

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6073783号
(P6073783)

(45) 発行日 平成29年2月1日(2017.2.1)

(24) 登録日 平成29年1月13日(2017.1.13)

(51) Int.Cl.	F 1
A 6 1 K 38/45	(2006.01) A 6 1 K 37/52
A 6 1 P 25/00	(2006.01) A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 25/18	(2006.01) A 6 1 P 25/18
A 6 1 P 25/20	(2006.01) A 6 1 P 25/20
A 6 1 K 47/04	(2006.01) A 6 1 K 47/04

請求項の数 19 (全 102 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-516843 (P2013-516843)
(86) (22) 出願日	平成23年6月25日(2011.6.25)
(65) 公表番号	特表2013-530988 (P2013-530988A)
(43) 公表日	平成25年8月1日(2013.8.1)
(86) 國際出願番号	PCT/US2011/041922
(87) 國際公開番号	W02011/163647
(87) 國際公開日	平成23年12月29日(2011.12.29)
審査請求日	平成26年6月25日(2014.6.25)
(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	米国(US)
(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	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】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

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

サンフィリッポA症候群を処置する方法における使用のための安定な製剤であって、前記方法は、対象に前記製剤を髄腔内投与するステップを含み、前記製剤は、5mg/ml以上の濃度のヘパランN-スルファターゼ(HNS)タンパク質および50mM以下の濃度のリン酸塩を含み、塩およびポリソルベート界面活性剤をさらに含む、製剤。

【請求項2】

前記ポリソルベート界面活性剤が、0.005~0.2%の範囲の濃度で存在する、請求項1に記載の使用のための安定な製剤。

【請求項3】

前記髄腔内投与が、前記対象に実質的な有害作用を生じさせず、必要に応じて、前記髄腔内投与が、前記対象に実質的な適応T細胞媒介免疫応答を生じさせない、請求項1~2のいずれか一項に記載の使用のための安定な製剤。

【請求項4】

(i) 前記製剤の前記髄腔内投与が、1種または複数の標的脳組織への前記HNSタンパク質の送達を生じさせ、必要に応じて、

(a) 前記1種または複数の標的脳組織が、灰白質、白質、室周囲領域、軟膜・毛膜、髓膜、新皮質、小脳、大脳皮質の深部組織、分子層、尾状/被殼領域、中脳、脳橋もしくは髓質の深部領域、およびこれらの組み合わせの組織からなる群から選択され、そして/または

10

20

(b) 前記 H N S タンパク質が、ニューロン、グリア細胞、血管周囲細胞および／または髄膜細胞に送達され、

(i i) 前記 H N S タンパク質が、脊髄のニューロンにさらに送達され、

(i i i) 前記製剤の前記髄腔内投与が、末梢標的組織への前記 H N S タンパク質の全身送達をさらに生じさせ、必要に応じて、前記末梢標的組織が、肝臓、腎臓および／または心臓から選択され、

(i v) 前記製剤の前記髄腔内投与が、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リソソーム局在化を生じさせ、

(v) 前記製剤の前記髄腔内投与が、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リソソーム蓄積を減少させ、必要に応じて、前記リソソーム蓄積が、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 倍だけ減少し、そして／あるいは

(v i) 前記製剤の前記髄腔内投与が、ニューロンの空胞形成を減少させ、必要に応じて、前記ニューロンがブルキン工細胞を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の安定な製剤。

【請求項 5】

前記製剤の前記髄腔内投与が、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 H N S 酵素活性を増加させ、必要に応じて

(i) 前記 H N S 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 倍だけ増加し、そして／または

(i i) 前記増加した酵素活性が、少なくとも 10 nmol / 時・mg、20 nmol / 時・mg、40 nmol / 時・mg、50 nmol / 時・mg、60 nmol / 時・mg、70 nmol / 時・mg、80 nmol / 時・mg、90 nmol / 時・mg、100 nmol / 時・mg、150 nmol / 時・mg、200 nmol / 時・mg、250 nmol / 時・mg、300 nmol / 時・mg、350 nmol / 時・mg、400 nmol / 時・mg、450 nmol / 時・mg、500 nmol / 時・mg、550 nmol / 時・mg または 600 nmol / 時・mg であり、

(i i i) 前記 H N S 酵素活性が腰部領域において増加し、

必要に応じて、前記腰部領域において増加した H N S 酵素活性が、少なくとも 2000 nmol / 時・mg、3000 nmol / 時・mg、4000 nmol / 時・mg、5000 nmol / 時・mg、6000 nmol / 時・mg、7000 nmol / 時・mg、8000 nmol / 時・mg、9000 nmol / 時・mg または 10,000 nmol / 時・mg である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の使用のための安定な製剤。

【請求項 6】

前記製剤の前記髄腔内投与が、サンフィリッポ A 症候群の少なくとも 1 つの症状もしくは特徴の強度、重症度または頻度の低下あるいは発症遅延を生じさせ、

必要に応じて、前記サンフィリッポ A 症候群の少なくとも 1 つの症状もしくは特徴が、聴力損失、言語発達障害、運動技能の欠乏、多動性障害、精神遅滞、攻撃性および／または睡眠障害である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の使用のための安定な製剤。

【請求項 7】

(i) 前記髄腔内投与が静脈内投与と併せて使用され、必要に応じて、前記静脈内投与が 1 か月に 1 回以下の頻度であるか、または 2 ヶ月に 1 回以下の頻度であり、あるいは

(i i) 前記髄腔内投与が静脈内投与の非存在下で使用され、そして／あるいは

(i i i) 前記髄腔内投与が 2 週間に 1 回、1 か月に 1 回、または 2 ヶ月に 1 回実施され、そして／あるいは

(i v) 前記髄腔内投与が同時免疫抑制薬療法の非存在下で使用される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の使用のための安定な製剤。

【請求項 8】

ヘパラン N - スルファターゼ (H N S) タンパク質、およびリン酸塩を含む髄腔内投与用の安定な製剤であって、ここで、

前記 H N S タンパク質が、5 m g / m l 以上の濃度で存在し；
 前記リン酸塩が、5 0 m M 以下の濃度で存在し；そして
 前記製剤が、サンフィリッポ A 症候群を処置するために使用され、塩およびポリソルベート界面活性剤をさらに含む、製剤。

【請求項 9】

前記 H N S タンパク質が、5 ~ 1 0 0 m g / m l の範囲の濃度で、必要に応じて 5 ~ 3 0 m g / m l の範囲の濃度で、必要に応じて 1 0 ~ 2 0 m g / m l の範囲の濃度で、必要に応じて 1 5 m g / m l の濃度で存在する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の安定な製剤または使用のための安定な製剤。

【請求項 10】

前記 H N S タンパク質が、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の安定な製剤または使用のための安定な製剤。

【請求項 11】

(i) 前記塩が N a C 1 であり、

必要に応じて、前記 N a C 1 が、0 ~ 3 0 0 m M の範囲の濃度で、必要に応じて、1 0 0 ~ 2 0 0 m M の範囲の濃度で、必要に応じて、1 4 5 m M の濃度で存在し、

(i i) 前記ポリソルベート界面活性剤が、ポリソルベート 2 0 、ポリソルベート 4 0 、ポリソルベート 6 0 、ポリソルベート 8 0 およびこれらの組み合わせからなる群から選択され、

必要に応じて、前記ポリソルベート界面活性剤がポリソルベート 2 0 であり、前記ポリソルベート 2 0 が 0 ~ 0 . 0 5 % の範囲の濃度で、必要に応じて、0 . 0 2 % の濃度で、必要に応じて、0 . 0 0 5 % の濃度で存在し、そして / または

(i i i) 前記リン酸塩が 2 0 m M 以下の濃度で、必要に応じて 5 m M の濃度で存在する、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の安定な製剤または使用のための安定な製剤。

【請求項 12】

前記製剤が、5 . 0 ~ 8 . 0 、6 . 5 ~ 7 . 5 、または 7 . 0 の p H を有する、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の安定な製剤または使用のための安定な製剤。

【請求項 13】

前記製剤が、安定化剤をさらに含み、

(i) 前記安定化剤が、スクロース、グルコース、マンニトール、ソルビトール、P E G 4 0 0 0 、ヒスチジン、アルギニン、リジン、リン脂質およびこれらの組み合わせからなる群から選択され、

(i i) 前記安定化剤がスクロースであり、前記スクロースが 0 ~ 1 0 % の範囲の濃度で存在し、必要に応じて、前記スクロースが 0 . 5 ~ 2 . 0 % の範囲の濃度で存在し、または

(i i i) 前記安定化剤がグルコースであり、前記グルコースが 0 . 5 ~ 1 . 0 % の範囲の濃度で存在する、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の安定な製剤または使用のための安定な製剤。

【請求項 14】

前記製剤が、

(i) 液体製剤であるか、または

(i i) 凍結乾燥した乾燥粉末として製剤化される、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の安定な製剤または使用のための安定な製剤。

【請求項 15】

前記製剤が、5 ~ 3 0 m g / m l の範囲の濃度のヘパラン N スルファターゼ (H N S) タンパク質と、1 0 0 ~ 2 0 0 m M の範囲の濃度の N a C 1 と、0 . 0 2 % の濃度のポリソルベート 2 0 と、5 m M の濃度のリン酸塩とを含み、7 . 0 の p H を有する、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の安定な製剤または使用のための安定な製剤。

【請求項 16】

(i) 前記 H N S タンパク質が 1 5 m g / m l の濃度であり、そして / または

10

20

30

40

50

(i i) 前記 N a C l が 1 4 5 m M の濃度である、請求項 1 5 に記載の安定な製剤または使用のための安定な製剤。

【請求項 1 7】

前記製剤が、 1 4 5 m M の濃度の N a C l と、
(i) 0 . 5 ~ 2 % の範囲の濃度のスクロース、または
(i i) 0 . 5 ~ 1 . 0 % の範囲の濃度のグルコース

を含み、必要に応じて、前記製剤が凍結乾燥した乾燥粉末として製剤化される、請求項 1 6 に記載の安定な製剤または使用のための安定な製剤。

【請求項 1 8】

請求項 1 0 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の安定な製剤の単一剤形を含む容器であって、
必要に応じて、

(i) 前記容器は、アンプル、充填済み注射器、バイアル、薬包、 L y o - J e c t 、またはレザバーから選択され、必要に応じて前記容器は充填済みバイアルであり、そして / または

(i i) 前記安定な製剤が、 5 0 m l 未満の容積で、必要に応じて 5 . 0 m l 未満の容積で存在する、容器。

【請求項 1 9】

請求項 1 に記載の使用のための安定な製剤であって、前記塩が N a C l であり、かつ 5 0 ~ 3 0 0 m M の範囲の濃度で存在し、前記製剤が 5 ~ 7 の p H を有する、製剤。

10

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(関連出願の相互参照)

本願は、米国特許仮出願第 6 1 / 3 5 8 , 8 5 7 号（ 2 0 1 0 年 6 月 2 5 日出願）；第 6 1 / 3 6 0 , 7 8 6 号（ 2 0 1 0 年 7 月 1 日出願）； 6 1 / 3 8 7 , 8 6 2 （ 2 0 1 0 年 9 月 2 9 日出願）；第 6 1 / 4 3 5 , 7 1 0 （ 2 0 1 1 年 1 月 2 4 日出願）；第 6 1 / 4 4 2 , 1 1 5 （ 2 0 1 1 年 2 月 1 1 日出願）；第 6 1 / 4 7 6 , 2 1 0 号（ 2 0 1 1 年 4 月 1 5 日出願）；および第 6 1 / 4 9 5 , 2 6 8 号（ 2 0 1 1 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に援用される）に対する優先権を主張する。本願は、米国特許出願 表題「治療薬の C N S 送達」（ 同日出願 ）；「イズロン酸スルファターゼの C N S 送達のための方法および組成物」（ 同日出願 ）；「 - ガラクトセレブロシダーゼの C N S 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 C N S 送達のための方法および組成物」（ 同日出願 ）；「サンフィリッポ症候群 B 型の治療」（ 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に援用される。

技術分野

【0 0 0 2】

酵素補充療法（ E R T ）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（ C N S ）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（ B B B ）を適切に横断しないため、 C N S 病因を有する疾患の処置は特に挑戦的であった。

【0 0 0 3】

血液 - 脳関門（ B B B ）は、 B B B を横切って、根元的脳脊髄液（ C S F ）および C N S 中に、血流中の有害物質、例えば細菌、高分子物質（ 例えはタンパク質 ）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（ C N S ）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】

40

50

【0004】

直接脳内注射、B B B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B B B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（非特許文献1；非特許文献2）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。10

【0005】

髄腔内（I T）注射または脳脊髄液（C S F）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らない。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強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、C S F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た。20

【先行技術文献】**【非特許文献】****【0006】**

【非特許文献1】 Bobo, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 91, 2076 - 2080 (1994)

【非特許文献2】 Nguyen, et al. 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髓膜において、グリコサミノグリカン（G A C）の大きな蓄積がしばしば認められ、種々の型のC N S症候を生じさせる。今までのところ、リソーム障害に起因するC N S症候は、利用可能な任意の手段により首尾よく処置してきた。30

【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（C N S）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、リソーム蓄積症（例えば、サンフィリッポA症候群）のための補充酵素（例えば、ヘパランN - スルフアターゼ）が高濃度（例えば、約3 m g / m g以上、4 m g / m l、5 m g / m l、10 m g / m l以上）での治療を必要とする対象の脳脊髄液（C S F）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製剤を用いて、そして対象において実質的副作用、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40

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治療のための直接CNS送達のための非常に効率的な、臨床的に望ましい、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】

以下に詳細に記載するように、本発明者らは、ヘパランN-スルファターゼ(HNS)タンパク質の効果的な髄腔内(IT)投与のための安定な製剤を首尾よく開発した。しかしながら、本明細書に記載する種々の安定な製剤は、一般的に、種々の他のリソソーム酵素を含む治療薬のCNS送達にしていると考えられる。実際、本発明による安定な製剤は、それだけに限らないが、実質内、脳内、脳室内(ICV)、髄腔内(例えば、IT-腰椎、IT-大槽)投与ならびにCNSおよび/またはCSFへの直接または間接注射のための任意の他の技術および経路を含む、種々の技術および経路を介してCNS送達のために使用することができる。
10

【0011】

本明細書に記載する種々の安定な製剤は、一般的に、リソソーム蓄積症のための種々の補充酵素を含む治療用タンパク質などの他の治療薬のCNS送達に適しているとも考えられる。いくつかの実施形態では、補充酵素は、合成、組換え、遺伝子活性化または天然酵素であり得る。

【0012】

一態様では、本発明は、ヘパランN-スルファターゼ(HNS)タンパク質、塩、緩衝剤およびポリソルベート界面活性剤を含む髄腔内投与用の安定な製剤を提供する。いくつかの実施形態では、HNSタンパク質は、約1～300mg/mlの範囲の濃度(例えば、1～250mg/ml、1～200mg/ml、1～150mg/ml、1～100mg/ml、1～50mg/ml)で存在する。いくつかの実施形態では、HNSタンパク質は、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml、25mg/ml、30mg/ml、35mg/ml、40mg/ml、45mg/ml、50mg/ml、60mg/ml、70mg/ml、80mg/ml、90mg/ml、100mg/ml、150mg/ml、200mg/ml、250mg/mlまたは300mg/mlから選択される濃度でまたは最大この濃度まで存在する。
20

【0013】

種々の実施形態では、本発明は、HNSタンパク質が配列番号1のアミノ酸配列を含む、本明細書に記載する実施形態のいずれかの安定な製剤を含む。いくつかの実施形態では、HNSタンパク質は、配列番号1と少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または98%同一なアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載する実施形態のいずれかの安定な製剤は、塩を含む。いくつかの実施形態では、塩はNaClである。いくつかの実施形態では、NaClは、約0～300mMの範囲の濃度(例えば、0～250mM、0～200mM、0～150mM、0～100mM、0～75mM、0～50mMまたは0～30mM)として存在する。いくつかの実施形態では、NaClは、約135～155mMの範囲の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、NaClは、約145mMの濃度で存在する。
30

【0014】

種々の実施形態では、本発明は、ポリソルベート界面活性剤がポリソルベート20、ポリソルベート40、ポリソルベート60、ポリソルベート80およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、本明細書に記載する実施形態のいずれかの安定な製剤を含む。いくつかの実施形態では、ポリソルベート界面活性剤はポリソルベート20である。いくつかの実施形態では、ポリソルベート20は、約0～0.02%の範囲の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ポリソルベート20は、約0.005%の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ポリソルベート20は、約0.02%の濃度で存在する。
40

【0015】

50

種々の実施形態では、本発明は、緩衝剤をさらに含む、本明細書に記載する実施形態のいずれかの安定な製剤を含む。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、リン酸塩、酢酸塩、ヒスチジン、コハク酸塩、トリスおよびこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、緩衝剤はリン酸塩である。いくつかの実施形態では、リン酸塩は、50 mM以下濃度（例えば、45 mM、40 mM、35 mM、30 mM、25 mM、20 mM、15 mM、10 mMまたは5 mM以下）で存在する。いくつかの実施形態では、リン酸塩は、20 mM以下の濃度で存在する。特定の実施形態では、リン酸塩は、約5 mMの濃度で存在する。種々の態様では、本発明は、約3～8（例えば、約4～7.5、5～8、5～7.5、5～6.5、5～7.5、5.5～8.0、5.5～7.7、5.5～6.5、6～7.5、6～7.0または6.5～7.5）のpHを有する、本明細書に記載する実施形態のいずれかの安定な製剤を含む。いくつかの実施形態では、製剤は、約6.5～7.5（例えば、6.5、6.7、6.9、7.0、7.2、7.3または7.5）のpHを有する。いくつかの実施形態では、製剤は、約7.0のpHを有する。
10

【0016】

いくつかの実施形態では、製剤は、安定化剤をさらに含む。特定の実施形態では、安定化剤は、スクロース、グルコース、マンニトール、ソルビトール、PEG4000、ヒスチジン、アルギニン、リジン、リン脂質およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、安定化剤はスクロースである。いくつかの実施形態では、スクロースは、約0～10%の範囲の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、スクロースは、約0.5～2.0%の範囲の濃度で存在する。特定の実施形態では、安定化剤はグルコースである。いくつかの実施形態では、グルコースは、約0.5～1.0%の範囲の濃度で存在する。
20

【0017】

いくつかの実施形態では、本発明は、液体製剤である本明細書に記載する実施形態のいずれかの安定な製剤を含む。種々の実施形態では、本発明は、凍結乾燥した乾燥粉末として製剤化された本明細書に記載する実施形態のいずれかの安定な製剤を含む。

【0018】

いくつかの実施形態では、本発明は、最大約30 mg / mlの濃度のヘパランNスルファターゼ(HNS)タンパク質と、約100～200 mMの濃度のNaClと、約0.02%の濃度のポリソルベート20と、約5 mMの濃度のリン酸塩とを含み、約7.0のpHを有する髄腔内投与用の安定な製剤を含む。いくつかの実施形態では、HNSタンパク質は約15 mg / mlの濃度である。いくつかの実施形態では、HNSタンパク質は、約30 mg / ml、40 mg / ml、50 mg / ml、100 mg / ml、150 mg / ml、200 mg / ml、250 mg / mlまたは300 mg / mlの濃度である。いくつかの実施形態では、NaClは約145 mMの濃度である。いくつかの実施形態では、製剤は、約0～10%（例えば、約0～5%、1～7%、1～2.5%、1～1.5%または0.5～1.5%）の濃度のスクロースをさらに含む。
30

【0019】

いくつかの実施形態では、本発明は、最大約30 mg / mlの濃度のヘパランNスルファターゼ(HNS)タンパク質と、約145 mMの濃度のNaClと、約0.02%の濃度のポリソルベート20と、約5 mMの濃度のリン酸塩と、約0.5～2%の濃度のスクロースとを含み、約7.0のpHを有する髄腔内投与用の安定な製剤を含む。
40

【0020】

いくつかの実施形態では、本発明は、最大約30 mg / mlの濃度のヘパランNスルファターゼ(HNS)タンパク質と、約145 mMの濃度のNaClと、約0.02%の濃度のポリソルベート20と、約5 mMの濃度のリン酸塩と、約0.5～1.0%の濃度のグルコースとを含み、約7.0のpHを有する髄腔内投与用の安定な製剤を含む。

【0021】

種々の態様では、本発明は、本明細書に記載する種々の実施形態の安定な製剤の单一剤形を含む容器を含む。いくつかの実施形態では、容器は、アンプル、バイアル、бин、薬
50

包、レザバー、Lyophilicまたは充填済み注射器から選択される。いくつかの実施形態では、容器は充填済み注射器である。いくつかの実施形態では、充填済み注射器は、焼シリコーンコーティングしたホウケイ酸ガラス注射器、シリコーン噴霧したホウケイ酸ガラス注射器またはシリコーンを含まないプラスチック樹脂注射器から選択される。いくつかの実施形態では、安定な製剤は、約50ml未満（例えば、約45ml、40ml、35ml、30ml、25ml、20ml、15ml、10ml、5ml、4ml、3ml、2.5ml、2.0ml、1.5ml、1.0mlまたは0.5ml未満）の容積で存在する。いくつかの実施形態では、安定な製剤は、約3.0ml未満の容積で存在する。

【0022】

10

種々の態様では、本発明は、本明細書に記載する実施形態のいずれかによる製剤を、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、サンフィリッポA症候群の治療方法を含む。

【0023】

いくつかの実施形態では、本発明は、約1～300mg/mlの範囲の濃度のHNSタンパク質と、約145mMの濃度のNaClと、約0.02%の濃度のポリソルベート20とを含み、約7のpHを有する製剤を、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、サンフィリッポA症候群の治療方法を含む。

【0024】

20

いくつかの実施形態では、髄腔内投与は、対象に実質的な有害作用（例えば、重度の免疫応答）を生じさせない。いくつかの実施形態では、髄腔内投与は、対象に実質的な適応T細胞媒介免疫応答を生じさせない。

【0025】

いくつかの実施形態では、製剤の髄腔内投与は、脳、脊髄および/または末梢器官の種々の標的組織へのHNSタンパク質の送達を生じさせる。いくつかの実施形態では、製剤の髄腔内投与は、標的脳組織へのHNSタンパク質の送達を生じさせる。特定の実施形態では、1種または複数の標的脳組織は、灰白質、白質、室周囲領域、軟膜/毛膜、髄膜、新皮質、小脳、大脑皮質の深部組織、分子層、尾状/被殻領域、中脳、脳橋もしくは髄質の深部領域、およびこれらの組み合わせの組織からなる群から選択される。特定の実施形態では、HNSタンパク質は、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。いくつかの実施形態では、HNSタンパク質は、脊髄のニューロンにさらに送達される。

30

【0026】

いくつかの実施形態では、製剤の髄腔内投与は、末梢標的組織へのHNSタンパク質の全身送達を生じさせる。いくつかの実施形態では、末梢標的組織は、肝臓、腎臓、脾臓および/または心臓から選択される。

【0027】

40

いくつかの実施形態では、製剤の髄腔内投与は、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リソソーム局在化を生じる。いくつかの実施形態では、製剤の髄腔内投与は、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。いくつかの実施形態では、GAG貯蔵は、対照（例えば、対象の前処置GAG貯蔵）と比較して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、1.5倍または2倍低減される。いくつかの実施形態では、製剤の髄腔内投与は、ニューロンの空胞形成の低減を生じる（例えば、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）。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。

【0028】

50

いくつかの実施形態では、製剤の髄腔内投与は、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HNS酵素活性増大を生じる。いくつかの実施形態では、HNS酵素活性は、対照（例えば、対象の前処置内因性酵素）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。いくつかの実施形態では、HNS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。

【0029】

いくつかの実施形態では、HNS酵素活性は、腰部領域で増大される。いくつかの実施形態では、腰部領域におけるHNS酵素活性増大は、少なくとも約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。

10

【0030】

いくつかの実施形態では、製剤の髄腔内投与は、サンフィリッポA症候群の少なくとも1つの症状もしくは特徴の強度、重症度または頻度の低下あるいは発症遅延を生じさせる。いくつかの実施形態では、サンフィリッポA症候群の少なくとも1つの症状もしくは特徴は、聴力損失、言語発達遅延、運動技能の欠乏、多動性障害、精神遅滞、攻撃性および/または睡眠障害である。

20

【0031】

いくつかの実施形態では、髄腔内投与は2週間に1回実施される。いくつかの実施形態では、髄腔内投与は1か月に1回実施される。いくつかの実施形態では、髄腔内投与は2ヶ月に1回実施される。いくつかの実施形態では、髄腔内投与は静脈内投与と併せて使用される。いくつかの実施形態では、静脈内投与は、1週間に1回以下の頻度である。いくつかの実施形態では、静脈内投与は、2週間に1回以下の頻度である。いくつかの実施形態では、静脈内投与は、1か月に1回以下の頻度である。いくつかの実施形態では、静脈内投与は、2ヶ月に1回以下の頻度である。特定の実施形態では、静脈内投与は、毎月投与より頻回であり、例えば週2回、週1回、2週間に1回、または月2回実施される。

30

【0032】

いくつかの実施形態では、静脈内および髄腔内投与は、同日に実施される。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る得る。

40

【0033】

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、1年またはそれ以上の間)、その後、IT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、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、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)を実施する。

50

、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、1年またはそれ以上の間)を実施する。

【0034】

いくつかの実施形態では、髄腔内投与は、静脈内投与の非存在下で使用される。

【0035】

いくつかの実施形態では、髄腔内投与は、同時免疫抑制薬療法の非存在下で使用される。

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)

ヘパランN-スルファターゼ(HNS)タンパク質、塩、緩衝剤およびポリソルベート界面活性剤を含む髄腔内投与用の安定な製剤。

10

(項目2)

前記HNSタンパク質が、最大約100mg/mlの濃度で存在する、項目1に記載の安定な製剤。

(項目3)

前記HNSタンパク質が、最大約30mg/mlの濃度で存在する、項目1に記載の安定な製剤。

(項目4)

前記HNSタンパク質が、約10~20mg/mlの範囲の濃度で存在する、項目1から3のいずれか一項に記載の安定な製剤。

(項目5)

前記HNSタンパク質が、約15mg/mlの濃度で存在する、項目1から4のいずれか一項に記載の安定な製剤。

20

(項目6)

前記HNSタンパク質が、配列番号1のアミノ酸配列を含む、項目1から5のいずれか一項に記載の安定な製剤。

(項目7)

前記塩がNaClである、項目1から6のいずれか一項に記載の安定な製剤。

(項目8)

前記NaClが、約0~300mMの範囲の濃度で存在する、項目7に記載の安定な製剤。

30

(項目9)

前記NaClが、約100~200mMの濃度で存在する、項目8に記載の安定な製剤。

。

(項目10)

前記NaClが、約145mMの濃度で存在する、項目9に記載の安定な製剤。

(項目11)

前記ポリソルベート界面活性剤が、ポリソルベート20、ポリソルベート40、ポリソルベート60、ポリソルベート80およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、項目1から10のいずれか一項に記載の安定な製剤。

(項目12)

前記ポリソルベート界面活性剤がポリソルベート20である、項目11に記載の安定な製剤。

40

(項目13)

前記ポリソルベート20が約0~0.05%の範囲の濃度で存在する、項目12に記載の安定な製剤。

(項目14)

前記ポリソルベート20が約0.02%の濃度で存在する、項目13に記載の安定な製剤。

(項目15)

前記ポリソルベート20が約0.005%の濃度で存在する、項目13に記載の安定な

50

製剤。

(項目 1 6)

前記緩衝剤がリン酸塩である、項目 1 から 1 5 のいずれか一項に記載の安定な製剤。

(項目 1 7)

前記リン酸塩が 5 0 m M 以下の濃度で存在する、項目 1 6 に記載の安定な製剤。

(項目 1 8)

前記リン酸塩が 2 0 m M 以下の濃度で存在する、項目 1 6 に記載の安定な製剤。

(項目 1 9)

前記リン酸塩が約 5 m M の濃度で存在する、項目 1 7 に記載の安定な製剤。

(項目 2 0)

約 5 . 0 ~ 8 . 0 の pH を有する、項目 1 から 1 9 のいずれか一項に記載の安定な製剤

。

(項目 2 1)

約 6 . 5 ~ 7 . 5 の pH を有する、項目 1 8 に記載の安定な製剤。

(項目 2 2)

約 7 . 0 の pH を有する、項目 1 9 に記載の安定な製剤。

(項目 2 3)

安定化剤をさらに含む、項目 1 から 2 2 のいずれか一項に記載の安定な製剤。

(項目 2 4)

