抗体は、ｗｔマウスの内因性マウスＮａｇｌｕまたはサンフィリッポＢマウスの変異Ｎａｇｌｕとは結合しないマウスモノクローナル抗体であった。ＬＡＭＰ－１免疫染色では、リソソーム膜タンパク質であるリソソーム膜タンパク質－１と結合する抗体を使用した。Ｉｂａ－１染色では、ミクログリア細胞およびマクロファージ細胞に特異的なイオン化カルシウム結合アダプタータンパク質と結合する抗体を使用した。ＧＦＡＰ染色では、アストロサイトに特

異的なグリア線維性酸性タンパク質と結合する抗体を使用した。

【０６１２】

サンフィリッポＢマウスへの頭蓋内（ＩＣ）注射によるｉｎ　ｖｉｖｏでの生物活性スクリーニング

本試験の目的は、Ｎａｇｌｕ酵素の生物活性をｉｎ　ｖｉｖｏで評価することであった。本試験では、サンフィリッポＢマウスの脳へのＩＣ注射によりタンパク質を投与した。本試験のためのサンフィリッポＢマウスの年齢を８週齢に厳密に一致させた。ＩＣ注射経路が、分子の有効性を評価するための最良の計画であった。神経細胞内に取り込まれてリソソーム蓄積を減少させる能力により、Ｎａｇｌｕタンパク質を評価した。免疫組織化学を用いて生体内分布を評価した。そして、リソソーム蓄積を、ＬＡＭＰ－１免疫染色法の陽性染色の数および大きさにより特徴付けた。

【０６１３】

サンフィリッポＢマウスの頭蓋から右側大脳皮質への直接注射によりＩＣ注射を行った。各個体に２マイクロリットルまたは３５μｇのＮａｇｌｕタンパク質を注射した。注射の７日後にマウスを屠殺した。注射の３、７および１４日後にマウスを屠殺する予備試験で、屠殺時間を予め定めた。予備試験から、免疫組織化学試験には注射の７日後が最適な時間であることが決定された。脳切片を横断面で切り（図１６９）、ＮａｇｌｕおよびＬａｍｐ－１による免疫染色を行った。ｒｈＮａｇｌｕ処置およびＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ処置サンフィリッポＢマウスにおけるニューロンおよびグリア細胞の両方への細胞内取込みが、抗ヒトＮａｇｌｕ抗体を用いた免疫組織化学により示された（図１７０および図１７１）。細胞内取込みに関して、ｒｈＮａｇｌｕ処置したサンフィリッポＢマウスとＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ処置したサンフィリッポＢマウスとの間に有意な差は見られなかった。さらに、ｒｈＮａｇｌｕ処置およびＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ処置マウスの両方の脳組織のＬＡＭＰ－１免疫染色は、リソソーム蓄積の有意なレベルの減少を示している。ｒｈＮａｇｌｕ処置およびＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ処置群両方におけるリソソーム蓄積減少のレベルは、正常ｗｔマウスとほぼ同じレベルであった。

【０６１４】

またリソソーム蓄積の減少は、ＩＣ注射後にＮａｇｌｕ－ＴＡＴ、Ｎａｇｌｕ－ＫｉｆおよびＰｅｒＴ－Ｎａｇｌｕで試験したサンフィリッポＢマウスでも観察された（データ不掲載）。本試験により、Ｎａｇｌｕのすべての変異体のｉｎ　ｖｉｖｏ生物活性が示された。

【０６１５】

別の試験では、Ｎａｇｌｕ欠損マウスに溶媒を、または代わりに、ＰＢＳに溶かした組換えＮａｇｌｕ－ＩｇＦ－ＩＩ融合タンパク質構築物（Ｎａｇｌｕ）を週１回の投与で１回、２回もしくは３回、ＩＴ投与した。未処置の野生型マウス群を未処置野性型対照として使用し、Ｎａｇｌｕを含まない溶媒を投与した。最後の注射の２４時間後にマウスを屠殺した後、免疫組織化学（ＩＨＣ）および組織病理学解析用に組織標本を作成した。

【０６１６】

組換えＮａｇｌｕのＩＴ投与後に、Ｎａｇｌｕ欠損マウス脳組織へのＮａｇｌｕの分布が明らかであった。図１７２Ａに示されるように、Ｎａｇｌｕ欠損マウスへの組換えＮａｇｌｕのＩＴ投与では、溶媒をＩＴ投与したＮａｇｌｕ欠損マウスに比べて、白質組織における細胞空胞化の広範な減少がもたらされた。同様に、図１７２Ｂに示されるように、形態計測学的解析により、処置マウスの白質組織におけるＬＡＭＰ１免疫染色が、未処置Ｎａｇｌｕ欠損マウスに比べて顕著に減少していることが明らかとなり、これは疾患病態の改善を示すものである。

【０６１７】

図１７３Ａ～１７３Ｂに示されるように、評価した脳組織の各領域（皮質、尾状核および被殻（ＣＰ）、視床（ＴＨ）、小脳（ＣＢＬ）ならびに白質（ＷＭ））では、Ｎａｇｌｕ処置マウスにおいて、ＬＡＭＰ陽性領域が未処置のＮａｇｌｕ欠損対照マウスに比べて減少し、野性型マウスのＬＡＭＰ陽性領域にほぼ近かった。Ｎａｇｌｕの２回または３回

のＩＴ投与後に、解析した脳組織の各領域のＬＡＭＰ陽性領域が、単回投与に比べてさらに減少していたのは特に注目すべきことである（図１７３Ａ）。

【０６１８】

これらの結果により、ＩＴ投与したＮａｇｌｕが、Ｎａｇｌｕ欠損マウスモデルにおいてサンフィリッポ症候群Ｂ型のようなリソソーム蓄積症の進行を変化させることができることが確認され、さらに、ＩＴ投与したＮａｇｌｕのような酵素が、サンフィリッポ症候群Ｂ型のようなリソソーム蓄積症に伴うＣＮＳ発症を治療することができることも確認される。

【０６１９】

ｗｔカニューレ処置ラットへの髄腔内（ＩＴ）注射による分子スクリーニング　本試験は、ポートによる薬物投与アプローチを直接模倣するものである。脳実質内への生体内分布を判定するために、Ｎａｇｌｕタンパク質をＩＴ注射によりｗｔカニューレ処置ラットに投与した。

【０６２０】

これらのラット内にあるカニューレは、脊髄の上腰部および下位胸部に留置されていた（図１７４）。ラットに３５μｌまたは３８５μｇのｒｈＮａｇｌｕ、Ｎａｇｌｕ－ＴＡＴ、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩおよびＰｅｒＴ－Ｎａｇｌｕをカニューレから注射した（溶解度の限度により、Ｎａｇｌｕ　Ｋｉｆは３８．５μｇしか注射されなかったが、これは他のＮａｇｌｕの１０倍少ない）。注射の４時間および２４時間後に屠殺を行った。

【０６２１】

脳および脊髄の組織を採取し、Ｎａｇｌｕ活性アッセイによる測定を行った。処置個体の脳では、Ｎａｇｌｕ－ＴＡＴおよびＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ処置個体が、ｒｈＮａｇｌｕおよび他のすべてのＮａｇｌｕ変異体で処置した個体よりも高い活性を示した（図１７５）。全般的な傾向として、全処置個体において、脊髄でのＮａｇｌｕ活性の方が脳での活性よりも有意に高かった（データ不掲載）。この現象は、ＩＴ注射に近い部位ほどタンパク質が多く吸収されたことを示しているのかもしれない。

【０６２２】

免疫組織化学解析により、ＩＴ注射の２４時間後のＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ処置群の脳における生体内分布が、他のすべてのＮａｇｌｕ変異体で処置した群よりも広範であることが示された（図１７６および図１７７）。ｒｈＮａｇｌｕ処置個体では、タンパク質が脳の髄膜でのみ観察された。脊髄切片では、ＩＨＣにより、灰白質ニューロンでのｒｈＮａｇｌｕの細胞内取込みがいくらか示されたが、その程度は脊髄ニューロンでのＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ取込みに比べれば、はるかに少なかった（データ不掲載）。

【０６２３】

Ｎａｇｌｕ－ＴＡＴをＩＴ注射した群では、脳組織において最も高いＮａｇｌｕ活性が生化学的分析により観察されたが、ＩＨＣでは、髄膜に留まっているだけで、脳実質内へのＮａｇｌｕ－ＴＡＴの浸透は示されなかった。ＩＴ注射後の脳でのＮａｇｌｕの細胞内取込みがＭ６Ｐ／ＩＧＦＩＩ受容体に依存することの有力な証拠である、髄膜を越えた生体内分布が、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩを除く他のすべてのＮａｇｌｕ変異体において示されなかった。本試験により、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩがサンフィリッポＢのための薬物開発のリード分子であることが示された。

【０６２４】

実施例２６：ＮＡＧＬＵ－ＩＧＦＩＩを用いた概念実証試験実験計画

サンフィリッポＢマウスにおけるＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩのＩＴ注射後の生体内分布およびリソソーム蓄積の逆転の両方を示すための概念実証試験を計画した。本試験では、３群の８週齢のサンフィリッポＢマウスをＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩのＩＴ注射により処置した。各ＩＴ注射は、１０μｌ体積または２６０μｇのＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩであった。処置群は、１回注射群、２回注射群および３回注射の３つであった。１回注射群では、０日目にタンパク質の単回投与を行った。注射の２４時間後にマウスを屠殺した。２回注射群では、０日目と７日目に２回のＩＴ注射を行い、最後の注射の２４時間後にマウスを屠

殺した。３回注射群では、０日目、７日目および１４日目にＩＴ注射を行い、最後の注射の２４時間後にマウスを屠殺した。３群の溶媒処置マウスも含まれていた。溶媒対照群では、サンフィリッポＢマウスに処置群と同じ時間間隔で溶媒を注射し、処置群と同じ方法で屠殺した。

【０６２５】

試験結果の評価には、生化学的分析および組織学的解析の両方を適用した。生化学的分析には、組織中の酵素量を測定するＮａｇｌｕ活性アッセイおよびリソソーム蓄積の減少を評価する総ＧＡＧアッセイが含まれていた。肝臓および脳が生化学的分析の２つの対象組織であった（図１７８および図１７９）。組織学的解析には、形態学的評価のための組織のＨ＆Ｅ染色（データ不掲載）、ならびに抗ヒトＮａｇｌｕ抗体、ＬＡＭＰ、ＩｂａおよびＧＦＡＰによる免疫組織化学染色（ＩｂａおよびＧＦＡＰ染色は不掲載）が含まれていた。

【０６２６】

本試験で使用した抗ヒトＮａｇｌｕ抗体は、ｗｔマウスの内因性マウスＮａｇｌｕまたはサンフィリッポＢマウスの変異Ｎａｇｌｕと結合しないマウスモノクローナル抗体であった。ＡＭＰ－１免疫染色では、リソソーム膜タンパク質と結合する抗体を使用した。Ｉｂａ－１染色では、ミクログリア細胞およびマクロファージ細胞に特異的なイオン化カルシウム結合アダプタータンパク質と結合する抗体を使用した。ＧＦＡＰ染色では、アストロサイトに特異的なグリア線維性酸性タンパク質と結合する抗体を使用した。

【０６２７】

Ｎａｇｌｕ免疫蛍光法の代表的な顕微鏡像を図１８０に示す。図１８１には、代表的な脳の断面図が示されている。Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩは、髄膜に近い大脳皮質内では検出されたが、尾状核、視床および白質のような皮質下領域では見られなかった（データ不掲載）。同じ皮質下領域におけるＬＡＭＰ－１、Ｉｂａ－１およびＧＦＡＰの免疫染色ではリソソーム蓄積の逆転が確かに示されたことから、深部脳領域においてＮａｇｌｕ免疫染色が陰性であったのは、おそらくＮａｇｌｕ免疫蛍光法の感度が原因である考えられた。

【０６２８】

Ｌａｍｐ－１免疫染色の代表的な顕微鏡像を図１８２～図１８６に示す。タンパク質の分布および有効性の程度を示すために、大脳皮質、尾状核、視床および白質のような皮質下領域、ならびに小脳皮質を免疫組織化学解析のために選択した。Ｉｂａ－１およびＧＦＡＰ免疫染色の結果から（データ不掲載）、ＬＡＭＰ－１免疫染色で見られたものは、ニューロンに加え、サンフィリッポＢマウスモデルにおいて冒されることが報告されている２つの細胞型であるミクログリア細胞およびアストロサイト（Ｌｉ，２００２，Ｏｈｍｉ　２００２）における変化の複合効果であることが示された。技術的限界により、ニューロンにおけるリソソーム蓄積をＬＡＭＰ－１免疫染色で明らかにすることはできなかった。ニューロンで空胞および封入体のようなリソソーム蓄積を最も良好に観察するためには、電子顕微鏡法を通常用いる（本試験にはＥＭは含まれていなかった）。

【０６２９】

細胞型の同定がニューロンおよびグリア細胞に限定されていたことが理解されるであろう。ニューロンは一般に、１つ以上の濃染した核小体を含む比較的大型で淡色の核、および頻繁に検出される細胞質により同定された。グリア細胞は一般に、小型で濃い核および目立たない細胞質により同定された。異なる型のグリア細胞、例えばアストロサイト、ミクログリア細胞、上衣細胞およびオリゴデンドロサイトなどの区別は通常、細胞型に特異的なマーカーでの染色により行うのが最も良い。

【０６３０】

Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩのＩＴ注射後の大脳皮質、尾状核、視床、白質および小脳において、ＬＡＭＰ－１免疫染色により示されたリソソーム蓄積の減少に加え、ミクログリア細胞の大きさおよび突起の数の減少がＩｂａ－１免疫染色により示され、またアストロサイトの細胞の大きさおよび突起の長さ／数の減少がＧＦＡＰ免疫染色により示された（データ不掲載）。さらに、免疫組織化学で調べたものと同じ領域の脳組織のＨ＆Ｅ染色（ヘ

マトキシリンおよびエオシン）による組織病理学的解析では、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの３回のＩＴ注射後のグリア細胞内において空胞の減少が示された。また上記の結果はすべて、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩのＩＴ注射用量依存的効果も示していた。

【０６３１】

Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩのＩＴ注射後のサンフィリッポＢマウスの生化学的分析では、Ｎａｇｌｕ活性が脳および肝臓で検出された。脳および肝臓における総ＧＡＧの減少により、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの有効性が示された。免疫組織化学により、脳の実質におけるＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの生体内分布が示された。脳の大脳皮質領域だけでなく、脳の皮質下領域である白質および小脳皮質においても、リソソーム蓄積の減少、ミクログリア細胞およびアストロサイトの大きさおよび突起の減少がＬＡＭＰ－１、Ｉｂａ－１、ＧＦＡＰの免疫染色、およびＨ＆Ｅ染色による組織病理学的解析により示された。

【０６３２】

結論

特に、融合タンパク質のＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩが、Ｎａｇｌｕの天然の基質と同様の構造を有する基質に対してｉｎ　ｖｉｔｒｏ酵素活性を示すということが示された。ｉｎ　ｖｉｔｒｏの細胞内取込み試験により、この分子が、Ｍ６Ｐ／ＩＧＦＩＩ受容体によりＭ６Ｐグリコシル化とは無関係に細胞に取り込まれることが示された。内部に取り込まれたＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩはリソソームと共局在することが示された。Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩは、サンフィリッポＢマウスへのＩＣ注射後にｉｎ　ｖｉｔｒｏでリソソーム蓄積を減少させることが示された。Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩは、ｒｈＮａｇｌｕならびに他のＮａｇｌｕ融合物および改変物に比べて、ＩＴ注射後のｗｔカニューレ処置ラットの脳実質内への浸透において、これらすべてのものよりも優れていた。最後に、サンフィリッポＢマウスへのＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩのＩＴ注射により、髄膜を十分に越えた広範な分布が示され、また大脳皮質および皮質下領域におけるリソソーム蓄積の逆転が観察された。まとめると、これらのデータは、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩがサンフィリッポＢ疾患治療のための候補薬物であることを示している。

【０６３３】

実施例２７：ＩＴ送達したＮＡＧＬＵ－ＩＧＦＩＩの毒性、薬物動態（ＰＫ）および組織生体内分布試験

マウスでの概念実証試験

３群（ｎ＝３）のＮａｇｌｕ（－／－）マウスに、２６０μｇのＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩを含む１０μＬを単回ボーラスＩＴ腰椎注射により投与した。２６０μｇの用量は、５２０ｍｇ／脳重量ｋｇの用量（マウスの脳＝０．０００５ｋｇ）に置き換えられる。１つ目の群では、０日目に注射を行い、注射の２４時間後に屠殺を行った。２つ目の群では、０日目と７日目に注射を行い、最後の注射の２４時間後に屠殺を行った。３つめの群では、０日目、７日目および１４日目に注射を行い、最後の注射の２４時間後に屠殺を行った。各Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ投与群を、年齢／疾患重症度に関する対照となる溶媒対照グループと対にした。

【０６３４】

脳および肝臓におけるＮａｇｌｕ酵素活性は、３つのＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ投与群とも同等であった。ｒｈＮａｇｌｕ酵素活性を肝臓と脳で比較すると、肝臓において１０倍以上のｒｈＮａｇｌｕ酵素活性が見られた。ラットおよび幼若ザルでのピボタルな毒性試験における投与の１か月、３か月および６か月後のｒｈＨＮＳ酵素活性のレベルが、脳および肝臓において同等であったことから、Ｎａｇｌｕ（－／－）マウスに投与したｒｈＮａｇｌｕ用量の一部は、ＩＴではなく全身に送達されたということが考えられた。それでも、３回のＩＴ注射後には、脳における総ＧＡＧレベルが統計的に有意な減少を示した（ｐ＜０．０５）。肝臓においては、総ＧＡＧレベルが減少するという用量依存的傾向が見られ、これは２回または３回投与した群において統計的に有意であった（ｐ＜０．０５）。

【０６３５】

ＩＴ注射後のＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの生体内分布が、髄膜を十分に越えた脳実質内で観察されたが、深部皮質下領域は抗Ｎａｇｌｕ抗体による免疫染色で陰性であった。リソソーム膜タンパク質（ＬＡＭＰ）免疫染色によるリソソーム活性の減少が、２回または３回投与した群でのみ観察された。リソソーム活性が減少した領域には、大脳皮質ならびに尾状核、視床および白質の深部皮質下領域が含まれていた。したがって、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ投与個体での各種免疫染色パラメーターの減少は、抗ＮＡＧＬＵ免疫染色が見られないにもかかわらず、治療レベルのＮＡＧＬＵが存在し得ることを示していた。２回または３回投与した群においてのみ、アストロサイトのグリア線維性酸性タンパク質（ＧＦＡＰ）免疫染色の減少およびミクログリア細胞／マクロファージのイオン化カルシウム結合アダプター分子（Ｉｂａ）染色の減少により、炎症性応答の減弱が明らかとなった。解析した領域には、大脳皮質ならびに尾状核、視床および白質の深部皮質下領域が含まれていた。

【０６３６】

ラットでの試験

ＩＴ投与したＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの毒性学的評価のためのげっ歯類として、Ｓ－Ｄラットを選択した。その結果、１６匹のラット（雌雄それぞれ８匹）に、組換えＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩを３日おきに、最大投与可能用量（ＭＦＤ）ならびにＭＦＤの約１／４および１／２（それぞれ低用量レベルおよび中用量レベル）で、合計８回投与した。

【０６３７】

単回投与でのＰＫ／生体内分布試験をＳ－Ｄラットで行い、雌雄の個体にＩＴ－Ｌ投与した後、ＣＳＦおよび血清中濃度または組織分布をそれぞれ決定した。

【０６３８】

Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩのＩＴ－Ｌ投与を、毒性学および安全性薬理学（神経、呼吸器および心血管の安全性）の観点から雌雄両方の個体で評価するための毒性学試験を計画した。本試験の毒性学的評価には、臨床観察、体重、摂餌量、臨床病理学、適切な安全性薬理学的評価（身体検査および心電図検査による）、肉眼的組織評価および顕微鏡評価が含まれる。限られた数のＣＳＦおよび血清試料を採取し、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩに関して、および被検試料に対する抗体に関して解析する。Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの組織分布および細胞内局在を、それぞれ酵素活性アッセイおよび免疫組織化学により定量化する。さらに、選択した試験には、あらゆる重要で顕著な毒性学的所見の可逆性、または遅発性出現の可能性を評価する回復期間が含まれる。

【０６３９】

サルにおける試験

カニクイザルが遺伝的および解剖学的にヒトに類似しており、より適切な種であると考えられたため、ＩＴ投与したＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの毒性学的評価のためのげっ歯類以外の種としてこれを選択した。サンフィリッポ症候群Ｂ型の臨床試験で計画されている患者集団が小児であるため、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの髄腔内薬物送達装置（ＩＤＤＤ）による投与に関する慢性の６か月間の毒性学試験を幼若カニクイザルで行う。幼若カニクイザルは一般に、試験開始時の年齢が１歳未満（約７～９か月齢）であり、試験開始時の体重が９００ｇ～１，５００ｇの間である。１か月間の反復投与による幼若カニクイザル毒性試験から得られたデータを、用量レベルの選択および６か月間の幼若ザル試験の計画の指針とする。反復投与毒性学試験は、予想される１～６か月の期間にわたる臨床適用経路（ＩＴ－Ｌボーラス）および投与頻度（隔週；ＥＯＷ）を模倣するように計画されている。

【０６４０】

上記のように、毒性学試験は、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩのＩＴ－Ｌ投与を、毒性学および安全性薬理学（神経、呼吸器および心血管の安全性）の観点から雌雄両方の個体で評価するために計画されている。本試験の毒性学的評価には、臨床観察、体重、摂餌量、臨床病理学、適切な安全性薬理学的評価（身体検査および心電図検査による）、肉眼的組織評価および顕微鏡評価が含まれる。限られた数のＣＳＦおよび血清試料を採取し、Ｎａｇｌ

ｕ－ＩＧＦＩＩに関して、および被検試料に対する抗体に関して解析する。Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの組織分布および細胞内局在を、それぞれ酵素活性アッセイおよび免疫組織化学により定量化する。さらに、選択した試験には、あらゆる重要で顕著な毒性学的所見の可逆性、または遅発性出現の可能性を評価する回復期間が含まれる。

【０６４１】

実施例２８：ＮＡＧＬＵ－ＩＧＦＩＩのＥＯＷ髄腔内投与

本実施例は、Ｎａｇｌｕ－／－マウスモデルにおいて、ＥＯＷで６回の注射でのＩＴ腰椎投与（３か月間の試験）の実現可能性を判定するために計画されたものである。本投与レジメンは、週１回の投与よりも臨床的に適切であり得る。

【０６４２】

８週齢のＮａｇｌｕ－／－雌雄マウスを以下の実験計画に従って調べた：

【表４９】

表４９：ＮａｇｌｕーＩＧＦＩＩのＥＯＷでのＩＴ送達のための実験計画

| 群 | N | 処置 | 用量 | 頻度 | 屠殺 |
|---|---|---|---|---|---|
| A | 3 | 溶媒 | N/A | 3か月間のEOWでのIT注射(合計6回の注射) | 最後の注射の24時間後 |
| B | 6 | Naglu-IGFＩＩ | 60mg/脳重量kg (30μg) | 3か月間のEOWでのIT注射(合計6回の注射) | 最後の注射の24時間後 |

【０６４３】

肝臓、脳および血清でのＮａｇｌｕ活性アッセイ、血清での抗Ｎａｇｌｕ抗体アッセイ、ならびに肝臓および脳でのＢＣＡアッセイを含む生理学的試験を行った。脳、脊髄および肝臓でのＮａｇｌｕ　ＩＨＣ、ならびに脳および脊髄でのＬａｍｐ染色を含む組織学的試験を行った。

