



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0050458

(51)⁸ A61K 38/43; A61K 9/00

(13) B

(21) 1-2018-02920

(22) 21/12/2016

(86) PCT/KR2016/015060 21/12/2016

(87) WO2017/116066 06/07/2017

(30) 62/272,843 30/12/2015 US; 62/369,970 02/08/2016 US

(45) 25/08/2025 449

(43) 25/10/2018 367A

(73) 1. GREEN CROSS CORPORATION (KR)

(Bojeong-dong) 107, Ihyeon-ro 30beon-gil, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do
16924, Republic of Korea

2. MEDIGENEBIO CORPORATION (KR)

(Bojeong-dong) 107, Ihyeon-ro 30beon-gil, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do
16924, Republic of Korea

(72) OKUYAMA, Torayuki (JP); JIN, Thong-Gyu (KR); BYUN, Han-Yeul (KR); SEO,
Jin-Wook (KR); LEE, Byoung-Ju (KR); KIM, Yong-Chul (KR); JANG, In-Young
(KR); LEE, Kyuhyun (KR).

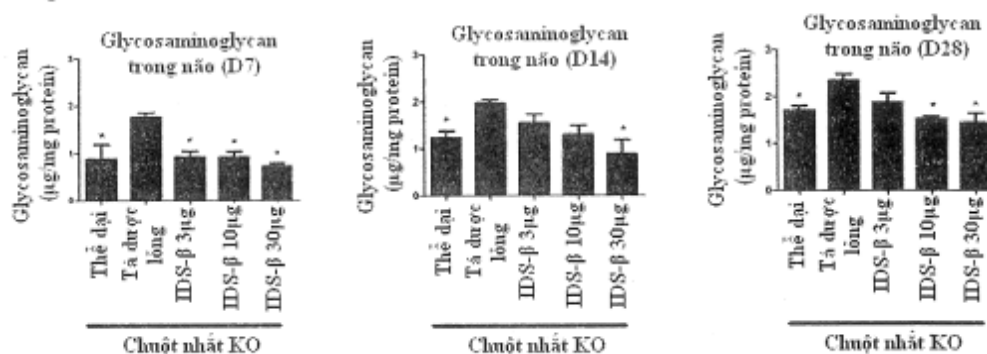
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHẾ PHẨM ĐIỀU TRỊ HỘI CHỨNG HUNTER

(21) 1-2018-02920

(57) Sáng chế đề xuất chế phẩm chứa protein idursulfaza- β , tức là protein iduronat-2-sulfataza tái tổ hợp của người, để điều trị hữu hiệu hội chứng hunter bằng cách phân phối trực tiếp vào hệ thần kinh trung ương. Chế phẩm theo sáng chế làm giảm hữu hiệu các triệu chứng ở cả não, tủy sống, và các mô ngoại vi bao gồm mô tim, mô gan, mô lá lách, mô phổi, và mô thận.

Fig.1



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm điều trị hội chứng hunter.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit týp II (hội chứng hunter) là rối loạn di truyền tích tụ mucopolysacarit trong lysosom liên quan đến tính trạng lặn của nhiễm sắc thể X gây ra bởi tình trạng thiếu hụt iduronat-2-sulfataza, là enzym có hoạt tính chuyển hóa mucopolysacarit [1]. Tình trạng thiếu hụt iduronat-2-sulfataza dẫn đến tích tụ glycosaminoglycan không chuyển hóa trong tế bào và dẫn đến tổn thương tiến triển nhiều cơ quan [2]. Trong số các glycosaminoglycan khác nhau, dermatan sulfat và heparan sulfat là các glycosaminoglycan tích tụ chủ yếu trong bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit týp II [2].

Biểu hiện lâm sàng của bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit týp II được phân loại thành thể nặng và thể nhẹ. Các đối tượng bị thể nhẹ biểu hiện các triệu chứng tổn thương cơ quan soma, bao gồm mắt to, gan lách to, loạn dưỡng mỡ sụn, cứng khớp và không có rối loạn thần kinh, trong khi đó các đối tượng bị thể nặng biểu hiện các triệu chứng suy giảm thần kinh và thoái hóa thần kinh tiến triển ngoài các triệu chứng trên các cơ quan soma. Nồng độ không đủ của iduronat-2-sulfataza nội sinh gây tích tụ bệnh lý heparan sulfat và dermatan sulfat trong, ví dụ tim, gan, hệ thần kinh trung ương, v.v. Các triệu chứng bao gồm thoái hóa thần kinh và chậm phát triển tâm thần xuất hiện trong thời thơ ấu; và tử vong sớm có thể xuất hiện do tổn thương cơ quan trong não.

Liệu pháp thay thế enzym bao gồm bước cho đối tượng sử dụng theo đường toàn thân protein và/hoặc enzym tự nhiên hoặc tái tổ hợp. Các protein được chấp thuận thường được tiêm tĩnh mạch cho đối tượng và thường hữu hiệu trong điều trị các triệu chứng trên các cơ quan soma của tình trạng thiếu hụt enzym nội sinh.

Do protein và/hoặc enzym được tiêm tĩnh mạch phân bố hạn chế vào tế bào và mô của hệ thần kinh trung ương, nên phương pháp điều trị các bệnh có rối loạn hệ thần kinh trung ương đã gặp nhiều trở ngại do các protein và/hoặc enzym được tiêm tĩnh mạch hoàn toàn không qua được hàng rào máu não.

Hàng rào máu não là hệ cấu trúc chứa tế bào nội mô có chức năng bảo vệ hệ thần

kinh trung ương khỏi các chất có hại trong dòng máu, như vi khuẩn, phân tử kích cỡ lớn (ví dụ protein) và các phân tử thân nước khác, bằng cách hạn chế khuếch tán các chất này qua hàng rào máu não và vào dịch não tủy và hệ thần kinh trung ương.

Nhiều người đã tin rằng hàng rào máu não để khuếch tán ở bề mặt não, cũng như không có các phương pháp phân phối thuốc hữu hiệu và thích hợp, là trở ngại rất lớn để đạt được hiệu quả điều trị mong muốn cho bệnh lý bất kỳ về não.

Hội chứng hunter ảnh hưởng đến hệ thần kinh và do đó thể hiện các thách thức rất lớn trong điều trị các bệnh này bằng các liệu pháp truyền thống. Glycosaminoglycan thường tích tụ rất nhiều trong neuron và màng não của các đối tượng bị bệnh, dẫn đến các thể khác nhau của các triệu chứng trên hệ thần kinh trung ương.

Do đó, vẫn cần có hệ thống để phân phối hữu hiệu các dược chất vào não. Cụ thể hơn, vẫn cần có phương pháp hữu hiệu hơn để phân phối hoạt chất vào hệ thần kinh trung ương để điều trị rối loạn tích tụ mucopolysacarit trong lysosom, như hội chứng hunter.

Để vượt qua được hàng rào máu não, bước tiêm vào dịch não tủy hoặc nội tủy mạc enzym tái tổ hợp đã kiểm chứng có thể dẫn đến một số tủy của mô hình động vật bị bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit [3-7]. Hơn nữa, thử nghiệm lâm sàng pha I/II ghi nhận rằng bước tiêm idursulfaza vào nội tủy mạc đã làm giảm nồng độ glycosaminoglycan trong dịch não tủy khoảng 80-90% ở trẻ em bị thể nặng của bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit tủy II. Tuy nhiên, rất nhiều tác dụng không mong muốn đã được ghi nhận trên thử nghiệm lâm sàng, hầu hết các tác dụng không mong muốn liên quan đến sự cố của hệ thống phân phối dược chất vào nội tủy mạc [8].

Mặc dù cơ chế tế bào của thoái hóa thần kinh trong thể nặng của bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit tủy II hoàn toàn chưa được biết rõ, một số nghiên cứu gần đây đã kiểm chứng được rằng mối tương quan giữa disacarit heparan sulfat và chậm phát triển tâm thần trên nhiều đối tượng bị bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit [9, 10]. Ngoài ra, các nghiên cứu trên động vật đã kiểm chứng thấy rằng heparan sulfat có thể dẫn đến rối loạn thần kinh trên mô hình chuột nhất bị bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit tủy III bằng cách hoạt hóa bám dính tập trung trên cơ sở nguyên vẹn trong tế bào hình sao hoặc tế bào gốc thần kinh [11, 12]. Bài báo Akiyama et al. [13] ghi nhận rằng “glycosaminoglycan bệnh lý” được đo bằng thử nghiệm Sensi-Pro Non-Reducing End HS [14] có độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn hơn nồng độ

glycosaminoglycan tổng số trong mô não của chuột nhắt bị bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit tít II [13]. Căn cứ trên các dữ liệu này, nồng độ heparan sulfat tích tụ có thể là chỉ thị sinh học để chẩn đoán bệnh lý về não và chức năng thần kinh của bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit tít II có độ nhạy cao hơn nồng độ glycosaminoglycan tổng số. Tuy nhiên, không thể đo được nồng độ heparan sulfat trong mô não trên lâm sàng. Do đó, chỉ thị sinh học lâm sàng hữu ích biểu thị heparan sulfat trong mô não cần được phát hiện. Các tác giả sáng chế giả định rằng nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy có thể là một trong số các chỉ thị sinh học lâm sàng nếu tương quan với nồng độ glycosaminoglycan trong mô não, đặc biệt là heparan sulfat.

Protein idursulfaza- β được tiêm liều đơn vào dịch não tủy theo sáng chế được dung nạp tốt, và làm giảm đáng kể nồng độ heparan sulfat và glycosaminoglycan trong não và các mô soma khác. Các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng mối tương quan có ý nghĩa thống kê tỷ lệ thuận của nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy giữa nồng độ heparan sulfat trong não và nồng độ glycosaminoglycan trong não gợi ý rằng nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy có thể là chỉ thị sinh học hữu ích để chẩn đoán bệnh lý về não ở các đối tượng bị bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit bị rối loạn hệ thần kinh trung ương.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm hữu hiệu để phân phối trực tiếp được chất vào hệ thần kinh trung ương. Các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng protein idursulfaza- β (protein iduronat-2-sulfataza tái tổ hợp của người) được phát triển làm enzym thay thế hữu hiệu để điều trị hội chứng hunter, có thể được đưa trực tiếp vào não thất của đối tượng thông qua bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy, sao cho enzym khuếch tán mạnh và hữu hiệu qua các bề mặt khác nhau và thâm vào các vùng khác nhau qua não, bao gồm vùng não sâu. Các tác giả sáng chế đã kiểm chứng thấy rằng được chất protein có thể được phân phối bằng cách sử dụng chế phẩm đơn giản chứa nước muối và không gây ra các tác dụng không mong muốn quá mức, như đáp ứng miễn dịch quá mức, ở đối tượng. Do đó, sáng chế đề xuất chế phẩm có hiệu lực lâm sàng cao, an toàn cho đối tượng bị bệnh, để phân phối trực tiếp vào hệ thần kinh trung ương và điều trị hội chứng hunter.

Để điều trị hội chứng hunter, vẫn cần có hệ thống để phân phối hữu hiệu các được chất vào não. Phương pháp tiêm vào nội tủy mạc, hoặc phương pháp tiêm được chất

protein vào dịch não tủy, gần đây đã được nỗ lực để điều trị các đối tượng bị hội chứng hunter nhưng nhiều tác dụng không mong muốn đã được ghi nhận trong thử nghiệm lâm sàng [8]. Mặc dù hầu hết các tác dụng không mong muốn liên quan đến sự cố của hệ thống phân phối được chất vào nội tủy mạc, nhưng vẫn cần các phương pháp khác, như phương pháp sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy để điều trị các đối tượng bị hội chứng hunter. Phương pháp sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy sẽ là phương pháp hữu hiệu để phân phối trực tiếp được chất vào não thất của đối tượng bị bệnh, hiện không có chế phẩm được cấp phép và/hoặc chế phẩm đang được phát triển để điều trị hội chứng hunter bằng bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy.

