

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043909**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.05

(51) Int. Cl. *A61K 38/46* (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201891842

(22) Дата подачи заявки
2017.02.17

(54) **СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ДОСТАВКИ АРИЛСУЛЬФАТАЗЫ А В ЦНС**

(31) **62/296,563; 62/453,864**

(32) **2016.02.17; 2017.02.02**

(33) **US**

(43) **2019.03.29**

(86) **PCT/US2017/018440**

(87) **WO 2017/143233 2017.08.24**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)**

(72) Изобретатель:
**Василевский Маргарет, Вятык Анна
(US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) DALI CHRISTINE ET AL.: "Intrathecal delivery of recombinant human arylsulfatase A in children with late-infantile metachromatic leukodystrophy", MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM, vol. 117, no. 2, 11 February 2015 (2015-02-11), XP029416367, ISSN: 1096-7192, DOI: 10.1016/J.YMGME.2015.12.231, abstract WO-A2-2011163650

(57) Предусмотрены способы лечения метахроматической лейкодистрофии, включающие введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества рекомбинантного фермента арилсульфатазы А.

B1

043909

043909

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на выдачу патента США № 62/296563, поданной 17 февраля 2016 г., и предварительной заявке на выдачу патента США № 62/453864, поданной 2 февраля 2017 г.; которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде и включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Файл под названием "SHR-1096_ST25.txt" был создан 13 февраля 2017 г. и имеет размер 8922 байта.

Предпосылки изобретения

Заместительная ферментная терапия (ERT) предусматривает системное введение природных или полученных рекомбинантным путем белков и/или ферментов субъекту. Одобренные средства терапии, как правило, вводятся субъектам внутривенно и в целом являются эффективными в лечении соматических симптомов первопричинного дефицита фермента. Вследствие ограниченного распределения внутривенно вводимого белка и/или фермента в клетках и тканях центральной нервной системы (ЦНС) лечение заболеваний, характеризующихся связанной с ЦНС этиологией, было особенно проблематичным, поскольку внутривенно вводимые белки и/или ферменты не проникают в достаточной концентрации через гематоэнцефалический барьер (BBB).

Гематоэнцефалический барьер (BBB) является структурной системой, состоящей из эндотелиальных клеток, функция которых заключается в защите центральной нервной системы (ЦНС) от вредных веществ в кровотоке, таких как бактерии, макромолекулы (например, белки) и другие гидрофильные молекулы, путем ограничения диффузии таких веществ через BBB и в находящуюся за ним спинномозговую жидкость (CSF) и ЦНС.

Существует несколько способов обхода BBB для усиления доставки терапевтического средства в головной мозг, в том числе прямая внутривенная инъекция, временная пермеабиллизация BBB и модификация активного вещества для изменения распределения в тканях. Прямая инъекция терапевтического средства в ткань головного мозга позволяет полностью обходить сосудистую сеть, но при ее применении возникают некоторые трудности главным образом из-за риска осложнений (инфекции, повреждения тканей, иммунологической реактивности), навлекаемого внутривенными инъекциями и недостаточной диффузией активного вещества из места введения. К настоящему времени прямое введение белков в вещество головного мозга не достигло значительного терапевтического эффекта ввиду наличия диффузионных барьеров и ограниченного объема терапевтического средства, который можно ввести. Конвективную диффузию изучали с помощью катетеров, размещенных в паренхиме головного мозга, с применением медленных длительных инфузий (Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 91, 2076-2080 (1994); Nguyen et al. J. Neurosurg. 98, 584-590 (2003)), но ни в одном из одобренных видов терапии в настоящее время не применяются этот подход в качестве длительной терапии. В дополнение, размещение интрацеребральных катетеров является весьма агрессивным и менее желательным в качестве клинической альтернативы.

Также предпринимались попытки проведения интратекальной (IT) инъекции или введения белков в спинномозговую жидкость (CSF), но пока что они не достигли терапевтического успеха. Основной проблемой в этом виде лечения является склонность активного вещества к очень плотному связыванию с эпидимальной выстилкой желудочка, что препятствовало последующей диффузии. В настоящее время не существует одобренных продуктов для лечения генетических заболеваний головного мозга путем прямого введения в CSF.

В действительности многие полагали, что барьер для диффузии на поверхности головного мозга, а также отсутствие эффективных и удобных способов доставки являются слишком большой преградой для достижения надлежащего терапевтического эффекта в головном мозге при каком-либо заболевании.

Многие лизосомные нарушения накопления поражают нервную систему, и поэтому обнаруживаются особые проблемы при лечении этих заболеваний с помощью традиционных видов терапии. В нейронах и мозговых оболочках пораженных индивидуумов зачастую наблюдается значительное накопление гликозаминогликанов (GAG), что приводит к появлению различных форм симптомов со стороны ЦНС. К настоящему времени никакие из симптомов со стороны ЦНС, обусловленных лизосомными нарушениями, не были успешно вылечены какими-либо доступными способами.

Таким образом, остается значительная потребность в эффективной доставке терапевтических средств в головной мозг. Более конкретно, существует значительная необходимость в более эффективной доставке активных веществ в центральную нервную систему для лечения лизосомных нарушений накопления.

Краткое описание изобретения

В изобретении предусмотрены, помимо прочего, композиции и способы для лечения синдрома метакроматической лейкодистрофии (MLD) путем интратекальной доставки арилсульфатазы А.

В определенных вариантах осуществления предусмотрены способы лечения синдрома метакроматической лейкодистрофии (MLD), включающие этап интратекального введения субъекту, нуждающемуся в лечении, рекомбинантного фермента арилсульфатазы А (ASA) в терапевтически эффективной дозе и

с некоторым интервалом между введениями в течение периода лечения, достаточного для улучшения, стабилизации или снижения темпов ухудшения одной или более двигательных функций по сравнению с исходным уровнем.

В некоторых вариантах осуществления введение рекомбинантного фермента ASA дополнительно приводит к улучшению, стабилизации или снижению темпов ухудшения одной или более когнитивных, адаптивных и/или исполнительных функций.

В некоторых вариантах осуществления одна или более двигательных функций включают в себя функцию крупной моторики. В некоторых вариантах осуществления функцию крупной моторики оценивают с помощью теста оценки функционирования крупной моторики (GMFM), такого как, например, GMFM-88. В некоторых вариантах осуществления исходный балл GMFM-88 субъекта превышает 40%. В некоторых вариантах осуществления исходный балл GMFM-88 пациента составляет меньше 40%. В некоторых вариантах осуществления введение рекомбинантного фермента ASA приводит к уменьшению балла GMFM-88 меньше чем на 10, 20, 30, 40 или 50%. В некоторых вариантах осуществления введение рекомбинантного фермента ASA приводит к значительной стабилизации балла GMFM-88. В некоторых вариантах осуществления введение рекомбинантного фермента ASA приводит к улучшению балла GMFM-88.

В определенных вариантах осуществления предусмотрены способы лечения синдрома метахроматической лейкоциклофилии (MLD), включающие этап интратекального введения субъекту, нуждающемуся в лечении, рекомбинантного фермента арилсульфатазы А (ASA) в терапевтически эффективной дозе и с некоторым интервалом между введениями в течение периода лечения, достаточного для уменьшения уровней биомаркера, накапливающегося при MLD в физиологической жидкости, выбранной из группы, состоящей из спинномозговой жидкости, мочи, крови и сыворотки крови, по сравнению с исходным уровнем биомаркера. В некоторых вариантах осуществления биомаркер выбран из группы, состоящей из сульфатида, лизосульфатида и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой сульфатид. В некоторых вариантах осуществления физиологическая жидкость представляет собой спинномозговую жидкость.

В некоторых вариантах осуществления исходный уровень сульфатидов в спинномозговой жидкости превышает приблизительно 0,1 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления исходный уровень сульфатидов в спинномозговой жидкости превышает приблизительно 0,2 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления исходный уровень сульфатидов в спинномозговой жидкости превышает приблизительно 0,3 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления введение рекомбинантного фермента ASA приводит к снижению уровней сульфатидов в спинномозговой жидкости больше чем на приблизительно 0,1 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления введение рекомбинантного фермента ASA приводит к снижению уровней сульфатидов в спинномозговой жидкости больше чем на приблизительно 0,2 мкг/мл.

В определенных вариантах осуществления предусмотрены способы лечения синдрома метахроматической лейкоциклофилии (MLD), включающие этап интратекального введения субъекту, нуждающемуся в лечении, рекомбинантного фермента арилсульфатазы А (ASA) в терапевтически эффективной дозе и с некоторым интервалом между введениями в течение периода лечения, достаточного для увеличения уровней биомаркера, сниженных при MLD, в ткани головного мозга по сравнению с исходным уровнем биомаркера.

В некоторых вариантах осуществления ткань головного мозга представляет собой глубокое белое вещество головного мозга. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой метаболит, такой как, например, N-ацетиласпартат. В некоторых вариантах осуществления уровни N-ацетиласпартата оценивают с помощью спектроскопии протонного магнитного резонанса.

В определенных вариантах осуществления предусмотрены способы лечения синдрома метахроматической лейкоциклофилии (MLD), включающие этап интратекального введения субъекту, нуждающемуся в лечении, рекомбинантного фермента арилсульфатазы А в терапевтически эффективной дозе и с некоторым интервалом между введениями в течение периода лечения, достаточного для стабилизации или снижения степени вовлечения в повреждение головного мозга по сравнению с исходным уровнем.

В некоторых вариантах осуществления вовлечение в повреждение головного мозга оценивают по баллу тяжести MLD, определяемому с помощью MRI (магнитно-резонансной томографии). В некоторых вариантах осуществления введение рекомбинантного фермента ASA приводит к снижению балла тяжести MLD, определяемого с помощью MRI, у субъекта по сравнению с исходным уровнем. В некоторых вариантах осуществления введение рекомбинантного фермента ASA приводит к стабилизации балла тяжести MLD, определяемого с помощью MRI, у субъекта по сравнению с исходным уровнем.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет или превышает 10 мг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет или превышает 30 мг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет или превышает 100 мг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет меньше 200 мг.

В некоторых вариантах осуществления интервал между введениями составляет одну неделю. В не-

которых вариантах осуществления интервал между введениями составляет две недели. В некоторых вариантах осуществления интервал между введениями составляет один месяц.

В некоторых вариантах осуществления субъектом является млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек.

В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет шестнадцать лет или меньше. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет двенадцать лет или меньше. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет девять лет или меньше. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет шесть лет или меньше. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет четыре года или меньше. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет три года или меньше. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет два года или меньше. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет 18 месяцев или меньше. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет 12 месяцев или меньше.

В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет 6 месяцев или меньше.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта проявляется по меньшей мере один симптом метахроматической лейкодиетрофии. В некоторых вариантах осуществления у субъекта не проявляются какие-либо симптомы метахроматической лейкодиетрофии. В некоторых вариантах осуществления у субъекта диагностирована метахроматическая лейкодиетрофия. В некоторых вариантах осуществления у субъекта идентифицировано наличие риска развития метахроматической лейкодиетрофии.

В некоторых вариантах осуществления арилсульфатазу А вводят в позвоночный канал. В некоторых вариантах осуществления арилсульфатазу А вводят в поясничную область. В некоторых вариантах осуществления арилсульфатазу А вводят путем люмбальной пункции.

В некоторых вариантах осуществления интратекальное введение осуществляют посредством периодического или постоянного доступа к имплантированному устройству для интратекальной доставки лекарственных средств (IDDD).

В некоторых вариантах осуществления период лечения составляет по меньшей мере 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления период лечения составляет по меньшей мере 9 месяцев. В некоторых вариантах осуществления период лечения составляет по меньшей мере 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления период лечения составляет по меньшей мере 24 месяца. В некоторых вариантах осуществления период лечения составляет по меньшей мере 26 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта не наблюдаются серьезные нежелательные эффекты, ассоциированные с введением рекомбинантной арилсульфатазы А.

В определенных вариантах осуществления предусмотрены рекомбинантные ферменты арилсульфатазы А (ASA) для применения в способе, включающем этап интратекального введения субъекту, имеющему риск развития метахроматической лейкодиетрофии или страдающему от нее, рекомбинантного фермента арилсульфатазы А в терапевтически эффективной дозе и с некоторым интервалом между введениями в течение периода лечения, достаточного для улучшения, стабилизации или снижения темпов ухудшения одной или более двигательных функций по сравнению с исходным уровнем.

В определенных вариантах осуществления предусмотрены рекомбинантные ферменты арилсульфатазы А (ASA) для применения в способе, включающем этап интратекального введения субъекту, имеющему риск развития метахроматической лейкодиетрофии или страдающему от нее, рекомбинантного фермента арилсульфатазы А в терапевтически эффективной дозе и с некоторым интервалом между введениями в течение периода лечения, достаточного для уменьшения уровней сульфатидов в спинномозговой жидкости (CSF) по сравнению с исходным уровнем.

В определенных вариантах осуществления предусмотрены рекомбинантные ферменты арилсульфатазы А (ASA) для применения в способе, включающем этап интратекального введения субъекту, имеющему риск развития метахроматической лейкодиетрофии или страдающему от нее, рекомбинантного фермента арилсульфатазы А в терапевтически эффективной дозе и с некоторым интервалом между введениями в течение периода лечения, достаточного для стабилизации или снижения степени вовлечения в повреждение головного мозга по сравнению с исходным уровнем.

В определенных вариантах осуществления предусмотрены пути применения рекомбинантных ферментов арилсульфатаз А в производстве лекарственного препарата для лечения или предупреждения метахроматической лейкодиетрофии, где лечение включает этап интратекального введения субъекту, имеющему риск развития метахроматической лейкодиетрофии или страдающему от нее, рекомбинантного фермента арилсульфатазы А в терапевтически эффективной дозе и с некоторым интервалом между введениями в течение периода лечения, достаточного для улучшения, стабилизации или снижения темпов ухудшения одной или более двигательных функций по сравнению с исходным уровнем.

В определенных вариантах осуществления предусмотрены пути применения рекомбинантных ферментов арилсульфатаз А в производстве лекарственного препарата для лечения или предупреждения метахроматической лейкодиетрофии, где лечение включает этап интратекального введения субъекту, имеющему риск развития метахроматической лейкодиетрофии или страдающему от нее, рекомбинантного фермента арилсульфатазы А в терапевтически эффективной дозе и с некоторым интервалом между вве-

днями в течение периода лечения, достаточного для уменьшения уровней сульфатидов в спинномозговой жидкости (CSF) по сравнению с исходным уровнем.

В определенных вариантах осуществления предусмотрены пути применения рекомбинантных ферментов арилсульфатазы А в производстве лекарственного препарата для лечения или предупреждения метахроматической лейкодистрофии, где лечение включает этап интратекального введения субъекту, имеющему риск развития метахроматической лейкодистрофии или страдающему от нее, рекомбинантного фермента арилсульфатазы А в терапевтически эффективной дозе и с некоторым интервалом между введениями в течение периода лечения, достаточного для стабилизации или снижения степени вовлечения в повреждение головного мозга по сравнению с исходным уровнем.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные ферменты ASA содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную на аминокислотном уровне SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные ферменты ASA содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную на аминокислотном уровне SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные ферменты ASA содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную на аминокислотном уровне SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные ферменты ASA содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную на аминокислотном уровне SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные ферменты ASA содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные ферменты ASA содержат аминокислотную последовательность, содержащую не более четырех несовпадений с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные ферменты ASA содержат аминокислотную последовательность, содержащую не более трех несовпадений с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные ферменты ASA содержат аминокислотную последовательность, содержащую не более двух несовпадений с SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные ферменты ASA содержат аминокислотную последовательность, содержащую не более одного несовпадения с SEQ ID NO: 1.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 проиллюстрирован план нерандомизированного открытого 40-недельного клинического исследования фазы 1/2 с повышением дозы для интратекально доставляемой рекомбинантной арилсульфатазы А человека у детей с метахроматической лейкодистрофией (MLD). IDDD: устройство для интратекальной доставки лекарственных средств; rhASA: рекомбинантная арилсульфатаза А человека.

На фиг. 2 показано изменение суммарного балла теста оценки функционирования крупной моторики-88 (GMFM-88) (от исходного уровня) в виде процентного значения в каждой из трех групп лечения (10, 30 и 100 мг rhASA) на 40 неделе клинического исследования фазы 1/2, описанного в примере 1. Показанные данные представляют собой средние значения, полученные способом наименьших квадратов; планки погрешностей представляют стандартную ошибку. Исходные данные представлены как среднее значение \pm среднеквадратическое отклонение. Сравнения между группами анализировали с помощью ковариационного анализа (ANCOVA) с изменениями балла GMFM-88 от исходного уровня в качестве зависимой переменной и дозовой группой и исходным значением в качестве ковариата.

На фиг. 3 показан эффект лечения (измеренный по изменению суммарного балла GMFM-88 от исходного уровня (%)) по сравнению с исходным суммарным баллом GMFM-88 (%) у пациентов в клиническом исследовании, описанном в примере 1. Кружки: 10 мг rhASA; квадраты: 30 мг rhASA; ромбы: 100 мг rhASA.

На фиг. 4 показано изменение суммарного балла GMFM-88 (%) во всех группах лечения в клиническом исследовании, описанном в примере 1, при этом значения для тех пациентов, которые имеют исходные суммарные баллы GMFM-88, превышающие 40%, представлены отдельными столбцами. Столбцами сплошного черного цвета показаны данные для всех пациентов, а столбцами сплошного белого цвета показаны данные только для пациентов с исходными суммарными баллами GMFM-88, превышающими 40%. Данные на фигурах представлены в виде средних значений, при этом планки погрешностей указывают на значения среднеквадратического отклонения. Исходные данные представлены как среднее значение \pm среднеквадратическое отклонение.

На фиг. 5 показано изменение балла тяжести метахроматической лейкодистрофии, определяемого с помощью магнитно-резонансной томографии (MRI), на 40 неделе у пациентов, включенных в клиническое исследование, описанное в примере 1. Показанные данные представляют собой средние значения, полученные способом наименьших квадратов; планки погрешностей представляют стандартную ошибку. Исходные данные представлены как среднее значение \pm среднеквадратическое отклонение. Поправку на несбалансированные исходные значения вводили путем использования среднего значения, полученного способом наименьших квадратов.

На фиг. 6 показаны уровни сульфатидов в спинномозговой жидкости на 40 неделе у пациентов, включенных в клиническое исследование, описанное в примере 1. Показанные данные представлены в

виде средних значений; планки погрешностей представляют среднееквадратическое отклонение. Исходные данные представлены как среднее значение \pm среднееквадратическое отклонение.

На фиг. 7 показаны уровни сульфатидов (в мкг/мл) в спинномозговой жидкости в динамике по времени по когортам у пациентов, включенных в клиническое исследование. Данные включают в себя данные по меньшей мере от двух пар сиблингов. Данные показаны для пациентов, которым вводили 10 мг, 30 мг и 100 мг рекомбинантной арилсульфатазы А человека.

На фиг. 8 проиллюстрирован план открытого неконтролируемого долгосрочного дополнительного клинического исследования фазы 1/2 для интратекально доставляемой рекомбинантной арилсульфатазы А человека у детей с метахроматической лейкодистрофией (MLD).

На фиг. 9А и 9В продемонстрирован эффект интратекально доставляемой rhASA в отношении двигательной функции в течение 104 недель лечения. На фиг. 9А показаны средние суммарные баллы GMFM-88 для каждой когорты по визитам в течение исследования. На фиг. 9В показаны отдельные суммарные баллы GMFM-88 по возрасту пациентов в течение 104 недель лечения.

На фиг. 10 показан эффект интратекально доставляемой rhASA в отношении балла тяжести MLD, определяемого с помощью MRI, спустя 104 недели лечения. Исходный балл показан как среднее значение \pm среднееквадратическое отклонение суммарного балла тяжести MLD, определяемого с помощью MRI, на исходном уровне (диапазоны баллов от 0 до 34, при этом более высокий балл указывает на большую степень тяжести заболевания).

На фиг. 11А и 11В показан эффект интратекально доставляемой rhASA в отношении среднего соотношения метаболитов NAA/креатин в белом веществе головного мозга в течение 104 недель лечения. На фиг. 11А показано белое вещество правой лобной доли, а на фиг. 11В показано белое вещество правых лобной и теменной долей. Данные показаны как среднее значение \pm стандартная ошибка.

На фиг. 12 показан эффект интратекально доставляемой rhASA в отношении концентрации сульфатидов в CSF в течение 104 недель лечения. Данные показаны как среднее значение \pm среднееквадратическое отклонение.

Определения

В целях облегчения понимания настоящего изобретения ниже сперва определены некоторые термины. Дополнительные определения следующих терминов и других терминов изложены во всем настоящем описании.

Примерно или приблизительно. Используемый в данном документе термин "примерно" или "приблизительно", применяемый в отношении одного или более значений, представляющих интерес, относится к значению, сходному с указанным эталонным значением. В определенных вариантах осуществления термин "примерно" или "приблизительно" относится к диапазону значений, находящихся в пределах 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% или меньше в любую сторону (большую или меньшую) от указанного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число будет превышать 100% от возможного значения).

Уменьшение интенсивности. Под используемым в данном документе термином "уменьшение интенсивности" подразумевается предупреждение, снижение интенсивности проявлений или ослабление состояния или улучшение состояния субъекта. Уменьшение интенсивности включает в себя полное выздоровление от болезненного состояния или полное его предотвращение, но не требует этого. В некоторых вариантах осуществления уменьшение интенсивности включает в себя увеличение уровней соответствующего белка или его активности, дефицит которых наблюдается в соответствующих пораженных тканях.

Исходный уровень. Используемый в данном документе термин "исходный уровень" относится к значению, уровню, статусу, состоянию и т. д. до начала периода лечения, как правило, в начале лечения.

Биологически активный. Используемая в данном документе фраза "биологически активный" относится к характеристике какого-либо средства, обладающего активностью в биологической системе, и в частности в организме. Например, средство, которое при введении в организм оказывает биологический эффект на этот организм, считается биологически активным. В конкретных вариантах осуществления, в которых белок или полипептид является биологически активным, часть этого белка или полипептида, обладающая по меньшей мере одним видом биологической активности белка или полипептида, как правило, называется "биологически активной" частью.

Объемобразующее средство. Используемый в данном документе термин "объемобразующее средство" относится к соединению, которое добавляет массу лиофилизированной смеси и вносит вклад в физическую структуру лиофилизированной лепешки (например, облегчает получение по сути однородной лиофилизированной лепешки, сохраняющей открытопористую структуру). Приводимые в качестве примера объемобразующие средства включают в себя маннит, глицин, хлорид натрия, гидроксипропановый крахмал, лактозу, сахарозу, трегалозу, полиэтиленгликоль и декстран.

Катионнезависимый рецептор маннозо-6-фосфата (CI-MPR). Используемый в данном документе термин "катионнезависимый рецептор маннозо-6-фосфата (CI-MPR)" относится к клеточному рецептору, связывающему маннозо-6-фосфатные (М6Р) метки на предшественниках кислой гидролазы в аппарате

Гольджи, предназначенных для транспорта в лизосомы. В дополнение к маннозо-6-фосфатам, CI-MPR также связывает другие белки, в том числе IGF-II. CI-MPR также известен как "рецептор M6P/IGF-II", "рецептор CI-MPR/IGF-II", "рецептор IGF-II" или "рецептор IGF2". Эти термины и их сокращения используются в данном документе взаимозаменяемо.

Сопутствующая иммунодепрессивная терапия. Используемый в данном документе термин "сопутствующая иммунодепрессивная терапия" включает любую иммунодепрессивную терапию, применяемую в качестве предварительного лечения, прекондиционирования или параллельно способу лечения.

Разбавитель. Используемый в данном документе термин "разбавитель" относится к фармацевтически приемлемому (например, безопасному и нетоксичному при введении человеку) разбавляющему веществу, применимому для получения разведенного состава. Приводимые в качестве примера разбавители включают в себя стерильную воду, бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), pH-буферный раствор (например, физиологический раствор с фосфатным буфером), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

Лекарственная форма. Используемые в данном документе термины "лекарственная форма" и "единичная лекарственная форма" относятся к физически дискретной единице терапевтического белка для пациента, подлежащего лечению. Каждая единица содержит предварительно определенное количество активного материала, рассчитанное для получения необходимого терапевтического эффекта. Однако будет понятно, что решение об общей дозе композиции будет приниматься лечащим врачом по результатам тщательной медицинской оценки.

Заместительная ферментная терапия (ERT). Используемый в данном документе термин "заместительная ферментная терапия (ERT)" относится к любой терапевтической стратегии, с помощью которой корректируют дефицит фермента путем предоставления недостающего фермента. В некоторых вариантах осуществления недостающий фермент предоставляется путем интратекального введения. В некоторых вариантах осуществления недостающий фермент предоставляется путем инфузии в кровоток. После введения фермент поглощается клетками и транспортируется в лизосомы, где фермент действует таким образом, чтобы устранить материал, накопившийся в лизосомах вследствие дефицита фермента. Как правило, для того, чтобы заместительная терапия лизосомными ферментами была эффективной, терапевтический фермент доставляется в лизосомы в соответствующих клетках в целевых тканях, где проявляется дефект накопления.

