



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104857504 A

(43) 申请公布日 2015.08.26

(21) 申请号 201510172262.0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011.06.25

A61K 38/46(2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 9/00(2006.01)

61/358,857 2010.06.25 US

A61K 9/19(2006.01)

61/360,786 2010.07.01 US

A61P 25/00(2006.01)

61/387,862 2010.09.29 US

A61P 7/10(2006.01)

61/435,710 2011.01.24 US

A61P 25/28(2006.01)

61/442,115 2011.02.11 US

61/476,210 2011.04.15 US

61/495,268 2011.06.09 US

(62) 分案原申请数据

201180040802.X 2011.06.25

(71) 申请人 夏尔人类遗传性治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 N·萨拉马特·米勒 K·泰勒

P·坎波列托 Z·夏若克 J·潘

L·恰尔纳斯 T·L·莱特

P·加莱斯

(74) 专利代理机构 北京商专永信知识产权代理

事务所(普通合伙) 11400

代理人 郭玥 葛强

权利要求书3页 说明书88页 附图36页

(54) 发明名称

芳基硫酸酯酶 A CNS 递送的方法和组合物

(57) 摘要

本发明提供了,除了其它的以外, CNS 递送溶酶体酶的组合物和方法,以有效治疗溶酶体贮积症。在一些实施方案中,本发明包括直接 CNS 鞘内施用的稳定制剂,所述稳定制剂包括芳基硫酸酯酶 A(ASA) 蛋白质、盐、和聚山梨醇酯表面活性剂,以治疗异染性脑白质营养不良。

1. 稳定制剂在生成用于治疗异染性脑白质营养不良 (MLD) 疾病的药物中的用途, 其中所述制剂包含浓度大于或等于 5mg/mL 的芳基硫酸酯酶 A (ASA) 蛋白质, 并且所述制剂中的磷酸盐浓度小于 50mM。
2. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述 ASA 蛋白质以选自 10mg/ml、30mg/ml、50mg/ml 或 100mg/ml 的浓度存在。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的用途, 其中所述 ASA 蛋白质包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列。
4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的用途, 其中从人类细胞系制备所述 ASA 蛋白质。
5. 如权利要求 1-3 中任一项所述的用途, 其中从 CHO 细胞制备所述 ASA 蛋白质。
6. 如前述任一项权利要求所述的用途, 其中所述制剂还包括盐。
7. 如前述任一项权利要求所述的用途, 其中所述盐是 NaCl。
8. 如权利要求 7 所述的用途, 其中所述 NaCl 存在的浓度范围是大约 0-300mM。
9. 如权利要求 8 所述的用途, 其中所述 NaCl 存在的浓度范围是大约 137-154mM。
10. 如权利要求 9 所述的用途, 其中所述 NaCl 存在的浓度是大约 154mM。
11. 如前述任一项权利要求所述的用途, 其中所述制剂还包括聚山梨醇酯表面活性剂。
12. 如权利要求 11 所述的用途, 其中所述聚山梨醇酯表面活性剂选自: 聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 40、聚山梨醇酯 60、聚山梨醇酯 80 及其组合。
13. 如权利要求 12 所述的用途, 其中所述聚山梨醇酯表面活性剂为聚山梨醇酯 20。
14. 如权利要求 13 所述的用途, 其中所述聚山梨醇酯 20 存在的浓度范围是大约 0-0.2%。
15. 如权利要求 14 所述的用途, 其中所述聚山梨醇酯 20 存在的浓度是大约 0.005%。
16. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述磷酸盐存在的浓度不大于 20mM。
17. 如权利要求 15 所述的用途, 其中所述制剂基本不含磷酸盐。
18. 如前述任一项权利要求所述的用途, 其中所述制剂的 pH 是大约 3-8.0。
19. 如权利要求 18 所述的用途, 其中所述制剂的 pH 是大约 6.0-6.5。
20. 如权利要求 19 所述的用途, 其中所述制剂的 pH 是大约 6.0。
21. 如前述任一项权利要求所述的用途, 其中所述制剂为液体制剂。
22. 如权利要求 1-20 中任一项所述的用途, 其中所述制剂配制成冻干干粉。
23. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述制剂还包括稳定剂。
24. 如权利要求 23 所述的用途, 其中所述稳定剂选自蔗糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、PEG 4000、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、磷脂及其组合。
25. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述制剂的鞘内施用与所述受试者中不产生实质性副作用。
26. 如权利要求 25 所述的用途, 其中所述制剂的鞘内施用与所述受试者中不产生实质性适应性 T-细胞介导的免疫应答。
27. 如权利要求 1-26 中任一项所述的用途, 其中所述制剂的鞘内施用导致递送所述 ASA 蛋白质至深部脑白质的少突胶质细胞。
28. 如权利要求 1-27 中任一项所述的用途, 其中所述 ASA 蛋白质被递送至神经元、胶质细胞、血管周细胞和 / 或脑膜细胞。

29. 如权利要求 1-28 中任一项所述的用途,其中所述 ASA 蛋白质被进一步递送至脊髓中的神经元。

30. 如权利要求 1-29 中任一项所述的用途,其中所述制剂的鞘内施用进一步导致所述 ASA 蛋白质在外周靶组织中的全身递送。

31. 如权利要求 30 所述的用途,其中所述外周靶组织选自:肝脏、肾脏、和 / 或心脏。

32. 如权利要求 1-31 中任一项所述的用途,其中所述制剂的鞘内施用导致在脑靶组织、脊髓神经元和 / 或外周靶组织中的溶酶体定位。

33. 如权利要求 1-32 中任一项所述的用途,其中所述制剂的鞘内施用导致在所述脑靶组织、脊髓神经元和 / 或外周靶组织中的硫脑苷酯储存减少。

34. 如权利要求 33 所述的用途,其中所述硫脑苷酯储存与对照相比,以至少 20%、40%、50%、60%、80%、90%、1 倍、1.5 倍、或者 2 倍地减少。

35. 如权利要求 1-34 中任一项所述的用途,其中所述制剂的鞘内施用导致在 CNS 和 PNS 以内的进行性脱髓鞘和轴突损失减少。

36. 如权利要求 1-35 中任一项所述的用途,其中所述制剂的鞘内施用导致在所述脑靶组织、脊髓神经元和 / 或外周靶组织中的 ASA 酶活性增加。

37. 如权利要求 36 所述的用途,其中所述 ASA 酶活性与对照相比,以至少 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍或者 10 倍地增加。

38. 如权利要求 36 或 37 所述的用途,其中所述增加的 ASA 酶活性为至少大约 10nmol/hr/mg、20nmol/hr/mg、40nmol/hr/mg、50nmol/hr/mg、60nmol/hr/mg、70nmol/hr/mg、80nmol/hr/mg、90nmol/hr/mg、100nmol/hr/mg、150nmol/hr/mg、200nmol/hr/mg、250nmol/hr/mg、300nmol/hr/mg、350nmol/hr/mg、400nmol/hr/mg、450nmol/hr/mg、500nmol/hr/mg、550nmol/hr/mg 或者 600nmol/hr/mg。

39. 如权利要求 38 所述的用途,其中所述 ASA 酶活性在腰区中增加。

40. 如权利要求 39 所述的用途,其中在所述腰区中所述增加的 ASA 酶活性为至少大约 2000nmol/hr/mg、3000nmol/hr/mg、4000nmol/hr/mg、5000nmol/hr/mg、6000nmol/hr/mg、7000nmol/hr/mg、8000nmol/hr/mg、9000nmol/hr/mg、或者 10,000nmol/hr/mg。

41. 如权利要求 1-40 中任一项所述的用途,其中所述制剂的鞘内施用导致所述 MLD 疾病的至少一种症状或特征在强度、严重程度或者频率方面减少,或者延缓发生。

42. 如权利要求 41 所述的用途,其中所述 MLD 疾病的至少一种症状或特征为:颅内压增高,脑外积水,在中枢和周围神经系统髓鞘中和在内脏器官中的硫酸糖脂积累,在所述 CNS 和 PNS 以内的进行性脱髓鞘和轴突损失,和 / 或运动和认知功能障碍。

43. 如权利要求 1-42 中任一项所述的用途,其中每两个星期进行一次所述鞘内施用。

44. 如权利要求 1-42 中任一项所述的用途,其中每月进行一次所述鞘内施用。

45. 如权利要求 1-42 中任一项所述的用途,其中每两个月进行一次所述鞘内施用。

46. 如权利要求 1-45 中任一项所述的用途,其中所述鞘内施用与静脉施用连同使用。

47. 如权利要求 46 所述的用途,其中所述静脉施用的频率不高于每月一次。

48. 如权利要求 46 所述的用途,其中所述静脉施用的频率不高于每两个月一次。

49. 如权利要求 1-45 中任一项所述的用途,其中所述鞘内施用在缺乏静脉施用时使用。

50. 如权利要求 1-49 中任一项所述的用途,其中所述鞘内施用在缺乏并发免疫抑制疗法时使用。

51. 如权利要求 1-50 中任一项所述的用途。

芳基硫酸酯酶 A CNS 递送的方法和组合物

[0001] 本申请是申请号为 201180040802.X、申请日为 2011 年 6 月 25 日、发明名称为“芳基硫酸酯酶 A CNS 递送的方法和组合物”的中国发明专利申请的分案申请,原申请为国际申请号为 PCT/US2011/041926 的国家阶段申请,该国际申请要求美国临时申请序列号 61/358,857(2010 年 06 月 25 日提交);61/360,786(2010 年 7 月 1 日提交);61/387,862(2010 年 9 月 29 日提交);61/435,710(2011 年 1 月 24 日提交);61/442,115(2011 年 2 月 11 日提交);61/476,210(2011 年 4 月 15 日提交)和 61/495,268(2011 年 6 月 9 日提交)的优先权;其中每个的整体通过参考的方式并入本文。

[0002] 与该国际申请相关的美国申请:名称为“治疗试剂的 CNS 递送,”于同日提交;“乙酰肝素 N-硫酸酯酶 CNS 递送的方法和组合物,”于同日提交;“艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶 CNS 递送的方法和组合物,”于同日提交;“ β -半乳糖脑苷脂酶 CNS 递送的方法和组合物,”于同日提交;“Sanfilippo 综合症类型 B 的治疗,”于同日提交;其中每个的整体通过参考的方式并入本文。

背景技术

[0003] 酶替代治疗(ERT)包括向受试者全身施用天然或重组衍生的蛋白质和/或酶。批准的疗法主要是通过静脉向受试者施用,并且对于治疗潜在的酶缺乏症的躯体症状有效。由于所述静脉施用的蛋白质和/或酶在进入所述中枢神经系统(CNS)的细胞和组织内的有限分布,具有 CNS 病因学的所述疾病的治疗尤其具有挑战性,因为所述静脉施用的蛋白质和/或酶没有充分穿过血-脑屏障(BBB)。

[0004] 所述血-脑屏障(BBB)是由内皮细胞构成的体系,其功能是保护所述中枢神经系统(CNS)使免于遭受在所述血流中的有害物质,例如细菌、大分子(例如蛋白质)和其它亲水性分子,通过限制这种物质穿过所述 BBB 的扩散并进入所述潜在的脑脊髓液(CSF)和 CNS。

[0005] 有几种绕过所述 BBB 的方式,以增强治疗试剂的脑递送,包括直接的颅内注射、所述 BBB 的短暂通透性、以及修饰活性剂以改变组织分布。治疗试剂完全绕过所述血管直接注射进入脑组织,但是主要有患并发症(传染、组织损伤、免疫应答)的风险,所述并发症由颅内注射、以及所述活性剂从所述施用位点的轻度扩散所引起。到目前为止,蛋白质直接施用进所述脑物质中不能实现显著的治疗效果,因为扩散障碍和可以被施用的治疗体积有限。对流协助扩散已经通过放置在所述脑实质中的导管研究,使用缓慢的、长期的输液(Bobo,等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 91,2076-2080(1994);Nguyen,等 J. Neurosurg. 98,584-590(2003)),但是没有使用这种方法进行长期治疗的批准疗法。另外,大脑内导管的放置是非常侵入性的,并且作为临床替代不太理想。

[0006] 鞘内(IT)注射,或者施用蛋白质到所述脑脊髓液(CSF),也已经被尝试,但是没有产生成功的治疗。在这种治疗方法中的主要的挑战是所述活性剂倾向于非常紧密地绑定在脑室室管膜衬里,其阻止了随后的扩散。目前,通过直接施用到所述 CSF 以治疗脑遗传性疾病,还没有批准的产品。

[0007] 事实上,很多人都认为在大脑表面扩散的障碍、以及缺乏有效和便捷的递送方式,极大地妨碍了在大脑中任何疾病达到足够的治疗效果。

[0008] 许多溶酶体贮积症影响神经系统,从而在用传统治疗方法治疗这些疾病中表现出独特的挑战。在受影响的个体的神经元和脑膜中往往在大量聚集糖胺聚糖 (GAG),导致各种形式的 CNS 症状。迄今为止,还没有成功地以任何方式治疗由溶酶体疾病导致的 CNS 症状。

[0009] 因此,仍然非常需要有效地将治疗试剂递送到大脑。更具体地讲,非常需要更有效地递送活性剂到中枢神经系统,用于治疗溶酶体贮积症。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供了有效和较少侵入性的直接递送治疗试剂到所述中枢神经系统 (CNS) 的方法。部分上,本发明基于意外发现的基础上,即溶酶体贮积症 (例如,MLD) 的替代酶 (例如,芳基硫酸酯酶 A (ASA)) 可以直接以高浓度 (例如,大于约 3mg/ml, 4mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml 或更多) 引入到有需要治疗的受试者的脑脊髓液 (CSF) 中,使得所述酶有效和广泛地在各表面之间扩散并在所述脑的各区域之间贯通,包括深部脑区域。更令人惊讶的是,本发明人已经证明可以使用简单的生理盐水或缓冲液为基础的制剂会达到如此高浓度蛋白的递送,而不诱发实质性的不利影响,如在所述受试者中严重的免疫反应。因此,本发明提供了高效、临床可取的和患者友好型的方法,用于直接 CNS 递送以治疗具有 CNS 组分,特别是溶酶体贮积病的各种疾病和紊乱。本发明在 CNS 靶向领域和酶替代疗法中代表了显著的进步。

[0012] 如下文详细描述,本发明人已经成功地开发了用于有效地鞘内施用芳基硫酸酯酶 A (ASA) 蛋白质的稳定制剂。可以设想,无论如何,下文描述的所述多种稳定制剂通常适合于治疗试剂的 CNS 递送,包括多种其它溶酶体酶。的确,根据本发明的稳定制剂可以用于通过多种技术和途径的 CNS 递送,包括:但不限于,脑实质内的、大脑内的、脑室内的 (intraventricular Cerebral, ICV)、鞘内的 (例如,IT- 腰椎, IT- 小脑延髓池) 施用、以及其它直接或间接注射入所述 CNS 技术和 / 或 CSF 的技术和途径。

[0013] 还可以设想,下文描述的多种稳定制剂通常适合于其它治疗试剂的 CNS 递送,例如治疗性蛋白质,包括用于溶酶体贮积症的多种替代酶。在一些实施方案中,替代酶可以是合成的、重组的、基因活化的或者天然的酶。

[0014] 在多种实施方案中,本发明包括直接 CNS 鞘内施用的稳定制剂,所述稳定制剂包括芳基硫酸酯酶 A (ASA) 蛋白质、盐和聚山梨醇酯表面活性剂。在一些实施方案中,所述 ASA 蛋白质存在的浓度范围从大约 1-300mg/ml (例如,1-250mg/ml, 1-200mg/ml, 1-150mg/ml, 1-100mg/ml, 1-50mg/ml)。在一些实施方案中,所述 ASA 蛋白质存在或至多达到的浓度选自: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, 或者 300mg/ml。

[0015] 在多种实施方案中,本发明包括下文描述的任意实施方案的稳定制剂,其中所述 ASA 蛋白质包括氨基酸序列 SEQ ID NO:1。在一些实施方案中,所述 ASA 蛋白质包括的氨基酸序列具有与 SEQ ID NO:1 至少 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或者 98% 的一致性。在一些实施方案中,所述下文描述的任意实施方案的稳定制剂包括盐。在一些实施方案中,所述盐是 NaCl。在一些实施方案中,所述 NaCl 存在的浓度范围从大约

0-300mM(例如,0-250mM,0-200mM,0-150mM,0-100mM,0-75mM,0-50mM,或者0-30mM)。在一些实施方案中,所述NaCl存在的浓度范围从大约137-154mM。在一些实施方案中,所述NaCl存在的浓度大约154mM。

[0016] 在多种实施方案中,本发明包括下文描述的任意实施方案的稳定制剂,其中所述聚山梨醇酯表面活性剂选自:聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯80及其组合。在一些实施方案中,所述聚山梨醇酯表面活性剂为聚山梨醇酯20。在一些实施方案中,所述聚山梨醇酯20存在的浓度范围大约0-0.02%。在一些实施方案中,所述聚山梨醇酯20以大约0.005%的浓度存在。

[0017] 在多种实施方案中,本发明包括下文描述的任意实施方案的稳定制剂,其中所述制剂进一步包括缓冲剂。在一些实施方案中,所述缓冲剂选自:磷酸盐、醋酸盐、组氨酸、琥珀酸盐、Tris、及其组合。在一些实施方案中,所述缓冲剂为磷酸盐。在一些实施方案中,所述磷酸盐存在的浓度不大于50mM(例如,不大于45mM、40mM、35mM、30mM、25mM、20mM、15mM、10mM、或者5mM)。在一些实施方案中,所述磷酸盐存在的浓度不大于20mM。多个方面中本发明包括下文描述的任意实施方案的稳定制剂,其中所述制剂具有pH大约3-8(例如,大约4-7.5、5-8、5-7.5、5-6.5、5-7.0、5.5-8.0、5.5-7.7、5.5-6.5、6-7.5、或者6-7.0)。在一些实施方案中,所述制剂具有pH大约5.5-6.5(例如,5.5、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、或者6.5)。在一些实施方案中,所述制剂具有pH大约6.0。

[0018] 在多种实施方案中,本发明包括本文描述的任意实施方案的稳定制剂,其中所述制剂为液体制剂。在多种实施方案中,本发明包括下文描述的任意实施方案的稳定制剂,其中所述制剂配制成冻干粉。

[0019] 在一些实施方案中,本发明包括鞘内施用的稳定制剂,所述稳定制剂包括:芳基硫酸酯酶A(ASA)蛋白质在从大约1-300mg/ml的浓度范围,NaCl在大约154mM的浓度,聚山梨醇酯20在大约0.005%的浓度,以及大约6.0的pH。在一些实施方案中,所述ASA蛋白质在大约10mg/ml的浓度。在一些实施方案中,所述ASA蛋白质在浓度大约30mg/ml,40mg/ml,50mg/ml,100mg/ml,150mg/ml,200mg/ml,250mg/ml,或者300mg/ml。

[0020] 在多个方面中,本发明包括容器,在本文描述的多种实施方案中,所述容器包括单剂型的稳定制剂。在一些实施方案中,所述容器选自:安瓿、小药瓶、瓶子、药筒、贮液囊、(装有冻干粉和稀释剂的)二室注射器给药系统、或者载药注射器。在一些实施方案中,所述容器为载药注射器。在一些实施方案中,所述载药注射器选自:具有烘干的硅树脂涂层的硼硅酸盐玻璃注射器,喷涂硅树脂的硼硅酸盐玻璃注射器,或者无硅树脂的塑料树脂注射器。在一些实施方案中,所述稳定制剂存在的体积小于约50mL(例如,小于约45ml、40ml、35ml、30ml、25ml、20ml、15ml、10ml、5ml、4ml、3ml、2.5ml、2.0ml、1.5ml、1.0ml、或者0.5ml)。在一些实施方案中,所述稳定制剂存在的体积小于约3.0mL。

[0021] 在多个方面中,本发明包括治疗异染性脑白质营养不良的方法,所述方法包括根据本文描述的任意实施方案,向需要治疗的受试者鞘内施用制剂的步骤。

[0022] 在一些实施方案中,本发明包括治疗异染性脑白质营养不良的方法,所述方法包括向需要治疗的受试者鞘内施用制剂的步骤,制剂包括:芳基硫酸酯酶A(ASA)蛋白质在浓度范围从大约1-300mg/ml,NaCl在大约154mM的浓度,聚山梨醇酯20在大约0.005%的浓度,以及大约6的pH。

[0023] 在一些实施方案中,所述鞘内施用在所述受试者中,没有导致实质性副作用(例如,严重的免疫应答)。在一些实施方案中,所述鞘内施用在所述受试者中,没有导致实质性适应性 T- 细胞介导的免疫应答。

[0024] 在一些实施方案中,所述制剂的所述鞘内施用导致所述芳基硫酸酯酶 A 蛋白质递送至在所述脑、所述脊髓和 / 或外周器官中的多个靶组织。在一些实施方案中,所述制剂的所述鞘内施用导致所述芳基硫酸酯酶 A 蛋白质递送至靶脑组织。在一些实施方案中,所述脑靶组织包括在所述灰质中的白质和 / 或神经元。在一些实施方案中,所述芳基硫酸酯酶 A 蛋白质被递送至神经元、胶质细胞、血管周细胞和 / 或脑膜细胞。在一些实施方案中,所述芳基硫酸酯酶 A 蛋白质被进一步递送至在所述脊髓中的神经元。

[0025] 在一些实施方案中,所述制剂的所述鞘内施用进一步导致所述 ASA 蛋白质在外周靶组织中的全身递送。在一些实施方案中,所述外周靶组织选自:肝脏、肾脏、脾脏和 / 或心脏。

[0026] 在一些实施方案中,所述制剂的所述鞘内施用导致在脑靶组织、脊髓神经元和 / 或外周靶组织中的溶酶体定位。在一些实施方案中,所述制剂的所述鞘内施用导致硫脑苷酯在所述脑靶组织、脊髓神经元和 / 或外周靶组织中的储存减少。在一些实施方案中,所述硫脑苷酯储存与对照相比,以至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1- 倍、1.5- 倍、或者 2- 倍地减少(例如,在所述受试者中的所述预处理 GAG 储存)。在一些实施方案中,所述制剂的所述鞘内施用导致在神经元中液泡化减少(例如与对照相比,以至少 20%、40%、50%、60%、80%、90%、1- 倍、1.5- 倍、或者 2- 倍地减少)。在一些实施方案中,所述神经元包括浦肯野细胞。

[0027] 在一些实施方案中,所述制剂的所述鞘内施用导致在所述脑靶组织、脊髓神经元和 / 或外周靶组织中的 ASA 酶活性增加。在一些实施方案中,所述 ASA 酶活性与对照相比,以至少 1- 倍、2- 倍、3- 倍、4- 倍、5- 倍、6- 倍、7- 倍、8- 倍、9- 倍或者 10- 倍地减少(例如,在所述受试者中的所述预处理内源性酶活性)。在一些实施方案中,所述增加的 ASA 酶活性微至少大约 10nmol/hr/mg, 20nmol/hr/mg, 40nmol/hr/mg, 50nmol/hr/mg, 60nmol/hr/mg, 70nmol/hr/mg, 80nmol/hr/mg, 90nmol/hr/mg, 100nmol/hr/mg, 150nmol/hr/mg, 200nmol/hr/mg, 250nmol/hr/mg, 300nmol/hr/mg, 350nmol/hr/mg, 400nmol/hr/mg, 450nmol/hr/mg, 500nmol/hr/mg, 550nmol/hr/mg 或者 600nmol/hr/mg。

[0028] 在一些实施方案中,所述 ASA 酶活性在所述腰区中增加。在一些实施方案中,在所述腰区中所述增加的 ASA 酶活性为至少大约 2000nmol/hr/mg, 3000nmol/hr/mg, 4000nmol/hr/mg, 5000nmol/hr/mg, 6000nmol/hr/mg, 7000nmol/hr/mg, 8000nmol/hr/mg, 9000nmol/hr/mg, 或者 10,000nmol/hr/mg。

[0029] 在一些实施方案中,所述制剂的所述鞘内施用导致 MLD 的至少一种症状或特征在强度、严重程度、或者频率方面减少,或者延缓发生。在一些实施方案中,所述 MLD 的所述至少一种症状或特征为:认知障碍;白质病变;在所述脑实质中扩大的血管周围间隙、神经节、胼胝体、和 / 或脑干;萎缩症;和 / 或巨脑室。

[0030] 在一些实施方案中,所述鞘内施用的发生每两个星期一次。在一些实施方案中,所述鞘内施用的发生每月一次。在一些实施方案中,所述鞘内施用的发生每两个月一次。在一些实施方案中,所述鞘内施用被用于连同静脉施用。在一些实施方案中,所述静脉施用没有

比每周一次更频繁。在一些实施方案中,所述静脉施用没有比每两个星期一次更频繁。在一些实施方案中,所述静脉施用没有比每月一次更频繁。在一些实施方案中,所述静脉施用没有比每两个月一次更频繁。在某些实施方案中,所述静脉施用比每月施用更频繁,例如每周两次、每周一次、每隔一周一次、或者每月两次。

[0031] 在一些实施方案中,静脉和鞘内施用在同一天进行。在一些实施方案中,所述静脉和鞘内施用不在彼此的一定时间内执行,例如不执行:在至少 2 天以内、在至少 3 天以内、在至少 4 天以内、在至少 5 天以内、在至少 6 天以内、在至少 7 天以内、或者在至少一周以内。在一些实施方案中,静脉和鞘内施用按照交替的时间表执行,例如每周一次、每隔一周、每月两次或者每月一次交替施用。在一些实施方案中,鞘内施用替代在施用时间表上的静脉施用,例如在每周一次、每隔一周、每月两次或者每月一次的静脉施用时间表上,在该时间表中的每第三次或第四次或第五次施用可以用鞘内施用代替静脉施用。

[0032] 在一些实施方案中,静脉和鞘内施用被连续地执行,例如首先执行静脉施用(例如,每周一次、每隔一周、每月两次或者每月一次,给药为期两周、一个月、二个月、三个月、四个月、五个月、六个月或者一年或者更久),接着 IT 施用(例如,每周一次、每隔一周、每月两次或者每月一次,给药为期多于两周、一个月、二个月、三个月、四个月、五个月、六个月或者一年或者更久)。在一些实施方案中,首先执行鞘内施用(例如,每周一次、每隔一周、每月两次、每月一次、每两个月一次、每隔三个月一次,给药为期两周、一个月、二个月、三个月、四个月、五个月、六个月或者一年或者更久),接着静脉施用(例如,每周一次、每隔一周、每月两次或者每月一次,给药为期多于两周、一个月、二个月、三个月、四个月、五个月、六个月或者一年或者更久)。

[0033] 在一些实施方案中,所述鞘内施用在缺乏静脉施用时使用。

[0034] 在一些实施方案中,所述鞘内施用在缺乏并发免疫抑制疗法时使用。

[0035] 附图简述

[0036] 图 1 图解了在 IV 施用之后,在血清中示例性的芳基硫酸酯酶 A (rhASA) 浓度数据。

[0037] 图 2 图解了在 IT- 腰椎施用之后,在血清中示例性的 rhASA 浓度数据。

[0038] 图 3 图解了在 IV 施用之后,在 CSF 中示例性的 rhASA 浓度。

[0039] 图 4 图解了在 IT- 腰椎施用之后,在 CSF 中示例性的 rhASA 浓度。

[0040] 图 5 图解了缓冲液和 pH 对于 rhASA 热稳定性影响的示例性分析。

[0041] 图 6 图解了在 $40 \pm 2^\circ\text{C}$ 时,在两个星期后, rhASA 示例性的 SDS-PAGE (Coomassie) 分析。

[0042] 图 7 图解了在 5°C 以及 25°C 时,在 3 个月后, rhASA 示例性的 SDS-PAGE (Coomassie) 分析。

[0043] 图 8 描述了在 48 小时的搅拌 (面板 A) 和震动 (面板 B) 之后,示例性的 rhASA 原料药和药物产品外观。

[0044] 图 9 描述了在 48 小时的搅拌之后,示例性的 rhASA 药物产品外观 (没有 P20), 具有 ($n = 2$) 以及不具有顶部空间 ($n = 1$)。

[0045] 图 10 图解了示例性数据,其演示了当用盐酸滴定时, rhASA 原料药与缓冲液对照相比的缓冲能力。

[0046] 图 11 图解了示例性的数据,其演示了当用 1M 氢氧化钠滴定时, rhASA 原料药与缓

冲液对照相比的缓冲能力。

[0047] 图 12 描述了在生理盐水中, pH 6.0 随浓度改变的示例性 rhASA 样品。

[0048] 图 13 图解了在 154mM NaCl, pH 5.9 中, rhASA (pH 5.5 流动相) 的示例性 SEC-HPLC 分析。

[0049] 图 14 图解了在 154mM NaCl, pH 5.9 中, rhASA (pH 7.0 流动相) 的示例性 SEC-HPLC 分析。

[0050] 图 15 图解了在 154mM NaCl, pH 5. 中, rhASA 基线、以及 11 个月稳定性样品的示例性体积排阻属性。

[0051] 图 16 描述了脑组织的示例性显微镜照片, 脑膜, 在处理后的浸润 (中和高剂量组, 两个性别都)。

[0052] 图 17 描述了脑组织的示例性显微镜照片, 脑膜, 在处理后的浸润 (中和高剂量组, 两个性别都)。

[0053] 图 18 描述了脑组织的示例性显微镜照片, 血管周的, 在处理后的浸润 (中剂量雄性; 高剂量雌性)。

[0054] 图 19 描述了用 rhASA 治疗后, 免疫耐受 MLD 小鼠脊髓的示例性 Alcian 蓝染色, 以及描述的示例性结果说明了由 Alcian 蓝染色动物颈部脊髓 (在 1、8、15 和 22 天接受鞘内注射重组 hASA, 剂量为 520mg/kg 的脑重量或媒介物对照) 所确定的硫脑苷酯的减少。正如所表明的那样, 用鞘内注射重组的 hASA 治疗导致硫脑苷酯在所述颈部脊髓中的积累减少。

[0055] 图 20 图解了来自 rhASA 治疗后的免疫耐受 MLD 小鼠的 Alcian 蓝染色脊髓切片的示例性形态计量分析, 包括的示例性结果图解了根据形态计量分析所测定的, 在总脊髓 (T- 脊髓)、总灰质 (T-GM)、腰椎灰质 (L-GM)、颈部灰质 (C-GM)、总白质 (T-WM)、腰椎白质 (L-WM)、以及颈部白质 (C-WM) 中, Alcian 蓝染色的光密度。如其所演示的, 观察到: 在 rhASA 处理的动物中 (与媒介物对照相比), Alcian 蓝染色统计学显著性减少。

[0056] 图 21 描述了用 rhASA 治疗的免疫耐受 MLD 小鼠白质 (海马伞) 中的 LAMP 染色的示例性减少, 并且描述的示例性结果说明了在海马伞中, 如免疫组化法测定的 LAMP-1 水平。放大倍率 = 20X。正如所表明的那样, 用 rhASA 鞘内注射治疗导致在脑白质中 LAMP-1 的减少。

[0057] 图 22 图解了以 rhASA 治疗的免疫耐受 MLD 小鼠脑的 LAMP 染色的示例性形态计量分析, 并且示例性的结果说明了用 20mg/kg 静脉内 rhASA、300mg/kg 脑量鞘内 rhASA、520mg/kg 脑量静脉内的 rhASA 治疗的动物胼胝体 (CC)、海马伞 (F)、小脑白质 (CB-WM) 和脑干 (BS), 或媒介物对照的 LAMP-1 染色强度。

[0058] 图 23 图解了在 EOW IT 给药 (为期 6 个月主要的尸检) 后, 媒介物给药的青少年食蟹猴脑钻孔的 rhASA 的示例性浓度。

[0059] 图 24 图解了在 rhASA 的 EOW IT 给药 (1.8mg/ 剂, 为期 6 个月主要的尸检) 后, 青少年食蟹猴脑钻孔的 rhASA 的示例性浓度。

[0060] 图 25 图解了在 rhASA 的 EOW IT 给药 (6.0mg/ 剂, 为期 6 个月主要的尸检) 后, 青少年食蟹猴脑钻孔的 rhASA 的示例性浓度。

[0061] 图 26 图解了在 rhASA 的 EOW IT 给药 (18.6mg/ 剂, 为期 6 个月主要的尸检) 后, 青少年食蟹猴脑钻孔的 rhASA 的示例性浓度。

[0062] 图 27 图解了在 EOW IT 给药 (PBS- 对照) (为期 6 个月恢复的尸检) 后, 青少年食蟹猴脑钻孔的 ASA 的示例性浓度。

[0063] 图 28 图解了在媒介物的 EOW IT 给药 (为期 6 个月恢复的尸检) 后, 青少年食蟹猴脑钻孔的 rh ASA 的示例性浓度。

[0064] 图 29 图解了在 rh ASA 的 EOW IT 给药 (1.8mg/ 剂, 为期 6 个月恢复的尸检) 后, 青少年食蟹猴脑钻孔的 rh ASA 的示例性浓度。

[0065] 图 30 图解了在 rhASA 的 EOW IT 给药 (6.0mg/ 剂, 为期 6 个月恢复的尸检) 后, 青少年食蟹猴脑钻孔的 rh ASA 的示例性浓度。

[0066] 图 31 图解了在 rhASA 的 EOW IT 给药 (18.6mg/ 剂, 为期 6 个月恢复的尸检) 后, 青少年食蟹猴脑钻孔的 rh ASA 的示例性浓度。

[0067] 图 32 图解了从选定的脑表面钻孔的 rhASA 示例性浓度, 对于设备对照、媒介物、1.8mg、6.0mg 和 18.6mg 处理的动物。(单独的雄性和雌性、设备对照数据从恢复的尸检获得, 所有其它数据从主要的尸检获得)。

[0068] 图 33 图解了从选定的脑深部白质区域钻孔的 rhASA 示例性浓度, 对于设备对照、媒介物、1.8mg、6.0mg 和 18.6mg 处理的动物。(单独的雄性和雌性、设备对照数据从恢复的尸检获得, 所有其它数据从主要的尸检获得)。

[0069] 图 34 图解了从选定的脑深部灰质区域钻孔的 rhASA 示例性浓度, 对于设备对照、媒介物、1.8mg、6.0mg 和 18.6mg 处理的动物。(单独的雄性和雌性、设备对照数据从恢复的尸检获得, 所有其它数据从主要的尸检获得)。

[0070] 图 35 图解了从多个区域选定的钻孔中的 rhASA 示例性浓度, 对于设备对照、媒介物、1.8mg、6.0mg 和 18.6mg 处理的动物。(联合的雄性和雌性, 设备对照数据从恢复的尸检获得, 所有其它数据从主要的尸检获得)。

[0071] 图 36 图解了在 EOW IT 给药 (为期 6- 个月恢复的尸检) 后, 在青少年食蟹猴的脊髓切片中 rhASA 的示例性浓度。

[0072] 图 37 图解了在 EOW IT 给药 (为期 6- 个月恢复的尸检) 后, 在青少年食蟹猴的肝脏中 rhASA 的示例性浓度。

[0073] 图 38 图解了某些脑钻孔的示例性解剖学定位。

[0074] 图 39 图解了某些脑钻孔的示例性解剖学定位。

[0075] 图 40 图解了某些脑钻孔的示例性解剖学定位。

[0076] 图 41 图解了某些脑钻孔的示例性解剖学定位。

[0077] 图 42 图解了某些脑钻孔的示例性解剖学定位。

[0078] 图 43 图解了某些脑钻孔的示例性解剖学定位。

[0079] 图 44A-G 图解了在从成年和青少年食蟹猴的脑组织钻孔提取的组织中, 重组人类芳基硫酸酯酶 A (rhASA) 的浓度, 其被施用媒介物、1.8mg rhASA 或者 18.6mg rhASA。图 44A-G 的每个对应于在图 39 中描述的脑组织区域。

[0080] 图 45A 和 B 图解了在成年和青少年食蟹猴中的所述深部白质 (图 45A) 或者所述深部灰质 (图 45B) 脑组织中测定的重组人类芳基硫酸酯酶 A (rhASA) 的示例性浓度比较, 所述食蟹猴被鞘内地 (IT) 或者脑室内地 (intracerebroventricularly, ICV) 施用 rhASA。

[0081] 图 46A 图解了自青少年 (年龄 <12 个月龄) 食蟹猴 (IT- 施用 18.6 或 1.8mg 剂量

的重组人类芳基硫酸酯酶 A (rhASA)) 钻孔的多个组织检测到的 rhASA 浓度。如图在 40A-B 二者中所示,递送到所述组织的 rhASA 浓度在 2.5mg/mg 蛋白质之内、或否则超过其的目标治疗浓度。所述脑组织的所述解剖区域对应的每一个在图 46A 和图 46B 所示的钻孔编号: 皮层下的白质 (1); 脑室周围白质和深部白质 (2); 皮层下的白质 (3); 皮层下的白质 (4); 内囊 (5); 内囊尾状核 (6); 深部白质 (7); 皮层下的白质和皮质 (8); 豆状核 (9); 颞皮层下的白质和皮质 (10), 深部灰质 (11), 深部灰质 (12), 额叶脑室周围 & 皮层下的 (13); 皮层下的白质, 皮质表面的 periaxial (14); 胼胝体和胼胝体周围皮层下的白质 (15); 深部皮层下的白质 (16); 深部灰质 (17); 深部灰质 (18); 脑室周围白质 (19); 深部皮层下的白质 (20); 海马 (21); 胼胝体 (22); 深部白质 (23); 皮层下的白质, 枕骨脑叶 (24); 以及小脑白质 (25)。

[0082] 图 47A 图解了从 IT- 施用 1.8mg rhASA 的食蟹猴提取的深部白质组织区域。图 47B 图解了所述深部白质组织的免疫染色, 以及在相关组织中 rhASA 的分布。图 47C 图解了所述 IT- 施用 rhASA, 其显示了: 在食蟹猴深部白质组织的细胞器共定位, 特别是在溶酶体中。在图 47C 中, 所述 ASA 免疫染色在所述顶部左侧方框中指出。

[0083] 图 48 比较了: 在 IT- 或者 ICV- 施用这种标记的 rhASA 至食蟹猴之后的 24 小时, ^{124}I - 标记的芳基硫酸酯酶 A (rhASA) 的分布 (使用 PET 扫描)。

[0084] 图 49 图解了在紧随 ICV 施用至食蟹猴之后 ^{124}I - 标记的 ASA 的分布, 并且比较了 IT- 施用的 ^{124}I - 标记的 ASA 在 2-5 小时以内的分布。如所演示的, IT 施用递送所述 ^{124}I - 标记的 ASA 至与所述 ICV 施用显示的相同的初始房室 (池和近端脊柱)。

[0085] 图 50 描述了在小鼠模型中, 示例性的 ICV 和 IT 施用。

[0086] 图 51 描述了示例性的鞘内药物递送设备 (IDDD)。

[0087] 图 52 描述了示例性的 PORT-A-CATH[®] 低调鞘内植入入口系统 (low profile intrathecal implant access system)。

[0088] 图 53 描述了示例性的鞘内药物递送设备 (IDDD)。

[0089] 图 54 描述了示例性的鞘内药物递送设备 (IDDD), 其允许在家施用以进行 CNS 酶替代治疗 (ERT)。

[0090] 图 55 图解并给出了具有固定机构的鞘内药物递送设备 (IDDD) 的示意图。

[0091] 图 56 描述了在患者体内 IDDD 可能被放置的示例性定位; 图 56B 描绘了鞘内药物递送设备 (IDDD) 的多种组件; 以及图 56C 描述了在 IT- 腰椎注射的患者体内的示例性插入位置。

[0092] 定义

[0093] 为了使本发明更容易被理解, 某些术语在下文首先被定义。下面的术语和其它术语的其它定义在整个说明书提出。

[0094] 约或者大约: 如本文使用的, 所述术语“约”或者“大约,” 如应用于一个或多个感兴趣的值, 其是指与规定的参考值相似的值。在某些实施方案中, 所述术语“约”或者“大约”是指某范围的值, 其落入所述规定的参考值在任意方向上 (大于或小于) 的 25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、或更小以内, 除非另有说明或以其他方式明显从上下文得出 (除非其中该数字将超过 100% 的可能值)。

[0095] 转佳：如本文使用的，所述术语“转佳”意思是状态的预防、减轻或者缓减，或者受试者状态的改善。转佳包括，但是不要求病情的痊愈或彻底的预防。在一些实施方案中，转佳包括相关蛋白质的水平或其活性的增加，所述相关蛋白质在相关疾病组织中缺乏。

[0096] 生物活性：：如本文使用的，所述短语“生物活性”是指在生物系统中具有活性的任何实际的特性，并且特别地在生物体中。例如，当将试剂施用到生物体中，所述试剂对生物体具有生物效应，这被认为是生物活性。在特别的实施方案中，当蛋白质或多肽是生物活性的，该部分的蛋白或多肽将享有至少所述蛋白或多肽的一种生物活性，这通常被称为“生物活性”部分。

[0097] 填充剂：如本文使用的，所述术语“填充剂”是指复合物，其为冻干混合物添加质量，并且有助于所述冻干块状物的物理结构（例如促进基本均匀的冻干块状物的生产，使其保持了开放的孔隙结构）。示例性的填充剂包括甘露醇、甘氨酸、氯化钠、羟乙基淀粉、乳糖、蔗糖、海藻糖、聚乙二醇和葡萄聚糖。

[0098] 阳离子依赖型甘露糖-6-磷酸受体 (CI-MPR)：如本文使用的，所述术语“阳离子依赖型甘露糖-6-磷酸受体 (CI-MPR)”是指细胞受体，所述细胞受体在高尔基体中，在酸水解酶前体上结合甘露糖-6-磷酸 (M6P) 标签，并被注定运输到所述溶酶体。除了甘露糖-6-磷酸，所述 CI-MPR 也结合其他蛋白质，包括 IGF-II。所述 CI-MPR 也被称为“M6P/IGF-II 受体”、“CI-MPR/IGF-II 受体”、“IGF-II 受体”或者“IGF2 受体”。这些术语和其省略语在本文中互换使用。

[0099] 并发免疫抑制疗法：如本文使用的，所述术语“并发免疫抑制疗法”包括作为预处理、预调节或者与治疗方法平行的任意免疫抑制疗法。

[0100] 稀释剂：如本文使用的，所述术语“稀释剂”是指药理学上可接受的（例如对施用到人类是安全的和非毒性的）稀释物质，其对于重组制剂的制备是有效的。示例性的稀释剂包括无菌水、注射用制菌水 (BWF1)、pH 缓冲溶液（例如磷酸盐-缓冲盐水）、无菌生理盐水、林格式溶液或者右旋糖溶液。

[0101] 剂型：如本文使用的，所述术语“剂型”和“单位剂型”是指待治疗患者的治疗蛋白质的物理上分离的单位。每个单位含有预定量的经计算产生预期治疗效果的活性材料。可以理解，尽管如此，所述组合物的总剂量可以被由主治医生根据合理的医学判断决定。

[0102] 酶替代治疗 (ERT)：如本文使用的，所述术语“酶替代治疗 (ERT)”是指任意的治疗策略，其可以通过所述丢失的酶以纠正酶缺乏。在一些实施方案中，所述丢失的酶通过鞘内施用提供。在一些实施方案中，所述丢失的酶通过注入到血流中提供。一旦施用，酶被细胞吸收，并运输到所述溶酶体，在所述溶酶体中所述酶发挥清除由于酶缺乏而累积在所述溶酶体中的材料。通常，为了使溶酶体酶替代治疗有效，所述治疗酶被递送到在靶组织合适的细胞中的溶酶体（在所述组织中所述贮积缺陷是明显的）。

[0103] 改善、增加、或者减少：如本文使用的，所述术语“改善”、“增加”或者“减少”或语法等价表达，包括相对于基线测量的值，例如在开始本文所描述的处理之前在相同个体中的测量，或者在缺乏本文所描述的处理的对照个体（或者多个对照个体）中的测量。“对照个体”是这样的个体：其受到与所述正被治疗的个体相同形式的溶酶体贮积症的折磨，并且其与所述治疗个体年龄相同（以确保在所述正被治疗的个体和所述对照个体之间所述疾病所处的阶段是可比性的）。

[0104] 个体、受试者、患者：如本文使用的，所述术语“受试者”、“个体”或者“患者”是指人类或者非人类的哺乳动物受试者。所述正被治疗的个体（也称为“患者”或者“受试者”）是患有疾病的个体（胎儿、婴儿、儿童、青少年、成人）。

[0105] 鞘内施用：如本文使用的，所述术语“鞘内施用”或者“鞘内注射”是指注射进入所述脊椎管（在所述脊髓周围的鞘内空间）。多种技术可以使用，包括但不限于，侧脑室注射（通过钻孔或小脑延髓池或腰椎穿刺或诸如此类）。在一些实施方案中，根据本发明的“鞘内施用”或“鞘内递送”是指 IT 施用或者递送（通过腰部或腰区），即腰椎 IT 施用或者递送。如本文使用的，所述术语“腰区”或“腰部”是指在所述第三和第四腰椎（下背部）骨之间的区域，更包含所述脊椎的 L2-S1 区域。

[0106] 连接体：如本文使用的，所述术语“连接体”是指，在融合蛋白中，不同于在天然蛋白质中在特定位点出现的氨基酸序列，并且通常设计成柔性的或插入到在两个蛋白质部分之间的结构中（例如 α -螺旋）。连接体也被称为间隔区。

[0107] 冻干保护剂：如本文使用的，所述术语“冻干保护剂”是指这样的分子：其防止或减少蛋白质或其它物质在经过冷冻干燥和后续储存中的化学和/或物理的不稳定性。示例性的冻干保护剂包括糖（例如蔗糖或海藻糖）；氨基酸（例如氨基酸（例如谷氨酸一钠或组氨酸））；甲胺（例如甜菜碱）；感胶离子盐（硫酸镁）；多元醇（例如三价或更高的糖醇，例如甘油、赤藻糖醇、甘油、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露醇）；丙二醇；聚乙二醇；普流罗尼类；及其组合。在一些实施方案中，冻干保护剂是非还原糖，例如海藻糖或蔗糖。

[0108] 溶酶体酶：如本文使用的，所述术语“溶酶体酶”是指任意的酶，其能够在哺乳动物溶酶体中累积的材料，或者能使一种或多种溶酶体贮积症症状得到拯救或转佳。适合于本发明的溶酶体酶包括野生类型的或者修饰的溶酶体酶，并能使用重组和合成的方法制备，或者从天然来源中纯化。示例性的溶酶体在表 1 中列出。

[0109] 溶酶体酶缺乏：如本文使用的，“溶酶体酶缺乏”是指一组遗传性疾病，其由于至少一种酶的缺乏所导致，所述酶是在溶酶体中将大分子（例如酶底物）裂解成肽、氨基酸、单糖、核酸和脂肪酸所需要的。结果，患有溶酶体酶缺乏症的个体在多种组织（例如 CNS、肝脏、脾脏、肠、血管壁和其它器官）中具有累积的材料。

[0110] 溶酶体贮积症：如本文使用的，所述术语“溶酶体贮积症”是指导致一种或多种溶酶体酶缺乏的任意疾病，所述溶酶体酶是代谢天然大分子所需要的。这些疾病通常导致在溶酶体中未降解分子的累积，导致贮藏粒（术语也称为储存囊泡）数量的增加。这些疾病和多种实施例在下文详细地被描述。

[0111] 多肽：如本文使用的，“多肽”，一般而言，是指由至少两个氨基酸彼此通过肽键连接成一串。在一些实施方案中，多肽包括至少 3-5 个氨基酸，其中每个通过至少一个肽键的方式与其余的连接。那些在本领域的普通技术人员会意识到有时多肽包括“非天然”氨基酸或者任选的、其它仍然能合并到多肽链中的其它实体。

[0112] 替代酶：如本文使用的，所述术语“替代酶”是指任意的酶，其能发挥作用以替代至少部分的所述（在待治疗的疾病中）缺乏或丢失的酶。在一些实施方案中，所述术语“替代酶”是指任意的酶，其能发挥作用以替代至少部分的所述（在待治疗的溶酶体贮积症中）缺乏或丢失的溶酶体酶。在一些实施方案中，替代酶能减少在哺乳动物溶酶体中累积的材料，或者其能拯救或改善一种或多种溶酶体贮积症症状。适合于本发明的替代酶包括野生类型