Sáng chế mô tả các phương án sau:

1. Phương pháp điều trị hội chứng hunter, bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy liều hữu hiệu của chế phẩm chứa protein idursulfaza- β ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1mg/mL đến 60mg/mL, natri clorua ở nồng độ khoảng 150mM, polysorbat 20 ở nồng độ khoảng 0,05mg/mL, và có độ pH khoảng 6.
2. Phương pháp theo phương án 1, trong đó chế phẩm này chứa protein idursulfaza- β ở nồng độ khoảng 15mg/mL, natri clorua ở nồng độ khoảng 150mM, polysorbat 20 ở nồng độ khoảng 0,05mg/mL, và có độ pH khoảng 6.
3. Phương pháp theo phương án 1, trong đó liều hữu hiệu của chế phẩm này nằm trong khoảng từ 1mg đến 30mg.
4. Phương pháp theo phương án 1, trong đó liều hữu hiệu của chế phẩm này khoảng 10mg.
5. Phương pháp theo phương án 1, trong đó bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện ba tuần một lần.
6. Phương pháp theo phương án 1, trong đó bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện mỗi tháng một lần.
7. Phương pháp theo phương án 1, trong đó bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện bằng hệ thống ống thông não thất bao gồm khoang chứa và ống thông được nối với khoang chứa này.
8. Phương pháp theo phương án 7, trong đó phương pháp này còn bao gồm các

bước:

phẫu thuật cấy ghép hệ thống ống thông não thất, trong đó khoang chứa của hệ thống này được đặt ở giữa da đầu và não của đối tượng cần điều trị và một đầu của ống thông được đặt vào bên trong não thất của đối tượng sao cho khoảng không bên trong của khoang chứa được nối với khoảng không bên trong của não thất nhờ khoảng không bên trong của ống thông để dịch não tủy chảy từ não thất vào khoang chứa và nạp đầy khoang chứa này;

hút dịch não tủy ở thể tích nằm trong khoảng từ 0,1 đến 5mL ra khỏi khoang chứa của hệ thống ống thông não thất ở tốc độ dòng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 60mL/phút;

tiêm chế phẩm điều trị hội chứng hunter nêu trên ở thể tích nằm trong khoảng từ 0,1 đến 5mL vào khoang chứa của hệ thống ống thông não thất ở tốc độ dòng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 60mL/phút; và

cho chế phẩm điều trị hội chứng hunter nêu trên chảy từ khoang chứa của hệ thống ống thông não thất vào não thất nhờ ống thông.

9. Phương pháp theo phương án 1, trong đó bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện kết hợp với ít nhất một biến thể bổ sung của liệu pháp thay thế enzym để điều trị hội chứng hunter.

10. Phương pháp theo phương án 9, trong đó biến thể bổ sung của liệu pháp thay thế enzym để điều trị hội chứng hunter được chọn từ nhóm bao gồm liệu pháp thay thế enzym sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch và liệu pháp thay thế enzym sử dụng qua đường tiêm dưới da.

11. Phương pháp theo phương án 10, trong đó bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện mỗi tháng một lần và liệu pháp thay thế enzym sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch được thực hiện mỗi tuần một lần.

12. Phương pháp theo phương án 10, trong đó bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện ba tuần một lần và liệu pháp thay thế enzym sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch được thực hiện mỗi tuần một lần.

13. Phương pháp theo phương án 10, trong đó bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện mỗi tháng một lần và liệu pháp thay thế enzym sử dụng qua đường tiêm dưới da được thực hiện mỗi tuần một lần.

14. Phương pháp theo phương án 10, trong đó bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện ba tuần một lần và liệu pháp thay thế enzym sử dụng qua đường tiêm dưới da được thực hiện mỗi tuần một lần.

15. Phương pháp theo phương án 10, trong đó bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện mỗi tháng một lần và liệu pháp thay thế enzym sử dụng qua đường tiêm dưới da được thực hiện mỗi tuần hai lần.

16. Phương pháp theo phương án 10, trong đó bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện ba tuần một lần và liệu pháp thay thế enzym sử dụng qua đường tiêm dưới da được thực hiện mỗi tuần hai lần.

17. Phương pháp theo phương án 10, trong đó bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện mỗi tháng một lần và liệu pháp thay thế enzym sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch và liệu pháp thay thế enzym sử dụng qua đường tiêm dưới da được thực hiện xen kẽ trong khoảng thời gian một tuần.

18. Phương pháp theo phương án 10, trong đó bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện ba tuần một lần và liệu pháp thay thế enzym sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch và liệu pháp thay thế enzym sử dụng qua đường tiêm dưới da được thực hiện xen kẽ trong khoảng thời gian một tuần.

19. Chế phẩm điều trị hội chứng hunter để sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy, chứa protein idursulfaza- β ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1mg/mL đến 60mg/mL, natri clorua ở nồng độ khoảng 150mM, polysorbat 20 ở nồng độ khoảng 0,05mg/mL, và có độ pH khoảng 6.

Protein idursulfaza- β được sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy theo sáng chế đã làm giảm nồng độ heparan sulfat và nồng độ glycosaminoglycan trong não và dịch não tủy ở chuột nhất bị bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit týp II.

Protein idursulfaza- β được sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy theo sáng chế đã làm giảm nồng độ heparan sulfat và nồng độ glycosaminoglycan trong các mô soma (ngoại vi) bao gồm tim, phổi, gan, lá lách và thận ở chuột nhất bị bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit týp II.

Theo sáng chế, đặc tính nồng độ glycosaminoglycan trong não có thể được dự đoán từ nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy, có thể cho phép chẩn đoán dễ dàng và

an toàn hơn mức độ nghiêm trọng của tình trạng tích tụ glycosaminoglycan trong não.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ thể hiện nồng độ glycosaminoglycan trong mô não của chuột nhất đột biến loại bỏ gen ids (chuột nhất KO) sau khi tiêm liều đơn của protein idursulfaza- β vào dịch não tủy.

Fig.2 là biểu đồ thể hiện nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy và mô não của chuột nhất đột biến loại bỏ gen ids (chuột nhất KO) sau khi tiêm liều đơn của protein idursulfaza- β vào dịch não tủy.

Fig.3 là đồ thị thể hiện mối tương quan giữa nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy và nồng độ heparan sulfat trong mô não của chuột nhất đột biến loại bỏ gen ids (chuột nhất KO) sau khi tiêm liều đơn của protein idursulfaza- β vào dịch não tủy.

Fig.4 là biểu đồ thể hiện nồng độ glycosaminoglycan trong các mô soma của chuột nhất đột biến loại bỏ gen ids (chuột nhất KO) sau khi tiêm liều đơn của protein idursulfaza- β vào dịch não tủy.

Fig.5 là hình ảnh thể hiện các mô não được thu nhận ở các thời điểm khác nhau sau khi tiêm và hiện màu bằng xanh trypan.

Fig.6 là biểu đồ thể hiện nồng độ glycosaminoglycan trong mô tim của chuột nhất đột biến loại bỏ gen ids (chuột nhất KO) sau khi tiêm liều đơn của protein idursulfaza- β vào dịch não tủy.

Fig.7 là biểu đồ thể hiện nồng độ glycosaminoglycan trong mô phổi của chuột nhất đột biến loại bỏ gen ids (chuột nhất KO) sau khi tiêm liều đơn của protein idursulfaza- β vào dịch não tủy.

Fig.8 là biểu đồ thể hiện nồng độ glycosaminoglycan trong mô gan của chuột nhất đột biến loại bỏ gen ids (chuột nhất KO) sau khi tiêm liều đơn của protein idursulfaza- β vào dịch não tủy.

Fig.9 là biểu đồ thể hiện nồng độ glycosaminoglycan trong mô lá lách của chuột nhất đột biến loại bỏ gen ids (chuột nhất KO) sau khi tiêm liều đơn của protein idursulfaza- β vào dịch não tủy.

Fig.10 là biểu đồ thể hiện nồng độ glycosaminoglycan trong mô thận của chuột

nhất đột biến loại bỏ gen ids (chuột nhất KO) sau khi tiêm liều đơn của protein idursulfaza- β vào dịch não tủy.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được mô tả chi tiết dưới đây, các tác giả sáng chế đã phát triển thành công chế phẩm ổn định chứa protein idursulfaza- β để sử dụng hữu hiệu qua đường tiêm vào dịch não tủy.

Theo các phương án khác nhau, sáng chế đề xuất chế phẩm ổn định để sử dụng trực tiếp qua đường tiêm vào dịch não tủy chứa protein idursulfaza- β , muối, và chất hoạt động bề mặt polysorbat. Theo một số phương án, chế phẩm ổn định này chứa protein idursulfaza- β ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 60mg/mL (ví dụ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 60mg/mL, nằm trong khoảng từ 0,1 đến 30mg/mL, nằm trong khoảng từ 0,3 đến 30mg/mL, nằm trong khoảng từ 0,2 đến 20mg/mL, nằm trong khoảng từ 0,2 đến 6mg/mL, nằm trong khoảng từ 0,6 đến 6mg/mL, nằm trong khoảng từ 5,0 đến 60mg/mL, hoặc nằm trong khoảng từ 10 đến 60mg/mL). Theo một số phương án, chế phẩm ổn định này chứa protein idursulfaza- β ở nồng độ hoặc nồng độ tối đa được chọn từ 0,1mg/mL, 0,2mg/mL, 0,5mg/mL, 0,6mg/mL, 1mg/mL, 2mg/mL, 5mg/mL, 6mg/mL, 10mg/mL, 15mg/mL, 20mg/mL, 30mg/mL, 40mg/mL, 50mg/mL, 55mg/mL, hoặc 60mg/mL.

Theo các phương án khác nhau, sáng chế đề xuất chế phẩm ổn định theo phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả. Theo một số phương án, protein idursulfaza- β chứa protein có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1. Theo một số phương án, protein idursulfaza- β còn chứa protein có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. SEQ ID NO.1 là protein iduronat-2-sulfataza tái tổ hợp của người. SEQ ID NO.2 là protein iduronat-2-sulfataza tái tổ hợp của người có xytesin ở vị trí số 59 được thay bằng formyl-glycin (G*).

Theo một số phương án, idursulfaza- β chứa khoảng 35% mol hoặc nhỏ hơn protein có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và khoảng 65% mol hoặc cao hơn protein có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Theo một số phương án, protein idursulfaza- β chứa khoảng 20% đến 35% mol protein có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và khoảng 65% đến 80% mol protein có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2.

Theo một số phương án, protein idursulfaza- β chứa protein có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với SEQ ID NO.1. Theo một số phương án, protein idursulfaza- β chứa protein có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98% so với SEQ ID NO.2.

Theo một số phương án, chế phẩm ổn định theo sáng chế chứa muối. Theo một số phương án, muối này là natri clorua (NaCl). Theo một số phương án, chế phẩm này chứa NaCl ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến 300mM (ví dụ nằm trong khoảng từ 0 đến 250mM, nằm trong khoảng từ 0 đến 200mM, nằm trong khoảng từ 0 đến 150mM, nằm trong khoảng từ 50 đến 250mM, hoặc nằm trong khoảng từ 100 đến 200mM). Theo một số phương án, chế phẩm này chứa NaCl ở nồng độ nằm trong khoảng từ 125 đến 175mM. Theo một số phương án, chế phẩm này chứa NaCl ở nồng độ khoảng 150mM.

Theo các phương án khác nhau, sáng chế đề xuất chế phẩm ổn định theo phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả, trong đó chế phẩm này còn chứa chất hoạt động bề mặt polysorbat được chọn từ nhóm bao gồm polysorbat 20, polysorb 40, polysorbat 60, polysorbat 80 và tổ hợp của chúng. Theo một số phương án, chất hoạt động bề mặt polysorbat là polysorbat 20 (Tween 20). Theo một số phương án, chế phẩm này chứa polysorbat 20 ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0% đến 0,02% (nằm trong khoảng từ 0 đến 0,2mg/mL). Theo một số phương án, chế phẩm này chứa polysorbat 20 ở nồng độ khoảng 0,005% (0,05mg/mL).

