



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **123704** (13) **C2**
(51) МПК

A61K 38/47 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2018 08279**
(22) Дата подання заявки: **21.12.2016**
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **20.05.2021**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **62/272,843, 62/369,970**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **30.12.2015, 02.08.2016**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, US**
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.01.2019, Бюл.№ 1**
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **19.05.2021, Бюл.№ 20**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **РСТ/KR2016/015060, 21.12.2016**

(72) Винахідник(и):
**Окуяма Тораюкі (JP),
Дзин Тонг-Гіу (KR),
Біун Хан-Йеул (KR),
Сео Дзин-Вок (KR),
Лі Біоунг-Дзи (KR),
Кім Йонг-Чул (KR),
Дзанг Ін-Янг (KR),
Лі Кіухіун (KR)**
(73) Володілець (володільці):
**ГРІН КРОСС КОРПОРЕЙШН,
(Bojeong-dong) 107, Ihyeon-ro 30beon-gil,
Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 16924,
Republic of Korea (KR),
МЕДІГЕНЕБІО КОРПОРЕЙШН,
(Bojeong-dong) 107, Ihyeon-ro 30beon-gil,
Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 16924,
Republic of Korea (KR)**
(74) Представник:
**Бреус Наталія Володимирівна, реєстр.
№167**
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
**US 2014271598 A1, 18.09.2014
US 2015320843 A1, 12.11.2015
US 6537785 B1, 25.03.2003
US 6153188 A, 28.11.2000
Calias P. 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, vol. 7, no. e30341, p. 1 - 13
WO 2013148277 A1, 03.10.2013
WO 2011163648 A1, 29.12.2011
MX 2013000321 A, 03.04.2013**

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ СИНДРОМУ ХАНТЕРА

(57) Реферат:

Спосіб лікування синдрому Хантера, який включає стадію введення інтрацеребровентрикулярно (ІЦВ введення) суб'єкту, який потребує лікування, терапевтично ефективною дози ІЦВ складу, який містить білок ідурсульфазу-бета (ІДС-β) у концентрації від 0,1 до 60 мг/мл, хлорид натрію у концентрації 150 мМ, полісорбат 20 у концентрації 0,05 мг/мл, фосфат у концентрації до 5 мМ і має рН 6, де зазначене ІЦВ введення здійснюють через інтравентрикулярну катетерну систему, яка містить резервуар і катетер, з'єднаний із

UA 123704 C2

зазначеним резервуаром. Винахід також стосується складу для інтрацеребровентрикулярного введення для лікування синдрому Хантера, який містить білок ідурсульфазу-бета (ІДС- β).

Опис

Галузь техніки

Даний винахід спрямований на вдосконалені способи і композиції для лікування синдрому Хантера.

5 Рівень техніки

Мукополісахаридоз типу II (МПС II, синдром Хантера) являє собою X-зв'язану рецесивно успадковану хворобу лізосомального нагромадження, викликану дефіцитом ідуронат-2-сульфатази, яка функціонує для деградації мукополісахаридів [1]. Дефіцит ідуронат-2-сульфатази призводить до нагромадження недеградованих глікозаміногліканів (ГАГ) у клітинах і

10

призводить до прогресуючого мультиорганного ушкодження [2]. Серед різних типів ГАГ, дерматансульфат (ДС) і гепарансульфат (ГС) є основними ГАГ, що накопичуються, при МПС II [2].

Клінічний фенотип МПС II класифікується на ослаблену і тяжку форми. Пацієнти з ослабленою формою виявляють соматичні прояви, включаючи грубі риси обличчя, гепатоспленомегалію, множинний дизостоз і скутість у суглобі без неврологічного залучення, тоді як пацієнти з тяжкою формою мають неврологічний дефіцит і прогресуючу нейродегенерацію на додаток до соматичних симптомів. Недостатній рівень ендогенної ІДС викликає патологічне нагромадження гепарансульфату і дерматансульфату, наприклад, у серці, печінці, центральній нервовій системі (ЦНС) тощо. Симптоми, включаючи нейродегенерацію і розумову відсталість, виникають у дитинстві; і рання смерть може відбутися через органне ушкодження в мозку.

15

20

Ферментативна замісна терапія (ФЗТ) включає системне введення природних або рекомбінантно отриманих білків і/або ферментів суб'єктові. Затверджені терапевтичні засоби зазвичай вводять суб'єктам внутрішньовенно і зазвичай ефективні в лікуванні соматичних симптомів дефіциту обумовлюючого ферменту.

25

У результаті обмеженого розподілу білка, що вводиться внутрішньовенно, і/або ферменту в клітинах і тканини центральної нервової системи (ЦНС) лікування захворювань, що мають етіологію ЦНС, було особливо складним, оскільки білки, що вводяться внутрішньовенно, і/або ферменти не в достатньому ступені перетинають гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ).

30

Гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ) являє собою структурну систему, що складається з ендотеліальних клітин, які функціонують для захисту центральної нервової системи (ЦНС) від шкідливих речовин у кровотоці, таких як бактерії, макромолекули (наприклад, білки) і інші гідрофільні молекули, обмежуючи дифузію таких речовин через ГЕБ і в розташовану нижче спинномозкову рідину (СМР) і ЦНС.

35

Багато хто вважає, що бар'єр для дифузії на поверхні мозку, а також відсутність ефективних і зручних способів доставки були занадто великою перешкодою для досягнення достатнього терапевтичного ефекту в головному мозку для будь-якого захворювання.

40

Синдром Хантера впливає на нервову систему і, таким чином, демонструє унікальні труднощі в лікуванні цих захворювань за допомогою традиційної терапії. Часто існує велике нагромадження глікозаміногліканів (ГАГ) у нейронах і оболонках головного мозку уражених людей, що призводить до різних форм симптомів ЦНС.

45

Таким чином, залишається велика потреба ефективно доставляти терапевтичні засоби в мозок. Більш конкретно, існує велика потреба в більш ефективній доставці активних засобів у центральну нервову систему для лікування хвороб лізосомального нагромадження, таких як синдром Хантера.

50

Щоб подолати ГЕБ, пряма доставка ліків через інтратекальні або інтравентрикулярні ін'єкції рекомбінантного ферменту продемонструвала багатообіцяючі результати в декількох типах тваринних моделей МПС [3-7]. Більше того, клінічне дослідження фази I/II показало, що інтратекальна (ІТ) ін'єкція ідурсульфатази (ІДС) зменшувала концентрації ГАГ у спинномозковій рідині (СМР) приблизно на 80-90 % у дітей з тяжкою формою МПС II. Але в клінічних випробуваннях була відзначена велика кількість побічних ефектів, більшість побічних ефектів були пов'язані з несправністю пристрою для ІТ доставки лікарських засобів [8].

55

Хоча клітинний механізм нейродегенерації при тяжкій формі МПС II не повністю зрозумілий, декілька недавніх досліджень продемонстрували кореляцію між дисахаридами, отриманими із ГС, і розумовою відсталістю в більших когортах пацієнтів із МПС [9, 10]. Крім того, дослідження на тваринах продемонстрували, що ГС може призвести до неврологічних розладів, пов'язаних з мишачою моделлю МПС III, шляхом активації фокальної адгезії на основі інтегрину в астроцитах або нервових стовбурових клітинах [11, 12]. Акіяма із співавт. [13] повідомили, що "патологічний ГАГ", виміряний за допомогою аналізу невідновлюючого кінця ГС Sensi-Pro [14], мав більш високу чутливість і специфічність, ніж загальна кількість ГАГ в тканині мозку мишей з

60

МПС II [13]. Виходячи із цих даних, кількість накопиченого ГС може бути більш чутливим біомаркером для представлення патології головного мозку і неврологічної функції МПС II, ніж загальна кількість ГАГ. Однак вимірювання ГС тканини головного мозку неможливе в клінічних умовах. Отже, необхідно знайти придатний клінічний біомаркер, що представляє ГС у тканинах головного мозку. Ми припустили, що концентрація ГС у СМР може бути одним із клінічних біомаркерів, якщо вона корелює з кількістю ГАГ у тканинах головного мозку, особливо із ГС.

Одинична ІЦВ (інтрацеребровентрикулярна) ін'єкція ІДС-β відповідно до даного винаходу добре переносилася і викликала значне зниження ГС і ГАГ у головному мозку та інших соматичних тканинах. Ми також виявили, що значна позитивна кореляція між вмістом ГС у СМР і ГС у головному мозку, і ГАГ у головному мозку припускає, що концентрація ГС у СМР може бути корисним біомаркером для представлення патології мозку в пацієнтів із МПС із залученням ЦНС.

Даний винахід надає ефективний підхід для прямої доставки терапевтичних засобів у центральну нервову систему (ЦНС). Даний винахід оснований на виявленні того, що Ідурсульфатаза-бета (ІДС-β), рекомбінантний білок Ідуронат-2-сульфатаза людини, що виробляється як ефективний заміщуючий фермент для синдрому Хантера, може бути безпосередньо введений у шлуночки суб'єкта через інтрацеребровентрикулярне (ІЦВ) введення, так що фермент ефективно і у великих кількостях дифундує через різні поверхні та проникає в різні відділи мозку, включаючи глибокі відділи мозку. Автори даного винаходу продемонстрували, що така доставка білка може бути досягнута з використанням простих складів на основі сольового розчину і без індукування суттєвих побічних ефектів, таких як важка імунна реакція, у суб'єкта. Таким чином, даний винахід надає високоефективний, клінічно бажаний і зручний для пацієнта підхід для прямої доставки в ЦНС для лікування синдрому Хантера.

Розкриття

Технічна задача

Для лікування синдрому Хантера залишається велика потреба ефективно доставляти терапевтичні засоби в мозок. Нещодавно була зроблена спроба інтратекальної (ІТ) ін'єкції або введення терапевтичних білків у спинномозкову рідину (СМР) для лікування пацієнтів із синдромом Хантера, але в клінічному дослідженні повідомлялося про велику кількість побічних ефектів [8]. Хоча більшість побічних ефектів були пов'язані з несправністю пристрою для ІТ доставки лікарських засобів, для лікування пацієнтів із синдромом Хантера необхідний інший підхід, такий як інтрацеребровентрикулярне (ІЦВ) введення. ІЦВ введення може бути ефективним підходом для прямої доставки терапевтичних засобів у шлуночки пацієнтів, на даний час не існує схвалених продуктів і/або розроблювальних продуктів, призначених для лікування синдрому Хантера за допомогою ІЦВ введення.

