

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038110**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.07.07

(51) Int. Cl. **A61K 38/16** (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201890182

(22) Дата подачи заявки
2016.07.04

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ СИНДРОМА ГУНТЕРА

(31) **62/187,867; 10-2015-0187297**

(32) **2015.07.02; 2015.12.28**

(33) **US; KR**

(43) **2018.06.29**

(86) **PCT/KR2016/007203**

(87) **WO 2017/003270 2017.01.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ГРИН КРОСС КОРПОРЕЙШН;
МЕДИГЕНЕБИО КОРПОРЕЙШН
(KR)**

(72) Изобретатель:
**Ли Дзин-Киунг, Биун Хан-Йеул, Дзунг
Миунг-Еун, Ли Киу-Хиун (KR)**

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

(56) **US-A1-20150086526
US-B2-8545837
KR-B1-101158673
KR-B1-101413947
KR-A-1020100116558**

(57) Изобретение относится к способу лечения синдрома Гунтера, включающему внутривенную инъекцию эффективной дозы первой композиции и подкожную инъекцию эффективной дозы второй композиции, где первая композиция содержит идуронат-2-сульфатазу, состоящую по меньшей мере из одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1 и 2; вторая композиция содержит идуронат-2-сульфатазу, состоящую по меньшей мере из одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1 и 2; первую композицию вводят посредством инъекции в эффективной дозе от 0,5 до 1 мг/кг в неделю; вторую композицию вводят посредством инъекции в эффективной дозе от 0,5 до 5 мг/кг в неделю; при этом первую композицию вводят посредством инъекции один раз в первую неделю, а вторую композицию вводят посредством инъекции один раз в неделю, на неделях 2-4. Способ согласно изобретению положительно влияет на соблюдение пациентами режима лечения по сравнению со стандартными терапевтическими средствами и методами лечения и повышает качество жизни и комфорт пациентов.

038110 B1

038110 B1

Область, к которой относится изобретения

Настоящее изобретение относится к способу лечения синдрома Гунтера с использованием состава согласно изобретению.

Предшествующий уровень техники

Синдром Гунтера или мукополисахаридоз типа II представляет собой одну из болезней лизосомного накопления (БНЛ), при которой мукополисахариды, такие как гликозаминогликан (GAG), не разлагаются и, тем самым, аккумулируются в лизосомах, что обусловлено дефицитом идуронат-2-сульфатазы (IDS). GAG аккумулируется во всех клетках организма и вызывает различные симптомы, которые включают аномальные изменения лица, увеличение размера головы и вздутие живота, вызываемое гипертрофией печени или селезенки, и сопровождаются выпадением волос, недостаточностью сердечного клапана, обструктивными респираторными заболеваниями и апное во сне. Эти симптомы могут также включать ограничение подвижности суставов, а также болезни нервной системы и задержку развития, вызываемые поражениями центральной нервной системы. Известно, что синдром Гунтера, который встречается у одного из 162000 человек и наследуется в X-сцепленной рецессивной форме, приносит большие страдания не только самим пациентам, но и всем членам его семьи.

До настоящего времени для лечения синдрома Гунтера применялись различные методы, такие как трансплантация костного мозга, ферментная терапия, генотерапия и т.п. Трансплантация костного мозга имеет те недостатки, что, хотя она приводит к значительному ослаблению симптома, однако, трудно найти донора, у которого антиген человеческих лейкоцитов (HLA) соответствовал бы этому антигену у пациента, и смертность пациентов до и после хирургической операции по трансплантации HLA от донора, HLA которого не соответствует HLA пациента, является высокой. Генотерапия представляет собой метод, при котором нормальный ген IDS вводят в организм с использованием вирусного или невирусного вектора, такого как аденовирус или ретровирус. Однако генотерапия применяется лишь на экспериментальном уровне и пока еще не является клинически апробированной.

В настоящее время наиболее широко применяемым методом является фермент-заместительная терапия (ФЗТ), при которой пациенту вводят рекомбинантный фермент IDS. Обычно пациент посещает клинику один раз в неделю, и этому пациенту фермент вводится внутривенно специальным медицинским персоналом. Одно такое введение занимает от 3 до 4 ч или более.

Пациенты, страдающие синдромом Гунтера, сталкиваются с серьезными проблемами в своей повседневной жизни, поскольку им бывает трудно дотянуться до нужных объектов, либо у них нарушается походка из-за аномалий системы суставов, либо часто наблюдаются нарушения развития и познавательных способностей, а также поведенческие расстройства из-за заболеваний нервной системы. Следовательно, стандартная терапия путем внутривенного вливания, которая предусматривает частые визиты в клинику и длительные периоды лечения, может снижать качество жизни пациентов и людей, осуществляющих уход за ними. Более серьезной проблемой является то, что терапевтический эффект значительно снижается из-за нарушения соблюдения пациентами режима лечения. Поскольку основным принципом метода стандартного лечения является введение IDS путем внутривенной инъекции один раз в неделю, то концентрация IDS в организме пациента достигает своей максимальной величины сразу после внутривенной инъекции, но со временем постепенно снижается, что снова приводит к увеличению концентрации GAG в организме. Увеличение концентрации GAG приводит к тяжелому обострению симптомов. Кроме того, учитывая исключительную тяжесть и необратимость симптомов синдрома Гунтера в целом, можно отметить, что если пациент пропускает какой-либо период лечения, то в итоге обострение симптомов может иметь роковые последствия и значительно сокращать продолжительность жизни пациента.

Как обсуждалось выше, внутривенное введение IDS стандартным методом лечения синдрома Гунтера имеет тот недостаток, что терапевтический эффект является довольно ограниченным и предполагаемая продолжительность жизни пациентов может сокращаться из-за нарушения соблюдения пациентами режима лечения. Поэтому крайне необходимо получить новый состав и разработать способ лечения, которые позволяли бы решить вышеуказанные проблемы.

Раскрытие изобретения

Техническая проблема

Целью настоящего изобретения является приготовление состава для лечения синдрома Гунтера, который является более удобным для соблюдения пациентом режима лечения.

Другой целью настоящего изобретения является предоставление способа лечения синдрома Гунтера, который может положительно повлиять на соблюдение пациентом режима лечения.

Решение проблемы

Способ лечения синдрома Гунтера включает внутривенную инъекцию эффективной дозы первой композиции и подкожную инъекцию эффективной дозы второй композиции, где первая композиция содержит идуронат-2-сульфатазу, состоящую по меньшей мере из одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1 и 2; вторая композиция содержит идуронат-2-сульфатазу, состоящую по меньшей мере из одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1 и 2; первую композицию вводят посредством инъекции в эффективной дозе от 0,5 до 1 мг/кг в неделю; вторую композицию вводят посредством инъекции в эффективной дозе от 0,5 до 5 мг/кг в неделю; при этом первую композицию

вводят посредством инъекции один раз в первую неделю, а вторую композицию вводят посредством инъекции один раз в неделю, на неделях 2-4.

Преимущественные эффекты изобретения

Терапевтический состав и способ терапии согласно изобретению обеспечивают эквивалентную или более высокую эффективность лекарственного средства по сравнению с IV-введением один раз в неделю.

Терапевтический состав и способ терапии согласно изобретению обеспечивают эквивалентную или более высокую эффективность лекарственного средства по сравнению со стандартным IV-введением один раз в неделю, а также позволяют уменьшить число визитов пациентов, страдающих синдромом Гунтера, в клинику до двух раз в месяц или менее.

Терапевтический состав и способ терапии согласно изобретению позволяют снижать число внутривенных инъекций пациентам, страдающим синдромом Гунтера.

Терапевтический состав и способ терапии согласно изобретению позволяют сделать более комфортным лечение пациентов, страдающих синдромом Гунтера и испытывающих затруднения в посещении клиники.

Терапевтический состав и способ терапии согласно изобретению положительно влияют на соблюдение пациентами, страдающими синдромом Гунтера, режима лечения, что тем самым повышает терапевтический эффект.

Терапевтический состав и способ терапии согласно изобретению являются подходящими для эффективного введения идуронат-2-сульфатазы, состоящей из предварительно определенной аминокислотной последовательности.

Настоящее изобретение может относиться к составу для лечения синдрома Гунтера, где стабильность *in vivo* этого состава повышается благодаря включению буфера, такого как фосфат натрия и L-гистидин, во вторую композицию.

Настоящее изобретение может относиться к составу для лечения синдрома Гунтера, где стабильность этого состава при хранении и транспортировке повышается благодаря включению стабилизатора, такого как полисорбат 20 и аргинин, во вторую композицию.