Theo các phương án khác nhau, sáng chế đề xuất chế phẩm ổn định theo phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả, trong đó chế phẩm này còn chứa tá dược đệm. Theo một số phương án, tá dược đệm được chọn từ nhóm bao gồm phosphat, axetat, histidin, succinat, Tris, và tổ hợp của chúng. Theo một số phương án, tá dược đệm is phosphat. Theo một số phương án, chế phẩm này chứa phosphat ở nồng độ không lớn hơn 50mM (ví dụ không lớn hơn 45mM, 40mM, 35mM, 30mM, 25mM, 20mM, 15mM, 10mM, 5mM, 0,25mM, hoặc 0,12mM). Theo một số phương án, chế phẩm này chứa phosphat ở nồng độ không lớn hơn 20mM. Theo các khía cạnh khác nhau, sáng chế đề xuất chế phẩm ổn định theo phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả, trong đó chế phẩm này có độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 8,0 (ví dụ nằm trong khoảng từ 4 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 5,0 đến 8,0, nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,5, nằm trong

khoảng từ 5,0 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 8,0, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,7, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,5, hoặc nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0). Theo một số phương án, chế phẩm này có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5 (ví dụ 5,5, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, hoặc 6,5). Theo một số phương án, chế phẩm này có độ pH khoảng 6,0.

Theo các phương án khác nhau, sáng chế đề xuất chế phẩm ổn định theo phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả, trong đó chế phẩm này là chế phẩm dạng lỏng. Theo các phương án khác nhau, sáng chế đề xuất chế phẩm ổn định theo phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả, trong đó chế phẩm này được bào chế dưới dạng bột đông khô.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm ổn định để sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy chứa protein idursulfaza- β ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 60mg/mL, NaCl ở nồng độ khoảng 150mM, polysorbat 20 ở nồng độ khoảng 0,005% (0,05mg/mL), và có độ pH khoảng 6,0. Theo một số phương án, chế phẩm này chứa protein idursulfaza- β ở nồng độ khoảng 0,1mg/mL, 0,2mg/mL, 0,5mg/mL, 0,6mg/mL, 1mg/mL, 2mg/mL, 5mg/mL, 6mg/mL, 10mg/mL, 15mg/mL, 20mg/mL, 30mg/mL, 40mg/mL, 50mg/mL, 55mg/mL, hoặc 60mg/mL.

Theo các khía cạnh khác nhau, sáng chế đề xuất đồ chứa chứa dạng bào chế đơn liều của chế phẩm ổn định theo các phương án khác nhau được mô tả trong sáng chế. Theo một số phương án, đồ chứa này được chọn từ ống tiêm, lọ, chai, hộp, thùng chứa, bơm tiêm bảo quản lạnh, hoặc bơm tiêm nạp sẵn. Theo một số phương án, đồ chứa này là bơm tiêm nạp sẵn. Theo một số phương án, bơm tiêm nạp sẵn được chọn từ bơm tiêm làm bằng thủy tinh bosilicat được phủ silicon chịu nhiệt, bơm tiêm làm bằng thủy tinh bosilicat được phủ silicon phun sương, hoặc bơm tiêm làm bằng nhựa dẻo không chứa silicon. Theo một số phương án, chế phẩm ổn định có mặt ở thể tích nhỏ hơn khoảng 50mL (ví dụ nhỏ hơn khoảng 45mL, 40mL, 35mL, 30mL, 25mL, 20mL, 15mL, 10mL, 5mL, 4mL, 3mL, 2,5mL, 2,0mL, 1,5mL, 1,0mL, hoặc 0,5mL). Theo một số phương án, đồ chứa theo sáng chế chứa chế phẩm ổn định này ở thể tích khoảng 6,0mL. Theo một số phương án, đồ chứa theo sáng chế chứa chế phẩm ổn định ở thể tích khoảng 3,0mL. Theo một số phương án, lọ dung tích 6,0mL chứa 2,0mL chế phẩm ổn định này. Theo một số phương án, lọ dung tích 5,0mL chứa 1,5mL chế phẩm ổn định này. Theo một số phương

án, lọ dung tích 3,0mL chứa 1,0mL chế phẩm ổn định này.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị hội chứng hunter, bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy chế phẩm theo phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị hội chứng hunter, bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy chế phẩm chứa protein idursulfaza- β ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 60mg/mL, NaCl ở nồng độ khoảng 150mM, polysorbat 20 ở nồng độ khoảng 0,005% (0,05mg/mL), và có độ pH khoảng 6.

Theo một số phương án, đối tượng cần điều trị được cấy ghép hệ thống ống thông não thất có khoang chứa và ống thông, như khoang chứa Ommaya, để sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy. Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện bằng cách tiêm chế phẩm điều trị hội chứng hunter nêu trên ở tốc độ dòng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 60mL/phút, vào khoang chứa của hệ thống ống thông não thất. Theo một số phương án, dịch não tủy của đối tượng được hút ở tốc độ dòng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 60mL/phút, khỏi khoang chứa trước khi tiêm chế phẩm này vào dịch não tủy, sao cho không làm tăng đáng kể thể tích dịch não tủy của đối tượng sau khi sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy, để ngăn ngừa tăng áp lực trong não. Theo một số phương án, chế phẩm này được tiêm vào khoang chứa được để chảy qua ống thông vào não thất của đối tượng bằng cách ấn và nhả từ từ khoang chứa.

Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy không gây ra các tác dụng không mong muốn quá mức (ví dụ đáp ứng miễn dịch quá mức) ở đối tượng. Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy không gây ra đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T quá mức ở đối tượng.

Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy chế phẩm này giúp phân phối protein idursulfaza- β vào các mô đích khác nhau trong não, tủy sống, và các cơ quan ngoại vi. Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy chế phẩm này giúp phân phối protein idursulfaza- β vào các mô đích ở não. Theo một số phương án, các mô đích ở não bao gồm chất trắng và/hoặc noron trong chất xám. Theo một số phương án, protein idursulfaza- β được phân phối vào noron, tế bào thần kinh đệm, tế bào quanh mạch và/hoặc tế bào màng não. Theo một số phương án, protein idursulfaza- β cũng được phân phối vào noron trong tủy sống.

Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy chế phẩm này cũng giúp phân phối toàn thân protein idursulfaza- β vào các mô đích ngoại vi. Theo một số phương án, các mô đích ngoại vi được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, mô tim, mô gan, mô lá lách, mô phổi, và/hoặc mô thận.

Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy chế phẩm này giúp phân bố lysosom tế bào trong mô đích ở não, tủy sống noron và/hoặc mô đích ngoại vi. Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy chế phẩm này làm giảm tích tụ glycosaminoglycan trong mô đích ở não, tủy sống noron và/hoặc mô đích ngoại vi. Theo một số phương án, tình trạng tích tụ glycosaminoglycan được giảm ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1 lần, 1,5 lần, hoặc 2 lần so với mẫu đối chứng âm (ví dụ tình trạng tích tụ glycosaminoglycan ở đối tượng trước khi điều trị hoặc sau khi tiêm tá dược lỏng). Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy chế phẩm này làm giảm tình trạng hình thành không bào trong noron (ví dụ by ít nhất 20%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90%, 1 lần, 1,5 lần, hoặc 2 lần so với mẫu đối chứng âm). Theo một số phương án, noron chứa tế bào purkinje.

Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy chế phẩm này làm tăng hoạt tính enzym protein idursulfaza- β trong mô đích ở não, tủy sống noron và/hoặc mô đích ngoại vi. Theo một số phương án, hoạt tính enzym protein idursulfaza- β được gia tăng ít nhất 1 lần, 2 lần, 3 lần, 4 lần, nằm trong khoảng từ 5 lần, nằm trong khoảng từ 6 lần, 7 lần, 8 lần, 9 lần hoặc 10 lần so với mẫu đối chứng âm (ví dụ hoạt tính enzym nội sinh ở đối tượng trước khi điều trị hoặc sau khi tiêm tá dược lỏng). Theo một số phương án, hoạt tính enzym protein idursulfaza- β được gia tăng ít nhất khoảng 10nmol/giờ/mg, 20nmol/giờ/mg, 40nmol/giờ/mg, 50nmol/giờ/mg, 60nmol/giờ/mg, 70nmol/giờ/mg, 80nmol/giờ/mg, 90nmol/giờ/mg, 100nmol/giờ/mg, 150nmol/giờ/mg, 200nmol/giờ/mg, 250nmol/giờ/mg, 300nmol/giờ/mg, 350nmol/giờ/mg, 400nmol/giờ/mg, 450nmol/giờ/mg, 500nmol/giờ/mg, 550nmol/giờ/mg hoặc 600nmol/giờ/mg.

Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy chế phẩm này làm giảm cường độ, mức độ nghiêm trọng hoặc tần suất hoặc tần xuất xuất hiện muộn của ít nhất một triệu chứng hoặc dấu hiệu của hội chứng hunter. Theo một số phương án, ít nhất một triệu chứng hoặc dấu hiệu của hội chứng hunter bao gồm suy giảm nhận thức; tổn thương chất trắng; giãn khoang quang mạch trong nhu mô não, hạch

não, thể chai, và/hoặc cuống phổi; chứng teo; và/hoặc giãn não thất.

Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện hai tuần một lần. Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện ba tuần một lần. Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện mỗi tháng một lần. Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện hai tháng một lần. Theo một số phương án, bước sử dụng này là liên tục, như thông qua bơm tiêm truyền liên tục. Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được sử dụng kết hợp với bước sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch. Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch được thực hiện mỗi tuần một lần. Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch được thực hiện hai tuần một lần. Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch được thực hiện mỗi tháng một lần. Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch được thực hiện hai tháng một lần.

Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch và bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện trong cùng ngày. Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch và bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy không được thực hiện trong vòng một khoảng thời gian nhất định trùng nhau, như không trong vòng ít nhất 2 ngày, trong vòng ít nhất 3 ngày, trong vòng ít nhất 4 ngày, trong vòng ít nhất 5 ngày, trong vòng ít nhất 6 ngày, trong vòng ít nhất 7 ngày, hoặc trong vòng ít nhất một tuần. Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch và bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện theo phác đồ xen kẽ, như sử dụng xen kẽ hàng tuần, cách tuần, hai lần mỗi tháng, hoặc hàng tháng. Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy thay thế bước sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch theo phác đồ quản lý, như theo phác đồ sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch hàng tuần, cách tuần, hai lần mỗi tháng, hoặc hàng tháng, ba lần một tháng hoặc bốn lần một tháng hoặc năm lần một tháng trong đó phác đồ này có thể được thay bằng bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy thay cho bước sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch.

Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch và bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện luân phiên, như bước sử dụng qua

đường tiêm tĩnh mạch được thực hiện trước tiên (ví dụ tiêm hàng tuần, cách tuần, ba tuần một lần, hai lần mỗi tháng, hoặc hàng tháng trong hai tuần, một tháng, hai tháng, ba tháng, bốn tháng, năm tháng, sáu tháng, một năm hoặc lâu hơn), tiếp theo thực hiện sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy (ví dụ tiêm hàng tuần, cách tuần, ba tuần một lần, hai lần mỗi tháng, hoặc hàng tháng trong hơn hai tuần, một tháng, hai tháng, ba tháng, bốn tháng, năm tháng, sáu tháng, một năm hoặc lâu hơn). Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện trước tiên (ví dụ hàng tuần, cách tuần, ba tuần một lần, hai lần mỗi tháng, hàng tháng, hai tháng một lần, ba tháng một lần dosing trong hai tuần, một tháng, hai tháng, ba tháng, bốn tháng, năm tháng, sáu tháng, một năm hoặc lâu hơn), tiếp theo thực hiện bước sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch (ví dụ tiêm hàng tuần, cách tuần, ba tuần một lần, hai lần mỗi tháng, hoặc hàng tháng trong hơn hai tuần, một tháng, hai tháng, ba tháng, bốn tháng, năm tháng, sáu tháng, một năm hoặc lâu hơn).

Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy không được sử dụng kết hợp với bước sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch.

Theo một số phương án, bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy không được sử dụng kết hợp với liệu pháp ức chế miễn dịch hiện hành.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ sau. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1

1-1: Tổng quan

Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá tác dụng dược học và mối tương quan đáp ứng liều của phương pháp tiêm vào dịch não tủy liều đơn của protein idursulfaza- β ở chuột nhất bị bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit tít II. Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã đo nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy và đánh giá mối tương quan giữa nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy và nồng độ heparan sulfat trong mô não và nồng độ glycosaminoglycan trong mô não của chuột nhất bị bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit tít II.

Protein idursulfaza- β (ba liều 3 μ g, 10 μ g, và 30 μ g) được tiêm vào dịch não tủy, và nồng độ glycosaminoglycan trong mô (não, tim, phổi, gan, lá lách, và thận) được đo sau khi tiêm 7, 14, và 28 ngày. Nồng độ heparan sulfat được đo bằng LC/MS-MS trong dịch não tủy và não của chuột nhắt. Nồng độ glycosaminoglycan tổng số trong não và các mô soma khác của toàn bộ các nhóm được điều trị bằng protein idursulfaza- β được giảm đáng kể. Mức độ giảm đáng kể này được duy trì trong 28 ngày ở nhóm được tiêm protein idursulfaza- β với liều 30 μ g. Các tác giả sáng chế cũng đã kiểm chứng được rằng nồng độ heparan sulfat đã giảm trong cả dịch não tủy và mô não của toàn bộ các nhóm được điều trị bằng protein idursulfaza- β . Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã kiểm chứng được rằng nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy tương quan có ý nghĩa thống kê với nồng độ heparan sulfat trong não và nồng độ glycosaminoglycan trong mô não.

Protein idursulfaza- β theo sáng chế được tiêm liều đơn vào dịch não tủy được dung nạp tốt, và làm giảm đáng kể nồng độ heparan sulfat và glycosaminoglycan trong não và các mô soma khác. Các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng mối tương quan có ý nghĩa thống kê tỷ lệ thuận của nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy giữa nồng độ heparan sulfat trong não và nồng độ glycosaminoglycan trong não gợi ý rằng nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy có thể là chỉ thị sinh học hữu ích để chẩn đoán bệnh lý về não ở đối tượng bị bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit tít II bị rối loạn hệ thần kinh trung ương.

1-2: Phương pháp

Động vật

Các chuột nhắt đột biến loại bỏ gen ids đã biết được sử dụng. Cụ thể, gen ids được loại bỏ khỏi đoạn exon 2 đến đoạn exon 3 [15]. Chuột nhắt KO được lai tạo từ loài gốc C57BL/6.129S và có đột biến lặn ở gen ids. Chuột nhắt đối chứng thể đại được lai tạo từ loài gốc C57BL/6.129S. Kiểu gen của toàn bộ các chuột nhắt được kiểm chứng bằng phản ứng chuỗi polymeaza ADN thu được từ mảnh đuôi. Nghiên cứu này được chấp thuận bởi Institutional Animal Care and Use Committee (Approval No. 20140925005) và thực hiện theo chính sách bảo vệ động vật do Samsung Biomedical Research Institute, Seoul, Korea ban hành.

Thiết kế nghiên cứu

Các chuột nhất 6 tuần tuổi được chia ngẫu nhiên thành 5 nhóm (12 chuột nhất mỗi nhóm). Các chuột nhất KO được chia thành 4 nhóm: Các chuột nhất KO được tiêm tá được lỏng và các chuột nhất KO được tiêm ba liều khác nhau (3 μ g, 10 μ g, và 30 μ g) của protein idursulfaza- β (Green Cross Corp., Yongin, Korea). Bốn chuột nhất mỗi nhóm được giết chết sau khi tiêm 7, 14, và 28 ngày. Nồng độ glycosaminoglycan của các mô khác nhau (não, tim, phổi, gan, lá lách, và thận) được phân tích, và nồng độ heparan sulfat từ dịch não tủy và não được đo sau khi tiêm 7, 14, và 28 ngày.

Chế phẩm chứa protein idursulfaza- β để tiêm vào dịch não tủy

Dung dịch tá được lỏng chứa 150mM natri clorua, 0,05mg/mL dung dịch Tween 20 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) được bào chế. Dung dịch đặc chứa protein idursulfaza- β (50mg/mL) được pha loãng bằng tá được lỏng để thu được các nồng độ 0,6mg/mL, 2mg/mL, và 6mg/mL.

Tiêm vào dịch não tủy

Phương pháp tiêm liều đơn vào dịch não tủy của các chuột nhất được thực hiện ở 6 tuần tuổi. Mỗi dung dịch được chất hoặc tá được lỏng được tiêm vào dịch não tủy của các chuột nhất ở thể tích tổng cộng bằng 5 μ L. Vào ngày tiêm, các chuột nhất được gây mê bằng chế phẩm xông hít chứa isofluran (Hana Pharm., Korea) và đặt vào thiết bị sinh thiết. Sau khi tạo vết rạch nhỏ, hộp sọ được bộc lộ và làm sạch. Phương pháp tiêm vào dịch não tủy được thực hiện theo phương pháp cải tiến đã biết [16, 17]. Protein idursulfaza- β hoặc tá được lỏng, được tiêm vào não thất bên phải bằng kim tiêm 31G ở tốc độ bằng 10mL/phút được kiểm soát bằng bơm tiêm (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) bằng cách sử dụng các thông số (Benchmark, Neurolab, St. Louis, MO): khoảng cách từ đuôi đến thóp đầu bằng 0,58mm, khoảng cách từ não thất bên đến đường khớp dọc bằng 1,25mm, và độ sâu bằng 1,77mm. Vị trí tiêm được theo dõi về các triệu chứng mạch bị vỡ hoặc sung mặt. Sau đó, kim tiêm được tháo ra sau khi ngừng chuyển động ống bơm tiêm 15 giây để ngăn ngừa hiện tượng chảy ngược. Vết rạch được đóng bằng kẹp vết thương và các chuột nhất được đặt vào bể ổn nhiệt ở nhiệt độ 37°C và theo dõi sau phẫu thuật cho đến khi phục hồi. Toàn bộ quy trình này được thực hiện trong 10 đến 15 phút cho một chuột nhất. Để kiểm chứng phương pháp tiêm vào dịch não tủy thành công, dung dịch chất màu được tiêm vào dịch não tủy. Não được thu nhận ở các thời điểm khác nhau sau khi tiêm và hiện màu. Phương pháp tiêm thích hợp vào một

trong số các não thất cho phép phân bố xanh trypan (0,05%) trên phía được tiêm của não khoảng 10~15 phút sau khi tiêm. Sự phân bố rộng của xanh trypan ở bán cầu não quan sát được khoảng 1 giờ sau khi tiêm. Phương pháp tiêm không chính xác có thể được phân biệt bởi sự thiếu hụt màu xanh ở bán cầu não (Fig.5).

Thu nhận dịch não tủy và mô

Sau khi tiêm 7, 14, và 28 ngày, các chuột nhắt được giết chết bằng cách tiêm lượng dư dung dịch Alfaxalone (Jurox/biệt dược: Alfaxan) (15mg/kg). Dịch não tủy được thu nhận từ bể lớn ở não bằng bơm tiêm làm bằng thủy tinh bosilicat (đường kính ngoài 10mm, đường kính trong: 0,75mm) và lạnh đông để đo nồng độ heparan sulfat. Máu trong mô não của các chuột nhắt được làm sạch bằng cách tiêm truyền qua tim bằng dung dịch đệm muối phosphat trong 1520 phút. Mô não được thu nhận và lạnh đông trên nước đá khô. Sau đó, các mẫu được đồng nhất và chia thành hai phần (một nửa để đo nồng độ glycosaminoglycan và một nửa để đo nồng độ heparan sulfat). Các mô soma khác (tim, phổi, gan, lá lách, và thận) cũng được thu nhận và đồng nhất trong dung dịch đệm muối phosphat.

Đo nồng độ glycosaminoglycan tổng số trong các mô

Các mẫu mô đã được đồng nhất được lắc qua đêm ở nhiệt độ 4°C và ly tâm trong 15 phút ở tốc độ bằng 12000 x g, sau đó các dịch nổi được thu nhận. Nồng độ glycosaminoglycan tổng số được bằng kit định lượng sGAG (Kamiya Biochemicals, Japan). Trước tiên, 50μL các mẫu đã được đồng nhất được ủ với guanidín-HCl (50μL, 8mol/L) ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Sau đó, 50μL dung dịch STA (0,3% H₂SO₄, 0,75% Triton X-100) được bổ sung vào trong 15 phút ở nhiệt độ phòng, và dung dịch chứa xanh alcian được bổ sung vào dung dịch này trong 15 phút. Sau đó các mẫu được ly tâm trong 15 phút ở tốc độ bằng 12000 vòng/phút và rửa bằng dung dịch DMSO (40% DMSO, 0,05mol/L MgCl₂). Cuối cùng, 500μL dung dịch Gu-prop (4mol/L guanidín-HCl, 33% 1-propanol, 0,25% Triton X-100) được bổ sung vào các hạt, và hỗn hợp được để hòa tan hoàn toàn. Ngoài ra, độ hấp thụ được đọc trên thiết bị X-Mark (Bio-Rad, Hercules, CA) ở bước sóng bằng 600nm. Nồng độ glycosaminoglycan được chuẩn hóa theo nồng độ protein, được đo bằng kit định lượng protein BCA (ThermoFisher, Waltham, MA). Nồng độ glycosaminoglycan được biểu diễn dưới dạng g GAG/mg protein, như được tính toán từ đường chuẩn biểu diễn nồng độ cơ chất của glycosaminoglycan, tức là

chondroitin sulfat-6. Dữ liệu của mỗi mẫu là trị số trung bình của 2 phép đo lặp lại.