Технічне рішення

1. Спосіб лікування синдрому Хантера, що включає стадію введення інтрацеребровентрикулярно (ІЦВ введення) суб'єктові, що потребує лікування, терапевтично ефективною дозою ІЦВ складу, що містить білок Ідурсульфазу-бета (ІДС-β) у концентрації від приблизно 0,1 мг/мл до приблизно 60 мг/мл, хлорид натрію в концентрації приблизно 150 мМ, полісорбат 20 у концентрації приблизно 0,05 мг/мл, і що має рН приблизно 6.

2. Спосіб за зазначеним технічним рішенням 1, у якому зазначений ІЦВ склад містить білок Ідурсульфазу-бета (ІДС-β) у концентрації приблизно 15 мг/мл, хлорид натрію в концентрації приблизно 150 мМ, полісорбат 20 у концентрації приблизно 0,05 мг/мл і має рН приблизно 6.

3. Спосіб за зазначеним технічним рішенням 1, у якому зазначена терапевтично ефективна доза становить від приблизно 1 мг до приблизно 30 мг.

4. Спосіб за зазначеним технічним рішенням 1, у якому зазначена терапевтично ефективна доза становить приблизно 10 мг.

5. Спосіб за зазначеним технічним рішенням 1, у якому зазначене ІЦВ введення проводять один раз на три тижні.

6. Спосіб за зазначеним технічним рішенням 1, у якому зазначене ІЦВ введення проводять один раз на місяць.

7. Спосіб за зазначеним технічним рішенням 1, у якому зазначене ІЦВ введення здійснюють через інтравентрикулярну катетерну систему, що містить резервуар і катетер, з'єднаний із зазначеним резервуаром.

8. Спосіб за зазначеним технічним рішенням 1, що додатково містить стадії хірургічної імплантації зазначеної інтравентрикулярної катетерної системи, де зазначений резервуар поміщають між покривними тканинами черепа і мозком суб'єкта, що потребує лікування, і кінець зазначеного катетера поміщають усередині шлуночка зазначеного суб'єкта так, що внутрішній

простір зазначеного резервуара з'єднаний із внутрішнім простором зазначеного шлуночка через внутрішній простір зазначеного катетера так, що спинномозкова рідина тече із зазначеного шлуночка в зазначений резервуар для заповнення зазначеного резервуара; вилучення 0,1-5 мл спинномозкової рідини із зазначеного резервуара зі швидкістю потоку 0,1-60 мл/хв; введення 0,1-5 мл зазначеного ІЦВ складу в зазначений резервуар зі швидкістю потоку 0,1-60 мл/хв; і забезпечення протікання зазначеного ІЦВ складу із зазначеного резервуара через зазначений катетер у зазначений шлуночок.

9. Спосіб за зазначеним технічним рішенням 1, у якому зазначене ІЦВ введення проводять у комбінації щонайменше з однією додатковою формою лікування ферментною замісною терапією від синдрому Хантера.

10. Спосіб за зазначеним технічним рішенням 9, у якому зазначену додаткову форму лікування ферментною замісною терапією від синдрому Хантера вибирають із групи, що складається із внутрішньовенного введення і підшкірного введення.

11. Спосіб за зазначеним технічним рішенням 10, у якому зазначене ІЦВ введення проводять один раз на місяць, і зазначене внутрішньовенне введення проводять один раз на тиждень.

12. Спосіб за зазначеним технічним рішенням 10, у якому зазначене ІЦВ введення проводять один раз на три тижні, і зазначене внутрішньовенне введення проводять один раз на тиждень.

13. Спосіб за зазначеним технічним рішенням 10, у якому зазначене ІЦВ введення проводять один раз на місяць, і зазначене підшкірне введення проводять один раз на тиждень.

14. Спосіб за зазначеним технічним рішенням 10, у якому зазначене ІЦВ введення проводять один раз на три тижні, і зазначене підшкірне введення проводять один раз на тиждень.

15. Спосіб за зазначеним технічним рішенням 10, у якому зазначене ІЦВ введення проводять один раз на місяць, і зазначене підшкірне введення проводять два рази на тиждень.

16. Спосіб за зазначеним технічним рішенням 10, у якому зазначене ІЦВ введення проводять один раз на три тижні, і зазначене підшкірне введення проводять два рази на тиждень.

17. Спосіб за зазначеним технічним рішенням 10, у якому зазначене ІЦВ введення проводять один раз на місяць, і зазначене внутрішньовенне введення і зазначене підшкірне введення проводять по черзі з інтервалом в один тиждень.

18. Спосіб за зазначеним технічним рішенням 10, у якому зазначене ІЦВ введення проводять один раз на три тижні, і зазначене внутрішньовенне введення і зазначене підшкірне введення проводять по черзі з інтервалом в один тиждень.

19. Склад для інтрацеребровентрикулярного введення для лікування синдрому Хантера, що містить білок Ідурсульфазу-бета (ІДС-β) у концентрації від приблизно 0,1 мг/мл до приблизно 60 мг/мл, хлорид натрію в концентрації приблизно 150 мМ, полісорбат 20 у концентрації приблизно 0,05 мг/мл, і що має рН приблизно 6.

Вигідні ефекти

Інтрацеребровентрикулярне введення ІДС-β відповідно до даного винаходу зменшувало рівні гепарансульфату (ГС) і глікозаміногліканів (ГАГ) у головному мозку та спинномозковій рідині (СМР) у мишей із МПС II.

Інтрацеребровентрикулярне введення ІДС-β відповідно до даного винаходу зменшувало рівні гепарансульфату (ГС) і глікозаміногліканів (ГАГ) у соматичних (периферичних) тканинах, включаючи серце, легені, печінку, селезінку і нирки у мишей із МПС II.

Згідно із даним винаходом тенденція концентрації ГАГ у мозку може бути передбачена на основі рівня гепарансульфату в СМР, що може надати можливість більш безпечної і більш легкої діагностики тяжкості накопичення ГАГ у головному мозку.

Опис креслень

На фігурі 1 показані рівні ГАГ у тканинах мозку мишей з "виключеною" ІДС після однократного ІЦВ введення ІДС-β.

На фігурі 2 показані рівні ГС у СМР і тканинах мозку мишей з "виключеною" ІДС після однократного ІЦВ введення ІДС-β.

На фігурі 3 показана кореляція між рівнем ГС у СМР і рівнем ГС у тканинах мозку мишей з "виключеною" ІДС після однократного ІЦВ введення ІДС-β.

На фігурі 4 показані рівні ГАГ у соматичних тканинах мишей з "виключеною" ІДС після однократного ІЦВ введення ІДС-β.

На фігурі 5 показані тканини мозку, зібрані в різні моменти часу після ін'єкції та візуалізовані за допомогою трипанового синього.

На фігурі 6 показані рівні ГАГ у тканинах серця мишей з "виключеною" ІДС після однократного ІЦВ введення ІДС-β.

На фігурі 7 показані рівні ГАГ у тканинах легень мишей з "виключеною" ІДС після однократного ІЦВ введення ІДС-β.

5 На фігурі 8 показані рівні ГАГ у тканинах печінки мишей з "виключеною" ІДС після однократного ІЦВ введення ІДС-β.

На фігурі 9 показані рівні ГАГ у тканинах селезінки мишей з "виключеною" ІДС після однократного ІЦВ введення ІДС-β.

10 На фігурі 10 показані рівні ГАГ у тканинах нирок мишей з "виключеною" ІДС після однократного ІЦВ введення ІДС-β.

Кращий режим

Як докладно описано нижче, автори даного винаходу успішно розробили стабільні склади для ефективного інтрацеребровентрикулярного (ІЦВ) введення білка Ідурсульфазу-бета (ІДС-β).

15 У різних варіантах здійснення даний винахід включає стабільний склад для прямого інтрацеребровентрикулярного (ІЦВ) введення білка, що містить білок Ідурсульфазу-бета (ІДС-β), сіль і полісорбатну поверхнево-активну речовину. У деяких варіантах здійснення білок ІДС-β є присутнім в ІЦВ складі в концентрації, що перебуває в діапазоні приблизно 0,1-60 мг/мл (наприклад, 0,1-60 мг/мл, 0,1-30 мг/мл, 0,3-30 мг/мл, 0,2-20 мг/мл, 0,2-6 мг/мл, 0,6-6 мг/мл, 5-60
20 мг/мл або 10-60 мг/мл). У деяких варіантах здійснення білок ІДС-β є присутнім в ІЦВ складі в концентрації або до концентрації, вибраної з 0,1 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,6 мг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 10 мг/мл, 15 мг/мл, 20 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл, 50 мг/мл, 55 мг/мл або 60 мг/мл.

У різних варіантах здійснення даний винахід включає стабільний склад за будь-яким з
25 варіантів здійснення, описаних у даному документі. У деяких варіантах здійснення ІДС-β містить білки, що мають амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1. У деяких варіантах здійснення ІДС-β додатково містить білки, що мають амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2. SEQ ID NO:1 являє собою рекомбінантний людський білок Ідуронат-2-сульфатазу. SEQ ID NO:2 являє собою рекомбінантний білок Ідуронат-2-сульфатазу людини з 59-м цистеїном, заміненим на форміл-гліцин (G*).

У деяких варіантах здійснення ІДС-β містить приблизно 35 % (молярних відсотків) або менше білків, що мають SEQ ID NO:1, і приблизно 65 % (молярних відсотків) або більше білків, що мають SEQ ID NO:2. У деяких варіантах здійснення ІДС-β містить приблизно 20-35 % (молярних відсотків) білків, що мають SEQ ID NO:1, і приблизно 65-80 % (молярних відсотків)
35 білків, що мають SEQ ID NO:2.

У деяких варіантах здійснення ІДС-β містить білки, що мають амінокислотну послідовність щонайменше на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 або 98 % ідентичну SEQ ID NO:1. У деяких варіантах здійснення ІДС-β містить білки, що мають амінокислотну послідовність щонайменше на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 або 98 % ідентичну SEQ ID NO:2.

