

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **041449**(13) **B1**

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2022.10.26**

(51) Int. Cl. **A61K 38/43** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201891533**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.12.21**

### (54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СИНДРОМА ХАНТЕРА

(31) **62/272,843; 62/369,970**

(32) **2015.12.30; 2016.08.02**

(33) **US**

(43) **2018.12.28**

(86) **PCT/KR2016/015060**

(87) **WO 2017/116066 2017.07.06**

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

(56) **US-A1-20140271598**

**US-A1-20150320843**

**CALIAS et al.: "CNS penetration of intrathecal-lumbar idursulfase in the monkey, dog and mouse: implications for neurological outcomes of lysosomal storage disorder", PloS One, vol. 7, № 1, e30341 (internal p. 1-13) (2012), see the whole document**

**US-B1-6537785**

**US-A-6153188**

(72) Изобретатель:  
**Окуяма Тораюки (JP), Дзин Тонг-Гиу,  
Биун Хан-Йеул, Сео Дзин-Воок, Ли  
Биоунг-Дзи, Ким Йонг-Чул, Дзанг Ин-  
Янг, Ли Киухиун (KR)**

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

(57) Изобретение относится к составу для интрацеребровентрикулярного введения для лечения синдрома Хантера, содержащему белок Идурсульфазу-бета (ИДС-β) в концентрации 15 мг/мл, хлорид натрия в концентрации 150 мМ, полисорбат 20 в концентрации 0,05 мг/мл, фосфат в концентрации не более 5 мМ и имеющему рН 6. Настоящее изобретение также относится к способу лечения синдрома Хантера, включающему стадию интрацеребровентрикулярного введения (ИЦВ введение) указанного состава субъекту, нуждающемуся в лечении, где ИЦВ введение осуществляют через интравентрикулярную катетерную систему и проводят в комбинации по меньшей мере с одной дополнительной формой лечения ферментно-заместительной терапией от синдрома Хантера. Состав и способ настоящего изобретения эффективно ослабляют симптомы не только в головном и спинном мозге, но также и в периферических тканях, включая сердце, печень, селезенку, легкие и почки.

**041449 B1**

**041449 B1**

### Область техники

Настоящее изобретение направлено на усовершенствованные способы и композиции для лечения синдрома Хантера.

### Уровень техники

Мукополисахаридоз типа II (МПС II, синдром Хантера) представляет собой X-связанную рецессивно унаследованную болезнь лизосомального накопления, вызванную дефицитом идуонат-2-сульфатазы, которая функционирует для деградации мукополисахаридов [1]. Дефицит идуонат-2-сульфатазы приводит к накоплению недеградированных гликозаминогликанов (ГАГ) в клетках и приводит к прогрессирующему мультиорганному повреждению [2]. Среди различных типов ГАГ, дерматансульфат (ДС) и гепарансульфат (ГС) являются основными накапливающимися ГАГ при МПС II [2].

Клинический фенотип МПС II классифицируется на ослабленную и тяжелую формы. Пациенты с ослабленной формой обнаруживают соматические проявления, включая грубые черты лица, гепатоспленомегалию, множественный дизостоз и скованность в суставе без неврологического вовлечения, тогда как пациенты с тяжелой формой имеют неврологический дефицит и прогрессирующую нейродегенерацию в дополнение к соматическим симптомам. Недостаточный уровень эндогенной ИДС вызывает патологическое накопление гепарансульфата и дерматансульфата, например, в сердце, печени, центральной нервной системе (ЦНС) и т.д. Симптомы, включая нейродегенерацию и умственную отсталость, возникают в детстве; и ранняя смерть может произойти из-за органного повреждения в мозге.

Ферментативная заместительная терапия (ФЗТ) включает системное введение природных или рекомбинантно полученных белков и/или ферментов субъекту. Утвержденные терапевтические средства обычно вводят субъектам внутривенно, и они обычно эффективны в лечении соматических симптомов дефицита обуславливающего фермента.

В результате ограниченного распределения внутривенно вводимого белка и/или фермента в клетки и ткани центральной нервной системы (ЦНС) лечение заболеваний, имеющих этиологию ЦНС, было особенно сложным, поскольку внутривенно вводимые белки и/или ферменты не в достаточной степени пересекают гематоэнцефалический барьер (ГЭБ).

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) представляет собой структурную систему, состоящую из эндотелиальных клеток, которые функционируют для защиты центральной нервной системы (ЦНС) от вредных веществ в кровотоке, таких как бактерии, макромолекулы (например, белки) и другие гидрофильные молекулы, ограничивая диффузию таких веществ через ГЭБ и в расположенную ниже спинномозговую жидкость (СМЖ) и ЦНС.

Многие полагают, что барьер для диффузии на поверхности мозга, а также отсутствие эффективных и удобных способов доставки были слишком большим препятствием для достижения достаточного терапевтического эффекта в головном мозге для любого заболевания.

Синдром Хантера воздействует на нервную систему и, таким образом, демонстрирует уникальные трудности в лечении этих заболеваний с помощью традиционной терапии. Часто существует большое накопление гликозаминогликанов (ГАГ) в нейронах и оболочках головного мозга пораженных людей, что приводит к различным формам симптомов ЦНС.

Таким образом, остается большая потребность эффективно доставлять терапевтические средства в мозг. Более конкретно, существует большая потребность в более эффективной доставке активных средств в центральную нервную систему для лечения болезней лизосомального накопления, таких как синдром Хантера.

Чтобы преодолеть ГЭБ, прямая доставка лекарств через интратекальные или интравентрикулярные инъекции рекомбинантного фермента продемонстрировала многообещающие результаты в нескольких типах животных моделей МПС [3-7]. Более того, клиническое исследование фазы I/II показало, что интратекальная (ИТ) инъекция идурсульфазы (ИДС) уменьшала концентрации ГАГ в спинномозговой жидкости (СМЖ) приблизительно на 80-90% у детей с тяжелой формой МПС II. Но в клинических испытаниях было отмечено большое количество побочных эффектов, большинство побочных эффектов были связаны с неисправностью устройства для ИТ доставки лекарственных средств [8].

Хотя клеточный механизм нейродегенерации при тяжелой форме МПС II не полностью понят, несколько недавних исследований продемонстрировали корреляцию между дисахаридами, полученными из ГС, и умственной отсталостью в больших когортах пациентов с МПС [9, 10]. Кроме того, исследования на животных продемонстрировали, что ГС может привести к неврологическим расстройствам, связанным с мышинной моделью МПС III, путем активации фокальной адгезии на основе интегрина в астроцитах или нервных стволовых клетках [11, 12]. Akiyama с соавт. [13] сообщили, что "патологический ГАГ", измеренный с помощью анализа невосстанавливающего конца ГС Sensi-Pro [14], имел более высокую чувствительность и специфичность, чем общее количество ГАГ в ткани мозга мышей с МПС II [13]. Исходя из этих данных количество накопленного ГС может быть более чувствительным биомаркером для представления патологии головного мозга и неврологической функции МПС II, чем общее количество ГАГ. Однако измерение ГС ткани головного мозга невозможно в клинических условиях. Следовательно, необходимо найти пригодный клинический биомаркер, представляющий ГС в тканях головного мозга. Мы предположили, что концентрация ГС в СМЖ может быть одним из клинических биомаркеров, если

она коррелирует с количеством ГАГ в тканях головного мозга, особенно с ГС.

Единичная ИЦВ (интрацеребровентрикулярная) инъекция ИДС-β в соответствии с настоящим изобретением хорошо переносилась и вызывала значительное снижение ГС и ГАГ в головном мозге и других соматических тканях. Мы также обнаружили, что значительная положительная корреляция между содержанием ГС в СМЖ и ГС в головном мозге и ГАГ в головном мозге предполагает, что концентрация ГС в СМЖ может быть полезным биомаркером для представления патологии мозга у пациентов с МПС с вовлечением ЦНС.

Настоящее изобретение предоставляет эффективный подход для прямой доставки терапевтических средств в центральную нервную систему (ЦНС). Настоящее изобретение основано на обнаружении того, что Идурсульфатаза-бета (ИДС-β), рекомбинантный белок Идуронат-2-сульфатаза человека, вырабатываемый в качестве эффективного замещающего фермента для синдрома Хантера, может быть непосредственно введен в желудочки субъекта через интрацеребровентрикулярное (ИЦВ) введение, так что фермент эффективно и в больших количествах диффундирует через различные поверхности и проникает в различные отделы мозга, включая глубокие отделы мозга. Авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что такая доставка белка может быть достигнута с использованием простых составов на основе солевого раствора и без индуцирования существенных побочных эффектов, таких как тяжелая иммунная реакция, у субъекта. Таким образом, настоящее изобретение предоставляет высокоэффективный, клинически желательный и удобный для пациента подход для прямой доставки в ЦНС для лечения синдрома Хантера.

### Раскрытие

Техническая задача.