Đo nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy và mô não

Nồng độ heparan sulfat trong các mẫu dịch não tủy và mô não của chuột nhắt được đo bằng LC-MS/MS. Các dung dịch gốc chứa mỗi chất chuẩn ở nồng độ bằng 5mg/mL được điều chế bằng cách hòa tan muối natri của heparan sulfat hoặc dermatan sulfat trong nước. Các dung dịch gốc chứa chất chuẩn được pha loãng bằng thể tích nước thích hợp để thu được 0,1 μ g/mL, 0,2 μ g/mL, 0,5 μ g/mL, 1,0 μ g/mL, 2,0 μ g/mL, 5,0 μ g/mL, 10 μ g/mL và 20 μ g/mL chất chuẩn và 0,2 μ g/mL, 2 μ g/mL và 15 μ g/mL các mẫu kiểm tra chất lượng. Ngoài ra, các dung dịch gốc chứa chất chuẩn ở nồng độ bằng 5mg/mL được đánh dấu bằng đoteri để thu được chất chuẩn nội là heparan sulfat-d6 và dermatan sulfat-d6. các dung dịch gốc chứa chất chuẩn (20 μ L) được bổ sung vào ống thủy tinh thử nghiệm và bay hơi trong điều kiện khí nitơ. Phần cặn được metanol hóa bằng cách trộn với 200 μ L metanol-d4-axetyl clorua (400:64, thể tích/thể tích) và gia nhiệt trong 90 phút ở nhiệt độ 65°C. Sau khi phân giải metanol, dung môi được làm bay hơi trong điều kiện khí nitơ. Phần cặn được hoàn nguyên trong nước (1mL), pha loãng bằng hỗn hợp nước-metanol-axit formic (950:50:1, thể tích/thể tích/thể tích: dung dịch đệm A) và dung dịch thu được được sử dụng làm dung dịch gốc chuẩn nội. Mẫu dịch não tủy của chuột nhắt được ly tâm ở tốc độ bằng 2100 $\times$ g và nhiệt độ 4°C trong 5 phút và dịch nổi được pha loãng bằng thể tích dung dịch đệm muối phosphat tương đương. Mô não của chuột được đồng nhất bằng 0,01mol/L natri hydroxit (50 hoặc 100 lần thể tích não). Hỗn hợp đồng nhất được ủ trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng và hỗn hợp đồng nhất (20 μ L) được bổ sung vào hỗn hợp nước-cloroform (180 μ L) (4:5, thể tích/thể tích). Sau khi trộn, mẫu được ly tâm ở tốc độ bằng 10000 $\times$ g và nhiệt độ 4°C trong 5 phút và dịch nổi được pha loãng bằng thể tích dung dịch đệm muối phosphat tương đương. Các mẫu này được điều chế từ dịch não tủy và não được sử dụng làm các mẫu thử để phân tích LC-MS/MS. Mẫu thử từ dịch não tủy (4 μ L) (20 μ L từ não), chất chuẩn hoặc mẫu kiểm tra chất lượng trong ống thử nghiệm được làm bay hơi trong điều kiện khí nitơ. Bổ sung HCl-MeOH 3M (50 μ L) và 2,2-dimethoxy propan (5 μ L) vào phần cặn và siêu âm trong 3 phút, gia nhiệt trong 90 phút ở nhiệt độ 65°C và bay hơi. Phần cặn được hoàn nguyên bằng dung dịch gốc chuẩn nội (200 μ L), siêu âm trong 3 phút và chuyển vào thiết bị lọc ly tâm, ly tâm ở tốc độ bằng 10000 $\times$ g và nhiệt độ 4°C trong 3 phút, và dịch lọc thu được được phân tích. mỗi mẫu

(5 μ L) được tiêm vào thiết bị khối phổ bộ ba tứ cực API5000 (AB/MDS Sciex) được trang bị hệ thống ACQUITY UPLC (Waters). Mẫu thử và chuẩn nội được phân tách trên cột ACQUITY UPLC HSS T3 (100 A 1,8 μ m, 2,1mm cách nhau 100mm) được gia nhiệt ở nhiệt độ 40°C. Pha động ban đầu chứa 100:0 (thể tích/thể tích) dung dịch đệm A:dung dịch đệm B [nước-metanol-axit formic (500:500:1, thể tích/thể tích/thể tích)] và rửa giải gradien ở tốc độ dòng bằng 0,4mL/phút. Quá trình rửa giải được thực hiện theo gradien tuyến tính, trong đó dung dịch đệm B được gia tăng từ 0% đến 45% trong từ 0,5 đến 4 phút, sau đó tăng đến 60% ở 4,01 phút, duy trì ở 60% trong 1 phút, sau đó giảm xuống 0% ở 5,01 phút, sau đó duy trì ở 0% trong 1 phút. Thiết bị khối phổ được thực hiện trong các chế độ thiết lập đặc hiệu cho ion hóa bằng tia điện trong phương pháp ion hóa và kiểu điện tích dương cho độ phân cực ion. Nitơ được sử dụng làm khí ngược dòng (40 psi) và không khí được sử dụng làm khí phun sương (50 psi) và khí gia nhiệt (40 psi). Các điều kiện kiểm soát ion bao gồm điện áp tia ion bằng 4,5kV và nhiệt độ mẫu dò Turbo bằng 600°C. Điện thế suy giảm, điện thế đầu vào và năng lượng va chạm tương ứng được thiết lập bằng 110V, 8V và 22eV. Dữ liệu được thu nhận bằng nhiều điều kiện kiểm soát phản ứng (MRM) bằng cách sử dụng tỷ số khối lượng và điện tích ion (m/z) 384 $\rightarrow$ 162 đối với heparan sulfat, m/z 426 $\rightarrow$ 236 đối với dermatan sulfat, m/z 390 $\rightarrow$ 162 đối với heparan sulfat-d6 and m/z 432 $\rightarrow$ 162 đối với dermatan sulfat-d6. Diện tích pic, đường chuẩn, và nồng độ đo được được tính toán bằng phần mềm Analyst phiên bản 1.5.1 (AB Scix).

Phân tích thống kê

Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm GraphPad Prism 6. Phép kiểm định MannWhitney U được sử dụng để so sánh mức độ khác biệt giữa mỗi nhóm được điều trị bằng dược chất và nhóm được điều trị bằng tá dược lỏng ở chuột nhắt KO. Mức độ khác biệt với trị số P nhỏ hơn 0,05 được xem là có ý nghĩa thống kê. Dữ liệu được biểu diễn dưới dạng trị số trung bình + sai số chuẩn. Để xác định mối tương quan giữa nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy và nồng độ heparan sulfat trong não và giữa nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy và nồng độ glycosaminoglycan trong não, các tác giả sáng chế đã đánh giá 73 mẫu dịch não tủy và mô não của chuột nhắt, và dữ liệu được phân tích bằng phương pháp hồi quy Spearman's rho và phương pháp hồi quy tuyến tính. Hệ số tương quan nội nhóm và khoảng tin cậy 95% được tính toán.

1-3: Kết quả

Trọng lượng cơ thể

Trọng lượng cơ thể của toàn bộ các nhóm thử nghiệm không thay đổi đáng kể trong thời gian nghiên cứu. Không có khác biệt đáng kể về trọng lượng của các chuột nhất trong các nhóm được điều trị bằng protein enzym thay thế qua đường tiêm vào dịch não tủy so với các nhóm đối chứng (các chuột nhất thể đại và các chuột nhất đột biến loại bỏ gen ids không được điều trị)). Các tác giả sáng chế cũng không phát hiện được dấu hiệu lâm sàng bất thường bất kỳ trong các thử nghiệm trên toàn bộ các nhóm được điều trị bằng protein enzym thay thế qua đường tiêm vào dịch não tủy.

Phương pháp tiêm liều đơn vào dịch não tủy của protein idursulfaza- β đã làm giảm glycosaminoglycan trong mô não của chuột nhất đột biến loại bỏ gen ids (chuột nhất KO)

Nồng độ glycosaminoglycan tổng số trong mô não của các chuột nhất đột biến loại bỏ gen ids trong nhóm được tiêm tá được lỏng cao hơn đáng kể nồng độ glycosaminoglycan tổng số trong mô não của các chuột nhất thể đại (Fig.1). Nồng độ glycosaminoglycan tổng số trong mô não của toàn bộ các nhóm được điều trị bằng protein idursulfaza- β được giảm đáng kể so với nồng độ glycosaminoglycan tổng số trong mô não của các chuột nhất đối chứng bị bệnh sau khi tiêm 7 ngày (Fig.1). Tuy nhiên, tình trạng tái tích tụ glycosaminoglycan quan sát được sau khi tiêm 14 ngày ở các nhóm được tiêm liều 3 μ g và 10 μ g. Sau khi tiêm 28 ngày, mức độ suy giảm đáng kể nồng độ glycosaminoglycan được duy trì ở nhóm được tiêm protein idursulfaza- β với liều 30 μ g mặc dù nồng độ glycosaminoglycan tổng số hơi cao hơn so với nồng độ glycosaminoglycan tổng số sau khi tiêm 7 ngày và sau khi tiêm 14 ngày (Fig.1).

Phương pháp tiêm liều đơn vào dịch não tủy của protein idursulfaza- β đã làm giảm HS trong dịch não tủy và mô não của chuột nhất đột biến loại bỏ gen ids (chuột nhất KO)

Nồng độ heparan sulfat được gia tăng đáng kể trong dịch não tủy và mô não của chuột nhất đột biến loại bỏ gen ids (chuột nhất KO) so với nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy và mô não của chuột nhất đối chứng thể đại (Fig.2). Sau khi tiêm vào dịch não tủy 7 ngày, nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy và mô não was significantly đã làm giảm ở toàn bộ ba nhóm được điều trị bằng protein idursulfaza- β . Mức độ giảm đáng kể của nồng độ heparan sulfat trong mô não được duy trì qua 28 ngày (Fig.2). Nồng độ

heparan sulfat trong dịch não tủy vẫn giảm sau khi tiêm vào dịch não tủy 14 ngày và sau khi tiêm vào dịch não tủy 28 ngày. Tuy nhiên, mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê chỉ quan sát được ở nhóm được điều trị bằng protein idursulfaza- β với liều 30 μ g sau khi tiêm vào dịch não tủy 28 ngày (Fig.2).

Nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy tương quan tỷ lệ thuận với nồng độ heparan sulfat trong mô não và nồng độ glycosaminoglycan trong mô não

Nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy tương quan tỷ lệ thuận với nồng độ heparan sulfat trong các mẫu mô não của chuột nhắt ($r = 0,785$, $P < 0,0001$) (Fig.3A). Hơn nữa, nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy cũng tương quan tỷ lệ thuận với nồng độ glycosaminoglycan trong mô não ($r = 0,703$, $P < 0,0001$) (Fig.3B).

Phương pháp tiêm liều đơn vào dịch não tủy của protein idursulfaza- β đã làm giảm nồng độ glycosaminoglycan trong các mô soma của chuột nhắt đột biến loại bỏ gen ids (chuột nhắt KO)

Các tác giả sáng chế đã đo nồng độ glycosaminoglycan tổng số theo phương pháp tiêm liều đơn vào dịch não tủy trong cả mô não và các mô soma khác (tim, phổi, gan, lá lách, và thận). Tình trạng tích tụ glycosaminoglycan được phát hiện trong toàn bộ các mô phân tích của chuột nhắt đột biến loại bỏ gen ids được tiêm tá được lỏng tương tự như chuột nhắt thể đại (Fig.4). Sau khi tiêm vào dịch não tủy 28 ngày, bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy protein idursulfaza- β (30 μ g) đã duy trì mức độ suy giảm đáng kể của glycosaminoglycan tổng số trong toàn bộ các mô phân tích (Fig.4). Nồng độ glycosaminoglycan trong các mô soma sau khi tiêm vào dịch não tủy 7 ngày và sau khi tiêm vào dịch não tủy 14 ngày được thể hiện trên Fig.6-Fig.10.

1-4: Bàn luận

Bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit t $\acute{y}$ p II là thể thường gặp của bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit ở Châu á, và khoảng 70% đối tượng bị bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit t $\acute{y}$ p II ở thể nặng [18, 19]. Do đó, phân tích bệnh lý về não là một trong các vấn đề quan trọng và thách thức nhất trong điều trị cho đối tượng bị bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit t $\acute{y}$ p II. Phương pháp tiêm vào nội tủy mạc hoặc dịch não tủy enzym tái tổ hợp đã đề xuất phương pháp phân phối dược chất này vào não. Trong nghiên cứu này, các tác giả sáng chế đã thực hiện phương pháp tiêm liều đơn

vào dịch não tủy ba liều khác nhau của protein idursulfaza- β trên các chuột nhắt đột biến loại bỏ gen ids 6 tuần tuổi để đánh giá mối tương quan đáp ứng liều và khoảng thời gian tác dụng được học.