40 У деяких варіантах здійснення стабільний склад за будь-яким з варіантів здійснення, описаних у даному документі, містить сіль. У деяких варіантах здійснення сіль являє собою хлорид натрію (NaCl). У деяких варіантах здійснення NaCl є присутнім у концентрації, що перебуває в діапазоні приблизно 0-300 мМ (наприклад, 0-250 мМ, 0-200 мМ, 0-150 мМ, 50-250 мМ або 100-200 мМ). У деяких варіантах здійснення NaCl є присутнім у концентрації, що
45 перебуває в діапазоні приблизно 125-175 мМ. У деяких варіантах здійснення NaCl є присутнім у концентрації приблизно 150 мМ.

У різних варіантах здійснення даний винахід включає стабільний склад за будь-яким з варіантів здійснення, описаних у даному документі, де полісорбатну поверхнево-активну речовину вибирають із групи, що складається з полісорбату 20, полісорбату 40, полісорбату 60,
50 полісорбату 80 і їх комбінації. У деяких варіантах здійснення полісорбатна поверхнево-активна речовина являє собою полісорбат 20 (Твін 20). У деяких варіантах здійснення полісорбат 20 є присутнім у концентрації, що перебуває в діапазоні приблизно 0-0,02 % (0-0,2 мг/мл). У деяких варіантах здійснення полісорбат 20 є присутнім у концентрації приблизно 0,005 % (0,05 мг/мл).

У різних варіантах здійснення даний винахід включає стабільний склад за будь-яким з
55 варіантів здійснення, описаних у даному документі, де склад додатково містить буферний агент. У деяких варіантах здійснення буферний агент вибирають із групи, що складається з фосфату, ацетату, гістидину, сукцинату, Трис і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення буферний агент являє собою фосфат. У деяких варіантах здійснення фосфат присутній у концентрації не більше 50 мМ (наприклад, не більше 45 мМ, 40 мМ, 35 мМ, 30 мМ, 25 мМ, 20 мМ, 15 мМ, 10 мМ,
60 5 мМ, 0,25 мМ або 0,12 мМ). У деяких варіантах здійснення фосфат присутній у концентрації не

більше 20 мМ. У різних аспектах винахід включає стабільний склад за будь-яким з варіантів здійснення, описаних у даному документі, де склад має рН приблизно 3-8 (наприклад, приблизно 4-7,5, 5-8, 5-7,5, 5-6,5, 5-7,0, 5,5-8,0, 5,5-7,7, 5,5-6,5, 6-7,5 або 6-7,0). У деяких варіантах здійснення склад має рН приблизно 5,5-6,5 (наприклад, 5,5, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 або 6,5). У деяких варіантах здійснення склад має рН приблизно 6,0.

У різних варіантах здійснення даний винахід включає стабільні склади за будь-яким з варіантів здійснення, описаних у даному документі, де склад являє собою рідкий склад. У різних варіантах здійснення даний винахід включає стабільний склад за будь-яким з варіантів здійснення, описаних у даному документі, де склад складений у вигляді ліофілізованого сухого порошку.

У деяких варіантах здійснення даний винахід включає стабільний склад для ІЦВ введення, що містить білок ІДС-β у концентрації, що перебуває в діапазоні приблизно 0,1-60 мг/мл, NaCl у концентрації приблизно 150 мМ, полісорбат 20 у концентрації приблизно 0,005 % (0,05 мг/мл), і що має рН приблизно 6,0. У деяких варіантах здійснення білок ІДС-β перебуває в концентрації приблизно 0,1 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,6 мг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 10 мг/мл, 15 мг/мл, 20 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл, 50 мг/мл, 55 мг/мл або 60 мг/мл.

У різних аспектах даний винахід включає контейнер, що містить одиничну дозовану форму стабільного складу в різних варіантах здійснення, описаних у даному документі. У деяких варіантах здійснення контейнер вибирають із ампули, флакона, пляшки, картриджа, резервуара, шприца "lyo-ject" або попередньо заповненого шприца. У деяких варіантах здійснення контейнер являє собою попередньо заповнений шприц. У деяких варіантах здійснення попередньо заповнений шприц вибирають зі шприців з боросилікатного скла з термообробленим силіконовим покриттям, шприців з боросилікатного скла з напиленням силіконом або шприців із пластичного полімеру без силікону. У деяких варіантах здійснення стабільний склад присутній в об'ємі менше приблизно 50 мл (наприклад, менше приблизно 45 мл, 40 мл, 35 мл, 30 мл, 25 мл, 20 мл, 15 мл, 10 мл, 5 мл, 4 мл, 3 мл, 2,5 мл, 2,0 мл, 1,5 мл, 1,0 мл або 0,5 мл). У деяких варіантах здійснення стабільний склад присутній в об'ємі приблизно 6,0 мл. У деяких варіантах здійснення стабільний склад присутній в об'ємі приблизно 3,0 мл. У деяких варіантах здійснення 2,0 мл стабільного складу присутні у флаконі об'ємом 6,0 мл. У деяких варіантах здійснення 1,5 мл стабільного складу присутні у флаконі об'ємом 5,0 мл. У деяких варіантах здійснення 1,0 мл стабільного складу присутній в флаконі об'ємом 3,0 мл.

У різних аспектах даний винахід включає способи лікування синдрому Хантера, що включає стадію введення інтрацеребровентрикулярно суб'єктові, що потребує лікування, складу за будь-яким з варіантів здійснення, описаних у даному документі.

У деяких варіантах здійснення даний винахід включає спосіб лікування синдрому Хантера, що включає стадію введення інтрацеребровентрикулярно суб'єктові, що потребує лікування, складу, що містить білок ІДС-β у концентрації, що перебуває в діапазоні приблизно 0,1-60 мг/мл, NaCl у концентрації приблизно 150 мМ, полісорбат 20 у концентрації приблизно 0,005 % (0,05 мг/мл), і що має рН приблизно 6.

У деяких варіантах здійснення суб'єкт, що потребує лікування, має інтравентрикулярну катетерну систему, що має резервуар і катетер, такий як резервуар Оммайя, імплантований для ІЦВ введення. У деяких варіантах здійснення ІЦВ введення здійснюють шляхом закачування вищезгаданих ІЦВ складів зі швидкістю потоку 0,1-60 мл/хв у резервуар. У деяких варіантах здійснення спинномозкова рідина (СМР) суб'єкта виводиться зі швидкістю потоку 0,1-60 мл/хв із резервуара перед ІЦВ введенням складів, так що немає ніякого чистого збільшення об'єму СМР суб'єкта після ІЦВ введення, щоб запобігти збільшенню тиску в головному мозку. У деяких варіантах здійснення складу, що закачується в резервуар, забезпечують прохід через катетер у шлуночок суб'єкта, м'яко натискаючи і вивільняючи резервуар.

У деяких варіантах здійснення ІЦВ введення не призводить до суттєвих побічних ефектів (наприклад, важкої імунної реакції) у суб'єкта. У деяких варіантах здійснення ІЦВ введення не приводить до суттєвої адаптивної опосередкованої Т-клітинами імунної реакції в суб'єкта.

У деяких варіантах здійснення ІЦВ введення складу призводить до доставки білка ІДС-β у різні тканини-мішені в головному мозку, спинному мозку і периферичних органах. У деяких варіантах здійснення ІЦВ введення складу призводить до доставки білка ІДС-β у тканини-мішені в головному мозку. У деяких варіантах здійснення тканини-мішені в головному мозку містять білу речовину і/або нейрони в сірій речовині. У деяких варіантах здійснення білок ІДС-β доставляється до нейронів, гліальних клітин, периваскулярних клітин і/або менінгіальних клітин. У деяких варіантах здійснення білок ІДС-β додатково доставляється до нейронів у спинному мозку.

У деяких варіантах здійснення ІЦВ введення складу додатково призводить до системної доставки білка ІДС-β у периферичні тканини-мішені. У деяких варіантах здійснення периферичні тканини-мішені вибирають, але не обмежуються ними, із серця, печінки, селезінки, легенів і/або нирок.

5 У деяких варіантах здійснення ІЦВ введення складу призводить до клітинної лізосомальної локалізації в тканинах-мішенях у головному мозку, нейронах спинного мозку і/або периферичних тканинах-мішенях. У деяких варіантах здійснення ІЦВ введення складу призводить до зменшення нагромадження ГАГ у тканинах-мішенях у головному мозку, нейронах спинного мозку і/або периферичних тканинах-мішенях. У деяких варіантах здійснення 10 нагромадження ГАГ знижується щонайменше на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, в 1 раз, в 1,5 рази або в 2 рази в порівнянні з негативним контролем (наприклад, нагромадження ГАГ у суб'єкта до лікування або після введення тільки носія). У деяких варіантах здійснення ІЦВ введення складу призводить до зменшення вакуолізації в нейронах (наприклад, щонайменше на 20 %, 40 %, 50 %, 60 %, 80 %, 90 %, в 1 раз, в 1,5 рази або в 2 рази в порівнянні 15 з негативним контролем). У деяких варіантах здійснення нейрони містять клітинах Пуркіне.

У деяких варіантах здійснення ІЦВ введення складу призводить до збільшення ферментативної активності ІДС-β у тканинах-мішенях у головному мозку, нейронах спинного мозку і/або периферичних тканинах-мішенях. У деяких варіантах ферментативна активність ІДС-β збільшується щонайменше в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, або в 10 раз у порівнянні з негативним 20 контролем (наприклад, ендогенна ферментативна активність у суб'єкта перед лікуванням або після введення тільки носія). У деяких варіантах здійснення збільшена ферментативна активність ІДС-β становить щонайменше приблизно 10 нмоль/год./мг, 20 нмоль/год./мг, 40 нмоль/год./мг, 50 нмоль/год./мг, 60 нмоль/год./мг, 70 нмоль/год./мг, 80 нмоль/год./мг, 90 нмоль/год./мг, 100 нмоль/год./мг, 150 нмоль/год./мг, 200 нмоль/год./мг, 250 нмоль/год./мг, 300 25 нмоль/год./мг, 350 нмоль/год./мг, 400 нмоль/год./мг, 450 нмоль/год./мг, 500 нмоль/год./мг, 550 нмоль/год./мг або 600 нмоль/год./мг.