前記安定化剤が、スクロース、グルコース、マンニトール、ソルビトール、P E G 4 0 0 0 、ヒスチジン、アルギニン、リジン、リン脂質およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、項目 2 3 に記載の安定な製剤。

20

(項目 2 5)

前記安定化剤がスクロースである、項目 2 4 に記載の安定な製剤。

(項目 2 6)

前記スクロースが約 0 ~ 1 0 % の範囲の濃度で存在する、項目 2 5 に記載の安定な製剤

。

(項目 2 7)

前記スクロースが約 0 . 5 ~ 2 . 0 % の範囲の濃度で存在する、項目 2 6 に記載の安定な製剤。

30

(項目 2 8)

前記安定化剤がグルコースである、項目 2 3 に記載の安定な製剤。

(項目 2 9)

前記グルコースが約 0 . 5 ~ 1 . 0 % の範囲の濃度で存在する、項目 2 8 に記載の安定な製剤。

(項目 3 0)

液体製剤である、項目 1 から 2 9 のいずれか一項に記載の安定な製剤。

(項目 3 1)

凍結乾燥した乾燥粉末として製剤化される、項目 1 から 2 9 のいずれか一項に記載の安定な製剤。

40

(項目 3 2)

最大約 3 0 m g / m l の濃度のヘパラン N スルファターゼ (H N S) タンパク質と、約 1 0 0 ~ 2 0 0 m M の濃度の N a C l と、約 0 . 0 2 % の濃度のポリソルベート 2 0 と、約 5 m M の濃度のリン酸塩とを含み、約 7 . 0 の pH を有する髄腔内投与用の安定な製剤

。

(項目 3 3)

前記 H N S タンパク質が約 1 5 m g / m l の濃度である、項目 3 2 に記載の安定な製剤

。

(項目 3 4)

前記 N a C l が約 1 4 5 m M の濃度である、項目 3 2 または 3 3 に記載の安定な製剤。

50

(項目 3 5)

約 0 ~ 1 0 % の濃度のスクロースをさらに含む、項目 3 2 から 3 4 のいずれか一項に記載の安定な製剤。

(項目 3 6)

最大約 3 0 m g / m l の濃度のヘパラン N スルファターゼ (H N S) タンパク質と、約 1 4 5 m M の濃度の N a C l と、約 0 . 0 2 % の濃度のポリソルベート 2 0 と、約 5 m M の濃度のリン酸塩と、約 0 . 5 ~ 2 % の濃度のスクロースとを含み、約 7 . 0 の p H を有する髄腔内投与用の安定な製剤。

(項目 3 7)

最大約 3 0 m g / m l の濃度のヘパラン N スルファターゼ (H N S) タンパク質と、約 1 4 5 m M の濃度の N a C l と、約 0 . 0 2 % の濃度のポリソルベート 2 0 と、約 5 m M の濃度のリン酸塩と、約 0 . 5 ~ 1 . 0 % の濃度のグルコースとを含み、約 7 . 0 の p H を有する髄腔内投与用の安定な製剤。

10

(項目 3 8)

凍結乾燥した乾燥粉末として製剤化される、項目 3 6 または 3 7 に記載の安定な製剤。

(項目 3 9)

項目 1 から 3 8 のいずれか一項に記載の安定な製剤の単一剤形を含む容器。

(項目 4 0)

アンプル、充填済み注射器、バイアル、薬包、 L y o - J e c t 、レザバーから選択される、項目 3 9 に記載の容器。

20

(項目 4 1)

充填済みバイアルである、項目 4 0 に記載の容器。

(項目 4 2)

前記安定な製剤が、約 5 0 m l 未満の容積で存在する、項目 3 9 から 4 1 のいずれか一項に記載の容器。

(項目 4 3)

前記安定な製剤が、約 5 . 0 m l 未満の容積で存在する、項目 4 2 に記載の容器。

(項目 4 4)

項目 1 から 3 8 のいずれか一項に記載の製剤を、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、サンフィリッポ A 症候群の治療方法。

30

(項目 4 5)

前記髄腔内投与が、前記対象に実質的な有害作用を生じさせない、項目 4 4 に記載の方法。

(項目 4 6)

前記髄腔内投与が、前記対象に実質的な適応 T 細胞媒介免疫応答を生じさせない、項目 4 5 に記載の方法。

(項目 4 7)

前記製剤の前記髄腔内投与が、1 種または複数の標的脳組織への前記 H N S タンパク質の送達を生じさせる、項目 4 4 から 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 8)

前記 1 種または複数の標的脳組織が、灰白質、白質、室周囲領域、軟膜・毛膜、髄膜、新皮質、小脳、大脳皮質の深部組織、分子層、尾状 / 被殻領域、中脳、脳橋もしくは髓質の深部領域、およびこれらの組み合わせの組織からなる群から選択される、項目 4 7 に記載の方法。

40

(項目 4 9)

前記 H N S タンパク質が、ニューロン、グリア細胞、血管周囲細胞および / または髓膜細胞に送達される、項目 4 7 または 4 8 に記載の方法。

(項目 5 0)

前記 H N S タンパク質が、脊髄のニューロンにさらに送達される、項目 4 4 から 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

50

(項目 5 1)

前記製剤の前記髄腔内投与が、末梢標的組織への前記HNSタンパク質の全身送達をさらに生じさせる、項目44から50のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 2)

前記末梢標的組織が、肝臓、腎臓および／または心臓から選択される、項目51に記載の方法。

(項目 5 3)

前記製剤の前記髄腔内投与が、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リソソーム局在化を生じさせる、項目44～52のいずれか1項に記載の方法。

(項目 5 4)

前記製剤の前記髄腔内投与が、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リソソーム蓄積を減少させる、項目44～53のいずれか1項に記載の方法。

10

(項目 5 5)

前記リソソーム蓄積が、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54に記載の方法。

(項目 5 6)

前記製剤の前記髄腔内投与が、ニューロンの空胞形成を減少させる、項目44～55のいずれか1項に記載の方法。

(項目 5 7)

前記ニューロンがプルキンエ細胞を含む、項目56に記載の方法。

20

(項目 5 8)

前記製剤の前記髄腔内投与が、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HNS酵素活性を増加させる、項目44～53のいずれか1項に記載の方法。

(項目 5 9)

前記HNS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58に記載の方法。

(項目 6 0)

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、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、項目58または59に記載の方法。

30

(項目 6 1)

前記HNS酵素活性が腰部領域において増加する、項目58に記載の方法。

(項目 6 2)

前記腰部領域において増加したHNS酵素活性が、少なくとも約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61に記載の方法。

40

(項目 6 3)

前記製剤の前記髄腔内投与が、サンフィリッポA症候群の少なくとも1つの症状もしくは特徴の強度、重症度または頻度の低下あるいは発症遅延を生じさせる、項目44から62のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 4)

前記サンフィリッポA症候群の少なくとも1つの症状もしくは特徴が、聴力損失、言語発達障害、運動技能の欠乏、多動性障害、精神遅滞、攻撃性および／または睡眠障害である、項目63に記載の方法。

50

(項目 6 5)

前記髄腔内投与が2週間に1回実施される、項目44から62のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 6)

前記髄腔内投与が1か月に1回実施される、項目44から62のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 7)

前記髄腔内投与が2ヶ月に1回実施される、項目44から62のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 8)

前記髄腔内投与が静脈内投与と併せて使用される、項目44から67のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 6 9)

前記静脈内投与が1か月に1回以下の頻度である、項目68に記載の方法。

(項目 7 0)

前記静脈内投与が2ヶ月に1回以下の頻度である、項目68に記載の方法。

(項目 7 1)

前記髄腔内投与が静脈内投与の非存在下で使用される、項目44から67のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 2)

20

前記髄腔内投与が同時免疫抑制薬療法の非存在下で使用される、項目44から71のいずれか一項に記載の方法。

【0036】

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】

【0037】

【図1-1】HNSについてのSEC-HPLC溶出プロファイルの例示的クロマトグラムを示す図である。(A) 2mg/ml rhHNS 20mMクエン酸塩、pH7.0のプロファイル；(B) 2mg/ml rhHNS 20mMクエン酸塩、pH7.0、ベースライン(ilc)の拡大クロマトグラム；(C) 50で7日後の2mg/ml rhHNS 20mMクエン酸塩、pH7.0の拡大クロマトグラム；(D) 50で7日後の2mg/ml クエン酸塩、pH7.0の16分ピークおよび26分二量体ピークの波長走査の重ね合わせ。

30

【図1-2】HNSについてのSEC-HPLC溶出プロファイルの例示的クロマトグラムを示す図である。(A) 2mg/ml rhHNS 20mMクエン酸塩、pH7.0のプロファイル；(B) 2mg/ml rhHNS 20mMクエン酸塩、pH7.0、ベースライン(ilc)の拡大クロマトグラム；(C) 50で7日後の2mg/ml rhHNS 20mMクエン酸塩、pH7.0の拡大クロマトグラム；(D) 50で7日後の2mg/ml クエン酸塩、pH7.0の16分ピークおよび26分二量体ピークの波長走査の重ね合わせ。

40

【図2-1】種々の緩衝液および種々のpHでのrhHNSについてのpH試験からの例示的還元SDS-PAGEゲルを示す図である(A~C)。

【図2-2】種々の緩衝液および種々のpHでのrhHNSについてのpH試験からの例示的還元SDS-PAGEゲルを示す図である(A~C)。

【図3-1】種々の緩衝液および種々のpHでのrhHNSについてのpH試験からの例示的非還元SDS-PAGEゲルを示す図である(A~C)。

【図3-2】種々の緩衝液および種々のpHでのrhHNSについてのpH試験からの例示的非還元SDS-PAGEゲルを示す図である(A~C)。

【図4】DSCにより決定されるクエン酸塩中の例示的pH依存性熱安定性を示す図である。クエン酸塩中のrhHNSの最高融解温度は、pH6.0で90であった。試験し

50

た pH 每の rhHNS の融解温度は 70 °C を超える。

【図 5】DSC により決定されるリン酸塩中の例示的 pH 依存性熱安定性を示す図である。リン酸塩を含む rhHNS 製剤は、pH 6 ~ 7 で最大の熱安定性を示した。試験した pH 每の rhHNS の融解温度は 70 °C を超える。

【図 6】50 °C で 7 日後のイオン影響試験からの rhHNS 製剤の例示的銀染色 SDS-PAGE ゲルを示す図である。10 分間沸騰させた試料を使用してゲルを流した (A ~ B)。

【図 7】例示的 rhHNS 溶解度試験を示す図である。(A) pH の rhHNS 溶解度への影響；(B) 塩濃度の rhHNS 溶解度への影響。pH および塩化ナトリウムの増加は、rhHNS 溶解度を増加させるように見える。
10

【図 8】AUC を使用した、rhHNS の天然状態への塩の影響の例示的試験を示す図である。(A) 145 mM 塩の影響；(B) 300 mM 塩の影響。

【図 9 A】凍結乾燥 rhHNS 製剤のケーク外観へのスクロース濃度および凍結乾燥装置の影響の例示的試験を示す図である。(A) VirTis 凍結乾燥装置；上のパネル、1 % スクロース；下のパネル、1.5 % スクロース；(B) 1.5 % スクロース；上のパネル、VirTis 凍結乾燥装置；下のパネル、Lyostar 凍結乾燥装置。

【図 9 B】凍結乾燥 rhHNS 製剤のケーク外観へのスクロース濃度および凍結乾燥装置の影響の例示的試験を示す図である。(A) VirTis 凍結乾燥装置；上のパネル、1 % スクロース；下のパネル、1.5 % スクロース；(B) 1.5 % スクロース；上のパネル、VirTis 凍結乾燥装置；下のパネル、Lyostar 凍結乾燥装置。
20

【図 10】凍結乾燥 rhHNS 試料についての Micro - Flow Imaging (MFI) による例示的粒子画像を示す図である。

【図 11】0.22 μm 濾過後の 1.5 % スクロースを含む凍結乾燥前 rhHNS 試料についての MFI により検出される粒子へのポリソルベート 20 の影響の試験の例示的画像を示す図である。

【図 12 A】6ヶ月の用量投与後の 1.5, 4.5 および 8.3 mg 用量での時間の一関数としての rhHNS の CSF 濃度を示す例示的結果を示す図である。

【図 12 B】サルにおける 1.5, 4.5 および 8.3 mg 用量の IT 投与の 6 カ月後の CSF 中の抗 HNS 抗体濃度を示す例示的結果を詳細に示す図である。データは、雌雄を併合して示されている。
30

【図 12 C】6ヶ月の用量投与後のサルにおける 1.5, 4.5 および 8.3 mg 用量の IT 投与の 6 カ月後の CSF 中の抗 HNS 抗体を示す例示的結果を詳細に示す図である。データは、雌雄合わせて示されている。8.3 mg の rhHNS での後 IT 用量投与 6 での 2 つの最高濃度 (32,205 ng/mL および 15,467 ng/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 13 - 1】ヘマトキシリント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例示的代表的画像を示す図である。図 13 A は、DC サルにおける IT カテー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 13 B は、高用量 (8.3 mg / 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 (4.5 mg / 用量投与) 群と同様であった（示されていない）。図 13 C は、血管周囲空隙（脳実質）中に好酸球を示す低用量 (1.5 mg / 用量投与) サルの高出力図を示す例示的結果を表す。図 13 D 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 (1.5 mg / 用量投与) を示す例示的結果を表す。図 13 E 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 13 F は、低用量 (1.5 mg / 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 : 200 μm。
40

【図 13 - 2】ヘマトキシリント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例示的代表的画像を示す図である。図 13 A は、DC サルにおける IT カテールテ
50

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13B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13C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13D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13E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13F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：200μm。

【図13-3】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例示的代表的画像を示す図である。図13A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13B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13C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13D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13E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13F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：200μm。

【図14-1】サル脊髄および脳におけるrhHNS酵素活性を示す例示的結果を示す図である。図14Aおよび14B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=頸椎；0=カテーテル先端。図14Cおよび14Dは、(C)雄および(D)雌サルの脳におけるrhHNS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14-2】サル脊髄および脳におけるrhHNS酵素活性を示す例示的結果を示す図である。図14Aおよび14B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=頸椎；0=カテーテル先端。図14Cおよび14Dは、(C)雄および(D)雌サルの脳におけるrhHNS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15A】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である。図15Aは、高用量(8.3mg/用量投与)群サルにおけるrhHNS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15Bは、サル肝臓におけるrhHNS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

\pm S E Mを表すが、但し、低用量(4.5 mg / 用量投与)雌群(n = 3)は除く。

【図15B】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である。図15Aは、高用量(8.3 mg / 用量投与)群サルにおけるr h H N S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 \pm S E M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つた。図15Bは、サル肝臓におけるr h H N S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 \pm S E Mを表すが、但し、低用量(4.5 mg / 用量投与)雌群(n = 3)は除く。

【図16】若年カニクイザル小脳:3ヶ月暫定同齢集団におけるr h H N S局在化を示す例示的結果を示す図である。図16Aは、r h H N S免疫染色に関して陰性のビヒケル対照動物(0 mg / 用量投与)の小脳を示す例示的結果を表す;倍率20倍。図16Bは、分子層に限定される最小陽性染色を示す低用量(1.5 mg / 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16Cは、外側顆粒層における最小染色を示す中用量(4.5 mg / 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16D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(8.3 mg / 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17】1および10 mg / kgでの¹²⁴I-H N S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r h H N Sの濃度の例示的試験を示す図である。

【図18】1および10 mg / kgでの¹²⁴I-H N SのIT用量投与後の経時的にプロットした脳におけるr h H N Sの濃度の例示的試験を示す図である。

【図19】1および10 mg / kgでの¹²⁴I-H N S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r h H N Sの濃度の例示的試験を示す図である。

【図20】1および10 mg / kgでの¹²⁴I-H N S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r h H N Sの濃度の例示的試験を示す図である。

【図21】1および10 mg / kgでの¹²⁴I-H N S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r h H N Sの濃度の例示的試験を示す図である。

【図22】1および10 mg / kgでの¹²⁴I-H N S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r h H N Sの濃度の例示的試験を示す図である。

【図23】1および10 mg / kgでの¹²⁴I-H N S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r h H N Sの濃度の例示的試験を示す図である。

【図24】1および10 mg / kgでの¹²⁴I-H N SのIT用量投与後の経時的にプロットした肝臓におけるr h H N Sの濃度の例示的試験を示す図である。

【図25】1および10 mg / kgでの¹²⁴I-H N SのIT用量投与後の経時的にプロットした脳におけるr h H N Sの濃度の例示的試験を示す図である。個別(上)および平均 \pm S D(下)。

【図26】1および10 mg / kgでの¹²⁴I-H N SのIT用量投与後の経時的にプロットしたr h H N Sの肝臓濃度の例示的試験を示す図である。個別(上)および平均 \pm S D(下)。

【図27】1および10 mg / kgでの¹²⁴I-H N SのIT用量投与後の経時的にプロットしたr h H N Sの腎臓濃度の例示的試験を示す図である。個別(上)および平均 \pm S D(下)。

【図28】1および10 mg / kgでの¹²⁴I-H N SのIT用量投与後の経時的にプロットしたr h H N Sの心臓濃度の例示的試験を示す図である。個別(上)および平均 \pm S D(下)。

【図29】1および10 mg / kgでの¹²⁴I-H N SのIT用量投与後の経時的にプロ

10

20

30

40

50

ロットした r h H N S の皮膚濃度の例示的試験を示す図である。個別（上）および平均 ± S D（下）。

【図 3 0】1 および 10 mg / kg での ¹⁻²⁻⁴I - H N S の I T 用量投与後の経時的にプロットした r h H N S の脳濃度の例示的試験（上）、ならびに脳における非区画 P K パラメータの比較（下）を示す図である。

【図 3 1】1 および 10 mg / kg での ¹⁻²⁻⁴I - H N S の I T 用量投与後の経時的にプロットした r h H N S 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 P K パラメータの比較（下）を示す図である。

【図 3 2】例示的髄腔内薬剤送達装置（I D D D）を示す図である。

【図 3 3】例示的 P O R T - A - C A T H（登録商標）低プロフィール髄腔内埋込み可能アクセス系を示す図である。
10

【図 3 4】例示的髄腔内薬剤送達装置（I D D D）を示す図である。

【図 3 5】C N S 酵素補充療法（E R T）のための在宅投与を可能にする、髄腔内薬剤送達装置（I D D D）を示す図である。

【図 3 6】安全機構を備える髄腔内薬剤送達装置（I D D D）の例示的図を説明する図である。

【図 3 7 A】I D D D を配置することができる患者の体内の例示的位置を示す図である。

【図 3 7 B】髄腔内薬剤送達装置（I D D D）の種々の部品を示す図である。

【図 3 7 C】I T - 腰椎注射のための患者の体内の例示的挿入位置を示す図である。

【発明を実施するための形態】
20

【0 0 3 8】

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。

【0 0 3 9】

「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）2 5 %、20 %、19 %、18 %、17 %、16 %、15 %、14 %、13 %、12 %、1 1 %、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）。
30

【0 0 4 0】

「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。

【0 0 4 1】

「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。
40

【0 0 4 2】

「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 50

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。

【0043】

「陽イオン非依存性マンノース - 6 - ホスフェート受容体 (C I - M P R) 」：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 (C I - M P R) 」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 (M 6 P) 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、C I - M P R は、他のタンパク質、例えば I G F - I I と結合する。C I - M P R は、「M 6 P / I G F - I I 受容体」、「C I - M P R / I G F - I I 受容体」、「I G F - I I 受容体」または「I G F 2 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。

10

【0044】

「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平行して用いられる任意の免疫抑制薬両方を包含する。

【0045】

「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 (B W F I) 、p H 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。

20

【0046】

「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。

【0047】

「酵素補充療法 (E R T) 」：本明細書中で用いる場合、「酵素補充療法 (E R T) 」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。

30

【0048】

「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）。

40

【0049】

「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。

【0050】

50

「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。

【0051】

「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。10

【0052】

「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ーナトリウム；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；ブルロニック；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。20

【0053】

「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。30

【0054】

「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、单糖、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。

【0055】

「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。40

【0056】

「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。50

【0057】

「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。10

【0058】

「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、5 mMリン酸ナトリウム（pH 7.0）中に175 mMまでの塩化ナトリウム）および糖含有溶液（例えば、5 mMリン酸ナトリウム（pH 7.0）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 150 mM の NaCl）である。20

【0059】

「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、長期間に亘って査定され得る（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。3040

【0060】

「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／または子宮内治療を必要とする対象方法の実施も、本発明により意図される。

【0061】

「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50

これらが、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。

【0062】

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。

【0063】

「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.), Bioin-

10

20

30

40

50

formatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Human 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。
10

【0064】

「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。

【0065】

「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。
20

【0066】

「標的組織」：本明細書中で用いる場合、「標的組織」は、治療を必要とする対象されるべきリ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。
30

【0067】

「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。

【0068】

「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、疾患の開始もしくは進行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
40
50

、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。

【0069】

「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。10

【0070】

「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A症候群、サンフィリッポB症候群）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。20

【0071】

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および組成物を提供する。上記のように、本発明は、リソソーム蓄積症（例えば、サンフィリッポA症候群）に関する補充酵素（例えば、HNSタンパク質）が、被験者における実質的副作用を誘導することなく、高濃度で治療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は、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副作用、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）、用いられ得る。30

【0072】

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、脾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。40

【0073】

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。

【0074】

10

20

30

40

50

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。

補充酵素

ヘパラン - N - スルファターゼ (HNS) タンパク質

【0075】

いくつかの実施形態では、本発明により提供される発明の方法および組成物は、サンフイリッポAを治療するためにヘパラン - N - スルファターゼ (HNS) タンパク質をCN Sに送達するために使用される。適当なHNSタンパク質は、天然ヘパラン - N - スルファターゼ (HNS) タンパク質活性に代わるあるいはHNS欠乏に関連する1種もしくは複数の表現型または症状を救うことができる任意の分子または分子の一部であり得る。いくつかの実施形態では、本発明に適した補充酵素は、N末端およびC末端、ならびに成熟ヒトHNSタンパク質と実質的に類似または同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。10

【0076】

典型的には、ヒトHNSは、成熟型にプロセシングされる前駆体分子として産生される。このプロセスは、一般的に、20個のアミノ酸シグナルペプチドを除去することにより起こる。典型的には、前駆体型は、502個のアミノ酸を含む全長前駆体または全長HNSタンパク質とも呼ばれる。N末端の20個のアミノ酸を切断することにより、長さ482個のアミノ酸の成熟型が生じる。したがって、N末端の20個のアミノ酸は、一般的に、HNSタンパク質活性に必要でないと考えられる。典型的な野生型もしくは天然ヒトHNSタンパク質の成熟型(配列番号1)および全長前駆体(配列番号2)のアミノ酸配列を表1に示す。20

【表1】

【表1】

ヒトヘパランーN—スルファターゼ

成熟型	RPRNALLLA	DDGGFESGAY	NNSAIATPHL	DALARSSLF	
	RNAFTSVSSC	SPSRASLLTG	LPQHQNGMYG		
	LHQDVHHFNS	FDKVRSLPLL	LSQAGVRTGI	IGKKHVGPET	
	VYPFDFAYTE	ENGSQLQVGR	NITRIKLLVR	KFLQTQDDRP	
	FFLYVAFHDP	HRCGHSQPQY	GTFCEKFGNG		
	ESGMGRIPDW	TPQAYDPLDV	LVPYFVPNTP	AARADLAAQY	
	TTVGRMDQGV	GLVLQELRDA	GVLNDTLVIF	TSDNGIPFPS	10
	GRTNLYWPGT	AEPLLVSSPE	HPKRWGQVSE		
	AYVSLLDLTP	TILDWFSIPIY	PSYAIFGSKT	IHLTGRSLLP	
	ALEAEPLWAT	VFGSQSHHEV	TMSYPMRSVQ	HRHFRLVHNL	
	NFKMPFPIDQ	DFYVSPTFQD	LLNRTTAGQP	TGWYKDLRHY	
	YYRARWELYD	RSRDPHETQN	LATDPRFAQL		
	LEMLRDQLAK	WQWETHDPWV	CAPDGVLEEK		
	LSPQCQPLHN				
	EL (配列番号1)				
全長前駆体	MSCPVPACCA	LLLVLGLCRA	RPRNALLLA	DDGGFESGAY	
	NNSAIATPHL	DALARSSLF	RNAFTSVSSC	SPSRASLLTG	20
	LPQHQNGMYG	LHQDVHHFNS	FDKVRSLPLL	LSQAGVRTGI	
	IGKKHVGPET	VYPFDFAYTE	ENGSQLQVGR	NITRIKLLVR	
	KFLQTQDDRP	FFLYVAFHDP	HRCGHSQPQY	GTFCEKFGNG	
	ESGMGRIPDW	TPQAYDPLDV	LVPYFVPNTP	AARADLAAQY	
	TTVGRMDQGV	GLVLQELRDA	GVLNDTLVIF	TSDNGIPFPS	
	GRTNLYWPGT	AEPLLVSSPE	HPKRWGQVSE	AYVSLLDLTP	
	TILDWFSIPIY	PSYAIFGSKT	IHLTGRSLLP	ALEAEPLWAT	
	VFGSQSHHEV	TMSYPMRSVQ	HRHFRLVHNL	NFKMPFPIDQ	
	DFYVSPTFQD	LLNRTTAGQP	TGWYKDLRHY	YYRARWELYD	
	RSRDPHETQN	LATDPRFAQL	LEMLRDQLAK	WQWETHDPWV	30
	CAPDGVLEEK	LSPQCQPLHN			
	EL (配列番号2)				

【0077】

したがって、いくつかの実施形態では、本発明に適した治療的部分は、成熟ヒトHNSタンパク質（配列番号1）である。いくつかの実施形態では、適当な治療的部分は、成熟ヒトHNSタンパク質の相同体または類似体であり得る。例えば、成熟ヒトHNSタンパク質の相同体または類似体は、実質的なHNSタンパク質活性を保持しながら、野生型または天然HNSタンパク質（例えば、配列番号1）と比較して、1個または複数のアミノ酸置換、欠失および／または挿入を含む修飾された成熟ヒトHNSタンパク質であり得る。したがって、いくつかの実施形態では、本発明に適した治療的部分は、成熟ヒトHNSタンパク質（配列番号1）と実質的に相同である。いくつかの実施形態では、本発明に適した治療的部分は、配列番号1と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上相同であるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、本発明に適した治療的部分は、成熟ヒトHNSタンパク質（配列番号1）と実質的に同一である。いくつかの実施形態では、本発明に適した治療的部分は、配列番号1と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、本発明に適した治療的部分は、成熟ヒトHNSタンパク質の断片または部分を含む。

【0078】

あるいは、本発明に適した治療的部分は、全長HNSタンパク質である。いくつかの実施形態では、適當な治療的部分は、全長ヒトHNSタンパク質の相同体または類似体であり得る。例えば、全長ヒトHNSタンパク質の相同体または類似体は、實質的なHNSタンパク質活性を保持しながら、野生型または天然全長HNSタンパク質（例えば、配列番号2）と比較して、1個または複数のアミノ酸置換、欠失および／または挿入を含む修飾された全長ヒトHNSタンパク質であり得る。したがって、いくつかの実施形態では、本発明に適した治療的部分は、全長ヒトHNSタンパク質（配列番号2）と實質的に相同である。いくつかの実施形態では、本発明に適した治療的部分は、配列番号2と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上相同であるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、本発明に適した治療的部分は、配列番号2と實質的に同一である。いくつかの実施形態では、本発明に適した治療的部分は、配列番号2と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、本発明に適した治療的部分は、全長ヒトHNSタンパク質の断片または部分を含む。本明細書で使用する場合、全長HNSタンパク質は、典型的にはシグナルペプチド配列を含む。他のリソーム蓄積症および補充酵素

【0079】

本発明による発明の方法および組成物は、他のリソーム蓄積症、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、ティ・サックス病、GM2 - ガングリオシドーシス II型、サンドホップ病、GM2 - ガングリオシドーシス、- マンノーシドーシス I / II型、- 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、ムコ多糖症 IIIA型、サンフィリッポ症候群（例えば、A、B、C、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 IV A型、モルキオ症候群、ムコ多糖症 IV B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）を治療するために用いられ得る。

【0080】

リ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、Scrieve 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2-1】

【表2】

病名	酵素欠乏	貯蔵物質
ポンペ病	酸- α 1,4-グルコシダーゼ	グリコーゲン α 1-4 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
ティ・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
サンドホップ病	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
ゴーシエ病	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
クラッペ病	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
サンフィリッポ 症候群 A型 (MPS IIIA)	ヘパラン N-スルファターゼ	ヘパランスルフェート
サンフィリッポ 症候群 B型 (MPS IIIB)	α -N-アセチルグルコサミニダーゼ	ヘパランスルフェート
サンフィリッポ 症候群	アセチル-CoA-グルコ	ヘパラン