Настоящее изобретение может относиться к составу для лечения синдрома Гунтера, где скорость всасывания в организме повышается благодаря включению усилителя всасывания, такого как гиалуронидаза, во вторую композицию.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 указана концентрация IDS в сыворотке после одного IV- или SC-введения состава для лечения синдрома Гунтера в примере испытания 1.

На фиг. 2 указана концентрация GAG в пробе мочи после одного IV- или SC-введения состава для лечения синдрома Гунтера в примере испытания 2.

На фиг. 3 указана концентрация GAG в образце селезенки после одного IV- или SC-введения состава для лечения синдрома Гунтера в примере испытания 2.

На фиг. 4 указана концентрация GAG в образце сердца после одного IV- или SC-введения состава для лечения синдрома Гунтера в примере испытания 2.

На фиг. 5 указана концентрация GAG в образце почек после одного IV- или SC-введения состава для лечения синдрома Гунтера в примере испытания 2.

На фиг. 6 указана концентрация GAG в образце печени после одного IV- или SC-введения состава для лечения синдрома Гунтера в примере испытания 2.

На фиг. 7 указана концентрация GAG в образце легких после одного IV- или SC-введения состава для лечения синдрома Гунтера в примере испытания 2.

На фиг. 8 указана концентрация GAG в образце головного мозга после одного IV- или SC-введения состава для лечения синдрома Гунтера в примере испытания 2.

На фиг. 9 указана концентрация GAG в образце почек после повторного и комбинированного IV- или SC-введения состава для лечения синдрома Гунтера в примере испытания 4.

На фиг. 10 указана концентрация GAG в образце печени после повторного и комбинированного IV- или SC-введения состава для лечения синдрома Гунтера в примере испытания 4.

На фиг. 11 указана концентрация GAG в образце селезенки после повторного и комбинированного IV- или SC-введения состава для лечения синдрома Гунтера в примере испытания 4.

На фиг. 12 указана концентрация GAG в пробе мочи после повторного и комбинированного IV- или SC-введения состава для лечения синдрома Гунтера в примере испытания 4.

Способ осуществления изобретения

Настоящее изобретение относится к составу для лечения синдрома Гунтера, а более конкретно, к составу для лечения синдрома Гунтера, который включает первую композицию для внутривенной инъекции и вторую композицию для подкожной инъекции, и обеспечивает эквивалентную или более высокую эффективность лекарственного средства по сравнению со стандартным IV-введением один раз в неделю, а также позволяет уменьшить число визитов пациентов, страдающих синдромом Гунтера, в клинику до двух раз в месяц или менее; положительно влияет на соблюдение пациентами, страдающими син-

дросом Гунтера, режима лечения по сравнению со стандартным терапевтическим составом и методом терапии и повышает качество жизни и комфорт пациентов, страдающих синдромом Гунтера. Способ комбинированного IV/SC-введения согласно изобретению включает замену определенного числа IV-введений стандартным методом IV-введения один раз в неделю, предусматривающим посещение пациентом клиники каждую неделю, на SC-введение, которое может быть осуществлено этому пациенту на дому. Способ согласно изобретению предусматривает более редкое посещение клиники пациентами, чем при проведении стандартного метода еженедельного IV-введения, и обеспечивает эквивалентную или более высокую эффективность лекарственного средства по сравнению со стандартным IV-введением один раз в неделю. Таким образом, настоящее изобретение полностью опровергает общепринятое мнение, что терапевтический эффект SC-введения не превосходит терапевтический эффект IV-введения. В соответствии с этим настоящее изобретение относится к составу и к способу, которые способствуют значительному увеличению терапевтического эффекта при лечении синдрома Гунтера по сравнению со стандартной терапией.

Настоящее изобретение относится к составу для лечения синдрома Гунтера, включающему первую композицию для внутривенной инъекции и вторую композицию для подкожной инъекции, и к способу лечения синдрома Гунтера, включающему комбинированное введение внутривенной инъекции первой композиции и подкожной инъекции второй композиции.

Настоящее изобретение более подробно описано ниже.

Состав для лечения синдрома Гунтера согласно изобретению включает первую композицию для внутривенной инъекции и вторую композицию для подкожной инъекции.

Первой композицией является композиция для внутривенной инъекции. Композиция для внутривенной инъекции представляет собой стерильную композицию, которая позволяет лекарственному средству в жидкой фазе проникать непосредственно в вену. Композиция для инъекции охватывает все композиции, которые могут быть использованы для приготовления специальной инъекции, и включают, но не ограничиваются ими, водные инъекции, безводные инъекции, суспензионные инъекции и лиофилизованные инъекции.

Первую композицию вводят внутривенно от одного раза в два месяца до двух раз в месяц.

Введение один раз в месяц означает, что интервал между первой внутривенной инъекцией и последующей внутривенной инъекцией составляет один месяц или т.п. Так, например, интервал между внутривенными инъекциями может составлять 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 или 33 дня, в зависимости от состояния здоровья пациента или способа лечения.

Первая композиция содержит активный ингредиент, который является эффективным для лечения синдрома Гунтера.

Идуронат-2-сульфатаза (IDS или I2S) может быть использована в качестве активного ингредиента в первой композиции.

В настоящем изобретении IDS содержит, например, белок, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 2. Белок, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, имеет в 59-м положении замену цистеина (Cys), который присутствует в белке, состоящем из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, на формилглицин (FGly).

IDS включает белки, где в белке, состоящем из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 2, некоторые аминокислоты были встроены, делетированы, заменены или т.п. при условии, что терапевтическая активность этого белка будет сохраняться при лечении синдрома Гунтера.

IDS может представлять собой белок, происходящий от животного, такого как человек, или он может быть рекомбинантным белком.

IDS может представлять собой смесь из двух или более белков. Так, например, IDS может представлять собой смесь белка, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и белка, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. Кроме того, IDS может представлять собой, например, смесь из 35% (по молям) или менее белка, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и 65% или более, 70% или более, 75% или более или 80% (по молям, в каждом случае) или более белка, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

Если белок, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, содержится в количестве 65% (по молям) или более, то это способствует повышению терапевтического эффекта при лечении синдрома Гунтера.

Белок, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 2, может содержать маннозо-6-фосфат (M6P) в количестве от 2,0 до 4,0 моль, предпочтительно от 2,3 до 3,5 моль, а более предпочтительно от 2,5 до 3,0 моль на 1 моль белка. Поскольку M6P участвует в поглощении IDS клетками и нацеливании на лизосомы, то это дает возможность эффективно разлагать гликозаминогликан, накопленный в лизосомах, если содержание M6P является высоким.

Первая композиция может содержать различные неактивные ингредиенты, необходимые для приготовления композиции для внутривенной инъекции и отличающиеся от активного ингредиента (т.е. от эффективного ингредиента).

Так, например, первая композиция может также содержать буферы (такие как фосфат натрия и

L-гистидин), углеводы (такие как глюкоза, манноза, сахароза и декстран), стабилизаторы (такие как бисульфит натрия, сульфит натрия или аскорбиновая кислота, полисорбат 20 и аргинин), антиоксиданты, бактериостатические агенты, хелатообразующие агенты (такие как EDTA и глутатион), адъюванты (такие как гидроксид алюминия), суспензии, загустители и/или консерванты (такие как хлорид бензалкония, метил- или пропилпарабен и хлорбутанол). Кроме того, первая композиция может также содержать различные антибактериальные агенты и противогрибковые агенты, такие как парабены, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота и тимерозал.

Первая композиция может содержать жидкость, подходящую для внутривенной инъекции. Такой жидкостью могут быть, но не ограничиваются ими, растворители или дисперсионные среды, содержащие воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль), их смеси и/или растительные масла. Более предпочтительно может быть использован изотонический раствор, такой как физиологический раствор, раствор Хэнкса, раствор Рингера, PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор), содержащий триэтаноламин, или стерилизованная вода для инъекций, 10% этанол, 40% пропиленгликоль и 5% декстроза. Другие жидкости, подходящие для внутривенного введения, также описаны в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995.

Вторая композиция представляет собой композицию для подкожной инъекции. Композиция для подкожной инъекции представляет собой стерильную композицию, которая позволяет лекарственному средству в жидкой фазе проникать в рыхлые соединительные ткани ниже дермы и поглощаться капиллярными кровеносными сосудами.

Вторую композицию подкожно вводят от одного до семи раз в неделю.