У деяких варіантах здійснення ІЦВ введення складу призводить до зниження інтенсивності, тяжкості або частоти виникнення, або затримки початку щонайменше одного симптому або ознаки синдрому Хантера. У деяких варіантах здійснення щонайменше один симптом або 30 ознака синдрому Хантера являє собою когнітивні порушення; ураження білої речовини; розширені периваскулярні простори в мозковій паренхімі, гангліях, мозолистих тілах і/або стовбурі головного мозку; атрофію; і/або вентрикуломегалію.

У деяких варіантах здійснення ІЦВ введення відбувається один раз на два тижні. У деяких варіантах здійснення ІЦВ введення відбувається один раз на три тижні. У деяких варіантах здійснення ІЦВ введення відбувається один раз на місяць. У деяких варіантах здійснення ІЦВ введення відбувається один раз у два місяці. У деяких варіантах здійснення введення є безперервним, наприклад, за допомогою безперервного перфузійного насоса. У деяких 35 варіантах здійснення ІЦВ введення використовують у комбінації із внутрішньовенним (ВВ) введенням. У деяких варіантах здійснення ВВ введення відбувається один раз на тиждень. У деяких варіантах здійснення ВВ введення відбувається один раз на два тижні. У деяких варіантах здійснення ВВ введення відбувається один раз на місяць. У деяких варіантах здійснення ВВ введення відбувається один раз у два місяці.

У деяких варіантах здійснення ВВ і ІЦВ введення виконують у той же день. У деяких варіантах здійснення ВВ і ІЦВ введення не виконують протягом певного періоду часу один від 45 одного, такого як не протягом щонайменше 2 днів, протягом щонайменше 3 днів, протягом щонайменше 4 днів, протягом щонайменше 5 днів, протягом щонайменше 6 днів, протягом щонайменше 7 днів або протягом щонайменше одного тижня. У деяких варіантах здійснення ВВ і ІЦВ введення виконують у режимі, що чергується, такому як введення, що чергуються раз на тиждень, раз на два тижні, два рази на місяць або один раз на місяць. У деяких варіантах 50 здійснення ІЦВ введення заміняє ВВ введення в режимі введення, такому як у режимі ВВ введення раз на тиждень, кожний другий тиждень, два рази на місяць або раз на місяць, кожне третє або четверте, або п'яте введення в цьому режимі можна замінити на ІЦВ введення замість ВВ введення.

У деяких варіантах здійснення ВВ і ІЦВ введення виконують послідовно, наприклад, 55 спочатку виконують ВВ введення (наприклад, введення дози один раз на тиждень, кожний другий тиждень, один раз на три тижні, два рази на місяць або один раз на місяць протягом двох тижнів, місяця, двох місяців, трьох місяців, чотирьох місяців, п'яти місяців, шести місяців, року або більше) з наступним ІЦВ введенням (наприклад, введення дози один раз на тиждень, кожний другий тиждень, один раз на три тижні, два рази на місяць або один раз на місяць 60 протягом більше ніж двох тижнів, місяця, двох місяців, трьох місяців, чотирьох місяців, п'яти

місяців, шести місяців, року або більше). У деяких варіантах здійснення ІЦВ введення виконують першим (наприклад, введення дози один раз на тиждень, один раз на два тижні, один раз на три тижні, два рази на місяць, один раз на місяць, один раз у два місяці, один раз у три місяці протягом двох тижнів, місяця, двох місяців, трьох місяців, чотирьох місяців, п'яти місяців, шести місяців, року або більше) з наступним ВВ введенням (наприклад, введення дози один раз на тиждень, кожний другий тиждень, один раз на три тижні, два рази на місяць або один раз на місяць протягом більше ніж двох тижнів, місяця, двох місяців, трьох місяців, чотирьох місяців, п'яти місяців, шести місяців, року або більше).

У деяких варіантах здійснення ІЦВ введення використовують під час відсутності ВВ введення.

У деяких варіантах здійснення ІЦВ введення використовують під час відсутності супутньої імуносупресивної терапії.

Приклади

Далі даний винахід буде описаний більш докладно з посиланням на приклади. Фахівцеві в даній галузі техніки буде очевидно, що ці приклади мають тільки ілюстративні цілі та не повинні тлумачитися як обмежуючі об'єм даного винаходу.

Приклад 1

1-1: Огляд

Дане дослідження проводили з метою вивчення фармакологічного ефекту і залежності "доза-відповідь" одиначної інтрацеребровентрикулярної (ІЦВ) ін'єкції Ідурсульфазі бета (ІДС-бета) у мишей із МПС II. Крім того, ми вимірювали концентрацію ГС у СМР і досліджували кореляцію між ГС у СМР і ГС і ГАГ у головному мозку мишей із МПС II.

Три дози ІЦВ ін'єкцій ІДС-бета (3, 10, і 30 мкг) використовували, і ГАГ у тканині (мозку, серці, легенях, печінці, селезінці і нирках) вимірювали на 7, 14 і 28 дні після ін'єкції. ГС вимірювали з використанням РХ/МС-МС у СМР і мозку мишей. Загальна кількість ГАГ у головному мозку і інших соматичних тканинах усіх ІДС-β-лікованих груп була значно знижена. Значне зниження підтримувалося протягом 28 днів у групі з ін'єкцією 30 мкг. Ми також продемонстрували, що вміст ГС був знижений як у СМР, так і в тканині мозку всіх ІДС-β-лікованих груп. Крім того, ми продемонстрували, що концентрація ГС у СМР вірогідно корелювала із ГС у головному мозку і з ГАГ у мозкових тканинах.

Одиначна ІЦВ ін'єкція ІДС-β відповідно до даного винаходу добре переносилася і викликала значне зниження ГС і ГАГ у головному мозку і інших соматичних тканинах. Ми також виявили, що значна позитивна кореляція між вмістом ГС у СМР і ГС у головному мозку і ГАГ у головному мозку припускає, що концентрація ГС у СМР може бути корисним біомаркером для представлення патології мозку в пацієнтів із МПС II із залученням ЦНС.

1-2: Способи

Тварини

Ми використовували раніше описаних мишей з "виключеною" ІДС (нокаутні). Коротко, ген ІДС видаляли з екзона 2 в екзон 3 [15]. Мишей з "виключеною" ІДС виводили з вихідного штаму C57BL/B6.129S, і вони мали нульову мутацію в гені ІДС. Контрольних мишей дикого типу (WT) виводили зі штаму C57BL/B6.129S. Генотип усіх мишей підтверджували полімеразною ланцюговою реакцією ДНК, отриманою з обрізка хвоста. Це дослідження було схвалене Інституціональним комітетом з догляду за тваринами і їх використанню (реєстраційний № 20140925005) і виконане відповідно до політики гуманного поводження із тваринами Інституту біомедицинських досліджень Samsung, Сеул, Корея.

План дослідження

6-тижневих тварин розподіляли по п'яти групам (по 12 тварин у кожній групі) шляхом стратифікованої рандомізації. Мишей з "виключеною" ІДС розподіляли по чотирьом групам: миші з "виключеною" ІДС із ін'єкцією носія і миші з "виключеною" ІДС із трьома різними дозами (3 мкг, 10 мкг і 30 мкг) ін'єкції ІДС-β (Green Cross Corp., Йон'їн, Корея). Чотирьох тварин у кожній групі умертвляли кожні 7, 14 і 28 днів після ІЦВ ін'єкції. Аналізували концентрації ГАГ різних тканин (головного мозку, серця, легенів, печінки, селезінки і нирок), і концентрації ГС зі СМР і головного мозку вимірювали через 7, 14 і 28 днів після ін'єкції.

Одержання ІДС-β для ІЦВ ін'єкції

Розчин носія являв собою розчин 150 мМ хлориду натрію і 0,05 мг/мл Твін 20 (Merck Millipore, Дармштадт, Німеччина). Концентровані розчини лікарського засобу ІДС-β (50 мг/мл) розбавляли носієм для одержання концентрацій 0,6, 2 і 6 мг/мл.

ІЦВ ін'єкція

Одиначне ІЦВ ін'єкування мишей проводили у віці 6 тижнів. Кожний розчин лікарського засобу або носія вводили ІЦВ мишам у загальному об'ємі 5 мкл. У день введення дози мишей

анестезували інгаляцією ізофлюрану (Hana Pharm., Корея) і поміщали в стереотаксичний прилад. Після того як робили невеликий розріз, череп оголювали та очищали. ІЦВ ін'єкцію виконували відповідно до модифікованих способів, описаних раніше [16, 17]. ІДС-β або носій вводили в правий бічний шлуночок голкою 31 калібру зі швидкістю 10 мл/хв, контрольованої шприцевим насосом (Harvard Apparatus, Холлістон, Массачусетс, США) з використанням координат (Benchmark, Neurolab, Сент-Луїс, Міссурі): 0,58 мм від каудальної границі до брегми, 1,25 мм від латеральної поверхні до сагітального шва і 1,77 мм у глибину. Ділянку ін'єкції контролювали на предмет розривів судин або набряку обличчя. Після цього голку видаляли через 15 секунд після припинення руху плунжера, щоб запобігти зворотному потоку. Розріз закривали раневими кліпсами і мишей поміщали на ізотермічну підбивку при 37°C і спостерігали після операції до відновлення. Увесь протокол займав 10-15 хвилин для однієї тварини. Щоб продемонструвати успішну методику ІЦВ ін'єкцій, розчин барвника вводили ІЦВ. Мозок збирали в різні моменти часу після ін'єкції і візуалізували. Точна ін'єкція в один із шлуночків дозволяла розподілити трипановий синій (0,05 %) на стороні мозку, що ін'єкується, приблизно через 10-15 хвилин після ін'єкції. Широкий розподіл трипанового синього в півкулі головного мозку було видно приблизно через 1 годину після ін'єкції. Неточні ін'єкції можна відрізнити через відсутність синього кольору в півкулі головного мозку (Фіг.5).

Збір СМР і тканин

Через 7, 14 і 28 днів після ін'єкції мишей піддавали евтаназії шляхом ін'єкції надлишкової кількості розчину Алфаксалону (Jugoh/назва: Алфаксан) (15 мг/кг). СМР збирали з мостомозочкової цистерни боросилкатним склом (Зовн.Д.: 10 мм, Внутр.Д.: 0,75 мм) і заморожували для вимірювання концентрації ГС. Кров у мозковій тканині мишей очищали транскадіальною перфузією за допомогою фосфатно-сольового буфера (ФСБ) протягом 15-20 хв. Тканину головного мозку збирали і заморожували на сухому льоді. Потім зразки гомогенізували і ділили на чверті (половину використовували для вимірювання ГАГ і половину - для вимірювання ГС). Інші соматичні тканини (серце, легені, печінку, селезінку і нирки) також збирали і гомогенізували у ФСБ.