或者修饰的溶酶体酶,并且能使用重组和合成的方法制备或者从天然来源中纯化。替代酶可以是重组的、合成的、基因活化的或者天然的酶。

[0113] 可溶性:如本文使用的,所述术语“可溶性”是指治疗试剂形成均匀的溶液的能力。在一些实施方案中,所述治疗试剂在所述溶液中的可溶性(其在所述溶液中被施用,并且通过它运输到作用的靶向位点(例如所述脑的所述细胞和组织))是足够的,以允许递送治疗有效量的治疗世界至作用的靶向位点。几种因素可以影响所述治疗试剂的可溶性。例如,可能影响蛋白质可溶性的相关因素包括离子强度、氨基酸序列和存在其它共溶剂或者盐(例如钙盐)。在一些实施方案中,所述药物组合物被配制,使得所述钙盐从这种组合物中排除。在一些实施方案中,依照本发明的所述试剂是在对应的组合物中可溶性的。可以理解,当等渗溶液通常对于肠胃外施用药物是优选的,使用等渗溶液可能限制一些治疗世界充分的溶解性,特别是某些蛋白质和/或酶。已经表明,轻微高渗溶液(例如高达175mM氯化钠,在5mM磷酸钠中,pH 7.0)和含糖溶液(例如高达2%蔗糖,在5mM磷酸钠中,pH 7.0)在猴中具有良好的耐受性。例如,最常见的批准的CNS推注制剂组合物是生理盐水(在水中150mM NaCl)。

[0114] 稳定性:如本文使用的,所述术语“稳定的”是指所述治疗试剂在较长期间保持其治疗效果(例如所有的或者大部分的其预期生物活性和/或理化完整性)的能力。所述治疗试剂的稳定性,以及所述药物组合物保持这种治疗试剂的稳定性能力,可以在延长的时间周期内进行评估(例如至少1、3、6、12、18、24、30、36月或更久)。通常,本文描述的药物组合物已经被配制,可以使得其能稳定、或者作为选择减慢或阻止与之相配制的一种或多种治疗试剂(例如重组蛋白质)的所述降解。在配制的情况下,稳定的制剂是一种,在这种制剂中所述治疗试剂在储存和在加工过程中(例如冷冻/融化,机械混合和冻干),基本保持其物理的和/或化学完整性和生物活性。对于蛋白质稳定性,其可以通过形成高分子量(HMW)聚集物酶活性损失、肽片段形成和电荷转移性能进行测量。

[0115] 受试者:如本文使用的,所述术语“受试者”意思是任意的哺乳动物,包括人类。在本发明的某些实施方案中,所述受试者是成年人、青少年或者婴儿。本发明也考虑了所述药物组合物的施用、和/或子宫内治疗方法的性能。

[0116] 基本的同源性:本文使用的所述短语“基本的同源性”是指,在氨基酸或核酸序列之间的比较。如本领域的普通技术人员的理解,两条序列通常会被认为“基本同源”,如果它们在对应的位点含有同源的残基。同源的残基可以是相同的残基。可选择的,同源的残基也可以是不相同的残基,其具有合适的相似结构和/或功能特性。例如,如本领域的普通技术人员所已知的,某些氨基酸通常被分类为“疏水的”或者“亲水的”氨基酸,和/或具有“极性”或“非极性|”侧链。一个氨基酸取代另一个相同类型的氨基酸,通常被认为是“|同源”取代。

[0117] 众所周知在本领域技术中,氨基酸或者核酸序列可以使用多种算法比较,包括商业计算机程序,例如核酸序列的BLASTN,氨基酸序列的BLASTP、间隙BLAST(gapped BLAST)和PSI-BLAST。示例性的这种程序在这些文献中进行了描述:Altschul,等,Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3):403-410, 1990; Altschul,等, *Methods in Enzymology*; Altschul,等,“Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997;

Baxevanis, et al., *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998; and Misener, 等, (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132)*, Humana Press, 1999. 除了识别同源序列, 上述提及的所述程序通常提供同源性的指示。在一些实施方案中, 两个序列被认为基本同源, 如果他们相应残基的至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多在相关延伸的残基之间是同源的。在一些实施方案中, 所述相关延伸是完全的序列。在一些实施方案中, 所述相关延伸是至少 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500 或更多残基。

[0118] 基本一致性: 本文使用的所述短语“基本一致性”是指在氨基酸或者核酸序列之间的比较。如本领域的普通技术人员所理解的, 两条序列通常会被认为是“基本一致的”, 如果它们在相应的位点含有一致的残基。众所周知在本领域技术中, 氨基酸或者核酸序列可以使用多种算法中的任意一个进行比较, 包括在商业计算机中的程序, 例如核酸序列的 BLASTN, 以及氨基酸序列的 BLASTP、间隙 BLAST (gappedBLAST) 和 PSI-BLAST。示例性的这种程序在下述的文献中进行了描述: Altschul, 等, *Basic local alignment search tool*, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410, 1990; Altschul, 等, *Methods in Enzymology*; Altschul 等, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, 1997; Baxevanis et al., *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998; and Misener, 等, (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132)*, Humana Press, 1999. 除了识别这些一致的序列, 上文所提及的所述程序通常提供了一致性程度的指示。在一些实施方案中, 所述序列被认为是基本一致的, 如果他们相应残基的至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多在相关延伸的残基之间是一致的。在一些实施方案中, 所述相关延伸是完全的序列。在一些实施方案中, 所述相关延伸是至少 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500 或更多残基。

[0119] 合成的 CSF: 如本文使用的, 所述术语“合成的 CSF”是指具有与脑脊髓液一致的 pH、电解质组成、葡萄糖含量和渗透压的溶液。合成的 CSF 也被称为人工 CSF。在一些实施方案中, 合成的 CSF 是 Elliott's B 溶液。

[0120] 适合于 CNS 递送: 如本文使用的, 所述短语“适合于 CNS 递送”或者“适合于鞘内递送”是指本发明的所述药物组合物, 通常是指这些组合物的稳定性、耐受性和可溶性性能, 以及这些组合物递送有效量的含于其中的治疗试剂至递送靶向位点 (例如所述 CSF 或者所述脑) 的能力。

[0121] 靶组织: 如本文使用的, 所述术语“靶组织”是指受到待治疗的所述溶酶体贮积症影响的任意组织, 或者在其中所述缺乏的溶酶体酶正常表达。在一些实施方案中, 靶组织包括这些组织, 在其中具有可检测的或者异常高量的酶底物 (例如储存在所述组织的所述细胞溶酶体中), 在患有或者易患有溶酶体贮积症的患者中。在一些实施方案中, 靶组织包括这些组织: 其表现疾病相关病理、症状或特征。在一些实施方案中, 靶组织包括这些组织: 在其中所述缺乏的溶酶体酶以升高的水平正常表达。如本文使用的, 靶组织可以是脑部靶

组织、脊髓靶组织和 / 或周边靶组织。示例性的靶组织在下文详细描述。

[0122] 治疗部分 :如本文使用的,所述术语“治疗部分”是指部分的分子,其为所述分子提供治疗效果。在一些实施方案中,治疗部分是具有治疗活性的多肽。

[0123] 治疗有效量 :如本文使用的,所述术语“治疗有效量”是指治疗性蛋白质(例如替代酶)的量,其给予所述治疗的受试者治疗效果,以合理的效益 / 风险比率(适合于任意的医疗)。所述治疗效果可以是客观的(例如通过某种测试或者标记物测量)或主观的(例如受试者给出的效果的指示或感觉)。特别地,所述“治疗有效量”是指某种量的治疗蛋白质或者组合物有效治疗、改善或者阻止预期的病或者病情,或者表现可检测的治疗或者预防效果(例如通过改善疾病相关症状、阻止或者延缓所述疾病的发生、和 / 或减少所述疾病的严重程度或频率)。在给药方案上的治疗有效量通常施用,可以包括多种单位剂量。对任何特定治疗蛋白质,治疗有效量(和 / 或在有效给药方案内的合适的单位剂量)会有所不同,例如,根据施用途径、以及其它药物试剂。而且,任何特定患者的所述特定的治疗有效量(和 / 或单位剂量)可以根据多种因素改变,包括被治疗的疾病和所述疾病的严重程度;所采用的特定药物试剂的活性;所采用的特定组合物;所述患者的年龄、体重、一般健康、性别和饮食;施用时间;施用途径;和 / 或所采用的特定融合蛋白的排泄和代谢;所述治疗持续的时间;以及在医药领域已知的类似因素。

[0124] 可容忍的 :如本文使用的,所述术语“可容忍的”和“耐受性”是指本发明的药物组合物在所述受试者(所述的这些受试者是指被施用组合物的受试者)中不引发有害反应的能力,或者可选择地在所述受试者(所述的这些受试者是指被施用组合物的受试者)中不引发严重的有害反应的能力。在一些实施方案中,本发明所述药物组合物可以被所述受试者(所述受试者是指被施用组合物的受试者)良好地容忍。

[0125] 治疗 :如本文使用的,所述术语“治疗”(也称为“处理”或“治疗”)是指任意施用的治疗性蛋白质(例如溶酶体酶),其部分地或者完全地缓解、改善、减轻、已知或者延缓发生,减少严重程度和 / 或减少(特定疾病、紊乱和 / 或病情(例如 Hunters 综合症、Sanfilippo 综合症类型 B 的)一种或多种症状或特征的发生率。这种治疗可以是这样的受试者(其不表现相关的疾病、紊乱和 / 或病情的体征),和 / 或这样的受试者(其仅仅表现相关的疾病、紊乱和 / 或病情的早期体征)。可选择地或者额外地这种治疗可以是这样的受试者,其表现所述相关的疾病、紊乱和 / 或病情的一种或多种已建立的体征。

[0126] 发明详述

[0127] 本发明提供了,此外,改善的方法和组合物用于有效直接递送治疗试剂至所述中枢神经系统(CNS)。如上文所讨论的,本发明基于意外的发现:溶酶体贮积症(例如,异染性脑白质营养不良)的替代酶(例如 ASA 蛋白质)可以以高浓度直接引入到有需要治疗的受试者的所述脑脊髓液(CSF)中,而在受试者中不诱发实质性副作用。更加出乎意料的是,本发明人发现:所述替代酶可以在简单的生理盐水或者缓冲液基础制剂中递送,而不使用合成的 CSF。甚至更出乎意料的是,根据本发明的鞘内递送在所述受试者中不导致实质性副作用,例如严重的免疫应答。因此,在一些实施方案中,根据本发明的鞘内递送可以在缺乏并发免疫抑制疗法时使用(例如通过预处理或者预调节不诱发免疫耐受性)。

[0128] 在一些实施方案中,根据本发明的鞘内递送允许在多种脑组织间的有效扩散,导致所述替代酶在在表面、浅部和 / 或深部的脑区域中多种靶脑组织中的有效递送。在一些

实施方案中,根据本发明的鞘内递送产生充分量的替代酶进入所述外周循环。结果,在某些情况下,根据本发明的鞘内递送导致所述替代酶在外周组织中的递送,例如肝脏、心脏、脾脏和肾脏。该发现是预料之外的,并且可以是对具有 CNS 和外周组件的所述溶酶体贮积症的治疗特别有用,其通常需要常规鞘内施用和静脉施用。这也是想到的:根据本发明的鞘内递送可以允许减少给药和 / 或 iv 注射的频率,而不损害周边症状治疗的治疗效果。

[0129] 本发明提供了多种意外的和有益的特征,其允许替代酶有效和便捷地递送至多种脑靶组织,导致具有 CNS 指示的溶酶体贮积症的有效治疗。

[0130] 本发明的多个方面在下面章节进行详细描述。所述章节的使用不是打算限制本发明。每章节可以应用于本发明的任意方面。在这份申请中,使用“或者”意思是“和 / 或”,除非另有声明。

[0131] 治疗性蛋白质

[0132] 在一些实施方案中,本发明提供的发明方法和组合物用于递送芳基硫酸酯酶 A (ASA) 蛋白质至所述 CNS,以治疗异染性脑白质营养不良。合适的 ASA 蛋白质可以是任意的某分子或者某分子的部分,其适合于天然发生的芳基硫酸酯酶 A (ASA) 蛋白质活性或者拯救与 ASA- 缺陷症并发的一种或多种表现型或症状。在一些实施方案中,适合于本发明的替代酶具有多肽的 N- 末端、C- 末端和氨基酸序列与成熟人类 ASA 蛋白质基本相似或者一致。

[0133] 通常地,人类 ASA 作为前体分子制备,所述前体分子被加工至成熟形式。这种加工通常通过去除所述 18 氨基酸信号肽而发生。通常地,所述前体形式也称为全长前体或者全长 ASA 蛋白质,其含有 507 个氨基酸。所述 N- 末端的 18 个氨基酸被裂开,形成长度为 489 个氨基酸的成熟形式。因此,可以设想,所述 N- 末端的 18 个氨基酸通常不是所述 ASA 蛋白质活性所必需的。所述成熟形式 (SEQ ID NO:1) 的所述氨基酸序列,和典型野生型或天发生的人类 ASA 蛋白质的全长前体 (SEQ ID NO:2) 在表 1 中示出。

[0134] 表 1. 人类芳基硫酸酯酶 A

[0135]

成熟形式	RPPNIVLIFADDLGYDGLGCGHPSSTTPNLDQLAAGGLRFTDFYVPSLCTPSRAALLTGRPLVRMGMPGVLVPSSRGGLPLEEVTVAEVLAAARGYLTMAGKWHLGVGPEGAFLLPHQGFHRFLGIPYSHDQGPCQNLTCFPPATPCDGGCDQGLVPIPLLANSVEAQPWPGLPGLARYMAFAHDLMA DAQRQRPFLLYYASHHHTYPQFSGQSFAERSGRGPFGLDLMELDAAVGLMTAIGDLGLEETLVIFTADNGPETMRMSRGGCSGLLRGKGTTYEGGVREPALAFWPGHIAPGVTHELASSDLLP TLAALAGAPLPNVTLDGFDLSPLLLGTGKSPRQSLFFYPSYPDEVRGVFAVRTGKYKAHFFTQG SAHSDTTADPACHASSSLTAHEPPLLYDLKDPGENYNLLGGVAGATPEVLQALKQLQLLKAQL DAAVTFGPSQVARGEDPALQICCHPGCTPRPACCHCPDPA (SEQ ID NO:1)
全长前体	MGAPRSLLLALAAGLAVARPPNIVLIFADDLGYDGLGCGHPSSTTPNLDQLAAGGLRFTDFYV PVS LCTPSRAALLTGRLPVRMGMPGVLVPSSRGGLPLEEVTVAEVLAAARGYLTMAGKWHLGV GPEGAFLLPHQGFHRFLGIPYSHDQGPCQNLTCFPPATPCDGGCDQGLVPIPLLANSVEAQPWP WPLPGLARYMAFAHDLMADAQRQRPFLLYYASHHHTYPQFSGQSFAERSGRGPFGLDLMELDA AVGLTMTAIGDLGLEETLVIFTADNGPETMRMSRGGCSGLLRGKGTTYEGGVREPALAFWPG

[0136]

HIAPGVTHELASSLDLLPTLAALAGAPLPNVTLDGFDLSPLLLGTGKSPRQSLFFYPSPDEVR GVFAVRTGKYKAHFFTQGSASDTTADPACHASSSLTAHEPPLLYDLKDPGENYNLLGGVAGA TPEVLQALKQLQLLKAQLDAAVTFGPSQVARGEDPALQICCHPGCTPRPACCHCPDPHA (SEQ ID NO:2)

[0137] 因此, 在一些实施方案中, 适合于本发明的治疗部分为成熟人类 ASA 蛋白质 (SEQ ID NO:1)。在一些实施方案中, 合适的治疗部分可以是成熟人类 ASA 蛋白质的同源物或者类似物。例如, 成熟人类 ASA 蛋白质的同源物或者类似物可以是修饰的成熟人类 ASA 蛋白质, 其含有一个或多个氨基酸替换、删除、和 / 或插入, 与野生型或天然发生的 ASA 蛋白质 (例如, SEQ ID NO:1) 相比, 同时保留基本的 ASA 蛋白质活性。因此, 在一些实施方案中, 适合于本发明的治疗部分与成熟人类 ASA 蛋白质 (SEQ ID NO:1) 基本同源。在一些实施方案中, 适合于本发明的治疗部分具有的氨基酸序列与 SEQ ID NO:1 至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多地同源。在一些实施方案中, 适合于本发明的治疗部分与成熟人类 ASA 蛋白质 (SEQ ID NO:1) 基本一致。在一些实施方案中, 适合于本发明的治疗部分具有的氨基酸序列与 SEQ ID NO:1 至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多地一致。在一些实施方案中, 适合于本发明的治疗部分含有成熟人类 ASA 蛋白质的片段或者部分。

[0138] 可选择地, 适合于本发明的替代酶为全长 ASA 蛋白质。在一些实施方案中, 合适的替代酶可以是全长人类 ASA 蛋白质同源物或类似物。例如, 全长人类 ASA 蛋白质同源物或类似物可以是修饰的全长人类 ASA 蛋白质, 其含有一个或多个氨基酸替换、删除、和 / 或插入, 与野生型或天然发生的全长 ASA 蛋白质 (例如, SEQ ID NO:2) 相比, 同时保留基本的 ASA 蛋白质活性。因此, 在一些实施方案中, 适合于本发明的替代酶与全长人类 ASA 蛋白质 (SEQ ID NO:2) 基本同源。在一些实施方案中, 适合于本发明的替代酶具有的氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多地同源。在一些实施方案中, 适合于本发明的替代酶与 SEQ ID NO:2 基本一致。在一些实施方案中, 适合于本发明的替代酶具有的氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多地一致。在一些实施方案中, 适合于本发明的替代酶含有全长人类 ASA 蛋白质的片段或者部分。如本文所使用的, 全长 ASA 蛋白质通常地含有信号肽序列。

[0139] 在一些实施方案中, 治疗性蛋白质包括靶向部分 (例如, 溶酶体靶序列) 和 / 或穿膜肽。在一些实施方案中, 定向序列和 / 或穿膜肽是治疗部分的内在部分 (例如, 通过化学键, 通过融合蛋白质)。在一些实施方案中, 定向序列含有甘露糖 -6- 磷酸盐部分。在一些实施方案中, 定向序列含有 IGF-I 部分。在一些实施方案中, 定向序列含有 IGF-II 部分。

[0140] 其它溶酶体贮积症和替代酶

[0141] 可以设想的是, 根据本发明发明的方法和组合物可以用治疗其它溶酶体贮积症, 特别是具有 CNS 病因和 / 或症状的溶酶体贮积症, 包括但不限于: 天冬氨酰葡萄糖胺尿症、胆固醇脂沉积病, 沃尔曼病、胱氨酸病、Danon 病、法布里病、Farber 脂肪肉芽肿病、Farber 病, 墨角藻糖苷酶缺乏病、半乳糖唾液酸沉积症 I/II 型、戈谢病类型 I/II/III、球细胞脑白

质营养不良、克拉伯病、糖原贮积症 II、庞贝氏症、GM1- 神经节苷脂沉积症类型 I/II/III、GM2- 神经节苷脂沉积症类型 I、泰 - 萨克斯病、GM2- 神经节苷脂沉积症类型 II、桑德霍夫病、GM2- 神经节苷脂沉积症、 α -甘露糖苷过多症类型 I/II、 β -甘露糖苷过多症、异染性脑白质营养不良、粘脂糖症类型 I、唾液酸沉积症类型 I/II、唾液酸沉积症类型 II/III、I- 细胞病、粘脂糖症类型 III C 假胡尔勒氏多种营养不良、黏多糖贮积症类型 I、黏多糖贮积症类型 II、黏多糖贮积症类型 IIIA、Sanfilippo 综合症、黏多糖贮积症类型 IIIB、黏多糖贮积症类型 IIIC、黏多糖贮积症类型 IIID、黏多糖贮积症类型 IVA、莫基奥综合症、黏多糖贮积症类型 IVB、黏多糖贮积症类型 VI、黏多糖贮积症类型 VII、Sly 综合症、黏多糖贮积症类型 IX、多种硫酸酯酶缺乏症、神经元蜡样脂褐质沉积症、CLN1Batten 病、CLN2Batten 病、尼曼匹克病类型 A/B、尼曼匹克病类型 C1、尼曼匹克病类型 C2、致密性成骨不全症、Schindler 病类型 I/II、戈谢病和唾液酸贮积病。

[0142] 所述溶酶体贮积症的遗传病因、临床表现和分子生物学的详细评论可以详参于 Scriver et al., eds., The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 7. sup. th Ed., Vol. II, McGraw Hill, (1995). 因此,在上文的疾病中的酶缺乏对本领域的普通技术人员是已知的,其中一些在表 2 中示出:

[0143] 表 2

[0144]

疾病名称	酶缺乏	贮积的物质
庞贝氏症	酸性 α -1,4 葡萄糖苷酶	糖原 α 1-4 连接的寡糖
GM1 Gangliosidosis	β -半乳糖苷酶	GM ₁ 神经节苷脂
泰-萨二氏病 (Tay-Sachs Disease)	β -氨基己糖苷酶 A	GM ₂ 神经节苷脂
GM2 神经节苷脂沉积症: AB 变异型	GM ₂ 激活蛋白	GM ₂ 神经节苷脂
桑德霍夫病	β -氨基己糖苷酶 A&B	GM ₂ 神经节苷脂
法布里病	α -半乳糖苷酶 A	红细胞糖苷酯
戈谢病	葡糖脑苷脂酶	葡糖苷(脂)酰鞘氨醇
异染性脑白质营养不良	芳基硫酸酯酶 A	硫脑苷酯[类]
克拉伯病	半乳糖(基)神经酰胺酶	半乳糖脑苷脂
尼曼匹克病, 类型 A & B	酸性鞘磷脂酶	(神经)鞘磷脂
尼曼匹克病, 类型 C	胆固醇酯化缺陷	(神经)鞘磷脂
尼曼匹克病, 类型 D	未知的	(神经)鞘磷脂
Farber 病	酸性神经酰胺酶	神经酰胺
沃尔曼病	酸性脂酶	胆固醇酯
赫尔利综合症 (MPS IH)	α -L-艾杜糖苷酸酶	乙酰肝素&硫酸皮肤素
沙伊综合症 (MPS IS)	α -L-艾杜糖苷酸酶	乙酰肝素&皮肤素、硫酸盐
Hurler-Scheie (MPS IH/S)	α -L-艾杜糖苷酸酶	乙酰肝素& 硫酸皮肤素
亨特综合症 (MPS II)	艾杜糖醛酸硫酸酯酶	乙酰肝素&硫酸皮肤素
Sanfilippo A (MPS IIIA)	乙酰肝素 N-硫酸酯酶	硫酸乙酰肝素
Sanfilippo B (MPS IIIB)	α -N-乙酰葡糖胺糖苷酶	硫酸乙酰肝素

[0145]

Sanfilippo C (MPS IIIC)	乙酰-CoA-氨基葡萄糖苷乙酰转移酶	硫酸乙酰肝素
Sanfilippo D (MPS IIID)	N-乙酰氨基葡萄糖-6-硫酸酯酶	硫酸乙酰肝素
Morquio B (MPS IVB)	β -半乳糖苷酶	硫酸角质素
Maroteaux-Lamy (MPS VI)	芳香基硫酸酯酶 B	硫酸皮肤素
Sly 综合症 (MPS VII)	β -葡萄糖醛酸酶	
α -甘露糖苷过多症	α -甘露糖苷酶	甘露糖/寡糖
β -甘露糖苷过多症	β -甘露糖苷酶	甘露糖/寡糖
墨角藻糖苷酶缺乏病	α -L-岩藻糖苷酶	岩藻糖基化寡糖
天冬氨酰葡萄糖胺尿症	N-天冬氨酰基- β -氨基葡萄糖苷酶	天冬氨酰基氨基葡萄糖天门冬氨酸
唾液酸沉积症(粘脂糖症 I)	α -唾液酸苷酶	唾液酸寡糖
半乳糖唾液酸沉积症 (Goldberg 综合症)	溶酶体保护蛋白缺乏症	唾液酸寡糖
Schindler 病	α -N-乙酰-半乳糖苷酶	
粘脂糖症 II (I-细胞病)	N-乙酰氨基葡萄糖-1-磷酸转移酶	硫酸乙酰肝素
粘脂糖症 III (假胡尔勒氏多种营养不良)	同 ML II	
胱氨酸病	胱氨酸转运蛋白	游离胱氨酸
Salla 病	唾液酸转运蛋白	游离唾液酸和葡萄糖醛酸
小儿唾液酸贮积病 (infantile sialic acid storage disease)	唾液酸转运蛋白	游离唾液酸和葡萄糖醛酸
小儿神经元蜡样脂褐质沉积症	棕榈酰-蛋白硫酯酶	脂褐质
粘脂糖症 IV	未知的	神经节苷脂& 透明质酸
鞘脂激活蛋白原	皂化蛋白 (saposin) A、B、C 或者 D	

[0146] 根据本发明发明的方法可以用于递送任何替代酶。如本文使用的,适合于本发明的替代酶可以包括任何替代酶,其能发挥作用替代在待治疗的溶酶体贮积症中缺陷或者丢失的溶酶体酶的至少部分活性。在一些实施方案中,替代酶能够减少在溶酶体中累积的物质,或者能拯救或改善一种或多种溶酶体贮积症症状。

[0147] 在一些实施方案中,合适的替代酶可以是已知的与待治疗的所述溶酶体贮积症相关的任何替代酶。在一些实施方案中,合适的替代酶是选自在上文的表 2 中列出的所述酶中的酶。

[0148] 在一些实施方案中,适合于本发明的替代酶可以具有野生型或者天然发生的序列。在一些实施方案中,适合于本发明的替代酶可以具有修饰的序列,所述修饰的序列与所

述野生型或者天然发生的序列具有基本的同源性或者一致性（例如与所述野生型或者天然发生的序列具有至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 的序列一致性）。

[0149] 适合于本发明的替代酶可以通过任何可用的方法制备。例如，替代酶可以利用设计表达替代酶编码核酸的宿主细胞系统重组制备。可选择地或者附加地，替代酶可以通过激活内源基因制备。可选择地或者附加地，替代酶通过化学合成部分地或者完全地制备。可选择地或者附加地，替代酶可以从天然来源纯化得到。

[0150] 可以使用任意的表达系统，来重组制备酶。为了给出一些例子，已知的表达系统包括：例如卵、杆状病毒、植物、酵母、或者哺乳动物细胞。

[0151] 在一些实施方案中，适合于本发明的酶在哺乳动物细胞中制备。可以根据本发明使用的哺乳动物细胞的非限定实施例包括：BALB/c 小鼠骨髓瘤系 (NS0/1, ECACC No:85110503)、人类成视网膜细胞 (PER.C6, CruCell, Leiden, 荷兰)、SV40 转化的猴肾脏 CV1 系 (COS-7, ATCC CRL 1651)、人类胚胎肾脏系（在悬浮培养生长的 293 或 293 细胞亚克隆, Graham 等, *J. Gen. Virol.*, 36:59, 1977)、人类纤维肉瘤细胞系（例如 HT1080）、幼地鼠肾脏细胞 (BHK, ATCC CCL 10)、中国仓鼠卵巢细胞 +/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216, 1980)、小鼠睾丸支持细胞 (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251, 1980)、猴肾脏细胞 (CV1ATCC CCL 70)、非洲绿猴肾脏细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587)、人类宫颈癌细胞 (HeLa, ATCC CCL 2)、犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL 34)、布法罗大鼠肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442)、人类肺细胞 (W138, ATCC CCL 75)、人类肝细胞 (Hep G2, HB 8065)、小鼠乳腺肿瘤 (MMT 060562, ATCC CCL51)、TRI 细胞 (Mather et al., *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 383:44-68, 1982)、MRC 5 细胞、FS4 细胞、和人类肝癌细胞系 (HepG2)。

[0152] 在一些实施方案中，根据本发明发明的方法被用来递送从人类细胞制备的替代酶。在一些实施方案中，使用根据本发明发明的方法递送从 CHO 细胞制备的替代酶。

[0153] 在一些实施方案中，使用本发明的方法递送的替代酶含有与在脑细胞表面上的受体结合的部分，以促进细胞吸收和 / 或靶向溶酶体。例如，这种受体可以是阳离子依赖型甘露糖 -6- 磷酸受体 (CI-MPR)，其与所述甘露糖 -6- 磷酸 (M6P) 残基结合。另外，所述 CI-MPR 也结合其它蛋白，包括 IGF-II。在一些实施方案中，适合于本发明的替代酶在所述蛋白的表面含有 M6P 残基。在一些实施方案中，适合于本发明的替代酶可以含有双磷酸化的寡糖，其与所述 CI-MPR 具有更高的结合亲和力。在一些实施方案中，合适的酶含有至多大约平均每酶大约至少 20% 双磷酸化的寡糖。在其它实施方案中，合适的酶可以含有每酶大约 10%、15%、18%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60% 双磷酸化的寡糖。而这种双磷酸化的寡糖可以是天然存在在所述酶上的，应该注意，所述酶可以通过某些酶修饰而拥有这种寡糖。例如，合适的替代酶可以被某些酶（其能够催化溶酶体酶上的 N-乙酰氨基葡萄糖 -L-磷酸盐从 UDP-GlcNAc 至 α -1,2-连接的甘露糖的 6' 位点）修饰。制备和使用这种酶的方法和组合物被详细描述，例如参见 Canfield 等（在美国专利号 6,537,785 中）和美国专利号 6,534,300，每个都通过参考的方式并入本文。

[0154] 在一些实施方案中，在本发明中使用的替代酶可以缀合或融合至能够结合到脑细胞表面上受体的溶酶体靶向部分。合适的溶酶体靶向部分可以是：IGF-I、IGF-II、RAP、p97、

和变异型、及其同源物或者片段（例如包括与野生类型成熟人类 IGF-I、IGF-II、RAP、p97 肽序列具有至少 70%、75%、80%、85%、90% 或者 95% 一致性的序列的肽）。

[0155] 在一些实施方案中，适合于本发明的替代酶未曾被修饰，以增强递送或者转运这种试剂穿过 BBB 而进入所述 CNS。

[0156] 在一些实施方案中，治疗性蛋白质包括靶向部分（例如，溶酶体靶序列）和 / 或穿膜肽。在一些实施方案中，定向序列和 / 或穿膜肽是治疗部分的内在部分（例如，通过化学键、通过融合蛋白质）。在一些实施方案中，定向序列含有甘露糖 -6- 磷酸盐部分。在一些实施方案中，定向序列含有 IGF-I 部分。在一些实施方案中，定向序列含有 IGF-II 部分。

[0157] 制剂

[0158] 水性的药物溶液和组合物（即，制剂），其习惯上被用来递送治疗试剂至受试者的所述 CNS，包括无缓冲的等渗生理盐水和 Elliott's B 溶液（其是人工 CSF）。所述 CSF 组合物相对于 Elliott's B 溶液的比较描述包含在下面的表 3 中。如表 3 所示，Elliott's B 溶液的所述浓度密切地与所述 CSF 相似。Elliott's B 溶液，尽管如此，含有非常低的缓冲液浓度，并且因此可能不能为稳定治疗试剂（例如蛋白质）的需要提供充分的缓冲能力，特别是在一段较长的时间（例如在储存条件下）。而且，Elliott's B 溶液含有某些盐，这些盐可能与所述制剂（所述制剂打算用于递送某些治疗试剂，特别是蛋白质或者酶）不相容。例如，存在于 Elliott's B 溶液中的钙盐能够调节蛋白沉淀，并且因此减少了所述制剂的稳定性。

[0159] 表 3

[0160]

溶液	Na ⁺ mEq/L	K ⁺ mEq/L	Ca ⁺⁺ mEq/L	Mg ⁺⁺ mEq/L	HCO ₃ ⁻ mEq/L	Cl ⁻ mEq/L	pH	含磷 mg/L	葡萄 糖 mg/L
CSF	117-137	2.3	2.2	2.2	22.9	113-127	7.31	1.2-2.1	45-80
Elliott's B 溶液	149	2.6	2.7	2.4	22.6	132	6.0-7.5	2.3	80

[0161] 本发明提供的制剂，可以是水性的、预冻干的、冻干的或者再生的形式，对于已经配制成使得其能够稳定化，或者可选择地减缓或者预防配制其中的一种或多种治疗试剂（例如，重组的蛋白质）的降解。在一些实施方案中，本发明的制剂为治疗试剂提供冻干制剂。在一些实施方案中，本发明制剂为治疗试剂提供水性的制剂。在一些实施方案中，所述制剂为稳定制剂。

[0162] 稳定制剂

[0163] 如本文使用的，所述术语“稳定的”是指所述治疗试剂（例如重组酶）在一段较长的时间内维持其治疗效果（例如它的预期的生物活性和 / 或理化完整性的全部或者大部分）的能力。治疗试剂的所述稳定性，和所述药物组合物维持这种治疗世界稳定性的能力，可以在一段较长的时间内（例如优选至少 1、3、6、12、18、24、30、36 月或者更多）进行评估。就制剂而言，稳定的制剂是这样的：其中的所述治疗试剂在储存和加工（例如冷冻 / 解冻、机械混合和冷冻干燥）过程中基本上保持其物理和 / 或化学完整性和生物活性。对于蛋白质稳定性，它可以通过形成高分子重量（HMW）聚集体，酶活性损失、肽片段的形成和电荷性能的变化进行量度。

[0164] 关于维持所述治疗试剂浓度的特定范围（使所述试剂能适合其预期的治疗功能所需要），所述治疗试剂的稳定性是特别重要的。所述治疗试剂的稳定性可以进一步评估，关于所述治疗试剂在较长一段时间内的生物活性或理化完整性。例如，在给定时间点的稳定性可以与较早时间点（例如在配制的第 0 天）进行比较，或者与未配制的治疗试剂进行比较，并且这种比较结果以百分数表示。优选的，本发明的药物组合物使所述治疗试剂的生物活性或者理化完整性在一端较长的时间（例如在至少大约 6-12 个月、在室温或者加速储存条件下）内维持至少 100%、至少 99%、至少 98%、至少 97% 至少 95%、至少 90%、至少 85%、至少 80%、至少 75%、至少 70%、至少 65%、至少 60%、至少 55% 或至少 50%。

[0165] 所述治疗试剂在本发明的药物组合物中优选是可溶的。所述术语“可溶性”（如其所提及的本发明的治疗试剂）是指这种治疗试剂形成均匀的溶液的能力。优选地，所述治疗试剂在所述溶液（在其中所述治疗试剂被施用，并且通过所述溶液所述治疗试剂被运送到作用的靶位点）中的可溶性是足够地以允许递送治疗有效量的所述治疗试剂至作用的靶位点。几种因素可以影响所述治疗试剂的可溶性。例如，可能影响蛋白质可溶性的相关因素，包括离子强度、氨基酸序列和存在其它共溶试剂或离子（例如钙盐）。在一些实施方案中，所述药物组合物被配制使得所述钙盐从所述组合物排除。

[0166] 合适的制剂，无论是水性的、预冻干的、冻干的还是再生的形式，可以含有多种浓度感兴趣的治疗试剂。在一些实施方案中，制剂可以含有感兴趣的蛋白质或者治疗试剂，其浓度范围约 0.1mg/ml 至 100mg/ml（例如，约 0.1mg/ml 至 80mg/ml，约 0.1mg/ml 至 60mg/ml，约 0.1mg/ml 至 50mg/ml，约 0.1mg/ml 至 40mg/ml，约 0.1mg/ml 至 30mg/ml，约 0.1mg/ml 至 25mg/ml，约 0.1mg/ml 至 20mg/ml，约 0.1mg/ml 至 60mg/ml，约 0.1mg/ml 至 50mg/ml，约 0.1mg/ml 至 40mg/ml，约 0.1mg/ml 至 30mg/ml，约 0.1mg/ml 至 25mg/ml，约 0.1mg/ml 至 20mg/ml，约 0.1mg/ml 至 15mg/ml，约 0.1mg/ml 至 10mg/ml，约 0.1mg/ml 至 5mg/ml，约 1mg/ml 至 10mg/ml，约 1mg/ml 至 20mg/ml，约 1mg/ml 至 40mg/ml，约 5mg/ml 至 100mg/ml，约 5mg/ml 至 50mg/ml，或者约 5mg/ml 至 25mg/ml）。在一些实施方案中，根据本发明的制剂可以含有治疗试剂的浓度为大约 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，或者 100mg/ml。

[0167] 本发明的所述制剂特征在于它们的耐受性，无论是作为水性的溶液或者再生的冻干的溶液。如本文所使用的，所述术语“可容忍的”和“耐受性”是指本发明的所述药物组合物在被施用这种组合物的所述受试者中，不引发不良反应的所述能力；或者可选择地，在被施用这种组合物的所述受试者中，不引发严重不良反应的能力。在一些实施方案中，本发明的所述药物组合物在被施用这种组合物的所述受试者中，能被良好地容忍。

[0168] 许多治疗试剂，特别是本发明的蛋白质和酶，要求可控制的 pH 和特定的赋形剂，以维持他们在本发明的药物组合物中的可溶性和稳定性。下面的表 4 区别了被认为能维持本发明所述蛋白质治疗试剂的可溶性和稳定性的某些典型方面。

[0169] 表 4

[0170]

参数	通常的范围/类型	基本的原理
pH	5 至 7.5	对于稳定性 有事也对于可溶性
缓冲剂类型	醋酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、组氨酸、磷酸盐或者 Tris	以维持最适 pH 也可能影响稳定性
缓冲剂浓度	5-50 mM	以维持 pH 也可能使稳定或增加离子强度
Tonicifier	NaCl、糖、甘露醇	以提供等渗或等渗溶液
表面活性剂	聚山梨醇酯 20, 聚山梨醇酯 80	使界面和切面稳定
其它	氨基酸 (例如精氨酸), 在几十到几百的 mM	以增强可溶性或稳定性

[0171] 缓冲剂

[0172] 所述制剂的所述 pH 是能够改变治疗试剂 (例如, 酶或者蛋白质) 在水性制剂中或者预-冻干制剂的可溶性的额外因素。因此, 本发明的所述制剂优选地包括一种或多种缓冲剂。在一些实施方案中, 所述水性制剂包括大量的缓冲剂, 其足够维持所述组合物的最适 pH, 在约 4.0-8.0 之间 (例如, 约 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.2、6.4、6.5、6.6、6.8、7.0、7.5、或者 8.0)。在一些实施方案中, 所述制剂的所述 pH 在约 5.0-7.5 之间, 在约 5.5-7.0 之间, 在约 6.0-7.0 之间, 在约 5.5-6.0 之间, 在约 5.5-6.5 之间, 在约 5.0-6.0 之间, 在约 5.0-6.5 之间以及在约 6.0-7.5 之间。合适的缓冲剂包括: 例如, 醋酸盐、柠檬酸盐、组氨酸、磷酸盐、琥珀酸盐、三羟甲基甲胺 (“Tris”) 和其它有机酸。本发明的所述药物组合物的所述缓冲剂浓度和 pH 范围是控制或调节所述制剂耐受性的因素。在一些实施方案中, 缓冲剂存在的浓度范围在约 1mM 至约 150mM 之间, 或者在约 10mM 至约 50mM 之间, 或者在约 15mM 至约 50mM 之间, 或者在约 20mM 至约 50mM 之间, 或者在约 25mM 至约 50mM 之间。在一些实施方案中, 合适的缓冲剂存在的浓度大约 1mM、5mM、10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、75mM、100mM、125mM 或者 150mM。

[0173] 渗透度

[0174] 在一些实施方案中, 制剂, 无论是水性的、预冻干的、冻干的或者再生的形式, 含有保持与所述制剂等渗的等渗剂。通常地, “等渗的” 意思是感兴趣的所述制剂具有与人类血液基本相同的渗透压。等渗的制剂通常具有的渗透压, 从约 240mOsm/kg 至约 350mOsm/kg。等渗性可以使用 (例如) 蒸汽压力或者凝固点类型渗透计进行测量。示例性的等渗剂包括但不限于: 甘氨酸、山梨糖、甘露糖、氯化钠和精氨酸。在一些实施方案中, 合适的等渗剂可以存在于水性的和 / 或预冻干的制剂中, 以浓度形式从约 0.01 - 5 重量% (例如, 0.05、0.1、0.15、0.2、0.3、0.4、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0 或者 5.0%)。在一些实施方案中, 冻干的制剂含有等渗剂, 以维持所述预-冻干制剂或者所述再生的制剂等渗。

[0175] 而且, 通常地对于非肠胃施用的药物需要制备等渗的溶液, 等渗的溶液的使用可以改变一些治疗试剂 (并且特别地, 一些蛋白质和 / 或酶) 的可溶性。已经证明: 稍微地高渗的溶液 (例如, 多达 175mM 氯化钠, 在 5mM 磷酸钠中, pH 7.0) 和含糖溶液 (例如, 多达 2% 蔗糖, 在 5mM 磷酸钠中, pH 7.0), 被良好地容忍。最普通批准的 CNS 推注制剂组合物为

生理盐水（约 150mM NaCl, 在水中）。

[0176] 稳定剂

[0177] 在一些实施方案中, 制剂可以含有稳定剂或冻干保护剂, 以保护所述蛋白质。通常地, 合适的稳定剂为糖、非还原性糖和 / 或氨基酸。示例性的糖包括但不限于: 葡萄聚糖、乳糖、甘露糖、甘露糖、山梨糖、棉子糖、蔗糖和海藻糖。示例性的氨基酸包括但不限于: 精氨酸、甘氨酸和蛋氨酸。附加的稳定剂可以包括氯化钠、羟乙基淀粉和聚乙烯吡咯烷酮。在所述冻干制剂中的稳定剂的量通常使得所属制剂为等渗的。无论如何, 高渗的再生的制剂也可以是合适的。另外, 所述稳定剂的量不能太低, 而使所述治疗试剂发生降解 / 聚集的量不可接受。在所述制剂中示例性的稳定剂浓度可以是范围, 从约 1mM 至约 400mM (例如, 从约 30mM 至约 300mM, 以及从约 50mM 至约 100mM), 或者可选择地, 从 0.1% 至 15% (例如, 从 1% 至 10%, 从 5% 至 15%, 从 5% 至 10%), 以重量计。在一些实施方案中, 所述稳定剂和所述治疗试剂的质量比例为约 1:1。在一些实施方案中, 所述稳定剂和所述治疗试剂的质量比例可以是约 0.1:1, 0.2:1, 0.25:1, 0.4:1, 0.5:1, 1:1, 2:1, 2.6:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1, 或者 20:1。在一些实施方案中, 适合于冷冻干燥, 所述稳定剂也是冻干保护剂。

[0178] 在一些实施方案中, 适合于本发明的液体制剂含有无定形材料。在一些实施方案中, 适合于本发明的液体制剂含有基本量的无定形材料 (例如, 基于蔗糖的制剂)。在一些实施方案中, 适合于本发明的液体制剂含有部分晶体 / 部分无定形材料。

[0179] 填充剂

[0180] 在一些实施方案中, 适合于冷冻干燥的制剂可以进一步包括一种或多种填充剂。“填充剂”是指复合物, 其为冻干混合物添加质量, 并且有助于所述冻干块状物的物理结构。例如, 填充剂可以改善冻干块状物的所述外观 (例如, 基本均一的冻干块状物)。合适的填充剂包括但不限于: 氯化钠、乳糖、甘露糖、甘氨酸、蔗糖、海藻糖、羟乙基淀粉。填充剂的示例性浓度选自: 从约 1% 至约 10% (例如, 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5%、6.0%、6.5%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5%、以及 10.0%)。

[0181] 表面活性剂

[0182] 在一些实施方案中, 理想的是, 添加表面活性剂至制剂。示例性的表面活性剂包括非离子表面活性剂, 例如聚山梨醇酯 (例如聚山梨醇酯 20 或者 80); 泊洛沙姆 (例如洛沙姆 188); Triton; 十二烷基硫酸钠 (SDS); 月桂基硫酸钠; sodium octyl glycoside; 十二烷基-, 十四烷基-, linoleyl-, 或者硬脂基-磺基甜菜碱; 十二烷基-, 十四烷基-, linoleyl- 或者硬脂基-肌氨酸; linoleyl-, 十四烷基-, 或者鲸蜡基-甜菜碱; lauroamidopropyl-, cocamidopropyl-, linoleamidopropyl-, myristamidopropyl-, palmidopropyl-, 或者异硬脂酰丙基-甜菜碱 (例如 lauroamidopropyl); myristarnidopropyl-, palmidopropyl-, 或者异硬脂酰丙基-二甲胺; 甲基椰油酰基钠-, 或者 disodium methyl ofeyle-aurate; 以及 MONAQUAT™ 系列 (Mona Industries, Inc., Paterson, N. J.), 聚乙二醇, 聚丙二醇, 以及乙烯和丙二醇的共聚物 (例如 Pluronic, PF68 等)。通常地, 所述添加的表面活性剂的量是使得所述蛋白质聚集减少, 并且使颗粒或冒泡形成最小化。例如, 存在于制剂中的表面活性剂可以是大约 0.001 - 0.5% (例如大约 0.005-0.05%, 或者 0.005-0.01%)。特别的, 存在于制剂中的表面活性剂浓度可以是约

0.005%、0.01%、0.02%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、或者0.5%等。可选择地,或者另外,所述表面活性剂可以添加至冻干制剂、预冻干制剂和/或再生制剂。

[0183] 其它药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂,例如在 Remington's pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) 中描述的,可以被包含在所述制剂(和/或所述冻干的制剂和/或所述再生的制剂)中,以他们对所述制剂的预期特性没有不良影响为条件。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对于接受者是无毒的,并且包括但不限于:附加的缓冲剂;防腐剂;共溶剂;抗氧化剂(包括抗坏血酸和蛋氨酸);螯合剂(例如 EDTA);金属复合物(例如, Zn-蛋白质复合物);生物可降解的多聚体(例如多元酯);和/或盐-形成平衡离子(例如钠)。

[0184] 根据本发明的制剂,无论是水性的、预冻干的、冻干的或者再生的形式,可以基于这些进行评估:产品质量分析、再生时间(如果冻干)、再生质量(如果冻干)、高分子量、湿度、和玻璃转化温度。通常地,蛋白质质量和产品分析包括产品降解率分析,使用的方法包括但不限于,体积排阻 HPLC (SE-HPLC)、阳离子交换-HPLC (CEX-HPLC)、X-射线衍射 (XRD)、调制式差示扫描量热法 (mDSC)、反相 HPLC (RP-HPLC)、多角度激光光散射 (MALS)、荧光、紫外吸收、浊度测定法、毛细管电泳 (CE)、SDS-PAGE、以及其组合。在一些实施方案中,根据本发明的产品的评估可以包括评估外貌的步骤(无论液体或者块状物的外貌)。

[0185] 通常,制剂(冻干的或者水性的)可以用于在室温下在长时间的储存。储存温度通常的范围可以从 0°C 至 45°C (例如 4°C、20°C、25°C、45°C 等)。制剂可以在数月至数年的时间段储存。储存时间通常是 24 月、12 月、6 月、4.5 月、3 月、2 月或者 1 月。制剂可以直接在用于在施用、消除转移步骤的所述容器中储存。

[0186] 制剂可以直接在冻干容器中储存(如果冻干),所述冻干容器可以起再生器皿、消除转移步骤的作用。可选择的,冻干产品制剂可以估量成更小的储存增量。储存应该通常避免导致所述蛋白质降解的事件,包括但不限于暴露在阳光、紫外辐射、其它电磁辐射形式、过热或过冷、快速热冲击和机械冲击。

[0187] 冻干

[0188] 可以利用根据本发明发明的方法,以冻干任何物质,特别是治疗试剂。通常地,预-冻干制剂进一步含有合适选择的赋形剂和其它成分(例如稳定剂、缓冲剂、填充剂和表面活性剂)以阻止感兴趣的复合物在冷冻干燥和储存期间降解(例如,蛋白质聚集、脱酰胺基、和/或氧化)。对于冷冻干燥的制剂可以包括一种或多种附加的成分,所述附加的成分包括冻干保护剂或者稳定剂、缓冲剂、填充剂、等渗剂和表面活性剂。