Введение от одного до семи раз в неделю означает, что введение осуществляют от одного до семи раз в неделю через регулярные промежутки времени. Так, например, введение два раза в неделю может быть осуществлено в понедельник и в четверг, во вторник и в пятницу, в среду и в субботу, в четверг и в воскресенье, в пятницу и в понедельник, в субботу и во вторник или в воскресенье и в среду. Кроме того, например, введение три раза в неделю может быть осуществлено в понедельник, в среду и в пятницу; во вторник, в четверг и в субботу; в среду, в пятницу и в воскресенье; в четверг, в субботу и в понедельник; в пятницу, в воскресенье и во вторник или в субботу, в понедельник и в среду.

Вторая композиция может быть приготовлена в основном так, чтобы она содержала такие же компоненты, как и компоненты первой композиции или аналогичные компоненты (например, активный ингредиент (т.е. эффективный ингредиент) и неактивные ингредиенты). При необходимости, эти компоненты могут быть заменены.

Вторая композиция может содержать жидкость, подходящую для подкожной инъекции. Эта жидкость может быть такой же, как жидкость, содержащаяся в первой композиции, или аналогичной жидкостью, и, при необходимости, эта жидкость может быть заменена.

Вторая композиция может содержать фосфат натрия и L-гистидин (20 мМ, pH 6,0) в качестве буфера. Добавление буфера может стимулировать стабилизацию активного фармацевтического ингредиента (АФИ) *in vivo* даже при временном изменении pH.

Вторая композиция может содержать полисорбат 20 и аргинин в качестве стабилизатора. Концентрация полисорбата 20 может составлять приблизительно от 0,05 до 0,22 мг/мл.

Помимо буфера, аргинин может служить в качестве стабилизатора и солюбилизатора.

Вторая композиция может содержать гиалуронидазу в качестве усилителя поглощения, который может повышать скорость поглощения активного ингредиента в организме.

Вторая композиция может содержать физиологический раствор. Концентрация хлорида натрия может составлять 2% или менее, а кислотность (pH) может составлять от 3 до 8.

Инъекция первой и второй композиций может быть осуществлена в следующем порядке: сначала может быть введена первая композиция, а затем вторая композиция, или сначала может быть введена вторая композиция, а затем первая композиция. Так, например, внутривенная инъекция может быть введена на неделю 1, а подкожные инъекции могут быть введены на недели 2-4; подкожные инъекции могут быть введены на неделю 1, внутривенная инъекция может быть введена на неделю 2, и подкожные инъекции могут быть введены на недели 3 и 4; подкожные инъекции могут быть введены на недели 1 и 2, внутривенная инъекция может быть введена на неделю 3, и подкожная инъекция может быть введена на неделю 4 или подкожные инъекции могут быть введены на недели 1-3, а внутривенная инъекция может быть введена на неделю 4.

Первая композиция может быть введена в различных эффективных дозах (т.е. масса активного ингредиента, вводимого на 1 килограмм массы тела, выражается в единицах мг/кг или м/к) в зависимости от тяжести заболевания. Обычно может быть введена эффективная доза от 0,05 мг/кг до 20 мг/кг в неделю (например, от 0,1 мг/кг до 5 мг/кг в неделю, от 0,5 мг/кг до 2 мг/кг в неделю, или от 0,5 мг/кг до 1 мг/кг в неделю). В соответствии с более конкретным примером, может быть введена эффективная доза 0,5 мг/кг в неделю.

Вторая композиция может быть введена в различных эффективных дозах в зависимости от тяжести заболевания. Обычно может быть введена эффективная доза от 0,1 до 40 мг/кг в неделю (например, от

0,2 до 20 мг/кг в неделю, от 0,5 до 10 мг/кг в неделю или от 0,5 до 5 мг/кг в неделю). В соответствии с более конкретным примером может быть введена эффективная доза от 1 до 5 мг/кг в неделю (например, от 2,5 до 5 мг/кг в неделю). Кроме того, объем одной дозы второй композиции может составлять 2 мл/участок или менее (например, 1 мл/участок или менее), а концентрация IDS может составлять от 1 до 300 мг/мл.

Еженедельная доза второй композиции может быть приготовлена так, чтобы концентрация IDS в сыворотке пациента составляла от 10 до 10000 нг/мл через 24 ч после введения; средняя максимальная концентрация в сыворотке (C_{max}) составляла 1,5 мкг/мл или более; а площадь под кривой зависимости концентрации от времени (AUC) составляла от 200 до 1000 мин·мкг/мл или более.

Введение второй композиции может быть осуществлено так, чтобы IDS доставлялась в ткани, выбранные из группы, состоящей из мышцы, кожи, печени, почек, селезенки, сустава, кости, легких, дыхательных путей, языка, верхних дыхательных путей, глаза, уха, соединительной ткани и сердца; или так, чтобы концентрация IDS в вышеупомянутых тканях могла увеличиваться. Введение второй композиции может приводить к увеличению активности IDS в тканях по меньшей мере в 1-10 раз или более по сравнению с контрольной группой; к увеличению активности на 10-600 нмоль/ч/мг или более и к увеличению активности на 10-95% или более по сравнению с нормальной активностью IDS.

Введение второй композиции может быть осуществлено так, чтобы концентрация GAG в сыворотке, в плазме, в моче и в вышеупомянутых тканях снижалась на 10-100% по сравнению с концентрацией GAG у контрольной группы (т.е. у контрольной группы до введения или у необработанной контрольной группы) и у нормальной группы (т.е. в нормальных тканях с отсутствием синдрома Гунтера); и так, чтобы размер печени или селезенки снижался на 10-100% по сравнению с размером у контрольной группы (т.е. у контрольной группы до введения или у необработанной контрольной группы) и у нормальной группы (т.е. в нормальных тканях с отсутствием синдрома Гунтера).

Введение второй композиции может быть осуществлено так, чтобы после проведения испытания по оценке походки в течение 6 мин, пациент мог пройти на 10-250 м или больше по сравнению с пациентом контрольной группы (т.е. у контрольной группы до введения или у необработанной контрольной группы) и на 10-1000% или более по сравнению с пациентом контрольной группы (т.е. у контрольной группы до введения или у необработанной контрольной группы).

Настоящее изобретение более подробно описано ниже со ссылкой на нижеследующие примеры и примеры испытаний. Однако эти примеры и примеры испытаний приводятся лишь для иллюстрации настоящего изобретения и не ограничивают его объема.

В нижеследующих примерах испытаний IV или I.V. означает внутривенную инъекцию. SC или S.C означает подкожную инъекцию. ФК означает фармакокинетику. ФД означает фармакодинамику. Кроме того, WT означает дикого типа, а KO означает IDS-нокаут.

Пример испытаний 1. Фармакокинетическое исследование по лечению синдрома Гунтера путем одного IV- или SC-введения.

IV-композицию и SC-композицию вводили мышам для определения концентрации IDS в сыворотке и проводили фармакокинетический анализ с помощью AUC и анализ на биодоступность. В данном случае использовали самцов 6-8-недельных мышей. Протокол эксперимента систематизирован в табл. 1.

Таблица 1

Протокол фармакокинетического эксперимента с одним введением

Группа (начальный возраст)	Подгруппа (3/время)	Способ введен ия	Схема введения доз (мг/кг)	Время ФК-анализа
Самцы WT (n=72) (возраст 6-8 недель)	N=18	I.V	5	5 мин, 30 мин, 1 ч, 3 ч, 6 ч, 8 ч
	N=18	S.C	5	1 ч, 2 ч, 8 ч, 12 ч, 16 ч, 24 ч
	N=18	S.C	10	1 ч, 2 ч, 8 ч, 12 ч, 16 ч, 24 ч
	N=18	SC	20	1 ч, 2 ч, 8 ч, 12 ч, 16 ч, 24 ч

72 нормальных мышей распределяли на четыре группы. Одной группе вводили внутривенную инъекцию 5 мг/кг, которая в 10 раз превышала клиническую дозу (0,5 мг/кг) внутривенной инъекции (IV), а другим трем группам вводили подкожную инъекцию 5, 10 и 20 мг/кг соответственно. Концентрацию IDS в сыворотке анализировали с помощью ELISA. Результаты представлены на фиг. 1. Для ФК-анализа использовали Phoenix™ WinNonlin® (ver 6,4, Pharsight)/NCA (некамерный анализ). Результаты фармакокинетического анализа систематизированы в табл. 2.