Вимірювання загальної концентрації ГАГ у тканинах

Зразки гомогенізованих тканин струшували протягом ночі при 4°C і центрифугували протягом 15 хв при 12000 × g, а потім збирали супернатанти. Загальні рівні ГАГ вимірювали з використанням набору для аналізу сГАГ (Kamiya Biochemicals, Японія). Спочатку 50 мкл гомогенізованих зразків інкубували з 50 мкл 8 моль/л гуанідину-НСІ при кімнатній температурі (КТ) протягом 15 хв. Потім протягом 15 хв при кімнатній температурі додавали 50 мкл розчину STA (0,3 % H₂SO₄, 0,75 % Тритон X-100), і до розчину протягом 15 хв додавали розчин альціанового синього. Зразки потім центрифугували протягом 15 хв при 12000 об/хв і промивали розчином ДМСО (40 % ДМСО, 0,05 моль/л MgCl₂). Нарешті, до гранул додавали 500 мкл розчину Gu-ргор (4 моль/л гуанідину-НСІ, 33 % 1-пропанолу, 0,25 % Тритону X-100), і суміш залишала повністю розчинятися. Альтернативно, поглинання зчитували в X-Mark (Bio-Rad, Геркулес, Каліфорнія) при 600 нм. Концентрацію ГАГ нормалізували до концентрації білка, яку вимірювали за допомогою набору для аналізу білка за допомогою біцинхонінової кислоти (ThermoFisher, Уолтем, Массачусетс). Концентрацію ГАГ виражали у вигляді г ГАГ/мг білка, як розраховано за стандартною кривою субстрату ГАГ, хондроїтинсульфату-6. Дані кожного зразка були середніми з повторних вимірювань.

Вимірювання ГС у СМР і тканині головного мозку

Рівні ГС у зразках мишачої СМР і мозкової тканини визначали з використанням РХ-МС/МС. 5 мг/мл вихідних розчинів кожного з каліброваних стандартів (СТД) готували розчиненням натрієвої солі ГС або ДС у воді. Вихідні розчини СТД розбавляли відповідним об'ємом води для одержання 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10 і 20 мкг/мл СТД і 0,2, 2 і 15 мкг/мл зразків контролю якості (КЯ). Крім того, 5 мг/мл вихідних розчинів СТД були міченими дейтерієм, щоб одержати ГС-d6 і ДС-d6 як внутрішній стандарт (ВС). 20 мкл розчинів СТД додавали в скляну пробірку і випарювали в атмосфері азоту. Залишок метанолізували шляхом змішування з 200 мкл метанолу-d4-ацетилхлориду (400:64, об./об.) і нагрівання протягом 90 хв при 65°C. Після метанолізу розчинник випарювали в атмосфері азоту. Залишок повторно розчиняли в 1 мл води, розбавляли водою-метанолом-мурашиною кислотою (950:50:1, об./об./об.: буфер А), і отриманий розчин використовували як вихідний розчин ВС. Зразок мишачої СМР центрифугували при 2100 × g при 4°C протягом 5 хв, і супернатант розбавляли рівним об'ємом ФСБ. Тканину головного мозку миші гомогенізували з 0,01 моль/л гідроксиду натрію (в 50 або 100-кратному об'ємі розраховуючи на масу мозку). Гомогенат інкубували протягом 24 годин при кімнатній температурі і 20 мкл гомогенату додавали до 180 мкл води-хлороформу (4:5, об./об.). Після перемішування зразок центрифугували при 10000 × g при 4°C протягом 5 хв, і

супернатант розбавляли рівним об'ємом ФСБ. Ці зразки, отримані зі СМР і головного мозку, використовували як випробувані зразки для аналізу РХ-МС/МС. 4 мкл випробуваного зразка зі СМР (20 мкл із головного мозку), СТД або КЯ у пробірці упарювали в атмосфері азоту. До залишку додавали 50 мкл 3М НСІ-МеОН і 5 мкл 2,2-диметоксипропану і обробляли
 5 ультразвуком протягом 3 хв, нагрівали протягом 90 хв при 65°C і упарювали. Залишок повторно розчиняли в 200 мкл вихідного розчину ВС, обробляли ультразвуком протягом 3 хв і переносили в центрифужний фільтр, центрифугували при $10000 \times g$ при 4°C протягом 3 хв і аналізували отриманий фільтрат. 5 мкл кожного зразка ін'єкували в трьохквадрольний мас-спектрометр API5000 (AB/MDS Sciex), оснащений системою ACQUITY UPLC (Waters).
 10 Випробуваний зразок і ВС розділяли на колонці ACQUITY UPLC HSS T3 (100 Å 1,8 мкм, 2,1 мм на 100 мм), нагрітій до 40°C. Початкова рухома фаза складалася з 100:0 (об./об.) буфер А:буфер В [вода-метанол-мурашина кислота (500:500:1, об./об./об.)] із градієнтним елююванням при швидкості потоку 0,4 мл/хв. Елюювання проводили в лінійному градієнті, де буфер В збільшувався від 0 до 45 % між 0,5 і 4 хв, потім збільшувався до 60 % на 4,01 хв, підтримувався при 60 % протягом 1 хв, потім зменшувався до 0 % на 5,01 хв, потім підтримувався при 0 % протягом 1 хв. Мас-спектрометр використовували при настройках, які вибирали іонізацію електророзпиленням для способу іонізації і позитивну для полярності іонів. Азот використовували як "газову завісу" (40 фунтів на квадратний дюйм), а повітря використовували як газ-розпилювач (50 фунтів на квадратний дюйм) і газ-нагрівач (40 фунтів на квадратний дюйм). Умови іонного моніторингу визначали як напругу розпилення іонів, що дорівнює 4,5 кВ і найвища температура вимірювання дорівнює 600°C. Ці установки для потенціалу декластеризації, потенціалу входу і енергії зіткнення становили 110 В, 8 В і 22 еВ, відповідно. Дані одержували шляхом моніторингу множинних реакцій (ММР) з використанням відношення маси до заряду (м/з) 384 → 162 для ГС, м/з 426 → 236 для ДС, м/з 390 → 162 для ГС-d6 і м/з 432 → 162 для ДС-d6. Пікові ділянки, крива СТД і вимірювані концентрації
 25 розраховували за допомогою Analyst ver.1.5.1 (AB Scix).

Статистичний аналіз

Статистичний аналіз виконували за допомогою GraphPad Prism 6. U-критерій Манна-Уїтні використовували для порівняння відмінностей між кожною лікованою лікарським засобом
 30 групою і лікованою носієм групою в нокаутних мишей. Відмінності зі значеннями Р менше 0,05 вважалися статистично значимими. Дані представляли у вигляді середніх і стандартної похибки середньої величини (SEM). Щоб визначити взаємозв'язок між ГС у СМР і ГС у мозку, а також між ГС у СМР і ГАГ у мозку, ми оцінювали 73 зразка СМР і тканини головного мозку мишей, і дані аналізували з використанням коефіцієнта Спірмана і лінійної регресії. Розраховували
 35 коефіцієнти внутрішньокласової кореляції (ВКК) і довірчі інтервали 95 %.

1-3: Результати

Маси тіла

Маси тіла всіх експериментальних груп суттєво не змінювалися протягом періоду дослідження. Істотних відмінностей у масах мишей у групах ІЦВ ФЗТ не було, у порівнянні з тими, що в контрольних групах (ДТ і не лікованих мишах з "виключеною" ІДС). Ми також не виявили ніяких аномальних клінічних ознак під час експериментів у будь-якій із груп ФЗТ.

Одинична ІЦВ ін'єкція ІДС-β зменшувала ГАГ у мозковій тканині мишей з "виключеною" ІДС

Загальна кількість ГАГ у мозковій тканині нокаутних мишей у групі з ін'єкцією носія була значне вище, ніж у мишей ДТ (Фіг.1). Загальна кількість ГАГ у мозковій тканині всіх ІДС-β-лікованих груп була значно знижена в порівнянні з мозковими тканинами в мишей для контролю захворювання через 7 днів після введення дози (Фіг.1). Однак повторне нагромадження ГАГ спостерігали через 14 днів після ін'єкції в групах з 3- і 10-мкг ін'єкціями. Через 28 днів після ін'єкції значне зниження ГАГ підтримувалося в групі з 30 мкг ін'єкцією, незважаючи на те, що загальний рівень ГАГ був злегка збільшений у порівнянні з рівнем 7-го дня і 14-го дня (Фіг. 1).

Одинична ІЦВ ін'єкція ІДС-β зменшувала ГС у СМР і мозковій тканині мишей з "виключеною" ІДС

Рівень ГС був значно збільшений у СМР і мозковій тканині мишей з "виключеною" ІДС у порівнянні з мишами контрольної групи ДТ (Фіг.2). Через сім днів після ІЦВ ін'єкції вміст ГС у СМР і тканині головного мозку значно зменшувався у всіх три ІДС-β-лікованих групах. Значні скорочення ГС у тканині головного мозку підтримувалися протягом 28 днів (Фіг.2). Вміст ГС у СМР залишався зменшеним через 14 і 28 днів після ІЦВ ін'єкції. Однак статистична значимість була виявлена тільки в групі, лікованій 30 мкг ІДС-β, через 28 днів після ІЦВ ін'єкції (Фіг.2).

Вміст ГС у СМР позитивно корелював із ГС і ГАГ у головному мозку

Була виявлена значна позитивна кореляція між вмістом ГС у СМР і концентрацією ГС у
 60 мозковій тканині зразків мишей ($r=0,785$, $P < 0,0001$) (Фіг.3А). Крім того, вміст ГС у СМР також

мав значну позитивну кореляцію з концентрацією ГАГ у головному мозку ($r=0,703$, $P < 0,0001$) (Фіг.3В).