[0189] 在将所述感兴趣的物质和其它附加的成分混合一起后,将所述制剂冻干。冻干通常包括三个主要的阶段:冷冻、初级干燥和次级干燥。冷冻对于将水转变成冰或者将一些无定形制剂组分转变为晶体形式是必要的。初级干燥是在低压和低温下,通过直接升华使冰从所述冷冻产品中除去的加工步骤。次级干燥是利用残余水至所述蒸发面的扩散作用,从所述产品基质除去结合水的加工步骤。在次级干燥期间的产品温度通常高于初级干燥。参见, Tang X. et al. (2004) "Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: Practical advice," Pharm. Res., 21:191-200; Nail S. L. et al. (2002) "Fundamentals of freeze-drying," in Development and manufacture of protein pharmaceuticals. Nail S. L. editor New York: Kluwer Academic/Plenum

Publishers, pp 281-353; Wang et al. (2000) "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals," Int. J. Pharm., 203:1-60; Williams N. A. et al. (1984) "The lyophilization of pharmaceuticals; A literature review." J. Parenteral Sci. Technol., 38:48-59。通常,任意的冻干过程可以与本发明结合使用。

[0190] 在一些实施方案中,可以在所述产品初始冷冻期间引入退火步骤。所述退火步骤可以减少所述总循环时间。不期望受任何理论的约束,可以设想,所述退火步骤有助于促进赋形剂结晶化、以及大冰晶的形成(由于在过冷期间形成的小晶体的再-结晶化),这反过来,改善了再生。通常地,退火步骤包括间隔或者冷冻期间的温度振荡。例如,所述冷冻温度可以是 -40°C ,所述退火步骤的所述温度将增加至,例如, -10°C 并维持该温度一段设定的时间。所述退火步骤时间范围可以从0.5小时至8小时(例如,0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3、4、6、和8小时)。所述退火温度可以在所述冷冻温度和 0°C 之间。

[0191] 冻干可以在容器中进行,例如管子、袋子、瓶子、盘子、小药瓶(例如,玻璃小药瓶)、注射器或者任意其它合适的容器。所述容器可以是一次性的。冻干也可以是大规模或者小规模进行。在一些情况下,在冻干所述蛋白质制剂的容器中,进行所述蛋白质的再生,以避免转移步骤,是可取的。在这种情况下下的所述容器可以例如是:3、4、5、10、20、50或者100cc小药瓶。

[0192] 为了该目的可以获得许多不同的冷冻干燥器,例如Hull pilot scale干燥器(SP Industries, USA), Genesis(SP Industries)实验室冷冻干燥器,或者其它任意能够控制所述给定的冻干加工参数的冷冻干燥器。冷冻-干燥通过所述制剂的冷冻、以及随后在适合初级干燥的温度下将冰从所述冷冻内容物升华来实现。初始冷冻使所述制剂温度低于约 -20°C (例如, -50°C 、 -45°C 、 -40°C 、 -35°C 、 -30°C 、 -25°C 、等),在通常不超过4小时内(例如,不超过约3小时,不超过约2.5小时,不超过约2小时)。在这个条件下,所述产品温度通常地低于所述制剂的共晶点或者崩塌温度。通常地,所述初级干燥的所述搁板温度范围从约 -30 至 25°C (以所述产品在初级干燥期间保持在所述熔点以下为条件),在合适的压力下,范围通常从约20至250mTorr。所述制剂、容纳所述样品的容器(例如玻璃小药瓶)的大小和类型、以及液体体积,将主要决定干燥所需要的时间(其范围可以从几小时至几天)。次级干燥阶段在约 $0-60^{\circ}\text{C}$ 下执行,主要根据所述容器的类型和大小、以及采用的治疗性蛋白质的类型。再者,液体的体积将主要决定干燥所需要的时间,其范围可以从几小时到几天。

[0193] 作为一个一般性的命题,冻干将导致冻干制剂其中的所述湿度小于约5%,小于约4%,小于约3%,小于约2%,小于约1%,以及小于约0.5%。

[0194] 再生

[0195] 当本发明的所述药物组合物通常以水性的形式施用至受试者,在一些实施方案中本发明的所述药物组合物是冻干的。这种组合物在施用至受试者前,必须通过添加一种或多种稀释剂至其中使其再生。在所述预期的阶段,通常在施用至所述患者之前的合适时间点,所述冻干制剂可以用稀释剂再生,使得在所述再生的制剂中的所述蛋白质浓度为理想的。

[0196] 多种稀释剂可以根据本发明使用。在一些实施方案中,对于再生合适的稀释剂是水。作为稀释剂使用的水可以以多种方式处理,包括:反渗透、蒸馏、消电离作用、过滤(例

如,活性炭、微量过滤、纳米过滤)以及这些治疗方法的组合。总之,所述水应该是适合于注射的,包括但不限于,无菌水或注射用抑菌水。

[0197] 附加的示例性稀释剂包括 pH 缓冲的溶液(例如,磷酸盐-缓冲的生理盐水),无菌生理盐水溶液, Elliot's 溶液, Ringer's 溶液或者右旋糖溶液。合适的稀释剂可以优选含有防腐剂。示例性的防腐剂包括芳香醇,例如苯甲基或者苯酚醇。采用的防腐剂的量通过评估不同防腐剂浓度来测定,使其与所述蛋白质和防腐剂功效测试相容。例如,如果所述防腐剂是芳香醇(例如苯甲醇),它能以从约 0.1-2.0%,从约 0.5-1.5%或者约 1.0-1.2%的量存在。

[0198] 适合本发明的稀释剂包括多种添加剂,包括但不限于, pH 缓冲剂(例如 Tris, 组氨酸),盐(例如,氯化钠)以及其它添加剂(例如,蔗糖)包括上文描述的这些(例如稳定剂,等渗剂)。

[0199] 根据本发明,冻干的物质(例如蛋白质)可以被再生至至少 25mg/ml 的浓度(例如,至少 50mg/ml,至少 75mg/ml,至少 100mg/ml)以及任何在其间的范围。在一些实施方案中,冻干的物质(例如,蛋白质)可以再生至浓度范围从约 1mg/ml 至 100mg/ml(例如,从约 1mg/ml 至 50mg/ml,从 1mg/ml 至 100mg/ml,从约 1mg/ml 至约 5mg/ml,从约 1mg/ml 至约 10mg/ml,从约 1mg/ml 至约 25mg/ml,从约 1mg/ml 至约 75mg/ml,从约 10mg/ml 至约 30mg/ml,从约 10mg/ml 至约 50mg/ml,从约 10mg/ml 至约 75mg/ml,从约 10mg/ml 至约 100mg/ml,从约 25mg/ml 至约 50mg/ml,从约 25mg/ml 至约 75mg/ml,从约 25mg/ml 至约 100mg/ml,从约 50mg/ml 至约 75mg/ml,从约 50mg/ml 至约 100mg/ml)。在一些实施方案中,在所述再生的制剂中的蛋白质浓度可以高于在所述预-冻干制剂中的浓度。在所述再生制剂中的蛋白质浓度对于打算皮下或者肌肉间递送的再生制剂特别有用。在一些实施方案中,在所述再生制剂中的蛋白质浓度可以是所述预冻干制剂的约 2-50 倍(例如约 2-20,约 2-10 倍,约 2-5 倍)。在一些实施方案中,在所述再生制剂中的蛋白质浓度可以是所述预冻干制剂的至少约 2 倍(例如,至约 3、4、5、10、20、40 倍数)。

[0200] 根据本发明的再生可以在任意的容器中进行。适合于本发明的示例性容器,包括但不限于:例如管子、小药瓶、注射器(例如,单室的或者二室的)、袋子、瓶子和盘子。合适的容器可以用任意材料制备,例如玻璃、塑料、金属。所述容器可以是一次使用的或者可多次使用的。再生也可以大规模或者小规模进行。

[0201] 在一些情况下,在冻干所述蛋白质制剂的容器中,进行所述蛋白质的再生,以避免转移步骤,是可取的。在这种情况下下的所述容器可以例如是:3、4、5、10、20、50 或者 100cc 小药瓶。在一些实施方案中,用于冻干和再生的合适的容器是二室的注射器(例如,(装有冻干粉和稀释剂的)二室注射器给药系统,® (Vetter) 注射器)。例如,二室的注射器可以含有冻干的物质和所述稀释剂两者,每个在单独的室中,通过阻塞物分开(参见实施例 5)。为了再生,可以在所述稀释剂侧将活塞与所述阻塞物连接并且按压让稀释剂移动进入所述产品室,使得所述稀释剂能接触所述冻干的物质,然后再生可以如本文所描述地发生(参见实施例 5)。

[0202] 本发明所述的药物组合物、制剂和相关方法对于递送多重共治疗试剂至受试者的所述 CNS(例如,鞘内地、脑室内地或者脑池内地)以及治疗所述相关的疾病是有用的。本发明的所述药物组合物对于递送蛋白质和酶(例如酶替代治疗)至患有溶酶体贮积症的受

试者特别有用。所述溶酶体贮积症代表了导致溶酶体功能缺陷的一组相对罕见的遗传性代谢疾病。所述溶酶体疾病的特征在于未消化大分子在所述溶酶体内的累积,其导致这种溶酶体大小和数量的增加,并最终导致细胞功能障碍和临床异常。

[0203] CNS 递送

[0204] 可以设想,下文描述的多种稳定制剂通常对于治疗试剂的 CNS 递送是合适的。根据本发明的稳定制剂可以通过多种技术和途径,用于 CNS 递送,包括但不限于,脑实质内的、大脑内的、脑室内的 (ICV)、鞘内的 (例如, IT- 腰椎、IT- 小脑延髓池) 施用,以及其它直接或间接注射入所述 CNS 技术和 / 或的技术和途径。

[0205] 鞘内的递送

[0206] 在一些实施方案中,替代酶在本文所描述的制剂中被递送至所述 CNS。在一些实施方案中,通过施用进入有需要治疗的受试者的所述脑脊髓液 (CSF) 中,送替代酶至所述 CNS。在一些实施方案中,鞘内施用被用于将预期的替代酶 (例如 ASA 蛋白质) 递送进入所述 CSF 中。如本文所使用的,鞘内施用 (也称为鞘内注射) 是指注射进入所述脊髓管 (在所述脊髓周围的鞘内空间)。可以使用多种技术,包括但不限于,侧脑室注射 (通过钻孔或小脑延髓池或腰椎穿刺或诸如此类)。示例性方法的描述见于 Lazorthes et al. *Advances in Drug Delivery Systems and Applications in Neurosurgery*, 143-192 and Omayya et al., *Cancer Drug Delivery*, 1:169-179, 其内容通过参考的方式并入本文。

[0207] 根据本发明,可以在所述脊髓管周围的任意区域注射酶。在一些实施方案中,将酶注射进入所述腰椎区域或者所述小脑延髓池,或者脑室内地注射进入脑室空间。如本文所使用的,所述术语“腰椎部位”或者“腰椎区域”是指在所述第三和第四腰椎 (下背部) 骨之间的区域,更包含所述脊椎的 L2-S1 区域。通常地,通过腰椎部位或腰椎区域的鞘内注射也称为“腰椎 IT 递送”或者“腰椎 IT 施用”。所述术语“小脑延髓池”是指在所述小脑周围和下方的空间 (经由在所述头骨和所述脊椎顶部之间的开口)。通常地,通过小脑延髓池的鞘内注射也称为“小脑延髓池递送”。所述术语“脑室”是指在所述脑中的空腔,其与所述脊髓的中央管是连续的。通常地,经由所述脑室空腔的注射是指脑室内的 (intraventricular Cerebral, ICV) 递送。

[0208] 在一些实施方案中,根据本发明的“鞘内施用”或者“鞘内递送”是指腰椎 IT 施用或者递送,例如,在所述第三和第四腰椎骨 (下背部) 之间递送,更包含所述脊椎的 L2-S1 区域。这也是考虑到的,腰部 IT 施用或者递送区别于在所述小脑延髓池递送,因为根据本发明的腰部 IT 施用或者递送提供了更好和更有效地递送至远端脊椎管,而小脑延髓池递送 (此外) 通常不能良好地递送至远端脊椎管。

[0209] 鞘内递送的设备

[0210] 根据本发明鞘内递送可以使用多种设备。在一些实施方案中,鞘内施用的设备含有:流体进入端口 (例如可注射的端口);空心体 (例如导管),所述空心体具有与所述流体进入端口液体连通的第一流体孔口以及配置插入到脊髓中的第二流体孔口;和固定机构,所述固定机构用于固定在所述脊髓中的空心体的插入。如在图 62 中示出的非限定性实施例,合适的固定机构含有固定在所述空心体表面的一个或多个球形门柄、以及可调节覆盖所述一个或多个球形门柄的缝合环,所述缝合环用于阻止所述空心体 (例如导管) 从所述脊髓滑出。在多种实施方案中,所述流体进入端口包括贮液囊。在一些实施方案中,所述流

体进入端口包括机械泵（例如灌流泵）。在一些实施方案中，植入的导管连接到贮液囊（例如用于推注递送），或者灌流泵。所述流体进入端口可以是植入的或者外置的。

[0211] 在一些实施方案中，鞘内施用可以通过腰椎穿刺（缓慢推注）或通过端口-导管递送系统（例如注射或者推注）进行。在一些实施方案中，所述导管插入到所述腰椎之间的薄层，所述前端被拧到预期水平的鞘空间（通常 L3-L4）（图 63）。

[0212] 相对于静脉施用，适合鞘内施用的单剂量体积通常地小的。通常地，根据本发明的鞘内递送维持了所述 CSF 的组合物与所述受试者颅内压力之间的平衡。在一些实施方案中，对于相应的去除了 CSF 的受试者，鞘内递送没有进行。在一些实施方案中，合适的单剂量体积可以例如小于大约 10ml、8ml、6ml、5ml、4ml、3ml、2ml、1.5ml、1ml、或者 0.5ml。在一些实施方案中，合适的单剂量体积可以是大约 0.5-5ml、0.5-4ml、0.5-3ml、0.5-2ml、0.5-1ml、1-3ml、1-5ml、1.5-3ml、1-4ml、或者 0.5-1.5ml。在一些实施方案中，根据本发明的鞘内递送涉及首先去除预期量的 CSF 的步骤。在一些实施方案中，小于大约 10ml（例如小于大约 9ml、8ml、7ml、6ml、5ml、4ml、3ml、2ml、1ml）的 CSF 首先被去除。在这些情况下，合适的单剂量体积可以是例如多于大约 3ml、4ml、5ml、6ml、7ml、8ml、9ml、10ml、15ml、或者 20ml。

[0213] 可以使用多种其它设备影响治疗组合物的鞘内施用。例如，含有预期酶的制剂的给予可以使用 Ommaya 贮液囊，所述 Ommaya 贮液囊通常用于脑膜癌扩散药物的鞘内施用（Lancet 2:983-84, 1963）。更具体地说，在这种方法中，脑室管通过在所述前角形成的孔中插入，并且连接到安装在所述头皮下的 Ommaya 贮液囊；并且所述 Ommaya 贮液囊是皮下穿刺，使其鞘内递送所述特定被替代的酶（所述酶被注射到所述贮液囊中）。治疗组合物或者制剂鞘内施用到个体的其它设备的描述可以参见：美国专利号 6,217,552，其通过参考的方式并入本文。可选择地，所述药物可以鞘内施用，例如，可以单一注射，或者持续注射。应该理解，所述剂量治疗可以以单一剂量施用或者多种剂量的形式。

[0214] 对于注射，本发明的制剂可以以液体溶液配制。另外，所述酶可以以固体形式配制，并且在使用之前重溶或者立即悬浮。冻干形式也包括在内。所述注射，例如以所述酶的推注注射或者持续注射（例如使用灌流泵）的形式。

[0215] 在本发明的一个实施方案中，所述酶通过侧脑室注射至所述受试者的脑中。所述注射，可以例如通过在所述受试者的头骨中钻孔。在另一实施方案中，所述酶和/或其它药物制剂通过外科插入分流至所述受试者的脑室中。例如，所述注射可以在侧脑室（其更大）进行。在一些实施方案中，也可以注射进入所述第三和第四较小脑室。

[0216] 在又一个实施方案中，在本发明中使用的所述药物组合物通过注射施用至受试者所述小脑延髓池、或腰椎区域。

[0217] 在本发明的又一实施方案中，所述药学可接受的制剂提供了持久的递送至受试者（例如：在本发明中使用的所述酶或者其它药物组合物的“缓慢释放”），在所述药学可接受的制剂被施用到所述受试者后，维持至少一周、两周、三周、四周或更长时间段。

[0218] 如本文使用的，所述术语“持久的递送”是指本发明的药物制剂在施用以后，在体内，在一段时间内持续递送，优选至少几天、一周或数周。所述组合物的持久递送可以被证明，例如所述酶在一段时间内的持久治疗效果（例如所述酶的持久递送可以通过在所述受试者中贮藏粒量的持续减少所证明）。可选择地，所述酶的持久递送可以被证明：通过在一定时间内检测在体内存在的所述酶。

[0219] 递送至靶组织

[0220] 如上文所讨论的,本发明的一种令人惊讶的和重要的特征是:所述治疗试剂,特别的,使用本发明施用的替代酶能有效地、广泛地分散在所述脑表面,并渗透多层脑区域(包括深部脑区域)。另外,本发明的方法和组合有效地递送治疗试剂(例如 ASA 酶)至脊髓的多种组织、神经元或细胞,包括腰区,所述腰区难以通过存在的 CNS 递送方法(例如 ICV 注射)靶向定位。而且,本发明的发明方法和组合物递送充分的量的治疗试剂(例如 ASA 酶)至血流、多种外周器官和组织中。

[0221] 因此,在一些实施方案中,治疗性蛋白质(例如 ASA 酶)被递送至受试者的中枢神经系统。在一些实施方案中,治疗性蛋白质(例如 ASA 酶)被递送至脑、脊髓、和/或外周器官的靶组织。如本文使用的,所述术语“靶组织”是指受到待治疗的溶酶体贮积症影响的任意组织,或者所述缺陷的溶酶体酶正常表达的任意组织。在一些实施方案中,靶组织包括这些组织:在所述组织中具有可检测的或者异常高的量的酶底物,例如储存在所述组织的细胞溶酶体中(在患有或已患有溶酶体贮积症的患者中)。在一些实施方案中,靶组织包括表现具有疾病相关病理、症状或特征的这些组织。在一些实施方案中,靶组织包括这些组织:在所述组织中所述缺陷的溶酶体酶以升高的水平正常表达。如本文使用的,靶组织可以是脑靶组织、脊髓靶组织和/或外周靶组织。示例性的靶组织在下文详细描述。

[0222] 脑靶组织

[0223] 一般而言,所述脑可以被分成不同的区域、层和组织。例如,脑膜组织是覆盖所述中枢神经系统(包括所述脑)的膜系统。所述脑膜含有三层,包括硬脑膜、蛛网膜和软脑膜。一般而言,所述脑膜和脑脊液的主要功能是保护所述中枢神经系统。在一些实施方案中,根据本发明的治疗性蛋白质被递送至一层或多层所述脑膜。

[0224] 所述脑具有三个主要的细分区,包括大脑、小脑和脑干。所述大脑半球位于大部分其它脑结构上方,并且被皮层覆盖。在所述大脑下面是脑干,所述脑干看起来像连接在所述大脑上的柄。在所述脑的后部,所述大脑以下和所述脑干后面,是小脑。

[0225] 间脑(其位于所述脑中线附近,并且在所述中脑上方)含有丘脑、后丘脑、下丘脑、上丘脑、腹侧丘脑和前顶盖。中脑(也称为中脑)含有顶盖、大脑脚盖、脑室中脑水管、大脑脚、红核、和颅神经 III 核。中脑与视觉、听觉、运动控制、睡眠/唤醒、警觉和温度调节相关。

[0226] 中枢神经系统组织的区域(包括脑)的特征,可以基于所述组织的深度划分。例如, CNS(例如脑)组织的特征可以描述成表面或者浅部组织、中层深度组织和/或深部组织。

[0227] 根据本发明,治疗性蛋白质(例如替代酶)可以递送到与在受试者中待治疗的特定疾病相关的任意合适的脑靶组织。在一些实施方案中,根据本发明的治疗性蛋白质(例如替代酶)被递送至表面或浅部的脑靶组织。在一些实施方案中,根据本发明的治疗性蛋白质被递送至中层深度脑靶组织。在一些实施方案中,根据本发明的治疗性蛋白质被递送至深部脑靶组织。在一些实施方案中,根据本发明的治疗性蛋白质被递送至表面或浅部脑靶组织、中层深度脑靶组织、和/或深部脑靶组织的组合。在一些实施方案中,根据本发明的治疗性蛋白质被递送至深部脑组织,其在脑的外部表面以下(或内部)至少 4mm、5mm、6mm、7mm、8mm、9mm、10mm 或更多。

[0228] 在一些实施方案中,治疗试剂(例如酶)被递送至大脑的一个或多个表面或者浅

部组织。在一些实施方案中,所述靶向的大脑表面或者浅部组织位于距所述大脑表面 4mm 以内。在一些实施方案中,所述靶向的大脑表面或浅部组织选自:软脑膜组织、大脑皮质带状组织、海马、Virchow Robin 空间、VR 空间内的血管、海马、在脑下表面上的部分下丘脑、视神经和神经束、嗅球和突起物、及其组合。

[0229] 在一些实施方案中,治疗试剂(例如酶)被递送至大脑的一个或多个深部组织。在一些实施方案中,所述靶向的大脑表面或浅部组织位于在所述脑表面以下(或内部)4mm(例如 5mm、6mm、7mm、8mm、9mm、或者 10mm)。在一些实施方案中,大脑的靶向深部组织包括大脑皮质丝带。在一些实施方案中,大脑的靶向深部组织包括间脑(例如下丘脑、丘脑、腹侧丘脑、底丘脑等)、后脑、豆状核、基底神经节、尾状核、豆状核、杏仁核、苍白球及其组合的一种或多种组织。

[0230] 在一些实施方案中,治疗试剂(例如酶)被递送至一种或多种的小脑组织。在某些实施方案中,所述靶向的一种多种小脑组织选自:分子层组织、浦肯野(氏)细胞层组织、颗粒细胞层组织、小脑脚、及其组合。在一些实施方案中,治疗试剂(例如酶)被递送至一种或多种小脑组织,包括但不限于浦肯野(氏)细胞层组织、颗粒细胞层组织、小脑深部白质组织(例如相对于颗粒细胞层的深部)、和小脑深部核组织。

[0231] 在一些实施方案中,治疗试剂(例如酶)被递送至一种或多种脑干组织。在一些实施方案中,所述靶向的一种或多种脑干组织包括脑干白质组织和/或脑干核组织。

[0232] 在一些实施方案中,治疗试剂(例如酶)被递送至多种脑组织,包括但不限于灰质、白质、脑室周围区域、软膜蛛网膜、脑膜、新皮质、小脑、大脑皮层中的深部组织、分子层、尾状核/豆状核区域、中脑、脑桥或者延髓的深部区域及其组合。

[0233] 在一些实施方案中,治疗试剂(例如酶)被递送至在脑中的多种细胞,包括但不限于神经元、胶质细胞、血管周细胞和/或脑膜细胞。在一些实施方案中,治疗性蛋白质被递送至深部白质的少突胶质细胞。

[0234] 脊髓

[0235] 一般而言,脊髓的区域或者组织可以根据组织深度的特点区分。例如,脊髓组织可以区分为表面或者浅部组织、中层深度组织、和/或深部组织。

[0236] 在一些实施方案中,治疗试剂(例如酶)被递送至脊髓的一种多种表面或者浅部组织。在一些实施方案中,靶向的脊髓的表面或浅部组织位于距离所述脊髓表面 4mm 以内。在一些实施方案中,靶向的脊髓的表面或浅部组织含有软脑膜和/或束状的白质。

[0237] 在一些实施方案中,治疗试剂(例如酶)被递送至所述脊髓的一种或多种组织。在一些实施方案中,脊髓的靶向深部组织位于距所述脊髓表面内部 4mm。在一些实施方案中,脊髓的靶向深部组织含有脊髓灰质和/或室管膜细胞。

[0238] 在一些实施方案中,治疗试剂(例如酶)被递送至脊髓的神经元。

[0239] 外周靶组织

[0240] 如本文使用的,外周器官或组织是指那些不是所述中枢神经系统(CNS)组成部分的任意器官或组织。外周靶组织可以包括,但不限于血液系统、肝脏、肾脏、心脏、内皮、骨髓和骨髓来源的细胞、脾脏、肺脏、淋巴结、骨、软骨、卵巢和睾丸。在一些实施方案中,根据本发明的治疗性蛋白质(例如替代酶)被递送至一种或多种外周靶组织。

[0241] 生物分布和生物药效率

[0242] 在多种实施方案中,一旦递送至所述靶组织,治疗试剂(例如ASA酶)被定位到细胞内。例如,治疗试剂(例如酶)可以定位至靶细胞(例如神经元,例如浦肯野细胞)的外显子、轴突、溶酶体、线粒体或者液泡。例如,在一些实施方案中,鞘内施用的酶展示易位动态,使得所述酶在所述血管周空间以内移动(例如通过脉动辅助对流机制)。此外,与将所述施用蛋白质或者酶与神经丝结合有关的活性轴突运输机制可能有助于或者促进鞘内施用蛋白质或者酶分布进入所述中枢神经系统的深部组织。

[0243] 在一些实施方案中,根据本发明递送的治疗试剂(例如ASA酶)可在多种本文描述的靶组织中,实现治疗(或临床)的效果水平(或活性)。如本文使用的,治疗(或临床)的效果水平(或活性)是这样的水平,其能在靶组织中提供足够的治疗效果。所述治疗效果可以是客观的(即通过某种测试或标记物进行可以测量的)或者主观的(即受试者给出的指示或者感觉的效果)。例如,治疗(或临床)的效果水平(或活性)可以是这样的酶水平或者活性:其可以足够地减缓与在所述靶组织中的疾病相关的症状(例如GAG储存)。

[0244] 在一些实施方案中,根据本发明递送的治疗试剂(例如替代酶)可以实现的酶水平或者活性是:相对于在靶组织中的溶酶体酶的正常水平或者活性的至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%。在一些实施方案中,根据本发明递送的治疗试剂(例如替代酶)可以实现的酶水平或者活性是:相对于对照(例如没有进行所述治疗时的内源水平或者活性),以至少1-倍、2-倍、3-倍、4-倍、5-倍、6-倍、7-倍、8-倍、9-倍或者10-倍地增加。在一些实施方案中,根据本发明递送的治疗试剂(例如替代酶)可以达到增加的酶水平或者活性是:在靶组织中,至少约10nmol/hr/mg、20nmol/hr/mg、40nmol/hr/mg、50nmol/hr/mg、60nmol/hr/mg、70nmol/hr/mg、80nmol/hr/mg、90nmol/hr/mg、100nmol/hr/mg、150nmol/hr/mg、200nmol/hr/mg、250nmol/hr/mg、300nmol/hr/mg、350nmol/hr/mg、400nmol/hr/mg、450nmol/hr/mg、500nmol/hr/mg、550nmol/hr/mg或者600nmol/hr/mg。

[0245] 在一些实施方案中,根据本发明发明的方法对于靶向腰椎部位特别有用。在一些实施方案中,根据本发明递送的治疗试剂(例如替代酶)可以达到的增加的酶水平或者活性是:在所述腰区中,至少约500nmol/hr/mg、600nmol/hr/mg、700nmol/hr/mg、800nmol/hr/mg、900nmol/hr/mg、1000nmol/hr/mg、1500nmol/hr/mg、2000nmol/hr/mg、3000nmol/hr/mg、4000nmol/hr/mg、5000nmol/hr/mg、6000nmol/hr/mg、7000nmol/hr/mg、8000nmol/hr/mg、9000nmol/hr/mg、或者10,000nmol/hr/mg。

[0246] 一般而言,根据本发明递送的治疗试剂(例如替代酶)在CSF以及脑、脊髓和外周器官的靶组织中具有充分长的半衰期。在一些实施方案中,根据本发明递送的治疗试剂(例如替代酶)可以具有的半衰期:至少约30分钟、45分钟、60分钟、90分钟、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、16小时、18小时、20小时、25小时、30小时、35小时、40小时、多达3天、多达7天、多达14天、多达21天或者多达一月。在一些实施方案中,在一些实施方案中,根据本发明递送的治疗试剂(例如替代酶)可以在CSF或者血流中持有可检测的水平或者活性,在施用的12小时、24小时、30小时、36小时、42小时、48小时、54小时、60小时、66小时、72小时、78小时、84小时、90小时、96小时、102小时、或一周后。可检测的水平或者活性可以使用本领域已知的方法测定。

[0247] 在某些实施方案中,根据本发明递送的治疗试剂(例如替代酶)达到的浓度是:在

施用后（在鞘内施用所述药物组合物至所述受试者后的例如 1 周、3 天、48 小时、36 小时、24 小时、18 小时、12 小时、8 小时、6 小时、4 小时、3 小时、2 小时、1 小时、30 分钟或更少）的所述受试者的所述 CNS 组织和细胞中，至少 $30 \mu\text{g/ml}$ 。在某些实施方案中，根据本发明递送的治疗试剂（例如替代酶）在施用至受试者（例如在鞘内施用这种组合物至所述受试者 1 周、3 天、48 小时、36 小时、24 小时、18 小时、12 小时、8 小时、6 小时、4 小时、3 小时、2 小时、1 小时、30 分钟或更少时间之后）后，在所述受试者的靶组织或细胞中（例如脑组织或神经元），达到的浓度为：至少 $20 \mu\text{g/ml}$ 、至少 $15 \mu\text{g/ml}$ 、至少 $10 \mu\text{g/ml}$ 、至少 $7.5 \mu\text{g/ml}$ 、至少 $5 \mu\text{g/ml}$ 、至少 $2.5 \mu\text{g/ml}$ 、至少 $1.0 \mu\text{g/ml}$ 或者至少 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 。

[0248] 异染性脑白质营养不良 (MLD) 的治疗

[0249] 异染性脑白质营养不良并病 (MLD) 是常染色体隐性遗传疾病，其导致 Arylsulfatase A (ASA) 酶的缺乏。ASA，其是由人类 ARSA 基因编码的，是降解脑苷脂 3-硫酸盐或者鞘脂类 3-O-磺基半乳糖基神经酰胺（硫脑苷酯）成脑苷脂和硫酸盐的酶。在缺乏这种酶时，硫脑苷酯在神经系统（例如髓鞘、神经元和胶质细胞）中累积，并且在内脏器官中以较小的程度累积。这些分子和细胞事件的后果是进行性的脱髓鞘和轴突损失（在所述 CNS 和 PNS 中），其伴随着临床上严重的运动和认知障碍。

[0250] 这种疾病的定义的临床特征是中枢神经系统 (CNS) 衰退，其导致认知障碍（例如智力迟钝、神经紊乱和失明等等）。

[0251] MLD 能够表现在幼童（晚期婴儿形式）中，其影响儿童，通常正好在其生命的第一年（例如在大约 15-24 月）开始表现症状，然后通常不会存活超过 5 岁。MLD 可以在儿童中表现（幼态形式），其影响儿童，通常表现在大约 3-10 岁之间的认知障碍，并且寿命可以变化（例如在发生症状后的 10-15 年的范围）。MLD 可以在成人中表现（成人发病形式），并且能够在个体的任何年龄出现（例如通常地在 16 岁或者更晚），并且所述疾病的进展可以变化很大。

[0252] 本发明的组合物和方法可以用于有效地治疗患有或易患有 MLD 的个体。所述术语，“处理”或者“治疗，”如本文所使用的，是指所述疾病并发的一种或多种症状的转佳，预防或者延缓所述疾病一种或多种症状的发病，和/或减轻所述疾病一种或多种症状的严重程度或者频率。示例性的症状包括但不限于：颅内压增高，脑外积水，在中枢和周围神经系统髓鞘中和在内脏器官中的硫酸糖脂积累，在所述 CNS 和 PNS 以内的进行性脱髓鞘和轴突损失，和/或运动和认知功能障碍。

[0253] 在一些实施方案中，治疗是指：在 MLD 患者中，使神经学损伤的严重程度和/或发生率部分地或者完全地缓解、转佳、减轻、抑制、延缓发生、降低。如本文所使用的，所述术语“神经学损伤”包括：与中枢神经系统（例如脑和脊髓）损伤并发的多种症状。在一些实施方案中，MLD 的多种症状与外周神经系统 (PNS) 损伤相关。在一些实施方案中，在 MLD 患者中的神经学损伤特征在于粗大运动功能的衰退。可以理解，粗大运动功能可以通过任何合适的方法评估。例如，在一些实施方案中，使用粗大运动功能评估量表 -88 (GMFM-88) 总原始分数，粗大运动功能按照从在运动功能中基线的变化测定。

[0254] 在一些实施方案中，治疗是指在多种组织中减少的硫脑苷酯累积。在一些实施方案中，治疗是指在脑靶组织、脊髓神经元和/或外周靶组织中，硫脑苷酯的累积减少。在某些实施方案中，硫脑苷酯的累积与对照相比，以约 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、

40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或者更多地减少。在一些实施方案中,硫脑苷酯的累积与对照相比,以至少1-倍、2-倍、3-倍、4-倍、5-倍、6-倍、7-倍、8-倍、9-倍或者10-倍地减少。应当理解,硫脑苷酯的储存可以通过任意合适的方法评估。例如,在一些实施方案中,硫脑苷酯储存通过 Alcian 蓝染色测量。在一些实施方案中,硫脑苷酯储存通过 LAMP-1 染色测量。

[0255] 在一些实施方案中,治疗是指在神经元(例如,含有浦肯野细胞的神经元)中液泡化减少。在某些实施方案中,在神经元中的液泡化与对照相比,以约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更多地减少。在一些实施方案中,液泡化与对照相比,以至少1-倍、2-倍、3-倍、4-倍、5-倍、6-倍、7-倍、8-倍、9-倍 or 10-倍地减少。

[0256] 在一些实施方案中,治疗是指在多种组织中 ASA 酶活性增加。在一些实施方案中,治疗是指在脑靶组织、脊髓神经元和/或外周靶组织中,ASA 酶活性增加。在一些实施方案中,ASA 酶活性与对照相比,以约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%或者更多地增加。在一些实施方案中,ASA 酶活性与对照相比,以至少1-倍、2-倍、3-倍、4-倍、5-倍、6-倍、7-倍、8-倍、9-倍或者10-倍地增加。在一些实施方案中,增加的 ASA 酶活性为至少大约 10nmol/hr/mg、20nmol/hr/mg、40nmol/hr/mg、50nmol/hr/mg、60nmol/hr/mg、70nmol/hr/mg、80nmol/hr/mg、90nmol/hr/mg、100nmol/hr/mg、150nmol/hr/mg、200nmol/hr/mg、250nmol/hr/mg、300nmol/hr/mg、350nmol/hr/mg、400nmol/hr/mg、450nmol/hr/mg、500nmol/hr/mg、550nmol/hr/mg、600nmol/hr/mg 或者更多。在一些实施方案中,ASA 酶活性在所述腰区中增加。在一些实施方案中,在所述腰区中增加的 ASA 酶活性为至少大约 2000nmol/hr/mg、3000nmol/hr/mg、4000nmol/hr/mg、5000nmol/hr/mg、6000nmol/hr/mg、7000nmol/hr/mg、8000nmol/hr/mg、9000nmol/hr/mg、10,000nmol/hr/mg 或更多。

[0257] 在一些实施方案中,治疗是指认知能力丧失的进展减少。在某些实施方案中,认知能力丧失的进展相对于对照,以大约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或者更多地减少。在一些实施方案中,治疗是指发展迟缓的减少。在某些实施方案中,发育迟缓相对于对照,以大约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或者更多地减少。

[0258] 在一些实施方案中,治疗涉及增加的存活率(例如存活时间)。例如,治疗能导致患者预期寿命的增加。在一些实施方案中,根据本发明的治疗导致患者预期寿命增加,相对于患有类似疾病而没有治疗的一个或多个个体对照的平均预期寿命,以多于大约5%、大约10%、大约15%、大约20%、大约25%、大约30%、大约35%、大约40%、大约45%、大约50%、大约55%、大约60%、大约65%、大约70%、大约75%、大约80%、大约85%、大约90%、大约95%、大约100%、大约105%、大约110%、大约115%、大约120%、大约125%、大约130%、大约135%、大约140%、大约145%、大约150%、大约155%、大约160%、大约165%、大约170%、大约175%、大约180%、大约185%、大约190%、大约195%、大约200%或更多地增加。在一些实施方案中,根据本发明的治疗导致患者预期寿命增加,相对于患有

类似疾病而没有治疗的一个或多个个体对照的平均预期寿命,以多于大约 6 月、大约 7 月、大约 8 月、大约 9 月、大约 10 月、大约 11 月、大约 12 月、大约 2 月、大约 3 月、大约 4 月、大约 5 月、大约 6 月、大约 7 月、大约 8 月、大约 9 月、大约 10 年或者更多地增加。在一些实施方案中,根据本 发明的治疗导致患者的长期存活。如本文使用的,所述术语“长期存活”是指存活时间或者预期寿命长于大约 40 年、45 年、50 年、55 年、60 年、或更长时间。

[0259] 所述术语“改善”、“增加”或“减少”如本文使用的,表示指示相对于对照的值。在一些实施方案中,合适的对照是基线测量,例如在启动本文描述的治疗之前的相同个体内的测量,或者在缺乏本文描述的治疗的对照个体(或多个对照个体)内的测量。“对照个体”是受所述相同形式的 MLD(例如,晚期婴儿、青少年或者成人发病形式)折磨的个体,并且其处于与正被治疗的个体相同的年龄和/或者性别(以确保被治疗的所述疾病的阶段和所述对照个体具有可比性)。

[0260] 正被治疗的所述个体(也称为“患者”或“受试者”)是这样的个体(胎儿、婴儿、儿童、青少年或成人人类):其患有 MLD 或者具有发展为 MLD 的潜力。所述个体具有残留的内源性 ASA 酶表达和/或活性、或者不可测量的活性。例如,患有 ASA 的所述个体可以具有的 ASA 表达水平,比正常 ASA 表达水平,低大约 30-50%、低大约 25-30%、低大约 20-25%、低大约 15-20%、低大约 10-15%、低大约 5-10%、低大约 0.1-5%。

[0261] 在一些实施方案中,所述个体是最近被诊断患有所述疾病的个体。通常地,早期治疗(在诊断后尽可能早地开始治疗)对于使疾病的影响最小化以及使治疗的益处最大化是重要的。

[0262] 免疫耐受性

[0263] 通常,鞘内施用根据本发明的治疗试剂(例如替代酶)在所述受试者中不导致严重的不良反应。如本文使用的,严重的不良反应包括但不限于,基本免疫应答、毒性或者死亡。如本文使用的,所述术语“基本免疫应答”是指严重的免疫应答,例如适应性 T- 细胞免疫应答。

[0264] 因此,在许多实施方案中,根据本发明发明的方法不涉及并发免疫抑制疗法(即,在与所述方法平行进行或作为预处理/预调节使用的许多免疫抑制剂治疗)。在一些实施方案中,根据本发明发明的方法不涉及在所述被治疗的受试者中的免疫耐受诱导。在一些实施方案中,根据本发明发明的方法不涉及使用 T- 细胞免疫抑制剂进行的预处理或预调节。

[0265] 在一些实施方案中,治疗试剂的鞘内施用可以发动针对这些试剂的免疫应答。因此,在一些实施方案中,它对于使得接受所述替代酶的所述受试者容忍所述酶替代疗法有用。免疫耐受性可以使用多种现有技术的方法诱导。例如,可以使用的方法:最初 30-60 天方案的 T- 细胞免疫抑制剂,例如环孢霉素 A(CsA) 和抗增殖剂(例如硫唑嘌呤(Aza)),并结合每周鞘内注射低剂量的预期替代酶。

[0266] 对本领域技术人员已知的任何免疫抑制剂,可以与本发明的组合疗法一起采用。这种免疫抑制剂包括但不限于:环孢霉素、FK506、纳巴霉素、CTLA4-Ig、和抗 TNF 试剂(例如依那西普)(参见例如 Moder, 2000, Ann. Allergy Asthma Immunol. 84, 280-284; Nevins, 2000, Curr. Opin. Pediatr. 12, 146-150; Kurlberg et al., 2000, Scand. J. Immunol. 51, 224-230; Ideguchi et al., 2000, Neuroscience 95, 217-226; Potteret

al., 1999, Ann. N. Y. Acad. Sci. 875, 159-174 ; Slavik et al., 1999, Immunol. Res. 19, 1-24 ; Gaziev et al., 1999, Bone Marrow Transplant. 25, 689-696 ; Henry, 1999, Clin. Transplant. 13, 209-220 ; Gummert et al., 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10, 1366-1380 ; Qi et al., 2000, Transplantation 69, 1275-1283)。所述抗 IL2 受体 (. α - 亚单位) 抗体赛尼哌 (例如 Zenapax. TM.), 其被表明在移植患者中有效, 也能作为免疫抑制剂使用 (参见例如 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)。其它免疫抑制剂包括但不限于: 抗 -CD2 (Branco et al., 1999, Transplantation 68, 1588-1596 ; Przepiorka et al., 1998, Blood 92, 4066-4071), 抗 -CD4 (Marinova-Mutafchieva et al., 2000, Arthritis Rheum. 43, 638-644 ; Fishwild et al., 1999, Clin. Immunol. 92, 138-152), 和抗 -CD40 配体 (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)。

[0267] 施用

[0268] 本发明的方法考虑到: 单一以及多个治疗有效量的本文所描述的所述治疗试剂 (例如替代酶) 的施用。治疗试剂 (例如替代酶) 可以根据所述受试者的病情 (例如溶酶体贮积症) 的特性、严重程度和范围, 以有规律的间隔施用。在一些实施方案中, 治疗有效量的本发明治疗试剂 (例如替代酶) 可以周期性地鞘内施用, 以有规律的间隔 (例如一年一次、6 个月一次、每五个月一次、每三个月一次、两月一次 (每两个月一次)、每月一次 (每月一次)、两周一次 (每两周一次)、每周一次)。

[0269] 在一些实施方案中, 鞘内施用可以连同其它施用途径使用 (例如静脉内的、皮下地、肌肉内的、肠胃外地、经皮肤地、或者经黏膜地 (或者口服地或经鼻地))。在一些实施方案中, 这些施用途径 (例如静脉施用) 执行的频率不多于两周一次、每月一次、每两个月一次、每三个月一次、每四个月一次、每五个月一次、每六个月一次、每年一次施用。

[0270] 如本文使用的, 所述术语 “治疗有效量” 很大程度上, 是基于在所述本发明药物组合物中的治疗试剂的总量决定的。通常的, 治疗有效量对于所述受试者足够能实现有意义的好处 (例如治疗、调整、治愈、阻止和 / 或改善所述潜在的疾病或病情)。例如, 治疗有效量可以是足够实现预期治疗和 / 或预防性效果的量, 并且这种量足够调节溶酶体受体或者他们的活性, 从而治疗这种溶酶体贮积症或者其症状 (例如在施用本发明组合物至受试者后, 使 “斑马小体” 或者细胞液泡化的存在或者发生率减少或者消除。通常, 治疗试剂 (例如溶酶体酶) 的量 (施用至需要其的受试者) 将根据所述受试者的特性变化。这种特性包括: 所述受试者的病情、疾病严重程度、健康状况、年龄、性别和体重。一个本领域技术人员将根据这些和其它相关因素, 容易地决定合适的剂量。另外, 客观的和主观的分析都可以任选地采用, 以识别最优剂量范围。

[0271] 治疗有效量通常施用的剂量方案, 包括多个单位剂量。对特定的治疗性蛋白质, 治疗有效量 (和 / 或在有效给药方案内的合适的单位剂量) 可能会变化, 例如根据结合其它药物试剂的施用途径。而且, 对于特定患者的特定治疗有效量 (和 / 或单位剂量) 可以根

据多种因素改变,包括正被治疗的疾病和所述疾病的严重程度、所采用的特定药物试剂的活性;所采用的特定组合物;所述受试者的年龄、体重、健康状况、性别和饮食;所采用的特定融合蛋白的施用时间、施用途径和/或排泄率或代谢率;所述治疗的持续时间;以及在医药领域已知的类似因素。

[0272] 在一些实施方案中,所述治疗有效剂量的范围:从大约 0.005mg/kg 脑重量至 500mg/kg 脑重量,例如,从大约 0.005mg/kg 脑重量至 400mg/kg 脑重量,从大约 0.005mg/kg 脑重量至 300mg/kg 脑重量,从大约 0.005mg/kg 脑重量至 200mg/kg 脑重量,从大约 0.005mg/kg 脑重量至 100mg/kg 脑重量,从大约 0.005mg/kg 脑重量至 90mg/kg 脑重量,从大约 0.005mg/kg 脑重量至 80mg/kg 脑重量,从大约 0.005mg/kg 脑重量至 70mg/kg 脑重量,从大约 0.005mg/kg 脑重量至 60mg/kg 脑重量,从大约 0.005mg/kg 脑重量至 50mg/kg 脑重量,从大约 0.005mg/kg 脑重量至 40mg/kg 脑重量,从大约 0.005mg/kg 脑重量至 30mg/kg 脑重量,从大约 0.005mg/kg 脑重量至 25mg/kg 脑重量,从大约 0.005mg/kg 脑重量至 20mg/kg 脑重量,从大约 0.005mg/kg 脑重量至 15mg/kg 脑重量,从大约 0.005mg/kg 脑重量至 10mg/kg 脑重量。

[0273] 在一些实施方案中,所述治疗有效剂量是:大于约 0.1mg/kg 脑重量,大于约 0.5mg/kg 脑重量,大于约 1.0mg/kg 脑重量,大于约 3mg/kg 脑重量,大于约 5mg/kg 脑重量,大于约 10mg/kg 脑重量,大于约 15mg/kg 脑重量,大于约 20mg/kg 脑重量,大于约 30mg/kg 脑重量,大于约 40mg/kg 脑重量,大于约 50mg/kg 脑重量,大于约 60mg/kg 脑重量,大于约 70mg/kg 脑重量,大于约 80mg/kg 脑重量,大于约 90mg/kg 脑重量,大于约 100mg/kg 脑重量,大于约 150mg/kg 脑重量,大于约 200mg/kg 脑重量,大于约 250mg/kg 脑重量,大于约 300mg/kg 脑重量,大于约 350mg/kg 脑重量,大于约 400mg/kg 脑重量,大于约 450mg/kg 脑重量,大于约 500mg/kg 脑重量。

[0274] 在一些实施方案中,所述治疗有效剂量也可以通过 mg/kg 体重定义。作为本领域技术人员,将理解:所述脑重量和体重是相关的。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。因此,在一些实施方案中,所述剂量可以根据在表 5 中所示的进行转化。

[0275] 表 5

[0276]

在雄性的脑重量、体重和年龄之间的相关性		
年龄 (年)	脑重量 (kg)	体重 (kg)
3 (31-43个月)	1.27	15.55
4-5	1.30	19.46

[0277] 在一些实施方案中,所述治疗有效剂量可以通过 mg/15cc 的 CSF 定义。作为本领域技术人员,将理解:根据脑重量和体重,将治疗有效量转化成 mg/15cc 的 CSF。例如,在成

年人类中的CSF的体积为约150mL(Johanson CE, et al. "Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease," cerebrospinal fluid Res. 2008 May 14 ;5:10).。因此,单剂量注射0.1mg至50mg蛋白质至成年人,在成年人中将会是约0.01 mg/15cc的CSF(0.1mg)至5.0mg/15cc的CSF(50mg)剂量。

[0278] 进一步可以理解,对于任意特定的受试者,随着时间的过去,根据所述个体需要和施用并监督(所述酶替代治疗的施用)的人员的专业判断,应该调整特定剂量方案,并且本文提出的给药范围仅仅是示例性的,并不打算限制本发明要求的范围或实践。