Таблица 2

Результаты фармакокинетического анализа с одним введением

ФК-параметры	Внутривенная инъекция	Подкожная инъекция		
	5 мг/кг	5 мг/кг	10 мг/кг	20 мг/кг
$C_{\max}$ (мкг/мл)	66,8 ± 1,57	1,41 ± 0,30	2,90 ± 0,687	8,48 ± 1,27
$C_{\max}/D$ (кг·мкг/мл/мг)	–	0,281 ± 0,06	0,290 ± 0,0687	0,424 ± 0,0636
C_0 (мкг/мл)	82,4 ± 1,28	–	–	–
C_{last} (мкг/мл)	0,176 ± 0,0187	0,116 ± 0,002	0,113 ± 0,0474	0,393 ± 0,0459
$T_{\max}$ (ч)	–	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
$T_{1/2}$ (ч, конечная фаза)	1,80 ± 0,218	6,89 ± 0,952	5,25 ± 0,501	5,60 ± 0,567
AUC_{INF} (ч·мкг/мл)	48,2 ± 3,61	10,6 ± 0,958	19,2 ± 4,02	53,9 ± 0,444
AUC_{INF}/D (ч·кг·мкг/мл/мг)	–	2,12 ± 0,192	1,92 ± 0,402	2,69 ± 0,0222
$AUC\%_{\text{Extrap}}$ (%)	0,969 ± 0,279	11,0 ± 2,24	4,37 ± 1,39	5,94 ± 1,27
Cl (мл/ч/кг)	104,1 ± 7,97	–	–	–
V_{ss} (мл/кг)	83,3 ± 3,99	–	–	–
MRT_{INF} (ч)	0,801 ± 0,0235	10,0 ± 1,16	7,29 ± 0,362	7,52 ± 0,765
BA (%)	–	22,0	19,9	27,9

Как показано выше в таблице, IDS достигала максимальной концентрации в сыворотке ($C_{\max}$, мкг/мл) с высокой скоростью в течение 1 ч в случае SC-введения. В случае IV-введения время полужизни ($T_{1/2}$, ч) составляло 1,80 ч в конечной фазе, а в случае SC-введения время полужизни увеличивалось до 5,25-6,89 ч. Среднее время удерживания (MRT , ч) составляло 0,801 ч для группы, которой вводили IV-инъекцию, и 7,29-10,0 ч для группы, которой вводили SC-инъекцию. Концентрация (C_0 , мкг/мл) сразу после IV-введения составляла 82,4 мкг/мл, что указывает на то, что данная концентрация была самой высокой при этой дозе (5 мг/кг). Величины $C_{\max}$ и AUC_{INF} , которые наблюдались после SC-введения в организм лекарственных средств, увеличивались в зависимости от дозы. Однако такое увеличение было несколько выше для группы, которой вводили 20 мг/кг, чем для групп, которым вводили 5 и 10 мг/кг. Величина $AUC\%_{\text{Extrap}}$ составляла от 0,969 до 11,0% для всех экспериментальных групп.

Величины биодоступности (BA , %) составляли 22,0, 19,9 и 27,9% для групп, которым подкожно вводили дозы 5, 10, и 20 мг/кг (как видно на AUC при SC-введении 5 мг/кг и предположительно при линейной ФК) соответственно. В целом, величины BA составляли приблизительно 20% по сравнению с величинами при IV-введении. Следовательно, можно предположить, что SC-введение в дозе, которая приблизительно в 5 раз превышает (2,5 мг/кг) IV-дозу, будет давать терапевтический эффект, аналогичный терапевтическому эффекту при IV-введении.

Пример испытания 2. Фармакодинамическое исследование по лечению синдрома Гунтера путем одного IV- или SC-введения.

Что касается фармакокинетического анализа (т.е. величина BA при SC-инъекции составляла приблизительно 20% от величины, полученной при IV-инъекции), то было установлено, что эффективная доза SC-инъекции составляла 2,5 мг/кг. После одной IV- или SC-инъекции их влияние на снижение концентрации GAG сравнивали в течение 4 недель. Пробы мочи брали в последний день 2-й недели (т.е. на день 14) и в последний день 4-й недели (т.е. на день 28), начиная со дня введения дозы (день 0). Образцы тканей (печени, головного мозга, сердца, почек, селезенки и легких) также брали в последний день 4-й недели (т.е. на день 28) для измерения концентраций GAG. Пробы мочи брали один раз в три дня до введения лекарственного средства для сравнения. Протокол фармакодинамического эксперимента систематизирован в табл. 3.

Таблица 3

Протокол фармакодинамического эксперимента с одним введением

Группа (начальный возраст)	Условия проведения испытания	Подгруппа	Способ введения	Схема введения доз (мг/кг)
WT (n=6)	Носитель	N=6	S.C	–
KO (n=30) (возраст 6–8 недель)	Носитель	N=6	S.C	–
	Состав для лечения синдрома Гунтера	N=6	S.C	0,5
		N=6	S.C	2,5
		N=6	S.C	12,5
	Состав для лечения синдрома Гунтера	N=6	I.V	0,5

Результаты анализа на концентрацию GAG в пробах мочи, проводимого согласно протоколу эксперимента, представленному в табл. 3, систематизированы в табл. 4 и на фиг. 2.

Таблица 4

Результаты анализа на концентрацию GAG в пробах мочи
с одним введением (день 28)

Группа		GAG (мкг/мкг креатинина)	P-величина	Обозначение
WT (n=6)		0,577 ± 0,155	<0,001	***
KO (n=6)		1,29 ± 0,0958	–	–
SC	0,5 мг/кг (n=6)	1,07 ± 0,0975	<0,05	*
	2,5 мг/кг (n=6)	0,867 ± 0,101	<0,001	***
	12,5 мг/кг (n=6)	0,815 ± 0,113	<0,001	***
IV	0,5 мг/кг (n=6)	0,923 ± 0,136	<0,001	***

Величины концентрации GAG выражены как среднее ± ср. кв. откл.

*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 для KO.

Односторонний критерий ANOVA и критерий множественного сравнения Дюннетта (GraphPad Prism).

Результаты анализа на концентрацию GAG в образцах селезенки, проводимого согласно протоколу эксперимента, представленному в табл. 3, систематизированы в табл. 5 и на фиг. 3.

Таблица 5

Результаты анализа на концентрацию GAG в образцах селезенки
с одним введением (день 28)

Группа		GAG (мкг/мг белка)	P-величина	Обозначение
WT (n=6)		1,41 ± 0,121	<0,001	***
KO (n=6)		8,55 ± 0,619	–	–
SC	0,5 мг/кг (n=6)	5,88 ± 0,329	<0,001	***
	2,5 мг/кг (n=6)	5,89 ± 0,524	<0,001	***
	12,5 мг/кг (n=6)	4,03 ± 0,362	<0,001	***
IV	0,5 мг/кг (n=6)	4,80 ± 0,470	<0,001	***

Величины концентрации GAG выражены как среднее ± ср. кв. откл.

*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 для KO.

Односторонний критерий ANOVA и критерий множественного сравнения Дюннетта (GraphPad Prism).

Результаты анализа на концентрацию GAG в образцах сердца, проводимого согласно протоколу эксперимента, представленному в табл. 3, систематизированы в табл. 6 и на фиг. 4.

Таблица 6

Результаты анализа на концентрацию GAG в образцах сердца
с одним введением (день 28)

Группа		GAG (мкг/мкг белка)	P-величина	Обозначение
WT (n=6)		0,390 ± 0,0594	<0,001	###
KO (n=6)		11,1 ± 0,560	–	–
SC	0,5 мг/кг (n=6)	10,7 ± 0,799	>0,05	–
	2,5 мг/кг (n=6)	6,75 ± 0,405	>0,05	–
	12,5 мг/кг (n=6)	3,49 ± 0,212	<0,01	##
IV (n=6)		5,96 ± 0,0613	>0,05	–

Величины концентрации GAG выражены как среднее ± ср. кв. откл.

#: p<0,05, ##: p<0,01, ###: p<0,001 для КО.

Критерий Крускала-Уоллиса и критерий множественного сравнения Данна (GraphPad Prism).

Результаты анализа на концентрацию GAG в образцах почек, проводимого согласно протоколу эксперимента, представленному в табл. 3, систематизированы в табл. 7 и на фиг. 5.

Таблица 7

Результаты анализа на концентрацию GAG в образцах почек
с одним введением (день 28)

Группа		GAG (мкг/мг белка)	P-величина	Обозначение
WT (n=6)		0,639 ± 0,0593	<0,01	##
KO (n=6)		25,0 ± 0,957	–	–
SC	0,5 мг/кг (n=6)	25,9 ± 0,645	>0,05	–
	2,5 мг/кг (n=6)	23,8 ± 0,821	>0,05	–
	12,5 мг/кг (n=6)	16,4 ± 0,740	>0,05	–
IV (n=6)		23,5 ± 1,34	>0,05	–

Величины концентрации GAG выражены как среднее ± ср. кв. откл.

#: p<0,05, ##: p<0,01, ###: p<0,001 для КО.

Критерий Крускала-Уоллиса и критерий множественного сравнения Данна (GraphPad Prism).