Glycosaminoglycan tổng số trong mô não của toàn bộ các nhóm được điều trị bằng protein idursulfaza- β được giảm đáng kể, và mức độ suy giảm đáng kể nồng độ glycosaminoglycan được duy trì trong 28 ngày ở nhóm được tiêm protein idursulfaza- β với liều 30 μ g (Fig.1). Mức độ giảm đáng kể của nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy cũng quan sát được ở nhóm được tiêm protein idursulfaza- β với liều 30 μ g sau khi tiêm vào dịch não tủy 28 ngày (Fig.2). Do đó, các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng phương pháp tiêm protein idursulfaza- β với liều 30 μ g vào não thất bên bốn tuần một lần có thể làm giảm hữu hiệu và duy trì mức độ suy giảm nồng độ glycosaminoglycan tích tụ trong não ở chuột nhắt bị bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit týp II. Hơn nữa, các kết quả này có thể đóng vai trò là bằng chứng quan trọng cho việc quyết định liều và tần suất tiêm trong việc sử dụng trên lâm sàng của phương pháp tiêm vào dịch não tủy enzym tái tổ hợp mặc dù kích cỡ não và tốc độ chuyển hóa khác nhau giữa chuột nhắt và người cần được xem xét. Tuy nhiên, để tiếp tục đánh giá hiệu lực của enzym sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy để cải thiện bệnh lý hệ thần kinh trung ương trong bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit týp II, các tác giả sáng chế cần mở rộng nghiên cứu và lặp lại thử nghiệm tiêm và thực hiện đánh giá chức năng bao gồm thử nghiệm hành vi và phân tích mô học của não.

Trong số các týp khác nhau của bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit, rối loạn hệ thần kinh trung ương xuất hiện trong thể nặng của bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit týp I (bệnh Hurler), thể nặng của bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit týp II, bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit týp III, và bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit týp VII. Ngược lại, các đối tượng bị bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit týp IV, bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit týp VI, thể nhẹ của bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit týp I (hội chứng Scheie), và thể nhẹ của bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit týp II không bị suy giảm nhận thức [2]. Heparan sulfat là một trong số các glycosaminoglycan tích tụ chủ yếu trong bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit týp I, bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit týp II, bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit týp III, và bệnh rối loạn chuyển hóa

mucopolysacarit tít VII [10]. Một số báo cáo đã kiểm chứng thấy rằng heparan sulfat tích tụ trong mô não gây rối loạn thần kinh của các bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit [9-12]. Hơn nữa, đã kiểm chứng được rằng nồng độ heparan sulfat là chỉ thị sinh học đặc hiệu và có độ nhạy cao hơn trong mô não của chuột nhắt bị bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit tít II [13, 20]. Tuy nhiên, không thể đo trực tiếp nồng độ heparan sulfat trong mô não trên lâm sàng. Do đó, các tác giả sáng chế đã phân tích nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy và xác định mối tương quan giữa nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy và mô não. Các tác giả sáng chế đã kiểm chứng được rằng nồng độ heparan sulfat được gia tăng đáng kể trong cả dịch não tủy và mô não của chuột nhắt đột biến loại bỏ gen ids (chuột nhắt KO) so với chuột nhắt thể đại và đã giảm ở toàn bộ các nhóm được điều trị bằng protein idursulfaza- β (Fig.2). Hơn nữa, đây là nghiên cứu đầu tiên để kiểm chứng rằng nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy tương quan có ý nghĩa thống kê với nồng độ heparan sulfat trong mô não và nồng độ glycosaminoglycan trong mô não (Fig.3). Do đó, các tác giả sáng chế cho rằng nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy có thể là một trong các chỉ thị sinh học hữu hiệu để xác định nồng độ heparan sulfat trong mô não hoặc nồng độ glycosaminoglycan mô não. Tuy nhiên, để xác định nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy có thể chẩn đoán chính xác bệnh lý hệ thần kinh trung ương hay không, các tác giả sáng chế cần nghiên cứu bổ sung bao gồm phân tích bệnh học của mô não do bệnh lý hệ thần kinh trung ương của bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit tít II không chỉ do mức độ tích tụ glycosaminoglycan mà còn do mức độ tích tụ của cơ chất thứ hai, tình trạng viêm, và các thay đổi thoái hóa hệ thần kinh trung ương [12, 21, 22]. Khi mối tương quan được xác định, nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy có thể là thông số hữu ích để chẩn đoán bệnh lý hệ thần kinh trung ương trong các thử nghiệm lâm sàng tiếp theo trên các đối tượng bị bệnh rối loạn chuyển hóa mucopolysacarit tít II bị rối loạn hệ thần kinh trung ương.

Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã kiểm chứng được rằng bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy protein idursulfaza- β cũng làm giảm đáng kể tình trạng tích tụ glycosaminoglycan trong các mô soma (gan, lá lách, thận, tim, và phổi) cũng như mô não theo cơ chế phụ thuộc liều, mặc dù tác dụng là khác nhau giữa các mô (Fig.4 và Fig.6-Fig.10). Mức độ giảm tích tụ glycosaminoglycan quan sát được là phụ thuộc liều, và các tác giả sáng chế lưu ý rằng protein idursulfaza- β được tiêm vào dịch não tủy với liều bằng 30 μ g có thể làm giảm đáng kể và duy trì mức độ suy giảm glycosaminoglycan tích

tụ trong các mô soma trong 28 ngày, tương tự như trong mô não. Nhìn chung, các dữ liệu này cho thấy quá trình vận chuyển sinh lý được chất protein từ dịch não tủy đến các cơ quan trong cơ thể sau khi sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy, đã đề xuất phương pháp phân phối hữu hiệu được chất enzyme vào cả não lẫn các cơ quan trong cơ thể. Ngoài ra, dịch não tủy có thể đóng vai trò là khoang chứa trung gian để enzyme đã được tiêm vào được vận chuyển từ khoang chứa này vào hệ tuần hoàn một cách từ từ sau khi tiêm vào dịch não tủy. Mặc dù cơ chế phân phối enzyme từ dịch não tủy vào hệ tuần hoàn vẫn chưa được biết rõ, nhưng đã kiểm chứng được rằng dịch não tủy chứa iduronat-2-sulfatase có thể nối thông với hệ tuần hoàn tĩnh mạch thông qua khoang dưới màng nhện [6, 23-25]. Tóm lại, phương pháp tiêm vào dịch não tủy liều đơn của protein idursulfatase được dung nạp tốt, và làm giảm đáng kể nồng độ heparan sulfat và nồng độ glycosaminoglycan trong mô não và glycosaminoglycan trong các mô soma của chuột nhắt đột biến loại bỏ gen ids (chuột nhắt KO). Hơn nữa, tác dụng này được duy trì sau khi tiêm vào dịch não tủy 28 ngày, đặc biệt ở liều 30µg. Ngoài ra, nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy có thể là chỉ thị sinh học hữu ích để chẩn đoán bệnh lý về não, do nồng độ heparan sulfat trong dịch não tủy tương quan tỷ lệ thuận với nồng độ heparan sulfat trong mô não và nồng độ glycosaminoglycan trong mô não.

1-5: Danh mục trình tự

SEQ ID NO.1

Chiều dài: 525

Loại: PRT

```
SETQANSTTD ALNVLLIIVD DLRPSLGCGY DKLVRSNPID QLASHSLLFQ NAFAQQAVCA
PSRVSFLTGR RPDTRRLYDF 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 KLFPYLDPFD
SASQLMEPGR QSMDLVELVS LFPTLAGLAG LQVPPRCVPV SFHVELCREG KNLLKHFRFR
DLEEDPYLPG NPRELIAYSQ YPRPSDIPQW NSDKPSLKDI KIMGYSIRTI DYRYTVWVGF
NPDEFLANFS DIHAGELYFV DSDPLQDHNM YNDSQGGDLF QLLMP
```

SEQ ID NO.2

Chiều dài: 525

Loại: PRT

```
SETQANSTTD ALNVLLIIVD DLRPSLG CYG DKLVRSPNID QLASHSLLFQ NAFAQQAVG*A
PSRVSFLTGR RPDTRLYDF 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 KLFPLYDPFD
SASQLMEPGR QSMDLVELVS LFPTLAGLAG LQVPPRCVP SFHVELCREG KNLLKHFRFR
DLEEDPYLPG NPRELIAYSQ YPRPSDIPQW NSDKPSLKDI KIMGYSIRTI DYRYTVWVG
NPDEFLANFS DIHAGELYFV DSDPLQDHNM YNDSQGGDLF QLLMP
```

(axit amin ở vị trí số 59 “G*” trên các sợi của trình tự SEQ ID NO.2 là formyl-glycin).

1-6: Tài liệu tham khảo

[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 Inher 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.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm điều trị hội chứng hunter để sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy, chứa protein idursulfaza- β ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1mg/mL đến 60mg/mL, natri clorua ở nồng độ khoảng 150mM, polysorbat 20 ở nồng độ khoảng 0,05mg/mL, phosphat ở nồng độ lên đến 5mM và có độ pH khoảng 6, trong đó bước sử dụng qua đường tiêm vào dịch não tủy được thực hiện bằng hệ thống ống thông não thất bao gồm khoang chứa và ống thông được nối với khoang chứa này.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa protein idursulfaza- β ở nồng độ khoảng 15mg/mL, natri clorua ở nồng độ khoảng 150mM, polysorbat 20 ở nồng độ khoảng 0,05mg/mL, và có độ pH khoảng 6.