[0279] 试剂盒

[0280] 本发明进一步提供了试剂盒或者含有本发明所述制剂的其它制造业制品,并提供了其再生(如果冻干)和/或使用的指导。试剂盒或其它制造业制品可以包括容器、IDDD、导管和其它对于鞘内施用和相关手术有用的制品、设备或装置。合适的容器包括,例如瓶子、小药瓶、注射器(例如载药注射器)、安瓿、药筒、贮液囊、或(装有冻干粉和稀释剂的)二室注射器给药系统(lyo-ject)。所述容器可以用多种材料(例如玻璃或者塑料)形成。在一些实施方案中,容器是载药注射器。合适的载药注射器包括,但不限于,具有烘干的硅树脂涂层的硼硅酸盐玻璃注射器、喷涂硅树脂的硼硅酸盐、或者无硅树脂的塑料树脂注射器。

[0281] 通常地,所述容器可以容纳制剂,并在其上具有标签,或者与之相关地,所述容器可以指示再生和/或施用的指导。例如,所述标签可以指示:再生所述制剂至上文所描述的蛋白质浓度。所述标签可以进一步指示:所述制剂是有用的,或者打算用于(例如)IT施用。在一些实施方案中,容器可以含有单剂量的稳定制剂,所述制剂含有治疗试剂(例如替代酶)。在多种实施方案中,单剂量的所述稳定的制剂以小于大约15ml、10ml、5.0ml、4.0ml、3.5ml、3.0ml、2.5ml、2.0ml、1.5ml、1.0ml、或者0.5ml的体积存在。可选择地,持有所述制剂的容器可以是多用途的小药瓶,其允许重复施用(例如2-6次施用)所述制剂。试剂盒或者制品可以进一步包括第二容器,所述第二容器包括合适的稀释剂(例如BWFI、生理盐水、缓冲的生理盐水)。在将所述稀释剂和所述制剂混合后,在所述再生的制剂中的所述最终蛋白质浓度通常可以是:至少1mg/ml(例如至少5mg/ml、至少10mg/ml、至少25mg/ml、至少50mg/ml、至少75mg/ml、至少100mg/ml)。试剂盒或者制品可以进一步包括其它(从商业和用户的角度看)理想的材料,其包括其它缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头、IDDD、导管、注射器和具有使用指南的包装说明书。

[0282] 通过参考以下的实施例,本发明将更充分地理解。但是这些用于解释的实施例不限制本发明的范围。所有文献引用通过参考的方式并入本文。

实施例

[0283] 实施例1:施用芳基硫酸酯酶A的毒理学

[0284] 为了评估其他鞘内-施用重组酶分布到的细胞和CNS组织的能力,进行GLP研究以从毒理学和安全药理学的角度评估,超过1个月期的青少年(年龄小于12个月)食蟹猴的重复给药鞘内(IT)施用重组-制备的人芳基硫酸酯酶A(rhASA)。制备rhASA制剂,并在154mM氯化钠、0.005%聚山梨酯20(pH为6.0)媒介物中配制。

[0285] 为了实现这一目标,按体重随机分配9只雄性和9名雌性少年食蟹猴至3个治疗

组之一,见下表 6 中所示。动物(剂量 1 的 1 只雄性动物例外)接受 0.6mL 短期 IT 输注 0, 3 或 31mg/mL 的 rhASA(总剂量为 0, 1.8 或 18.6mg),每隔 1 周,每只动物进行总的 3 次给药。监测体重、临床观察发现、精神和身体检查、临床病理、眼科检查和毒物采样。第 29, 30 或 31(最后 IT 给药后~24 小时)天,尸检所有的动物。收集选定的组织,保存和显微镜检查。

[0286] 表 6

[0287]

组	动物数量	标称给药浓度 (mg/mL)	给药体积 (mL)	施用的剂量 (mg)
1	3M, 3F	0	0.6	0

[0288]

2	3M, 3F	3	0.6	1.8
3	3M, 3F	31	0.6	18.6

[0289] 使用 ELISA 分析食蟹猴 CNS 组织中检测到的 rhASA 浓度,并与正常人类 rhASA 浓度 10% 的治疗目标相比,对应组织的约 2.5ng/mg。分别提取食蟹猴大脑不同区域的组织样品或钻孔活组织,并进一步分析存在的 rhASA。图 24 示出了该钻孔中提取的组织。钻孔活组织的组织样品反映了 rhASA 浓度的增加,反映在图 25A-G 中,从大脑皮层到深部白质和深部灰质具沉积梯度。

[0290] 使用相同钻孔活组织,从 IT 和 ICV 施用途径检测 rhASA 的浓度,对 6 只猴子施用 18.6mg 剂量的 rhASA,见图 26A-B 所示。成年和青少年食蟹猴鞘内-(IT)或脑室内地-(ICV)施用 rhASA,深部白质(图 25A)和在深部灰质(图 26B)的脑组织中检测到的 rhASA 浓度具有可比性。

[0291] 然后进行分析从成年和青少年食蟹猴的大脑的钻孔提取的组织样品,以确定沉积在所提取的组织样品中的 rhASA 的浓度,并比较此浓度与治疗的 2.5ng rhASA 每 mg 蛋白的目标浓度(对应于在健康受试者中正常浓度 rhASA 的 10%)。如图 27A 141A 所示,在每个组织样品中,钻孔分析 IT- 施用 18.6mg 剂量的 rhASA,导致 rhASA 浓度超过目标治疗蛋白质 2.5ng/mg 的浓度。同样,当 IT- 施用 1.8mg 剂量的 rhASA 于青少年食蟹猴,每个组织样品钻孔分析表明:rhASA 浓度在 2.5ng/mg 的蛋白质治疗浓度之内或超过,而且对所有组织钻孔测试(如图 27B)而言,中位 rhASA 浓度在治疗目标之上。

[0292] 要确定是否 IT- 施用的 rhASA 分布至相关的细胞,分析食蟹猴中深部白质的组织,所述食蟹猴 IT- 施用 1.8mg ASA,从图 28A 中示出的区域。深部白质组织的免疫染色揭示了 rhASA 在食蟹猴少突胶质细胞的分布,如图 28B 所示。同样,图 28C 表明,IT- 施用的 rhASA 在食蟹猴深部白质组织中表现出共定位。特别是,在目标细胞器,如溶酶体中,染色共定位是明显的(图 28C),支持结论:IT- 施用的 rhASA 能够分布到 CNS 相关的细胞、组织和细胞器,包括少突胶质细胞中的溶酶体。前文支持结论:也发现对于 rhASA 递送,在 ICV 和 IT 递送之间的区别程度最小。

[0293] 实施例 2: 具有放射性-标记的蛋白质的生物分布

[0294] 制备标记有正电子发射体 ^{124}I 的 rhASA,并在 154mM 氯化钠,0.005% 聚山梨酯 20, pH 为 6.0 的媒介物中配制。等价于 3mg rhASA (对应约为脑的 38mg/kg) 的制剂体积通过脑室内地 (ICV) 和鞘内施用途径 (IT) 施用于成年食蟹猴。对食蟹猴进行高分辨率的 PET 扫描成像研究 (微 PET P4),以测定施用的 ^{124}I 标记的 rhASA 的分布。

[0295] PET 成像数据 (图 29) 示出了 ICV 和 IT- 施用的 ^{124}I - 标记的 rhASA 二者在 CNS 组织中的有效分布,尤其是 ^{124}I - 标记的 rhASA 立即通过 IT 腰椎导管施用以及在脊柱长度上的脑脊髓液 (CSF) 中的均匀散布。特别是,如在图 29 中示出,ICV- 和 IT 施用后,在食蟹猴受试者的 CNS 组织 (包括脑,脊髓和脑脊液) 中检测 ^{124}I - 标记的 rhASA 的治疗浓度。在 CNS 等组织中浓度检到的 rhASA,特别是在大脑组织中,超出了治疗目标蛋白质 2.5ng/mg 的浓度。

[0296] 虽然 IT 和 ICV 施用途径的 rhASA 蛋白质分布是可比的,ICV 导致在脊柱中沉积显著减少,如图 29 证实。

[0297] 施用制剂 24 小时后,ICV 和 -IT- 施用的 ^{124}I - 标记的 ASA 有效地分布在 CNS 组织。特别是,与 ICV- 施用剂量的 16.7% 相比,在颅区,IT- 施用后 24 小时为施用剂量的 12.4%。因此,在此 CNS 组织检测到的 rhASA 浓度,特别是在大脑组织中,IT 施用的 rhASA 接近这些检测的浓度 (当 ICV- 施用相同剂量后)。

[0298] ICV 注射 ^{124}I - 标记 rhASA 导致 ICV 注射导致立即传输注入的量到小脑延髓池,脑桥池, (脑) 脚间池和近侧脊柱,如在图 30 中所示。也如图 30 所示,在 2-5 小时内,IT 施用递送 ^{124}I - 标记 rhASA 的相同的初始房室 (池与近端脊柱) 如 ICV 施用所示。24 小时后的 ICV- 和 IT 施用 ^{124}I - 标记的 rhASA 分布,在脊柱区池和近端是可比的,如在图 31 中示出。因此,与小分子药物不同,前述的结果表明,ICV- 施用比 IT- 施用 rhASA 具有最小的优势。

[0299] 这些结果证实,可以使用微创的 IT 施用途径将 rhASA 递送给受试者,从而在靶细胞和组织中达到治疗的浓度。

[0300] 所述溶酶体贮积症,代表酶丢失或损坏所造成的遗传性疾病家族,其导致异常的物质积累。而与这些疾病相关的几个周边症状,可以通过过静脉施用重组酶有效地减轻,静脉施用此重组酶预计不会显著影响与多数溶酶体贮积症相关的 CNS 表现。例如,重组人己醛糖酸盐 -2- 硫酸酯酶 (艾杜硫酸酶, Elaprase®; Shire 人类基因疗法, Inc. Lexington, MA) 被批准用于治疗 Hunter 综合症的躯体症状,但有没有药物疗法用于治疗 Hunter 综合症的神经系统表现,其中可包括迟缓发育和精神障碍加剧。这部分是由于 I2S 的天性,其为大的、高度糖基化的酶,其分子量约 76kD 而且静脉内施用后不穿过血脑屏障。

[0301] 因此,本发明人已经进行了计划,以研究鞘内 (IT) 递送重组人酶的鞘内制剂,诸如,例如,艾杜糖醛酸 -2- 硫酸酯酶 (I2S), 芳基硫酸酯酶 A (rhASA) 和 α -N- 乙酰氨基 (Naglu)。本文所示的结果第一次证明,施用 IT- 腰椎施用重组溶酶体蛋白导致施用的蛋白质显著部分递送到脑,特别是导致在在食蟹猴和狗的大脑和脊髓的神经元中广泛沉积这种蛋白质。CNS 组织的免疫组织化学分析表明,该蛋白定位到溶酶体,在溶酶体贮积症中病理粘多糖积累的位点。此外,在 Hunter 综合症的 IKO 小鼠模型、Sanfilippo 综合症 B 型的 Naglu- 缺陷小鼠模型、和异染性脑白质病变 (MLD) 的 ASA 基因敲除小鼠模型中,所述形态改善表现出加强观察 IT- 施用的酶分布到适当的组织和转运到适当的细胞房室和细胞器。

[0302] IT 腰椎和 ICV 施用 I2S 后,在脑分布格局中检测到的相似观察暗示 CSF 的散流

和活性再混合。因此,在临床设置中,IT 和 ICV 二者的施用途径是潜在可行的,然而,IT 施用后所观察到的 I2S 在脊髓中沉积中提供了在处理脊髓后遗症和溶酶体贮积症组分(如 Hunter 综合症)中的明显的优势。此外,脊髓内注射端口是微创的,并预期更适合长期使用,尤其是儿童受试者中。

[0303] 血管周细胞染色和通过上述 PET 成像研究观察的蛋白质转运动态证据表明:在血管周围间隙内酶的移动,可能是通过脉动辅助对流机制。由观察的关联 I2S 的神经丝蛋白,指示积极轴突运输,暗示额外的运输机制。后者假定蛋白质与神经元甘露糖-6-磷酸(M6P)受体的相互作用开始,这可能导致在脊髓和脑细胞上的广泛表达,其直接施用脑实质可引发靶细胞细胞很容易地吸收 I2S 酶。(Begley, et al., Curr Pharm Des (2008) 14:1566-1580)。

[0304] 虽然先前已通过体内间接的方法和体外成像暗示轴突运输溶酶体酶,目前的研究提供了轴突运输非病毒的或通过 CSF 递送表达酶的第一个直接证据。因此,从 CSF 到脑表面和深入脑组织的蛋白递送似乎取决于活性转移过程,其中没有先前已经描述或阐明蛋白质或酶递送到大脑的细胞、组织和细胞器。

[0305] 与流行的观点相反,软组织间质和 CSF 的流体动力可防止 IT-腰椎施用的蛋白质到脑白质的分布,即使研究清楚地表明:IT 递送溶酶体酶导致蛋白质在所有脑组织中的分布和积累以及沉积在靶细胞溶酶体房室中的积累,其为粘多糖积累的病理位点。(见, Fenstermacher et al., Ann N Y Acad Sci (1988) 531:29-39 和 DiChiro et al., Neurology (1976) 26:1-8.)。再加上 IT-腰椎递送的微创性本质,这条路线提供了递送生物疗法到脑的临床相关方法,特别是在儿童中。

[0306] 实施例 3: IT 施用芳基硫酸酯酶的制剂

[0307] 该实施例概述了这项工作:建立 rhASA(芳基硫酸酯酶 A)高浓度液体剂型、以及(原料药和药物产品的)制剂,用于通过鞘内(IT)施用途径治疗异染性脑白质营养不良(MLD)。

[0308] 所述稳定性数据表明,原料药和药物产品(没有 PBS 20)的盐制剂是稳定的(在 <-65 摄氏度,在 18 个月后;以及 2-8 摄氏度下的 18 个月后)。在这种蛋白质的药物开发期间,由于其打算递送至所述 CNS,研究在限定的缓冲剂和赋形剂条件下 rhASA 的可溶性和稳定性。先前,进行制剂开发研究,以开发静脉(IV)制剂。根据这些实验的结果,选择某制剂(在 10mM 柠檬酸盐-磷酸盐缓冲剂中含有 30mg/ml rhASA, pH 5.5, 以及 137mM NaCl 和 0.15% 泊洛沙姆 188),作为主要的 IV 制剂。也配制 rhASA 在三种制剂中,用于 IT 递送;并且对这种蛋白质在这些条件下的稳定性数据进行研究。利用来源于上游材料产品一个位点的 rhASA 批件。所述结果表明:rhASA 在 154mM 氯化钠溶液中,并具有 0.005% 聚山梨醇酯 20(P20), pH 6.0 是稳定的(2-8 摄氏度下,至少 18 个月)。另外,已经进行此项研究证明,对冻融的稳定性和搅拌-诱导的降解。

[0309] 将开发的批件被纯化、超滤和渗滤(UF/DF)进 10mM 柠檬酸盐/磷酸盐、137mM NaCl, pH 5.5, 随后接着 UF/DF 进入最终的生理盐水溶液,浓度大约 40mg/mL。所述 UF/DF 操作概述见于表 7 中。

[0310] 表 7: 选定制剂的 UF/DF 操作(来自 Xcellerex)

[0311]

制剂	初始缓冲剂以及 UF/DF 进入生理盐水	添加剂
A	10mM 柠檬酸盐/磷酸盐, 137mM NaCl, pH 5.5。随后 UF/DF 进入 154 mM NaCl 中。最终 pH 5.9	0.005% 聚山梨醇酯 20*
B	10mM 柠檬酸盐/磷酸盐, 137mM NaCl, pH 5.5。随后 UF/DF 进入 5mM 磷酸钠, 145mM NaCl, pH 6.0 中。最终 pH 6.0	0.005% 聚山梨醇酯 20*
C	10mM 柠檬酸盐/磷酸盐, 137mM NaCl, pH 5.5。随后 UF/DF 进入 10mM 柠檬酸盐/磷酸盐, 137mM NaCl, pH 7.0 中, 并且二次 UF/DF 进入 154 mM NaCl 中。最终 pH 6.5	0.005% 聚山梨醇酯 20*

[0312] rhASA

[0313] 配制 rhASA, 将在柠檬酸盐磷酸钠以及 137mM NaCl 中, 40mg/mL rhASA, pH 5.6 透析成 5 种制剂, 所述制剂被用于 IT- 预制剂研究 (表 8)。

[0314] 表 8: IT 相容性制剂筛选选点的缓冲剂

[0315]

制剂编号	缓冲剂种类	pH
1	154 mM NaCl *	5.9
2	154 mM NaCl **	7
3	5 mM 磷酸盐缓冲剂并具有 145 mM NaCl	6
4	5 mM 磷酸盐缓冲剂并具有 145 mM NaCl	7
5	1 mM 磷酸盐缓冲剂并具有 2 mM CaCl ₂ 和 137 mM NaCl	7

[0316] 方法

[0317] 为了通过差异扫描热量法 (DSC) 测定熔点 (T_m), 采用毛细管 DSC 微热量计 (MicroCal), 以及 60°C /hr 的扫描速率和 10-110°C 的温度范围。从所述蛋白质扫描减去缓冲剂基线。将所述扫描归一化为每个样品的蛋白质浓度 (通过在 280nm 下测定紫外吸光度, 并使用 0.69(mg/mL)⁻¹.cm⁻¹) 的消光系数。对于初始短期稳定性实验, rhASA 原料药在 40°C 下经历 2 个星期或者 40°C 下一个月。关于短期稳定性, 放置附加的样品在 2-8°C 为

期 3 个月。过滤样品 (Millipore, P/N SLGV033RS), 并且 0.5mL 的等分试样被分配到具有 13mmFluortec 瓶塞的 2mL 中。

[0318] 使用 DSC, 研究制剂组合物 (表 8) 对于 T_m (所述热诱导变性的温度中点) 的影响。在图 5 中示出了不同制剂组合物的所述 T_m 值。对于大多数制剂, 所述 T_m 值表现出相似的伸展温度; 除了观察到 (配制在 5mM 磷酸钠以及 154mM NaCl, pH 7.0 中; 或者 1mM 磷酸钠以及 2mM $CaCl_2$ 和 137mM NaCl, pH 7.0 中) 的 rhASA 为低 T_m 值。

[0319] 在所述 5 种选定的制剂 (表 8) 中, 研究了热诱导对 rhASA 降解的影响。将样品储存在 40°C 两星期或者一个月; 或者在 2-8°C, 为期 3 个月。对 40°C 储存 2 星期的样品进行 SDS-PAGE (Coomassie) 分析, 检测到 rhASA 的碎片, 所述 rhASA 配制在 5mM 磷酸钠 (具有 154mM NaCl 中, pH 7.0) 中, 以及 1mM 磷酸钠 (具有 2mM $CaCl_2$ 和 137mM NaCl, pH 7.0) 中 (图 6)。对于其他制剂没有观察到这种降解。

[0320] 所述降解产品的存在与大多数相同时间点的所述较低百分比主峰 (通过 RP-HPLC 观察) 一致 (表 10)。也观察到, 配制在 1mM PBS (具有 2mM $CaCl_2$, pH 7.0) 中的 rhASA 没有维持其 pH 值 (在所述短期暴露于热胁迫条件的开始和之后)。

[0321] 使用水 HPLC 系统, 进行体积排阻和反相 HPLC 分析。对于初始 SEC-HPLC 分析, 将 50 μ g rhASA 注射在 Agilent Zorbax GF-250 柱 (4.6mm x 250mm) 上, 并以 0.24mL/min 恒溶剂成分地运行, 使用 100mM 柠檬酸钠 pH 5.5 (八聚体检测) 流动相, 以及 280nm 的检测波长。使用 100mM 柠檬酸钠, pH 7.0 (二聚体检测) 的流动相条件, 进行所述重复分析。

[0322] 使用微量离心浓缩器 -Plus 20 (Millipore, 10kDa MWC0), 进行所有的缓冲液替换和浓度研究。

[0323] 预制剂筛选研究 - 缓冲剂种类和 pH 的影响

[0324] 由于批准的用于 CNS 施用的溶液组合物的数量有限, 筛选只选择了 5 种等渗溶液组合物, 如在表 8 中列出的。

[0325] pH 值记忆

[0326] 对于长期稳定性, 在所述缓冲剂选择之前, 进行两个“pH 值记忆”实验, 以研究替换成生理盐水溶液的所述蛋白质缓冲剂是否能够维持所述缓冲剂的最初 pH 值。在所述初始实验中, 在大约 8mg/mL 的 rhASA, 首先被透析进入 10mM 柠檬酸盐 - 磷酸盐 (具有 137mM NaCl, pH 值为 5.5 或 7.0), 接着二次透析进入生理盐水溶液。在所述第二个实验中, rhASA 被透析进入 10mM 柠檬酸盐 - 磷酸盐 (具有 137mM NaCl, pH 值为 5.5 或者 7.0) 中, 并且随后替换缓冲剂, 并浓缩进入生理盐水溶液中至大约 35mg/mL。

[0327] 当配制在 10mM 柠檬酸盐 - 磷酸盐 (具有 137mM NaCl, pH 值为 5.5 或者 7.0) 中的 rhASA, 被透析进入生理盐水溶液中, 没有观察到浊度增加。最终生理盐水溶液的 pH 与先前它所暴露的柠檬酸盐 - 磷酸盐缓冲剂的 pH 相似。当配制在柠檬酸盐 - 磷酸盐为基础的缓冲剂 (pH 值为 5.5 或者 7.0) 中, 被透析进入生理盐水溶液中, 然后使用微量离心浓缩器浓缩至大约 35mg/mL, 所述蛋白质生理盐水溶液的 pH 分别从 5.5 变换至 5.8 或者从 7.0 变换至 6.8。在生理盐水中浓缩的两种 rhASA 溶液稍微地呈乳光的, 并具有 OD320 值范围为 0.064 (pH 6.8) 至 0.080 (pH 5.5)。

[0328] 赋形剂选择

[0329] 在所有 5 中选定的溶液组合物中包括聚山梨醇酯 20 (P20), 其最终浓度为

0.005%。根据先前 P20 (在 0.005%) 在活体内的耐受性经验,选择表面活性剂,用于其它 Shire 蛋白质的 CNS 递送。制备 P20(v/v) 的溶液,并添加合适的体积至每种蛋白质制剂,以获得最终 0.005% 的浓度。

[0330] 制剂耐用性研究 - 稳定性研究

[0331] 根据从不同缓冲剂和 pH 值筛选获得的初始结果,选择三种溶液组合物进行长期稳定性研究(样品制备参见表 8)。在所述推荐的制剂中(表 9),启动一年的研究。在每个时间点的所述稳定性样品,分析其 SEC-HPLC、RP-HPLC、OD320、蛋白质浓度、pH、特异性活性、SDS-PAGE(Coomassie)、和外观。

[0332] 表 9- 进行长期稳定性研究的制剂

[0333]

制剂	制剂组合物, 具有 0.005% 聚山梨醇酯 20	研究条件
A	154 mM NaCl, pH 5.9	5° C、25° C、40° C、和冷冻基线, 在 ≤ -65° C
B	5mM 磷酸钠, 145mM NaCl, pH 6.0	
C	154 mM NaCl, pH 6.5	

[0334] 表 10: 选定制剂 (在 40±2°C) 在 2 星期后的稳定性

[0335]

制剂	外观	蛋白质浓度 (mg/mL)	OD320	SEC-HPLC (% 主峰), pH5.5	SEC-HPLC (% 主峰), pH7.0	RP-HPLC (% 主峰)	pH	特异性 活性 (U/mg)	
生理盐水, pH 5.9									
基线	清的 稍地 光的	晰至 微乳	29.9	0.044	>99.9	99.7	99.8	5.6	74
胁迫的	清的 稍地 光的	晰至 微乳	31.1	0.062	99.8	99.6	99.9	5.7	88
生理盐水, pH 7.0									
基线	清的 稍地 光的	晰至 微乳	29.0	0.038	>99.9	99.6	>99.9	6.7	83
胁迫的	清的 稍地 光的	晰至 微乳	32.1	0.041	99.1	99.7	97.0	6.5	66
5 mM PBS, pH 6.0									
基线	清的 稍地 光的	晰至 微乳	29.8	0.058	>99.9	99.7	99.9	5.9	102
胁迫的	清的 稍地 光的	晰至 微乳	30.5	0.076	98.8	99.7	99.7	5.9	95

[0336]

	地乳光的							
5 mM PBS, pH 7.0								
基线	清晰的 稍微地乳光的	29.7	0.035	>99.9	99.7	>99.7	6.9	86
胁迫的	稍微地乳光的 至乳光的	30.5	0.041	95.4	99.4	98.0	6.8	94
1 mM PBS, pH 7.0 以及 2 mM CaCl ₂ , pH 7.0								
基线	清晰的 稍微地乳光的	27.5	0.040	>99.9	99.7	>99.9	5.6	90
胁迫的	稍微地乳光的 至乳光的	27.7	0.042	94.8	99.8	99.0	6.6	93

[0337] 对于胁迫的样品（表 10），没有观察到特异性活性的显著改变。通过体积排阻 HPLC 分析检测到配制在 5mM 磷酸钠（具有 154mM NaCl, pH7.0）中的热胁迫样品在 2 星期内有一些降解。使用 pH 5.5 流动相条件的 SEC-HPLC 的降解更加显著，其与诱导 rhASA 称为八聚体相关。在这些流动相条件下，配制 rhASA 在 pH7.0, 1mM PBS（具有 2mM CaCl₂）中，表现出显著的降解。

[0338] 在暴露至 1 个月（在 40°C）之后，通过 SDS-PAGE（数据未示出），证明了配制在 5mM PBS, pH 7.0 以及 1mM PBS, pH 7.0（具有 2mM CaCl₂）中的样品表现出破碎。与这种观察一致，对于贮存在这两种 pH 7 制剂中的样品（表 11），（通过 RP-HPLC 和 SEC-HPLC）也观察到所述百分比主峰减少。尽管如此，特异性活性减少仅在配制于 5mM PBS, pH 7.0 的 rhASA 中观察到。

[0339] 表 11: 在一个月 (40±2°C) 后, 选定的 IT 制剂的稳定性

[0340]

制剂	外观	蛋白质 浓度 (mg/mL)	OD320	SEC-HPLC (% 主 峰) , pH5.5	SEC-HPLC (% 主 峰) , pH7.0	RP-HPLC (% 主 峰)	pH	特异性 活性 (U/mg)
生理盐水, pH 5.9								
基线	清晰的至 稍微地乳 光的	29.9	0.044	>99.9	99.7	99.8	5.6	74
胁迫的	清晰的至 稍微地乳 光的	28.3	0.061	>99.9	99.5	99.9	5.7	107
生理盐水, pH 7.0								
基线	清晰的至 稍微地乳 光的	29.0	0.038	>99.9	99.6	>99.9	6.7	83
胁迫的	清晰的至 稍微地乳 光的	25.7	0.189	95.7	99.8	99.5	6.6	100
5 mM PBS, pH 6.0								
基线	清晰的至 稍微地乳 光的	29.8	0.058	>99.9	99.7	99.9	5.9	102
胁迫的	清晰的至 稍微地乳 光的	28.0	0.059	>99.9	99.6	99.9	6.0	94
5 mM PBS, pH 7.0								
基线	清晰的至 稍微地乳 光的	29.7	0.035	>99.9	99.7	>99.9	6.9	86
胁迫的	稍微地乳 光的至乳 光的	27.3	0.142	91.8	89.6	97.1	6.9	48
1 mM PBS, pH 7.0 并具有 2 mM CaCl ₂								
基线	清晰的至 稍微地乳 光的	27.5	0.040	>99.9	99.7	>99.9	5.6	90
胁迫的	稍微地 乳光的 to 乳光 的	28.3	0.053	90.6	88.7	97.9	6.7	133

[0341] 在 2-8°C 储存 3 个月之后, rhASA 在所有制剂中保持其活性 (表 12)。此外, rhASA 维持 > 其主峰区的 99.8%, 如通过 SEC-HPLC, 在两种流动相条件下所评估的。在 2-8°C 为期 3 个月的稳定性数据概述见表 12 中。

[0342] 表 12: 选定的 IT 缓冲剂在 3 个月 (2-8°C) 后的稳定性

[0343]

制剂	外观	蛋白质 浓度 (mg/mL)	OD320	SEC-HPLC (% 主 峰) , pH5.5	SEC-HPLC (% 主 峰) , pH7.0	RP-HPLC (% 主 峰)	pH	特异性 活性 (U/mg)
生理盐水, pH 5.9								
基线	清晰的至 稍微地乳 光的	29.9	0.044	>99.9	99.7	99.8	5.6	74
胁迫的	清晰的至 稍微地乳 光的	29.4	0.056	99.8	>99.9	99.9	5.6	97
生理盐水, pH 7.0								
基线	清晰的至 稍微地乳 光的	29.0	0.038	>99.9	99.6	>99.9	6.7	83
胁迫的	清晰的至 稍微地乳 光的	25.5	0.040	99.8	>99.9	>99.9	6.6	127
5 mM PBS, pH 6.0								
基线	清晰的至 稍微地乳 光的	29.8	0.058	>99.9	99.7	99.9	5.9	102
胁迫的	清晰的至 稍微地乳 光的	29.9	0.045	99.8	>99.9	>99.9	5.9	109
5 mM PBS, pH 7.0								
基线	清晰的至 稍微地乳 光的	29.7	0.035	>99.9	99.7	>99.9	6.9	86
胁迫的	清晰的至 稍微地乳 光的	29.0	0.038	99.8	>99.9	>99.9	6.9	110
1 mM PBS, pH 7.0 并具有 2 mM CaCl ₂								
基线	清晰的至	27.5	0.040	>99.9	99.7	>99.9	5.6	90

[0344]

	稍微地乳 光的							
胁迫的	清晰的至 稍微地乳 光的	28.0	0.042	99.8	99.9	>99.9	6.6	105

[0345] 也评估了储存在 25°C 加速条件下三个月后, 配制在生理盐水 (pH 7.0) 以及 1mM PBS (pH 7.0, 并具有 2mM CaCl_2) 中的 rhASA。如在图 7 中所示, 在这些制剂中, rhASA 经历了稍微量的破碎 (具有强度大约 0.5% BSA 杂质波峰)。

[0346] 总体地, 所述预制剂研究证明了 rhASA 的稳定性在 5.5 至 6.0 的 pH 值范围内维持。在使用制剂溶液 (pH7.0) 的所有研究中, rhASA 表现破碎, 由于其一种降解途径。对所述 IT 制剂后候选物 (pH7.0) 获得的所述热胁迫结果与从所述 IV 制剂 (10mM 柠檬酸钠 - 磷酸盐, 并具有 137mM NaCl) (pH7.0) 获得的热胁迫结果相似 (其中被观察到了破碎)。根据这些研究, 三种下述的制剂, 见表 9 中, 被选定以进行长期稳定性研究。

[0347] 冻融研究

[0348] 执行冻融实验, 通过进行 3 个循环的控制冻融, 从室温至 -50°C (以 $0.1^\circ\text{C}/\text{min}$), 在 Vertis Genesis 35EL 冷冻干燥器的架子上。1mL 等分试样的原料药以 30mg/mL 配制在所述 5 种溶液组合物 (表 8) 的每一种中, 并分配至这项研究的 3mL 玻璃小药瓶中。

[0349] 对于所有冻融研究, 使用原料药 ($38 \pm 4\text{mg}/\text{mL}$)。对于小规模控制速率冻融实验, 2mL 等分试样的原料药被分配至 5mL 玻璃小药瓶 (具有 20mm Flurotec 瓶塞) 中。冻融胁迫的实验或者在 Virtis Genesis 35EL 冷冻干燥器的架子上进行, 或者在控制速率的冷藏箱 (Tenney Jr Upright Test Chamber, Model:TUJR-A-VERV) 的架子上进行。三个循环的冷冻至 -50°C 以及融化至 25°C 的进行可以是: 以 $0.1^\circ\text{C}/\text{min}$ 的冻融速率 (使用控制速率的冷藏箱); 或者 $0.1^\circ\text{C}/\text{min}$ 的冷冻速率和 $0.03^\circ\text{C}/\text{min}$ 的融化速率 (使用冷冻干燥器)。对于批量冻融研究, 90mL 的原料药被分配至 250mL 聚碳酸酯瓶子中。对于在干冰上的冻融研究, 3mL 的原料药被分配至 5mL 聚碳酸酯 (Biotainer P/N 3500-05) 小药瓶 (具有或不具有聚丙烯螺旋帽)。所述样品在 $\leq -65^\circ\text{C}$ 冷冻过夜, 并且然后放置在封闭桶内的干冰上。对于这些实验, 含有相同样品体积的塞瓶塞玻璃小药瓶, 作为研究对照使用。对于稀释的原料药的冻融研究, 1mL 等分试样 (1 以及 $5\text{mg}/\text{mL}$) 被分配进 2mL 聚丙烯管子中, 并在 $\leq -65^\circ\text{C}$ 下冷冻。随后将所述冷冻的样品在所述工作台顶部上融化。重复所述循环至多 10 次, 以使任何潜在的胁迫最小化, 所述胁迫可能随所述参考标准等分试样发生。

[0350] 冻融对于在所述推荐的制剂 (具有 0.005% P20) 中的 rhASA 质量的影响, 在控制速率 ($0.1^\circ\text{C}/\text{min}$) 的冷冻和融化 (3 个循环) 后进行测定。没有观察到 rhASA 的外观变化, 并且使用 SEC 或者 RP-HPLC 方法没有识别到可溶性聚集体或者降解剂, 此外, 在所述减少的 SDS-PAGE 分析中, 没有观察到破碎或者聚集的条带 (数据未示出)。

[0351] 表 13 概述了这些研究的结果。

[0352] 表 13: 小规模冻融对于 rhASA 原料药质量的影响

[0353]

制剂	外观	蛋白质 浓度 (mg/mL)	SEC-HPLC (% 主峰), pH5.5	SEC-HPLC (% 主 峰) , pH7.0	RP-HPLC (% 主峰)	pH	特异性 活性 (U/mg)
生理盐水, pH 5.9							
基线	清晰的至稍微地乳光的	29.9	NT*	NT	NT	5.6	102
胁迫的	清晰的至稍微地乳光的	29.4	>99.9	99.6	99.4	5.5	86
生理盐水, pH 7.0							
基线	清晰的至稍微地乳光的	29.0	NT	NT	NT	6.7	94
胁迫的	清晰的至稍微地乳光的	25.0	>99.9	99.6	99.2	6.6	96
5 mM PBS, pH 6.0							
基线	清晰的至稍微地乳光的	29.8	NT	NT	NT	5.9	92
胁迫的	清晰的至稍微地乳光的	31.1	>99.9	99.7	99.5	5.9	95
5 mM PBS, pH 7.0							

[0354]

基线	清晰的至稍微地乳光的	29.7	NT	NT	NT	6.9	99
胁迫的	清晰的至稍微地乳光的	29.9	>99.9	99.6	99.0	6.9	112
1 mM PBS, pH 7.0 并具有 2 mM CaCl ₂							
基线	清晰的至稍微地乳光的	27.5	NT	NT	NT	5.6	90
胁迫的	清晰的至稍微地乳光的	27.3	>99.9	99.6	99.3	6.7	103

[0355] * 未检测到的

[0356] 对于 2mL 等分试样的原料药, 小规模控制速率的冻融研究一式三份地进行, 其结果概述于表 14 中。没有观察到所述原料药的品质变化。所述冷冻和融化的原料药外观与所述基线样品的外观是可以相比的。没有观察到蛋白质浓度或者材料纯度的降低。

[0357] 表 14: 小规模冻融对于 rhASA 原料药质量的影响

[0358]

冷冻/融化速率	基线	0.1 °C/min 冷冻- 0.1 °C/min 融化 使用控制速率的冷藏 箱	0.1 °C/min 冷冻- 0.03 °C/min 融化 使用冷冻干燥箱
外观	稍微地乳光的 至乳光的	稍微地乳光的至乳光的 的	稍微地乳光的至乳光的 的
蛋白质浓度 (mg/mL)	42	37	36
光密度 at 320 nm	0.044	0.045	0.043
SEC-HPLC (% 主峰)	99.6%	99.7%	99.7%
RP-HPLC (% 主峰)	>99.9%	>99.9%	>99.9%
pH	5.9	5.9	5.9
特异性活性 (U/mg)	65	69	71

[0359] 所有的实验证明了 rhASA 在冻融后维持其质量属性。应该理解,对于 1mg/mL rhASA 样品,在 10 个循环的冻融之后,对于所述活性和所述反相百分比主峰观察到小量降低的趋势(如表 15 所示)。

[0360] 表 15: 小规模冻融对于稀释至 1mg/mL 的原料药的影响

[0361]

样品	基线	1 F/T 循 环	3 F/T 循 环	5 F/T 循 环	10 F/T 循 环
蛋白质浓度 (mg/mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
光密度 at 320 nm	0.013	0.005	0.010	0.006	0.017

[0362]

SEC-HPLC (% 主峰)	99.5%	99.5%	99.5%	99.5%	99.6%
RP-HPLC (% 主峰)	99.2%	99.2%	99.1%	99.0%	98.9%
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
特异性活性 (U/mg)	78	76	75	69	65

[0363] 搅拌研究

[0364] 1.0mL 无菌过滤蛋白质的等分试样以 30mg/mL 配置在 5 中选定溶液组合物(具有 P20)的每一种中(表 8),并分配至具有 13mm Flurotec 瓶塞的 3mL 玻璃小药瓶中。在 Labline Orbital 摇床上,将小药瓶放置在其一侧,并在 100rpm 下摇动 24 小时。

[0365] 为了评估 rhASA 对搅拌的易感性,对于原料药和药物产品两者都进行了摇动和搅拌研究,浓度分别在 35.4 和 30mg/mL。对于这些研究,1.0mL 等分试样的原料药被分配至具有 13mm Flurotec 瓶塞的 3mL 玻璃小药瓶中。对于开始的 8 小时,每隔 4 小时检查所述搅拌的小药瓶,其后在 24 和 48 小时检查。在浑浊性的所述第一迹象出现时,除去所述小药瓶,并进行分析。记录所述样品的外观,并使用 pH、SEC-HPLC、特异性活性和 OD320 分析所述样品。一式三份(在 154mM NaCl 中,pH 6.0,具有 0.005% P20)地进行药物产品搅拌研究,并与原料药(在 154mM NaCl 中,pH 6.0)的一个复制品进行比较。也重复进行摇动研究,在生理盐水制剂中不包含 P20。对于这些研究,无论 1mL 或者 3mL 等分试样的药物产

品 (30mg/mL) 被分配至 3mL 小药瓶中,以研究摇动以及所述顶部空间对 rhASA 质量的影响。对于这些摇动研究使用 220rpm 的转速。

[0366] 进行 IV 制剂开发研究的 rhASA 初始摇动研究,表明了存在表面活性剂时的潜在优势。对于 IT 制剂开发,选定 0.005% P20 并包括在所述制剂中(对于所述摇动研究)。在 15-24 小时的摇动 (100rpm) 之后,对于任意的所述制剂,没有观察到肉眼可见的变化,并且所述摇动速率增加至 200rpm。在所述推荐的候选物制剂中,在总共 48 小时的摇动后 (100 以及 200rpm),所述摇动样品的外观没有观察到变化。在这个时期以后,分析所述样品,并在表 16 中总结。任何所述检测手段都没有观察到变化。对于所述摇动样品,SDS-PAGECoomassie 也没有表现额外高或者低的分子重量带(数据未示出)。

[0367] 表 16: 选定 IT 制剂的摇动研究结果

[0368]

制剂	外观	蛋白质浓度 (mg/mL)	OD320	SEC-HPLC (% 主峰), pH5.5*	RP-HPLC (% 主峰)	特异性活性 (U/mg)
生理盐水, pH 5.9						
基线	清晰的至稍微地乳光的	29.9	0.044	NT**	NT	111
胁迫的	清晰的至稍微地乳光的	28.5	0.041	>99.9	99.9	111
生理盐水, pH 7.0						
基线	清晰的至稍微地乳光的	29.0	0.038	NT	NT	115
胁迫的	清晰的至稍微地乳光的	24.7	0.032	>99.9	>99.9	110
5 mM PBS, pH 6.0						
基线	清晰的至稍微地乳光的	29.8	0.058	NT	NT	103
胁迫的	清晰的至稍微地乳光的	30.4	0.047	>99.9	99.9	116
5 mM PBS, pH 7.0						
胁迫的	清晰的至稍微地乳光的	29.7	0.035	NT	NT	92
基线	清晰的至稍微地乳光的	26.5	0.029	>99.9	99.9	110
1 mM PBS, pH 7.0 并具有 2 mM CaCl ₂						
基线	清晰的至稍微地乳光的	27.5	0.040	NT	NT	147
胁迫的	清晰的至稍微地乳光的	27.0	0.038	>99.9	99.9	107

[0369] * 由于柱问题,没有获得二聚体形式的 SEC 属性(在 pH7.0 流动相)。

[0370] ** 未检测到的

[0371] 对于开始的为期 4 小时的搅拌,在原料药 (在 154mM NaCl 中,pH6.0) 或者药物产品 (在 154mM NaCl 中,pH6.0,具有 0.005% P20) 的外观中,没有观察到变化。在 6 小时搅拌后,原料药和药物产品都变得稍微浑浊 (数据未示出)。在搅拌 48 小时后,在不存在 P20D 制剂中,所述浑浊性更加显著。此外,暴露于摇动的原料药和药物产品在 24 小时后变得混浊。图 8 表明了 48 小时后观察到的现象。

[0372] 表 17 和表 18 总结了所述搅拌研究观察现象。

[0373] 表 17:rhASA 原料药和药物产品 (具有 P20) 在搅拌后的外观

[0374]

小时	搅拌后的原料药	搅拌后的药物产品
基线	无色的, 乳光的, 无颗粒	无色的, 乳光的, 无颗粒
2	没有变化	没有变化
4	没有变化	没有变化
6	1-2 薄片, 稍微地混浊	纤维材料, 稍微地混浊
8	1-2 薄片, 稍微地混浊	纤维材料, 稍微地混浊
24	1-2 薄片, 非常混浊	纤维材料, 混浊
48	1-2 薄片, 非常混浊	纤维材料, 非常混浊

[0375] 表 18:rhASA 原料药和药物产品 (具有 P20) 在摇动后的外观

[0376]

小时	摇动的原料药	摇动的药物产品
基线	无色的, 乳光的, 无颗粒	无色的, 乳光的, 无颗粒
2	没有变化	没有变化
4	没有变化	没有变化
6	没有变化	没有变化

[0377]

8	没有变化	没有变化
24	1-2 薄片	1-2 纤维
48	纤维材料	1-2 纤维

[0378] 所述搅拌的样品也通过 OD320、pH、特异性活性、RP-HPLC、以及 SEC-HPLC 进行分析。所述结果在表 19 和表 20 中示出。总之,在搅拌和摇动后,rhASA 没有观察到明显的品质变化 (除了所述外观)。

[0379] 表 19:48 小时的摇动对于原料药和药物产品的影响

[0380]

冷冻/融化速率	基线	摇动原料药 48 小时 (n=1)	摇动药物产品 48 小时 (n=3)
光密度 at 320 nm	0.080	0.053	0.048
SEC-HPLC (% 主峰)	99.7%	99.7%	99.7%
RP-HPLC (% 主峰)	>99.9%	>99.9%	>99.9%
pH	6.0	6.0	5.9
特异性活性 (U/mg)	96	71	72

[0381] 在搅拌药物产品 6 小时以后,具有 0.005% P20,所述三个重复本之一变得混浊。除去这个样品,剩余的两个样品继续搅拌至 49 小时。表 20 表明了所述重复样品的平均数据。

[0382] 表 20: 48 小时的搅拌对于原料药和药物产品的影响

[0383]

冷冻/融化速率	基线	搅拌后的原料药 6 小时 (n=1)	搅拌药物产品 48 小时 (n=2)
光密度, 在 320 nm	0.080	0.244	0.103
SEC-HPLC (% 主峰)	99.7%	99.7%	99.7%
RP-HPLC (% 主峰)	>99.9%	>99.9%	>99.9%

[0384]

pH	6.0	6.0	6.0
特异性活性 (U/mg)	69	73	73

[0385] 根据所述结果和目视观察现象,原料药和药物产品对于搅拌 - 诱导的降解是不敏感的,因为使外观发生改变,需要消耗~ 4 小时的持续搅拌 (设置编号为 5) 以及 8 小时的持续剧烈摇动 (220rpm)。

[0386] 用药物产品,在缺乏 P20 的情况下,重复所述摇动研究。对于这些研究,使每个小药瓶填充 1mL 或者 3mL 的药物产品,以研究摇动以及顶部空间对于 rhASA 品质的影响。对于在 3mL 小药瓶中填充 1mL 的,经过 8 小时的 220rpm 摇动 (n = 2, 数据未示出) 后没有观察到药物产品的外观变化。没有顶部空间的小药瓶 (n = 1) 表明,小型薄片、一些纤维和絮状物质以较快的速率形成 (与具有较大顶部空间的小药品相比)。所述 48 小时的观察现象在图 9 中呈现。

[0387] 所述可见的结果也在表 21 和表 22 中总结。

[0388] 表 21: 在摇动 48 小时后 (在 3mL 小药瓶中填充 1mL),在缺乏聚山梨醇酯 20 时的药物产品的外观

[0389]

小时	摇动的药物产品 MLD-200L-001 不具有 P20	摇动的药物产品 MLD-200L-003 不具有 P20	对照_摇动的药物 产 品 MLD-200L-001 具 有 P20
基线	无色的, 稍微地 乳光的, 基本地无颗粒		
2	没有变化	没有变化	没有变化
4	没有变化	没有变化	没有变化
6	没有变化	没有变化	没有变化
8	没有变化	没有变化	没有变化
24	絮状	显著的絮状	没有变化
48	絮状	显著的絮状	没有变化

[0390] 表 22: 在摇动 48 小时后 (在 3mL 小药瓶中填充 3mL), 在缺乏聚山梨醇酯 20 时的药物产品的外观

[0391]

小时	摇动 药物产品 MLD-200L-001 不具有 P20	对照_摇动 药物产品 MLD-200L-001 具有 P20
基线	无色的, 稍微地 乳光的, 基本地 无颗粒	
2	没有变化	没有变化
4	小薄片, 少数纤维和絮状	没有变化
6	小薄片, 少数纤维和絮状	没有变化
8	小薄片, 少数纤维和絮状	没有变化
24	小薄片, 少数纤维和絮状	没有变化
48	小薄片, 少数纤维和絮状	没有变化

[0392] 没有观察到蛋白质浓度的变化, 此外, 使用 SEC-HPLC 没有检测到可溶性聚集体, 无论 1mL 还是 3mL 填充体积 (表 23 和表 24)。还原的 SDS-PAGE (Coomassie) 分析没有检测到任何高或者低的分子量带 (数据未示出)。

[0393] 表 23: 在缺乏聚山梨醇酯 20 时的药物产品摇动 48 小时 (在 3mL 小药瓶中填充 1mL) 的结果

[0394]

分析	基线	在摇动药物产品 24 小时后, (n=2) 不具有 P20	在摇动药物产品 48 小时后, (n=2) 不具有 P20	对照 (n=1) 具有 P20
浓度 (mg/mL)	32.3	32.9	33.8	31.8
光密度, 在 320 nm	0.164	0.160	0.163	0.169
SEC-HPLC (% 主峰)	99.5	99.5	99.5	99.6
pH	6.1	6.1	6.0	6.0
特异性活性 (U/mg)	64	63	62	72

[0395] 表 24: 在缺乏聚山梨醇酯 20 时的药物产品摇动 48 小时 (在 3mL 小药瓶中填充 3mL) 的结果

[0396]

分析	基线	在摇动药物产品 4 小时后, (n=1) 不具有 P20	在摇动药物产品 48 小时后, (n=1) 不具有 P20	对照 (n=1) with P20
浓度 (mg/mL)	31.02	34.4	32.1	32.6
光密度, 在 320 nm	0.152	0.163	0.166	0.151
SEC-HPLC (% 主峰)	99.6	99.6	99.6	99.6
pH	6.0	6.0	5.9	6.0
特异性活性 (U/mg)	70	64	65	71