Одинична ІЦВ ін'єкція ІДС-β зменшувала ГАГ у соматичних тканинах мишей з "виключеною" ІДС

Ми виміряли загальну концентрацію ГАГ після одиної ІЦВ ін'єкції як у тканині головного мозку, так і в інших соматичних тканинах (серці, легенях, печінці, селезінці і нирках). Нагромадження ГАГ було виявлено у всіх проаналізованих тканинах мишей з "виключеною" ІДС із ін'єкцією носія в порівнянні з мишами ДТ (Фіг.4). Через 28 днів після ІЦВ ін'єкції ІЦВ введення з 30 мкг ІДС-β підтримувало значне зниження загальної кількості ГАГ у всіх досліджених тканинах (Фіг.4). Концентрації ГАГ у соматичних тканинах через 7 і 14 днів після ІЦВ ін'єкції показані на Фіг. 6-10.

1-4: Обговорення

МПС II є найпоширенішим типом МПС в Азії, і приблизно 70 % пацієнтів із МПС II мають тяжку форму [18, 19]. Тому корекція патології головного мозку є однією з найбільш важливих і складних проблем у лікуванні пацієнтів із МПС II. Інтратекальна або інтравентрикулярна ін'єкція рекомбінантного ферменту була запропонована як стратегія доставки терапевтичного лікарського засобу в мозок. У даному дослідженні ми виконали одиної ІЦВ ін'єкції трьох різних доз ІДС-β у 6-тижневих мишей з "виключеною" ІДС для оцінки залежності "доза-відповідь" і часової динаміки фармакологічного ефекту.

Загальна кількість ГАГ у тканині головного мозку всіх ІДС-β-лікованих груп була значно знижена, і значне зниження ГАГ підтримувалося протягом 28 днів у групі з 30 мкг ін'єкцією (Фіг.1). Значне зниження концентрації ГС у СМР також послідовно спостерігалось в групі, лікованій 30 мкг, через 28 днів після ІЦВ ін'єкції (Фіг.2). Тому ми припускаємо, що ін'єкція 30 мкг ІДС-β у бічний шлуночок один раз на чотири тижні може бути ефективною для зниження і підтримки накопичених ГАГ у мозку в мишей із МПС II. Крім того, ці результати можуть бути основним доказом для визначення дози і частоти введення при клінічному використанні ІЦВ ін'єкцій рекомбінантного ферменту, хоча слід враховувати відмінності в розмірі мозку і швидкості обміну речовин між мишами і людиною. Однак для подальшого з'ясування ефективності ІЦВ введення ферменту для полегшення патології ЦНС при МПС II нам необхідно розширити дослідження за допомогою повторних ін'єкцій і провести функціональні оцінки, включаючи поведінкові тести і гістологічні аналізи головного мозку.

Серед різних типів МПС залучення ЦНС є присутнім у тяжкій формі МПС I (хвороба Херлера), тяжкій формі МПС II, МПС III і МПС VII. Навпаки, пацієнти із МПС IV, МПС VI, ослабленим типом МПС I (синдром Шейє) і ослабленим типом МПС II не мають когнітивних порушень [2]. ГС є одним з основних ГАГ, що накопичуються, при МПС I, II, III і VII [10]. У декількох повідомленнях продемонстровано, що накопичений ГС у тканині головного мозку відповідає за неврологічні прояви МПС [9-12]. Крім того, було показано, що концентрація ГС є більш чутливим і специфічним біомаркером у тканині мозку мишей із МПС II [13, 20]. Однак пряме вимірювання кількості ГС у тканині головного мозку неможливе в клінічних умовах. Тому ми проаналізували концентрації ГС у СМР і спробували знайти кореляцію між рівнем ГС у СМР і мозкової тканині. Ми продемонстрували, що вміст ГС був значно збільшений як у СМР, так і в мозковій тканині мишей з "виключеною" ІДС у порівнянні з мишами ДТ і зменшувався у всіх групах, лікованих ІДС-β (Фіг.2). Крім того, це перше дослідження, яке демонструє, що концентрація ГС у СМР значно корелювала із ГС у головному мозку і ГАГ у головному мозку (Фіг.3). Тому ми припускаємо, що вміст ГС у СМР може бути одним з потенційних біомаркерів для припущення рівнів ГС або ГАГ у тканині мозку. Однак для демонстрації того, що вміст ГС у СМР може дійсно представляти патологію ЦНС, нам потрібне додаткове дослідження, включаючи патологічне дослідження тканини головного мозку, оскільки патологія ЦНС при МПС II обумовлена не тільки нагромадженням ГАГ, але і нагромадженням вторинного субстрату, запаленням і дегенеративними змінами ЦНС [12, 21, 22]. Якщо кореляція буде продемонстрована, то вміст ГС у СМР може бути корисним параметром для оцінки патології ЦНС у можливих майбутніх клінічних випробуваннях пацієнтів із МПС II із залученням ЦНС.

Крім того, ми продемонстрували, що ІЦВ введення ІДС-β також значно зменшувало нагромадження ГАГ у соматичних тканинах (печінці, селезінці, нирках, серці і легенях), а також мозковій тканині дозозалежним чином, хоча ефект різнився серед тканин (Фіг.4 і Фіг.6-10). Було відзначено, що ступінь зниження ГАГ залежить від дози, і ми відзначили, що введення 30 мкг ІДС-β може значно зменшувати та підтримувати накопичені ГАГ у соматичних тканинах протягом 28 днів, що було так само, як і в тканині головного мозку. У цілому ці дані демонструють фізіологічний перенос терапевтичного білка зі СМР у системні органи після ІЦВ введення, що вказує на клінічно можливий шлях доставки терапевтичного ферменту як у мозок,

так і в системні органі. Крім того, CMP може служити проміжним резервуаром для ферменту, що ін'єкується, з якого деякі кількості поступово переносяться в системний кровотік після ІЦВ ін'єкції. Хоча механізм доставки ферментів зі CMP у системний кровотік не ясний, було висловлене припущення, що CMP, яка містить ідуронат-2-сульфатазу, може сполучатися із системним венозним кровотоком через субарахноїдальний простір [6, 23-25].

На закінчення, одинична ІЦВ ін'єкція ІДС-β добре переносилася і це призвело до значного зниження ГС і ГАГ у тканині головного мозку і ГАГ у соматичних тканинах мишей з "виключеною" ІДС. Більше того, ефект підтримувався через 28 днів після ІЦВ ін'єкції, особливо в дозі 30 мкг. Крім того, концентрація ГС у CMP може бути корисним біомаркером для представлення патології мозку, оскільки концентрація ГС у CMP позитивно корелювала із ГС і ГАГ у головному мозку.

1-5: Список послідовності

1-5: СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТІ

SEQ ID NO: 1

Довжина: 525

Тип: PRT

```

SETQANSTTD  ALNVLLIIVD  DLRPSLG CYG  DKLVRSPNID  QLASHSLLFQ
NAFAQQAVCA
PSRVSFLTGR  RPDTRRLYDF  NSYWRVHAGN  FSTIPQYFKE  NGYVTMSVGK
VFHPGISSNH
TDDSPYSWSF  PPYHPSSEKY  ENTKTCRGPD  GELHANLLCP  VDVLDVPEGT
LPDKQSTEQA
IQLLEKMKTS  ASPFFLAVGY  HKPHIPFRYP  KEFQKLYPLE  NITLAPDPEV
PDGLPPVAYN
PWMDIRQRED  VQALNISVPY  GPIPVDVFQRK  IRQSYFASVS  YLDTQVGRLL
SALDDLQLAN
STIIAFTSDH  GWALGEHGEW  AKYSNFDVAT  HVPLIFYVPG  RTASLPEAGE
KLFPYLDPPD
SASQLMEPGR  QSMDLVELVS  LFPTLAGLAG  LQVPPRCVPV  SFHVLCREG
KNLLKHFRFR
DLEEDPYLPG  NPRELIAYSQ  YPRPSDIPQW  NSDKPSLKDI  KIMGYSIRTI
DYRYTVWVGF

```

NPDEFLANFS DIHAGELYFV DSDPLQDHNM YNDSQGGDLF QLLMP

SEQ ID NO:2

Довжина: 525

Тип: PRT

```

SETQANSTTD  ALNVLLIIVD  DLRPSLG CYG  DKLVRSPNID  QLASHSLLFQ
NAFAQQAVG*A
PSRVSFLTGR  RPDTRRLYDF  NSYWRVHAGN  FSTIPQYFKE  NGYVTMSVGK
VFHPGISSNH
TDDSPYSWSF  PPYHPSSEKY  ENTKTCRGPD  GELHANLLCP  VDVLDVPEGT
LPDKQSTEQA

```

IQLLEKMKTS ASPFFLA VGY HKPHIPFRYP KEFQKLYPLE NITLAPDPEV
 PDGLPPVAYN
 PWMDIRQRED VQALNISVPY GPIPVD FQRK IRQSYFASVS YLDTQVGRLL
 SALDDLQLAN
 STIIAFTSDH GWALGEHGEW AKYSNFDVAT HVPLIFYVPG RTASLPEAGE
 KLFPYLD PFD
 SASQLMEPGR QSMDLVELVS LFPTLAGLAG LQVPPRC PVP SFHVELCREG
 KNLLKHFRFR
 DLEEDPYLPG NPRELIAYSQ YPRPSDIPQW NSDKPSLKDI KIMGYSIRTI
 DYRYTVWVGF
 NPDEFLANFS DIHAGELYFV DSDPLQDHNM YNDSQGGDLF QLLMP
 (59-а амінокислота "G*" SEQ ID NO: 2 позначає форміл-
 гліцин) .

1-6: Посилання

- 5 [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.
- 10 [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*
- 15 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.
- 20 [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.
- 25 [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.
- 30 [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.
- 35 [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.
- 40 [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.

5 [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.

10 [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.

15 [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

[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.

25 [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.

30

[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.

35 [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 ВИНАХОДУ

40 1. Спосіб лікування синдрому Хантера, який включає стадію введення інтрацеребровентрикулярно (ІЦВ введення) суб'єкту, який потребує лікування, терапевтично ефективною дози ІЦВ складу, який містить білок ідурсульфазу-бета (ІДС-β) у концентрації від 0,1 до 60 мг/мл, хлорид натрію у концентрації 150 мМ, полісорбат 20 у концентрації 0,05 мг/мл, фосфат у концентрації до 5 мМ і має рН 6, де зазначене ІЦВ введення здійснюють через

45 інтравентрикулярну катетерну систему, яка містить резервуар і катетер, з'єднаний із зазначеним резервуаром.