Fig.1

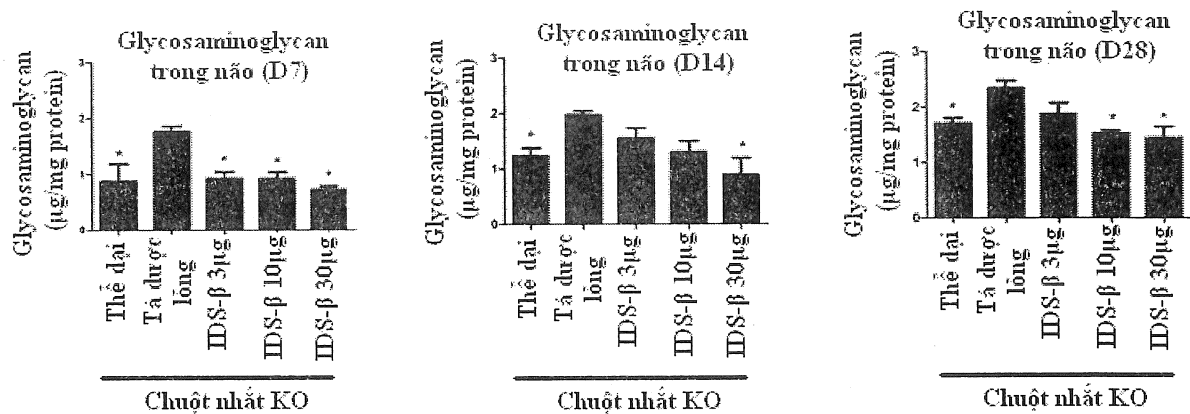


Fig.2

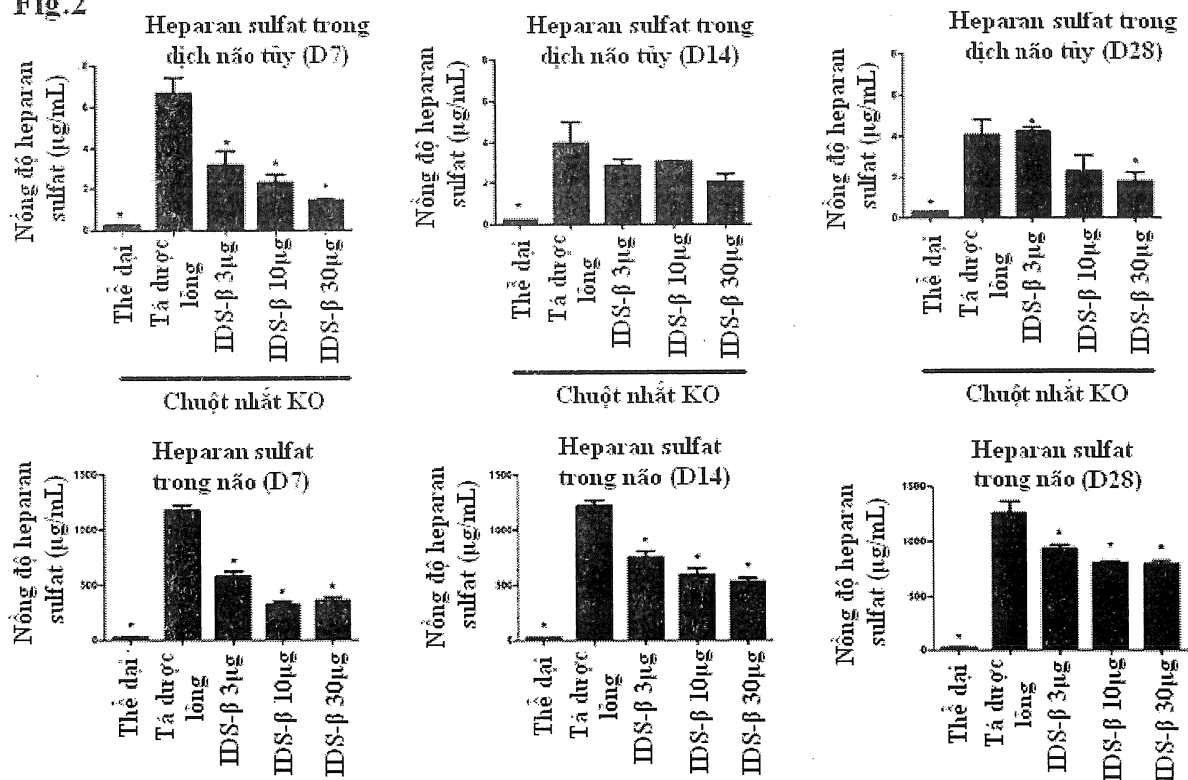


Fig.3

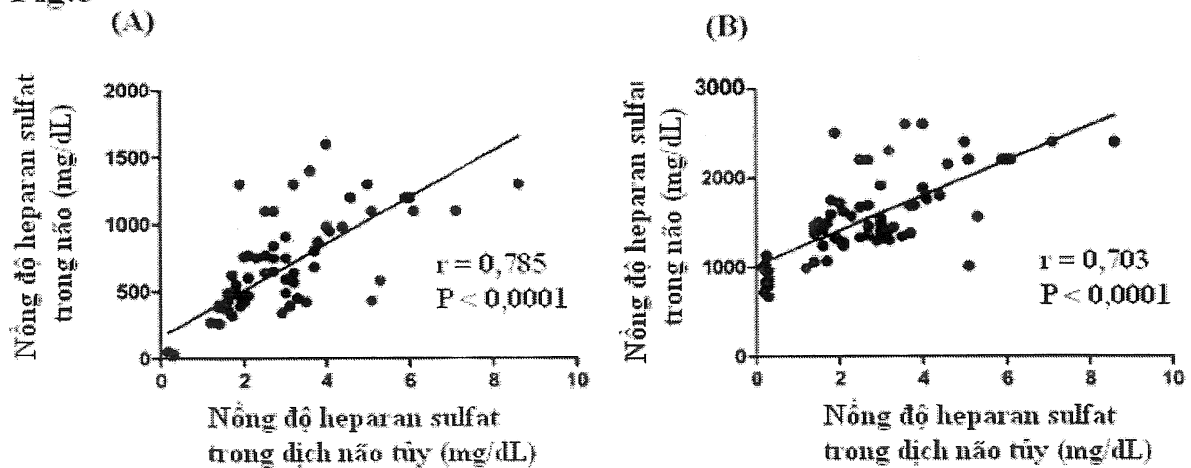


Fig. 4

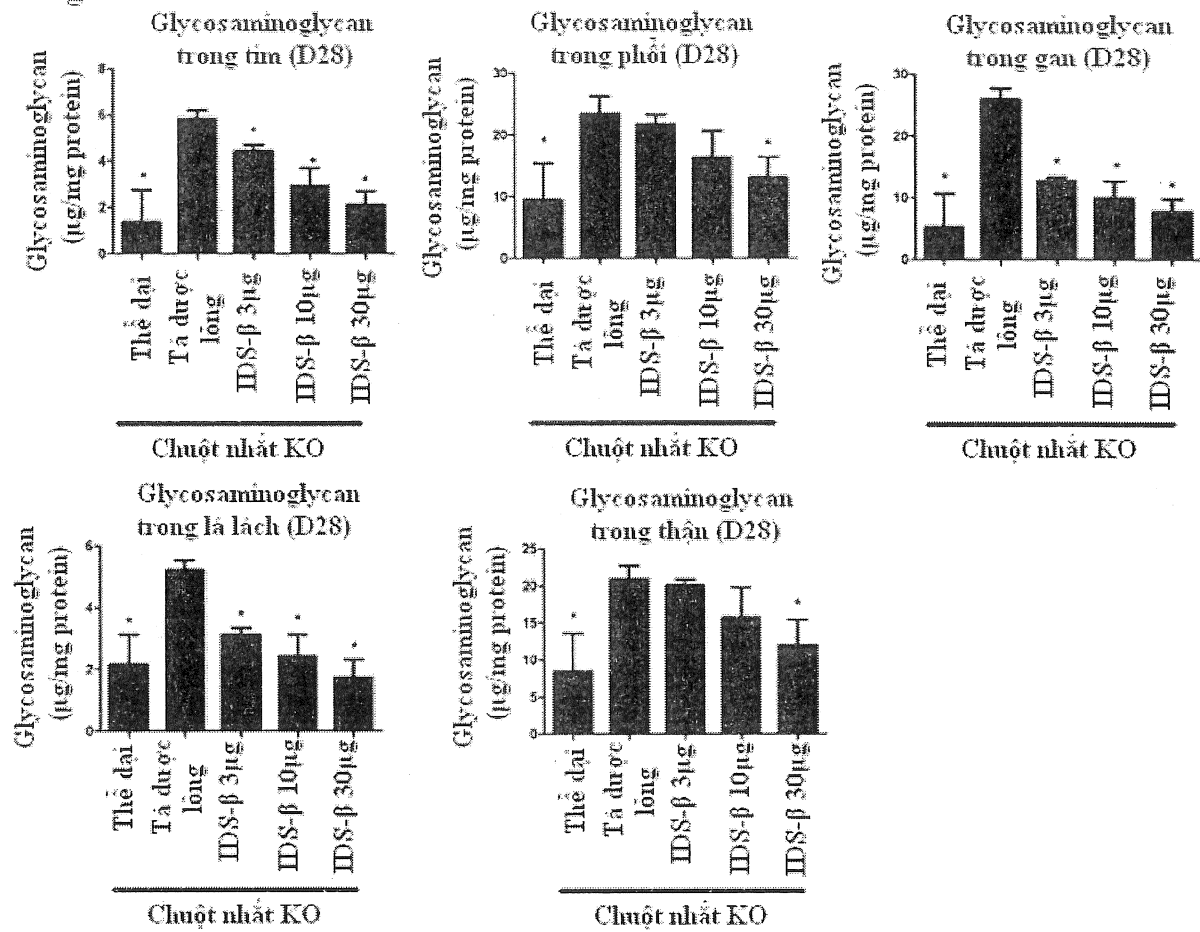


Fig. 5

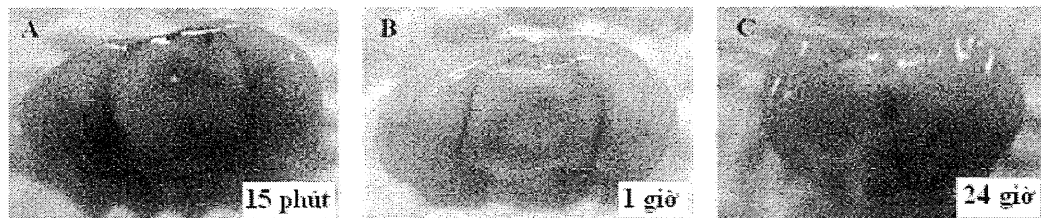


Fig. 6

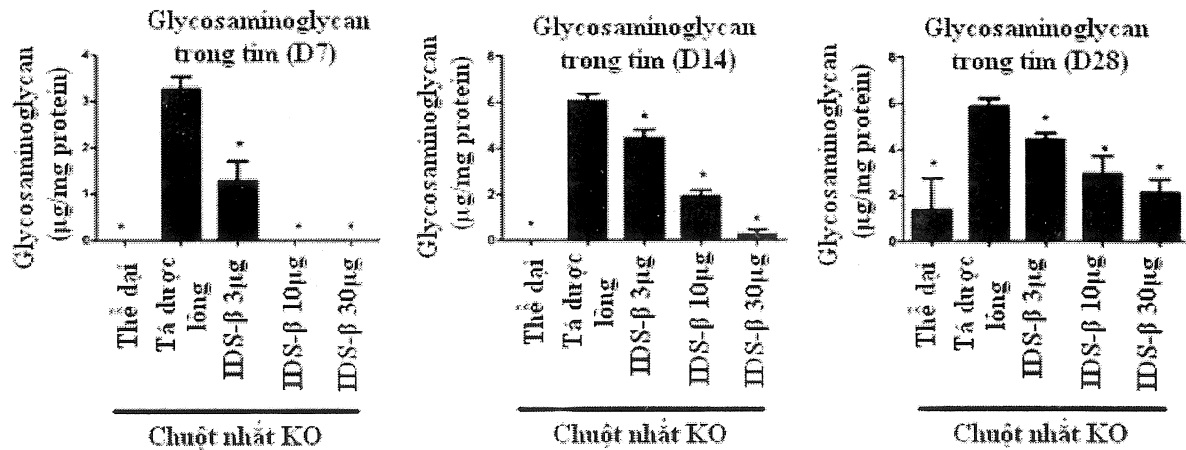


Fig. 7

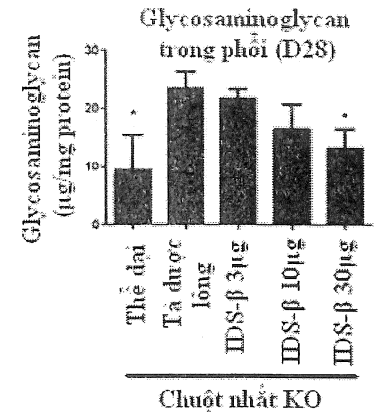
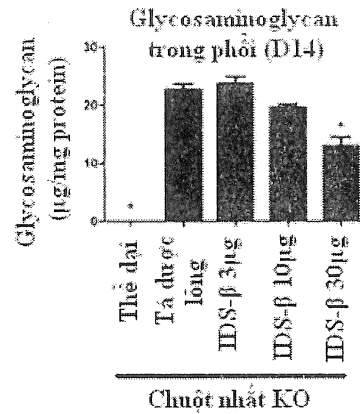
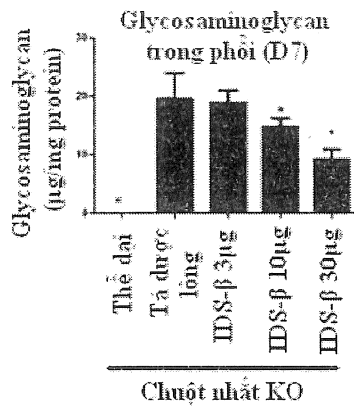


Fig. 8

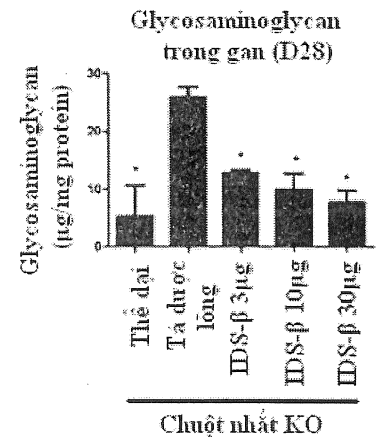
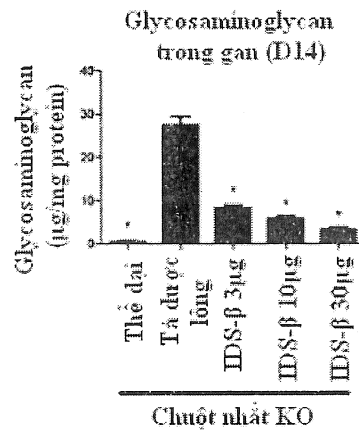
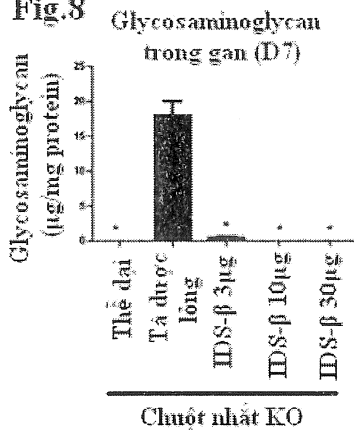