10

20

30

40

【表 2 - 2】

C型 (MPS IIIC)	サミニド アセチルラン スフェラーゼ	スルフェート	
サンフィリッポ [®] 症候群 D型 (MPS IID)	N-アセチルグルコサミ ン-6-スルファターゼ	ヘパラン スルフェート	
モルキオB (MPS IVB)	β -ガラクトシダーゼ	カラタン スルフェート	10
マロトー・ラミー (MPS VI)	アリールスルファターゼ B	デルマタン スルフェート	
スライ症候群 (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/ 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/ 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 アスパラギン	20
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 (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 (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	30
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	
サラ病	シアアル酸輸送タンパク 質	遊離シアアル酸および グルクロン酸	
小児性シアアル酸蓄積 症	シアアル酸輸送 タンパク 質	遊離シアアル酸および グルクロン酸	40
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		

【0081】

本発明の方法は、種々の他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、治療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。

【0082】

いくつかの実施形態では、適切な補充酵素は、治療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2に列挙された酵素から選択される酵素である。

【0083】

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50%、55%、60%、65%、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。

【0084】

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產生され得る。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、組換え的に产生され得る。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产生され得る。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。

【0085】

酵素が組換え的に产生される場合、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。

【0086】

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

B A L B / c マウス骨髄腫株 (N S O / 1、E C A C C 番号：8 5 1 1 0 5 0 3)；ヒト網膜芽細胞 (P E R . C 6、C r u c e l l , L e i d e n , T h e N e t h e r l a n d s)；S V 4 0 により形質転換されたサル腎臓 C V 1 株 (C O S - 7、A T C C

C R L 1 6 5 1)；ヒト胚性腎臓株 (2 9 3 または 2 9 3 細胞 (懸濁液培養中での増殖のためにサブクローニング)、G r a h a m et al . , J . G e n V i r o l . , 3 6 : 5 9 , 1 9 7 7)；ヒト纖維肉腫細胞株 (例えば、H T 1 0 8 0)；ハムスター幼仔腎細胞 (B H K、A T C C C C L 1 0)；チャイニーズハムスター卵巣細胞 + / - D H F R (C H O、U r l a u b a n d C h a s i n , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 7 7 : 4 2 1 6 , 1 9 8 0)；マウスセルトリ細胞 (T M 4、M a t h e r , B i o l . R e p r o d . , 2 3 : 2 4 3 - 2 5 1 , 1 9 8 0)；サル腎細胞 (C V 1 A T C C C C L 7 0)；アフリカミドリザル腎細胞 (V E R O - 7 6、A T C C C R L - 1 5 8 7)；ヒト子宮頸部癌細胞 (H e L a、A T C C C C L 2)；イヌ腎細胞 (M D C K、A T C C C C L 3 4)；バッファローラット肝細胞 (B R L 3 A、A T C C C R L 1 4 4 2)；ヒト肺細胞 (W 1 3 8、A T C C C C L 7 5)；ヒト肝細胞 (H e p G 2、H B 8 0 6 5)；マウス乳癌 (M M T 0 6 0 5 6 2、A T C C C C L 5 1)；T R I 細胞 (M a t h e r et al . , A n n a l s N . Y . A c a d . S c i . , 3 8 3 : 4 4 - 6 8 , 1 9 8 2)；M R C 5 細胞；F S 4 細胞；およびヒト肝細胞癌株 (H e p G 2)。

【0087】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、ヒト細胞から产生される補充酵素を送達す

10

20

30

40

50

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、C H O 細胞から產生される補充酵素を送達するために用いられる。

【0088】

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 (M 6 P) 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 (C I - M P R) であり得る。さらに、C I - M P R は、他のタンパク質、例えば I G F - I I 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 M 6 P 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、C I - M P R 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、U D P - G l c N A c からリソーム酵素上の - 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。このような酵素を產生し、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に援用される）に記載されている。10

【0089】

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ームターゲッティング部分と共に役されるかまたは融合され得る。適切なリソームターゲッティング部分は、I G F - I、I G F - I I、R A P、p 97、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 I G F - I、I G F - I I、R A P、p 97 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。20

【0090】

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、B B B を横断し、C N S 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。

【0091】

いくつかの実施形態では、治療用タンパク質は、ターゲッティング部分（例えば、リソームターゲッティング配列）および／または膜貫通ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ターゲッティング配列および／または膜貫通ペプチドは、治療的部分の固有の部分である（例えば、化学結合を介して、融合タンパク質を介して）。いくつかの実施形態では、ターゲッティング配列は、マンノース - 6 - リン酸部分を含む。いくつかの実施形態では、ターゲッティング配列は、I G F - I 部分を含む。いくつかの実施形態では、ターゲッティング配列は、I G F - I I 部分を含む。30

製剤

【0092】

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な製剤中で送達される。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製剤が、C N S 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、H N S 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製剤は、高濃度の治療薬（例えば、H N S 酵素）を可溶化し得るし、C N S 構成成分および／または病因を有する疾患（例えば、サンフィリップ A 症候群）の治療のために対象の C N S 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4050

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。

【0093】

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3に含まれている。表3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製剤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、それにより製剤の安定性を低減し得る。
10

【表3】

溶液	Na ⁺ mEq/L	K ⁺ mEq/L	Ca ⁺⁺ mEq/L	Mg ⁺⁺ mEq/L	HCO ₃ ⁻ 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

【0094】

したがって、いくつかの実施形態では、本発明によるCNS送達に適した製剤は、合成または人工CSFではない。

【0095】

いくつかの実施形態では、CNS送達のための製剤は、それらが、それとともに製剤化される治療薬(例えば、HNS酵素)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、製剤化されている。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、HNS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)に亘って査定され得る。製剤の状況では、安定な製剤は、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。
30

【0096】

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査定され得る。例えば、所定の時点での安定性は、早期時点(例えば、処方0日目)での安定性に対して、あるいは非製剤化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。
40
50

【0097】

いくつかの実施形態では、治療薬（例えば、所望の酵素）は、本発明の製剤中で可溶性である。「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製剤化される。

10

【0098】

水性、凍結乾燥前、凍結乾燥または再構成型のいずれかの適当な製剤は、種々の濃度で対象となる治療薬を含み得る。いくつかの実施形態では、製剤は、約0.1mg/ml～100mg/ml（例えば、約0.1mg/ml～80mg/ml、約0.1mg/ml～60mg/ml、約0.1mg/ml～50mg/ml、約0.1mg/ml～40mg/ml、約0.1mg/ml～30mg/ml、約0.1mg/ml～25mg/ml、約0.1mg/ml～20mg/ml、約0.1mg/ml～60mg/ml、約0.1mg/ml～50mg/ml、約0.1mg/ml～40mg/ml、約0.1mg/ml～30mg/ml、約0.1mg/ml～25mg/ml、約0.1mg/ml～20mg/ml、約0.1mg/ml～15mg/ml、約0.1mg/ml～10mg/ml、約0.1mg/ml～5mg/ml、約1mg/ml～10mg/ml、約1mg/ml～20mg/ml、約1mg/ml～40mg/ml、約5mg/ml～100mg/ml、約5mg/ml～50mg/mlまたは約5mg/ml～25mg/ml）の範囲の濃度で対象となるタンパク質または治療薬を含み得る。いくつかの実施形態では、本発明による製剤は、約1mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml、25mg/ml、30mg/ml、40mg/ml、50mg/ml、60mg/ml、70mg/ml、80mg/ml、90mg/mlまたは100mg/mlの濃度で治療剤を含み得る。

20

【0099】

本発明の製剤は、水溶液または再構成凍結乾燥溶液のいずれかとしてのその耐容性を特徴とする。本明細書で使用する場合、用語「耐容可能な」および「耐容性」とは、本発明の医薬組成物が、このような組成物を投与する対象の有害反応を誘発しない、あるいはこのような組成物を投与する対象の重篤な有害反応を誘発しない能力を指す。いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物は、このような組成物を投与する対象がよく耐容性を示す。

30

【0100】

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こ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4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とみなされるタンパク質製剤の典型的な例示的態様を確認するのに役立つ。

40

【表4】

【表4】

パラメータ	典型的範囲／型	論理的根拠
pH	5 to 7.5	安定性のため 時々、溶解性のためもある
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 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 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

緩衝剤

【0101】

製剤のpHは、水性製剤または凍結乾燥前製剤中の治療薬(例えば、酵素またはタンパク質)の溶解度を変えることができる追加の因子である。したがって、本発明の製剤は、好みしくは1種または複数の緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、水性製剤は、約4.0~8.0の間(例えば、約4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.2、6.4、6.5、6.6、6.8、7.0、7.5または8.0)の前記組成物の最適pHを維持するのに十分な量の緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、製剤のpHは、約5.0~7.5の間、約5.5~7.0の間、約6.0~7.0の間、約5.5~6.0の間、約5.5~6.5の間、約5.0~6.0の間、約5.0~6.5の間および約6.0~7.5の間である。適当な緩衝剤には、例えば、酢酸塩、クエン酸塩、ヒスチジン、リン酸塩、コハク酸塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(「トリス」)および他の有機酸が含まれる。本発明の医薬組成物の緩衝剤濃度およびpH範囲は、製剤の耐容性の制御または調整の因子である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、約1mM~約150mMの間、または約10mM~約50mMの間、または約15mM~約50mMの間、または約20mM~約50mMの間、または約25mM~約50mMの間の範囲の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、適当な緩衝剤は、約1mM、5mM、10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、75mM、100mM、125mMまたは150mMの濃度で存在する。

張性

【0102】

いくつかの実施形態では、水性、凍結乾燥前、凍結乾燥または再構成型のいずれかの製剤は、製剤を等張に保つ等張化剤を含む。典型的には、「等張」により、当該製剤が、ヒト血液と本質的に同じ浸透圧を有することが意味される。等張製剤は、一般的に、約240mOsm/kg~約350mOsm/kgの浸透圧を有するだろう。等張性は、例えば、蒸気圧または凝固点型浸透圧計を使用して測定することができる。代表的な等張化剤には、それだけに限らないが、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含まれる。いくつかの実施形態では、適当な等張化剤は、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%)の濃度で水性および/または凍結乾燥前製剤中に存在し得る。いくつかの実施形態では、凍結乾燥用の製剤は、凍結乾燥前製剤または再構成製剤を等張に保つ等張化剤を含む。

【0103】

10

20

30

40

50

一般的に非経口投与薬剤には等張溶液が好ましいが、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／または酵素の溶解度を変化させ得る。わずかに高張性の溶液（例えば、pH 7.0 の 5 mM リン酸ナトリウム中最大 175 mMまでの塩化ナトリウム）および糖含有溶液（例えば、pH 7.0 の 5 mM リン酸ナトリウム中最大 2 %までのスクロース）は、耐容性が高いことが示された。最も一般的な認可された CNS ボーラス製剤組成物は、生理食塩水（水中約 150 mM NaCl）である。

安定化剤

【 0 1 0 4 】

いくつかの実施形態では、製剤は、タンパク質を保護するための安定化剤またはリオブロテクタントを含み得る。典型的には、適当な安定化剤は、糖、非還元糖および／またはアミノ酸である。代表的な糖には、それだけに限らないが、デキストラン、ラクトース、マンニトール、マンノース、ソルビトール、ラフィノース、スクロースおよびトレハロースが含まれる。代表的なアミノ酸には、それだけに限らないが、アルギニン、グリシンおよびメチオニンが含まれる。別の安定化剤には、塩化ナトリウム、ヒドロキシエチルデンプンおよびポリビニルピロリドンが含まれ得る。凍結乾燥製剤中の安定化剤の量は、一般的には製剤が等張であるような量である。しかしながら、高張再構成製剤も適当であり得る。さらに、安定化剤の量は、治療薬の許容できない量の分解／凝集が起こるほど低すぎてはならない。代表的な製剤中の安定化剤濃度は、約 1 mM ~ 約 400 mM（例えば、約 30 mM ~ 約 300 mM および約 50 mM ~ 約 100 mM）、あるいは 0.1 重量% ~ 1.5 重量%（例えば、1 重量% ~ 10 重量%、5 重量% ~ 15 重量%、5 重量% ~ 10 重量%）に及び得る。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 または 20 : 1 であり得る。いくつかの実施形態では、凍結乾燥に適した安定化剤はリオブロテクタントでもある。

【 0 1 0 5 】

いくつかの実施形態では、本発明に適した液体製剤は、非晶物質を含む。いくつかの実施形態では、本発明に適した液体製剤は、相当な量の非晶物質（例えば、スクロースベースの製剤）を含む。いくつかの実施形態では、本発明に適した液体製剤は、部分的に結晶性の／部分的に非晶質の物質を含む。

バルク剤

【 0 1 0 6 】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥に適した製剤は、1種または複数のバルク剤をさらに含み得る。「バルク剤」とは、凍結乾燥混合物にかさを付加し、凍結乾燥ケーキの物理的構造に寄与する化合物である。例えば、バルク剤は、凍結乾燥ケーキの外観を改善することができる（例えば、本質的に均一な凍結乾燥ケーキ）。適当なバルク剤には、それだけに限らないが、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含まれる。バルク剤の代表的な濃度は、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。

界面活性剤

【 0 1 0 7 】

いくつかの実施形態では、製剤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-、ミリストミド

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 - またはニ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%）の濃度で製剤中に存在し得る。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%等の濃度で製剤中に存在し得る。あるいはまたはさらに、界面活性剤を凍結乾燥製剤、凍結乾燥前製剤および／または再構成製剤に添加することができる。10

【0108】

製剤の所望の特性に悪影響を及ぼさない限り、Remington's Pharmaceutical Sciences 第16版、Osol, A. 編(1980)に記載されているものなどの他の薬学的に許容される担体、賦形剤または安定化剤を製剤（および／または凍結乾燥製剤および／または再構成製剤）に含ませてよい。許容される担体、賦形剤または安定化剤は、使用する用量および濃度でレシピエントに無毒性で、これらには、それだけに限らないが、別の緩衝剤；保存剤；共溶媒；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；EDTAなどのキレート化剤、金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；ポリエステルなどの生分解性ポリマー；ならびに／あるいはナトリウムなどの塩形成対イオンが含まれる。20

【0109】

本発明による水性、凍結乾燥前、凍結乾燥または再構成型のいずれかの製剤は、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査定され得る。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-PAGE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包含する。30

【0110】

一般的に、製剤（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。製剤は、数ヶ月～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。製剤は、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。40

【0111】

製剤は、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、凍結乾燥物質製剤は、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、休息な熱ショック、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。

凍結乾燥

【0112】

本発明による発明の方法は、任意の物質、特に治療薬を凍結乾燥するために利用することができる。典型的には、凍結乾燥前製剤は、適当な種々の賦形剤、あるいは凍結乾燥および貯蔵中に分解（例えば、タンパク質凝集、脱アミノ化および／または酸化）から対象とする化合物を保護するための安定化剤、緩衝剤、バルク剤および界面活性剤などの他の成分をさらに含む。凍結乾燥のための製剤は、リオプロテクタントもしくは安定化剤、緩衝剤、バルク剤、等張剤および界面活性剤を含む1種または複数の追加の成分を含むことができる。

【0113】

当該物質および任意の他の成分を混合した後、製剤を凍結乾燥する。凍結乾燥は、一般的に、3つの主要な段階：凍結、一次乾燥および二次乾燥を含む。凍結は、水を氷にまたはある非晶質製剤成分を結晶型に転換するために必要である。一次乾燥は、低圧および低温での直接昇華により凍結生成物から氷を除去するプロセスステップである。二次乾燥は、残留水の蒸発表面への拡散を利用して生成物基質から結合水を除去するプロセスステップである。二次乾燥中の生成物温度は、通常は一次乾燥中よりも高い。Tang X等(2004)「Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: Practical advice」、Pharm. Res.、21:191~200; Nail S. L.等(2002)「Fundamentals of freeze-drying」Development and manufacture of protein pharmaceuticals中、Nail S. L.編者 ニューヨーク:Kluwer Academic/Plenum Publishers、281~353頁; Wang等(2000)「Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals」、Int. J. Pharm.、203:1~60; Williams N. A.等(1984)「The lyophilization of pharmaceuticals; A literature review」、J. Parenteral Sci. Technol.、38:48~59を参照されたい。一般的に、任意の凍結乾燥プロセスを本発明に関連して使用することができる。

【0114】

いくつかの実施形態では、生成物の最初の凍結中にアニーリングステップを導入してもよい。アニーリングステップは、全体的なサイクル時間を減少させることができる。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、アニーリングステップは、賦形剤結晶化および過冷却中に形成される小結晶の再結晶化によるより大きな氷結晶の形成を促進することができ、これが次に、再構成を改善すると考えられる。典型的には、アニーリングステップは、凍結中の温度の間隔または振動を含む。例えば、凍結温度は、-40であってよく、アニーリングステップは、この温度を例えば、-10に増加させ、一定期間この温度を維持するだろう。アニーリングステップ時間は、0.5時間~8時間（例えば、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3、4、6および8時間）に及び得る。アニーリング温度は、凍結温度と0との間であり得る。

【0115】

凍結乾燥は、容器、例えば、チューブ、バッグ、BIN、トレー、バイアル（例えば、ガラスバイアル）、注射器または任意の他の適当な容器中で行なうことができる。容器は、使い捨てであり得る。凍結乾燥は、大規模で行っても小規模で行なってもよい。いくつかの例では、移送ステップを避けるために、タンパク質の再構成を行う容器中でタンパク質製剤を凍結乾燥することが望ましいだろう。この例の容器は、例えば、3、4、5、10、20、50または100ccバイアルであり得る。

【0116】

Hull1バイロットスケール乾燥機(S P Industries, U.S.A.)、Genesis(S P Industries)実験室凍結乾燥機または所与の凍結乾燥プロセスパラメータを制御することができる任意の凍結乾燥機などの多くの異なる凍結乾燥機を

10

20

30

40

50

この目的のために利用することができる。製剤を凍結し、その後一次乾燥に適した温度で凍結内容物から氷を昇華させることにより凍結乾燥を行う。最初の凍結は、典型的には約4時間以下（例えば、約3時間以下、約2.5時間以下、約2時間以下）で製剤を約-20℃未満の温度（例えば、-50℃、-45℃、-40℃、-35℃、-30℃、-25℃等）にする。この条件下、生成物温度は、典型的には製剤の共晶点または崩壊温度未満である。典型的には、一次乾燥のための棚温度は、典型的には約20~250mTorrの範囲の適当な圧力で約-30~25℃の範囲のだろう（一次乾燥中に生成物が融点未満のままであるという条件で）。製剤、試料を収容している容器（例えば、ガラスバイアル）の大きさおよび種類、ならびに液体の容積は、乾燥に必要とされる時間を主に指示し、これは数時間～数日に及び得る。二次乾燥段階は、主に使用する容器の種類および大きさならびに治療薬の種類に応じて約0~60℃で行われる。また、液体の容積は、乾燥に必要とされる時間を主に指示し、これは数時間～数日に及び得る。

【0117】

一般的な提案として、凍結乾燥は、その水分含量が約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、約1%未満および約0.5%未満である凍結乾燥製剤を生じさせるだろう。

再構成

【0118】

本発明の医薬組成物は、一般的に、対象に投与する際、水性形態であるが、いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物は凍結乾燥される。このような組成物は、対象に投与する前に1種または複数の希釈剤を添加することにより再構成しなければならない。所望の段階、典型的には、患者に投与する前の適当な時点で、再構成製剤中のタンパク質濃度が望ましくなるように希釈剤により凍結乾燥製剤を再構成することができる。

【0119】

本発明にしたがって種々の希釈剤を使用することができる。いくつかの実施形態では、再構成に適した希釈剤は水である。希釈剤として使用する水は、逆浸透、蒸留、脱イオン化、濾過（例えば、活性炭、精密濾過、ナノ濾過）およびこれらの処理法の組み合わせを含む種々の方法で処理することができる。一般に、水は、それだけに限らないが、注射用の滅菌水または静菌水を含む注射に適したものであるべきである。

【0120】

他の代表的な希釈剤には、pH緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝食塩水）、滅菌生理食塩水、エリオット液、リンガー液またはブドウ糖溶液が含まれる。適当な希釈剤は、任意選択により保存剤を含むことができる。代表的な保存剤には、ベンジルまたはフェノールアルコールなどの芳香族アルコールが含まれる。使用する保存剤の量は、タンパク質との適合性について異なる保存剤濃度を評価することおよび保存剤効果を試験することにより決定される。例えば、保存剤が芳香族アルコール（ベンジルアルコールなど）である場合、これは約0.1~2.0%、約0.5~1.5%、または約1.0~1.2%の量で存在することができる。

【0121】

本発明に適した希釈剤は、それだけに限らないが、pH緩衝剤（例えば、トリス、ヒスチジン）、塩（例えば、塩化ナトリウム）および上記のもの（例えば、安定化剤、等張剤）を含む他の添加剤（例えば、スクロース）を含む種々の添加剤を含むことができる。

【0122】

本発明によると、凍結乾燥物質（例えば、タンパク質）は、少なくとも25mg/ml（例えば、少なくとも50mg/ml、少なくとも75mg/ml、少なくとも100mg/ml）およびその間の任意の範囲の濃度に再構成することができる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥物質（例えば、タンパク質）を、約1mg/ml~100mg/mlの範囲の濃度（例えば、約1mg/ml~50mg/ml、1mg/ml~100mg/ml、約1mg/ml~約5mg/ml、約1mg/ml~約10mg/ml、約1mg/ml~約25mg/ml、約1mg/ml~約75mg/ml、約10mg/ml~約50mg/ml）に再構成することができる。

30 mg / ml、約 10 mg / ml ~ 約 50 mg / ml、約 10 mg / ml ~ 約 75 mg / ml、約 10 mg / ml ~ 約 100 mg / ml、約 25 mg / ml ~ 約 50 mg / ml、約 25 mg / ml ~ 約 75 mg / ml、約 25 mg / ml ~ 約 100 mg / ml、約 50 mg / ml ~ 約 75 mg / ml、約 50 mg / ml ~ 約 100 mg / ml) に再構成することができる。いくつかの実施形態では、再構成製剤中のタンパク質の濃度は、凍結乾燥前製剤中の濃度よりも高くなり得る。再構成製剤中の高タンパク質濃度は、再構成製剤の皮下または筋肉内送達を意図する場合に特に有用であると考えられる。いくつかの実施形態では、再構成製剤中のタンパク質濃度は、凍結乾燥前製剤の約 2 ~ 50 倍 (例えれば、約 2 ~ 20 倍、約 2 ~ 10 倍または約 2 ~ 5 倍) であり得る。いくつかの実施形態では、再構成製剤中のタンパク質濃度は、凍結乾燥前製剤の少なくとも約 2 倍 (例えれば、少なくとも約 3、4、5、10、20、40 倍) であり得る。
10

【 0123 】

本発明による再構成は、任意の容器中で行うことができる。本発明に適した代表的な容器には、それだけに限らないが、例えれば、チューブ、バイアル、注射器 (例えれば、一室型もしくは二室型) 、バッグ、BIN およびトレーが含まれる。適当な容器は、ガラス、プラスチック、金属などの任意の材料でできていよい。容器は、使い捨てでも再利用型でもよい。再構成は、大規模で行っても小規模でも行ってよい。

【 0124 】

いくつかの例では、移送ステップを避けるためにタンパク質の再構成を行う容器中でタンパク質製剤を凍結乾燥することが望ましいだろう。この例の容器は、例えれば、3、4、5、10、20、50 または 100 cc バイアルであり得る。いくつかの実施形態では、凍結乾燥および再構成に適した容器は、二室型注射器 (例えれば、Lyophil-Ject (登録商標) 、(Vetter) 注射器) である。例えれば、二室型注射器は、それぞれ、栓により分離された別々の室中にある凍結乾燥物質および希釈剤の両者を含むことができる (実施例 5 参照) 。再構成するために、プランジャーを希釈剤側の栓に取り付けて、希釈剤を生成物室中に動かし、希釈剤が凍結乾燥物質に接触して、本明細書に記載するように再構成が起こるようにすることができる (実施例 5 参照) 。
20

【 0125 】

本発明の医薬組成物、製剤および関連する方法は、種々の治療薬を対象の CNS に送達する (例えれば、髄腔内に、脳室内にもしくは大槽内に) 、および関連する疾患を治療するのに有用である。本発明の医薬組成物は、タンパク質および酵素を、リソーム貯蔵障害を患っている患者に送達する (例えれば、酵素補充療法) のに特に有用である。リソーム蓄積症は、リソーム機能の欠損から生じる比較的まれな先天性代謝障害の群を表す。リソーム症は、リソーム中への未消化の巨大分子の蓄積を特徴とし、このようなリソームの大きさおよび数の増大、ならびに最終的には細胞機能障害および臨床的異常を生じさせる。
30

CNS 送達

【 0126 】

本明細書に記載する種々の安定な製剤は、一般的に治療薬の CNS 送達に適していると考えられる。本発明による安定な製剤は、それだけに限らないが、実質内、脳内、脳室内 (I C V) 、髄腔内 (例えれば、I T 腰椎、I T 大槽) 投与ならびに CNS および / または CSF に直接的または間接的に注射するための任意の他の技術および経路を含む種々の技術および経路を介した CNS 送達に使用することができる。
40

髄腔内送達

【 0127 】

いくつかの実施形態では、補充酵素は、本明細書に記載する製剤で CNS に送達される。いくつかの実施形態では、補充酵素は、治療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 CNS に送達される。いくつかの実施形態では、所望の補充酵素 (例えれば、HNS タンパク質) を CSF 中に送達するために髄腔内投与が使用される。本明細書で使用する場合、髄腔内投与 (髄腔内注射とも呼ぶ) とは、脊柱管 (脊髄を囲む髄腔
50

内空間)への注射を指す。それだけに限らないが、穿頭孔または大槽もしくは腰椎穿刺などを通した脳室側部注射を含む種々の技術を使用することができる。代表的な方法は、その内容が参照により本明細書に組み込まれている、*Lazorthes等、Advances in Drug Delivery Systems and Applications in Neurosurgery*、143~192および*Omaya等、Cancer Drug Delivery*、1:169~179に記載されている。

【0128】

本発明によると、脊柱管を囲む任意の領域で酵素を注射することができる。いくつかの実施形態では、酵素は、腰部領域もしくは大槽に注射、または脳室空間に脳室内注射される。本明細書で使用する場合、用語「腰部領域」または「腰椎域」とは、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。典型的には、腰部領域または腰椎域を介した髄腔内注射を、「腰椎IT送達」または「腰椎IT投与」とも呼ぶ。用語「大槽」とは、頭蓋骨と脊椎上部との間の開口部を通した小脳の周囲および下の空間を指す。典型的には、大槽を介した髄腔内注射を、「大槽送達」とも呼ぶ。用語「脳室」とは、脊髄の中心管と連続した脳内の腔を指す。典型的には、脳室腔を介した注射を、脳室内(ICKV)送達とも呼ぶ。

10

【0129】

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」とは、例えば、第三および第四腰椎(背中下部)間、さらに包括的には、脊椎のL2~S1領域に送達される腰椎IT投与または送達を指す。本発明による腰椎IT投与または送達が遠位脊髄管によりうまくより効果的に送達する一方で、大槽送達が特に典型的には遠位脊髄管にうまく送達しないという点で、腰椎IT投与または送達が大槽送達と識別されると考えられる。

20

髄腔内送達のための装置

【0130】

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、流体アクセスポート(例えば注射用口)；流体アクセス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36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環を含有する。種々の実施形態では、流体アクセスポートはレザバーを含む。いくつかの実施形態では、流体アクセスポートは、機械的ポンプ(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、レザバー(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。流体アクセスポートは、埋め込まれるかまたは外側に存在し得る。

30

【0131】

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37A~C)。

40

【0132】

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

50

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。

【0133】

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（O m m a y a）レザバーを用いて投与され得る（Lancet 2: 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レザバーに連結され、レザバーは皮下穿刺されて、レザバー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製剤の髄腔内投与のための他の装置は、米国特許第6,217,552号（この記載内容は参照により本明細書に援用される）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。投薬治療は、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。

【0134】

注射のためには、本発明の製剤は、液体溶液中に製剤化され得る。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。

【0135】

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/または他の薬学的製剤は、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。

【0136】

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。

【0137】

本発明の方法の別の実施形態では製薬上許容可能な製剤は、製薬上許容可能な製剤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。