2. Спосіб за п. 1, в якому зазначений ІЦВ склад містить білок ідурсульфазу-бета (ІДС-β) у концентрації 15 мг/мл, хлорид натрію у концентрації 150 мМ, полісорбат 20 у концентрації 0,05 мг/мл і має рН 6.

50 3. Спосіб за п. 1, в якому зазначена терапевтично ефективна доза становить від 1 до 30 мг.

4. Спосіб за п. 1, в якому зазначена терапевтично ефективна доза становить 10 мг.

5. Спосіб за п. 1, в якому зазначене ІЦВ введення проводять один раз на три тижні.

6. Спосіб за п. 1, в якому зазначене ІЦВ введення проводять один раз на місяць.

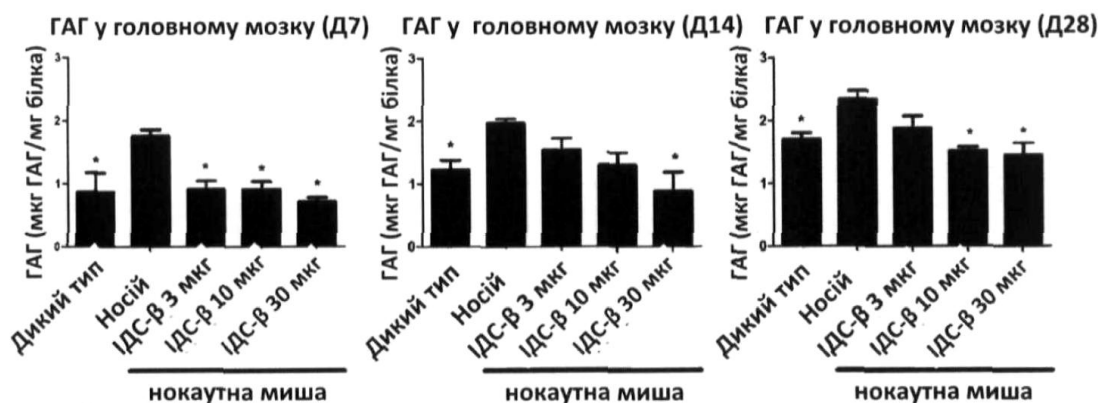
7. Спосіб за п. 1, який додатково включає стадії хірургічної імплантації зазначеної

55 інтравентрикулярної катетерної системи, при цьому зазначений резервуар поміщають між покривними тканинами черепа і мозком суб'єкта, який потребує лікування, і кінець зазначеного катетера поміщають усередині шлуночка зазначеного суб'єкта так, що внутрішній простір зазначеного резервуара з'єднаний із внутрішнім простором зазначеного шлуночка через внутрішній простір зазначеного катетера так, що спинномозкова рідина тече із зазначеного шлуночка в зазначений резервуар для заповнення зазначеного резервуара; вилучення 0,1-5 мл

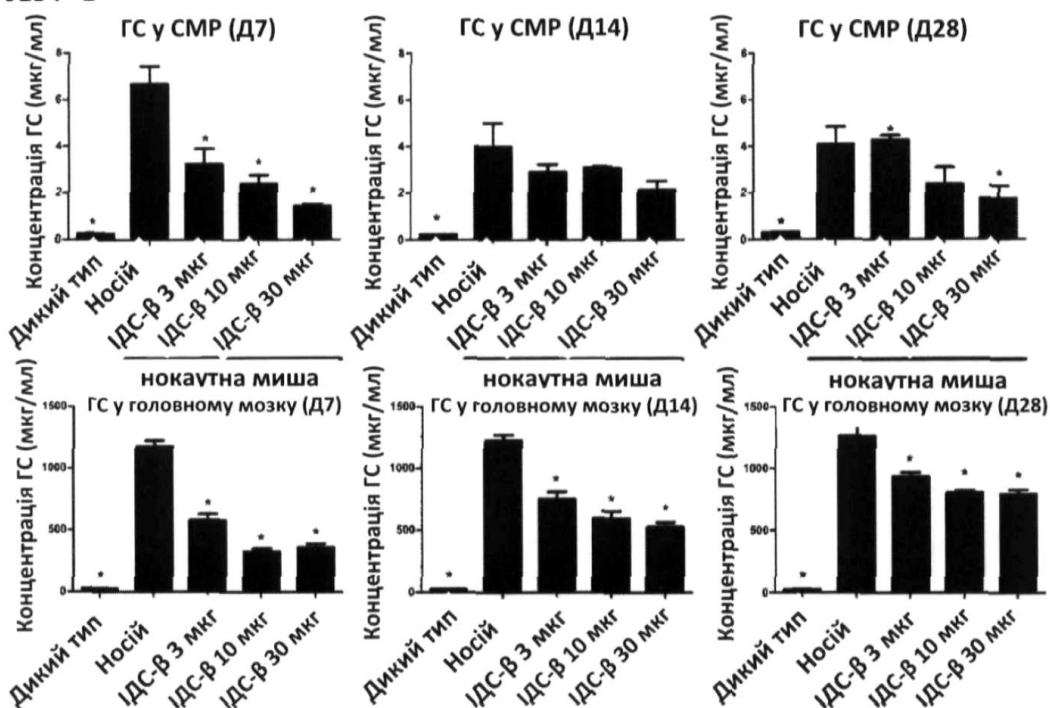
60

спинномозкової рідини із зазначеного резервуара зі швидкістю потоку 0,1-60 мл/хв; введення 0,1-5 мл зазначеного ІЦВ складу в зазначений резервуар зі швидкістю потоку 0,1-60 мл/хв; і забезпечення протікання зазначеного ІЦВ складу із зазначеного резервуара через зазначений катетер у зазначений шлуночок.

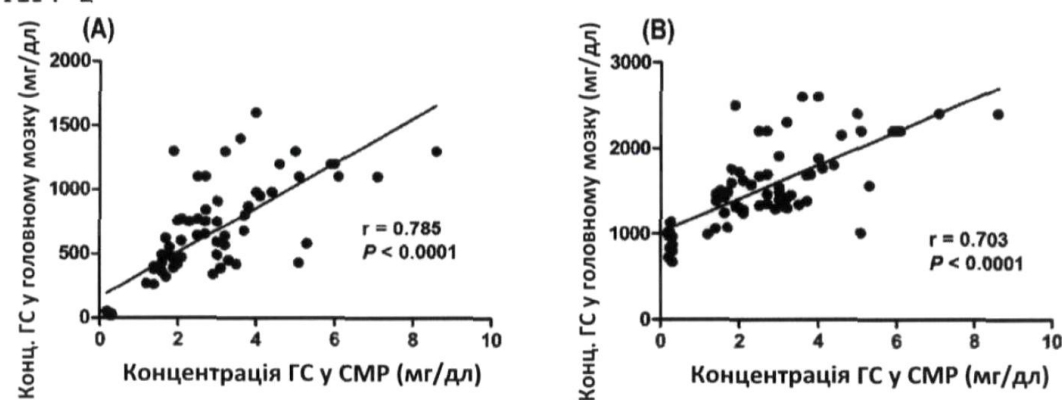
- 5 8. Спосіб за п. 1, в якому зазначене ІЦВ введення проводять у комбінації щонайменше з однією додатковою формою лікування ферментною замісною терапією від синдрому Хантера.
9. Спосіб за п. 8, в якому зазначену додаткову форму лікування ферментною замісною терапією від синдрому Хантера вибирають із групи, що складається із внутрішньовенного введення і підшкірного введення.
- 10 10. Спосіб за п. 9, в якому зазначене ІЦВ введення проводять один раз на місяць, і зазначене внутрішньовенне введення проводять один раз на тиждень.
11. Спосіб за п. 9, в якому зазначене ІЦВ введення проводять один раз на три тижні, і зазначене внутрішньовенне введення проводять один раз на тиждень.
12. Спосіб за п. 9, в якому зазначене ІЦВ введення проводять один раз на місяць, і зазначене підшкірне введення проводять один раз на тиждень.
- 15 13. Спосіб за п. 9, в якому зазначене ІЦВ введення проводять один раз на три тижні, і зазначене підшкірне введення проводять один раз на тиждень.
14. Спосіб за п. 9, в якому зазначене ІЦВ введення проводять один раз на місяць, і зазначене підшкірне введення проводять двічі на тиждень.
- 20 15. Спосіб за п. 9, в якому зазначене ІЦВ введення проводять один раз на три тижні, а зазначене підшкірне введення проводять двічі на тиждень.
16. Спосіб за п. 9, в якому зазначене ІЦВ введення проводять один раз на місяць, і зазначене внутрішньовенне введення і зазначене підшкірне введення проводять по черзі з інтервалом в один тиждень.
- 25 17. Спосіб за п. 9, в якому зазначене ІЦВ введення проводять один раз на три тижні, і зазначене внутрішньовенне введення і зазначене підшкірне введення проводять по черзі з інтервалом в один тиждень.
18. Склад для інтрацеребровентрикулярного введення для лікування синдрому Хантера, який містить білок ідурсульфазу-бета (ІДС-β) у концентрації від 0,1 до 60 мг/мл, хлорид натрію у концентрації 150 мМ, полісорбат 20 у концентрації 0,05 мг/мл і має рН 6, де зазначене ІЦВ введення здійснюють через інтравентрикулярну катетерну систему, яка містить резервуар і катетер, з'єднаний із зазначеним резервуаром.
- 30