Для лечения синдрома Хантера остается большая потребность эффективно доставлять терапевтические средства в мозг. Недавно была предпринята попытка интратекальной (ИТ) инъекции или введения терапевтических белков в спинномозговую жидкость (СМЖ) для лечения пациентов с синдромом Хантера, но в клиническом исследовании сообщалось о большом количестве побочных эффектов [8]. Хотя большинство побочных эффектов были связаны с неисправностью устройства для ИТ доставки лекарственных средств, для лечения пациентов с синдромом Хантера необходим другой подход, такой как интрацеребровентрикулярное (ИЦВ) введение. ИЦВ введение может быть эффективным подходом для прямой доставки терапевтических средств в желудочки пациентов, в настоящее время не существует одобренных продуктов и/или разрабатываемых продуктов, предназначенных для лечения синдрома Хантера при помощи ИЦВ введения.

Техническое решение.

1. Способ лечения синдрома Хантера, включающий стадию введения интрацеребровентрикулярно (ИЦВ введение) субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективной дозы ИЦВ состава, содержащего белок Идурсульфазу-бета (ИДС-β) в концентрации 15 мг/мл, хлорид натрия в концентрации 150 мМ, полисорбат 20 в концентрации 0,05 мг/мл, фосфат в концентрации не более 5 мМ и имеющего pH 6, в котором указанное ИЦВ введение осуществляют через интравентрикулярную катетерную систему, содержащую резервуар и катетер, соединенный с указанным резервуаром, в котором указанное ИЦВ введение проводят в комбинации по меньшей мере с одной дополнительной формой лечения ферментно-заместительной терапией от синдрома Хантера, в котором указанная дополнительная форма лечения ферментно-заместительной терапией от синдрома Хантера представляет собой внутривенное введение и в котором указанное ИЦВ введение проводят один раз в месяц и указанное внутривенное введение проводят один раз в неделю.

2. Способ по указанному техническому решению 1, в котором указанная терапевтически эффективная доза составляет от 1 до 30 мг.

3. Способ по указанному техническому решению 1, в котором указанная терапевтически эффективная доза составляет 10 мг.

4. Способ по указанному техническому решению 1, дополнительно содержащий стадии хирургической имплантации указанной интравентрикулярной катетерной системы, где указанный резервуар помещают между покровными тканями черепа и мозгом субъекта, нуждающегося в лечении, и конец указанного катетера помещают внутри желудочка указанного субъекта так, что внутреннее пространство указанного резервуара соединено с внутренним пространством указанного желудочка через внутреннее пространство указанного катетера так, что спинномозговая жидкость течет из указанного желудочка в указанный резервуар для заполнения указанного резервуара; извлечения 0,1-5 мл спинномозговой жидкости из указанного резервуара со скоростью потока 0,1-60 мл/мин; введения 0,1-5 мл указанного ИЦВ состава в указанный резервуар со скоростью потока 0,1-60 мл/мин; и обеспечения протекания указанного ИЦВ состава из указанного резервуара через указанный катетер в указанный желудочек.

5. Состав для интрацеребровентрикулярного введения для лечения синдрома Хантера, содержащий белок Идурсульфазу-бета (ИДС-β) в концентрации 15 мг/мл, хлорид натрия в концентрации 150 мМ, полисорбат 20 в концентрации 0,05 мг/мл, фосфат в концентрации не более 5 мМ и имеющий pH 6.

Выгодные эффекты.

Интрацеребровентрикулярное введение ИДС-β в соответствии с настоящим изобретением уменьшало уровни гепарансульфата (ГС) и гликозаминогликанов (ГАГ) в головном мозге и спинномозговой жидкости (СМЖ) у мышей с МПС II.

Интрацеребровентрикулярное введение ИДС-β в соответствии с настоящим изобретением уменьшало уровни гепарансульфата (ГС) и гликозаминогликанов (ГАГ) в соматических (периферических) тканях, включая сердце, легкие, печень, селезенку и почки, у мышей с МПС II.

Согласно настоящему изобретению тенденция концентрации ГАГ в мозге может быть предсказана на основании уровня гепарансульфата в СМЖ, что может предоставить возможность более безопасной и более легкой диагностики тяжести накопления ГАГ в головном мозге.

Описание чертежей.

На фиг. 1 показаны уровни ГАГ в тканях мозга мышей с "выключенной" ИДС после однократного ИЦВ введения ИДС-β.

На фиг. 2 показаны уровни ГС в СМЖ и тканях мозга мышей с "выключенной" ИДС после однократного ИЦВ введения ИДС-β.

На фиг. 3 показана корреляция между уровнем ГС в СМЖ и уровнем ГС в тканях мозга мышей с "выключенной" ИДС после однократного ИЦВ введения ИДС-β.

На фиг. 4 показаны уровни ГАГ в соматических тканях мышей с "выключенной" ИДС после однократного ИЦВ введения ИДС-β.

На фиг. 5 показаны ткани мозга, собранные в разные моменты времени после инъекции и визуализированные с помощью трипанового синего.

На фиг. 6 показаны уровни ГАГ в тканях сердца мышей с "выключенной" ИДС после однократного ИЦВ введения ИДС-β.

На фиг. 7 показаны уровни ГАГ в тканях легких мышей с "выключенной" ИДС после однократного ИЦВ введения ИДС-β.

На фиг. 8 показаны уровни ГАГ в тканях печени мышей с "выключенной" ИДС после однократного ИЦВ введения ИДС-β.

На фиг. 9 показаны уровни ГАГ в тканях селезенки мышей с "выключенной" ИДС после однократного ИЦВ введения ИДС-β.

На фиг. 10 показаны уровни ГАГ в тканях почек мышей с "выключенной" ИДС после однократного ИЦВ введения ИДС-β.

Лучший режим.

Как подробно описано ниже, авторы настоящего изобретения успешно разработали стабильные составы для эффективного интрацеребровентрикулярного (ИЦВ) введения белка Идурсульфазы-бета (ИДС-β).

В различных вариантах осуществления настоящее изобретение включает стабильный состав для прямого интрацеребровентрикулярного (ИЦВ) введения белка, содержащий белок Идурсульфазу-бета (ИДС-β), соль и полисорбатное поверхностно-активное вещество. Белок ИДС-β присутствует в ИЦВ составе в концентрации 15 мг/мл.

В различных вариантах осуществления настоящее изобретение включает стабильный состав по любому из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ИДС-β содержит белки, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления ИДС-β дополнительно содержит белки, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 1 представляет собой рекомбинантный человеческий белок Идуронат-2-сульфатазу. SEQ ID NO: 2 представляет собой рекомбинантный белок Идуронат-2-сульфатазу человека с 59-м цистеином, замененным на формил-глицин (G\*).

В некоторых вариантах осуществления ИДС-β содержит приблизительно 35% (молярных процентов) или менее белков, имеющих SEQ ID NO: 1, и приблизительно 65% (молярных процентов) или более белков, имеющих SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления ИДС-β содержит приблизительно 20-35% (молярных процентов) белков, имеющих SEQ ID NO: 1, и приблизительно 65-80% (молярных процентов) белков, имеющих SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления ИДС-β содержит белки, имеющие аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 98% идентичную SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления ИДС-β содержит белки, имеющие аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 98% идентичную SEQ ID NO: 2.

Стабильный состав по любому из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, содержит соль, которая представляет собой хлорид натрия (NaCl). NaCl присутствует в концентрации 150 mM.

Настоящее изобретение включает стабильный состав по любому из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, где полисорбатное поверхностно-активное вещество представляет собой

полисорбат 20 (Твин 0), которое присутствует в концентрации 0,005% (0,05 мг/мл).

Настоящее изобретение включает стабильный состав по любому из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, где состав также содержит буферный агент. Буферный агент представляет собой фосфат, который присутствует в концентрации не более 5 мМ. Изобретение включает стабильный состав по любому из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, где состав имеет рН 6,0.

В различных вариантах осуществления настоящее изобретение включает стабильные составы по любому из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, где состав представляет собой жидкий состав. В различных вариантах осуществления настоящее изобретение включает стабильный состав по любому из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, где состав составлен в виде лиофилизированного сухого порошка.

Настоящее изобретение включает стабильный состав для ИЦВ введения, содержащий белок ИДС-β в концентрации 15 мг/мл, NaCl в концентрации 150 мМ, полисорбат 20 в концентрации 0,005% (0,05 мг/мл), фосфат в концентрации не более 5мМ и имеющий рН 6,0.