【０６４４】

脳、脊髄および肝臓を採取し、１０％ＮＢＦで固定した。５μｍのパラフィン切片を組織学的染色用に作成した。Ｎａｇｌｕの免疫組織化学的（ＩＨＣ）染色を用いて、注射したタンパク質の細胞内取込みを検出した。Ｈ＆Ｅ染色を用いて形態学的変化を観察した。リソソームの活性および病的状態の指標であるＬＡＭＰ、活性化したアストロサイトおよびミクログリア細胞に対する２つのＣＮＳ病理マーカーであるＧＦＡＰおよびＩｂａ－１を、組織病理学的改善の評価に用いた。

【０６４５】

溶媒処置およびＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ処置マウスの脳、脊髄および肝臓におけるＮａｇｌｕ免疫染色では、脳および脊髄において、注射したＮａｇｌｕが髄膜（Ｍ）でのみＩＨＣで検出され、Ｎａｇｌｕ陽性染色は他のいずれの領域でも検出されないことが示された（図１８７）。肝臓においては、類洞細胞（Ｓ）がＮａｇｌｕ陽性であり、肝細胞（Ｈ）ではＮａｇｌｕ取込みが見られなかった。

【０６４６】

溶媒処置およびＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ処置マウスの肝臓および脊髄におけるＬＡＭＰ免疫染色およびＨ＆Ｅ染色では、溶媒処置個体に比べ、Ｎａｇｌｕで処置した肝臓および脊髄の両方の全体にわたりＬＡＭＰ染色が減少していることが示された。Ｈ＆Ｅ染色により、処置群では溶媒処置個体に比べ、肝細胞における細胞空胞化が明らかに減少していることが示された（図１８８および図１８９）。

【０６４７】

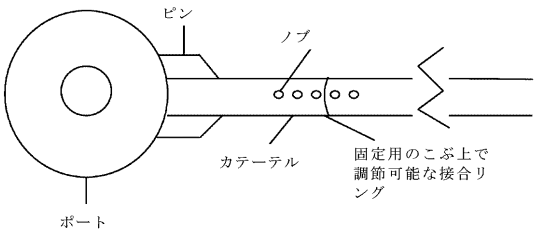
溶媒処置およびＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ処置マウスの脳におけるＨ＆Ｅ染色では、３か月間のＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの６回の隔週ＩＴ注射後に、脳における形態学的改善が示された。処置群の脳では、全検査領域の細胞空胞化（矢印）が溶媒群に比べて減少していた（図１９０）。

【０６４８】
３か月間の６回のＩＴ　Ｎａｇｌｕ注射後の各種脳領域におけるＬＡＭＰ　ＩＨＣでは、ＳＦＢマウスへのＮａｇｌｕ　ＩＴ投与により、溶媒処置群に比べ、全検査領域においてリソソーム活性が減少していることがＬＡＭＰ免疫染色で明らかに示された（図１９０）。この減少は、ＬＡＭＰ陽性細胞の数が減少していること、細胞の大きさが小さいこと、および染色が明るいことを特徴とした。他の脳領域に比べて、脊髄に近い脳の尾状核の位置にある小脳および脳幹において顕著な減少が見られた。また、白質、海馬および視床を含めた深部脳領域でも明らかな減少が見られた。
【０６４９】
３か月間の６回のＩＴ　Ｎａｇｌｕ注射後の各種脳領域におけるＩｂａ　ＩＨＣでは、ミクログリア細胞の活性化が明らかとなった（図１９１）。Ｎａｇｌｕ処置群において、溶媒処置群と比べて、陽性細胞数および染色強度の減少は見られなかった。しかし、検査したすべての脳領域において、陽性ミクログリア細胞の細胞形態が、溶媒群の大型で空胞のある細胞に比べて細胞の大きさが小さくなって変化していた（挿入図）。
【０６５０】
３か月間の６回のＩＴ　Ｎａｇｌｕ注射後の各種脳領域におけるＧＦＡＰ　ＩＨＣでは、アストロサイトの活性化が明らかとなった（図１９２）。溶媒処置群に比べて、ＧＦＡＰ陽性染色が小脳および脳幹では減少し、他の検査領域ではわずかに減少していた。
【０６５１】
細胞内取込みに関しては、これらのデータは、脳および脊髄において、３か月間の６回の隔週Ｎａｇｌｕ　ＩＧＦＩＩ　ＩＴ注射の後のみでＮａｇｌｕが髄膜細胞で検出されたことを示している。脳および脊髄の他のいずれの領域でも、ＮａｇｌｕはＩＨＣにより検出されなかった。肝臓では、Ｎａｇｌｕ陽性染色が類洞細胞で見られた。
【０６５２】
脳および脊髄において、３か月間のＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの６回の隔週ＩＴ注射後に、ＩＨＣでは注射したＮａｇｌｕが検出されなかったが、脳および脊髄全体にわたり組織病理学的改善が見られた。Ｈ＆Ｅ染色では、検査したすべての脳領域で細胞空胞化の減少が示された。処置群の脊髄の全体にわたり、および深部脳領域である白質、海馬および視床を含む評価したすべての脳領域で、ＬＡＭＰ染色が減少し、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ処置群の小脳および脳幹では顕著な減少が見られた。アストロサイトに対するＧＦＡＰ染色の染色減少パターンは、ＬＡＭＰほど劇的な減少ではなかったが、ＬＡＭＰ染色と一致していた。Ｉｂａ－１染色により、検査したすべての脳領域において、ミクログリア細胞の大きさの減少が示された。肝臓では、Ｈ＆Ｅ染色により細胞空胞化の減少が示され、Ｎａｇｌｕ処置群においてはＬＡＭＰ染色の顕著な減少が見られた。
【０６５３】
実施例２９：サンフィリッポＢ患者の治療
例えばＩＴ送達による、ＣＮＳへの直接投与を用いて、サンフィリッポ症候群Ｂ型（サンフィリッポＢ）患者を効果的に治療することができる。本実施例は、サンフィリッポＢの患者に対して、隔週（ＥＯＷ）、全４０週で、髄腔内薬物送達装置（ＩＤＤＤ）により投与する、３用量レベルまでのＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩおよび／またはｒｈＮａｇｌｕの安全性を評価するために計画された、多施設用量漸増試験を示すものである。ヒト治療に適した髄腔内薬物送達装置の様々な例を、図９４～９７に図示する。
【０６５４】
最大２０患者まで登録：
コホート１：５患者（最低用量）
コホート２：５患者（中間用量）
コホート３：５患者（最高用量）
無作為に５患者を無治療とする。
【０６５５】
以下の基準を含むか否かに基づき、試験する患者を選択する：

【０６５６】
サンフィリッポＢの患者において、４０週間、用量を漸増してＩＴ注射により投与するＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの安全性を判定する。さらに、認知機能に対するＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩおよび／またはｒｈＮａｇｌｕの臨床活性、ならびに単回および反復投与の血清中薬物動態および脳脊髄液（ＣＳＦ）中濃度を評価する。
【０６５７】
通常、治療有効量のＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩおよび／またはｒｈＮａｇｌｕを、疾患の影響の性質および程度に応じて、髄腔内に定期的および継続的に投与する。ある「間隔」での投与は、本明細書で使用される場合、治療有効量を定期的に投与することを表す（１回投与とは区別される）。この間隔は、標準的な臨床技術により決定され得る。いくつかの実施形態では、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩおよび／またはｒｈＮａｇｌｕを、隔月で、月１回、月２回、３週間ごとに、２週間ごとに、週１回、週２回、週３回または毎日、髄腔内に投与する。一個人の投与間隔を固定する必要はなく、個人の必要に応じて徐々に変化させてもよい。例えば、身体的な疾患またはストレス時に、抗Ｎａｇｌｕ抗体が見られるもしくは増加した場合、または疾患症状が悪化した場合、投与の間隔を減らしてもよい。
【０６５８】
本明細書に記載の化合物、組成物および方法は、特定の実施形態に従って具体的に記載されているが、後の実施例は単に本発明の化合物を例示するためのものであり、これらを限定することを意図するものではない。
【０６５９】
本明細書および特許請求の範囲で使用される冠詞「ａ」および「ａｎ」は、そうでないことが明記されない限り、複数形の指示対象を含むということを理解するべきである。あるグループの１つ以上の要素の間に「または（もしくは、あるいは）」が含まれる請求項または記載事項は、そうでないことが明記されるかまたは文脈から明らかでない限り、１つ、２つ以上またはすべてのグループの要素が所与の製品または工程に存在する、使用されるまたは関連する場合に満たされるものとする。本発明は、グループの中の正確に１つの要素が所与の製品または工程に存在する、使用されるまたは関連する実施形態を含む。また本発明は、グループの２つ以上の要素または全要素が所与の製品または工程に存在する、使用されるまたは関連する実施形態も含む。さらに本発明は、別途明記されない限り、または矛盾もしくは不一致が生じることが当業者に明らかでない限り、列挙されている１つ以上の請求項の１つ以上の制限、要素、条項、記述用語などが、基本請求項に従属する別の請求項に（または関連する他の任意の請求項として）組み込まれるすべての変更、組合せおよび置換を包含するということを理解するべきである。要素が列挙されている場合（例えば、マーカッシュ群またはこれと同様の形式において）、要素の各下位グループも開示され、任意の要素（１つまたは複数）がそのグループから除外され得ることを理解するべきである。一般に、本発明または本発明の態様が特定の要素、特徴などを含むという場合、本発明の特定の実施形態または本発明の特定の態様は、このような要素、特徴などからなる、またはこのような要素、特性などから本質的になるということを理解するべきである。簡潔にするために、これらの実施形態があらゆる場合に正確に本明細書に具体的に記載されているわけではない。本発明の任意の実施形態または態様が、本明細書において具体的に除外されることが記載されているか否かにかかわらず、請求項から明確に除外され得ることも理解するべきである。本発明の背景を説明するために、および本発明の実施に関するさらなる詳細を提供するために本明細書において参照される刊行物、ウェブサイトおよびその他の参考資料は、参照により本明細書に組み込まれる。

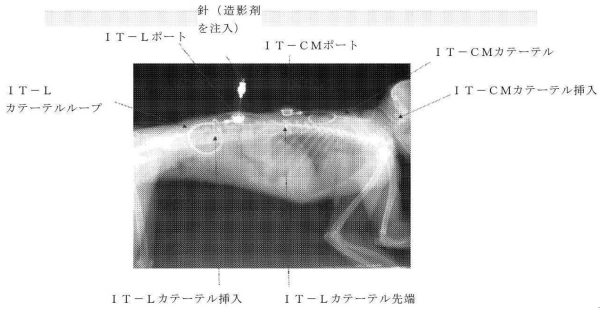
【図１】

【図１】



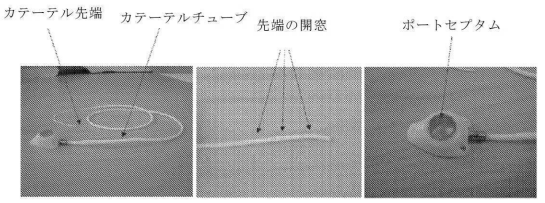

【図２Ａ】

【図２Ａ】



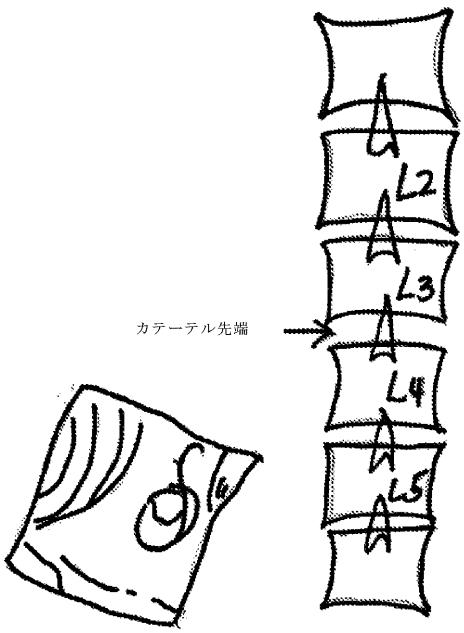

【図２Ｂ】

【図２Ｂ】



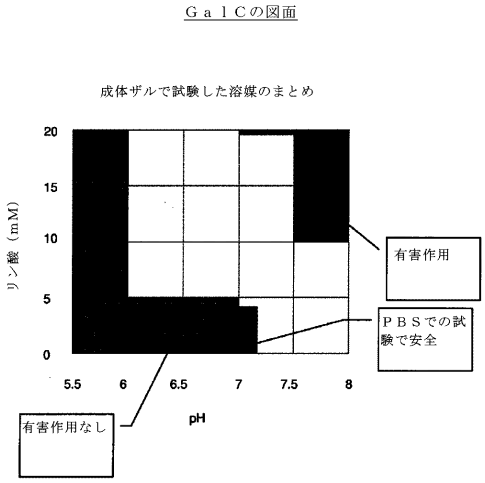

【図２Ｃ】

【図２Ｃ】




【図３】

【図３】

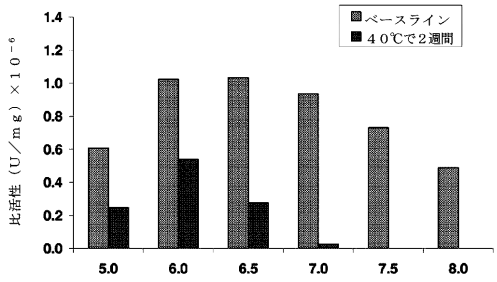


【図４】

【図４】

ｐＨの関数として表したｈＧａｌＣの熱スクリーニング

５０ｍＭ　ＮａＣｌを含む３ｍＭクエン酸、リン酸およびホウ酸緩衝液中
１ｍｇ／ｍＬのＧａｌＣ

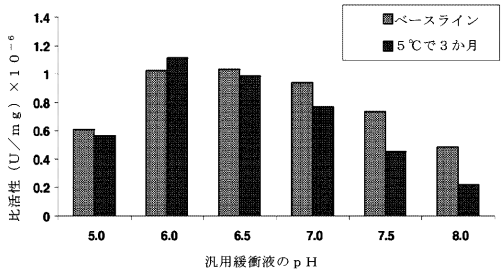



【図５】

【図５】

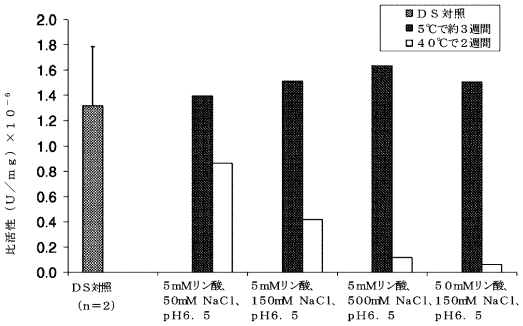
ｐＨの関数として表したｈＧａｌＣの比活性

５０ｍＭ　ＮａＣｌを含む３ｍＭクエン酸、リン酸およびホウ酸緩衝液中１ｍｇ／ｍＬのＧａｌＣ



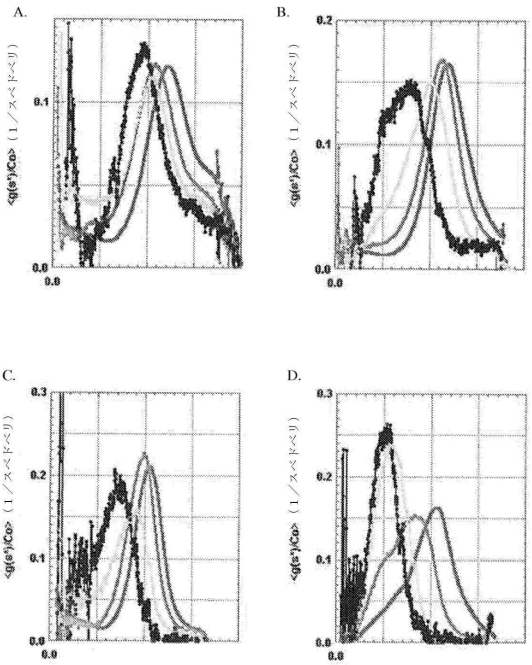

【図６】

【図６】




【図７】

【図７】

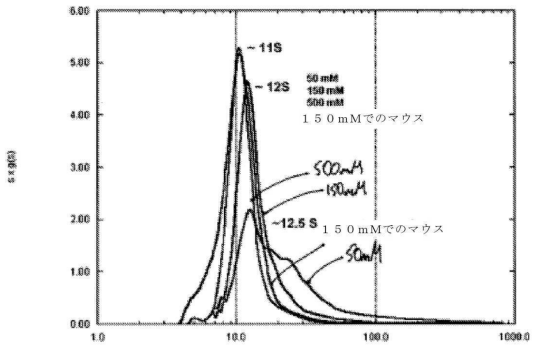



【図８】

【図８】

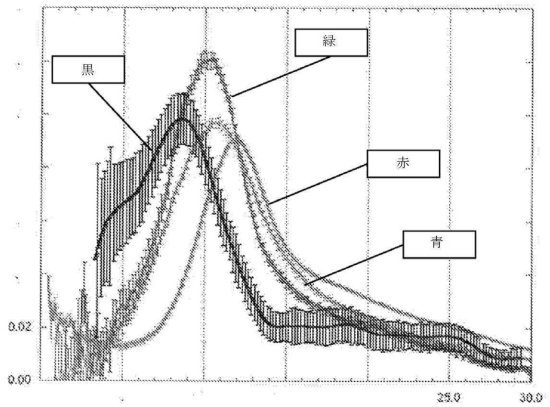
塩濃度の関数として表したＡＵＣプロファイル

１ｍＭ／ｍＬ、５ｍＭリン酸Ｎａ、ｐＨ６．０



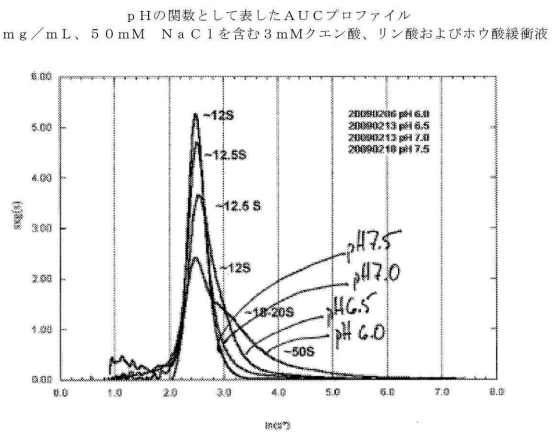
【図９】

【図９】



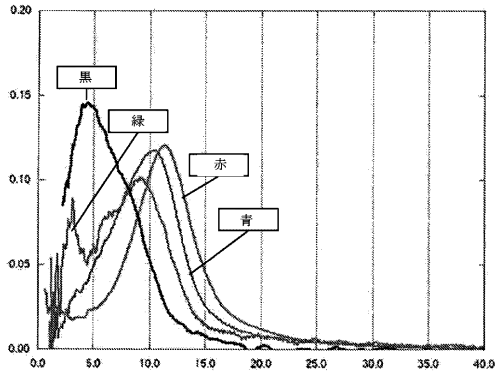

【図１０】

【図１０】



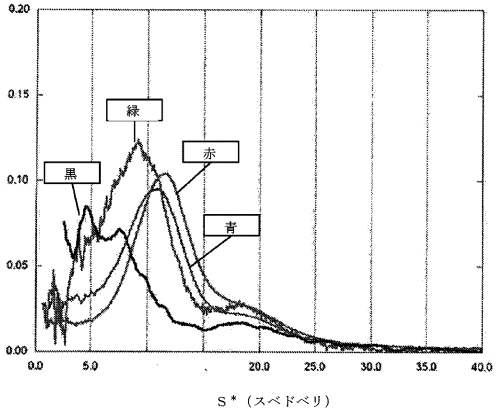

【図１１】

【図１１】



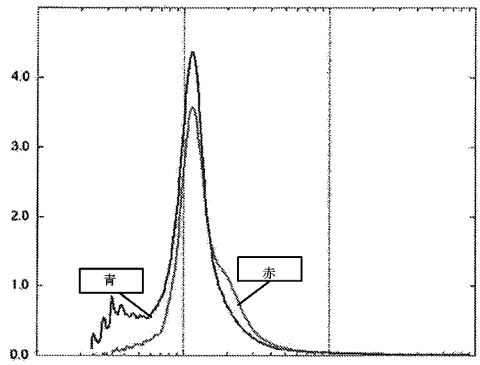

【図１２】

【図１２】



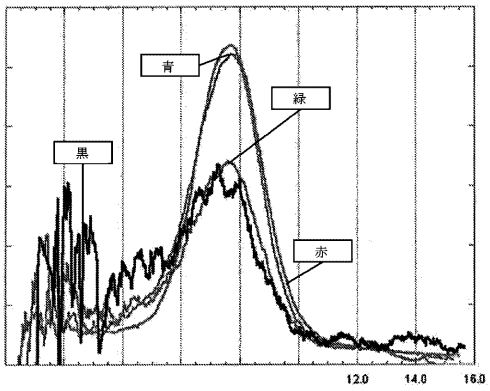
【図１３】

【図１３】




【図１４】

【図１４】




【図１５】

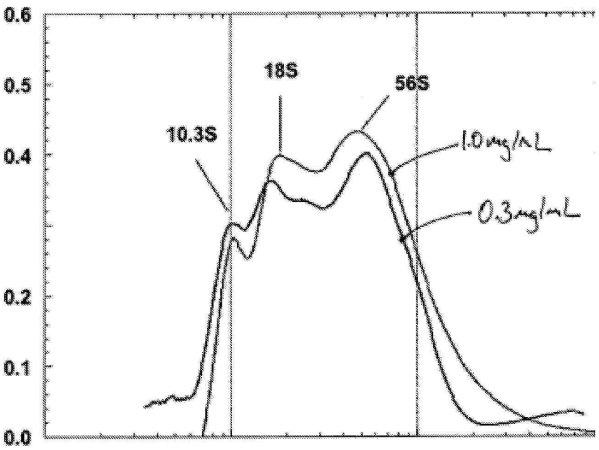
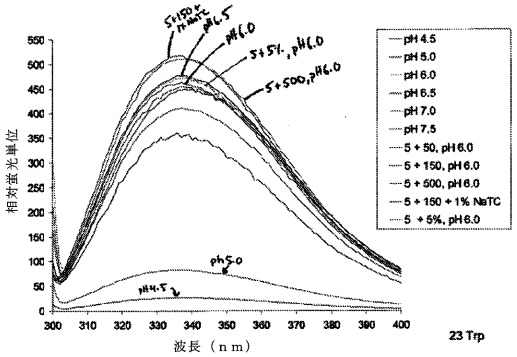



Figure 15

【図１６】

【図１６】

様々な緩衝液およびｐＨ中で１ｍｇ／ｍＬ

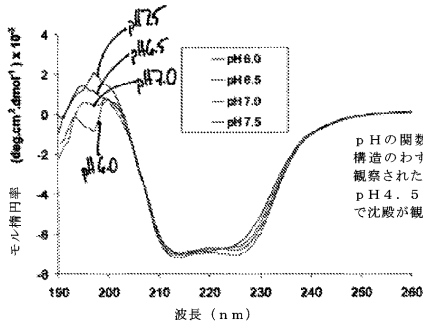



【図１７】

【図１７】

ｐＨの関数として表したｈＧａｌＣの円二色性

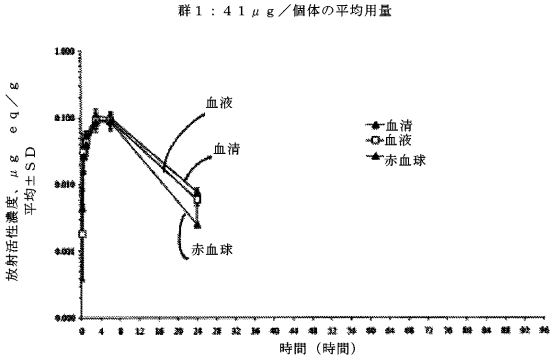
５０ｍＭ　ＮａＣｌを含む３ｍＭクエン酸、リン酸およびホウ酸緩衝液中１ｍｇ／ｍＬのＧａｌＣ