Результаты анализа на концентрацию GAG в образцах печени, проводимого согласно протоколу эксперимента, представленному в табл. 3, систематизированы в табл. 8 и на фиг. 6.

Таблица 8

Результаты анализа на концентрацию GAG в образцах печени
с одним введением (день 28)

Группа		GAG (мкг/мг белка)	P-величина	Обозначение
WT (n=6)		0,676 ± 0,0143	<0,001	###
KO (n=6)		50,5 ± 1,19	–	–
SC	0,5 мг/кг (n=6)	23,7 ± 0,159	>0,05	–
	2,5 мг/кг (n=6)	18,6 ± 0,815	>0,05	–
	12,5 мг/кг (n=6)	10,3 ± 0,799	<0,01	##
IV	0,5 мг/кг (n=6)	16,0 ± 0,762	>0,05	–

Величины концентрации GAG выражены как среднее ± ср. кв. откл.

#: p<0,05, ##: p<0,01, ###: p<0,001 для КО.

Критерий Крускала-Уоллиса и критерий множественного сравнения Данна (GraphPad Prism).

Результаты анализа на концентрацию GAG в образцах легких, проводимого согласно протоколу эксперимента, представленному в табл. 3, систематизированы в табл. 9 и на фиг. 7.

Таблица 9

Результаты анализа на концентрацию GAG в образцах легких
с одним введением (день 28)

Группа		GAG (мкг/мг белка)	P-величина	Обозначение
WT (n=6)		0,992 ± 0,0951	<0,001	###
KO (n=6)		34,4 ± 2,43	–	–
SC	0,5 мг/кг (n=6)	31,3 ± 2,42	>0,05	–
	2,5 мг/кг (n=6)	28,8 ± 2,10	>0,05	–
	12,5 мг/кг (n=6)	19,2 ± 0,955	<0,05	#
IV	0,5 мг/кг (n=6)	29,1 ± 2,11	>0,05	–

Величины концентрации GAG выражены как среднее ± ср. кв. откл.

#: p<0,05, ##: p<0,01, ###: p<0,001 для КО.

Критерий Крускала-Уоллиса и критерий множественного сравнения Данна (GraphPad Prism).

Результаты анализа на концентрацию GAG в образцах головного мозга, проводимого согласно протоколу эксперимента, представленному в табл. 3, систематизированы в табл. 10 и на фиг. 8.

Таблица 10

Результаты анализа на концентрацию GAG в образцах головного мозга
с одним введением (день 28)

Группа		GAG (мкг/мг белка)	P-величина	Обозначение
WT (n=6)		0,558 ± 0,0369	<0,001	***
KO (n=6)		1,27 ± 0,0651	–	–
SC	0,5 мг/кг (n=6)	1,27 ± 0,0868	>0,05	–
	2,5 мг/кг (n=6)	1,19 ± 0,0602	>0,05	–
	12,5 мг/кг (n=6)	1,16 ± 0,0756	>0,05	–

IV	0,5 (n=6) мг/кг	1,12 ± 0,0798	>0,05	-
----	--------------------	---------------	-------	---

Величины концентрации GAG выражены как среднее ± ср. кв. откл.

*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 для КО.

Односторонний критерий ANOVA и критерий множественного сравнения Дюнкетта (GraphPad Prism).

Исходя из результатов, представленных в табл. 4-10, можно сделать вывод, что состав для лечения синдрома Гунтера согласно изобретению, по существу, снижает концентрацию GAG в зависимости от дозы при введении одной подкожной (SC) инъекции. Кроме того, при введении 2,5 мг/кг путем подкожной (SC) инъекции эффект снижения GAG скорости был аналогичен эффекту, достигаемому при введении клинической дозы 0,5 мг/кг путем внутривенной (IV) инъекции.

Пример испытания 3: Определение скорости SC-вливания состава для лечения синдрома Гунтера.

Коммерчески доступный флакон для внутривенной инъекции IDS имеет объем 3,0 мл и содержит раствор, который включает 6,0 мг фермента IDS в концентрации 2,0 мг/мл. Этот флакон предназначен для одноразового использования. Рекомендованная доза для пациентов составляет 0,5 мг на 1 кг массы тела, и эту дозу постепенно вводят пациентам внутривенно при посещении пациентом клиники один раз в неделю. Количество, соответствующее массе тела пациента, разводят в 100 мл 0,9% хлорида натрия в воде для инъекции, который вводили внутривенно. Общая доза должна быть введена постепенно в течение 1-3 ч или более. Время вливания может быть увеличено, так как любое вливание может вызывать какие-либо реакции. Однако время вливания не должно превышать 8 ч. Начальная скорость вливания должна составлять 8 мл/ч в течение 15 мин после начала вливания, и эта скорость может быть затем увеличена на 8 мл/ч через интервалы в 15-мин так, чтобы общая доза была введена в предусмотренный период времени, при условии отсутствия токсической реакции. Однако лечащие врачи и медсестры должны быть проинформированы, что скорость вливания не должна превышать максимальную величину 100 мл/ч.

В случае подкожной инъекции относительно небольшой объем обычно вводят за один раз. Однако лекарственное средство может быть введено путем непрерывного SC-введения или SC-вливания, если имеется ограничение, при котором лекарственное средство концентрируют для снижения его общего объема. В случае если лекарственное средство, изначально приготовленное для внутривенной инъекции, было введено путем подкожной инъекции в соответствии с настоящим изобретением, то необходимо точно подтвердить, можно ли это лекарственное средство использовать для непрерывного SC-введения или SC-вливания. В соответствии с настоящим изобретением подкожное введение может быть осуществлено в объеме 2 мл/участок или менее. В соответствии с более конкретным примером эта доза может составлять 1 мл/участок или менее.

Пример испытания 4. Фармакодинамическое исследование по лечению синдрома Гунтера путем повторных и комбинированных IV- и SC-введений.

Был использован активный ингредиент идурсульфазы бета согласно одному из вариантов осуществления изобретения. Эффективная доза для IV-введения составляла 0,5 мг/кг, а эффективная доза для SC-введения составляла 0,5, 1, 2,5 или 5 мг/кг. Мышам вводили повторные IV-инъекции, повторные SC-инъекции и повторные IV-инъекции и SC-инъекции согласно протоколу эксперимента, представленному ниже в табл. 11. В случае если эффективная доза для IV- и SC-введения составляла 0 мг/кг, как показано в табл. 11, то это означает, что контрольной группе вводили только физиологический раствор.

Таблица 11

Мышь	Вещество	Еженедельная схема введения доз							
		день 0	день 7	день 14	день 21	день 28	день 35	день 42	день 49
WT	Физиологический раствор	IV (0)	SC (0)	SC (0)	SC (0)	IV (0)	SC (0)	SC (0)	SC (0)
IDS КО	Физиологический раствор	IV (0)	SC (0)	SC (0)	SC (0)	IV (0)	SC (0)	SC (0)	SC (0)

Идурсульфаз бета	IV (0,5)	SC (0,5)	SC (0,5)	SC (0,5)	IV (0,5)	SC (0,5)	SC (0,5)	SC (0,5)
	IV (0,5)	SC (1)	SC (1)	SC (1)	IV (0,5)	SC (1)	SC (1)	SC (1)
	IV (0,5)	SC (2,5)	SC (2,5)	SC (2,5)	IV (0,5)	SC (2,5)	SC (2,5)	SC (2,5)
	IV (0,5)	SC (5)	SC (5)	SC (5)	IV (0,5)	SC (5)	SC (5)	SC (5)
	IV (0,5)	IV (0,5)	IV (0,5)	IV (0,5)	IV (0,5)	IV (0,5)	IV (0,5)	IV (0,5)
	SC (2,5)	SC (2,5)	SC (2,5)	SC (2,5)	SC (2,5)	SC (2,5)	SC (2,5)	SC (2,5)
	Идурсульфаз	IV (0,5)	IV (0,5)	IV (0,5)	IV (0,5)	IV (0,5)	IV (0,5)	IV (0,5)

День 0 означает первый день введения, а день 7, день 14, день 21, день 28, день 35, день 42 и день 49 означает 7-, 14-, 21-, 28-, 35-, 42- и 49-й дни после первого дня введения соответственно.

Пробы мочи брали на день -3, день 14, день 28, и день 56; а день -3 означает взятие проб за 3 дня до первого дня введения.

Образцы тканей брали на день 56.

IV или SC означает способ введения в соответствующий день введения (IV: внутривенная инъекция, SC: подкожная инъекция).