В различных аспектах настоящее изобретение включает контейнер, содержащий единичную дозированную форму стабильного состава в различных вариантах осуществления, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления контейнер выбирают из ампулы, флакона, бутылки, картриджа, резервуара, шприца "luno-ject" или предварительно заполненного шприца. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой предварительно заполненный шприц. В некоторых вариантах осуществления предварительно заполненный шприц выбирают из шприцев из боросиликатного стекла с термообработанным силиконовым покрытием, шприцев из боросиликатного стекла с напыленным силиконом или шприцев из пластичного полимера без силикона. В некоторых вариантах осуществления стабильный состав присутствует в объеме менее приблизительно 50 мл (например, менее приблизительно 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2,5, 2,0, 1,5, 1,0 или 0,5 мл). В некоторых вариантах осуществления стабильный состав присутствует в объеме приблизительно 6,0 мл. В некоторых вариантах осуществления стабильный состав присутствует в объеме приблизительно 3,0 мл. В некоторых вариантах осуществления 2,0 мл стабильного состава присутствуют во флаконе объемом 6,0 мл. В некоторых вариантах осуществления 1,5 мл стабильного состава присутствуют во флаконе объемом 5,0 мл. В некоторых вариантах осуществления 1,0 мл стабильного состава присутствует во флаконе объемом 3,0 мл.

В различных аспектах настоящее изобретение включает способ лечения синдрома Хантера, включающий стадию введения интрацеребровентрикулярно субъекту, нуждающемуся в лечении, состава по любому из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает способ лечения синдрома Хантера, включающий стадию введения интрацеребровентрикулярно субъекту, нуждающемуся в лечении, состава, содержащего белок ИДС-β в концентрации 15 мг/мл, NaCl в концентрации 150 мМ, полисорбат 20 в концентрации 0,005% (0,05 мг/мл), фосфат в концентрации не более 5мМ и имеющего рН 6.

В некоторых вариантах осуществления субъект, нуждающийся в лечении, имеет интравентрикулярную катетерную систему, имеющую резервуар и катетер, такой как резервуар Оммайа, имплантированный для ИЦВ введения. В некоторых вариантах осуществления ИЦВ введение осуществляют путем закачивания вышеупомянутых ИЦВ составов со скоростью потока 0,1-60 мл/мин в резервуар. В некоторых вариантах осуществления спинномозговая жидкость (СМЖ) субъекта выводится со скоростью потока 0,1-60 мл/мин из резервуара перед ИЦВ введением составов, так что нет никакого чистого увеличения объема СМЖ субъекта после ИЦВ введения, чтобы предотвратить увеличение давления в головном мозге. В некоторых вариантах осуществления составу, закачиваемому в резервуар, обеспечивают проход через катетер в желудочек субъекта, мягко нажимая и высвобождая резервуар.

В некоторых вариантах осуществления ИЦВ введение не приводит к существенным побочным эффектам (например, тяжелой иммунной реакции) у субъекта. В некоторых вариантах осуществления ИЦВ введение не приводит к существенной адаптивной опосредованной Т-клетками иммунной реакции у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления ИЦВ введение состава приводит к доставке белка ИДС-β в различные ткани-мишени в головном мозге, спинном мозге и периферических органах. В некоторых вариантах осуществления ИЦВ введение состава приводит к доставке белка ИДС-β в ткани-мишени в головном мозге. В некоторых вариантах осуществления ткани-мишени в головном мозге содержат белое вещество и/или нейроны в сером веществе. В некоторых вариантах осуществления белок ИДС-β доставляется к нейронам, глиальным клеткам, периваскулярным клеткам и/или менингеальным клеткам. В некоторых вариантах осуществления белок ИДС-β дополнительно доставляется к нейронам в спинном мозге.

В некоторых вариантах осуществления ИЦВ введение состава дополнительно приводит к системной доставке белка ИДС-β в периферические ткани-мишени. В некоторых вариантах осуществления периферические ткани-мишени выбирают, но не ограничиваются ими, из сердца, печени, селезенки, легких и/или почек.

В некоторых вариантах осуществления ИЦВ введение состава приводит к клеточной лизосомаль-

ной локализации в тканях-мишенях в головном мозге, нейронах спинного мозга и/или периферических тканях-мишенях. В некоторых вариантах осуществления ИЦВ введение состава приводит к уменьшению накопления ГАГ в тканях-мишенях в головном мозге, нейронах спинного мозга и/или периферических тканях-мишенях. В некоторых вариантах осуществления накопление ГАГ снижается по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90%, в 1 раз, в 1,5 раза или в 2 раза по сравнению с отрицательным контролем (например, накопление ГАГ у субъекта до лечения или после введения только носителя). В некоторых вариантах осуществления ИЦВ введение состава приводит к уменьшению вакуолизации в нейронах (например, по меньшей мере на 20, 40, 50, 60, 80, 90%, в 1 раз, в 1,5 раза или в 2 раза по сравнению с отрицательным контролем). В некоторых вариантах осуществления нейроны содержат клетки Пуркинье.

В некоторых вариантах осуществления ИЦВ введение состава приводит к увеличению ферментативной активности ИДС-β в тканях-мишенях в головном мозге, нейронах спинного мозга и/или периферических тканях-мишенях. В некоторых вариантах ферментативная активность ИДС-β увеличивается по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или в 10 раз по сравнению с отрицательным контролем (например, эндогенная ферментативная активность у субъекта перед лечением или после введения только носителя). В некоторых вариантах осуществления увеличенная ферментативная активность ИДС-β составляет по меньшей мере приблизительно 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 или 600 нмоль/ч/мг.

В некоторых вариантах осуществления ИЦВ введение состава приводит к снижению интенсивности, тяжести или частоты возникновения или задержке начала по меньшей мере одного симптома или признака синдрома Хантера. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один симптом или признак синдрома Хантера представляет собой когнитивные нарушения; поражения белого вещества; расширенные периваскулярные пространства в мозговой паренхиме, ганглиях, мозолистых телах и/или стволе головного мозга; атрофию; и/или вентрикуломегалию.

ИЦВ введение происходит один раз в месяц. В некоторых вариантах осуществления введение является непрерывным, например, посредством непрерывного перфузионного насоса. ИЦВ введение используют в сочетании с внутривенным (ВВ) введением. ВВ введение происходит один раз в неделю.

В некоторых вариантах осуществления ВВ и ИЦВ введения выполняют в тот же день. В некоторых вариантах осуществления ВВ и ИЦВ введения не выполняют в течение определенного периода времени друг от друга, такого как не в течение по меньшей мере 2 дней, в течение по меньшей мере 3 дней, в течение по меньшей мере 4 дней, в течение по меньшей мере 5 дней, в течение по меньшей мере 6 дней, в течение по меньшей мере 7 дней или в течение по меньшей мере одной недели.

В некоторых вариантах осуществления ВВ и ИЦВ введения выполняют последовательно, например сначала выполняют ВВ введения (например, введение дозы один раз в неделю) с последующим ИЦВ введением (например, введение дозы один раз в месяц). В некоторых вариантах осуществления ИЦВ введение выполняют первым (например, введение дозы один раз в месяц) с последующим ВВ введением (например, введение дозы один раз в неделю).

### Примеры

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на примеры. Специалисту в данной области техники будет очевидно, что эти примеры имеют только иллюстративные цели и не должны толковаться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

#### Пример 1.

##### 1.1. Обзор.

Настоящее исследование проводили с целью изучения фармакологического эффекта и зависимости "доза-ответ" единичной интрацеребровентрикулярной (ИЦВ) инъекции Идурсульфазы бета (ИДС-бета) у мышей с МПС II. Кроме того, мы измеряли концентрацию ГС в СМЖ и исследовали корреляцию между ГС в СМЖ и ГС и ГАГ в головном мозге мышей с МПС II.

Три дозы ИЦВ инъекций ИДС-бета (3, 10, и 30 мкг) использовали и ГАГ в ткани (мозге, сердце, легких, печени, селезенке и почках) измеряли на 7, 14 и 28 дни после инъекции. ГС измеряли с использованием ЖХ/МС-МС в СМЖ и мозге мышей. Общее количество ГАГ в головном мозге и других соматических тканях всех ИДС-β-леченых групп было значительно снижено. Значительное снижение поддерживалось в течение 28 дней в группе с инъекцией 30 мкг. Мы также продемонстрировали, что содержание ГС было снижено как в СМЖ, так и в ткани мозга всех ИДС-β-леченых групп. Кроме того, мы продемонстрировали, что концентрация ГС в СМЖ достоверно коррелировала с ГС в головном мозге и с ГАГ в мозговых тканях.

Единичная ИЦВ инъекция ИДС-β в соответствии с настоящим изобретением хорошо переносилась и вызывала значительное снижение ГС и ГАГ в головном мозге и других соматических тканях. Мы также обнаружили, что значительная положительная корреляция между содержанием ГС в СМЖ и ГС в головном мозге и ГАГ в головном мозге предполагает, что концентрация ГС в СМЖ может быть полезным биомаркером для представления патологии мозга у пациентов с МПС II с вовлечением ЦНС.

## 1.2. Способы.

### Животные.

Мы использовали ранее описанных мышей с "выключенной" ИДС (нокаутные). Вкратце ген Идс удаляли из экзона 2 в экзон 3 [15]. Мышей с "выключенной" ИДС выводили из исходного штамма C57BL/6.129S, и они имели нулевую мутацию в гене Идс. Контрольных мышей дикого типа (WT) выводили из штамма C57BL/6.129S. Генотип всех мышей подтверждали полимеразной цепной реакцией ДНК, полученной из обрезка хвоста. Это исследование было одобрено Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию (регистрационный № 20140925005) и выполнено в соответствии с политикой гуманного обращения с животными Института биомедицинских исследований Samsung, Сеул, Корея.