Улучшать, увеличивать или снижать. Используемые в данном документе термины "улучшать", "увеличивать" или "снижать" или их грамматические эквиваленты указывают на значения по сравнению с измерением исходного уровня, таким как измерение у того же самого индивидуума до начала лечения, описанного в данном документе, или измерение у контрольного индивидуума (или нескольких контрольных индивидуумов) при отсутствии лечения, описанного в данном документе. "Контрольным индивидуумом" является индивидуум, пораженный той же формой лизосомной болезни накопления, что и индивидуум, подвергаемый лечению, который имеет приблизительно такой же возраст, как и индивидуум, подвергаемый лечению (для гарантирования того, что стадии заболевания у индивидуума, подвергаемого лечению, и контрольного(ых) индивидуума(ов) являются сопоставимыми).

Индивидуум, субъект, пациент. Используемые в данном документе термины "субъект", "индивидуум" или "пациент" относятся к субъекту-человеку или отличному от человека субъекту-млекопитающему. Индивидуум (также называемый "пациентом" или "субъектом"), подвергаемый лечению, является индивидуумом (плодом, младенцем, ребенком, подростком или взрослым человеком), страдающим от заболевания.

Интратекальное введение. Используемый в данном документе термин "интратекальное введение" или "интратекальная инъекция" относится к инъекции в позвоночный канал (интратекальное пространство, окружающее спинной мозг). Можно применять различные методики, в том числе люмбальную пункцию. В некоторых вариантах осуществления "интратекальное введение" или "интратекальная доставка" в соответствии с настоящим изобретением относится к IT введению или доставке в поясничную зону или область, т.е. к люмбальным IT введению или доставке. Используемый в данном документе термин "поясничная область" или "поясничная зона" относится к зоне между третьим и четвертым поясничными позвонками (в нижнем отделе спины) и, более содержательно, к области L2-S1 позвоночника.

Линкер. Используемый в данном документе термин "линкер" относится к аминокислотной последовательности в слитом белке, отличной от присутствующей в конкретном положении в природном белке и обычно предназначенной для того, чтобы быть гибкой, или для внедрения в структуру, такую как а-спираль, между двумя белковыми компонентами. Линкер также называют спейсером.

Лиопротектор. Используемый в данном документе термин "лиопротектор" относится к молекуле, предотвращающей или снижающей химическую и/или физическую нестабильность белка или другого вещества при лиофилизации и последующем хранении. Приводимые в качестве примера лиопротекторы включают в себя сахара, такие как сахароза или трегалоза; аминокислоту, такую как глутамат мононатрия или гистидин; метиламин, такой как бетаин; лиотропную соль, такую как сульфат магния; полиол, такой как трехагломные или высшие сахарные спирты, например глицерин, эритрит, глицерол, арабит, ксилит, сорбит и маннит; пропиленгликоль; полиэтиленгликоль; плюроники и их комбинации. В некото-

рых вариантах осуществления лиопротектор представляет собой невосстанавливающий сахар, такой как трегалоза или сахароза.

Лизосомный фермент. Используемый в данном документе термин "лизосомный фермент" относится к любому ферменту, который способен снижать количество накапливающихся материалов в лизосомах млекопитающих или может обеспечивать избавление от одного или более симптомов лизосомной болезни накопления или уменьшение их интенсивности. Лизосомные ферменты, подходящие для настоящего изобретения, включают в себя как принадлежащие к дикому типу, так и модифицированные лизосомные ферменты и могут быть получены с помощью рекомбинантных и синтетических способов или очищены из природных источников. Приводимые в качестве примера лизосомные ферменты перечислены в табл. 1.

Дефицит лизосомных ферментов. Используемый в данном документе "дефицит лизосомных ферментов" относится к группе генетических нарушений, обусловленных дефицитом по меньшей мере одного из ферментов, требующихся для разрушения макромолекул (например, субстратов ферментов) до пептидов, аминокислот, моносахаридов, нуклеиновых кислот и жирных кислот в лизосомах. В результате этого у индивидуумов, страдающих от различных форм дефицита лизосомных ферментов, накапливаются материалы в различных тканях (например, в ЦНС, печени, селезенке, кишечнике, стенках кровеносных сосудов и других органах).

Лизосомная болезнь накопления. Используемый в данном документе термин "лизосомная болезнь накопления" относится к любому заболеванию, обусловленному дефицитом одного или более лизосомных ферментов, необходимых для превращения природных макромолекул в процессе метаболизма. Эти заболевания, как правило, приводят к накоплению неразложившихся молекул в лизосомах, в результате чего увеличивается количество накопительных гранул (также называемых накопительными везикулами). Эти заболевания и различные примеры более подробно описаны ниже.

Полипептид. Используемый в данном документе "полипептид", говоря в целом, представляет собой нить по меньшей мере из двух аминокислот, соединенных друг с другом пептидной связью. В некоторых вариантах осуществления полипептид может содержать по меньшей мере 3-5 аминокислот, каждая из которых соединена с другими с помощью по меньшей мере одной пептидной связи. Средним специалистам в данной области будет понятно, что полипептиды необязательно иногда содержат "неприродные" аминокислоты или другие объекты, которые, тем не менее, способны встраиваться в полипептидную цепь.

Заместительный фермент. Используемый в данном документе термин "заместительный фермент" относится к любому ферменту, который может действовать таким образом, чтобы, по меньшей мере, частично замещать дефицитный или недостающий фермент при заболевании, подлежащем лечению. В некоторых вариантах осуществления термин "заместительный фермент" относится к любому ферменту, который может действовать таким образом, чтобы, по меньшей мере, частично замещать дефицитный или недостающий лизосомный фермент при лизосомной болезни накопления, подлежащей лечению. В некоторых вариантах осуществления заместительный фермент способен снижать количество накапливающихся материалов в лизосомах млекопитающих или может обеспечивать избавление от одного или более симптомов лизосомной болезни накопления или уменьшение их интенсивности. Заместительные ферменты, подходящие для настоящего изобретения, включают в себя как принадлежащие к дикому типу, так и модифицированные лизосомные ферменты и могут быть получены с помощью рекомбинантных и синтетических способов или очищены из природных источников. Заместительный фермент может представлять собой рекомбинантный, синтетический, ген-активированный или природный фермент.

Растворимый. Используемый в данном документе термин "растворимый" относится к способности терапевтического средства образовывать гомогенный раствор. В некоторых вариантах осуществления растворимость терапевтического средства в растворе, в который его вводят и с помощью которого его переносят в целевое место действия (например, в клетки и ткани головного мозга), является достаточной для обеспечения доставки терапевтически эффективного количества терапевтического средства в целевое место действия. На растворимость терапевтических средств может влиять несколько факторов. Например, существенные факторы, которые могут влиять на растворимость белка, включают в себя ионную силу, аминокислотную последовательность и наличие других совместных солибилизирующих средств или солей (например, солей кальция). В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции составлены таким образом, что соли кальция не включены в такие композиции. В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства в соответствии с настоящим изобретением являются растворимыми в их соответствующей фармацевтической композиции. Будет понятно, что, хотя для парентерального введения лекарственных средств обычно предпочтительными являются изотонические растворы, применение изотонических растворов может ограничивать надлежащую растворимость для некоторых терапевтических средств, и в частности для некоторых белков и/или ферментов. Было продемонстрировано, что слабо гипертонические растворы (например, до 175 мМ хлорида натрия в 5 мМ фосфата натрия при pH 7,0) и сахаросодержащие растворы (например, до 2% сахарозы в 5 мМ фосфата натрия при pH 7,0) хорошо переносятся обезьянами. Например, наиболее распространенной одобренной композицией состава для болюсного введения в ЦНС является физиологический раствор (150 мМ NaCl в воде).

Стабильность. Используемый в данном документе термин "стабильный" относится к способности терапевтического средства (например, рекомбинантного фермента) сохранять свою терапевтическую эффективность (например, свою предполагаемую биологическую активность и/или физико-химическую целостность полностью или по большей части) в течение продолжительных периодов времени. Стабильность терапевтического средства и способность фармацевтической композиции поддерживать стабильность такого терапевтического средства можно оценивать в течение продолжительных периодов времени (например, в течение по меньшей мере 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36 месяцев или дольше). Как правило, фармацевтические композиции, описанные в данном документе, были составлены таким образом, чтобы они были способны стабилизировать одно или более терапевтических средств, с которыми они составлены (например, рекомбинантных белков), или, в качестве альтернативы, замедлять или предотвращать их разложение. Что касается состава, стабильным составом является состав, в котором терапевтическое средство, содержащееся в нем, фактически сохраняет свою физическую и/или химическую целостность и биологическую активность при хранении и в ходе процессов (таких как замораживание/размораживание, механическое перемешивание и лиофилизация). Показателем стабильности белка может быть образование высокомолекулярных (HMW) агрегатов, потеря ферментативной активности, образование пептидных фрагментов и сдвиг профилей распределения зарядов.

Субъект. Используемый в данном документе термин "субъект" означает любое млекопитающее, в том числе людей. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения субъект является взрослым, подростком, ребенком или младенцем. Настоящее изобретение также охватывает введение фармацевтических композиций и/или осуществление способов лечения *in utero*.

В значительной степени гомологичный. Фраза "в значительной степени гомологичный" используется в данном документе в отношении сравнения между аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновых кислот. Как будет понятно средним специалистам в данной области, две последовательности обычно считаются "в значительной степени гомологичными", если они содержат гомологичные остатки в соответствующих положениях. Гомологичные остатки могут являться идентичными остатками. В качестве альтернативы, гомологичные остатки могут быть неидентичными остатками, обладающими соответствующими сходными структурными и/или функциональными характеристиками. Например, как хорошо известно средним специалистам в данной области, определенные аминокислоты обычно классифицируют как "гидрофобные" или "гидрофильные" аминокислоты и/или как имеющие "полярные" или "неполярные" боковые цепи. Замена одной аминокислоты на другую того же типа часто может считаться "гомологичной" заменой.

Как хорошо известно из уровня техники, аминокислотные последовательности или последовательности нуклеиновых кислот можно сравнивать с помощью любого из ряда алгоритмов, в том числе доступных в коммерческих компьютерных программах, таких как BLASTN для нуклеотидных последовательностей и BLASTP, BLAST с гэпами и PSI-BLAST для аминокислотных последовательностей. Такие приводимые в качестве примера программы описаны в Altschul et al., Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410, 1990; Altschul et al., *Methods in Enzymology*; Altschul et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997; Baxevanis et al., *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998; и Misener et al., (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132)*, Humana Press, 1999. В дополнение к идентификации гомологичных последовательностей, программы, упомянутые выше, как правило, предоставляют указание на степень гомологии. В некоторых вариантах осуществления две последовательности считаются в значительной степени гомологичными, если по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше их соответствующих остатков являются гомологичными на протяжении существенного фрагмента из остатков. В некоторых вариантах осуществления существенным фрагментом является полная последовательность. В некоторых вариантах осуществления существенный фрагмент имеет по меньшей мере 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 или больше остатков.

В значительной степени идентичный. Фраза "в значительной степени идентичный" используется в данном документе в отношении сравнения между аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновых кислот. Как будет понятно средним специалистам в данной области, две последовательности обычно считаются "в значительной степени идентичными", если они содержат идентичные остатки в соответствующих положениях. Как хорошо известно из уровня техники, аминокислотные последовательности или последовательности нуклеиновых кислот можно сравнивать с помощью любого из ряда алгоритмов, в том числе доступных в коммерческих компьютерных программах, таких как BLASTN для нуклеотидных последовательностей и BLASTP, BLAST с гэпами и PSI-BLAST для аминокислотных последовательностей. Такие приводимые в качестве примера программы описаны в Altschul et al., Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410, 1990; Altschul et al., *Methods in Enzymology*; Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997; Baxevanis et al., *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998; и Misener et al., (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132)*, Humana Press, 1999. В дополнение к идентифика-

ции идентичных последовательностей, программы, упомянутые выше, как правило, предоставляют указание на степень идентичности. В некоторых вариантах осуществления две последовательности считаются в значительной степени идентичными, если по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше их соответствующих остатков являются идентичными на протяжении существенного фрагмента из остатков. В некоторых вариантах осуществления существенным фрагментом является полная последовательность. В некоторых вариантах осуществления существенный фрагмент имеет по меньшей мере 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 или больше остатков.

Синтетическая CSF. Используемый в данном документе термин "синтетическая CSF" относится к раствору, имеющему pH, электролитный состав, содержание глюкозы и осмолярность, соответствующие спинномозговой жидкости. Синтетическая CSF также называется искусственной CSF. В некоторых вариантах осуществления синтетическая CSF представляет собой раствор Эллиотта В.

Подходящий для доставки в ЦНС. Используемая в данном документе фраза "подходящий для доставки в ЦНС" или "подходящий для интратекальной доставки", связанная с фармацевтическими композициями по настоящему изобретению, обычно относится к свойствам стабильности, переносимости и растворимости таких композиций, а также к способности таких композиций доставлять эффективное количество терапевтического средства, содержащегося в них, в целевое место доставки (например, в CSF или головной мозг).

Целевые ткани. Используемый в данном документе термин "целевые ткани" относится к любой ткани, пораженной лизосомной болезнью накопления, подлежащей лечению, или любой ткани, в которой в обычных условиях экспрессируется дефицитный лизосомный фермент. В некоторых вариантах осуществления целевые ткани включают в себя те ткани, в которых имеется выявляемое или аномально высокое количество субстрата фермента, например хранящегося в клеточных лизосомах ткани, у пациентов, страдающих от лизосомной болезни накопления или подверженных ей. В некоторых вариантах осуществления целевые ткани включают в себя те ткани, которые демонстрируют патологический процесс, симптом или признак, ассоциированный с заболеванием. В некоторых вариантах осуществления целевые ткани включают в себя те ткани, в которых дефицитный лизосомный фермент в обычных условиях экспрессируется на повышенном уровне. Как используется в данном документе, целевая ткань может представлять собой целевую ткань головного мозга, целевую ткань спинного мозга и/или периферическую целевую ткань. Приводимые в качестве примера целевые ткани подробно описаны ниже.

Терапевтический компонент. Используемый в данном документе термин "терапевтический компонент" относится к части молекулы, придающей молекуле терапевтический эффект. В некоторых вариантах осуществления терапевтический компонент представляет собой полипептид, обладающий терапевтической активностью.

Терапевтически эффективное количество. Используемый в данном документе термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству терапевтического белка (например, заместительного фермента), обеспечивающему терапевтический эффект в отношении субъекта, подвергаемого лечению, при разумном соотношении польза/риск, применимом для любого вида медицинского лечения. Терапевтический эффект может быть объективным (т.е. измеряемым с помощью определенного теста или маркера) или субъективным (т.е. субъект дает указание на эффект или ощущает его). В частности, "терапевтически эффективное количество" относится к количеству терапевтического белка или композиции, эффективному для лечения, уменьшения интенсивности проявлений или предупреждения требуемого заболевания или состояния или для проявления выявляемого терапевтического или предупреждающего эффекта, как, например, путем уменьшения интенсивности симптомов, ассоциированных с заболеванием, предупреждения или задержки начала проявления заболевания и/или также уменьшения тяжести или частоты возникновения симптомов заболевания. Терапевтически эффективное количество обычно вводят согласно режиму дозирования, который может предусматривать несколько разовых доз. Для любого конкретного терапевтического белка терапевтически эффективное количество (и/или соответствующая разовая доза в рамках эффективного режима дозирования) может варьироваться, например, в зависимости от пути введения, от комбинации с другими фармацевтическими средствами. Кроме того, конкретное терапевтически эффективное количество (и/или разовая доза) для любого конкретного пациента может зависеть от ряда факторов, включающих нарушение, подвергаемое лечению, и тяжесть нарушения; активность конкретного используемого фармацевтического средства; конкретную используемую композицию; возраст, вес тела, общее состояние здоровья, пол и режим питания пациента; время введения, путь введения и/или скорость экскреции или метаболизма конкретного используемого слитого белка; продолжительность лечения и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

Переносимый. Используемые в данном документе термины "переносимый" и "переносимость" относятся к способности фармацевтических композиций по настоящему изобретению не вызывать нежелательную реакцию у субъекта, которому вводят такую композицию, или, в качестве альтернативы, не вызывать серьезную нежелательную реакцию у субъекта, которому вводят такую композицию. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению хорошо переносятся субъектом, которому вводят такие композиции.

Лечение. Используемый в данном документе термин "лечение" (также "лечить" или "проводить лечение") относится к любому введению терапевтического белка (например, лизосомного фермента), при котором наблюдаются частичные или полные облегчение, уменьшение интенсивности, ослабление, ингибирование, задержка начала проявления, снижение тяжести и/или снижение частоты возникновения одного или более симптомов или признаков конкретного заболевания, нарушения и/или состояния (например, метахроматической лейкоцистозии). Такое лечение может проводиться в отношении субъекта, у которого не проявляются признаки соответствующего заболевания, нарушения и/или состояния, и/или в отношении субъекта, у которого проявляются только ранние признаки заболевания, нарушения и/или состояния. В качестве альтернативы или дополнительно, такое лечение может проводиться в отношении субъекта, у которого проявляются один или более установленных признаков соответствующего заболевания, нарушения и/или состояния.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении предусмотрены, помимо прочего, улучшенные способы и композиции для эффективной прямой доставки терапевтического средства в центральную нервную систему (ЦНС). В основе настоящего изобретения лежит неожиданное обнаружение того, что заместительный фермент (например, белок ASA) при лизосомной болезни накопления (например, заболевании метахроматической лейкоцистозии) можно вводить напрямую в спинномозговую жидкость (CSF) субъекта, нуждающегося в лечении, в высокой концентрации, не индуцируя значительные нежелательные эффекты у субъекта. Что более удивительно, авторы настоящего изобретения обнаружили, что заместительный фермент можно доставлять в составе на основе простого физиологического раствора или буфера без применения синтетической CSF. Что еще более неожиданно, интратекальная доставка в соответствии с настоящим изобретением не приводит к значительным нежелательным эффектам, таким как сильный иммунный ответ, у субъекта. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления интратекальную доставку в соответствии с настоящим изобретением можно применять при отсутствии сопутствующей иммунодепрессивной терапии (например, без индукции иммунной толерантности путем предварительного лечения или преколонизации).

В некоторых вариантах осуществления интратекальная доставка в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает эффективную диффузию в различные тканях головного мозга, что в результате обеспечивает эффективную доставку заместительного фермента в различные целевые ткани головного мозга в поверхностных, неглубоких и/или глубоких областях головного мозга. В некоторых вариантах осуществления интратекальная доставка в соответствии с настоящим изобретением приводит к поступлению достаточного количества заместительных ферментов в периферическую часть системы кровообращения. В результате этого в некоторых случаях интратекальная доставка в соответствии с настоящим изобретением приводит к доставке заместительного фермента в периферические ткани, такие как печень, сердце, селезенка и почки. Это обнаружение является неожиданным и может быть особенно применимым для лечения лизосомных болезней накопления, имеющих как компонент ЦНС, так и периферический компонент, которые, как правило, будут требовать как регулярного интратекального введения, так и внутривенного введения. Считается, что интратекальная доставка в соответствии с настоящим изобретением может позволять снижать дозу и/или частоту iv инъекции без отрицательного влияния на терапевтические эффекты при лечении периферических симптомов.

В настоящем изобретении предусмотрены различные неожиданные и полезные признаки, позволяющие осуществлять эффективную и удобную доставку заместительных ферментов в различные целевые ткани головного мозга, что в результате обеспечивает эффективное лечение лизосомных болезней накопления, имеющих признаки со стороны ЦНС.

Различные аспекты настоящего изобретения подробно описаны в нижеследующих разделах. Использование разделов не подразумевает ограничение настоящего изобретения. Каждый раздел может применяться в отношении любого аспекта настоящего изобретения. В настоящей заявке использование "или" означает "и/или", если не указано иное.

Рекомбинантные ферменты арилсульфатазы А.

В некоторых вариантах осуществления являющиеся объектом настоящего изобретения способы и композиции, предусмотренные в настоящем изобретении, применяются для доставки рекомбинантного фермента арилсульфатазы А (ASA) в ЦНС для лечения заболевания метахроматической лейкоцистозии. Подходящий фермент ASA может представлять собой любую молекулу или часть молекулы, которая может заменять активность встречающегося в природе фермента арилсульфатазы А (ASA) или обеспечивать избавление от одного или более фенотипов или симптомов, ассоциированных с дефицитом ASA. В некоторых вариантах осуществления заместительный фермент, подходящий для настоящего изобретения, представляет собой полипептид, имеющий N-конец и C-конец и аминокислотную последовательность, в значительной степени сходные с таковыми или идентичные таковым у зрелого фермента ASA человека.

Как правило, ASA человека вырабатывается в виде молекулы-предшественника, которая процессируется до зрелой формы. Этот процесс обычно происходит посредством удаления 18-аминокислотного сигнального пептида. Как правило, форма-предшественник также называется полноразмерным предше-

стенником или полноразмерным ферментом ASA, который содержит 507 аминокислот. 18 N-концевых аминокислот отщепляются с получением в результате зрелой формы длиной 489 аминокислот. Таким образом, считается, что 18 N-концевых аминокислот обычно не требуются для активности фермента ASA. Аминокислотные последовательности зрелой формы (SEQ ID NO: 1) и полноразмерного предшественника (SEQ ID NO: 2) типичного принадлежащего к дикому типу или встречающегося в природе фермента ASA человека показаны в табл. 1.

Таблица 1

ASA человека	Последовательность
Зрелая форма	RPPNIVLIFADDLGYGDLGCGHPSSTTPNLDQLAAGGLRFTDFY VPVSLCTPSRAALLTGRLPVRMGYPGVLPVSSRGGLPLEEVTVA EVLAARGYLTMAGKWHLGVGPEGAFLPPHQGFHRFLGIPYSHDQ GPCQNLTCFPPATPCDGGCDQGLVPIPLLANLSVEAQPPWLPGLE ARYMAFAHDLMADAQRQDRPFFLYYASHHHTHYQFSGQSFAERSG RGPFGDSLMELEDAVGTLMATAIGDLGLEETLVI FTADNGPETMR MSRGGCSGLLRGCGKGTTYEGGVREPALAFWPGHIAPGVTHELASS LDLLPTLAALAGAPLPNVTLDGFDLSPLLLGTGKSPRQSLFFYPS YPDEVRGVFAVRTGKYKAHFFTQGSASDTTADPACHASSSLTAH EPPLLYDLSKDPGENYNLLGGVAGATPEVLQALKQLQLLKAQLDA AVTFGPSQVARGEDPALQICCHPGCTPRPACCHCPDPHA (SEQ ID NO: 1)
Полноразмерный предшественник	MGAPRSLLLALAAGLAVARPPNIVLIFADDLGYGDLGCGHPSST TPNLDQLAAGGLRFTDFYVPVSLCTPSRAALLTGRLPVRMGYPG VLVPSRGGGLPLEEVTVAEVLAARGYLTMAGKWHLGVGPEGAFL PPHQGFHRFLGIPYSHDQGPCQNLTCFPPATPCDGGCDQGLVPI LLANLSVEAQPPWLPGLEARYMAFAHDLMADAQRQDRPFFLYYAS HHTHYQFSGQSFAERSGRGPFGDSLMELEDAVGTLMATAIGDLG LEETLVI FTADNGPETMRMSRGGCSGLLRGCGKGTTYEGGVREPAL AFWPGHIAPGVTHELASSLDLLPTLAALAGAPLPNVTLDGFDLS LLLGTGKSPRQSLFFYPSYPDEVRGVFAVRTGKYKAHFFTQGSAS DTTADPACHASSSLTAHEPPLLYDLSKDPGENYNLLGGVAGATP EVLQALKQLQLLKAQLDAAVTFGPSQVARGEDPALQICCHPGCTP RPACCHCPDPHA (SEQ ID NO: 2)

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления рекомбинантная арилсульфатаза А в настоящем изобретении представляет собой зрелый белок ASA человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления подходящая рекомбинантная арилсульфатаза А может представлять собой гомолог или аналог зрелого белка ASA человека. Например, гомолог или аналог зрелого белка ASA человека может представлять собой модифицированный зрелый белок ASA человека, содержащий одну или более замен, делеций и/или вставок аминокислот по сравнению с принадлежащим к дикому типу или встречающимся в природе белком ASA (например, SEQ ID NO: 1) и сохраняющий при этом в значительной степени активность белка ASA. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления рекомбинантная арилсульфатаза А, подходящая для настоящего изобретения, является в значительной степени гомологичной зрелому белку ASA человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная арилсульфатаза А, подходящая для настоящего изобретения, имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше гомологичную SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная арилсульфатаза А, подходящая для настоящего изобретения, является в значительной степени идентичной зрелому белку ASA человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная арилсульфатаза А, подходящая для настоящего изобретения, имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше идентичную SEQ ID NO: 1. Например, в некоторых вариантах осуществления рекомбинантный фермент арилсульфатаза А содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную на аминокислотном уровне SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный фермент ASA содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную на аминокислотном уровне SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный фермент арилсульфатаза А содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную на аминокислотном уровне SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный фермент арилсульфатаза А содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную на аминокислотном уровне SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный фермент арилсульфатаза А содержит аминокислотную последовательность аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный фермент арилсульфатаза А содержит аминокислотную последовательность, имеющую небольшое количество несовпадений с SEQ ID NO: 1, например не более четырех, не более трех, не более двух или не более одного несовпадения с SEQ ID NO:

1.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная арилсульфатаза А, подходящая для настоящего изобретения, содержит фрагмент или часть зрелого белка ASA человека. В некоторых вариантах осуществления фрагмент или часть являются каталитически активными.