ｐＨの関数として二次構造のわずかな変化が観察された。
ｐＨ４．５および５．０で沈殿が観察された。

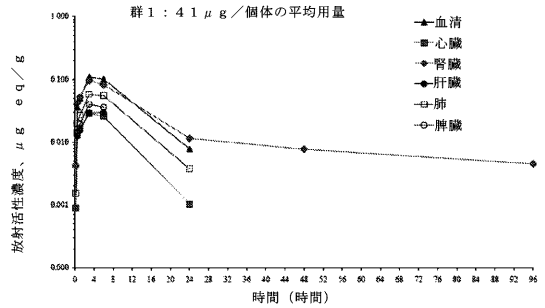
【図１８】

【図１８】



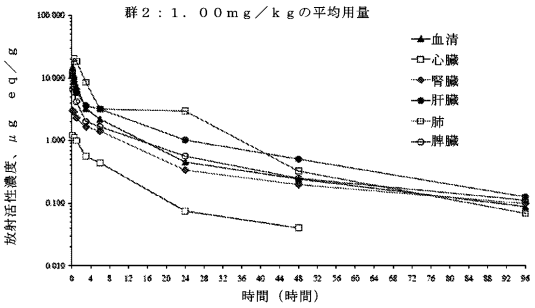

【図１９】

【図１９】



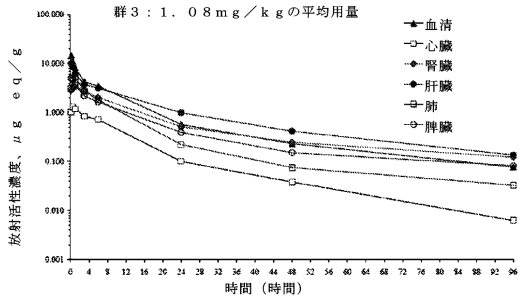

【図２０】

【図２０】



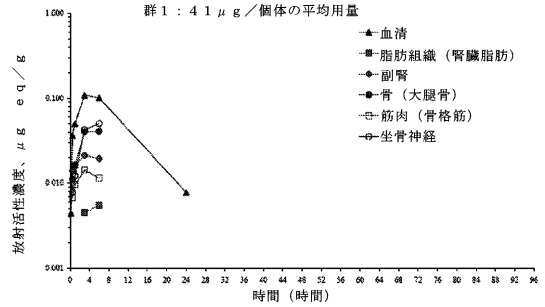

【図２１】

【図２１】



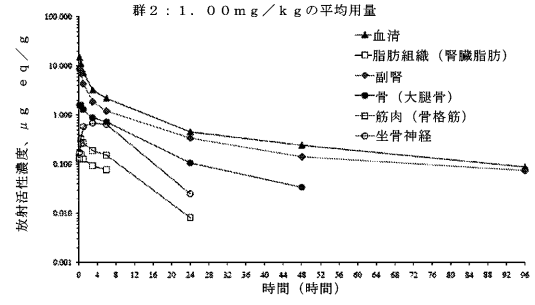

【図２２】

【図２２】



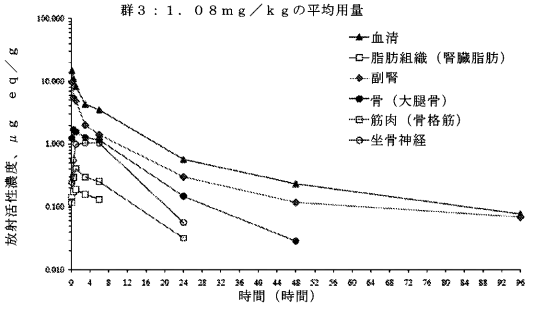

【図２３】

【図２３】



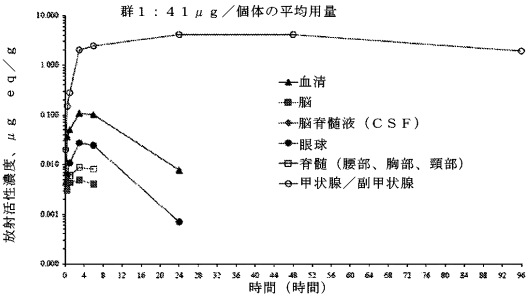

【図２４】

【図２４】



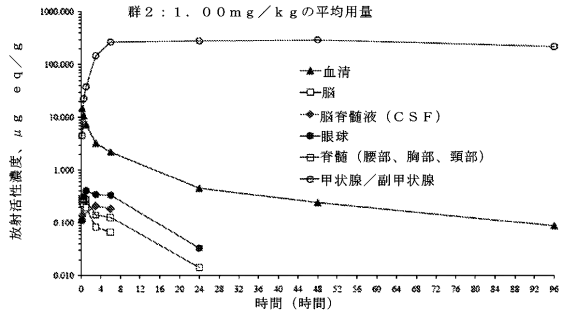

【図２５】

【図２５】



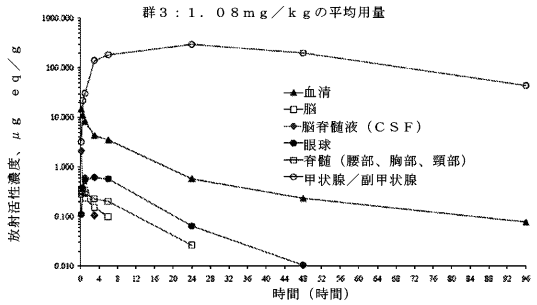
【図２６】

【図２６】



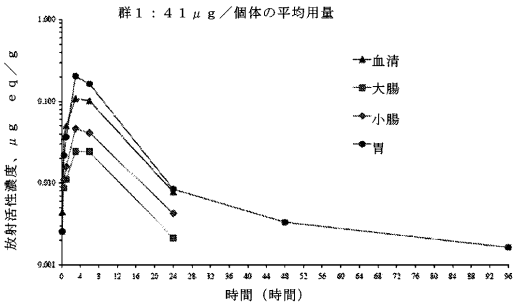

【図２７】

【図２７】



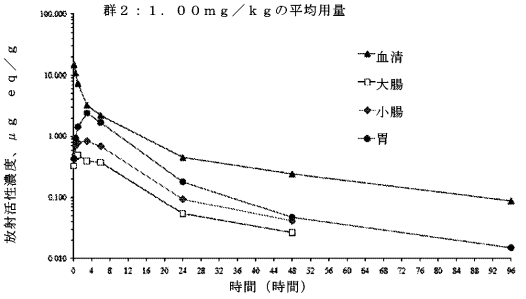

【図２８】

【図２８】



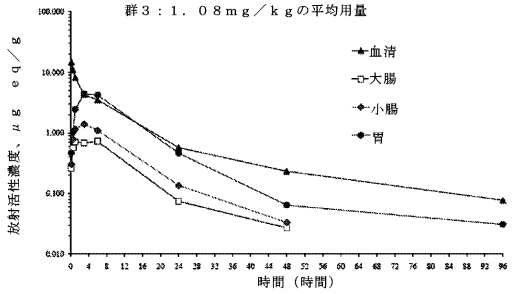

【図２９】

【図２９】



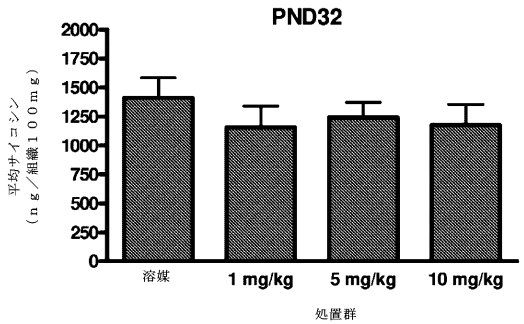

【図３０】

【図３０】



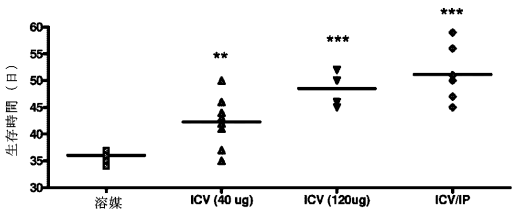

【図３１】

【図３１】



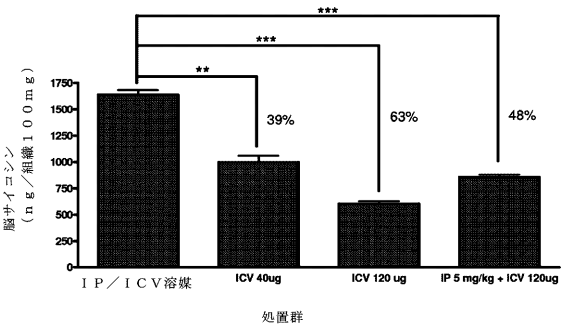

【図３２】

【図３２】



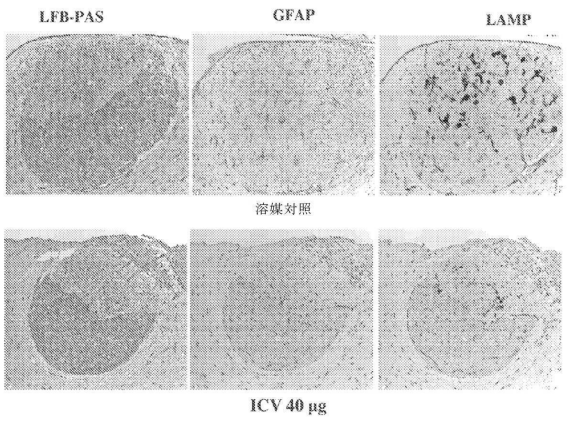

【図３３】

【図３３】



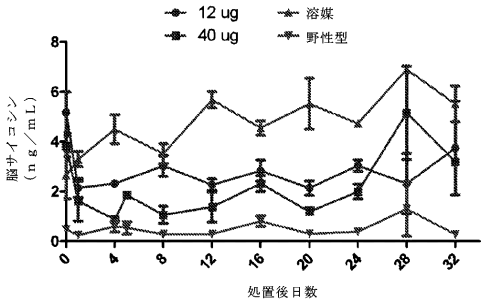
【図３４】

【図３４】



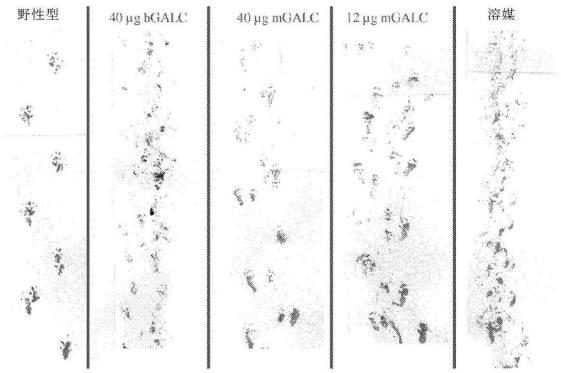

【図３５】

【図３５】



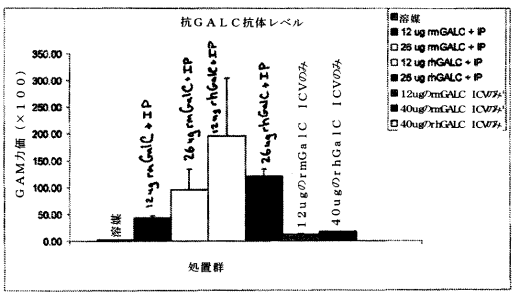

【図３８】

【図３８】



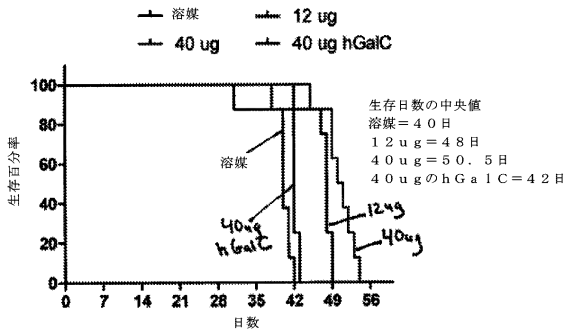

【図３９】

【図３９】



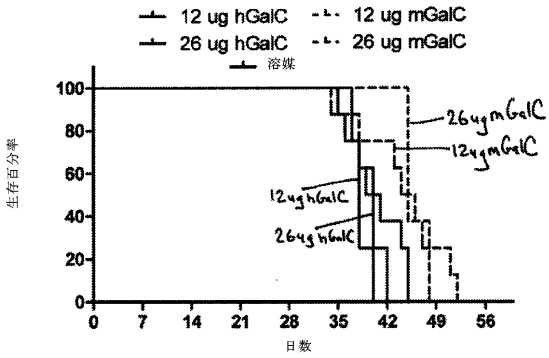

【図３６】

【図３６】



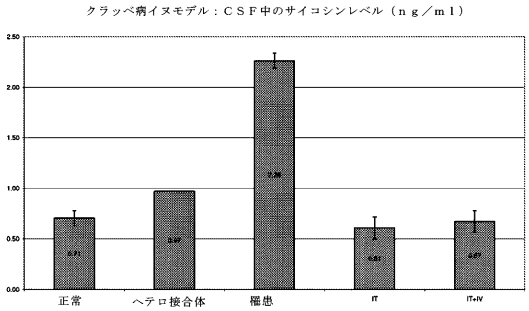

【図３７】

【図３７】



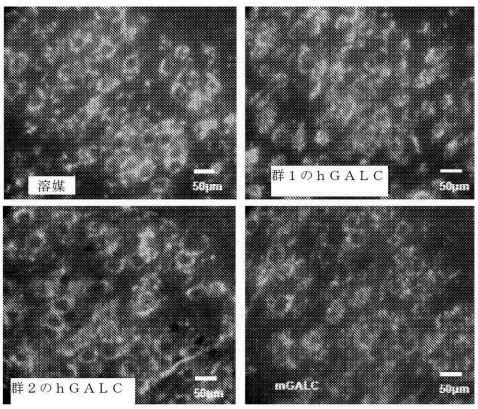

【図４０】

【図４０】



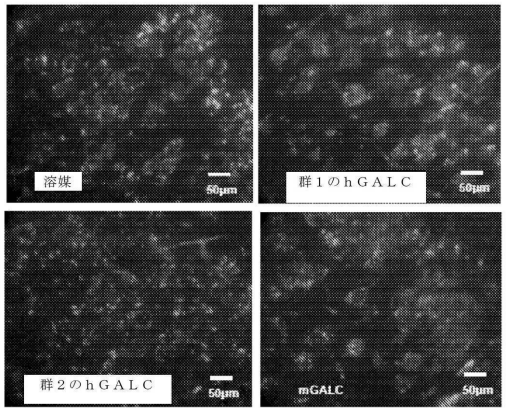

【図４１】

【図４１】



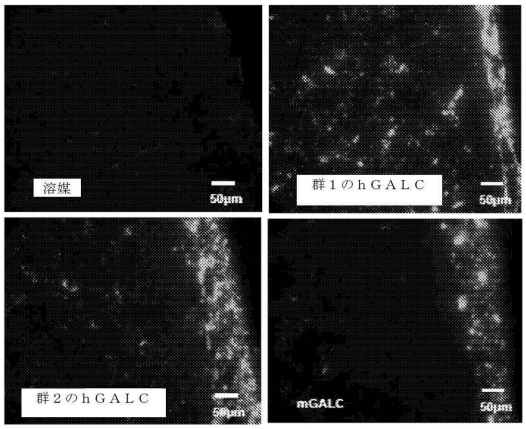
【図４２】

【図４２】



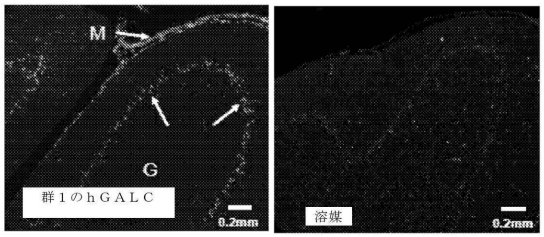

【図４３】

【図４３】



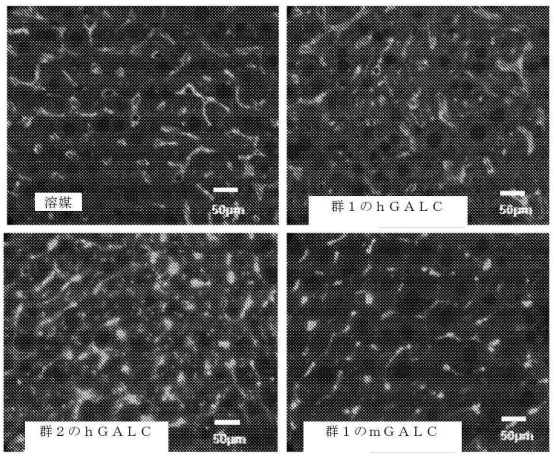

【図４４】

【図４４】



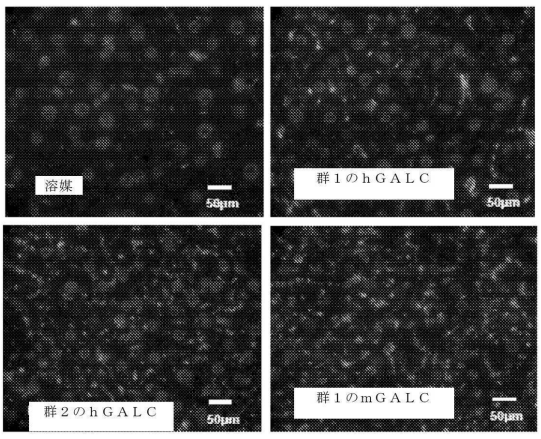

【図４５】

【図４５】



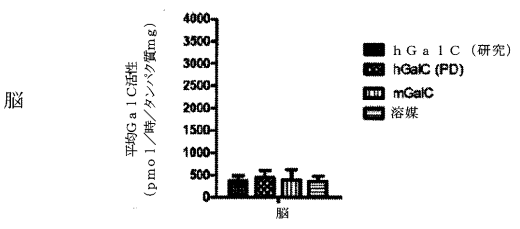

【図４６】

【図４６】



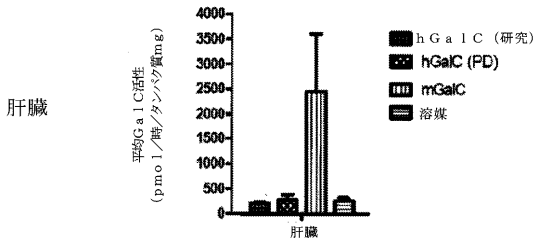

【図４７】

【図４７】



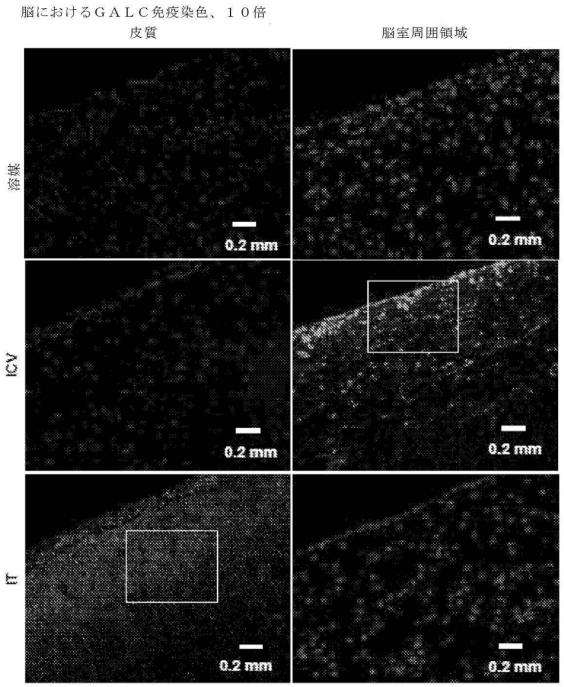
【図４８】

【図４８】



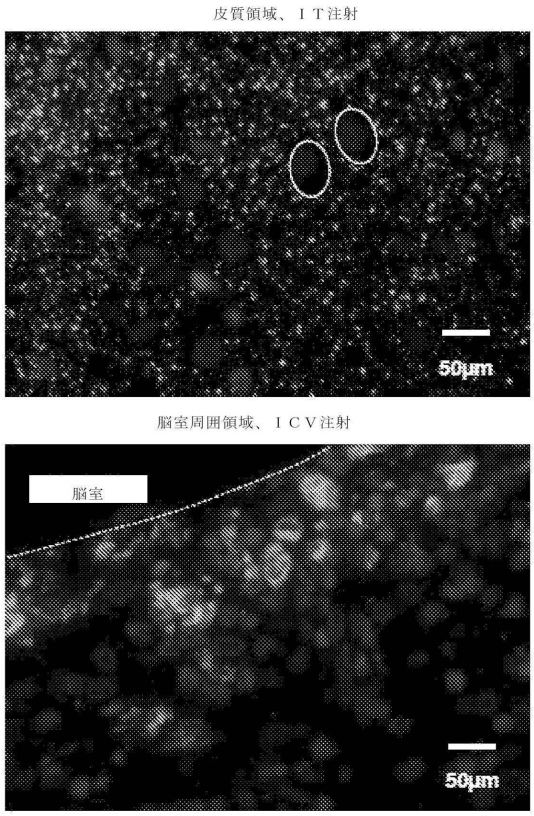

【図４９】

【図４９】



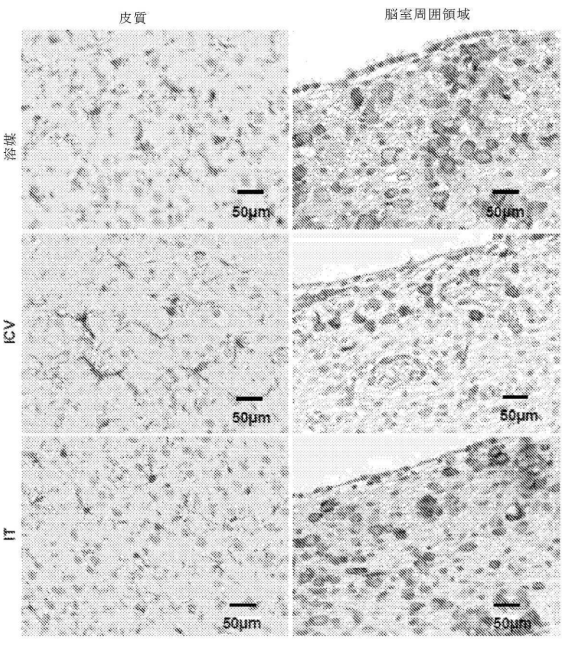

【図５０】

【図５０】



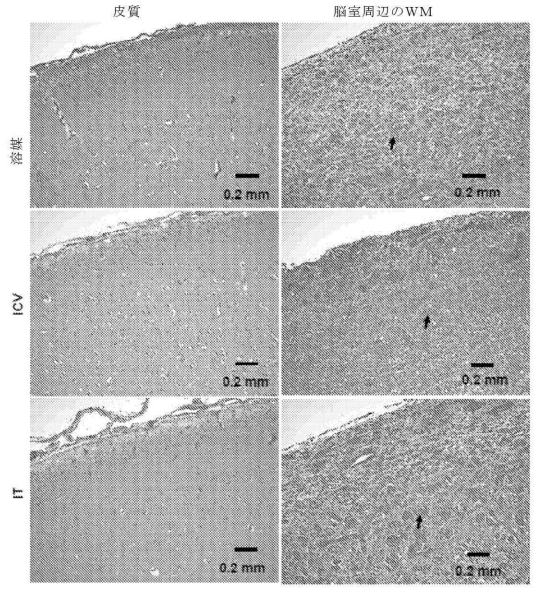

【図５１】

【図５１】



【図５２】

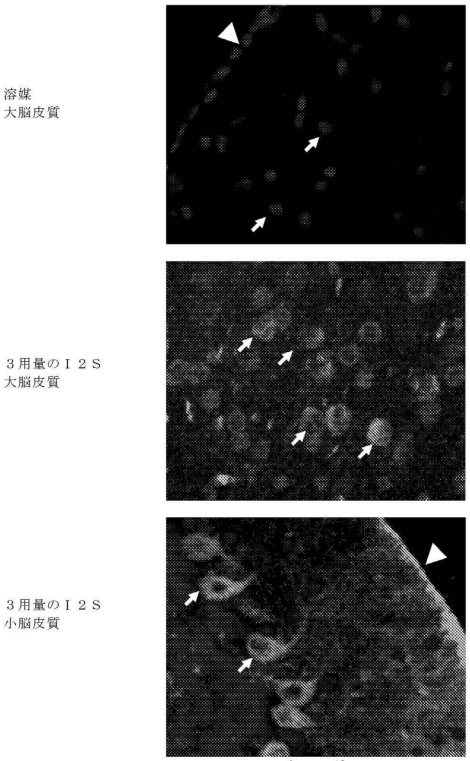
【図５２】




【図５３】

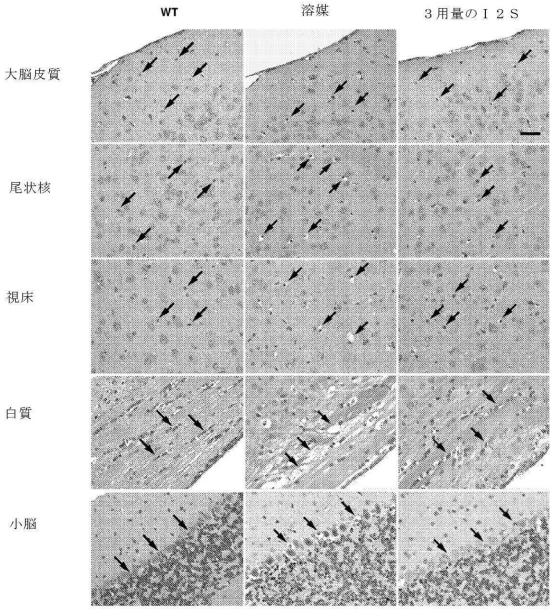
【図５３】

Ｉ２Ｓの図面



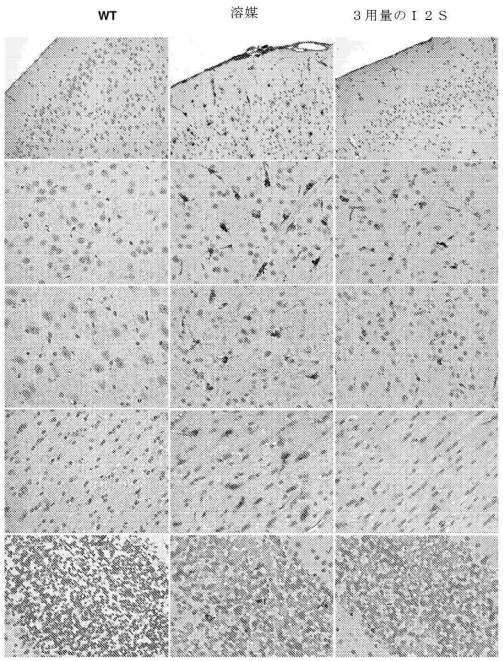

【図５４】

【図５４】



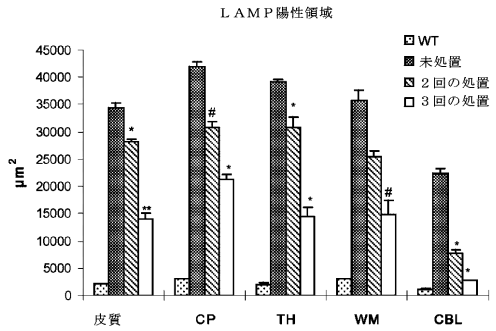

【図５５】

【図５５】



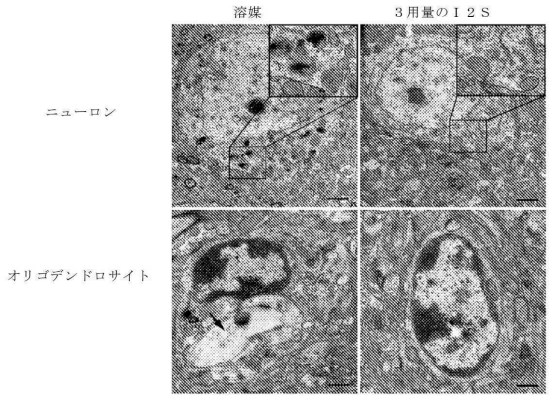
【図５６】

【図５６】



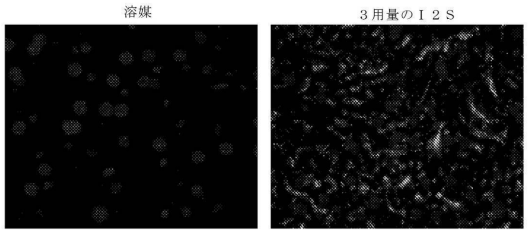

【図５７】

【図５７】



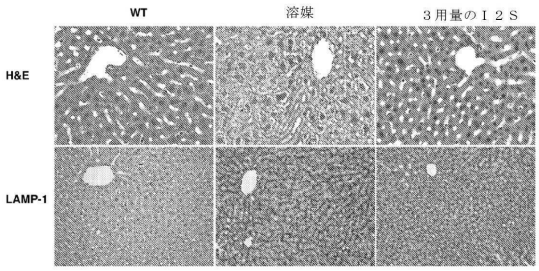

【図５８】

【図５８】




【図５９】

【図５９】




【図６０】