[0397] 缓冲能力研究

[0398] 为了测定 rhASA 的缓冲能力, 将产品一式三份地进行滴定, 用稀释的酸或者稀释的碱。等分试样的 10mL 的原料药, 在 38 或者 30mg/mL (后者模拟药物产品), 被放置在 20mL 玻璃小药瓶 (其中添加微搅拌棒) 中。添加等分试样 1 μ L 的 1N 盐酸 (HCl) 至所述蛋白质溶液, 混合所述内容物, 并记录所述 pH 值。添加 1 μ L HCl 波峰继续所述实验, 并且在所述测量之间不清洗 pH 探头, 以避免任何的稀释, 知道达到大约 5.5pH。一式三份地进行所述实验, 并且含有 150mM 氯化钠, pH 6.0 的 5mM 磷酸盐缓冲剂并行地进行滴定作为比较。相似地, 在这两个浓度的原料药用 1M 氢氧化钠 (NaOH) 滴定, 直到最后达到 pH 大约 6.5。为了研究任何残留的磷酸盐是否存在于 rhASA 中, 通过电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS) 分析原料药。也研究了稀释的 rhASA 原料药的缓冲能力, 以确保溶液的 pH 值在蛋白质稀释后没有改变。在 1.5mL eppendorf 管子中制备稀释的样品 (范围从 30mg/mL 至 1mg/mL), 并且在所述稀释开始时、以及在 2-8 $^{\circ}$ C 储存一周后, 测量所述 pH 值。

[0399] 稀释酸和稀释碱滴定研究的结果表明了 rhASA 溶液充分的缓冲能力。对于滴定研究, 使用 HCl, 初始添加大约 2 μ L 的 1M 酸没有改变原料药或者缓冲剂对照的 pH。尽管如此, 酸体积的增加表明, 缓冲剂 pH 剧烈下降 (与原料药相比)。在添加 13 μ L 的 19M HCl 后, 缓冲剂对照的 pH 大于 2 个 pH 单位, 低于原料药的 pH。30mg/mL 的原料药浓度也包含在

这个实验中,以模拟所述药物产品浓度。图 10 图解了 rhASA 原料药当用酸滴定时的缓冲能力,其与 5mM 磷酸钠缓冲剂(并具有 150mM 氯化钠, pH 6.3)相比。

[0400] 用氢氧化钠滴定 rhASA 原料药表明了关于维持所述 pH 相对不同的结果(图 11)。pH 改变的速率在原料药和所述缓冲剂对照中基本没有不同。

[0401] 根据所述观察的结果,不预期受到任意理论的约束, rhASA 可能有助于所述溶液的缓冲能力,因为天冬氨酸、谷氨酸和组氨酸侧链具有质子受体和 / 或供体的能力,以维持所述溶液 pH。先前,当发现所述“pH 值记忆”效应时,也观察了这种蛋白质在预制剂研究期间的缓冲能力。pH 滞留已经被证明数次,包括在实验室规模和大规模操作阶段。总体地,这两个实验的结果暗示: rhASA 在生理盐水中在酸性方向上的缓冲能力更具有优势。根据文献报道,所述较低 pH 值的缓冲能力直接指示了在给定蛋白质内有较大量的天冬氨酸和谷氨酸残基(与组氨酸残基相比)。当不预期受任何理论约束时,这可能的确是芳基硫酸酯酶 A 的事实,芳基硫酸酯酶 A 有谷氨酸残基以及天冬氨酸残基总共 45 个(而组氨酸残基为 18 个)。

[0402] 原料药的缓冲能力可能也归因于残留的结合磷酸盐,使用 ICP-MS 其被显示存在于原料药中。表 25 表明了,存在于三种不同 LSDL 原料药批件中残留的磷酸盐的量。该数据也证实了,中试规模加工的超过滤和膜渗滤步骤的一致性。

[0403] 表 25: 在 LSDL 制备的原料药中,残留的磷酸盐的量

[0404]

rhASA 批号	磷酸盐浓度 (ppm)
001	27
002	31

[0405]

003	31
-----	----

[0406] 为了进一步理解这种蛋白质的缓冲能力,研究了稀释对于 pH 的影响。在用生理盐水稀释 rhASA 原料药以降低蛋白质浓度后,没有观察到原料药 pH 值的变化。随后,所述稀释的原料药储存在 2-8°C 下一星期,其后记录所述 pH 测量。表 26 总结了所述数据。所述结果表明了所述稀释和在 2-8°C 的储存对于稀释的原料药的 pH 值没有影响。这些观察现象进一步支持了酸和碱滴定研究的结论:其表明了配制在生理盐水中的 rhASA 原料药具有充分的缓冲能力。

[0407] 表 26: 稀释的 rhASA 原料药的 pH 值

[0408]

原料药 目标浓 度 (mg/mL)	使 用 A280 测 量的原料 药 浓 度 (mg/mL)	开始的 pH 值	在 2-8°C 储存 1 星期后的 pH 值
37.0	38.8	6.00	6.20
30.0	33.4	6.07	6.10
25.0	28.3	6.04	6.09
20.0	20.1	6.02	6.12
10.0	9.2	6.04	6.10
5.0	4.5	6.03	6.11
1.0	1.0	6.00	6.07

[0409] 在研究 rhASA 稀释和 pH 期间,观察到:稀释样品的外观乳光被表明具有浓度依赖性的降低,即具有较高浓度的 rhASA 样品具有更多的乳光,与具有较低浓度的样品(其具有几乎清晰的外观)相比。图 12 表现了稀释的 rhASA 观察的外观。所述 1mg/mL rhASA 溶液被表明与水相似,而 30mg/mL 外观在参考悬浮液 II 和 III、或者 III 和 IV 之间进行了评估。

[0410] 稳定性研究

[0411] 对于稳定性研究,在 154mM NaCl (pH 6.0) 中以 38 ± 4 mg/mL 配制原料药,并且在 154mM NaCl (pH 6.0) 中以 30 ± 3 mg/mL 配制药物产品(存在以及缺乏 0.005% 聚山梨醇酯 20) 等分试样的 1mL 原料药被分配至 5mL 聚碳酸酯瓶子(具有聚丙烯螺旋盖)中,并在 $\leq -65^\circ\text{C}$ 、 -15°C 至 -25°C 、以及 $2-8^\circ\text{C}$ 储存。1.0 至 1.1mL 等分试样的药物产品被分配至 3mL 玻璃小药瓶(具有 13mm Flurotec 瓶塞),并在 $2-8^\circ\text{C}$ 、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、以及 $40 \pm 2^\circ\text{C}$ 储存。对于初始稳定性研究,将药物产品小药瓶以竖立方向储存;并在后者使员工药物产品的研究中,改变成倒转方向。在每个时间点,通过 SEC-HPLC、RP-HPLC、OD320、蛋白质浓度、pH、特异性活性、SDS-PAGE (Coomassie) 以及外观,来测试稳定性样品。肽地图、聚糖地图和甲酰甘氨酸百分比每年进行。此外,所述后者的分析也在胁迫和加速条件下进行。总体地,预制剂、冻融和搅拌研究的结果表明,只有三种制剂对于进一步开发是适合的。在这三种制剂中,在存在 0.005% P20 时,启动长期稳定性研究。表 27、表 28 和表 29 总结了三种制剂在选定的时间点的稳定性。

[0412] 表 27: rhASA 在 154mM NaCl (pH 5.9) 中, $2-8^\circ\text{C}$ 储存的长期稳定性

[0413]

测试	基线	3m	6m	11m
外观	清晰的至稍微地乳光的	清晰的至稍微地乳光的	清晰的至稍微地乳光的	清晰的至稍微地乳光的
蛋白质浓度 (mg/mL)	25.6	24.3	26.5	27.3
SEC-HPLC (% 主峰), pH5.5	>99.9	99.8	99.9	99.8
SEC-HPLC (% 主峰), pH7.0	99.1	99.0	99.4	99.7
RP-HPLC (% 主峰)	99.6	99.7	99.8	>99.9
pH	5.9	6.0	6.0	6.0
特异性活性 (U/mg)	95	79	90	87
SDS-Page (Coomassie)	符合参考标准, 没有强度大于1%分析对照的新带	符合	符合	符合

[0414] 表 28:rhASA 在 154mM NaCl (pH 7.0) 中, 2-8℃ 储存的长期稳定性

[0415]

Test	基线	3m	6m	11m
外观	清晰的至稍微地乳光的	清晰的至稍微地乳光的	清晰的至稍微地乳光的	清晰的至稍微地乳光的
蛋白质浓度 (mg/mL)	27.3	26.9	28.1	29.2
SEC-HPLC (% 主峰), pH5.5	99.9	97.5	99.8	>99.9
SEC-HPLC (% 主峰), pH7.0	99.4	99.0	99.2	99.8
RP-HPLC (% 主峰)	99.6	99.7	99.9	>99.9
pH	6.5	6.6	6.7	6.5
特异性活性 (U/mg)	112	88	98	86
SDS-Page (Coomassie)	符合参考标准, 没有强度大于1%分析对照的新带	符合	符合	符合

[0416] 表 29:rhASA 在 5mM 磷酸盐缓冲剂并具有 145mM NaCl (pH 6.0) 中, 2-8℃ 储存的长期稳定性

[0417]

Test	基线	3m	6m	11m
外观	清晰的至稍微地乳光的	清晰的至稍微地乳光的	清晰的至稍微地乳光的	清晰的至稍微地乳光的
蛋白质浓度 (mg/mL)	27.9	27.4	27.1	29.3
SEC-HPLC (% 主峰), pH5.5	99.9	97.8	99.8	99.9
SEC-HPLC (% 主峰), pH7.0	98.9	98.9	99.2	99.9
RP-HPLC (% 主峰)	99.7	99.6	99.8	>99.9
pH	5.9	6.0	6.0	5.9
特异性活性 (U/mg)	87	88	95	90
SDS-Page (Coomassie)	符合参考标准, 没有强度大于1%分析对照的新带	符合	符合	符合

[0418] 在 2-8°C 下进行的多达 11 个月的稳定性研究, 表明 rhASA 品质在所述原型制剂中维持。在生理盐水 (pH 5.9) 中 rhASA 的体积排阻 HPLC 属性的代表在图 13 和 14 中示出。体积排阻 HPLC 没有检测到与 rhASA 相关状态在 2-8°C 储存 11 个月之后有任何显著性变化。

[0419] 总之, 在所有三种候选物制剂中的所有药物产品的品质在 2-8°C 下储存 11 个月后维持。

[0420] 实施例 4-毒理学

[0421] 这个是实施例从毒理学和安全性药理学观点解释了在 6 个月期间内重复剂量鞘内 (IT) 施用的 rhASA。这个研究的所述 IT 测试制品是 rhASA。36 雄性和 36 雌性食蟹猴随机分配至 5 个治疗组。在组 1 中的所述动物未处理植入设备对照 (端口 & 导管), 并且没有给药所述媒介物或者测试制品; 无论如何, 这些动物根据与所述测试制品时间表匹配的时间表给药 0.6mL 的 PBS。在组 2-5 中的所述动物接受 0.6mL IT 输注的 0、3、10 或者 31mg/mL 的 rhASA (0、1.8、6.0 或者 18.6mg 的总剂量), 每隔一星期 (即总共 12 剂量)。在 6 个月 (在末次 IT 给药后的 24 小时), 将动物尸检; 并且剩余的 4 只动物 / 性别 / 组在 4 星期恢复期的结束进行尸检。收集选定的组织, 保存并微观检查。

[0422] 总之, 所述测试制品相关变化可以分成两种主要类型, 并且在所有的剂量水平 (1.8, 6.0 和 18.6mg/剂) 存在。(白血细胞, 通常有显著的嗜酸性成分) 在脑膜、脑实质、脊髓实质、三叉神经节, 以及偶尔为脊神经根 / 节 (或围绕这些结构的外膜) 的浸润增加。不希望受任何理论的约束, 此增加被解释为是由于在鞘内空间和和神经系统组织中存在测试制品 (蛋白质)。在偶尔的动物 (在任何高剂量的动物中没有观察到小胶质细胞积累) 的脊髓和脑中小胶质细胞轻微地、灶状增加。不希望受任何理论的约束, 两种类别的形态学变化被解释为响应测试制品的存在。没有任何动物神经元坏死的证据。在脑、脊髓, 脊神经根或神经节中, 没有测试制品相关变化有关的任何生物的不良反应。具体来说, 没有证据证明神经元坏死或生物学重要的胶质响应。在非神经系统组织中, 没有测试制品相关的病变。

[0423] 经过为期一个月的恢复时期 (给药自由期) 后, 变化相关的测试制品或完全消退或仅限于之前炎症反应 (与测试制品存在相关) 增加的残余。在恢复的动物中无不良的形态影响。在恢复的动物中无不良的形态影响。如基于双盲纤维检查分配半定量染色评

分,对于芳基硫酸酯酶 A(rhASA ;测试制品)的免疫组织化学染色,在脑和脊髓中的各种细胞类型增加,除了神经元,对于所有测试制品治疗的组在终末期处死时。此增长在肝脏的 Kupffer 细胞中也很明显。1 个月的恢复期后,在测试制品治疗的动物(所有剂量组)rhASA 染色已返回到对照(设备和 / 或媒介物对照)水平。在低剂量恢复的雄性中,有多个星形胶质细胞和神经元的损失的病灶,表示多个区域局部缺血之前,在大脑皮质中。虽然在这种动物中的这些病变确切发病机制并不明显,在任何其他测试制品治疗的动物中,缺乏类似的病变,包括获得 10 倍剂量的高剂量的动物,表明这些病变与测试制品是不相关的。

[0424] 这个研究的所述 IT 测试制品是 rhASA。36 雄性和 36 雌性食蟹猴随机分配至 5 个治疗组。在组 1 中的所述动物未处理植入设备对照(端口 & 导管),并且没有给药所述媒介物或者测试制品;无论如何,这些动物根据与所述测试制品时间表匹配的时间表给药 0.6mL 的 PBS。在组 2-5 中的所述动物接受 0.6mL IT 输注的 0、3、10 或者 31mg/mL 的 rhASA(0、1.8、6.0 或者 18.6mg 的总剂量),每隔一星期(即总共 12 剂量)。在 6 个月(在末次 IT 给药后的 24 小时),将动物尸检;并且剩余的 4 只动物 / 性别 / 组在 4 星期恢复期的结束进行尸检。收集选定的组织,保存并微观检查。下表中反映的研究的设计,因为其涉及本研究的病理方面。

[0425] 在处死的时候,大脑削减成约 3mm 冠状切片厚度的大脑基质。在处死的时候,大脑削减成约 3mm 冠状切片厚度的大脑基质。第一片和此后每一片被固定在福尔马林中用于组织病理学评估及免疫组化分析。大脑被处理为全冠部分。这些部分包括至少以下的大脑区域。

[0426] • 新皮层(包括额叶,顶叶,颞叶和枕叶皮质):脑切片 1 至 8(及切片 9,如果存在的话)。

[0427] • 原脑皮(质)(嗅球和 / 或梨状叶):脑切片 1 至 3。

[0428] • 基底神经节(包括尾状核和壳核):脑切片 3 和 4。

[0429] • (大脑)边缘系统(包括海马和扣带回):脑切片 4 和 5。

[0430] • 丘脑 / 下丘脑和中脑区域,包括黑质脑切片 4 和 5。

[0431] • 小脑,脑桥和延髓:脑切片 6 至 8(及切片 9,如果存在的话)。

[0432] 脑切片列于数据表中,作为 1 至 8/9(一些动物,通过测试设施所提供切片 9 的)。动物之间切片略有不同。上述提供的脑切片(1 至 8/9)大概位于各种解剖区域。列于的数据表的脑切片作为单独切片,与该切片相关的诊断以方便潜在的,未来的其他切片审查(如果有的话)。在数据的解释中,对单独的脑解剖部位(如上所列)进行了比较,以确定任何独特的测试制品的影响(即独特的特定的大脑区域)。在 TPS,来自所有动物的脑切片被包埋在石蜡中,切片为 5 微米,用苏木精和伊红(H&E)染色,并进行显微镜检查。此外,用 Fluoro-Jade B(染色增加大脑的神经元变性评估的敏感性)和 Bielschowsky 银染色(允许直接可视化轴突,树突和神经丝的过程)对对照和高剂量组的动物脑进行染色并检验。

[0433] 将脊髓(颈,胸和腰)切成 1 厘米切片。第一切片和其后的其他切片固定在福尔马林中,用于组织病理学观察及免疫组化分析。来自所有动物的脊髓切片(颈,胸(包括导管尖端)和腰椎)切片成约 5 微米,用 H&E 染色,并在每个水平检查横向和倾斜部分。另外,用 Bielschowsky 银染和抗-GFAP(免疫组化染色,允许直接可视化星形胶质细胞及其过程)对照和高剂量组的系列脊髓切片染色。

[0434] 脊神经根和神经节（在中颈，中胸，中腰椎）包埋在石蜡中，用 H&E 染色连续切片，此外，用 Bielschowsky 银染染色来自对照和高剂量组的连续切片。

[0435] 对于来自所有的动物坐骨神经，胫骨和腓肠神经节：每个神经的纵向切片在石蜡中包埋，切片约 5 微米，并用 H&E 染色。每个神经的横截面后固定在娥中，嵌入到 Spurr 树脂中，约 1 至 2 微米的切片，并用甲苯胺蓝染色。娥后固定及树脂包埋提供了髓鞘在周围神经中优越的保存，从而更细致地检查神经。

[0436] 收集的所有组织和从所有的动物尸检中收获肉眼病变也用石蜡包埋，用 H&E 染色，并进行显微镜检查。通过 TPS 进行病理组织学处理和评估及免疫组化分析。

[0437] 芳基硫酸酯酶 A (rhASA) 染色

[0438] 由研究赞助者提供的阳性对照切片。切片为注射 rhASA 的小鼠的肝切片。在肝脏的 Kupffer 细胞（正弦巨噬细胞）中，阳性对照切片都表现出充分的 rhASA 样本证据。储存阳性对照切片及本研究的其他切片。所有 rhASA 染色切片的评估最初进行盲法治疗动物组。其通过病理学家最初读取的 rhASA 染色切片与标签上的遮蔽（由具有实际动物评估知识的助手）动物数量来得到，在评估过程中口述的得分（严重程度等级），相同的助手立即记录的染色得分（严重程度等级）到数据表中。然后通过研究神经病理学家和助手验证动物 ID，以保证准确的数据输入。进行此程序，因此不会把任何偏差引入到判定染色（为检测细胞内 rhASA 的免疫组织化学染色）的整体强度。对所有的脑和脊髓节切片的神经元，脑膜巨噬细胞，血管周围巨噬细胞和神经胶质细胞（星形胶质细胞和小神经胶质细胞，但可能主要为小胶质细胞）的染色的相对程度进行分级。合计（通过组）各组每个大脑和脊髓水平的平均严重度评分并作为整体记录，在所述组织下（标题：大脑，一般，rhASA 染色和脊髓，一般，rhASA 染色）。

[0439] 在一般情况下，在大脑神经元的 rhASA 染色为在大脑中大脑皮层和其他核区域的神经元的度量。脑膜中巨噬细胞的 rhASA 染色为脑膜巨噬细胞和 / 或脑膜巨噬细胞中内源性 rhASA 摄取测试制品的证据。rhASA 染色血管周围的巨噬细胞为巨噬细胞中的脑 / 脊髓（或内源性 rhASA 的）摄取 rhASA 的测量，尽管应该指出：在脑和脊髓（Virchow-Robins 空间）中的血管周围空间为连续的脑膜。在一般情况下，神经胶质细胞中 rhASA 染色的分级为主要测量摄取测试制品 / 渗透测试制品进入灰和 / 或白质，尤其是在大脑皮质（电晕辐射为大脑皮质下方的白质）。白质中的 rhASA 染色出现在星形胶质细胞和小胶质细胞。

[0440] 下列分级方案用于在各种细胞类型（神经元，神经胶质细胞，巨噬细胞）中，rhASA 染色程度的得分。

[0441] 等级说明（可能细胞染色的%）

[0442] 1 小于 10%

[0443] 2 大于 10 to 25%

[0444] 3 大于 25 to 50%

[0445] 4 大于 50 to 75%

[0446] 5 大于 75%

[0447] 注意：此方案为不严格的定量。其被用于作为高效、半定量的方法来评估用 rhASA 染色脑和脊髓的程度。据神经病理学家研究指出：并非所有的神经元区域具有相等的 rhASA 染色。也有人指出：在一些对照动物中和脉络丛和背根神经节神经元的细胞的内源

性神经元染色, 往往 rhASA 染色强烈, 即使在对照动物中。脉络丛和背根神经节染色是不分级的, 但通过神经病理学家研究指出, 即使在控制动物中较为突出。

[0448] 注意: 所有剂量组: 低剂量 = 1.8mg/ 剂量; 中剂量 = 6.0mg/ 剂量, 高剂量 = 18.6mg/ 剂量。在非神经系统组织中没有测试制品相关病变, 除了各剂量组 (男, 女, 见下文) 的肝脏中的增加 rhASA 染色。

[0449] 末期牺牲动物 (每星期给药为期 6 个月): rhASA 染色切片

[0450] 在随后的组织 / 细胞类型中具有增加的 rhASA 染色。当考虑在特定的剂量组的特定细胞类型中, 测试制品影响 rhASA 染色的程度, 在并发的媒介物对照和设备对照 (牺牲的恢复期牺牲动物) 中的染色水平被认为是用于比较。

[0451] 脑、脑膜、巨噬细胞 (所有剂量组、雄性和雌性)

[0452] • 脑、血管周围, 巨噬细胞 (所有剂量组、雄性和雌性)

[0453] • 脑、胶质细胞 (所有剂量组、雄性和雌性)

[0454] • 脊髓、脑膜、巨噬细胞 ((所有剂量组、雄性和雌性)

[0455] • 脊髓、血管周围, 巨噬细胞 (所有剂量组、雄性和雌性)

[0456] • 脊髓、胶质细胞 (中和高剂量组雄性和雌性)

[0457] • 肝、Kupffer 细胞 (所有剂量组、雄性和雌性)

[0458] 由于内源性染色, 大脑和脊髓中的神经元的 rhASA 的染色水平的是最困难来具体的定义的。rhASA 染色表现出在脑膜和脑 / 脊髓血管周的巨噬细胞已经神经胶质细胞内不断增加的 rhASA 水平。在对照和测试制品处理的动物之间的神经元中, 没有可检测的 rhASA 染色差异。

[0459] 恢复期牺牲的动物 (每隔一周给药为期 6 个月, 随后进行为期一个月时间不给药)

[0460] 在一般情况下, 这些动物中测试制品相关的变化完全溶解或显著减少, 允许尸检之前 1 个月内没有给药。下面的微观变化存在于发病率和 / 或严重程度, 其表明与测试制品可能的关系。

[0461] 测试制品相关的微观变化 (恢复期动物)

[0462] • 脑, 脑膜, 浸润 (中和高剂量组, 两性) (图 16 和图 17)

[0463] • 脑, 脑膜, 浸润, %嗜酸粒细胞 (中剂量雄性; 高剂量雌性)

[0464] • 脑, 血管周围, 浸润 (中剂量雄性; 高剂量雌性) (图 18)

[0465] • 脑, 血管周围, 浸润, %嗜酸粒细胞 (中剂量雄性; 高剂量雌性)

[0466] • 脑, 灰质, 浸润 (所有剂量组, 两性)

[0467] • 脑, 灰质浸润, %嗜酸粒细胞 (低剂量雄性)

[0468] • 脑, 灰质, 嗜酸粒细胞, 坏疽 (低剂量雄性)

[0469] • 脊髓, 脑膜, 浸润 (中和高剂量雄性; 低和高剂量雌性)

[0470] • 脊髓, 脑膜, 浸润, %嗜酸粒细胞 (中剂量雄性; 低剂量雌性)

[0471] • 脊髓, 灰质, 浸润 (低剂量雌性)

[0472] • 脊髓, 灰质, 浸润, %嗜酸粒细胞 (低剂量雌性)

[0473] • 背根节和根, 神经外膜, 浸润 (中剂量雌性)

[0474] • 脊髓神经根和神经节, 浸润, 嗜酸性粒细胞 (中和高剂量雄性; 所有剂量, 雌性)

[0475] • 三叉神经节, 浸润, 嗜酸性粒细胞 (中等剂量的雄性和雌性)

[0476] 所有这些变化被解释指出在末期牺牲的动物中增加的炎症变化为的残余代表。至于在末期牺牲的动物中,没有证据表明增加的炎症性细胞浸润仍然存在于一些恢复期动物中,代表造成任何不利的影响的形态学改变。在非神经系统组织中没有测试制品相关的病变。

[0477] 恢复期牺牲的动物(每隔一周给药为期 6个月,随后是为期一个月时间的不给药): rhASA染色。

[0478] 与设备和 / 或媒介物对照相比,没有任何迹象表明恢复期雄性或雌性 rhASA 染色增加。在低,中,高剂量恢复期的雄性大脑中,与设备和 / 或媒介物对照相比,在某些类型的细胞(这各不相同,治疗组)中实际上 rhASA 染色有下降迹象。此原因,包括其为实际的效果并不明显。可能的解释是,施用外源性 rhASA 可能会导致一些内源性 rhASA 生产的减少。类似的发现不存在于雄性脊髓中。在恢复期雄性和雌性中,在肝脏中染色,类似于对照中指出的。

[0479] 在一般情况下,测试制品相关的变化可以分为两大类,并在所有剂量水平(1.8, 6.0 和 18.6mg/剂)存在。

[0480] (白血细胞,通常有显著的嗜酸性成分)在脑膜、脑实质、脊髓实质、三叉神经节,以及偶尔为脊神经根 / 节(或围绕这些结构的外膜)的浸润增加。此增加被解释为是由于在鞘内空间和神经系统组织中存在测试制品(蛋白质)。

[0481] 在偶尔的动物(在任何高剂量的动物中没有观察到小胶质细胞积累)的脊髓和脑中小胶质细胞轻微地、灶状增加。两种类别的形态学变化被解释为响应测试制品的存在。没有任何动物神经元坏死的证据。在脑、脊髓,脊神经根或神经节中,没有测试制品相关变化有关的任何生物的不良反应。具体来说,没有证据证明神经元坏死或生物学重要的胶质响应。在非神经系统组织中,没有测试制品相关的病变。经过为期一个月的恢复时期(给药自由期)后,变化相关的测试制品或完全消退或仅限于之前炎症反应(与测试制品存在相关)增加的残余。恢复期动物形态无不良影响。

[0482] 基于双盲镜检分配半定量的染色评分,在所有测试制品治疗组中,各种细胞类型的脑和脊髓中,芳基硫酸酯酶(rhASA ;所述测试制品)的免疫组织化学染色增加,除了神经元。在肝脏的Kupffer细胞中,此增长也很明显。经过1个月的恢复期,测试制品治疗的动物(所有剂量组)的rhASA染色已回归到对照(设备和 / 或媒介物对照)的水平。在低剂量恢复的雄性中,有多个星形胶质细胞和神经元的损失的病灶,表示大脑皮质中之前缺血的多个领域。虽然在这种动物中的这些病变的确切发病机制并不明显,任何其他测试制品治疗的动物缺乏类似的病变,包括高剂量的动物接受10X的剂量,这些病变与测试制品是不相关的。根据这项研究中严格的肉眼和显微镜的结果(石蜡包埋,苏木精和曙红染色切片),没有观察到不良的效应水平(NOEL)为18.6mg。

[0483] 实施例 5- 药代动力学数据

[0484] 6 个月动物数据

[0485] 本实施例提供了血清和 rhASA 的 CSF 浓度以及来自 Northern Biomedical Research, Inc. 的抗 rhASA 血清抗体的解释性分析。

[0486] 本实施例的目的是评估在青少年(年龄 <12 个月)食蟹猴中,从毒理学和安全药理学的角度来评估重复剂量鞘内(IT)施用 rhASA。在6个月内,共12剂。最后1次给药后

24 小时或 1 个月尸检动物。该研究的设计示于表 30。

[0487] 表 30: 研究设计

[0488]

研究设计						
组	动物数量	标称给药浓度 (mg/mL)	施用的剂量 (mg)	动物数量, 6 个月处死	动物数量, 1 个月恢复处死	
1	4M, 4F	DC	0	-	4M, 4F	
2	8M, 8F	0	0	4 M, 3 F ^a	4M, 4F	
3	8M, 8F	3	1.8	4 M, 4 F	4M, 4F	
4	8M, 8F	10	6.0	4 M, 4 F	4M, 4F	
5	8M, 8F	31	18.6	4 M, 4 F	4M, 4F	

[0489] DC = 设备对照 ;组 1 中的动物不给药以媒介物或测试制品。

[0490] ^a媒介物对照动物编号 044 在第 50 天处死, 由于导管泄漏

[0491] 分析方法 - 抗体分析

[0492] 使用经过验证的方法, 对食蟹猴 CSF 和血清中的抗 -rhASA 抗体进行定量。简言之, 通过阻断 MSD 的链霉抗生物素蛋白涂板开始测定, 然后与生物素标记的 rhASA 孵育。经过洗涤步骤后, 向板中加入稀释的样本, 校准器, 和 QC。经过额外的洗涤步骤后, 添加 SULFO TAG- 标记的药物并孵育。进行最后的清洗步骤并加入 MSD 读出缓冲器。立即读板。使用 SoftMax Pro 模板分析相对发光单位 (RLU) 中的信号数据。

[0493] 血清和 CSF 浓度

[0494] 使用经过验证的方法, 对食蟹猴 CSF 和血清中的 rhASA 进行定量。该方法是基于酶联免疫吸附试验 (ELISA) 技术。简要地说, 微量滴 定板涂覆以免多克隆抗体 (SH040) (针对抗重组人类芳基硫酸酯酶 A (rhASA))。参考标准和试验样品, 用 rhASA 孵育后, 通过辣根过氧化物酶 (HRP) - 缀合的抗 -ASA 单克隆抗体 (克隆 19-16-3) 可检测到束缚 rhASA 蛋白。然后将所述板与 HRP, TMB 过氧化物酶的底物孵育。通过加入 2N 硫酸 (H₂SO₄) 停止此酶 - 底物反应, 而且用参考波长 655nm 的吸光度波长 450nm 来测量各孔的吸光度。在相同的板中使用 rhASA 校准曲线, 计算样品中的 rhASA 浓度。

[0495] rhASA 的血清浓度、rhASA 的 CSF 浓度、抗 -rhASA 血清抗体浓度、抗 -rhASA CSF 抗体浓度、组别及性别抗体的发病率的总结见下文表 33-39。

[0496] 表 33: 食蟹猴中 rhASA 的血清浓度总结

[0497]

组 1: 媒介物对照	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
给药 2 之前	0	0	4	0	0	4
给药 2 之后	0	0	4	0	0	4
给药 4 之前	0	0	4	0	0	4
给药 4 之后	0	0	4	0	0	4
给药 6 之前	0	0	4	0	0	4
给药 6 之后	0	0	4	0	0	4
给药 8 之前	0	0	4	0	0	4
给药 8 之后	0	0	4	0	0	4
给药 10 之前	0	0	4	0	0	4
给药 10 之后	0	0	4	0	0	4
给药 12 之前	0	0	4	0	0	4
给药 12 之后	0	0	4	0	0	4
中期恢复	0	0	4	0	0	4
恢复期尸检	0	0	4	0	0	4

[0498]

组 2: 0 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
给药 2 之前	0	0	8	0	0	7
给药 2 之后	0	0	8	0	0	7
给药 4 之前	0	0	8	0	0	7

[0499]

给药 4 之后	0	0	8	0	0	7
给药 6 之前	0	0	8	0	0	8
给药 6 之后	0	0	8	0	0	8
给药 8 之前	0	0	8	0	0	8
给药 8 之后	0	0	8	0	0	8
给药 10 之前	0	0	8	0	0	7
给药 10 之后	0	0	8	0	0	7
给药 12 之前	0	0	8	0	0	7
给药 12 之后 (在 6-个月尸检之前)	0	0	8	0	0	8
中期恢复	0	0	4	0	0	4
恢复期尸检	0	0	4	0	0	4

[0500] 表 33(补充): 食蟹猴中 rhASA 的血清浓度总结

[0501]

组 3: 1.8 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
给药 2 之前	0	0	8	0	0	8
给药 2 之后	49.2	46.8	8	40.3	27.3	8
给药 4 之前	0	0	8	0	0	8
给药 4 之后	0	0	8	0	0	8
给药 6 之前	0	0	8	0	0	8
给药 6 之后	0	0	8	0	0	8
给药 8 之前	0	0	8	0	0	8
给药 8 之后	0	0	8	0	0	8
给药 10 之前	0	0	8	0	0	8
给药 10 之后	0	0	8	0	0	8
给药 12 之前	0	0	8	0	0	8
给药 12 之后 (在 6-个月尸检之前)	0	0	8	0	0	8
中期恢复	0	0	4	0	0	4
恢复期尸检	0	0	4	0	0	4

[0502]

组 4: 6.0 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
给药 2 之前	0	0	8	0	0	8
给药 2 之后	173.6	69.5	8	143.2	89.0	8
给药 4 之前	0	0	8	0	0	8
给药 4 之后	17	49	8	63.8	119.9	8
给药 6 之前	0	0	8	0	0	8
给药 6 之后	0	0	8	0	0	8

[0503]

给药 8 之前	0	0	8	0	0	8
给药 8 之后	0	0	8	0	0	8
给药 10 之前	0	0	8	0	0	8
给药 10 之后	0	0	8	0	0	8
给药 12 之前	0	0	8	0	0	8
给药 12 之后 (在 6-个月尸检之前)	0	0	8	0	0	8
中期恢复	0	0	4	0	0	4
恢复期尸检	0	0	4	0	0	4

[0504] 表 33(补充): 食蟹猴中 rhASA 的血清浓度总结

[0505]

组 5: 18.6 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
给药 2 之前	0	0	8	0	0	8
给药 2 之后	348.0	272.9	8	562.3	204.3	8
给药 4 之前	0	0	8	0	0	8
给药 4 之后	105.7	274.6	8	172.0	141.3	8
给药 6 之前	0	0	8	0	0	8
给药 6 之后	20.4	38.4	8	88.6	121.4	8
给药 8 之前	0	0	8	0	0	8
给药 8 之后	0	0	8	54.0	89.4	8
给药 10 之前	0	0	8	0	0	8
给药 10 之后	0	0	8	6	18	8
给药 12 之前	0	0	8	0	0	8
给药 12 之后 (在 6-个月尸检之前)	0	0	8	0	0	8
中期恢复	0	0	4	0	0	4
恢复期尸检	0	0	4	0	0	4

[0506] 表 34: 食蟹猴中 CSF 浓度总结

[0507]

组 1: 媒介物对照	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
给药 2 之前	0	0	4	0	0	4
给药 2 之后	0	0	4	0	0	4
给药 4 之前	0	0	4	0	0	4
给药 4 之后	0	0	4	0	0	4
给药 6 之前	0	0	4	0	0	4
给药 6 之后	0	0	4	0	0	4

[0508]

给药 8 之前	0	0	4	0	0	4
给药 8 之后	0	0	4	0	0	4
给药 10 之前	0	0	4	0	0	4
给药 10 之后	0	0	3	0	0	4
给药 12 之前	0	0	3	0	0	4
给药 12 之后	0	0	3	0	0	4
中期恢复	0	0	3	0	0	4
恢复期尸检	0	0	4	0	0	4

[0509]

组 2: 0 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
给药 2 之前	0	0	6	0	0	7
给药 2 之后	0	0	5	0	0	7
给药 4 之前	0	0	5	0	0	6
给药 4 之后	0	0	5	0	0	5
给药 6 之前	0	0	5	0	0	5
给药 6 之后	0	0	5	0	0	5
给药 8 之前	0	0	5	0	0	5
给药 8 之后	0	0	5	0	0	5
给药 10 之前	0	0	4	0	0	5
给药 10 之后	0	0	4	0	0	5
给药 12 之前	0	0	4	0	0	5
给药 12 之后 (在 6-个月尸检之前)	0	0	5	0	0	5
中期恢复	0	0	2	0	0	3
恢复期尸检	0	0	4	0	0	4

[0510] 表 34(补充): 食蟹猴中 CSF 浓度总结

[0511]

组 3: 1.8 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
给药 2 之前	42491	59255	7	42217	47300	6
给药 2 之后	95886	22626	7	125717	61723	6
给药 4 之前	17664	24372	6	50829	41891	6
给药 4 之后	106783	42823	6	138400	49908	6
给药 6 之前	39400	50105	4	45817	38404	6
给药 6 之后	95275	12836	4	104080	37423	5
给药 8 之前	25799	31589	4	58086	43821	5
给药 8 之后	148750	34664	4	119200	66556	5
给药 10 之前	25927	31380	4	30380	30328	5

[0512]

给药 10 之后	89975	29494	4	105200	44603	5
给药 12 之前	29746	34267	4	82780	65906	5
给药 12 之后 (在 6-个月尸检之前)	32030	39155	7	47331	49015	6
中期恢复	0	0	3	0	0	2
恢复期尸检	0	0	4	0	0	4
组 4: 6.0 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
给药 2 之前	75203	67002	8	146979	233673	6
给药 2 之后	360000	179276	8	267667	103369	6
给药 4 之前	58064	77210	8	53285	73340	5
给药 4 之后	369250	241251	8	305517	152232	6
给药 6 之前	77253	91407	8	97987	146762	6
给药 6 之后	418600	200098	5	369000	232238	5
给药 8 之前	66342	80374	5	11592	23072	4
给药 8 之后	329400	209841	5	340500	135128	4
给药 10 之前	119420	148408	5	74031	104609	2
给药 10 之后	412000	149278	5	245500	161927	2
给药 12 之前	68651	92902	5	74577	105251	2
给药 12 之后 (在 6-个月尸检之前)	141833	173933	7	58986	99016	4
中期恢复	0	0	3	0	NA	1
恢复期尸检	0	0	4	0	0	4

[0513] 表 34(补充): 食蟹猴中 CSF 浓度总结

[0514]

组 5: 18.6 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
给药 2 之前	289917	291188	7	201339	250774	8
给药 2 之后	734429	298352	7	920143	448409	7
给药 4 之前	150238	210302	7	169895	185675	6
给药 4 之后	984857	570039	7	965167	425924	6
给药 6 之前	265479	252067	7	288879	226889	6
给药 6 之后	758143	102009	7	1270000	558533	6
给药 8 之前	190529	240081	7	196021	199396	6
给药 8 之后	1003429	538271	7	989800	585072	5
给药 10 之前	176297	272500	7	168864	191087	6
给药 10 之后	1013000	390673	7	773400	103717	5
给药 12 之前	142334	196793	5	430542	436534	6
给药 12 之后 (在 6-个月尸检之前)	291525	350251	7	252142	381200	6

[0515]

中期恢复	0	0	3	0	0	2
恢复期尸检	0	0	4	0	0	4

[0516] 表 35: 血清中抗-rhASA 抗体浓度总结

[0517]

组 1: 媒介物对照	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/ml		ng/mL	ng/mL	
预给药 2	0	0	4	0	0	4
预给药 4	0	0	4	0	0	4
预给药 6	0	0	4	0	0	4
预给药 8	0	0	4	0	0	4
预给药 10	0	0	4	0	0	4
预给药 12	0	0	4	0	0	4
中期恢复	0	0	4	0	0	4
恢复期尸检	0	0	4	0	0	4

[0518]

组 2: 0 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
预给药 2	0	0	8	0	0	8
预给药 4	0	0	8	0	0	8
预给药 6	0	0	8	0	0	7
预给药 8	0	0	8	0	0	7
预给药 10	0	0	8	0	0	7
预给药 12	0	0	8	0	0	7
尸检 (在末次给药后的 24 hr)	0	0	4	0	0	4
中期恢复	0	0	4	0	0	4
恢复期尸检	0	0	4	0	0	4

[0519]

组 3: 1.8 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	N
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
预给药 2	0	0	8	0	0	8
预给药 4	18409	21371	8	27648	37504	8
预给药 6	75913	64863	8	85625	79871	8
预给药 8	132163	95576	8	151900	97818	8
预给药 10	392338	606626	8	290675	186213	8
预给药 12	499438	735028	8	524438	569523	8
尸检 (在末次给药后的 24 hr)	261625	157865	4	733550	928411	4
中期恢复	339250	265888	4	377175	218955	4
恢复期尸检	712500	1107129	4	295525	174718	4

[0520] 表 35(补充): 血清中抗-rhASA 抗体浓度总结

[0521]

组 4: 6.0 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	N
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
预给药 2	0	0	8	0	0	8
预给药 4	30419	30561	8	64000	89510	8
预给药 6	143693	128094	8	191750	150511	8
预给药 8	325750	190651	8	305850	224707	8
预给药 10	669125	515458	8	832188	846241	8
预给药 12	946125	651530	8	1060775	1088889	8
尸检 (在末次给药后的 24 hr)	713500	598812	4	1047568	1132048	4
中期恢复	1566000	708132	4	975500	1149734	4
恢复期尸检	1113250	554510	4	793000	991450	4

[0522]

组 5: 18.6 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	N
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
预给药 2	0	0	8	0	0	8
预给药 4	56873	39107	8	39994	53411	8
预给药 6	311638	237796	8	193263	208952	8
预给药 8	482875	270130	8	399363	360425	8
预给药 10	1006750	857916	8	866875	894776	8
预给药 12	1419000	1382276	8	1341500	1373771	8
尸检 (在末次给药后的 24 hr)	165000	147463	4	407300	268570	4
中期恢复	2884250	1363128	4	2101500	2090420	4
恢复期尸检	2504250	1118042	4	1506000	1524682	4

[0523] 表 36: CSF 中抗-rhASA 抗体浓度总结

[0524]

组 1: 媒介物对照	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
手术	0	0	4	0	0	4
预给药 2	0	0	4	0	0	4
预给药 4	0	0	4	0	0	4
预给药 6	0	0	4	0	0	4
预给药 8	0	0	4	0	0	4

[0525]

预给药 10	0	0	4	0	0	4
预给药 12	0	0	3	0	0	4
中期恢复	0	0	3	0	0	4
恢复期尸检	0	0	4	0	0	4

[0526]

组 2: 0 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
手术	0	0	7	0	0	6
预给药 2	0	0	6	0	0	7
预给药 4	0	0	5	0	0	6
预给药 6	0	0	5	0	0	5
预给药 8	0	0	5	0	0	5
预给药 10	0	0	4	0	0	5
预给药 12	0	0	4	0	0	5
尸检 (在末次给药后的 24 hr)	0	0	3	0	0	2
中期恢复	0	NA	1	0	0	3
恢复期尸检	0	0	4	0	0	4

[0527]

组 3: 1.8 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
手术	0	0	7	0	0	8
预给药 2	0	0	7	0	0	6
预给药 4	0	0	6	41	101	6
预给药 6	685	1317	4	632	1413	5
预给药 8	2238	2596	4	2180	4875	5
预给药 10	3393	5038	4	5560	12433	5
预给药 12	6436	8266	4	12700	28398	5
尸检 (在末次给药后的 24 hr)	14848	12401	4	21442	32382	4
中期恢复	29307	40617	3	18700	283	2
恢复期尸检	21060	30010	3	13078	7181	4

[0528] 表 36(补充):CSF 中抗-rhASA 抗体浓度总结

[0529]

组 4: 6.0 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
手术	0	0	7	0	0	8
预给药 2	0	0	7	0	0	6
预给药 4	99	172	7	84	187	5
预给药 6	1117	1862	8	1473	2775	6
预给药 8	3987	5580	5	20824	27320	4
预给药 10	6600	9679	5	2715	1237	2

[0530]

预给药 12	5285	7279	5	955	1237	2
尸检 (在末次给药后的 24 hr)	16870	16350	4	63000	63000	3
中期恢复	66233	42238	3	16800	NA	1
恢复期尸检	53600	14388	3	28880	29890	4

[0531]

组 5: 18.6 mg	雄性			雌性		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
手术	0	0	7	0	0	6
预给药 2	0	0	7	0	0	8
预给药 4	102	192	7	0	0	6
预给药 6	233	351	7	1506	3234	6
预给药 8	3378	5931	7	6367	9865	6
预给药 10	16327	24035	7	19567	27542	6
预给药 12	11596	16406	5	15143	24351	6
尸检 (在末次给药后的 24 hr)	5168	7427	4	12135	10341	4
中期恢复	54700	26439	3	46315	62770	2
恢复期尸检	50725	29217	4	37790	35967	4

[0532] 表 37: 血清和 CSF 中 rhASA 浓度, 雄性和雌性联合的 (ng/mL)

[0533]

组 1: 媒介物对照	血清 rhASA (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
	组总计			组总计		
时间点	平均值	SD	n	平均值	SD	n
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
给药 2 之前	0	0	8	0	0	8
给药 2 之后	0	0	8	0	0	8
给药 4 之前	0	0	8	0	0	8
给药 4 之后	0	0	8	0	0	8
给药 6 之前	0	0	8	0	0	8
给药 6 之后	0	0	8	0	0	8
给药 8 之前	0	0	8	0	0	8
给药 8 之后	0	0	8	0	0	8
给药 10 之前	0	0	8	0	0	8
给药 10 之后	0	0	8	0	0	7
给药 12 之前	0	0	8	0	0	7
给药 12 之后	0	0	8	0	0	7
中期恢复	0	0	8	0	0	7
恢复期尸检	0	0	8	0	0	8

[0534]

组 2: 0 mg	血清 rhASA	CSF rhASA
-----------	----------	-----------

[0535]

时间点	(ng/mL)			(ng/mL)		
	组总计			组总计		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
给药 2 之前	0	0	16	0	0	13
给药 2 之后	0	0	16	0	0	12
给药 4 之前	0	0	16	0	0	11
给药 4 之后	0	0	16	0	0	10
给药 6 之前	0	0	15	0	0	10
给药 6 之后	0	0	15	0	0	10
给药 8 之前	0	0	15	0	0	10
给药 8 之后	0	0	15	0	0	10
给药 10 之前	0	0	15	0	0	9
给药 10 之后	0	0	15	0	0	9
给药 12 之前	0	0	15	0	0	9
给药 12 之后 (在 6-个月尸检之前)	0	0	15	0	0	10
中期恢复	0	0	8	0	0	5
恢复期尸检	0	0	8	0	0	8

[0536] 表 37(补充): 血清和 CSF 中 rhASA 浓度, 雄性和雌性联合的 (ng/mL)

[0537]

组 3: 1.8 mg	血清 rhASA (ng/mL)			CSF rhASA (ng/mL)		
	组总计			组总计		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
给药 2 之前	0	0	16	42365	51844	13
给药 2 之后	44.7	37.3	16	109654	45639	13
给药 4 之前	0	0	16	34247	36982	12
给药 4 之后	0	0	16	122592	47311	12
给药 6 之前	0	0	16	43250	40831	10
给药 6 之后	0	0	16	100167	27992	9
给药 8 之前	0	0	16	43736	40298	9
给药 8 之后	0	0	16	132333	53926	9
给药 10 之前	0	0	16	28401	28890	9
给药 10 之后	0	0	16	98433	37220	9
给药 12 之前	0	0	16	59209	58253	9
给药 12 之后 (在 6-个月尸检之前)	0	0	16	39092	42786	13
中期恢复	0	0	8	0	0	5
恢复期尸检	0	0	8	0	0	8

[0538]

组 4: 6.0 mg	血清 rhASA (ng/mL)	CSF rhASA (ng/mL)
-------------	---------------------	----------------------

[0539]

时间点	组总计			组总计		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
给药 2 之前	0	0	16	105964	157408	14
给药 2 之后	158.4	78.7	16	320429	153832	14
给药 4 之前	0	0	16	56226	72638	13
给药 4 之后	40.6	91.7	16	341936	203284	14
给药 6 之前	0	0	16	86139	113563	14
给药 6 之后	0	0	16	393800	206033	10
给药 8 之前	0	0	16	42009	65286	9
给药 8 之后	0	0	16	334333	169995	9
给药 10 之前	0	0	16	106452	130375	7
给药 10 之后	0	0	16	364429	160707	7
给药 12 之前	0	0	16	70344	87227	7
给药 12 之后 (在 6-个月尸检之前)	0	0	16	111707	151129	11
中期恢复	0	0	8	0	0	4
恢复期尸检	0	0	8	0	0	8