Дополнительно или в качестве альтернативы, заместительный фермент, подходящий для настоящего изобретения, представляет собой полноразмерный белок ASA. В некоторых вариантах осуществления подходящий заместительный фермент может представлять собой гомолог или аналог полноразмерного белка ASA человека. Например, гомолог или аналог полноразмерного белка ASA человека может представлять собой модифицированный полноразмерный белок ASA человека, содержащий одну или более замен, делеций и/или вставок аминокислот по сравнению с принадлежащим к дикому типу или встречающимся в природе полноразмерным белком ASA (например, SEQ ID NO: 2) и сохраняющий при этом в значительной степени активность белка ASA. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления заместительный фермент, подходящий для настоящего изобретения, является в значительной степени гомологичным полноразмерному белку ASA человека (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления заместительный фермент, подходящий для настоящего изобретения, имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше гомологичную SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления заместительный фермент, подходящий для настоящего изобретения, является в значительной степени идентичным SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления заместительный фермент, подходящий для настоящего изобретения, имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше идентичную SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления заместительный фермент, подходящий для настоящего изобретения, содержит фрагмент или часть полноразмерного белка ASA человека. Как используется в данном документе, полноразмерный белок ASA, как правило, содержит последовательность сигнального пептида.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный фермент арилсульфатаза А содержит нацеливающийся компонент (например, последовательность, нацеливающуюся на лизосомы) и/или мембранопроникающий пептид. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность и/или мембранопроникающий пептид являются неотъемлемой частью рекомбинантной арилсульфатазы А (например, посредством химической связи, посредством слитого белка). В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность содержит компонент маннозо-6-фосфат. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность содержит компонент IGF-I. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность содержит компонент IGF-II.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный фермент арилсульфатаза А, подходящий для настоящего изобретения, может иметь принадлежащую к дикому типу или встречающуюся в природе последовательность. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный фермент арилсульфатаза А, подходящий для настоящего изобретения, может иметь модифицированную последовательность, в значительной степени гомологичную или идентичную принадлежащей к дикому типу или встречающейся в природе последовательности (например, обладающую по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98% идентичностью последовательности с принадлежащей к дикому типу или встречающейся в природе последовательностью).

Заместительные ферменты (например, рекомбинантный фермент арилсульфатаза А), подходящие для настоящего изобретения, могут быть получены рекомбинантным путем, например, путем применения системы клеток-хозяев, сконструированной для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный фермент. В качестве альтернативы или дополнительно, заместительные ферменты можно частично или полностью получать с помощью химического синтеза.

В случаях, когда заместительный фермент получают рекомбинантным путем, можно применять любую систему экспрессии. В качестве лишь нескольких примеров можно привести известные системы экспрессии, которые включают в себя, например, яйцеклетки, клетки, инфицированные бакуловирусом, клетки насекомых, растений, дрожжей или млекопитающих.

В некоторых вариантах осуществления ферменты, подходящие для настоящего изобретения, вырабатываются в клетках млекопитающих. Неограничивающие примеры клеток млекопитающих, которые можно применять в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя линию клеток миеломы мышей BALB/c (NSO/1, № в ECACC 85110503); ретинобласты человека (PER.C6, CruCell, Лейден, Нидерланды); линию клеток почки обезьяны CV1, трансформированных SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линию клеток эмбриональной почки человека (клетки 293 или 293, пересейанные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59, 1977); линию клеток фибросаркомы человека (например, HT1080); клетки почки новорожденного хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка +/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216, 1980); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251, 1980); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой марышки (VERO-76, ATCC CRL-1 587); клетки карциномы шейки матки человека (HeLa, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени

человека (Herp G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68, 1982); клетки MRC 5; клетки FS4 и линию клеток гепатомы человека (Herp G2).

В некоторых вариантах осуществления являющиеся объектом настоящего изобретения способы в соответствии с настоящим изобретением применяются для доставки заместительных ферментов, вырабатываемых в человеческих клетках. В некоторых вариантах осуществления являющиеся объектом настоящего изобретения способы в соответствии с настоящим изобретением применяются для доставки заместительных ферментов, вырабатываемых в клетках СНО.

В некоторых вариантах осуществления заместительные ферменты, доставляемые с помощью способа по настоящему изобретению, содержат компонент, связывающийся с рецептором на поверхности клеток головного мозга, для облегчения поглощения клетками и/или нацеливания на лизосомы. Например, такой рецептор может представлять собой катионнезависимый рецептор маннозо-6-фосфата (CI-MPR), связывающий остатки маннозо-6-фосфата (М6Р). В дополнение, CI-MPR также связывает другие белки, в том числе IGF-II. В некоторых вариантах осуществления заместительный фермент, подходящий для настоящего изобретения, содержит остатки М6Р на поверхности белка. В некоторых вариантах осуществления заместительный фермент, подходящий для настоящего изобретения, может содержать бисфосфорилированные олигосахариды, обладающие более высокой аффинностью связывания с CI-MPR. В некоторых вариантах осуществления подходящий фермент содержит до приблизительно в среднем приблизительно по меньшей мере 20% бисфосфорилированных олигосахаридов на фермент. В других вариантах осуществления подходящий фермент может содержать приблизительно 10, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60% бисфосфорилированных олигосахаридов на фермент. Хотя такие бисфосфорилированные олигосахариды могут присутствовать в ферменте в естественных условиях, следует отметить, что ферменты можно модифицировать таким образом, чтобы они содержали такие олигосахариды. Например, подходящие заместительные ферменты можно модифицировать с помощью определенных ферментов, способных катализировать перенос N-ацетилглюкозамин-L-фосфата с UDP-GlcNAc в 6'-положение соединенных α -1,2-связями остатков маннозы в лизосомных ферментах. Способы и композиции для получения и применения таких ферментов описаны, например, Canfield и соавт. в патенте США № 6537785 и патенте США № 6534300, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления заместительные ферменты для применения в настоящем изобретении могут быть конъюгированы или слиты с компонентом, нацеливающимся на лизосомы, который способен связываться с рецептором на поверхности клеток головного мозга. Подходящими компонентами, нацеливающимися на лизосомы, могут являться IGF-I, IGF-II, RAP, p97 и их варианты, гомологи или фрагменты (например, включающие в себя пептид, имеющий последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90 или 95% идентичную последовательности зрелого человеческого пептида IGF-I, IGF-II, RAP, p97 дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления заместительные ферменты, подходящие для настоящего изобретения, не были модифицированы для усиления доставки или транспорта таких средств через BBB и в ЦНС.

В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок содержит нацеливающийся компонент (например, последовательность, нацеливающуюся на лизосомы) и/или мембранопроникающий пептид. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность и/или мембранопроникающий пептид являются неотъемлемой частью рекомбинантной арилсульфатазы А (например, посредством химической связи, посредством слитого белка). В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность содержит компонент маннозо-6-фосфат. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность содержит компонент IGF-I. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность содержит компонент IGF-II.

Составы.

Водные фармацевтические растворы и композиции (т.е. составы), традиционно применяемые для доставки терапевтических средств в ЦНС субъекта, включают в себя незабуференный изотонический физиологический раствор и раствор Эллиотта В, который представляет собой искусственную CSF. Сопоставление, в котором отображен состав CSF в сравнении с составом раствора Эллиотта В, содержится в табл. 2 ниже. Как показано в табл. 2, концентрация раствора Эллиотта В близко соответствует концентрации CSF. Раствор Эллиотта В, однако, имеет очень низкую концентрацию буфера и, соответственно, может не обеспечивать надлежащую буферную емкость, необходимую для стабилизации терапевтических средств (например, белков), в частности в течение продолжительных периодов времени (например, в условиях хранения). Кроме того, раствор Эллиотта В содержит определенные соли, которые могут быть несовместимыми с составами, предназначенными для доставки некоторых терапевтических средств, и в частности белков или ферментов. Например, соли кальция, присутствующие в растворе Эллиотта В, способны опосредовать осаждение белка и, таким образом, снижать стабильность состава.

Таблица 2

Раствор	Na ⁺ мЭКВ/ /л	K ⁺ мЭКВ/ л	Ca ⁺⁺ мЭКВ/ л	Mg ⁺⁺ мЭКВ/ л	НСО ₃ ⁻ мЭКВ/ л	Сl ⁻ мЭКВ/ л	рН	Фосфо р мг/л	Глюко за мг/л
CSF	117- 137	2,3	2,2	2,2	22,9	113- 127	7,31	1,2- 2,1	45-80
Раствор Эллиотта В	149	2,6	2,7	2,4	22,6	132	6,0- 7,5	2,3	80

В настоящем изобретении предусмотрены составы в водной форме, форме до лиофилизации, лиофилизированной либо разведенной форме для терапевтических средств, которые были составлены таким образом, чтобы они были способны стабилизировать или, в качестве альтернативы, замедлять или предотвращать разложение одного или более терапевтических средств, с которыми они составлены (например, рекомбинантных белков). В некоторых вариантах осуществления составы по настоящему изобретению предусматривают лиофилизированный состав для терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления составы по настоящему изобретению предусматривают водные составы для терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления составы являются стабильными составами.

Стабильные составы.

Используемый в данном документе термин "стабильный" относится к способности терапевтического средства (например, рекомбинантного фермента) сохранять свою терапевтическую эффективность (например, свою предполагаемую биологическую активность и/или физико-химическую целостность полностью или по большей части) в течение продолжительных периодов времени. Стабильность терапевтического средства и способность фармацевтической композиции поддерживать стабильность такого терапевтического средства можно оценивать в течение продолжительных периодов времени (например, предпочтительно в течение по меньшей мере 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36 месяцев или дольше). Что касается состава, стабильным составом является состав, в котором терапевтическое средство, содержащееся в нем, фактически сохраняет свою физическую и/или химическую целостность и биологическую активность при хранении и в ходе процессов (таких как замораживание/размораживание, механическое перемешивание и лиофилизация). Показателем стабильности белка может быть образование высокомолекулярных (НМВ) агрегатов, потеря ферментативной активности, образование пептидных фрагментов и сдвиг профилей распределения зарядов.

Стабильность терапевтического средства особенно важна в том, что касается поддержания установленного диапазона концентрации терапевтического средства, требуемого для обеспечения выполнения средством его предполагаемой терапевтической функции. Стабильность терапевтического средства можно дополнительно оценивать в том, что касается биологической активности или физико-химической целостности терапевтического средства в течение продолжительных периодов времени. Например, стабильность в указанный момент времени можно сравнивать со стабильностью в более ранний момент времени (например, в день 0 после составления) или с несоставленным терапевтическим средством, и результаты этого сравнения выражать в виде процентного значения. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению предпочтительно сохраняют по меньшей мере 100%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 55% или по меньшей мере 50% биологической активности или физико-химической целостности терапевтического средства в течение продолжительного периода времени (например, при измерении в течение по меньшей мере приблизительно 6-12 месяцев при комнатной температуре или в условиях ускоренного хранения).

Терапевтические средства предпочтительно являются растворимыми в фармацевтических композициях по настоящему изобретению. Термин "растворимый", связанный с терапевтическими средствами по настоящему изобретению, относится к способности таких терапевтических средств образовывать гомогенный раствор. Растворимость терапевтического средства в растворе, в который его вводят и с помощью которого его переносят в целевое место действия (например, в клетки и ткани головного мозга), предпочтительно является достаточной для обеспечения доставки терапевтически эффективного количества терапевтического средства в целевое место действия. На растворимость терапевтических средств может влиять несколько факторов. Например, существенные факторы, которые могут влиять на растворимость белка, включают в себя ионную силу, аминокислотную последовательность и наличие других совместных солибилизирующих средств или солей (например, солей кальция). В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции составлены таким образом, что соли кальция не включены в такие композиции.

Подходящие составы в водной форме, форме до лиофилизации, лиофилизированной либо разведенной форме могут содержать терапевтическое средство, представляющее интерес (например, рекомби-

нантную арилсульфатазу А человека), в различных концентрациях. В некоторых вариантах осуществления составы могут содержать белок или терапевтическое средство, представляющие интерес, в концентрации в диапазоне от приблизительно 0,1 до 100 мг/мл (например, приблизительно от 0,1 до 80 мг/мл, приблизительно от 0,1 до 60 мг/мл, приблизительно от 0,1 до 50 мг/мл, приблизительно от 0,1 до 40 мг/мл, приблизительно от 0,1 до 30 мг/мл, приблизительно от 0,1 до 25 мг/мл, приблизительно от 0,1 до 20 мг/мл, приблизительно от 0,1 до 60 мг/мл, приблизительно от 0,1 до 50 мг/мл, приблизительно от 0,1 до 40 мг/мл, приблизительно от 0,1 до 30 мг/мл, приблизительно от 0,1 до 25 мг/мл, приблизительно от 0,1 до 20 мг/мл, приблизительно от 0,1 до 15 мг/мл, приблизительно от 0,1 до 10 мг/мл, приблизительно от 0,1 до 5 мг/мл, приблизительно от 1 до 10 мг/мл, приблизительно от 1 до 20 мг/мл, приблизительно от 1 до 40 мг/мл, приблизительно от 5 до 100 мг/мл, приблизительно от 5 до 50 мг/мл или приблизительно от 5 до 25 мг/мл). В некоторых вариантах осуществления составы в соответствии с настоящим изобретением могут содержать терапевтическое средство в концентрации, составляющей по меньшей мере или примерно 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления составы содержат терапевтическое средство в концентрации, составляющей по меньшей мере или примерно 25 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления составы содержат терапевтическое средство в концентрации, составляющей по меньшей мере или примерно 30 мг/мл.

Составы по настоящему изобретению характеризуются своей переносимостью в виде водных растворов либо в виде разведенных лиофилизированных растворов. Используемые в данном документе термины "переносимый" и "переносимость" относятся к способности фармацевтических композиций по настоящему изобретению не вызывать нежелательную реакцию у субъекта, которому вводят такую композицию, или, в качестве альтернативы, не вызывать серьезную нежелательную реакцию у субъекта, которому вводят такую композицию. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению хорошо переносятся субъектом, которому вводят такие композиции.

Многие терапевтические средства, и в частности, белки и ферменты по настоящему изобретению, требуют регулируемого pH и конкретных наполнителей для поддержания их растворимости и стабильности в фармацевтических композициях по настоящему изобретению. В табл. 3 ниже определены типичные аспекты белковых составов, которые считаются поддерживающими растворимость и стабильность белковых терапевтических средств по настоящему изобретению.

Таблица 3

Параметр	Типичный диапазон/Тип	Обоснование использования
pH	5-7,5	Для стабильности Иногда также для растворимости
Тип буфера	Ацетатный, сукцинатный, цитратный, гистидиновый, фосфатный или Tris	Для поддержания оптимального pH Также может влиять на стабильность
Концентрация буфера	5-50 мМ	Для поддержания pH Может также стабилизировать или добавлять ионную силу
Модификатор тоничности	NaCl, сахара, маннит	Для придания растворам осмоотичности или изотоничности
Поверхностно-активное вещество	Полисорбат 20, полисорбат 80	Для стабилизации границ раздела фаз против сдвига
Другие	Аминокислоты (например, аргинин) в концентрации от нескольких десятков до нескольких сотен мМ	Для повышения растворимости или стабильности

Буферы.

pH состава является дополнительным фактором, способным изменять растворимость терапевтического средства (например, фермента или белка) в водном составе или в составе до лиофилизации. Соответственно, составы по настоящему изобретению предпочтительно содержат один или более буферов. В некоторых вариантах осуществления водные составы содержат количество буфера, достаточное для поддержания оптимального pH указанной композиции при приблизительно 4,0-8,0 (например, приблизительно 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,2, 6,4, 6,5, 6,6, 6,8, 7,0, 7,5 или 8,0). В некоторых вариантах осуществления pH состава составляет приблизительно 5,0-7,5, приблизительно 5,5-7,0, приблизительно 6,0-7,0, прибли-

зительно 5,5-6,0, приблизительно 5,5-6,5, приблизительно 5,0-6,0, приблизительно 5,0-6,5 и приблизительно 6,0-7,5. Подходящие буферы включают в себя, например, ацетатный, цитратный, гистидиновый, фосфатный, сукцинатный, трис(гидроксиметил)аминометановый ("Tris") буферы и буферы на основе других органических кислот. В некоторых вариантах осуществления буфер является фосфатным.

Концентрация буфера и диапазон pH фармацевтических композиций по настоящему изобретению являются факторами, учитываемыми при регулировании или корректировке переносимости состава. В некоторых вариантах осуществления буферное средство присутствует в концентрации в диапазоне от приблизительно 1 мМ до приблизительно 150 мМ, или от приблизительно 10 мМ до приблизительно 50 мМ, или от приблизительно 15 мМ до приблизительно 50 мМ, или от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ, или от приблизительно 25 мМ до приблизительно 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления подходящее буферное средство присутствует в концентрации примерно 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125 или 150 мМ.

В некоторых вариантах осуществления буфер присутствует в концентрации, не превышающей верхний предел, составляющий, например, примерно 100, 90, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 10 или 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер присутствует в концентрации, не превышающей примерно 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер присутствует в концентрации, не превышающей примерно 25 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер присутствует в концентрации, не превышающей примерно 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер присутствует в концентрации, не превышающей примерно 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер присутствует в концентрации, не превышающей примерно 5 мМ.

Тоничность.

В некоторых вариантах осуществления составы в водной форме, форме до лиофилизации, лиофилизированной либо разведенной форме содержат средство, придающее изотоничность, для поддержания изотоничности составов. Как правило, под "изотоническим" подразумевается, что состав, представляющий интерес, имеет по сути такое же осмотическое давление, что и кровь человека. Изотонические составы обычно имеют осмотическое давление от приблизительно 240 мОсм/кг до приблизительно 350 мОсм/кг. Изотоничность можно измерять с помощью, например, осмометров давления пара или точки замерзания. Приводимые в качестве примера средства, придающие изотоничность, включают в себя без ограничения глицин, сорбит, маннит, хлорид натрия и аргинин. В некоторых вариантах осуществления подходящие средства, придающие изотоничность, могут присутствовать в водных составах и/или составах до лиофилизации в концентрации, составляющей приблизительно 0,01-5% (например, 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 или 5,0%) по весу. В некоторых вариантах осуществления составы для лиофилизации содержат средство, придающее изотоничность, для поддержания изотоничности составов до лиофилизации или разведенных составов.

Хотя для парентерального введения лекарственных средств обычно предпочтительными являются изотонические растворы, применение изотонических растворов может изменять растворимость для некоторых терапевтических средств и, в частности, для некоторых белков и/или ферментов. Было продемонстрировано, что слабо гипертонические растворы (например, до 175 мМ хлорида натрия в 5 мМ фосфате натрия при pH 7,0) и сахаросодержащие растворы (например, до 2% сахарозы в 5 мМ фосфата натрия при pH 7,0) переносятся хорошо. Наиболее распространенной одобренной композицией состава для болюсного введения в ЦНС является физиологический раствор (приблизительно 150 мМ NaCl в воде).

Стабилизаторы.

В некоторых вариантах осуществления составы могут содержать стабилизатор или лиопротектор для защиты белка. Как правило, подходящий стабилизатор представляет собой сахар, невосстанавливающий сахар и/или аминокислоту. Приводимые в качестве примера сахара включают в себя без ограничения декстран, лактозу, маннит, маннозу, сорбит, раффинозу, сахарозу и трегалозу. Приводимые в качестве примера аминокислоты включают в себя без ограничения аргинин, глицин и метионин. Дополнительные стабилизаторы могут включать в себя хлорид натрия, гидроксипропилированный крахмал и поливинилпирролидон. Количество стабилизатора в лиофилизированном составе обычно является таким, при котором состав будет изотоническим. Тем не менее, гипертонические разведенные составы также могут быть подходящими. В дополнение, количество стабилизатора не должно быть таким чрезмерно низким, при котором будет иметь место неприемлемая величина разложения/агрегации терапевтического средства. Приводимые в качестве примера концентрации стабилизатора в составе могут находиться в диапазоне от приблизительно 1 мМ до приблизительно 400 мМ (например, от приблизительно 30 мМ до приблизительно 300 мМ и от приблизительно 50 мМ до приблизительно 100 мМ) или, в качестве альтернативы, от 0,1 до 15% (например, от 1 до 10%, от 5 до 15%, от 5 до 10%) по весу. В некоторых вариантах осуществления соотношение массовых количеств стабилизатора и терапевтического средства составляет приблизительно 1:1. В других вариантах осуществления соотношение массовых количеств стабилизатора и терапевтического средства может составлять приблизительно 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 или 20:1. В некоторых вариантах осуществления, подходящих для лиофилизации, стабилизатор также представляет собой лиопротектор.

В некоторых вариантах осуществления жидкие составы, подходящие для настоящего изобретения,

содержат аморфные вещества. В некоторых вариантах осуществления жидкие составы, подходящие для настоящего изобретения, содержат значительное количество аморфных веществ (например, составы на основе сахарозы). В некоторых вариантах осуществления жидкие составы, подходящие для настоящего изобретения, содержат частично кристаллические/частично аморфные вещества.

Объемообразующие средства.

В некоторых вариантах осуществления подходящие составы для лиофилизации могут дополнительно содержать одно или более объемообразующих средств. "Объемообразующее средство" представляет собой соединение, которое добавляет массу лиофилизованной смеси и вносит вклад в физическую структуру лиофилизованной лепешки. Например, объемообразующее средство может улучшать внешний вид лиофилизованной лепешки (например, по сути однородной лиофилизованной лепешки). Подходящие объемообразующие средства включают в себя без ограничения хлорид натрия, лактозу, маннит, глицин, сахарозу, трегалозу, гидроксипропиловый крахмал. Приводимые в качестве примера концентрации объемообразующих средств составляют от приблизительно 1% до приблизительно 10% (например, 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 и 10,0%).

Поверхностно-активные вещества.

В некоторых вариантах осуществления желательно добавлять поверхностно-активное вещество в составы. Приводимые в качестве примера поверхностно-активные вещества включают в себя неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты (например, полисорбаты 20 или 80); полксамеры (например, полксамер 188); Triton; додецилсульфат натрия (SDS); лаурилсульфат натрия; октилгликозид натрия; лаурил-, миристил-, линолеил- или стеарилсульфобеттаин; лаурил-, миристил-, линолеил-или стеарилсаркозин; линолеил-, миристил- или цетилбеттаин; лауроамидопропил-, кокаמידопропил-, линолеамидопропил-, миристамидопропил-, пальмидопропил- или изостеарамидопропилбеттаин (например, лауроамидопропил); миристамидопропил-, пальмидопропил- или изостеарамидопропилдиметиламин; натрия метилкокоил- или динатрия метилолеилтаурат; а также серию MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Патерсон, Нью-Джерси), полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль и сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля (например, плуроники, PF68 и т.д.). Как правило, количество добавляемого поверхностно-активного вещества является таким, при котором оно снижает агрегацию белка и сводит к минимуму образование твердых частиц или пузырьков газа. Например, поверхностно-активное вещество может присутствовать в составе в концентрации, составляющей приблизительно 0,001-0,5% (например, приблизительно 0,005-0,05% или 0,005-0,01%). В частности, поверхностно-активное вещество может присутствовать в составе в концентрации, составляющей примерно 0,005, 0,01, 0,02, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 или 0,5% и т.д. В качестве альтернативы или в дополнение, поверхностно-активное вещество можно добавлять в лиофилизированный состав, состав до лиофилизации и/или разведенный состав.

Другие фармацевтически приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы, такие как описанные в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980), могут быть включены в состав (и/или в лиофилизированный состав, и/или в разведенный состав) при условии, что они не оказывают неблагоприятное влияние на желаемые характеристики состава. Приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы являются нетоксичными для получающих их пациентов в используемых дозах и концентрациях и включают в себя без ограничения дополнительные буферные средства; консерванты; совместные растворители; антиоксиданты, в том числе аскорбиновую кислоту и метионин; хелатообразователи, такие как EDTA; комплексы металлов (например, комплексы белков с Zn); биоразлагаемые полимеры, такие как сложные полиэфиры; и/или солеобразующие противоионы, такие как ион натрия.