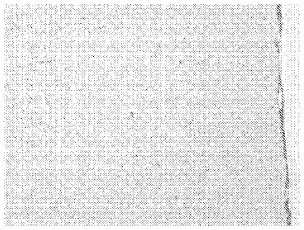


Figure 60

【図６１】

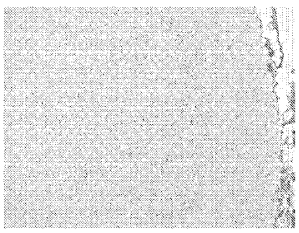


Figure 61

【図６２】

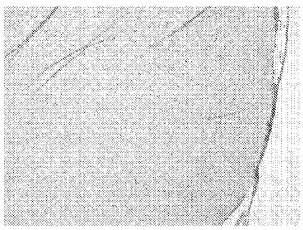


Figure 62

【図６３】

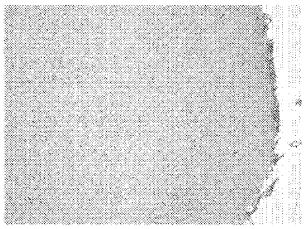


Figure 63

【図６４】

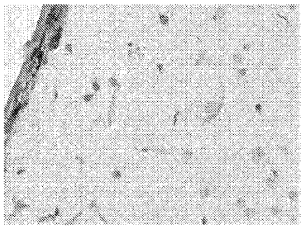


Figure 64

【図６５】

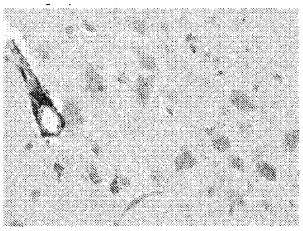


Figure 65

【図６６】

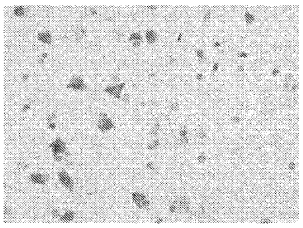


Figure 66

【図６７】

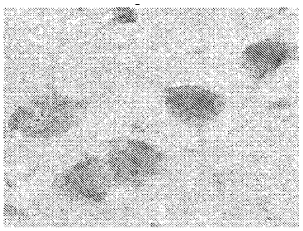


Figure 67

【図６８】

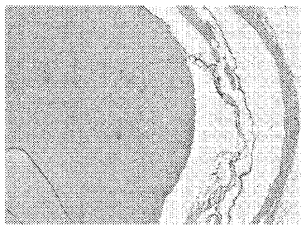


Figure 68

【図６９】

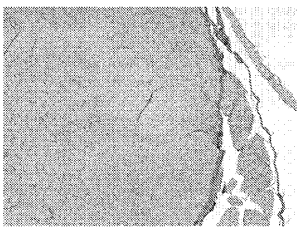


Figure 69

【図７０】

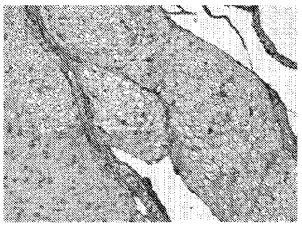


Figure 70

【図７１】

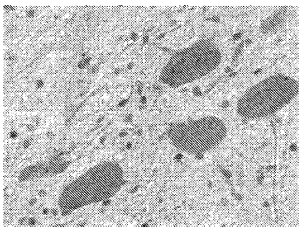


Figure 71

【図７２】

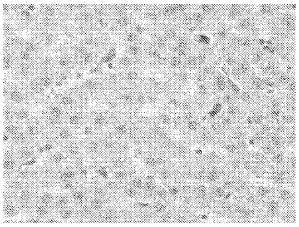


Figure 72

【図７３】

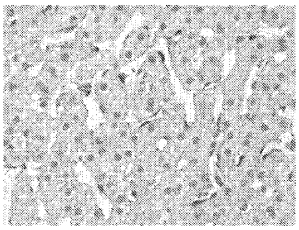


Figure 73

【図７４】

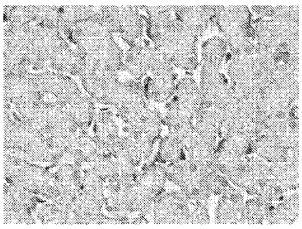


Figure 74

【図７５】

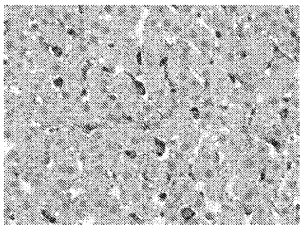


Figure 75

【図７６】

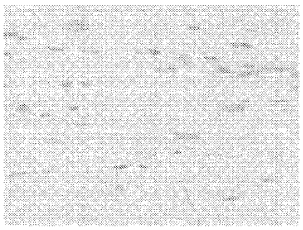


Figure 76

【図７７】

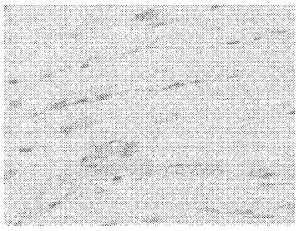


Figure 77

【図７８】

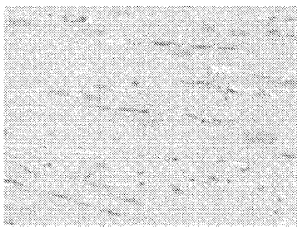


Figure 78

【図７９】

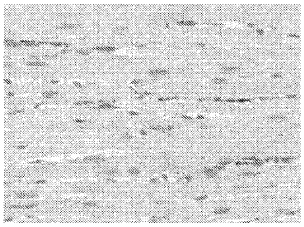


Figure 79

【図８０】

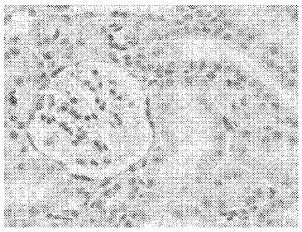


Figure 80

【図８１】

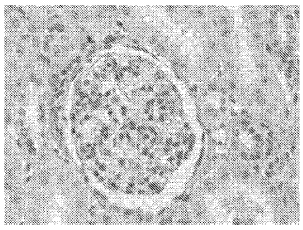


Figure 81

【図８２】

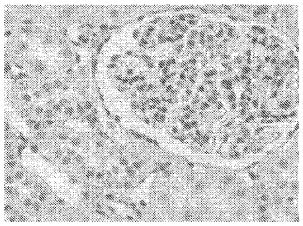


Figure 82

【図８３】

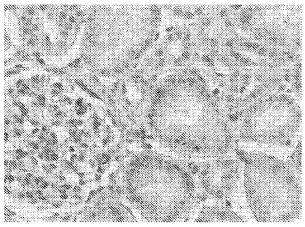


Figure 83

【図８４】

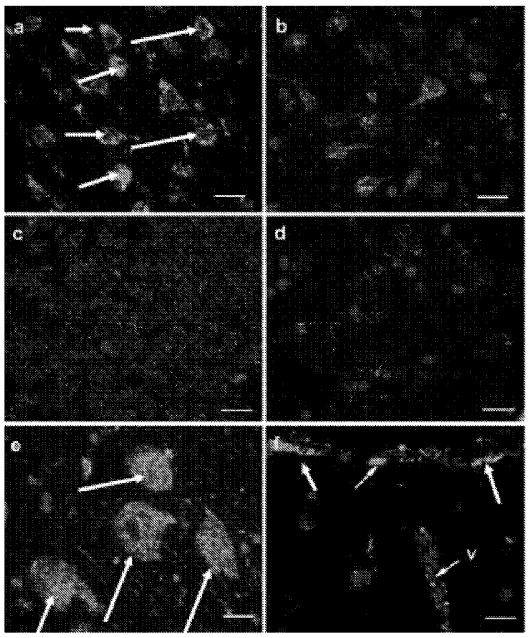
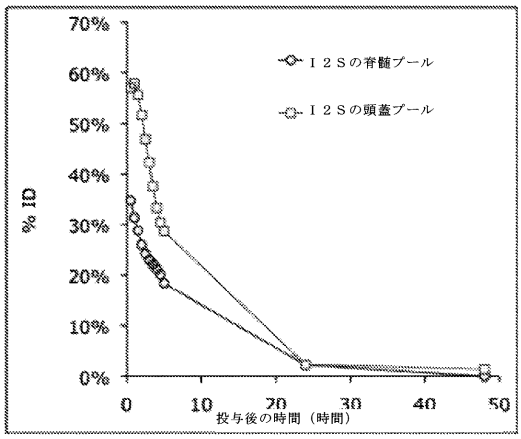



Figure 84

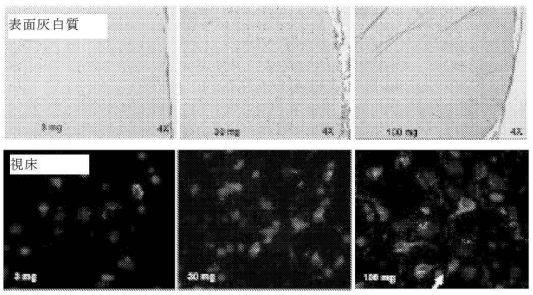
【図８５】

【図８５】



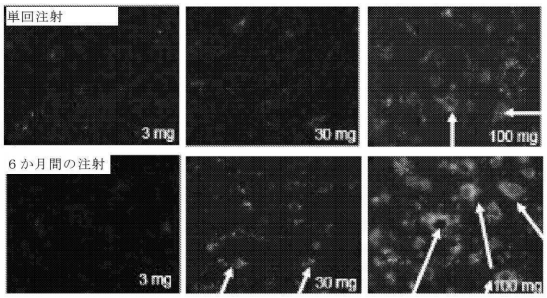

【図８６】

【図８６】



【図８７】

【図８７】




【図８８】

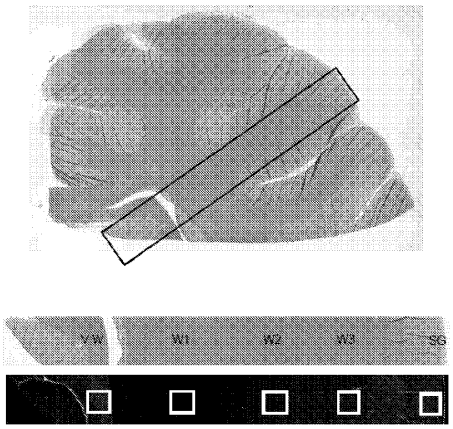



Figure 88

【図８９Ａ】

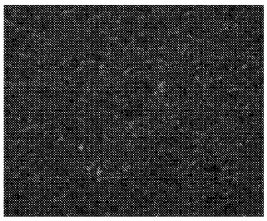


Figure 89A

【図８９Ｂ】



Figure 89B

【図８９Ｃ】

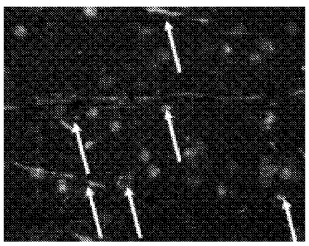


Figure 89C

【図８９Ｄ】

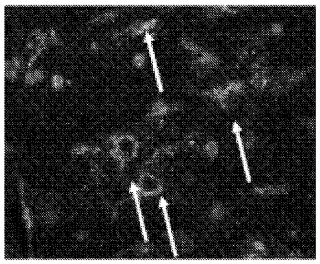
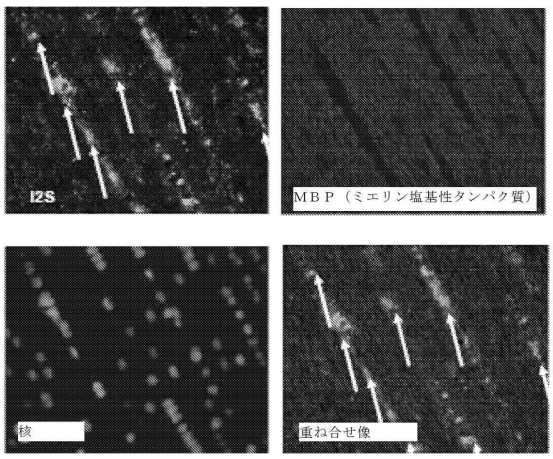


Figure 89D

【図９０】

【図９０】



【図９１】

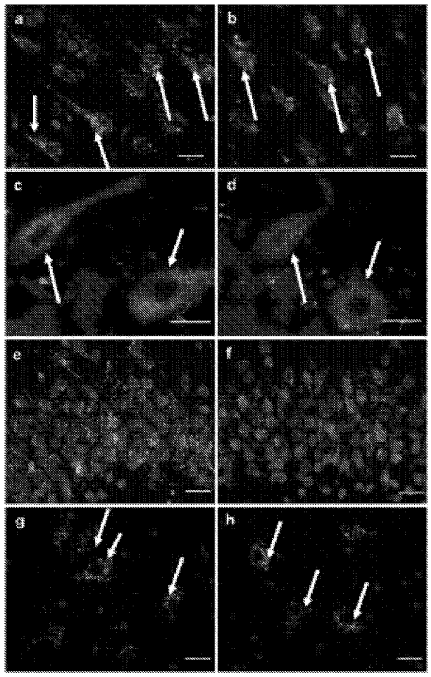
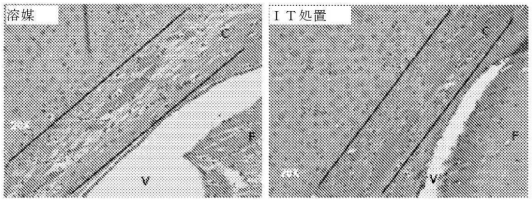



Figure 91

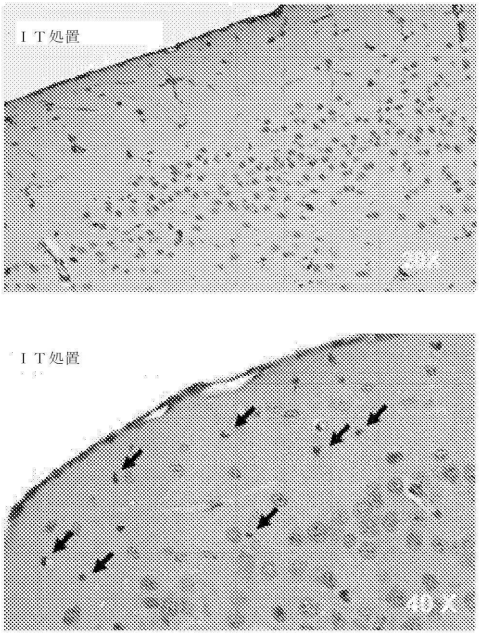
【図９２】

【図９２】



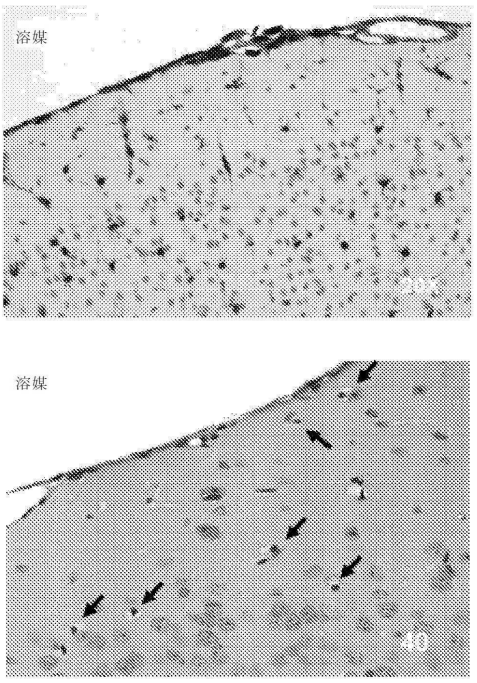

【図９３Ａ】

【図９３Ａ】



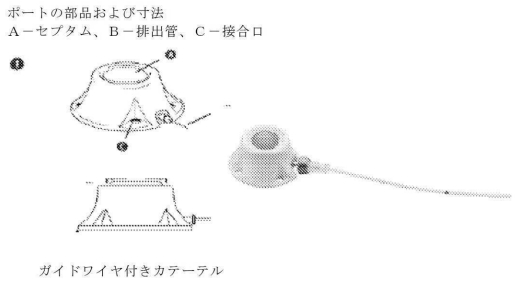

【図９３Ｂ】

【図９３Ｂ】



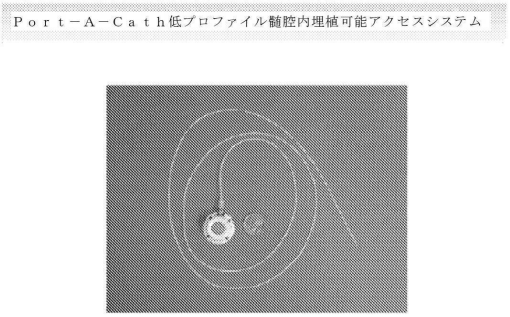
【図９４】

【図９４】




【図９５】

【図９５】




【図９６】

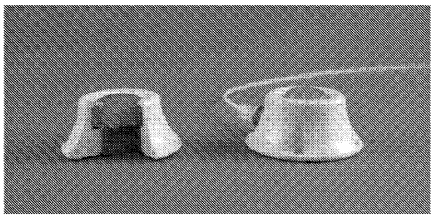
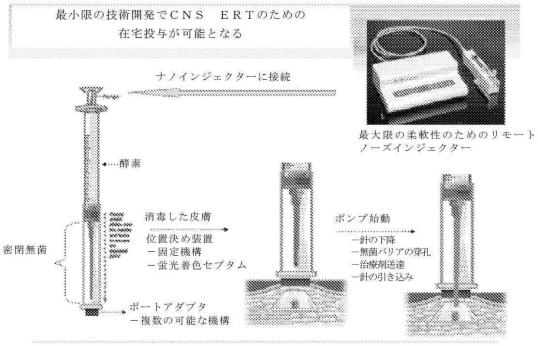