【0138】

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、好みしくは少なくとも数日間、1週間または数週間、in vivoで本発明の薬学的製剤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

【0139】

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IC

10

20

30

40

50

V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、HNS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、HNS酵素）を送達する。

【0140】

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、HNS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、HNS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、治療されるべきリ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、リソーム蓄積症に罹患しているかまたは罹り易い患者において、例えば組織の細胞リ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、欠損リソーム酵素が高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

【0141】

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、くも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。

【0142】

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。

【0143】

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。

【0144】

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、表面または浅在組織、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。

【0145】

本発明によれば、治療用タンパク質（例えば、補充酵素）は、対象において治療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、10

10

20

30

40

50

mm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。

【0146】

いくつかの実施形態では、治療薬（例えば酵素）は、大脳の1つ以上の表面または浅在組織に送達される。いくつかの実施形態では、大脳の標的化表面または浅在組織は、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、大脳の標的化表面または浅在組織は、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。

【0147】

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、大脳の標的化表面または浅在組織は、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。

10

【0148】

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から選択される。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。

20

【0149】

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。

【0150】

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-くも膜、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。

30

【0151】

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

【0152】

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、表面または浅在組織、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。

40

【0153】

いくつかの実施形態では、治療薬（例えば酵素）は、脊髄の1つ以上の表面または浅在組織に送達される。いくつかの実施形態では、脊髄の標的化表面または浅在組織は、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、脊髄の標的化表面または浅在組織は、軟膜および／または白質路を含有する。

【0154】

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

50

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。

【0155】

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

【0156】

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、骨髓および骨髓由来細胞、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。

10

生体分布および生物学的利用能

【0157】

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HNS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。

20

【0158】

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HNS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。

30

【0159】

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、治療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、500nmol/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。

40

【0160】

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

50

時・mg、800 nmol/時・mg、900 nmol/時・mg、1000 nmol/時・mg、1500 nmol/時・mg、2000 nmol/時・mg、3000 nmol/時・mg、4000 nmol/時・mg、5000 nmol/時・mg、6000 nmol/時・mg、7000 nmol/時・mg、8000 nmol/時・mg、9000 nmol/時・mgまたは10,000 nmol/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。

【0161】

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（譬如補充酵素）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（譬如補充酵素）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。

【0162】

ある実施形態では、本発明に従って送達される治療薬（譬如補充酵素）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30 μg/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（譬如補充酵素）は、対象の標的化組織または細胞（譬如、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（譬如、対象へのこのような薬学的組成物の髄腔内腔内投与の、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20 μg/ml、少なくとも15 μg/ml、少なくとも10 μg/ml、少なくとも7.5 μg/ml、少なくとも5 μg/ml、少なくとも2.5 μg/ml、少なくとも1.0 μg/mlまたは少なくとも0.5 μg/mlの濃度を達成する。

サンフィリッポA症候群および他のリソソーム蓄積症の治療

【0163】

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）により特徴化され、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。

【0164】

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（譬如、1つ以上の補充酵素）の送達を有益に助長し得る。例えば、サンフィリッポ症候群A型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）の蓄積により特徴化されるため、リソソームは、リソソーム蓄積障害の治療のための所望の標的細胞小器官を表す。

【0165】

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治療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、譬如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

10

20

30

40

50

おり、一般的には、根元的酵素欠乏症の体細胞性症候を治療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。

【0166】

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治療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治療のために、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治療するためでもある。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、神経学的後遺症を治療し、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治療する。例えば、リソソーム蓄積症（例えばサンフィリッポ症候群A型）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、HNS）を含む薬学的組成物を、神経学的後遺症を治療するために、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治療するために、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。

10

【0167】

サンフィリッポ症候群またはムコ多糖症IIIA型（MPS IIIA）は、グリコサミノグリカン（GAG）の分解に関する酵素の欠損を特徴とするまれな遺伝子疾患である。酵素が存在しないと、部分的に分解されたGAG分子は体から排出されず、種々の組織のリソソームに蓄積し、進行性の広範な身体機能障害を生じさせる（NeufeldおよびMuenzer、2001）。

20

【0168】

MPS IIIA、B、CおよびDと呼ばれる4種の異なる型のMPS IIIが同定された。各々がGAGヘパラン硫酸の分解に関する4種の酵素の1種の欠損を示す。全ての型が、粗野な顔の特徴、肝脾腫、角膜混濁および骨格奇形を含む異なる程度の同一の臨床症状を有する。しかしながら、最も著しくは、ニューロン中のヘパラン硫酸の蓄積だけでなく、一次GAG蓄積により引き起こされるガングリオシドGM2、GM3およびGD2のその後の上昇にも結び付けられる認知能力の重度のおよび進行性の喪失である（Walkey 1998）。

30

【0169】

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。

40

【0170】

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、主要な発達里程碑を失い、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、典型的には、それ自体、幼児において、症

50

状発現し、罹患した個体の寿命は、一般的には、10代後期～20代前半を超えることはない。

【0171】

本発明の組成物および方法を使用して、サンフィリップ症候群A型に罹患しているまたは罹患しやすい個体を有効に治療することができる。「治療する」または「治療」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もしくは進行の防止または遅延、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。

【0172】

いくつかの実施形態では、治療は、サンフィリップA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、発育遅延、進行性認知障害、聴力損失、言語発達障害、運動技能の欠乏、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。

10

【0173】

いくつかの実施形態では、治療は、種々の組織におけるリソーム貯蔵（例えば、GAGの）低減を指す。いくつかの実施形態では、治療は、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ーム貯蔵低減を指す。ある実施形態では、リソーム貯蔵は、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、リソーム貯蔵は、リ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）。

20

【0174】

いくつかの実施形態では、治療は、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。

30

【0175】

いくつかの実施形態では、治療は、種々の組織中のHNS酵素活性の増大を指す。いくつかの実施形態では、治療は、脳標的組織、脊髄ニューロンおよび／または末梢標的組織中のHNS酵素活性の増大を指す。いくつかの実施形態では、HNS酵素活性は、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%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%またはそれ以上増大する。いくつかの実施形態では、HNS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倍増大する。いくつかの実施形態では、HNS酵素活性の増大は、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、600nmol/時・mg、

40

50

mg またはそれ以上である。いくつかの実施形態では、HNS 酵素活性は、腰部領域で増大する。いくつかの実施形態では、腰部領域のHNS 酵素活性の増大は、少なくとも約 2000 nmol / 時・ mg 、3000 nmol / 時・ mg 、4000 nmol / 時・ mg 、5000 nmol / 時・ mg 、6000 nmol / 時・ mg 、7000 nmol / 時・ mg 、8000 nmol / 時・ mg 、9000 nmol / 時・ mg 、10000 nmol / 時・ mg またはそれ以上である。

【0176】

いくつかの実施形態では、治療は、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。¹⁰ いくつかの実施形態では、治療は、発育遅延低減を指す。ある実施形態では、発育遅延は、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。

【0177】

いくつかの実施形態では、治療は、生存（例えば、生存時間）増大を指す。例えば、治療は、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、本発明による治療は、治療を伴わない同様の疾患有する 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。²⁰ いくつかの実施形態では、本発明による治療は、治療を伴わない同様の疾患有する 1 人以上の対照個体の平均余命と比較して、約 6 カ月より長く、約 7 カ月、約 8 カ月、約 9 カ月、約 10 カ月、約 11 カ月、約 12 カ月、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、本発明による治療は、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 またはそれより以上の生存時間または平均余命を指す。³⁰

【0178】

「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治療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治療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、治療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、サンフィリップ症候群 A 型に苦しむ個体である（治療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）。⁴⁰

【0179】

治療されている個体（「患者」または「対象」とも呼ばれる）は、サンフィリップ症候群 A 型を有するかまたはサンフィリップ症候群 A 型疾患有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 HNS 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、サンフィリップ症候群 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 ~ 5 % 未満である HNS 発現レベルを有し得る。

【0180】

いくつかの実施形態では、個体は、当該疾患有あると最近診断された個体である。典型

的には、疾患の効果を最小化し、治療の利点を最大化するためには、早期の治療（診断後可能な限り早期の治療開始）が重要である。

免疫寛容

【0181】

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。

【0182】

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平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、治療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。10

【0183】

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、例えばシクロスボリンA（CsA）および抗増殖剤、例えばアザチオプリン（Azathioprine）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。20

【0184】

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、シクロスボリン、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; Potter et al., 1999, Ann. N.Y. Acad. Sci. 875, 159-174; Slavik et al., 1999, Immunol. Res. 19, 1-24; Gaziiev 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-サブユニット）抗体ダクリズマブ（例えば、ゼナバックス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,

304050

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

【0185】

10

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。

【0186】

20

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。

【0187】

30

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治療し、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りソソーム蓄積症またはその症候を治療する（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。

【0188】

40

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、例えば治療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；治療の持続期間；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。

【0189】

いくつかの実施形態では、治療的有効用量は、約0.005mg/脳1kg～500mg/脳1kg、例えば、約0.005mg/脳1kg～400mg/脳1kg、約0.0

50

0.5 mg / 脳 1 kg ~ 300 mg / 脳 1 kg、約 0.005 mg / 脳 1 kg ~ 200 mg / 脳 1 kg、約 0.005 mg / 脳 1 kg ~ 100 mg / 脳 1 kg、約 0.005 mg / 脳 1 kg ~ 90 mg / 脳 1 kg、約 0.005 mg / 脳 1 kg ~ 80 mg / 脳 1 kg、約 0.005 mg / 脳 1 kg ~ 70 mg / 脳 1 kg、約 0.005 mg / 脳 1 kg ~ 60 mg / 脳 1 kg、約 0.005 mg / 脳 1 kg ~ 50 mg / 脳 1 kg、約 0.005 mg / 脳 1 kg ~ 40 mg / 脳 1 kg、約 0.005 mg / 脳 1 kg ~ 30 mg / 脳 1 kg、約 0.005 mg / 脳 1 kg ~ 25 mg / 脳 1 kg、約 0.005 mg / 脳 1 kg ~ 20 mg / 脳 1 kg、約 0.005 mg / 脳 1 kg ~ 15 mg / 脳 1 kg、約 0.005 mg / 脳 1 kg ~ 10 mg / 脳 1 kg の範囲である。

【0190】

10

いくつかの実施形態では、治療的有効用量は、約 0.1 mg / 脳 1 kg より多く、約 0.5 mg / 脳 1 kg より多く、約 1.0 mg / 脳 1 kg より多く、約 3 mg / 脳 1 kg より多く、約 5 mg / 脳 1 kg より多く、約 10 mg / 脳 1 kg より多く、約 15 mg / 脳 1 kg より多く、約 20 mg / 脳 1 kg より多く、約 30 mg / 脳 1 kg より多く、約 40 mg / 脳 1 kg より多く、約 50 mg / 脳 1 kg より多く、約 60 mg / 脳 1 kg より多く、約 70 mg / 脳 1 kg より多く、約 80 mg / 脳 1 kg より多く、約 90 mg / 脳 1 kg より多く、約 100 mg / 脳 1 kg より多く、約 150 mg / 脳 1 kg より多く、約 200 mg / 脳 1 kg より多く、約 250 mg / 脳 1 kg より多く、約 300 mg / 脳 1 kg より多く、約 350 mg / 脳 1 kg より多く、約 400 mg / 脳 1 kg より多く、約 450 mg / 脳 1 kg より多く、約 500 mg / 脳 1 kg より多い。

【0191】

20

いくつかの実施形態では、治療的有効用量は、mg / 体重 1 kg 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 5 に示されるように換算され得る。

【表5】

【表5】

30

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

【0192】

いくつかの実施形態では、治療的有効用量は、mg / CSF 15 cc 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的有効用量は、mg / CSF 15 cc に換算され得る。例えば、成人におけるCSFの容積は約 150 mL 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 0.1 mg ~ 50 mg の単一用量注射は、成人では約 0.01 mg / CSF 15 cc (0.1 mg) ~ 5.0 mg / CSF 15 cc (50 mg) 用量である。

40

【0193】

任意の特定の対象に関して、具体的な投与量レジメンは、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。

50

キット

【0194】

本発明はさらに、本発明の製剤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、I D D D、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、レザバーまたは1 y o - j e c t s 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。

【0195】

典型的には、容器は、製剤、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、製剤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、製剤が、例えばI T 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な製剤を含有し得る。種々の実施形態において、単一用量の安定な製剤は、約15m1未満、10m1、5.0m1、4.0m1、3.5m1、3.0m1、2.5m1、2.0m1、1.5m1、1.0m1または0.5m1の容量で存在する。代替的には、製剤を保持するよう器は、多数回使用バイアルであって、これは、製剤の反復投与（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、B W F I、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。希釈剤および製剤の混合時に、再構成化製剤中の最終タンパク質濃度は、一般的に、少なくとも1mg/m1（例えば、少なくとも5mg/m1、少なくとも10mg/m1、少なくとも25mg/m1、少なくとも50mg/m1、少なくとも75mg/m1、少なくとも100mg/m1）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、I D D D、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。

【0196】

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に援用される。

【実施例】

【0197】

実施例

実施例1：H N S 製剤

本実施例の実験は、髄腔内送達を意図したp H、イオン強度および緩衝剤型を含む種々の製剤条件におけるヘパラン-N-スルファターゼ（H N S）の安定性を試験するための予備処方試験の一部として設計した。

【0198】

H N Sは、一般的にその天然状態で二量体であることが分かっている（B i e l i c k i等、Journal of Biochemistry、1998、329、145～150）。H N S二量体の分子量は115kDaである。H N Sは、典型的にはサイズ排除クロマトグラフィー（S E C）中に二量体として溶出する。S D S - P A G E ゲル上に流すと、ゲルに充填する前に試料を100℃に加熱しない限り（その場合、H N Sは単量体（62kDa）として現れる）H N Sは二量体として現れる。H N Sの全長および成熟配列を表6および表7のそれぞれで以下に示す。成熟H N S配列は、5個のシステイン残基（下線部）を含み、これらは2つの内部ジスルフィド結合および1つの遊離システイン

を可能にするだろう。

【表6】

【表6】

全長HNSの配列

MSCPVPACCA	LLLVLGLCRA	RPRNALLLA	DDGGFESGAY	NNSAIATPHL
DALARRSLLF	RNAFTSVSSC	SPSRASLLTG	LPQHQNGMYG	LHQDVHHFNS
FDKVRSLPLL	LSQAGVRTGI	IGKKHVGPET	VYPFDFAYTE	ENGSQLQVGR
NITRIKLLVR	KFLQTQDDRP	FFLYVAFHDP	HRCGHSQPQY	GTFCEKFGNG
ESGMGRIPDW	TPQAYDPLDV	LVPYFVPNTP	AARADLAAQY	TTVGRMDQGV
GLVLQELRDA	GVLNDTLVIF	TSDNGIPFPS	GRTNLYWPGT	AEPLLVSSPE
HPKRWGQVSE	AYVSLLDLTP	TILDWFSIPIY	PSYAIFGSKT	IHLTGRSLLP
ALEAEPLWAT	VFGSQSHHEV	TMSYPMRSVQ	HRHFRLVHNL	NFKMPFPIDQ
DFYVSPTFQD	LLNRTTAGQP	TGWYKDLRHY	YYRARWELEYD	RSRDPHETQN
LATDPRFAQL	LEMIRDQLAK	WQWETHDPWV	CAPDGVLEEK	LSPQCQPLHN
EL (配列番号2)				

【表7】

【表7】

成熟HNS(rhHNS)の配列

RPRNALLLA	DDGGFESGAY	NNSAIATPHL	DALARRSLLF	RNAFTSVSSC
SPSRASLLTG	LPQHQNGMYG	LHQDVHHFNS	FDKVRSLPLL	LSQAGVRTGI
IGKKHVGPET	VYPFDFAYTE	ENGSQLQVGR	NITRIKLLVR	KFLQTQDDRP
FFLYVAFHDP	HRCGHSQPQY	GTFCEKFGNG	ESGMGRIPDW	TPQAYDPLDV
LVPYFVPNTP	AARADLAAQY	TTVGRMDQGV	GLVLQELRDA	GVLNDTLVIF
TSDNGIPFPS	GRTNLYWPGT	AEPLLVSSPE	HPKRWGQVSE	AYVSLLDLTP
TILDWFSIPIY	PSYAIFGSKT	IHLTGRSLLP	ALEAEPLWAT	VFGSQSHHEV
TMSYPMRSVQ	HRHFRLVHNL	NFKMPFPIDQ	DFYVSPTFQD	LLNRTTAGQP
TGWYKDLRHY	YYRARWELEYD	RSRDPHETQN	LATDPRFAQL	LEMIRDQLAK
WQWETHDPWV	CAPDGVLEEK	LSPQCQPLHN	EL (配列番号1)	

【0199】

この実施例では、以下の製剤パラメータを試験した：(1) pH 3～8 のクエン酸塩製剤および pH 5～8 のリン酸塩製剤中の pH；(2) 緩衝剤：クエン酸ナトリウム緩衝液(pH 3.0～8.0)およびリン酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0～8.0)、全て 20 mM の濃度；ならびに(3) イオン強度：NaCl(0～300 mM)。

【0200】

本実施例に記載する全ての予備処方試験は、1～2 mg / ml の低タンパク質濃度で行った。

【0201】

種々のストレス下で生成する製剤生成物および分解生成物を分析するために、SEC-HPLC、SDS-PAGE、示差走査熱量測定(DSC)、濁度(OD320)および酵素活性アッセイを使用した。

【0202】

一般的に、SDS-PAGE結果は、低pH(pH 3)で製剤の断片化を示した一方で、高pH製剤は、ほとんど断片化を示さなかった。DSCによる融解温度の評価は、クエン酸塩およびリン酸塩を含むrhHNS製剤が6～7のpH範囲で最大の熱安定性を有することを示した。酵素活性結果は、評価した全pH値で、クエン酸塩を含むrhHNS製剤が、5.0 で 7 日間の貯蔵後に不活性になることを示した。pH 6～7 で リン酸塩を含むrhHNS 製剤は、5.0 で 7 日間の貯蔵後に有意な活性を保持した。しかしながら、同じ製剤の別の調製品では一貫して観察されなかつたが、高分子量ピーク(「SECにより見られる「16分ピーク」)は、pH 7～8 で最大である。

【0203】

20

30

40

50

イオン強度0～300mM NaClのrhHNS製剤安定性への影響も評価した。50で7日間の加速安定性条件で貯蔵した試料のSDS-PAGEゲルは、内部ロット対照よりも大きな断片化を示さなかった。クエン酸塩を含むrhHNS製剤は、イオン強度にかかわらず50で7日後に活性の完全な喪失を示した。リン酸塩を含むrhHNS製剤は、50～300mM NaClで有意な活性を保持した。しかしながら、16分ピーク(SECによる)は、50～150mM NaCl範囲で最大である。

方法

pHのrhHNS安定性への影響

【0204】

透析(Piece Slide-A-Lyzer、PN番号66383、ロット番号HK107537)を使用して、rhHNS(10mMリン酸ナトリウム、138mM塩化ナトリウム、pH7.0中9.2mg/ml)を3.0～8.0のpH範囲を有する20mMクエン酸ナトリウムおよび6.0～8.0のpH範囲を有する20mMリン酸ナトリウムに緩衝液交換した。各交換した緩衝液中の最終タンパク質濃度を2.0mg/mlに標的化した。これらの溶液を、それぞれ0.5mlで2.0mlガラスバイアル中(West Pharmaceuticals、カタログ番号:6800-0314、ロット番号:30809A2001)に分取し、次いで、50、25および2～8チャンバー中でインキュベートした。7、14および28日後、凝集(SEC-HPLC)、断片化(SDS-PAGE)、濁度(OD320)および酵素活性の分析のために試料を引き出した。

10

【0205】

リン酸塩緩衝液中でのその後のpH試験を上記と同じ手順にしたがって反復したが、rhHNSロット番号SS10を使用した。最初のリン酸塩試験についてのpH範囲は狭かったので、より広範なpH範囲を組み込むよう試験を反復した。

20

OD320

【0206】

OD320測定を行うことにより、rhHNS試料の濁度を決定した。試料を、0.2cm経路長セル中2mg/mlでMolecular Devices Spectra Max Plus 384で測定した。各試験について総量は30μlとした。

30

SEC-HPLC

【0207】

rhHNSのSEC-HPLC分析のために、Superdex column 200(10/300GL、PN:17-5175-01、GE Healthcare)を使用した。移動相は、0.5ml/分の流速で流れるリン酸緩衝食塩水(25mMリン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム、pH6)とした。注入量は、1mg/ml(それぞれの緩衝液中2mg/mlから希釈した)の30μlとした。各注入の実行時間は50分とし、214nmの検出波長とした。

SDS-PAGE

【0208】

この方法は、還元および変性条件下でのrhHNSの断片化および凝集を評価する。rhHNS試料をSDS緩衝液と混合し(最終濃度=0.5mg/ml)、DTTを添加した(還元試料のみ)。試料を100℃に5分間加熱した。5分より長い間試料を沸騰させると、rhHNSの断片化が生じた。各レーンに8～16%勾配アクリルアミドゲル(カタログ番号:EC6045BOX)上rhHNS試料10μgをロードした。ゲルを150Vで流し、次いで、Gel Code Blue Coomassie染料と共に一晩インキュベートした(震盪しながら)。スキャンの1時間前にゲルを水で脱染した。

40

活性アッセイ

【0209】

rhHNSについての活性アッセイは2ステップ反応である。第1反応では、ヘパラン-N-スルファーアーゼが基質を脱硫酸化する。第2反応で、-グルコシダーゼ酵素の添

50

加によりさらなる加水分解が起こり、4-MUを放出し、次いでこれを測定することができる。r h H N S を 1 0 μ g / m l の最終アッセイ濃度にするために 1 : 2 1 0 希釈した。リン酸塩緩衝液 pH 試験のために、アッセイを修正し、約 1 0 0 μ g / m l の最終アッセイ濃度にするために r h H N S を 1 : 2 4 希釈した。

D S C

【 0 2 1 0 】

示差走査熱量 (D S C) 測定を Microcalorimeter instrument (MicroCal VP - D S C) で行った。試験する r h H N S 試料は 0 . 5 m g / m l とした。温度を 1 0 に平衡化し、次いで、1 分当たり 1 で 1 0 0 まで勾配を与えた。

10

H N S 安定性へのイオン強度の影響

【 0 2 1 1 】

透析 (Piece Slide - A - Lyzer ロット番号 HK 1 0 7 5 3 7) を使用して、r h H N S を 0 ~ 3 0 0 mM の範囲の塩化ナトリウムを含む pH 6 . 0 の 2 0 mM クエン酸塩緩衝液および 0 ~ 3 0 0 mM の範囲の塩化ナトリウムを含む pH 7 . 0 の 2 0 mM リン酸塩緩衝液に緩衝液交換した。各交換した緩衝液中の最終タンパク質濃度を 2 . 0 m g / m l に標的化した。これらの溶液を、それぞれ 0 . 5 m l で 2 . 0 m l ガラスバイアル中 (West Pharmaceuticals 、カタログ番号： 6 8 0 0 - 0 3 1 4 、ロット番号： 3 0 8 0 9 A 2 0 0 1) に分取し、次いで、 5 0 、 2 5 および 2 ~ 8 チャンバー中でインキュベートした。 7 、 1 4 および 2 8 日後、凝集 (SEC - H P L C) 、断片化 (SDS - PAGE) 、濁度 (O D 3 2 0) および酵素活性の分析のために試料を引き出した。

20

結果

H N S 安定性への pH の影響

O D 3 2 0 および外観

【 0 2 1 2 】

濁度を測定するための O D 3 2 0 値の結果を表 8 で以下に示す。 pH 7 のリン酸塩または pH 3 ~ 6 のクエン酸塩を含む r h H N S 製剤の加速安定性条件下で濁度の有意な変化はなかった。しかしながら、pH 8 . 0 のリン酸塩およびクエン酸塩製剤の両者ならびに pH 7 . 0 のクエン酸塩製剤中の試料は、 5 0 で 7 日後に濁度の増加を示した。外観チェックを、ライトボックス (M . W . T e c h n o l o g i e s , I N C 、モデル番号： M I H - D X) 下で行ったところ、全製剤は無色透明で目に見える粒子がないままのように見えた。

30

【表8】

【表8】

pH試験のOD320概要

貯蔵条件	製剤	OD 320	
ILC	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 3.0	0.005	10
50°C 7日	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 3.0	0.006	
25°C 14日	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 3.0	0.007	
5°C 28日	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 3.0	0.003	
ILC	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 4.0	0.002	
50°C 7日	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 4.0	0.006	
25°C 14日	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 4.0	0.009	
5°C 28日	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 4.0	0.000	
ILC	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 5.0	0.002	
50°C 7日	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 5.0	0.004	
25°C 14日	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 5.0	0.004	20
5°C 28日	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 5.0	0.004	
ILC	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 6.0	0.000	
50°C 7日	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 6.0	0.002	
25°C 14日	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 6.0	0.001	
5°C 28日	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 6.0	0.000	
ILC	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 7.0	0.001	
50°C 7日	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 7.0	0.017	
25°C 14日	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 7.0	0.002	
5°C 28日	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 7.0	-0.001	
ILC	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 8.0	0.000	30
50°C 7日	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 8.0	0.018	
25°C 14日	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 8.0	0.002	
5°C 28日	2mg/ml HNS 20mM クエン酸塩, pH 8.0	-0.001	
ILC	2mg/ml HNS 20mM リン酸塩, pH 7.0	0.000	
50°C 7日	2mg/ml HNS 20mM リン酸塩, pH 7.0	0.005	
25°C 14日	2mg/ml HNS 20mM リン酸塩, pH 7.0	0.000	
5°C 28日	2mg/ml HNS 20mM リン酸塩, pH 7.0	0.001	
ILC	2mg/ml HNS 20mM リン酸塩, pH 8.0	0.002	
50°C 7日	2mg/ml HNS 20mM リン酸塩, pH 8.0	0.023	
25°C 14日	2mg/ml HNS 20mM リン酸塩, pH 8.0	0.002	
5°C 28日	2mg/ml HNS 20mM リン酸塩, pH 8.0	0.001	

S E C - H P L C

40

【0213】

r h H N S の S E C 溶出プロファイルの例示的クロマトグラムを図 1 A ~ 1 C に示す。ベースライン試料は主としてそれぞれ約 2.2 分、約 2.6 分および約 3.2 分の保持時間占有する 3 つのピークを含む。時折、これはまた、約 3.4 分にもピーク占有する。S E C - L S により、約 2.6 分の主ピークが二量体として確認された。他のピークの性質は不明である。

【0214】

第 1 pH 試験からの S E C データを表 9 で以下に概説する。全体的に、全製剤は、ストレス条件 (50) ならびに加速 (25) およびリアルタイム貯蔵条件 (2 ~ 8) 下で本質的にほとんど変化を有さなかった。しかしながら、50 で 7 日後、p H 6 ~ 8 の

50

クエン酸塩およびリン酸塩を含む r h H N S 製剤は、16 分の保持時間有する高分子量ピークを生成した。pH 7.0 のリン酸塩を含む r h H N S 製剤では、16 分ピークは、総面積の約 2 % を占める。しかしながら、イオン強度試験で調製した同じ製剤は、約 0.1 % しか含まなかった。

【表9】

【表9】
pH 試験からの SEC-HPLC データ概要

貯蔵条件	製剤種類	16分ピーク%	二量体%
ILC	20 mM クエン酸塩 pH 3.0	0	99.8
7 日 50° C	20 mM クエン酸塩 pH 3.0	0	99.9
14 日 25° C	20 mM クエン酸塩 pH 3.0	0	99.7
1 月 5° C	20 mM クエン酸塩 pH 3.0	0	99.7
ILC	20 mM クエン酸塩 pH 4.0	0	99.8
7 日 50° C	20 mM クエン酸塩 pH 4.0	0	99.8
14 日 25° C	20 mM クエン酸塩 pH 4.0	0	99.6
1 月 5° C	20 mM クエン酸塩 pH 4.0	0	99.5
ILC	20 mM クエン酸塩 pH 5.0	0	99.8
7 日 50° C	20 mM クエン酸塩 pH 5.0	0	99.8
14 日 25° C	20 mM クエン酸塩 pH 5.0	0	99.6
1 月 5° C	20 mM クエン酸塩 pH 5.0	0	99.5
ILC	20 mM クエン酸塩 pH 6.0	0	99.8
7 日 50° C	20 mM クエン酸塩 pH 6.0	0.3	99.0
14 日 25° C	20 mM クエン酸塩 pH 6.0	0	99.6
1 月 5° C	20 mM クエン酸塩 pH 6.0	0	99.3
ILC	20 mM クエン酸塩 pH 7.0	0	99.8
7 日 50° C	20 mM クエン酸塩 pH 7.0	0.9	98.6
14 日 25° C	20 mM クエン酸塩 pH 7.0	0	99.6
1 月 5° C	20 mM クエン酸塩 pH 7.0	0	99.2
ILC	20 mM クエン酸塩 pH 8.0	0	99.8
7 日 50° C	20 mM クエン酸塩 pH 8.0	0.5	98.7
14 日 25° C	20 mM クエン酸塩 pH 8.0	0	99.6
1 月 5° C	20 mM クエン酸塩 pH 8.0	0	99.4
ILC	20 mM リン酸塩 pH 7.0	0	99.8
7 日 50° C	20 mM リン酸塩 pH 7.0	2.0	97.2
14 日 25° C	20 mM リン酸塩 pH 7.0	0	99.6
1 月 5° C	20 mM リン酸塩 pH 7.0	0	99.5
ILC	20 mM リン酸塩 pH 8.0	0	99.8
7 日 50° C	20 mM リン酸塩 pH 8.0	1.0	98.8
14 日 25° C	20 mM リン酸塩 pH 8.0	0	99.7
1 月 5° C	20 mM リン酸塩 pH 8.0	0	99.4