[0540] 表 37(补充): 血清和 CSF 中 rhASA 浓度, 雄性和雌性联合的 (ng/mL)

[0541]

组 5: 18.6 mg	血清 rhASA (ng/mL)	CSF rhASA (ng/mL)				
	组总计	组总计				
时间点	平均值	SD	n	平均值	SD	n
	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
给药 2 之前	0	0	16	242676	264338	15
给药 2 之后	455.1	257.8	16	827286	378379	14
给药 4 之前	0	0	16	159311	191264	13
给药 4 之后	138.8	213.7	16	975769	488021	13
给药 6 之前	0	0	16	276279	231010	13
给药 6 之后	54.5	93.8	16	994385	453568	13
给药 8 之前	0	0	16	193064	213058	13
给药 8 之后	27.0	67.1	16	997750	531567	12
给药 10 之前	0	0	16	172866	228817	13
给药 10 之后	3.2	13	16	913167	319975	12
给药 12 之前	0	0	16	299538	365275	11
给药 12 之后 (在 6-个月尸检之前)	0	0	16	273348	349718	13
中期恢复	0	0	8	0	0	5
恢复期尸检	0	0	8	0	0	8

[0542] 表 38: 血清和 CSF 抗-rhASA 抗体,雄性和雌性联合的 (ng/mL)

[0543]

组 1: 媒介物对照	血清 抗-rhASA 抗体	CSF 抗-rhASA 抗体 (ng/mL)
------------	---------------	------------------------

[0544]

	(ng/mL)					
	组总计			组总计		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
手术				0	0	8
预给药 2	0	0	8	0	0	8
预给药 4	0	0	8	0	0	8
预给药 6	0	0	8	0	0	8
预给药 8	0	0	8	0	0	8
预给药 10	0	0	8	0	0	8
预给药 12	0	0	8	0	0	7
中期恢复	0	0	8	0	0	7
恢复期尸检	0	0	8	0	0	8

[0545]

组 2: 0 mg	血清 抗-rhASA 抗体 (ng/mL)			CSF 抗-rhASA 抗体 (ng/mL)		
	组总计			组总计		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
手术				0	0	13
预给药 2	0	0	16	0	0	13
预给药 4	0	0	16	0	0	11
预给药 6	0	0	15	0	0	10
预给药 8	0	0	15	0	0	10
预给药 10	0	0	15	0	0	9
预给药 12	0	0	15	0	0	9
尸检 (在末次给药后的 24 hr)	0	0	8	0	0	5
中期恢复	0	0	8	0	0	4
恢复期尸检	0	0	8	0	0	8

[0546] 表 38(补充): 血清和 CSF 抗-rhASA 抗体,雄性和雌性联合的 (ng/mL) (

[0547]

组 3: 1.8 mg	血清 抗-rhASA 抗体 (ng/mL)			CSF 抗-rhASA 抗体 (ng/mL)		
	组总计			组总计		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
手术				0	0	15
预给药 2	0	0	16	0	0	13
预给药 4	23028	29871	16	21	72	12
预给药 6	80769	70467	16	656	1284	9
预给药 8	142031	93979	16	2206	3796	9

[0548]

预给药 10	341506	436656	16	4597	9386	9
预给药 12	511938	635340	16	9916	20970	9
尸检 (在末次给药后的 24 hr)	497588	666122	8	18145	22972	8
中期恢复	358213	226397	8	25064	29302	5
恢复期尸检	504013	766860	8	16499	18552	7

[0549]

组 4: 6.0 mg	血清 抗-rhASA 抗体 (ng/mL)			CSF 抗-rhASA 抗体 (ng/mL)		
	组总计			组总计		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
手术				0	0	15
预给药 2	0	0	16	0	0	13
预给药 4	47209	66899	16	93	170	12
预给药 6	167721	137276	16	1269	2205	14
预给药 8	315800	201572	16	11470	19344	9
预给药 10	750656	682110	16	5490	8143	7
预给药 12	1003450	868860	16	4048	6328	7
尸检 (在末次给药后的 24 hr)	880534	857199	8	36640	45439	7
中期恢复	1270750	938646	8	53875	42430	4
恢复期尸检	953125	763122	8	39474	26274	7

[0550] 表 38(补充): 血清和 CSF 抗-rhASA 抗体, 雄性和雌性联合的 (ng/mL)

[0551]

组 5: 18.6 mg	血清 抗-rhASA 抗体 (ng/mL)			CSF 抗-rhASA 抗体 (ng/mL)		
	组总计			组总计		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
时间点	ng/mL	ng/mL		ng/mL	ng/mL	
手术				0	0	13
预给药 2	0	0	16	0	0	15
预给药 4	48433	46054	16	55	146	13
预给药 6	252450	224723	16	821	2204	13
预给药 8	441119	310702	16	4757	7781	13
预给药 10	936813	849893	16	17822	24652	13
预给药 12	1380250	1331905	16	13531	20189	11
尸检 (在末次给药后的 24 hr)	286150	238760	8	8652	9129	8
中期恢复	2492875	1686472	8	51346	36819	5
恢复期尸检	2005125	1347857	8	44258	31114	8

[0552] 表 39: 抗 -rhASA 抗体在尸检时的发生率

[0553]

组	血清抗体-阳性动物 (阳性/总测试的)				CSF 抗体-阳性动物 (阳性/总测试的)			
	M		F		M		F	
	6-个 月尸 检	恢复 期尸 检	6-个 月尸 检	恢复 期尸 检	6-个 月尸 检	恢复 期尸 检	6-个 月尸 检	恢复 期尸 检
1 (DC)	NA	0/4	NA	0/4	NA	0/4	NA	0/4
2 (媒介 物)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/3	0/4	0/2	0/4
3 (1.8 mg IT)	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/3	3/4	4/4
4 (6.0 mg IT)	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/3	2/3	4/4
5 (18.6 mg IT)	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4	4/4	4/4

[0554] 食蟹猴血清 rhASA 的定量限为 39.1ng/mL, 并且来自组 1 和组 2 的所有血清样本均低于定量限 (BQL), 见表 33。在给药 2, 4, 6, 8, 10, 12 (6 个月尸检) 之前和 24 小时之后, 测试 rhASA 的血清水平, 中途经过复苏期, 并在恢复期尸检之前。组 3 (1.8mg/ 剂)、组 4 (6.0mg/ 剂) 和组 5 (18.6mg/ 剂) 中, 在给药 2、4、6、8、10 和 12 之前检测不到 rhASA 水平。给药 12 后, 中途通过恢复期间, 以及在恢复期尸检之前。给药 2 之后, 血清中的 rhASA 水平与剂量有关。给药 4 (组 3), 给药 6 (组 3 和组 4), 和给药 8 和 10 (组 3 和组 4 和组 5 雄性) 后, 检测不到 rhASA 水平。组 4 (6.0mg/ 剂) 给药 4 和组 5 (18.6mg/ 剂) 雄性给药 4 和 6 后以及雌性给药 4、6、8、和 10 之后, 血清 rhASA 下降。血清中 rhASA 水平的明显下降可能与抗 -rhASA

抗体浓度的增加有关。目前在本研究中,给定的样本变异性和小组数量中,血清 rhASA 水平还没有明显的性别差异。

[0555] 食蟹猴 CSF 的 rhASA 的定量限为 19.5ng/mL,来自组 1 和组 2 的所有 CSF 样本为 BQL,见表 34。所有给药组中,在所有给药组中给药 2、4、6、8、10、和 12(6 个月尸检)之前和之后,可检测到 CSF 中 rhASA。水平高于给药后(约给药后 24 小时)并与剂量相关。CSF 中的水平比血清中的更大。在本研究中,当给定样本的变异性和小组数量时,CSF 的 rhASA 水平目前还没有明显的性别差异。在所有剂量组的恢复时期和恢复期尸检之前,中途的 rhASA 是不可检测的。rhASA 治疗组在给药 12(尸检)收集的 CSF 水平低于给药 8 和 11 后的水平。尸检时,低 rhASA 水平的潜在原因包括在尸检时采取的较大体积(~2.25mL 总细胞数,化学, rhASA 和抗-rhASA 抗体)vs. 在生活给药间隔(高达 0.5mL 前或预给药的 rhASA 浓度)采取的体积。此外,尸检时,某些动物没有通畅的导管,因此通过 CM 抽头而不是经导管来采取样品。与通过导管取样相比,这条路线一直得到较低的 rhASA 浓度。这可能是由于 CSF 集流有限的 rostrorocaudal 方向,被公认的发生在垂直方向的动物,例如猴子和人(例如,其为众所周知,CSF 成分在整个个体一生中表现出明显的 rostrorocaudal 梯度)。

[0556] 在一些时间点,每个用 rhASA 治疗的动物血清中,抗-rhASA 抗体是可检测的,见表 35。如果抗-rhASA 抗体水平在定量限(78.1ng/mL)以上,则动物被定义对抗-rhASA 抗体为阳性。一旦其血清阳转,动物对抗-rhASA 抗体保持阳性。在预给药 2 时间点,无任何动物对抗-rhASA 抗体呈阳性。在预给药 4 的时间点,除了雄性 026 号(第 4 组,6.0mg/剂),所有 rhASA 动物对血清抗-rhASA 抗体为阳性。在预给药 6 时间点,雄性 026 号对血清抗体为阳性。在第 5 组(18.6mg/kg),尸检抗体样本具有较低的抗体水平。此明显的减少可能是由于存在 rhASA 干扰检测。中,高-剂量组(6.0 和 18.6mg/剂)的滴度普遍高于低剂量组的动物(1.8mg/剂)。用重组人蛋白质治疗食蟹猴,存在抗-rhASA 抗体是预期结果。由于变异的结果,并没有明显的性别差异。

[0557] 所有在 CSF 中具有可检测抗-rhASA 抗体的动物,在血清也有可检测的 rhASA 抗体,除雌性 049(组 3,1.8mg/剂量)和 057(组 4,6.0mg/剂量)号。抗体浓度和发病率的变异性排除剂量响应的测定。如果抗 rhASA 抗体水平在定量限(78.1ng/mL)以上,则动物被定义为对抗-rhASA 抗体为阳性。

[0558] 雄性和持续血清和 CSF RHASA 水平以及抗-RHASA 抗体的组合值示于表 36 和表 37 中。上述讨论,雄性和持续的联合结果与个体性别是相似的。

[0559] 实施例 6- 功效

[0560] 在这个实施例中,11 只野生型对照(mASA+/+hASA-/-)小鼠被分配到 A 组而且未接受治疗。34 只(34)hASAC69S/ASA-/-小鼠分配给每个 5 剂量组并在 1、9、15/16、和 22 天,接受剂量为 20mg/kg(静脉注射[IV];组 C)或 0.04、0.12、和 0.21mg(组 D,E,和 F,分别)的媒介物(B 组)或 rhASA(rhASA)。所有 IV 剂量经尾静脉施用。在近似范围 2 μ L/20 秒(表 40)12 μ L 内的体积,作为输液对所有鞘内(IT)的剂量施用。

[0561] 表 40: 研究设计

[0562]

组	动物数量	动物类型	治疗	剂量	途径	注射总数量	处死	Mg/kg 脑重量的剂量 ^a
A	11	野生型对照 (mASA +/+ hASA -/-)	None	NA	NA	NA	NA	NA
B	9	hASAC69S/ ASA -/-	媒介物 对照	媒介物	IT 腰椎	4 (1, 9, 15/16 ^b , 和 22 天)	第 4 给 药后 24 小时	0
C	5		rhASA	20 mg/kg	IV (tail vein)			NA
D	5		rhASA	0.04 mg	IT 腰 椎			100
E	5		rhASA	0.12 mg	IT 腰 椎			300
F	10		rhASA	0.21 mg	IT 腰 椎			520

[0563] NA = not applicable ;IT =鞘内的 ;IV =静脉。

[0564] ^a小鼠的脑重量大约为 0.0004kg。

[0565] ^b第 15 天给药组 C、D、和 E ;第 15 天给药组 B 和 E。

[0566] ASA 基因敲除小鼠 hASAC69S/ASA(-/-) 为 MLD 公认的模式,并用于测试对此疾病潜在的治疗。鞘内途径为人类预期的施用途径。此化合物以及在 MLD 小鼠中类似化合物的静脉施用途径已经过测试。已加入静脉注射对照组作为预期的外周器官组织学改变的阳性对照。动物接受 100,300,或 520mg/kg 脑重量 (0.04,0.12,0.21 毫克,分别) 的 rhASA。选自本研究的剂量水平归一化到脑重量对应于计划用于人体中或已经用于毒理学研究或在以前疗效模型溶酶体贮积症的剂量。这些剂量预期不会有任何毒性。

[0567] 收条

[0568]

物种	小鼠 (小家鼠)
株	hASAC69S/ASA (-/-) 小鼠和野生型对照
年龄	抵达时大约 14-17 个月
组数量	6
动物数量	34 ASA 敲除小鼠 + 11 野生型对照

[0569] 抵达后,检查每只动物以评估健康状态。

[0570] 圈养

[0571] 在高温聚碳酸酯过滤器顶部的笼子里圈养动物组,具有 CareFresh 垫纸和水瓶。每个笼子里清楚地标有笼子卡显示项目,组和动物数目,和性别。耳朵打孔系统唯一标识每

只动物。动物处理符合联邦指导。

[0572] 动物房环境和光周期的定向条件如下：

[0573] 温度 22°C ± 3°C

[0574] 湿度 50% ± 20%

[0575] 光循环 12 小时光照和 12 小时暗

[0576] 在给药施用期间和之后，按照预计的活动，所述光照被暂时性中断。认为这种中断不影响本研究的结果或者品质。

[0577] 所有可用的野生动物 (11) 被分配到组 A，编号为 35 至 45。ASA (-/-)hASA (+/-) 动物被分配为连续的数字 (1 至 34)，将他们从笼中取出，称重，并在驯化中对耳朵钻孔。然后，2011 年 1 月 3 日，使用研究随机数发生器 (www.randomizer.org) 将动物分配到治疗组。前 9 个数被分配到 B 组，接下来的 5 个分配到 C 组，接下来的 5 个分配到 D 组，接下来的 5 个分配到 E 组，最后的 10 个分配到 F 组。按照表 41，动物被分配如下：

[0578] 表 41: 动物分配

[0579]

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

[0580] ^a动物编号 19 在给药时间不能定位。

[0581] ^b动物编号 3 在给药之前死去。

[0582] 测试制品和媒介物

[0583] 测试制品

[0584]

特性 rhASA

描述 人类重组芳基磺胺酶 A (ARSA)

储藏条件 约 4° C

[0585]

媒介物

特性 rhASA 媒介物 (154 mM NaCl, 0.005% 聚山梨酯

20, pH ~6.0)

储藏条件 约 4° C

[0586] 制备媒介物

[0587] 使用提供的媒介物。在工作台 (环境) 上加热媒介物。一旦媒介物加热，通过轻轻涡旋和反转混合该物质。不振荡或摇动瓶。进入材料之前干燥瓶。任何剩余的媒介物放

回到冰箱 (1°C -8°C)。

[0588] 剂量制剂制备

[0589] 用媒介物稀释 rhASA 以达到所需的浓度。在工作台 (环境) 上加热测试制品。一旦所述测试制品被加热,通过轻轻涡旋和反转混合该物质。不振荡或摇动瓶。

[0590] 染料跟踪注射:

[0591] 像这样的染料已被用于鞘内注射作为鞘内施用后的存活程序。施用前,染料与测试制品混合;1 μ L 的 1nmole 染料被添加到测试制品中。除了红外染料,1 μ L 的 FD&C 蓝色 #1 (0.25%) 用于跟踪注射。此蓝色染料为常见的食品添加剂,并且通常被认为是安全和无毒的。

[0592] 腰骶部 IT 注射 rhASA 或媒介物

[0593] 在第 1、9、15 或 16、和 22 天,组 B, D, E, 和 F 的动物接受鞘内注射。

[0594] 通过腹膜内注射,使用 1.25% 2, 2, 2 三溴乙醇 (Avertin) (200-300 μ L/10 克体重 (250-350mg/kg)), 麻醉成年小鼠。除去尾基和肩胛之间的背毛,用 povidine/ 聚乙烯吡咯酮碘擦洗剃除区域,随后用异丙醇擦洗。在腰骶部和背中线的交叉点以及确定的回肠 (奇异回肠) 翼部的颅方面制作小正中皮肤切口 (1-2cm)。在髂窝内的肌肉 (臀中肌) 为心形的肌肉,而且“心”顶部两侧接近回肠翼部的位置。32 号计量注射针连接到气密 10-20 μ L 玻璃 Hamilton 注射器并插入,直到从底层的骨感觉到阻力。在近似速率为 2 μ L/20 秒 (10 μ L/2 分钟) 下进行注射 10 μ L 的测试制品,1 μ L 的红外染料,1 μ L 的 FD&C 蓝色 #1 (总注射量 12 μ L)。使用适当的创伤夹关闭皮肤切口。通过成像测定红外染料是否已分布于整个 CNS,以及可见的蓝色染料,来判断注射的成功。成像后,动物允许在恢复室恢复。

[0595] 静脉注射 rhASA

[0596] 在第 1, 9, 15, 和 22 天,组 C 的动物接受静脉注射。

[0597] 对于 IV 注射,如果需要的话用异氟醚将动物麻醉,并置于限制器内。用手指轻轻弹的尾部加热以扩张尾静脉。然后用 70% 乙醇擦拭注射部位。可替换地,将动物放置在暖腔室 (40°C) 内进行 1-1.5 分钟。28-30 号针用于注射试验材料。注射量为 5-10mL/kg。

[0598] 第 4 给药后约 24 小时之后,使组 B-F 动物安乐死。进行动物不同组织的收集程序,详细说明如下。组 A 动物未接受治疗;然而,于 2011 年 1 月 27 日或 28 日,进行动物的安乐死和组织收集程序,详细说明如下。

[0599] 血清 (所有动物)

[0600] 在异氟醚麻醉下,通过眶后穿刺,收集所有动物 (组 A-F) 的末端血液样品 (约 0.5mL)。玻璃管放置在眼眶上,轻轻地穿透眼睛后面的区域,这样就打乱了位于眼睛后方的静脉引流。通过毛细作用和 / 或重力流采集血液。采血后,在眼眶施加压力,达到止血。

[0601] 全血样品进行处理血清并在 <-80°C 下冷冻,这些血清保存在 -80°C 下,并分析抗体。

[0602] 组织进行光镜检查 (组 A-F; 每组 5 只小鼠)

[0603] 采血后,通过 CO₂ 窒息处死动物。灌注之前收集尾巴剪切,并冻结用于可能的基因分型。心包腔暴露出来。每组 3 (3) 只小鼠穿心地灌注以肝素化生理盐水溶液 (1U/mL 的肝素钠在 0.9% 的 NaCl 中,无菌过滤) 冷藏冰冻冷却,然后在约 4°C 下 4% 多聚甲醛。除去脑,而且剪切腹部以进一步暴露出内部器官。大脑和胎体被放置的多聚甲醛中,除了被冻结的

尾部剪切。

[0604] 组织用于脂质分析（组 A、B，和 F；6、4，和 5 动物，分别地）

[0605] 采血后，通过 CO₂ 窒息处死动物。灌注之前收集尾巴剪切，并冻结用于可能的基因分型。心包腔暴露出来。对于血脂分析，每组 4-6 只小鼠穿心地灌注以肝素生理盐水溶液（1U/mL 的肝素钠在 0.9% NaCl 中，无菌过滤）冷藏冰冻冷。脂质分析收集的示例性组织在表 42 中呈现。

[0606] 表 42: 收集组织用于脂质分析

[0607]

收集组织用于脂质分析	
脑（分为左，右半球并称重）	肾脏（2）
脊髓（从脊柱中除去）	
坐骨（2）（从肌肉剥离）	尾部剪切（灌注之前）

[0608] 经过收集，称重组织然后在干冰上或通过 -80°C 冰箱中冷冻。脑部被分为左，右半球。右半球将通过 MS 用于脂质分析。分析左半球用于可能的 N-乙酰基-L-天门冬氨酸 (NAA) 分析。组织保存在 -80°C 直至分析（参见表 43）。

[0609] 表 43: 组织储藏条件

[0610]

样品类型	储藏温度
血清	大约 -80°C 冷冻
组织用于血渍分析	大约 -80°C 冷冻

[0611]

尾部剪切	大约 -80°C 冷冻
组织用于光学显微检测	大约 4°C

[0612] rhASA 减少硫脑苷酯在 MLD 小鼠脊髓的存储，特别是在白质中，图 19。脊髓的形态分析表明，rhASA 给药后 alcian 蓝染色的光密度的统计学显著减少，图 20。rhASA 治疗的 MLD 小鼠在大脑中表现出溶酶体活性的减少，如图 21。与媒介物治疗的动物相比，在高剂量组（0.21mg-520mg/kg 脑重量）中，此减少有显著的统计学意义，图 22。

[0613] 1 岁年龄以上的免疫耐受 MLD 小鼠 (hASAC69S/ASA(-/-))，每周一次鞘内腰椎施用 rhASA，连续 4 周（共 4 个剂量）。剂量为媒介物（154mM 氯化钠，0.005% 聚山梨酯 20，pH 值 ~ 6.0），0.04, 0.12, 0.21mg/剂（归一化的剂量分别为 100, 300 和 520mg/kg 的脑重量）。采用免疫组化评估在大脑和脊髓中的硫脑苷酯清除和溶酶体活性来评估终端时间点的疗效。使用 alcian 蓝染色组织中的目标硫脑苷酯来进行脊髓和脑组织切片染色。也染色脑切片表示溶酶体相关膜蛋白 (LAMP) 的存在，为溶酶体过程的指示。此外，alcian 和 LAMP（颈椎，胸椎和腰椎）染色脊髓和大脑切片以进行形态分析。

[0614] 这些初步的研究结果表明鞘内腰椎 rhASA 施用的疗效。与媒介物对照组相比，rhASA 治疗的 MLD 小鼠的疾病组织学标志物表现出改善的证据，如硫苷存储（由 alcian 染色指出的）和在大脑中的溶酶体活性降低。在施用（脊髓）位点附近以及所述脑的远侧部位，观察到这些病理组织学变化。

[0615] 实施例 7 - 生物分布 2

[0616] 概要

[0617] 在这项研究中,36 只雄性和 36 只雌性青少年食蟹猴 (<12 个月在起始) 被分配到每个 5 剂量组中,并接受剂量为 0(设备对照;动物给药以 0.6mL PBS)、0(媒介物对照)、1.8、6.0,或 18.6mg(分别为组 1,2,3,4 和 5) 的 rhASA(rhASA),每隔一周,进行 6 个月,总共 12 剂量。所有剂量为给药体积为 0.6mL 的输液,然后由 0.5mL PBS 冲洗,经过大约 10 分钟(表 44)。

[0618] 表 44: 研究设计

[0619]

研究设计						
组	动物数量	标称给药浓度 (mg/mL)	施用的剂量 (mg)	动物数量, 6 个 月处死	动物数量, 1 个月 恢复处死	
1	4M, 4F	DC	0	-	4M, 4F	
2	8M, 8F	0	0	4 M, 3 F ^a	4M, 4F	
3	8M, 8F	3	1.8	4 M, 4 F	4M, 4F	
4	8M, 8F	10	6.0	4 M, 4 F	4M, 4F	
5	8M, 8F	31	18.6	4 M, 4 F	4M, 4F	

[0620] DC = 设备对照;组 1 中的动物不给药以媒介物或测试制品。

[0621] ^a媒介物对照动物编号 044 在第 50 天处死,由于导管泄漏

[0622] 材料和方法

[0623] 组织收集

[0624] 脑被切成 3mm 厚的冠状切片厚度的脑基质。每个脑分为完整的冠状切片,包括:新皮层(包括额叶、顶叶、颞叶和枕叶皮质),旧皮质(嗅球和/或梨状叶),基底节区(包括尾状核和壳核),边缘系统(包括海马和扣带脑回),丘脑/下丘脑,中脑区(包括黑质),小脑,桥脑,和延髓。从单个组织样本获得(通过 4 毫米活检钻孔)的位置见图 32-37 所示。图 32-37 中的图像来自 Wisconsin 大学和威斯康星州和 Michigan State 比较哺乳动物脑收集中心(也是国家卫生与医学博物馆)。没有收集打孔 22 号,在尸检中这种结构是不存在的。所有脑样本冷冻并贮存于 -60°C 或以下,在进行使用酶联免疫吸附试验分析 rhASA 的温度之前。

[0625] 第一脑切片其后的每一第二切片被固定在福尔马林中,用于组织病理学评估及免疫组化。第二脑切片其后的每一第二切片被冷冻用于测试制品浓度分析。冷冻前,脑样本取自偶数右侧部分,测试制品分析脑切片用于生物分布分析。尸检时拍摄脑样本的位置并记录脑切片号。使用 4 毫米的圆钻孔或用解剖刀切割获得所述样本,以优化收集的白质数量。所有的钻孔被冷冻和储存在 -60°C 或以下,用于测试制品分析。剩余部分的脑切片被冻结,保存在 -60°C 或以下,用于可能的测试制品分析。钻孔的定位见于附录 B 中。

[0626] 所述脊髓(颈、胸、腰椎)被切成 1 厘米长的段。第一切片和此后每一第二切片被固定在福尔马林中,用于病理组织学和免疫组化分析。脊髓的第二切片和此后的每一第二切片被冷冻,并储存在 -60°C 或更低温度下,用于测试制品分析。调节切片的分布,使所述切片的前端的鞘内导管(切片 0)固定在福尔马林中,并用于组织病理学分析。

[0627] 脑,肝,脊髓提取物的制备和 rhASA 浓度的测定

[0628] 使用经过验证的方法,符合美国食品和药物管理 (FDA) 良好实验室规范 (GLP) 法规 21CFR,第 58 部分并适用于中西部生物学研究的标准作业程序,对大脑钻孔、脊髓,和肝脏样本进行了分析。在裂解缓冲液中匀浆组织样本,离心除去任何组织碎片,并储存于 -80°C ,直至测定。使用多克隆兔抗体 SH040 作为捕获抗体和 HRP (辣根过氧化物酶) 标记的抗-rhASA 单克隆抗体 19-16-3 作为检测抗体,通过 ELISA 测定组织匀浆中可溶性组分的 rhASA 浓度。经过洗涤步骤除去未结合的材料,在 HRP 偶联抗体的存在下,四甲基联苯胺 (TMB) 底物溶液与过氧化物反应中以产生色度信号,其在最初步骤中的抗 ASA 抗体约束的 ASA 的量是成比例的。由此产生的在每个组织匀浆中的 rhASA 量为来自标准曲线的插值。

[0629] 也由二辛可宁酸 (BCA) 蛋白质测定实验分析样本,以获得未知样品中蛋白质的浓度。通过插入白蛋白的标准曲线,对每个样品的蛋白质浓度进行测定。然后归一化 rhASA 浓度的结果到组织提取物中的总蛋白,如由二辛可宁酸检测法测定的。

[0630] 媒介物 (1.8mg/剂,6.0mg/剂,和 18.6mg/剂组) 的所有钻孔的 ASA 水平,分别见图 23、图 24、图 25 和图 26 所示。恢复期动物设备对照,媒介物 (1.8mg/剂,6.0mg/剂,和 18.6mg/剂组) 的所有钻孔的 ASA 水平,分别见图 27、图 28、图 29、图 30、以及图 31 所示。

[0631] 脑表面附近 (脑膜) 采取的,选择的钻孔的 ASA 水平,如图 32 所示。选择的钻孔的 ASA 水平被认为是包含多个深部脑白质物质,如图 33 所示。白质由髓神经细胞的突起 (或轴突) 束组成。选择的束主要包含深部脑灰质,如图 34 所示。与白质相比,灰质包含神经细胞体。每个记录组从表面上,深白质和深灰质选定的 ASA 值,如图 35 所示。

[0632] 脊髓浓度数据见图 36 所示。

[0633] 肝浓度数据见图 37 所示。

[0634] 设备和媒介物给药的对照组中,肝脏、脊髓和大脑的 ASA 浓度在某些情况下是可测量的。在肝脏和脊髓中的水平分别比任何 rhASA 治疗的组低 (图 23、图 32 和图 33)。在设备对照和媒介物给药的动物中,测量的 rhASA 水平代表 ELISA 中使用的天然食蟹猴蛋白与抗-rhASA 抗体的交叉性反应。在设备对照和媒介物组织的报告值并不代表组织中用于食蟹猴 rhASA 的量化值,因为抗体和食蟹猴 ASA 之间的交叉反应性的程度是不知道的,而事实上,该检测标准使用人类 ASA。然而,不希望受任何理论的约束,设备对照和媒介物给药的组之间检测的 rhASA 水平的变化可以解释为表明在食蟹在不同组织和解剖区中的域 ASA 相对量的变化。

[0635] 分别对 1.8,6.0,和 18.6mg/剂组,雄性脊髓切片中的 ASA 水平范围为 160-2352,1081-6607,1893-9252ng/mg 蛋白,而在雌性中为 0-3151,669-6637,和 1404-16424ng/mg 蛋白 (图 32)。脊椎中腰椎区域的 ASA 水平比颈区域较高。在 rhASA 治疗的组中,肝脏中检测到的 ASA 蛋白质水平为剂量反应型,而且在媒介物组中是非常低的。在 1.8,6.0 和 18.6mg/剂组,雄性和雌性的平均 ASA 水平分别为 88,674,2424 和 140,462,和 1996ng/mg 蛋白质 (图 33)。

[0636] 总体而言,在 rhASA 给药组的脊髓切片和肝制备样品中的 ASA 水平表出现剂量相关性。许多测试的脑区域,ASA 水平和 rhASA 施用之间表现出明显的剂量关系,而其它更模棱两可。在一般情况下,在脑中的 ASA 水平随 rhASA 剂量增加。

[0637] 实施例 8: 药代动力学和生物分布研究

[0638] 本研究的目的是评估鞘内 (IT) 和静脉 (IV) 施用于食蟹猴后, 各种治疗替代酶的药代动力学 (PK) 和生物分布。

[0639] 在本研究中, 共有 12 只雄性和 12 只雌性食蟹猴按体重被随机分配分为 4 治疗组, 以进行阶段 1a (IS2 施用) 和阶段 1b (ASA 施用), 所述食蟹猴具有通畅的鞘内腰椎 (IT-L) 导管和鞘内的 - 小脑延髓池 (IT-CM) 导管。

[0640] 两个阶段给药后, 在指定的时间间隔收集血液和 CSF (从 IT-CM 导管)。从阶段 1a 收集最后的样品后, 动物被允许阶段 1B 开始前进行 7 天的清除期。

[0641] 从阶段 1b 收集最后的样本后, 在两个阶段之间, 这些动物将被允许为期 7 天的清除期。来自阶段 1b 的共有 12 只雄性和雌性的食蟹猴按体重被随机分配分成 IS2 (组 1a-6a) 和 ASA (组 1b-6b) 的 12 个治疗组。

[0642] 随着 IT-L 施用, 血清中的 ASA 绝对生物利用度为 ~ 30 至 40%。相比之下, 在 CSF 中, 只有 0.5% 的 IV 剂量为生物利用。

[0643] 随着 IT-L 施用, 暴露到血清中的 ASA 按大于比例的方式增加。

[0644] 随着 IT-L 施用, 暴露到 CSF 中的 ASA 小于剂量 (增加) 比例的方式增加。在血清中 rhASA 的 PK 参数、在 CSF 中 rhASA 的 PK 参数, 以及生物利用度在表 45 ~ 47 中示出。

[0645] 表 45- 食蟹猴血清中的 ASA PK 参数总结

[0646]

平均值 (CV%)	血清芳基硫酸酯酶 A			
	芳基硫酸酯酶 A (阶段 1B: IV 1 MG/KG)	芳基硫酸酯酶 A (阶段 1B: IT-L 1.8 MG)	芳基硫酸酯酶 A (阶段 1B: IT-L 6 MG)	芳基硫酸酯酶 A (阶段 1B: IT-L 18.6 MG)
N	8	6	8	8
AUC _{0-T} (NG•H/ML)	10505 (16.9)	2219 (41.9)	10352 (31.9)	17583 (28.2)
AUC _{0-∞} (NG•H/ML)	11069 (17.2)	NC (NC)B	9634 (28.9)C	20789 (27.8)D
C _{MAX} (NG/ML)	11911 (20.0)	363 (40.4)	1160 (29.9)	1621 (25.1)
T _{MAXA} (H)	0.08 (0.08, 0.08)	4.00 (2.00, 4.00)	4.00 (1.00, 4.00)	3.00 (1.00, 4.00)
T _{1/2} (H)	6.55 (31.8)	NC (NC)B	6.77 (21.4)C	7.40 (32.8)D
CL OR CL/F (ML/H)	261 (17.0)	NC (NC)B	654 (25.0)C	944 (25.4)D
VZ OR VZ/F (ML)	2418 (32.4)	NC (NC)B	6523 (41.3)C	9686 (25.8)D

[0647] 表 46- 食蟹猴 CSF 中的 ASA PK 参数总结

[0648]

平均值 (CV%)	CSF 芳基硫酸酯酶 A			
	芳基硫酸酯酶 A (阶段 1b: IV 1 mg/kg)	芳基硫酸酯酶 A (阶段 1b: IT-L 1.8 mg)	芳基硫酸酯酶 A (阶段 1b: IT-L 6 mg)	芳基硫酸酯酶 A (阶段 1b: IT-L 18.6 mg)
N	4	6	8	8
AUC _{0-t} (ng·h/mL)	1629 (179.8)	1267266 (86.6)	5334329 (68.8)	8028775 (71.2)
AUC _{0-∞} (ng·h/mL)	8221 (NC) ^b	1595942 (79.1) ^c	4291829 (84.2) ^d	9406664 (64.5) ^e
C _{max} (ng/mL)	69.3 (94.2)	345167 (48.7)	1039079 (73.6)	1841125 (62.8)
T _{max} (h)	6.00 (1.00, 8.00)	0.08 (0.08, 4.00)	0.29 (0.08, 4.00)	2.04 (0.08, 4.00)
t _{1/2} (h)	37.6 (NC) ^b	23.6 (68.3) ^c	17.1 (31.3) ^d	13.4 (29.3) ^e
CL 或者 CL/F (mL/h)	392 (NC) ^b	1.95 (74.1) ^c	38.1 (214.8) ^d *	3.04 (66.1) ^e
V _z 或者 V _z /F (mL)	21237 (NC) ^b	80.6 (110.4) ^c	1090 (215.1) ^d	67.6 (81.2) ^e

[0649] 表 47 - 血清和 CSF 中 ASA 的生物利用度

[0650]

	绝对生物利用度比较		
	芳基硫酸酯酶 A (阶段 1b: IT-L 1.8 mg)	芳基硫酸酯酶 A (阶段 1b: IT-L 6 mg)	芳基硫酸酯酶 A (阶段 1b: IT-L 18.6 mg)
F _{abs} (%)	NC	39.9	27.3

[0651] 在 IT-L 施用后,血清中的 ASA 生物药效率为~ 30%至 40%。与之相反,由 IV 途径施用剂量后,在 CSF 中只有 0.5%的生物利用度。在表 48 中示出了 CSF 血清分区。

[0652] 表 48-CSF: 血清分区

[0653]

CSF: 等离子分区			
芳基硫酸酯酶 A (阶段 1B: IV 1 MG/KG)	芳基硫酸酯酶 A (阶段 1B: IT-L 1.8 MG)	芳基硫酸酯酶 A (阶段 1B: IT-L 6 MG)	芳基硫酸酯酶 A (阶段 1B: IT-L 18.6 MG)
0.74	NC	445	452

[0654] 实施例 9-MLD 患者的治疗

[0655] 通过例如 IT 递送的直接 CNS 施用可以用于有效治疗 MLD 患者。这个实施例解释了多剂量递增研究,其被设计以评估每隔一周 (EOW) 高达 3 剂量水平,持续总共 40 周,通过鞘内药物递送设备 (IDDD) 施用 rhASA 至患有婴儿型 MLD 患者的安全性。适合于人类治疗的多种示例性的鞘内药物递送设备在图 45-48 中描述。

[0656] 将招募多达 20 例患者:

[0657] 队列 1:5 例患者 (最低剂量)

[0658] 队列 2:5 例患者 (中剂量)

[0659] 队列 3:5 例患者（最高剂量）

[0660] 5 例患者被随机分配至没有治疗组。

[0661] 为本研究选取的患者是根据一下标准的内容：(1) 在 30 个月的年龄之前出现第一症状的外观；(2) 在筛选的时候是能走动的（定义为独立站立和用一只手举着向前走 10 步的能力）；(3) 在筛选时存在神经学体征。通常地，具有造血干细胞移植历史的患者被排除。

[0662] 通过 IT 注射，持续 40 周，测定在儿童（具有晚期婴儿 MLD）中施用 rhASA 的递增剂量的安全性。此外，评估了 rhASA 在粗大运动功能方面的临床活性、以及在血清中单一和重复剂量的药代动力学、以及在脑脊髓液（CSF）中的浓度。

[0663] 虽然本文描述的某复合物、组合物和方法已经根据某实施方案进行特定的描述，但是所述实施例仅用于解释本发明的复合物，并且不用于限制必须与其相同。

[0664] 所述冠词“a”和“an”，如本文在说明书中和权利要求书中使用的，除非清楚地表明与之相反，应该被理解为包括其复数形式。在某组的一个或多个成员之间包括“或者”的权利要求或者描述，被认为：如果一个、一个或多个、或所有组成员存在、被采用或者以其它方式与给定的产品或过程相关，那么就是符合的；除非从上下文中表示相反或者其它方式明显地指出。本发明包括这样的实施方案：其中所述组的只有一个成员存在、或者被采用、或者以其它方式与给定的产品或过程相关。本发明也包括这样的实施方案：其中多个、或者整个组成员存在、或者被采用、或者以其他方式与给定的产品或过程相关。而且，应该理解，本发明包括来自一条或多条所列出的权利要求所有的变型、组合、以及置换，其中一种或多种限制、元素、条款、描述性术语等，其根据所述相同权利基础（或者相关、任意其它权利要求）被引入到另一权利要求，除非其它方式指出或者除非其对于本领域技术人员将明显地出现矛盾或者不一致。当元素以列表形式呈现（例如在 Markush 基团中或者类似的形式）时，应该理解，所述元素的每个亚组也是包括在内地被公开，并且任何元素可以从所述组删除。应该理解，一般而言，当本发明、或者本发明的某些方面，被指出包括特定的元素、特征等，那么本发明或者本发明的方面的某些实施方案、或者基本含有这些元素、特征等。为了简化这些实施方案，本文没有在每个案例中具体提出这么多的单词。应该理解，本发明的任意实施方案或者方面可以被清楚地从所述权利要求排除，无论所述具体的排除是否在本说明书中叙述。本文所引用的所述公开文本、网址和其它参考材料，为了描述本发明的背景、以及提供关于其实践的其它细节；都通过参考的方式引入本文。