Составы в водной форме, форме до лиофилизации, лиофилизованной либо разведенной форме в соответствии с настоящим изобретением можно оценивать на основании анализа качества продукта, времени разведения (в случае с лиофилизованной формой), качества разведения (в случае с лиофилизованной формой), высокого молекулярного веса, содержания влаги и температуры стеклования. Как правило, анализ качества белка и продукта включает в себя анализ скорости разложения белка с помощью способов, включающих в себя без ограничения эксклюзионную HPLC (SE-HPLC), катионообменную HPLC (CEX-HPLC), рентгеновскую дифракцию (XRD), модулированную дифференциальную сканирующую калориметрию (mDSC), обращенно-фазовую HPLC (RP-HPLC), многоугловое рассеяние света (MALS), флуоресцентный анализ, анализ поглощения ультрафиолетового излучения, нефелометрию, капиллярный электрофорез (CE), SDS-PAGE и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления оценивание продукта в соответствии с настоящим изобретением может включать этап оценивания внешнего вида (внешнего вида жидкости либо лепешки).

Составы (лиофилизированные или водные) обычно можно хранить в течение продолжительных периодов времени при комнатной температуре. Температура хранения может, как правило, находиться в диапазоне от 0 до 45°C (например, составлять 4, 20, 25, 45°C и т.д.). Составы можно хранить в течение от периода, составляющего нескольких месяцев, до периода, составляющего нескольких лет. Время хранения обычно составляет 24, 12, 6, 4,5, 3, 2 или 1 месяц. Составы можно хранить непосредственно в контейнере, применяемом для введения, исключая этапы переноса.

Составы можно хранить непосредственно в контейнере для лиофилизации (в случае с лиофилизованной формой), который также может функционировать в качестве сосуда для разведения, исключая

этапы переноса. В качестве альтернативы, из лиофилизированных составов продуктов можно отмерить меньшие партии для хранения. При хранении обычно следует избегать обстоятельств, приводящих к разложению белков, в том числе без ограничения воздействия солнечного света, УФ-излучения, других форм электромагнитного излучения, перегрева или переохлаждения, быстрого температурного шока и механического шока.

Ллиофилизация.

Являющиеся объектом настоящего изобретения способы в соответствии с настоящим изобретением можно использовать для лиофилизации любых материалов, в частности терапевтических средств. Как правило, состав до лиофилизации дополнительно содержит надлежащим образом выбранные наполнители или другие компоненты, такие как стабилизаторы, буферные средства, объемообразующие средства и поверхностно-активные вещества, для предотвращения разложения соединения, представляющего интерес (например, агрегации, дезамидирования и/или окисления белка), в ходе сублимационной сушки и хранения. Состав для лиофилизации может содержать один или более дополнительных ингредиентов, включающих в себя лиопротекторы или стабилизаторы, буферы, объемообразующие средства, средства, придающие изотоничность, и поверхностно-активные вещества.

После смешивания вещества, представляющего интерес, и каких-либо дополнительных компонентов друг с другом состав лиофилизируют. Ллиофилизация обычно включает три основных стадии: замораживание, первичную сушку и вторичную сушку. Замораживание необходимо для превращения воды в лед или некоторых аморфных компонентов состава в кристаллическую форму. Первичная сушка представляет собой этап процесса, на котором лед удаляют из замороженного продукта путем непосредственной сублимации при низких значениях давления и температуры. Вторичная сушка представляет собой этап процесса, на котором связанную воду удаляют из матрицы продукта с использованием диффузии остаточной воды к поверхности испарения. Температура продукта в ходе вторичной сушки в обычных условиях является более высокой, чем в ходе первичной сушки. См. 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," в *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. Обычно в рамках настоящего изобретения можно применять любой процесс лиофилизации.

В некоторых вариантах осуществления в ходе первоначального замораживания продукта можно внедрять этап отжига. Этап отжига может обеспечивать снижение общей продолжительности цикла. Не желая ограничиваться какими-либо теориями, считают, что этап отжига может способствовать стимуляции кристаллизации наполнителя и образованию более крупных кристаллов льда вследствие перекристаллизации небольших кристаллов, образующихся в ходе сверхохлаждения, которое, в свою очередь, улучшает разведение. Как правило, этап отжига предусматривает температурный интервал или колебание температуры в ходе замораживания. Например, температура замораживания может составлять -40°C , а на этапе отжига температура будет повышаться, например, до -10°C , и эта температура будет поддерживаться в течение заданного периода времени. Продолжительность этапа отжига может находиться в диапазоне от 0,5 до 8 ч (например, составляя 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3, 4, 6 и 8 ч). Температура отжига может находиться в диапазоне между температурой замораживания и 0°C .

Ллиофилизацию можно осуществлять в контейнере, таком как пробирка, пакет, бутылка, лоток, флакон (например, стеклянный флакон), шприц или любые другие подходящие контейнеры. Контейнеры могут быть одноразовыми. Ллиофилизацию также можно осуществлять в большом масштабе или в малом масштабе. В некоторых случаях может быть желательно лиофилировать белковый состав в контейнере, в котором надлежит провести разведение белка, в целях избегания этапа переноса. Контейнер в данном случае может, например, представлять собой флакон на 3, 4, 5, 10, 20, 50 или 100 см^3 .

Для этой цели доступно много различных сублимационных сушилок, таких как полупромышленная сушилка Hull (SP Industries, США), лабораторные сублимационные сушилки Genesis (SP Industries) или любые сублимационные сушилки, способные регулировать заданные параметры процесса лиофилизации. Сублимационную сушку выполняют путем замораживания состава и последующей сублимации льда из замороженного содержимого при температуре, подходящей для первичной сушки. При первоначальном замораживании состав доводят до температуры ниже приблизительно -20°C (например, -50 , -45 , -40 , -35 , -30 , -25 и т.д.), как правило, не более чем за приблизительно 4 ч (например, не более чем за приблизительно 3 ч, не более чем за приблизительно 2,5 ч, не более чем за приблизительно 2 ч). При этом условии температура продукта, как правило, является более низкой, чем эвтектическая точка или температура коллапса состава. Как правило, температура полки на этапе первичной сушки будет находиться в диапазоне от приблизительно -30 до 25°C (при условии, что температура продукта остается ниже точки плавления в ходе первичной сушки) при подходящем давлении, как правило, находящемся в диапазоне от приблизительно 20-250 мторр. Время, требуемое для сушки, которое может находиться в диапазоне от нескольких часов до нескольких дней, будет определяться главным образом составом, размером и типом контейнера, в котором содержится образец (например, стеклянный флакон), а также объемом жидкости.

Стадию вторичной сушки проводят при приблизительно 0-60°C в зависимости прежде всего от используемых типа и размера контейнера и типа терапевтического белка. Время, требуемое для сушки, которое может находиться в диапазоне от нескольких часов до нескольких дней, в этом случае также будет определяться главным образом объемом жидкости.

В качестве общей нормы лиофилизация будет приводить к получению лиофилизированного состава, содержание влаги в котором составляет меньше чем приблизительно 5%, меньше чем приблизительно 4%, меньше чем приблизительно 3%, меньше чем приблизительно 2%, меньше чем приблизительно 1% и меньше чем приблизительно 0,5%.

Разведение.

Хотя фармацевтические композиции по настоящему изобретению обычно находятся в водной форме при введении субъекту, в некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению являются лиофилизированными. Такие композиции должны быть разведены путем добавления к ним одного или более разбавителей перед введением субъекту. На необходимой стадии, как правило, в соответствующий момент времени перед введением пациенту, лиофилизированный состав можно разводить с помощью разбавителя таким образом, чтобы концентрация белка в разведенном составе была необходимой.

В соответствии с настоящим изобретением можно применять различные разбавители. В некоторых вариантах осуществления подходящий разбавитель для разведения представляет собой воду. Воду, применяемую в качестве разбавителя, можно обрабатывать рядом способов, включающих в себя обратный осмос, дистилляцию, деионизацию, виды фильтрации (например, фильтрацию активированным углем, микрофильтрацию, нанофильтрацию) и комбинации этих способов обработки. Как правило, вода должна быть подходящей для инъекций, включая без ограничения стерильную воду или бактериостатическую воду для инъекций.

Дополнительные приводимые в качестве примера разбавители включают в себя pH-буферный раствор (например, физиологический раствор с фосфатным буфером), стерильный физиологический раствор, раствор Эллиотта, раствор Рингера или раствор декстрозы. Подходящие разбавители могут необязательно содержать консервант. Приводимые в качестве примера консерванты включают в себя ароматические спирты, такие как бензиловый или фениловый спирт. Количество используемого консерванта определяют путем оценки различных концентраций консерванта в отношении совместимости с белком и тестирования эффективности консерванта. Например, если консервант представляет собой ароматический спирт (такой как бензиловый спирт), то он может присутствовать в количестве, составляющем приблизительно 0,1-2,0%, приблизительно 0,5-1,5% или приблизительно 1,0-1,2%.

Разбавители, подходящие для настоящего изобретения, могут содержать ряд добавок, в том числе без ограничения pH-буферные средства (например, Tris, гистидин), соли (например, хлорид натрия) и другие добавки (например, сахарозу), в том числе описанные выше (например, стабилизаторы, средства, придающие изотоничность).

В соответствии с настоящим изобретением лиофилизированное вещество (например, белок, такой как рекомбинантная арилсульфатаза А человека) можно разводить до концентрации, составляющей по меньшей мере 25 мг/мл (например, по меньшей мере 50 мг/мл, по меньшей мере 75 мг/мл, по меньшей мере 100 мг/мл) и находящейся в любых диапазонах между этими значениями. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированное вещество (например, белок) можно разводить до концентрации в диапазоне от приблизительно 1 до 100 мг/мл (например, от приблизительно 1 до 50 мг/мл, от 1 до 100 мг/мл, от приблизительно 1 до приблизительно 5 мг/мл, от приблизительно 1 до приблизительно 10 мг/мл, от приблизительно 1 до приблизительно 25 мг/мл, от приблизительно 1 до приблизительно 75 мг/мл, от приблизительно 10 до приблизительно 30 мг/мл, от приблизительно 10 до приблизительно 50 мг/мл, от приблизительно 10 до приблизительно 75 мг/мл, от приблизительно 10 до приблизительно 100 мг/мл, от приблизительно 25 до приблизительно 50 мг/мл, от приблизительно 25 до приблизительно 75 мг/мл, от приблизительно 25 до приблизительно 100 мг/мл, от приблизительно 50 до приблизительно 75 мг/мл, от приблизительно 50 до приблизительно 100 мг/мл). В некоторых вариантах осуществления концентрация белка в разведенном составе может быть более высокой, чем концентрация в составе до лиофилизации. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированное вещество разводят до концентрации, составляющей по меньшей мере 25 мг/мл, например 30 мг/мл. Высокие концентрации белка в разведенном составе считаются особенно применимыми в случаях, когда предполагается подкожная или внутримышечная доставка разведенного состава. В некоторых вариантах осуществления концентрация белка в разведенном составе может в приблизительно 2-50 раз (например, в приблизительно 2-20, приблизительно 2-10 раз или приблизительно 2-5 раз) превышать концентрацию в составе до лиофилизации. В некоторых вариантах осуществления концентрация белка в разведенном составе может по меньшей мере в приблизительно 2 раза (например, по меньшей мере в приблизительно 3, 4, 5, 10, 20, 40 раз) превышать концентрацию в составе до лиофилизации.

Разведение в соответствии с настоящим изобретением можно осуществлять в любом контейнере. Приводимые в качестве примера контейнеры, подходящие для настоящего изобретения, включают в себя без ограничения, например, пробирки, флаконы, шприцы (например, однокамерные или двухкамерные),

пакеты, бутылки и лотки. Подходящие контейнеры могут быть изготовлены из любых материалов, таких как стекло, пластмасса, металл. Контейнеры могут быть одноразовыми или многоразовыми. Разведение также можно осуществлять в большом масштабе или в малом масштабе.

В некоторых случаях может быть желательно лиофилизировать белковый состав в контейнере, в котором надлежит провести разведение белка, в целях избегания этапа переноса. Контейнер в данном случае может, например, представлять собой флакон на 3, 4, 5, 10, 20, 50 или 100 см³. В некоторых вариантах осуществления подходящий контейнер для лиофилизации и разведения представляет собой двухкамерный шприц (например, шприцы Lyo-Ject® (Vetter)). Например, двухкамерный шприц может содержать как лиофилизированное вещество, так и разбавитель, каждый из которых находится в отдельной камере, отделенной уплотнителем (см. пример 5). Для разведения к уплотнителю со стороны разбавителя может быть прикреплен поршень, на который можно нажимать для перемещения разбавителя в камеру с продуктом таким образом, чтобы разбавитель мог вступить в контакт с лиофилизированным веществом, и разведение могло произойти так, как описано в данном документе (см. пример 5).

Фармацевтические композиции, составы и соответствующие способы по настоящему изобретению являются применимыми для доставки ряда терапевтических средств в ЦНС субъекта (например, интратекальным, интравентрикулярным или интрацистернальным путем) и для лечения сопутствующих заболеваний. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению являются особенно применимыми для доставки белков и ферментов (например, при заместительной ферментной терапии) субъектам, страдающим от лизосомных нарушений накопления. Лизосомные болезни накопления представляют собой группу относительно редких наследственных метаболических нарушений, обусловленных дефектами функционирования лизосом. Лизосомные заболевания характеризуются накоплением нерасщепленных макромолекул в лизосомах, что приводит к увеличению размера и количества таких лизосом и в конечном счете к клеточной дисфункции и клиническим аномалиям.

Доставка в ЦНС.

Считается, что различные стабильные составы, описанные в данном документе, в целом подходят для доставки терапевтических средств в ЦНС. Стабильные составы в соответствии с настоящим изобретением можно применять для доставки в ЦНС посредством различных методик и путей, в том числе без ограничения с помощью интрапаренхимального, интрацеребрального, интравентрикулярного интрацеребрального (ICV), интратекального (например, люмбального IT, IT в большую цистерну) введения и любых других методик и путей прямой или не прямой инъекции в ЦНС и/или CSF. Термин "большая цистерна" относится к пространству вокруг и ниже мозжечка в виде просвета между черепом и верхней частью позвоночника. Как правило, инъекция в большую цистерну также называется "доставкой в большую цистерну".

Интратекальная доставка.

В некоторых вариантах осуществления заместительный фермент доставляется в ЦНС в составе, описанном в данном документе. В некоторых вариантах осуществления заместительный фермент доставляется в ЦНС путем введения в спинномозговую жидкость (CSF) субъекта, нуждающегося в лечении. В некоторых вариантах осуществления для доставки необходимого заместительного фермента (например, белка ASA) в CSF применяют интратекальное введение. Как используется в данном документе, интратекальное введение (также называемое интратекальной инъекцией) относится к инъекции в позвоночный канал (интратекальное пространство, окружающее спинной мозг). Можно применять различные методики, включающие в себя без ограничения люмбальную пункцию. Приводимые в качестве примера способы описаны в Lazorthes et al. *Advances in Drug Delivery Systems and Applications in Neurosurgery*, 143-192, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки.

В соответствии с настоящим изобретением фермент можно инъецировать в любую область, окружающую позвоночный канал. В некоторых вариантах осуществления фермент инъецируют в поясничную зону. Используемый в данном документе термин "поясничная область" или "поясничная зона" относится к зоне между третьим и четвертым поясничными позвонками (в нижнем отделе спины) и, более содержательно, к области L2-S1 позвоночника. Как правило, интратекальная инъекция в поясничную область или поясничную зону также называется "люмбальной интратекальной доставкой" или "люмбальным интратекальным введением".

В некоторых вариантах осуществления терапевтические белки, например рекомбинантную арилсульфатазу А, доставляют путем люмбального интратекального введения, например, доставляют в область между третьим и четвертым поясничными позвонками (в нижнем отделе спины) и, более содержательно, в область L2-S1 позвоночника. Считается, что люмбальные интратекальные введение или доставка отличаются от доставки в большую цистерну тем, что люмбальные интратекальные введение или доставка в соответствии с настоящим изобретением обеспечивают лучшую и более эффективную доставку в дистальный отдел позвоночного канала, тогда как доставка в большую цистерну, помимо прочего, как правило, не обеспечивает хорошую доставку в дистальный отдел позвоночного канала.

Устройство для интратекальной доставки.

Для интратекальной доставки в соответствии с настоящим изобретением можно применять различные устройства. В некоторых вариантах осуществления устройство для интратекального введения со-

держит порт доступа жидкости (например, инъекционный порт); полый корпус (например, катетер), имеющий первую расходомерную диафрагму, находящуюся в гидравлическом сообщении с портом доступа жидкости, и вторую расходомерную диафрагму, выполненную с возможностью вставки в спинной мозг; и фиксирующий механизм для фиксации вставленного полого корпуса в спинном мозге. В качестве неограничивающего примера подходящий фиксирующий механизм содержит один или более выступов, размещенных на поверхности полого корпуса, и шовное кольцо, устанавливаемое на один или более выступов, для предотвращения выскальзывания полого корпуса (например, катетера) из спинного мозга. В различных вариантах осуществления порт доступа жидкости включает в себя резервуар. В некоторых вариантах осуществления порт доступа жидкости включает в себя механический насос (например, инфузионный насос). В некоторых вариантах осуществления имплантированный катетер соединен с резервуаром (например, для болюсной доставки) или инфузионным насосом. Порт доступа жидкости может быть имплантированным или наружным.

В некоторых вариантах осуществления интратекальное введение можно осуществлять с помощью люмбальной пункции (т.е. путем медленного болюсного введения) либо посредством системы доставки порт-катетер (т.е. путем инфузии или болюсного введения). В некоторых вариантах осуществления катетер вставляют между пластинками дуг поясничных позвонков, и наконечник осторожно продвигают в интратекальное пространство до необходимого уровня (обычно L3-L4).

В некоторых вариантах осуществления интратекальное введение осуществляют посредством периодического или постоянного доступа к имплантированному устройству для интратекальной доставки лекарственных средств (IDDD).

По сравнению с внутривенным введением объем однократной дозы, подходящий для интратекального введения, является, как правило, небольшим. Как правило, при интратекальной доставке в соответствии с настоящим изобретением поддерживается баланс состава CSF, а также внутричерепное давление субъекта. В некоторых вариантах осуществления интратекальную доставку осуществляют при отсутствии соответствующего удаления CSF из организма субъекта. В некоторых вариантах осуществления подходящий объем однократной дозы может составлять, например, меньше чем приблизительно 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1,5, 1 или 0,5 мл. В некоторых вариантах осуществления подходящий объем однократной дозы может составлять приблизительно 0,5-5, 0,5-4, 0,5-3, 0,5-2, 0,5-1, 1-3, 1-5, 1,5-3, 1-4 или 0,5-1,5 мл. В некоторых вариантах осуществления интратекальная доставка в соответствии с настоящим изобретением предусматривает этап первоначального удаления необходимого количества CSF. В некоторых вариантах осуществления перед интратекальным введением вначале удаляют меньше чем приблизительно 10 мл (например, меньше чем приблизительно 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 мл) CSF. В этих случаях подходящий объем однократной дозы может составлять, например, больше чем приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 мл.

Другие устройства для интратекального введения терапевтических композиций или составов индивидууму описаны в патенте США № 6217552, включенном в данный документ посредством ссылки. В качестве альтернативы, лекарственное средство можно давать интратекально, например посредством однократной инъекции или непрерывной инфузии. Следует понимать, что лечение дозами может происходить в виде введения однократной дозы или многократных доз.

Для инъекции составы по настоящему изобретению можно составлять в виде жидких растворов. В дополнение, фермент можно составлять в твердой форме и повторно растворять или суспендировать непосредственно перед применением. Также включены лиофилизированные формы. Инъекцию можно осуществлять, например, в виде болюсной инъекции или непрерывной инфузии фермента (например, с помощью инфузионных насосов).

Способы доставки, отличные от интратекальных.

Терапевтические ферменты, например рекомбинантную арилсульфатазу А, можно вводить с помощью способов, отличных от интратекальных, например путем интрацеребральной инъекции в боковые желудочки головного мозга субъекта. Инъекцию можно осуществлять, например, через трепанационное отверстие, сделанное в черепе субъекта. В другом варианте осуществления ферментный и/или другой фармацевтический состав вводят через вставленный хирургическим путем шунт в желудочек головного мозга субъекта. Например, инъекцию можно осуществлять в боковые желудочки, большие по размеру. В некоторых вариантах осуществления также можно осуществлять инъекцию в третий и четвертый желудочки, меньшие по размеру.

В качестве альтернативы, фармацевтические композиции можно вводить посредством инъекции в большую цистерну или поясничную зону субъекта.

Можно применять определенные устройства для выполнения введения терапевтической композиции. Например, составы, содержащие необходимые ферменты, можно предоставлять с помощью резервуара Оммайя, широко используемого для интратекального введения лекарственных средств при канцероматозе мозговых оболочек (Lancet 2: 983-84, 1963). Более конкретно, в этом способе вентрикулярную трубку вставляют через отверстие, образованное в переднем роге спинного мозга, и соединяют с резервуаром Оммайя, установленным под кожей волосистой части головы, и резервуар прокалывают под кожей для интратекальной доставки конкретного замещающего фермента, вводимого в резервуар.

Медленное высвобождение/стабильная доставка.

В другом варианте осуществления способа по настоящему изобретению фармацевтически приемлемый состав обеспечивает стабильную доставку, например "медленное высвобождение", ферментной или другой фармацевтической композиции, применяемой в настоящем изобретении, в организм субъекта в течение по меньшей мере одной, двух, трех, четырех недель или более длительных периодов времени после введения субъекту фармацевтически приемлемого состава.

Используемый в данном документе термин "стабильная доставка" относится к непрерывной доставке фармацевтического состава по настоящему изобретению *in vivo* в течение некоторого периода времени после введения, предпочтительно по меньшей мере нескольких дней, недели или нескольких недель. Стабильная доставка композиции может быть продемонстрирована, например, по продолжительному терапевтическому эффекту фермента в течение некоторого времени (например, стабильная доставка фермента может быть продемонстрирована по продолжительному снижению количества накопительных гранул у субъекта). В качестве альтернативы, стабильная доставка фермента может быть продемонстрирована по выявлению наличия фермента *in vivo* в течение некоторого времени.

Доставка в целевые ткани.

Как обсуждается выше, одним из удивительных и важных признаков настоящего изобретения является то, что терапевтические средства, в частности заместительные ферменты, вводимые с применением являющихся объектом настоящего изобретения способов и композиций по настоящему изобретению, способны к эффективной и обширной диффузии через поверхность головного мозга и к проникновению в различные слои или области головного мозга, в том числе в глубокие области головного мозга. В дополнение, являющиеся объектом настоящего изобретения способы и композиции по настоящему изобретению обеспечивают эффективную доставку терапевтических средств (например, фермента ASA) в различные ткани, нейроны или клетки спинного мозга, в том числе в поясничную область, нацеливание на которую с помощью существующих способов доставки в ЦНС, таких как ICV инъекция, является затруднительным. Кроме того, являющиеся объектом настоящего изобретения способы и композиции по настоящему изобретению обеспечивают доставку достаточного количества терапевтических средств (например, фермента ASA) в кровотоки и различные периферические органы и ткани.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления терапевтический белок (например, фермент ASA) доставляют в центральную нервную систему субъекта. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок (например, фермент ASA) доставляют в одну или более целевых тканей головного мозга, спинного мозга и/или периферических органов. Используемый в данном документе термин "целевые ткани" относится к любой ткани, пораженной лизосомной болезнью накопления, подлежащей лечению, или любой ткани, в которой в обычных условиях экспрессируется дефицитный лизосомный фермент. В некоторых вариантах осуществления целевые ткани включают в себя те ткани, в которых имеется выявляемое или аномально высокое количество субстрата фермента, например хранящегося в клеточных лизосомах ткани, у пациентов, страдающих от лизосомной болезни накопления или подверженных ей. В некоторых вариантах осуществления целевые ткани включают в себя те ткани, которые демонстрируют патологический процесс, симптом или признак, ассоциированный с заболеванием. В некоторых вариантах осуществления целевые ткани включают в себя те ткани, в которых дефицитный лизосомный фермент в обычных условиях экспрессируется на повышенном уровне. Как используется в данном документе, целевая ткань может представлять собой целевую ткань головного мозга, целевую ткань спинного мозга и/или периферическую целевую ткань. Приводимые в качестве примера целевые ткани подробно описаны ниже.

Целевые ткани головного мозга.

Как правило, головной мозг можно подразделить на различные области, слои и ткани. Например, менингеальная ткань представляет собой систему мембран, покрывающих центральную нервную систему, в том числе головной мозг. Мозговые оболочки содержат три слоя, включающие твердую мозговую оболочку, паутинную мозговую оболочку и мягкую мозговую оболочку. Как правило, основной функцией мозговых оболочек и спинномозговой жидкости является защита центральной нервной системы. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок в соответствии с настоящим изобретением доставляется в один или более слоев мозговых оболочек.

Головной мозг имеет три основных подотдела, включающие большой мозг, мозжечок и ствол головного мозга. Полушария головного мозга расположены над большинством других структур головного мозга и покрыты кортикальным слоем. Под большим мозгом залегает ствол головного мозга, напоминающий стебель, к которому прикреплен большой мозг. В задней части головного мозга ниже большого мозга и сзади ствола головного мозга расположен мозжечок.