### План исследования.

6-недельных животных распределяли по пяти группам (по 12 животных в каждой группе) путем стратифицированной рандомизации. Мышей с "выключенной" ИДС распределяли по четырем группам: мыши с "выключенной" ИДС с инъекцией носителя и мыши с "выключенной" ИДС с тремя различными дозами (3, 10 и 30 мкг) инъекции ИДС-β (Green Cross Corp., Йонъин, Корея). Четырех животных в каждой группе умерщвляли каждые 7, 14 и 28 дней после ИЦВ инъекции. Анализировали концентрации ГАГ различных тканей (головного мозга, сердца, легких, печени, селезенки и почек) и концентрации ГС из СМЖ и головного мозга измеряли через 7, 14 и 28 дней после инъекции.

### Получение ИДС-β для ИЦВ инъекции.

Раствор носителя представлял собой раствор 150 мМ хлорида натрия и 0,05 мг/мл Твин 20 (Merck Millipore, Дармштадт, Германия). Концентрированные растворы лекарственного средства ИДС-β (50 мг/мл) разбавляли носителем для получения концентраций 0,6, 2 и 6 мг/мл.

### ИЦВ инъекция.

Единичное ИЦВ инъекционное введение мышей проводили в возрасте 6 недель. Каждый раствор лекарственного средства или носитель вводили ИЦВ мышам в общем объеме 5 мкл. В день введения дозы мышей анестезировали ингаляцией изофлюрана (Napa Pharm., Корея) и помещали в стереотаксический прибор. После того как делали небольшой разрез, череп обнажали и очищали. ИЦВ инъекцию выполняли в соответствии с модифицированными способами, описанными ранее [16, 17]. ИДС-β или носитель вводили в правый боковой желудочек иглой 31 калибра со скоростью 10 мл/мин, контролируемой шприцевым насосом (Harvard Apparatus, Холлистон, Массачусетс, США) с использованием координат (Benchmark, Neurolab, Сент-Луис, Миссури): 0,58 мм от каудальной границы до брегмы, 1,25 мм от латеральной поверхности до сагиттального шва и 1,77 мм в глубину. Участок инъекции контролировали на предмет разрывов сосудов или отека лица. После этого иглу удаляли через 15 с после прекращения движения плунжера, чтобы предотвратить обратный поток. Разрез закрывали раневыми клипсами и мышью помещали на изотермическую подкладку при 37°C и наблюдали после операции до восстановления. Весь протокол занимал 10-15 мин для одного животного. Чтобы продемонстрировать успешную методику ИЦВ инъекций, раствор красителя вводили ИЦВ. Мозг собирали в разные моменты времени после инъекции и визуализировали. Точная инъекция в один из желудочков позволяла распределить трипановый синий (0,05%) на инъектируемой стороне мозга приблизительно через 10-15 мин после инъекции. Широкое распределение трипанового синего в полушарии головного мозга было видно приблизительно через 1 ч после инъекции. Неточные инъекции можно отличить из-за отсутствия синего цвета в полушарии головного мозга (фиг. 5).

### Сбор СМЖ и тканей.

Через 7, 14 и 28 дней после инъекции мышей подвергали эвтаназии путем инъекции избыточного количества раствора Алфаксалона (Jugoh/название: Алфаксан) (15 мг/кг). СМЖ собирали из мостомозжечковой цистерны боросиликатным стеклом (Внеш.Д.: 10 мм, Внутр.Д.: 0,75 мм) и замораживали для измерения концентрации ГС. Кровь в мозговой ткани мышей очищали транскадиальной перфузией с помощью фосфатно-солевого буфера (ФСБ) в течение 15-20 мин. Ткань головного мозга собирали и замораживали на сухом льду. Затем образцы гомогенизировали и делили на четверти (половину использовали для измерения ГАГ и половину - для измерения ГС). Другие соматические ткани (сердце, легкие, печень, селезенку и почки) также собирали и гомогенизировали в ФСБ.

### Измерение общей концентрации ГАГ в тканях.

Образцы гомогенизированных тканей встряхивали в течение ночи при 4°C и центрифугировали в течение 15 мин при 12000×g, а затем собирали супернатанты. Общие уровни ГАГ измеряли с использованием набора для анализа сГАГ (Kamiya Biochemicals, Япония). Сначала 50 мкл гомогенизированных образцов инкубировали с 50 мкл 8 моль/л гуанидина-HCl при комнатной температуре (КТ) в течение 15 мин. Затем в течение 15 мин при комнатной температуре добавляли 50 мкл раствора STA (0,3% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,75% Тритон X-100) и к раствору в течение 15 мин добавляли раствор альцианового синего. Образцы затем центрифугировали в течение 15 мин при 12000 об/мин и промывали раствором ДМСО (40% ДМСО, 0,05 моль/л MgCl<sub>2</sub>). Наконец, к гранулам добавляли 500 мкл раствора Gu-ргор (4 моль/л гуанидина-HCl, 33% 1-пропанола, 0,25% Тритона X-100) и смесь оставляли полностью растворяться. Альтернативно по-

глошение считывали в X-Mark (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния) при 600 нм. Концентрацию ГАГ нормализовали до концентрации белка, которую измеряли с помощью набора для анализа белка с помощью бицинхониновой кислоты (ThermoFisher, Уолтем, Массачусетс). Концентрацию ГАГ выражали в виде г ГАГ/мг белка, как рассчитано по стандартной кривой субстрата ГАГ, хондроитинсульфата-6. Данные каждого образца были средними из повторных измерений.

Измерение ГС в СМЖ и ткани головного мозга.

Уровни ГС в образцах мышечной СМЖ и мозговой ткани определяли с использованием ЖХ-МС/МС. 5 мг/мл исходных растворов каждого из калибровочных стандартов (СТД) готовили растворением натриевой соли ГС или ДС в воде. Исходные растворы СТД разбавляли соответствующим объемом воды для получения 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10 и 20 мкг/мл СТД и 0,2, 2 и 15 мкг/мл образцов контроля качества (КК). Кроме того, 5 мг/мл исходных растворов СТД были меченными дейтерием, чтобы получить ГС-d6 и ДС-d6 в качестве внутреннего стандарта (ВС). 20 мкл растворов СТД добавляли в стеклянную пробирку и выпаривали в атмосфере азота. Остаток метанолизировали путем смешивания с 200 мкл метанола-d4-ацетилхлорида (400:64, об./об.) и нагревания в течение 90 мин при 65°C. После метанолиза растворитель выпаривали в атмосфере азота. Остаток повторно растворяли в 1 мл воды, разбавляли водой-метанолом-муравьиной кислотой (950:50:1, об./об./об.: буфер А) и полученный раствор использовали в качестве исходного раствора ВС. Образец мышечной СМЖ центрифугировали при 2100×g при 4°C в течение 5 мин и супернатант разбавляли равным объемом ФСБ. Ткань головного мозга мыши гомогенизировали с 0,01 моль/л гидроксида натрия (в 50 или 100-кратном объеме в расчете на массу мозга). Гомогенат инкубировали в течение 24 ч при комнатной температуре и 20 мкл гомогената добавляли к 180 мкл воды-хлороформа (4:5 об./об.). После перемешивания образец центрифугировали при 10000×g при 4°C в течение 5 мин и супернатант разбавляли равным объемом ФСБ. Эти образцы, полученные из СМЖ и головного мозга, использовали в качестве испытуемых образцов для анализа ЖХ-МС/МС. 4 мкл испытуемого образца из СМЖ (20 мкл из головного мозга), СТД или КК в пробирке упаривали в атмосфере азота. К остатку добавляли 50 мкл 3М HCl-MeOH и 5 мкл 2,2-диметоксипропана и обрабатывали ультразвуком в течение 3 мин, нагревали в течение 90 мин при 65°C и упаривали. Остаток повторно растворяли в 200 мкл исходного раствора ВС, обрабатывали ультразвуком в течение 3 мин и переносили в центрифужный фильтр, центрифугировали при 10000×g при 4°C в течение 3 мин и анализировали полученный фильтрат. 5 мкл каждого образца инъецировали в трехквadrupольный масс-спектрометр API5000 (AB/MDS Sciex), оснащенный системой ACQUITY UPLC (Waters). Испытуемый образец и ВС разделяли на колонке ACQUITY UPLC HSS T3 (100 Å 1,8 мкм, 2,1 на 100 мм), нагретой до 40°C. Начальная подвижная фаза состояла из 100:0 (об./об.) буфер А:буфер В [вода-метанол-муравьиная кислота (500:500:1, об./об./об.)]. С градиентным элюированием при скорости потока 0,4 мл/мин. Элюирование проводили в линейном градиенте, где буфер В увеличивался от 0 до 45% между 0,5 и 4 мин, затем увеличивался до 60% на 4,01 мин, поддерживался при 60% в течение 1 мин, затем уменьшался до 0% на 5,01 мин, затем поддерживался при 0% в течение 1 мин. Масс-спектрометр использовали при настройках, которые выбирали ионизацию электрораспылением для способа ионизации и положительную для полярности ионов. Азот использовали в качестве "газовой завесы" (40 фунтов на квадратный дюйм), а воздух использовали в качестве газа-распылителя (50 фунтов на квадратный дюйм) и газа-нагревателя (40 фунтов на квадратный дюйм). Условия ионного мониторинга определяли как напряжение распыления ионов равное 4,5 кВ и наивысшая температура измерения, равная 600°C. Эти установки для потенциала декластеризации, потенциала входа и энергии столкновения составляли 110, 8 В и 22 эВ соответственно. Данные получали путем мониторинга множественных реакций (ММР) с использованием отношения массы к заряду ( $m/z$ ) 384 → 162 для ГС,  $m/z$  426 → 236 для ДС,  $m/z$  390 → 162 для ГС-d6 и  $m/z$  432 → 162 для ДС-d6. Пиковые области, кривая СТД и измеренные концентрации рассчитывали с помощью Analyst ver.1.5.1 (AB Sciex).