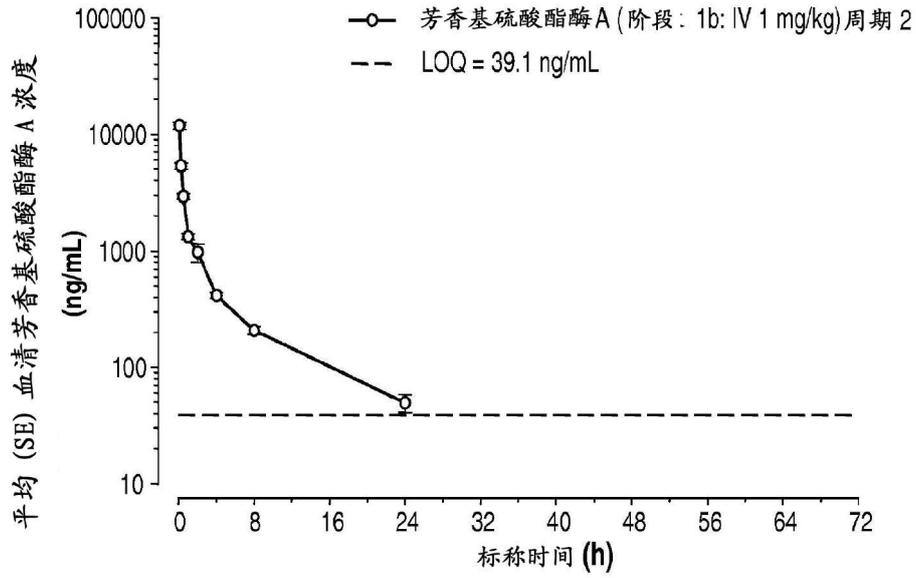


图 1

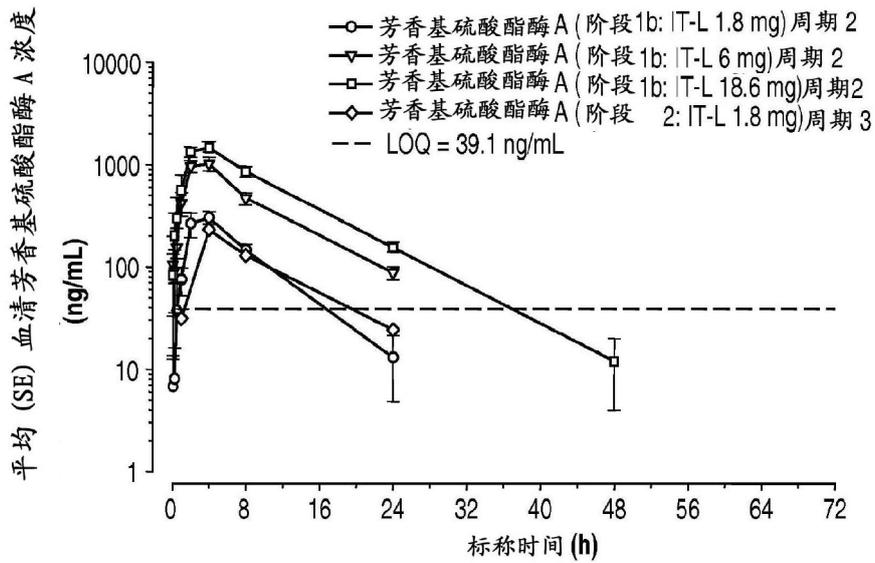


图 2

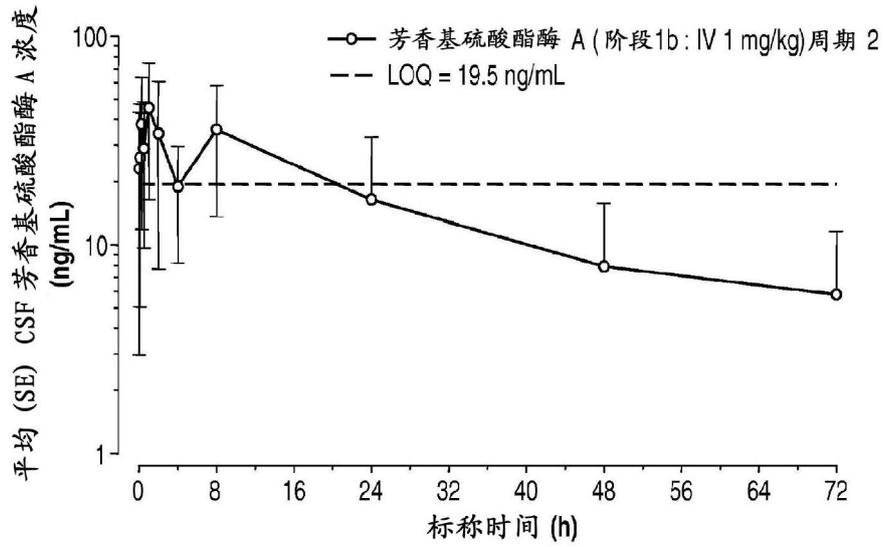


图 3

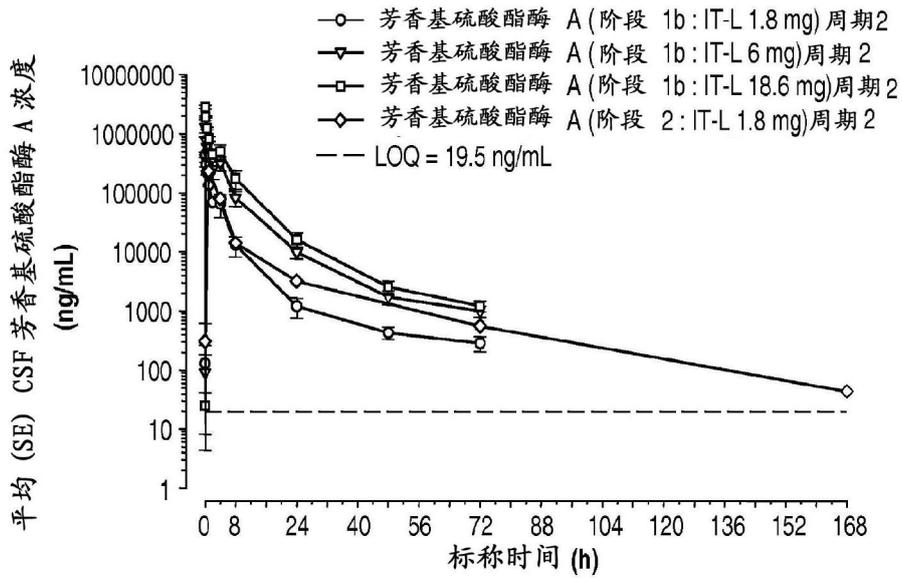


图 4

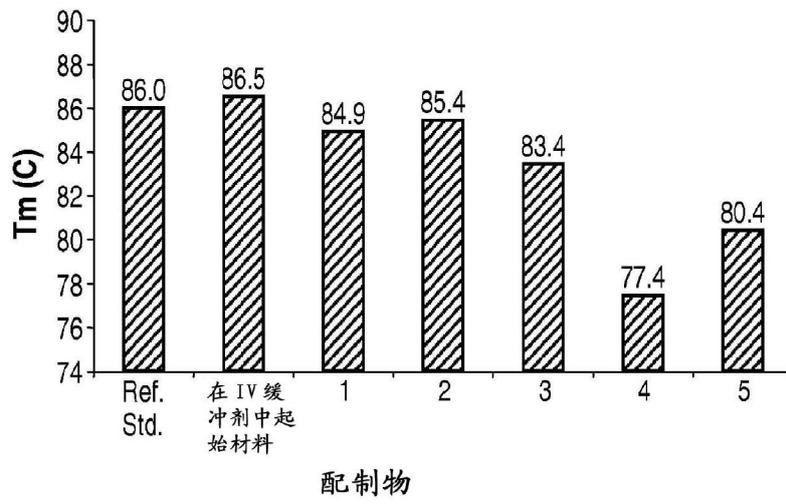


图 5

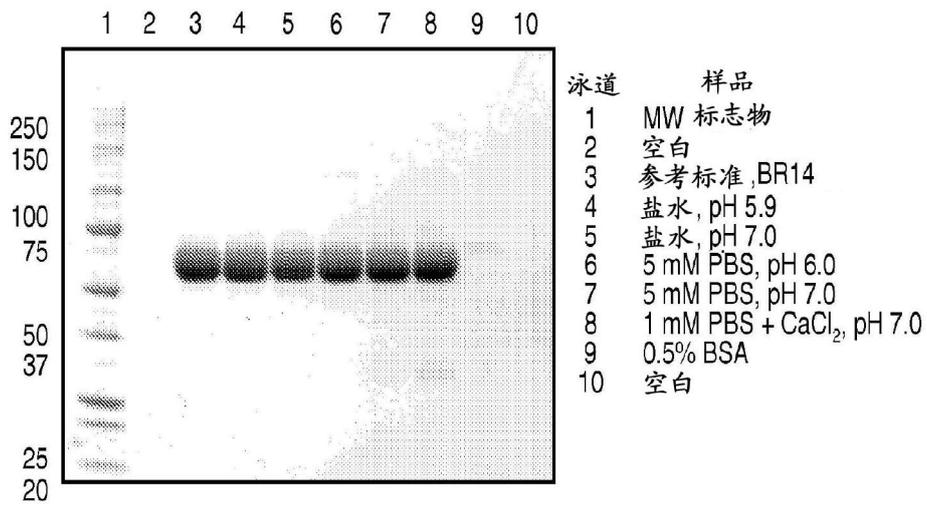


图 6

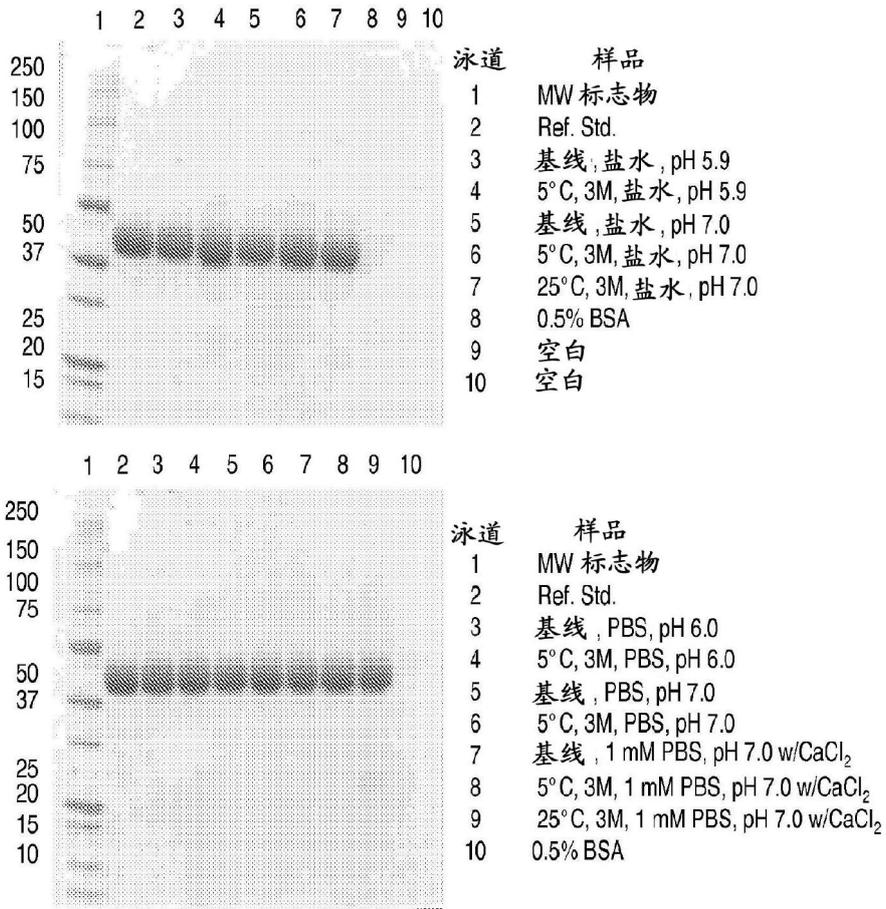


图 7

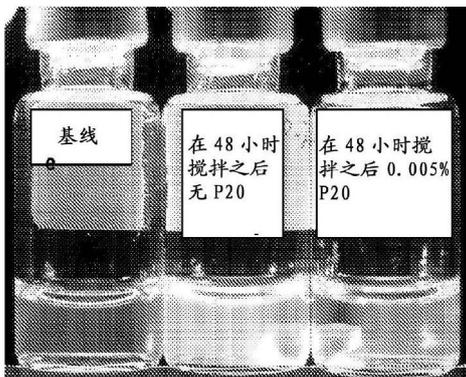


图 8A

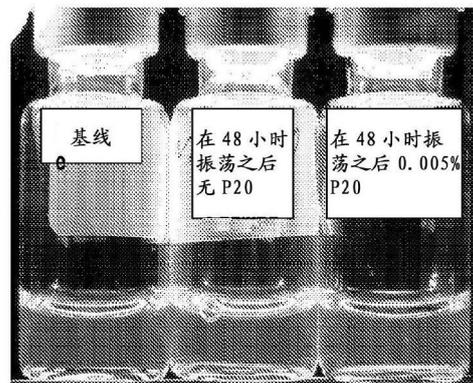


图 8B

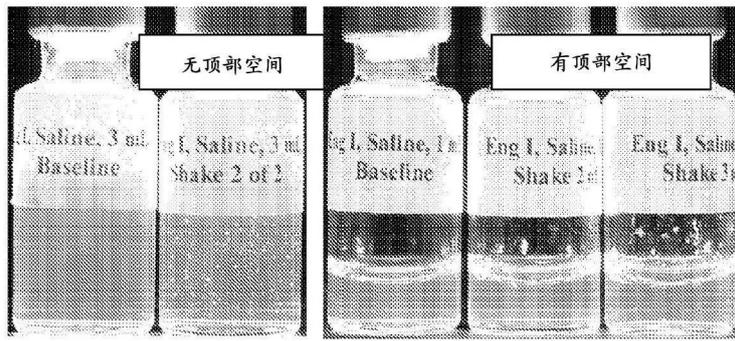


图 9

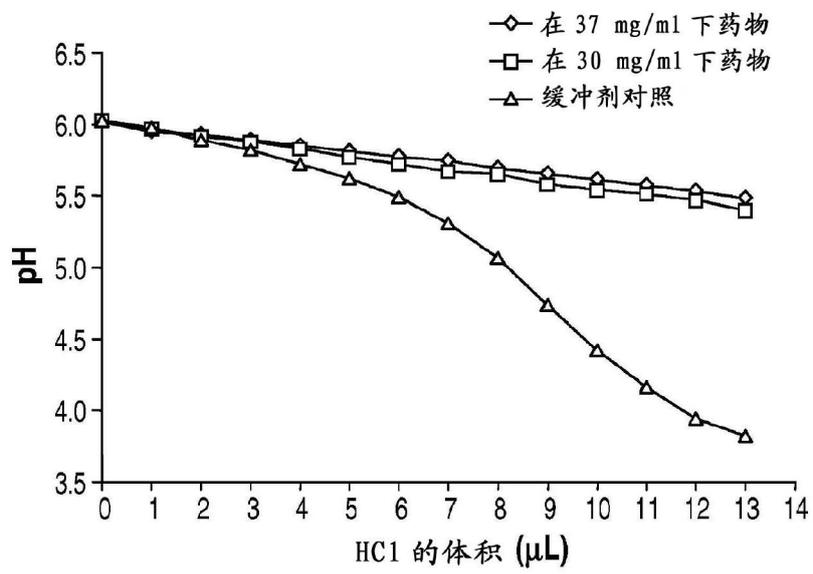


图 10

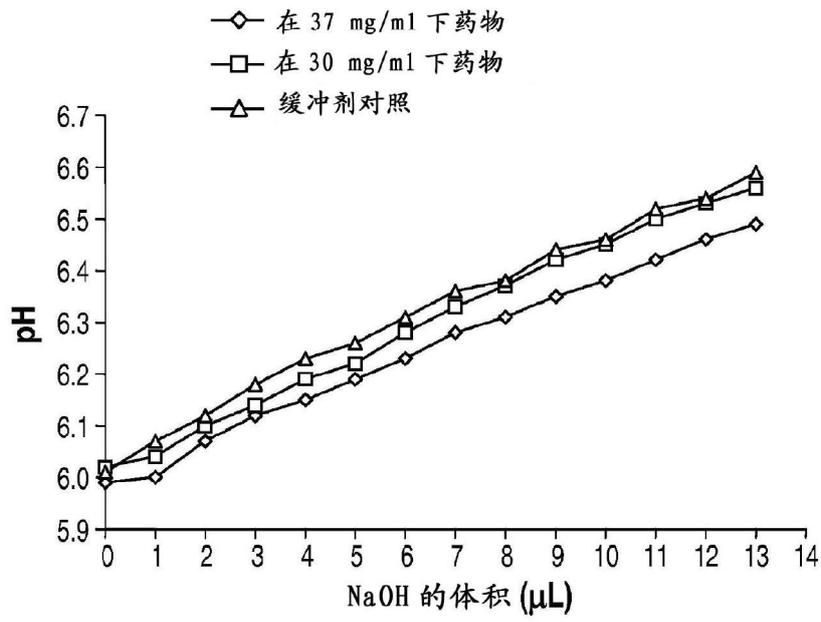


图 11



图 12

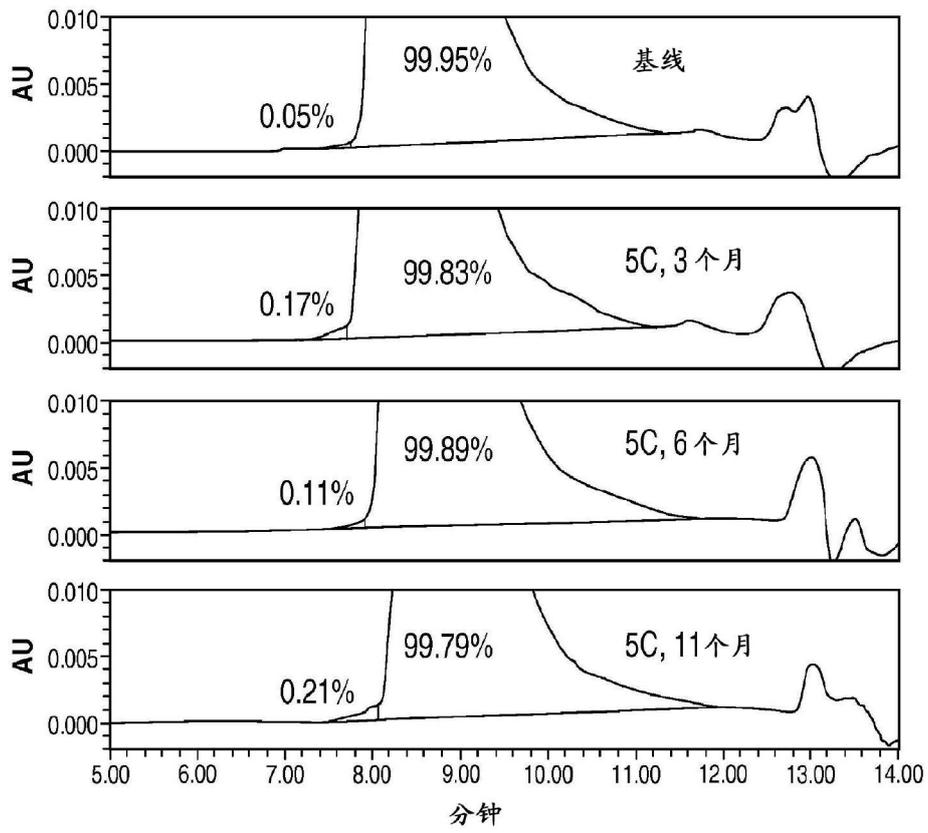


图 13

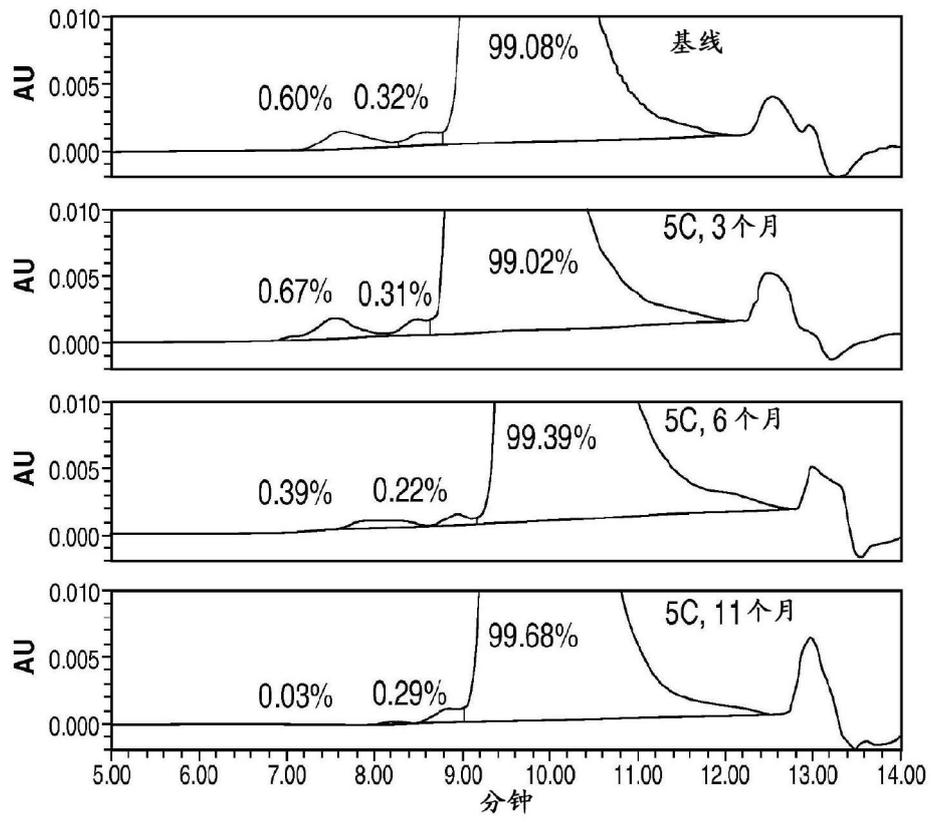


图 14

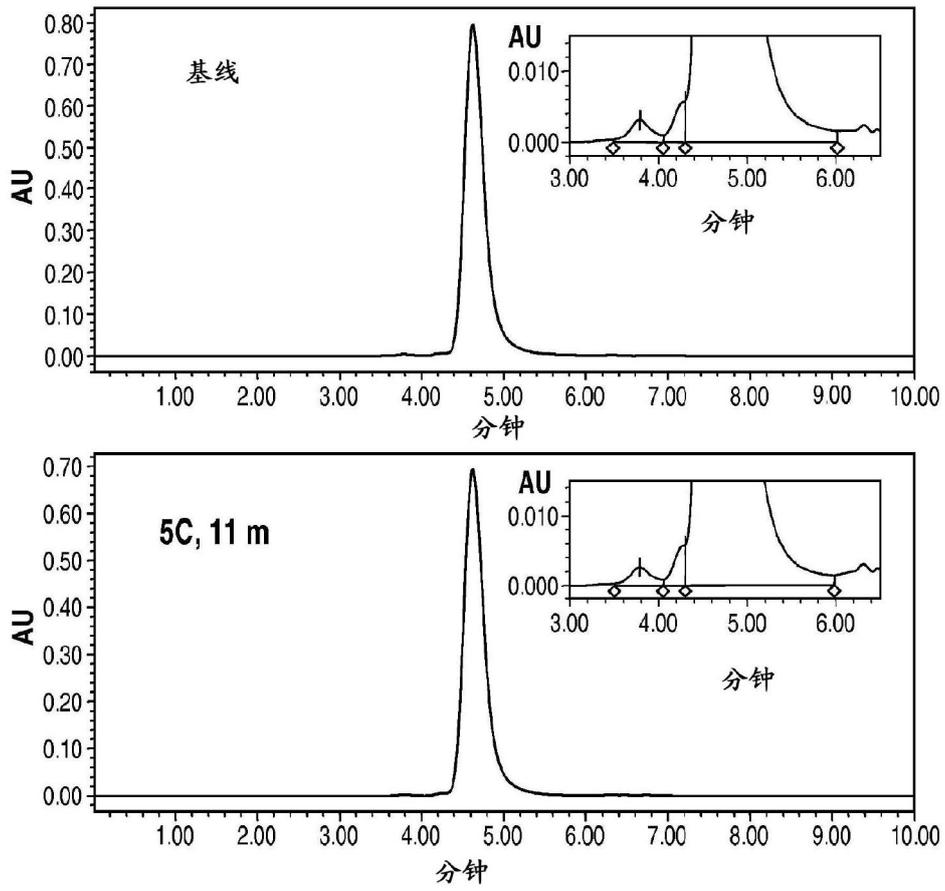


图 15

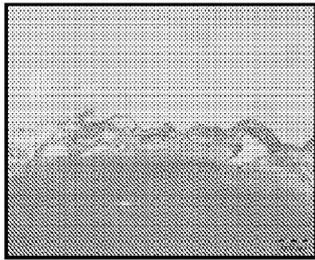


图 16

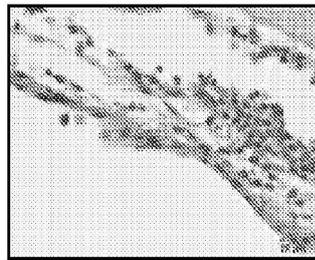


图 17

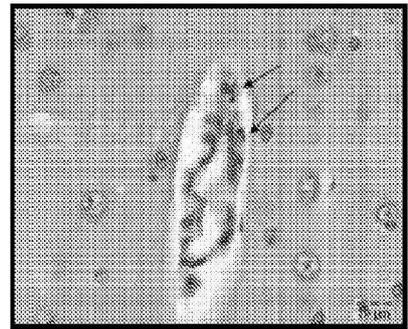
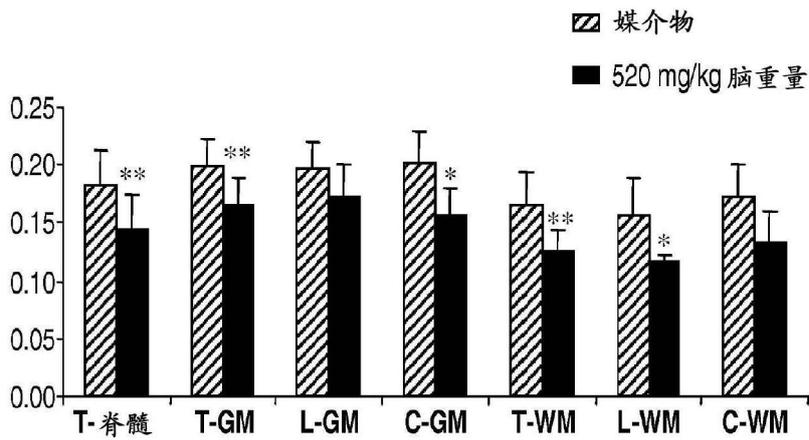


图 18



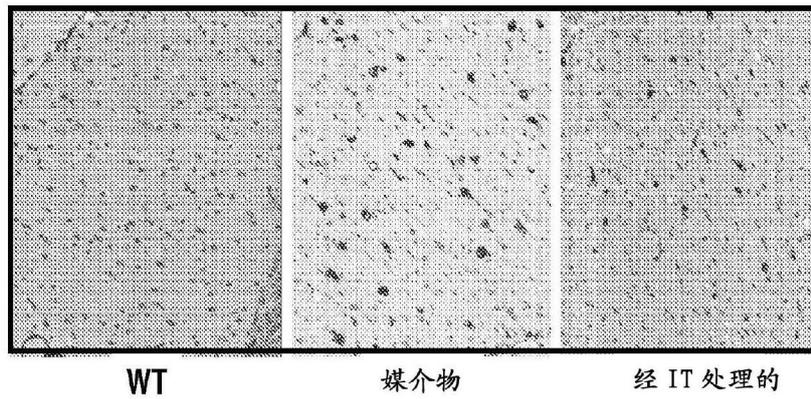
WT 媒介物 经 IT 处理的
 WT = 野生型; 经 IT 处理的小鼠接受 4 周剂量的 520 mg/kg 脑重量的 rhASA1 (0.21mg), 4X 放大倍数

图 19



** P<0.001; * P<0.05
 T-脊髓 = 全部脊髓
 T-GM = 全部灰质
 L-GM = 腰椎灰质
 C-GM = 颈椎灰质
 T-WM = 全部白质
 L-WM = 腰椎白质
 C-WM = 颈椎白质

图 20



WT = 野生型; 经 IT 处理的小鼠接受 4 周剂量的 520 mg/kg 脑重量的 rhASA1 (0.21mg), 20X 放大倍数

图 21

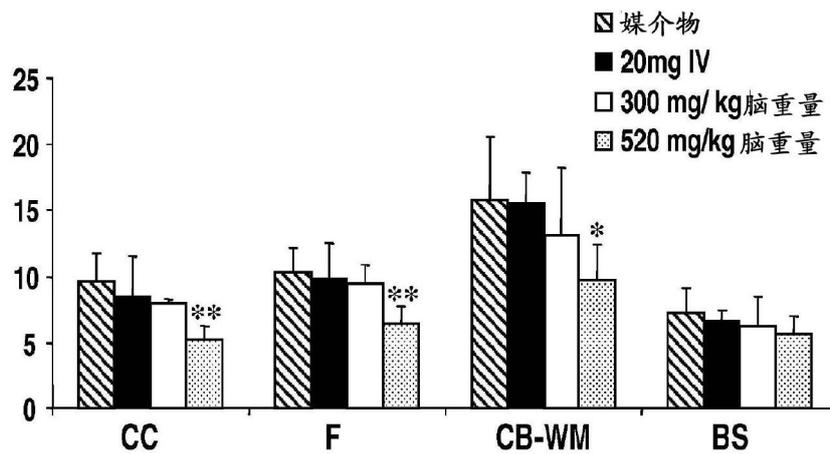


图 22

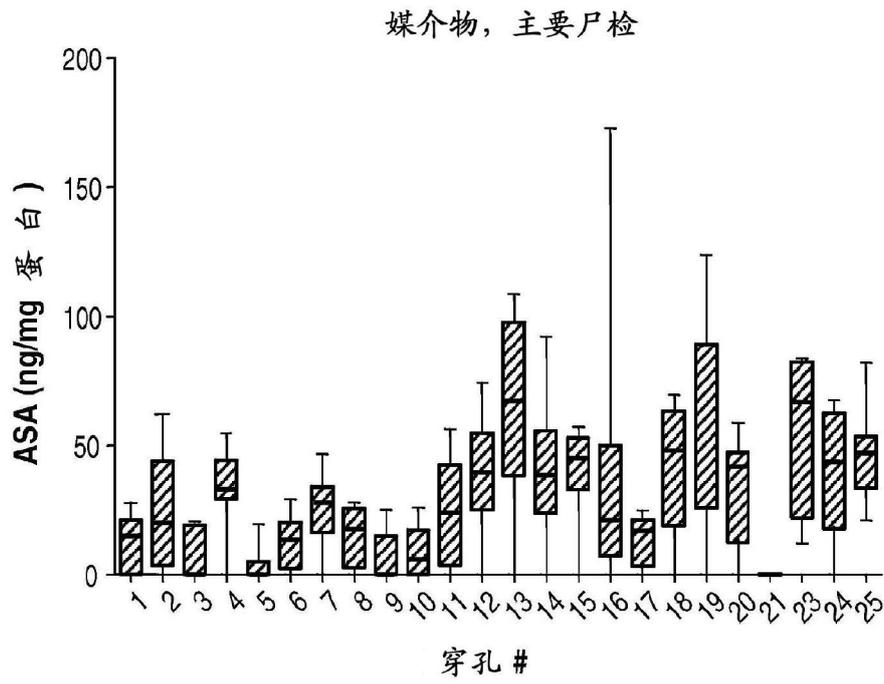


图 23

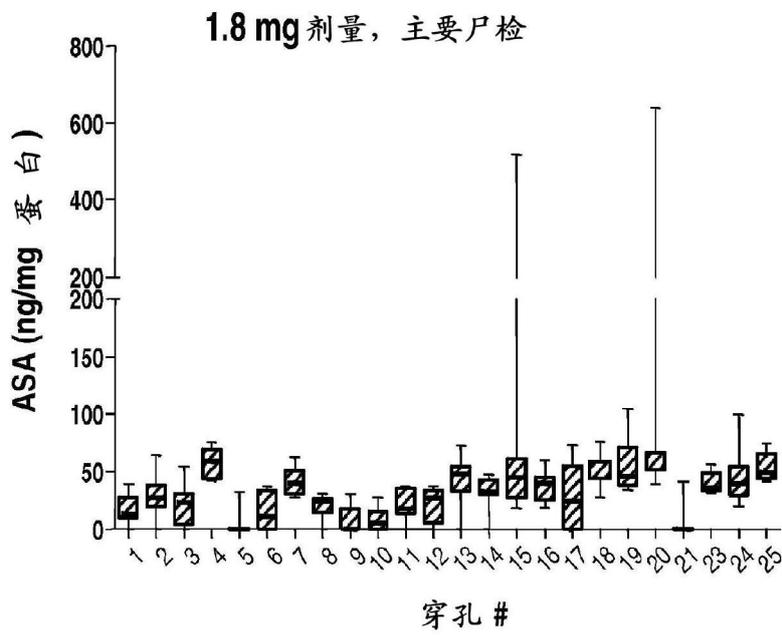


图 24

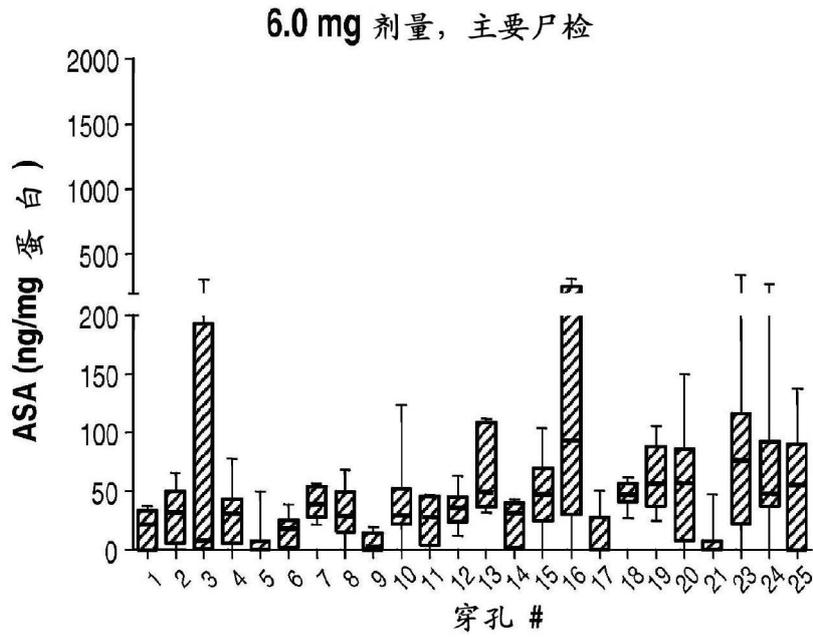


图 25

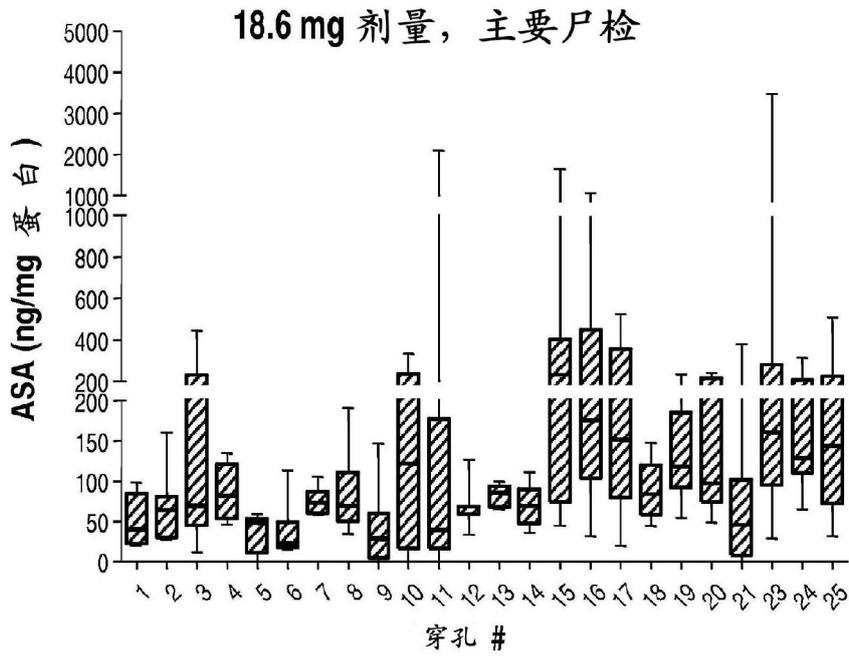


图 26

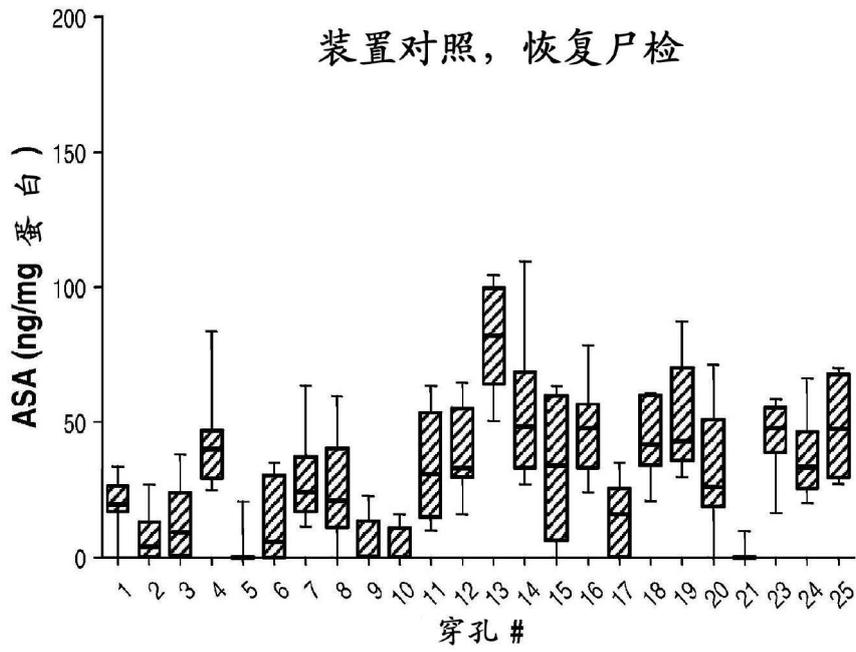


图 27

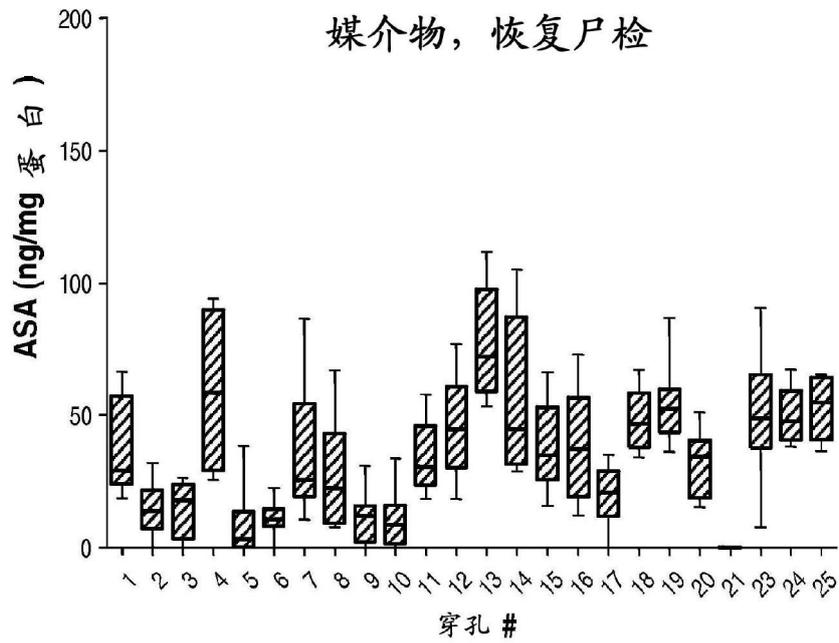


图 28

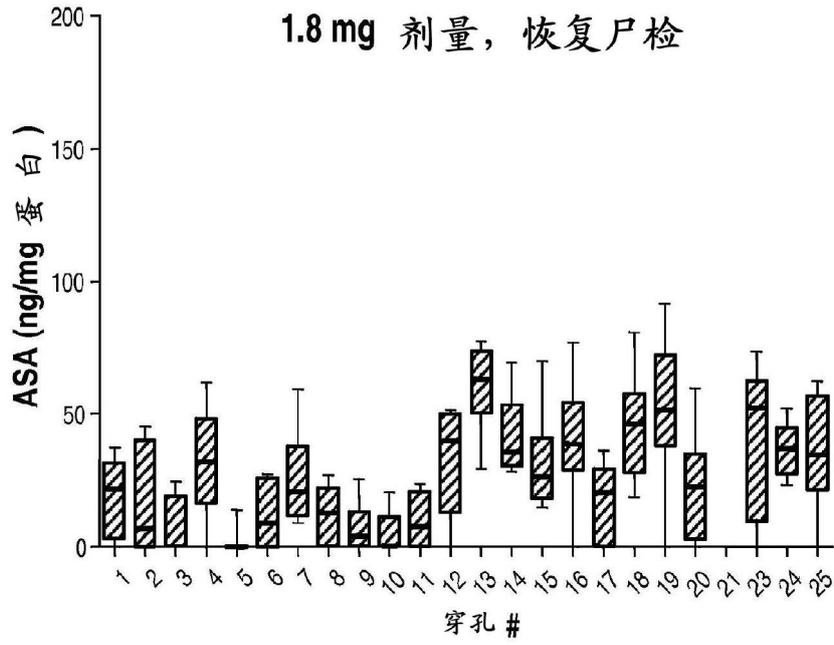


图 29

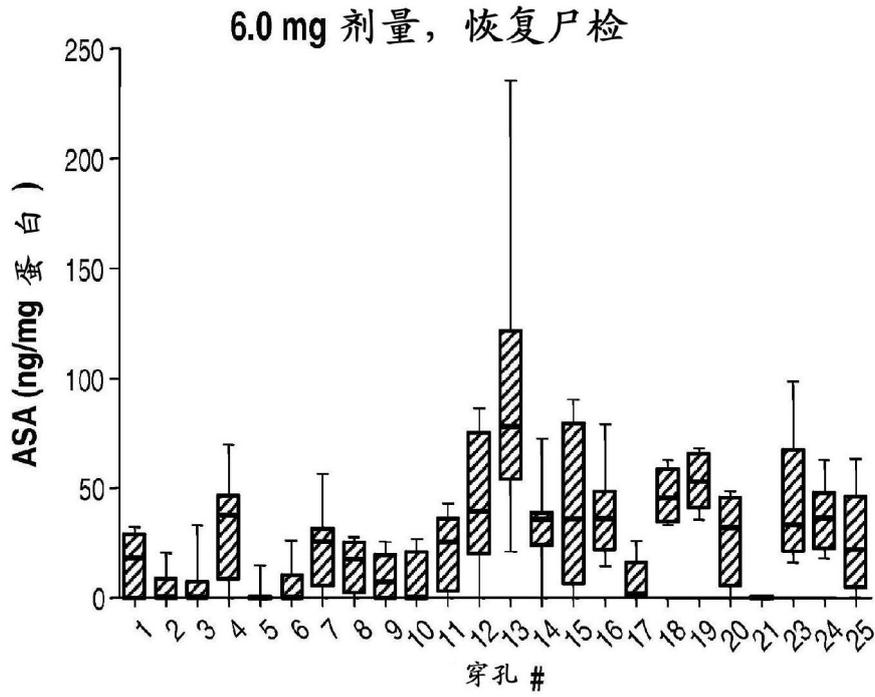


图 30

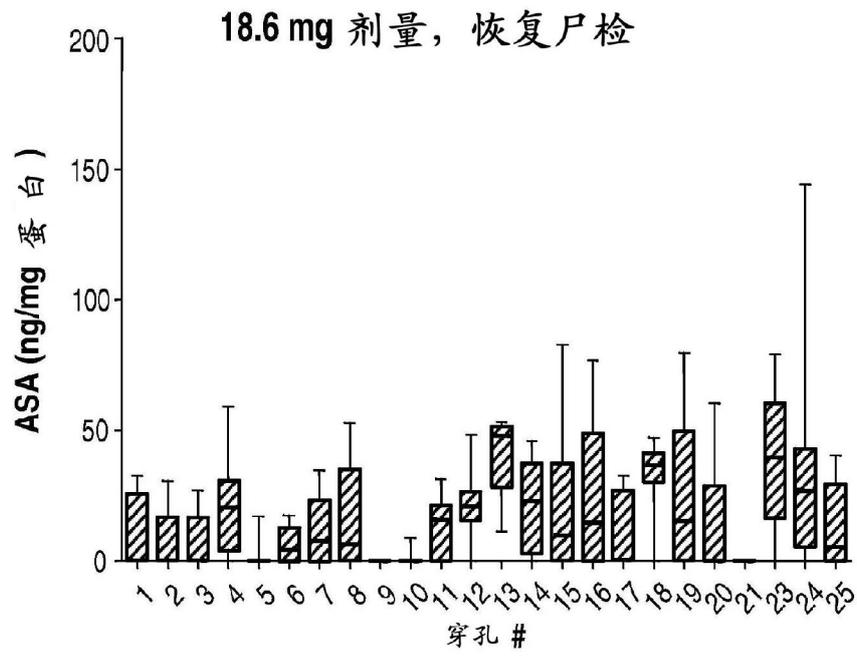


图 31

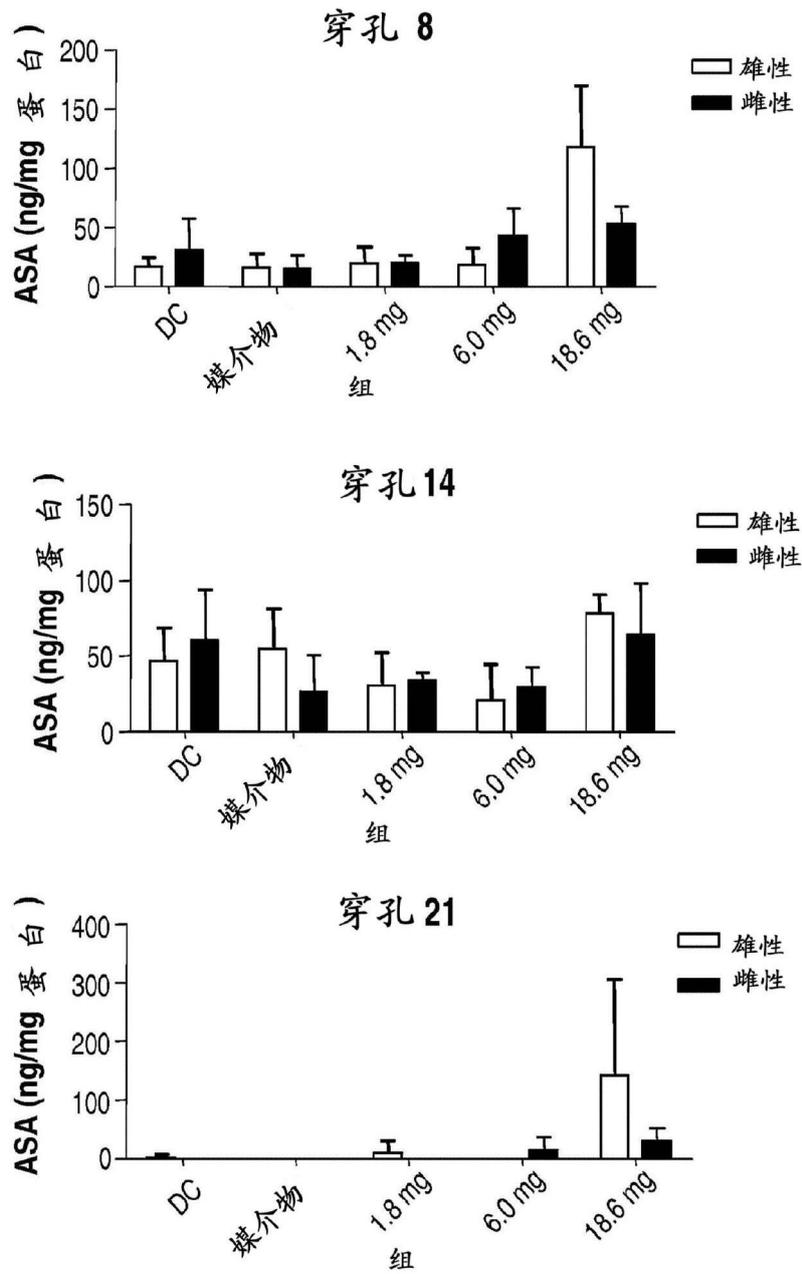


图 32

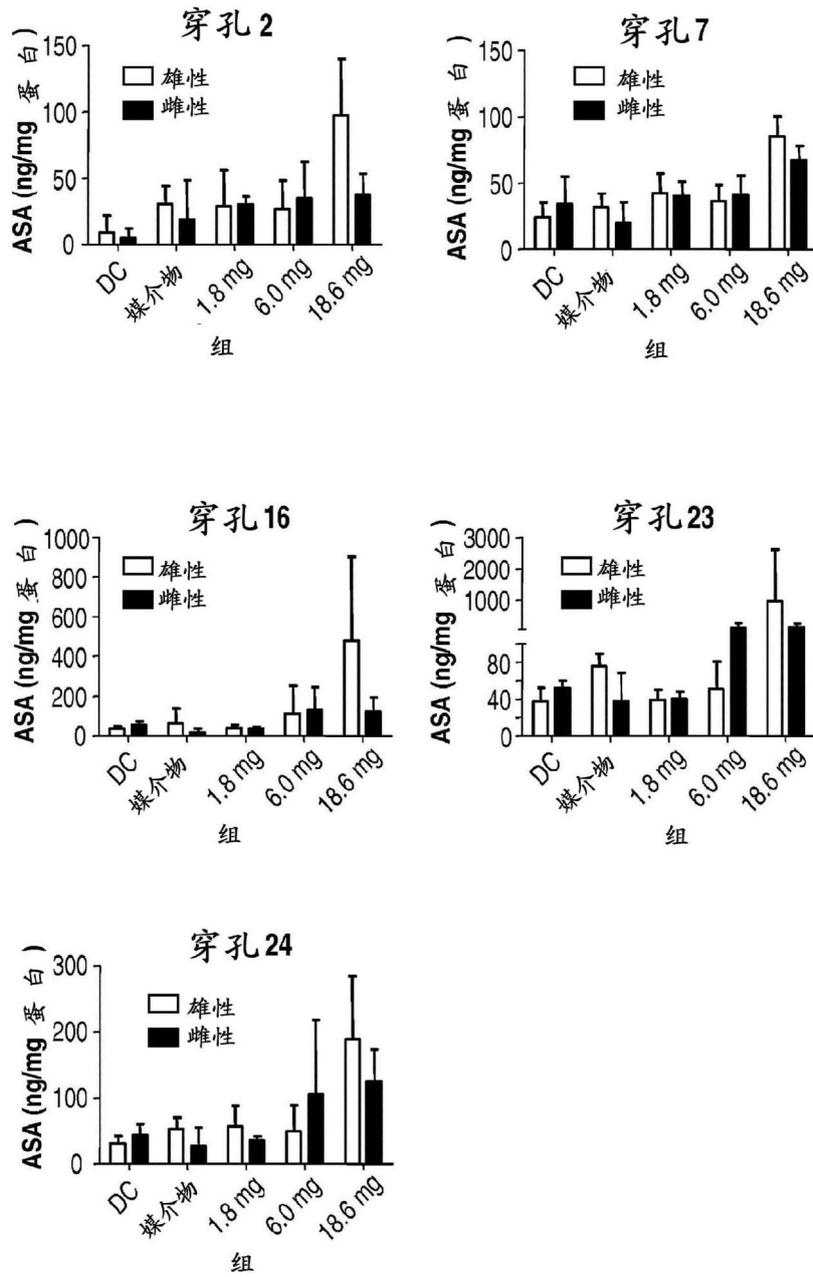


图 33

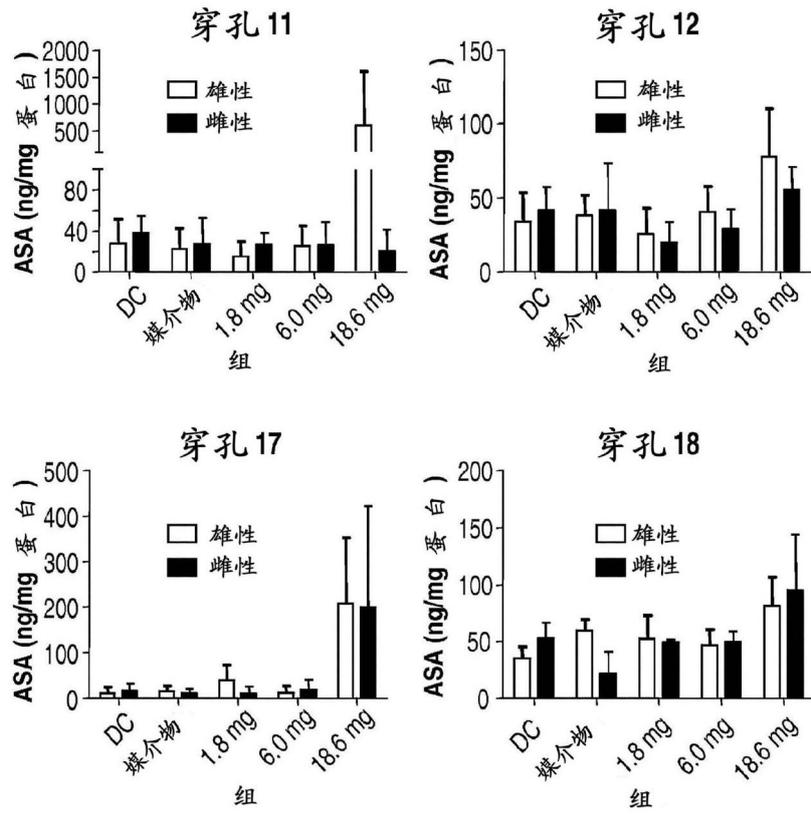


图 34

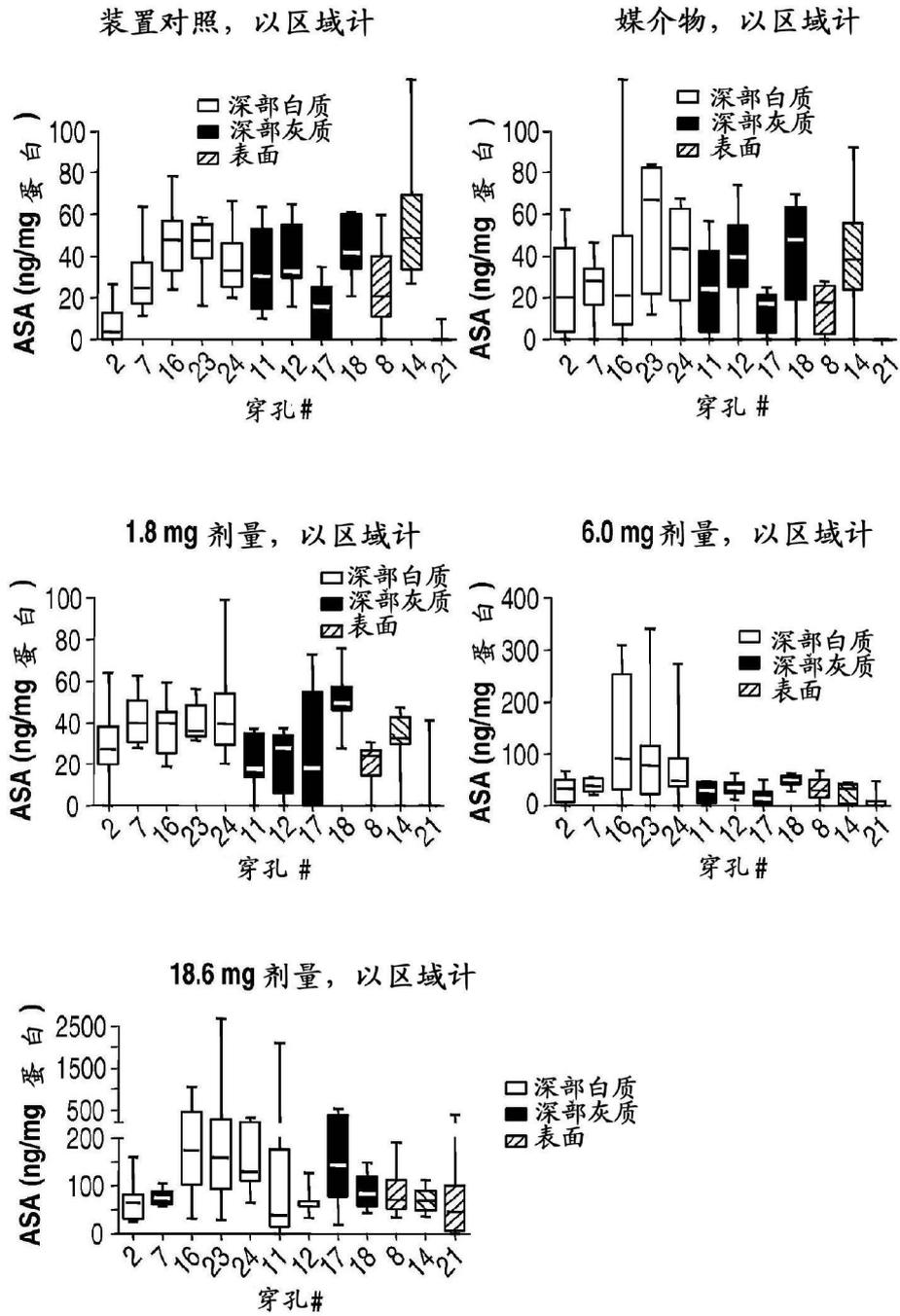


图 35

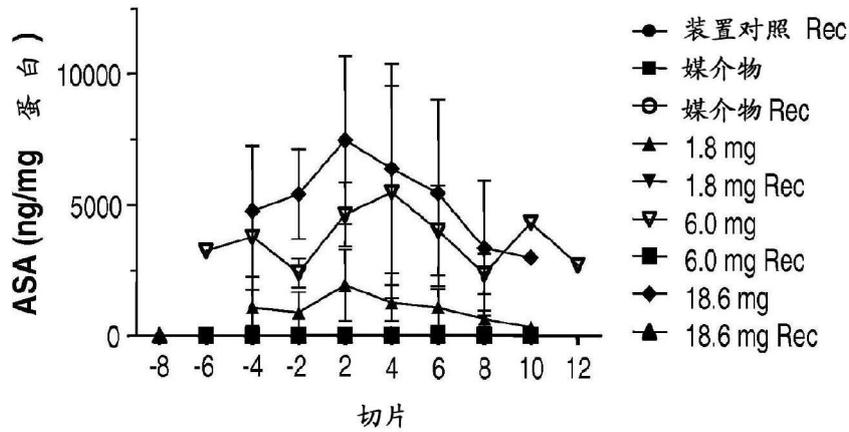
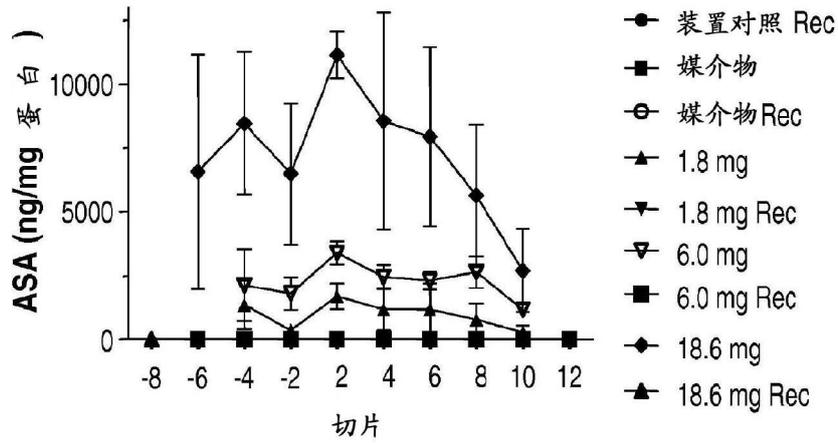