Figure 96

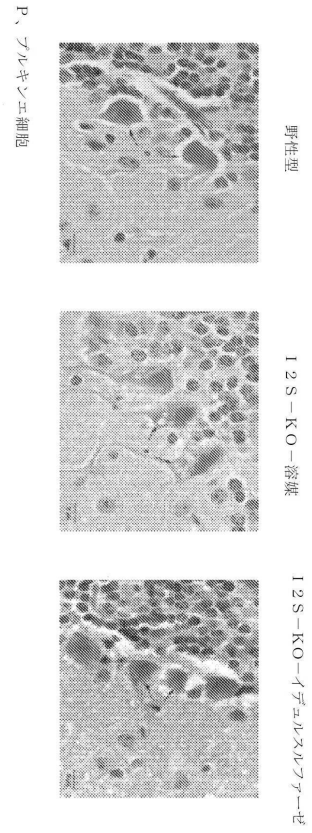
【図９７】

【図９７】



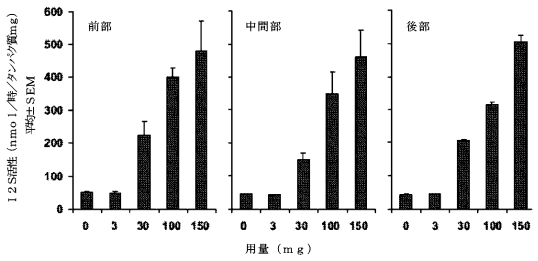

【図９８】

【図９８】



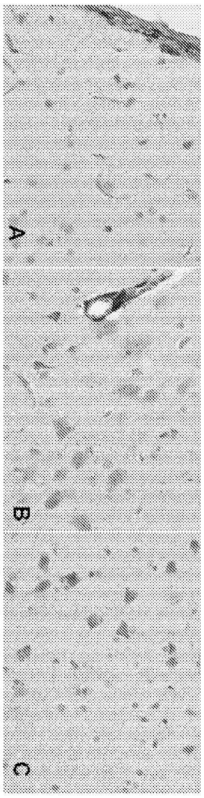

【図９９】

【図９９】



【図１００】

【図１００】

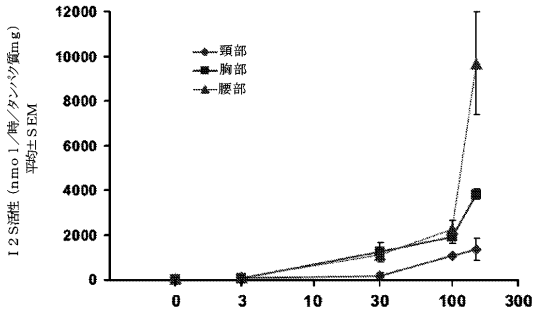



脳の層Ｉ（パネルＡ）、層ＩＩＩ（パネルＢ）および層ＶＩ（パネルＣ）においてＩ２Ｓ陽性のニューロン、グリア細胞および髄膜細胞が見られた。この個体は３０ｍｇ用量群であった（４０倍に拡大）。

３０ｍｇ用量群。元の倍率＝４０倍

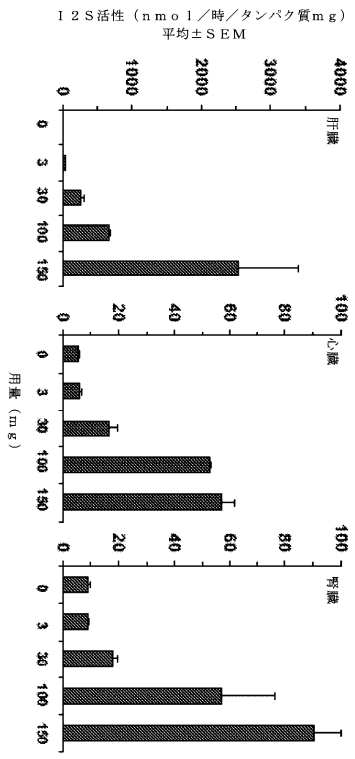
【図１０１】

【図１０１】



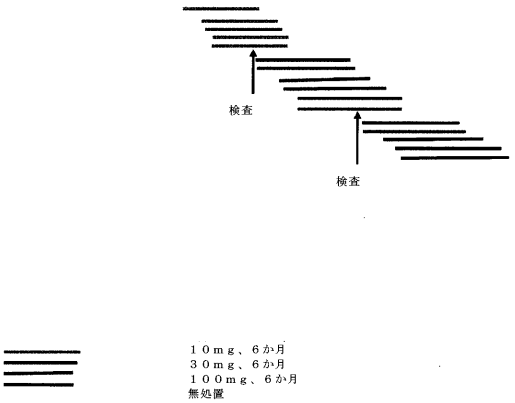

【図１０２】

【図１０２】



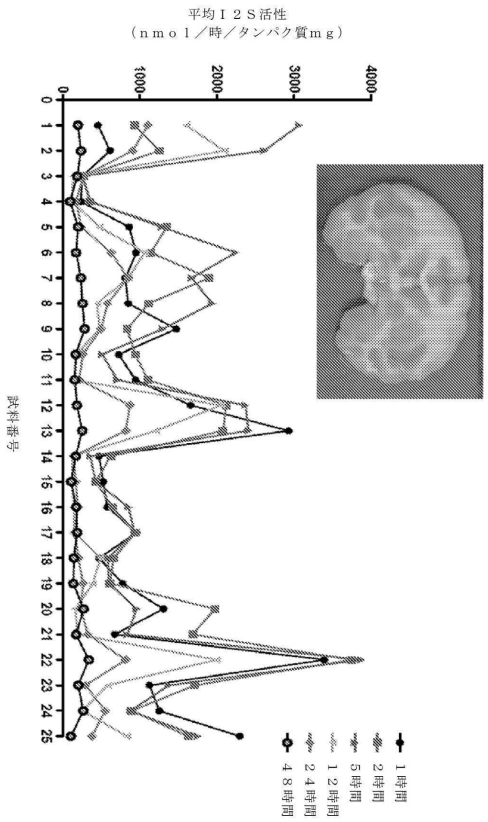

【図１０３】

【図１０３】



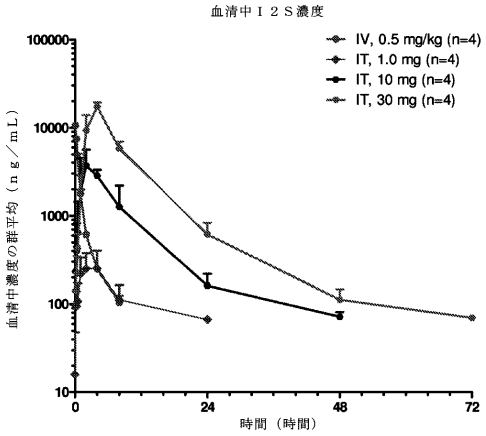
【図１０４】

【図１０４】




【図１０５】

【図１０５】




【図１０６】

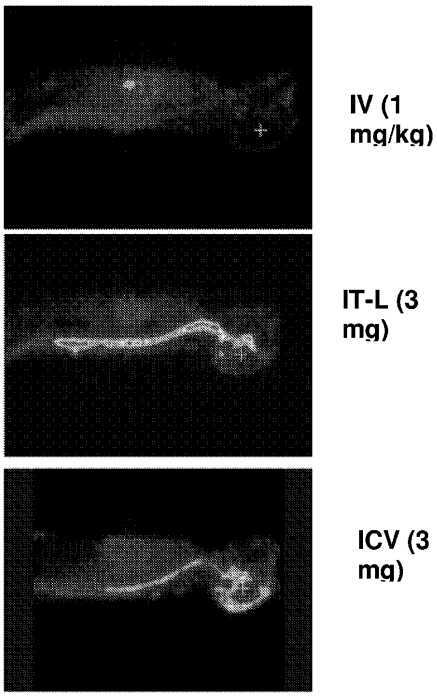
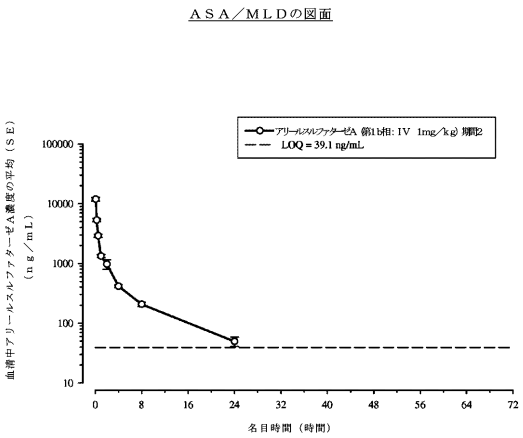



Figure 106

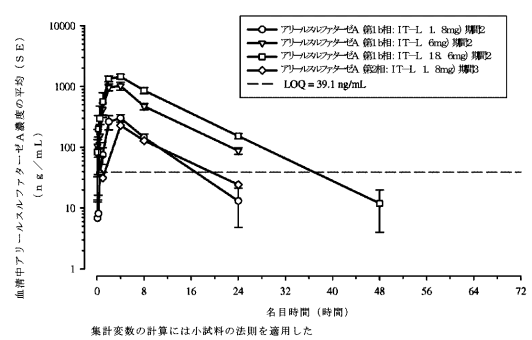
【図１０７】

【図１０７】



【図１０８】

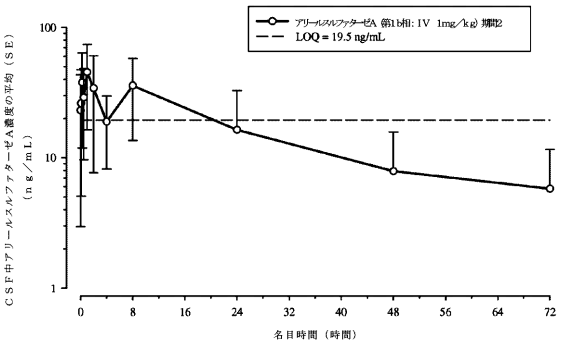
【図１０８】




集計変数の計算には小試料の法則を適用した

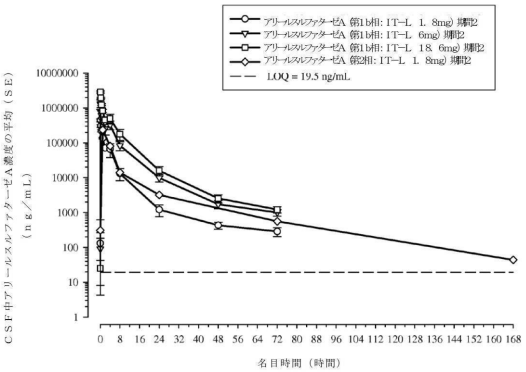
【図１０９】

【図１０９】




【図１１０】

【図１１０】




集計変数の計算には小試料の法則を適用した

【図１１１】

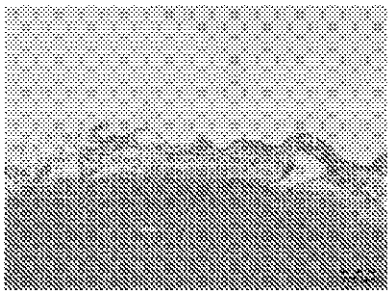


Figure 111:

【図１１２】

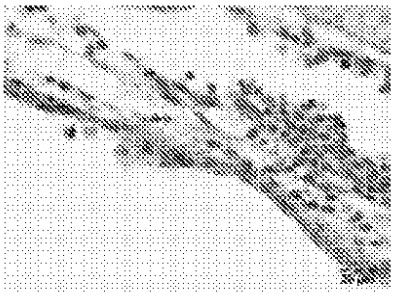


Figure 112:

【図１１３】

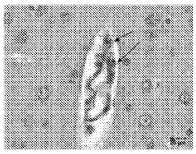
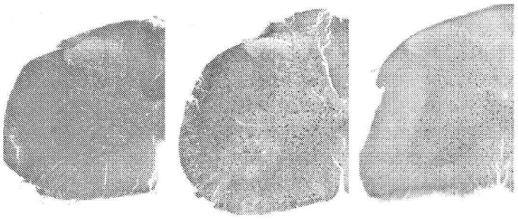


Figure 113:

【図１１４】

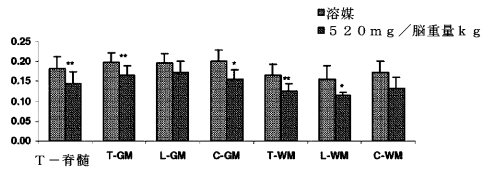
【図１１４】




ＷＴ＝野性型；ＩＴ処置マウスには５２０ｍｇ／脳重量ｋｇのｒｈＡＳＡ（０．２１ｍｇ）を週１回で４回投与、倍率４倍。

【図１１５】

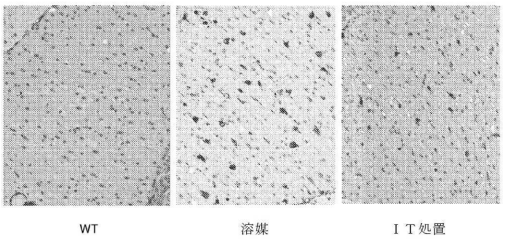
【図１１５】




＊＊Ｐ＜０．００１；＊Ｐ＜０．０５；Ｔ－脊髄＝全脊髄；Ｔ－ＧＭ＝全灰白質；Ｌ－ＧＭ＝腰部灰白質；Ｃ－ＧＭ＝頸部灰白質；Ｔ－ＷＭ＝全白質；Ｌ－ＷＭ＝腰部白質；Ｃ－ＷＭ＝頸部白質