Число в скобках после IV или SC означает эффективную дозу состава для лечения синдрома Гунтера на одно введение, выраженную в мг/кг,

Идурсульфаз бета представляет собой активный ингредиент в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения.

Идурсульфаз была использована для введения контрольной группе.

В соответствии с вышеуказанным протоколом эксперимента повторные IV-введения, повторные SC-введения и повторные IV- и SC-введения осуществляли всего 8 раз в каждом испытании с интервалами в одну неделю. Пробы мочи брали за три дня до первого дня введения, а также на 14-, 28- и 56-й дни со дня первого введения соответственно. Образцы ткани брали на 56-й день (D 56). Затем сравнивали эффекты снижения GAG.

Результаты анализа на концентрацию GAG в образцах почек, печени и селезенки, проводимого в соответствии с протоколом эксперимента, представленным в табл. 11, систематизированы в табл. 12-14 и на фиг. 9-11.

Таблица 12

Результаты анализа на концентрацию GAG в образцах почек с комбинированными введениями (день 56)					
Мышь	Вещество	Концентрация	GAG (мкг/мг белка)	P-величина	Обозначение
WT (n=4)	Физиологический раствор	–	0,25±0,25	<0,001	***
IDS KO (n=4)	Физиологический раствор	–	20,65±0,30	–	–
	Идурсульфаз бета	0,5 IV ® 0,5 SC	13,66±1,40	<0,05	*
		0,5 IV ® 1,0 SC	13,98±0,94	<0,05	*
		0,5 IV ® 2,5 SC	10,86±1,22	<0,01	**
		0,5 IV ® 5,0 SC	6,61±2,66	<0,001	***
		2,5 SC	14,83±0,90	>0,05	–
		0,5 IV	8,01±2,92	<0,001	***
	Идурсульфаз	0,5 IV	10,47±1,92	<0,001	***

Величины концентрации GAG выражены как среднее ± ср. кв. откл.

*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 для KO.

Односторонний критерий ANOVA и критерий множественного сравнения Дюнетта (GraphPad Prism).

Как показано в табл. 12 и на фиг. 9, при введении состава для лечения синдрома Гунтера в виде комбинации эффективной IV-дозы 0,5 мг/кг и эффективной SC-дозы 2,5 мг/кг (см. "0,5 IV ® 2,5 SC" в табл. 12 и на фиг. 9) и при введении состава для лечения синдрома Гунтера в виде комбинации эффективной IV-дозы 0,5 мг/кг и эффективной SC-дозы 5,0 мг/кг (см. "0,5 IV ® 5,0 SC" в табл. 12 и на фиг. 9), концентрации GAG в почках были эквивалентны концентрациям или были ниже, чем концентрации после повторных введений состава в эффективной IV-дозе 0,5 мг/кг (см. "0,5 IV" в табл. 12 и на фиг. 9).

Таблица 13

Результаты анализа на концентрацию GAG в образцах печени с комбинированными введениями (день 56)					
Мышь	Вещество	Концентрация	GAG (мкг/мг белка)	P-величина	Обозначение
WT (n=4)	Физиологический раствор	–	0,94±0,09	<0,001	***
IDS KO (n=4)	Физиологический раствор	–	30,05±0,65	–	–
	Идурсульфата бета	0,5 IV ® 0,5 SC	1,60±0,43	<0,001	***
		0,5 IV ® 1,0 SC	1,31±0,38	<0,001	***
		0,5 IV ® 2,5 SC	1,58±0,42	<0,001	***
		0,5 IV ® 5,0 SC	0,81±0,18	<0,001	***
		2,5 SC	2,75±0,66	<0,001	***
		0,5 IV	0,91±0,17	<0,001	***
	Идурсульфата	0,5 IV	1,07±0,21	<0,001	***

Величины концентрации GAG выражены как среднее ± ср. кв. откл.

*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 для KO.

Односторонний критерий ANOVA и критерий множественного сравнения Дюннетта (GraphPad Prism).

Как показано в табл. 13 и на фиг. 10, при введении состава для лечения синдрома Гунтера в виде комбинации эффективной IV-дозы 0,5 мг/кг и эффективной SC-дозы 0,5 мг/кг (см. "0,5 IV ® 0,5 SC" в табл. 13 и на фиг. 10), при введении состава для лечения синдрома Гунтера в виде комбинации эффективной IV-дозы 0,5 мг/кг и эффективной SC-дозы 1,0 мг/кг (см. "0,5 IV ® 1,0 SC" в табл. 13 и на фиг. 10), при введении состава для лечения синдрома Гунтера в виде комбинации эффективной IV-дозы 0,5 мг/кг и эффективной SC-дозы 2,5 мг/кг (см. "0,5 IV ® 2,5 SC" в табл. 13 и на фиг. 10) и при введении состава для лечения синдрома Гунтера в виде комбинации эффективной IV-дозы 0,5 мг/кг и эффективной SC-дозы 5,0 мг/кг (см. "0,5 IV ® 5,0 SC" в табл. 13 и на фиг. 10), концентрации GAG в печени были эквивалентны концентрациям или ниже, чем концентрации после повторных введений состава в эффективной IV-дозе 0,5 мг/кг (см. "0,5 IV" в табл. 13 и на фиг. 10).

Таблица 14

Результаты анализа на концентрацию GAG в образцах селезенки с комбинированными введениями (день 56)					
Мышь	Вещество	Концентрация	GAG (мкг/мг белка)	P-величина	Обозначение
WT (n=4)	Физиологический раствор	–	0,00±0,00	<0,001	***
IDS KO (n=4)	Физиологический раствор	–	4,64±0,43	–	–
	Идурсульфата бета	0,5 IV ® 0,5 SC	1,20±0,44	<0,001	***
		0,5 IV ® 1,0 SC	0,77±0,27	<0,001	***
		0,5 IV ® 2,5 SC	0,85±0,53	<0,001	***
		0,5 IV ® 5,0 SC	0,45±0,27	<0,001	***
		2,5 SC	1,43±0,15	<0,001	***
		0,5 IV	0,68±0,31	<0,001	***
	Идурсульфата	0,5 IV	0,65±0,23	<0,001	***

Величины концентрации GAG выражены как среднее ± ср. кв.откл.

*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 для КО.

Односторонний критерий ANOVA и критерий множественного сравнения Дюнетта (GraphPad Prism).

Как показано в табл. 14 и на фиг. 11, при введении состава для лечения синдрома Гунтера в виде комбинации эффективной IV-дозы 0,5 мг/кг и эффективной SC-дозы 1,0 мг/кг (см. "0,5 IV ® 1,0 SC" в табл. 14 и на фиг. 11), при введении состава для лечения синдрома Гунтера в виде комбинации эффективной IV-дозы 0,5 мг/кг и эффективной SC-дозы 2,5 мг/кг (см. "0,5 IV ® 2,5 SC" в табл. 14 и на фиг. 11), и при введении состава для лечения синдрома Гунтера в виде комбинации эффективной IV-дозы 0,5 мг/кг и эффективной SC-дозы 5,0 мг/кг (см. "0,5 IV ® 5,0 SC" в табл. 14 и на фиг. 11), концентрации GAG в селезенке были эквивалентны концентрациям или были ниже, чем концентрации после повторных введений состава в эффективной IV-дозе 0,5 мг/кг (см. "0,5 IV" в табл. 14 и на фиг. 11).

В соответствии с протоколом эксперимента, представленным в табл. 11, пробы мочи брали на день 0, день 14, день 28 и день 56. Результаты анализа на концентрацию GAG систематизированы в табл. 15 и на фиг. 12.

Таблица 15

Результаты анализа на концентрацию GAG в пробах мочи с комбинированными введениями (день 56)					
Мышь	Вещество	Концентрация	GAG (мкг/мг белка)	P-величина	Обозначение
WT (n=4)	Физиологический раствор	–	0,14±0,02	<0,01	**
IDS KO (n=4)	Физиологический раствор	–	0,49±0,04	–	–
	Идурсульфата бета	0,5 IV ® 0,5 SC	0,27±0,06	>0,05	–
		0,5 IV ® 1,0 SC	0,26±0,07	<0,05	*
		0,5 IV ® 2,5 SC	0,31±0,06	>0,05	–
		0,5 IV ® 5,0 SC	0,24±0,02	<0,05	*
		2,5 SC	0,39±0,09	>0,05	–
		0,5 IV	0,32±0,01	>0,05	–
	Идурсульфата	0,5 IV	0,25±0,03	<0,05	*

Величины концентрации GAG выражены как среднее ± ср. кв.откл.

*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 для КО.

Односторонний критерий ANOVA и критерий множественного сравнения Дюнетта (GraphPad Prism).