图 36

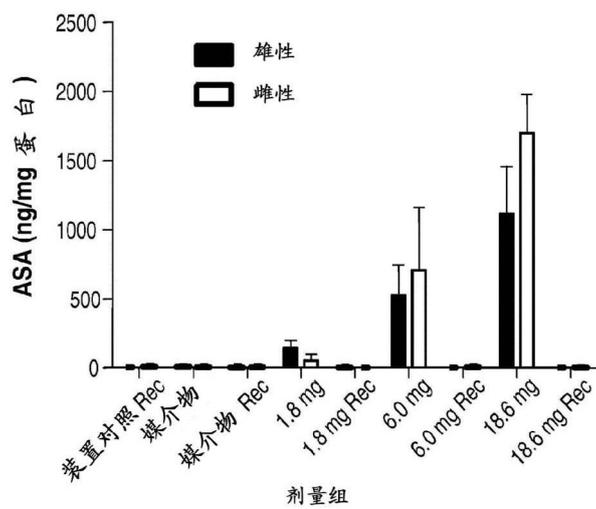
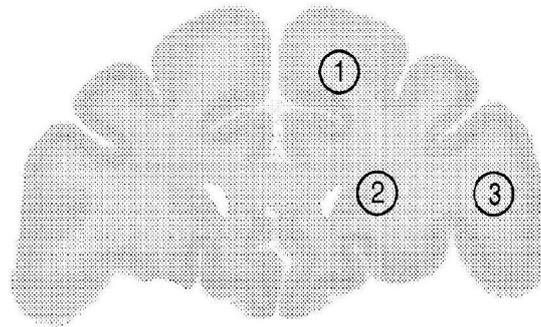


图 37

62-133

#458

切片 4



解剖标记

- 1. 皮质层下 WM
- 2. 室周 MM 和深部白质
- 3. 3. 皮质层下 WM

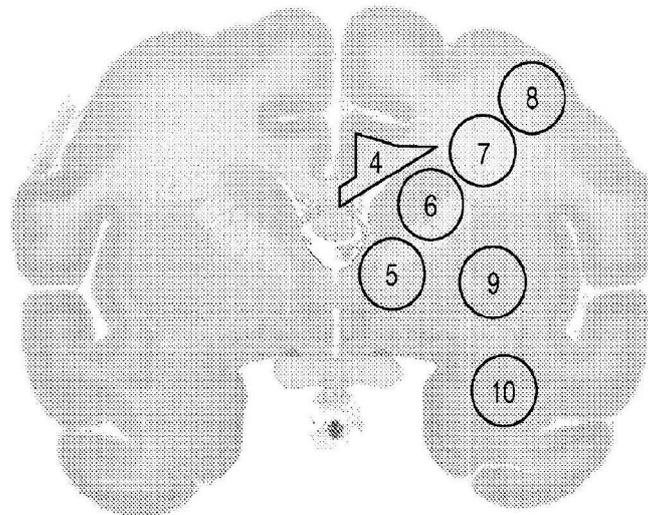
1 cm

图 38

62-133

切片 6

#780



1 cm

解剖标记

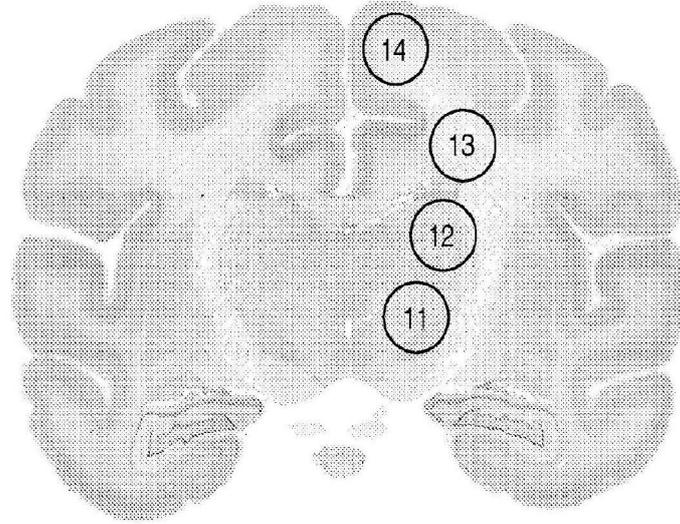
- 4. 胼胝体和胼胝体周皮质层下 WM
- 5. 内囊, GPI
- 6. 内囊, 尾状核
- 7. 深部白质
- 8. 皮质层下 WM 和皮质层
- 9. 壳核
- 10. 颞皮质层下 WM 和皮质层

图 39

62-133

切片 8

#962



1 cm

解剖标记

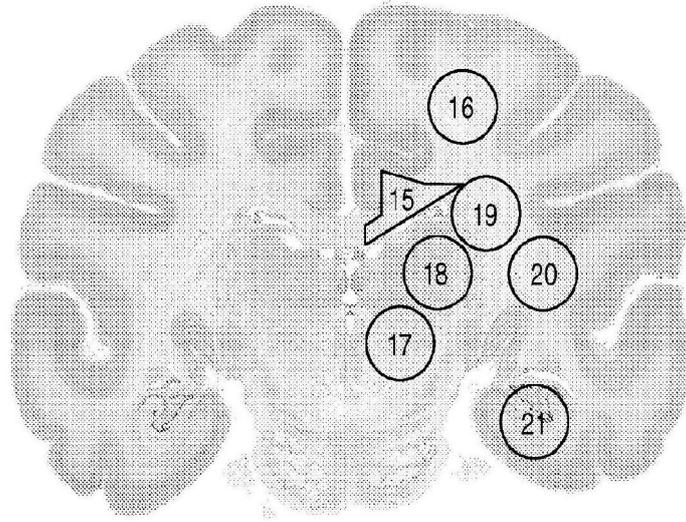
- 11. 深部灰质
- 12. 深部灰质
- 13. 深部 WM, 额叶脑室周围和皮质层下
- 14. 皮质层下白质和皮质层, 表面的矢状

图 40

62-133

切片 10

#1102



1 cm

解剖标记

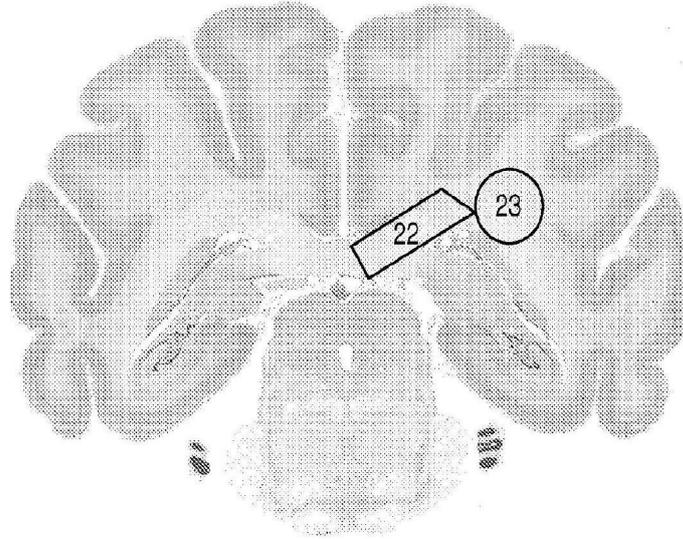
- 15. 在胼胝体和胼胝体周围皮质层下的 WM
- 16. 深部皮质层下的 WM
- 17. 深部灰质
- 18. 深部灰质
- 19. 室周 WM
- 20. 皮质层下的 WM
- 21. 海马

图 41

62-133

切片 12

#1240



1 cm

解剖标记

22. 胼胝体

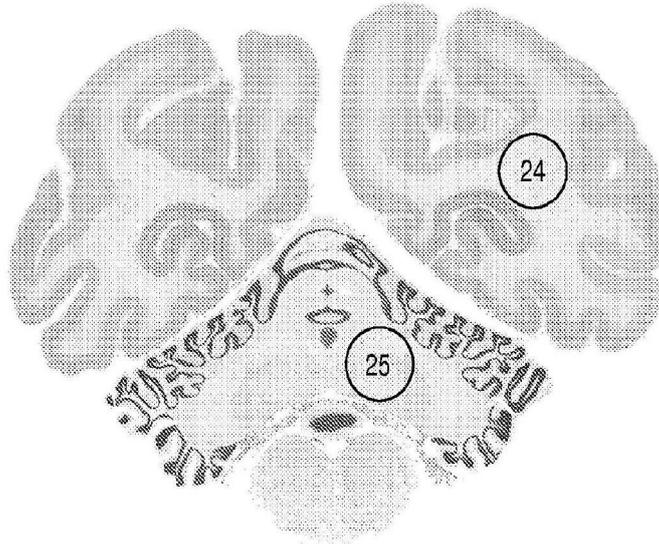
23. 深部 WM

图 42

62-133

切片 14

#1486



1 cm

解剖标记

24. 皮质层下的 WM, 枕叶

25. 小脑白质, 包括齿状核 (WM)

图 43

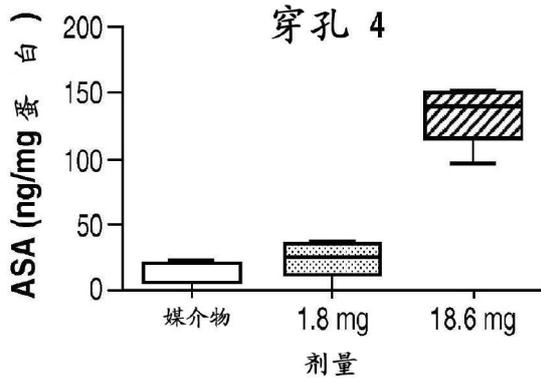


图 44A

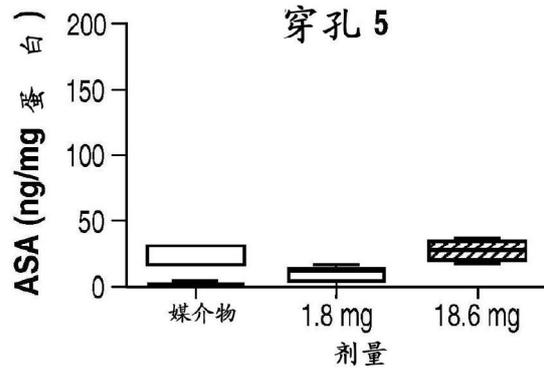


图 44B

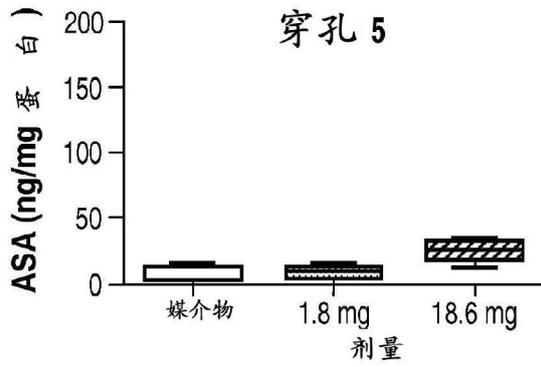


图 44C

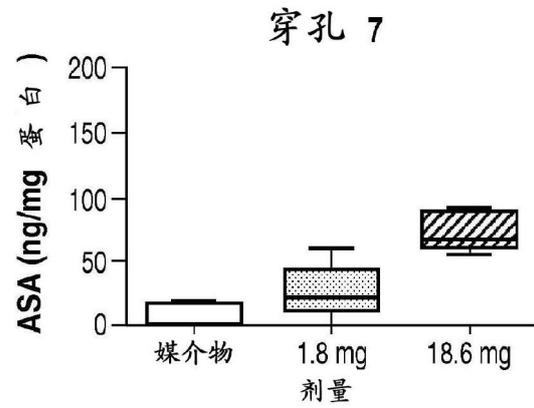


图 44D

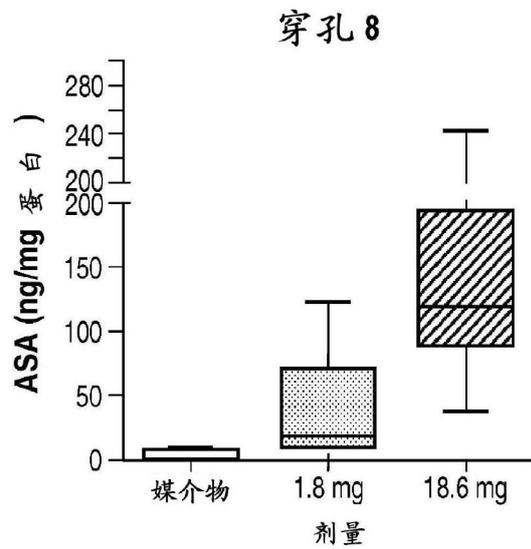


图 44E

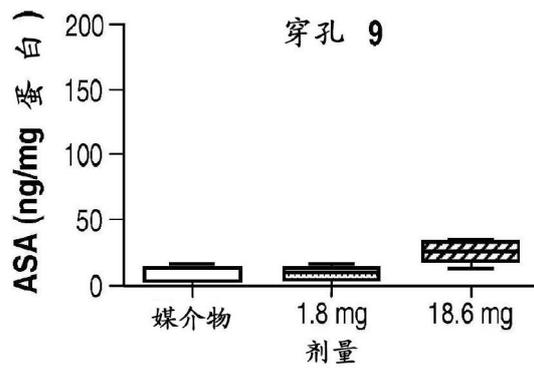


图 44F

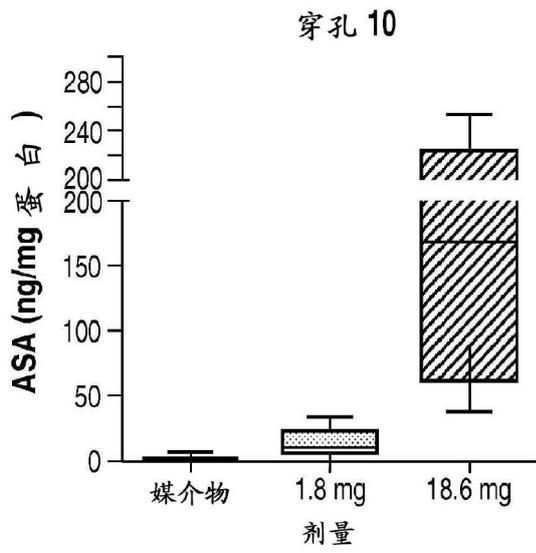


图 44G

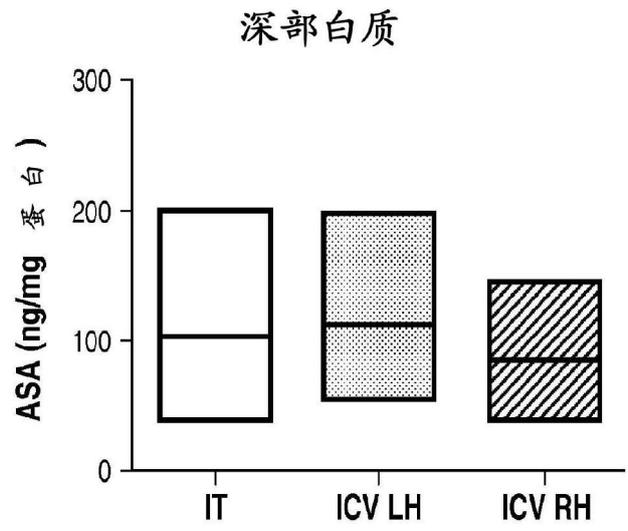


图 45A

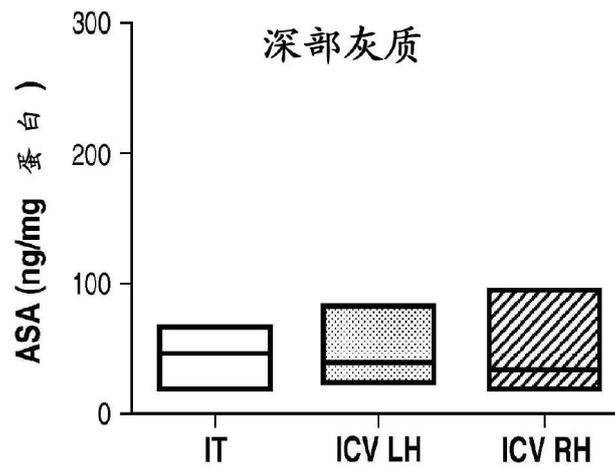


图 45B

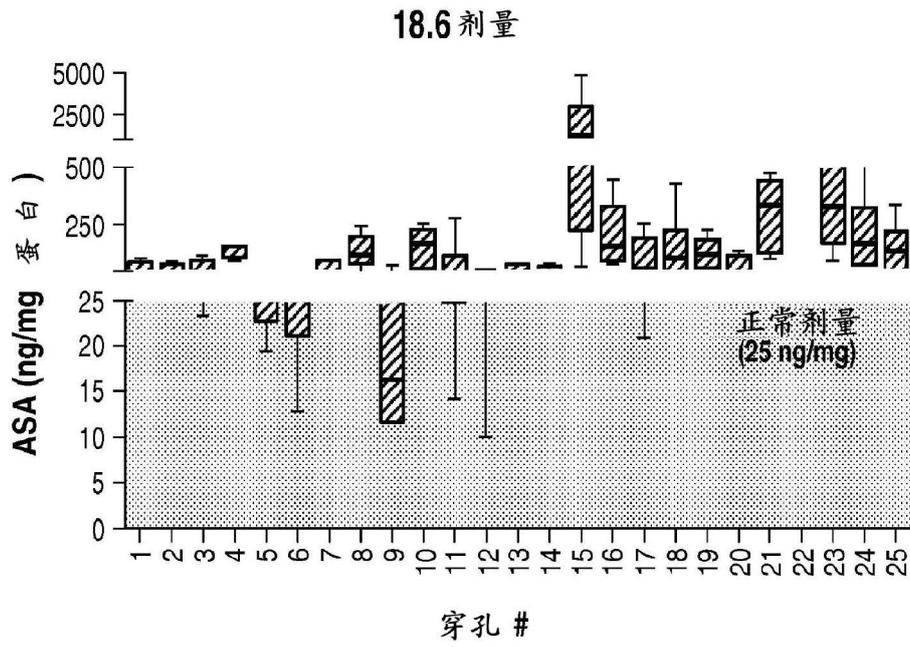


图 46A

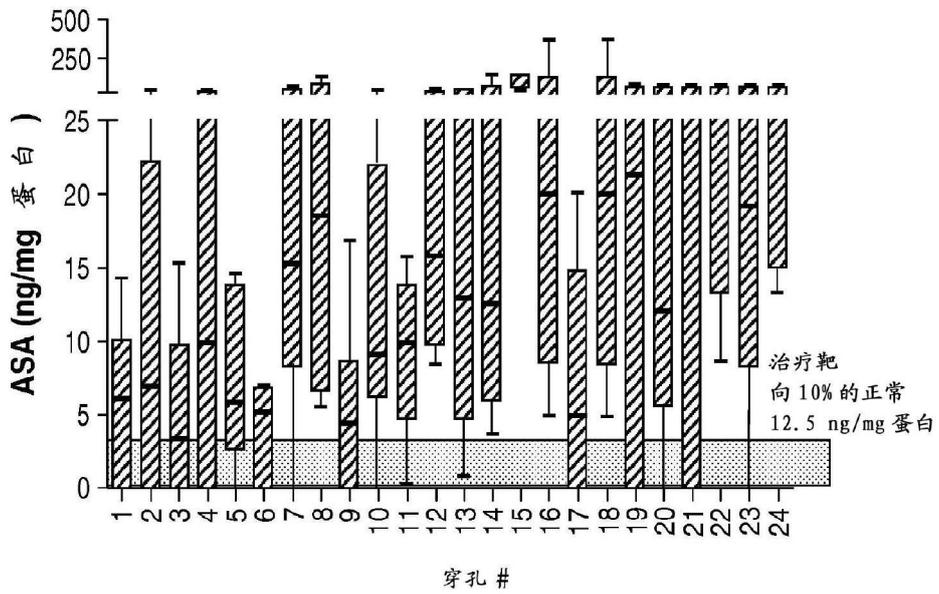


图 46B

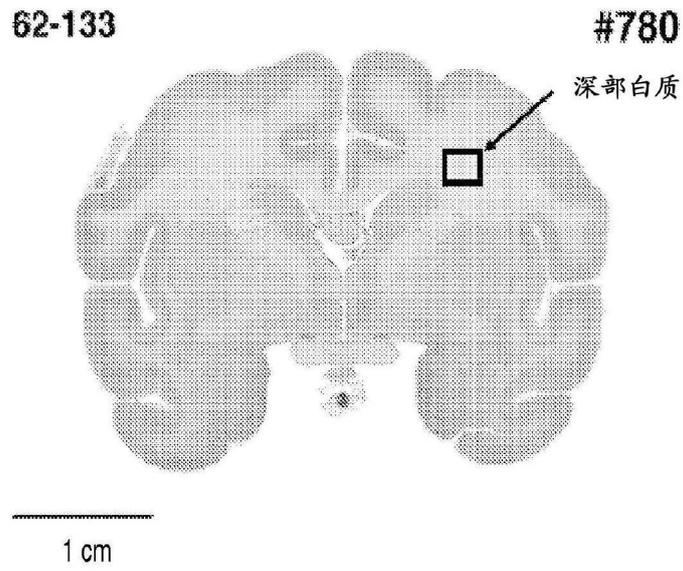


图 47A

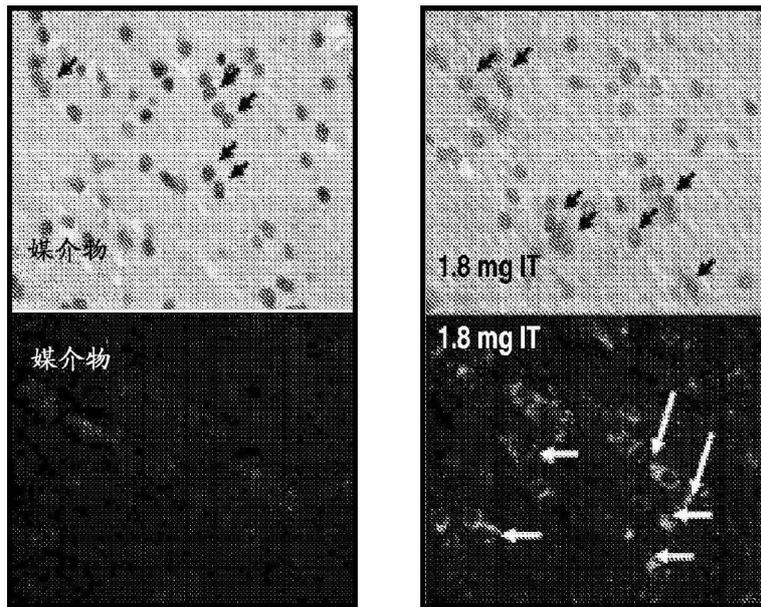


图 47B

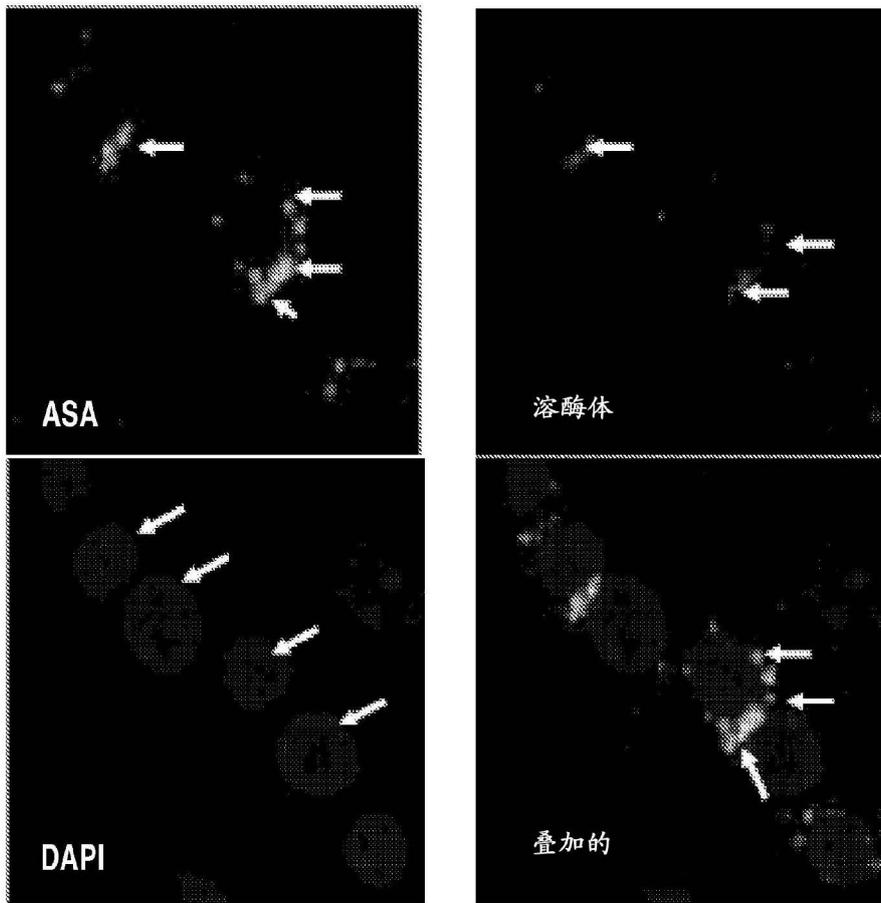


图 47C

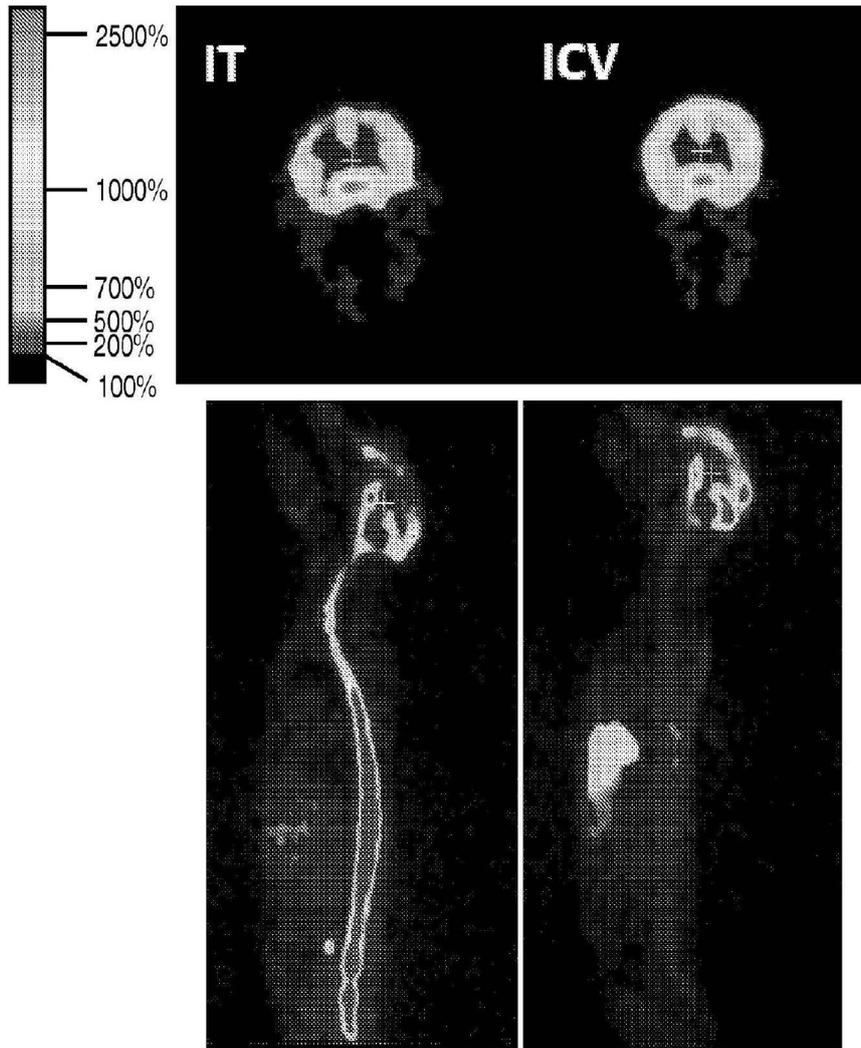


图 48

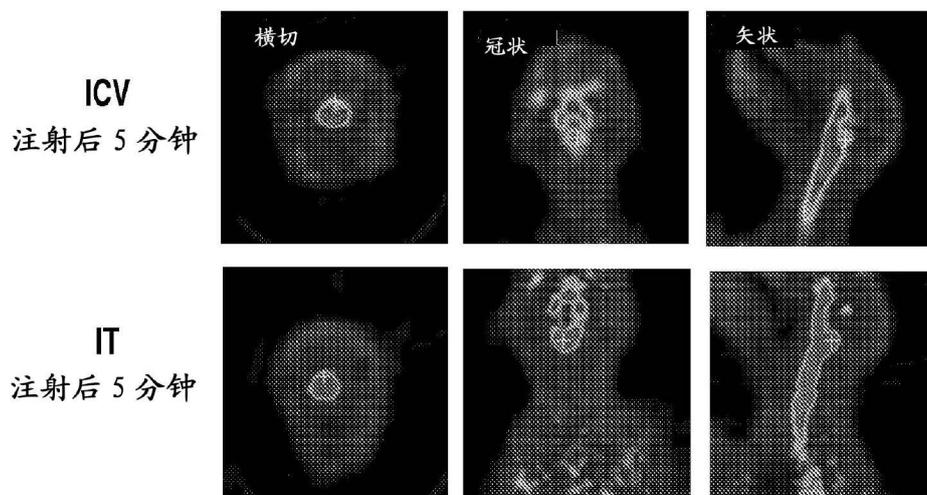


图 49

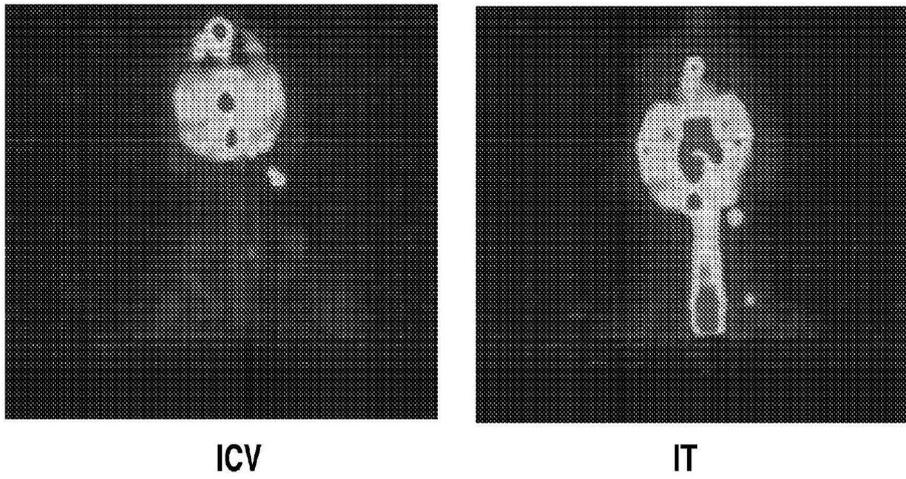


图 50

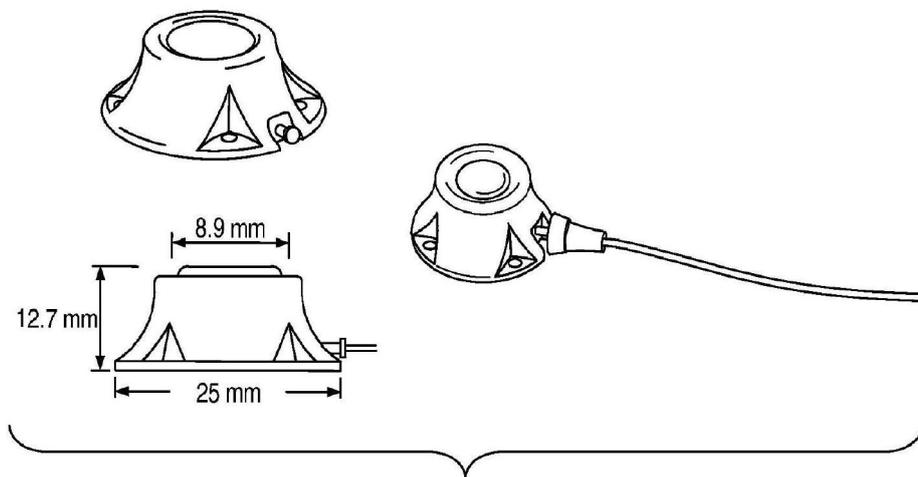


图 51

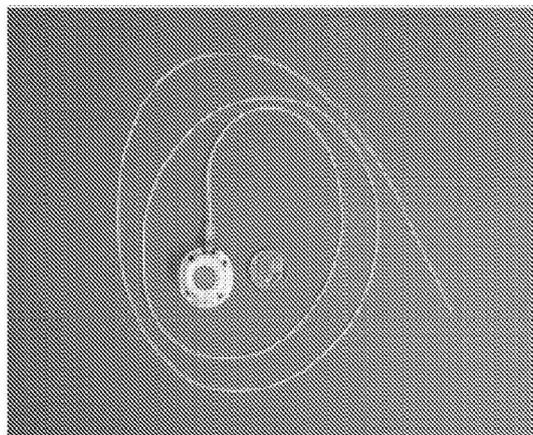


图 52

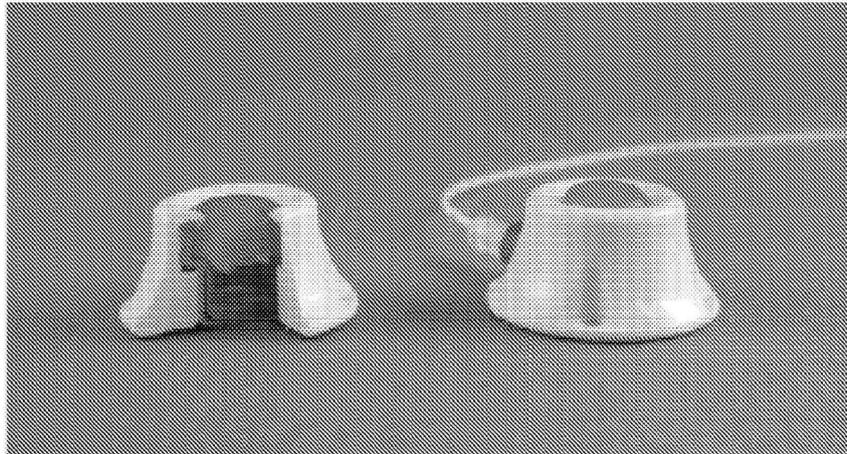


图 53

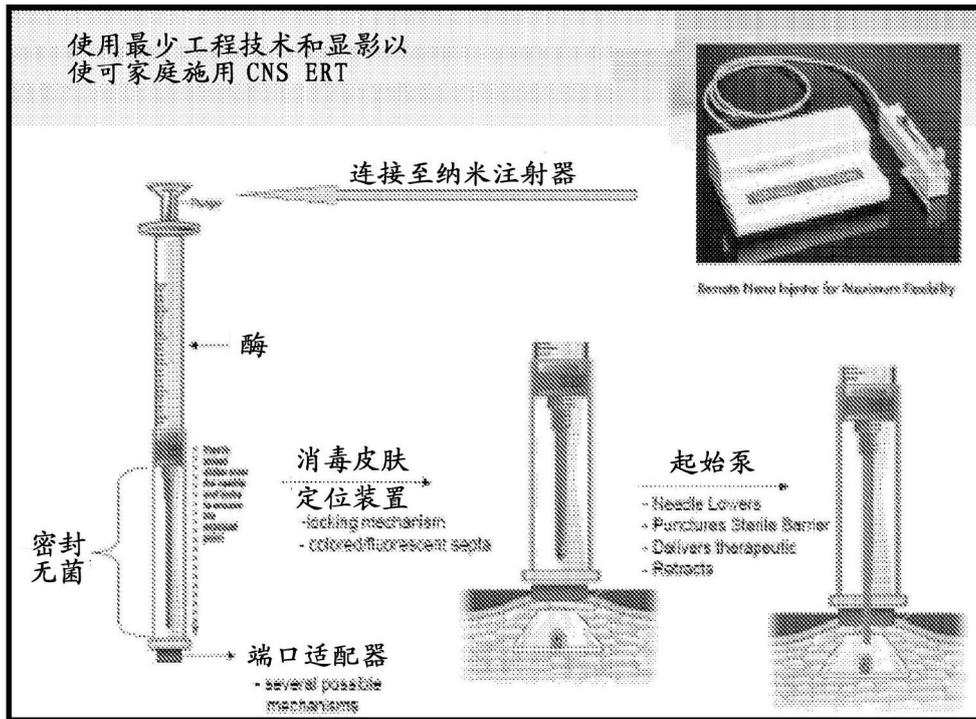


图 54

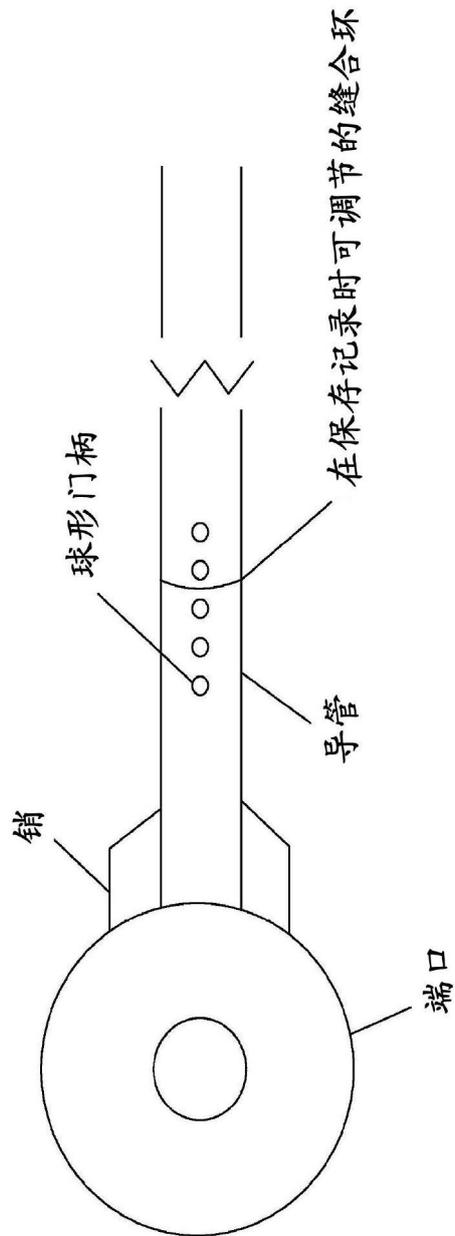


图 55

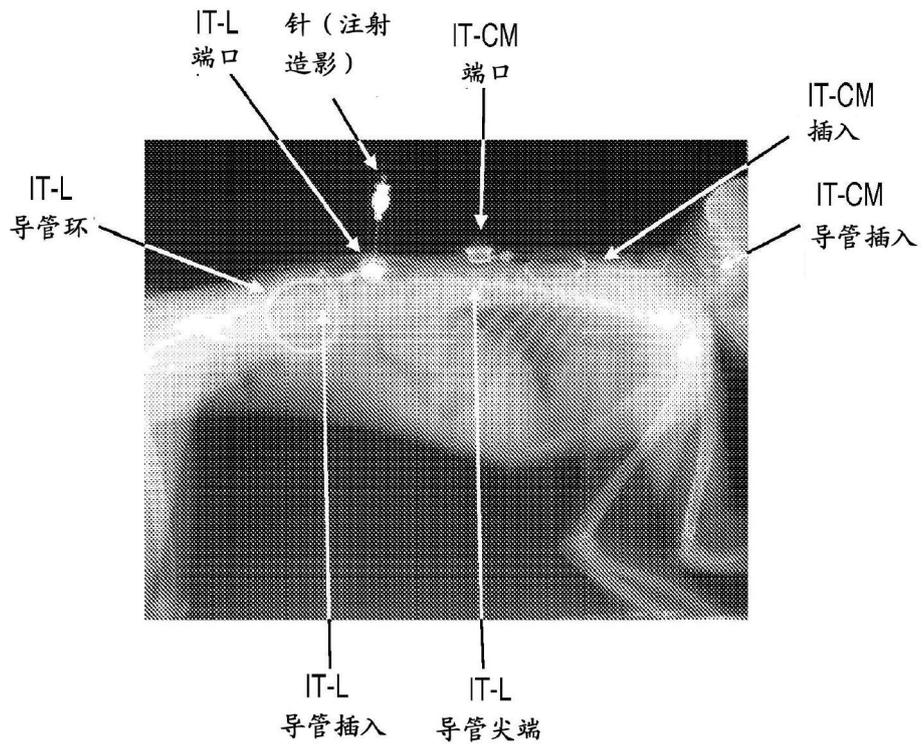


图 56A

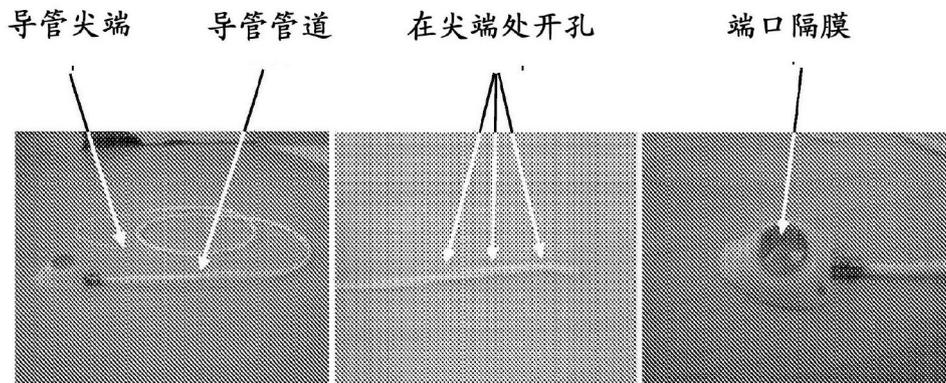


图 56B

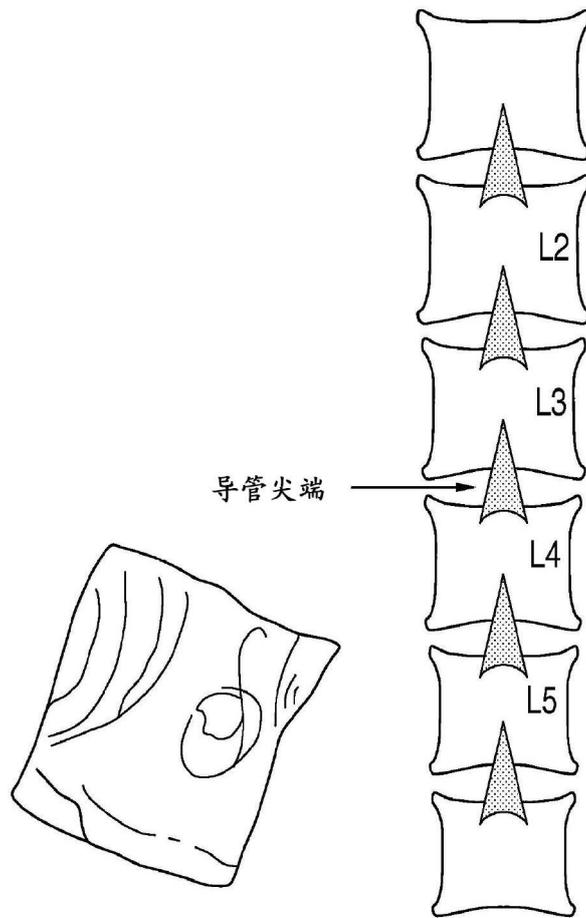


图 56C

Abstract

The present invention provides, among other things, compositions and methods for CNS delivery of lysosomal enzymes for effective treatment of lysosomal storage diseases. In some embodiments, the present invention includes a stable formulation for direct CNS intrathecal administration comprising an arylsulfatase A (ASA) protein, salt, and a polysorbate surfactant for the treatment of Metachromatic Leukodystrophy Disease.