【図１１６】

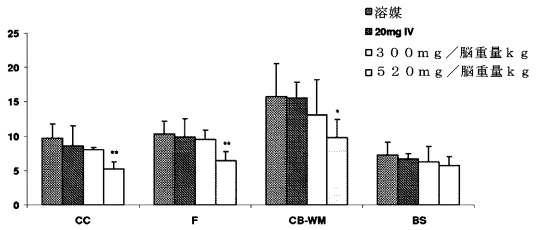
【図１１６】




ＷＴ＝野性型；ＩＴ処置マウスには５２０ｍｇ／脳重量ｋｇのＨＧＴ－１１１０（０．２１ｍｇ）を週１回で４回投与、倍率２０倍。

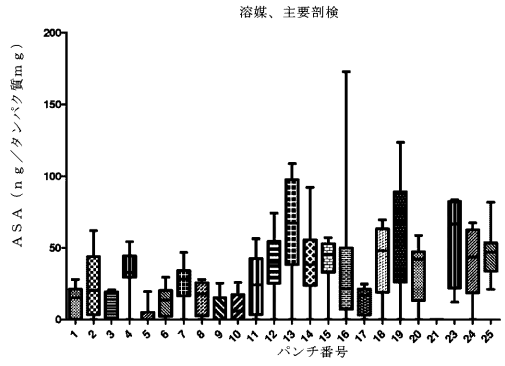
【図１１７】

【図１１７】



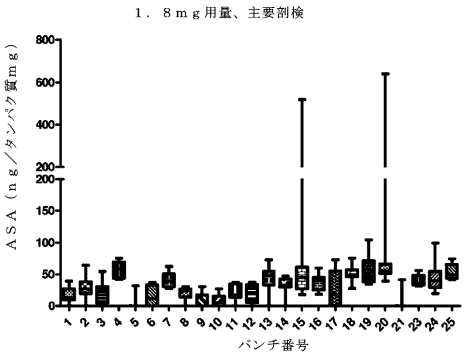

【図１１８】

【図１１８】



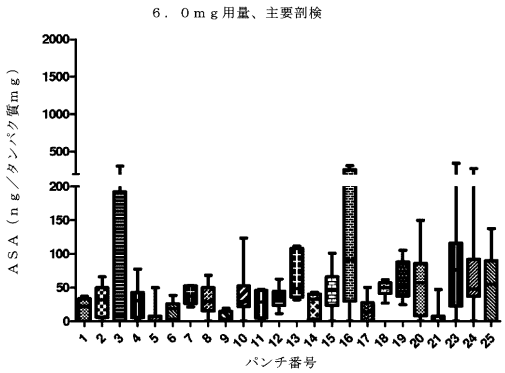

【図１１９】

【図１１９】



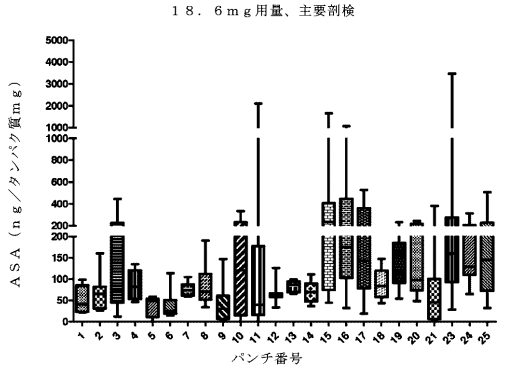
【図１２０】

【図１２０】



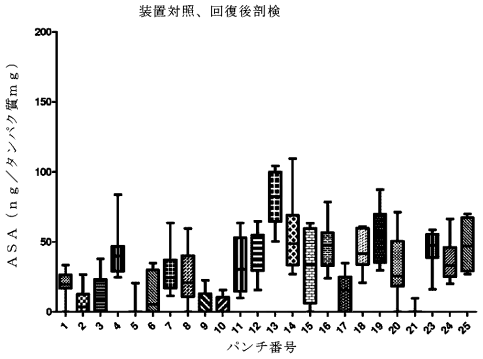

【図１２１】

【図１２１】



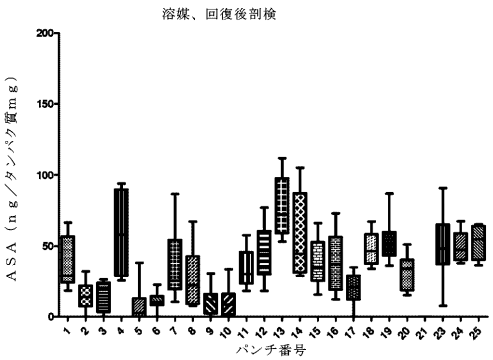

【図１２２】

【図１２２】



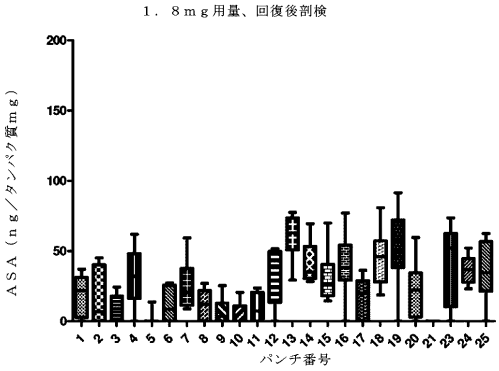

【図１２３】

【図１２３】



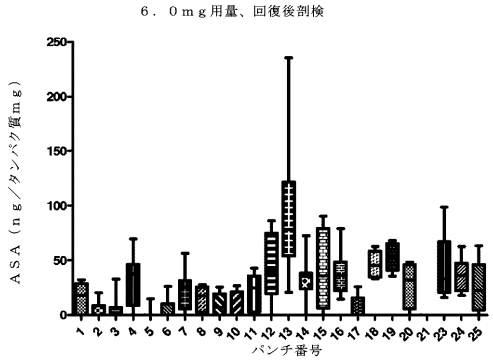
【図１２４】

【図１２４】



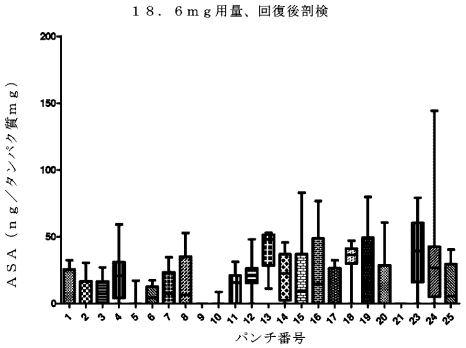

【図１２５】

【図１２５】



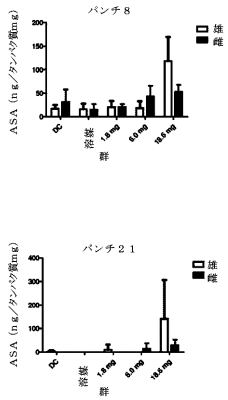

【図１２６】

【図１２６】



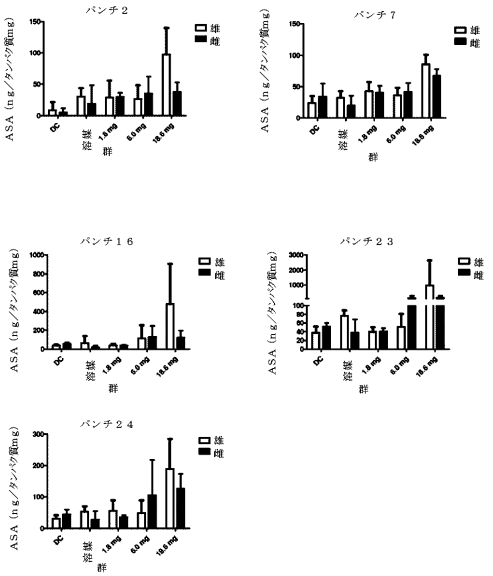

【図１２７】

【図１２７】



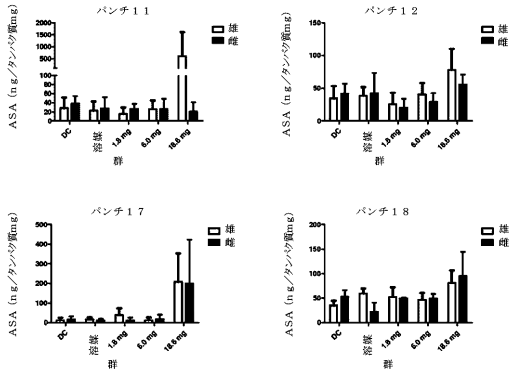

【図１２８】

【図１２８】



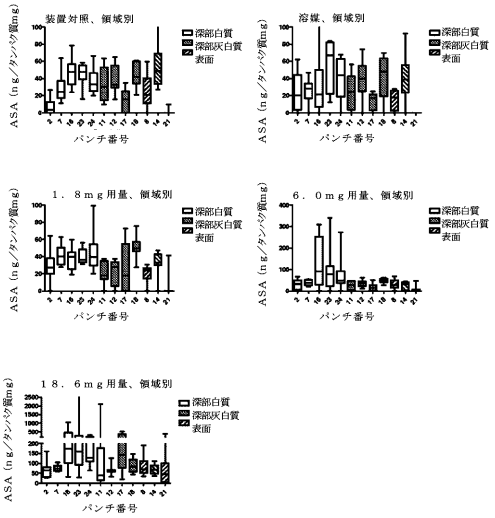
【図１２９】

【図１２９】



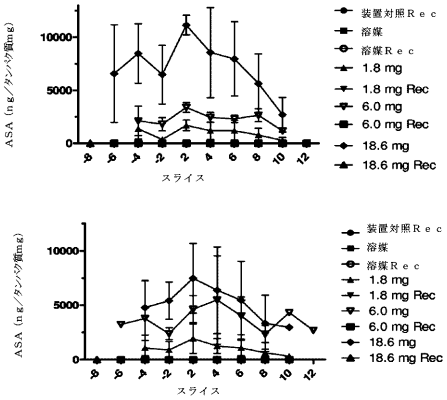

【図１３０】

【図１３０】



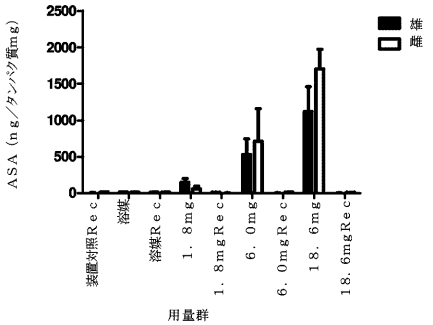

【図１３１】

【図１３１】



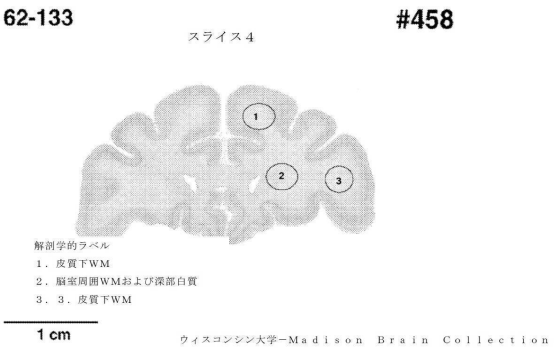

【図１３２】

【図１３２】




【図１３３】

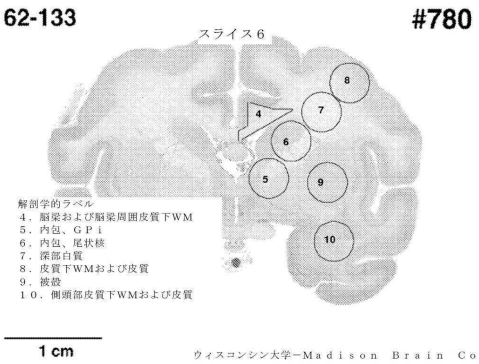
【図１３３】




脳パンチの解剖学的位置

【図１３４】

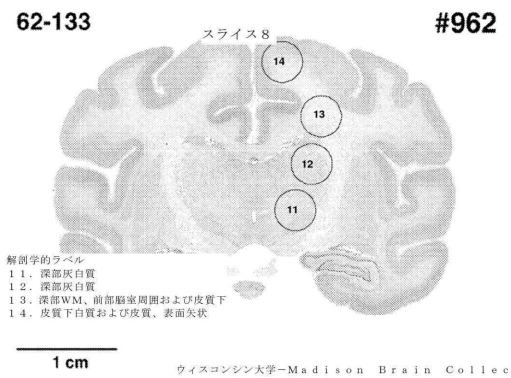
【図１３４】




脳パンチの解剖学的位置

【図１３５】

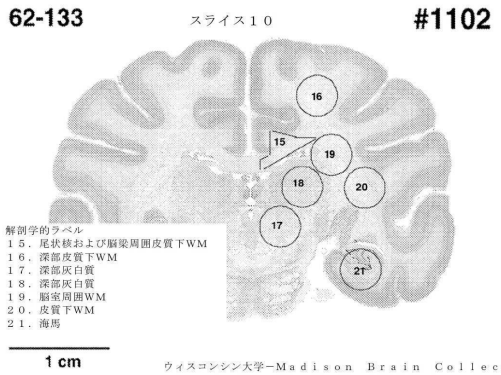
【図１３５】




脳パンチの解剖学的位置

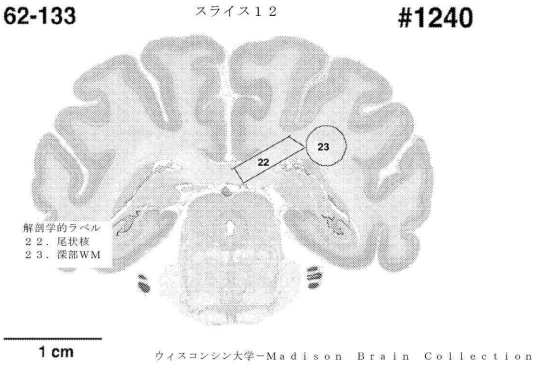
【図１３６】

【図１３６】



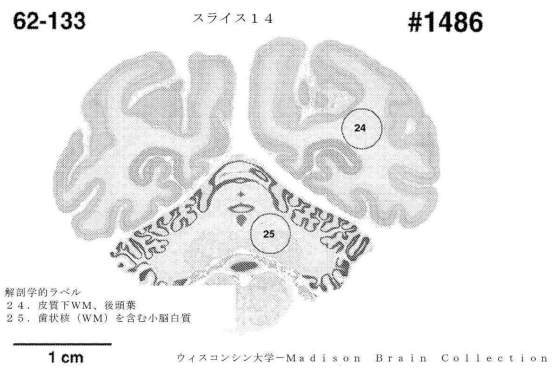

【図１３７】

【図１３７】



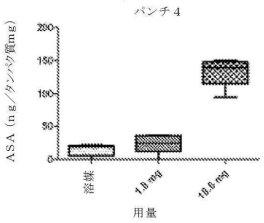
【図１３８】

【図１３８】



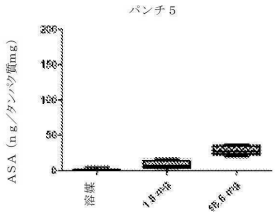

【図１３９Ａ】

【図１３９Ａ】



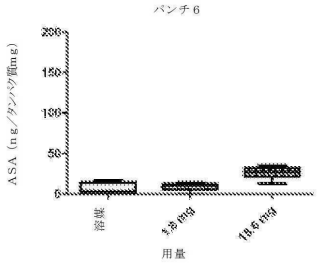

【図１３９Ｂ】

【図１３９Ｂ】



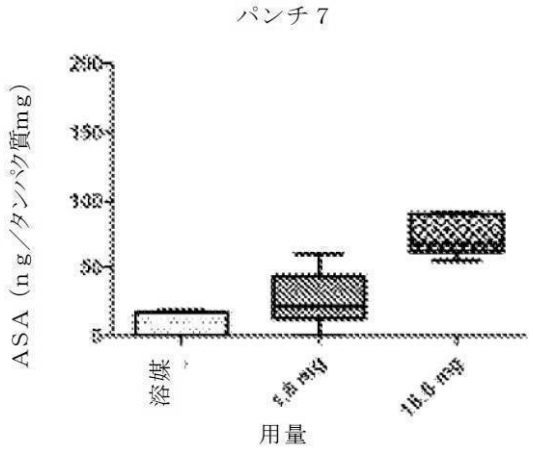

【図１３９Ｃ】

【図１３９Ｃ】



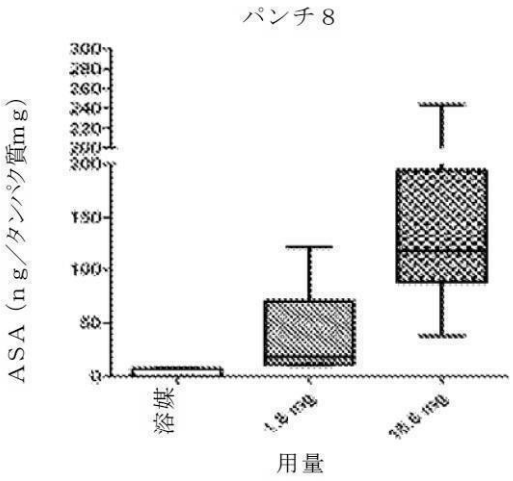

【図１３９Ｄ】

【図１３９Ｄ】



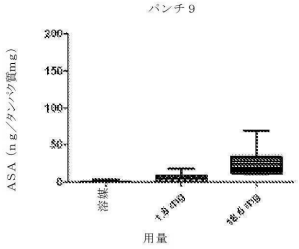

【図１３９Ｅ】

【図１３９Ｅ】



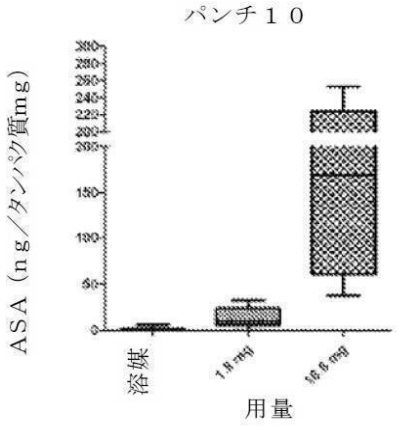

【図１３９Ｆ】

【図１３９Ｆ】



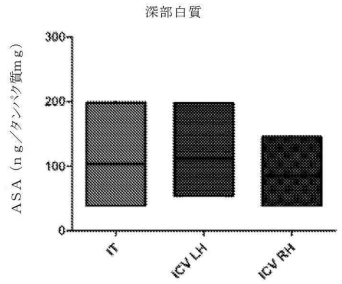
【図１３９Ｇ】

【図１３９Ｇ】

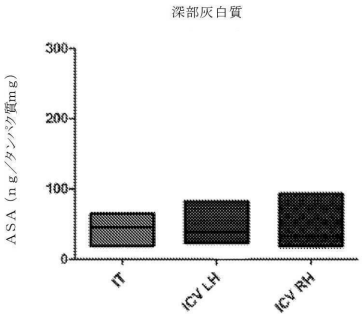



【図１４０】

【図１４０Ａ】

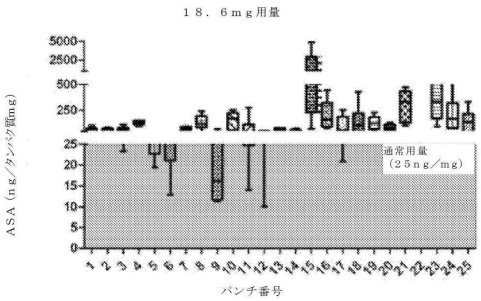



【図１４０Ｂ】

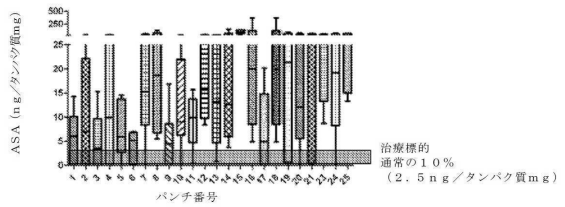



【図１４１】

【図１４１Ａ】

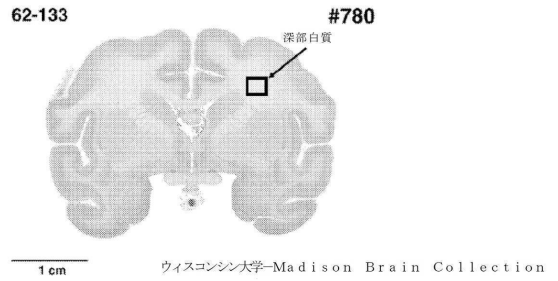



【図１４１Ｂ】



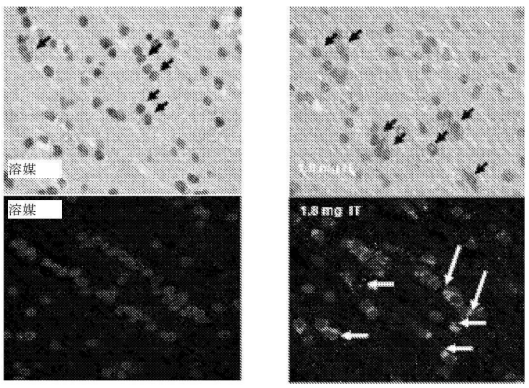

【図１４２Ａ】

【図１４２Ａ】



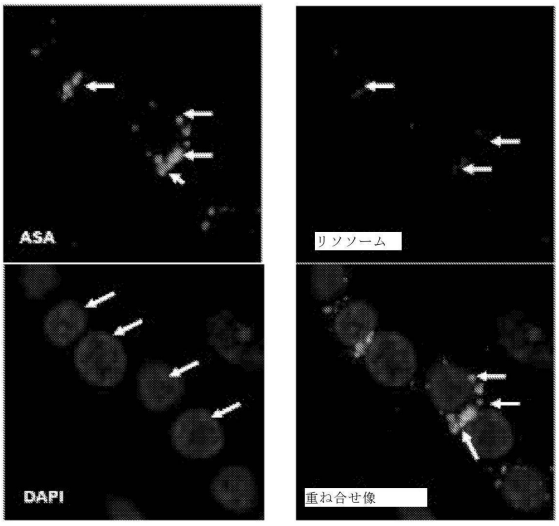

【図１４２Ｂ】

【図１４２Ｂ】



【図１４２Ｃ】

【図１４２Ｃ】




【図１４３】

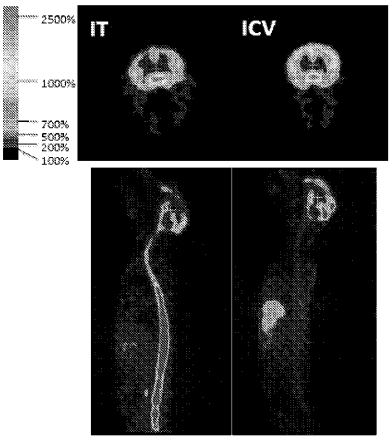
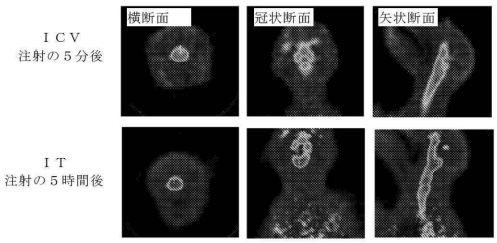



Figure 143

【図１４４】

【図１４４】




【図１４５】

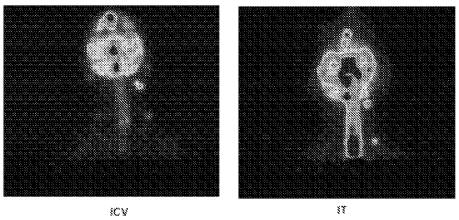
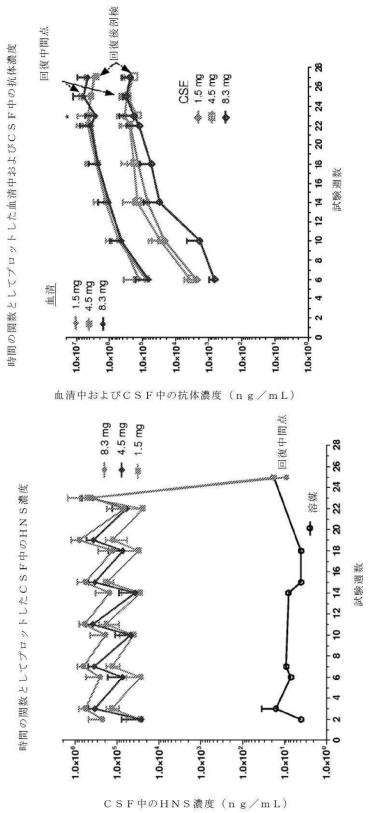