Как показано в табл. 15 и на фиг. 12, при введении состава для лечения синдрома Гунтера в виде комбинации эффективной IV-дозы 0,5 мг/кг и эффективной SC-дозы 1,0 мг/кг (см. "0,5 IV ® 1,0 SC" в табл. 15 и на фиг. 12), при введении состава для лечения синдрома Гунтера в виде комбинации эффективной IV-дозы 0,5 мг/кг и эффективной SC-дозы 2,5 мг/кг (см. "0,5 IV ® 2,5 SC" в табл. 15 и на фиг. 12) и при введении состава для лечения синдрома Гунтера в виде комбинации эффективной IV-дозы 0,5 мг/кг и эффективной SC-дозы 5,0 мг/кг (см. "0,5 IV ® 5,0 SC" в табл. 15 и на фиг. 12), концентрации GAG во всех пробах мочи, взятых на день 14, день 28 и день 56, были эквивалентны концентрациям или были ниже, чем концентрации после повторных введений состава в эффективной IV-дозе 0,5 мг/кг (см. "0,5 IV" в табл. 15 и на фиг. 12).

В целом, исходя из результатов экспериментов, проводимых в соответствии с протоколом эксперимента, представленным в табл. 11, можно сделать вывод, что способ комбинированных IV/SC-введений согласно изобретению, в частности комбинированных введений эффективной IV-дозы 0,5 мг/кг и эффективной SC-дозы от 2,5 до 5 мг/кг, давал эффект при лечении синдрома Гунтера, который был эквивалентен или превышал эффект, достигаемый при стандартном IV-введении (т.е. IV-введении с интервалами в 7 дней).

Следовательно, применение состава для комбинированных IV/SC-введений и способа комбинированного IV/SC-введения согласно изобретению предусматривает замену определенного числа IV-введений стандартным методом IV-введения один раз в неделю, при котором пациент должен посещать клинику каждую неделю на 3-4 ч или более, на SC-введение, которое может быть осуществлено пациенту на дому. Применение состава и способа согласно изобретению предусматривает, что пациенты будут реже посещать клинику, чем при проведении стандартного метода IV-введения один раз в неделю, что, тем самым, позволяет устранить возможность пропуска пациентом визита в клинику для лечения и положительно повлиять на соблюдение пациентами, страдающими синдромом Гунтера, режима лечения. Кроме того, поскольку состав и способ согласно изобретению обеспечивают эквивалентную или более высокую эффективность лекарственного средства по сравнению со стандартным IV-введением один раз в неделю, то они позволяют осуществлять более эффективное лечение синдрома Гунтера по сравнению со стандартной терапией.

Пример испытаний 5. Активный ингредиент состава для лечения синдрома Гунтера.

Активный ингредиент, который может быть использован в составе и в способе лечения синдрома Гунтера согласно варианту осуществления изобретения, может включать, например, SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

Список последовательностей, представленный в свободном формате

SEQ ID NO: 1

Аминокислотная последовательность IDS

525 а.к.

SETQANSTTD	ALNVLLIIVD	DLRPSLGCGY	DKLVRSPNID	QLASHSLLFQ
NAFAQQAVCA	PSRVSF LTGR	RPDTTRL YDF	NSYWRVHAGN	FSTIPQYFKE
NGYVTMSVGK	VFHPGISSNH	TDDSPYSWSF	PPYHPSSEKY	ENTKTCRGPD
GELHANLLCP	VDVLDVPEGT	LPDKQSTEQA	IQLLEKMKTS	ASPFFLAVGY
HKPHIPFRYP	KEFQKLYPLE	NITLAPDPEV	PDGLPPVAYN	PWMDIRQRED
VQALNISVPY	GPIPVDFQRK	IRQSYFASVS	YLDTVQGRLL	SALDDLQLAN
STIIAFTSDH	GWALGEHGEW	AKYSNFDVAT	HVPLIFYVPG	RTASLPEAGE
KLFPYLDPDF	SASQLMEPGR	QSMDLVELVS	LFPTLAGLAG	LQVPPRCVP
SFHVELCREG	KNLLKHFRFR	DLEEDPYLPG	NPRELIAYSQ	YPRSPDIPQW
NSDKPSLKDI	KIMGYSIRTI	DYRYTVWVGF	NPDEFLANFS	DIHAGELYFV
DSDPLQDHNH YNDSQGGDLF QLLMP				

SEQ ID NO: 2

Аминокислотная последовательность IDS

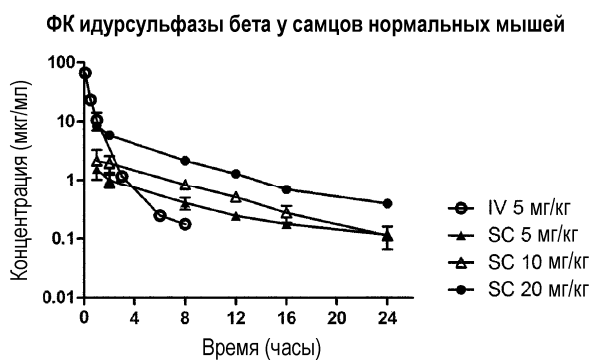
525 а.к.

SETQANSTTD	ALNVLLIIVD	DLRPSLGCGY	DKLVRSPNID	QLASHSLLFQ
NAFAQQAVG*A	PSRVSF LTGR	RPDTTRL YDF	NSYWRVHAGN	FSTIPQYFKE
NGYVTMSVGK	VFHPGISSNH	TDDSPYSWSF	PPYHPSSEKY	ENTKTCRGPD
GELHANLLCP	VDVLDVPEGT	LPDKQSTEQA	IQLLEKMKTS	ASPFFLAVGY
HKPHIPFRYP	KEFQKLYPLE	NITLAPDPEV	PDGLPPVAYN	PWMDIRQRED
VQALNISVPY	GPIPVDFQRK	IRQSYFASVS	YLDTVQGRLL	SALDDLQLAN
STIIAFTSDH	GWALGEHGEW	AKYSNFDVAT	HVPLIFYVPG	RTASLPEAGE
KLFPYLDPDF	SASQLMEPGR	QSMDLVELVS	LFPTLAGLAG	LQVPPRCVP
SFHVELCREG	KNLLKHFRFR	DLEEDPYLPG	NPRELIAYSQ	YPRSPDIPQW
NSDKPSLKDI	KIMGYSIRTI	DYRYTVWVGF	NPDEFLANFS	DIHAGELYFV
DSDPLQDHNH YNDSQGGDLF QLLMP				

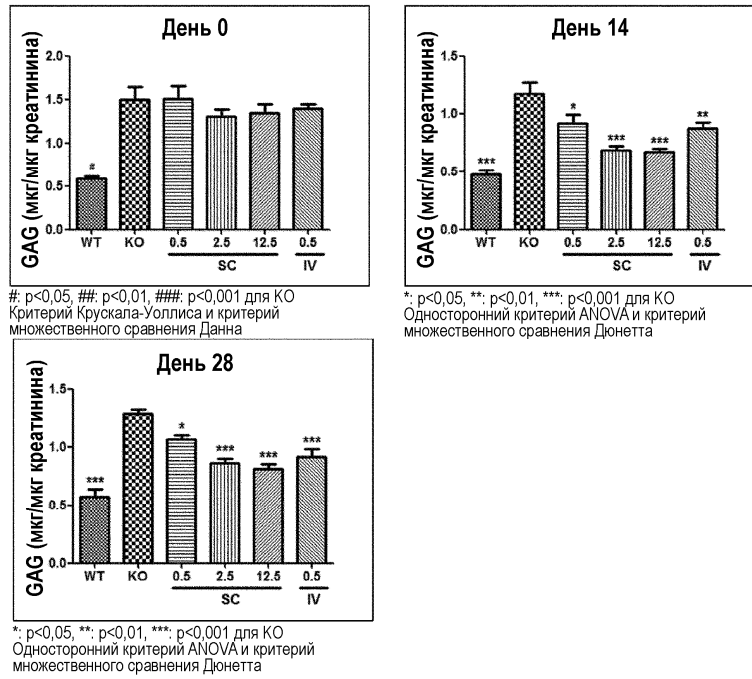
(G* в положении 59 вышеуказанной SEQ ID NO: 2 означает формилглицин (FGly)).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