【0215】

この現象を検証するために、リン酸塩緩衝液での pH 試験をより広範囲の pH にわたって反復し、SEC データを表 10 で以下に概説する。この試験では、50° C で 7 日後に pH 5 緩衝液には 16 分ピークは存在しなかったが、実際、pH 6 ~ 8 の製剤には存在し、これは pH が増加するにつれて増加した。ポリソルベート 20 (0.05%) の添加は、16 分ピークの大きさに有意に影響しなかった。興味深いことに、pH 5 製剤は安定性試料中にこのピークを含まなかたが、pH 5 への生理食塩水からの透析の調製中、有意な量の r h H N S が沈殿した。

10

20

30

40

50

【表10】

【表10】
反復リン酸塩緩衝液pH試験からのSEC-HPLCデータ概要

貯蔵条件	製剤種類	16分ピーク%	二量体%
5°C 7日	2 mg/ml HNS 20mM リン酸塩, pH 5.0	0.0	98.4
50°C 7日	2 mg/ml HNS 20mM リン酸塩, pH 5.0	0.0	99.3
5°C 7日	2 mg/ml HNS 20mM リン酸塩, pH 6.0	0.0	99.0
50°C 7日	2 mg/ml HNS 20mM リン酸塩, pH 6.0	0.2	99.1
5°C 7日	2 mg/ml HNS 20mM リン酸塩, pH 7.0	0.0	98.8
50°C 7日	2 mg/ml HNS 20mM リン酸塩, pH 7.0	0.6	98.8
5°C 7日	2 mg/ml HNS 20mM リン酸塩, pH 7.0, 0.05% ポリソルベート20	0.0	98.9
50°C 7日	2 mg/ml HNS 20mM リン酸塩, pH 7.0, 0.05% ポリソルベート20	0.8	98.0
5°C 7日	2 mg/ml HNS 20mM リン酸塩, pH 8.0	0.0	99.1
50°C 7日	2 mg/ml HNS 20mM リン酸塩, pH 8.0	1.6	97.6

【0216】

予備的特性評価結果は、16分ピークが、スケール変更すると、rhHNS二量体ピークのスペクトルとうまく重ね合わせられるタンパク質を示すスペクトルを有することを確認している(図1D)。SEC-LSにより試験すると、16分ピークは、1MDaを超える見かけの分子量を示す。このピークの性質を理解するためにはさらなる特性評価が必要となり得る。

酵素活性

【0217】

第1pH試験からの活性データ概要を表5で以下に示す。50で7日間の加速安定性条件下で、rhHNSは、pH3~8の製剤を含む全クエン酸塩中で酵素活性の大半を喪失した一方で、pH7~8のリン酸塩を含むrhHNS製剤は、活性を保持している。25および5では、クエン酸塩およびリン酸塩緩衝液の両者中の全rhHNS製剤が活性の大半を保持した。pH3.0のクエン酸塩を含むrhHNS製剤は、より低い全体的活性値を有するように見える。リン酸塩における反復pH試験からの活性データを表11および12に概説する。pH8.0のrhHNS製剤が65%活性を喪失したことを除いては、pH5~7の全rhHNS製剤が、50で7日後に酵素活性の84~100%を保持している。

10

20

30

40

【表 11】

【表 11】

第 1 pH 試験からの活性概要

貯蔵条件	製剤種類	活性 nmol/mg/時間
ILC	20 mM クエン酸塩 pH 3.0	639
7 日 50° C	20 mM クエン酸塩 pH 3.0	29
14 日 25° C	20 mM クエン酸塩 pH 3.0	920
1 月 5° C	20 mM クエン酸塩 pH 3.0	794
ILC	20 mM クエン酸塩 pH 4.0	2178
7 日 50° C	20 mM クエン酸塩 pH 4.0	43
14 日 25° C	20 mM クエン酸塩 pH 4.0	1998
1 月 5° C	20 mM クエン酸塩 pH 4.0	2123
ILC	20 mM クエン酸塩 pH 5.0	1901
7 日 50° C	20 mM クエン酸塩 pH 5.0	72
14 日 25° C	20 mM クエン酸塩 pH 5.0	1779
1 月 5° C	20 mM クエン酸塩 pH 5.0	2194
ILC	20 mM クエン酸塩 pH 6.0	2316
7 日 50° C	20 mM クエン酸塩 pH 6.0	80
14 日 25° C	20 mM クエン酸塩 pH 6.0	2026
1 月 5° C	20 mM クエン酸塩 pH 6.0	2122
ILC	20 mM クエン酸塩 pH 7.0	2312
7 日 50° C	20 mM クエン酸塩 pH 7.0	115
14 日 25° C	20 mM クエン酸塩 pH 7.0	2009
1 月 5° C	20 mM クエン酸塩 pH 7.0	2205
ILC	20 mM クエン酸塩 pH 8.0	2221
7 日 50° C	20 mM クエン酸塩 pH 8.0	44
14 日 25° C	20 mM クエン酸塩 pH 8.0	2071
1 月 5° C	20 mM クエン酸塩 pH 8.0	2505
ILC	20 mM リン酸塩 pH 7.0	640
7 日 50° C	20 mM リン酸塩 pH 7.0	1200
14 日 25° C	20 mM リン酸塩 pH 7.0	1749
1 月 5° C	20 mM リン酸塩 pH 7.0	1391
ILC	20 mM リン酸塩 pH 8.0	1451
7 日 50° C	20 mM リン酸塩 pH 8.0	1125
14 日 25° C	20 mM リン酸塩 pH 8.0	1620
1 月 5° C	20 mM リン酸塩 pH 8.0	1492

【表12】

【表12】

反復pH試験からの活性概要

pH試験からのHNS製剤のSDS-PAGEゲル

貯蔵条件	製剤種類	活性 nmol/mg/時間
°C 7日	2 mg/ml HNS 20mM リン酸塩、pH 5.0	10 4201
50°C 7日	2 mg/ml HNS 20mM リン酸塩、pH 5.0	
5°C 7日	2 mg/ml HNS 20mM リン酸塩、pH 6.0	
50°C 7日	2 mg/ml HNS 20mM リン酸塩、pH 6.0	
5°C 7日	2 mg/ml HNS 20mM リン酸塩、pH 7.0	
50°C 7日	2 mg/ml HNS 20mM リン酸塩、pH 7.0	
5°C 7日	2 mg/ml HNS 20mM リン酸塩、pH 7.0, 0.05 % ポリソルベート20	
50°C 7日	2 mg/ml HNS 20mM リン酸塩、pH 7.0, 0.05 % ポリソルベート20	
5°C 7日	2 mg/ml HNS 20mM リン酸塩、pH 8.0	
50°C 7日	2 mg/ml HNS 20mM リン酸塩、pH 8.0	

20

【0218】

例示的 SDS - PAGE ゲルを図 2 および図 3 に示す。 pH 試験からの還元ゲルを図 2 に示すが、これは pH 3 のクエン酸塩を含む製剤の断片化バンドを示している。40 で 7 日後の pH 8.0 クエン酸塩緩衝液でいくらかの高 MW 凝集が示されたことを除いては、pH 4 ~ 8 の全ての他の製剤は類似であり、約 60 kDa で主（単量体）バンドを示すのみである。図 3 は、pH 試験からの非還元ゲルを示している。ここでもまた pH 3 のクエン酸塩を含む rhHNS 製剤で断片化を見ることができた。

【0219】

これらの結果に基づいて、還元剤の存在または非存在は主バンドの位置に影響を及ぼさないので、rhHNS 天然二量体は主に非共有結合していることが明らかであった。しかしながら、かすかな 125 kDa 二量体バンドが主に非還元試料で存在し、このバンドが共有結合した非天然二量体であることを示唆している。非天然二量体バンドは、40 試料よりも ILC および 25 試料で明白であった。

30

pH 試験からの DSC データ

【0220】

図 4 は、DSC により決定されるクエン酸塩の pH 依存性熱安定性を示している。クエン酸塩中の rhHNS の最高融解温度は、pH 6.0 で 90 であった。リン酸塩を含む rhHNS 製剤は、pH 6 ~ 7 で最大の熱安定性を示した。試験した pH 每で rhHNS の融解温度は、70 を超えた。

rhHNS 安定性へのイオン強度の影響

40

濁度および外観

【0221】

OD320 値の概要を表 13 で以下に示す。経時的な試料の濁度の変化および値の温度依存性変化は観察されなかった。各時点で試料の外観は変化しないままであった。全試料は無色透明で目に見える粒子はないように見えた。

【表13】

【表13】

イオンの影響のOD320

試料	製剤	OD 320
ILC	10 mM クエン酸塩 pH 6.0	0.001
50° C 7 日	10 mM クエン酸塩 pH 6.0	0.006
25° C 14 日	10 mM クエン酸塩 pH 6.0	0.005
5° C 28 日	10 mM クエン酸塩 pH 6.0	0.003
ILC	10 mM クエン酸塩 pH 6.0 100 mM NaCl	0.002
50° C 7 日	10 mM クエン酸塩 pH 6.0 100 mM NaCl	0.009
25° C 14 日	10 mM クエン酸塩 pH 6.0 100 mM NaCl	0.004
5° C 28 日	10 mM クエン酸塩 pH 6.0 100 mM NaCl	0.001
ILC	10 mM クエン酸塩 pH 6.0 150mM NaCl	0.001
50° C 7 日	10 mM クエン酸塩 pH 6.0 150mM NaCl	0.007
25° C 14 日	10 mM クエン酸塩 pH 6.0 150mM NaCl	0.003
5° C 28 日	10 mM クエン酸塩 pH 6.0 150mM NaCl	0.001
ILC	10 mM クエン酸塩 pH 6.0 300mM NaCl	0.001
50° C 7 日	10 mM クエン酸塩 pH 6.0 300mM NaCl	0.006
25° C 14 日	10 mM クエン酸塩 pH 6.0 300mM NaCl	0.006
5° C 28 日	10 mM クエン酸塩 pH 6.0 300mM NaCl	0.003
ILC	10 mM リン酸塩 pH 7.0	0.002
50° C 7 日	10 mM リン酸塩 pH 7.0	0.009
25° C 14 日	10 mM リン酸塩 pH 7.0	0.005
5° C 28 日	10 mM リン酸塩 pH 7.0	0.002
ILC	10 mM リン酸塩 pH 7.0 50mM NaCl	0.001
50° C 7 日	10 mM リン酸塩 pH 7.0 50mM NaCl	0.009
25° C 14 日	10 mM リン酸塩 pH 7.0 50mM NaCl	0.003
5° C 28 日	10 mM リン酸塩 pH 7.0 50mM NaCl	0.002
ILC	10 mM リン酸塩 pH 7.0 100mM NaCl	0.002
50° C 7 日	10 mM リン酸塩 pH 7.0 100mM NaCl	0.009
25° C 14 日	10 mM リン酸塩 pH 7.0 100mM NaCl	0.004
5° C 28 日	10 mM リン酸塩 pH 7.0 100mM NaCl	0.002
ILC	10 mM リン酸塩 pH 7.0 150mM NaCl	0.002
50° C 7 日	10 mM リン酸塩 pH 7.0 150mM NaCl	0.004
25° C 14 日	10 mM リン酸塩 pH 7.0 150mM NaCl	0.002
5° C 28 日	10 mM リン酸塩 pH 7.0 150mM NaCl	0.001
ILC	10 mM リン酸塩 pH 7.0 300mM NaCl	0.002
50° C 7 日	10 mM リン酸塩 pH 7.0 300mM NaCl	0.010
25° C 14 日	10 mM リン酸塩 pH 7.0 300mM NaCl	0.005
5° C 28 日	10 mM リン酸塩 pH 7.0 300mM NaCl	0.003

S E C - H P L C

【0222】

表14は、イオン影響試験からのS E C - H P L Cデータ概要を示している。50°で7日後、全製剤は、16分ピークを除いてはほとんど変化しなかった。クエン酸塩緩衝液では、16分ピーク面積割合は、0.1~0.3%の間であり、NaClレベルによる具体的な増加または減少傾向を有さなかった。しかしながら、リン酸塩緩衝液では、50~150mMのイオン強度について約0.5%までの16分ピーク割合の増加があった。よ

10

20

30

40

50

り低いおよびより高いイオン強度で、16分ピークは約0.1%まで下がった。

【表14】

イオン強度の影響のSEC-HPLCデータ概要

貯蔵条件	製剤種類	16分ピーク%	二量体%
ILC	クエン酸塩 pH 6.0	0	99.3
7日 50°C	クエン酸塩 pH 6.0	0.24	99.2
14日 25°C	クエン酸塩 pH 6.0	0	99.4
1月 5°C	クエン酸塩 pH 6.0	0	99.5
ILC	クエン酸塩 pH 6.0 100mM NaCl	0	99.3
7日 50°C	クエン酸塩 pH 6.0 100mM NaCl	0.10	99.3
14日 25°C	クエン酸塩 pH 6.0 100mM NaCl	0	99.1
1月 5°C	クエン酸塩 pH 6.0 100mM NaCl	0	99.4
ILC	クエン酸塩 pH 6.0 150mM NaCl	0	99.8
7日 50°C	クエン酸塩 pH 6.0 150mM NaCl	0.22	99.5
14日 25°C	クエン酸塩 pH 6.0 150mM NaCl	0	99.2
1月 5°C	クエン酸塩 pH 6.0 150mM NaCl	0	99.5
ILC	クエン酸塩 pH 6.0 300 mM NaCl	0	99.5
7日 50°C	クエン酸塩 pH 6.0 300 mM NaCl	0.04	99.6
14日 25°C	クエン酸塩 pH 6.0 300 mM NaCl	0	99.4
1月 5°C	クエン酸塩 pH 6.0 300 mM NaCl	0	99.3
ILC	リン酸塩 pH 7.0	0	99.3
7日 50°C	リン酸塩 pH 7.0	0.11	99.1
14日 25°C	リン酸塩 pH 7.0	0	99.2
1月 5°C	リン酸塩 pH 7.0	0	99.4
ILC	リン酸塩 pH 7.0 50mM NaCl	0	99.4
7日 50°C	リン酸塩 pH 7.0 50mM NaCl	0.57	98.9
14日 25°C	リン酸塩 pH 7.0 50mM NaCl	0	99.3
1月 5°C	リン酸塩 pH 7.0 50mM NaCl	0	99.5
ILC	リン酸塩 pH 7.0 100mM NaCl	0	99.3
7日 50°C	リン酸塩 pH 7.0 100mM NaCl	0.53	98.9
14日 25°C	リン酸塩 pH 7.0 100mM NaCl	0	99.2
1月 5°C	リン酸塩 pH 7.0 100mM NaCl	0	99.3
ILC	リン酸塩 pH 7.0 150mM NaCl	0	99.4
7日 50°C	リン酸塩 pH 7.0 150mM NaCl	0.52	98.9
14日 25°C	リン酸塩 pH 7.0 150mM NaCl	0	99.2
1月 5°C	リン酸塩 pH 7.0 150mM NaCl	0	99.4
ILC	リン酸塩 pH 7.0 300mM NaCl	0	99.4
7日 50°C	リン酸塩 pH 7.0 300mM NaCl	0.06	99.3
14日 25°C	リン酸塩 pH 7.0 300mM NaCl	0	99.3
1月 5°C	リン酸塩 pH 7.0 300mM NaCl	0	99.1

酵素活性

【0223】

表15は、50°で7日の加速条件下でのr h H N S 安定性へのイオンの影響の活性データ概要を示している。クエン酸塩を含むr h H N S 製剤は、加速条件下でイオン強度にかかわらず8~30%の活性しか保持しなかった。0~300mM NaClと共にリン酸塩を含むr h H N S 製剤は全て、加速条件下でより高い全体活性、45~70%を示した。

【表15】

【表15】
イオン強度の影響試験の活性概要

貯蔵条件	製剤種類	活性 nmol/mg/時間
ILC	クエン酸塩 pH 6.0	1725
7日 50°C	クエン酸塩 pH 6.0	144
ILC	クエン酸塩 pH 6.0 100mM NaCl	1715
7日 50°C	クエン酸塩 pH 6.0 100mM NaCl	303
ILC	クエン酸塩 pH 6.0 150mM NaCl	1475
7日 50°C	クエン酸塩 pH 6.0 150mM NaCl	250
ILC	クエン酸塩 pH 6.0 300 mM NaCl	2059
7日 50°C	クエン酸塩 pH 6.0 300 mM NaCl	619
ILC	リン酸塩 pH 7.0	1661
7日 50°C	リン酸塩 pH 7.0	766
ILC	リン酸塩 pH 7.0 50mM NaCl	1441
7日 50°C	リン酸塩 pH 7.0 50mM NaCl	784
ILC	リン酸塩 pH 7.0 100mM NaCl	1290
7日 50°C	リン酸塩 pH 7.0 100mM NaCl	875
ILC	リン酸塩 pH 7.0 150mM NaCl	1297
7日 50°C	リン酸塩 pH 7.0 150mM NaCl	839
ILC	リン酸塩 pH 7.0 300mM NaCl	1338
7日 50°C	リン酸塩 pH 7.0 300mM NaCl	693

S D S - P A G E

【0224】

図6は、50で7日後のイオン影響試験からのr h H N S 製剤の銀染色したS D S - P A G E ゲルを示している。その後の試験で、r h H N S を5分間沸騰させた場合に断片化は観察されなかったので、10分間沸騰させた試料を使用してこれらのゲルを泳動させたところゲル上に見られる断片化は10分の沸騰によるものであり得る。

【0225】

0~300mM NaClを含むクエン酸塩製剤および0~300mM NaClを含むリン酸塩製剤は全て、60kDaに主モノマーバンドを示した。r h H N S 製剤の内部ロット標準(-80で貯蔵)は、7日間50で維持した試料よりも明白な断片バンドを示すように見えた。全体的には、イオン強度はS D S ゲル上のバンドパターンに影響を及ぼさなかった。

結論

【0226】

この試験の結果は、製剤スクリーニングについての主要な安定性を示す分析法が酵素活性およびHPLC - SECであることを示している。DSCデータは、r h H N S がpH 6~7で約90のTm値の最大熱安定性を有することを示した。クエン酸塩緩衝液中のr h H N S は、全てのpHおよびイオン強度の加速条件下で有意な活性喪失を示し、クエン酸塩が許容できない製剤緩衝液であることを示唆した。リン酸塩についての結果は、かなり良く、pH 6~7の加速条件下で最大活性を保持した。さらに、100~150mM NaClを含むリン酸塩製剤は、加速条件下で最大の活性保持を示した。しかしながら

10

20

30

40

50

、S E C - H P L C の高分子量(16分)ピークは、加速条件下、pH 6~8および50~150 mMのイオン強度で最大である。

【0227】

16分ピークの原因をより理解するための追加の製剤実験が進行中である。さらに、非緩衝食塩水製剤を含むリン酸塩製剤の安定性と、低タンパク質濃度対高タンパク質濃度の安定性を比較するための試験が進行中である。

実施例2：R H H N S のための液体製剤

【0228】

この実施例の実験は、髄腔内送達を意図したr h H N S 製剤の溶解度を最適化するよう設計した。本明細書に記載するように、髄腔内薬剤送達は、少量の注射液体量を要し、結果として、高濃縮タンパク質溶液が必要とされる。しかしながら、r h H N S は、典型的にはその溶解度に影響する、5.1~6.5の範囲の等電点範囲を有する不均一電荷プロファイルを有する。本実施例の試験は、r h H N S 製品の溶解度へのpHおよび塩化ナトリウム濃度の影響についての情報を提供する。

【0229】

図7で分かるように、pHおよび塩濃度(例えば、塩化ナトリウム)の増加は、r h H N S 溶解度の増加をもたらした。r h H N S 天然状態を、変化する塩濃度(145 mMまたは300 mM)で製剤化したr h H N S の分析用超遠心法(AUC)により分析した。図8で分かるように、r h H N S は同種の分子を含み、pH 7で145 mM~300 mMの塩濃度で同じ構造を維持する。まとめると、これらの結果は、NaCl濃度の増加がr h H N S の溶解度を増加させることを示した。

【0230】

高塩液体製剤(15 mg / mL r h H N S、175 mM NaCl、5 mMリン酸塩、0.005%ポリソルベート20、pH 7.0)およびスクロース含有製剤(15 mg / mL r h H N S、2%スクロース、145 mM NaCl、5 mMリン酸塩、0.005%ポリソルベート20、pH 7.0)を含む2種の液体製剤を同定してさらに試験した。

実施例3：R H H N S のための凍結乾燥製剤

【0231】

この実施例の実験は、r h H N S のための凍結乾燥製剤および条件を最適化するよう設計した。特に、これらの試験は、凍結乾燥ケーキの外観、r h H N S 酵素活性および凍結乾燥製品の化学的完全性を含む、製品の安定性への製剤の影響についての情報を提供する。

【0232】

r h H N S を種々のリン酸塩ベースの凍結乾燥製剤に製剤化した。以下の製剤パラメータを試験した：(1) 安定化剤：グルコース(0.5~1%)もしくはスクロース(1~1.5%)；および界面活性剤：ポリソルベート20(0.02~0.005%)。試験した全製剤に以下のパラメータを使用した：(3) 15 mg / mL r h H N S；(4) 145 mM NaCl；(5) 5 mMリン酸塩；(6) pH 7.0。

【0233】

例示的製剤を表16の条件にしたがって凍結乾燥した。

10

20

30

40

【表16】

【表16】

例示的凍結乾燥サイクル

総凍結乾燥時間 - 4日間	
凍結 / アニーリング	
凍結	-20°Cまで 0.25°C/分
維持	-20°Cで 5 時間
凍結継続	0.25°C/分で -50°C
維持	-50 で 3 時間
一次乾燥	
勾配	-25°Cまで 0.5°C/分および 60 mTまで 真空
維持	50 時間 -25°C および 60 mT
二次乾燥	
勾配	20°Cまで 0.3°C/分および 150 mTまで N2圧力
維持	6 時間 20°C および 150 mT

【0234】

グルコース含有製剤は、化学安定性が維持されるが（データ不掲載）、長い再構成時間（30分超）を有することが認められた。

【0235】

1%スクロースを含む r h H N S 凍結乾燥製剤は、2~8 の 15ヶ月データおよび 25 / 40 の 3ヶ月データ（表17で以下に示す）を有し、SEC、RP および SDS-PAGE で 1%以下の変化を示した。

10

20

【表17】

【表17】

1%スクロース凍結乾燥製剤安定性

試験	凍結乾燥前	凍結乾燥後	5 ± 3°C		25 ± 2°C	40 ± 2°C
			3 M	15 M	3 M	0.5 M
ケーク外観	データ無し	白色、固体ケーク	白色、固体ケーク	白色、固体ケーク	白色、固体ケーク	白色、固体ケーク
水分含量	データ無し	0.5%	データ無し	データ無し	データ無し	データ無し
再構成時間	データ無し	60秒未満	60秒未満	60秒未満	60秒未満	60秒未満
再構成溶液の外観	乳白光、無色のw/o粒子	乳白光、無色のw/o粒子	乳白光、無色のw/o粒子	乳白光、無色のw/o粒子	乳白光、無色のw/o粒子	乳白光、無色のw/o粒子
pH	7.2	7.2	7.3	データ無し	7.2	7.2
タンパク質濃度(mg/mL)	14.8	14.8	データ無し	15.3	14.6	14.0
特異的活性(U/mg)	71	62	データ無し	78	85	78
SEC 主ピーク%	99.9%	99.8%	99.6%	99.5%	99.6%	99.5%
RP-HPLC 主ピーク%	99.0%	98.9%	98.4%	98.5%	98.7%	98.5%
SDS-PAGE	一致	一致	一致	低いバンドでわずかな増加(1%未満)	一致	一致

10

20

30

【0236】

1.5%スクロースを含むr h H N S凍結乾燥製剤は、2~8の14ヶ月データおよび25の3月ヶ月データ(表18で以下に示す)を有し、SEC、RPおよびSDS-PAGEで0.2%以下の変化を示した。

【表18】

【表18】

1. 5%スクロース凍結乾燥製剤安定性

試験	凍結乾燥 前	凍結乾燥 後	5 ± 3°C	25 ± 2°C	40 ± 2°C	
			3M	3M	1M	3M
ケーク外観	データ無し	白色、固体ケーク	白色、固体ケーク	白色、固体ケーク	白色、固体ケーク	白色、固体ケーク
水分含量	データ無し	0.5%	データ無し	データ無し	データ無し	データ無し
再構成時間	データ無し	60秒未満	60秒未満	60秒未満	60秒未満	60秒未満
再構成溶液の外観	乳白光、無色のw/o粒子	乳白光、無色のw/o粒子	乳白光、無色のw/o粒子	乳白光、無色のw/o粒子	乳白光、無色のw/o粒子	乳白光、無色のw/o粒子
pH	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9
タンパク質濃度(mg/mL)	16.1	14.2	15.7	15.4	16.6	15.4
特異的活性(U/mg)	176	210	149	122	169	139
SEC 主要ピーク%	99.9%	99.8%	99.8%	99.6%	99.6%	99.0%
RP-HPLC 主要ピーク%	99.2%	99.0%	98.8%	98.5%	98.0%	97.7%
SDS-PAGE	一致	一致	一致	低いバンドでわずかな増加(1%未満)	一致	低いバンドでわずかな増加(約1%)

【0237】

ケーク外観および完全性(例えば、メルトバック)について凍結乾燥ケークを観察した。図9Aで分かるように、1.5%スクロースと共に製剤化した凍結乾燥ケークは、1.0%スクロースと共に製剤化したものよりもケーク収縮が大きかった。1.5%スクロースと共に製剤化した凍結乾燥ケークはまた、VirTis装置対Lyostar装置などの異なる凍結乾燥装置により敏感であった(図9B)。

【0238】

以下の表19に示すように、別の一連の実験により、スクロースの増加がケーク収縮の増大を生じさせることが確認される。

10

20

30

40

【表19】

【表19】

種々のスクロースでのrhHNS安定性およびケーク外観の比較

試験	ベースラインからの変化			5 10 20 30
	1% スクロース	1.25% スクロース	1.5% スクロース	
長期(5C)	22M	6M	21M	5
SEC	12M	0.1%	M	
RP	0.4%	0.5%	0.1%	0%
SDS-PAGE	0.2% 0.5% 0.5% 1%未満 1%未満	1%未満 0.5% 0% 0%	0.3% 0% 0%	10
加速(25C)	20M	6M	21M	
SEC	12M	0.1%	12M	
RP	0.5%	0.5%	0.1%	
SDS-PAGE	0.2% 1.5% 0.5% 1%未満 1%	1% 0.5% 0% 0% 0%	0% 0% 0% 0% 0%	20
ストレスデータ(40C)	0.5M 3M	1M 0.1%	1M M	1
SEC	0.5%	0.4%	0.1%	
RP	1%		1% 0.2%	
SDS-PAGE	0.5% 1.5% 1%未満 1%超	0.5% 0.2% 1%未満 0%	0.5% 0.2% 0% 0%	
ケーク外観	わずかな収縮	いくらかの収縮	より大きな収縮	

【0239】

まとめると、これらのデータは、rhHNS凍結乾燥製剤中のスクロース濃度の増加が、安定性増大ならびに凍結乾燥ケーク収縮増大と相関したことを示している。

【0240】

再構成した凍結乾燥製剤を、Micro-Flow Imaging (MFI) により粒子の存在について観察した。例示的粒子画像を図10に示す。図10で分かるように、貯蔵後、1%および1.5%スクロースのいずれかを含む凍結乾燥製剤の再構成後に大きな粒子が観察された。