Промежуточный мозг, расположенный возле средней линии головного мозга и над средним мозгом, содержит таламус, метаталамус, гипоталамус, эпителиамус, преталамус и претектальную область. Средний мозг, также называемый мезэнцефалоном, содержит крышу, покрывающую, водопровод и ножки мозга, красное ядро и ядро III пары черепных нервов. Средний мозг связан со зрением, слухом, управлением движениями, циклом сон/бодрствование, концентрацией внимания и терморегуляцией.

Области тканей центральной нервной системы, в том числе головного мозга, можно охарактеризо-

вать по глубине залегания тканей. Например, ткани ЦНС (например, головного мозга) можно охарактеризовать как поверхностные или неглубокие ткани, ткани средней глубины залегания и/или глубокие ткани.

В соответствии с настоящим изобретением терапевтический белок (например, заместительный фермент) можно доставлять в любую(ые) соответствующую(ие) целевую(ые) ткань(и) головного мозга, ассоциированную(ые) с конкретным заболеванием, подлежащим лечению у субъекта. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок (например, заместительный фермент) в соответствии с настоящим изобретением доставляют в поверхностную или неглубокую целевую ткань головного мозга. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок в соответствии с настоящим изобретением доставляют в целевую ткань головного мозга средней глубины залегания. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок в соответствии с настоящим изобретением доставляют в глубокую целевую ткань головного мозга. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок в соответствии с настоящим изобретением доставляют в комбинации поверхностной или неглубокой целевой ткани головного мозга, целевой ткани головного мозга средней глубины залегания и/или глубокой целевой ткани головного мозга. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок в соответствии с настоящим изобретением доставляется в глубокую ткань головного мозга, расположенную по меньшей мере на 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 мм или больше ниже наружной поверхности головного мозга (или по направлению внутрь от нее).

В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства (например, ферменты) доставляются в одну или более поверхностных или неглубоких тканей большого мозга. В некоторых вариантах осуществления целевые поверхностные или неглубокие ткани большого мозга расположены в пределах 4 мм от поверхности большого мозга. В некоторых вариантах осуществления целевые поверхностные или неглубокие ткани большого мозга выбраны из тканей мягкой мозговой оболочки, тканей полосы коркового вещества головного мозга, гиппокампа, пространства Вирхова-Робена, кровеносных сосудов в пространстве VR, гиппокампа, частей гипоталамуса на нижней поверхности головного мозга, зрительных нервов и трактов, обонятельной луковицы и ее проекций и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства (например, ферменты) доставляются в одну или более глубоких тканей большого мозга. В некоторых вариантах осуществления целевые поверхностные или неглубокие ткани большого мозга расположены на 4 мм (например, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мм) ниже поверхности большого мозга (или по направлению внутрь от нее). В некоторых вариантах осуществления целевые глубокие ткани большого мозга включают в себя полосу коркового вещества головного мозга. В некоторых вариантах осуществления целевые глубокие ткани большого мозга включают в себя одно или более из промежуточного мозга (например, гипоталамуса, таламуса, преталамуса, субталамуса и т.д.), заднего мозга, чечевицеобразных ядер, базальных ганглиев, хвостатого ядра, скорлупы, миндалевидного тела, бледного шара и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства (например, ферменты) доставляют в одну или более тканей мозжечка. В определенных вариантах осуществления одна или более целевых тканей мозжечка выбраны из группы, состоящей из тканей молекулярного слоя, тканей слоя клеток Пуркинью, тканей зернистого слоя клеток, ножек мозжечка и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства (например, ферменты) доставляют в одну или более глубоких тканей мозжечка, в том числе без ограничения в ткани слоя клеток Пуркинью, ткани зернистого слоя клеток, глубокую ткань белого вещества мозжечка (например, глубокую по сравнению с зернистым слоем клеток) и глубокую ткань ядер мозжечка.

В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства (например, ферменты) доставляют в одну или более тканей ствола головного мозга. В некоторых вариантах осуществления одна или более целевых тканей ствола головного мозга включают в себя ткань белого вещества ствола головного мозга и/или ткань ядер ствола головного мозга.

В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства (например, ферменты) доставляют в различные ткани головного мозга, в том числе без ограничения в серое вещество, белое вещество, перивентрикулярные зоны, мягкую и паутинную мозговые оболочки, мозговые оболочки, новую кору, мозжечок, глубокие ткани в коре головного мозга, молекулярный слой, область хвостатого ядра/скорлупы, средний мозг, глубокие области варолиева моста или спинного мозга и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства (например, ферменты) доставляют в различные клетки в головном мозге, в том числе без ограничения в нейроны, глиальные клетки, периваскулярные клетки и/или менингеальные клетки. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок доставляют в олигодендроциты глубокого белого вещества.

Спинной мозг.

Как правило, области или ткани спинного мозга можно охарактеризовать по глубине залегания тканей. Например, ткани спинного мозга можно охарактеризовать как поверхностные или неглубокие ткани, ткани средней глубины залегания и/или глубокие ткани.

В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства (например, ферменты) доставляют в одну или более поверхностных или неглубоких тканей спинного мозга. В некоторых вариантах

осуществления целевая поверхностная или неглубокая ткань спинного мозга расположена в пределах 4 мм от поверхности спинного мозга. В некоторых вариантах осуществления целевая поверхностная или неглубокая ткань спинного мозга содержит мягкую мозговую оболочку и/или тракты белого вещества.

В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства (например, ферменты) доставляют в одну или более глубоких тканей спинного мозга. В некоторых вариантах осуществления целевая глубокая ткань спинного мозга расположена в пределах 4 мм по направлению внутрь от поверхности спинного мозга. В некоторых вариантах осуществления целевая глубокая ткань спинного мозга предусматривает серое вещество и/или эпендимальные клетки спинного мозга.

В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства (например, ферменты) доставляют в нейроны спинного мозга.

Периферические целевые ткани.

Как используется в данном документе, периферические органы или ткани относятся к любым органам или тканям, не являющимся частью центральной нервной системы (ЦНС). Периферические целевые ткани могут включать в себя без ограничения систему крови, печень, почку, сердце, эндотелий, костный мозг и клетки, происходящие из костного мозга, селезенку, легкое, лимфатический узел, кость, хрящ, яичник и семенник. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок (например, заместительный фермент) в соответствии с настоящим изобретением доставляется в одну или несколько периферических целевых тканей.

Биораспределение и биодоступность.

В различных вариантах осуществления после доставки в целевую ткань терапевтическое средство (например, фермент ASA) локализуется внутриклеточно. Например, терапевтическое средство (например, фермент) может локализоваться в экзонах, аксонах, лизосомах, митохондриях или вакуолях целевых клеток (например, нейронов, таких как клетки Пуркинье). Например, в некоторых вариантах осуществления интратекально вводимые ферменты демонстрируют такую динамику транслокации, при которой фермент перемещается в периваскулярном пространстве (например, с помощью пульсационных конвективных механизмов). В дополнение, механизмы активного аксонального транспорта, связанные с ассоциацией вводимого белка или фермента с нейрофиламентами, также могут вносить вклад в распределение интратекально вводимых белков или ферментов в более глубоких тканях центральной нервной системы или иным образом способствовать ему.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство (например, фермент ASA), доставляемое в соответствии с настоящим изобретением, может достигать терапевтически или клинически эффективных уровней или видов активности в различных целевых тканях, описанных в данном документе. Как используется в данном документе, терапевтически или клинически эффективными уровнем или активностью являются уровень или активность, достаточные для обеспечения терапевтического эффекта в целевой ткани. Терапевтический эффект может быть объективным (т.е. измеряемым с помощью определенного теста или маркера) или субъективным (т.е. субъект дает указание на эффект или ощущает его). Например, терапевтически или клинически эффективными уровнем или активностью могут являться уровень или активность фермента, достаточные для уменьшения интенсивности симптомов, ассоциированных с заболеванием, в целевой ткани (например, накопления GAG).

В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство (например, заместительный фермент), доставляемое в соответствии с настоящим изобретением, может достигать уровня или активности фермента, составляющих по меньшей мере 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% от нормальных уровня или активности соответствующего лизосомного фермента в целевой ткани. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство (например, заместительный фермент), доставляемое в соответствии с настоящим изобретением, может достигать уровня или активности фермента, увеличенных по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз по сравнению с контролем или с исходным уровнем (например, с эндогенными уровнями или видами активности при отсутствии лечения). В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство (например, заместительный фермент), доставляемое в соответствии с настоящим изобретением, может достигать увеличенных уровня или активности фермента, составляющих по меньшей мере примерно 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 или 600 нмоль/ч/мг в целевой ткани.

В некоторых вариантах осуществления являющиеся объектом настоящего изобретения способы в соответствии с настоящим изобретением являются особенно применимыми для нацеливания на поясничную область. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство (например, заместительный фермент), доставляемое в соответствии с настоящим изобретением, может достигать увеличенных уровня или активности фермента в поясничной области, составляющих по меньшей мере примерно 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 или 10000 нмоль/ч/мг.

Как правило, терапевтические средства (например, заместительные ферменты), доставляемые в соответствии с настоящим изобретением, имеют достаточно длительный период полувыведения из CSF и целевых тканей головного мозга, спинного мозга и периферических органов. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство (например, заместительный фермент), доставляемое в соответствии с настоящим изобретением, может иметь период полувыведения, составляющий по меньшей мере

примерно 30, 45, 60, 90 мин, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40 ч, до 3, до 7, до 14, до 21 дня или до месяца. В некоторых вариантах осуществления, в некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство (например, заместительный фермент), доставляемое в соответствии с настоящим изобретением, может сохранять выявляемый уровень или активность в CSF или кровотоке через 12, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102 ч или неделю после введения. Выявляемый уровень или активность можно определить с помощью различных способов, известных из уровня техники.

В определенных вариантах осуществления терапевтическое средство (например, заместительный фермент), доставляемое в соответствии с настоящим изобретением, достигает концентрации, составляющей по меньшей мере 30 мкг/мл, в тканях и клетках ЦНС субъекта после введения (например, через неделю, 3 дня, 48, 36, 24, 18, 12, 8, 6, 4, 3, 2, 1 ч, 30 мин или меньше после интратекального введения фармацевтической композиции субъекту). В определенных вариантах осуществления терапевтическое средство (например, заместительный фермент), доставляемое в соответствии с настоящим изобретением, достигает концентрации, составляющей по меньшей мере 20 мкг/мл, по меньшей мере 15 мкг/мл, по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 7,5 мкг/мл, по меньшей мере 5 мкг/мл, по меньшей мере 2,5 мкг/мл, по меньшей мере 1,0 мкг/мл или по меньшей мере 0,5 мкг/мл, в целевых тканях или клетках субъекта (например, в тканях или нейронах головного мозга) после введения такому субъекту (например, через неделю, 3 дня, 48, 36, 24, 18, 12, 8, 6, 4, 3, 2, 1 ч, 30 мин или меньше после интратекального введения таких фармацевтических композиций субъекту).

Лечение заболевания метахроматической лейкодистрофии (MLD).

Заболевание метахроматическая лейкодистрофия (MLD), также известное как синдром MLD, представляет собой аутосомно-рецессивное нарушение, обусловленное дефицитом фермента арилсульфатазы А (ASA). ASA, кодируемая геном ARSA у людей, представляет собой фермент, разрушающий цереброзид-3-сульфат или сфинголипид 3-0-сульфогалактозилцерамид (сульфатид) до цереброзида и сульфата. При отсутствии фермента сульфатида накапливаются в нервной системе (например, в миелиновых оболочках, нейронах и глиальных клетках) и в меньшей степени в висцеральных органах. Следствием этих молекулярных и клеточных событий является прогрессирующая демиелинизация и потеря аксонов в ЦНС и ПНС, что сопровождается клиническими проявлениями в виде тяжелой двигательной и когнитивной дисфункций.

Определяющим клиническим признаком этого нарушения является дегенерация центральной нервной системы (ЦНС), которая приводит к нарушению когнитивных функций (например, среди прочего, к умственной отсталости, нервным расстройствам и слепоте).

MLD может проявляться у маленьких детей (поздняя младенческая форма), при этом у пораженных детей, как правило, начинают проявляться симптомы вскоре по прошествии первого года жизни (например, в возрасте приблизительно 15-24 месяцев), и дети обычно не живут дольше 5 лет. MLD может проявляться у детей (ювенильная форма), при этом пораженные дети, как правило, демонстрируют нарушение когнитивных функций к возрасту приблизительно 3-10 лет, и продолжительность жизни может варьироваться (например, в диапазоне 10-15 лет после начала проявления симптомов). MLD может проявляться у взрослых (форма с возникновением в зрелом возрасте) и может появляться у индивидуумов в любом возрасте (например, как правило, в возрасте 16 лет и позднее). Прогрессирование заболевания может значительно варьироваться.

Композиции и способы по настоящему изобретению можно применять для эффективного лечения индивидуумов, страдающих от MLD или подверженных ей. Определенные способы по настоящему изобретению для лечения MLD обычно включают этап интратекального введения субъекту, нуждающемуся в лечении, рекомбинантного фермента арилсульфатазы А (ASA) в терапевтически эффективной дозе и с некоторым интервалом между введениями в течение периода лечения, достаточного для наблюдения у субъекта по меньшей мере одного показателя эффективности лечения. В соответствии со многими способами, предусмотренными в настоящем изобретении, у субъекта не наблюдаются серьезные нежелательные эффекты, ассоциированные с введением рекомбинантной арилсульфатазы А.

Термины "лечить" или "лечение", используемые в данном документе, относятся к уменьшению интенсивности одного или более симптомов, ассоциированных с заболеванием, предупреждению или задержке начала проявления одного или более симптомов заболевания, уменьшению тяжести или частоты одного или более симптомов заболевания и/или замедлению, стабилизации или снижению темпов прогрессирования ухудшения одной или более функций, ассоциированного с заболеванием. Приводимые в качестве примера симптомы включают в себя без ограничения внутричерепное давление, гидроцефалию *ex vacuo*, накопление сульфатированных гликолипидов в миелиновых оболочках в центральной и периферической нервных системах и в висцеральных органах, прогрессирующую демиелинизацию и потерю аксонов в ЦНС и ПНС и/или двигательную и когнитивную дисфункцию.

В некоторых вариантах осуществления лечение относится к частичным или полным облегчению, уменьшению интенсивности, ослаблению, ингибированию, задержке начала проявления, снижению тяжести и/или частоты возникновения, замедлению прогрессирования, стабилизации или устранению неврологического нарушения у пациента с MLD. Используемый в данном документе термин "неврологическое нарушение" включает различные симптомы, ассоциированные с нарушением функционирования

центральной нервной системы (например, головного мозга и спинного мозга). В некоторых вариантах осуществления различные симптомы MLD ассоциированы с нарушением функционирования периферической нервной системы (ПНС).

Двигательные функции.

В некоторых вариантах осуществления неврологическое нарушение у пациента с MLD характеризуется ухудшением двигательной функции, например функции крупной моторики. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения предусматривает показатель, который связан с одной или более двигательными функциями.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы лечения синдрома метакроматической лейкодистрофии (MLD), включающие этап интратекального введения субъекту, нуждающемуся в лечении, рекомбинантного фермента арилсульфатазы А (ASA) в терапевтически эффективной дозе и с некоторым интервалом между введениями в течение периода лечения, достаточного для улучшения, стабилизации или снижения темпов ухудшения одной или более двигательных функций по сравнению с исходным уровнем. В некоторых вариантах осуществления введение рекомбинантного фермента ASA дополнительно приводит к улучшению, стабилизации или снижению темпов ухудшения одной или более когнитивных, адаптивных и/или исполнительных функций.

Одна или более двигательных функций могут включать в себя, например, функцию крупной моторики. Будет понятно, что функцию крупной моторики можно оценивать с помощью любого соответствующего способа. Например, в некоторых вариантах осуществления функцию крупной моторики оценивают по изменению двигательной функции от исходного уровня с помощью суммарных предварительных балла или процентного значения теста оценки функционирования крупной моторики, такого как тест оценки функционирования крупной моторики-88 (GMFM-88) или тест оценки функционирования крупной моторики-66 (GMFM-66). В некоторых вариантах осуществления субъект, подвергаемый лечению, имеет исходный балл GMFM-88, превышающий 40%. В некоторых вариантах осуществления субъект, подвергаемый лечению, имеет исходный балл GMFM-88, составляющий меньше 40%.

В некоторых вариантах осуществления введение рекомбинантного фермента ASA в соответствии со способами, раскрытыми в данном документе, приводит к меньшему ухудшению двигательных функций, чем ухудшение, которое, как правило, будет наблюдаться без введения. Например, в некоторых вариантах осуществления введение рекомбинантного фермента ASA в соответствии со способами по настоящему изобретению приводит к уменьшению балла GMFM-88 меньше чем на 10, 20, 30, 40 или 50%.

В некоторых вариантах осуществления введение рекомбинантного фермента ASA в соответствии со способами, раскрытыми в данном документе, приводит к значительной стабилизации двигательной функции, например значительной стабилизации балла, такого как балл GMFM-88. Под "значительной стабилизацией" подразумевается, что ухудшение или усугубление отсутствует в течение некоторого периода времени, например в течение периода лечения и/или в течение периода, в ходе которого в обычных условиях будет ожидать ухудшение или усугубление в отсутствие лечения.

В некоторых вариантах осуществления введение рекомбинантного фермента ASA в соответствии со способами, раскрытыми в данном документе, приводит к улучшению двигательной функции, например улучшению балла, такого как балл GMFM-88.

Биомаркеры.

В определенных вариантах осуществления эффективность лечения предусматривает изменение(я) уровня(ей) одного или более биомаркеров, например накапливающихся или присутствующих на пониженных уровнях у пациентов с MLD.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы лечения синдрома метакроматической лейкодистрофии (MLD), включающие этап интратекального введения субъекту, нуждающемуся в лечении, рекомбинантного фермента арилсульфатазы А (ASA) в терапевтически эффективной дозе и с некоторым интервалом между введениями в течение периода лечения, достаточного для уменьшения уровней биомаркера, накапливающегося при MLD, по сравнению с исходным уровнем биомаркера.

Биомаркер, накапливающийся при MLD, может представлять собой, например, сульфатид, лизо-сульфатид или как тот, так и другой. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой сульфатид. Биомаркер может представлять собой биомаркер, накапливающийся в одной или более тканях организма и/или одной или более физиологических жидкостях у пациентов с MLD. Например, в некоторых вариантах осуществления биомаркер накапливается в физиологической жидкости, выбранной из группы, состоящей из спинномозговой жидкости, мочи, крови и сыворотки крови. В некоторых вариантах осуществления физиологическая жидкость представляет собой спинномозговую жидкость.

В определенных вариантах осуществления исходный уровень сульфатидов в спинномозговой жидкости субъекта, подвергаемого лечению, превышает определенный уровень, например превышает приблизительно 0,1 мкг/мл, превышает приблизительно 0,2 мкг/мл или превышает приблизительно 0,3 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления введение рекомбинантного фермента ASA в соответствии со способами, раскрытыми в данном документе, приводит к снижению уровней сульфатидов в спинномозговой жидкости, например, больше чем на приблизительно 0,1 мкг/мл или больше чем на приблизительно 0,2 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к уменьшенному накоплению сульфатидов в различных тканях или физиологических жидкостях. В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к уменьшенному накоплению сульфатидов в целевых тканях головного мозга, нейронах спинного мозга и/или периферических целевых тканях. В определенных вариантах осуществления накопление сульфатидов уменьшается на приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100% или больше по сравнению с контролем или исходным уровнем. В некоторых вариантах осуществления накопление сульфатидов уменьшается по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз по сравнению с контролем или исходным уровнем. Будет понятно, что накопление сульфатидов можно оценивать с помощью любого соответствующего способа. Например, в некоторых вариантах осуществления накопление сульфатидов измеряют путем окрашивания альциановым синим. В некоторых вариантах осуществления накопление сульфатидов измеряют путем окрашивания с помощью LAMP-1.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы лечения синдрома метахроматической лейкодистрофии (MLD), включающие этап интратекального введения субъекту, нуждающемуся в лечении, рекомбинантного фермента арилсульфатазы А (ASA) в терапевтически эффективной дозе и с некоторым интервалом между введениями в течение периода лечения, достаточного для увеличения уровней биомаркера, сниженных при MLD, в ткани головного мозга по сравнению с исходным уровнем биомаркера.

Ткань головного мозга может представлять собой любую ткань головного мозга пациентов с MLD, в которой уровни биомаркера, как правило, снижены, например глубокое белое вещество головного мозга. Биомаркеры, которые могут быть применимыми, включают в себя определенные метаболиты, такие как N-ацетиласпартат. Уровни N-ацетиласпартата в тканях головного мозга можно оценивать, например, с помощью спектроскопии протонного магнитного резонанса.

Вовлечение в повреждение головного мозга.

В определенных вариантах осуществления эффективность лечения предусматривает показатель, связанный с вовлечением в повреждение головного мозга. В определенных вариантах осуществления предусмотрены способы лечения синдрома метахроматической лейкодистрофии (MLD), включающие этап интратекального введения субъекту, нуждающемуся в лечении, рекомбинантного фермента арилсульфатазы А в терапевтически эффективной дозе и с некоторым интервалом между введениями в течение периода лечения, достаточного для стабилизации или снижения степени вовлечения в повреждение головного мозга по сравнению с исходным уровнем.

Вовлечение в повреждение головного мозга можно оценивать, например, с помощью неинвазивных способов, таких как способы визуализации. Подходящие способы оценки включают в себя качественные, количественные и полуколичественные способы. Например, неинвазивный способ визуализации для оценки вовлечения в повреждение головного мозга у пациентов с MLD представляет собой определение с помощью MRI (магнитно-резонансной томографии) балла тяжести MLD. (См., например, Eichler et al. *AJNR Am. J. Neurodiagnol.* 2009 Nov; 30 (10):1893-7, полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки.) В некоторых вариантах осуществления введение рекомбинантного фермента ASA приводит к снижению у субъекта балла тяжести MLD, определяемого с помощью MRI, по сравнению с исходным уровнем. В некоторых вариантах осуществления введение рекомбинантного фермента ASA приводит к стабилизации балла тяжести MLD, определяемого с помощью MRI, у субъекта по сравнению с исходным уровнем.

Дополнительные показатели эффективности лечения.

Являющиеся объектом настоящего изобретения способы в качестве альтернативы или дополнительно приводят к одному или более другим показателям эффективности лечения, обсуждаемым в данном документе. В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к сниженной вакуолизации нейронов (например, нейронов, предусматривающих клетки Пуркинье). В определенных вариантах осуществления вакуолизация нейронов уменьшается на приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100% или больше по сравнению с контролем или исходным уровнем. В некоторых вариантах осуществления вакуолизация уменьшается по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз по сравнению с контролем или исходным уровнем.

В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к увеличенной активности фермента ASA в различных тканях. В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к увеличенной активности фермента ASA в целевых тканях головного мозга, нейронах спинного мозга и/или периферических целевых тканях. В некоторых вариантах осуществления активность фермента ASA увеличивается на приблизительно 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% или больше по сравнению с контролем или исходным уровнем. В некоторых вариантах осуществления активность фермента ASA увеличивается по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз или 10 раз по сравнению с контролем или исходным уровнем. В некоторых вариантах осуществления повышенная ферментативная активность ASA составляет по меньшей мере примерно 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600 нмоль/ч/мг или больше. В некоторых вариантах осуществления ферментативная активность ASA увеличивается в

поясничной области. В некоторых вариантах осуществления повышенная ферментативная активность ASA в поясничной области составляет по меньшей мере примерно 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 нмоль/ч/мг или больше.

В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к уменьшенному прогрессированию утраты когнитивной способности. В определенных вариантах осуществления прогрессирование утраты когнитивной способности уменьшается на приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100% или больше по сравнению с контролем или исходным уровнем. В некоторых вариантах осуществления лечение относится к пониженной задержке в развитии. В определенных вариантах осуществления задержка в развитии уменьшается на приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100% или больше по сравнению с контролем или исходным уровнем.