Статистический анализ.

Статистический анализ выполняли с помощью GraphPad Prism 6. U-критерий Манна-Уитни использовали для сравнения различий между каждой леченной лекарственным средством группой и леченной носителем группой у нокаутных мышей. Различия с значениями P менее 0,05 считались статистически значимыми. Данные представляли в виде средних и стандартной погрешности средней величины (SEM). Чтобы определить взаимосвязь между ГС в СМЖ и ГС в мозге, а также между ГС в СМЖ и ГАГ в мозге оценивали 73 образца СМЖ и ткани головного мозга мышей и данные анализировали с использованием коэффициента Спирмана и линейной регрессии. Рассчитывали коэффициенты внутриклассовой корреляции (ВКК) и доверительные интервалы 95%.

### 1.3. Результаты.

Массы тела.

Массы тела всех экспериментальных групп существенно не изменялись в течение периода исследования. Существенных различий в массах мышей в группах ИЦВ ФЗТ не было по сравнению с теми, что в контрольных группах (ДТ и нелеченых мышях с "выключенной" ИДС). Мы также не обнаружили никаких аномальных клинических признаков во время экспериментов в любой из групп ФЗТ.

Единичная ИЦВ инъекция ИДС-β уменьшала ГАГ в мозговой ткани мышей с "выключенной" ИДС.

Общее количество ГАГ в мозговой ткани нокаутных мышей в группе с инъекцией носителя было значительно выше, чем у мышей ДТ (фиг. 1). Общее количество ГАГ в мозговой ткани всех ИДС-β-леченных групп было значительно снижено по сравнению с мозговыми тканями у мышей для контроля заболевания через 7 дней после введения дозы (фиг. 1). Однако повторное накопление ГАГ наблюдали через 14 дней после инъекции в группах с 3- и 10-мкг инъекциями. Через 28 дней после инъекции значительное снижение ГАГ поддерживалось в группе с 30 мкг инъекцией, несмотря на то что общий уровень ГАГ был слегка увеличен по сравнению с уровнем 7-го дня и 14-го дня (фиг. 1).

Единичная ИЦВ инъекция ИДС-β уменьшала ГС в СМЖ и мозговой ткани мышей с "выключенной" ИДС.

Уровень ГС был значительно увеличен в СМЖ и мозговой ткани мышей с "выключенной" ИДС по сравнению с мышами контрольной группы ДТ (фиг. 2). Через семь дней после ИЦВ инъекции содержание ГС в СМЖ и ткани головного мозга значительно уменьшалось во всех трех ИДС-β-леченных группах. Значительные сокращения ГС в ткани головного мозга поддерживались в течение 28 дней (фиг. 2). Содержание ГС в СМЖ оставалось уменьшенным через 14 и 28 дней после ИЦВ инъекции. Однако статистическая значимость была обнаружена только в группе, леченной 30 мкг ИДС-β, через 28 дней после ИЦВ инъекции (фиг. 2).

Содержание ГС в СМЖ положительно коррелировало с ГС и ГАГ в головном мозге.

Была обнаружена значительная положительная корреляция между содержанием ГС в СМЖ и концентрацией ГС в мозговой ткани образцов мышей ( $r=0,785$ ,  $P<0,0001$ ) (фиг. 3А). Кроме того, содержание ГС в СМЖ также имело значительную положительную корреляцию с концентрацией ГАГ в головном мозге ( $r=0,703$ ,  $P<0,0001$ ) (фиг. 3В).

Единичная ИЦВ инъекция ИДС-β уменьшала ГАГ в соматических тканях мышей с "выключенной" ИДС.

Мы измерили общую концентрацию ГАГ после единичной ИЦВ инъекции как в ткани головного мозга, так и в других соматических тканях (сердце, легких, печени, селезенке и почках). Накопление ГАГ было обнаружено во всех проанализированных тканях мышей с "выключенной" ИДС с инъекцией носителя по сравнению с мышами ДТ (фиг. 4). Через 28 дней после ИЦВ инъекции ИЦВ введение с 30 мкг ИДС-β поддерживало значительное снижение общего количества ГАГ во всех исследованных тканях (фиг. 4). Концентрации ГАГ в соматических тканях через 7 и 14 дней после ИЦВ инъекции показаны на фиг. 6-10.

#### 1.4. Обсуждение.

МПС II является наиболее распространенным типом МПС в Азии, и приблизительно 70% пациентов с МПС II имеют тяжелую форму [18, 19]. Поэтому коррекция патологии головного мозга является одной из наиболее важных и сложных проблем в лечении пациентов с МПС II. Интратекальная или интравентрикулярная инъекция рекомбинантного фермента была предложена в качестве стратегии доставки терапевтического лекарственного средства в мозг. В настоящем исследовании мы выполнили единичные ИЦВ инъекции трех разных доз ИДС-β у 6-недельных мышей с "выключенной" ИДС для оценки зависимости "доза-ответ" и временной динамики фармакологического эффекта.

Общее количество ГАГ в ткани головного мозга всех ИДС-β-леченных групп было значительно снижено, и значительное снижение ГАГ поддерживалось в течение 28 дней в группе с 30 мкг инъекцией (фиг. 1). Значительное снижение концентрации ГС в СМЖ также последовательно наблюдалось в группе, леченной 30 мкг, через 28 дней после ИЦВ инъекции (фиг. 2). Поэтому мы предполагаем, что инъекция 30 мкг ИДС-β в боковой желудочек один раз в четыре недели может быть эффективной для снижения и поддержания накопленных ГАГ в мозге у мышей с МПС II. Кроме того, эти результаты могут служить основным доказательством для определения дозы и частоты введения при клиническом использовании ИЦВ инъекций рекомбинантного фермента, хотя следует учитывать различия в размере мозга и скорости обмена веществ между мышами и человеком. Однако для дальнейшего выяснения эффективности ИЦВ введения фермента для облегчения патологии ЦНС при МПС II нам необходимо расширить исследование с помощью повторных инъекций и провести функциональные оценки, включая поведенческие тесты и гистологические анализы головного мозга.

Среди различных типов МПС вовлечение ЦНС присутствует в тяжелой форме МПС I (болезнь Херлера), тяжелой форме МПС II, МПС III и МПС VII. Напротив, пациенты с МПС IV, МПС VI, ослабленным типом МПС I (синдром Шейе) и ослабленным типом МПС II не имеют когнитивных нарушений [2]. ГС является одним из основных накапливающихся ГАГ при МПС I, II, III и VII [10]. В нескольких сообщениях продемонстрировано, что накопленный ГС в ткани головного мозга отвечает за неврологические проявления МПС [9-12]. Кроме того, было показано, что концентрация ГС является более чувствительным и специфическим биомаркером в ткани мозга мышей с МПС II [13, 20]. Однако прямое измерение количества ГС в ткани головного мозга невозможно в клинических условиях. Поэтому мы проанализировали концентрации ГС в СМЖ и попытались найти корреляцию между уровнем ГС в СМЖ и мозговой ткани. Мы продемонстрировали, что содержание ГС было значительно увеличено как в СМЖ, так и в мозговой ткани мышей с "выключенной" ИДС по сравнению с мышами ДТ и уменьшалось во всех груп-

пах, леченных ИДС-β (фиг. 2). Кроме того, это первое исследование, демонстрирующее, что концентрация ГС в СМЖ значительно коррелировала с ГС в головном мозге и ГАГ в головном мозге (фиг. 3). Поэтому мы предполагаем, что содержание ГС в СМЖ может быть одним из потенциальных биомаркеров для предположения уровней ГС или ГАГ в ткани мозга. Однако для демонстрации того, что содержание ГС в СМЖ может действительно представлять патологию ЦНС, нам нужно дополнительное исследование, включая патологическое исследование ткани головного мозга, поскольку патология ЦНС при МПС II обусловлена не только накоплением ГАГ, но и накоплением вторичного субстрата, воспалением и дегенеративными изменениями ЦНС [12, 21, 22]. Если корреляция будет продемонстрирована, то содержание ГС в СМЖ может быть полезным параметром для оценки патологии ЦНС в возможных будущих клинических испытаниях пациентов с МПС II с вовлечением ЦНС.