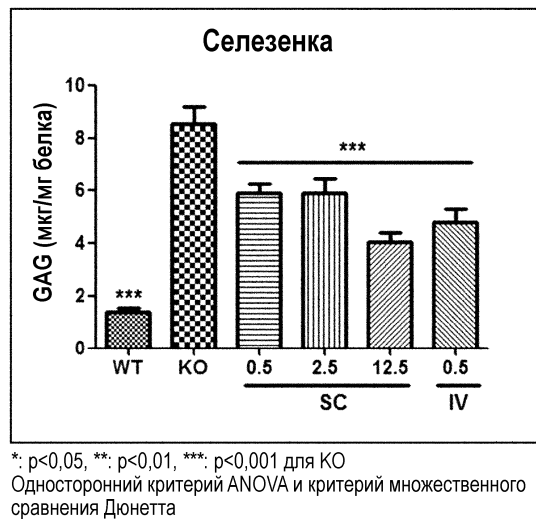
Способ лечения синдрома Гунтера, включающий внутривенную инъекцию эффективной дозы первой композиции и подкожную инъекцию эффективной дозы второй композиции, где первая композиция содержит идуронат-2-сульфатазу, состоящую по меньшей мере из одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1 и 2; вторая композиция содержит идуронат-2-сульфатазу, состоящую по меньшей мере из одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NOS: 1 и 2; первую композицию вводят посредством инъекции в эффективной дозе от 0,5 до 1 мг/кг в неделю; вторую композицию вводят посредством инъекции в эффективной дозе от 0,5 до 5 мг/кг в неделю; при этом первую композицию вводят посредством инъекции один раз в первую неделю, а вторую композицию вводят посредством инъекции 1 раз в неделю, на неделях 2-4.



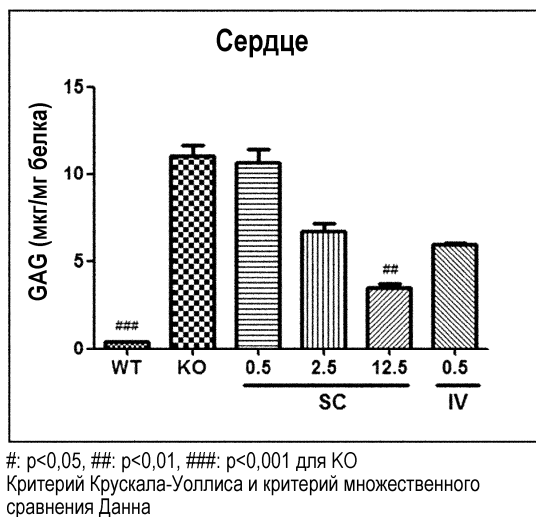
Фиг. 1



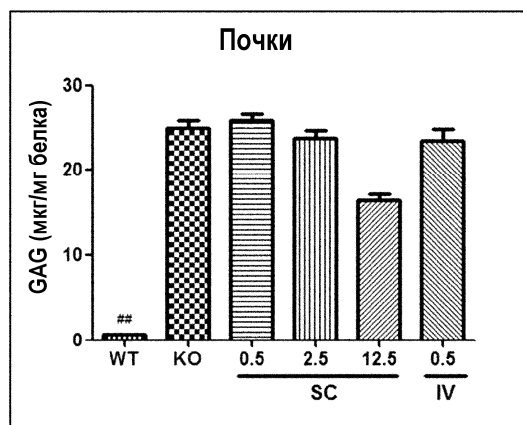
Фиг. 2



Фиг. 3

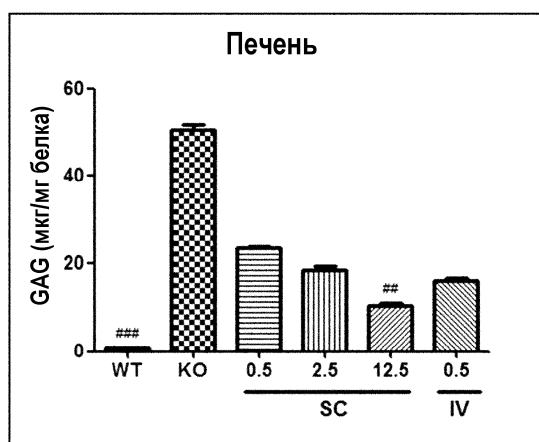


Фиг. 4



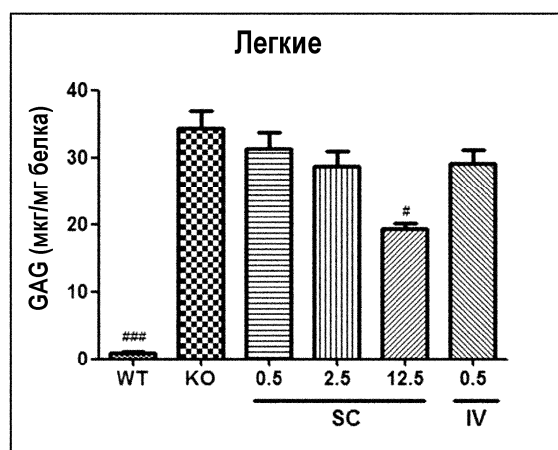
#: $p < 0,05$, ##: $p < 0,01$, ###: $p < 0,001$ для КО
Критерий Крускала-Уоллиса и критерий множественного сравнения Данна

Фиг. 5



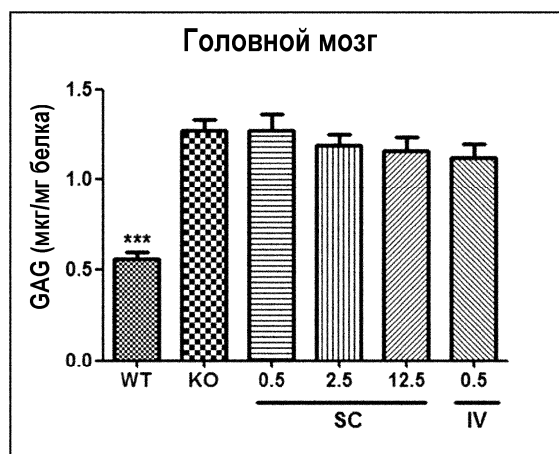
#: $p < 0,05$, ##: $p < 0,01$, ###: $p < 0,001$ для КО
Критерий Крускала-Уоллиса и критерий множественного сравнения Данна (GraphPad Prism)

Фиг. 6



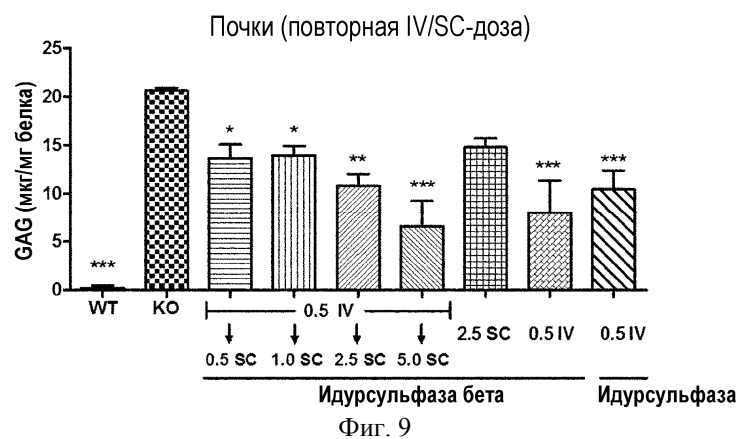
#: $p < 0,05$, ##: $p < 0,01$, ###: $p < 0,001$ для КО
Критерий Крускала-Уоллиса и критерий множественного сравнения Данна (GraphPad Prism)

Фиг. 7

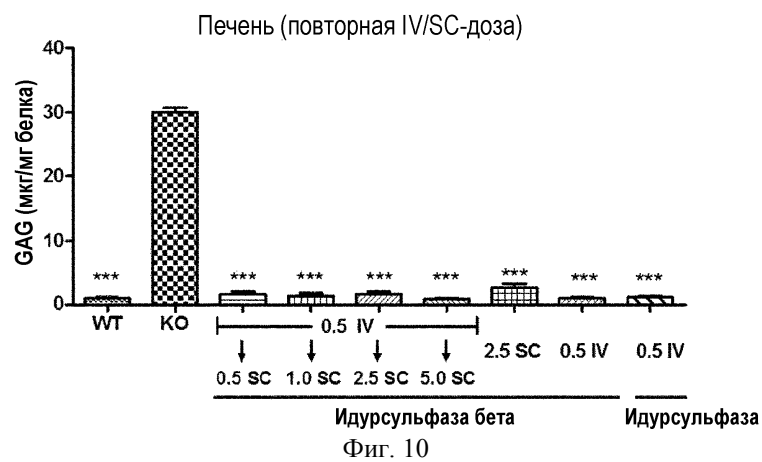


*, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$ для КО.
 Односторонний критерий ANOVA и критерий множественного сравнения Дюнетта (GraphPad Prism)

Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