В некоторых вариантах осуществления лечение относится к увеличенной выживаемости (например, времени выживаемости). Например, лечение может приводить к увеличенной ожидаемой продолжительности жизни пациента. В некоторых вариантах осуществления лечение в соответствии с настоящим изобретением приводит к ожидаемой продолжительности жизни пациента, увеличенной более чем на приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 100%, приблизительно 105%, приблизительно 110%, приблизительно 115%, приблизительно 120%, приблизительно 125%, приблизительно 130%, приблизительно 135%, приблизительно 140%, приблизительно 145%, приблизительно 150%, приблизительно 155%, приблизительно 160%, приблизительно 165%, приблизительно 170%, приблизительно 175%, приблизительно 180%, приблизительно 185%, приблизительно 190%, приблизительно 195%, приблизительно 200% или больше по сравнению со средней ожидаемой продолжительностью жизни одного или более контрольных индивидуумов со сходным заболеванием без лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение в соответствии с настоящим изобретением приводит к ожидаемой продолжительности жизни пациента, увеличенной более чем на приблизительно 6 месяцев, приблизительно 7 месяцев, приблизительно 8 месяцев, приблизительно 9 месяцев, приблизительно 10 месяцев, приблизительно 11 месяцев, приблизительно 12 месяцев, приблизительно 2 года, приблизительно 3 года, приблизительно 4 года, приблизительно 5 лет, приблизительно 6 лет, приблизительно 7 лет, приблизительно 8 лет, приблизительно 9 лет, приблизительно 10 лет или больше по сравнению со средней ожидаемой продолжительностью жизни одного или более контрольных индивидуумов со сходным заболеванием без лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение в соответствии с настоящим изобретением приводит к долгосрочной выживаемости пациента. Используемый в данном документе термин "долгосрочная выживаемость" относится ко времени выживаемости или ожидаемой продолжительности жизни, составляющим более чем приблизительно 40, 45, 50, 55, 60 лет или больше.

Термины "улучшать", "увеличивать" или "снижать", используемые в данном документе, указывают на значения по сравнению с контролем. В некоторых вариантах осуществления подходящий контроль представляет собой измерение на исходном уровне, такое как измерение у одного и того же индивидуума до начала лечения, описанного в данном документе, или измерение у контрольного индивидуума (или нескольких контрольных индивидуумов) в отсутствие лечения, описанного в данном документе. "Контрольным индивидуумом" является индивидуум, пораженный одной и той же формой MLD (например, поздней младенческой, ювенильной или взрослой формой), который имеет приблизительно такой же возраст и/или пол, что и индивидуум, подвергаемый лечению (для гарантирования того, что стадии заболевания у индивидуума, подвергаемого лечению, и контрольного(ых) индивидуума(ов) являются сопоставимыми).

Субъекты.

Индивидуум (также называемый "пациентом" или "субъектом"), подвергаемый лечению, является индивидуумом (например, плодом, младенцем, ребенком, подростком или взрослым человеком), у которого имеется MLD или вероятность развития MLD (т.е. наличие риска развития MLD).

Во многих вариантах осуществления субъектом является млекопитающее, например человек.

В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет шестнадцать лет или меньше, например двенадцать лет или меньше, девять лет или меньше, шесть лет или меньше, четыре года или меньше, три года или меньше, два года или меньше, 18 месяцев или меньше, 12 месяцев или меньше или 6 месяцев или меньше.

Субъекты могут иметь любую из форм MLD, например взрослую форму, ювенильную форму или позднюю младенческую форму.

У субъектов может проявляться по меньшей мере один симптом MLD, обсуждаемый в данном документе, или не проявляться на момент начала лечения.

У субъектов может быть диагностировано MLD или не диагностировано на момент начала лечения. Например, в некоторых вариантах осуществления у субъекта не было идентифицировано наличие риска развития MLD.

У индивидуума могут наблюдаться остаточная эндогенная экспрессия и/или активность ASA или отсутствие измеряемой активности. Например, у индивидуума, имеющего MLD, могут наблюдаться уровни экспрессии ASA, составляющие меньше чем приблизительно 30-50%, меньше чем приблизительно 25-30%, меньше чем приблизительно 20-25%, меньше чем приблизительно 15-20%, меньше чем приблизительно 10-15%, меньше чем приблизительно 5-10%, меньше чем приблизительно 0,1-5% от нормальных уровней экспрессии ASA.

В некоторых вариантах осуществления индивидуумом является индивидуум, у которого недавно диагностировали заболевание. Как правило, раннее лечение (лечение, которое начинают в кратчайшие сроки после постановки диагноза) имеет большое значение для сведения к минимуму эффектов заболевания и повышения до максимума благоприятных эффектов лечения.

Иммунная толерантность.

Обычно интратекальное введение терапевтического средства (например, заместительного фермента) в соответствии с настоящим изобретением не приводит к тяжелым неблагоприятным эффектам у субъекта. Как используется в данном документе, тяжелые неблагоприятные эффекты приводят без ограничения к значительному иммунному ответу, токсичности или летальному исходу. Используемый в данном документе термин "значительный иммунный ответ" относится к сильным или серьезным иммунным ответам, таким как адаптивные Т-клеточные иммунные ответы.

Таким образом, во многих вариантах осуществления являющиеся объектом настоящего изобретения способы в соответствии с настоящим изобретением не предусматривают сопутствующую иммунодепрессивную терапию (т.е. любую иммунодепрессивную терапию, применяемую в качестве предварительного лечения/прекондиционирования или параллельно способу). В некоторых вариантах осуществления являющиеся объектом настоящего изобретения способы в соответствии с настоящим изобретением не предусматривают индукцию иммунной толерантности у субъекта, подвергаемого лечению. В некоторых вариантах осуществления являющиеся объектом настоящего изобретения способы в соответствии с настоящим изобретением не предусматривают предварительного лечения субъекта или проведения у него преко́ндиционирования с помощью иммунодепрессивного в отношении Т-клеток средства.

В некоторых вариантах осуществления интратекальное введение терапевтических средств может обеспечивать иммунный ответ на эти средства. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления полезным может быть обеспечение у субъекта, получающего заместительный фермент, толерантности к заместительной ферментной терапии. Иммунную толерантность можно индуцировать с помощью различных способов, известных из уровня техники. Например, можно применять изначальный режим введения иммунодепрессивного в отношении Т-клеток средства, такого как циклоспорин А (CsA), и антипролиферативного средства, такого как азатиоприн (Aza), в течение 30-60 дней в сочетании с еженедельным проведением интратекальных инфузий низких доз требуемого заместительного фермента.

Любое иммунодепрессивное средство, известное специалисту в данной области, можно использовать вместе с комбинированной терапией по настоящему изобретению. Такие иммунодепрессивные средства включают в себя без ограничения циклоспорин, FK506, рапамицин, CTLA4-Ig и средства, направленные против TNF, такие как этанерцепт (см., например, Moder, 2000, Ann. Allergy Asthma Immunol. 84, 280-284; Nevins, 2000, Curr. Opin. Pediatr. 12, 146-150; Kurlberg et al., 2000, Scand. J. Immunol. 51, 224-230; Ideguchi et al., 2000, Neuroscience 95, 217-226; Potteret et al., 1999, Ann. N.Y. Acad. Sci. 875, 159-174; Slavik et al., 1999, Immunol. Res. 19, 1-24; Gaziev et al., 1999, Bone Marrow Transplant. 25, 689-696; Henry, 1999, Clin. Transplant. 13, 209-220; Gummert et al., 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10, 1366-1380; Qi et al., 2000, Transplantation 69, 1275-1283). Антитело к рецептору IL2 (субъединице альфа) даклизумаб (например, Zenarax.TM.), которое продемонстрировало эффективность у пациентов, которым проводили трансплантацию, также можно применять в качестве иммунодепрессивного средства (см., например, 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). Дополнительные иммунодепрессивные средства включают в себя без ограничения антитело к CD2 (Branco et al., 1999, Transplantation 68, 1588-1596; Przepiorka et al., 1998, Blood 92, 4066-4071), антитело к CD4 (Marinova-Mutafchieva et al., 2000, Arthritis Rheum. 43, 638-644; Fishwild et al., 1999, Clin. Immunol. 92, 138-152) и антитело к лиганду CD40 (Hong et al., 2000, Semin. Nephrol. 20, 108-125; Chirmule et al., 2000, J. Virol. 74, 3345-3352; Ito et al., 2000, J. Immunol. 164, 1230-1235).

Введение.

Являющиеся объектом настоящего изобретения способы по настоящему изобретению охватывают однократные, а также многократные введения терапевтически эффективного количества терапевтических средств (например, заместительных ферментов), описанных в данном документе. Терапевтические средства (например, заместительные ферменты) можно вводить с равными интервалами в зависимости от характера, тяжести и степени выраженности состояния (например, лизосомной болезни накопления) у субъекта. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество терапевтических средств (например, заместительных ферментов) по настоящему изобретению можно периодически вводить интратекально с равными интервалами (например, один раз в год, один раз в шесть месяцев,

один раз в пять месяцев, один раз в три месяца, каждые два месяца (один раз в два месяца), ежемесячно (один раз в месяц), каждые две недели (один раз в две недели), еженедельно).

В некоторых вариантах осуществления интратекальное введение можно применять в сочетании с другими путями введения (например, внутривенным, подкожным, внутримышечным, парентеральным, трансдермальным или чресслизистым (например, пероральным или назальным)). В некоторых вариантах осуществления введение такими другими путями (например, внутривенное введение) можно осуществлять не чаще чем введение каждые две недели, ежемесячно, один раз в два месяца, один раз в три месяца, один раз в четыре месяца, один раз в пять месяцев, один раз в шесть месяцев, один раз в год.

Используемый в данном документе термин "терапевтически эффективное количество" в широком смысле определяется как общее количество терапевтического средства, содержащегося в фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Обычно терапевтически эффективное количество является достаточным для достижения значимого благоприятного эффекта у субъекта (например, лечения, модулирования, излечения, предупреждения и/или уменьшения интенсивности первопричинного заболевания или состояния). Например, терапевтически эффективным количеством может являться количество, достаточное для достижения требуемого терапевтического и/или профилактического эффекта, такое как количество, достаточное для модулирования рецепторов лизосомных ферментов или их активности, с обеспечением, таким образом, лечения такой лизосомной болезни накопления или ее симптомов (например, снижения количества "полосатых телец" или устранения их присутствия или частоты их появления или клеточной вакуолизации после введения субъекту композиций по настоящему изобретению). Обычно количество терапевтического средства (например, рекомбинантного лизосомного фермента), вводимого субъекту, нуждающемуся в этом, будет зависеть от характеристик субъекта. Такие характеристики включают в себя состояние, степень тяжести заболевания, общее состояние здоровья, возраст, пол и вес тела субъекта. Средний специалист в данной области с легкостью сможет определить соответствующие дозы в зависимости от этих и других взаимосвязанных факторов. В дополнение, как объективные, так и субъективные анализы можно необязательно использовать для идентификации оптимальных диапазонов доз.

Терапевтически эффективное количество обычно вводят согласно режиму дозирования, который может предусматривать несколько разовых доз. Для любого конкретного терапевтического белка терапевтически эффективное количество (и/или соответствующая разовая доза в рамках эффективного режима дозирования) может варьироваться, например, в зависимости от пути введения, от комбинации с другими фармацевтическими средствами. Кроме того, конкретное терапевтически эффективное количество (и/или разовая доза) для любого конкретного пациента может зависеть от ряда факторов, включающих нарушение, подвергаемое лечению, и тяжесть нарушения; активность конкретного используемого фармацевтического средства; конкретную используемую композицию; возраст, вес тела, общее состояние здоровья, пол и режим питания пациента; время введения, путь введения и/или скорость экскреции или метаболизма конкретного используемого слитого белка; продолжительность лечения и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет или превышает приблизительно 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 мг. В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет или превышает приблизительно 10 мг. В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет или превышает приблизительно 30 мг. В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет или превышает приблизительно 100 мг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет меньше чем приблизительно 500, 450, 400, 350, 300, 250 или 200 мг. В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет меньше чем приблизительно 200 мг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза находится в диапазоне приблизительно 1-100 мг, приблизительно 5-100 мг, приблизительно 10-90 мг, приблизительно 10-80 мг, приблизительно 5-70 мг, приблизительно 5-60 мг, приблизительно 5-60 мг, приблизительно 10-100 мг, приблизительно 10-90 мг, приблизительно 10-80 мг, приблизительно 10-70 мг, приблизительно 10-60 мг или приблизительно 10-50 мг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза находится в диапазоне от приблизительно 100 мг до приблизительно 200 мг.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза находится в диапазоне от приблизительно 0,005 мг/кг веса головного мозга до 500 мг/кг веса головного мозга, например от приблизительно 0,005 мг/кг веса головного мозга до 400 мг/кг веса головного мозга, от приблизительно 0,005 мг/кг веса головного мозга до 300 мг/кг веса головного мозга, от приблизительно 0,005 мг/кг веса головного мозга до 200 мг/кг веса головного мозга, от приблизительно 0,005 мг/кг веса головного мозга до 100 мг/кг веса головного мозга, от приблизительно 0,005 мг/кг веса головного мозга до 90 мг/кг веса головного мозга, от приблизительно 0,005 мг/кг веса головного мозга до 80 мг/кг веса головного мозга, от приблизительно 0,005 мг/кг веса головного мозга до 70 мг/кг веса головного мозга, от приблизительно 0,005 мг/кг веса головного мозга до 60 мг/кг веса головного мозга, от приблизительно 0,005 мг/кг веса головного мозга до 50 мг/кг веса головного мозга, от приблизительно 0,005 мг/кг веса головного мозга до 40 мг/кг веса головного мозга, от приблизительно 0,005 мг/кг веса головного мозга до 30 мг/кг веса го-

ловного мозга, от приблизительно 0,005 мг/кг веса головного мозга до 25 мг/кг веса головного мозга, от приблизительно 0,005 мг/кг веса головного мозга до 20 мг/кг веса головного мозга, от приблизительно 0,005 мг/кг веса головного мозга до 15 мг/кг веса головного мозга, от приблизительно 0,005 мг/кг веса головного мозга до 10 мг/кг веса головного мозга.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза превышает приблизительно 0,1 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 0,5 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 1,0 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 3 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 5 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 10 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 15 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 20 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 30 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 40 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 50 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 60 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 70 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 80 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 90 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 100 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 150 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 200 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 250 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 300 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 350 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 400 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 450 мг/кг веса головного мозга, превышает приблизительно 500 мг/кг веса головного мозга.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза также может быть определена в мг/кг веса тела. Как будет понятно специалисту в данной области, значения веса головного мозга и значения веса тела могут коррелировать. Dekaban AS. "Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights," *Ann Neurol* 1978; 4:345-56. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления дозы можно превратить, как показано в табл. 4.

Таблица 4

Корреляция между значениями веса головного мозга, значениями веса тела и возрастом лиц мужского пола

Возраст (года)	Вес головного мозга (кг)	Вес тела (кг)
3 (31-43 месяца)	1,27	15,55
4-5	1,30	19,46

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза также может быть определена в мг/15 куб. см. CSF. Как будет понятно специалисту в данной области, терапевтически эффективные дозы в пересчете на значения веса головного мозга и значения веса тела можно превратить в мг/15 куб. см. CSF. Например, объем CSF у взрослых людей составляет примерно 150 мл (Johanson CE, et al. "Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease," *Cerebrospinal Fluid Res.* 2008 May 14;5:10). Таким образом, инъекции взрослым однократной дозы от 0,1 до 50 мг белка будут составлять дозы примерно от 0,01 мг/15 см³. CSF (0,1 мг) до 5,0 мг/15 см³. CSF (50 мг) для взрослых.

Также следует понимать, что для любого конкретного субъекта конкретные режимы дозирования необходимо корректировать с течением времени в соответствии с индивидуальной необходимостью и профессиональной оценкой специалиста, осуществляющего введение или контролирующего введение заместительной ферментной терапии, и что диапазоны доз, изложенные в данном документе, приводятся только в качестве примера и не предполагают ограничения объема или практической реализации заявляемого изобретения.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантный фермент арилсульфатазу А вводят с некоторым интервалом между введениями, например с равным интервалом. Например, интервал между введениями может составлять неделю, две недели или месяц.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантный фермент арилсульфатазу А вводят в течение периода лечения. Период лечения может быть предварительно определен, или он может быть скорректирован в зависимости от ответа пациента на лечение, в том числе без ограничения возможных нежелательных симптомов и/или свидетельств, указывающих на эффективность лечения, как обсуждается в данном документе. Например, период лечения может составлять по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 24 месяца или даже еще больше.

Считается, что в некоторых вариантах осуществления лечение субъектов будет осуществляться в течение определенного периода лечения, при этом обеспечивается определенный период, в ходе которого они не получают лечение или получают альтернативное лечение, а затем снова обеспечивается другой период лечения.

Наборы.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены наборы или другие изделия, которые содержат состав по настоящему изобретению и предусматривают инструкции по его разведению (в случае с лиофилизированной формой) и/или применению. Наборы или другие изделия могут включать в себя контейнер, IDDD, катетер и любые другие изделия, устройства или оборудование, применимые при ин-

тракеальном введении и ассоциированном с ним хирургическом вмешательстве. Подходящие контейнеры включают в себя, например, бутылки, флаконы, шприцы (например, предварительно заполненные шприцы), ампулы, картриджи, резервуары или шприцы "luc-ject". Контейнер может быть изготовлен из ряда материалов, таких как стекло или пластмасса. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой предварительно заполненный шприц. Подходящие предварительно заполненные шприцы включают в себя без ограничения шприцы из боросиликатного стекла с нанесенным кремнийорганическим соединением путем спекания, шприцы из боросиликатного стекла с нанесенным кремнийорганическим соединением путем распыления или шприцы из пластичного полимера, не содержащие кремнийорганического соединения.

Как правило, контейнер может содержать составы и этикетку, расположенную на поверхности контейнера или ассоциированную с ним, которая может давать указания по разведению и/или применению. Например, этикетка может указывать на то, что состав разведен до концентраций белка, описанных выше. Этикетка может дополнительно указывать на то, что состав является применимым или предназначен, например, для ИТ введения. В некоторых вариантах осуществления контейнер может содержать однократную дозу стабильного состава, содержащего терапевтическое средство (например, заместительный фермент). В различных вариантах осуществления однократная доза стабильного состава присутствует в объеме, составляющем менее чем приблизительно 15, 10, 5,0, 4,0, 3,5, 3,0, 2,5, 2,0, 1,5, 1,0 или 0,5 мл. В качестве альтернативы, контейнер, содержащий состав, может представлять собой многократно применяемый флакон, который позволяет осуществлять повторные введения (например, 2-6 введений) состава. Наборы или другие изделия могут дополнительно включать в себя второй контейнер, содержащий подходящий разбавитель (например, BWFI, физиологический раствор, забуференный физиологический раствор). При смешивании разбавителя и состава конечная концентрация белка в разведенном составе обычно будет составлять по меньшей мере 1 мг/мл (например, по меньшей мере 5 мг/мл, по меньшей мере 10 мг/мл, по меньшей мере 25 мг/мл, по меньшей мере 50 мг/мл, по меньшей мере 75 мг/мл, по меньшей мере 100 мг/мл). В некоторых вариантах осуществления конечная концентрация белка составляет по меньшей мере 25 мг/мл, например 30 мг/мл. Наборы или другие изделия могут дополнительно включать в себя другие материалы, целесообразные с коммерческой и потребительской точки зрения, в том числе другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, IDDD, катетеры, шприцы и листки-вкладыши с инструкциями по применению.

Более полное понимание настоящего изобретения будет достигаться при помощи ссылки на ниже следующие примеры. Однако их не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения. Хотя определенные соединения, композиции и способы, описанные в данном документе, были конкретно описаны в соответствии с определенными вариантами осуществления, ниже следующие примеры служат лишь в качестве иллюстрации соединений по настоящему изобретению и не предполагают его ограничения. Все цитируемые литературные источники включены посредством ссылки.

Примеры

Пример 1. Интракеальное введение рекомбинантной арилсульфатазы А является безопасным и облегчает симптомы у пациентов-людей с поздней младенческой и ювенильной метакроматической лейкодистрофией.

Клинические формы метакроматической лейкодистрофии, как правило, подразделяются с учетом возраста начала проявления, при этом поздняя младенческая метакроматическая лейкодистрофия ассоциирована с началом проявления в возрасте трех лет или меньше, ювенильная метакроматическая лейкодистрофия ассоциирована с началом проявления в возрасте от четырех до шестнадцати лет и взрослая метакроматическая лейкодистрофия ассоциирована с началом проявления в возрасте больше шестнадцати лет.

Дети с метакроматической лейкодистрофией, как правило, испытывают ухудшение двигательной функции, а у детей с поздней младенческой метакроматической лейкодистрофией наблюдается показатель пятилетней выживаемости, составляющий только приблизительно 52% (Mahmood A. et al. J. Child Neurol. 2010; 25:572-80). В настоящее время не существует одобренных фармакологических средств для лечения.

В данном примере описано нерандомизированное открытое клиническое исследование фазы 1/2 с повышением дозы для оценки безопасности и эффективности рекомбинантной арилсульфатазы А (ASA) человека у детей с метакроматической лейкодистрофией (MLD), например имеющих позднюю младенческую или ювенильную метакроматическую лейкодистрофию. Для оценки эффективности анализировали эффект лечения рекомбинантной ASA человека в отношении функции крупной моторики, вовлечения в повреждение головного мозга и уровней сульфатидов в CSF.

Восемнадцать пациентов мужского или женского пола включали в исследование, и они соответствовали всем из ниже следующих критериев отбора: диагноз MLD, подтвержденный на основании дефицита ASA (с помощью анализа лейкоцитов) и повышенных уровней сульфатидов в моче пациента; появление первых симптомов заболевания в возрасте 30 месяцев или раньше; ходячие на момент отбора (например, с минимальным необходимым уровнем функции, определяемым как способность стоять и проходить 10 шагов вперед с удерживанием за одну руку); возраст, составляющий меньше двенадцати лет на

момент включения; и присутствие неврологических признаков MLD при скрининговом обследовании.

Критерии исключения включали: наличие в анамнезе трансплантации гемопоэтических стволовых клеток; наличие любой известной или предполагаемой гиперчувствительности к анестезии или неприемлемо высокого риска осложнений при проведении анестезии вследствие скомпрометированности дыхательных путей или других состояний; наличие любого другого медицинского состояния, серьезного интеркуррентного заболевания или ослабляющего обстоятельства, которое будет препятствовать участию в исследовании. План исследования показан на фиг. 1.

После включения пациентов подвергали скринингу для оценки их пригодности на основании критериев, изложенных выше, а также для получения информированного согласия. Также можно осуществлять предхирургические оценки безопасности в отношении хирургической имплантации IDDD. Соблюдали стандартные для медицинских учреждений процедуры хирургического вмешательства.

Пациентов включали в одну из трех когорт повышающихся доз (n=6 пациентов на когорту с дозой 10, 30 или 100 мг) рекомбинантной ASA человека, вводимых интратекально. При необходимости пациенты получали седацию по усмотрению лица, осуществляющего введение. Основанием для любого повышения дозы у заново включенных пациентов до следующего уровня было рассмотрение данных о безопасности, полученных для пациентов из когорты с более низкой дозой, независимым комитетом по мониторингу данных безопасности и представителями компании Shire Human Genetic Therapies, и только после того, как пациенты получили по меньшей мере две дозы. В табл. 5 показаны демографические характеристики пациентов, участвующих в исследовании.

Таблица 5

Характеристика		10 мг rhASA (n=6)	30 мг rhASA (n=6)	100 мг rhASA (n=6)
Возраст на момент включения, месяцы	Среднее значение \pm среднеквадратическое отклонение	31,5 \pm 11,5	47,3 \pm 20,2	52,3 \pm 31,1
	Диапазон	23-54	31-81	23-107
Мальчики, n		3	3	5
Этническая принадлежность, n	Белые	5	4	2
	Азиаты	0	0	4
	Другие	1	2	0

Вкратце, порт устанавливали подкожно над ребром, при этом катетер помещали в позвоночный канал на уровне поясницы. Если устройство переставало функционировать в любой момент времени, то его удаляли и заменяли. Применяли PORT-A-CATH II® либо SOPH-A-PORT® Mini S, последний из которых оказался лучше переносимым. (См. табл. 6.) Ряд оценок CSF осуществляли на исходном уровне и на каждом визите исследования перед введением дозы. Введение доз рекомбинантной ASA человека осуществляли посредством имплантированного IDDD один раз в две недели в течение 38 недель (начиная с недели 0) в общей сложности в количестве 20 инъекций. IDDD применяли как для отбора образцов CSF, так и для инъекций рекомбинантной ASA человека. Образцы для измерений с целью оценки безопасности/эффективности отбирали один раз в две недели перед введением дозы.

Безопасность.

В табл. 6 перечислены нежелательные явления, сообщаемые в исследовании, при этом показанные количества представляют количество пациентов. Как показано в табл. 6, серьезные нежелательные явления, связанные с лечением, летальные исходы или случаи преждевременного завершения исследования отсутствовали в любой из трех когорт (введение дозы 10, 30 или 100 мг).

Таблица 6

Сообщаемое явление	10 мг rhASA (n=6)	30 мг rhASA (n=6)	100 мг rhASA (n=6)

Любое нежелательное явление (АЕ)	6	6	6
Любое АЕ, связанное с IDDD	3	3	4
Летальный исход	0	0	0
Преждевременное завершение исследования вследствие АЕ	0	0	0
Любое серьезное АЕ ^а	5	4	4
Любое АЕ, связанное с лечением ^а	3	4	4
Нарушения со стороны крови и лимфатической системы	0	2	0
Общие нарушения и реакции в месте введения	3	1	0
Лабораторные и инструментальные данные (результаты клинико-лабораторных исследований) ^б	3	1	1
Нарушения со стороны кожи и подкожных тканей	2	2	0

^аЯвления согласно системно-органному классу приводятся, если они наблюдаются по меньшей мере у двух пациентов в любой группе.