Кроме того, мы продемонстрировали, что ИЦВ введение ИДС-β также значительно уменьшало накопление ГАГ в соматических тканях (печени, селезенке, почках, сердце и легких), а также мозговой ткани дозозависимым образом, хотя эффект различался среди тканей (фиг. 4 и 6-10). Было отмечено, что степень снижения ГАГ зависит от дозы, и авторы отметили, что введение 30 мкг ИДС-β может значительно уменьшать и поддерживать накопленные ГАГ в соматических тканях в течение 28 дней, что было так же, как и в ткани головного мозга. В целом эти данные демонстрируют физиологический перенос терапевтического белка из СМЖ в системные органы после ИЦВ введения, что указывает на клинически возможный путь доставки терапевтического фермента как в мозг, так и в системные органы. Кроме того, СМЖ может служить промежуточным резервуаром для инъектируемого фермента, из которого некоторые количества постепенно переносятся в системный кровоток после ИЦВ инъекции. Хотя механизм доставки ферментов из СМЖ в системный кровоток не ясен, было высказано предположение, что СМЖ, содержащая идуронат-2-сульфатазу, может сообщаться с системным венозным кровотоком через субарахноидальное пространство [6, 23-25].

В заключение единичная ИЦВ инъекция ИДС-β хорошо переносилась, и это привело к значительному снижению ГС и ГАГ в ткани головного мозга и ГАГ в соматических тканях мышей с "выключенной" ИДС. Более того, эффект поддерживался через 28 дней после ИЦВ инъекции, особенно в дозе 30 мкг. Кроме того, концентрация ГС в СМЖ может быть полезным биомаркером для представления патологии мозга, поскольку концентрация ГС в СМЖ положительно коррелировала с ГС и ГАГ в головном мозге.

#### 1.5. Список последовательностей.

SEQ ID NO: 1

Длина: 525

Тип: PRT

|            |             |            |            |            |
|------------|-------------|------------|------------|------------|
| SETQANSTTD | ALNVLLIIVD  | DLRPSLGCYG | DKLVRSPNID | QLASHSLLFQ |
| NAFAQQAVCA |             |            |            |            |
| PSRVSFLTGR | RPDTTRL YDF | NSYWRVHAGN | FSTIPQYFKE | NGYVTMSVGK |
| VFHPGISSNH |             |            |            |            |
| TDDSPYSWSF | PPYHPSSEKY  | ENTKTCRGPD | GELHANLLCP | VDVLDVPEGT |
| LPDKQSTEQA |             |            |            |            |
| IQLLEKMKTS | ASPFFLAVGY  | HKPHIPFRYP | KEFQKLYPLE | NITLAPDPEV |
| PDGLPPVAYN |             |            |            |            |
| PWMDIRQRED | VQALNISVPY  | GPIPVDFQRK | IRQSYFASVS | YLDTQVGRLL |
| SALDDLQLAN |             |            |            |            |
| STIIAFTSDH | GWALGEHGEW  | AKYSNFDVAT | HVPLIFYVPG | RTASLPEAGE |
| KLFPYLDPDF |             |            |            |            |
| SASQLMEPGR | QSMDELVELVS | LFPTLAGLAG | LQVPPRCVP  | SFHVELCREG |
| KNLLKHFRFR |             |            |            |            |
| DLEEDPYLPG | NPRELIAYSQ  | YPRPSDIPQW | NSDKPSLKDI | KIMGYSIRTI |
| DYRYTVWVGF |             |            |            |            |
| NPDEFLANFS | DIHAGELYFV  | DSDPLQDHNM | YNDSQGGDLF | QLLMP      |

SEQ ID NO:2  
 Длина: 525  
 Тип: PRT

|            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|
| SETQANSTTD | ALNVLLIIVD | DLRPSLGCGY | DKLVRSPNID | QLASHSLLFQ |
|------------|------------|------------|------------|------------|

NAFAQQAVG\*A

|             |            |            |            |            |
|-------------|------------|------------|------------|------------|
| PSRVSF LTGR | RPDTTRLYDF | 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 |
|------------|------------|------------|------------|------------|

KLFPYLDPPD

|            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|
| SASQLMEPGR | QSMDLVELVS | LFPTLAGLAG | LQVPPRCPPV | SFHVELCREG |
|------------|------------|------------|------------|------------|

KNLLKHFRFR

|            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|
| DLEEDPYLPG | NPRELIAYSQ | YPRPSDIPQW | NSDKPSLKDI | KIMGYSIRTI |
|------------|------------|------------|------------|------------|

DYRYTVWVGF

NPDEFLANFS DIHAGELYFV DSDPLQDHNH YNDSQGGDLF QLLMP

(59-я аминокислота "G\*" SEQ ID NO: 2 обозначает формил-глицин).

#### 1.6. Ссылки.

- [1] Bach G, Eisenberg F, Jr., Cantz M, Neufeld EF: The defect in the Hunter syndrome: deficiency of sulfiduronate sulfatase. Proc Natl Acad Sci U S A 1973, 70:2134-2138.
- [2] Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, vol. III. McGraw-Hill: New York, 2001:34213452.
- [3] Kakkis E, McEntee M, Vogler C, Le S, Levy B, Belichenko P, Mobley W, Dickson P, Hanson S, Passage M: Intrathecal enzyme replacement therapy reduces lysosomal storage in the brain and meninges of the canine model of MPS I. Mol Genet Metab 2004, 83:163-174.
- [4] Auclair D, Finnie J, White J, Nielsen T, Fuller M, Kakkis E, Cheng A, O'Neill CA, Hopwood JJ: Repeated intrathecal injections of recombinant human 4-sulphatase remove dural storage in mature mucopolysaccharidosis VI cats primed with a short-course tolerisation regimen. Mol Genet Metab 2010, 99:132-141.
- [5] Hemsley KM, Hopwood JJ: Delivery of recombinant

proteins via the cerebrospinal fluid as a therapy option for neurodegenerative lysosomal storage diseases. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2009, 47 Suppl 1:S118-123.

[6] Higuchi T, Shimizu H, Fukuda T, Kawagoe S, Matsumoto J, Shimada Y, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Morimoto H et al: Enzyme replacement therapy (ERT) procedure for mucopolysaccharidosis type II (MPS II) by intraventricular administration (IVA) in murine MPS II. *Mol Genet Metab* 2012, 107:122-128.

[7] Calias P, Papisov M, Pan J, Savioli N, Belov V, Huang Y, Lotterhand J, Alessandrini M, Liu N, Fischman AJ et al: CNS penetration of intrathecal-lumbar idursulfase in the monkey, dog and mouse: implications for neurological outcomes of lysosomal storage disorder. *PLoS One* 2012, 7:e30341.

[8] Muenzer J, Hendriksz CJ, Fan Z, Vijayaraghavan S, Perry V, Santra S, Solanki GA, Mascelli MA, Pan L, Wang N et al: A phase I/II study of intrathecal idursulfase-IT in children with severe mucopolysaccharidosis II. *Genet Med* 2015.

[9] de Ruijter J, Ijlst L, Kulik W, van Lenthe H, Wagemans T, van Vlies N, Wijburg FA: Heparan sulfate derived disaccharides in plasma and total urinary excretion of glycosaminoglycans correlate with disease severity in Sanfilippo disease. *J Inherit Metab Dis* 2013, 36:271-279.

[10] Coppa GV, Gabrielli O, Zampini L, Maccari F, Mantovani V, Galeazzi T, Santoro L, Padella L, Marchesiello RL, Galeotti F et al: Mental retardation in mucopolysaccharidoses correlates with high molecular weight urinary heparan sulphate derived glucosamine. *Metab Brain Dis* 2015, 30:1343-1348.

[11] Bruyere J, Roy E, Ausseil J, Lemonnier T, Teyre G, Bohl D, Etienne-Manneville S, Lortat-Jacob H, Heard JM, Vitry S: Heparan sulfate saccharides modify focal adhesions: implication in mucopolysaccharidosis neuropathophysiology. *J Mol Biol* 2015, 427:775-791.

[12] Wilkinson FL, Holley RJ, Langford-Smith KJ, Badrinath S, Liao A, Langford-Smith A, Cooper JD, Jones SA, Wraith JE, Wynn RF et al: Neuropathology in mouse models of

mucopolysaccharidosis type I, IIIA and IIIB. PLoS One 2012, 7:e35787.