Figure 145

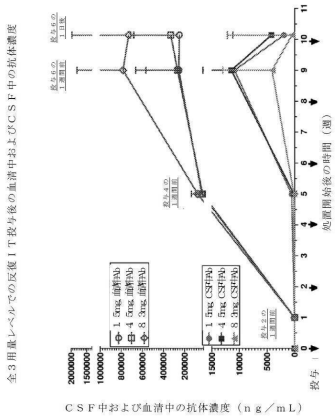
【図１４６－１】

【図１４６－１】



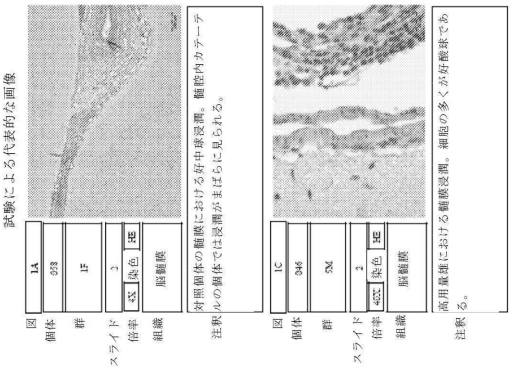
【図１４６－２】

【図１４６－２】



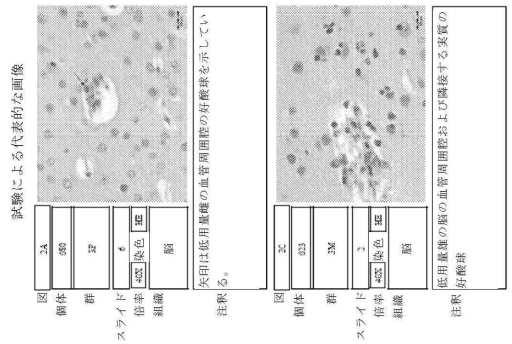

【図１４７－１】

【図１４７－１】



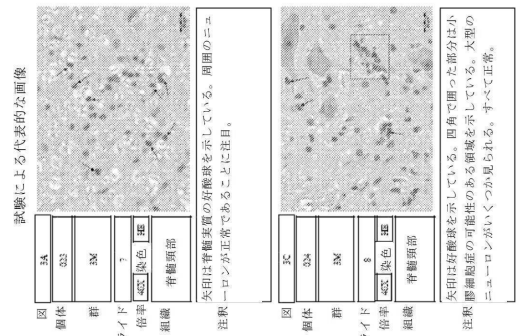

【図１４７－２】

【図１４７－２】



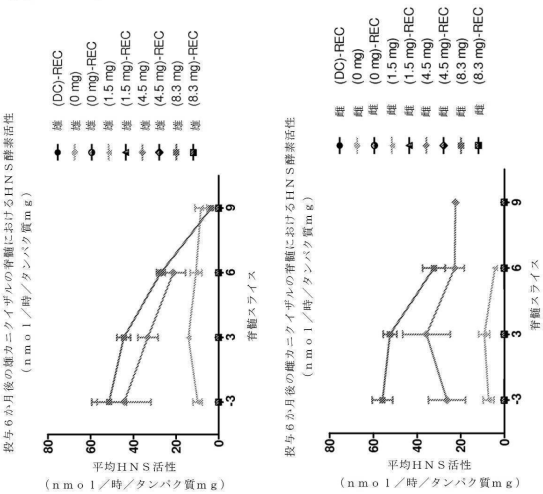

【図１４７－３】

【図１４７－３】



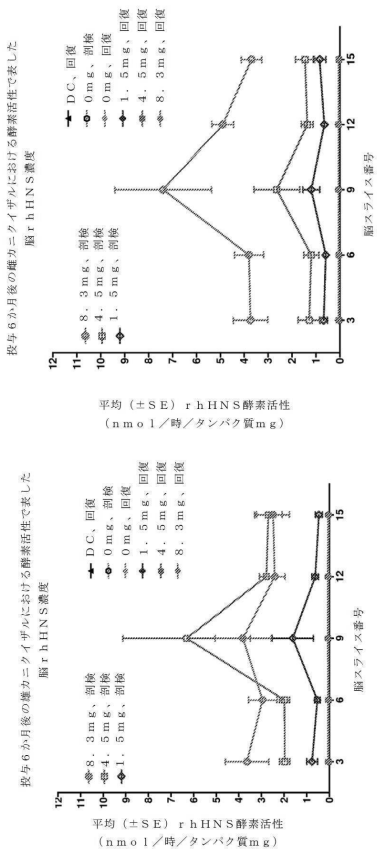

【図１４８－１】

【図１４８－１】



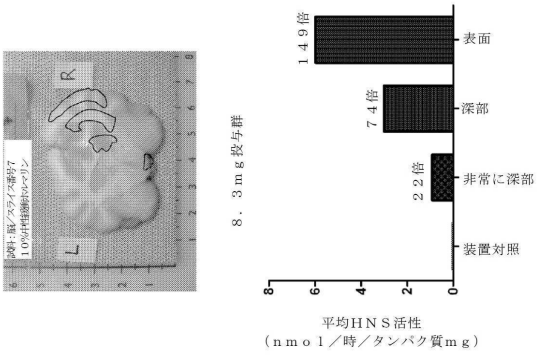
【図１４８－２】

【図１４８－２】



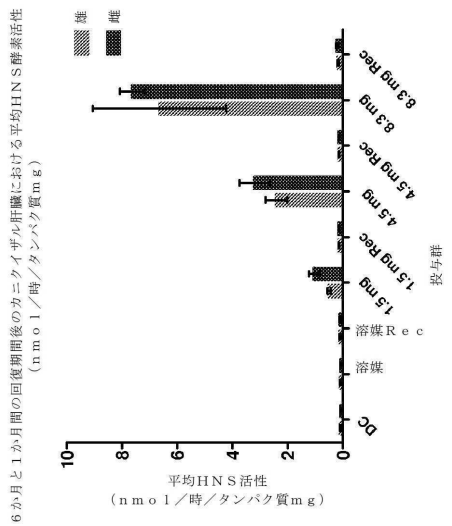

【図１４９Ａ】

【図１４９Ａ】



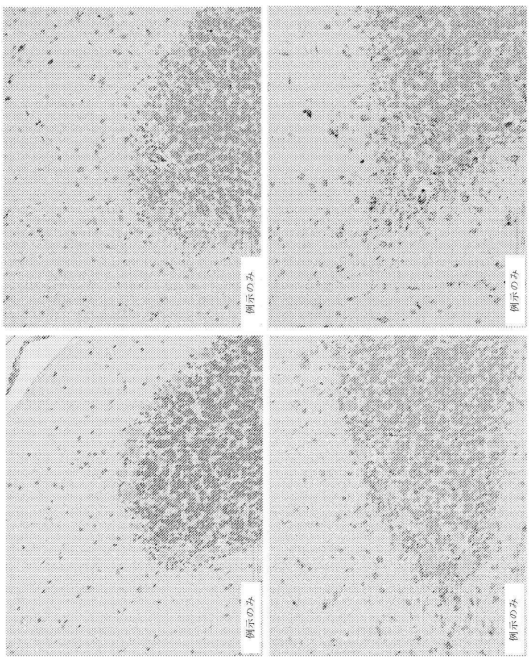

【図１４９Ｂ】

【図１４９Ｂ】



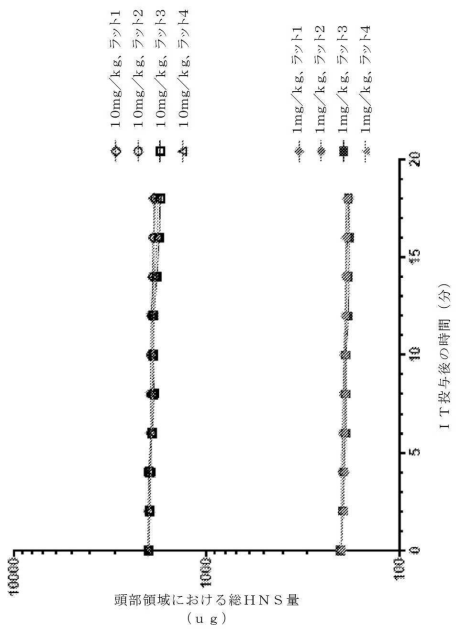

【図１５０】

【図１５０】



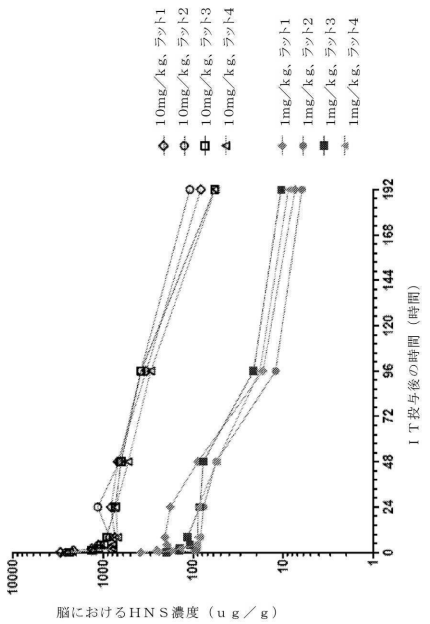
【図１５１】

【図１５１】



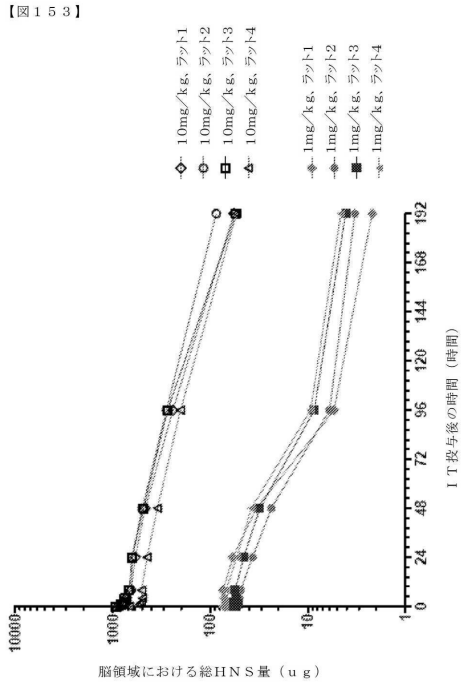

【図１５２】

【図１５２】



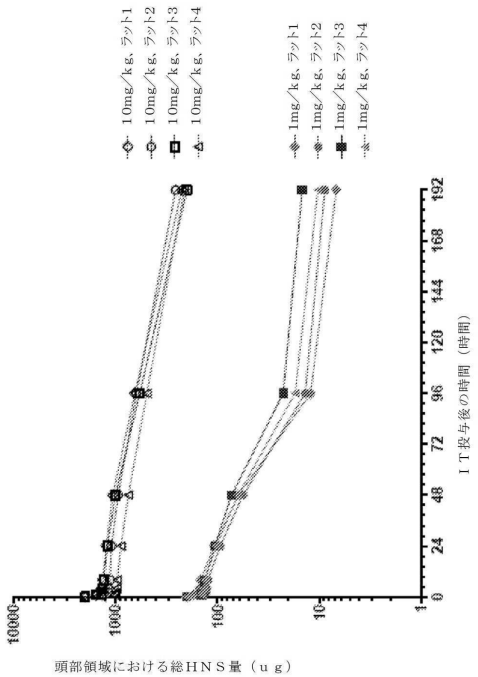

【図１５３】

【図１５３】



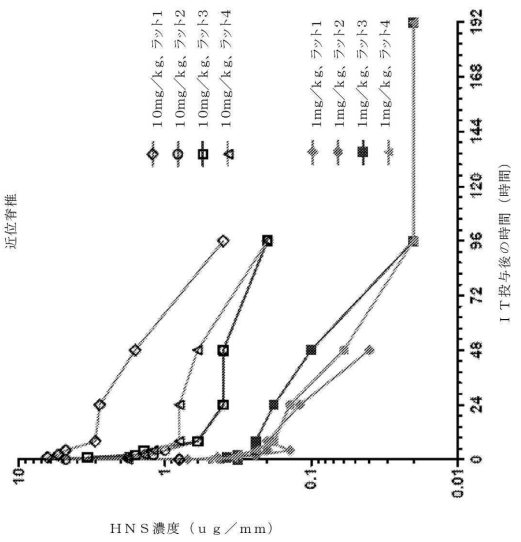

【図１５４】

【図１５４】



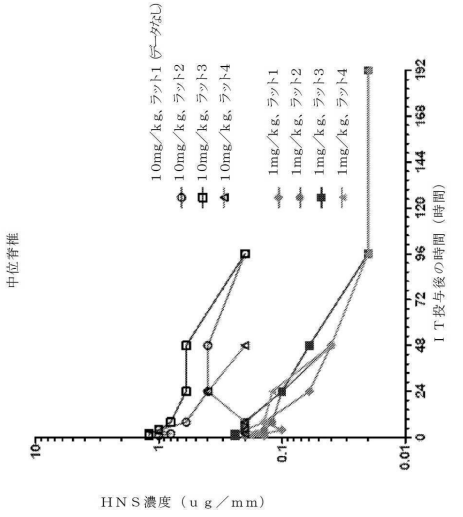
【図１５５】

【図１５５】



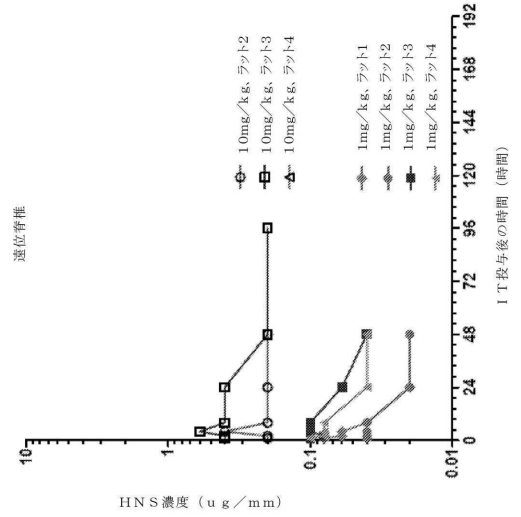

【図１５６】

【図１５６】



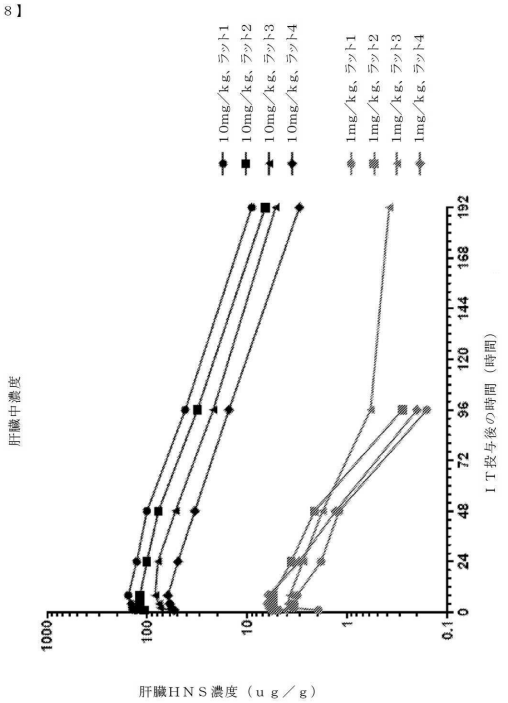

【図１５７】

【図１５７】



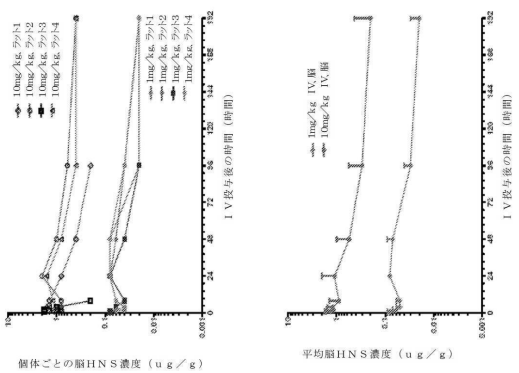

【図１５８】

【図１５８】



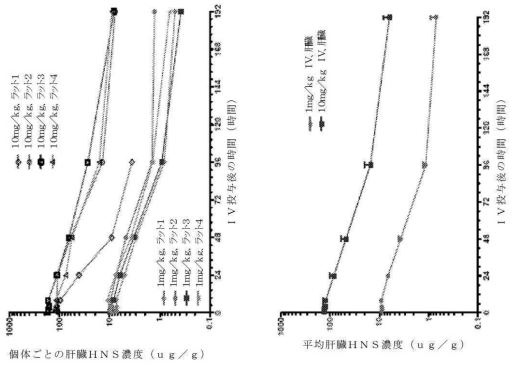
【図１５９】

【図１５９】



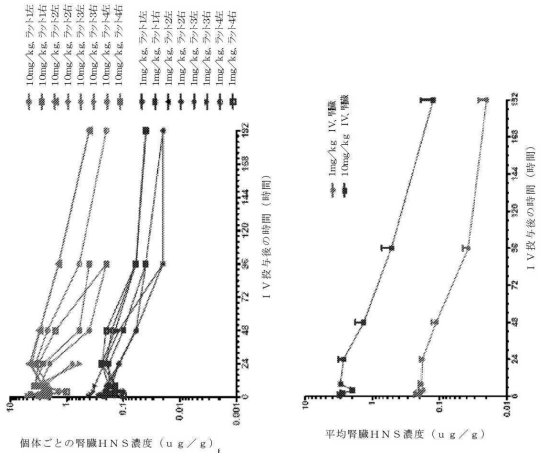

【図１６０】

【図１６０】



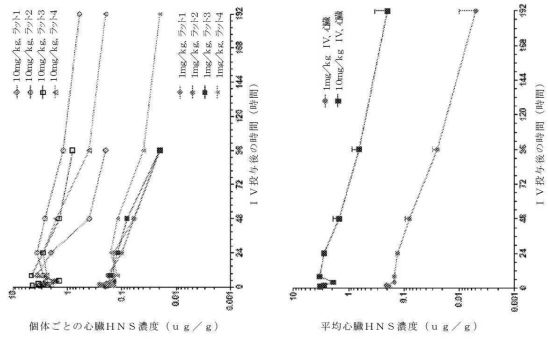

【図１６１】

【図１６１】



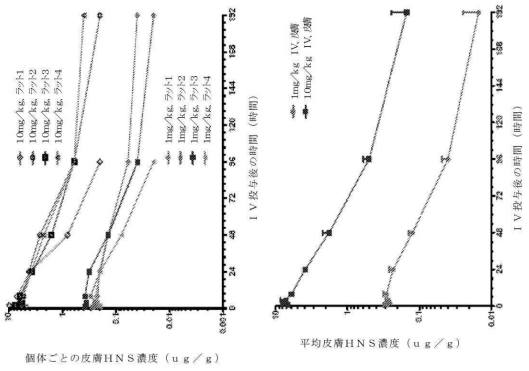

【図１６２】

【図１６２】



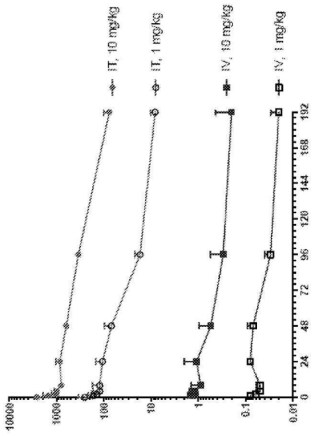
【図１６３】

【図１６３】




【図１６４】

【図１６４】

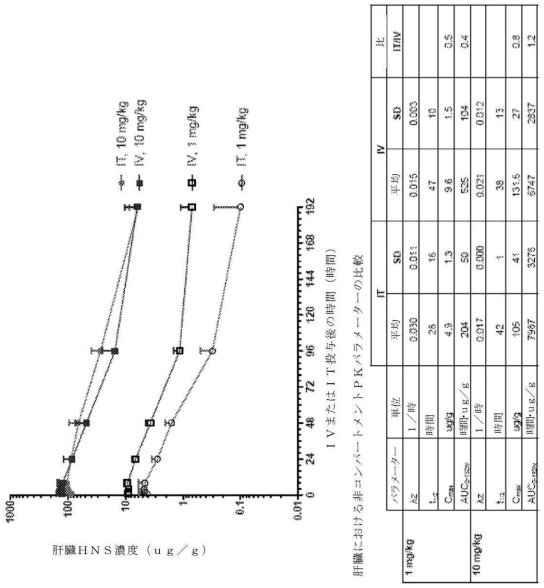



脳におけるHNSパラメーターの比較

| | パラメーター | 単位 | IT 平均 | IT SD | IV 平均 | IV SD | 比 IT/IV |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 mg/kg | λz | 1／時 | 0.018 | 0.003 | 0.011 | 0.005 | |
| | t½ | 時間 | 45 | 7 | 71 | 23 | |
| | Cmax | ng/g | 257 | 96 | 0.1 | 0.0 | 3212 |
| | AUCinf | 時間*ug／g | 8385 | 2457 | 7 | 2 | 1136 |
| 10 mg/kg | λz | 1／時 | 0.014 | 0.001 | 0.102 | 0.166 | |
| | t½ | 時間 | 49 | 4 | 80 | 53 | |
| | Cmax | ng/g | 2626 | 265 | 1.8 | 0.2 | 1501 |
| | AUCinf | 時間*ug／g | 83962 | 18883 | 86 | 95 | 973 |

【図１６５】

【図１６５】




肝臓における非コンパートメントPKパラメーターの比較

| | パラメーター | 単位 | IT 平均 | IT SD | IV 平均 | IV SD | 比 IT/IV |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 mg/kg | λz | 1／時 | 0.030 | 0.011 | 0.015 | 0.003 | |
| | t½ | 時間 | 26 | 16 | 47 | 10 | |
| | Cmax | ng/g | 4.3 | 1.3 | 9.6 | 1.5 | 0.5 |
| | AUCinf | 時間*ug／g | 204 | 58 | 526 | 104 | 0.4 |
| 10 mg/kg | λz | 1／時 | 0.017 | 0.000 | 0.025 | 0.012 | |
| | t½ | 時間 | 42 | 1 | 28 | 13 | |
| | Cmax | ng/g | 105 | 41 | 131.6 | 27 | 0.8 |
| | AUCinf | 時間*ug／g | 7937 | 3278 | 5747 | 2837 | 1.2 |

【図１６６】

【図１６６】

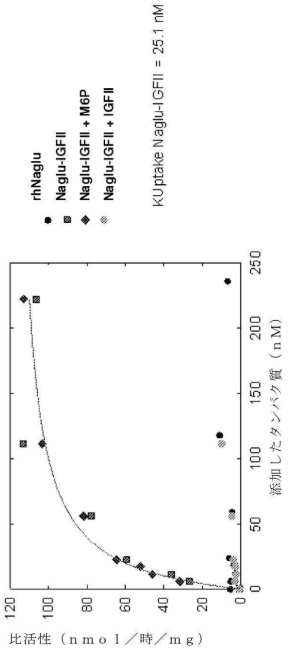



図２－１３．正常ヒト由来の初代線維芽細胞（Ｓｈｉｒｅ　ＨＦ１１５６細胞）をｒｈＮａｇｌｕおよびＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの細胞内取込み試験に使用した。ｒｈＮａｇｌｕの細胞内取込みが最小限であったのに対し、Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの細胞内取込みは極めて顕著であった。Ｎａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩ取込みの飽和曲線は受容体を介した取込みを示していた。この取込みはＩＧＦＩＩにより阻害されたが、マンノース－６－リン酸によっては阻害されなかった。

【図１６７】

【図１６７】

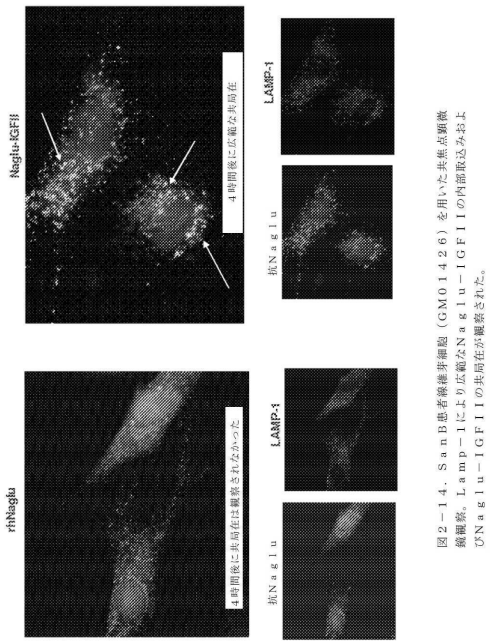



図２－１４．ＳａｎＢ患者線維芽細胞（ＧＭ０１４２６）を用いた共焦点顕微鏡観察。Ｌａｍｐ－１により広範なＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの内部取込みおよびＮａｇｌｕ－ＩＧＦＩＩの共局在が観察された。

【図１６８】

【図１６８】

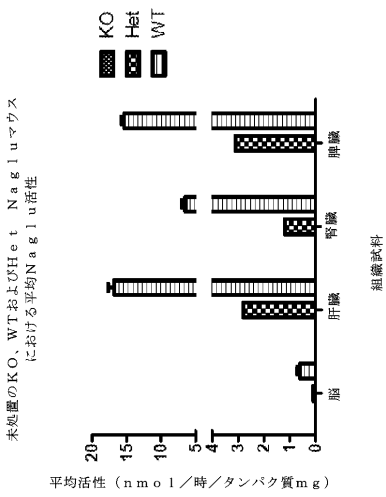
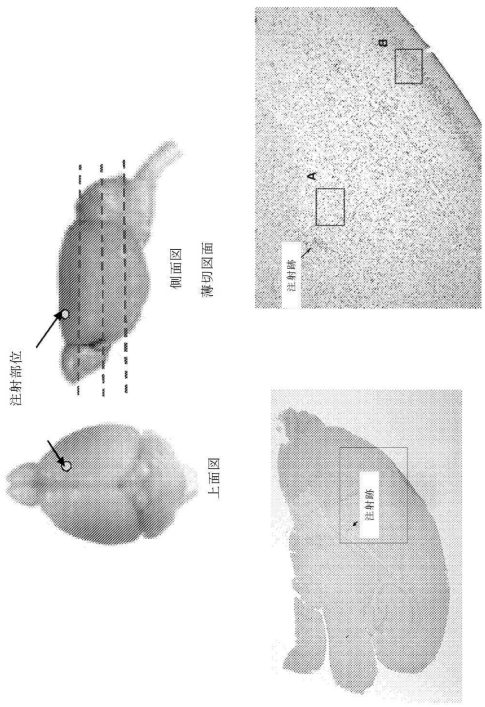



図２－１５．野性型（ＷＴ）、Ｎａｇｌｕ－／－（ＫＯ）およびヘテロ接合体Ｎａｇｌｕ＋／－（Ｈｅｔ）マウスにおけるＮａｇｌｕ活性。ＳａｎＢマウスでは、脳、肝臓、腎臓および脾臓で全欠損が観察された。