^бВключают в себя повышенные значения уровня аланинаминотрансферазы, кровяного давления, числа эозинофилов и уровня γ -глутамилтрансферазы. АЕ - нежелательные явления; IDDD - устройство для интратекальной доставки лекарственных средств; rhASA - рекомбинантная арилсульфатаза А человека.

Таблица 7

Серьезное АЕ, связанное с IDDD	PORT-A-CATH II®		SOPH-A-PORT® Mini S
	10 мг rhASA (n=6)	30 мг rhASA (n=5) ^а	100 мг rhASA (n=6)
Выход из строя устройства	2	0	1
Смещение устройства	1	1	0
Сбой функционирования устройства	1	0	0
Закупоривание устройства	1	0	0
Излияние в месте имплантации	1	0	1
Инфекция в месте имплантации	0	0	1
Количество пациентов	≥ 1 серьезное АЕ, связанное с IDDD, сообщаемое четырьмя пациентами		Все серьезные АЕ, связанные с IDDD, сообщаемые одним пациентом

^аОдному пациенту имплантировали SOPH-A-PORT® Mini S в начале исследования. АЕ - нежелательные явления; IDDD - устройство для интратекальной доставки лекарственных средств; rhASA - рекомбинантная арилсульфатаза А человека.

Двигательная функция.

Двигательную функцию оценивали с помощью теста оценки функционирования крупной моторики-88 (GMFM-88), клинического инструмента, разработанного для количественной оценки изменений функции крупной моторики у детей. Пункты в GMFM-88 включают в себя виды активности, предусматривающие навыки лежания, перекачивания, ходьбы, бега и прыжков.

Изменения суммарного балла GMFM-88 во всех группах лечения на 40 неделе показаны на фиг. 2. На 40 неделе ухудшение двигательной функции было количественно более низким в группе пациентов, которым вводили 100 мг, чем в других группах (более низкие дозы), хотя статистически значимых различий между группами не выявляли.

Однако выявляли статистически значимую взаимосвязь между исходным суммарным баллом GMFM-88 и эффектом лечения (оцениваемым по изменению балла GMFM-88 от исходного уровня) ($p=0,0067$ в ANCOVA (ковариационном анализе); см. фиг. 3). На 40 неделе среди детей с исходными суммарными баллами GMFM-88, превышающими 40%, меньшее ухудшение двигательной функции наблюдалось у тех детей, которые получали лечение с помощью 100 мг rhASA, чем в других группах. (См.

фиг. 4.)

Вовлечение в повреждение головного мозга.

Балл тяжести метахроматической лейкодистрофии, определяемый с помощью магнитно-резонансной томографии (MLD MRI), является количественным показателем вовлечения в повреждение головного мозга. (См., например, Eichler et al. AJNR Am. J. Neuroradiol. 2009 Nov; 30(10):1893-7.) Данные MRI пациентов на 40 неделе оценивал один исследователь слепым способом.

Как показано на фиг. 5, на 40 неделе балл тяжести MLD, определяемый с помощью MRI, оказался устойчивым в когорте с дозой 100 мг, которая характеризовалась небольшим уменьшением балла. Изменение балла тяжести MLD, определяемого с помощью MRI, в когорте с дозой 100 мг значительно отличалось от изменений, наблюдаемых в когортах с дозой 10 и 30 мг, которые характеризовались увеличением баллов тяжести MLD, определяемых с помощью MRI, на протяжении курса лечения.

Уровни сульфатидов в спинномозговой жидкости.

Концентрации сульфатида, метаболита, который накапливается у пациентов с метахроматической лейкодистрофией, изучали в спинномозговой жидкости пациентов. Как показано на фиг. 6, небольшие снижения концентраций сульфатидов наблюдались во всех когортах на 40 неделе.

Обсуждение.

Из результатов, описанных в этом примере, видно, что интратекальное введение рекомбинантной ASA человека пациентам с MLD характеризуется приемлемым профилем безопасности и стабилизирует заболевание и/или замедляет его прогрессирование. Поскольку в настоящее время не существует доступных средств для лечения этого прогрессирующего и приводящего в конечном счете к смертельному исходу заболевания, интратекальное введение рекомбинантной ASA человека представляет перспективный подход к лечению MLD.

Пример 2. Дополнительные оценки безопасности и эффективности рекомбинантной арилсульфатазы А для лечения метахроматической лейкодистрофии.

Пациентов с поздней младенческой или ювенильной метахроматической лейкодистрофией включали в клиническое исследование, план и критерии включения и исключения которого были сходными с таковыми, описанными в примере 1. Для дополнительной оценки безопасности рекомбинантной ASA человека при конкретных дозах проводили физикальное и неврологическое обследование пациентов и осуществляли мониторинг их показателей жизненно-важных функций. В дополнение, проводили комплекс анализов, включающий анализ мочи, биохимический анализ сыворотки крови, определение уровней сульфатидов в сыворотке крови, общий анализ крови, обычные анализы спинномозговой жидкости и анализы биомаркеров в спинномозговой жидкости, а также электрокардиографию. Кроме того, измеряли концентрации антитела к rhASA и/или уровни метаболитов (например, сульфатида, лиосульфатида и/или N-ацетиласпартата) в различных жидкостях, таких как спинномозговая жидкость, моча и кровь. Уровни метаболитов также можно оценивать в глубоком белом веществе головного мозга с помощью спектроскопии протонного магнитного резонанса.

Чтобы оценить эффективность, оценивали одно или более изменений в балле GMFM-88 от исходного уровня, показателей проводимости двигательного нерва (таких как скорость проводимости нерва, суммарный потенциал действия двигательного нерва и дистальная латентность), показателей проводимости чувствительного нерва (таких как скорость проводимости нерва, амплитуда и дистальная латентность), данных магнитно-резонансной томографии и/или спектроскопии магнитного резонанса для выявления связанных с MLD аномалий, значениях потенциала, вызванного соматосенсорным раздражением, функциональной эндоскопической оценке глотания и вызванном слуховом потенциале в стволе головного мозга.

Пример 3. Уменьшение уровней сульфатидов в спинномозговой жидкости с течением времени.

В клиническое исследование включали детей и им вводили 10, 30 или 100 мг рекомбинантной арилсульфатазы А человека путем интратекального введения один раз в две недели в течение 40 недель. На фиг. 7 представлены данные от нескольких детей на когорту, и они включают в себя данные от двух пар сиблингов (одна пара - доза 30 мг, и другая пара - доза 100 мг). Как показано на фиг. 7, с течением времени наблюдалась общая тенденция к уменьшению уровней сульфатидов в спинномозговой жидкости, особенно заметная у детей, которым давали дозы 30 и 100 мг. Более того, у детей, которым вводили 100 мг рекомбинантной арилсульфатазы А человека, уровни сульфатидов в конечном счете уменьшались таким образом, что они не выходили за верхний предел диапазонов нормальных значений.

Пример 4. Интратекально доставляемая rhASA хорошо переносилась в течение 104 недель.

Три когорты, описанные в примерах 1-3, были пригодны для долгосрочного дополнительного исследования, которое включало анализ безопасности и оценки других исходов вплоть до 104 недели (включая начальное 40-недельное исследование с повышением дозы (фиг. 8)). Дети с MLD были пригодны для включения в начальное 40-недельное исследование, если их возраст составлял меньше 12 лет; первые симптомы MLD у них появлялись в возрасте 30 месяцев или раньше и на момент скрининга они могли пройти 10 шагов с удерживанием за одну руку. Пригодных пациентов последовательно включали в одну из трех когорт повышающихся доз (когорта 1, 10 мг rhASA; когорта 2, 30 мг rhASA; когорта 3, 100 мг rhASA). Каждому пациенту хирургическим путем имплантировали устройство для интратекаль-

ной доставки лекарственных средств (IDDD) перед получением их первой дозы. Одиннадцати пациентам на начальном этапе исследования имплантировали PORT-A-CATH II (Smiths Medical ASD, Inc., Сент-Пол, Миннесота, США), и восьми пациентам имплантировали SOPH-A-PORT Minis (Sophysa, Орсе, Франция) (включая одного пациента, который перешел на это устройство после первоначальной имплантации PORT-A-CATH II).

Дети получали интратекальные инъекции rhASA один раз в 2 недели. После начального 40-недельного исследования дозу rhASA индивидуально повышали в когортах 1 и 2 (когорта 1, поэтапно), при этом все пациенты в конечном счете получали 100 мг rhASA в текущем исследовании. Решение к переходу на более высокую дозу основывалось на рассмотрении данных безопасности комитетом по мониторингу данных после того, как пациенты получили по меньшей мере две дозы из предшествующего уровня дозы. Оценкой первичного исхода была безопасность rhASA и IDDD. Другие основные исходы, оцениваемые на 104 неделе, включали в себя изменение двигательной функции, оцениваемое с помощью суммарного балла теста оценки функционирования крупной моторики-88 (GMFM-88) (диапазон 0-100%); изменение степени тяжести MLD, оцениваемое с помощью магнитно-резонансной томографии (MRI) и схожего способа оценки в баллах по Eichler et al. (диапазон 0-34, при этом более высокий балл указывает на большую степень тяжести заболевания) (см., например, Eichler et al. AJNR Am J Neuroradiol. 2009 Nov; 30(10):1893-7); изменение уровней N-ацетиласпартата (NAA) в белом веществе головного мозга, оцениваемое с помощью спектроскопии магнитного резонанса, и изменение концентрации сульфатидов в спинномозговой жидкости (CSF). В табл. 8 показаны демографические характеристики пациентов, участвующих в исследовании.

Таблица 8. Демографические характеристики пациентов

Характеристика	Когорта 1 (n=6)	Когорта 2 (n=6)	Когорта 3 (n=6)
Возраст на момент включения, месяцы	31,5 ± 11,5 (26,5, 23-54)	47,3 ± 20,2 (39,5, 31-81)	52,3 ± 31,1 (41,0, 23-107)
Мальчики, n	3	3	5
Этническая принадлежность, n ^a			
Белые	5	4	2
Азиаты	0	0	4
Другие	1	2	0
Возраст на момент начала проявления симптомов MLD, месяцы	17,3 ± 7,1 (17,0, 6-27)	23,3 ± 3,3 (24,0, 18-28)	24,0 ± 4,5 (24,5, 16-30)
Продолжительность лечения, недели ^b	137,2 ± 63,5 (159,9, 28,3с-195,9)	134,7 ± 12,2 (128,9, 122,1-150,1)	111,2 ± 5,2 (110,6, 106,1-117,1)

Данные для возраста на момент включения, возраста на момент начала проявления симптомов и продолжительности воздействия показаны как среднее значение ± среднее квадратическое отклонение (медианное значение, диапазон).

^aДетей включали в исследование в пяти странах: Франция (n=7), Дания (n=4), Австралия (n=3), Германия (n=2) и Бразилия (n=2). Два пациента из Австралии переезжали в Японию в ходе дополнительного исследования.

^bВремя от введения первой дозы до введения последней вводимой дозы rhASA.

^cОдин ребенок преждевременно покинул 40-недельное исследование с повышением дозы вследствие отсутствия эффективности. MLD, метахроматическая лейкоцисторфия; rhASA, рекомбинантная арилсульфатаза А человека.

Безопасность.

Краткое описание нежелательных явлений (АЕ), отмеченных на протяжении вплоть до 104 недели, представлено в табл. 9. Одиннадцать пациентов испытывали по меньшей мере одно АЕ, связанное с IDDD, и 14 пациентов испытывали по меньшей мере одно серьезное АЕ (SAE). Шесть пациентов испытывали по меньшей мере одно SAE, связанное с IDDD. Тринадцать пациентов испытывали по меньшей мере одно АЕ, которое по мнению исследователей было связано с исследуемым лечением, наиболее часто - лихорадку (n=6).

Таблица 9. Краткое описание нежелательных явлений, наблюдаемых на протяжении вплоть до 104 недели

Сообщаемое явление	Когорта 1 (n=6)	Когорта 2 (n=6)	Когорта 3 (n=6)
ЛЮБОЕ АЕ	6	6	6
Любое АЕ, связанное с IDDD	5	2	4
Летальный исход	0	1	0
Преждевременное завершение исследования вследствие АЕ	0	0	0
Любое SAE ^a	5	5	4
Судорога	2	2	1
Обезвоживание	1	1	1
Дисфагия	2	1	1
Фибриллярная судорога	2	1	3
Мышечная спастичность	2	2	0
Назофарингит	2	1	0
Лихорадка	2	0	1
Эпилептическое состояние	0	1	2
Вирусная инфекция	1	1	1
Любое SAE, связанное с IDDD ^b	4	1	1
Смещение устройства	0	1	0
Выход из строя устройства	2	1	1
Сбой функционирования устройства	2	0	0
Излияние в месте имплантации	1	0	1
Инфекция в месте имплантации	0	0	1
Любое АЕ, связанное с лечением ^c	4	5	4
Нарушения со стороны крови и лимфатической системы	0	2	0
Эозинофилия	0	2	0
Лейкоцитоз	0	1	0
Общие нарушения и реакции в месте введения	4	2	0
Лихорадка	4	2	0
Дискомфорт	0	1	0
Лабораторные и инструментальные данные (результаты клинико-лабораторных исследований)	4	1	1
Повышенный уровень γ -глутамилтрансферазы	2	0	1
Повышенный уровень аланинаминотрансферазы	1	0	0
Повышенное кровяное давление	1	0	0
Повышенная температура тела	1	0	0
Повышенное число эозинофилов	0	1	0
Нарушения со стороны кожи и подкожных тканей	2	2	0
Высыпания	2	1	0
Гирсутизм	0	1	0

Данные показаны в виде количества пациентов.

^aSAE согласно предпочтительным терминам приводятся, если они наблюдаются по меньшей мере у трех пациентов в исследовании. Все SAE были признаны несвязанными с лечением;

^bКогорта 1 и пять пациентов из когорты 2 получали PORT-A-CATH II в начале исследования. Все пациенты из когорты 3 и один пациент из когорты 2 получали SOPH-A-PORT Mini S;

^cАЕ согласно системно-органному классу приводятся, если они наблюдаются по меньшей мере у двух пациентов в любой группе. Для каждого системно-органного класса показаны предпочтительные термины. АЕ, нежелательное явление; IDDD, устройство для интратекальной доставки лекарственных средств; SAE, серьезное нежелательное явление

Двигательная функция.

Средний суммарный балл GMFM-88, который уменьшался во всех когортах от исходного уровня до 104 недели, показан на фиг. 9А. У двух детей из когорты 3 (возрастом 23 и 107 месяцев на момент начала лечения) наблюдались свидетельства, указывающие на стабилизацию их двигательной функции, при этом абсолютные суммарные баллы GMFM-88, превышающие 40% вплоть до 104 недели, показаны в виде звездочек на фиг. 9В. На 104 неделе у одного из этих детей (возрастом 23 месяца на момент начала лечения) суммарный балл GMFM-88 составлял 94,3%. У старшего сиблинга этого пациента (также из когорты 3), лечение которого начинали в возрасте 42 месяца, суммарный балл GMFM-88 составлял 12,2% примерно в том же возрасте, а на 104 неделе балл составлял 13,7%. На основании баллов от 34

здоровых детей возрастом 0-6 лет было определено, что средний суммарный балл GMFM-88 у здоровых детей младше 30 месяцев составляет > 90% (см., например, Sessa M et al. Lancet 2016;388:476-87). Среднее изменение \pm среднее квадратическое отклонение суммарного балла GMFM-88 рассчитано от исходного уровня до 104 недели. После 40 недели пациентам в когортах 1 и 2 индивидуально повышали их дозы (когорта 1, поэтапно), при этом все пациенты в конечном счете получали 100 мг rhASA.

Измерения степени тяжести MLD.

Средний суммарный балл тяжести MLD, определяемый с помощью MRI, повышался от исходного уровня до 104 недели в когортах 1 и 2; однако, как оказалось, он был устойчивым в течение того же периода в когорте 3 (фиг. 10). Среднее значение \pm среднее квадратическое отклонение суммарного балла тяжести MLD, определяемого с помощью MRI, на исходном уровне (диапазоны баллов от 0 до 34, при этом более высокий балл указывает на большую степень тяжести заболевания). Оценивали эффект интратекально доставляемой rhASA в отношении среднего соотношения метаболитов NAA/креатин в белом веществе головного мозга в течение 104 недель лечения. Среднее соотношение метаболитов NAA/креатин в белом веществе лобной доли (фиг. 11A) и лобной и теменной долей (фиг. 11B) оказалось устойчивым в течение 104 недель в когортах 2 и 3, но в когорте 1 наблюдалась тенденция к его уменьшению. Уменьшение соотношения NAA/креатина указывает на потерю нейронов и прогрессирование заболевания MLD. У четырех здоровых детей возрастом 2,5-6 лет соотношение NAA/креатина в перивентрикулярном белом веществе составляло 1,51-2,30 (см., например, Assadi M et al. J Cent Nerv Syst Dis 2013;5:25-30).

Концентрация сульфатидов в CSF.

Средняя концентрация сульфатидов в CSF уменьшалась от исходного уровня до 104 недели во всех когортах, при этом в когорте 3 она находилась в пределах диапазона нормальных значений ($\leq 0,11$ мкг/мл с учетом образцов CSF от 60 педиатрических пациентов) с 15 недели (фиг. 12). Исходные уровни сульфатидов в CSF были более низкими в когорте 3, чем в других двух когортах.

Краткое описание дополнительного исследования.

Интратекально доставляемая rhASA хорошо переносилась у детей с MLD. Хотя в целом наблюдалось ухудшение двигательной функции в течение 104 недель лечения, у пациентов, получавших 100 мг rhASA с самого начала исследования (когорта 3), наблюдались свидетельства, указывающие на ответ на лечение. В когорте 3 наблюдалось минимальное изменение среднего балла тяжести MLD, определяемого с помощью MRI, и уровней NAA в белом веществе. У двух пациентов из когорты 3 наблюдали стабилизацию двигательной функции. Ответ на лечение не наблюдали в когортах 1 и 2. Один ребенок в исследовании может характеризоваться формой, не типичной для поздней младенческой MLD, а более характерной для ювенильной MLD. Эти результаты обеспечивают основание для продолжающейся разработки интратекально доставляемой rhASA в качестве потенциального средства для лечения пациентов с поздней младенческой MLD. Впоследствии дополнительных шесть детей (когорта 4) включали в исследование, и они в настоящее время получают 100 мг rhASA один раз в две недели.

Формы единственного числа, используемые в данном документе в описании и в формуле изобретения, если четко не указано обратное, следует понимать как включающие ссылки на множественное число. Пункты формулы изобретения или описания, которые включают "или" между одним или более представителями группы, считаются удовлетворяющими требованиям, если один, более чем один или все представители группы присутствуют, используются или иным образом относятся к указанному продукту или способу, если не указано обратное или иное не очевидно из контекста. Настоящее изобретение включает в себя варианты осуществления, в которых ровно один представитель группы присутствует, используется или иным образом относится к указанному продукту или способу. Настоящее изобретение также включает в себя варианты осуществления, в которых более чем один или все представители группы присутствуют, используются или иным образом относятся к указанному продукту или способу. Кроме того, следует понимать, что настоящее изобретение охватывает все вариации, комбинации и сочетания, в которых одно или более ограничений, элементов, условий, описательных терминов и т.д. из одного или более перечисленных пунктов формулы изобретения вводятся в другой пункт формулы изобретения, зависимый от одного и того же независимого пункта формулы изобретения (или любого другого пункта формулы изобретения, в зависимости от того, что применимо), если не указано иное или если среднему специалисту в данной области не будет очевидно, что будет возникать противоречие или несоответствие. Если элементы представлены в виде перечней (например, в виде группы Маркуша или в сходном формате), следует понимать, что также раскрывается каждая подгруппа элементов, и любой(ые) элемент(ы) могут быть удалены из группы. В целом, следует понимать, что если настоящее изобретение или аспекты настоящего изобретения обозначается/обозначаются как содержащее/содержащие конкретные элементы, признаки и т.д., то определенные варианты осуществления настоящего изобретения или аспекты настоящего изобретения состоят или, по сути, состоят из таких элементов, признаков и т.д. Для целей упрощения такие варианты осуществления были не в каждом случае так подробно конкретно изложены в данном документе. Также следует понимать, что любой вариант осуществления или аспект настоящего изобретения могут быть явно исключены из формулы изобретения независимо от того, из-

ложено ли конкретное исключение в описании. Публикации, вебсайты и другие ссылочные материалы, приводимые в данном документе в качестве ссылки для описания уровня техники настоящего изобретения и для предоставления дополнительной информации касательно его практической реализации, включены в данный документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

<110> Шайер Хьюман Дженетик Терапис, Инк.

<120> СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ДОСТАВКИ АРИЛСУЛЬФАТАЗЫ А В ЦНС

<130> SHR-1096WO

<150> 62/296563

<151> 2016-02-17

<150> 62/453,864

<151> 2017-02-02

<160> 2

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 489

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 1

Arg Pro Pro Asn Ile Val Leu Ile Phe Ala Asp Asp Leu Gly Tyr Gly
1 5 10 15

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

Gln Leu Ala Ala Gly Gly Leu Arg Phe Thr Asp Phe Tyr Val Pro Val
35 40 45

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

Val Arg Met Gly Met Tyr Pro Gly Val Leu Val Pro Ser Ser Arg Gly
65 70 75 80

Gly Leu Pro Leu Glu Glu Val Thr Val Ala Glu Val Leu Ala Ala Arg
85 90 95

Gly Tyr Leu Thr Gly Met Ala Gly Lys Trp His Leu Gly Val Gly Pro
100 105 110

Glu Gly Ala Phe Leu Pro Pro His Gln Gly Phe His Arg Phe Leu Gly
115 120 125

Ile Pro Tyr Ser His Asp Gln Gly Pro Cys Gln Asn Leu Thr Cys Phe

043909

Ser Ala His Ser Asp Thr Thr Ala Asp Pro Ala Cys His Ala Ser Ser
385 390 395 400

Ser Leu Thr Ala His Glu Pro Pro Leu Leu Tyr Asp Leu Ser Lys Asp
405 410 415

Pro Gly Glu Asn Tyr Asn Leu Leu Gly Gly Val Ala Gly Ala Thr Pro
420 425 430

Glu Val Leu Gln Ala Leu Lys Gln Leu Gln Leu Leu Lys Ala Gln Leu
435 440 445

Asp Ala Ala Val Thr Phe Gly Pro Ser Gln Val Ala Arg Gly Glu Asp
450 455 460

Pro Ala Leu Gln Ile Cys Cys His Pro Gly Cys Thr Pro Arg Pro Ala
465 470 475 480

Cys Cys His Cys Pro Asp Pro His Ala
485

<210> 2
<211> 507
<212> BEJOK
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Ala Pro Arg Ser Leu Leu Leu Ala Leu Ala Ala Gly Leu Ala
1 5 10 15

Val Ala Arg Pro Pro Asn Ile Val Leu Ile Phe Ala Asp Asp Leu Gly
20 25 30

Tyr Gly Asp Leu Gly Cys Tyr Gly His Pro Ser Ser Thr Thr Pro Asn
35 40 45

Leu Asp Gln Leu Ala Ala Gly Gly Leu Arg Phe Thr Asp Phe Tyr Val
50 55 60

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

Leu Pro Val Arg Met Gly Met Tyr Pro Gly Val Leu Val Pro Ser Ser
85 90 95

Arg Gly Gly Leu Pro Leu Glu Glu Val Thr Val Ala Glu Val Leu Ala
100 105 110

043909

Ala Arg Gly Tyr Leu Thr Gly Met Ala Gly Lys Trp His Leu Gly Val
115 120 125

Gly Pro Glu Gly Ala Phe Leu Pro Pro His Gln Gly Phe His Arg Phe
130 135 140

Leu Gly Ile Pro Tyr Ser His Asp Gln Gly Pro Cys Gln Asn Leu Thr
145 150 155 160

Cys Phe Pro Pro Ala Thr Pro Cys Asp Gly Gly Cys Asp Gln Gly Leu
165 170 175

Val Pro Ile Pro Leu Leu Ala Asn Leu Ser Val Glu Ala Gln Pro Pro
180 185 190

Trp Leu Pro Gly Leu Glu Ala Arg Tyr Met Ala Phe Ala His Asp Leu
195 200 205

Met Ala Asp Ala Gln Arg Gln Asp Arg Pro Phe Phe Leu Tyr Tyr Ala
210 215 220

Ser His His Thr His Tyr Pro Gln Phe Ser Gly Gln Ser Phe Ala Glu
225 230 235 240

Arg Ser Gly Arg Gly Pro Phe Gly Asp Ser Leu Met Glu Leu Asp Ala
245 250 255

Ala Val Gly Thr Leu Met Thr Ala Ile Gly Asp Leu Gly Leu Leu Glu
260 265 270

Glu Thr Leu Val Ile Phe Thr Ala Asp Asn Gly Pro Glu Thr Met Arg
275 280 285

Met Ser Arg Gly Gly Cys Ser Gly Leu Leu Arg Cys Gly Lys Gly Thr
290 295 300

Thr Tyr Glu Gly Gly Val Arg Glu Pro Ala Leu Ala Phe Trp Pro Gly
305 310 315 320

His Ile Ala Pro Gly Val Thr His Glu Leu Ala Ser Ser Leu Asp Leu
325 330 335

Leu Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Gly Ala Pro Leu Pro Asn Val Thr
340 345 350

Leu Asp Gly Phe Asp Leu Ser Pro Leu Leu Leu Gly Thr Gly Lys Ser
355 360 365

Pro Arg Gln Ser Leu Phe Phe Tyr Pro Ser Tyr Pro Asp Glu Val Arg
 370 375 380

Gly Val Phe Ala Val Arg Thr Gly Lys Tyr Lys Ala His Phe Phe Thr
 385 390 395 400

Gln Gly Ser Ala His Ser Asp Thr Thr Ala Asp Pro Ala Cys His Ala
 405 410 415

Ser Ser Ser Leu Thr Ala His Glu Pro Pro Leu Leu Tyr Asp Leu Ser
 420 425 430

Lys Asp Pro Gly Glu Asn Tyr Asn Leu Leu Gly Gly Val Ala Gly Ala
 435 440 445

Thr Pro Glu Val Leu Gln Ala Leu Lys Gln Leu Gln Leu Leu Lys Ala
 450 455 460

Gln Leu Asp Ala Ala Val Thr Phe Gly Pro Ser Gln Val Ala Arg Gly
 465 470 475 480

Glu Asp Pro Ala Leu Gln Ile Cys Cys His Pro Gly Cys Thr Pro Arg
 485 490 495

Pro Ala Cys Cys His Cys Pro Asp Pro His Ala
 500 505

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения синдрома метахроматической лейкодистрофии (MLD), включающий этап интратекального введения субъекту, нуждающемуся в лечении, рекомбинантного фермента арилсульфатазы А (ASA) в терапевтически эффективной дозе по меньшей мере 100 мг и с интервалом между введениями в течение периода лечения по меньшей мере 2 года, достаточного для:

(а) улучшения, стабилизации или снижения темпов ухудшения одной или более двигательных функций по сравнению с исходным уровнем;

(b) для уменьшения уровней биомаркера, накапливающегося при MLD в физиологической жидкости, выбранной из группы, состоящей из спинномозговой жидкости, мочи, крови и сыворотки крови, по сравнению с исходным уровнем биомаркера;

(с) увеличения уровней биомаркера, сниженных при MLD, в ткани головного мозга по сравнению с исходным уровнем биомаркера; или

стабилизации или снижения вовлечения в повреждение головного мозга по сравнению с исходным уровнем, оцениваемым по баллу тяжести MLD, определяемому с помощью MRI (магнитно-резонансной томографии).