Fig. 9

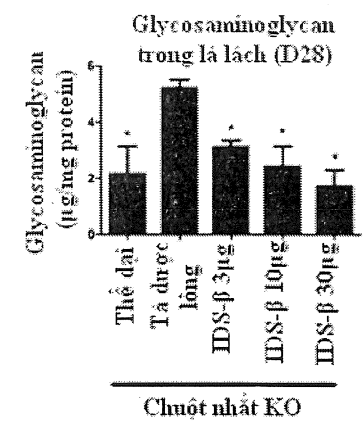
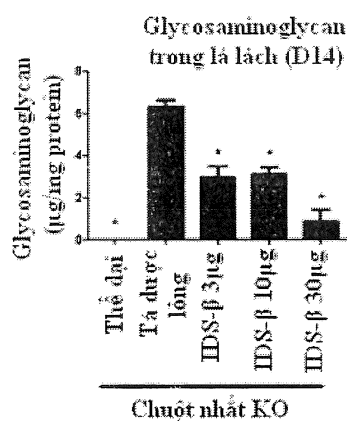
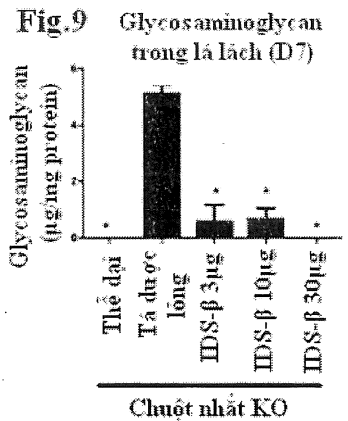
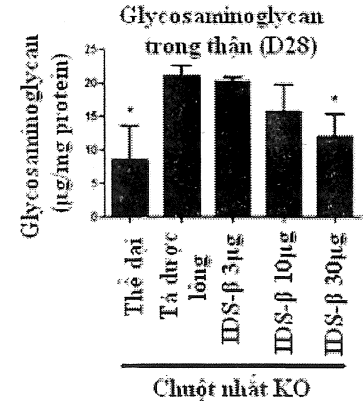
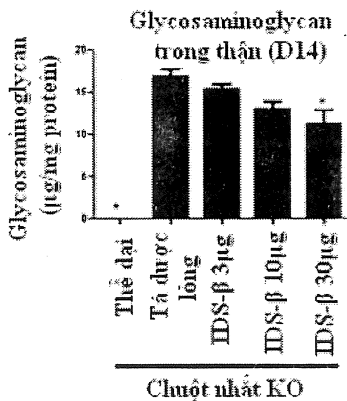
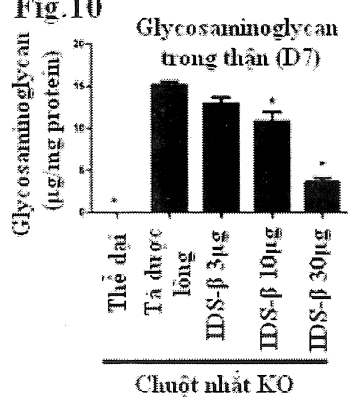


Fig. 10



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> GREEN CROSS CORPORATION
 MEDIGENEBIO CORPORATION
 <120> CHẾ PHẨM ĐIỀU TRỊ HỘI CHỨNG HUNTER
 <130> 16PCT12002P
 <150> US 62/272,843
 <151> 2015 đến 12-30
 <150> US 62/369,970
 <151> 2016-08-02
 <160> 2
 <170> KoPatentIn 3,0
 <210> 1
 <211> 525
 <212> PRT
 <213> Trình tự chưa biết
 <220>
 <223> Protein idursulfaza- β
 <400> 1
 Ser Glu Thr Gln Ala Asn Ser Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Ile Ile Val Asp Asp Leu Arg Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys
 20 25 30
 Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile Asp Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu
 35 40 45
 Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln Gln Ala Val Cys Ala Pro Ser Arg Val
 50 55 60
 Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe
 65 70 75 80
 Asn Ser Tyr Trp Arg Val His Ala Gly Asn Phe Ser Thr Ile Pro Gln
 85 90 95
 Tyr Phe Lys Glu Asn Gly Tyr Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe
 100 105 110
 His Pro Gly Ile Ser Ser Asn His Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp
 115 120 125
 Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro Ser Ser Glu Lys Tyr Glu Asn Thr Lys
 130 135 140
 Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly Glu Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro
 145 150 155 160
 Val Asp Val Leu Asp Val Pro Glu Gly Thr Leu Pro Asp Lys Gln Ser
 165 170 175
 Thr Glu Gln Ala Ile Gln Leu Leu Glu Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser
 180 185 190
 Pro Phe Phe Leu Ala Val Gly Tyr His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg
 195 200 205
 Tyr Pro Lys Glu Phe Gln Lys Leu Tyr Pro Leu Glu Asn Ile Thr Leu
 210 215 220
 Ala Pro Asp Pro Glu Val Pro Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn
 225 230 235 240
 Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln Arg Glu Asp Val Gln Ala Leu Asn Ile
 245 250 255
 Ser Val Pro Tyr Gly Pro Ile Pro Val Asp Phe Gln Arg Lys Ile Arg
 260 265 270
 Gln Ser Tyr Phe Ala Ser Val Ser Tyr Leu Asp Thr Gln Val Gly Arg
 275 280 285
 Leu Leu Ser Ala Leu Asp Asp Leu Gln Leu Ala Asn Ser Thr Ile Ile
 290 295 300
 Ala Phe Thr Ser Asp His Gly Trp Ala Leu Gly Glu His Gly Glu Trp
 305 310 315 320
 Ala Lys Tyr Ser Asn Phe Asp Val Ala Thr His Val Pro Leu Ile Phe
 325 330 335
 Tyr Val Pro Gly Arg Thr Ala Ser Leu Pro Glu Ala Gly Glu Lys Leu
 340 345 350
 Phe Pro Tyr Leu Asp Pro Phe Asp Ser Ala Ser Gln Leu Met Glu Pro
 355 360 365
 Gly Arg Gln Ser Met Asp Leu Val Glu Leu Val Ser Leu Phe Pro Thr
 370 375 380
 Leu Ala Gly Leu Ala Gly Leu Gln Val Pro Pro Arg Cys Pro Val Pro
 385 390 395 400
 Ser Phe His Val Glu Leu Cys Arg Glu Gly Lys Asn Leu Leu Lys His
 405 410 415
 Phe Arg Phe Arg Asp Leu Glu Glu Asp Pro Tyr Leu Pro Gly Asn Pro
 420 425 430
 Arg Glu Leu Ile Ala Tyr Ser Gln Tyr Pro Arg Pro Ser Asp Ile Pro
 435 440 445
 Gln Trp Asn Ser Asp Lys Pro Ser Leu Lys Asp Ile Lys Ile Met Gly
 450 455 460
 Tyr Ser Ile Arg Thr Ile Asp Tyr Arg Tyr Thr Val Trp Val Gly Phe

```

465          470          475          480
Asn Pro Asp Glu Phe Leu Ala Asn Phe Ser Asp Ile His Ala Gly Glu
          485          490          495
Leu Tyr Phe Val Asp Ser Asp Pro Leu Gln Asp His Asn Met Tyr Asn
          500          505          510
Asp Ser Gln Gly Gly Asp Leu Phe Gln Leu Leu Met Pro
          515          520          525
<210>      2
<211>      525
<212>      PRT
<213>      Trình tự chưa biết
<220>
<223>      Protein idursulfaza- $\beta$  (xystein ở vị trí số 59 được cải biến sau dịch mã thành
formylglycin)
<220>
<221>      Trình tự cải biến
<222>      (59)
<223>      Formyl hóa, (axit amin ở vị trí số 59 là formylglycin)
<400>      2
Ser Glu Thr Gln Ala Asn Ser Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu
 1          5          10          15
Ile Ile Val Asp Asp Leu Arg Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys
          20          25          30
Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile Asp Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu
          35          40          45
Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln Gln Ala Val Gly Ala Pro Ser Arg Val
          50          55          60
Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe
          65          70          75          80
Asn Ser Tyr Trp Arg Val His Ala Gly Asn Phe Ser Thr Ile Pro Gln
          85          90          95
Tyr Phe Lys Glu Asn Gly Tyr Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe
          100          105          110
His Pro Gly Ile Ser Ser Asn His Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp
          115          120          125
Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro Ser Ser Glu Lys Tyr Glu Asn Thr Lys
          130          135          140
Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly Glu Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro
          145          150          155          160
Val Asp Val Leu Asp Val Pro Glu Gly Thr Leu Pro Asp Lys Gln Ser
          165          170          175
Thr Glu Gln Ala Ile Gln Leu Leu Glu Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser
          180          185          190
Pro Phe Phe Leu Ala Val Gly Tyr His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg
          195          200          205
Tyr Pro Lys Glu Phe Gln Lys Leu Tyr Pro Leu Glu Asn Ile Thr Leu
          210          215          220
Ala Pro Asp Pro Glu Val Pro Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn
          225          230          235          240
Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln Arg Glu Asp Val Gln Ala Leu Asn Ile
          245          250          255
Ser Val Pro Tyr Gly Pro Ile Pro Val Asp Phe Gln Arg Lys Ile Arg
          260          265          270
Gln Ser Tyr Phe Ala Ser Val Ser Tyr Leu Asp Thr Gln Val Gly Arg
          275          280          285
Leu Leu Ser Ala Leu Asp Asp Leu Gln Leu Ala Asn Ser Thr Ile Ile
          290          295          300
Ala Phe Thr Ser Asp His Gly Trp Ala Leu Gly Glu His Gly Glu Trp
          305          310          315          320
Ala Lys Tyr Ser Asn Phe Asp Val Ala Thr His Val Pro Leu Ile Phe
          325          330          335
Tyr Val Pro Gly Arg Thr Ala Ser Leu Pro Glu Ala Gly Glu Lys Leu
          340          345          350
Phe Pro Tyr Leu Asp Pro Phe Asp Ser Ala Ser Gln Leu Met Glu Pro
          355          360          365
Gly Arg Gln Ser Met Asp Leu Val Glu Leu Val Ser Leu Phe Pro Thr
          370          375          380
Leu Ala Gly Leu Ala Gly Leu Gln Val Pro Pro Arg Cys Pro Val Pro
          385          390          395          400
Ser Phe His Val Glu Leu Cys Arg Glu Gly Lys Asn Leu Leu Lys His
          405          410          415
Phe Arg Phe Arg Asp Leu Glu Glu Asp Pro Tyr Leu Pro Gly Asn Pro
          420          425          430
Arg Glu Leu Ile Ala Tyr Ser Gln Tyr Pro Arg Pro Ser Asp Ile Pro
          435          440          445
Gln Trp Asn Ser Asp Lys Pro Ser Leu Lys Asp Ile Lys Ile Met Gly
          450          455          460
Tyr Ser Ile Arg Thr Ile Asp Tyr Arg Tyr Thr Val Trp Val Gly Phe
465          470          475          480

```

Asn Pro Asp Glu Phe Leu Ala Asn Phe Ser Asp Ile His Ala Gly Glu
485 490 495
Leu Tyr Phe Val Asp Ser Asp Pro Leu Gln Asp His Asn Met Tyr Asn
500 505 510
Asp Ser Gln Gly Gly Asp Leu Phe Gln Leu Leu Met Pro
515 520 525