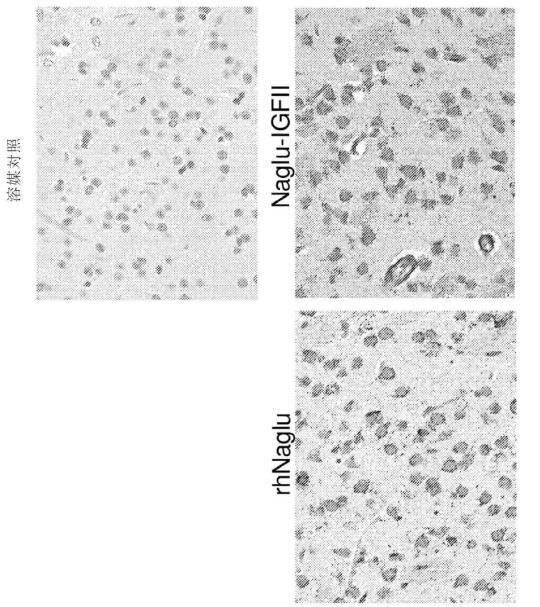
【図１６９】

【図１６９】



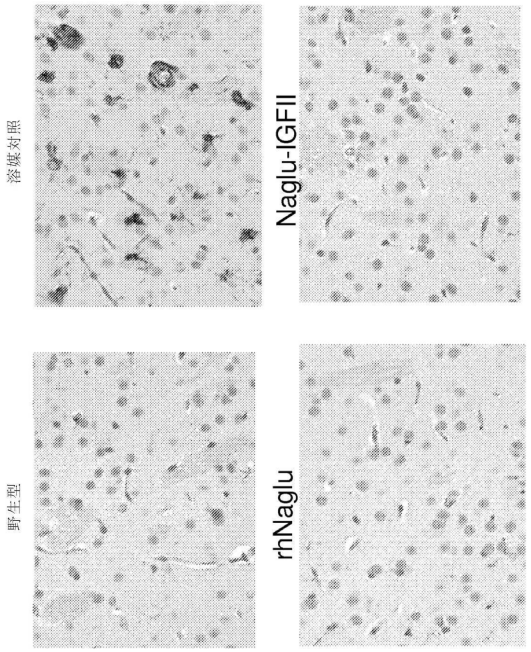

【図１７０】

【図１７０】



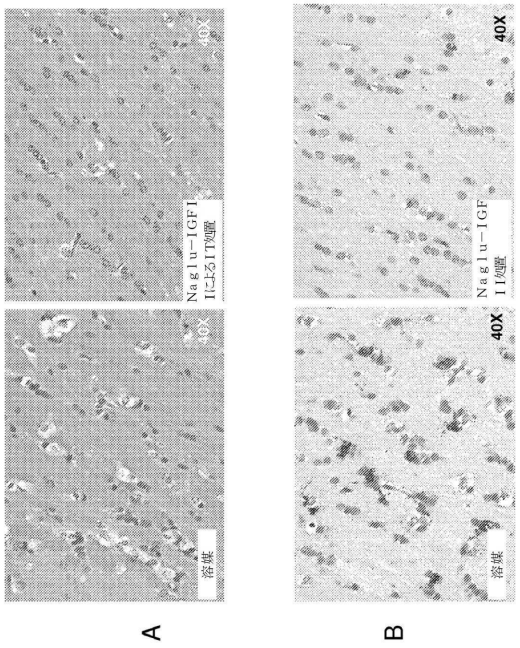
【図１７１】

【図１７１】



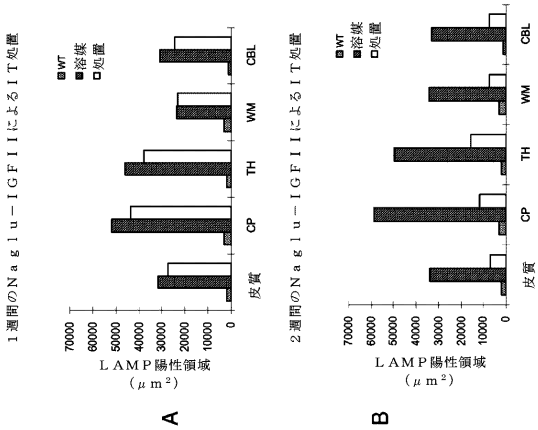

【図１７２】

【図１７２】



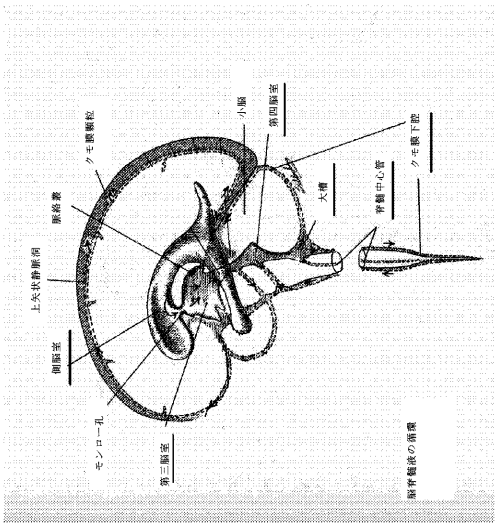

【図１７３】

【図１７３】



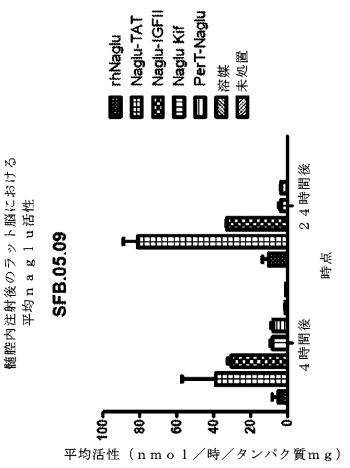

【図１７４】

【図１７４】



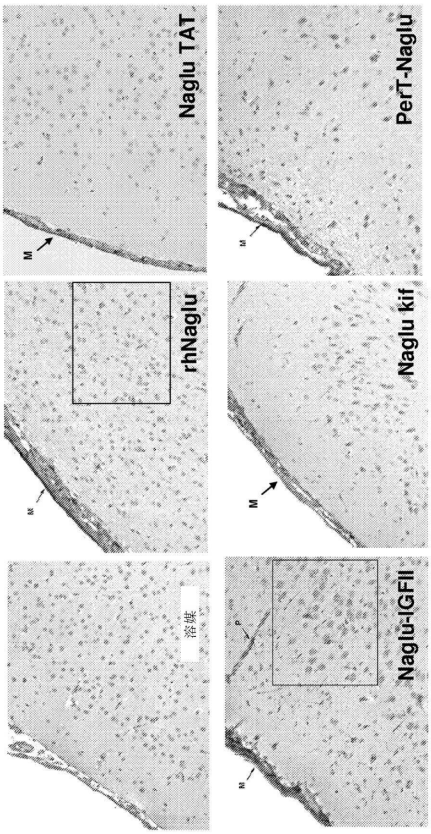
【図１７５】

【図１７５】

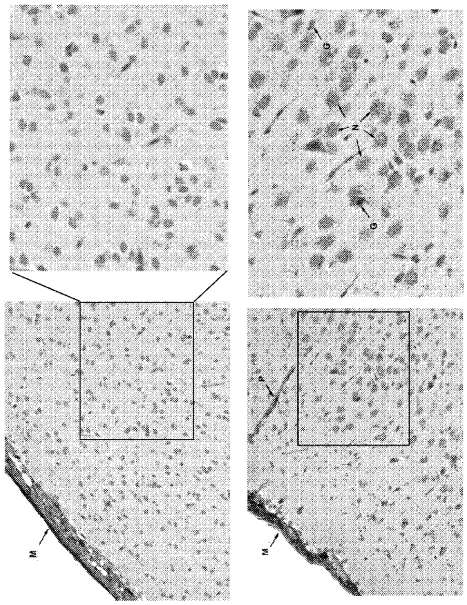



【図１７６】

【図１７６】



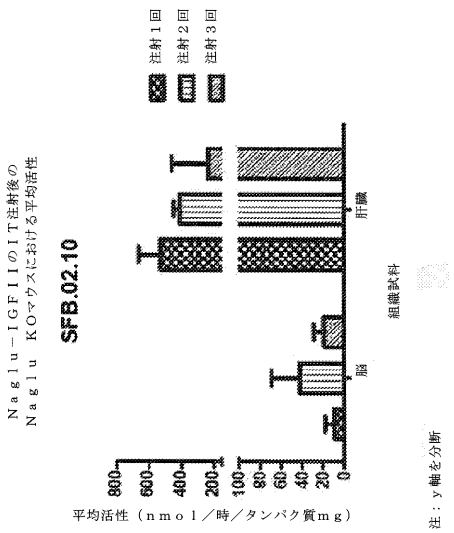

【図１７７】




【図１７８】

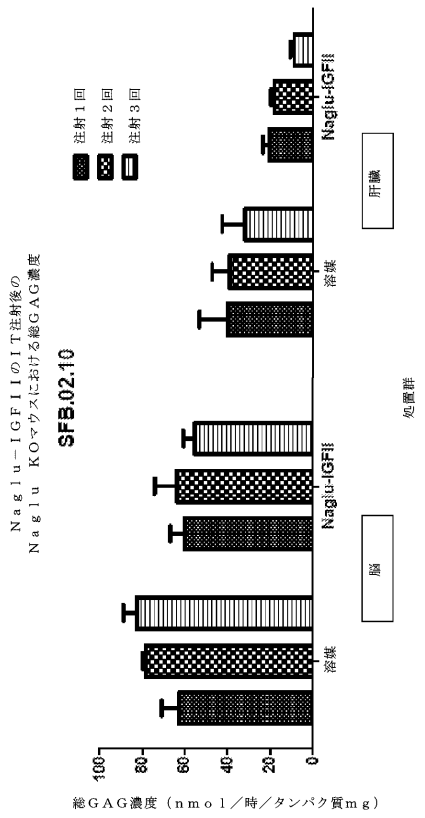
【図１７８】

Figure 177



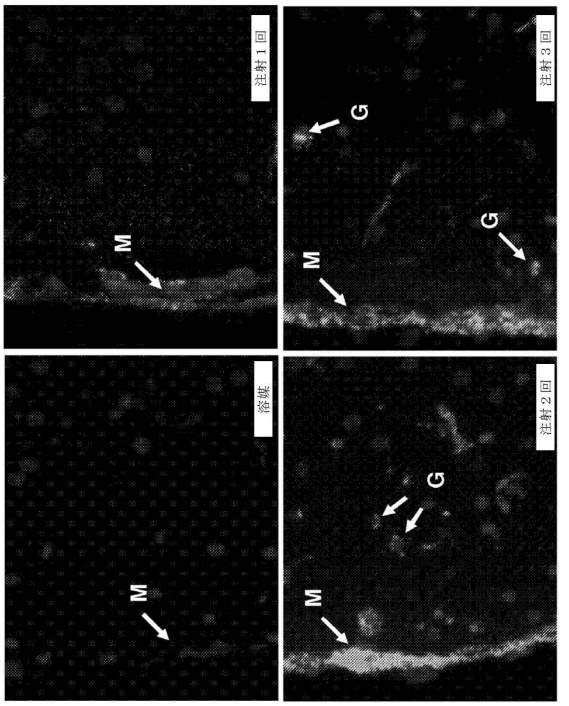
【図１７９】

【図１７９】



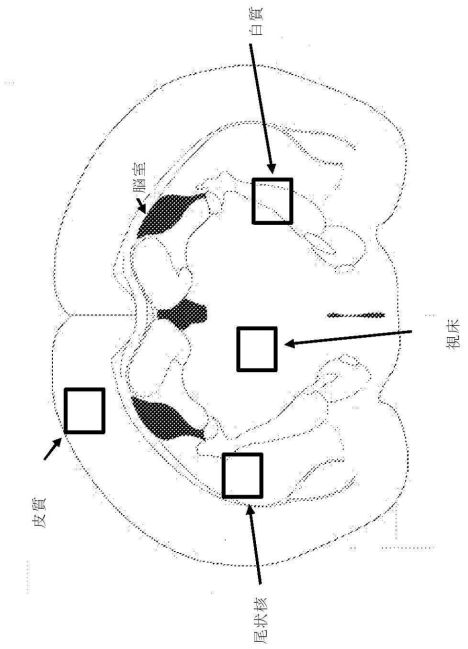

【図１８０】

【図１８０】



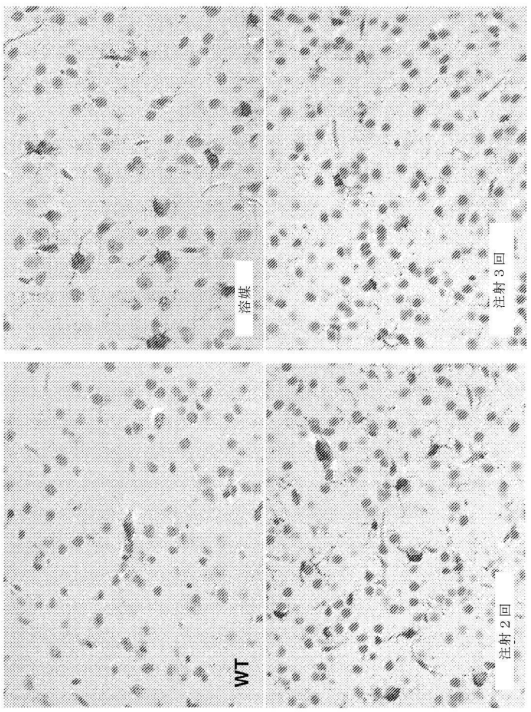

【図１８１】

【図１８１】



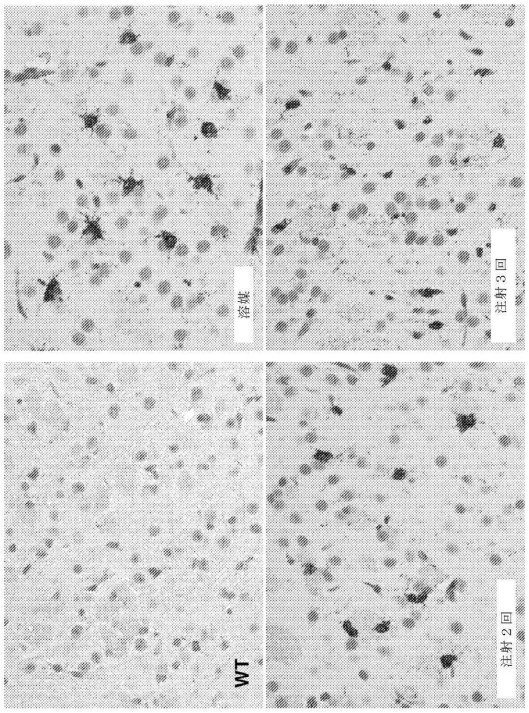

【図１８２】

【図１８２】



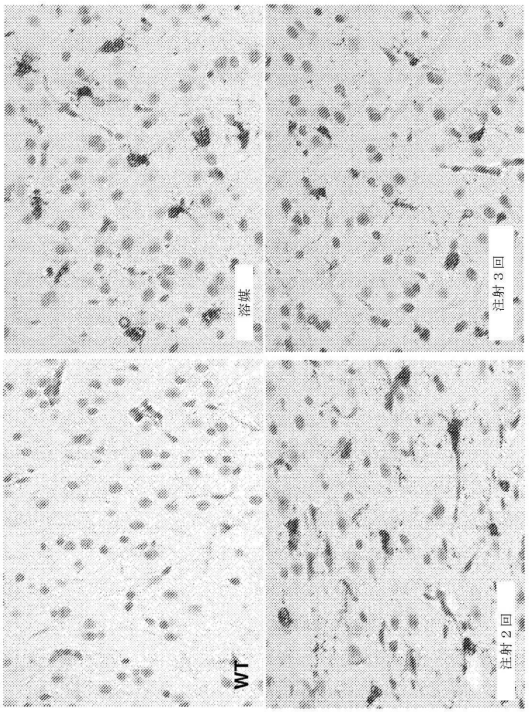
【図１８３】

【図１８３】



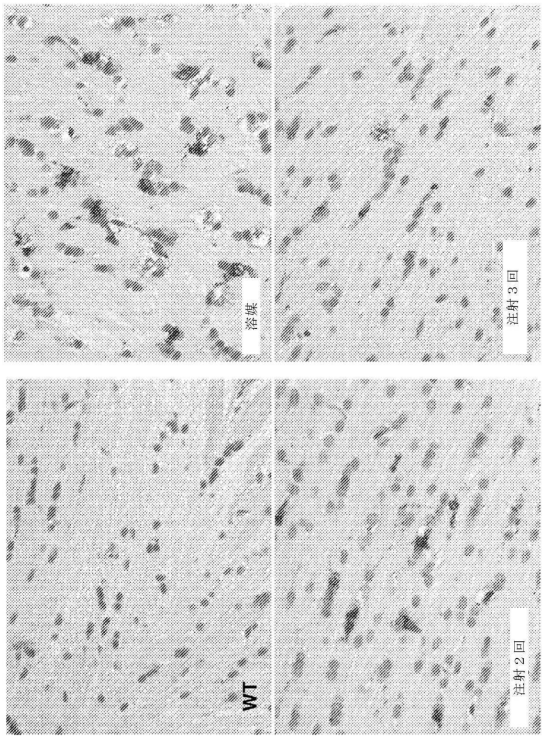

【図１８４】

【図１８４】



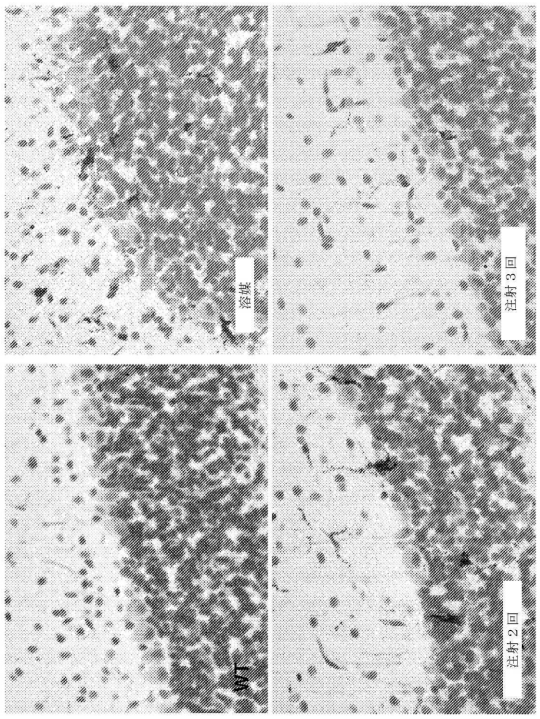

【図１８５】

【図１８５】



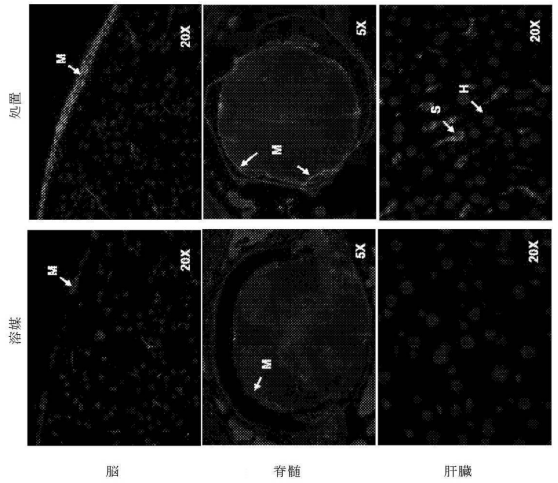

【図１８６】

【図１８６】



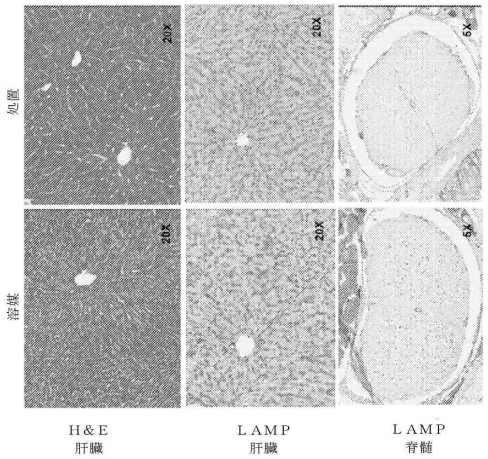
【図１８７】

【図１８７】



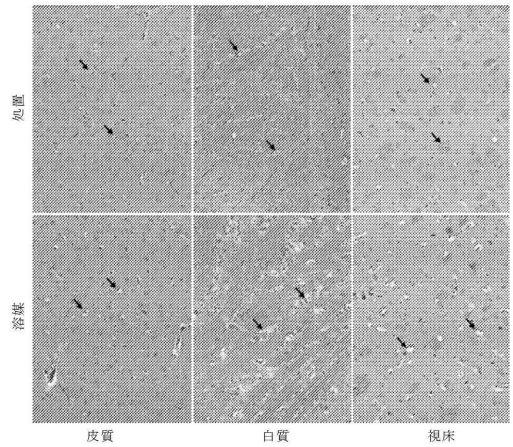

【図１８８】

【図１８８】



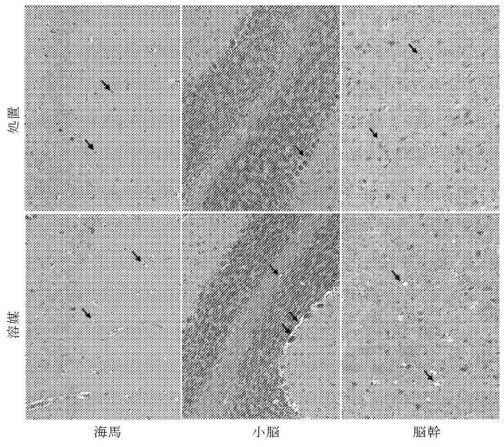

【図１８９Ａ】

【図１８９Ａ】



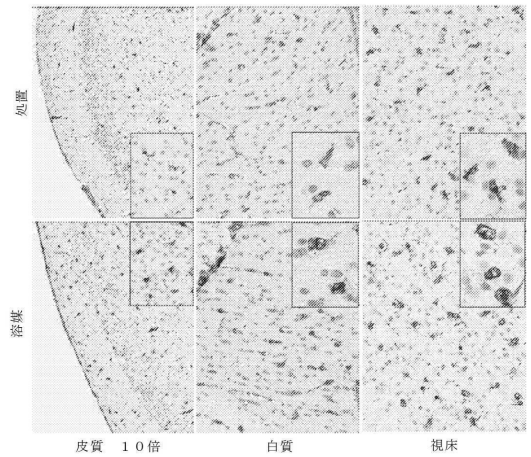

【図１８９Ｂ】

【図１８９Ｂ】



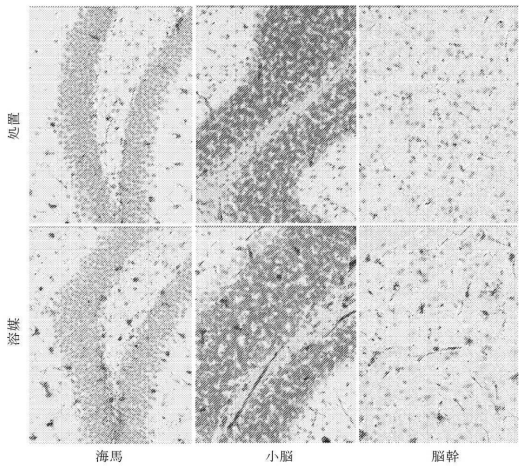
【図１９０Ａ】

【図１９０Ａ】



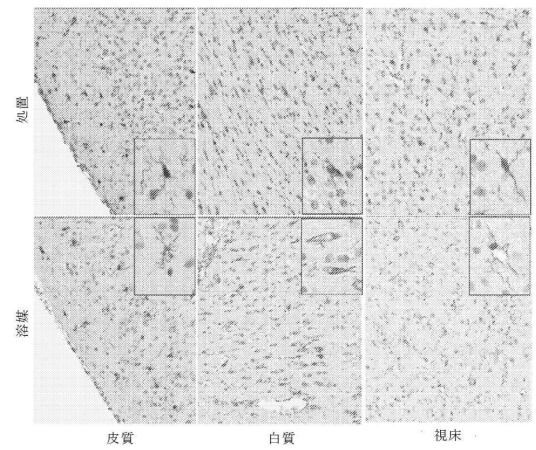

【図１９０Ｂ】

【図１９０Ｂ】



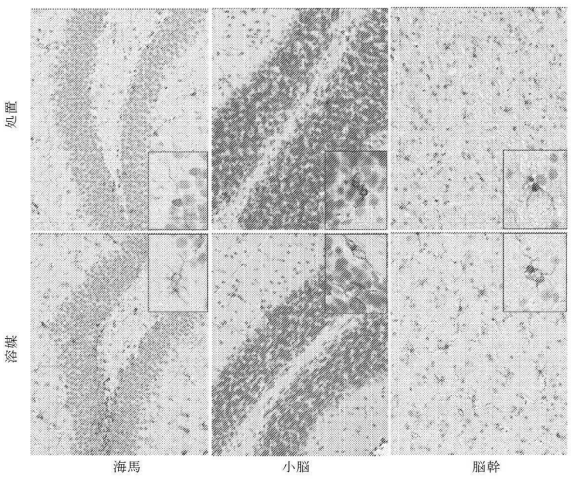

【図１９１Ａ】

【図１９１Ａ】



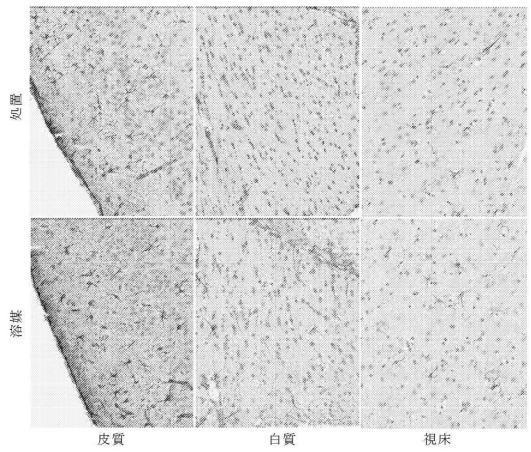

【図１９１Ｂ】

【図１９１Ｂ】



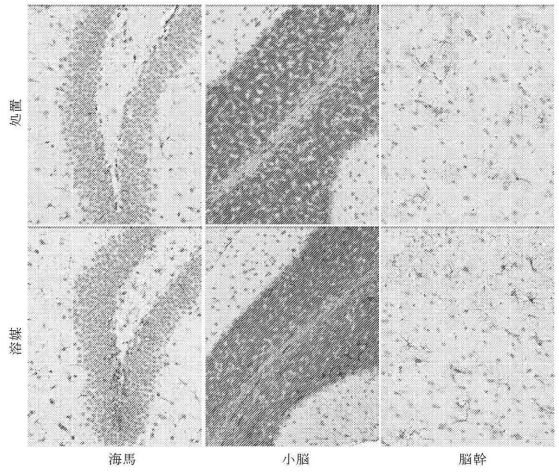
【図１９２Ａ】

【図１９２Ａ】




【図１９２Ｂ】

【図１９２Ｂ】



フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/435,710
(32)優先日 平成23年1月24日(2011.1.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 61/442,115
(32)優先日 平成23年2月11日(2011.2.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 61/360,786
(32)優先日 平成22年7月1日(2010.7.1)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 61/495,268
(32)優先日 平成23年6月9日(2011.6.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 61/358,857
(32)優先日 平成22年6月25日(2010.6.25)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(72)発明者 ペリクルス カリアス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１７６, メルローズ, スウェンズ ポンド アベニュー ３９
(72)発明者 ジン パン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１７１９, ボックスボロー, デポット ロード ８６８
(72)発明者 ジャン パウエル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１７４２, コンコード, オールド マルボロ ロード ５６０
(72)発明者 ローレンス チャーナス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１７６０, ネイティック, ミル ストリート ４９
(72)発明者 トーマス マッコーリー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４１, ケンブリッジ, ゴア ストリート ８５
(72)発明者 テレサ リア ライト
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２, レキシントン, アール ストリート ３９
(72)発明者 リチャード ファイファー
アメリカ合衆国 コネチカット ０６０６０, ノース グランビー, シルバー ストリート ２４３
(72)発明者 ザーラ シャーロク
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４９３, ウェストン, テラス ロード ５

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献 特表２００７－５０４１６６（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ３８／００

A61K 47/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)