【0241】

凍結乾燥前製剤を、0.22μm濾過後の粒子の存在について観察した。図11で分かるように、ポリソルベート20 (P20) の存在が、0.22μm濾過時にP20がない場合に産生されるタンパク質様凝集剤を妨げた。したがって、P20は、濾過中に粒子形成を妨げるおよび/またはrhHNSタンパク質を保護するのに有効である。さらなる試験は、P20の存在が、rhHNS製剤中の凍結融解誘発粒子ならびに凍結乾燥誘発粒子の存在を減少させるのに有効であることを示した（データ不掲載）。

凍結乾燥条件

【0242】

凍結乾燥サイクル条件を試験して、rhHNS凍結乾燥製剤への影響を決定した。例えば、一次乾燥温度を-38から-20まで変化させ、酵素活性、SEC、RPおよび

ケーク外観により r h H N S 凍結乾燥製剤の安定性を決定した。これらの分析の例示的結果を以下の表 20 に示す。

【表 20】

【表20】

表20. 1. 5%スクロース凍結乾燥製剤への一次乾燥の影響

試験	(-38°C)			(-30°C)		(-25°C)		(-23°C)		(-20°C)	
	凍結乾燥前	凍結乾燥後	40°C	凍結乾燥後	40°C	凍結乾燥後	40°C	凍結乾燥後	40°C	凍結乾燥後	40°C
			0.5M		1M		0.5M		0.5M		0.5M
活性	246	285	236	227	125	141	124	160	128	249	157
SEC	99.8	99.8	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.6	99.8
RP	98.8	98.8	98.5	98.8	NT	99.2	NT	99.1	98.8	98.9	99.0
2-10 μm	データ無し	2958	1395	7593	4013	1550	3188	869	942	1235	4650
ケーク収縮	データ無し	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

【0243】

分かるように、 -38 ~ -20 の一次乾燥温度の範囲内で安定性プロファイルの有意な差異は観察されなかった。凍結乾燥ケーク外観は、 -20 の一次乾燥温度でケーク収縮増大を示した。同様の結果が、 1.25 % および 1.0 % スクロースを含む凍結乾燥製剤でも観察された（データ不掲載）。

実施例 4 . ヘパラン N - スルファターゼの慢性髄腔内投与

【0244】

本実施例は、ムコ多糖症 II IA (MPS II IA ; サンフィリッポ症候群) 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 (r h H N S) 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、 r h H N S の慢性 I T 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。

【0245】

簡潔に述べれば、ムコ多糖症 II IA (MPS II IA ; サンフィリッポ症候群) 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 (r h H N S) の髄腔内 (I T) 製剤を開発した。MPS II IA 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 r h H N S に関するピボタルな毒性学試験を幼若力ニクイザルにおいて行った。サルに髄腔内 (I T) 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 8.3 mg / 投与の r h H N S を 6 か月間 ; 12 用量)、装置対照および溶媒対照には、そ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 I T 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 r h H N S 用量群の 8 個体を最後の I T 投与の 1 か月後に剖検した。r h H N S 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關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变化を伴わなかった。脳、脊髄および肝臓において、平均 CSF 中 r h H N S レベルおよび組織中 r h H N S 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 8.3 mg / 投与であったが、このことは、r h H N S が 8.3 mg / 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。

【0246】

サンフィリップA疾患

ムコ多糖症III型(MPS IIIA; サンフィリップA疾患)は、世界の約100,000に1人が罹患する稀なリ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)のリソーム異化作用に関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 E F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。

【0247】

r h HNS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r h HNSに関するピボタルな毒性学試験を幼若力ニクイザル(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 R D, Developmental and Reproductive Toxicology: A practical approach(2006) p. 276)。この取組みの一部として、r h HNSのIT腰椎投与を評価するために、幼若力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か月齢幼若力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。今までに知られているデータに基づいて、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。

【0248】

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匹の雌幼若力ニクイザル(Macaca fascicularis)を用いた。サルにPMI-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。

【0249】

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。手術前にコハク酸ブ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HC1; 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(L₄、L₅またはL₆)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、L₃、L₄またはL₅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 Diagnostic 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。

10

20

30

40

50

【0250】

本試験では、r h H N S を 5 mM リン酸ナトリウム、145 mM 塩化ナトリウムおよび 0.005% ポリソルベート 20 を含む I T 製剤溶媒 (pH 7.0) に溶かして調製した。r h H N S の E O W 投与を、約 11 分間にわたる短時間注入、すなわち、6 mL (4 分)、次いで 0.5 mL リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) による洗い流し (7 分) で行った。溶媒対照群の個体には、I T 製剤のみを投与し、D C 個体には P B S (pH 7.2) を I T で投与した。

【0251】

病的状態および死亡

r h H N S 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、r h H N S 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、搔痒、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 r h H N S 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れた。投与時および投与直後に観察された臨床兆候は、対照群 (D C 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。r h H N S 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 E C G もしくは眼科検査における変化は見られなかった。

【0252】

臨床病理学

どのインターバル期間においても、r h H N S 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の変化は見られなかった。

【0253】

C S F の細胞計数および化学

投与の 24 時間後に、D C および 0 mg / 投与群を含めた全群の平均 C S F 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 C S F 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、4.5 mg / 投与および 8.3 mg / 投与群の r h H N S 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 C S 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 (D C および 0 mg / 投与群に対して $P < 0.05$) が、雌の r h H N S 投与群ではそれほど明らかな傾向が見られなかった。

【0254】

r h H N S 濃度および抗体解析

一般的に、血清中の平均 r h H N S レベルは、全群の全時点において検出限界 (L O D) 未満であった。D C 対照および溶媒投与対照群の個体の C S F 中 r h H N S 濃度は、一般的に定量下限 (L O Q) を下回っていた。統計解析は行わなかったが、C S F 中の平均 r h H N S レベルが 1.5、4.5 および 8.3 mg / 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 C S F の平均 r h H N S レベルは、投与後の C S F 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 H N S 濃度を表 2-1 にまとめる。所与の用量レベルにおいて、血清および C S F 中の抗 H N S 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、C S F 中の r h H N S の平均濃度は同じ範囲に維持されるようであった (図 1-2 A)。

10

20

30

40

【表21】

【表21】

試験終了時(主要剖検および回復後剖検)のCSF中rhHNS濃度

群	主要剖検		回復後剖検	
	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ースルファターゼ; 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。

20

【0255】

6か月/回復コホートでは、試験したどの時点でも、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。

【0256】

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、剖検を含めたどの時点でも試料が採取されなかっため、これらの結果は、rhHNS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。

30

【0257】

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rhHNS投与群間でレベルが同等になった(図12B)。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。

40

【0258】

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12B)、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22)。

【表22】

【表22】

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ースルファターゼ; 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。

【0259】

20

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12C)。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。

【0260】

CSF中に抗HNS抗体が存在しても、CSF中のrhHNS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rhHNS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rhHNS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12C)。

【0261】

30

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13)が見られた(図13A~13E)。浸潤は、髄膜/神経周膜の浸潤および/または組織実質内のrhHNSの存在(透過)に続発するものであるように見えた。炎症型の変化が多数見られたが、カニクイザルはrhHNSの投与に対して忍容性があると思われ、どの浸潤も神経系実質の有害な形態学的变化に関連する、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、rhHNS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。

【0262】

40

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つたが、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13F)。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、rhHNS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つた。

【0263】

50

全用量レベルにおいて、雌雄に関係なく、ほとんどの r h H N S 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 r h H N S の存在（透過）により生じたものであるよう見えた。回復後に屠殺した個体では、r h H N S に関する影響は、一般に見られなかつたか、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。r h H N S に関する変化は、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つた。

【 0 2 6 4 】

脊髄中の神経線維変性および神経膠症は、I T カテールの配置および / または存在に続発性であるように見えた。これらの変化は、対照と r h H N S 投与群との間で比較的類似であった。脊髄神経根、シュワン細胞（末梢神経系のミエリン形成細胞）過形成および神経線維変性は、対照および r h H N S 投与サルの両方で存在した。これらの変化は、カテーテル配置時の 1 つまたは複数の脊髄神経根への損傷が原因であった。

10

【 0 2 6 5 】

H N S 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 r h H N S 酵素活性（0 . 0 ~ 0 . 1 5 4 n m o l / 時・タンパク質m g）は、3 か月中間コホートの組織で見られたレベル（0 . 0 ~ 0 . 0 1 5 4 n m o l / 時・タンパク質m g）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 衍分高かった）、4 . 5 m g および 8 . 3 m g / 投与群が同等のレベルであった。脊髄スライスの r h H N S 酵素活性は、1 . 5、4 . 5 および 8 . 3 m g / 投与群において、雄（図 14 A）でそれぞれ 3 . 9 ~ 1 8 . 6、1 3 . 1 ~ 6 7 . 1 および 3 . 6 ~ 6 9 . 2 n m o l / 時・タンパク質m g、雌（図 14 B）でそれぞれ 1 . 8 ~ 1 6 . 2、4 . 5 ~ 6 1 . 2 および 2 1 . 1 ~ 6 6 . 0 n m o l / 時・タンパク質m g 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。

20

【 0 2 6 6 】

脳スライスでの r h H N S 酵素活性は、1 . 5、4 . 5 および 8 . 3 m g / 投与群において、雄（図 14 C）でそれぞれ 0 . 0 3 ~ 1 6 . 0、0 . 3 0 ~ 5 5 . 7 および 0 . 1 5 ~ 2 1 . 2 n m o l / 時・タンパク質m g、雌（図 14 D）でそれぞれ 0 . 0 4 ~ 5 . 1、0 . 0 ~ 1 4 . 4 および 0 . 9 ~ 3 3 . 2 n m o l / 時・タンパク質m g 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。

30

【 0 2 6 7 】

内因性のレベル（D C 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 15 A 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 I T 投与した r h H N S が脳室周囲領域まで透過することが示された。

【 0 2 6 8 】

6 か月 / 回復コホートでは、1 . 5、4 . 5 および 8 . 3 m g / 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 . 5 0、2 . 4 1 および 6 . 6 5 n m o l / 時・タンパク質m g、雌でそれぞれ 1 . 0 4、4 . 1 5 および 7 . 6 2 n m o l / 時・タンパク質m g であった（図 15 B）。溶媒対照個体のレベルは、雄で 0 . 0 8 9 n m o l / 時・タンパク質m g、雌で 0 . 0 8 3 n m o l / 時・タンパク質m g であった。回復期間後、肝臓における r h H N S 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。

40

【 0 2 6 9 】

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 I T 注射による C N S への r h H N S 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 / モ膜組織ま

50

で送達された。r h H N SでI T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はらつきながら存在していた。溶媒投与対照の個体（図16 A）では染色が見られなかったことにより、ヒトH N S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I TによるC N Sへのr h H N S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16 B～16 D）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髓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。r h H N Sを投与した全個体の肝臓において（肝細胞ではなく、K u p f f e r 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 . 5 m g / 投与群）では、免疫反応性が明らかではなかった。

【0270】

1 . 5 m g / 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 . 3 m g / 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r h H N Sレベルが、溶媒投与対照で見られたレベルに近かった。

議論

【0271】

本試験では、I Tで行った6か月間のr h H N SのE O W送達では、一般に高い容忍性が認められた。体重、臨床状態、眼科検査／神経学検査／身体検査、E C G、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つた。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つた、C S F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r h H N Sの広範な分布が観察された。

【0272】

r h H N SのE O WでのI T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B B Bの不完全な開口により、白血球および血漿タンパク質がC S F内に侵入したことによるものであろう（S imard J Mら, Lancet Neurol. (2007) 6, 258 - 268; Stamatovic S M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する要素、もう1つはタンパク質のI T投与に関する要素の結果であり得る。

【0273】

B B B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つた。

【0274】

平均C S F中r h H N S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C S F中の抗H N S抗体レベルの増加にもかかわらず、C S F中のr h H N Sの平均濃度は同じ範囲で維持されるようであつた。

【0275】

r h H N S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。この顕微鏡的变化は溶媒投与対照でも認められ、一部の反応がI T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C N Sに浸透する生物製剤／タンパク質をI T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（H o v l a n d D Nら, Toxicol. Pathol. (2007) 35, 1013 - 1029；B

10

20

30

40

50

utt 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つた。rhHNS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变化を伴わぬようであつた。脳、脊髄または神経節のニューロン壞死は認められなかつた。

【0276】

神経線維変性、カテーテル管線維症および脊髄の圧縮を含む、いくつかのサルにおける薬剤送達装置に関連した脊髄の後脊髄路の変化があつた。これらの変化のいずれも、ITカテーテルの近くに生じたという点でrhHNSに関連するとみなされなかつた。IT腰椎薬剤送達装置は、ヒトより小さいIT空間を有する幼若サルでのIT埋め込み用に特別に設計されなかつた。IT試験における対照（装置および／または生理食塩水投与）動物からの顕微鏡評価データのレトロスペクティブ分析は、いくらかの最小限の髓膜浸潤、ならびにカテーテル管関連炎症、線維症および神経膠症、ならびに脊髄神經線維変性が見られると結論づけた（Butt MT, Toxicol. Pathol. (2011) 39, 213 ~ 219）。

【0277】

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 R Pら, Regul. Toxicol. Pharmacol. (2009) 54, 164 - 182）。本試験では、3か月間コホートおよび6か月コホートの脳および脊髄において、用量依存的および定量的に同様のレベルのrhHNS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rhHNS平均濃度が同じ範囲に維持されるようであったが、本発明者らは、中和活性が見られないと結論づけた。

【0278】

脊髄、脳および肝臓において、rhHNS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つた。6か月コホートの脳および脊髄組織では、3か月間コホートに比べて、rhHNS蓄積の証拠が認められなかつた。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rhHNSは深部の脳室周囲領域まで浸透した。肝臓でのrhHNS酵素活性は、rhHNS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および解剖病理パラメータの評価により、rhHNSに関連する有害作用は観察されなかつた。

【0279】

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髓膜、ならびに髓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／髓質のような深部構造では、免疫反応性は明らかではなかつたが、酵素活性の結果は、腰椎IT投与したrhHNSが深部の脳室周囲領域に浸透したことを見出している。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つた。

【0280】

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、臨床病理および解剖病理、CSFおよび血清中のrhHNSおよび抗HNS抗体の濃度ならびにrhHNSの分布／細胞

10

20

30

40

50

内局在を含めた r h H N S に関する変化が、3か月間屠殺および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、r h H N S の影響が見られなかつたか、または有意に減少していた。したがつて、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 . 3 m g / 投与であった。

【 0 2 8 1 】

C S F 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变化の信頼できる関連要素であると考えられ、r h H N S により I T で治療した患者において有用であり得る。これらの变化は、I T 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 I T 治療法を追求するための確信を与えるものである。この幼若非ヒト靈長類での毒性学試験は、I T 腰椎薬物送達装置により r h H N S 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 C N S 病理および有害な臨床兆候が見られなかつたことは、最近の試験医薬品の書類承認を支持し、また、I T 投与した r h H N S がサンフィリップ A 症候群の C N S 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つた。10

【 0 2 8 2 】

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。

【 0 2 8 3 】

試験計画および r h H N S 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 [D C] ）、ポートおよびカテーテル）、溶媒も被検試料も投与しなかつた。群 2 ~ 5 には、0 、 2 . 5 、 7 . 5 または 13 . 8 m g / m l の r h H N S を 0 . 6 m L (すなわち、0 、 1 . 5 、 4 . 5 または 8 . 3 m g の総用量) を、E O W で I T 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 D C 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 / 群の剖検を行つた。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。20

【 0 2 8 4 】

r h H N S を 5 m M リン酸ナトリウム、145 m M 塩化ナトリウムおよび 0 . 0 0 5 % ポリソルベート 20 (p H 7 . 0) からなる I T 製剤溶媒に溶かして準備した。r h H N S の隔週投与を、約 11 分間にわたる短時間注入、すなわち、6 m L (4 分) 、次いで 0 . 5 m L リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) による洗い流し (7 分) で行つた。溶媒対照群の個体には、I T 製剤のみを投与し、D C 個体には P B S (p H 7 . 2) を I T で投与した。30

【 0 2 8 5 】

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) を行つた。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 (足感覺反射、膝蓋腱反射、皮膚反射、固有感覺反射および尾部反射) も評価した。最初の r h H N S 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 (E C G ; リード I 、 I I および I I I) および眼科検査を行つた。サルをケタミン H C 1 (I M 、 8 m g / k g) 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つた。40

【 0 2 8 6 】

臨床病理学

血液試料を、試験開始前、I T 投与 1 、 3 、 5 、 7 、 9 および 11 の後、回復期中間お50

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。

10

【0287】

r h H N S 解析

r h H N S 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。r h H N S 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H N S IgG、検出抗体は同じウサギ抗H N S 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。

20

【0288】

抗H N S 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H N S 抗体の検出に用いた。このアッセイは、任意の種の抗H N S 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。

30

【0289】

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HC1 (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、r h H N S 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。

40

【0290】

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r h H N S 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

50

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 r h H N S 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 5 g の肝臓の重複試料を 2 つの別々の葉から採取して r h H N S 解析用に凍結させ、約 5 g の追加の試料を免疫組織化学解析用に固定した。

【 0 2 9 1 】

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。

【 0 2 9 2 】

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 - J a d e B（神経変性の評価の感度を増強する染色）および B i e l s c h o w s k y 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 - J a d e 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。

【 0 2 9 3 】

脊髄を連続的に薄切り、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 S p u r r 樹脂に包埋し、薄切して（2 μm）、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 B i e l s c h o w s k y 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。

【 0 2 9 4 】

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 4 mm 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； V d e e p ）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。

【 0 2 9 5 】

10 mM Tris、5 mM エチレンジアミン四酢酸、0.1% Igepal に A l p h a C o m p l e t e 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（1 ml / 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

10

20

30

40

50

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 - - 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 rhHNS 活性を決定した。

【0296】

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 3 mm 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、rhHNS 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; Main Biotech, Portland, ME) を用いて、IT 投与した rhHNS の細胞内への取込みを検出し、この試薬により、内因性のカニケイザル rhHNS 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。二次ヤギ抗マウスピ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トリカルミンで対比染色した。

【0297】

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 Dunnnett 検定による装置対照および溶媒対照群と各 rhHNS 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。

【0298】

実施例 5 : 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 rhHNS の静脈内または髄腔内単回投与 (1 mg / kg または 10 mg / kg) 後の rhHNS 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 rhHNS 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 (1 mg / kg または 10 mg / kg) で投与したときの rhHNS 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 rhHNS の薬物動態特性を決定することであった。

【0299】

ラットにおける 1 mg / kg または 10 mg / kg の ¹⁻²⁻⁴I-HNS 静脈内 (IV) または髄腔内 (IT) 単回投与後の ¹⁻²⁻⁴I-スルファミダーゼ (rhHNS) 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 - 時間のデータを得た。

【0300】

4 つの各群 (1 mg / kg IV, 1 mg / kg IT, 10 mg / kg IV および 10 mg / 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

10

20

30

40

50

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(ug/g)を、対応する%IDまたは%ID/gのデータから計算した。

【0301】

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rHNSの総量が0.002/分～0.011/分(z)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(z: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-infinite)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。

10

【0302】

IT投与後、肝臓のrHNSタンパク質は、1mg/kgのrHNSでは96時間後まで、10mg/kgのrHNS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z)であり、10mg/kgにおける消失(z: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。

20

【0303】

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 4.7 ± 1.0 時間および 3.8 ± 1.3 時間、腎臓が 5.4 ± 2.5 時間および 2.9 ± 1.6 時間、心臓が 3.6 ± 1.5 時間および 4.2 ± 1.9 時間、皮膚が 4.0 ± 2.1 時間および 3.1 ± 1.3 時間であったのに対し、脳における半減期は 7.1 ± 2.3 時間および 6.0 ± 5.3 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 $9.6 \mu\text{g/g}$ 、 $0.30 \mu\text{g/g}$ 、 $0.25 \mu\text{g/g}$ 、 $0.22 \mu\text{g/g}$ および $0.08 \mu\text{g/g}$ 、10mg/kgでは $13.2 \mu\text{g/g}$ 、 $7.9 \mu\text{g/g}$ 、 $3.9 \mu\text{g/g}$ 、 $3.7 \mu\text{g/g}$ および $1.8 \mu\text{g/g}$ 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 $5.25 \text{時間} \cdot \mu\text{g/g}$ 、 $1.6 \text{時間} \cdot \mu\text{g/g}$ 、 $1.4 \text{時間} \cdot \mu\text{g/g}$ 、 $9 \text{時間} \cdot \mu\text{g/g}$ および $7 \text{時間} \cdot \mu\text{g/g}$ であり、10mg/kgでは $67.47 \text{時間} \cdot \mu\text{g/g}$ 、 $27.6 \text{時間} \cdot \mu\text{g/g}$ 、 $18.3 \text{時間} \cdot \mu\text{g/g}$ 、 $20.1 \text{時間} \cdot \mu\text{g/g}$ および $8.6 \text{時間} \cdot \mu\text{g/g}$ 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)。

30

【0304】

同じ用量のrHNSを注射した場合、髄腔内投与では静脈内投与よりも310g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rHNS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。

40

【0305】

実験計画

50

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、サンフィリップ（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。

【0306】

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变化がわかる。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。10

【0307】

材料および方法

被検試料

rHNS濃度が20mg/mlのヘパリンN-スルファターゼ（rHNS）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。rHNSをヨウ素124で標識した。20

【0308】

試料入手源

放射活性画像を、¹²⁴I-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。

【0309】

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。30

【0310】

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。40

【0311】

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（50

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。

【0312】

全データを¹²⁴I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¹²⁴I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。

【0313】

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、rhHNS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パラメータの平均および標準偏差を計算した。Studentのt検定を行って、z、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。

【0314】

結果

下の表、図およびPK解析中のrhHNS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。

【0315】

1mg/kgおよび10mg/kgの用量での¹²⁴I-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17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18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19および図20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21~図23に示した。図24は、肝臓中のrhHNS濃度(μg/g)の変化を、1mg/kgおよび10mg/kgでの¹²⁴I-HNSのIT投与後の時間とともに示したものである。

【0316】

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(WinnNonlin 5.2、Pharsight、Mountain View、CA)により解析した。一定の消失速度(z)、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パラメータを、各個体のデータから推定した。

【0317】

クリアランス速度および分布容積を推定したが(付属書類3参照)、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rhHNS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。z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。

【0318】

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パラメータを下の表23にまとめる。

10

20

30

40

50

【表23】

【表23】

1および10mg/kgの¹²⁴I-HNSのITおよびIV投与後の種々の組織における非コンパートメント

PKパラメータの概要(群平均±SD)

1 mg/kg IT パラメータ	脳(ug/g)*		肝臓		脳(ug)*		頭部(ug)*		近位		中位		遠位	
	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	-

10

1 mg/kg IV	脳(ug/g)*		肝臓		腎臓		心臓		皮膚	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
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

30

【0319】

投与後の最初の20分間に、頭部領域のrhHNSの総量(ug)が、1mg/kgでは1分当たり0.002~0.011(z、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17)。

40

【0320】

脳の濃度-時間曲線(ug/g、0.05~192時間)は、二相性のプロファイルを示した(図18)。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4.5±7および4.9±4時間)。ピーク濃度の値(257±90および2628±265μg/g)およびAUC_{last}(1mg/kgおよび10mg/kgにおいてそれぞれ8393±2457および89460±12098)においてそれぞれ8393±2457および89460±12098

50

10083時)は、用量を 1 mg/kg から 10 mg/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 $1\sim10\text{ mg/kg}$ 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(T_{max})に現れた。

【0321】

脳および頭部領域の総量-時間曲線(μg 、 $0.05\sim192\text{ 時間}$)は、脳の濃度-時間曲線($\mu\text{g/g}$)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19および図20)。脳領域の C_{max} の値は、頭部領域の値よりも有意に低かった(それぞれ、 1 mg/kg では 6.9 ± 8 と 200 ± 0 、 $p<0.01$; 10 mg/kg では 83.6 ± 11.7 と $184.4\pm31.4\text{ ug}$ 、 $p<0.01$)。一定の消失速度は、 1 mg/kg および 10 mg/kg においてそれぞれ、脳では $0.017\pm0.002/\text{時}$ と $0.014\pm0.001/\text{時}$ であった。頭部領域では $0.016\pm0.002/\text{時}$ と $0.010\pm0.001/\text{時}$ であった。平均残留時間の値は、 1 mg/kg および 10 mg/kg においてそれぞれ、脳では $4.2\pm5\text{ 時間}$ と $5.1\pm5\text{ 時間}$ ($p=0.048$)、頭部では $4.5\pm7\text{ 時間}$ と $7.0\pm9\text{ 時間}$ ($p<0.01$)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。 $r\text{hHNS}$ の 1 mg/kg および 10 mg/kg でのIT投与後のこれらの領域における平均半減期は、 $4.2\sim7.0\text{ 時間}$ の範囲であった。

【0322】

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($\mu\text{g/脊柱mm}$)が、近位部分では30分前後($0\sim1\text{ 時間}$)、中位部分では $1\sim4\text{ 時間}$ (24 時間 である1匹のラットを除く)、遠位部分では $1\sim8\text{ 時間}$ 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 $t_{1/2}: 1\text{ mg/kg}$ および 10 mg/kg においてそれぞれ、脊椎の近位部分では $3.2\pm1.3\text{ 時間}$ と $4.5\pm1.8\text{ 時間}$ 、中位部分では $3.9\pm1.6\text{ 時間}$ と約 5.0 時間 、遠位部分では $3.0\pm1.2\text{ 時間}$ と約 1.23 時間)。 1 mg/kg および 10 mg/kg の $^{124}\text{I-HNS}$ 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 $0.5\text{ }\mu\text{g/mm}$ と $6.0\text{ }\mu\text{g/mm}$ 、 $0.2\text{ }\mu\text{g/mm}$ と $0.9\text{ }\mu\text{g/mm}$ 、 $0.1\text{ }\mu\text{g/mm}$ と $0.5\text{ }\mu\text{g/mm}$)。AUC_{last}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 $9.5\text{ 時間}\cdot\mu\text{g/mm}$ と $8.3\text{ 時間}\cdot\mu\text{g/mm}$ 、 $6.8\text{ 時間}\cdot\mu\text{g/mm}$ と $3.5\text{ 時間}\cdot\mu\text{g/mm}$ 、 $2\text{ 時間}\cdot\mu\text{g/mm}$ と $3.8\text{ 時間}\cdot\mu\text{g/mm}$)。

【0323】

ほとんどの末梢器官では $r\text{hHNS}$ 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、 1 mg/kg では 9.6 時間 後(4個体のうち3個体)まで、 10 mg/kg では 19.2 時間 後(全4個体)まで測定可能であった(図24)。肝臓での濃度は、 1 mg/kg のIT投与の2時間後、 10 mg/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 1 mg/kg ($z: 0.030\pm0.011/\text{時}$)の方が 10 mg/kg ($z: 0.017\pm0/\text{時}$)よりも速く($p=0.10$)、これは 1 mg/kg の方が $t_{1/2}$ が短い(1 mg/kg および 10 mg/kg の用量で、それぞれ $2.8\pm1.6\text{ 時間}$ と $4.2\pm1\text{ 時間}$ 、 $p=0.76$)ことに対応していた。 1 mg/kg のAUC_{last}値は、 10 mg/kg の値と比べて約40倍減少していた(それぞれ $204\pm50\text{ }\mu\text{g/g}$ と $7987\pm3276\text{ }\mu\text{g/g}$)。

【0324】

1 mg/kg および 10 mg/kg の用量での $^{124}\text{I-HNS}$ 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、それぞれ図25~図29に示されるように、 1 mg/kg および 10 mg/kg での $r\text{hHNS}$ 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。

【0325】

肝臓、腎臓、心臓および皮膚における消失半減期は、 1 mg/kg および 10 mg/kg においてそれぞれ、肝臓では 4.7 ± 1.0 時間と 3.8 ± 1.3 時間、腎臓では 5.4 ± 2.5 時間と 2.9 ± 1.6 時間、心臓では 3.6 ± 1.5 時間と 4.2 ± 1.9 時間、皮膚では 4.0 ± 2.1 時間と 3.1 ± 1.3 時間であったのに対し、脳での半減期は、 1 mg/kg および 10 mg/kg において、それぞれ 7.1 ± 2.3 時間と 6.0 ± 5.3 時間であった(10 mg/kg 群のラット3は、 $t_{1/2}$ 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、 1 mg/kg の半減期と 10 mg/kg の半減期との間に統計的な差は見られなかった。