[13] Akiyama K, Shimada Y, Higuchi T, Ohtsu M, Nakauchi H, Kobayashi H, Fukuda T, Ida H, Eto Y, Crawford BE et al: Enzyme augmentation therapy enhances the therapeutic efficacy of bone marrow transplantation in mucopolysaccharidosis type II mice. Mol Genet Metab 2014, 111:139-146.

[14] Lawrence R, Brown JR, Al-Mafraji K, Lamanna WC, Beitel JR, Boons GJ, Esko JD, Crawford BE: Disease-specific non-reducing end carbohydrate biomarkers for mucopolysaccharidoses. Nat Chem Biol 2012, 8:197-204.

[15] Jung SC, Park ES, Choi EN, Kim CH, Kim SJ, Jin DK: Characterization of a novel mucopolysaccharidosis type II mouse model and recombinant AAV2/8 vector-mediated gene therapy. Mol Cells 2010, 30:13-18.

[16] Lee WC, Tsoi YK, Troendle FJ, DeLucia MW, Ahmed Z, Dicky CA, Dickson DW, Eckman CB: Single-dose intracerebroventricular administration of galactocerebrosidase improves survival in a mouse model of globoid cell leukodystrophy. Faseb j 2007, 21:2520-2527.

[17] Glascock JJ, Osman EY, Coady TH, Rose FF, Shababi M, Lorson CL: Delivery of therapeutic agents through intracerebroventricular (ICV) and intravenous (IV) injection in mice. J Vis Exp 2011.

[18] Lin HY, Lin SP, Chuang CK, Niu DM, Chen MR, Tsai FJ, Chao MC, Chiu PC, Lin SJ, Tsai LP et al: Incidence of the mucopolysaccharidoses in Taiwan, 1984-2004. Am J Med Genet A 2009, 149A:960-964.

[19] Sohn YB, Choi EW, Kim SJ, Park SW, Kim SH, Cho SY, Jeong SI, Huh J, Kang IS, Lee HJ et al: Retrospective analysis of the clinical manifestations and survival of Korean patients with mucopolysaccharidosis type II: emphasis on the cardiovascular complication and mortality cases. Am J Med Genet A 2012, 158A:90-96.

[20] Shimada Y, Wakabayashi T, Akiyama K, Hoshina H, Higuchi T, Kobayashi H, Eto Y, Ida H, Ohashi T: A method for

measuring disease-specific iduronic acid from the non-reducing end of glycosaminoglycan in mucopolysaccharidosis type II mice. *Mol Genet Metab* 2015.

[21] Hamano K, Hayashi M, Shioda K, Fukatsu R, Mizutani S: Mechanisms of neurodegeneration in mucopolysaccharidoses II and IIIB: analysis of human brain tissue. *Acta Neuropathol* 2008, 115:547-559.

[22] Archer LD, Langford-Smith KJ, Bigger BW, Fildes JE: Mucopolysaccharide diseases: a complex interplay between neuroinflammation, microglial activation and adaptive immunity. *J Inherit Metab Dis* 2014, 37:1-12.

[23] Chen L, Elias G, Yostos MP, Stimec B, Fasel J, Murphy K: Pathways of cerebrospinal fluid outflow: a deeper understanding of resorption. *Neuroradiology* 2015, 57:139-147.

[24] Hladky SB, Barrand MA: Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: evaluation of the evidence. *Fluids Barriers CNS* 2014, 11:26.

[25] Glimcher SA, Holman DW, Lubow M, Grzybowski DM: Ex vivo model of cerebrospinal fluid outflow across human arachnoid granulations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008, 49:4721-4728.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения синдрома Хантера, включающий стадию введения интрацеребровентрикулярно (ИЦВ введение) субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективной дозы ИЦВ состава, содержащего белок Идурсульфазу-бета (ИДС-β) в концентрации 15 мг/мл, хлорид натрия в концентрации 150 мМ, полисорбат 20 в концентрации 0,05 мг/мл, фосфат в концентрации не более 5 мМ и имеющего рН 6,

в котором указанное ИЦВ введение осуществляют через интравентрикулярную катетерную систему, содержащую резервуар и катетер, соединенный с указанным резервуаром,

в котором указанное ИЦВ введение проводят в комбинации по меньшей мере с одной дополнительной формой лечения ферментно-заместительной терапией от синдрома Хантера,

в котором указанная дополнительная форма лечения ферментно-заместительной терапией от синдрома Хантера представляет собой внутривенное введение, и

в котором указанное ИЦВ введение проводят один раз в месяц и указанное внутривенное введение проводят один раз в неделю.

2. Способ по п.1, в котором указанная терапевтически эффективная доза составляет от 1 до 30 мг.

3. Способ по п.1, в котором указанная терапевтически эффективная доза составляет 10 мг.

4. Способ по п.1, дополнительно содержащий стадию

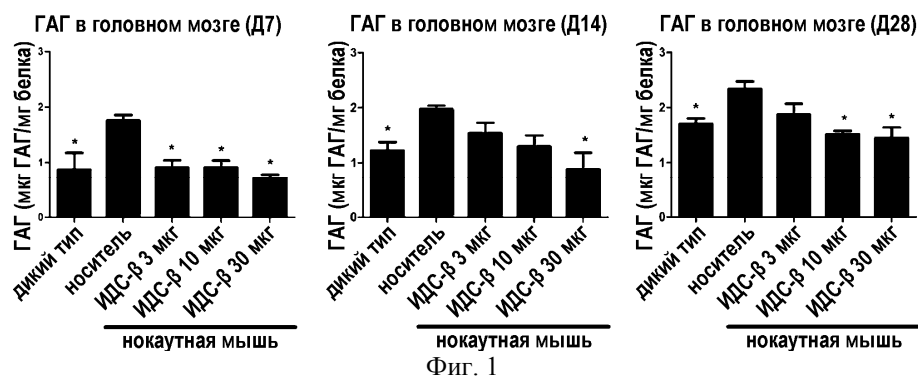
хирургической имплантации указанной интравентрикулярной катетерной системы, при этом указанный резервуар помещают между покровными тканями черепа и мозгом субъекта, нуждающегося в лечении, и конец указанного катетера помещают внутри желудочка указанного субъекта так, что внутреннее пространство указанного резервуара соединено с внутренним пространством указанного желудочка через внутреннее пространство указанного катетера так, что спинномозговая жидкость течет из указанного желудочка в указанный резервуар для заполнения указанного резервуара;

извлечения 0,1-5 мл спинномозговой жидкости из указанного резервуара со скоростью потока 0,1-60 мл/мин;

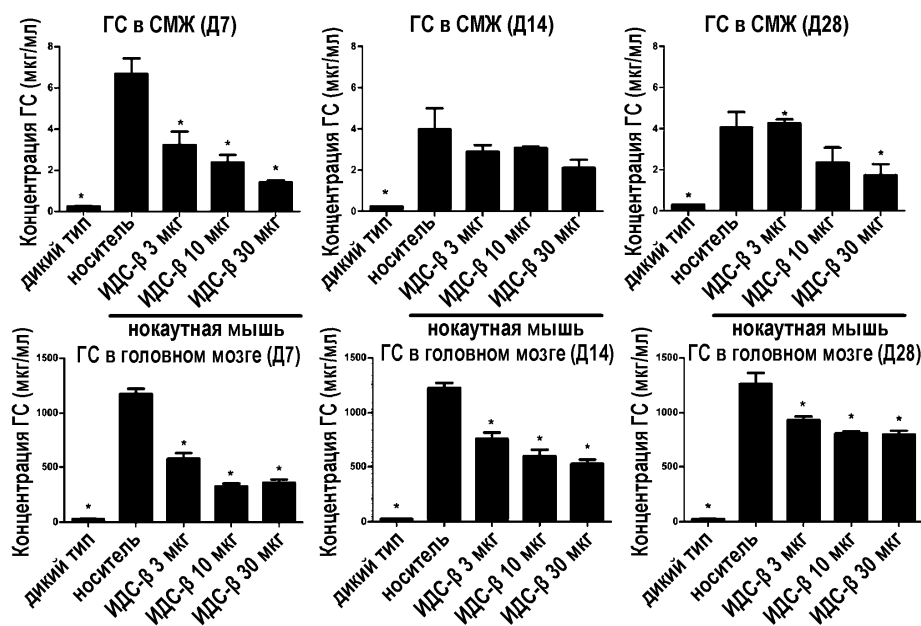
введения 0,1-5 мл указанного ИЦВ состава в указанный резервуар со скоростью потока 0,1-60 мл/мин; и

обеспечения протекания указанного ИЦВ состава из указанного резервуара через указанный катетер в указанный желудочек.