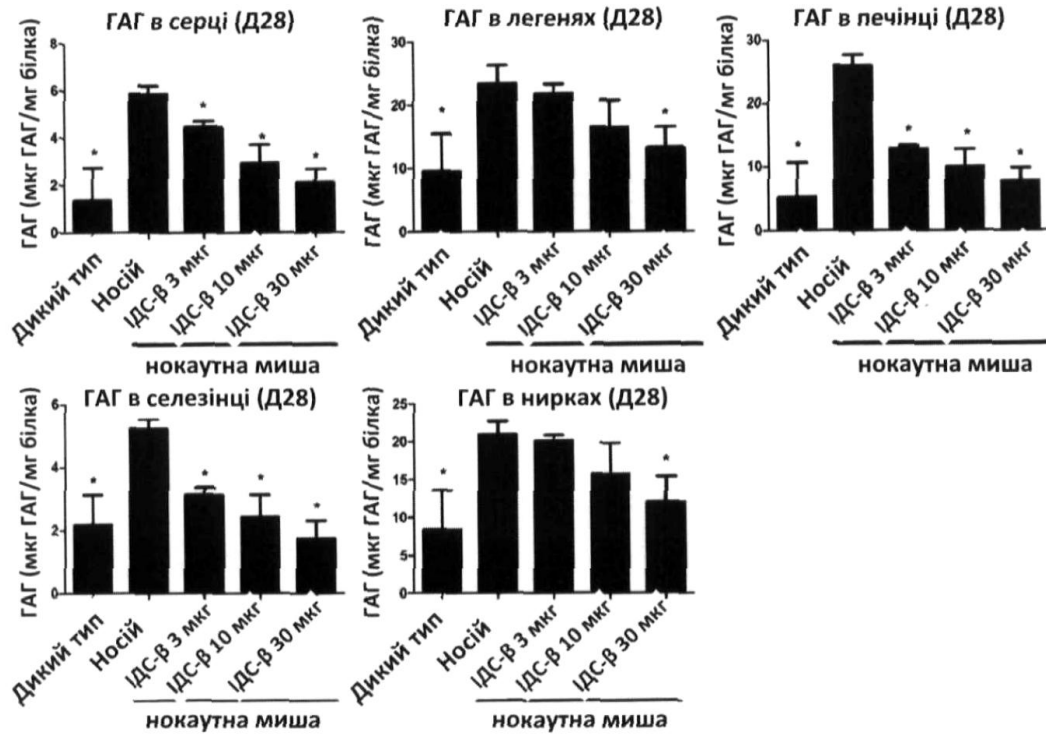
ФІГ. 1



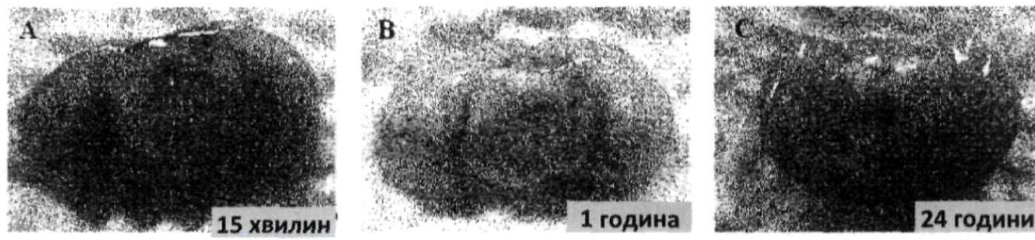
ФІГ. 2



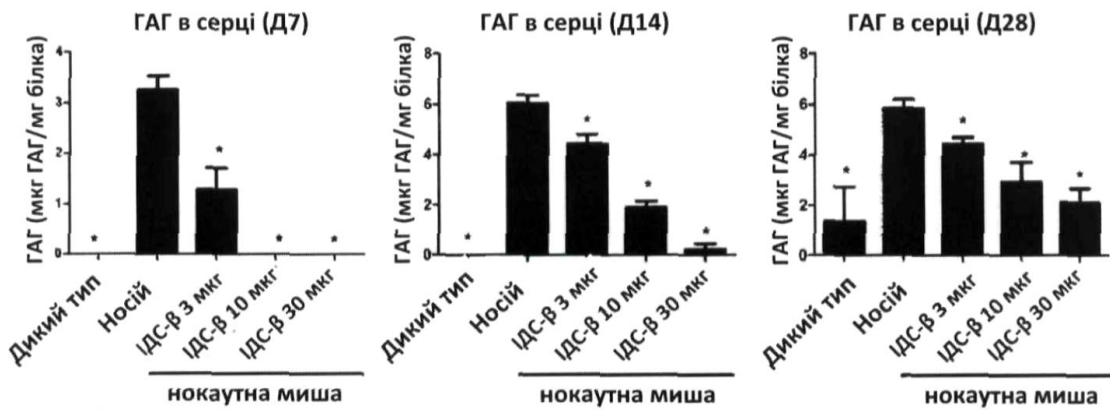
ФІГ. 3



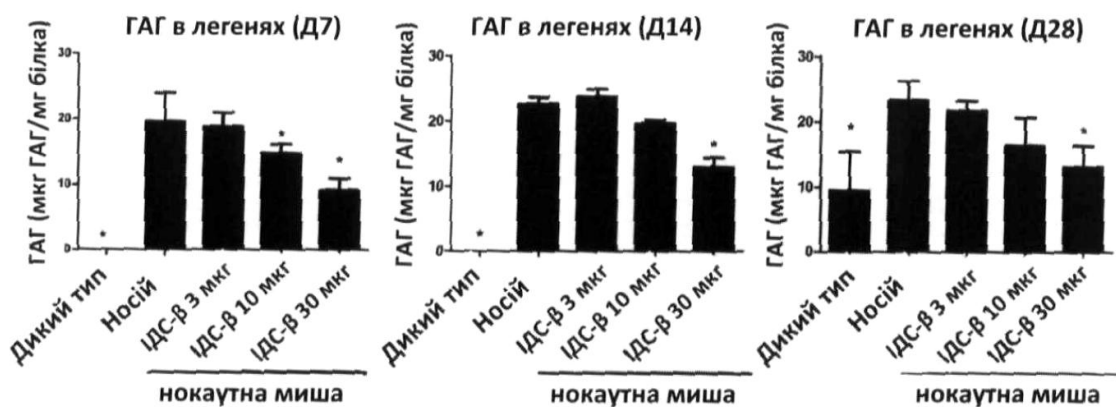
ФІГ. 4



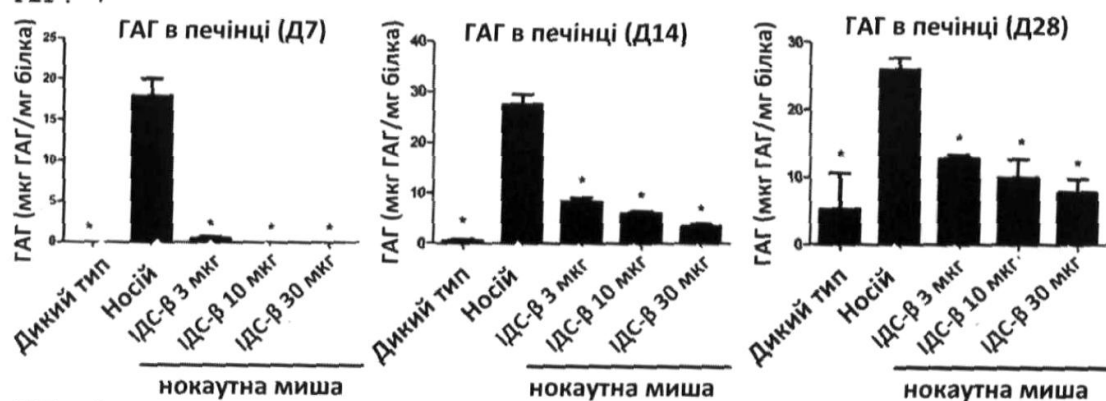
ФІГ. 5



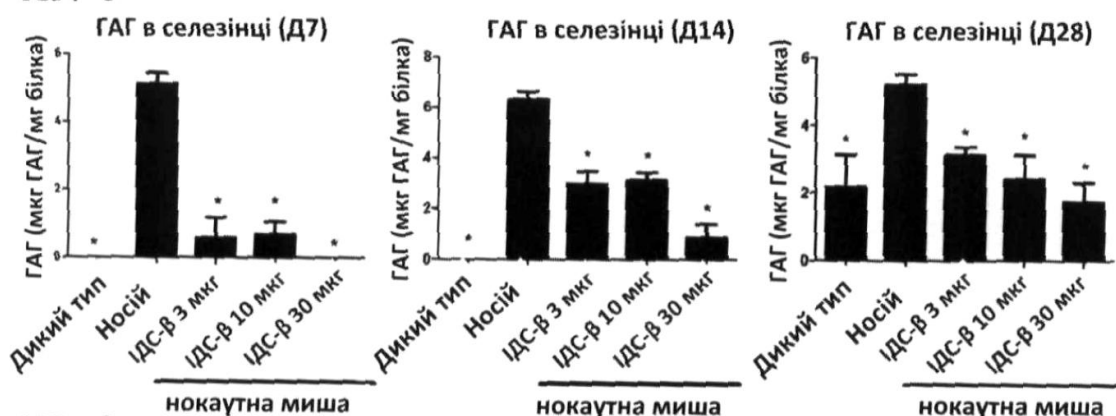
ФІГ. 6



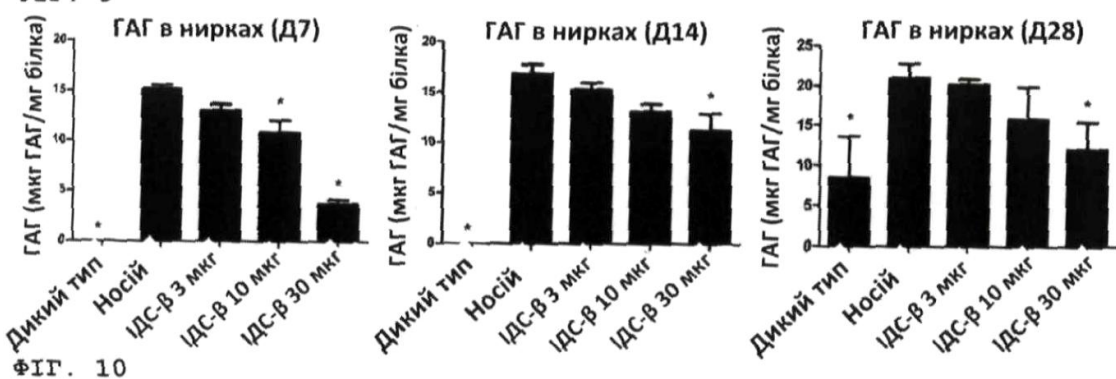
ФІГ. 7



ФІГ. 8



ФІГ. 9



ФІГ. 10