【0326】

肝臓、皮膚、腎臓、心臓および脳の C_{max} の平均値は、 1 mg/kg では $9.6\text{ }\mu\text{g/g}$ 、 $0.3\text{ }\mu\text{g/g}$ 、 $0.25\text{ }\mu\text{g/g}$ 、 $0.22\text{ }\mu\text{g/g}$ および $0.08\text{ }\mu\text{g/g}$ 、 10 mg/kg では $13.2\text{ }\mu\text{g/g}$ 、 $7.9\text{ }\mu\text{g/g}$ 、 $3.9\text{ }\mu\text{g/g}$ 、 $3.7\text{ }\mu\text{g/g}$ および $1.8\text{ }\mu\text{g/g}$ であった。上記器官における 10 mg/kg での C_{max} 値の 1 mg/kg での対応する値に対する比は、 1.4 、 2.6 、 1.6 、 1.7 および 2.3 であった。各個体の C_{max} 値を用量に対して正規化すると、上記の全器官において、 10 mg/kg における $C_{max}/\text{投与}$ の値は、 1 mg/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 AUC_{last} の値は、 1 mg/kg では $5.25\text{ 時間}\cdot\mu\text{g/g}$ 、 $1.6\text{ 時間}\cdot\mu\text{g/g}$ 、 $1.4\text{ 時間}\cdot\mu\text{g/g}$ 、 $9.3\text{ 時間}\cdot\mu\text{g/g}$ および $7\text{ 時間}\cdot\mu\text{g/g}$ ； 10 mg/kg では $6.747\text{ 時間}\cdot\mu\text{g/g}$ 、 $2.76\text{ 時間}\cdot\mu\text{g/g}$ 、 $1.83\text{ 時間}\cdot\mu\text{g/g}$ 、 $2.01\text{ 時間}\cdot\mu\text{g/g}$ および $8.6\text{ 時間}\cdot\mu\text{g/g}$ であった。上記器官における 10 mg/kg での AUC_{last} の 1 mg/kg での対応する AUC_{last} 値に対する比はそれぞれ、 1.3 、 1.7 、 1.3 、 2.2 および 1.2 であった。正規化すると、皮膚では 10 mg/kg における $AUC_{last}/\text{投与}$ が 1 mg/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)。

【0327】

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($10/1\text{ mg/kg}$)、全試験器官の 10 mg/kg での C_{max} 値が 1 mg/kg での値よりも10倍増加した。

【0328】

脳では、IV投与の1~24時間後(T_{max})にピーク濃度に達した。

【0329】

IV処置とIT処置の比較

1 mg/kg および 10 mg/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、それぞれ図30および図31で比較する。脳におけるIT/IVの C_{max} の比は、 1 mg/kg および 10 mg/kg において、それぞれ 3.212 および 1.501 であった。 AUC_{0-192} 時間のこの比は 1.136 および 0.978 であった。これらの観察は、同じ用量のrHHS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 3.10 倍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(1 mg/kg および 10 mg/kg で4.5時間および4.9時間)、IV投与では3日(1 mg/kg および 10 mg/kg で7.1

10

20

30

40

50

時間および 60 時間) であった。

【0330】

しかし、IT 投与後の肝臓における曝露量は、同じ用量の rhHNS で IV 投与後の曝露量と同等であった。肝臓における 1 mg / kg および 10 mg / 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。

【0331】

結論

^{1 2 4} I - スルファミダーゼ (rhHNS) の薬物動態および生体内分布プロファイルを、1 mg / kg または 10 mg / kg の ^{1 2 4} 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 rhHNS の総量が、最初の 20 分間に 0.005 / 分 ~ 0.007 / 分 (平均 z) 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 (z : 1 mg / kg および 10 mg / 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。

【0332】

上記 IT 単回投与レジメンで投与された 1 ~ 10 mg / 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 指示が示された。

【0333】

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。

【0334】

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 指示も示された。

【0335】

IT 投与後、肝臓においては、rhHNS タンパク質が 1 mg / kg では非常に早期から 96 時間後にかけて、10 mg / 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 1 mg / kg (z : 0.030 / 時) の方が 10 mg / kg (z : 0.017 / 時) よりも速く、これは低用量の方が t_{1/2} が短いことに対応していた (1 mg / kg および 10 mg / kg の用量でそれぞれ 28 ± 16 時間および 42 ± 1 時間)。

【0336】

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、1 mg / kg および 10 mg / 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、1 mg / kg および 10 mg / 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、1 mg / kg では 9.6 μg / g、0.3 μg / g、0.25 μg / g、0.22 μg / g および 0.08 μg / g、10 mg / kg では 13.2 μg / g、7.9 μg / g、3.9 μg / g、3.7 μg / g および 1.8 μg / 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、10 mg / kg における Cmax / 投与の値は、1 mg / 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、1 mg / 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；10 mg / 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 10 mg / kg における AUClast / 投与が 1 mg / kg での値よりも有

10

20

30

40

50

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)。

【0337】

実施例 6 : R H H N S によるサンフィリッポ A (S A N A) 患者の処置

例えば I T 送達による、C N S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 (E O W) 、全 40 週で、髄腔内薬物送達装置 (I D D D) により投与する、3 用量レベルまでの r h H N S 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 32 ~ 35 に図示する。

【0338】

特定の一例では、最大 16 患者まで登録する。

コホート 1 : 4 患者 (最低用量 - 10 mg)

コホート 2 : 4 患者 (中間用量 - 30 mg)

コホート 3 : 4 患者 (最高用量 - 100 mg)

無作為に 4 患者を無治療または装置の使用とする。

10

【0339】

サンフィリッポ症候群 A 型患者は、一般的に、初期発達里程碑（例えば、歩行、言語、トイレトレーニング）の遅れ、知能欠陥、多動性障害、聴力損失、言語発達障害、運動技能の欠乏、多動性障害、攻撃性および/または睡眠障害などを含む認知および神経発達障害を示す。徴候の全ては治験の基準の一部となり得る。以下の基準の包含に基づく試験のために患者を選択する：(1) 3 ~ 18 歳；(2) 77 未満の知能指数または過去 3 年間ににおける I Q 15 ~ 30 の低下；(3) C S F 閉鎖または十分制御できない発作性疾患がない、ならびに(4) 麻酔および/または手術危険度を示す共存症がない。

20

【0340】

遅発乳児型サンフィリッポ症候群 A 型の子供に 6 ヶ月間 I T 注射により投与した r h H N S の上昇用量の安全性を決定する。患者の安全性の十分な評価を提供するには、登録および段階的拡大は非常に遅いだろう。さらに、全体の運動機能に対する r h H N S の臨床的活性、ならびに血清中の単一および反復投与薬物動態、ならびに脳脊髄液 (C S F) 中の濃度を評価する。

30

【0341】

本試験の目的は、r h H N S の上昇用量の安全性および耐容性、ならびに I D D D の安全性、耐容性および長期開存性を評価することであるだろう。さらに、C S F および血液中の単一および反復 I T 投与後の r h H N S の濃度、ならびに C F バイオマーカーおよび尿中 G A G への r h H N S の影響がある。さらなる評価には、生理学および神経認知評価、神経機能ならびに脳構造容積などの臨床的パラメータへの r h H N S の影響も含まれるだろう。さらに、日常生活への治療の影響およびバイオマーカーと症状との間の関係を評価することができる。

30

【0342】

典型的には、r h H N S の I T 送達によるサンフィリッポ症候群 A 型患者の処置は、種々の組織（例えば、神経系、腎臓、胆嚢および他の器官）中の G A G の蓄積の低減を生じさせる。

40

【0343】

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。

【0344】

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「a n」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

50

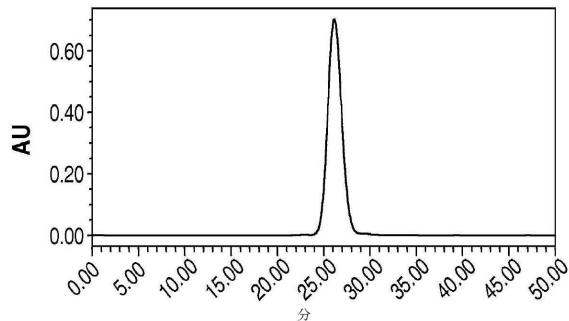
つ、2つ以上またはすべてのグループの要素が所与の製品または工程に存在する、使用されるまたは関連する場合に満たされるものとする。本発明は、グループの中の正確に1つの要素が所与の製品または工程に存在する、使用されるまたは関連する実施形態を含む。また本発明は、グループの2つ以上の要素または全要素が所与の製品または工程に存在する、使用されるまたは関連する実施形態も含む。さらに本発明は、別途明記されない限り、または矛盾もしくは不一致が生じることが当業者に明らかでない限り、列挙されている1つ以上の請求項の1つ以上の制限、要素、条項、記述用語などが、基本請求項に従属する別の請求項に（または関連する他の任意の請求項として）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。

10

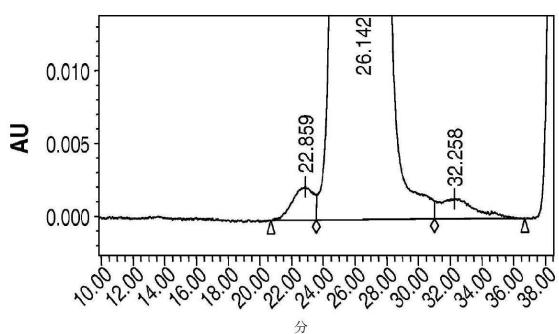
20

【図1-1】

【図1A】

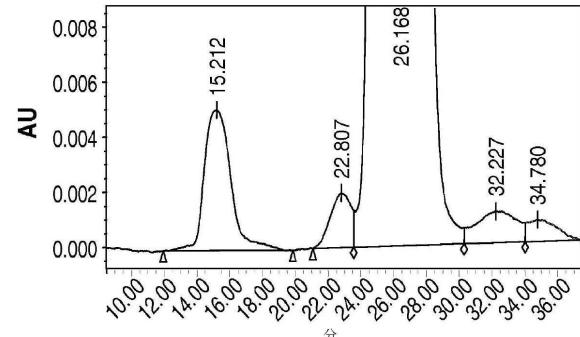


【図1B】

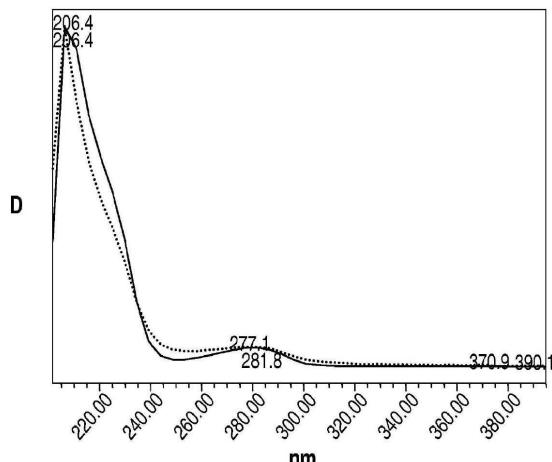


【図1-2】

【図1C】

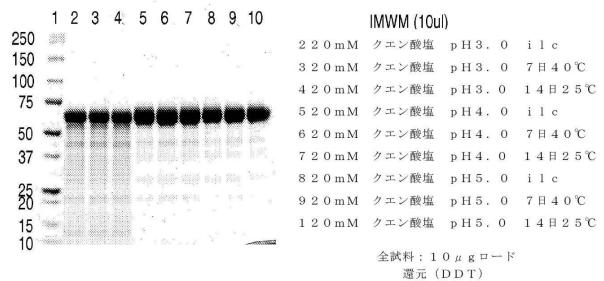


【図1D】

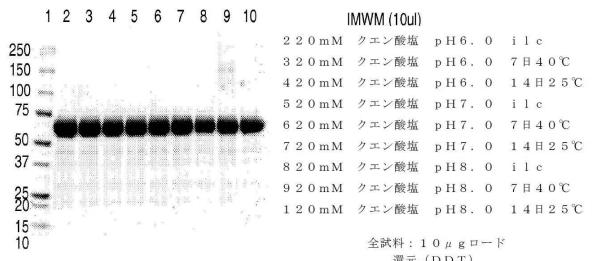


【図2-1】

【図2 A】

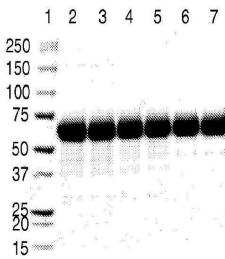


【図2 B】



【図2-2】

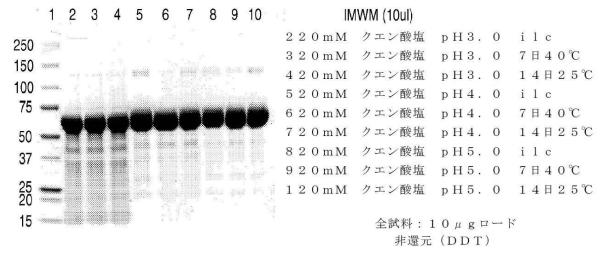
【図2 C】



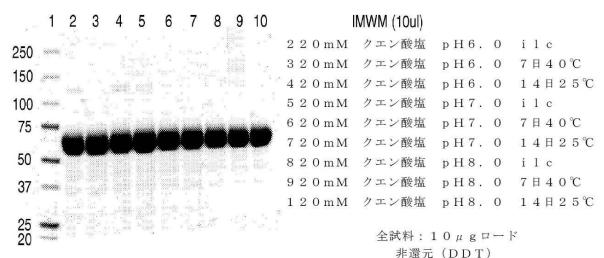
全試料: 10 μg ロード
還元 (DDT)

【図3-1】

【図3 A】

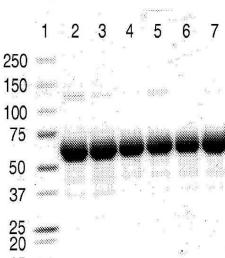


【図3 B】



【図3-2】

【図3 C】

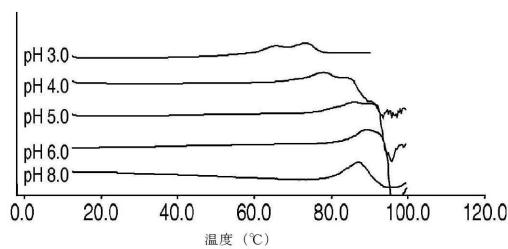


全試料: 10 μg ロード
非還元 (DDT)

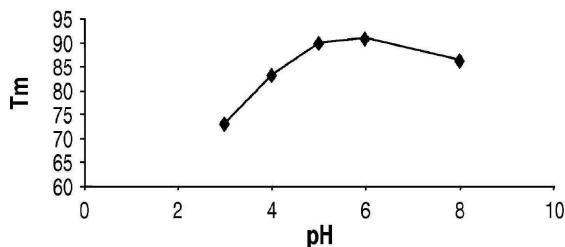
【図4】

【図4】

クエン酸中HNSのpH依存性融解



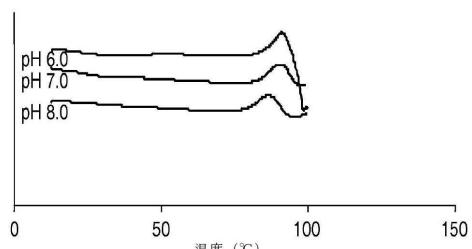
クエン酸塩中のpH依存性Tm



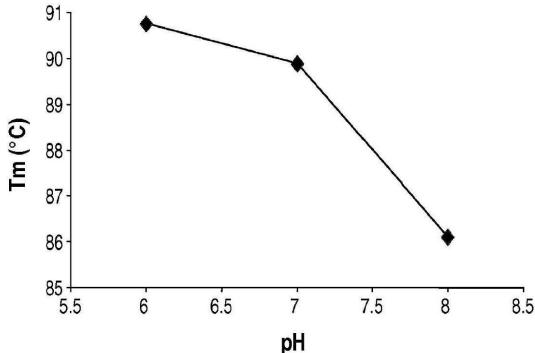
【図5】

【図5】

リン酸中HNSのpH依存性融解

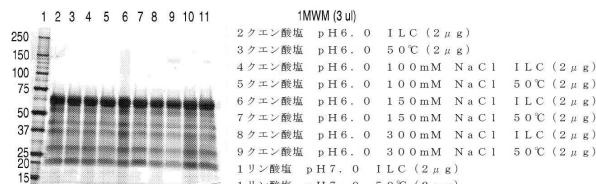


リン酸塩中のpH依存性Tm

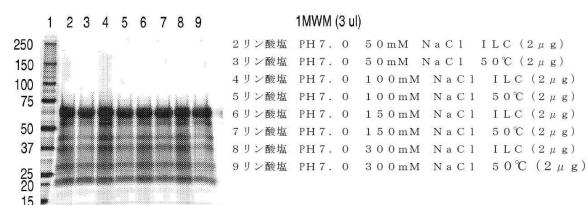


【図6】

【図6 A】

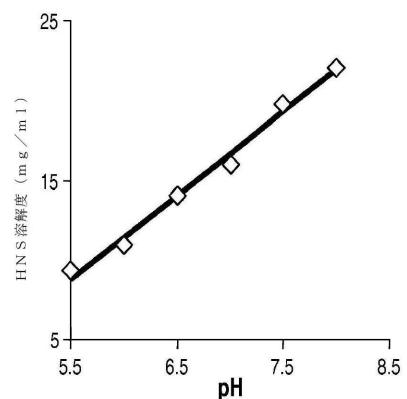


【図6 B】



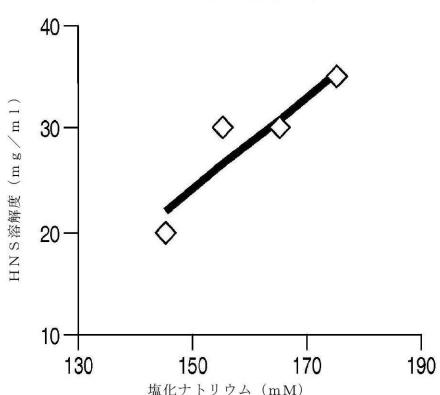
【図7】

【図7 A】



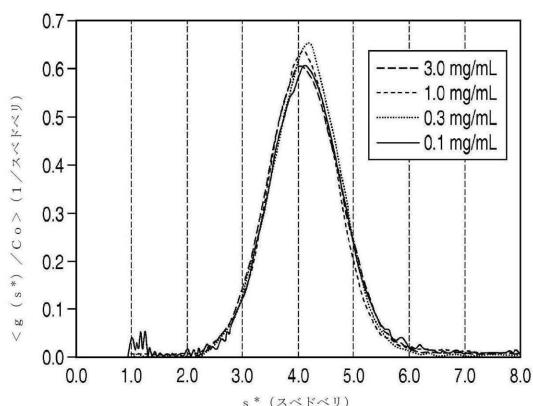
【図7 B】

5 mMリソ酸塩緩衝液を含みpH 7

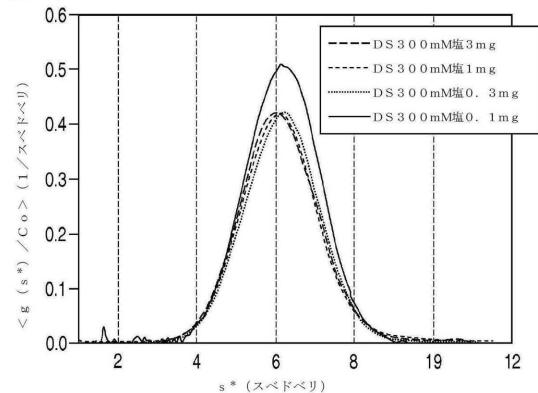


【図 8】

【図 8 A】

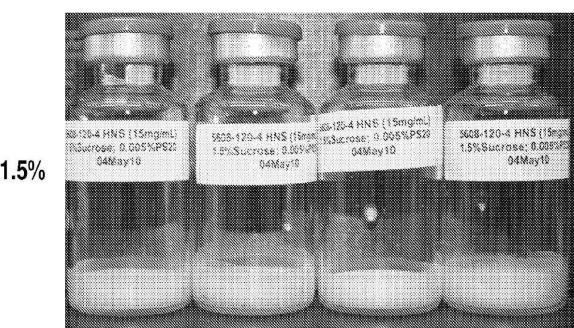
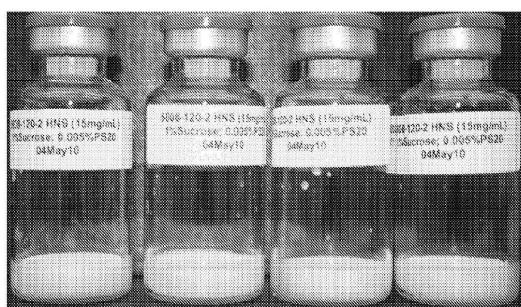