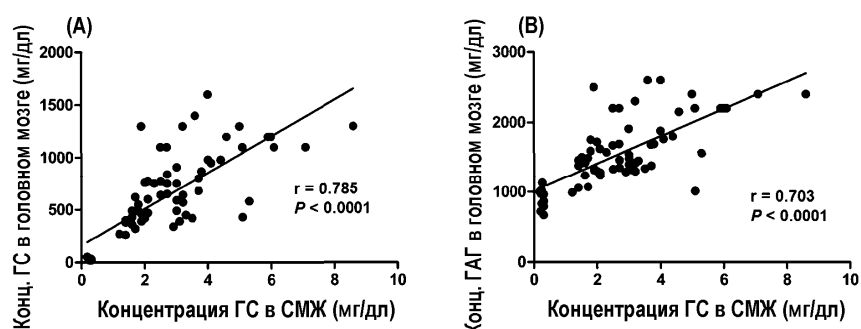
5. Состав для интрацеребровентрикулярного введения для лечения синдрома Хантера, содержащий белок Идурсульфазу-бета (ИДС-β) в концентрации 15 мг/мл, хлорид натрия в концентрации 150 мМ, полисорбат 20 в концентрации 0,05 мг/мл, фосфат в концентрации не более 5 мМ и имеющий рН 6.



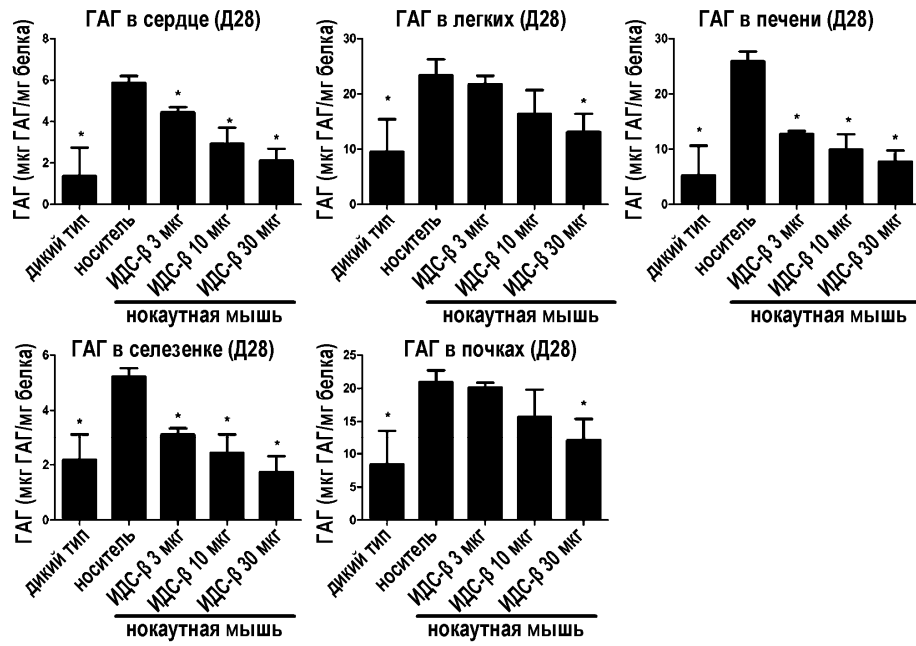
Фиг. 1



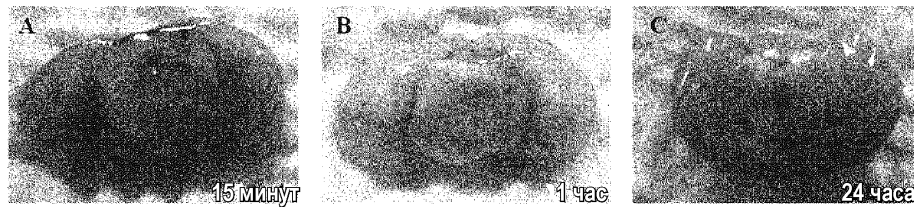
Фиг. 2



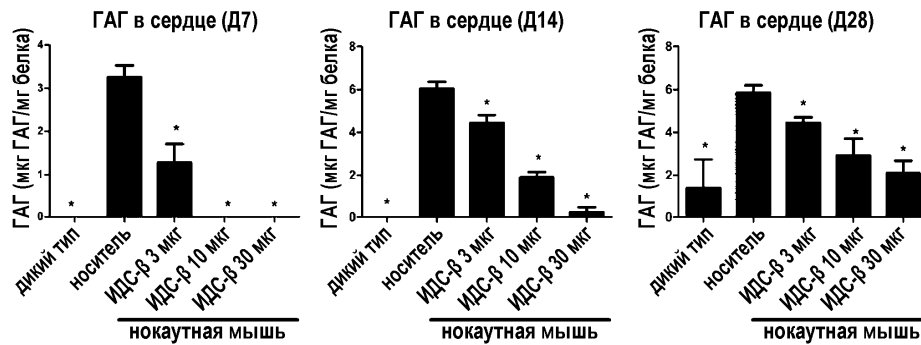
Фиг. 3



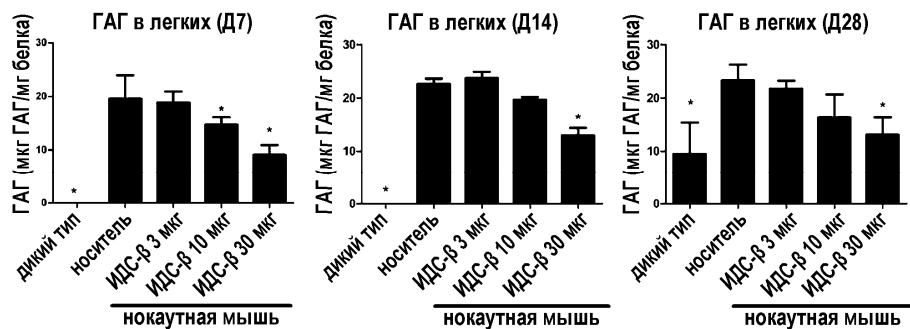
Фиг. 4



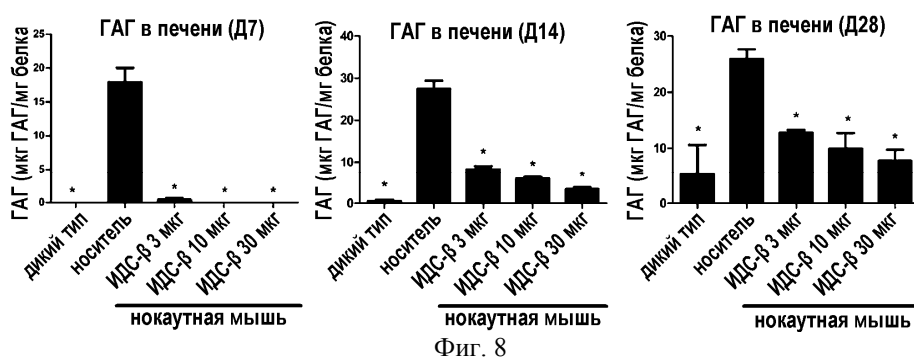
Фиг. 5



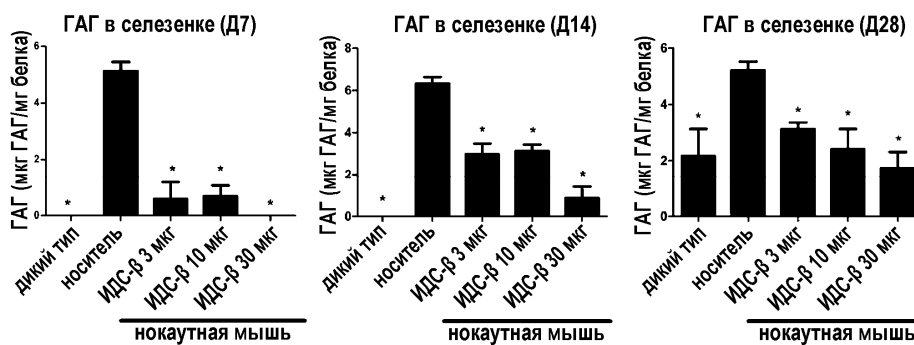
Фиг. 6



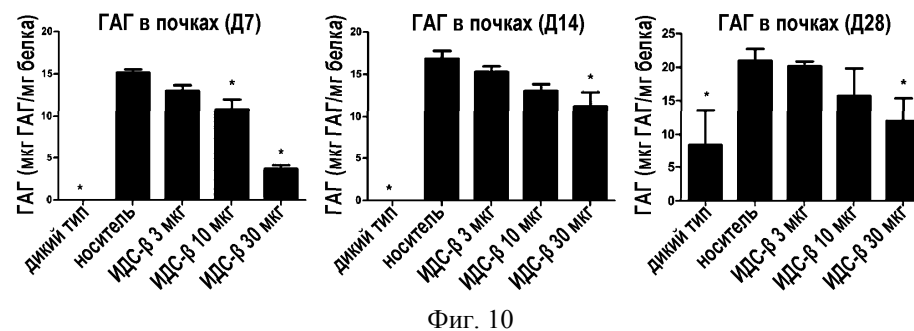
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