2. Способ по п.1, где введение рекомбинантного фермента ASA дополнительно приводит к улучшению, стабилизации или снижению темпов ухудшения одной или более когнитивных, адаптивных и/или исполнительных функций.

3. Способ по п.2, где одна или более двигательных функций включают в себя функцию крупной моторики, где необязательно функцию крупной моторики оценивают с помощью теста оценки функционирования крупной моторики (GMFM), где необязательно тест GMFM представляет собой GMFM-88, где необязательно исходный балл GMFM-88 выше или ниже 40%.

4. Способ по любому из пп.1-3, где введение рекомбинантного фермента ASA приводит к:

(а) уменьшению балла GMFM-88 меньше чем на 10, 20, 30, 40 или 50%;

(b) значительной стабилизации балла GMFM-88; и/или

(с) улучшению балла GMFM-88.

5. Способ по п.1, где биомаркер выбран из группы, состоящей из сульфатида, лизосульфатида и их комбинаций, где необязательно биомаркер представляет собой сульфатид.

6. Способ по п.1 или 5, где физиологическая жидкость представляет собой спинномозговую жидкость, где необязательно:

(а) исходный уровень сульфатидов в спинномозговой жидкости превышает приблизительно 0,1 мкг/мл, превышает приблизительно 0,2 мкг/мл, превышает приблизительно 0,3 мкг/мл; и/или

(b) введение рекомбинантного фермента ASA приводит к снижению уровней сульфатидов в спинномозговой жидкости больше чем на приблизительно 0,1 мкг/мл или больше чем на приблизительно 0,2 мкг/мл.

7. Способ по п.1, где:

(а) ткань головного мозга представляет собой глубокое белое вещество головного мозга; и/или

(b) биомаркер представляет собой метаболит, где необязательно метаболит представляет собой N-ацетиласпартат, где необязательно уровни N-ацетиласпартата оценивают с помощью спектроскопии протонного магнитного резонанса.

8. Способ по п.1, где введение рекомбинантного фермента ASA приводит к:

(а) снижению балла тяжести MLD, определяемого с помощью MRI, у субъекта по сравнению с исходным уровнем; или

(b) стабилизации балла тяжести MLD, определяемого с помощью MRI, у субъекта по сравнению с исходным уровнем.

9. Способ по любому из предыдущих пунктов, где терапевтически эффективная доза находится между 100 и 200 мг.

10. Способ по любому из предыдущих пунктов, где интервал между введениями составляет одну неделю, две недели или один месяц.

11. Способ по любому из предыдущих пунктов, где:

(а) субъектом является млекопитающее, где необязательно субъектом является человек; и/или

(b) возраст субъекта составляет шестнадцать лет или меньше, двенадцать лет или меньше, девять лет или меньше, шесть лет или меньше, четыре года или меньше, три года или меньше, два года или меньше, 18 месяцев или меньше, 12 месяцев или меньше, 6 месяцев или меньше.

12. Способ по любому из предыдущих пунктов, где:

(а) у субъекта (i) проявлялся по меньшей мере один симптом метахроматической лейкодистрофии или (ii) не проявлялись какие-либо симптомы метахроматической лейкодистрофии; и/или

(b) у субъекта (i) была диагностирована метахроматическая лейкодистрофия или (ii) было идентифицировано наличие риска развития метахроматической лейкодистрофии.

13. Способ по любому из предыдущих пунктов, где:

(а) арилсульфатазу А вводят в позвоночный канал, где необязательно арилсульфатазу А вводят в поясничную область, где необязательно арилсульфатазу А вводят путем люмбальной пункции; и/или

(b) интратекальное введение осуществляют посредством периодического или постоянного доступа к имплантированному устройству для интратекальной доставки лекарственных средств (IDDD).

14. Способ по любому из предыдущих пунктов, где:

(а) период лечения составляет по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 24 месяца; и/или

(b) у субъекта не наблюдаются серьезные нежелательные эффекты, ассоциированные с введением рекомбинантной арилсульфатазы А.

15. Способ по любому из предыдущих пунктов, где рекомбинантный фермент ASA содержит аминокислотную последовательность:

(а) по меньшей мере на 85% идентичную на аминокислотном уровне SEQ ID NO: 1;

(b) по меньшей мере на 90% идентичную на аминокислотном уровне SEQ ID NO: 1;

(c) по меньшей мере на 95% идентичную на аминокислотном уровне SEQ ID NO: 1;

(d) по меньшей мере на 98% идентичную на аминокислотном уровне SEQ ID NO: 1;

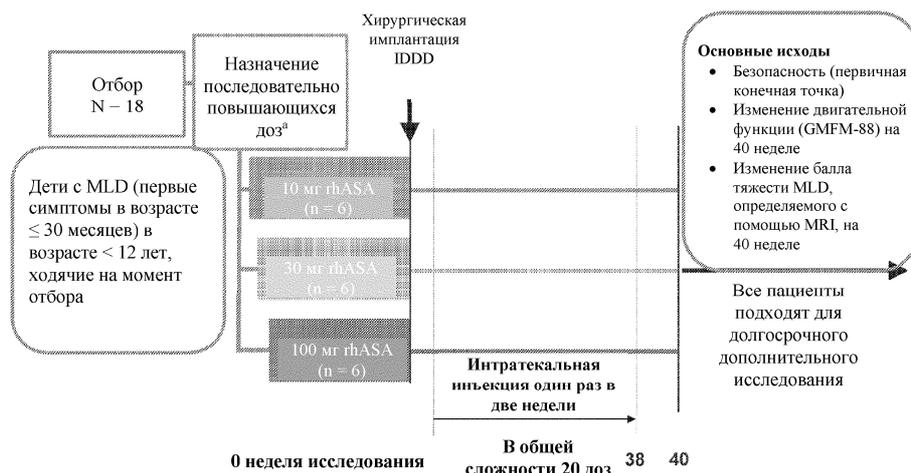
(e) представляющую собой SEQ ID NO: 1;

(f) содержащую не более четырех несовпадений с SEQ ID NO: 1;

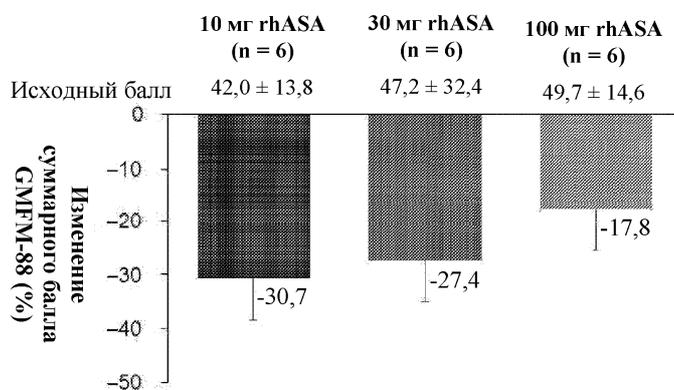
(g) содержащую не более трех несовпадений с SEQ ID NO: 1;

(h) содержащую не более двух несовпадений с SEQ ID NO: 1; и/или

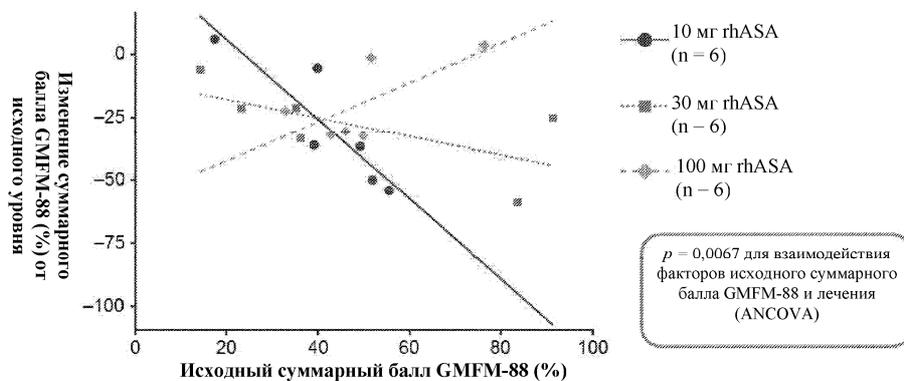
(i) содержащую не более одного несовпадения с SEQ ID NO: 1.



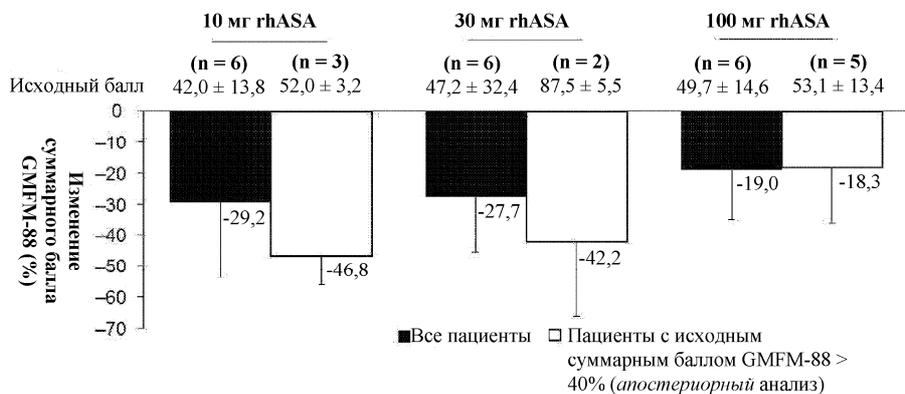
Фиг. 1



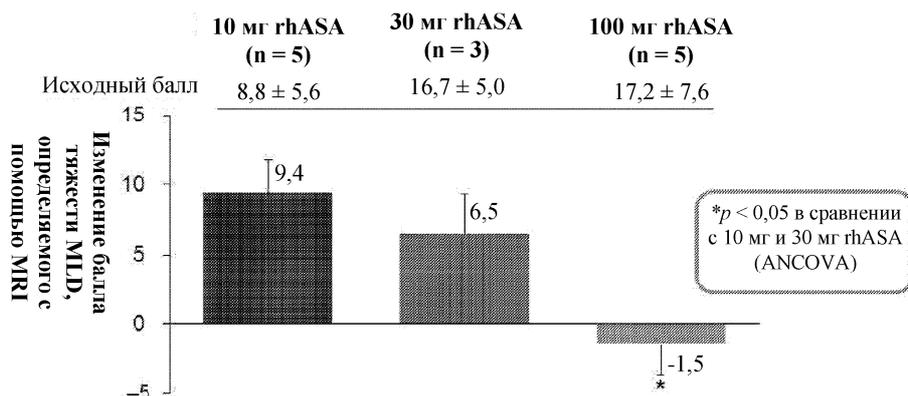
Фиг. 2



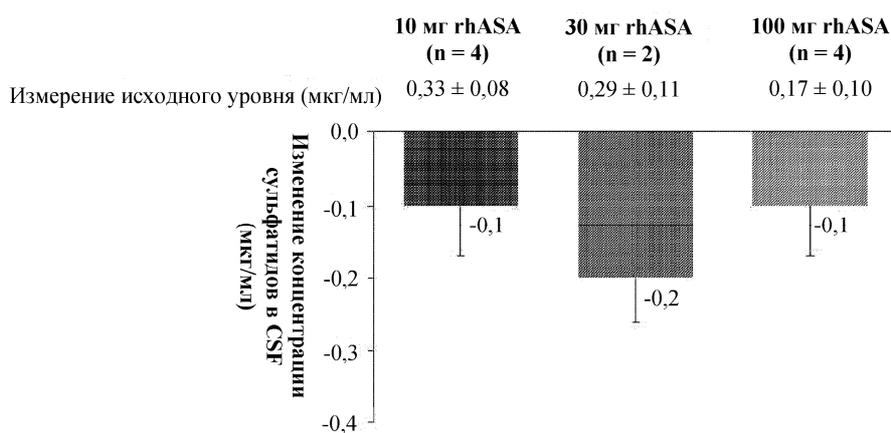
Фиг. 3



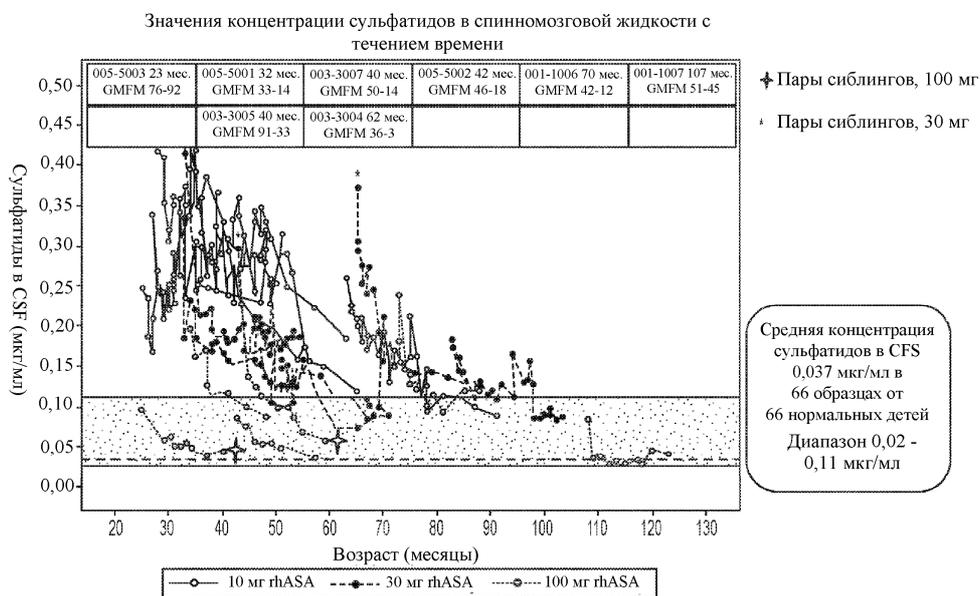
Фиг. 4



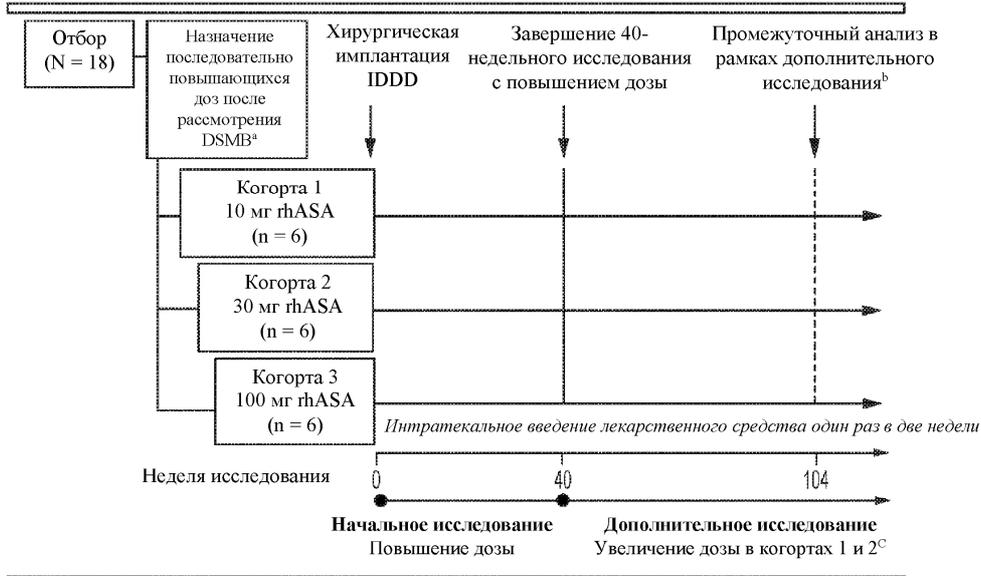
Фиг. 5



Фиг. 6

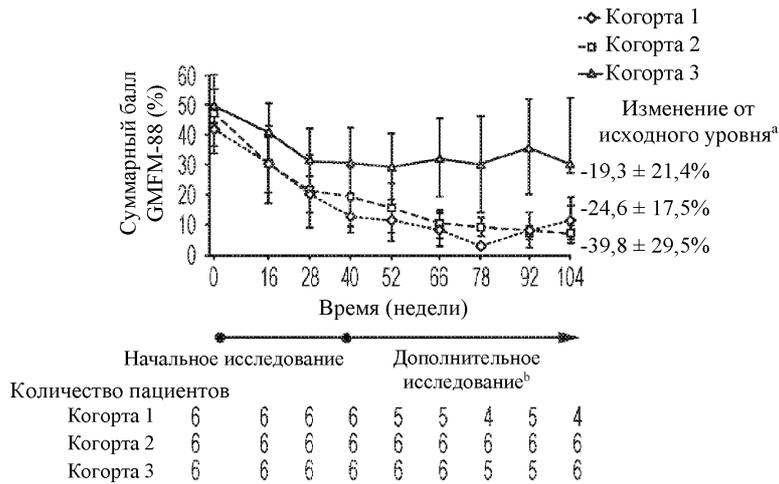


Фиг. 7



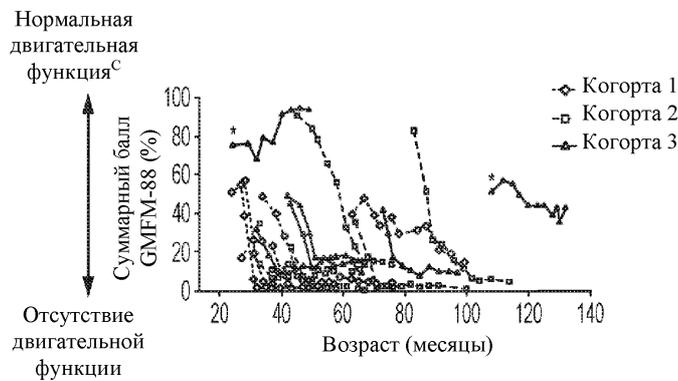
Фиг. 8

А) Средние суммарные баллы GMFM-88 для каждой когорты по визитам в ходе исследования

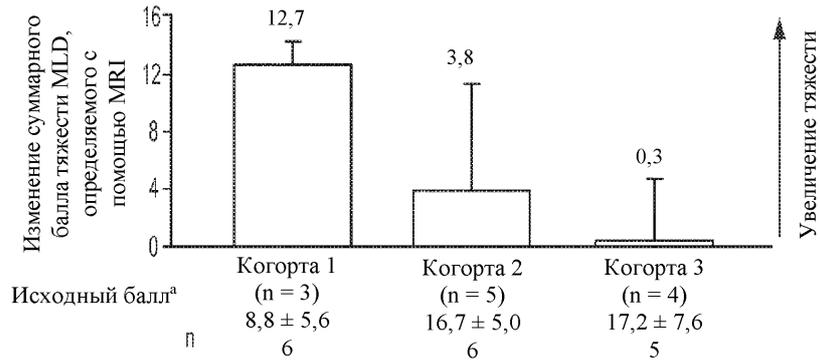


Фиг. 9А

В) Отдельные суммарные баллы GMFM-88 по возрасту пациентов в течение 104 недель лечения

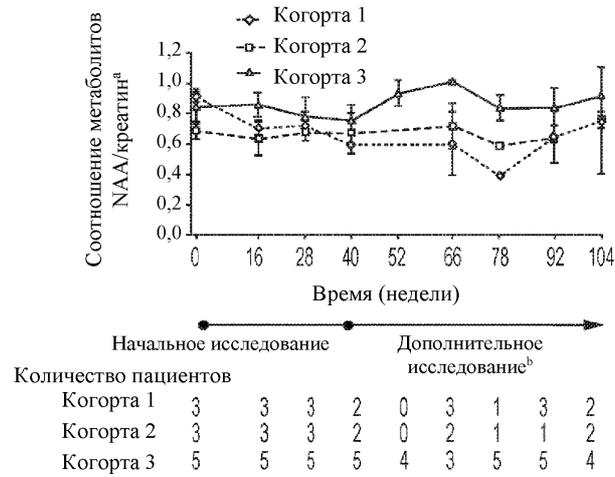


Фиг. 9В



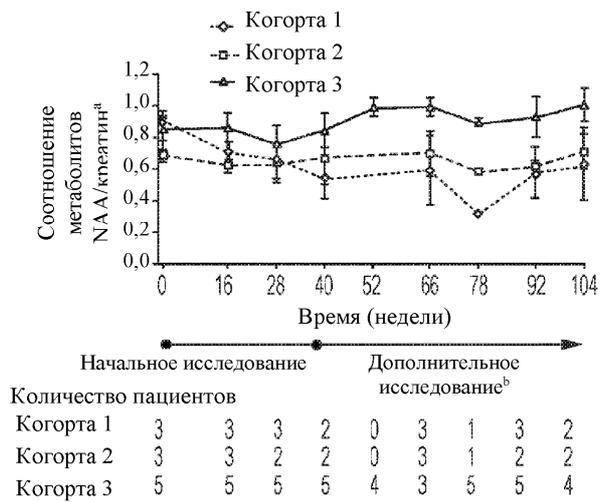
Фиг. 10

А) Белое вещество правой лобной доли

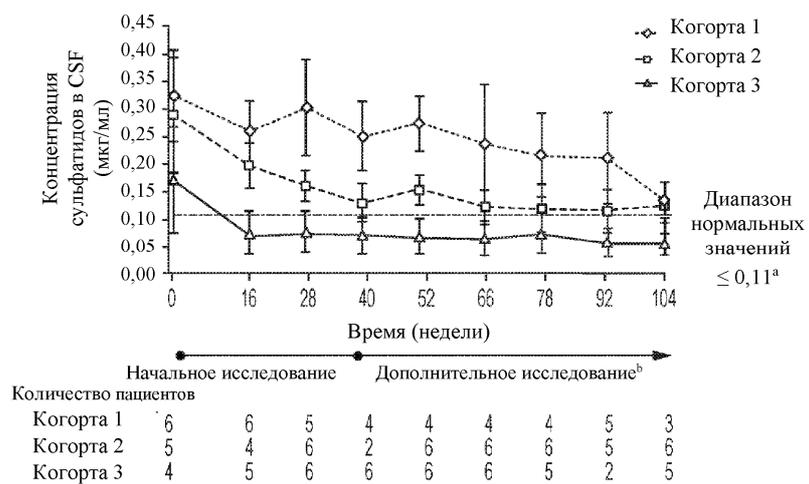


Фиг. 11А

В) Белое вещество правых лобной и теменной долей



Фиг. 11В



Фиг. 12



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2