【図 8 B】



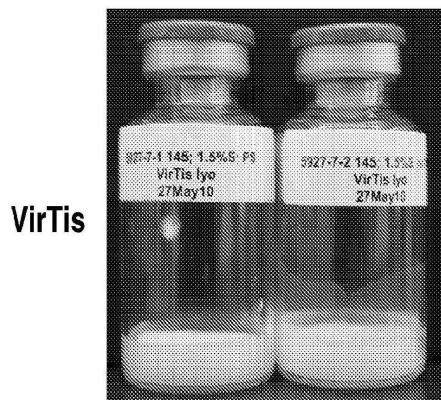
【図 9 A】

【図 9 A】

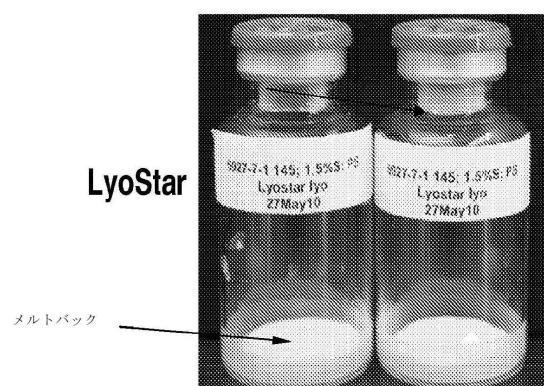


【図 9 B】

【図 9 B】

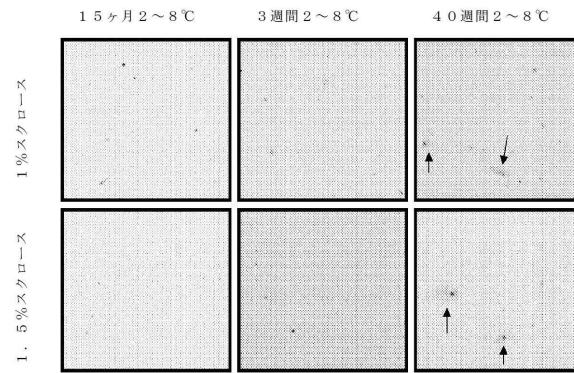


LyoStar



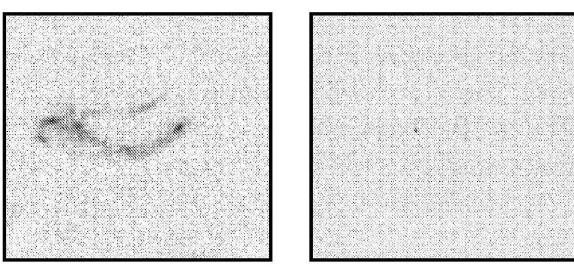
【図 10】

【図 10】



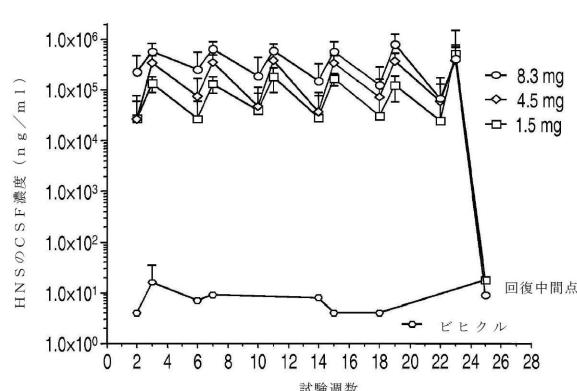
【図 11】

【図 11】

P20無し
0.22μm濾過後P20有り
0.22μm濾過後

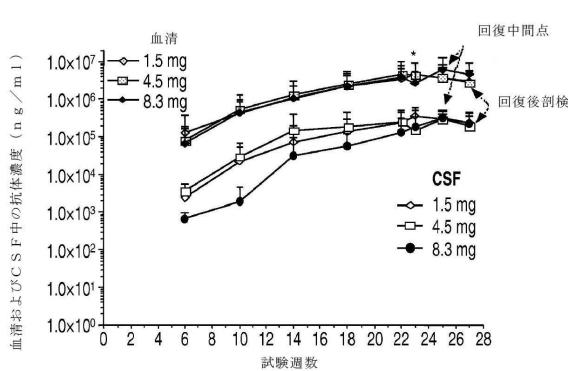
【図 1 2 A】

【図 1 2 A】 時間の一関数としての HNS の CSF 濃度のプロット



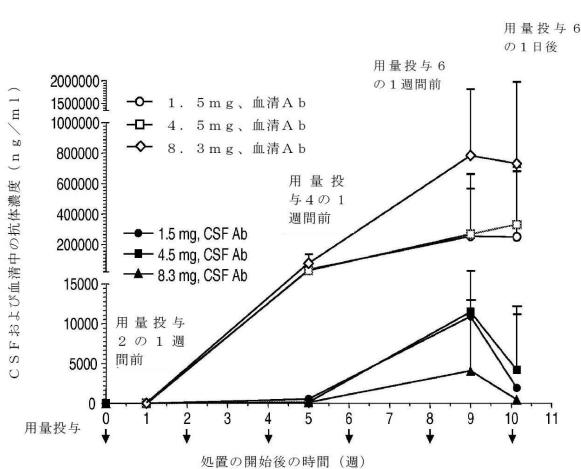
【図 1 2 B】

【図 1 2 B】 時間の一関数としての血清対 CSF 中の抗体濃度のプロット



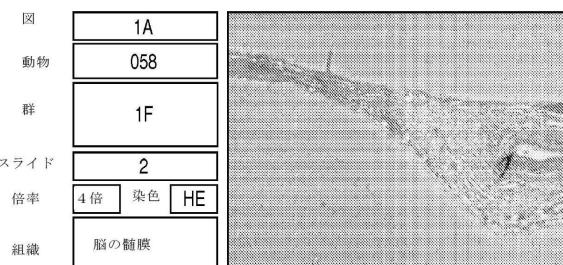
【図 1 2 C】

【図 1 2 C】 全 3 種類の用量レベルの反復 I.T 投与後の血清および CSF 中の抗体濃度

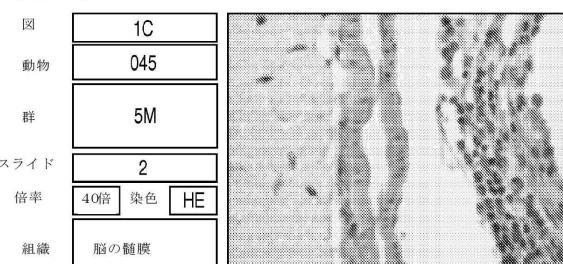


【図 1 3 - 1】

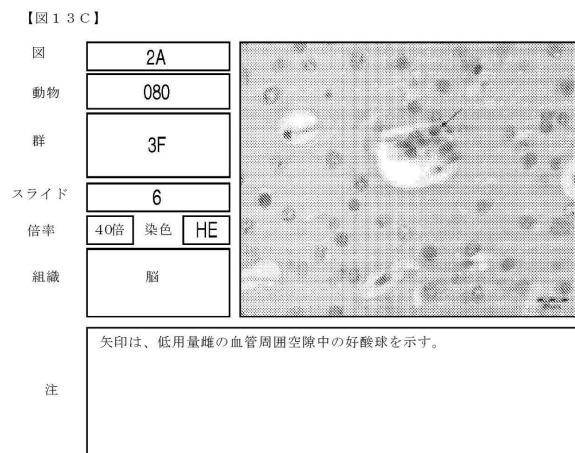
【図 1 3 A】



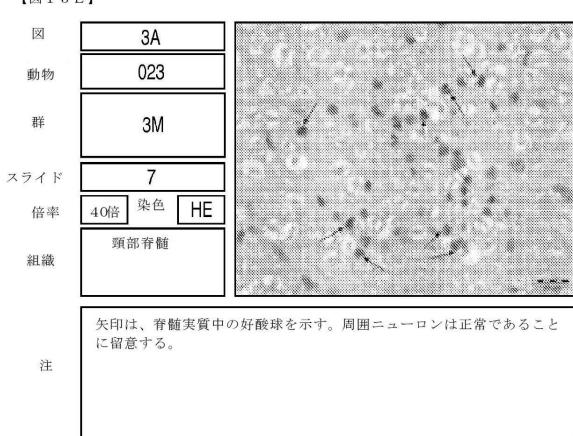
【図 1 3 B】



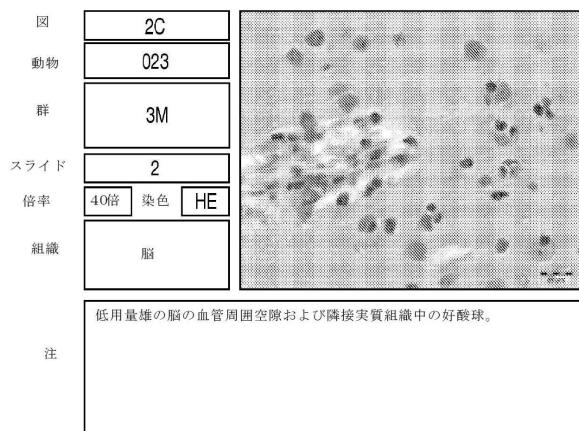
【図 1 3 - 2】



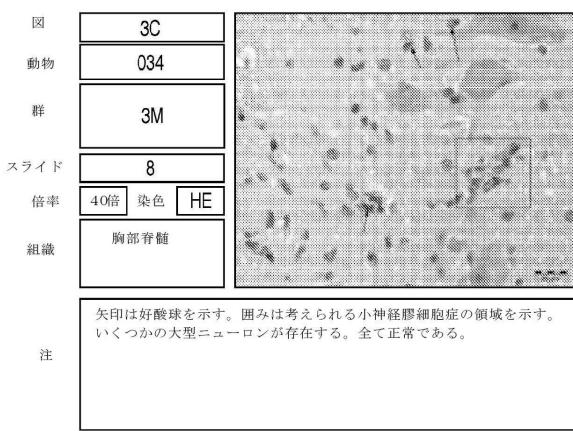
【図 1 3 - 3】



【図 1 3 D】

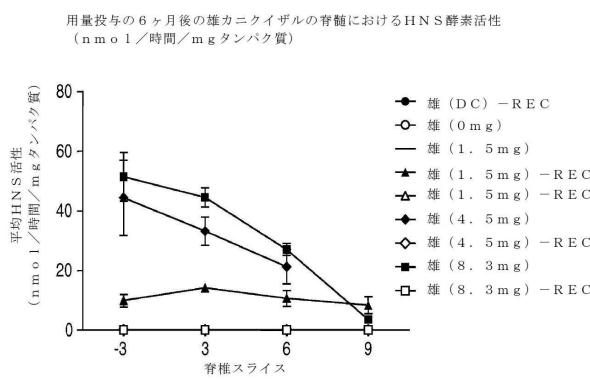


【図 1 3 F】



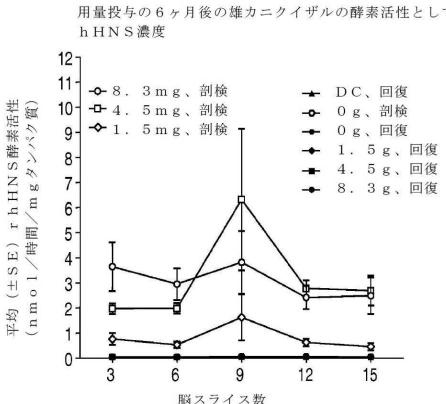
【図 1 4 - 1】

【図 1 4 A】

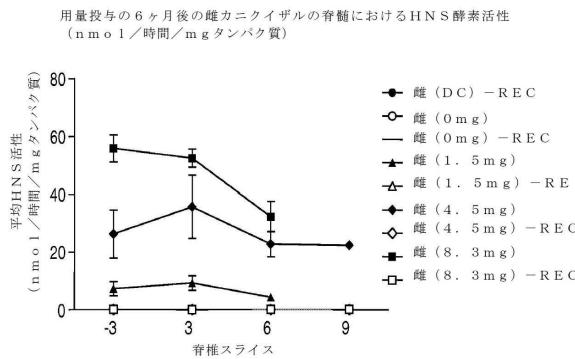


【図 1 4 - 2】

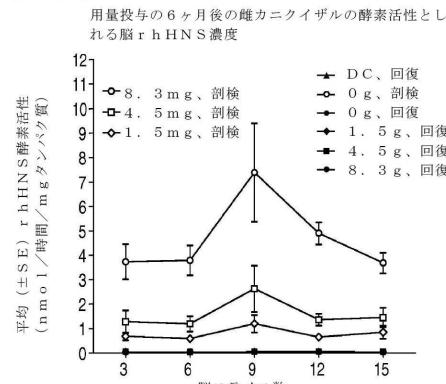
【図 1 4 C】



【図 1 4 B】

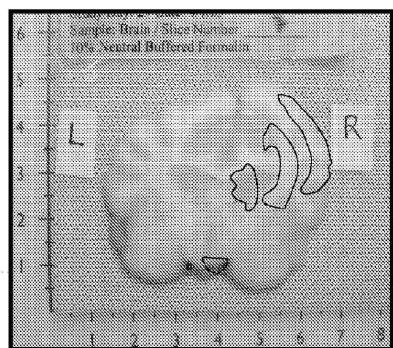


【図 1 4 D】



【図 15 A】

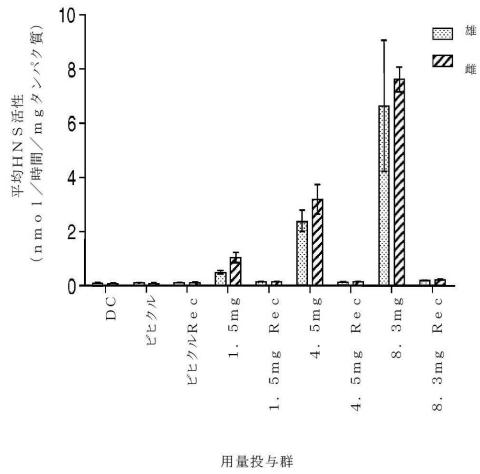
【図 15 A】



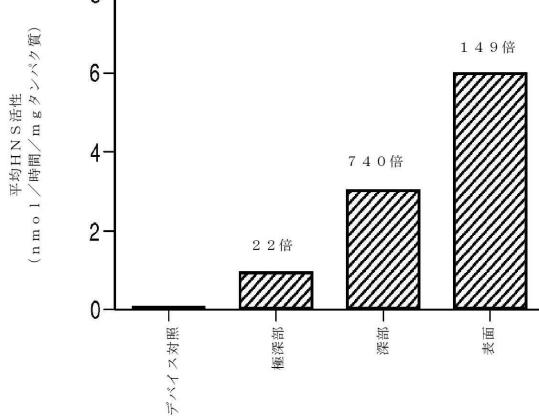
【図 15 B】

【図 15 B】

6ヶ月および1ヶ月の回復期間後のカニクイザル肝臓における平均HN S酵素活性
(nmol/時間/mgタンパク質)

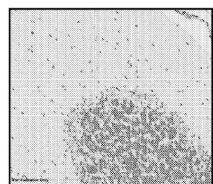


8. 3 mg 用量投与群

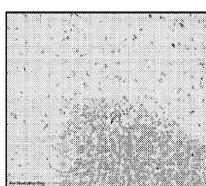


【図 16】

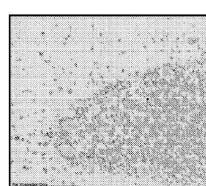
【図 16 A】



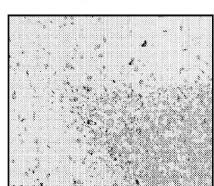
【図 16 B】



【図 16 C】

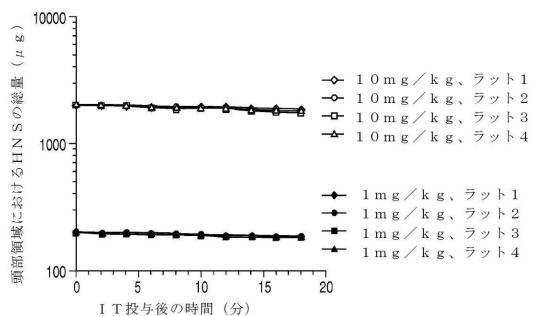


【図 16 D】



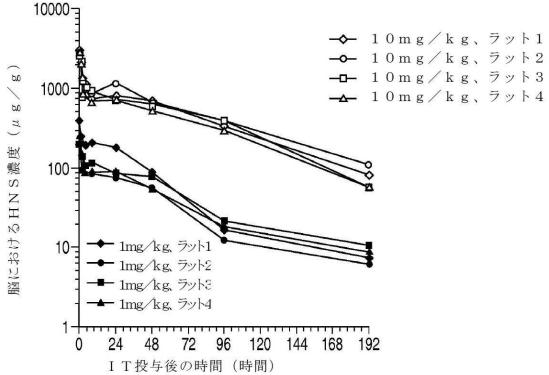
【図 17】

【図 17】

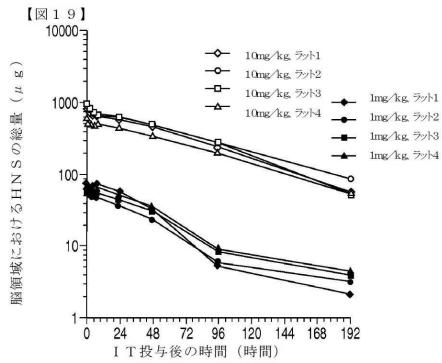


【図 18】

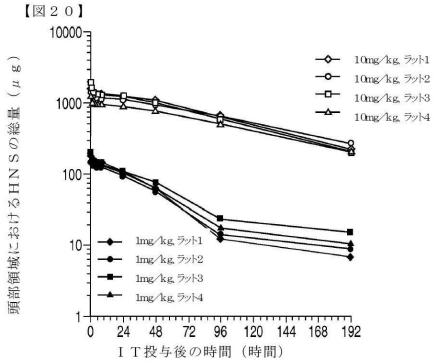
【図 18】



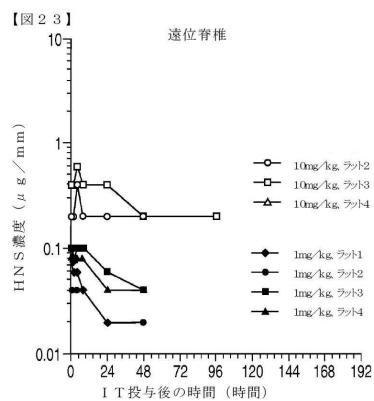
【図19】



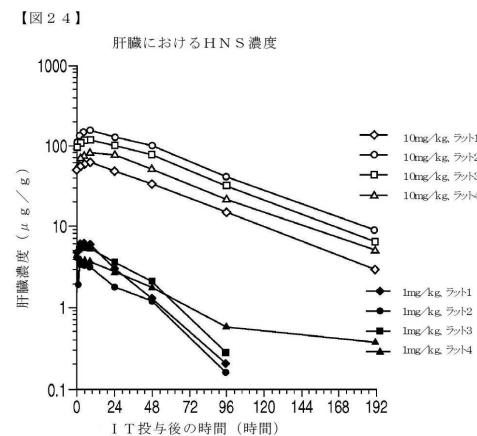
【図20】



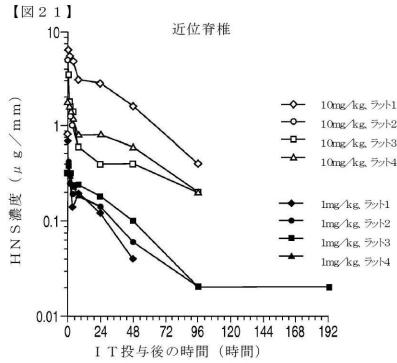
【 図 2 3 】



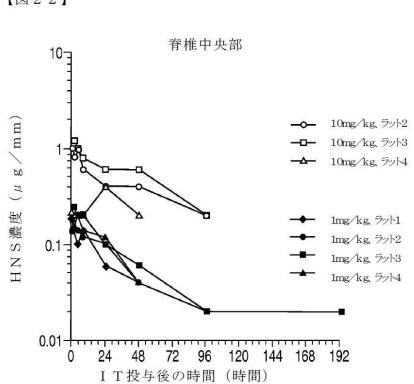
【 図 2 4 】



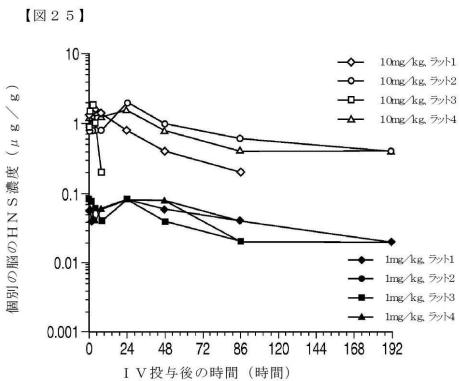
【図21】



【図22】



【図25】

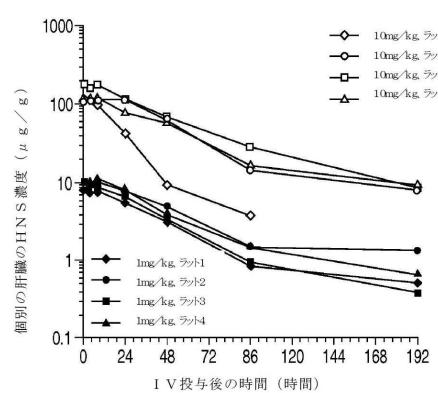


Detailed description of Figure 2: This is a semi-logarithmic line graph showing the concentration of HNS in the individual brain over time. The y-axis is labeled '個別の脳のHNS濃度 (μg/g)' and ranges from 0.001 to 1.0. The x-axis is labeled 'I.V.投与後の時間 (時間)' and ranges from 0 to 192. Two data series are plotted: one for 1 mg/kg i.v. (represented by open diamonds) and one for 10 mg/kg i.v. (represented by open triangles). Both series show an initial increase peaking at 24 hours and then a slow decrease. The 10 mg/kg group starts higher and reaches a lower steady state compared to the 1 mg/kg group.

Time (時間)	1 mg/kg i.v. (μg/g)	10 mg/kg i.v. (μg/g)
0	~0.06	~0.08
24	~0.10	~0.12
48	~0.08	~0.07
86	~0.05	~0.04
192	~0.03	~0.02

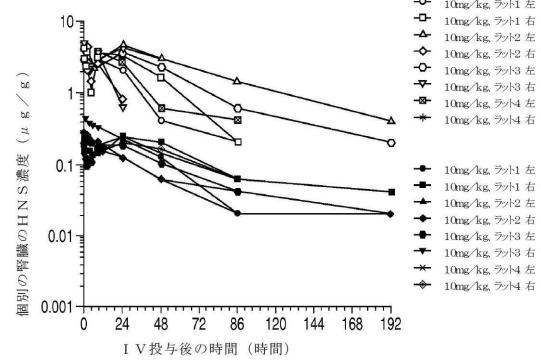
【図 2 6】

【図 2 6】



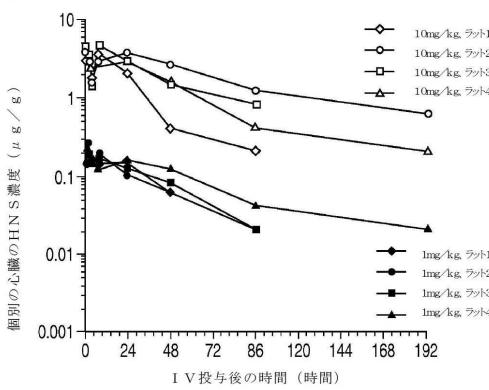
【図 2 7】

【図 2 7】



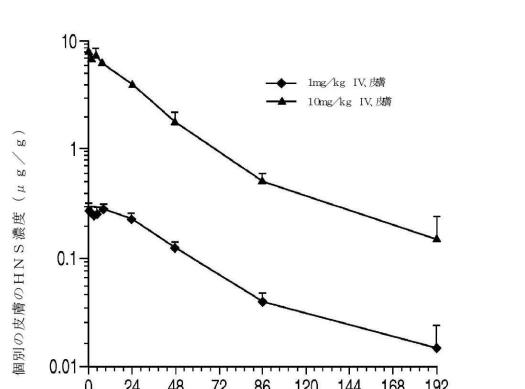
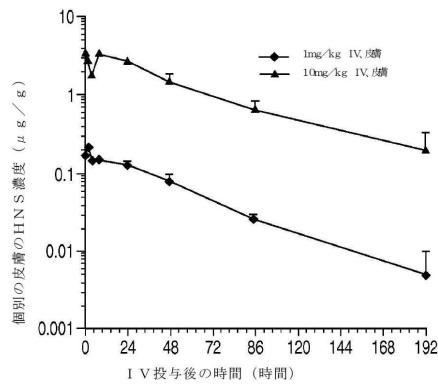
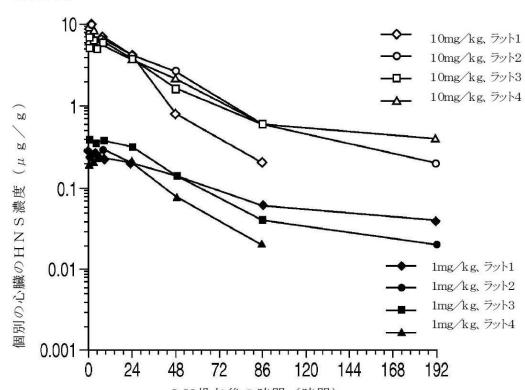
【図 2 8】

【図 2 8】



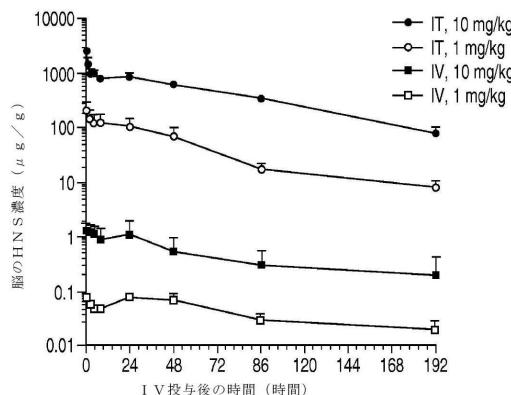
【図 2 9】

【図 2 9】



【図30】

【図30】

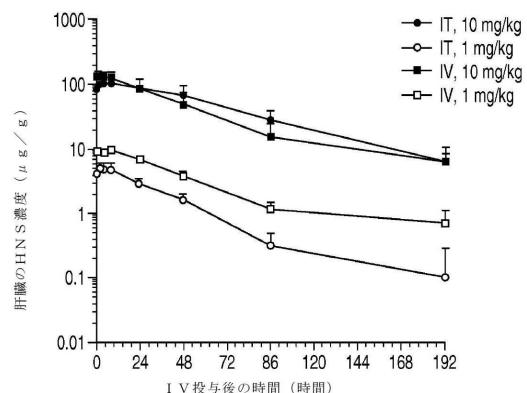


脳における非コンパートメントPKパラメータの比較

		IT		IV		IT/IV
		パラメータ	単位	平均	標準偏差	
1 mg/kg	λ_z	1/hr	0.016	0.003	0.011	0.005
	$t_{1/2}$	hr	45	7	71	23
	C_{max}	ug/g	257	90	0.1	0.0
	AUC _{0-192hr}	hr ² ug/g	8393	2457	7	2
10 mg/kg	λ_z	1/hr	0.014	0.001	0.102	0.180
	$t_{1/2}$	hr	49	4	60	53
	C_{max}	ug/g	2628	265	1.8	0.2
	AUC _{0-192hr}	hr ² ug/g	83962	10083	86	66

【図31】

【図31】

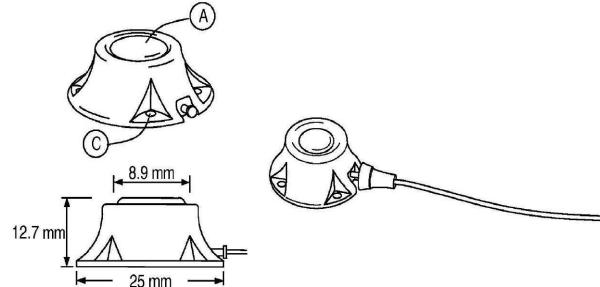


肝臓における非コンパートメントPKパラメータの比較

		IT		IV		IT/IV
		パラメータ	単位	平均	標準偏差	
1 mg/kg	λ_z	1/hr	0.030	0.011	0.015	0.003
	$t_{1/2}$	hr	28	16	47	10
	C_{max}	ug/g	4.9	1.3	9.6	0.5
	AUC _{0-192hr}	hr ² ug/g	204	50	525	0.4
10 mg/kg	λ_z	1/hr	0.017	0.000	0.021	0.012
	$t_{1/2}$	hr	42	1	38	13
	C_{max}	ug/g	105	41	131.6	27
	AUC _{0-192hr}	hr ² ug/g	7987	3276	6747	2837

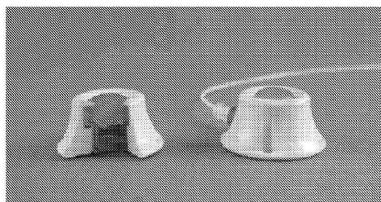
【図32】

【図32】



【図34】

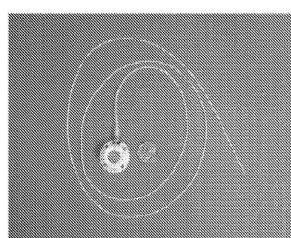
【図34】



【図33】

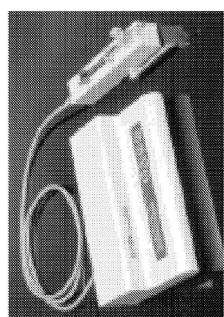
【図33】

PORT-A-CATH低プロファイル脳腔内埋込み可能アクセス系

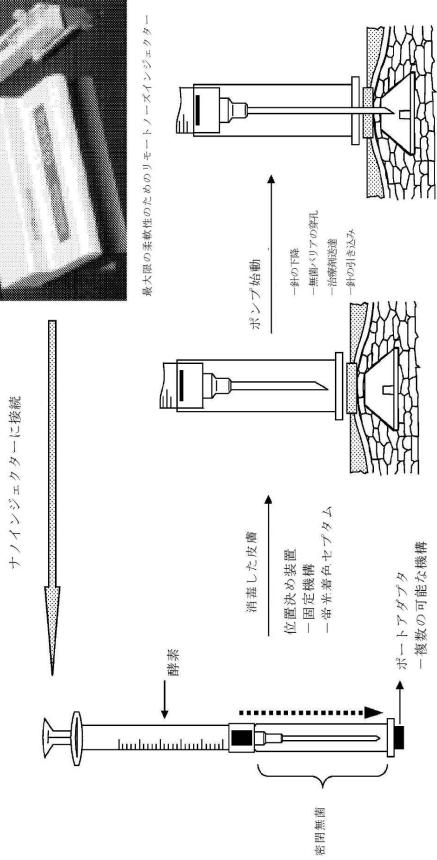


【図 3 5】

【図 3 5】

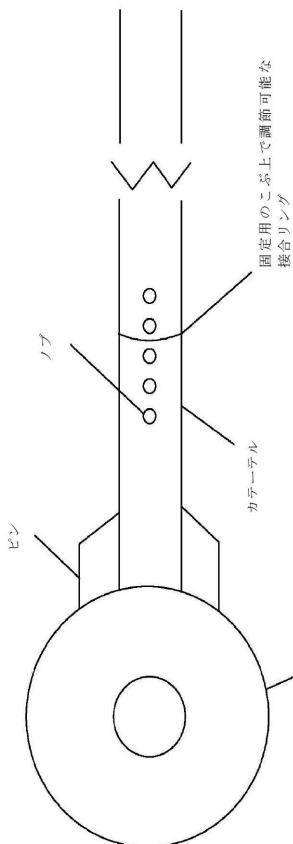


最小限の技術開発でCNS ERTのための在宅投与が可能となる



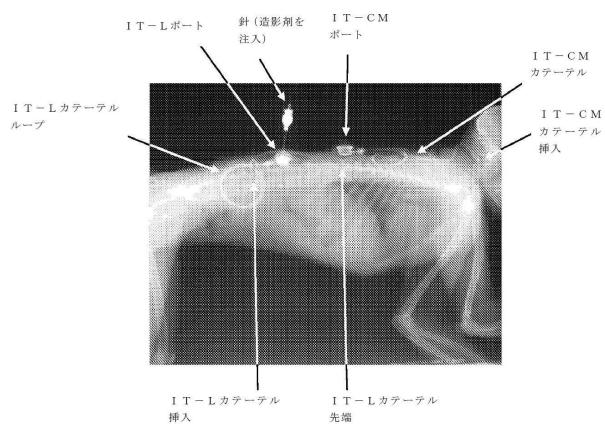
【図 3 6】

【図 3 6】



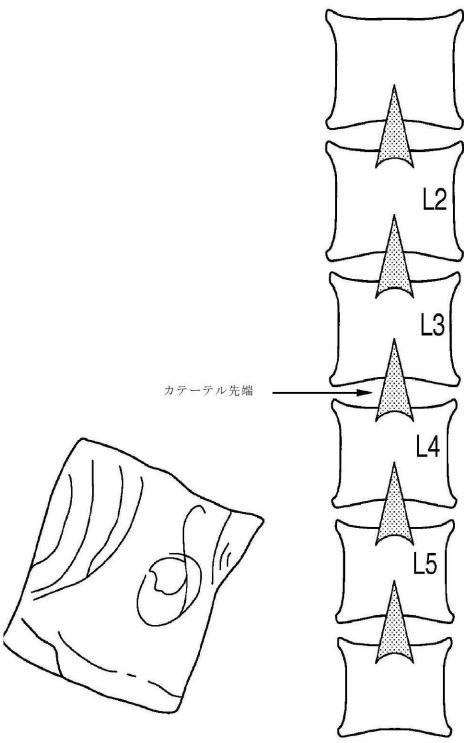
【図 3 7 A】

【図 3 7 A】



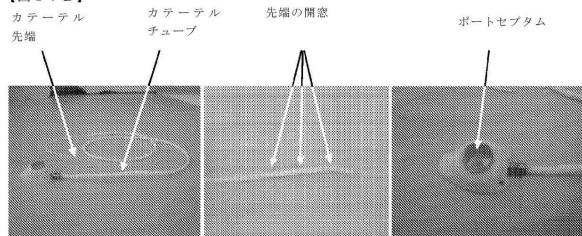
【図 3 7 C】

【図 3 7 C】



【図 3 7 B】

【図 3 7 B】



【配列表】

0006073783000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 61 K 47/02 (2006.01)	A 61 K 47/02
A 61 K 47/34 (2017.01)	A 61 K 47/34
A 61 K 47/26 (2006.01)	A 61 K 47/26
A 61 K 47/10 (2006.01)	A 61 K 47/10
A 61 K 47/16 (2006.01)	A 61 K 47/16
A 61 K 47/24 (2006.01)	A 61 K 47/24
A 61 K 9/08 (2006.01)	A 61 K 9/08
A 61 K 9/19 (2006.01)	A 61 K 9/19

(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 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 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 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 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 米国(US)

前置審査

(72)発明者 ナトリ , ファラー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01833 , ジョージタウン , ポンド ストリート 1
 06
 (72)発明者 チュー , ガオチョン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02493 , ウエストン , サウス アベニュー 680
 , ユニット 15
 (72)発明者 テルー , ジェニファー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01742 , コンコード , コモンウェルス アベニュー
 225
 (72)発明者 ジャン , ユアン
 アメリカ合衆国 ニューハンプシャー 03053 , ロンドンデリー , フォレスト ストリート
 42
 (72)発明者 ツン , ジェイミー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02482 , ウエルスレイ , カールトン ロード 7
 (72)発明者 シャーロク , ザーラ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02493 , ウエストン , テラス ロード 5
 (72)発明者 バーナグリア , ブライアン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01890 , ウィンチェスター , サージェント ロード
 19
 (72)発明者 パン , ジン

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 86
8

(72)発明者 ファイファー, リチャード
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 カリアス, ペリクルス
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

審査官 長岡 真

(56)参考文献 特表2007-504166(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/45

A61K 9/00 - 9/72

A61K 47/00 - 47/48

A61P 25/00

A61P 25/18

A61P 25/20

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)